

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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

Dr. Balajthy András

Témavezető: Dr. Hajdu Péter Béla



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2016

TARTALOMJEGYZÉK

Az értekezésben gyakran használt rövidítések jegyzéke	4
I. Bevezetés.....	5
II. Elméleti összefoglaló	7
II.1. Az ioncsatornákról általánosságban	7
II.2. A feszültségfüggő (Kv) ioncsatornák osztályozása	7
II.3. A Kv1.3 ioncsatorna szerkezete.....	7
II.4. A Kv1.3 ioncsatorna működését jellemző biofizikai paraméterek	11
II.5. Az intracelluláris N- és C-terminális szerepe az ioncsatornák működésében	11
II.6. A Kv1.3 ioncsatorna szöveti és sejtszintű expressziója	12
II.7. A Kv1.3 ioncsatorna élettani feladatai	12
II.8. Ioncsatornák szerepe a T-sejtek működésében. Áttörés az autoimmun betegségek kezelésében?	13
II.8.1. Az immunrendszer működésének rövid áttekintése.....	13
II.8.2. A T-sejt aktiváció során kialakuló kalciumjelet a Kv1.3 és IKCa1 káliumcsatornák szabályozzák	13
II.8.3. A Kv1.3 csatorna gátlószerek az autoimmun betegségek új, terápiás alternatívái.....	15
II.9. A sejtmembrán szerkezetének és funkcióinak alapjai.....	16
II.10. A koleszterin a lipid-raftok meghatározó alkotóeleme	17
II.11. A koleszterin szerepe az ioncsatornák működésének szabályozásában	17
II.12. A koleszterinhomeosztázisban fellépő zavar betegségek kialakulásához vezet	19
II.13. A koleszterin bioszintézis zavarának prototípusa: Smith-Lemli-Opitz szindróma.....	20
II.14. Hiperkoleszterinémia és annak immunológiai vonatkozásai	21
III. Célkitűzések, vizsgált kérdések.....	24
IV. Anyagok és Módszerek.....	26
IV.1. Oldatok, vegyszerek	26
IV.2. Mintagyűjtés, csoportba rendezés	26
IV.2.1. Hiperkoleszterinémia	26
IV.2.2. Smith-Lemli-Opitz szindróma	26
IV.3. Sejtek, sejtvonalak.....	27
IV.3.1. Mononukleáris sejtek szeparálása	27
IV.3.2. CHO (Chinese Hamster Ovary) sejtvonala	27
IV.3.3. Stablan transzfektált CHO sejtvonalak	27
IV.4. Koleszterin és 7-dehidrokoleszterin töltés	27

IV.5.	A sejtek koleszterin és 7DHC összetételének meghatározása	28
IV.5.1.	Amplex Red Cholesterol Assay Kit	28
IV.5.2.	Gázkromatográfia-tömegspektrometria (GC-MS).....	28
IV.6.	Limfocitaaktiváció, proliferáció vizsgálata	29
IV.6.1.	A CD154 expressziójának vizsgálata	29
IV.6.2.	Karboxifluorescein-szukcinimidil-észter (CFSE) hígulási esszé.....	29
IV.7.	Elektrofiziológia	30
IV.7.1.	A patch-clamp technika alapjai	30
IV.7.2.	A patch-clamp mérések során használt műszerek, módszerek és oldatok.....	31
IV.7.3.	A patch-clamp mérések során alkalmazott protokollok	32
IV.8.	Flanking primer mutagenesis	34
IV.8.1.	A flanking-primer mutagenesis módszer ismertetése	34
IV.8.2.	PCR reakció.....	35
IV.8.3.	Gélelektroforézis	36
IV.8.4.	DNS extrakció és tisztítás.....	36
IV.8.5.	Hasítás restrikciós enzimmel	37
IV.8.6.	Ligálás, transzformálás, plazmidpreparálás.....	37
IV.8.7.	DNS szekvenálás	37
IV.9.	Tranziens transzfekció	37
IV.10.	Statisztika.....	38
V.	Eredmények.....	39
V.1.	A limfociták koleszterintartalmának vizsgálata hiperkoleszterinémiában.....	39
V.2.	A Kv1.3 expressziójának vizsgálata hiperkoleszterinémia esetén.....	40
V.3.	A Kv1.3 ioncsatorna kapuzását jellemző biofizikai paraméterek meghatározása hiperkoleszterinémia esetén	40
V.4.	Az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggése	42
V.5.	Hiperkoleszterinémiás betegekből izolált limfociták osztódásának vizsgálata CFSE hígulási esszével.....	43
V.6.	A SLOS sejtek szterolösszetételének vizsgálata GC-MS módszerrel.....	44
V.7.	A Kv1.3 ioncsatorna expresszió vizsgálata SLOS esetén.....	46
V.8.	A Kv1.3 kapuzását jellemző biofizikai paraméterek meghatározása SLOS esetén.....	47
V.9.	Az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggése	48
V.10.	SLOS-ből izolált limfociták aktivációjának és proliferációjának vizsgálata	49
V.11.	SLOS modellrendszer kialakítása M β CD/7DHC komplex segítségével	51
V.12.	Kv1.3 ioncsatornák vizsgálata SLOS modellrendszerben	52

V.13.	A CHOL és 7DHC töltés Kv1.3 ioncsatornákra gyakorolt hatásának összehasonlítása	53
V.14.	A Kv1.3 C-terminálisának eltávolítása megszünteti a csatorna szterollokkal szembeni érzékenységét.....	57
VI.	Eredmények megbeszélése	64
VII.	Összefoglalás	75
VIII.	Summary.....	76
IX.	Hivatkozások.....	77
X.	Publikációs lista.....	90
XI.	Tárgyszavak	92
XII.	Köszönetnyilvánítás.....	93
XIII.	Függelék.....	94

AZ ÉRTEKEZÉSBEN GYAKRAN HASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

CHOL	koleszterin
CFSE	karboxifluoreszcein-szukcinimidil-észter
CFSE-DA	karboxifluoreszcein-diacetát-szukcinimidil-észter
CRAC csatorna	Ca ²⁺ -felszabadulás aktiválta Ca ²⁺ csatorna
CRAC szekvencia	koleszterin felismerő aminosav motívum
CHO sejtvonal	Chinese Hamster Ovary sejtvonal
ER	endoplazmatikus retikulum
GC-MS	gázkromatográfia-tömegspektrometria
HC	hiperkoleszterinémia
IFN- γ	interferon- γ
IP3	inozitol 1,4,5-trifoszfát
IKCa1	Ca ²⁺ -aktivált K ⁺ csatorna
Kv	feszültség-kapuzott K ⁺ csatorna
7DHC	7-dehidrokoleszterin
7DHCR	7-dehidrokoleszterin-reduktáz
LDL	kis sűrűségű lipoprotein (Low Density Lipoprotein)
M β CD	metil- β ciklodextrin
M β CD/CHOL	metil- β ciklodextrin-koleszterin zárványkomplex
M β CD/7DHC	metil- β ciklodextrin-7DHC zárványkomplex
nAchR	nikotinerger acetilkolin receptor
oxLDL	az LDL oxidált formája (Oxidized Low-Density Lipoprotein)
SLOS	Smith-Lemli-Opitz szindróma
T _C	citotoxikus T-sejt
T _{EM}	effektor memória T-sejt
T _{CM}	centrális memória T-sejt
TCR/CD3	T-sejt receptor/CD3 komplex
T _H	T helper sejt
VRAC	volumen regulált anion csatornák

I. BEVEZETÉS

A koleszterin az emberi szervezet egyik fontos építőeleme, mely a sejtmembrán felépítésében betöltött szerepén túl részt vesz számos biológiailag jelentős molekula (pl. D vitamin, epesavak) szintézisében, mint prekursor. A koleszterin koncentrációja más létfontosságú molekulákhoz hasonlóan szigorúan szabályozott. Az optimális koncentráció eltolódása az alacsonyabb vagy magasabb tartományok irányába betegségek kialakulásához vezethet. A megemelkedett plazmakoleszterinszint (hiperkoleszterinémia) fontos rizikófaktora a fejlett országok halálozási statisztikáit vezető szív- és érrendszeri betegségeknek. Kevésbé ismertek azonban a koleszterinszintézis károsodásával járó genetikai betegségek, ahol a szérum és a sejtek koleszterintartalmának karakterisztikus csökkenése mellett a szintézis előalakjainak koncentrációja megemelkedhet. Ezek közül az egyik legismertebb a Smith-Lemli-Opitz szindróma, melynél elsőként bizonyították a koleszterinszintézis zavarát, mint kóroki tényezőt.

A sejtmembránban elhelyezkedő koleszterin direkt és indirekt interakción keresztül szabályozhatja a transzmembrán fehérjék funkcióját. *In vitro* kísérletekben a membránkoleszterin módosítása megváltoztatja az ioncsatornák kapuzását jellemző idő- és feszültség-függő állandókat. Munkacsoportunk korábbi eredményei szerint az egészséges donorokból izolált limfociták sejtmembránja koleszterintartalmának *in vitro* növelése lassította a Kv1.3 ioncsatorna kapuzását, a félaktivációs feszültséget pedig pozitívabb membránpotenciál értékek felé tolta el. Kísérleteinkben más munkacsoportokhoz hasonlóan *in vitro* módszerekkel (pl. ciklodextrin-koleszterin zárványkomplex, liposzóma) módosítottuk a sejtmembrán koleszterintartalmát, majd a kezelt sejtek ioncsatornáit vizsgálva vontunk le következtetéseket. Felmerül a kérdés, hogy a Kv1.3 kapuzás *in vitro* kísérletekben leírt koleszterin-függő változásainak van-e biológiai relevanciája? Előfordulhat-e olyan betegség/kórállapot, ahol a megváltozott membrán-koleszterinszint az ioncsatornák által szabályozott élettani folyamatokat befolyásolja? A fenti kérdések megválaszolásához hiperkoleszterinémiás (HC), illetve Smith-Lemli-Opitz (SLOS) szindrómában szenvedő betegekből izoláltunk limfocitákat, és megvizsgáltuk az *in vivo* megváltozott membránkoleszterin összetétel hatását a Kv1.3 ioncsatornák és a T-sejtek működésére.

Eredményeink két különböző szinten hordozhatnak értékes információt. Egyrészt alátámaszthatjuk azt a modellrendszerek alapján levont általános következtetést, hogy a sejtmembrán szteroltartalmának megváltozása *in vivo* is módosíthatja a Kv ioncsatornák, és így az azokat expresszáló sejtek működését. Ugyanakkor új információval szolgálhatunk a limfociták Kv1.3 ioncsatornájáról két eddig még nem vizsgált patológiás állapotban. Habár a

hiperkoleszterinémia molekuláris szintű történéseivel számtalan tanulmány foglalkozik, a Kv1.3 csatornákra gyakorolt hatásáról publikációnk megjelenéséig semmilyen információ nem állt rendelkezésre. A Smith-Lemli-Opitz szindróma esetében pedig összesen egy olyan tanulmányról tudunk, ahol vizsgálták egy ioncsatorna működését, azonban a publikációban bemutatott kalcium és feszültség aktivált BK csatorna felépítése, funkciója jelentősen különbözik az általunk vizsgált feszültségfüggő Kv1.3 ioncsatornától (166).

A Kv1.3 ioncsatorna működése szempontjából esszenciális transzmembrán szegmensek szerkezetéről, funkciójáról széles körű ismereteink vannak (151, 157). Az ionok transzportjában közvetlenül nem érdekelt C-terminális funkciójáról viszont limitált információ áll rendelkezésünkre. Úgy tűnik, hogy a C-terminálisának jelentős feladata lehet a csatorna működésének finomhangolásában, egyéb csatornákkal (beleértve a járulékos alegységeket is) és fehérjékkel történő interakció közvetítésében (72, 192). P2X és BK csatornák esetében a C-terminálison található koleszterinkötő helyek felelősek a csatorna szterollokkal szembeni érzékenységeért (168, 181). Munkánk során vizsgáltuk a Kv1.3 C-terminálisa, valamint az azon található feltételezett koleszterinkötő helyek szerepét az *in vitro* membrán koleszterin összetétel módosítás közvetítésében. A feltételezett koleszterinkötő helyek vizsgálata segíthet jobban megismerni a Kv1.3 C-terminálisának funkcióját a csatorna működésében.

II. ELMÉLETI ÖSSZEFOGLALÓ

II.1. Az ioncsatornákról általánosságban

Az ioncsatornák pórusformáló transzmembrán fehérjék, feladatuk az ionok elektrokémiai gradiensnek megfelelő, passzív transzportja a sejtmembránon keresztül. Három alapvető tulajdonságuk a kapuzás, a szelektív permeabilitás és a vezetőképesség. A kapuzás alatt a csatornák megfelelő „inger” hatására végbemenő konformációváltozását értjük, melyek a csatorna eltérő funkcionális (vezető, nem vezető) és szerkezeti (nyitott, zárt, inaktivált) állapotai közti átmenetnek felelnek meg. Az „inger” szerint megkülönböztethetünk feszültség, extracelluláris ligand, intracelluláris szignál, valamint mechanikai feszülés kapuzott csatornákat. Az ioncsatornák szelektíven működnek, azaz egy adott ioncsatorna csak meghatározott ionok transzportjára képes. A szelektivitás alapján beszélhetünk alacsony szelektivitású, magas szelektivitású és nem szelektív csatornákról. (78)

II.2. A feszültségfüggő (Kv) ioncsatornák osztályozása

A magas szelektivitású káliumcsatornák az emberi szervezet ioncsatornáinak legnagyobb és legváltozatosabb csoportját képezik, ezen belül is kiemelkednek a feszültségfüggő káliumcsatornák (Kv), mely csoport 40 tagját Gutman és mtsai. 12 családba osztották (68). A nevezéktanban a Kv rész utal a feszültségfüggő káliumcsatornára, a különböző családokat és az ezekbe tartozó csatornákat pedig arab számokkal különböztetjük meg Kv1.1-től kezdve Kv12.3-mal bezárólag (68). A családba sorolás alapját a csatornák aminosavszekvenciájának hasonlósága adja. A hivatalos nevezéktan mellett a szakirodalom párhuzamosan használja a hagyományosnak tekinthető neveket is, mely az ecetmuslica (*Drosophila Melanogaster*) káliumcsatornáival történő homológián alapul (193). Így pl. a Kv1.X csatornákat sok helyen *Shaker*, a K2.X csatornák *Shab*, a K3.X csatornákat *Shaw* típusú káliumcsatornaként említik (35, 61, 68).

II.3. A Kv1.3 ioncsatorna szerkezete

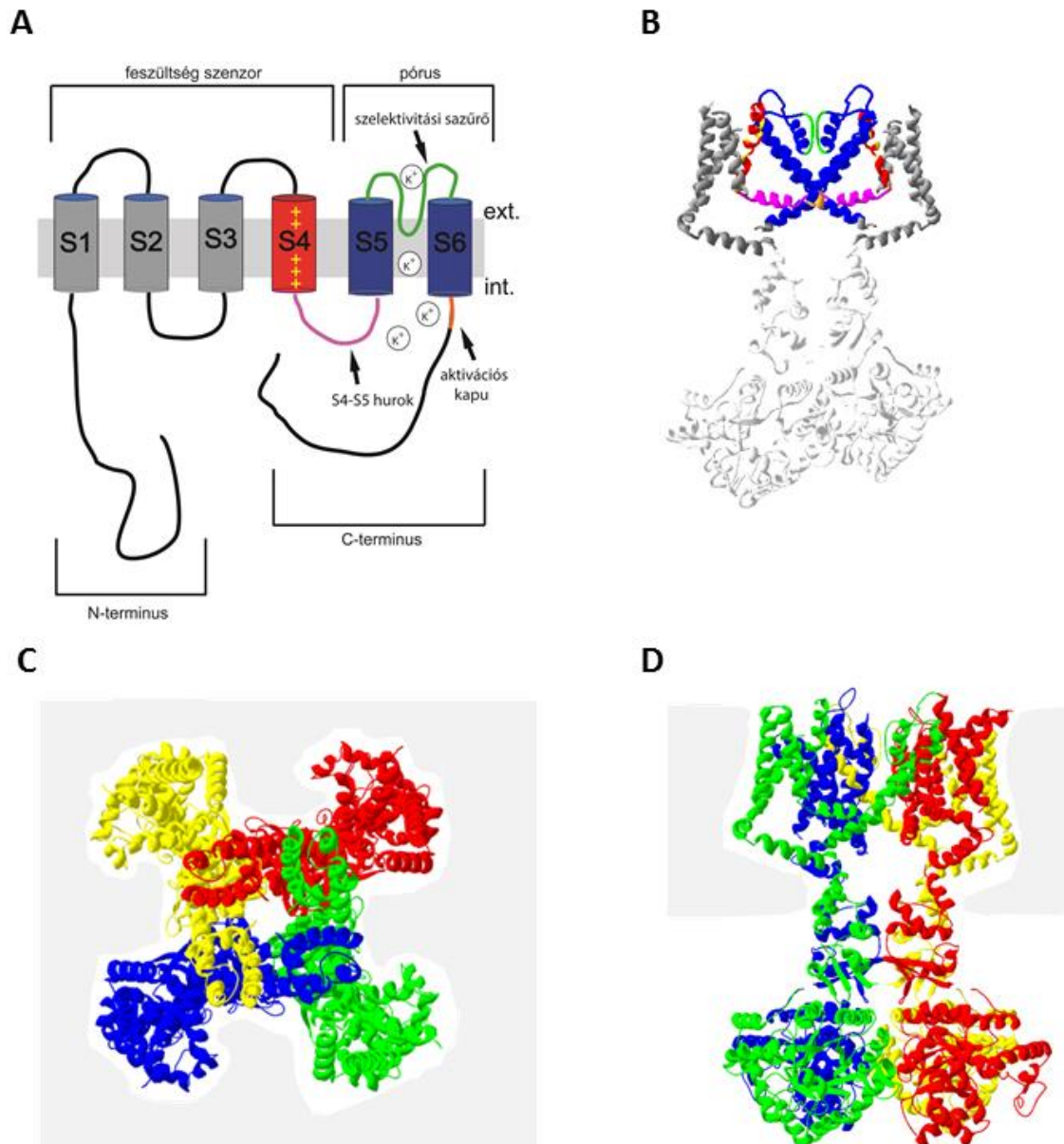
A kálium ioncsatornák felépítését, működését már több mint 30 éve kutatják intenzíven, igazán nagy áttörést azonban Roderick MacKinnon 1998-ban közölt tanulmánya hozott. Munkatársaival röntgen krisztallográfiás módszerrel határozta meg egy bakteriális eredetű káliumcsatorna (*Streptomyces lividans*ból izolált KcsA) térbeli szerkezetét, ezzel alátámasztva vagy megcáfolva a káliumcsatornák szerkezetéről korábbi indirekt módszerekkel levont következtetéseket (47). MacKinnon munkacsoportja később elsőként publikálta egy feszültségfüggő ioncsatorna (KvAP) és egy feszültségfüggő emlős ioncsatorna (Kv1.2) atomi

szintű felépítését is (1/ B,C,D ábrák) (87, 114, 116). A Kv1.3 ioncsatorna kristályszerkezete nem ismert, azonban a *Shaker* családba tartozó csatornák alapvető szerkezetének hasonlósága miatt számos következtetést vonhatunk le az úttörő munkájáért 2003-ban Nobel díjjal elismert kutató eredményeiből az általunk vizsgált csatorna esetében is.

A Kv1.3 csatorna négy azonos szerkezetű, nem kovalensen kapcsolódó, egyenként 523 aminosavból álló alegységből felépülő homomer fehérje. Minden alegység hat, kb. 10-20 aminosav hosszúságú α -helikális transzmembrán szegmentumból áll (S1-S6), amit 20-40 aminosav hosszúságú intra- és extracelluláris hurkok kapcsolnak össze amint az a 1. ábra A részén is látható (151). Ezen túl minden alegység rendelkezik egy intracellulárisan elhelyezkedő 94 aminosav hosszúságú C és egy szintén intracelluláris, 184 aminosav hosszúságú N-terminálissal is. Míg a transzmembrán részek nagyfokú rendezettséget mutatnak, addig pl. a rendkívül flexibilis C-terminálishoz nem lehet egyértelmű konformációt rendelni (151, 157). A Kv1.3 alegységei más Kv alegységekkel kombinálódva (pl. Kv1.1, Kv1.2, Kv1.4, Kv1.5) funkcionális heterotetramer csatornákat is képezhetnek, melyek különböző arányban tartalmazhatják az eltérő Kv alegységeket (39, 93, 211). A heterotetramer csatornák szerkezete, biofizikai és farmakológiai tulajdonságai az alegység összetételétől függ (211).

A transzmembrán szegmentumok és hurkok a Kv1.3 csatorna meghatározott tulajdonságaiért felelnek úgy, hogy azok megvalósításában a négy alegység identikus részei közösen vesznek részt. A csatorna funkcionálisan két részre osztható: az ionok transzportját biztosító pórusra és a membránpotenciál érzékeny feszültség-szenzorra. A pórus kialakításában az S5 és S6 szegmentumok mellett az őket összekötő ún. pórusformáló hurkok (P-loop) vesznek részt, a feszültség-szenzorokat pedig az S1-S4 szegmentumok hozzák létre. A két funkcionális egységet alegységenként az S4-S5 szegmentumok közötti rövid aminosav szakasz (S4-S5 linker) köti össze (38, 186). A Kv1.3-al nagy fokú hasonlóságot mutató Kv1.2 röntgenkristallográfiás szerkezete alapján ismert, hogy a négy alegység S6 szegmentumai egy „indián sátrat” formáznak a membránban, melynek csúcsa a membrán belső oldala felé néz (1/B ábra, az S6 szegmentumok kék színnel jelölve) (115). A membrán külső oldala felől nézve durván négyzet alapú „sátor” négy sarkán helyezkednek el a S1-S4 szegmentumok által felépített feszültség-szenzorok (1/C ábra). A pórus extracelluláris oldalán helyezkedik el a szelektivitási szűrő, valamint az inaktivációs kapu, míg az aktivációs kapu a „sátor rudak” kereszteződésénél, a membrán belső oldalán található (1/A és B ábrák) (71, 186, 199). A konzervált szelektivitási szűrő érzékenységét jól jellemzi, hogy a szintén monovalens Na^+ -hoz képest a K^+ ionokra három nagyságrenddel szelektívebb a csatorna (31). A „sátor” belsejét határoló aminosavak egy hidrofíl üreget hoznak létre a szelektivitási szűrő és az aktivációs kapu között (1/ C és D ábrák) (111). Nyugalmi

membránpotenciál esetén ($\approx -70 - -90$ mV) a csatornák nagy valószínűséggel zárt állapotban találhatóak, az aktivációs kapu lezárja a pórus intracelluláris oldala felé néző nyílását. Depolarizáció hatására a pozitív töltésű aminosavakkal (arginin/lizin) rendelkező feszültségszenzorok az extracelluláris oldal felé mozdulnak el, mely mozgás máig sem teljesen tisztázott mechanizmussal úgy módosítja az aktivációs kapu szerkezetét, hogy a hidrofíl üreg megnyíljon és a csatorna nyitott konformációba kerüljön (87, 115, 158). Így a szelektivitási szűrő által átengedett kálium ionok számára megnyílik az út a membránon keresztül. Hosszan tartó depolarizáció alatt a csatorna inaktiválódik, azaz újabb konformáció változást követően a zárt konformációtól eltérő, de funkcionálisan szintén nem vezető állapotba kerül. A Kv1.3 csatornákra az ún. C- (más nomenklatúrában P/C) vagy lassú típusú inaktiváció jellemző, szemben a feszültségfüggő csatornák esetében általánosságban megfigyelhető N- vagy gyors-típusú inaktivációval (154). A C-típusú inaktivációért a pórus extracelluláris oldalán, a szelektivitási filterhez közeli aminosav láncok konformációváltozása a felelős úgy, hogy a négy alegység releváns részei együttműködve alakítják ki az inaktív állapotot (154). Repolarizáció hatására az inaktív állapotból másodpercek múlva újra zárt állapotba kerülhet a csatorna.



1. ábra A feszültségfüggő (Kv) ioncsatornák általános szerkezete. (A) A Kv1.3 ioncsatorna egy alegységének sematikus képe. A különböző feladatot ellátó régiók színekkel ellátva (részleteket lásd a II.3 fejezetben). (B) A Kv1.3 ioncsatornával nagy hasonlóságot mutató Kv1.2 ioncsatorna két alegysége, az A panellel megegyező színekkel alkalmazva. (C) A Kv1.2 ioncsatorna négy alegységének komplexe a sejtmembránban az extracelluláris oldal irányából felülnézetből, valamint (D) oldalnézetből. Az egyes alegységek különböző színnel jelölve. Az atomi struktúrát leíró szerkezeti képeket (B,C,D) a MacKinnon munkacsoport által közölt kristálystruktúra alapján, a SWISS-Model program felhasználásával készítettem (13, 114).

II.4. A Kv1.3 ioncsatorna működését jellemző biofizikai paraméterek

A különböző szerkezeti állapotok közötti átmeneteket jellemző időállandók és feszültségértékek megadásával könnyen karakterizálhatók az egyes Kv csatornák, melyek segítségével szolgálhatnak ismeretlen ionáramok eredetének beazonosításához (ezen paraméterekre a szaknyelv összefoglalóan mint a *csatorna kapuzását jellemző biofizikai paraméterekre* vagy egyszerűen mint *biofizikai paraméterekre* szokott hivatkozni). A limfocita Kv1.3 csatornák biofizikai paramétereinek jellemzését patch-clamp technika segítségével mind teljes sejt (31, 149) mind pedig cell attached patch (210) konfigurációban elvégezték. Ezen tanulmányokból ismert, hogy a csatorna aktivációs küszöbe -60 mV körül található, a nyitási valószínűség pedig meredeken emelkedik a depolarizáció növekedésével, egészen 0 – 10mV-ig, mely feszültségérték fölött telítésbe fut. Az aktivációs időállandó -120 mV tartófeszültségről +50mV-ra történő depolarizáció esetén ~0.6 ms. Az egyes csatornák vezetőképessége 10-12 pS nagyságú. Az egyensúlyi aktivációt jellemző paraméterek közül a félaktivációs feszültség -30 és -40 mV közé esik, meredeksége pedig, ami arányos a konduktancia feszültségfüggésével, ~10mV-nak adódik. Az egyensúlyi inaktiváció feszültségfüggésének középpontja -60 és -70 mV, meredeksége ~-10 mV (150). Az inaktivációs időállandó +50mV-ra történő depolarizáció esetén 200ms körül van, az inaktivációból történő visszatéréshez 30-50 másodpercre van szükség (151).

II.5. Az intracelluláris N- és C-terminális szerepe az ioncsatornák működésében

A Shaker típusú kálium ioncsatornák C- és N-terminálisai többnyire nem vesznek részt a csatorna szigorú értelemben vett működésében (a kálium ionok membránon keresztüli transzportjában) azonban széles körű szabályzó szerepük elengedhetetlen a csatorna fiziológiás működéséhez. A nagyfokú rendezettséget mutató transzmembrán részekkel szemben az ioncsatornák intracelluláris részei (a T1 domén kivételével, lásd alább) nehezen kristályosíthatóak, mely megnehezíti ezen régiók szerkezetének atomi szintű meghatározását (209). Míg a transzmembrán részek alapszerkezete hasonló elven épül fel, addig a Kv csatornák C- és N-terminálisa között jelentős eltérések lehetnek még egy adott családon belül is. Ez alól kivételt képez az N-terminálison található T1 (tetramerizációs) domén, melynek szerkezete, funkciója többnyire megegyezik a Kv1 családon belül (96, 109). A T1 domén fontos szerepet játszik a különálló Kv alegységek funkcionális homo- vagy heterotetramerré történő összeszerelésében, az egyes alegységek egymás általi felismerésében (46). Jelenléte egyes csatornák esetében esszenciális a funkcionális ioncsatorna expressziójához (pl. Kv1.1), míg más (pl. Kv1.3, Kv1.4) ioncsatornánál a teljes T1 domén eltávolítása esetén is mérhető ionáramok (82, 99, 202). Az intracelluláris részek a vezikuláris transzport mellett a citoskeletonhoz történő

kihorgonyzásban, a csatorna membránbeli eloszlásának szabályozásában, jelátviteli folyamatokban, a csatornák nem-konduktív funkcióinak közvetítésében is fontos szerepet játszhatnak (20, 133). A Kv1.3 ioncsatorna esetében a C- illetve N-terminális jelentős részének eltávolítása nem módosítja szignifikánsan a csatorna biofizikai paramétereit azonban a csatorna immunológiai szinapszisba történő feldúsulása, vezikuláris transzportja, laterális diffúziója megváltozik (73, 133, 192, 202).

II.6. A Kv1.3 ioncsatorna szöveti és sejtszintű expressziója

A Kv1.3 ioncsatornát először a humán T-sejtek sejtmembránjának transzmembrán fehérjéjeként írták le 1984-ben (43, 135). A Kv1.3 azonban nem korlátozódik a T-sejtek sejtmembránjára, szöveti és sejtszintű eloszlása is jóval komplexebb ennél. A sejtmembránon kívül megjelenhet a mitokondrium belső membránjában (190), illetve a sejtmembránban is (85). Átfogó proteomikai kutatásoknak köszönhetően ismert, hogy fehérje szinten expresszálódik az immunrendszer egyéb sejtjein is (pl. B-sejt, dendritikus sejt), továbbá a központi idegrendszer különböző részeiben (pl. homlokleány, gerincvelő), hasnyálmirigyben, prosztatában, illetve a gyomor-bél rendszerben is egészséges szövetek esetén (92). A csatorna expressziója megváltozhat daganatos elváltozások esetén (pl. krónikus limfocitás leukémia (97), prosztaták (3), vastagbélrák (26)). Bizonyos elváltozásokban a csatorna expressziója korrelál a tumor grádusával felvetve a lehetőségét annak, hogy a Kv1.3-csatornát tumormarkerként alkalmazzák (55). Más Kv csatornához hasonlóan megjelenik embrionális szövetekben is (25).

II.7. A Kv1.3 ioncsatorna élettani feladatai

A Kv csatornák elsődleges és legrégebben ismert funkciója a sejtmembrán repolarizációja (hiperpolarizációja) az akciós potenciál során, valamint az idegsejtek ingerlékenységének szabályozása (78, 80). A membránpotenciál szabályozásán keresztül a Kv csatornák további specifikus és komplex folyamatok irányításában is részt vehetnek, mint neurotranszmitterek és endokrin hormonok felszabadulása, vagy a T-sejtek aktivációjának szabályozása (63). A Kv1.3 ioncsatorna elsőként leírt és a legszélesebb körben kutatott funkciója a T-sejt aktiváció során kialakuló kalciumjel szabályozása a membrán negatív feszültség értéken tartása révén (43, 57, 157). A csatorna által ellátott feladatok azonban nem korlátozódnak erre az egy sejt típusra (A Kv1.3 immunrendszerben betöltött szerepét a következő alfejezetben részletezem). A központi idegrendszerben kifejeződő Kv1.3 jelentős szerepet tölthet be a szervezet energia és testsúly szabályozásában (203, 218). Kv1.3^{-/-} egerek esetében magas zsírtartalmú diéta esetén elmaradt a súlynövekedés, alacsony glükóz és inzulin szinteket regisztráltak kontroll állatokhoz viszonyítva (204). A magas Kv1.3

expresszióval jellemezhető szaglógumó (*bulbus olfactorius*) eltávolítása csökkentette a Kv1.3 géndeláció testsúlykontrolláló hatását (52). Ezek alapján a metabolikus szenzorként funkcionáló szaglógumó Kv1.3 ioncsatornáinak szelektív gátlása potenciális terápiás lehetőségként szolgálhat elhízás és inzulin rezisztencia esetén (206). A központi idegrendszerben a Kv1.3 szabályozza a mikroglia sejtek peroxinitrit általi ölfunkcióját (58), illetve a striatum sejtjeinek dopaminfelszabadulását (128). A Kv1.3 az immunsejtek mellett a vérlemezkék kalciumhomeosztázisának szabályozásában (136), valamint a vese kálium transzportjában is részt vesz (51).

II.8. Ioncsatornák szerepe a T-sejtek működésében. Áttörés az autoimmun betegségek kezelésében?

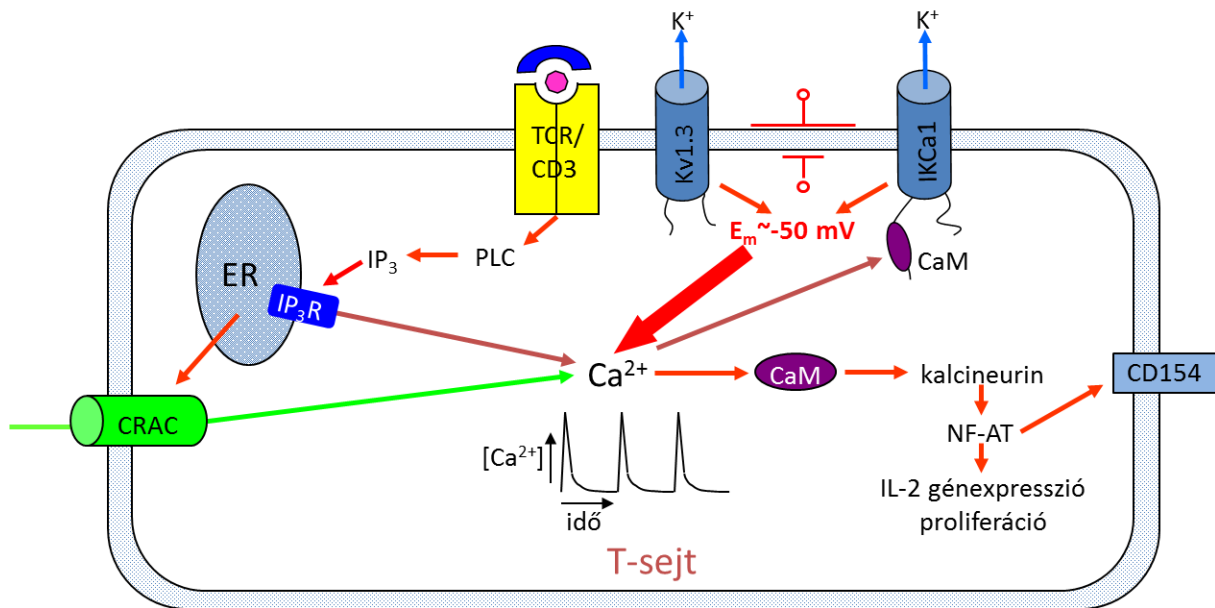
II.8.1. Az immunrendszer működésének rövid áttekintése

Az immunrendszer legfőbb feladata a szervezetet károsító kórokozók elleni védelem. A védekezés során lejátszódó reakciók és az ezekért felelős sejtek alapján két részre oszthatjuk: a törzsfajlás során korábban kialakult veleszületett (természetes, natív) és a specifikusabb szerzett (adaptív) immunválaszra. Az adaptív immunrendszer kialakításában a B és T limfocitákon kívül az általuk termelt antitestek és citokinek vesznek részt. Ezen sejtek legfontosabb tulajdonsága, hogy olyan receptorokat hordoznak, melyek az antigéneket specifikusan ismerik fel: a B-sejtek közvetlenül, a T-sejtek pedig antigén prezentáló sejtek (APC-Antigen Presenting Cell) MHC (Major Histocompatibility Complex) fehérjéin keresztül. A vérben keringő naív T-sejtek a specifikus antigénnel való találkozást követően limfoblastokká differenciálódnak, majd gyors klonális proliferációt követően effektor T-sejtek alakulnak ki. Az effektor T-sejteket funkciójuk alapján két nagy csoportba soroljuk: CD4 sejtfelszíni markereket hordozó segítő (T-helper, T_H) és a CD8 markerrel jellemezhető sejtpusztító (T-citotoxikus, T_C) sejteket különböztetünk meg. Az antigén eliminációt követően az effektor T-sejtek jelentős része apoptózison megy keresztül, kis részük azonban effektor memória (T_{EM}) vagy centrális memória (T_{CM}) sejté differenciálódik. Feladatuk az adaptív immunrendszer gyors aktiválása ismételt antigén stimulust követően. (84)

II.8.2. A T-sejt aktiváció során kialakuló kalciumjelet a Kv1.3 és IKCa1 káliumcsatornák szabályozzák

A T-limfocita aktivációjának első lépése az APC sejtek MHC molekulái által megkötött specifikus antigének és a T-sejt-receptor/CD3 komplex (TCR/CD3) kölcsönhatása (2. ábra). A TCR/CD3 komplex aktivációjának következtében megemelkedik az

intracelluláris IP_3 koncentráció, mely az endoplazmatikus retikulumban (ER) elhelyezkedő specifikus receptorához kötődik, onnan kalciumot szabadít fel, létrehozva a T-sejt aktiváció esszenciális lépésének számító bifázisos Ca^{2+} -jel első szakaszát (57, 157). A kalciumjel második, jelentősebb intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció emelkedést biztosító fázisáért a Ca^{2+} felszabadulás aktiválta Ca^{2+} csatornákon (CRAC-Calcium Release Activated Calcium Channel) keresztül, az extracelluláris térből, az elektrokémiai gradiensnek megfelelően beáramló kalcium felelős (106, 225). A megnövekedett intracelluláris kalciumszint két alapvető következménnyel jár: 1.) a kalciumfüggő szignalizációs útvonalak aktivációja, valamint 2.) a sejtmembrán depolarizációja. A kalmodulin mint intracelluláris kalciumkötő fehérje kiemelkedő szereppel bír a kalciumjel közvetítésében. A kalciumkötés hatására konformációváltáson keresztül menő kalmodulin aktiválja a calcineurin nevű intracelluláris foszfatázt, mely defoszforilálja az NFAT-t (Nuclear Factor of Activated T-cells). A foszforilált NFAT inaktív citoszolikus fehérje, azonban a defoszforiláció hatására képes a sejtmagba vándorolni, majd transzkripció faktoraként a DNS-hez kötődve elősegíti az interleukin-2 (IL-2), CD154 (más nevezéktanban CD40 ligand) és egyéb, a T-sejt aktivációhoz nélkülözhetetlen fehérjék átírását (157, 207). Az IL-2 a T-sejtek legfontosabb autokrin szabályzó faktora. Az IL-2 gén aktivációja és expresszió-fokozódása a T-sejt aktiváció kritikus pontja, ugyanis innentől kezdve a folyamat antigéntől függetlenné válik, azaz a TCR/CD3 komplex aktivációját követően két-három óra múlva a T-sejtek proliferációja abban az esetben is lezajlik, ha a kiváltó stimulus megszűnik. A CRAC csatornákon keresztüli Ca^{2+} beáramlás következtében a sejtmembrán depolarizációja csökkenti azt az elektrokémiai gradienst, mely a kalcium-beáramláshoz szükséges, így ez a folyamat, mint egy negatív visszacsatolás, megakadályozná a limfocita aktivációhoz/proliferációhoz elengedhetetlen tartós kalciumszint-emelkedést. Ezt az inkongruenciát oldják fel a sejtmembránban elhelyezkedő kálium ioncsatornák azzal, hogy a rajtuk keresztül az extracelluláris térbe irányuló kálium transzport negatív irányba tolja el a membránpotenciált. Azaz a depolarizáló kalcium influxot repolarizáló kálium áram ellensúlyozza. A kalcium-beáramlás fenntartásában és így a T-sejtek membránpotenciáljának és aktivációjának szabályozásában elsődlegesen két kálium ioncsatorna vesz részt: a feszültségfüggő Kv1.3 (135) és a intracelluláris kalcium aktivált IKCa1/KCa3.1 csatorna (2.ábra) (67). A kálium- és a CRAC csatornák ezen összjátékának köszönhetően válik a Ca^{2+} -jel membránpotenciál-függővé, és ez teszi lehetővé a T-sejt-aktiváció gátlását a kálium ioncsatornák működésére ható farmakonok által (30, 32, 146, 151, 157, 160)



2. ábra A Kv1.3 és IKCa1 ioncsatornák részt vesznek a T-sejt aktiváció során kialakuló jelátviteli folyamatok szabályozásában (TCR/CD3: T-sejt receptor/CD3 komplex, PLC: foszfolipáz C, IP₃: inozitol-1,4,5-triszfoszfát, ER: endoplazmatikus retikulum, E_m: membrán potenciál, CaM: kalmodulin; Panyi és mtsai. nyomán (156))

II.8.3. A Kv1.3 csatorna gátlószerek az autoimmun betegségek új, terápiás alternatívái

A kálium ioncsatornák gátlása depolarizálja a T-sejteket és altípusonként eltérő mértékben gátolja a kalciumjel kialakulását (23, 146). Ennek következtében elmarad a sejtek aktivációja és proliferációja, zavart szenved a migráció és csökken az interleukin-2 (IL-2), interferon- γ (IFN- γ) termelése (23, 102, 153, 160). Az elmúlt években számos kis molekulású peptid és nem peptid típusú gátlószer került kifejlesztésre, melyek szelektíven és specifikusan blokkolják a Kv1.3 vagy IKCa1 csatornákat *in vitro* körülmények között (15, 36, 147, 208, 217). A nyugalomban lévő perifériás T-sejtek nagyjából 200-400 Kv1.3 ioncsatornát tartalmaznak, 8-10 IKCa1 csatorna mellett (32, 216). Mitogénnel történő aktiváció hatására a Kv1.3, illetve IKCa1 ioncsatornák expressziója T-sejt szubpopulációfüggő változást mutat (34, 216). A naív és a centrális memóriasejtek (T_{CM}) esetében az aktiváció során az IKCa1 csatornák száma rendkívüli mértékben megnövekszik (500 csatorna/sejt), míg a Kv1.3 csatornák száma mérsékeltebb 1,5-szeres emelkedést mutat. Ezzel szemben az effektor memória (T_{EM}) sejtek esetében a Kv1.3 csatornák átlagos sejtenkénti száma 1500-ra növekszik, miközben az IKCa1 csatornák száma kismértékben változik (~50 csatorna per sejt). Mivel a T-sejtek egyes típusaiban eltérő, hogy a két K⁺ ioncsatorna közül melyik játszik domináns szerepet a membránpotenciál szabályozásában, így megfelelően szelektív gátlószerek segítségével az egyes alpopulációk aktivációját/funkcióját egymástól

függetlenül gátolhatjuk (216). Az aktivált T_{EM} sejtek ioncsatornáinak specifikus expressziós mintázata lehetővé teszi a Kv1.3 ioncsatorna-blokkolók terápiás felhasználását azon autoimmun kórképekben, ahol ez a szubpopuláció felelős a betegség kialakulásáért, mint pl. sclerosis multiplex (SM), reumatoid arthritis (RA), 1-es típusú diabétesz (23, 173, 198, 216). A limfociták ioncsatornáinak gátlása eltérő módon befolyásolja az egészséges felnőttek sejtjeihez képest az újszülöttekből, idősekből vagy terhesekből izolált T-sejtek kalciumjelének kinetikáját (95, 196, 197). Ezen eredmények alapján fontos figyelembe venni a speciális életkori és élettani helyzetekből adódó immunológiai eltéréseket az ioncsatornák gátlásán alapuló terápiák megtervezésénél. Az *in vitro* és állatkísérletek sikeres eredményeinek köszönhetően ma már Fázis 1B típusú humán kísérleteket folytatnak a specifikus Kv1.3 inhibitor ShK-186 toxinnal psoriasisban szenvedő betegek bevonásával (A Fázis 1 vizsgálatokat a Kineta nevű amerikai székhelyű cég indította el, az ShK-186 a Dalatazide nevet kapta (http://www.kineta.bio.com/autoimmune_diseases.html). A kezdeti eredmények kedvező hatásról számolnak be, így a csatorna felfedezésétől számított nagyjából 30 éven belül realitássá vált a Kv1.3 gátlásán alapuló szelektív immunszuppresszió.

II.9. A sejtmembrán szerkezetének és funkcióinak alapjai

A sejtmembrán kettős feladattal bír: egyrészt statikus, fizikai barrierként védi és elhatárolja a citoszólt és az intracelluláris kompartmenteket a külső környezettől (egyéb sejtektől), ugyanakkor lehetőséget nyújt az extra és intracelluláris terek (sejtek) közötti kommunikációra azáltal, hogy megfelelő platformot teremt a transzporterek, jelátviteli molekulák számára. Régóta ismert tény, hogy a sejtmembrán vázát nem kovalens kötésekkel összetartott foszfolipidek alkotják, melyek kettősrétegében számos fehérje, szénhidrát, koleszterin és egyéb lipid molekulák helyezkednek el (64, 113). A sejtmembránt leíró elméletekben áttörést hozott Singer és Nicolson folyadék-mozaik membránmodellje, mely szerint a sejtmembrán alapját képező folyékony lipid kettősrétegben szabadon "úsznak" a fehérjék (180). A tudomány jelenlegi állása ebből kiindulva a sejtmembránt egy dinamikus struktúraként értelmezi, ahol azonban a lipid kettősrétegen belül elkülönülnek bizonyos kisméretű, heterogén, koleszterinben és szfingolipidben gazdag domének, melyeket lipid-raftoknak vagy lipid-tutajoknak nevezünk (177). A membrán raftok feltételezett szerepe a sejtmembránon keresztül lejátszódó transzport és szignalizációs folyamatokban részt vevő molekulák kompartmentalizációja, valamint a sejtmembrán laterális szervezethez való biztosítása (178). A raftok jelenlétét kimutatták a neuronok közötti szinapszisokban, valamint az immunológiai szinapszisban is (6, 138, 185).

II.10. A koleszterin a lipid-raftok meghatározó alkotóeleme

A sejtmembrán lipid komponensei közül kiemelt jelentőséggel bír a koleszterin. Az amfipatikus tulajdonságú molekula planáris gyűrűkből álló merev szteránváza és a hozzákapcsolódó rövid szénlánc alkotják a hidrofób részt, mely kiegészül egy poláros 3 β -hidroxil csoporttal (53, 169). A membránokat kialakító lipid kettősrétegekben a koleszterin planáris része és a foszfolipidek zsírsavoldalláncai között erős kölcsönhatás alakul ki, ami miatt a szénhidrogénlánc csak egy másik oldali lipid apoláris csoportjaihoz tud kapcsolódni. A poláros feji rész pedig a foszfolipidek hidrofil részeivel alakít ki hidrogénkötéseket. Az erős kölcsönhatások következtében a fázisátalakulási hőmérséklet felett a koleszterin növeli a membránok mechanikai szilárdságát, ugyanakkor csökkenti a fluiditást. A koleszterin a szfingolipidek szénhidrátláncai között hasonló mechanizmussal, mintegy dinamikus „ragasztóként” működve biztosítja a raftok integritását (179). A koleszterin kivonása a raftokból azok disszociációjához és a raft fehérjék funkcióvesztéséhez vezet (88, 165). A lipid tutajok és a membránfehérjék közötti kapcsolat háromféle lehet: 1.) a fehérjék egy részének működése rafthoz kötött, 2.) egy másik részük működése teljesen független a raftoktól 3.) a harmadik csoport tagjai pedig megtalálhatóak mind a raftokban, mind pedig azokon kívül. Az általunk vizsgált Kv1.3 ioncsatorna a lipid-raft asszociált fehérjék családjába sorolható (27), jelenlétét az immunológiai szinapszisban munkacsoportunk publikálta először (155).

II.11. A koleszterin szerepe az ioncsatornák működésének szabályozásában

Az utóbbi években egyre több tanulmány hangsúlyozta a koleszterin szerepét az ioncsatorna-működés szabályozásában (103, 105, 123, 131). Az ioncsatornák szerkezeti és funkcióbeli sokszínűsége miatt azonban a koleszterin eltérő módon befolyásolja a különböző csatornák működését. Míg a koleszterinszint növelésének legáltalánosabb hatása a csatornák aktivitásának (nyitási valószínűség, vezetőképesség) koncentrációfüggő csökkenése, melyet számos K⁺ csatorna mellett feszültségfüggő Na⁺ és Ca²⁺ csatornára is kimutattak (28, 200, 215), addig a tranziens receptor potenciál (TRP) csatornák esetében a koleszterin kivonása a membránból gátolta a csatornák működését (112). Más csatornák esetében a koleszterin a kinetikai és egyensúlyi aktivációs paraméterekre van hatással (16, 74, 130).

A koleszterin ioncsatornákra kifejtett hatását két eltérő elmélettel magyarázzák. Az első a koleszterin és az ioncsatornák direkt és specifikus lipid-fehérje kölcsönhatását valószínűsíti. A koleszterin részt vesz annak a lipidekből álló „övek” vagy „buroknak” a kialakításában, ami közvetlenül az ioncsatorna körül helyezkedik el. (19, 127) Az övet alkotó lipid molekulák kapcsolatba kerülnek az ioncsatornák transzmembrán hélixjeinek sejtmembránnal határos

régióival, melyek a lehetséges lipid kötő szekvenciákat tartalmazzák. Az elmélet szerint a lipid öv koleszterin koncentrációjának változása a koleszterin és a csatorna ligand-receptor kölcsönhatásainak befolyásolásán keresztül módosíthatja az ioncsatornák konformációját és vezethet a biofizikai paraméterek megváltozásához. A lipid öv betüremkedhet a transzmembrán hélixek találkozásánál kialakuló árkokba, növelve a lipid-fehérje kölcsönhatásokhoz szükséges határfelületek felszínét (199). A betüremkedéseknek köszönhetően a lipid környezet a transzmembrán domének által határolt pórusra is hatással lehet. Az elmúlt évek kutatásai olyan új kötőhelyekre mutattak rá, melyek nem a klasszikus értelemben vett lipid-fehérje határfelületen helyezkedtek el, hanem az intracelluláris C- vagy N-terminálison (168, 181).

Több olyan általános koleszterinkötő szekvenciát is azonosítottak, mely alapján feltételezni lehet egy transzmembrán fehérje koleszterinnel szembeni érzékenységét (50, 53, 105). Ezek közül a legelsőként leírt és legjelentősebbnek tartott a CRAC és CARC szekvencia. A CRAC (cholesterol recognition amino acid consensus motif, koleszterin felismerő aminosav motívum) szekvencia egy nagyon egyszerű algoritmust követ: az első tagja egy elágazó láncú apoláris aminosav (leucin vagy valin), melyet egy-öt darab tetszőleges aminosav követ, majd egy aromás tirozinon keresztül ismét egy-öt tetszőleges aminosav vezet a szekvenciát záró pozitív töltésű aminosavhoz (lizin, arginin) (108). A CRAC-hoz nagyon hasonló CARC szekvencia az előbbi inverze, ahol a sort egy pozitív aminosav indítja, az aromás aminosav pedig a tirozin mellett fenilalanin is lehet (53). Az algoritmus egyszerűségéből adódóan CRAC/CARC szekvenciával rendelkező fehérjék szterolérzékenységét megfelelő szkepticizmussal, csupán prediktív jelleggel lehet felhasználni (50). Azonban nem lehet figyelmen kívül hagyni azokat az eredményeket, ahol ezen szekvenciák egyszerű pontmutációja vagy deléciója teljesen megváltoztatta a vad-típusú csatornára jellemző koleszterin iránti érzékenységet (161, 168, 181).

Más megközelítésben a koleszterin a sejtmembrán általános fizikai paramétereit megváltoztatva képes az ioncsatornák működésének befolyásolására (10, 118). A transzmembrán fehérjék és a lipid kettősréteg hidrofób részei eltérő átmérőjének következtében a fehérje pertubálja a környező lipideket, megváltoztatva a kettősréteg vastagságát, rendezettségét. A lipid réteg úgy fog igazodni, hogy lokális vastagsága megegyezzen a transzmembrán fehérje hidrofób szakaszával (54). Ezen nyugalmi állapot megváltoztatása energiaigényes folyamat. A fehérjék konformációváltozás során deformálják a környező lipid kettősréteget, és minél nagyobb a membrán ellenállása, annál több energia kell ahhoz, hogy a folyamat kivitelezhető legyen (119). A lipidkörnyezet fizikai paramétereinek változtatása a folyamat energetikai szükségleteit megváltoztatva módosíthatja

a molekuláris mozgásokat. A koleszterinmolekulák hatással vannak a membrán fluiditására, vastagságára, permeabilitására, a membránfehérjék laterális diffúziójára, így ezeken keresztül befolyásolhatják az ioncsatornák konformációváltozásának valószínűségét, kinetikai és egyensúlyi jellemzőit (9, 74, 118, 142). A két modell nem zárja ki egymást, azonban az egyes mechanizmusok szerepe csatornánként eltérő jelentőségű lehet. A két hatás elkülönítése egy adott csatorna esetén kihívás elé állítja a kutatókat (31). Az elkülönítés egyik lehetséges módszere olyan koleszterin analógok vizsgálatán alapszik, melyek sejtmembrán szerkezetéregyakorolt hatása hasonló a koleszterinhez, azonban a receptor-ligand kölcsönhatások során nem tudja helyettesíteni azt (105). Az epikoleszterin és ent-koleszterin két olyan királis koleszterin analóg, amelyek kisebb fenntartásokkal ugyan (44), de megfelelnek a fenti kritériumoknak (222). Míg a koleszterin csökkenti a Kir2.1 csatorna áramsűrűségét, addig az epikoleszterin növeli azt, specifikus lipid-fehérje kölcsönhatást valószínűsítve (170). Hasonló koleszterin analógokkal szembeni sztereo-specificitást publikáltak KCa1.1 és TRPV1 (Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1) csatornák esetén (29, 161), míg az nAChR (nikotinerger acetilkol receptor) vagy VRAC (volumen regulált anion csatorna) csatornák esetén nem volt eltérés a optikai izomerek és a koleszterin hatásában (162, 171).

II.12. A koleszterinhomeosztázisban fellépő zavar betegségek kialakulásához vezet

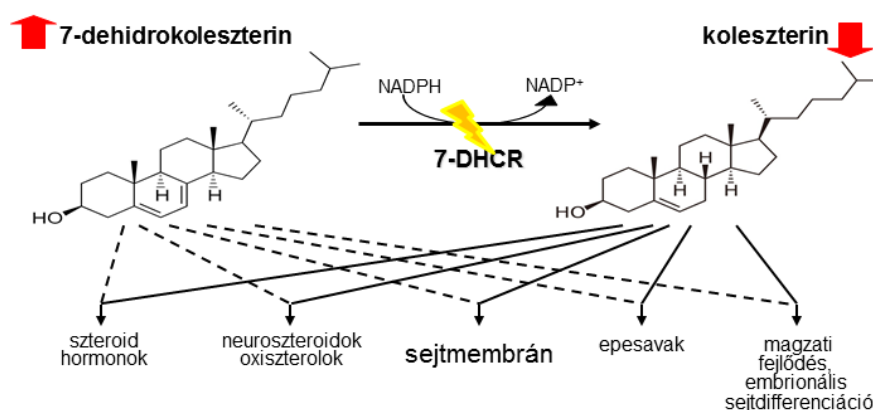
A humán sejtekben található koleszterin két különböző forrásból származik. Az endogén koleszterin-bioszintézis során a sejtek acetátból kiindulva többlépcsős enzimátikus folyamatok során hozzák létre a koleszterint és egyéb szterol származékokat. A táplálékkal felvett (dietáris), exogén eredetű koleszterin lipoprotein partikulákba csomagolva juthat el a célsejtekhez. Koleszterin többlet esetén a sejtek leadhatják a koleszterint az extracelluláris térbe. A szintézis, felvétel és leadás szigorúan szabályozott homeosztázisában bekövetkező változások anyagcsere-betegségek kialakulásához vezethetnek (62, 69, 125) A fejlett társadalmakban leggyakrabban a táplálékkal történő túlzott koleszterinbevitel okoz problémát, azonban nem elhanyagolható a homeosztázisban részt vevő enzimek és egyéb fehérjék mutációi során kialakuló betegségek gyakorisága (143). A szterol-szintézis károsodásával járó genetikai betegségek incidenciája relatíve alacsony, így ezen állapotok részletes feltérképezése, terápiás lehetőségek kidolgozása sajnálatos módon, anyagi és technikai okok miatt nem kellőképpen alapos (164). Ezen ritka betegségek alap kutatásban történő vizsgálata segítheti a korai diagnózis megalkotását, prognózis meghatározását és a terápiás célpontok feltérképezését. A hiányállapotban talált eltérések ugyanakkor információval szolgálnak a koleszterin fiziológiás funkciójáról is.

II.13. A koleszterin bioszintézis zavarának prototípusa: Smith-Lemli-Opitz szindróma

Az elmúlt harminc évben több malformációs szindrómáról (Smith-Lemli-Opitz szindróma, lathosterolosis, desmosterolosis) derült ki, hogy a betegség hátterében a szterolszintézis örökletes zavara áll (164). Ezek közül a legelsőként leírt a Smith-Lemli-Opitz szindróma (SLOS), mely nevét a betegséget 1964-ben leíró orvosokról kapta (182). Az SLOS autoszomális recesszíven öröklődő, monogénes, malformációs szindróma (McKusick 270400 (7)). A szindrómát az endogén koleszterin bioszintézis Kandutsch-Russel útvonalának záró lépését katalizáló 7-dehidrokoleszterin-reduktáz enzim (7DHCR) vele született zavara okozza (83, 195). Az enzimdefektus a koleszterinszint csökkenése mellett a koleszterinszintézis prekursor molekuláinak (elsődlegesen 7-dehidrokoleszterin (7DHC) és izomere, a 8-dehidrokoleszterin) emelkedett szintjéhez vezet a vérplazmában és a sejtmembránban egyaránt (40). A folyamat eredményeképpen megváltozik a lipid-raftok és a membránok szerveződése, zavart szenvednek különböző szignáltranszdukciós útvonalak, illetve a koleszterin mint univerzális prekursor molekula (epesavak, neuroaktív szteroidok, szteránvázas hormonok) sem tudja maradéktalanul ellátni feladatát (3. ábra) (163). Továbbra is nyitott kérdés azonban, hogy a tünetek kialakulásáért elsődlegesen a koleszterin hiánya vagy a prekursor molekulák toxikus hatása tehető felelőssé.

A betegség tünettana és megjelenése szerteágazó, az arc és a fej-nyak régió gyakori fejlődési rendellenességei és neurológiai eltérések mellett szinte minden szervrendszer érintett lehet (163). A betegséget eredetileg a klinikai fenotípus, az együttesen fenálló arcdysmorphia, microcephalia, hypospadiasis és szomatomentális retardáció alapján írta le Smith, Lemli és Opitz (182). Az SLOS-re jellemző jegyek mellett a súlynövekedés elmaradása és táplálási nehézségek hívhatják fel a kezelőorvos figyelmét a betegségre. Gyakoriak a légzőrendszer különböző bakteriális és virális fertőzései, melyek hátterében inkább másodlagos tényezők (a fej-nyak régió anatómiai elváltozásai, betegek immobilitása, légzési segédizmok hypotóniája) állhatnak, mintsem a betegséghez társuló immunszupresszió (90). A klinikai tünetek alapján felmerülő SLOS gyanút a szérumban koleszterin csökkenése és emelkedett 7DHC szint igazolhatja, további bizonyítást a molekuláris genetikai vizsgálat ad (163). A 7DHCR több mint 130 különböző mutációját azonosították eddig, de a genotípus-fenotípus között nincs szoros összefüggés, azaz ugyanazon mutáció vezethet enyhe vagy súlyos rendellenességhez is (213). A betegek súlyosság szerinti besorolása a fenotípus jegyeket alapul vevő, Kelley és Hennekam által módosított Bialer pontrendszer segítségével történik (90). A betegség kezelésére jelenleg csak tüneti terápia áll rendelkezésre. Orális koleszterin szubsztitúció hatására a viselkedési problémák és a

hallásfunkciók javulását, a fényérzékenység és a fertőzések csökkenését tapasztalták (48). Antioxidáns kezelés, valamint statin terápia a szterol prekursorok toxicitásának mérséklésén keresztül lehet hatásos (70). A kezelések hatásosságáról megoszlanak a vélemények, ugyanis a randomizált, placebo kontrollált klinikai tanulmányok vagy hiányoznak, vagy nem támasztják alá a nem standardizált tanulmányokban talált eltéréseket (176, 194). Az első magyarországi SLOS beteget 2002-ben diagnosztizálták, ezt követően további 14 beteg került felismerésre (191). A magyarországi betegek többségét a Debreceni Egyetem Gyermekgyógyászati Klinikájának laboratóriumában diagnosztizálták a klinikai gyanú felmerülését követően szérum



3. ábra Smith-Lemli-Opitz szindróma (SLOS) A sejtekben a 7-dehidrokoleszterin reduktáz (7-DHCR) mutációja következtében csökkenő koleszterin és emelkedő 7-dehidrokoleszterintartalom komplex sejtbiológiai és élettani hatásokkal jár (F.D. Porter nyomán(163)).

7DHC-koncentráció meghatározásával (144, 145). 2014-ben a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetben a magyarországi betegek gondozására SLO-szindróma diagnosztikai és terápiás munkacsoportot alakítottak ki (188). A munkacsoport részletesen feltérképezte az általuk gondozott betegek klinikai, biokémiai és genetikai jellemzőit és elsőként írta le a 7DHCR egy újonnan felismert mutációját (18, 117, 145, 189). Egyenlőre nincs adat a betegség magyarországi incidenciájáról, de a becsült értékek (1:10000-1:70000 (176), egy friss kutatás 1:39125 (41) a kórkép jelentős aluldiagnosztizáltságára utal (94). Az általam vizsgált minták a korábban diagnosztizált magyarországi betegektől származtak.

II.14. Hiperkoleszterinémia és annak immunológiai vonatkozásai

A koleszterinnel kapcsolatos betegségek másik, széles körben is ismert spektrumát a zsírsanyagcsere koleszterinszint-emelkedéssel járó zavarai képviselik. A hiperlipidémiák során kialakuló hiperkoleszterinémia (HC) csak tünet, melynek háttérében 3 fő ok állhat: a kedvezőtlen

étrend és életmód által kiváltott anyagcsere-túlterhelés, betegségek vagy gyógyszerek hatására kialakuló szekunder anyagcserezavarok, valamint a zsíryanagcsere primer, örökletes zavarai (2). A koleszterin mellett természetesen más lipidek és lipoproteinek koncentrációja is megváltozik, így az eltérések felosztása az etológia mellett történhet a lipoproteinek koncentrációját figyelembe vevő Fredrickson-féle beosztás, vagy a triglicerid és koleszterinszint meghatározása alapján is (33, 60). A hiperkoleszterinémia következménye az etiológiától, beosztástól függetlenül szisztémás érlemeszesedés és következményes szívinfarktus, agyi infarktus vagy perifériás érelzáródás lehet (107, 140). A hiperlipidémiák sikeres kezelésének alapját a megfelelő diéta és életmódváltás jelentheti, mely legtöbb esetben kiegészül a koleszterin bioszintézis kulcsenzimét, a hydroxy-metil-glutanyl-CoA-t (HMGCoA) szelektíven gátló statin készítmények alkalmazásával (1). A hiperlipidémiák népegészségügyi jelentőségét nem lehet eléggé hangsúlyozni, a jóléti társadalmakban a felnőtt populáció több mint 50 százalékának kóros a lipid profilja, a társuló betegségek pedig jelentősen terhelik az egészségügyi ellátó rendszert (1, 201). Habár az utóbbi években némi javulás volt tapasztalható, a kardiovaszkuláris halálozás még mindig első helyen áll Magyarországon (124).

Az elmúlt évek során intenzív alapkutatások zajlottak az érlemeszesedés patogenezisének, molekuláris és sejtszintű történéseinek feltárására (11, 134). A jelenleg legelfogadottabb hipotézis szerint az érlemeszesedés az endotél sejtek különböző eredetű (mechanikai stressz, anyagcsere betegségek, fertőzések, dohányzás) károsodására adott krónikus gyulladási válaszreakciója, mely fenntartásában kiemelt szerepet játszanak az érfalba lerakódó lipid (köztük koleszterin) molekulák (2, 100). A károsodott endotél által termelt gyulladási faktorok aktiválják a veleszületett és a szerzett immunrendszer sejtjeit, melyek az osztódó simaizomsejtekkel közösen vesznek részt a főleg koleszterinnel telített ateroszklerotikus plakkok kialakításában (100). A plakk nemcsak elzárhatja az ereket, de a leszakadó törmelékek mikroembóliákat okozhatnak, a plakk alatti meggyengült érfalban pedig gyakran alakul ki aneurizma, melynek megrepedése súlyos vérzéssel járhat (2). Úgy tűnik, hogy a T-sejtek kiemelt szerepet játszanak az érlemeszesedés gyulladási folyamataiban (214). Érlemeszesedésben szenvedő betegek és modellállatok vizsgálata egyaránt alátámasztotta az aktivált T-sejtek jelenlétét az ateroszklerotikus plakkokban (76, 172, 184). A T-sejtek jelentős része oxidált LDL partikulumokra volt specifikus (184). Hiperlipidémiás állatmodellekben a CD4⁺ limfociták depléciója csökkentette az érlemeszesedés progresszióját (49), immunhiányos SCID egerekben az immunológiai funkciók helyreállítása viszont felgyorsította a folyamatot (223). Fontos észrevétel, hogy az érlemeszesedéshez vezető állapotok befolyásolják az immunrendszer normál működését is, többnyire csökkentve a szervezet ellenálló képességét különböző kórokozók

szemben (101, 129). Hiperkoleszterinémia hatására megemelkedik a limfociták sejtmembránjának koleszterintartalma (174). A mesterségesen előidézett hiperkoleszterinémia állatkísérletekben negatívan befolyásolta a Kv ioncsatornák által ellátott élettani funkciókat (77, 86). Legjobb tudásunk szerint munkacsoportunk publikálta először az emelkedett hiperkoleszterinémia hatását humán mintákból izolált limfociták Kv1.3 csatornái esetén (183).

III. CÉLKITŰZÉSEK, VIZSGÁLT KÉRDÉSEK

Az elmúlt évek során számos olyan tanulmány látott napvilágot ahol a koleszterint az ioncsatornák működésének fontos szabályzójaként jellemezték (103, 105). Ezen tanulmányokban általában *in vitro* módszerekkel (pl. ciklodextrin-koleszterin zárványkomplexszel) módosították a membrán koleszterintartalmát, majd vizsgálták a megváltozott membránkörnyezet hatását az ioncsatornák működésére. Munkacsoportunk korábbi eredményei szerint az *in vitro* megnövelt koleszterinszint módosítja az egészséges donorokból izolált limfociták Kv1.3 ioncsatornáinak kapuzását. Az aktivációs és inaktivációs kinetika lelassult, a csatorna egyensúlyi aktivációja pedig a pozitívabb membránpotenciálok felé tolódott el a kezelés hatására (74). Hasonló változásokat írtak le egyéb kálium ioncsatornák vizsgálata során is (103). Jelen munkánk egyik alapkérdése az, hogy a szterolok *in vitro* kísérletekben talált módosító szerepének van-e valódi biológiai jelentősége? Előfordulhat-e olyan betegség/kórállapot, ahol a sejtmembrán megváltozott koleszterintartalma befolyásolja az ioncsatornák működését? Ennek megválaszolására a koleszterinhomeosztázist jelentősen, de eltérő módon befolyásoló (koleszterinszintézis zavara, illetve hiperkoleszterinémia) betegségek ioncsatornákra és T-sejtek működésére gyakorolt hatását vizsgáltuk meg perifériás vérből izolált T-sejteken.

A Kv1.3 ioncsatorna C-terminálisának funkciójáról kevés információ van. Hipotézisünk szerint a Kv1.3 C-terminálisa más ioncsatornákhöz hasonlóan (pl. P2X7 és BK csatornák) részt vehet a csatorna szterollokkal történő interakciójában (168, 181). A Kv1.3 aminosav szekvenciáját vizsgálva több CARC koleszterin felismerő motívumot térképeztünk fel a Kv1.3 C-terminálisán. Kísérleteinkben vizsgálni kívántuk a Kv1.3 C-terminálisának szerepét a szterollokkal történő interakciókban.

Munkánkat az alábbi konkrét célkitűzések mentén folytattuk:

- I. Hiperkoleszterinémiás és Smith-Lemli-Optiz szindrómás betegekből izolált sejtek koleszterintartalmának, illetve szterolprofiljának vizsgálata
- II. Kv1.3 ioncsatornák kapuzásának vizsgálata hiperkoleszterinémiás és Smith-Lemli-Optiz szindrómás betegekből izolált limfociták esetén
- III. Vizsgálni kívántuk ezekben a kórállapotokban a membránkoleszterin *in vivo* megváltozott összetételének hatását a T-limfocita ioncsatornák által szabályozott funkcióira (aktiváció, proliferáció)
- IV. A SLOS szindrómára jellemző membrán 7DHC tartalom modellezése egészséges donorokból izolált limfociták esetén

- V. Kv1.3 ioncsatornák biofizikai jellemzőinek vizsgálata SLOS modellrendszerben
- VI. A koleszterin és a 7DHC Kv1.3 ioncsatornára gyakorolt hatásának összehasonlítása
- VII. A C-terminálisától megfosztott Kv1.3 ioncsatorna koleszterin/7-DHC-érzékenységének vizsgálata
- VIII. A Kv1.3 C-terminálisán található CARC szekvenciák pontmutációival előállított csatornák koleszterinérzékenységének vizsgálata

IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

IV.1. Oldatok, vegyszerek

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

IV.2. Mintagyűjtés, csoportba rendezés

IV.2.1. Hiperkoleszterinémia

A kísérletek során 15, korábban nem kezelt, a Friderickson szerinti besorolás alapján II/A; II/B csoportba tartozó hiperkoleszterinémiás személyt vizsgáltunk. A mintagyűjtés során arra törekedtünk, hogy a mintaadók teljes koleszterinszintje a fiziológiás $<5,2$ mmol/l értéknél magasabb legyen. Mivel ezen értékek nagysága tág határok között mozgott a megfigyelt populációban, a hiperkoleszterinémiás mintákat a koleszterinszintek alapján két csoportra bontottuk. Az első csoportba (HC I. csoport) a mérsékelten ($5,2$ mmol/l $< X < 10$ mmol/l), a második csoportba (HC II. csoport) a jelentősen (10 mmol/l $< X$) emelkedett koleszterinszinttel rendelkező személyek mintái kerültek. A vizsgálatok során a kontroll sejteket hét, normál koleszterinszinttel rendelkező önkéntesből nyertük. Sem a hiperkoleszterinémiás, sem a kontroll csoport tagjai nem szenvedtek egyéb, általunk ismert olyan betegségben, amely befolyásolhatta a mérési eredményeket, illetve a szérumkoleszterinszinteket. Így a máj, vese, endokrin zavarok, cukorbetegség, alkoholizmus, drogfüggőség, lipidcsökkentő és egyéb gyógyszerek használata a tanulmányból való kizárást vonta maga után. A kiválasztott betegektől és kontroll személyektől a Belgyógyászati Klinika A Épülete Lipid Szakrendelésének munkatársai egyenként 10 ml perifériás vénás vért vettek a véralvadást elkerülendő, heparinizált Vacutainer csövekbe.

IV.2.2. Smith-Lemli-Opitz szindróma

Vizsgálataim kezdetéig Magyarországon 15 SLOS-ban szenvedő gyermeket diagnosztizáltak (145). A Debreceni Egyetem „SLO-szindróma diagnosztikai és terápiás munkacsoport”-ja két tanulmányában publikálta a diagnosztizált betegek részletes esetismertetését különös tekintettel a fenotípusos, biokémiai és genetikai jellemzőkre (18, 144). A betegeket a fenotípusos jellemzőket figyelembe vevő Kelly és Henekkam féle súlyossági rendszer alapján osztották csoportokba. Az enyhe csoportba négy, a tipikus csoportba hét, míg a súlyos csoportba négy gyermek került. A tipikus csoportból két, a súlyos csoportból pedig mind a négy gyermek elhunyt a mintavételezés megkezdése előtt. A

diagnózist követően minden gyermek orális koleszterinpótlásban (150-300 mg/ttkg) részesült, valamint statin terápia is indult, amit öt esetben a mellékhatások miatt felfüggesztettek. Tanulmányunkba végül a kilenc elérhető magyarországi betegből 8-at sikerült bevonni (életkor: $7,65 \pm 2,23$ év), egy gyermek ugyanis külföldön tartózkodott. A mintavételezés során 8 egészséges, az SLOS betegek életkorához igazított kontroll személyt (életkor: $7,66 \pm 1,83$ év) is bevontunk a tanulmányba. A betegektől és egészséges kontroll személyektől egyenként 10 ml perifériás vért vettünk heparinizált vákumos csövekbe.

IV.3. Sejtek, sejtvonalak

IV.3.1. Mononukleáris sejtek szeparálása

A vérmintákból Ficoll-Hypaque sűrűséggradiens centrifugálással nyertünk mononukleáris sejteket, majd kétszer mostuk őket Ca^{2+} - és Mg^{2+} -mentes 25 mM HEPES-t tartalmazó Hanks oldatban, végül 10% FBS-t (Fetal Bovine Serum) és 25 mM HEPEST-t tartalmazó RPMI-1640 oldatban szuszpendáltuk fel őket. A sejtek felét ezután lefagyasztottuk -80 °C-ra és ott tároltuk az elektrofiziológiai vizsgálatok elvégzéséig. A proliferációs kísérleteket frissen izolált sejtek felhasználásával végeztük.

IV.3.2. CHO (Chinese Hamster Ovary) sejtvonala

A kínai hörcsög petefészkéből izolált sejtvonalat (CHO) magas glükóz (4500 mg/ml), 10% FBS, 2 mM l-glutamin, 100 U/ml penicilin-G, és 100 µg/ml streptomycin tartalmú Dulbecco féle minimum esszenciális (DMEM) tápoldatban tenyésztettük, 37°C -on, 5% CO_2 és 95%-os páratartalom mellett. A sejteket hetente háromszor passzáltuk.

IV.3.3. Stablan transzfektált CHO sejtvonala

A Kv1.3 ioncsatorna vad típusú (VT-Kv1.3) és a C-terminálisának utolsó 84 aminosavától megfosztott ($\Delta\text{C-Kv1.3}$, ún. deléciós mutáns) verzióját stablan expresszálló CHO sejtvonalatunk munkacsoportunk munkatársa, Dr. Szilágyi Orsolya hozta létre retrovirális transzdukciós módszerrel (192). A csatornákat monomerikus zöld fluoreszcens fehérjével (mGFP) konjugálta, mely lehetőséget adott az elektrofiziológiai mérések során a vad típusú és deléciós mutánst expresszálló CHO sejtek kiválasztásához.

IV.4. Koleszterin és 7-dehidrokoleszterin töltés

A frissen izolált lipocitákat, illetve CHO sejteket kétszer mostuk Hanks oldattal, majd 2×10^6 sejt/ml koncentrációban szuszpendáltuk metil- β -ciklodextrin/koleszterin-t (M β CD/CHOL) vagy metil- β -ciklodextrin/7-dehidrokoleszterin-t (M β CD/7DHC, CycloLab,

Magyarország) tartalmazó Hanks oldatba (a szövegben és ábrákon feltüntetett koncentrációértékek minden esetben a komplexek koleszterin, illetve 7DHC tartalmára utalnak). A sejtszuspenziót 60 percig 37°C-on inkubáltuk, majd kétszer mostuk Hanks oldatban, végül az elektrofiziológiai mérések során külső oldatként alkalmazott normál extracelluláris oldatban vettük fel a sejteket. A kontroll sejtek esetében ciklodextrin származékok nélkül inkubáltuk a sejteket.

IV.5. A sejtek koleszterin és 7DHC összetételének meghatározása

IV.5.1. Amplex Red Cholesterol Assay Kit

A hiperkoleszterinémiás sejtek koleszterintartalmának meghatározását az Amplex Red Cholesterol Assay segítségével végeztük. Az esszé során a sejteket először Triton X-100 alapú oldat segítségével lizáltuk (az oldat összetevői: 50 mM Tris, (pH 8,0), 2 mM CaCl₂, 80 mM NaCl, 1% Triton X-100), majd a gyártó által ajánlott protokollnak megfelelően a lizátumot és a reagenseket 96 lyukú tálcán inkubáltuk (8). A sejtek lizálása során felszabaduló koleszterinmolekulák koleszterin-oxidáz hatására bomlanak, a reakció során keletkező hidrogén-peroxid pedig az Amplex-Red reagenssel (10-acetil-3,7-dihidroxiphenoxazin) egy fluoreszcens molekulát (rezorufin) képez. A koleszterinnel ekvimoláris mennyiségben keletkező rezorufint fluorimetriás eljárással detektáltuk, amiből következtettünk a sejtek összkoleszterin-koncentrációjára. A mérésekhez Multimode Microplate Reader-t (BioTek, Winooski, VT) használtunk. A minták koleszterinkoncentrációjának meghatározásához ismert koleszterinkoncentrációjú referencia oldatok segítségével kalibrációs görbét készítettünk. Annak érdekében, hogy eredményeink a minták sejtszámától függetlenek legyenek, a koleszterinkoncentráció meghatározása során kapott értékeket a fehérjekoncentrációval arányos, 280 nm-en mérhető abszorbanciára normáltuk.

IV.5.2. Gázkromatográfia-tömegspektrometria (GC-MS)

Az SLOS betegekből származó vörösvértetek (vvt) CHOL és 7DHC koncentrációjának meghatározásához gázkromatográfia-tömegspektrometrián (GCMS-QP2010, Shimadzu) alapuló módszert alkalmaztunk. A kísérleteket Dr. Péter Mária az SZBK munkatársa végezte. A mintákhoz belső standardként 10 µg/ mg protein ergosterol került hozzáadásra. A lipidextrakció módosított Folch protokoll alapján történt (17). A minták fehérjetartalmának meghatározásához BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham) került felhasználására a gyártó utasításait követve. Az extraktumok elpárolása utáni maradék anyagot 25 µl benzénben oldották, majd 3 µl N,O-bis(trimethylsilyl)acetamid-ban

vették fel és inkubálták szobahőmérsékleten 1 órán keresztül. A reakció során keletkező trimethylsilyl éter származékok 1-1 μl -ét injektálták a kromatográfiás oszlopokra. Az egyes szterolok azonosítása koleszterin és 7DHC referenciaoldatok segítségével történt.

IV.6. Limfocitaaktiváció, proliferáció vizsgálata

IV.6.1. A CD154 expressziójának vizsgálata

A CD154 (CD40 ligand) egy korai, kalciumfüggő T-sejt aktivációs marker (37, 207). Expressziójának vizsgálatához az SLOS és kontroll sejteket tartalmazó mintákat $1\mu\text{M}$ thapsigarginnal aktiváltuk 3 órán keresztül, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, majd 5% FCS/PBS-ben mostuk a sejteket háromszor. Ezután phycoerythrinrel (PE) konjugált egér anti-CD3 és Alexa 488 konjugált egér anti-CD-154 antitestekkel jelöltük a sejteket 20 percig, szobahőmérsékleten, a gyártó utasításait követve. A kontroll mintákhoz a fent említett antitest (CD3) izotípus kontrollját adtuk. Az inkubációt követően háromszor mostuk a sejteket 5% FCS/PBS-ben. A jelölést követően BD FACScan (Beckton-Dickinson, New Jersey, USA) citométerrel vizsgáltuk a mintákat. Minden esetben legalább 10000 CD3^+ T-sejt CD154 expresszióját értékeltük ki FCS Express 4 szoftver (De Novo Software, Glendale, USA) segítségével.

IV.6.2. Karboxifluoreszcein-szukcinimidil-észter (CFSE) hígulási esszé

A T limfociták proliferációjának vizsgálatához a Lyons és mtsai. által kidolgozott CFSE-hígulási esszé munkacsoportunk által módosított változatát használtuk (120-122, 160). A módszer előnye a többi ismert proliferációs esszével szemben, hogy hosszan, akár 4-6 osztódási cikluson keresztül lehet monitorozni a 24-48 óránként osztódó T-limfocitákat. Az esszé során membrán-permeábilis, de nem fluoreszcens CFDA-SE (karboxifluoreszcein-diacetát-szukcinimidil-észter) oldattal inkubáljuk a sejteket. A citoplazmába diffundáló CFDA-SE molekulákról intracelluláris észterázok hasítják le a két acetát csoportot, kialakítva a fluoreszcens és nem membránpermeábilis CFSE molekulát (47). A CFSE intracelluláris fehérjék aminocsoportjaihoz kapcsolódva stabil festék-fehérje konglomerátumokat képez. A lassan metabolizálódó citoskeletális fehérjékhez való kapcsolódás okozza a CFSE-festés hosszú életidejét. A T-limfociták mitotikus osztódása során az utódsejtek CFSE koncentrációja a kiindulási érték felére csökken, így áramlási citométeren jól megfigyelhetőek az egyes osztódási ciklusokon átment T-limfociták egyes populációihoz tartozó fluoreszcenciacsúcsok. A perifériás vérből frissen szeparált mononukleáris sejtekhez $1\mu\text{M}$ -os végkoncentrációban adtuk a CFSE-t, majd a sejtszuspenziót 15 percig szobahőmérsékleten és 20 percig $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltuk. Tekintve,

hogy a CFSE fényérzékeny anyag, a sejteket az áramlási citométeres mérésekig (lásd lentebb) fénytől védve kezeltük és tároltuk. A limfociták szelektív aktivációjához 500ng/ml anti-CD3 és 1 µg/ml anti-CD28 szolubilis antitesteket használtunk, mely hatására a sejtek átlagosan naponta-kétnaponta osztódtak. A CFSE-vel jelölt sejtek proliferációját a stimulációt követő ötödik napon vizsgáltuk FACScan típusú citométer segítségével (a CFSE gerjesztési maximuma 488nm, illetve emissziós maximuma 520 nm saját spektrofluorimetriás mérés, illetve irodalmi alapok alapján (120)). Köpenyfolyadéként PBS (20mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl, pH 7,4) oldatot használtunk. A vizsgált sejtek száma tenyésztőedény lyukakként 100 000 volt. Három paramétert mértünk: az előreszórást (FSC), az oldalszórást (SSC), illetve a sejtekben található CFSE által emittált fluoreszcenciaintenzitást. Az FSC és SSC értékek alapján kaput illesztettünk a limfocitákra, majd a kapu által határolt populációnak vizsgáltuk meg a CFSE fluoreszcencia-hisztogramját (lásd 15.ábra). A proliferáció mértékét az osztódások során létrejött utódsejtek és az összes sejt számának hányadosaként definiált osztódási indexszel (*OI*) jellemeztük, az alábbi képlet segítségével:

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

ahol az n darab osztódási ciklus alatt a k ciklusban A_k darab sejt volt a mintában.

IV.7. Elektrofiziológia

IV.7.1. A patch-clamp technika alapjai

Elektrofiziológiai méréseinket az Erwin Neher és Bert Sakmann által 1976-ban publikált patch-clamp technika segítségével végeztük, feszültségzár üzemmódban, teljes-sejt, illetve outside-out patch konfigurációban (141). A teljes-sejt konfiguráció kialakítása során az általunk használt üvegpipetta és a sejtmembrán között nagy ellenállású kapcsolatot, ún. giga-sealt hoztunk létre, majd az üreges pipetta belsejében hirtelen csökkentjük a nyomást, aminek hatására kiszakad a pipetta nyílása alatt elhelyezkedő membráncsík. A pipetta belsejében elhelyezkedő belső oldat és a sejt citoplazmája ekkor találkozik egymással, így a pipettában található elektródával könnyen mérhetővé válik a teljes sejtmembránon átfolyó áram. Az outside-out patch konfiguráció kialakításához a teljes-sejt konfiguráció elérését követően lassan felemeljük a pipetta hegyét, kiszakítva a membrán egy kicsiny, pipettához tapadó részét. A mindkét oldala felé nyitott, zsákszerű membráncsík pipetta lumenétől távolabbi része általában spontán összeolvad, kialakítva egy vezikula szerű képződményt, melyet a pipetta belső oldata tölt ki. Az eredeti membráncsík intracelluláris oldala a vezikula lumene, míg extracelluláris oldala a külső tér felé néz (innen ered a módszer elnevezése). A módszer

előnye többek között az, hogy a citoplazmatikus szabályozó tényezők hatása korlátozottan vagy egyáltalán nem érvényesülhet, míg a csatorna biofizikai paraméterei nem változnak. Különösen előnyös az outside-out patch konfiguráció, amikor a nagy teljes-sejt áramok esetén kialakuló jelentős soros ellenállás mérési hibát okozna- ekkor a vizsgált membrán felszín csökkentésével a hiba elkerülhető. A feszültség-zár üzemmód során tetszőleges membránpotenciál értékeket állítunk be a membrán/membrándarab két oldala között, majd vizsgáljuk a depolarizáció/repolarizáció hatására kialakuló ionáramok biofizikai paramétereit.

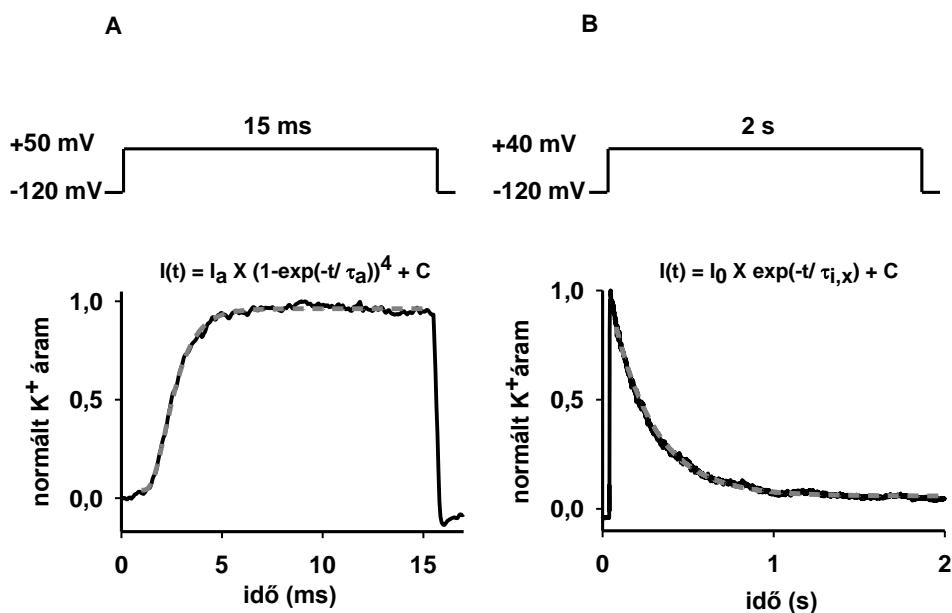
IV.7.2. A patch-clamp mérések során használt műszerek, módszerek és oldatok

A mérések során személyi számítógéphez Digidata 1440 és 1322A A/D konverter segítségével kapcsolt Axopatch-200A és Axopatch-200B erősítőket alkalmaztunk. (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) A sejteket Nikon TE2000U vagy TS100 mikroszkóp alatt azonosítottuk, a mérőelektrodát a mikropipettával Burleigh PCS-PS60 mikromanipulátor (Thorlabs, Newton, NJ, USA) segítségével irányítottuk a sejtekhez. Az adatok felvételéhez és kiértékeléséhez pClamp10 szoftvercsomagot használtunk (Axon Instruments Inc., Foster City, CA). Az elektrofiziológiai mérések során a CD4⁺ T-sejtek szelekciónak Matteson és Deutsch (135) után a következőképpen végeztük: az egér anti-humán CD4 antitestekkel jelölt sejteket olyan speciális Petri-csészékben inkubáltuk, melyek aljához kecskében termeltetett anti-egér-IgG antitesteket kötöttünk ki. A mérések előtt a Petri-csészéket öt alkalommal mostuk normál extracelluláris oldattal, így eltávolítottuk az antitestek által ki nem horgonyzott sejteket. A mérések során felhasznált pipettákat GC 150 F-15 boroszilikát (Clark Biomedical Instruments, Pangbourne, UK) üvegkapillárisokból húztuk négy fázisban, majd hő segítségével políroztuk a pipetták hegyét. A pipetták ellenállása normál intra- és extracelluláris oldat esetén 3–5 MΩ volt, outside-out konfiguráció esetén 5-7 MΩ. Az elektrofiziológiai mérések során az extracelluláris vagy más néven külső oldat összetétele a következő volt: 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2,5 mM CaCl₂, 5,5 mM glükóz, 10 mM HEPES (pH 7,35, 305 mOsm), míg a pipettában lévő belső oldat: 140 mM KF, 11 mM K₂EGTA, 1 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂ és 10 mM HEPES (pH 7,20, 295 mOsm) volt. A méréseket minden esetben szobahőmérsékleten (22-24 °C) végeztük. Az elektrofiziológiai mérések során az ohmikus szivárgási áram korrekcióját részben mérés közben P/N protokollal, részben utólagosan a pClamp10 szoftvercsomag segítségével végeztük. Az áramgörbéket 4 pólusú Bessel szűrővel szűrőztük, utólag pedig individuális értékelés után, amennyiben szükség volt rá digitálisan szűrtük három pontos boxcar módszerrel. A

mintavételezés frekvenciája a protokolloktól függően 1 és 10 KHz között volt a Nyquist teória figyelembe vételével.

IV.7.3. A patch-clamp mérések során alkalmazott protokollok

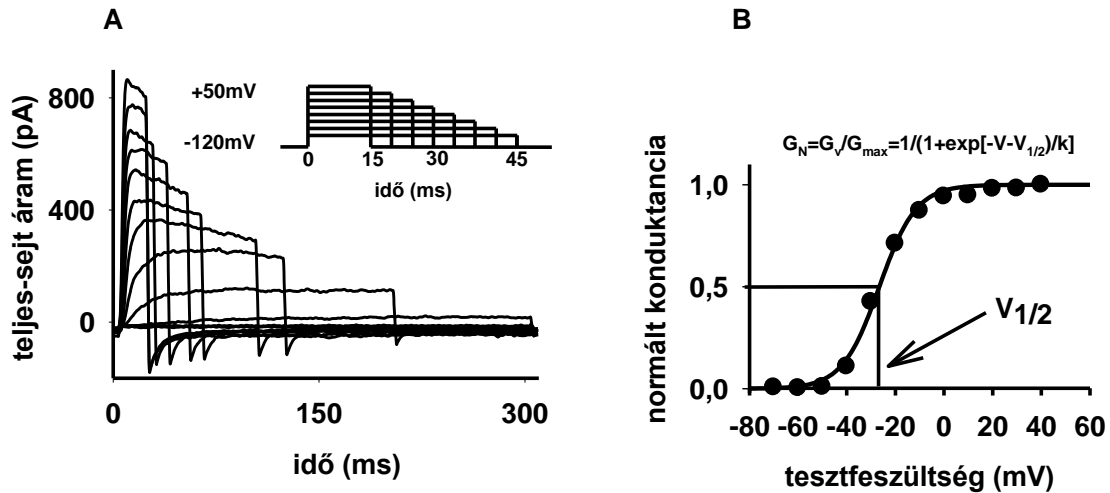
A Kv1.3 expresszióját közvetett módon, az áramsűrűség ($J_{Kv1.3}$) kiszámításával számszerűsítettük. Az egységnyi felületegységre eső csatornaszámmal arányos áramsűrűséget a +50 mV-os depolarizáció során mért csúcsáram (I_{max}) és a teljes-sejt kapacitás (C_m) hányadosaként definiáltuk. Ennek megfelelően a sejteket a kezdeti -120mV-os tartó



4. ábra A Kv1.3 ioncsatorna aktivációjának és inaktivációjának vizsgálata. Az **A** panel felső részén az aktivációs kinetika, a **B** panel esetén az inaktivációs kinetika vizsgálata során alkalmazott feszültségprotokollok láthatóak. A panelek alsó részén a feszültség protokollok alkalmazását követően regisztrált aktivációs (**A**) és inaktivációs (**B**) áramgörbék. Az aktivációs és inaktivációs időállandók meghatározásához a paneleken látható képletekkel illesztettük az áramgörbék (a képletekben szereplő változókat lásd a IV.7.3 fejezetben). Az illesztések eredményét szürke szaggatott vonallal jelöltük.

feszültségről +50mV-ra depolarizáltuk, 15 ms hosszan, 30 s-onként. Minden sejt esetében legalább három egymás utáni depolarizáló impulzus során kapott áramgörbe amplitúdójának átlagát tekintettük a csúcsáramnak. Az Axopatch erősítő teljes sejt membránkapacitás kompenzációjához szükséges beállítást tekintettük a sejtek kapacitásának, mely adatot a pClamp10 szoftver minden sejtről egyedileg rögzített.

A Kv1.3 ioncsatorna aktivációs kinetikájának vizsgálatához a sejteket a -120mV-os tartófeszültségről +50mV-ra depolarizáltuk 15 ms hosszan, az impulzusokat 15 másodpercenként ismételtük meg. A kapott áramgörbék a pClamp10 szoftver



5. ábra A Kv1.3 ioncsatorna egyensúlyi aktivációjának vizsgálata. Az **A** panel jobb felső sarkában az egyensúlyi aktiváció vizsgálatához használt feszültség–protokoll és az alkalmazása során kapott áramgörbék láthatóak. A **B** panelen található, ún. $G_N(V)$ görbe megszerkesztéséhez a feltüntetett képlet segítségével (a képletekben szereplő változókat lásd a IV.7.3 fejezetben) határoztuk meg az egyes tesztpotenciálokhoz tartozó maximális konduktancia értékeket. Az egyensúlyi aktivációt a $G_N(V)$ görbe meredekségével és a félaktivációs feszültséggel ($V_{1/2}$) jellemeztük.

felhasználásával, Hodgkin és Huxley alapján, az úgynevezett n^4 -es modellel illesztettük: $I(t) = I_a \times (1 - \exp(-t/\tau_a))^4 + C$, ahol $I(t)$ a t -időpontban mérhető áram, I_a a protokoll során mért áram amplitúdója, τ_a az aktivációs kinetikát jellemző időállandó, C pedig a -120 mV-on mért áram nagysága. Minden sejt esetében legalább három egymást követő depolarizáló impulzust alkalmaztunk, majd a kapott áramgörbék közül az illesztés után meghatároztuk az aktivációs időállandók (τ_a) átlagát (4/A ábra).

A Kv1.3 ioncsatornák inaktivációjának meghatározása során -120 mV-os tartófeszültségről $+40$ mV-ra depolarizáltuk a sejteket két másodperc hosszan (4/B ábra). A csatornák gyors aktiválódása után a Kv1.3 csatornára jellemző lassú, úgynevezett C-típusú inaktiváció volt megfigyelhető. A mérés során kapott áramgörbék leszálló szárát egy exponenciális tagot tartalmazó függvény segítségével illesztettük: $I(t) = I_0 \times \exp(-t/\tau_i) + C$, ahol $I(t)$ az illesztés kezdetétől számított t időpontban mérhető áramerősség, I_0 az inaktiválódó komponens amplitúdója, τ_i az inaktivációs időállandó, C pedig az egyensúlyi (steady-state) áram nagysága a depolarizáció végén. Az egyedi sejtre jellemző inaktivációs időállandó meghatározása során minden sejt esetében legalább három depolarizáló impulzust alkalmaztunk 60 másodpercenként, majd az egyes áramregiszterek illesztése során kapott inaktivációs időállandókat átlagoltuk.

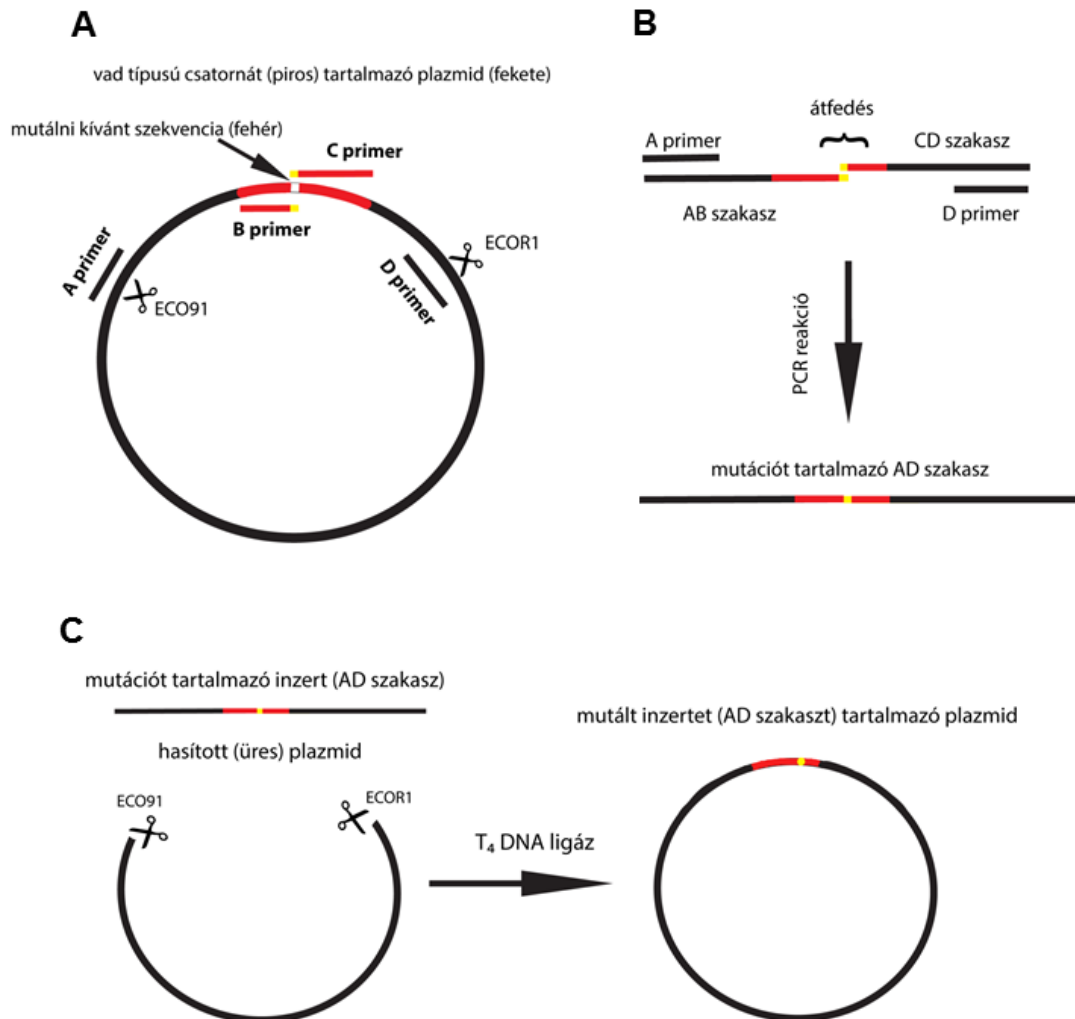
Az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggését az alábbi módon karakterizáltuk: a sejteket a -120 mV-os tartófeszültségről egyre pozitívabb tesztpotenciálokra depolarizáltuk, -70 mV-tól +40 mV-ig, 10 mV nagyságú lépésközöket alkalmazva (ún. I-V görbe). A depolarizáló impulzusok hosszát egyre csökkentettük, ugyanis a depolarizációs feszültség növelésekor az áram aktivációjának gyorsulása miatt a teljes-sejt áram rövidebb idő alatt éri el a maximális értékét (5/A ábra). Ezt követően az egyes tesztpotenciálokra kapott maximális áramértékekből az alábbi összefüggés alapján számoltuk ki a teljes-sejt konduktanciát: $G(V)=I_{\max}/(V-E_{\text{rev}})$, ahol a $G(V)$ a V tesztpotenciálon mért teljes-sejt konduktancia, I_{\max} az adott tesztpotenciálon mért csúcsáram, V a tesztpotenciál, E_{rev} pedig a Nernst egyenletből számított K^+ egyensúlyi potenciál (-85 mV). A kapott G értékeket normáltuk a maximális konduktancia értékre, majd ábrázoltuk a tesztpotenciál függvényében, így kapva meg a normált konduktancia-tesztfeszültség függvényt (ún. G-V görbe) (5/B ábra). Az adatpontokra Boltzmann-függvényt illesztettünk: $G_N=1/(1+\exp[-(V-V_{1/2})/k])$ ahol G_N a normált konduktancia, V az aktuális tesztpotenciál, $V_{1/2}$ a félaktivációs feszültség, k pedig az aktiváció feszültségfüggésének meredeksége. Az egyensúlyi aktivációt a félaktivációs feszültség és a meredekség meghatározásával jellemeztük.

IV.8. Flanking primer mutagenesis

IV.8.1. A flanking-primer mutagenesis módszer ismertetése

A mutáns Kv1.3 csatornákat az 5. ábrán bemutatott flanking-primer mutagenesis technika laborunkban optimalizált változatával hoztuk létre (79). A mutációhoz egy külső (A szensz és D antiszensz primerek) és egy belső primer párt (B szensz és C antiszensz primerek) terveztünk (6/A ábra). A külső primer pár (A és D) esetén a mutálni kívánt szekvenciától proximálisan, illetve disztálisan elhelyezkedő, Eco9II, illetve EcoR1 restrikciós hasítóhelyeket magába foglaló szakaszokkal komplementer szálakat terveztünk. A belső primer párnál (B és C) a módosítani kívánt szakasszal részben átfedő, de a megfelelő helyeken eltérő nukleotidokat tartalmazó primereket terveztünk. Az első PCR reakció során kevert primer párokat alkalmazva felerősítettük az AB és CD szakaszokat. A belső primereknek köszönhetően a keletkező termékek a tervezett helyeken pontmutációkat tartalmaztak. A részben átfedő AB és CD szakaszokat egy második PCR reakcióban az A és D primereket felhasználva egyesítettük és felerősítettük (6/B ábra). A második PCR reakció során így egy olyan AD terméket kaptunk, amely már tartalmazza az általunk tervezett pontmutációkat. Ezt követően a restrikciós enzimekkel meghasítottuk a vad típusú Kv1.3-at tartalmazó plazmidunkat és a második PCR reakció során kapott AD terméket (6/C ábra). A

hasítást követően agaróz gélen futattuk és izoláltuk a plazmidot, majd ligálással egyesítettük a mutált AD szakaszt és a hasított plazmidot (6/C ábra). A ligálás utáni plazmidot *E. Coli* kompetens sejtekbe transzformáltuk, majd a bakteriális telepek újbóli leoltását követően izoláltuk és DNS szekvenálással ellenőriztük a mutáció jelenlétét.



6. ábra Flanking primer mutagenesis módszer. A részleteket lásd a szövegben (IV.8.1 fejezet).

IV.8.2. PCR reakció

A PCR primereket Vector NTi (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham) szoftver segítségével terveztük, melyeket az Integrated DNA Technologies gyártott le (Coralville, USA). A PCR reakciók során Phusion High-Fidelity DNA Polymerase-t (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham) használtunk a gyártó utasításait követve. Az alábbi primereket használtuk a mutációk létrehozásához (pirossal kiemelve a módosított bázis tripletek):

Belső primer párok a CARC4 kötőhely esetén:

szensz primer:

5' **GCGGTATCGGAGGCTGCGT**GAGTCTCAGCTCAATGAGGA

antiszensz primer:

5' **GCGT**CGGAGG**GCTATGGCG**ATCGAAGAGGGGGGTATGAAC

Belső primer párok a CARC5 kötőhely esetén:

szensz primer:

5' **AGCATCGGTGGCTATCGCTGCG**GATGTTGACACAAGAGTTGGG

antiszensz primer:

5' **GCAGCG**ATAG**CCACCGATGCTT**AAGCGGCCGCGAATTCTGCAGTC

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

szensz primer:

5'- CAGT**GGTAACCA**TGACAACAGTGGGTTACGGC

antiszensz primer:

5'-CGC**GAATTC**CCCTTAAACATCGGTGAATATC

IV.8.3. Gélelektroforézis

A PCR reakció során keletkezett DNS termékeket 1%-os agaróz gélben futattuk meg, melyhez 0,5 µg/ml etídium bromidot adtunk. A mintákat 6x töltő pufferrel jelöltük, majd felvittük az 1x Tris-acetát-ETDA-ban (TAE) inkubálódó agaróz gélre. Kontrollként 1 kb DNS létrát alkalmaztunk (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham). 30 percen keresztül, 100V feszültség mellett futattuk a mintákat, majd alacsony intenzitású UV megvilágítás alatt kivágtuk az amplifikált DNS fragmentumokat a gélből.

IV.8.4. DNS extrakció és tisztítás

A DNS extrakcióhoz hagyományos fenol extrakciós módszert alkalmaztunk. A kivágott agaróz gélt centrifugálással homogenizáltuk, majd felvettük 400 µl fenolban és 20 percig -80 °C-on tároltuk. A kiolvasztott mintát centrifugáltuk (5000 RCF, 5 perc), és a felső, DNS-t tartalmazó réteget pipettával kinyertük. Ehhez 200 µl fenolt és 200 µl kloroformot adtunk, majd ismét centrifugáltuk (5000 g, 5 perc). A centrifugálás után kinyertük a felső réteget, amit 40 µl Na-acetáttal és 1ml tiszta etanollal kevertünk össze. A mintát 60 percig -

20°C-on inkubáltuk, majd ismét centrifugáltuk 4 °C-on (5000 g, 20 perc). A felülúszót eltávolítottuk és 1 ml 70%-os etanollal mostuk a DNS pelletet. Újabb centrifugálás (16000 g, 15 perc) után eltávolítottuk a felülúszót és kiszárítottuk a mintákat. A DNS koncentrációt NanoDrop 2000 spektrofotométerrel határoztuk meg (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham).

IV.8.5. Hasítás restrikciós enzimmel

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

IV.8.6. Ligálás, transzformálás, plazmidpreparálás

Ligálás során T4 DNA Ligase enzimet használtuk a gyártó utasításai alapján. A plazmid-inzert arány 1:5 volt (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA). A transzformáláshoz E. Coli (ET12567) kompetens sejteket használtunk. A plazmidokat felszuszpendáltuk 200 µl kompetens sejteket tartalmazó oldatban, majd 20 percig inkubáltuk a mintát jégen. 1 perces 42 °C-os hőshockot követően 2 percre ismét jégre helyeztük a mintákat. Ezt követően 800 µl SOC médiumot adtunk a sejtekhez és 200 1/perc sebességgel, 37°C-on rázattuk őket 45 percig. Időközben elkészítettük a 10ml LB agart (10 g/l tryptone, 5 g/l élesztő kivonat, 10 g/l NaCl, 1,5% agar, pH 7,0) és 50 µg/ml kanamycint tartalmazó tenyésztő lemezeket. A rázatást követően a transzformált sejteket lecentrifugáltuk (10 min, 400g) majd 200 µl SOC oldatba vettük fel és szélesztettük őket a tenyésztő lemezeken. A lemezeket 37 °C-on inkubáltuk 12-18 órán keresztül. A transzformált baktériumok egy-egy telepét 5ml, 50 µg/ml kanamycin tartalmú folyékony LB médiumba (10 g/l tryptone, 5 g/l élesztő kivonat, 10 g/l NaCl, pH 7,0) oltottuk le, majd 12-18 órán át rázattuk, 200 rpm-en, 37°C-on. A plazmid DNS kinyeréséhez a PureYield Plasmid Miniprep System-et (Promega Corporation, USA) használtuk a gyártó utasításait követve.

IV.8.7. DNS szekvenálás

A DNS mintákat a Debreceni Egyetem Klinikai Genomikai Központjának munkatársai szekvenálták, a szekvenálási eredményeket VectorNTI (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham) program felhasználásával ellenőriztük.

IV.9. Tranziens transzfecció

A CHO sejteket Lipofectamine 2000 reagenst használva transzfeccióztuk a gyártó (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) útmutatásai szerint. A transzfecciózt 12 lyukú

szövettenyésztő edényben, a sejtek kb. 80%-os konfluenciája mellett végeztük. A Kv1.3 csatornákat N-terminális EGFP (zöld fluoreszcens fehérje) jelöléssel láttuk el, így a transzfektált, csatornát expresszáló sejtek fluoreszcens mikroszkóp segítségével közel 100%-os pontossággal azonosíthatók. Az EGFP-pozitív, transzfektált sejteket Nikon TE2000U vagy TS100 inverz fluoreszcens mikroszkóppal azonosítottuk.

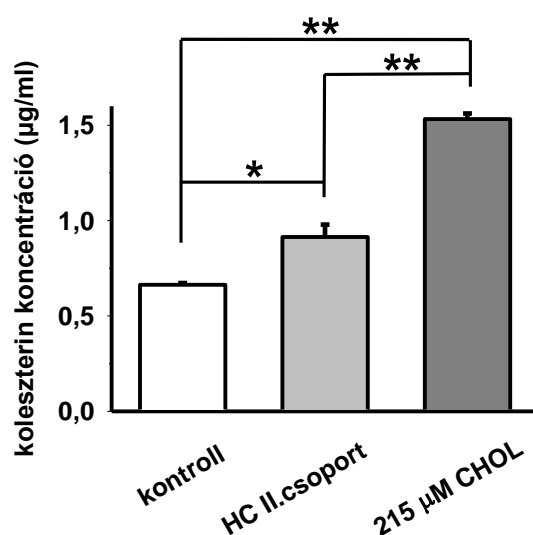
IV.10. Statisztika

Az eredmények statisztikai összehasonlítását Student féle t-tesztel (normális eloszlás esetén) vagy Mann-Whitney-próbával (nem normális eloszlás esetén) végeztük. Több mint két minta összehasonlítása során egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA) alkalmaztunk Holm-Sidak post hoc analízissel. A mérési eredmények feltüntetése során minden esetben az átlagértékeket és azok közepes hibáját (SEM) adtuk meg, $n > 4$ független mérésre. A szignifikáns eltéréseket $p < 0,05$ esetén *, $p < 0,001$ esetén ** jelöltük.

V. EREDMÉNYEK

V.1. A limfociták koleszterintartalmának vizsgálata hiperkoleszterinémiában

Korábbi irodalmi adatok alapján ismert, hogy hiperkoleszterinémia esetén megemelkedik a T-sejtek koleszterintartalma (174). Hipotézisünk szerint az emelkedett koleszterintartalom esetén a membrán koleszterintartalom is emelkedik, ami módosíthatja a transzmembrán fehérjék, így az ioncsatornák működését is. A korábbi eredmények megerősítése érdekében első lépésként összehasonlítottuk az egészséges donorokból illetve hiperkoleszterinémiás betegekből származó limfociták koleszterintartalmát. Pozitív kontrollként normokoleszterinémiás sejteket töltöttünk 215 μ M M β CD/CHOL segítségével. A koleszterintartalom meghatározásához az Anyagok és módszerek IV.5.1 fejezetében részletesen bemutatott Amplex-Red esszét használtuk fel. A koleszterin koncentráció meghatározása során kapott értékeket a 280 nm-en mérhető abszorbanciára normáltuk. Ezen a hullámhosszon mért abszorbancia arányos a mintában található fehérje (és a sejtek) mennyiségével, ami lehetővé teszi, hogy a normálás utáni mérési eredmények a sejtszámtól függetlenek legyenek. Méréseink során azt tapasztaltuk, hogy a hiperkoleszterinémiás betegekből izolált sejtek koleszterin koncentrációja szignifikánsan magasabb, mint a kontroll sejteké (kontroll: $0,66 \pm 0,009 \mu\text{g/ml}$, $n=3$, HC II. csoport: $0,91 \pm 0,07 \mu\text{g/ml}$, $n=3$, $p=0,007$). Azonban a 215 μ M M β CD/CHOL töltés a limfociták koleszterin koncentrációját nemcsak a kontroll, de a II. csoport hiperkoleszterinémiás sejtjeihez képest is magasabb értékre emeli



7. ábra. Hiperkoleszterinémia hatására megemelkedik a limfociták koleszterintartalma.

A kontroll, HC II. csoport és a 215 μ M M β CD/CHOL-nal töltött limfociták koleszterin tartalmát Amplex Red koleszterin esszé segítségével határoztuk meg (lásd Anyagok és módszerek IV.5.1). A szignifikáns eltéréseket * ($p<0,05$) és ** ($p<0,001$) jelöli.

(215 μ M M β CD/COL: 1,53 \pm 0,03 μ g/ml, n=3, mindkét esetben p <0,001; 7. ábra)

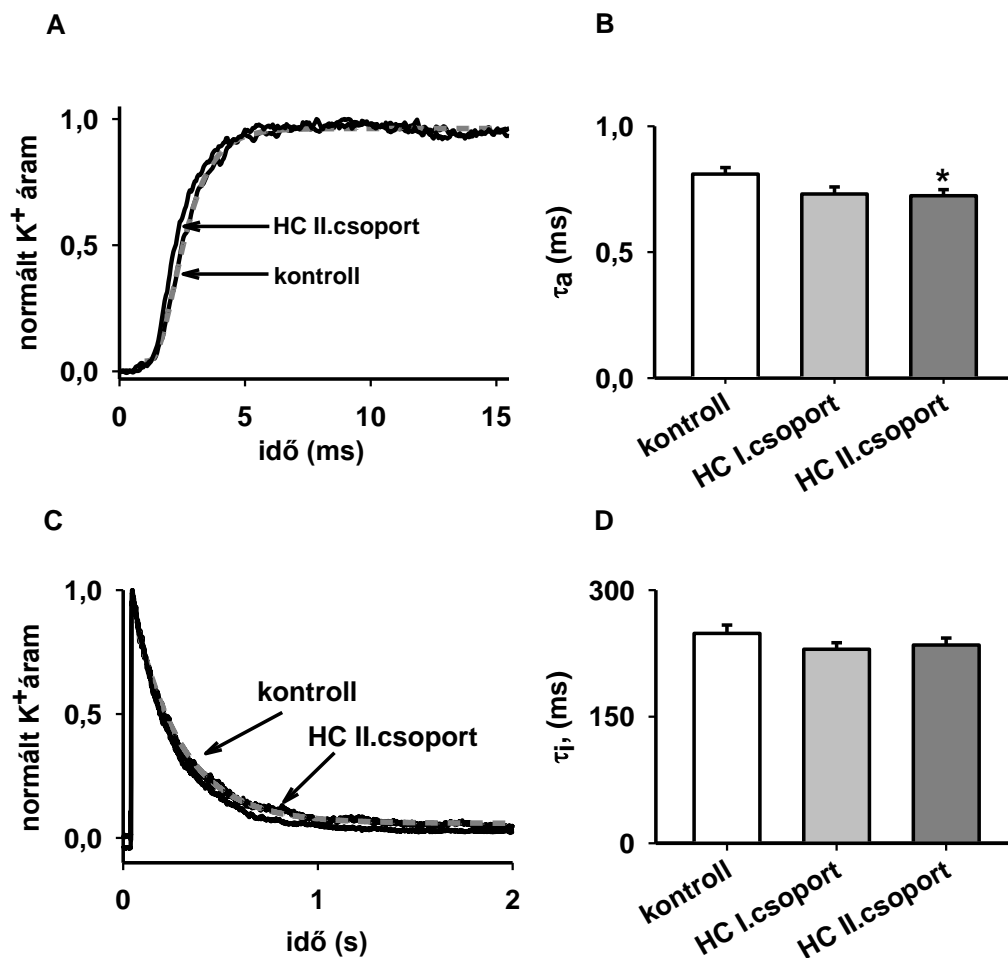
V.2. A Kv1.3 expressziójának vizsgálata hiperkoleszterinémia esetén

Munkacsoportunk korábbi eredményei szerint a limfociták koleszterinnel történő töltése lecsökkenti, a koleszterin membránból való kivonása növeli a Kv1.3 expresszióját (74). Ezek alapján feltételeztük, hogy a megemelkedett koleszterintartalommal jellemezhető HC sejtek Kv1.3 expressziója alacsonyabb, mint a kontroll sejteké. A Kv1.3 ioncsatorna expresszióját közvetett módon, az áramsűrűség meghatározásával jellemeztük. Az áramsűrűséget a teljes-sejt kapacitás és a +50mV-os depolarizáló impulzus során mért csúcsáram hányadosaként definiáltuk. A teljes-sejt kapacitás arányos a sejtmembrán felületével, a csúcsáram pedig a funkcionális csatornák számával. A hányados jól közelíti az egységnyi felületre jutó csatornaszámot, a funkcionális csatornaexpressziót. Eredményeink szerint a hiperkoleszterinémia nem változtatta meg szignifikánsan a +50mV-on mérhető csúcsáramot. Ehhez hasonlóan a sejtek kapacitása sem változott meg, melyből következik, hogy az áramsűrűség esetén sem találtunk szignifikáns eltérést. A két betegcsoport között szintén nem volt eltérés (1. táblázat).

V.3. A Kv1.3 ioncsatorna kapuzását jellemző biofizikai paraméterek meghatározása hiperkoleszterinémia esetén

Egészséges donorokból izolált limfociták M β CD/CHOL komplexszel történő töltése lassította a Kv1.3 ioncsatorna aktivációs és inaktivációs kinetikáját (74). Kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy a hiperkoleszterinémia az *in vitro* kísérletekhez hasonlóan befolyásolja-e a Kv1.3 ioncsatornák működését. A Kv1.3 ioncsatorna aktivációs kinetikájának vizsgálatához rövid depolarizációs impulzust alkalmaztunk (részletesebben lásd Anyagok és módszerek IV.7.3 fejezet). A gyorsan aktiválódó Kv1.3 ioncsatornák áramgörbéit a Hodgkin-Huxley szerinti modellel illesztve meghatároztuk az aktivációs kinetikát jellemző aktivációs időállandót. Az aktivációs időállandó a HC II. csoport esetén statisztikailag szignifikáns csökkenést mutatott, míg az I. csoport esetén nem volt szignifikánsnak tekintett eltérés a kontrollhoz képest (8. ábra, I. táblázat).

A két betegcsoport között nem volt szignifikáns eltérés ($p=0,859$). Az aktivációs kinetikát megvizsgáltuk 0 mV-ra történő depolarizáció során is, ahol a csatorna kinetikai paramétereinek feszültségfüggése miatt lassabb a csatorna nyitása. Ezen a tesztfeszültségen mind a két betegcsoport esetében szignifikáns gyorsulást találtunk a kontroll sejtekhez viszonyítva ($\tau_{\text{kontroll}} = 2,28 \pm 0,13$ ms, $n=50$, $\tau_{\text{HC I. csoport}} = 1,86 \pm 0,09$ ms, $n=48$, $p=0,05$; $\tau_{\text{HC II. csoport}} = 1,79 \pm 0,08$ ms, $n=40$, $p=0,002$). A két betegcsoport esetében itt sem volt különbség ($p=0,651$). A Kv1.3-ra jellemző C-típusú inaktiváció vizsgálatához két másodperc hosszú depolarizációt alkalmaztunk. Az inaktiválódó áramgörbék leszálló szárát exponenciális

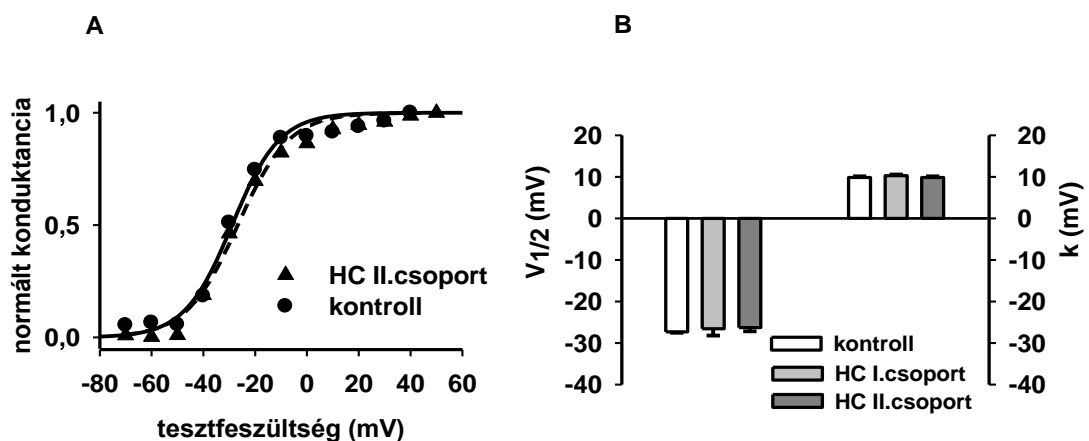


8. ábra. A hiperkoleszterinémia hatása a Kv1.3 kapuzásának kinetikai paramétereire. Az A ábrán egy kontroll és egy HC II. csoportból származó sejt aktivációjának vizsgálata során kapott áramgörbéje látható. Az áramgörbét a Hodgkin és Huxley által kidolgozott ún. n^4 -es modell szerint illesztettük (szaggatott vonal, lásd Anyagok és módszerek IV.7.3 fejezet), majd az aktivációs kinetikát az aktivációs időállandóval (τ_a) jellemeztük. Az inaktivációs kinetika jellemzéséhez (szaggatott vonallal) egy-exponenciális függvénnyel illesztettük az áramgörbék leszálló ágát és meghatároztuk az inaktivációs időállandót (τ_i). **(B,D)** Az oszlopdiagramokon az aktivációs és inaktivációs időállandók átlag \pm SEM értékeit tüntettük fel, * jelöli a szignifikáns eltérést ($p<0,05$).

függvénnyel illetve meghatároztuk az inaktivációs időállandót (τ_i). Az inaktivációs kinetika nem mutatott eltérést a kontroll és a hiperkoleszterinémias betegekből izolált limfociták esetén (1. táblázat). A mérsékelt és a jelentősen emelkedett koleszterinnel jellemzett betegcsoportok között szintén nem volt eltérés (1. táblázat).

V.4. Az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggése

A kinetikai paramétereket követően megvizsgáltuk az emelkedett koleszterinszint hatását a csatorna egyensúlyi aktivációjára. Korábbi *in vitro* kísérleteinkben az áramsűrűség és a kinetikai paraméterek mellett az egyensúlyi aktiváció is megváltozott, a kontroll limfociták félaktivációs feszültsége jobbra tolódott koleszterintöltés hatására (74). A HC sejtek egyensúlyi aktivációját két paraméterrel jellemeztük: a félaktivációs feszültséggel (mely megadja azt a membránpotenciál értéket, ahol a csatornák fele nyitott állapotban van) és az egyensúlyi aktiváció meredekségével. Ezen paraméterek a normált konduktancia-tesztfeszültség függvény illesztéséből közvetlenül meghatározhatók (G-V görbe). A kinetikai paraméterekhez hasonlóan az egyensúlyi aktiváció egyik paramétere sem mutatott eltérést hiperkoleszterinémia esetén (9. ábra, 1. táblázat). A két betegcsoportok között szintén nem volt eltérés (1. táblázat).



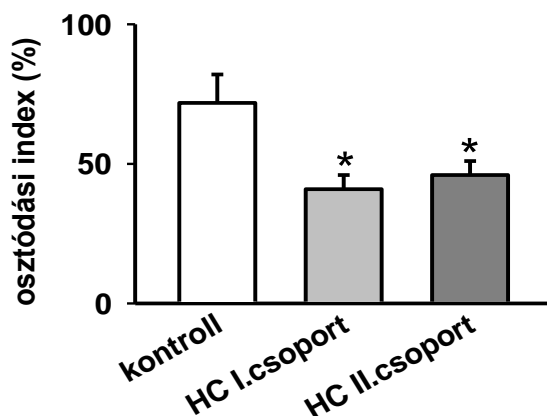
9. ábra Hiperkoleszterinémia hatására nem változik a limfociták Kv1.3 ioncsatornáinak egyensúlyi aktivációja. Az A ábrán egy kontroll és egy HC II. csoportba tartozó sejt G-V függvénye és hozzá illesztett Boltzmann görbéje látható (lásd Anyagok és módszerek IV.7.3 fejezet). (B) Az egyensúlyi aktivációt jellemző két paraméter (k : meredekség, $V_{1/2}$: félaktivációs feszültség) átlagai megegyeztek a kontroll és a két

	kontroll	HC I.csoport	p	HC II. csoport	p
I_{max} (pA)	642,1±44 (n=51)	631,9±48 (n=57)	0,87	620,2±37,4 (n=42)	0,74
C_m (pF)	1,68±0,17(n=51)	1,67±0,12(n=57)	0,96	1,54±0,09(n=42)	0,48
$J_{Kv1.3}$ (pA/pF)	499±65,4 (n=51)	450,7±41(n=57)	0,49	478,1±45,6 (n=42)	0,78
τ_a (ms)	0,81±0,03 (n=51)	0,731±0,03(n=57)	0,07	0,724±0,02 (n=42)	0,02*
τ_i (ms)	243,8±8 (n=41)	229,3±6,9(n=48)	0,17	234,9±8,2(n=35)	0,43
$V_{1/2}$ (mV)	-24,9±0,9 (n=26)	-26,5±1 (n=38)	0,25	-26,1±1(n=27)	0,43
k (mV)	10,8±0,4(n=26)	10,4±0,2(n=38)	0,32	10±0,3(n=27)	0,07

1. táblázat A Kv1.3 expresszióját és kapuzását jellemző paraméterek összehasonlítása egészséges (kontroll), mérsékelt (HC I. csoport) és jelentősen emelkedett (HC II. csoport) plazma koleszterinnel rendelkező személyekből izolált limfociták esetén. A táblázatban az átlag ± SEM értékeket tüntettük fel. I_{max} : +50mV-on mért csúcsáram, C_m : teljes-sejt kapacitás, $J_{Kv1.3}$: Kv1.3 áramsűrűség, τ_a : aktivációs időállandó, τ_i : inaktivációs időállandó, $V_{1/2}$: félaktivációs feszültség, k: egyensúlyi aktiváció meredekség; n= sejtszám, * jelöli a statisztikailag szignifikáns ($p < 0,05$) eltérést

V.5. Hiperkoleszterinémias betegekből izolált limfociták osztódásának vizsgálata CFSE hígulási esszével

A limfociták proliferációjának vizsgálatát az Anyagok és módszerek fejezetben részletesen bemutatott CFSE esszé segítségével végeztük anti-CD3-anti-CD28 stimulációt követően (Lásd Anyagok és módszerek IV.6.2 fejezet). Az öt napos stimuláció után a hiperkoleszterinémias betegek limfocitái szignifikánsan alacsonyabb osztódási indexet (OI) mutattak, mint az egészséges donorokból izolált sejtek (10. ábra, $OI_{kontroll}$: 71,8±10,2%, n=10; $OI_{HC\ I.csoport}$: 40,9±5,1%, n=7, $p=0,014$; $OI_{HC\ II.csoport}$: 46,0±5,0%, n=11, $p=0,02$). A két betegcsoport átlagos osztódási indexei között nem volt szignifikáns eltérés ($p=0,65$).



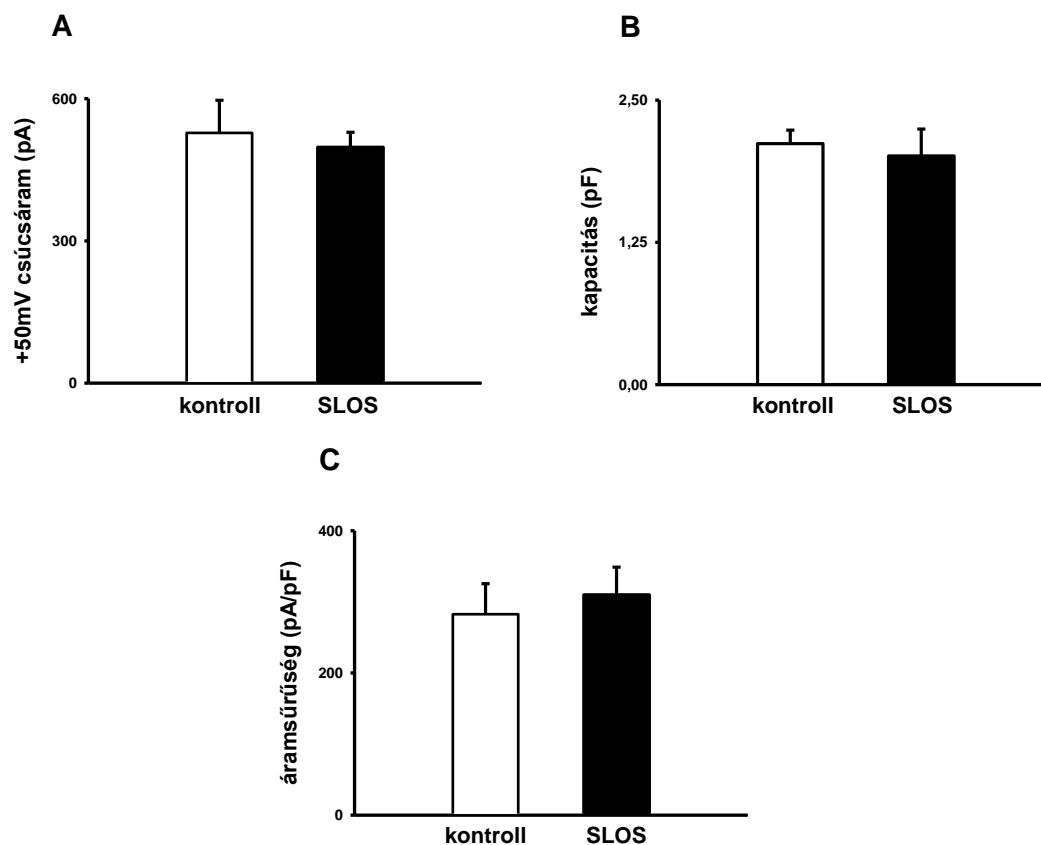
10. ábra A HC betegekből izolált T-sejtek osztódása zavart szenved Az egészséges kontroll és hiperkoleszterinémias T-sejtek CFSE esszével meghatározott osztódási indexe, (a CFSE esszé leírását lásd Anyagok és módszerek IV.6.2 fejezet).

V.6. A SLOS sejtek szterolösszetételének vizsgálata GC-MS módszerrel

Mivel az Amplex-Red esszével nem lehet különbséget tenni a koleszterin és oxidált/redukált származékai között, ezért az SLOS betegekből származó sejtek szterolösszetételének vizsgálatához GC-MS módszert alkalmaztunk (Ezen kísérleteket Dr. Péter Mária, az SZBK munkatársa végezte.). A perifériás vérből származó minták térfogata rendkívül limitált ezért kísérleteinkben limfociták helyett a nagy mennyiségben izolált vörösvértetek (vvt) szterolösszetételét határoztuk meg. A vvt mérés további előnye, hogy fejlett intracelluláris membránrendszerek hiányában a teljes sejt szterolmérése jó megközelítést ad a membrán koleszterinösszetételére. Az irodalmi adatoknak megfelelően minden egyes SLOS mintában sikerült azonosítanunk a kórjelző 7-dehidrokoleszterint, valamint izomerét, a 8-dehidrokoleszterint (21, 195). Kontroll mintáink esetében nem voltak detektálhatóak ezen vegyületek (2. táblázat). Eredményeink alátámasztják a korábbi megfigyeléseket, mely szerint a prekursor molekulák koncentrációjának növekedése mellett a sejtek koleszterinkoncentrációja szignifikánsan csökkent ($p=0,031$) (40, 205). Az összkoleszterin és 7DHC koncentrációk mellett meghatároztuk a minták 7DHC/CHOL arányát is, mely hasonló értékeket mutatott a korábbi egyetlen átfogó tanulmányban közölt eredményekhez (2. táblázat) (40).

minta sorszám	klinikai súlyosság	szterolkoncentráció (mmol/L)		
		CHOL	7DHC	7DHC/CHOL
SLOS#1	E	0,93	0,10	0,11
SLOS#2	E	1,23	0,30	0,25
SLOS#3	E	1,48	0,11	0,08
SLOS#4	T	1,73	0,93	0,54
SLOS#5	T	3,44	0,53	0,16
SLOS#6	T	0,13	0,76	5,63
SLOS#7	T	0,10	0,67	6,47
átlag±SEM	–	1,29±1,14	0,49±0,32	1,89±2,86
kontroll#1	–	5,08	ND	–
kontroll#2	–	4,75	ND	–
kontroll#3	–	4,36	ND	–
kontroll#4	–	4,83	ND	–
kontroll#5	–	2,46	ND	–
átlag±SEM	–	4,3±0,47	–	–

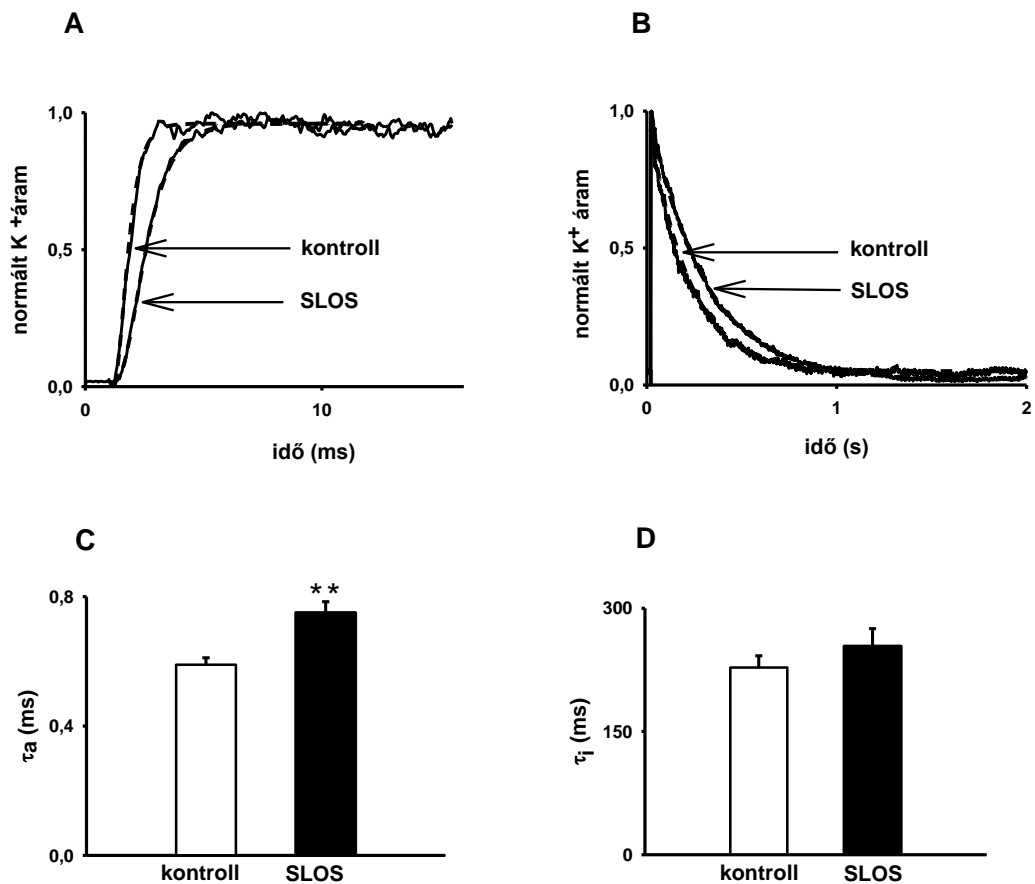
2. táblázat SLOS és egészséges minták szterolösszetétele. Az egyes minták különböző személyektől származnak. (CHOL: koleszterin; 7DHC: 7-dehidrokoleszterin; ND: nem detektálható; E: enyhe; T: tipikus, ** jelöli a kontrollhoz képesti szignifikáns eltérést p<0,05 esetén)



11. ábra. SLOS hatására nem változik a limfociták Kv1.3 ioncsatornáinak expressziója. Kontroll és SLOS T-sejtek +50 mV-on mért csúcsáramainak (A), teljes-sejt kapacitásainak (B) és áramsűrűségeinek (C) átlagértéke. Mindegyik panelen átlag \pm SEM értéket ábrázoltunk.

V.7. A Kv1.3 ioncsatorna expresszió vizsgálata SLOS esetén

SLOS esetén a sejtmembrán koleszterinszintjének csökkenésén túl az előalakok (pl. 7DHC, 8DHC) koncentrációja jelentősen megemelkedik. Nem ismeretes azonban az, hogy e vegyületek tudják-e helyettesíteni akár részben akár egészben a koleszterin élettani funkcióit (164). Az ioncsatornák működését számos ponton befolyásolhatja a sejtmembrán szteroljainak megváltozott aránya a (trafficking, laterális diffúzió, kapuzás). Az *in vitro* kísérletekben a koleszterin membránból történő kivonása a Kv1.3 expressziójának csökkenéséhez, a kinetikai paraméterek gyorsulásához vezetett (74). Nincs azonban adat arra vonatkozólag, hogy a csökkent koleszterin mellett az SLOS-ben megjelenő prekursor molekulák milyen hatással vannak a Kv ioncsatornák működésére. Munkánk során az SLOS ioncsatornákra gyakorolt hatását (a hiperkoleszterinémiához hasonlóan) a betegekből izolált limfociták Kv1.3 csatornáin keresztül tanulmányoztuk. A csatorna expresszióját ismételtén indirekt módon, az áramsűrűség meghatározásával jellemeztük (Lásd Anyagok és módszerek



12. ábra. A SLOS hatására lassul a Kv1.3 aktivációs kinetikája. (A) rövid depolarizációs impulzus hatására (15 ms, +50 mV) aktiválódó Kv1.3 ioncsatornák reprezentatív áramgörbéi láthatók egy SLOS és kontroll sejten regisztrálva (lásd Anyagok és módszerek IV.7.3 fejezet). **A B** ábrán egy kontroll és egy SLOS sejt inaktivációs áramgörbéje látható (lásd Anyagok és Módszerek IV.7.3 fejezet). Az oszlopdiagrammokon az aktivációs **(C)** és inaktivációs **(D)** időállandók átlag±SEM értékeit tüntettük fel, ** jelöli a szignifikáns eltérést ($p < 0,001$, 2 .táblázat).

IV.7.3). Az SLOS sejtek esetén a +50 mV tesztpotenciálon mért csúcáram, a teljes sejt membránkapacitása és a kettő hányadosaként definiált áramsűrűség nem tért el a kontroll sejtek esetén mért értékektől (11. ábra, 3. táblázat). Az áramsűrűség változatlan értéke arra utal, hogy az egységnyi felületre jutó funkcionális csatornák száma nem változik SLOS-ben.

V.8. A Kv1.3 kapuzását jellemző biofizikai paraméterek meghatározása SLOS esetén

A kinetikai paraméterek vizsgálatát az Anyagok és módszerek IV.7.3 fejezetében leírtaknak megfelelően végeztük. Az 12. A és B ábra egy reprezentatív kontroll és SLOS sejt Kv1.3 áramgörbéit mutatja, melyek alkalmasak az aktivációs és az inaktivációs kinetika jellemzésére. Az áramgörbéket illesztve meghatároztuk az aktivációs és inaktivációs időállandókat (12 C és D ábra). Az SLOS sejtek aktivációs időállandója szignifikánsan megnőtt a kontroll sejtekhez viszonyítva, az inaktivációs kinetika esetén azonban nem volt

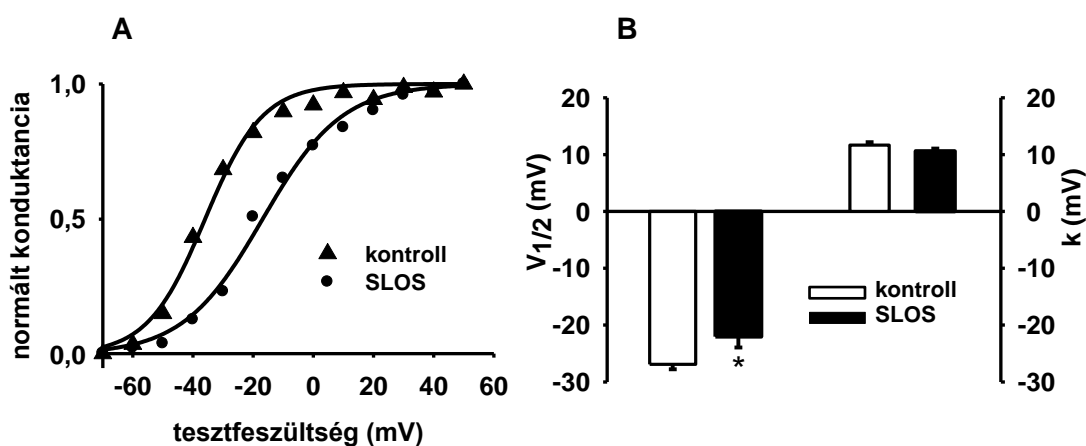
	kontroll	SLOS	p
$I_{peak}(pA)$	$528,0 \pm 69$ (n=56)	$497,5 \pm 318$ (n=51)	0,695
C_m (pF)	$2,1 \pm 0,1$ (n=56)	$2,0 \pm 0,2$ (n=51)	0,688
$J_{Kv1,3}$ (pA/pF)	$282,5 \pm 42,9$ (n=56)	$309,8 \pm 39$ (n=51)	0,645
τ_a (ms)	$0,59 \pm 0,02$ (n=56)	$0,75 \pm 0,03$ (n=51)	0,001*
τ_i (ms)	$227,8 \pm 14,2$ (n=38)	$253,7 \pm 21,4$ (n = 45)	0,329
$V_{1/2}$ (mV)	$-26,9 \pm 0,9$ (n=41)	$-22,0 \pm 1,9$ (n=35)	0,030*
k (mV)	$11,7 \pm 0,5$ (n=41)	$10,6 \pm 0,5$ (n=35)	0,140

3. táblázat A Kv1.3 expresszióját és kapuzását jellemző paraméterek összehasonlítása egészséges (kontroll) és SLOS-ból izolált T limfociták esetén. A táblázatban az átlag \pm SEM értékeket tüntettük fel. I_{max} : +50mV-on mért csúcsáram, C_m : teljes-sejt kapacitás, $J_{Kv1,3}$: Kv1.3 áramsűrűség, τ_a : aktivációs időállandó, τ_i : inaktivációs időállandó, $V_{1/2}$: félaktivációs-feszültség, k: egyensúlyi aktiváció meredeksége; n= sejtszám ; * jelöli a statisztikailag szignifikáns eltéréseket $p<0.05$ esetén

statisztikailag szignifikáns eltérés (3. táblázat). Az aktivációs időállandó növekedéséből a csatorna aktivációjának lassulására következtethetünk, mely negatívan befolyásolhatja a Kv1.3 élettani feladatainak ellátását.

V.9. Az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggése

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

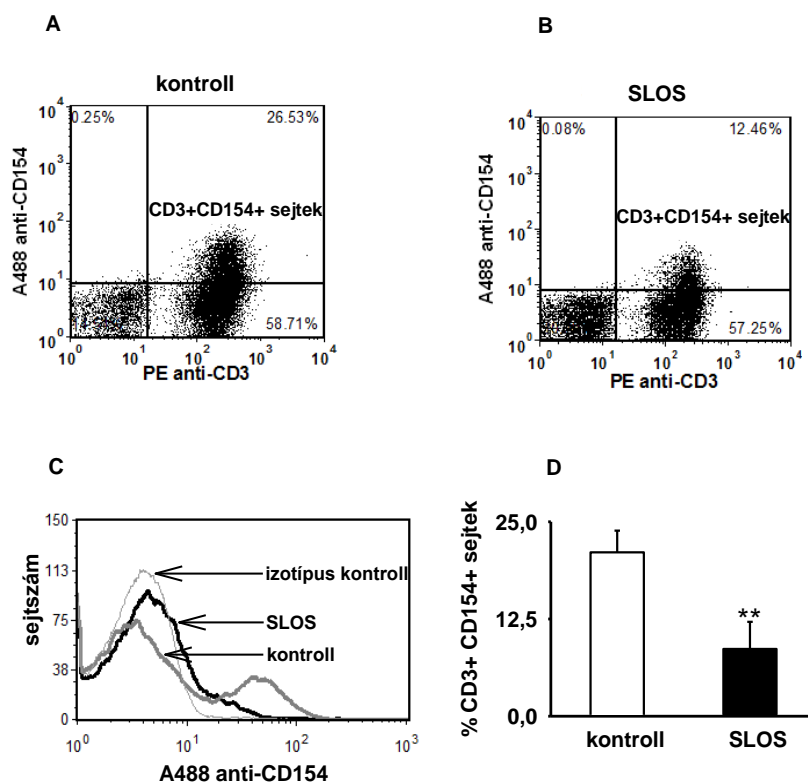


13. ábra Az egyensúlyi aktiváció jobbra tolódik az SLOS-ból izolált limfociták esetén. Az A ábrán egy kontroll és egy SLOS sejt reprezentatív G-V görbéje látható (lásd Anyagok és módszerek IV.7.3 fejezet). (B) Az oszlopdiaagramon a félaktivációs feszültség és meredekség átlag \pm SEM értékeit tüntettük fel, * jelöli a szignifikáns eltérést ($p<0,05$, 3. táblázat).

adott membránpotenciálon (lásd Anyagok és módszerek IV.7.3 fejezet). A 13. A ábrán egy reprezentatív kontroll és SLOS sejt G-V függvénye látható. Az SLOS-sejt egyensúlyi aktivációját jellemző Boltzmann-görbe a kontrollhoz viszonyítva jobbra tolódott, azaz ugyanolyan nyitási valószínűség eléréséhez az SLOS sejteket pozitívabb értékekre kell depolarizálni, mint a kontroll sejteket. A félaktivációs feszültség szignifikáns növekedésével szemben az egyensúlyi aktiváció meredeksége nem változott meg (13. B ábra, 3. táblázat).

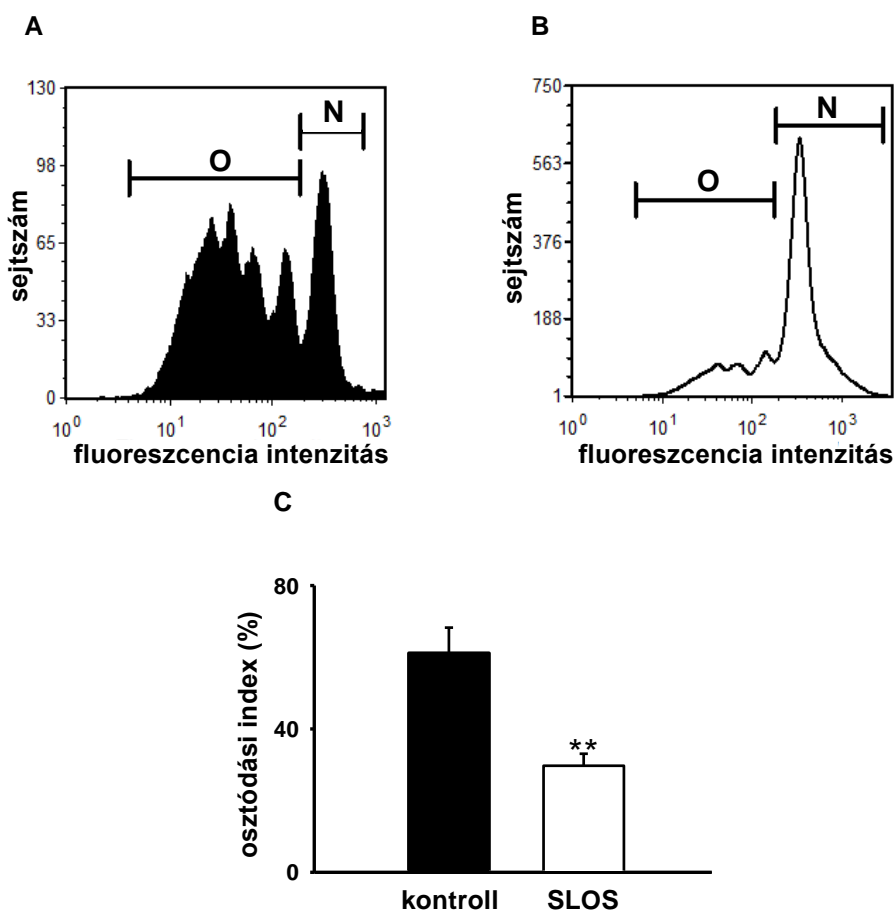
V.10. SLOS-ból izolált limfociták aktivációjának és proliferációjának vizsgálata

A T-limfociták aktivációjában és proliferációjában központi szerepet játszik a kalciumjel és az ehhez kapcsolódó jelátviteli útvonalak. A kalciumjel kialakításában esszenciálisnak tűnik a feszültségfüggő Kv1.3 és a kalciumraktárak ürülésének hatására



14. ábra A T-sejt aktiváció zavart szenved SLOS-ben A CD3+ T-sejtek aktivációját egy korai aktivációs marker, a CD 154 expressziójával monitoroztuk. Az **A** és **B** ábrán egy aktivált kontroll és SLOS minta PE anti-CD3 és A488 anti-CD154 jelölést követő reprezentatív dot-plotja látható. A **C** ábrán ugyanazon minták CD3+ sejtjeinek A488 anti-CD154 fluoreszcencia intenzitása látható az izotípus kontroll feltüntetésével. (**D**) Az oszlopdiaagramon a CD154 pozitív sejtek arányának átlag±SEM értékeit tüntettük fel, ** jelöli a szignifikáns eltérést ($p < 0,001$).

aktiválódó CRAC csatornák összehangolt működése. Hipotézisünk szerint a sejtmembrán megemelkedett 7DHC/CHOL aránya negatívan befolyásolja a kalciumjel kialakításában részt vevő (pl. Kv1.3) ioncsatornák működését mely a T-sejt aktiváció és proliferáció károsodásához vezethet. A T-sejt aktiváció következtében számos kalciumfüggő sejt felszíni molekula expressziója megemelkedik, ezek monitorozása indirekt információt szolgáltat a limfociták aktivációjáról. Kísérleteinkben thapsigargin stimulust követően vizsgáltuk egy korai T-sejt aktivációs marker, a CD154 (más nomenklaturában CD40 ligand) expresszióját. A CD154 expressziója normál körülmények között az aktivációt követően megemelkedő intracelluláris kalcium hatására rövid időn megemelkedik (207). Kísérleteinkben 3 órán keresztül stimuláltunk egészséges és SLOS mononukleáris sejteket. Az aktivációt követően PE-konjugált anti-CD3-mal és A488 konjugált anti-CD154-gyel jelöltük a sejteket. A T-sejteket a CD3 pozitívitás alapján azonosítottuk. Eredményeink szerint az SLOS betegekből izolált mononukleáris sejtek esetén zavart szenved a T-sejt aktiváció, a CD154 pozitív T-sejtek aránya szignifikánsan csökkent (14. ábra, CD3⁺CD154⁺ sejtek aránya SLOS-ben: 8,6 ± 3,2%, n=5; kontroll esetén: 21,1 ± 2,8%, n=4, p<0,001). A limfociták aktivációját a sejtek osztódása követi. Az SLOS sejtek proliferációjának vizsgálatához a korábban ismertetett CFSE hígulási esszét alkalmaztuk. A T-sejt receptorait anti-CD3 és anti-CD28 antitestek segítségével aktiváltuk, majd öt nappal később ellenőriztük a sejtek osztódását. Az SLOS betegekből izolált sejtek osztódási indexe jelentősen csökkent a kontroll sejtekhez viszonyítva (15. ábra, OI_{kontroll}: 61,1 ± 7,1%, n = 5; OI_{SLOS}: 29,4 ± 3,5%, n = 6, p=0,002).

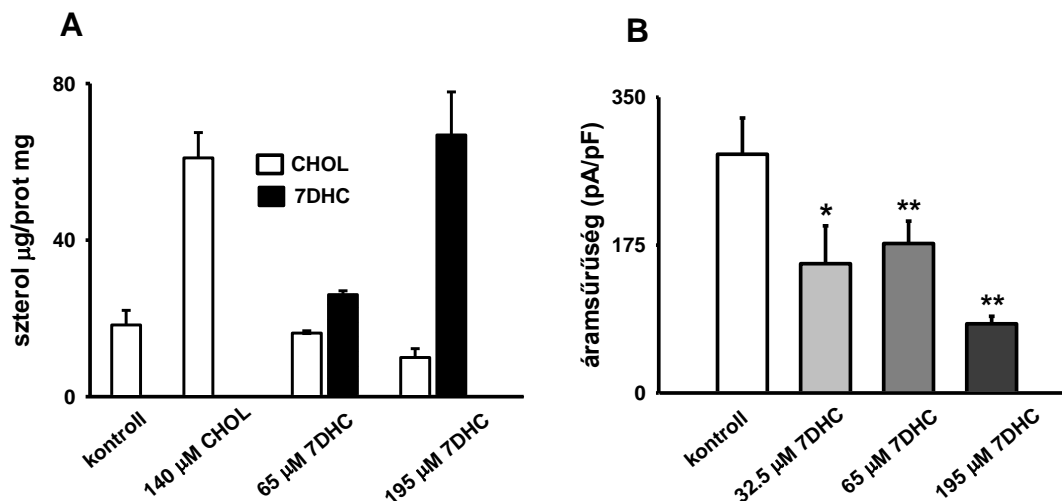


15. ábra SLOS-ban csökken a T-sejtek osztódási indexe. Az egészséges donorokból izolált kontroll és SLOS sejtek proliferációját CFSE hígulási esszével követtük. Az **A** és **B** ábrán egy kontroll és egy SLOS minta CFSE eloszlási hisztogramja látható az öt napos stimulációt követően. N-el jelöltük a kiindulási fluoreszcencia tartalommal rendelkező (nem osztódott) sejteket, míg O jelöli az osztódások következtében alacsonyabb fluoreszcencia intenzitással jellemezhető utódsejteket. **(C)** Az oszlopdiagramon az osztódási indexek átlag±SEM értékeit tüntettük fel, ** jelöli a szignifikáns eltérést (p=0,002)

V.11. SLOS modellrendszer kialakítása MβCD/7DHC komplex segítségével

Hipotézisünk szerint a sejtmembrán megváltozott szterolösszetétele felelős a Kv1.3 ioncsatorna módosult működéséért SLOS-ben. Ennek igazolására létrehoztunk egy modellrendszert, ahol *in vitro* körülmények között növeltük a sejtek 7DHC-tartalmát, létrehozva az SLOS-re jellemző emelkedett 7DHC/CHOL arányt. A töltéshez 7DHC/MβCD komplexet alkalmaztunk. Az egészséges donorokból izolált mononukleáris sejteket több koncentrációban inkubáltuk 7DHC/MβCD-vel, majd GC-MS technikával ellenőriztük a töltés hatékonyságát. Eredményeink szerint a töltés dóziszfüggő módon emelte a sejtek 7DHC koncentrációját és csökkentette a koleszterintartalmát, kialakítva az SLOS-re jellemző szterolösszetételt (16. ábra; fehérje tartalomra normált 7DHC koncentráció 65μM

M β CD/7DHC töltést követően $26,1 \pm 1,0$ $\mu\text{g}/\text{mg}$, míg 195 μM M β CD/7DHC töltést követően $66,8 \pm 11$ $\mu\text{g}/\text{mg}$. A fehérje tartalomra normált koleszterinkoncentráció: $18,3 \pm 3,7$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ a kontroll esetén, 65 μM M β CD/7DHC töltés követően $16,2 \pm 0,2$ $\mu\text{g}/\text{mg}$, míg 195 μM M β CD/7DHC töltést követően $13,3 \pm 2$ $\mu\text{g}/\text{mg}$). Ezen adatok alapján a 7DHC töltött sejtek alkalmasak lehetnek az SLOS sejszintű hatásainak modellezésére.



16. ábra M β CD/7DHC töltéssel modellezni lehet az Smith-Lemli-Opitz szindróma hatását a sejtek szterolösszetételére. (A) Az egészséges donorokból izolált kontroll sejteket különböző koncentrációjú M β CD/7DHC komplexszel töltöttük, majd GC-MS készülék segítségével vizsgáltuk a sejtek szterolösszetételét (lásd Anyagok és módszerek IV.5.2 fejezet). Pozitív kontrollként M β CD/CHOL komplexet alkalmaztunk. A minták 7DHC tartalma dóziszfüggő emelkedést mutatott, míg a koleszterin csökkent. A minták 7DHC/koleszterin aránya a SLOS-re jellemzően, szignifikánsan megemelkedett. **(B)** A 7DHC-val töltött sejtek áramsűrűsége a kezelés hatására csökkent (4. táblázat).

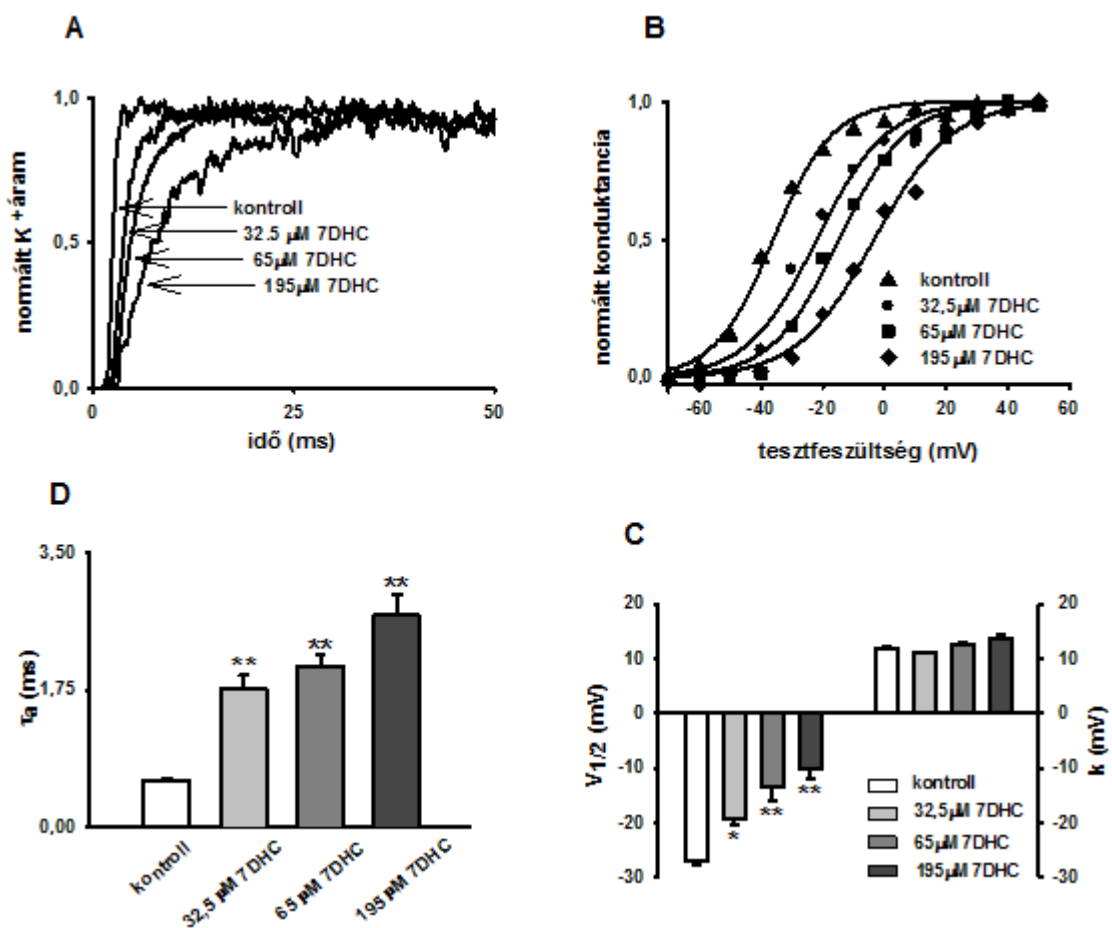
V.12. Kv1.3 ioncsatornák vizsgálata SLOS modellrendszerben

A 7DHC töltés hatását a Kv1.3 expressziójára és a csatorna kapuzására egészséges donorokból izolált limfociták esetén teszteltük. A sejteket három különböző koncentrációban töltöttük M β CD/7DHC-val, majd patch-clamp technikával vizsgáltuk a Kv1.3 kinetikai és egyensúlyi paramétereit, valamint az áramsűrűséget. Az elektrofiziológiai méréseket a korábban részletezett protokollok felhasználásával, teljes-sejt konfigurációban végeztük (lásd Anyagok és módszerek IV.7.3 fejezet) A 7DHC töltés hatására a csatorna aktivációs és inaktivációs kinetikája egyaránt lelassult (17. A és C ábra, 4. táblázat), az M β CD/7DHC koncentrációjának növelésével párhuzamosan az aktivációs, inaktivációs időállandó is dóziszfüggően növekedett. Az egyensúlyi aktiváció esetében a G-V görbe dóziszfüggően jobbra tolódott, a félaktivációs feszültség pedig szignifikánsan megnőtt (17.B és D ábra, 4. táblázat). Az egyensúlyi aktiváció meredeksége nem változott. Ezen eltérések iránya

megegyezik az SLOS-ben találtakkal, mértékük azonban sokkal markánsabb. A csatorna expresszióját a korábbiakhoz hasonlóan, az áramsűrűség meghatározásával, indirekt módon jellemeztük. A 7DHC töltés hatására a teljes-sejt kapacitás nem változott, a +50mV-os depolarizációs során mért csúcsáram azonban a kezelés koncentrációjával fordított arányosan változott. A két paraméter hányadosaként definiált áramsűrűség szignifikáns, dózisfüggő csökkenést mutatott (17. B ábra, 4. táblázat).

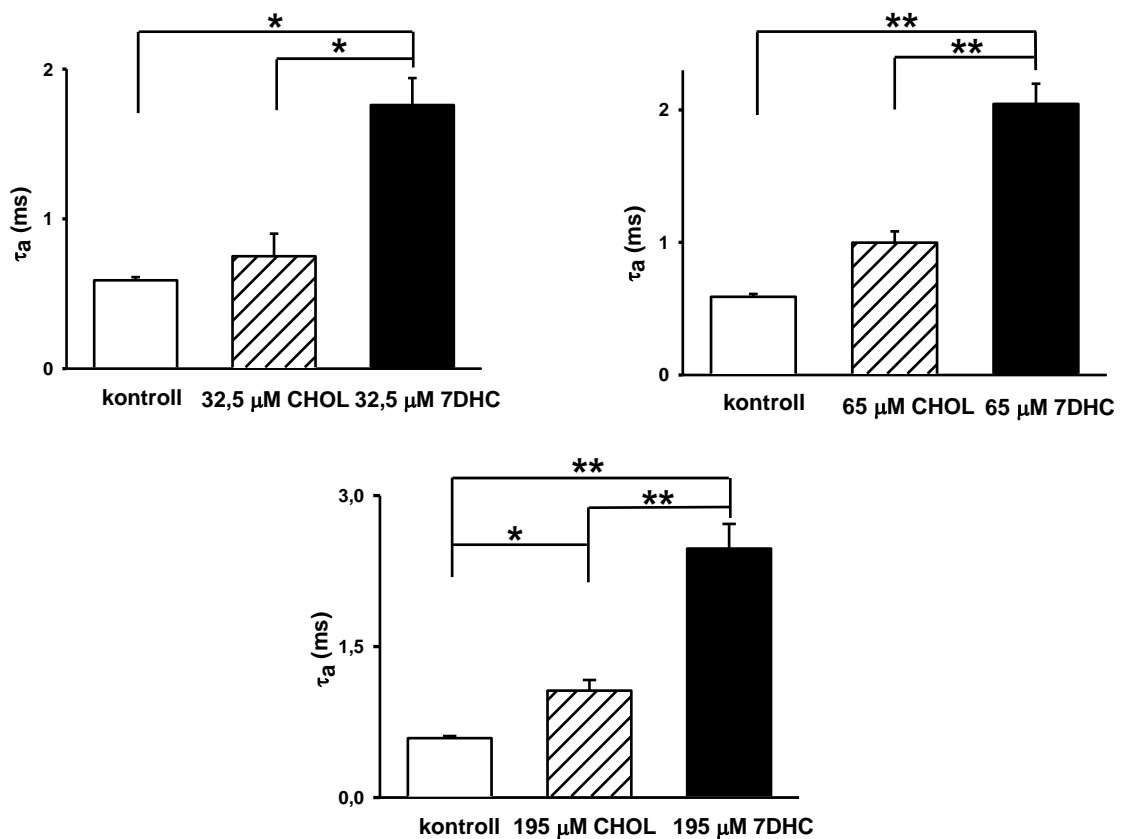
V.13. A CHOL és 7DHC töltés Kv1.3 ioncsatornákra gyakorolt hatásának összehasonlítása

Korábbi eredményeink szerint az *in vitro* koleszterin töltés a 7DHC töltéshez hasonlóan lassította a Kv1.3 csatorna kinetikai paramétereit, az egyensúlyi aktivációt pedig a pozitívabb membránpotenciálok felé tolta el (74). Felmerül a kérdés, hogy van-e eltérés a



17. ábra MβCD/7DHC komplexszel történő kezeléssel modellezni lehet az SLOS-ban talált elektrofiziológiai eltéréseket. Különböző koncentrációjú MβCD/7DHC töltést követően regisztrált reprezentatív áram (A) és G-V görbék (B). Az oszlopdigramokon az aktivációs időállandók (C), valamint az egyensúlyi aktiváció félaptevíciós feszültségének és meredekségének (D) átlag±SEM értékeit tüntettük fel. A szignifikáns eltéréseket * (p<0,05) és ** (p<0,001) jelöli (lásd még 4. táblázat).

koleszterin illetve 7DHC töltés hatása között, vagy a két molekula teljesen azonos módon, az össz-szterol koncentráció emelésén keresztül hat a csatornákra. Ennek eldöntéséhez azonos koncentrációjú koleszterin és 7DHC töltést alkalmaztunk egészséges donorokból izolált limfociták esetén, majd megvizsgáltuk a Kv1.3 biofizikai paramétereit. Az elektrofiziológiai mérések alapján a két szterol hasonlóan hat a Kv1.3 működésére, azonban a Kv1.3 ioncsatorna sokkal érzékenyebb azonos koncentrációjú 7DHC töltésre, mint koleszterinre. 32,5 μM 7DHC töltés esetén már szignifikánsan növekedett az aktivációs időállandó és a



18. ábra Az azonos koncentrációjú 7DHC és CHOL töltés eltérő mértékben lassítja a limfociták Kv1.3 ioncsatornáinak aktivációs kinetikáját. Az oszlopdiagramokon 32,5 (A) 65 (B) és 195 (C) μM 7DHC és CHOL töltést követően, az Anyagok és módszerek IV.7.3 fejezetében leírtak szerint meghatározott aktivációs időállandók $\text{átlag} \pm \text{SEM}$ értékeit tüntettük fel. A szignifikáns eltéréseket *(p<0,05) és ***(p<0,001) jelöli (lásd még 4. táblázat).

félaktivációs feszültség, míg a koleszterinnel végzett töltésnek ilyen körülmények között nem volt hatása. Magasabb koncentrációjú koleszterin a 7DHC töltéshez hasonlóan szignifikáns eltéréseket okozott, azonban a 7DHC hatása minden esetben statisztikailag jelentősebb volt a koleszterinhez viszonyítva (18. és 19. ábra, 4. táblázat).

	kontroll	32,5 μ M			65 μ M			195 μ M					
		CHOL	p	7DHC	CHOL	p	7DHC	CHOL	p	7DHC			
I_{max} (pA)	528,0 \pm 69 (n=56)	311 \pm 23,8 (n=5)	0,023*	296,5 \pm 52,5 (n=7)	0,002*	359,54 \pm 36,60 (n=5)	0,060	300,0 \pm 37,4 (n=11)	0,003*	240,11 \pm 51,1 (n=7)	<0,001*	174,8 \pm 9,1 (n=11)	<0,001*
C_m (pF)	2,1 \pm 0,1 (n=56)	2,42 \pm 0,2 (n=5)	0,722	2,20 \pm 0,22 (n=7)	0,80	1,76 \pm 0,27 (n=5)	0,81	2,02 \pm 0,29 (n=11)	0,81	1,89 \pm 0,25 (n=7)	0,614	2,26 \pm 0,21 (n=11)	0,65
J (pA/pF)	282,5 \pm 42,9 (n=56)	132,6 \pm 14,8 (n=5)	0,024*	153,0 \pm 44,8 (n=7)	0,005*	222,81 \pm 39 (n=5)	0,257	176,9 \pm 26,5 (n=11)	0,002*	150,97 \pm 46,05 (n=7)	0,012*	81,9 \pm 8,9 (n=11)	<0,001*
τ_a (ms)	0,59 \pm 0,02 (n=56)	0,75 \pm 0,15 (n=5)	0,40	1,76 \pm 0,18 (n=7)	<0,001*	0,99 \pm 0,09 (n=5)	0,059	2,04 \pm 0,15 (n=11)	<0,001*	1,05 \pm 0,09 (n=5)	0,02*	2,70 \pm 0,26 (n=11)	<0,001*
τ_i (ms)	227,8 \pm 14,2 (n=38)	188,96 \pm 9,82 (n=5)	0,101	318,57 \pm 22 (n=5)	0,064	204,47 \pm 31,41 (n=5)	0,653	339 \pm 57 (n=6)	0,02*	220,17 \pm 9,96 (n=5)	0,757	362 \pm 26,4 (n=5)	<0,001*
$V_{1/2}$ (mV)	-26,9 \pm 0,9 (n=41)	-24,4 \pm 3,1 (n=5)	0,318	-19,2 \pm 1,3 (n=6)	<0,001*	-17,4 \pm 0,58 (n=5)	0,024*	-13,4 \pm 2,6 (n=9)	<0,001*	-16,2 \pm 2,72 (n=5)	<0,001*	-10,1 \pm 1,9 (n=9)	<0,001*
k (mV)	11,7 \pm 0,5 (n=41)	13,96 \pm 1,9 (n=5)	0,103	11,07 \pm 0,11 (n=6)	0,53	11,282 \pm 1,07 (n=5)	0,73	12,48 \pm 0,56 (n=9)	0,34	15,19 \pm 2,07 (n=5)	0,038*	13,58 \pm 0,80 (n=9)	0,03*

4. táblázat Azonos koncentrációjú koleszterin és 7DHC töltés Kv1.3 ioncsatorna kapuzására gyakorolt hatásának összehasonlítása A táblázatban az átlag \pm SEM értékeket

tüntettük fel. I_{max} : +50mV-on mért csúcáram, C_m : a teljessejt kapacitása, J: áramsűrűség, τ_a :

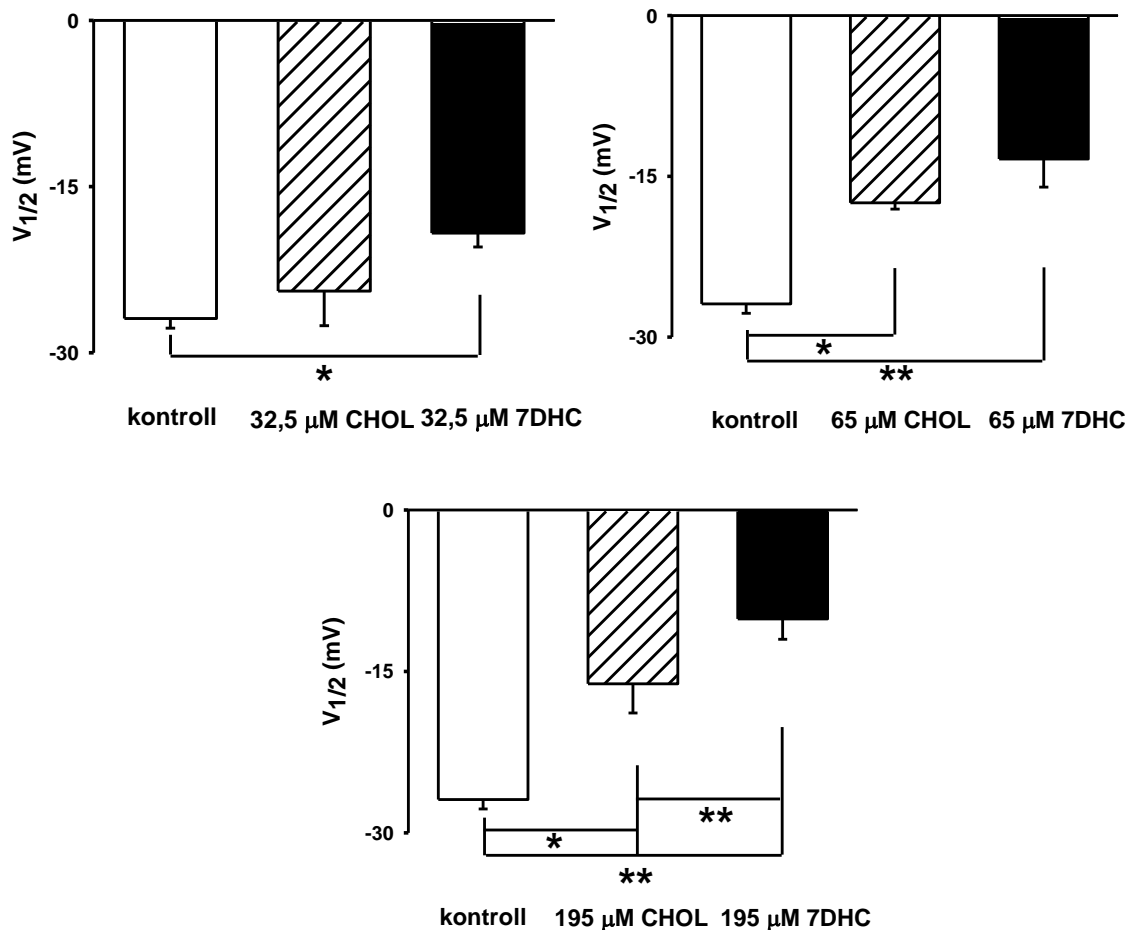
aktivációs időállandó, τ_i : inaktivációs időállandó, $V_{1/2}$: félaktivációs-feszültség, k: egyensúlyi

aktiváció meredeksége; n= sejtszám; * jelöli a kontrollhoz képest statisztikailag szignifikáns

eltéréseket p<0,05 esetén.

V.14. A Kv1.3 C-terminálisának eltávolítása megszünteti a csatorna szterollokkal szembeni érzékenységét

Az feszültségfüggő ioncsatornák felépítésében részt vevő transzmembrán szegmensek szerkezete és funkciója többnyire ismert. A csatornák szigorúan értelemben vett működéséhez (kapuzás, szelektív permeabilitás) nem esszenciális C-terminálisról azonban hiányosak az ismereteink. Feltételezésünk szerint a Kv1.3 C-terminálisa, mivel tartalmaz CRAC/CARC koleszterinkötő helyeket, fontos szerepet játszhat a csatorna szterollokkal történő interakciójában is. Ennek bizonyítására a vad típusú Kv1.3 (VT-Kv1.3) mellett olyan rövidített (deléciós mutáns) Kv1.3 konstruktot (Δ C-Kv1.3) vizsgáltunk, mely esetében hiányzott a C-



19. ábra Az azonos koncentrációjú 7DHC és CHOL töltés eltérő mértékben módosítja a limfociták Kv1.3 ioncsatornáinak egyensúlyi aktivációját. Az oszlopdiaagramokon 32,5 (A) 65 (B) és 195 (C) μM 7DHC és CHOL töltést követően, az Anyagok és módszerek IV.7.3 fejezetében leírtak szerint meghatározott féllaktivációs feszültségek átlag±SEM értékeit tüntettük fel. A szignifikáns eltéréseket *($p < 0,05$) és **($p < 0,001$) jelöli (lásd még 4. táblázat).

terminális jelentős részét kitevő, utolsó 84 aminosav (20. ábra). Munkacsoportunk korábbi eredményei szerint ezen szakasz eltávolítása nem befolyásolta szignifikánsan a csatorna működését, azaz a csatorna kapuzását jellemző biofizikai paraméterek nem változtak a vad típusú csatornához képest (192). Kísérleteinkben a korábbiakhoz hasonló módszerrel töltöttük a ΔC -Kv1.3 és VT-Kv1.3 ioncsatornát stabilan expresszáló CHO sejteket koleszterinnel és 7DHC-val. A töltött sejtek Kv1.3 ioncsatornáit a korábban alkalmazott elektrofiziológiai protokollok szerint vizsgáltuk, azzal az eltéréssel, hogy teljes-sejt helyett outside-out konfigurációt alkalmaztunk. A CHO sejtekben ugyanis a teljes sejt Kv1.3 csúcsáram +50 mV-on több nA volt, az ebből adódó soros ellenállás hibáját az outside-out konfiguráció a membránfelszín és az ezzel párhuzamos áramerősség-csökkenés miatt eliminálja. A VT-Kv1.3 csatornát expresszáló CHO sejtek koleszterinnel, illetve 7DHC-vel történő töltése (420 μ M) a csatorna kapuzását jellemző kinetikai paraméterek lassulását és az egyensúlyi aktiváció feszültség függésének jobbra tolódását okozza (20. ábra, 5. táblázat). A CHO sejtek koleszterinnel, illetve 7DHC-vel történő töltése tehát kvalitatíven hasonló eredményt adott a Kv1.3-at endogéne kifejező limfociták kezelésekor kapotthoz (ld. 16. 17. és 18. és 19. ábrák, valamint (74)). Az outside-out konfigurációban kapott eredmények ezen felül megerősítik azon korábbi feltevésünket, hogy a ciklodextrin/szterol komplexek nem az ioncsatorna citoplazmatikus regulátorain keresztül befolyásolják a Kv1.3 működését, ugyanis ez utóbbiak jelentősége outside-out konfigurációban elenyésző, a ciklodextrin/szterol komplexek hatása viszont megmarad. A Kv1.3 csatorna C-terminálisának delécióna megszüntette a csatorna szterolérzékenységét: ΔC -Kv1.3 csatorna esetében a 420 μ M-os CHOL és 7DHC töltés nem volt hatással a csatorna kapuzására: az aktivációs időállandó és félaktivációs feszültség esetében sem volt eltérés a kezelt és kezeletlen sejtek között (20. B és E ábrák, 5. táblázat). Ezek alapján feltételezhető, hogy a csatorna C-terminálisa fontos szerepet játszik a csatorna szterolok általi szabályozásában.

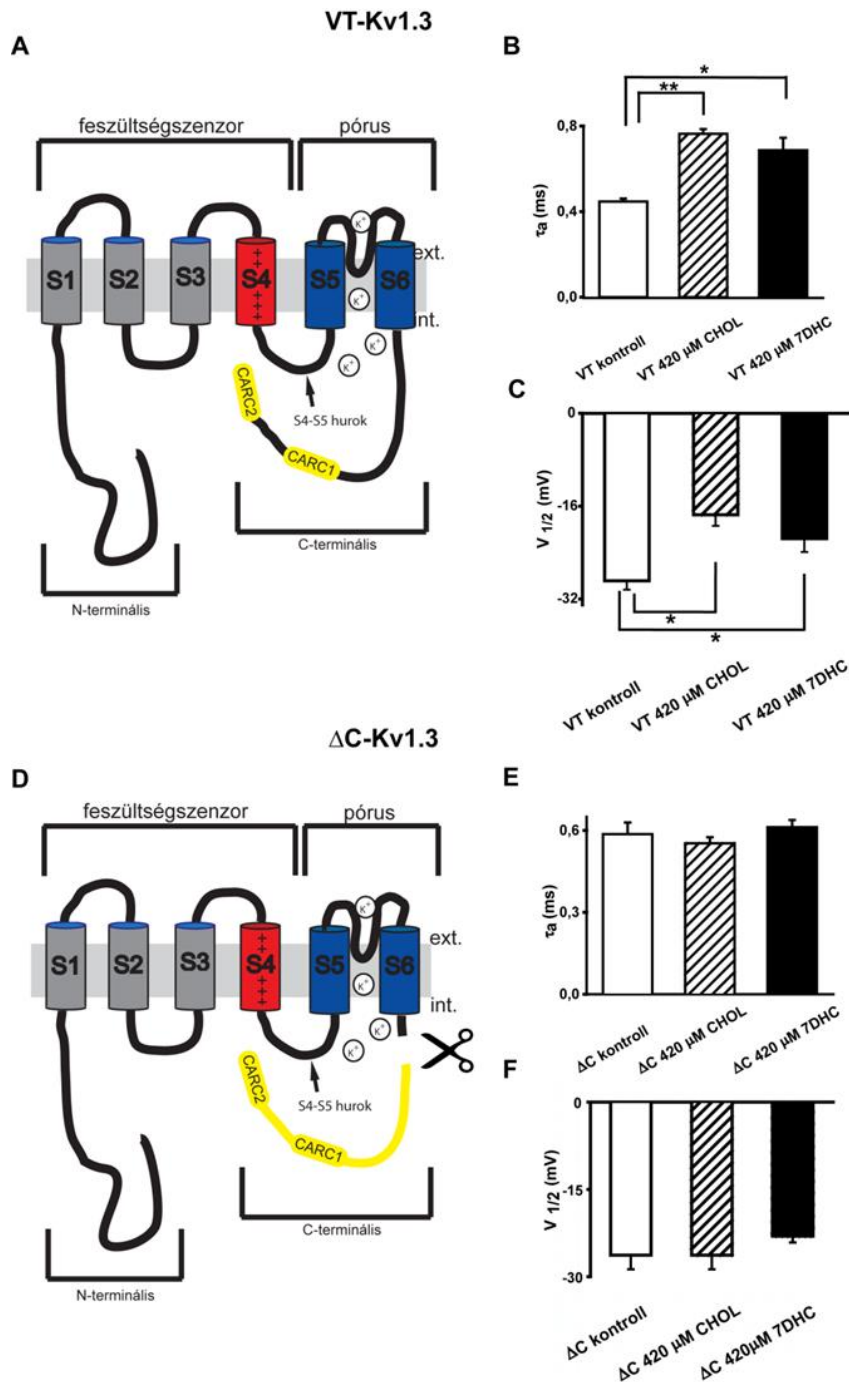
	VT					ΔC				
	kontroll	CHOL	p	7DHC	p	kontroll	CHOL	p	7DHC	p
τ_{akt}	0,45± 0,01 n=4	0,76± 0,02 n=7	0,002*	0,69± 0,06 n=10	0,008*	0,55± 0,04 n=6	0,55± 0,02 n=7	>0,05	0,61± 0,03 n=10	>0,05
$V_{1/2}$	-28,87± 1,5 n=5	-17,48± 1,9 n=7	<0,001*	-19,25± 4,7 n=7	0,028*	-26,73± 2,7 n=6	-26,31± 2,4 n=8	>0,05	-23,05± 1,1 n=6	>0,05

5. táblázat A vad típusú (VT) és a C-terminális deléció mutáns (ΔC) Kv1.3 csatornák összehasonlítása 420 μM koleszterin (CHOL) vagy 420 μM 7DHC töltést követően.

(τ_{akt} : aktivációs időállandó, $V_{1/2}$: félaktivációs feszültség, * jelöli a szignifikáns eltéréseket)

Az intracellulárisan elhelyezkedő C-terminális, a transzmembrán régiókkal ellentétben kevésbé lehet érzékeny a sejtmembrán fizikai paramétereiben bekövetkező változásokra. Ezek alapján feltételeztük, hogy a koleszterin nemcsak a sejtmembrán biofizikai paramétereinek befolyásolásán keresztül, de specifikus lipid-fehérje interakciókon keresztül is módosíthatja a Kv1.3 kapuzását. A C-terminális aminosav szekvenciáját elemezve két potenciális koleszterinkötő helyet találtunk (Kv1.3_{CARC1} és Kv1.3_{CARC2}, 20. ábra). A CARC1 és CARC2 szterolok általi szabályozásban betöltött szerepének vizsgálatához alaninra cseréltük a vad típusú Kv1.3 csatorna koleszterinkötő szekvenciáinak esszenciális aminosavait (21. A és D ábrák). A mKv1.3_{CARC1} esetén a 474. pozícióban található lizint, a 477 pozícióban lévő tirozint és a 479 pozícióban elhelyezkedő valint, a mKv1.3_{CARC2} esetén az 517. és 518. pozícióban a lizinet, a 520. fenilalanint és a 523. pozícióban található valint cseréltük alaninra. A ΔC-Kv1.3 konstrukt alapján várható volt, hogy a C-terminálison létrehozott pontmutációk nem fogják jelentősen módosítani a csatorna működését, azonban első lépésként összehasonlítottuk a mutáns és a vad-típusú csatornák kapuzási paramétereit. A mKv1.3_{CARC1} és mKv1.3_{CARC2} konstruktok ionáramai, aktivációs kinetikája és az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggése a ΔC-Kv1.3 csatornához hasonlóan nem tért el a vad típusú csatornától, a mutációk nem módosították jelentősen a csatorna működését (6. táblázat). A továbbiakban a mKv1.3-maltranszfektált CHO sejteket 420 μM koleszterinnel és azonos koncentrációjú 7DHC-vel töltöttük, majd vizsgáltuk a mKv1.3_{CARC1} és mKv1.3_{CARC2} csatornák biofizikai paramétereit. A mutációk hatására mindkét csatorna koleszterinnel szembeni érzékenysége módosult. Az mKv1.3_{CARC1} esetén a félaktivációs feszültség jobbra tolódott, azonban az aktivációs időállandó nem mutatott eltérést a kezeletlen csatornához viszonyítva a koleszterin kezelést követően (21/B és C ábrák, 7. táblázat). Az azonos koncentrációjú 7DHC töltés az aktivációs kinetikát szignifikánsan megnövelte, a félaktivációs feszültséget pedig jobbra tolta. A mKv1.3_{CARC2} esetén a koleszterin töltés lassította az aktivációs kinetikát, de nem volt hatása az egyensúlyi aktivációra (21/E és F ábra, 7. táblázat).

A 7DHC kezelés viszont a vad típusú csatornához hasonlóan módosította az $mKv1.3_{CARC2}$ aktivációs kinetikáját és egyensúlyi aktivációját (21/E és F ábra, 7. táblázat).



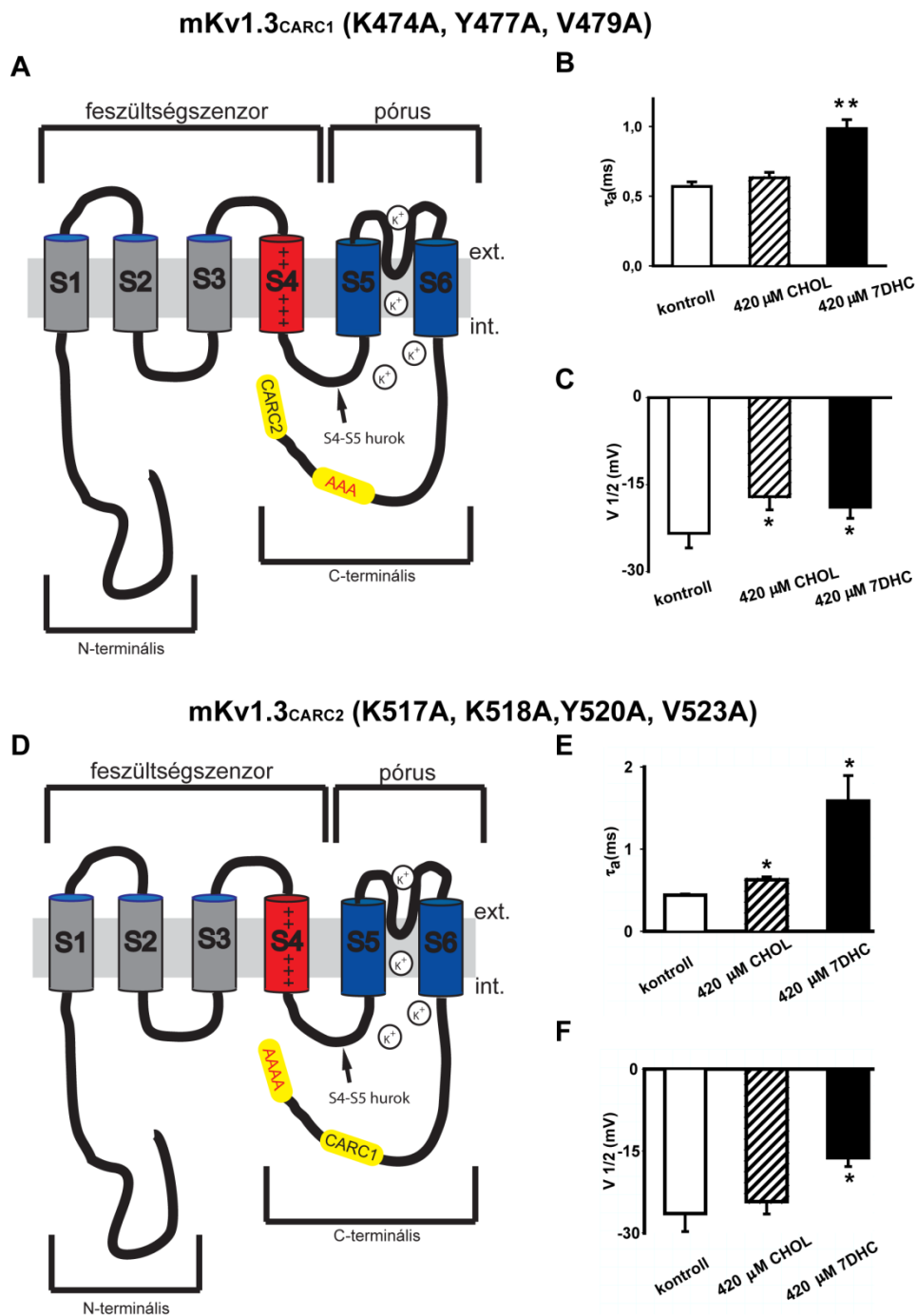
20. ábra A Kv1.3 C-terminálisának eltávolítása esetén megszűnik a csatorna szterollokkal szembeni érzékenysége. (A) A vad típusú Kv1.3 csatorna két potenciális koleszterin felismerő CARC szekvenciát tartalmaz a C-terminális disztális végén. **(B, C)** A B és C ábrákon a vad típusú (VT-Kv1.3) csatornával transzfektált CHO sejtek 420 μ M 7DHC, illetve koleszterin töltést követően meghatározott aktivációs időállandóinak és a félaktivációs feszültségeinek ($V_{1/2}$) átlag \pm SEM értékeit tüntettük fel. **(D)** A C-terminális Kv1.3 ioncsatorna szterolok általi regulációjában betöltött szerepének vizsgálatához egy olyan deléciós konstruktot alkalmaztunk, mely esetében a CARC szekvenciák is eltávolításra kerültek (Δ C-Kv1.3). Az **E, F** diagramokon a Δ C-Kv1.3 csatornát kifejező CHO sejtek aktivációs időállandóinak és félaktivációs feszültségeinek átlag \pm SEM értékeit tüntettük fel 420 μ M M β CD/CHOL és M β CD/7DHC töltést követően (lásd még 5. táblázat). A szignifikáns eltéréseket * ($p < 0,05$) és ** ($p < 0,001$) jelöli.

	VT	mKv1.3 _{CARC1}	p	mKv1.3 _{CARC2}	p
τ_{akt}	0,45± 0,01 n=4	0,57± 0,03 n=14	0,072	0,44± 0,01 n=11	0,769
$V_{1/2}$	-28,9± 1,5 n=5	-26,37± 1,6 n=8	0,315	-26,45± 3,3 n=5	0,524

6. táblázat A vad típusú (VT) és a potenciális koleszterinkötő helyeken mutált (mKv1.3_{CARC1}, mKv1.3_{CARC2}) Kv1.3 csatornák összehasonlítása. (τ_{akt} : aktivációs időállandó, $V_{1/2}$: félaktivációs feszültség, * jelöli a szignifikáns eltéréseket)

	mKv1.3 _{CARC1}					mKv1.3 _{CARC2}				
	N.K.	CHOL	p	7DHC	p	N.K.	CHOL	p	7DHC	p
τ_{akt}	0,57± 0,03 n=14	0,62± 0,04 n=14	0,248	0,98± 0,06 n=3	<0,001**	0,44± 0,01 n=11	0,63± 0,03 n=14	<0,001**	1,59± 0,31 n=5	<0,001**
$V_{1/2}$	-26,37± 1,6 n=8	-17,09± 2,27 n=8	0,005*	-18,89± 1,94 n=3	0,03*	-26,45± 3,3 n=5	-24,26± 2,27 n=9	0,59	-16,23± 1,61 n=5	0,024*

7. táblázat CHOL és 7DHC töltés hatása a potenciális koleszterinkötő helyeken mutált (mCARC1, mCARC2) Kv1.3 csatornákra. A mutáns csatornákkal transzfektált CHO sejtekben kontroll körülmények között, valamint 420 μ M 7DHC, illetve koleszterin töltést követően meghatároztuk a csatornapuzás releváns biofizikai paramétereit (átlag±SEM, τ_{akt} : aktivációs időállandó, $V_{1/2}$: félaktivációs feszültség, N.K.: nem kezelt, CHOL: koleszterin, 7DHC: 7-dehidrokoleszterin, * jelöli a szignifikáns eltéréseket)



21. ábra A C-terminális CARC1 és CARC2 szekvenciáinak pontmutációi megváltoztatja a csatornák szterollokkal szembeni érzékenységét. (A,D) A CARC szekvenciák ioncsatorna regulációban betöltött szerepének vizsgálatához alaninra cseréltük a feltételezett szterolkötő helyek kritikus aminosavait. A mutáns csatornákat CHO sejtekbe transzfektáltuk, majd M β CD/CHOL és M β CD/7DHC töltést követően outside-out patch konfigurációban vizsgáltuk az ionáramokat. Az oszlopdiagramokon az mKv1.3_{CARC1} (B,C), illetve mKv1.3_{CARC2} (E,F) csatornák aktivációs időállandóinak és féltaktivációs feszültségeinek átlag \pm SEM értékeit tüntettük fel 420 μ M 7DHC, illetve koleszterin töltést követően. A szignifikáns eltéréseket * ($p < 0,05$) és ** ($p < 0,001$) jelöli (lásd még 7. táblázat).

VI. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

Az ioncsatornák működését alapvetően meghatározza a sejtmembrán fő építőelemeinek számító lipidek összetétele. A foszfolipidek zsírsavláncainak hossza, telítettségük aránya vagy a koleszterin koncentráció változtatása módosítja ezen transzporterek működését. A membrán általános fizikai paraméterein (vastagság, fluiditás, viszkozitás) túl specifikus lipid-fehérje interakciók is szerepet játszhatnak a hatás közvetítésében. *In vitro* kísérletekben és modellmembránok alkalmazásával kapott eredmények alapján ismert, hogy a különböző családokba tartozó ioncsatornákra eltérő módon hat a sejtmembrán szerkezetének megváltoztatása. Munkacsoportunk 2003-ban publikálta, hogy a sejtmembrán ciklodextrin zárványkomplexek felhasználásával létrehozott koleszterintartalom módosítása (a továbbiakban „*in vitro*” koleszterintartalom módosítás, töltés vagy kivonás) a limfociták működése szempontjából esszenciális Kv1.3 ioncsatorna kapuzását jelentősen befolyásolja (74). Hajdu és mtsai. azt találták, hogy az *in vitro* koleszterintöltés csökkentette, a kivonás pedig növelte a limfociták endogén Kv1.3 ioncsatornáinak áramsűrűségét. Ezen felül a membrán koleszterinnel történő töltése lassította a Kv1.3 membránpotenciál- és időfüggő aktivációs és inaktivációs kinetikáját, az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggését pedig jobbra tolta, ugyanakkor a kivonásnak nem volt szignifikáns hatása sem a csatorna kapuzás kinetikai, sem pedig annak egyensúlyi paramétereire. Bár vannak adatok a koleszterinkivonás más Kv csatornákra gyakorolt hatásáról (pl. Kv1.5, Kv2.1, Kv11.1), de a Kv1.3-hoz hasonló részletes elektrofiziológiai vizsgálat egyik csatorna esetében sem történt (4, 16, 130). Mivel az *in vitro* koleszterintartalom módosítás és az ennek következtében mért ioncsatorna kapuzás változások biológiai jelentőségéről nemcsak a Kv, de egyéb ioncsatornák esetében is kevés információ áll rendelkezésre, ezért célul tűztük ki két, a koleszterinhomeosztázis különböző szintjeit befolyásoló kórállapot Kv1.3 ioncsatornákra és T-sejtek proliferációjára gyakorolt hatásának vizsgálatát. Ez esetben ugyanis elkerüljük a ciklodextrin komplexek esetleges nem specifikus hatásait (224). Ezen felül a sejtek és a sejtmembrán koleszterintartalma a betegség patofiziológiájának megfelelően módosul, azaz nem kell attól tartani, hogy extrém, még patofiziológiás körülmények között sem kialakuló koleszterintartalom-emelkedést vagy csökkenést hozunk létre.

Mindkét általunk vizsgált betegség esetén a korábbi tanulmányok alapján várható volt a sejtek membránjának fiziológiástól eltérő szterolösszetétele (166, 174, 205), ezért az egyszerűség kedvéért ezeket „*in vivo*” szteroltartalom módosításként nevezzük (annak

ellenére, hogy természetesen az elektrofiziológiai és a proliferációs vizsgálatok *ex vivo* történtek). Más munkacsoportokhoz hasonlóan azt találtuk, hogy a hiperkoleszterinémias betegekben izolált limfociták koleszterintartalma megnőtt a kontroll sejtekhez viszonyítva (174). A korábbi *in vitro* koleszterintartalom módosítási kísérleteink és munkacsoportunktól független kutatók állatmodelljei esetén a mesterségesen előidézett sejtszintű hiperkoleszterinémia gátolta a Kv ioncsatornák működését (74, 77, 86). A membrán megnövekedett membrán koleszterinkoncentrációja a annak fluiditását csökkenti, viszkozitását növeli (74). A biofizikai paraméterek ilyen irányú megváltozása lassíthatja a csatornák működése során lejátszódó konformációváltozások sebességét, az egyedi csatornák nyitási valószínűségét és a konduktanciát (103). A lipid-raftok eloszlása és az esetlegesen fellépő specifikus koleszterin-fehérje interakciók szintén módosulhatnak a membrán koleszterinszintjének növekedésével (103). Ezek alapján feltételeztük, hogy az emelkedett koleszterinkoncentráció csökkenti a limfociták Kv1.3 ioncsatornáinak áramsűrűségét és lassítja a kinetikai paramétereket. A kísérletek során azonban azt tapasztaltuk, hogy a HC sejtek Kv1.3 csatornáinak biofizikai paraméterei közül csak az áram aktivációs kinetikája mutatott eltérést, és a feltételezett lassulás helyett a 0 és +50 mV-ra történő depolarizáció mellett is az aktivációs kinetika gyorsulását találtuk. Mivel a tanulmányba bevont mérsékelt és jelentősen emelkedett szérumszintű koleszterinnel jellemzett betegcsoportok sejtjei között nem volt eltérés az aktivációs kinetikában úgy gondoljuk, hogy a gyorsulásáért nem az eltérő membrán-koleszterinszint a felelős. A lipid-raft-asszociált Kv1.3 ioncsatorna működése nagy mértékben függ ezen jelátviteli platformok összetételétől (81, 152). A zsírsavcsere zavarai során a koleszterin kívül felhalmozódó egyéb pl. oxidált lipidszármazékok raftok szétesését okozhatják, mely a csatorna koleszterinben szegény (nem raft) régióiban történő feldúsuláshoz vezethet, ahol az aktivációt kísérő konformációváltozások felgyorsulhatnak (104). Az *in vitro* kísérleteinkben előidézett, illetve *in vivo* körülmények között kialakuló hiperkoleszterinémia esetén talált különböző eredmények további oka a sejtek eltérő koleszterintartalma lehet. Az *in vitro* kísérletekben alkalmazott 1,5 mg/ml M β CD/CHOL komplex ugyanis a kontroll és a HC sejtekhez képest is szignifikánsan megemeli a sejtek koleszterintartalmát. Így a HC sejtek esetén a mérsékeltbben emelkedett membrán-koleszterinszint nem volt elegendő ahhoz, hogy szignifikánsan befolyásolja a Kv1.3 ioncsatorna működését. Ezt az elképzelést támasztják alá egy extrém magas (29 mmol/l) szérumszintű koleszterinnel rendelkező páciens sejtjeinek vizsgálata során kapott eredmények: az aktivációs és inaktivációs kinetika lassult, és az egyensúlyi aktiváció az *in vitro* kísérletek során találtakhoz hasonlóan jobbra tolódott (τ_{akt} : 0,97 \pm 0,06 ms, n=15, τ_{inakt} : 289 \pm 10 ms, n=7,

$V_{1/2}$: $-14,3 \pm 4.5$ mV, $n=9$, a kontroll értékeket lásd az 1. táblázatban) . Ezek alapján úgy tűnik, hogy csak a kiugróan magas szérumszterinnel rendelkező páciensek esetén lehet biológiailag is jelentős a HC Kv1.3-ra gyakorolt hatása.

A hiperkoleszterinémias sejtek vizsgálata során csökkent T-sejt proliferációt találtunk. Mivel a Kv1.3 működése ezen sejtekben nem változott jelentősen, más oknak kell az eltérés mögött állni. A T-sejt proliferáció szabályozásában a Kv1.3-on kívül számos membrán transzporter, jelátviteli molekula és csatorna vesz részt (57, 156). Elképzelhető, hogy ezek valamelyike már olyan koncentrációban is érzékeny a membrán koleszterintartalmának megváltozására, ami a Kv1.3 esetében még nem okoz eltérést. A hiperkoleszterinémia során felhalmozódó egyéb lipidek a csatorna működésétől függetlenül a csökkent proliferációért is felelősek lehetnek. A T-sejtek oxidált szterolszármazékokkal történő töltése nem volt hatással az aktiváció során kialakuló kalciumjelre, azonban gátolta az aktivációt követő membránkondenzációt és az aktin filamentumok reorganizációját (167). A koleszterin egyik természetes analógja, a koleszterin szulfát koncentrációja szintén megemelkedik hiperkoleszterinémiában, gátolva a T-sejt aktivációjának korai szakaszát (212). A T-sejt aktiváció és proliferáció különböző szintjeire (TCR aktiváció, kalciumjel, NFAT függő jelátviteli útvonalak, stb.) kiterjedő részletes vizsgálat segíthetne pontosabban meghatározni a hiperkoleszterinémia limfocitákra gyakorolt kórélettani hatásait.

Az SLOS-ból izolált limfociták teljes-sejt konfigurációban történő elektrofiziológiai vizsgálata során szignifikánsan megváltozott a Kv1.3 ioncsatorna működése, az aktivációs kinetika lassult, az egyensúlyi aktiváció pedig jobbra tolódott. A koleszterinszintézis károsodásával járó betegségekben a mai napig kérdéses (a klinikai és sejtszintű vizsgálatokban egyaránt), hogy a koleszterinszint csökkenése vagy az enzimblokk következtében felhalmozódó prekursor molekulák megjelenése okozza elsődlegesen a rendellenességeket. A Kv1.3 működésének megváltozása mögött az irodalmi adatokat is figyelembe véve az alábbi okok állhatnak:

- 1, Az enzimblokk következtében felhalmozódó 7DHC, 8DHC és ezek oxidált származékai olyan komplex változást hoznak létre a membrán összetételében, aminek hatására a Kv1.3 működése zavart szenved

- 2, Az enzimblokk következtében csökken a membrán koleszterintartalma, mely a felhalmozódó prekursoroktól függetlenül módosíthatja a Kv1.3 működését

- 3, A sejtmembrán teljes szteroltartalmának (koleszterin+prekursorok) tartalmának növekedése a szterolok kvalitatív arányától függetlenül gátolja a Kv1.3 működését

4, Az SLOS a sejtmembrántól függetlenül, az intracelluláris jelátviteli útvonalakon és citoplazmatikus regulátorokon keresztül befolyásolja a Kv1.3 kapuzásának kinetikai és egyensúlyi paramétereit.

5, A sejtmembránban felhalmozódó domináns prekursor molekula, a 7DHC önmagában képes lehet a Kv1.3 működésének megváltoztatására

Ad 1: SLOS-ben a sejtmembrán szterolösszetétele a koleszterinszint csökkenésén túl jelentős, komplex változásokon megy keresztül. Az irodalmi adatoknak megfelelően minden vizsgálatba bevont személy esetén megemelkedett 7DHC és 8DHC koncentrációkat találtunk a vvt mintákban (2. táblázat). A prekursor molekulák oxidációival szembeni érzékenysége miatt további szterolszármazékok is megjelenhetnek a membránban (66, 219). Az SLOS-ben felhalmozódó különböző koleszterinszármazékok összessége olyan környezetet hozhat létre a sejtmembránban, ami az ioncsatornák élettanitól eltérő működéséhez vezethet. Ennek ellentmondanak az M β CD/7DHC töltést követően kapott eredményeink. A töltés segítségével egészséges sejteken dóziszfüggően tudtuk modellezni az SLOS-re jellemző csökkenő koleszterin és emelkedő 7DHC koncentrációkat, azonban a 7DHC-től eltérő prekursorok és azok oxidált származékai nem voltak jelen a mesterségesen töltött sejtekben. Ennek ellenére az SLOS sejtekkel kvalitatíve megegyező elektrofiziológiai eltéréseket kaptunk, azaz az aktivációs kinetika lassult, az egyensúlyi aktiváció pedig jobbra tolódott 7DHC töltést követően.

Ad2: A sejtmembrán koleszterintartalmának csökkenése számos ioncsatorna működésére van hatással (103). Az ok a membrán fizikai paramétereinek módosítása (pl. fluiditás növelése) mellett a lipid-raftok szétesése és a csatornák non-raft környezetbe történő diffúziója lehet. A raft-asszociált Kv11.1 csatornák esetében a koleszterin *in vitro* kivonása az egyensúlyi aktiváció jobbra tolódását okozta, míg a Kv1.5 esetén a G-V görbék balra tolódtak (16, 132). Ezzel szemben a munkacsoportunk korábbi eredményei szerint az *in vitro* koleszterindepléció nincs hatással a Kv1.3 kapuzásának biofizikai paramétereire (74). Az SLOS-ben talált elektrofiziológiai eltérések ezért nem valószínű, hogy a sejtek koleszterintartalmának csökkenése miatt következtek be.

Ad3: A Kv1.3 ioncsatornák a sejtmembrán *in vitro* koleszterintöltésére az SLOS-hez hasonlóan, az aktivációs kinetika lassulásával és a félaktivációs feszültség jobbra tolódásával reagálnak. Ezek alapján felmerülhetne annak a lehetősége, hogy csupán a megemelkedett össz-szterolkoncentráció okozza az általunk talált eltéréseket SLOS-ben. A klinikai minták szteroltartalmának vizsgálata esetünkben és tőlünk független tanulmányokban is arra a megállapításra vezetett, hogy az SLOS-ben felhalmozódó koleszterin- és prekursor molekulák

összkoncentrációja elmarad az egészségesekben mérhető koleszterintartalomtól (166, 205). Ennek ellenére összehasonlítottuk az azonos koncentrációjú koleszterin és 7DHC töltés hatását Kv1.3-al transzfektált CHO sejteken. A korábbi eredményeknek megfelelően mindkét esetben lassultak a kinetikai paraméterek és a félaktivációs feszültség jobbra tolódott, de a 7DHC töltés minden esetben jelentősebb eltéréseket okozott, mint az azonos koncentrációjú koleszterin.

Ad 4: A teljes-sejt konfigurációban történő mérések során az ioncsatornákat a sejtmembrán elhelyezkedő regulátorok mellett citoplazmatikus hatások is érhetik. A Kv1.3 működését szabályzó citoszólikus tirozin kinázok (pl. Lck, ZAP-70, PKC, PKA) a csatorna egyensúlyi és kinetikai paramétereit egyaránt módosíthatják (75, 151, 159). A SLOS-ban felhalmozódó 7DHC többek között a Ret és Wnt/ β -katenin jelátviteli útvonalak kinázait gátolva neurológiai tünetek kialakulásához vezethet (59, 65). Annak kizárására, hogy az SLOS-ban látott eltérésekért a Kv1.3 működését szabályzó intracelluláris jelátviteli útvonalakban bekövetkező változások a felelősek outside-out patch-clamp konfigurációban vizsgáltuk az M β CD/7DHC-val töltött CHO sejtek Kv1.3 áramait. A módszer során a vizsgált membrándarabkát eredeti környezetéből eltávolítjuk, így lehetőség nyílik a citoplazmatikus szabályzóelemek kiiktatására. A 7DHC-val töltött CHO sejtek Kv1.3 áramainak egyensúlyi és kinetikai paramétereit kvalitatíve megegyeztek az SLOS-ból izolált limfocitákon mért áramokkal. Ezek alapján elvethetjük annak a lehetőségét, hogy az SLOS hatására módosuló jelátviteli útvonalak a felelősek a Kv1.3 megváltozott működésért.

Ad 5: Mindezen lehetőségeket összevetve úgy tűnik, hogy a Kv1.3 ioncsatorna kapuzásának megváltozásáért a sejtmembránban felhalmozódó 7DHC önmagában felelős lehet. Erre a legerősebb bizonyítékot *in vitro* modellünk adja, ahol a sejtmembrán 7DHC-val történő töltése a citoplazmatikus regulátoroktól és egyéb szterolszármazékoktól függetlenül az SLOS-el kvalitatíve megegyező módon befolyásolta a Kv1.3 működését. Feltehetőleg az alacsony esetszám miatt nem találtunk korrelációt a vvt minták 7DHC koncentrációja (vagy 7DHC/koleszterin aránya) és az elektrofiziológiai eltérések mértéke között. A 7DHC töltés során tapasztalt dóziszfüggő eredmények azonban felvetik annak a lehetőségét, hogy az SLOS sejtek 7DHC tartalma és az elektrofiziológiai változások mértéke között összefüggés lehet. Ennek alátámasztására nagyobb létszámú, akár több ország betegeit lefedő minta lenne alkalmas.

A leíró vizsgálatokat követően magától adódik a kérdés: milyen módon befolyásolja az SLOS-ben felhalmozódó 7DHC (illetve az *in vitro* koleszterin töltés) a Kv1.3 működését? Az irodalmi adatok alapján három különböző lehetőséget fogalmaztunk meg:

1, A 7DHC a membrán fizikai paramétereit módosítva indirekten befolyásolja a csatornák működését

2, A membránban megjelenő 7DHC megváltoztatja a lipid-raftok összetételét, a raft asszociált csatornák működése zavart szenved

3, A 7DHC/koleszterin arány növekedése az ioncsatornák direkt és specifikus koleszterin-fehérje interakción keresztül fejt ki hatását

Ad 1: A 7DHC sejtmembrán összetételére, fizikai paramétereire gyakorolt hatásáról ellentmondó eredményeket publikáltak. Tulenko és mtsai. SLOS betegekből izolált fibroblasztok esetén megnövekedett membránfluiditásról számoltak be, ami feltételezésük szerint magyarázhatja az SLOS-ben talált, sejtleletani eltéréseket (205). Más vizsgálatok nem támasztják alá ennek tényét, Liu és munkatársai szerint éppen ellenkezőleg a membránösszetételre gyakorolt hatás szempontjából elhanyagolható a különbség a két molekula között (110). Amennyiben SLOS-ben vagy a 7DHC töltés során megnövekszik a membránfluiditás, a Kv1.3 kinetikai paramétereinek gyorsulni, így az aktivációs időállandónak csökkenni kellett volna az általunk talált lassulással szemben (28, 103). A fentiek alapján nem zárható ki egyértelműen az, hogy a 7DHC nem specifikus membrán biofizikai hatásai is hozzájárulhatnak a Kv1.3 kapuzásának módosításához, de ezt nem tartjuk valószínűnek a ΔC -Kv1.3 konstruktok vizsgálatának tükrében (ld. később).

Ad 2: A sejtmembrán laterális szervezetségét meghatározó, szterolokban és szfingomielinben gazdag lipid-raftok ideális környezetet hoznak létre a különböző jelátviteli molekulák, ioncsatornák és receptorok működéséhez. A dolgozatban vizsgált Kv1.3 ioncsatorna a raft asszociált fehérjék csoportjába tartozik, jelenlétét a nyugalmi állapotban lévő sejtek lipid-raftjaiban és a limfociták aktivációja során kialakuló speciális platformon, az ún. immunológiai szinapszisban egyaránt kimutatták (27, 155). A Kv1.3 csatorna raftokba történő feldúsulását adaptor fehérjék segítik, ezek közül az egyik legjelentősebb a PSD-95 lehet, ami a csatorna C-terminálisával kölcsönhatva segíti elő annak immunológiai szinapszisba vándorlását (192). A lipid-raftok összetételének módosítása a szfingomielint hasító szfingomielinázzal vagy a koleszterint kivonó ciklodextrinekkal a Jurkat sejtek Kv1.3 ioncsatornáinak gátlásához vezetett (27). Felmerül annak a lehetősége, hogy az SLOS-ben megjelenő 7DHC a lipid-raftok összetételén keresztül módosítja a Kv1.3 működését. Fliesler munkacsoportja szerint az *in vitro* körülmények között létrehozott lipid-raftok esetén a 7DHC helyettesíteni tudta a koleszterint, sőt London munkacsoportja szerint azokat a koleszterintől jobban stabilizálja (89, 137, 221). Más tanulmányok viszont nem zárják ki annak a lehetőségét, hogy SLOS-ben megváltozik az ioncsatornák eloszlása a lipid-raftokban (24,

205). A lipid-raftok szerveződését segítő adaptor fehérjék szintén érzékenyek a membrán lipidösszetételére, a PSD-95 például specifikus koleszterinkötő helyekkel rendelkezik (175). A koleszterinérzékeny adaptor proteinek 7DHC iránti affinitásáról és esetleges jelentőségéről a koleszterinbioszintézis zavaraiiban nincs irodalmi adat. A Kv1.3 esetében a lipid-raftok károsításának leggyakoribb következménye az egységnyi felületre jutó funkcionális csatornák számának (áramsűrűség) módosulása volt, a kinetikai és egyensúlyi paraméterek azonban nem változtak (27, 74). Az SLOS minták elektrofiziológiai vizsgálata során ezzel szemben nem találtunk eltérést az áramsűrűségben. Ezek alapján nem lehet kizárni, hogy a 7DHC lipid-raftok összetételére gyakorolt direkt vagy adaptor fehérjéken keresztüli indirekt hatásain keresztül módosítja a Kv1.3 működését, azonban nem tartjuk valószínűnek, hogy ez lenne az elsődleges hatásmechanizmusa. Az SLOS lipid-raftokra gyakorolt hatásának mélyebb megismerése érdekében indokolt lenne a Kv1.3 vagy egyéb raft-asszociált molekula membránbeli eloszlásának vizsgálata.

Ad 3: A direkt kölcsönhatás lehetőségéből kiindulva, az ioncsatornákat körülvevő lipid övben a koleszterin 7DHC-ra cserélődhet. A 7DHC és koleszterin közötti minimális strukturális eltérés elegendő lehet a direkt, szterol-fehérje kölcsönhatások megváltozásához, ami befolyásolhatja a csatorna működése során lejátszódó konformációváltozásokat. Az elmúlt években számos ioncsatorna esetén ismertettek specifikus koleszterinkötő helyeket, melyek mutációja alapvetően befolyásolta a csatorna szterolokkal szembeni érzékenységet. Dopico és mtsai. publikációjukban felvetették, hogy a Kv csatornák is tartalmaznak ilyen, ún. CRAC és CARC koleszterinkötő helyeket (181). Ezek jelentőségét SLOS-ben, esetlegesen a 7DHC-val szembeni érzékenységet ez idáig egy munkacsoport sem vizsgálta. A Kv1.3 ioncsatorna szerkezetét elemezve több ilyen koleszterinkötő helyet térképeztünk fel. Ezek egy része átfed a csatorna konzervált, működés szempontjából esszenciális részeivel (S4 szegmens, aktivációs kapu). Más kötőhelyek a csatorna variábilis, elsősorban szabályozásban részt vevő részeivel, mint pl. C-terminális fednek át. A konzervált régiókban található kötőhelyek mutációkon alapuló vizsgálata megoldhatatlan feladatnak tűnik, tekintve, hogy egy egyszerű pontmutáció is könnyen nem-vezető csatorna kialakulásához vezet (71, 98). Ezzel szemben a C-terminálison található kötőhelyek vizsgálata kivitelezhető, ugyanis nagy részének eltávolítása sincs jelentős hatással a Kv1.3 ioncsatorna kapuzására (192). A Kv1.3 C-terminálisán két koleszterin-kötőhely található, melyeket CARC1 és CARC2-nek neveztünk el (20. A ábra). A C-terminális szterolok általi szabályozásban betöltött szerepének vizsgálatához először egy olyan konstruktot használtunk, mely esetében hiányzott a csatorna utolsó 84 aminosav hosszúságú, a két koleszterinkötő helyet is magába foglaló része. A Δ C-

Kv1.3-al transzfektált CHO sejtek esetében hatástalan volt a koleszterin illetve 7DHC töltés, a Kv1.3 kapuzását jellemző paraméterek közül egyik esetén sem volt eltérés. Ez az eredmény nagyon erős érv az ellen, hogy a 7DHC hatásmechanizmusa a membrán fiziko-kémiai és biofizikai paramétereinek megváltoztatása. A membránban bekövetkező változásokra ugyanis elsősorban a csatorna transzmembrán régiói érzékenyek, így amennyiben a 7DHC a membránra gyakorolt hatását annak fizikai paraméterein keresztül fejt ki hatását a ΔC -Kv1.3 csatorna esetén a vad típushoz hasonlóan meg kellett volna változnia a Kv1.3 kinetikai és egyensúlyi paramétereinek. Mivel a C-terminális eltávolítása mindkét szterol hatását megszüntette, megerősítést nyert azon az elképzelésünk, hogy a koleszterin és 7DHC hasonló mechanizmusokon keresztül szabályozza a csatornák működését. A CHOL és a 7DHC hatása a Kv1.3 kapuzási paramétereire azonban kvantitatíven különböző volt, a Kv1.3 kapuzás megváltozása 7DHC töltésre érzékenyebb volt, azonos koncentrációjú CHOL vagy 7DHC ciklodextrin zárványkompleksszel történő töltést követően (mind az aktivációs kinetika, mind pedig a félaktivációs feszültség nagyobb változást mutatott 7DHC töltés esetén, mint CHOL töltés esetén, 18. és 19. ábrák). E különbség egyik magyarázata az lehet, hogy a sejtek különböző mértékben veszik fel a CHOL-t vagy a 7DHC-t ugyanolyan zárványkomplex koncentráció mellett, vagy pedig a CHOL és a 7DHC specifikus kölcsönhatásai a Kv1.3 C-terminálisával különböző hatásosságúak. Az első állítás vizsgálatához a sejtmembrán szterolösszetételének részletesebb elemzésére lenne szükség 7DHC, illetve CHOL töltést követően.

A specifikus kölcsönhatások vizsgálatához olyan kísérleteket terveztünk, ahol potenciális szterol-kötőhelyeket módosítottuk molekuláris biológiai eszközökkel, a kötőhelyek kritikus aminosavait alaninra cseréltük. A kötőhelyek ilyen jellegű módosítása más, nem Kv ioncsatornához hasonlóan a koleszterinnel szembeni érzékenység csökkenéséhez vezetett (21. ábra) (161, 168). Az eredmények alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a membránban található koleszterinmolekulák a C-terminális koleszterinkötő helyeihez kapcsolódva gátolhatják a Kv1.3 csatorna működését kísérő konformációváltozásokat. Tekintve a koleszterin membránbeli lokalizációját ez a hatás abban az esetben lehetséges, ha az intracelluláris térbe nyúló C-terminális visszahajolva, a sejtmembrán koleszterinmolekuláival kölcsönhatásba kerül. A membrán szteroltartalmának növelése elősegítheti a koleszterinkötő hely és szterolok közti kölcsönhatás kialakulását, ami a csatorna kinetikai paramétereinek lassulásához és az egyensúlyi aktivációs feszültségfüggésének eltolódásához vezet. Hasonló konklúziót közöltek Robinson és mtsai., akik a P2X7 receptor esetében a membránhoz visszacsapódó C-terminális CRAC régióit

jelölték meg a koleszterin hatásának közvetítésért felelősnek (168). A két feltételezett szterolkötőhely feltehetően egyidejűleg vesz részt a csatorna szabályozásában, azonban a csatorna működését eltérő pontokon tudják befolyásolni. Erre utal, hogy a CARC1 mutációja esetén az aktivációs kinetika, a CARC2 esetén pedig az egyensúlyi kinetika veszti el koleszterinnel szembeni érzékenységét. A két kötőhely eltérő viselkedésére C-terminálison történő elhelyezkedésük adhat magyarázatot. A membránhoz visszahajoló C-terminális CARC1 szekvenciája fizikailag közelebb kerülhet az S6 szegment disztális részén és a C-terminális elején található aktivációs kapuhoz (melynek működése alapvetően meghatározza az aktivációs kinetikát), mint a fark legvégén elhelyezkedő CARC2. Ugyanakkor a C-terminális legvégén található CARC2 hosszabb távolságokra is elérhet, így nagyobb valószínűséggel tud kölcsönhatni a feszültség-szenzorral vagy a feszültség-szenzort és pórust összekötő S4-S5 linkerrel, ezzel befolyásolva a csatorna egyensúlyi aktivációját (lásd 1. és 21. ábra). Természetesen e spekulatív elméleteket szükséges lenne a későbbiekben *in silico* modellkísérletekkel vagy részletesebb szerkezet-funkció vizsgálatokkal (pl. voltage-clamp fluorimetria) alátámasztani.

A koleszterinnel ellentétben a 7DHC mindkét mutáns csatorna esetén a vad típusú csatornához hasonlóan lassította az aktivációt és jobbra tolta az egyensúlyi aktivációt. A 7DHC koleszterintől eltérő hatásának két magyarázata lehet:

- 1, A 7DHC a C-terminálison keresztül, de a CARC1 és CARC2 szekvenciáktól függetlenül gátolja a Kv1.3 működését.

- 2, A 7DHC a CARC1 és CARC2 kötőhelyekhez a koleszterintől nagyobb affinitással kötődhet.

Az első állításnak ellentmond, hogy ha a minimális strukturális eltérés következtében a 7DHC nem tudna ezekhez a helyekhez kötődni és más alternatív úton fejti ki hatását, akkor kvalitatíve miért látjuk ugyanazt a hatást, mint a CHOL töltés esetében. Véleményünk szerint elenyésző annak a valószínűsége, hogy létezik egy másik, szintén a C-terminális hoz kötődő szabályozási mód, ami a CARC1/CARC2-höz hasonlóan befolyásolná a Kv1.3 működését. Ennek ellenére nem lehet kizárni annak a lehetőségét, hogy a 7DHC a C-terminálison található egyéb kötőhelyeken keresztül vagy indirekt módon fejti ki hatását. Ezzel szemben úgy gondoljuk, hogy a 7DHC mindkét kötőhelyhez kapcsolódhat, ráadásul a koleszterintől nagyobb affinitással. Így egyik vagy másik mutációja esetén a 7DHC hatása szignifikáns marad. Ez megmagyarázná azt is, hogy azonos koncentrációjú szterol/ciklodextrin komplexszel történő töltés esetén a 7DHC hatása miért markánsabb (18. és 19. ábrák). A jövőben tervezzük egy olyan mutáns csatorna létrehozását, mely esetén a CARC1 és CARC2

kötőhelyeket egyaránt módosítjuk. A dupla mutáns csatorna esetén a 7DHC hatás megszűnését várjuk. A potenciális kötőhelyek és a ligand-receptor kapcsolat létrejöttének igazolására további kísérletekre, köztük *in silico* molekuláris dokkolás és spinjelölt fehérjék/lipidek elektron paramágneses rezonancia (EPR) spektroszkópia vizsgálatára lenne szükség (126).

Az elmúlt évtizedben számos örökletes betegség esetén mutatták ki az ioncsatornák veleszületett mutációit kóroki tényezőként (42, 91). Az SLOS-ben az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggésének jobbra tolódása olyan kóréletteni hatással rendelkezhet, mint a például az ioncsatornák funkcióvesztéses mutációi. A félaktivációs-feszültség növekedésével ugyanis csökken a működő ioncsatornák száma az élettanilag fontos membránpotenciál tartományokban. Az ioncsatornák veleszületett mutációi a G-V görbe eltolásán keresztül a Kv1.2 esetében epilepszia (187), a Kv7.1 esetében long QT szindróma (12), míg a Kv1.1 esetében pedig epizodikus ataxia (5) kialakulásához vezetnek. A fent említett csatornák koleszterinnel szembeni érzékenységéről még nincs adat, szerkezetük azonban nagyon hasonló a Kv1.3-hoz, így elképzelhető, hogy szintén a félaktivációs-feszültség eltolódásával reagálnak az SLOS-re jellemző lipidösszetételre. A központi idegrendszerben is kifejeződő Kv1.3 ioncsatorna alegység összeállhat más Kv alegységekkel, a különböző heterotetramerek biofizikai tulajdonságai pedig az alegységek arányától függenek. Egy ilyen heterotetramert a Kv1.3 alegység megjelenése koleszterin és 7DHC érzékennyé tehet, annak ellenére, hogy a többi alegység nem érzékeny a szterolkoncentráció módosítására. Az SLOS esetében megjelenő tünetek jelentős részéért neurológiai eltérések felelősek, de előfordulnak kardiológiai problémák is. A fenti adatok alapján feltételezhetjük, hogy az SLOS-re jellemző szterolösszetételnek a központi idegrendszer vagy a szív sejtjeinek ioncsatornáira gyakorolt hatása kóroki tényező lehet.

A Kv1.3 ioncsatorna optimális működése elengedhetetlen feltétele a fiziológias T-sejt aktivációnak. Bármely hatás, amely gátolja a Kv1.3 működését a T-sejtek aktivációjának és proliferációjának gátlásához vezethet (57, 160). Eredményeink szerint az SLOS-ből izolált T-sejtek aktivációja és proliferációja elmarad a kontroll sejtekhez képest. Az SLOS hatására módosult Kv1.3 működés hozzájárulhat a T-sejtek csökkent működéséhez. Ugyanakkor nagyon fontos megemlíteni azt a tényt, hogy a T-sejt aktivációja során kialakuló kalciumjelet ioncsatornák, transzporterek és jelátviteli molekulák sokasága közösen szabályozza. Ezek egy része, mint pl. a CRAC csatorna pórúsát kialakító Orai1 vagy a kalciumszenzorként funkcionáló STIM1 önmaga is koleszterinre érzékeny (45, 148). Így nem lehet kizárni, hogy a megváltozott membránkörnyezet a Kv1.3-on kívül egyéb transzporterek, jelátviteli

molekulák működését is befolyásolja. Szintén nem lehet elhanyagolni az SLOS-ben felhalmozódó 7DHC és egyéb prekursor molekulák toxikus és esetlegesen immunszuppresszív hatását (56, 139, 220). Az immunológiai eltérések nem tartoznak az SLOS diagnosztikai kritériumaihoz, azonban két olyan esettanulmányt is publikáltak ahol SLOS-ben szenvedő gyermekekben klinikailag nem indokolt súlyosságú tünetek alakultak ki egyszerű fertőzéseket követően (14, 22). A T-sejtek SLOS-ben talált csökkent funkciója háttérben álló mechanizmusok részletesebb elemzése érdekében fontos lenne a kalciumjel kialakításában részt vevő egyéb transzporterek ionáramainak és membránbeli eloszlásának tanulmányozása. Az immundeficiencia bizonyítására további funkcionális esszék pl. ELISA, ELISpot, citotoxicitás esszé használatára lenne szükség.

VII. ÖSSZEFOGLALÁS

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

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

VIII. SUMMARY

Cholesterol is an essential component of the cell membrane and involved in the syntheses of many bioactive molecules. Hypercholesterinemia, which is characterized by the abnormally elevated serum cholesterol level, is a frequent dyslipidemia. Inborn errors of cholesterol synthesis (e.g. Smith-Lemli-Opitz syndrome, SLOS) are rare, genetic disorders with pathognomonic low cholesterol and increased cholesterol precursor serum levels. *In vitro* manipulation of the membrane cholesterol of T cells modifies the gating parameters of the essential voltage-gated Kv1.3 channel, however a comprehensive study that confirms the pathophysiological significance of these results is missing. Therefore we isolated lymphocytes from patient with SLOS and hypercholesterinemia to study the consequence of *in vivo* altered membrane cholesterol composition on Kv1.3 channel and T lymphocyte function. To expand our knowledge about the interaction of sterols with Kv1.3 we searched for the existence of cholesterol recognition sites in an *in vitro* modified sterol environment. Our results indicated that hypercholesterinemia just slightly altered the Kv1.3 function unlike in our former study where *in vitro* cholesterol loading had remarkable effects. The reason of this could be that the cholesterol content of the cells in hypercholesterolemia is not as high as in the *in vitro* model systems. This is supported by the data obtained in a patient with extreme high cholesterol level: changes in Kv1.3 biophysical parameters were comparable to those described for the *in vitro* loaded T cells. The proliferation capacity of the T cells decreased regardless of the lack in the Kv1.3 function.

In SLOS the kinetics of Kv1.3 gating slowed down and the steady-state activation shifted toward positive potentials. Identical changes in Kv1.3 operation were observed when control/healthy T cell membrane was loaded with 7DHC. Functional assays exhibited impaired activation and proliferation rate of T cells probably partially due to the modified Kv1.3 operation. Removal of the putative sterol binding sites on Kv1.3 resulted in a phenotype that was not influenced by the elevation in membrane sterol level. We suppose that in hypercholesterinemia only the extreme high serum cholesterol levels influence biological functions of Kv1.3 significantly. We also concluded that the altered membrane sterol composition in SLOS hindered the operation of Kv1.3 as well as the ion channel-controlled T cell functions. We propose that the ion channel-sterol interaction described in our study reveals a molecular mechanism that may contribute to the pathophysiological conditions in SLOS, and may lead to the most prominent neurological and cardiovascular symptoms via influencing the physiological function of ion channels.

IX. HIVATKOZÁSOK

1. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 106: 3143-3421, 2002.
2. **Abbas AK, Aster JC, Kumar V, and Robbins SL.** *Robbins basic pathology*. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders, 2013, p. xii, 910 p.
3. **Abdul M, and Hoosein N.** Reduced Kv1.3 potassium channel expression in human prostate cancer. *The Journal of membrane biology* 214: 99-102, 2006.
4. **Abi-Char J, Maguy A, Coulombe A, Balse E, Ratajczak P, Samuel JL, Nattel S, and Hatem SN.** Membrane cholesterol modulates Kv1.5 potassium channel distribution and function in rat cardiomyocytes. *The Journal of physiology* 582: 1205-1217, 2007.
5. **Adelman JP, Bond CT, Pessia M, and Maylie J.** Episodic ataxia results from voltage-dependent potassium channels with altered functions. *Neuron* 15: 1449-1454, 1995.
6. **Allen JA, Halverson-Tamboli RA, and Rasenick MM.** Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nature reviews Neuroscience* 8: 128-140, 2007.
7. **Amberger J, Bocchini CA, Scott AF, and Hamosh A.** McKusick's Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). *Nucleic acids research* 37: D793-796, 2009.
8. **Amundson DM, and Zhou M.** Fluorometric method for the enzymatic determination of cholesterol. *Journal of biochemical and biophysical methods* 38: 43-52, 1999.
9. **An H, Nussio MR, Huson MG, Voelcker NH, and Shapter JG.** Material properties of lipid microdomains: force-volume imaging study of the effect of cholesterol on lipid microdomain rigidity. *Biophysical journal* 99: 834-844, 2010.
10. **Andersen OS, and Koeppe RE, 2nd.** Bilayer thickness and membrane protein function: an energetic perspective. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 36: 107-130, 2007.
11. **Andersson J, Libby P, and Hansson GK.** Adaptive immunity and atherosclerosis. *Clin Immunol* 134: 33-46, 2010.
12. **Arbour L, Rezazadeh S, Eldstrom J, Weget-Simms G, Rupps R, Dyer Z, Tibbits G, Accili E, Casey B, Kmetc A, Sanatani S, and Fedida D.** A KCNQ1 V205M missense mutation causes a high rate of long QT syndrome in a First Nations community of northern British Columbia: a community-based approach to understanding the impact. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 10: 545-550, 2008.
13. **Arnold K, Bordoli L, Kopp J, and Schwede T.** The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22: 195-201, 2006.
14. **Babovic-Vuksanovic D, Jacobson RM, Lindor NM, and Weiler CR.** Selective antibody immune deficiency in a patient with Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Journal of inherited metabolic disease* 28: 181-186, 2005.
15. **Bagdany M, Batista CV, Valdez-Cruz NA, Somodi S, Rodriguez de la Vega RC, Licea AF, Varga Z, Gaspar R, Possani LD, and Panyi G.** Anuroctoxin, a new scorpion toxin of the alpha-KTx 6 subfamily, is highly selective for Kv1.3 over IKCa1 ion channels of human T lymphocytes. *Molecular pharmacology* 67: 1034-1044, 2005.
16. **Balijepalli RC, Foell JD, Hall DD, Hell JW, and Kamp TJ.** Localization of cardiac L-type Ca(2+) channels to a caveolar macromolecular signaling complex is required for beta(2)-adrenergic regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 7500-7505, 2006.
17. **Balogh G, Peter M, Liebisch G, Horvath I, Torok Z, Nagy E, Maslyanko A, Benko S, Schmitz G, Harwood JL, and Vigh L.** Lipidomics reveals membrane lipid remodelling and release of potential lipid mediators during early stress responses in a murine melanoma cell line. *Biochimica et biophysica acta* 1801: 1036-1047, 2010.

18. **Balogh I, Koczok K, Szabo GP, Torok O, Hadzsiev K, Csabi G, Balogh L, Dzsudzsak E, Ajzner E, Szabo L, Csakvary V, and Olah AV.** Mutational spectrum of Smith-Lemli-Opitz syndrome patients in Hungary. *Molecular syndromology* 3: 215-222, 2012.
19. **Barrantes FJ.** Structural basis for lipid modulation of nicotinic acetylcholine receptor function. *Brain research Brain research reviews* 47: 71-95, 2004.
20. **Barros F, Dominguez P, and de la Pena P.** Cytoplasmic domains and voltage-dependent potassium channel gating. *Frontiers in pharmacology* 3: 49, 2012.
21. **Batta AK, Tint GS, Shefer S, Abuelo D, and Salen G.** Identification of 8-dehydrocholesterol (cholesta-5,8-dien-3 beta-ol) in patients with Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Journal of lipid research* 36: 705-713, 1995.
22. **Beby-Defaux A, Maille L, Chabot S, Nassimi A, Oriot D, and Agius G.** Fatal adenovirus type 7b infection in a child with Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Journal of medical virology* 65: 66-69, 2001.
23. **Beeton C, Wulff H, Standifer NE, Azam P, Mullen KM, Pennington MW, Kolski-Andreaco A, Wei E, Grino A, Counts DR, Wang PH, LeeHealey CJ, B SA, Sankaranarayanan A, Homerick D, Roeck WW, Tehranzadeh J, Stanhope KL, Zimin P, Havel PJ, Griffey S, Knaus HG, Nepom GT, Gutman GA, Calabresi PA, and Chandy KG.** Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 17414-17419, 2006.
24. **Benesch MG, Lewis RN, and McElhaneey RN.** A calorimetric and spectroscopic comparison of the effects of cholesterol and its immediate biosynthetic precursors 7-dehydrocholesterol and desmosterol on the thermotropic phase behavior and organization of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes. *Chemistry and physics of lipids* 191: 123-135, 2015.
25. **Bielanska J, Hernandez-Losa J, Moline T, Somoza R, Ramon YCS, Condom E, Ferreres JC, and Felipe A.** Voltage-dependent potassium channels Kv1.3 and Kv1.5 in human fetus. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 26: 219-226, 2010.
26. **Bielanska J, Hernandez-Losa J, Perez-Verdaguer M, Moline T, Somoza R, Ramon YCS, Condom E, Ferreres JC, and Felipe A.** Voltage-dependent potassium channels Kv1.3 and Kv1.5 in human cancer. *Current cancer drug targets* 9: 904-914, 2009.
27. **Bock J, Szabo I, Gamper N, Adams C, and Gulbins E.** Ceramide inhibits the potassium channel Kv1.3 by the formation of membrane platforms. *Biochemical and biophysical research communications* 305: 890-897, 2003.
28. **Bolotina V, Omelyanenko V, Heyes B, Ryan U, and Bregestovski P.** Variations of membrane cholesterol alter the kinetics of Ca²⁺-dependent K⁺ channels and membrane fluidity in vascular smooth muscle cells. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 415: 262-268, 1989.
29. **Bukiya AN, Belani JD, Rychnovsky S, and Dopico AM.** Specificity of cholesterol and analogs to modulate BK channels points to direct sterol-channel protein interactions. *The Journal of general physiology* 137: 93-110, 2011.
30. **Cahalan MD, and Chandy KG.** The functional network of ion channels in T lymphocytes. *Immunological reviews* 231: 59-87, 2009.
31. **Cahalan MD, Chandy KG, DeCoursey TE, and Gupta S.** A voltage-gated potassium channel in human T lymphocytes. *The Journal of physiology* 358: 197-237, 1985.
32. **Cahalan MD, Wulff H, and Chandy KG.** Molecular properties and physiological roles of ion channels in the immune system. *Journal of clinical immunology* 21: 235-252, 2001.
33. **Chait A, and Brunzell JD.** Acquired hyperlipidemia (secondary dyslipoproteinemias). *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 19: 259-278, 1990.
34. **Chandy KG, Wulff H, Beeton C, Pennington M, Gutman GA, and Cahalan MD.** K⁺ channels as targets for specific immunomodulation. *Trends Pharmacol Sci* 25: 280-289, 2004.
35. **Chen X, Wang Q, Ni F, and Ma J.** Structure of the full-length Shaker potassium channel Kv1.2 by normal-mode-based X-ray crystallographic refinement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 11352-11357, 2010.

36. **Chhabra S, Chang SC, Nguyen HM, Huq R, Tanner MR, Londono LM, Estrada R, Dhawan V, Chauhan S, Upadhyay SK, Gindin M, Hotez PJ, Valenzuela JG, Mohanty B, Swarbrick JD, Wulff H, Iadonato SP, Gutman GA, Beeton C, Pennington MW, Norton RS, and Chandy KG.** Kv1.3 channel-blocking immunomodulatory peptides from parasitic worms: implications for autoimmune diseases. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28: 3952-3964, 2014.
37. **Chimote AA, Hajdu P, Kottyan LC, Harley JB, Yun Y, and Conforti L.** Nanovesicle-targeted Kv1.3 knockdown in memory T cells suppresses CD40L expression and memory phenotype. *Journal of autoimmunity* 69: 86-93, 2016.
38. **Choe S.** Potassium channel structures. *Nature reviews Neuroscience* 3: 115-121, 2002.
39. **Coleman SK, Newcombe J, Pryke J, and Dolly JO.** Subunit composition of Kv1 channels in human CNS. *Journal of neurochemistry* 73: 849-858, 1999.
40. **Corso G, Gelzo M, Barone R, Clericuzio S, Pianese P, Nappi A, and Dello Russo A.** Sterol profiles in plasma and erythrocyte membranes in patients with Smith-Lemli-Opitz syndrome: a six-year experience. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 49: 2039-2046, 2011.
41. **Cross JL, Iben J, Simpson CL, Thurm A, Swedo S, Tierney E, Bailey-Wilson JE, Biesecker LG, Porter FD, and Wassif CA.** Determination of the allelic frequency in Smith-Lemli-Opitz syndrome by analysis of massively parallel sequencing data sets. *Clinical genetics* 87: 570-575, 2015.
42. **D'Adamo MC, Catacuzzeno L, Di Giovanni G, Franciolini F, and Pessia M.** K(+) channelepsy: progress in the neurobiology of potassium channels and epilepsy. *Frontiers in cellular neuroscience* 7: 134, 2013.
43. **DeCoursey TE, Chandy KG, Gupta S, and Cahalan MD.** Voltage-gated K⁺ channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? *Nature* 307: 465-468, 1984.
44. **Demel RA, Bruckdorfer KR, and van Deenen LL.** Structural requirements of sterols for the interaction with lecithin at the air water interface. *Biochimica et biophysica acta* 255: 311-320, 1972.
45. **Derler I, Jardin I, Stathopoulos PB, Muik M, Fahrner M, Zayats V, Pandey SK, Poteser M, Lackner B, Absolonova M, Schindl R, Groschner K, Ettrich R, Ikura M, and Romanin C.** Cholesterol modulates Orai1 channel function. *Science signaling* 9: ra10, 2016.
46. **Deutsch C.** The birth of a channel. *Neuron* 40: 265-276, 2003.
47. **Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, and MacKinnon R.** The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280: 69-77, 1998.
48. **Elias ER, Irons MB, Hurley AD, Tint GS, and Salen G.** Clinical effects of cholesterol supplementation in six patients with the Smith-Lemli-Opitz syndrome (SLOS). *American journal of medical genetics* 68: 305-310, 1997.
49. **Emeson EE, Shen ML, Bell CG, and Qureshi A.** Inhibition of atherosclerosis in CD4 T-cell-ablated and nude (nu/nu) C57BL/6 hyperlipidemic mice. *The American journal of pathology* 149: 675-685, 1996.
50. **Epand RM.** Cholesterol and the interaction of proteins with membrane domains. *Progress in lipid research* 45: 279-294, 2006.
51. **Escobar LI, Martinez-Tellez JC, Salas M, Castilla SA, Carrisoza R, Tapia D, Vazquez M, Bargas J, and Bolivar JJ.** A voltage-gated K(+) current in renal inner medullary collecting duct cells. *American journal of physiology Cell physiology* 286: C965-974, 2004.
52. **Fadool DA, Tucker K, and Pedarzani P.** Mitral cells of the olfactory bulb perform metabolic sensing and are disrupted by obesity at the level of the Kv1.3 ion channel. *PLoS one* 6: e24921, 2011.
53. **Fantini J, and Barrantes FJ.** How cholesterol interacts with membrane proteins: an exploration of cholesterol-binding sites including CRAC, CARC, and tilted domains. *Frontiers in physiology* 4: 31, 2013.
54. **Fattal DR, and Ben-Shaul A.** A molecular model for lipid-protein interaction in membranes: the role of hydrophobic mismatch. *Biophysical journal* 65: 1795-1809, 1993.

55. **Felipe A, Bielanska J, Comes N, Vallejo A, Roig S, Ramon YCS, Condom E, Hernandez-Losa J, and Ferreres JC.** Targeting the voltage-dependent K(+) channels Kv1.3 and Kv1.5 as tumor biomarkers for cancer detection and prevention. *Current medicinal chemistry* 19: 661-674, 2012.
56. **Fernandez C, Martin M, Gomez-Coronado D, and Lasuncion MA.** Effects of distal cholesterol biosynthesis inhibitors on cell proliferation and cell cycle progression. *Journal of lipid research* 46: 920-929, 2005.
57. **Feske S, Wulff H, and Skolnik EY.** Ion channels in innate and adaptive immunity. *Annual review of immunology* 33: 291-353, 2015.
58. **Fordyce CB, Jagasia R, Zhu X, and Schlichter LC.** Microglia Kv1.3 channels contribute to their ability to kill neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25: 7139-7149, 2005.
59. **Francis KR, Ton AN, Xin Y, O'Halloran PE, Wassif CA, Malik N, Williams IM, Cluzeau CV, Trivedi NS, Pavan WJ, Cho W, Westphal H, and Porter FD.** Modeling Smith-Lemli-Opitz syndrome with induced pluripotent stem cells reveals a causal role for Wnt/beta-catenin defects in neuronal cholesterol synthesis phenotypes. *Nature medicine* 22: 388-396, 2016.
60. **Fredrickson DS, and Lees RS.** A System for Phenotyping Hyperlipoproteinemia. *Circulation* 31: 321-327, 1965.
61. **Gambale F, and Uozumi N.** Properties of shaker-type potassium channels in higher plants. *The Journal of membrane biology* 210: 1-19, 2006.
62. **Goedeke L, and Fernandez-Hernando C.** Regulation of cholesterol homeostasis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69: 915-930, 2012.
63. **Gonzalez C, Baez-Nieto D, Valencia I, Oyarzun I, Rojas P, Naranjo D, and Latorre R.** K(+) channels: function-structural overview. *Comprehensive Physiology* 2: 2087-2149, 2012.
64. **Gorter E, and Grendel F.** On Bimolecular Layers of Lipoids on the Chromocytes of the Blood. *The Journal of experimental medicine* 41: 439-443, 1925.
65. **Gou-Fabregas M, Macia A, Anerillas C, Vaquero M, Jove M, Jain S, Ribera J, and Encinas M.** 7-dehydrocholesterol efficiently supports Ret signaling in a mouse model of Smith-Opitz-Lemli syndrome. *Scientific reports* 6: 28534, 2016.
66. **Griffiths WJ, Abdel-Khalik J, Crick PJ, Ogundare M, Shackleton CH, Tuschl K, Kwok MK, Bigger BW, Morris AA, Honda A, Xu L, Porter NA, Bjorkhem I, Clayton PT, and Wang Y.** Sterols and oxysterols in plasma from Smith-Lemli-Opitz syndrome patients. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2016.
67. **Grissmer S, Nguyen AN, and Cahalan MD.** Calcium-activated potassium channels in resting and activated human T lymphocytes. Expression levels, calcium dependence, ion selectivity, and pharmacology. *The Journal of general physiology* 102: 601-630, 1993.
68. **Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stuhmer W, and Wang X.** International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacological reviews* 57: 473-508, 2005.
69. **Gylling H.** Cholesterol metabolism and its implications for therapeutic interventions in patients with hypercholesterolaemia. *International journal of clinical practice* 58: 859-866, 2004.
70. **Haas D, Garbade SF, Vohwinkel C, Muschol N, Trefz FK, Penzien JM, Zschocke J, Hoffmann GF, and Burgard P.** Effects of cholesterol and simvastatin treatment in patients with Smith-Lemli-Opitz syndrome (SLOS). *Journal of inherited metabolic disease* 30: 375-387, 2007.
71. **Hackos DH, Chang TH, and Swartz KJ.** Scanning the intracellular S6 activation gate in the shaker K+ channel. *The Journal of General Physiology* 119: 521-532, 2002.
72. **Haitin Y, and Attali B.** The C-terminus of Kv7 channels: a multifunctional module. *The Journal of physiology* 586: 1803-1810, 2008.
73. **Hajdu P, Martin GV, Chimote AA, Szilagy O, Takimoto K, and Conforti L.** The C-terminus SH3-binding domain of Kv1.3 is required for the actin-mediated immobilization of the channel via cortactin. *Molecular biology of the cell* 26: 1640-1651, 2015.

74. **Hajdu P, Varga Z, Pieri C, Panyi G, and Gaspar R, Jr.** Cholesterol modifies the gating of Kv1.3 in human T lymphocytes. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 445: 674-682, 2003.
75. **Hanada T, Lin L, Chandy KG, Oh SS, and Chishti AH.** Human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor binds to p56lck tyrosine kinase and Shaker type Kv1.3 potassium channel in T lymphocytes. *The Journal of biological chemistry* 272: 26899-26904, 1997.
76. **Hansson GK, Holm J, and Jonasson L.** Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. *The American journal of pathology* 135: 169-175, 1989.
77. **Heaps CL, Tharp DL, and Bowles DK.** Hypercholesterolemia abolishes voltage-dependent K⁺ channel contribution to adenosine-mediated relaxation in porcine coronary arterioles. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 288: H568-576, 2005.
78. **Hille B.** *Ion channels of excitable membranes.* Sunderland, Mass.: Sinauer, 2001, p. xviii, 814 p.
79. **Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, and Pease LR.** Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77: 51-59, 1989.
80. **Hodgkin AL, and Huxley AF.** A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of physiology* 117: 500-544, 1952.
81. **Hong KH, and Miller C.** The lipid-protein interface of a Shaker K(+) channel. *The Journal of general physiology* 115: 51-58, 2000.
82. **Hopkins WF, Demas V, and Tempel BL.** Both N- and C-terminal regions contribute to the assembly and functional expression of homo- and heteromultimeric voltage-gated K⁺ channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 14: 1385-1393, 1994.
83. **Irons M, Elias ER, Salen G, Tint GS, and Batta AK.** Defective cholesterol biosynthesis in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Lancet* 341: 1414, 1993.
84. **Janeway CA, Travers, P., Walport, M., és Shlomchik, M.J.** *Immunobiology, 5 edn.* New York: Garland Publishing, 2001
85. **Jang SH, Byun JK, Jeon WI, Choi SY, Park J, Lee BH, Yang JE, Park JB, O'Grady SM, Kim DY, Ryu PD, Joo SW, and Lee SY.** Nuclear localization and functional characteristics of voltage-gated potassium channel Kv1.3. *The Journal of biological chemistry* 290: 12547-12557, 2015.
86. **Jiang J, Thoren P, Caligiuri G, Hansson GK, and Pernow J.** Enhanced phenylephrine-induced rhythmic activity in the atherosclerotic mouse aorta via an increase in opening of K_{Ca} channels: relation to Kv channels and nitric oxide. *British journal of pharmacology* 128: 637-646, 1999.
87. **Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT, and MacKinnon R.** X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 423: 33-41, 2003.
88. **Kabouridis PS, Janzen J, Magee AL, and Ley SC.** Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes. *European journal of immunology* 30: 954-963, 2000.
89. **Keller RK, Arnold TP, and Fliesler SJ.** Formation of 7-dehydrocholesterol-containing membrane rafts in vitro and in vivo, with relevance to the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Journal of lipid research* 45: 347-355, 2004.
90. **Kelley RI, and Hennekam RC.** The Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Journal of medical genetics* 37: 321-335, 2000.
91. **Kim JB.** Channelopathies. *Korean journal of pediatrics* 57: 1-18, 2014.
92. **Kim MS, Pinto SM, Getnet D, Nirujogi RS, Manda SS, Chaerkady R, Madugundu AK, Kelkar DS, Isserlin R, Jain S, Thomas JK, Muthusamy B, Leal-Rojas P, Kumar P, Sahasrabudhe NA, Balakrishnan L, Advani J, George B, Renuse S, Selvan LD, Patil AH, Nanjappa V, Radhakrishnan A, Prasad S, Subbannayya T, Raju R, Kumar M, Sreenivasamurthy SK, Marimuthu A, Sathe GJ, Chavan S, Datta KK, Subbannayya Y, Sahu A, Yelamanchi SD, Jayaram S, Rajagopalan P, Sharma J, Murthy KR, Syed N, Goel R, Khan AA, Ahmad S, Dey G, Mudgal K, Chatterjee A, Huang TC, Zhong J, Wu X, Shaw PG, Freed D, Zahari MS, Mukherjee KK, Shankar S, Mahadevan A, Lam H, Mitchell CJ, Shankar SK, Satishchandra P, Schroeder JT, Sirdeshmukh R, Maitra A, Leach SD, Drake CG, Halushka MK, Prasad TS, Hruban RH, Kerr CL, Bader GD, Iacobuzio-Donahue CA, Gowda H, and Pandey A.** A draft map of the human proteome. *Nature* 509: 575-581, 2014.

93. **Koch RO, Wanner SG, Koschak A, Hanner M, Schwarzer C, Kaczorowski GJ, Slaughter RS, Garcia ML, and Knaus H-G.** Complex Subunit Assembly of Neuronal Voltage-gated K⁺ Channels: Basis for high-affinity toxin interactions and pharmacology *Journal of Biological Chemistry* 272: 27577-27581, 1997.
94. **Koczok K, A VO, G PS, Olah E, Torok O, and Balogh I.** [Inborn error of cholesterol biosynthesis: Smith-Lemli-Opitz syndrome]. *Orvosi hetilap* 156: 1695-1702, 2015.
95. **Kollar S, Berta L, Vasarhelyi ZE, Balog A, Vasarhelyi B, Rigo J, Jr., and Toldi G.** Impact of aging on calcium influx and potassium channel characteristics of T lymphocytes. *Oncotarget* 6: 13750-13756, 2015.
96. **Kremer W, Weyand M, Winklmeier A, Schreier C, and Kalbitzer HR.** 1.2 A X-ray structure of the renal potassium channel Kv1.3 T1 domain. *The protein journal* 32: 533-542, 2013.
97. **Leanza L, Trentin L, Becker KA, Frezzato F, Zoratti M, Semenzato G, Gulbins E, and Szabo I.** Clofazimine, Psora-4 and PAP-1, inhibitors of the potassium channel Kv1.3, as a new and selective therapeutic strategy in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 27: 1782-1785, 2013.
98. **Lee SY, Banerjee A, and MacKinnon R.** Two separate interfaces between the voltage sensor and pore are required for the function of voltage-dependent K(+) channels. *PLoS biology* 7: e47, 2009.
99. **Lee TE, Philipson LH, Kuznetsov A, and Nelson DJ.** Structural determinant for assembly of mammalian K⁺ channels. *Biophysical journal* 66: 667-673, 1994.
100. **Legein B, Temmerman L, Biessen EA, and Lutgens E.** Inflammation and immune system interactions in atherosclerosis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 70: 3847-3869, 2013.
101. **Lei L, Li H, Yan F, and Xiao Y.** Hyperlipidemia impaired innate immune response to periodontal pathogen porphyromonas gingivalis in apolipoprotein E knockout mice. *PLoS one* 8: e71849, 2013.
102. **Leonard RJ, Garcia ML, Slaughter RS, and Reuben JP.** Selective blockers of voltage-gated K⁺ channels depolarize human T lymphocytes: mechanism of the antiproliferative effect of charybdotoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 10094-10098, 1992.
103. **Levitan I, Fang Y, Rosenhouse-Dantsker A, and Romanenko V.** Cholesterol and ion channels. *Sub-cellular biochemistry* 51: 509-549, 2010.
104. **Levitan I, and Shentu TP.** Impact of oxLDL on Cholesterol-Rich Membrane Rafts. *Journal of lipids* 2011: 730209, 2011.
105. **Levitan I, Singh DK, and Rosenhouse-Dantsker A.** Cholesterol binding to ion channels. *Frontiers in physiology* 5: 65, 2014.
106. **Lewis RS.** Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annual review of immunology* 19: 497-521, 2001.
107. **Leys D.** Atherothrombosis: a major health burden. *Cerebrovasc Dis* 11 Suppl 2: 1-4, 2001.
108. **Li H, and Papadopoulos V.** Peripheral-type benzodiazepine receptor function in cholesterol transport. Identification of a putative cholesterol recognition/interaction amino acid sequence and consensus pattern. *Endocrinology* 139: 4991-4997, 1998.
109. **Liu HL, Chen CW, and Lin JC.** Homology models of the tetramerization domain of six eukaryotic voltage-gated potassium channels Kv1.1-Kv1.6. *Journal of biomolecular structure & dynamics* 22: 387-398, 2005.
110. **Liu Y, Chipot C, Shao X, and Cai W.** The effects of 7-dehydrocholesterol on the structural properties of membranes. *Physical biology* 8: 056005, 2011.
111. **Liu Y, Holmgren M, Jurman ME, and Yellen G.** Gated access to the pore of a voltage-dependent K⁺ channel. *Neuron* 19: 175-184, 1997.
112. **Lockwich TP, Liu X, Singh BB, Jadlowiec J, Weiland S, and Ambudkar IS.** Assembly of Trp1 in a signaling complex associated with caveolin-scaffolding lipid raft domains. *The Journal of biological chemistry* 275: 11934-11942, 2000.
113. **Lombard J.** Once upon a time the cell membranes: 175 years of cell boundary research. *Biology direct* 9: 32, 2014.

114. **Long SB, Campbell EB, and Mackinnon R.** Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* 309: 897-903, 2005.
115. **Long SB, Campbell EB, and Mackinnon R.** Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science* 309: 903-908, 2005.
116. **Long SB, Tao X, Campbell EB, and MacKinnon R.** Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature* 450: 376-382, 2007.
117. **Lorincz H, Harangi M, Olah AV, Szabo GP, Fulop P, Somodi S, Paragh G, and Seres I.** Altered lipid subfraction profile and impaired antioxidant defense of high-density lipoprotein in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Pediatric research* 77: 703-709, 2015.
118. **Lundbaek JA, Birn P, Hansen AJ, Sogaard R, Nielsen C, Girshman J, Bruno MJ, Tape SE, Egebjerg J, Greathouse DV, Mattice GL, Koeppe RE, 2nd, and Andersen OS.** Regulation of sodium channel function by bilayer elasticity: the importance of hydrophobic coupling. Effects of Micelle-forming amphiphiles and cholesterol. *The Journal of general physiology* 123: 599-621, 2004.
119. **Lundbaek JA, Collingwood SA, Ingolfsson HI, Kapoor R, and Andersen OS.** Lipid bilayer regulation of membrane protein function: gramicidin channels as molecular force probes. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* 7: 373-395, 2010.
120. **Lyons AB.** Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *Journal of immunological methods* 243: 147-154, 2000.
121. **Lyons AB, Blake SJ, and Doherty KV.** Flow cytometric analysis of cell division by dilution of CFSE and related dyes. *Current protocols in cytometry / editorial board, J Paul Robinson, managing editor [et al]* Chapter 9: Unit9 11, 2013.
122. **Lyons AB, and Parish CR.** Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *Journal of immunological methods* 171: 131-137, 1994.
123. **Maguy A, Hebert TE, and Nattel S.** Involvement of lipid rafts and caveolae in cardiac ion channel function. *Cardiovascular research* 69: 798-807, 2006.
124. **Mark L, and Hanyecz V.** How did cholesterol levels change in a village in Bekes County, Hungary, during the last 20 years? . *Orvosi hetilap* 156: 1614-1617, 2015.
125. **Mark L, and Paragh G.** Change in the cholesterol metabolism associated with the combined inhibition of synthesis and absorption. *Orvosi hetilap* 148: 627-632, 2007.
126. **Marsh D.** Electron spin resonance in membrane research: protein-lipid interactions from challenging beginnings to state of the art. *European biophysics journal : EBJ* 39: 513-525, 2010.
127. **Marsh D, and Barrantes FJ.** Immobilized lipid in acetylcholine receptor-rich membranes from *Torpedo marmorata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75: 4329-4333, 1978.
128. **Martel P, Leo D, Fulton S, Berard M, and Trudeau LE.** Role of Kv1 potassium channels in regulating dopamine release and presynaptic D2 receptor function. *PLoS one* 6: e20402, 2011.
129. **Martens GW, Arikan MC, Lee J, Ren F, Vallerkog T, and Kornfeld H.** Hypercholesterolemia impairs immunity to tuberculosis. *Infection and immunity* 76: 3464-3472, 2008.
130. **Martens JR, Navarro-Polanco R, Coppock EA, Nishiyama A, Parshley L, Grobaski TD, and Tamkun MM.** Differential targeting of Shaker-like potassium channels to lipid rafts. *The Journal of biological chemistry* 275: 7443-7446, 2000.
131. **Martens JR, O'Connell K, and Tamkun M.** Targeting of ion channels to membrane microdomains: localization of KV channels to lipid rafts. *Trends in pharmacological sciences* 25: 16-21, 2004.
132. **Martens JR, Sakamoto N, Sullivan SA, Grobaski TD, and Tamkun MM.** Isoform-specific localization of voltage-gated K⁺ channels to distinct lipid raft populations. Targeting of Kv1.5 to caveolae. *The Journal of biological chemistry* 276: 8409-8414, 2001.
133. **Martinez-Marmol R, Perez-Verdaguer M, Roig SR, Vallejo-Gracia A, Gotsi P, Serrano-Albarras A, Bahamonde MI, Ferrer-Montiel A, Fernandez-Ballester G, Comes N, and Felipe A.** A non-canonical di-acidic signal at the C-terminus of Kv1.3 determines anterograde trafficking and surface expression. *Journal of cell science* 126: 5681-5691, 2013.

134. **Matsuura E, Atzeni F, Sarzi-Puttini P, Turiel M, Lopez LR, and Nurmohamed MT.** Is atherosclerosis an autoimmune disease? *BMC medicine* 12: 47, 2014.
135. **Matteson DR, and Deutsch C.** K channels in T lymphocytes: a patch clamp study using monoclonal antibody adhesion. *Journal of Physiology* 307: 468-471, 1984.
136. **McCloskey C, Jones S, Amisten S, Snowden RT, Kaczmarek LK, Erlinge D, Goodall AH, Forsythe ID, and Mahaut-Smith MP.** Kv1.3 is the exclusive voltage-gated K⁺ channel of platelets and megakaryocytes: roles in membrane potential, Ca²⁺ signalling and platelet count. *The Journal of physiology* 588: 1399-1406, 2010.
137. **Megha, Bakht O, and London E.** Cholesterol precursors stabilize ordinary and ceramide-rich ordered lipid domains (lipid rafts) to different degrees. Implications for the Bloch hypothesis and sterol biosynthesis disorders. *The Journal of biological chemistry* 281: 21903-21913, 2006.
138. **Miceli MC, Moran M, Chung CD, Patel VP, Low T, and Zinnanti W.** Co-stimulation and counter-stimulation: lipid raft clustering controls TCR signaling and functional outcomes. *Seminars in immunology* 13: 115-128, 2001.
139. **Moog C, Luu B, Altmeyer A, and Bischoff P.** Studies on the immunosuppressive properties of 7,25 dihydroxycholesterol--II. Effects on early steps of T-cell activation. *International journal of immunopharmacology* 11: 559-565, 1989.
140. **Moreno PR.** Pathophysiology of plaque disruption and thrombosis in acute ischemic syndromes. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association* 10: 2-9, 2001.
141. **Neher E, and Sakmann B.** Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260: 799-802, 1976.
142. **Nezil FA, and Bloom M.** Combined influence of cholesterol and synthetic amphiphilic peptides upon bilayer thickness in model membranes. *Biophysical journal* 61: 1176-1183, 1992.
143. **O'Donnell CJ, and Elosua R.** Cardiovascular risk factors. Insights from Framingham Heart Study. *Revista espanola de cardiologia* 61: 299-310, 2008.
144. **Olah AV, Szabo GP, Varga J, Balogh L, Csabi G, Csakvary V, Erwa W, and Balogh I.** Relation between biomarkers and clinical severity in patients with Smith-Lemli-Opitz syndrome. *European journal of pediatrics* 172: 623-630, 2013.
145. **Oláh AV, Szabó, G. P., Varga, J., et al.** Typical biomarkers of congenital cholesterol deficiency in Smith–Lemli–Opitz syndrome patients and carriers. *Metabolismus* 12: 348-353, 2014.
146. **Orban C, Bajnok A, Vasarhelyi B, Tulassay T, and Toldi G.** Different calcium influx characteristics upon Kv1.3 and IKCa1 potassium channel inhibition in T helper subsets. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 85: 636-641, 2014.
147. **Ortiz E, Gurrola GB, Schwartz EF, and Possani LD.** Scorpion venom components as potential candidates for drug development. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 93: 125-135, 2015.
148. **Pacheco J, Dominguez L, Bohorquez-Hernandez A, Asanov A, and Vaca L.** A cholesterol-binding domain in STIM1 modulates STIM1-Orai1 physical and functional interactions. *Scientific reports* 6: 29634, 2016.
149. **Pahapill PA, and Schlichter LC.** Modulation of potassium channels in human T lymphocytes: effects of temperature. *The Journal of physiology* 422: 103-126, 1990.
150. **Pahapill PA, and Schlichter LC.** Modulation of potassium channels in intact human T lymphocytes. *The Journal of physiology* 445: 407-430, 1992.
151. **Panyi G.** Biophysical and pharmacological aspects of K⁺ channels in T lymphocytes. *European biophysics journal : EBJ* 34: 515-529, 2005.
152. **Panyi G, Bagdany M, Bodnar A, Vamosi G, Szentesi G, Jenei A, Matyus L, Varga S, Waldmann TA, Gaspar R, and Damjanovich S.** Colocalization and nonrandom distribution of Kv1.3 potassium channels and CD3 molecules in the plasma membrane of human T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 2592-2597, 2003.

153. **Panyi G, Possani LD, Rodriguez de la Vega RC, Gaspar R, and Varga Z.** K⁺ channel blockers: novel tools to inhibit T cell activation leading to specific immunosuppression. *Current pharmaceutical design* 12: 2199-2220, 2006.
154. **Panyi G, Sheng Z, and Deutsch C.** C-type inactivation of a voltage-gated K⁺ channel occurs by a cooperative mechanism. *Biophysical journal* 69: 896-903, 1995.
155. **Panyi G, Vamosi G, Bacso Z, Bagdany M, Bodnar A, Varga Z, Gaspar R, Matyus L, and Damjanovich S.** Kv1.3 potassium channels are localized in the immunological synapse formed between cytotoxic and target cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 1285-1290, 2004.
156. **Panyi G, Vamosi G, Bodnar A, Gaspar R, and Damjanovich S.** Looking through ion channels: recharged concepts in T-cell signaling. *Trends in immunology* 25: 565-569, 2004.
157. **Panyi G, Varga Z, and Gaspar R.** Ion channels and lymphocyte activation. *Immunology letters* 92: 55-66, 2004.
158. **Papazian DM, Timpe LC, Jan YN, and Jan LY.** Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature* 349: 305-310, 1991.
159. **Payet MD, and Dupuis G.** Dual regulation of the n type K⁺ channel in Jurkat T lymphocytes by protein kinases A and C. *The Journal of biological chemistry* 267: 18270-18273, 1992.
160. **Petho Z, Balajthy A, Bartok A, Bene K, Somodi S, Szilagyi O, Rajnavolgyi E, Panyi G, and Varga Z.** The anti-proliferative effect of cation channel blockers in T lymphocytes depends on the strength of mitogenic stimulation. *Immunology letters* 171: 60-69, 2016.
161. **Picazo-Juarez G, Romero-Suarez S, Nieto-Posadas A, Llorente I, Jara-Oseguera A, Briggs M, McIntosh TJ, Simon SA, Ladron-de-Guevara E, Islas LD, and Rosenbaum T.** Identification of a binding motif in the S5 helix that confers cholesterol sensitivity to the TRPV1 ion channel. *The Journal of biological chemistry* 286: 24966-24976, 2011.
162. **Popot JL, Demel RA, Sobel A, Van Deenen LL, and Changeux JP.** Interaction of the acetylcholine (nicotinic) receptor protein from *Torpedo marmorata* electric organ with monolayers of pure lipids. *European journal of biochemistry / FEBS* 85: 27-42, 1978.
163. **Porter FD.** Smith-Lemli-Opitz syndrome: pathogenesis, diagnosis and management. *European journal of human genetics : EJHG* 16: 535-541, 2008.
164. **Porter FD, and Herman GE.** Malformation syndromes caused by disorders of cholesterol synthesis. *Journal of lipid research* 52: 6-34, 2011.
165. **Pottosin II, Valencia-Cruz G, Bonales-Alatorre E, Shabala SN, and Dobrovinskaya OR.** Methyl-beta-cyclodextrin reversibly alters the gating of lipid rafts-associated Kv1.3 channels in Jurkat T lymphocytes. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 454: 235-244, 2007.
166. **Ren G, Jacob RF, Kaulin Y, Dimuzio P, Xie Y, Mason RP, Tint GS, Steiner RD, Roulet JB, Merkens L, Whitaker-Menezes D, Frank PG, Lisanti MP, Cox RH, and Tulenko TN.** Alterations in membrane caveolae and BKCa channel activity in skin fibroblasts in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Molecular genetics and metabolism* 104: 346-355, 2011.
167. **Rentero C, Zech T, Quinn CM, Engelhardt K, Williamson D, Grewal T, Jessup W, Harder T, and Gaus K.** Functional implications of plasma membrane condensation for T cell activation. *PLoS one* 3: e2262, 2008.
168. **Robinson LE, Shridar M, Smith P, and Murrell-Lagnado RD.** Plasma membrane cholesterol as a regulator of human and rodent P2X7 receptor activation and sensitization. *The Journal of biological chemistry* 289: 31983-31994, 2014.
169. **Rog T, Pasenkiewicz-Gierula M, Vattulainen I, and Karttunen M.** Ordering effects of cholesterol and its analogues. *Biochimica et biophysica acta* 1788: 97-121, 2009.
170. **Romanenko VG, Rothblat GH, and Levitan I.** Modulation of endothelial inward-rectifier K⁺ current by optical isomers of cholesterol. *Biophysical journal* 83: 3211-3222, 2002.
171. **Romanenko VG, Rothblat GH, and Levitan I.** Sensitivity of volume-regulated anion current to cholesterol structural analogues. *The Journal of general physiology* 123: 77-87, 2004.

172. **Roselaar SE, Kakkanathu PX, and Daugherty A.** Lymphocyte populations in atherosclerotic lesions of apoE $-/-$ and LDL receptor $-/-$ mice. Decreasing density with disease progression. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 16: 1013-1018, 1996.
173. **Rus H, Pardo CA, Hu L, Darrah E, Cudrici C, Niculescu T, Niculescu F, Mullen KM, Allie R, Guo L, Wulff H, Beeton C, Judge SI, Kerr DA, Knaus HG, Chandy KG, and Calabresi PA.** The voltage-gated potassium channel Kv1.3 is highly expressed on inflammatory infiltrates in multiple sclerosis brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 11094-11099, 2005.
174. **Seres I, Freyss-Beguín M, Mohacsi A, Kozlovsky B, Simon J, Devynck MA, and Fulop T, Jr.** Alteration of lymphocyte membrane phospholipids and intracellular free calcium concentrations in hyperlipidemic subjects. *Atherosclerosis* 121: 175-183, 1996.
175. **Sheng R, Chen Y, Yung Gee H, Stec E, Melowic HR, Blatner NR, Tun MP, Kim Y, Kallberg M, Fujiwara TK, Hye Hong J, Pyo Kim K, Lu H, Kusumi A, Goo Lee M, and Cho W.** Cholesterol modulates cell signaling and protein networking by specifically interacting with PDZ domain-containing scaffold proteins. *Nature communications* 3: 1249, 2012.
176. **Sikora DM, Ruggiero M, Petit-Kekel K, Merckens LS, Connor WE, and Steiner RD.** Cholesterol supplementation does not improve developmental progress in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *The Journal of pediatrics* 144: 783-791, 2004.
177. **Simons K, and Ikonen E.** Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387: 569-572, 1997.
178. **Simons K, and Sampaio JL.** Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3: a004697, 2011.
179. **Simons K, and Toomre D.** Lipid rafts and signal transduction. *Nature reviews Molecular cell biology* 1: 31-39, 2000.
180. **Singer SJ, and Nicolson GL.** The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175: 720-731, 1972.
181. **Singh AK, McMillan J, Bukiya AN, Burton B, Parrill AL, and Dopico AM.** Multiple cholesterol recognition/interaction amino acid consensus (CRAC) motifs in cytosolic C tail of Slo1 subunit determine cholesterol sensitivity of Ca²⁺- and voltage-gated K⁺ (BK) channels. *The Journal of biological chemistry* 287: 20509-20521, 2012.
182. **Smith DW, Lemli L, and Opitz JM.** A Newly Recognized Syndrome of Multiple Congenital Anomalies. *The Journal of pediatrics* 64: 210-217, 1964.
183. **Somodi S, Balajthy A, Szilagyi O, Petho Z, Harangi M, Paragh G, Panyi G, and Hajdu P.** Analysis of the K⁺ current in human CD4⁺ T lymphocytes in hypercholesterolemic state. *Cellular immunology* 281: 20-26, 2013.
184. **Stemme S, Faber B, Holm J, Wiklund O, Witztum JL, and Hansson GK.** T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 3893-3897, 1995.
185. **Suzuki T.** Lipid rafts at postsynaptic sites: distribution, function and linkage to postsynaptic density. *Neuroscience research* 44: 1-9, 2002.
186. **Swartz KJ.** Towards a structural view of gating in potassium channels. *Nature reviews Neuroscience* 5: 905-916, 2004.
187. **Syrbe S, Hedrich UB, Riesch E, Djemie T, Muller S, Moller RS, Maher B, Hernandez-Hernandez L, Synofzik M, Caglayan HS, Arslan M, Serratosa JM, Nothnagel M, May P, Krause R, Löffler H, Detert K, Dorn T, Vogt H, Kramer G, Schols L, Mullis PE, Linnankivi T, Lehesjoki AE, Sterbova K, Craiu DC, Hoffman-Zacharska D, Korff CM, Weber YG, Steinlin M, Gallati S, Bertsche A, Bernhard MK, Merckenschlager A, Kiess W, Gonzalez M, Zuchner S, Palotie A, Suls A, De Jonghe P, Helbig I, Biskup S, Wolff M, Maljevic S, Schule R, Sisodiya SM, Weckhuysen S, Lerche H, and Lemke JR.** De novo loss- or gain-of-function mutations in KCNA2 cause epileptic encephalopathy. *Nature genetics* 47: 393-399, 2015.
188. **Szabó GP.** Szubtelmerikus kromoszóma átrendeződések kimutatása és a Smith-Lemli-Opitz szindróma genetikai és biokémiai eltéréseinek vizsgálata mentálisan retardált betegekben (Egyetemi Doktori Értekezés) In: *Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola* Debreceni Egyetem, 2013.

189. **Szabo GP, Olah AV, Kozak L, Balogh E, Nagy A, Blahakova I, and Olah E.** A patient with Smith-Lemli-Opitz syndrome: novel mutation of the DHCR7 gene and effects of therapy with simvastatin and cholesterol supplement. *European journal of pediatrics* 169: 121-123, 2010.
190. **Szabo I, Bock J, Jekle A, Soddemann M, Adams C, Lang F, Zoratti M, and Gulbins E.** A novel potassium channel in lymphocyte mitochondria. *The Journal of biological chemistry* 280: 12790-12798, 2005.
191. **Szabó L EW, Soroncz M.** Metabolic background of the Smith–Lemli–Opitz (genito-facio-digital) syndrome. *Gyermekgyógyászat* 53: 695–702, 2002.
192. **Szilagi O, Boratko A, Panyi G, and Hajdu P.** The role of PSD-95 in the rearrangement of Kv1.3 channels to the immunological synapse. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 465: 1341-1353, 2013.
193. **Tempel BL, Papazian DM, Schwarz TL, Jan YN, and Jan LY.** Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of *Drosophila*. *Science* 237: 770-775, 1987.
194. **Tierney E, Conley SK, Goodwin H, and Porter FD.** Analysis of short-term behavioral effects of dietary cholesterol supplementation in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *American journal of medical genetics Part A* 152A: 91-95, 2010.
195. **Tint GS, Irons M, Elias ER, Batta AK, Frieden R, Chen TS, and Salen G.** Defective cholesterol biosynthesis associated with the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *The New England journal of medicine* 330: 107-113, 1994.
196. **Toldi G, Stenczer B, Treszl A, Kollar S, Molvarec A, Tulassay T, Rigo J, and Vasarhelyi B.** Lymphocyte calcium influx characteristics and their modulation by Kv1.3 and IKCa1 channel inhibitors in healthy pregnancy and preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 65: 154-163, 2011.
197. **Toldi G, Treszl A, Pongor V, Gyarmati B, Tulassay T, and Vasarhelyi B.** T-lymphocyte calcium influx characteristics and their modulation by Kv1.3 and IKCa1 channel inhibitors in the neonate. *International immunology* 22: 769-774, 2010.
198. **Toldi G, Vasarhelyi B, Kaposi A, Meszaros G, Panczel P, Hosszufalusi N, Tulassay T, and Treszl A.** Lymphocyte activation in type 1 diabetes mellitus: the increased significance of Kv1.3 potassium channels. *Immunology letters* 133: 35-41, 2010.
199. **Tombola F, Pathak MM, and Isacoff EY.** How does voltage open an ion channel? *Annual review of cell and developmental biology* 22: 23-52, 2006.
200. **Toselli M, Biella G, Taglietti V, Cazzaniga E, and Parenti M.** Caveolin-1 expression and membrane cholesterol content modulate N-type calcium channel activity in NG108-15 cells. *Biophysical journal* 89: 2443-2457, 2005.
201. **Toth PP, Potter D, and Ming EE.** Prevalence of lipid abnormalities in the United States: the National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2006. *Journal of clinical lipidology* 6: 325-330, 2012.
202. **Tu L, Santarelli V, and Deutsch C.** Truncated K⁺ channel DNA sequences specifically suppress lymphocyte K⁺ channel gene expression. *Biophysical journal* 68: 147-156, 1995.
203. **Tucker K, Cavallin MA, Jean-Baptiste P, Biju KC, Overton JM, Pedarzani P, and Fadool DA.** The Olfactory Bulb: A Metabolic Sensor of Brain Insulin and Glucose Concentrations via a Voltage-Gated Potassium Channel. *Results and problems in cell differentiation* 52: 147-157, 2010.
204. **Tucker K, Overton JM, and Fadool DA.** Diet-induced obesity resistance of Kv1.3^{-/-} mice is olfactory bulb dependent. *Journal of neuroendocrinology* 24: 1087-1095, 2012.
205. **Tulenko TN, Boeze-Battaglia K, Mason RP, Tint GS, Steiner RD, Connor WE, and Labelle EF.** A membrane defect in the pathogenesis of the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Journal of lipid research* 47: 134-143, 2006.
206. **Upadhyay SK, Eckel-Mahan KL, Mirbolooki MR, Tjong I, Griffey SM, Schmunk G, Koehne A, Halbout B, Iadonato S, Pedersen B, Borrelli E, Wang PH, Mukherjee J, Sassone-Corsi P, and Chandy KG.** Selective Kv1.3 channel blocker as therapeutic for obesity and insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: E2239-2248, 2013.
207. **van Kooten C, and Banchereau J.** CD40-CD40 ligand. *Journal of leukocyte biology* 67: 2-17, 2000.

208. **Varga Z, Gurrola-Briones G, Papp F, Rodriguez de la Vega RC, Pedraza-Alva G, Tajhya RB, Gaspar R, Cardenas L, Rosenstein Y, Beeton C, Possani LD, and Panyi G.** Vm24, a natural immunosuppressive peptide, potently and selectively blocks Kv1.3 potassium channels of human T cells. *Molecular pharmacology* 82: 372-382, 2012.
209. **Varshney A, and Mathew MK.** A tale of two tails: cytosolic termini and K(+) channel function. *Progress in biophysics and molecular biology* 83: 153-170, 2003.
210. **Verheugen JA, Vijverberg HP, Oortgiesen M, and Cahalan MD.** Voltage-gated and Ca(2+)-activated K⁺ channels in intact human T lymphocytes. Noninvasive measurements of membrane currents, membrane potential, and intracellular calcium. *The Journal of general physiology* 105: 765-794, 1995.
211. **Villalonga N, Escalada A, Vicente R, Sanchez-Tillo E, Celada A, Solsona C, and Felipe A.** Kv1.3/Kv1.5 heteromeric channels compromise pharmacological responses in macrophages. *Biochemical and biophysical research communications* 352: 913-918, 2007.
212. **Wang F, Beck-Garcia K, Zorzin C, Schamel WW, and Davis MM.** Inhibition of T cell receptor signaling by cholesterol sulfate, a naturally occurring derivative of membrane cholesterol. *Nature immunology* 17: 844-850, 2016.
213. **Witsch-Baumgartner M, and Lanthaler B.** Birthday of a syndrome: 50 years anniversary of Smith-Lemli-Opitz Syndrome. *European journal of human genetics : EJHG* 23: 277-278, 2015.
214. **Witztum JL, and Lichtman AH.** The influence of innate and adaptive immune responses on atherosclerosis. *Annual review of pathology* 9: 73-102, 2014.
215. **Wu CC, Su MJ, Chi JF, Chen WJ, Hsu HC, and Lee YT.** The effect of hypercholesterolemia on the sodium inward currents in cardiac myocyte. *Journal of molecular and cellular cardiology* 27: 1263-1269, 1995.
216. **Wulff H, Calabresi PA, Allie R, Yun S, Pennington M, Beeton C, and Chandy KG.** The voltage-gated Kv1.3 K(+) channel in effector memory T cells as new target for MS. *The Journal of clinical investigation* 111: 1703-1713, 2003.
217. **Wulff H, Miller MJ, Hansel W, Grissmer S, Cahalan MD, and Chandy KG.** Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel, IKCa1: a potential immunosuppressant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 8151-8156, 2000.
218. **Xu J, Koni PA, Wang P, Li G, Kaczmarek L, Wu Y, Li Y, Flavell RA, and Desir GV.** The voltage-gated potassium channel Kv1.3 regulates energy homeostasis and body weight. *Human molecular genetics* 12: 551-559, 2003.
219. **Xu L, Davis TA, and Porter NA.** Rate constants for peroxidation of polyunsaturated fatty acids and sterols in solution and in liposomes. *Journal of the American Chemical Society* 131: 13037-13044, 2009.
220. **Xu L, Sheflin LG, Porter NA, and Fliesler SJ.** 7-Dehydrocholesterol-derived oxysterols and retinal degeneration in a rat model of Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Biochimica et biophysica acta* 1821: 877-883, 2012.
221. **Xu X, Bittman R, Duportail G, Heissler D, Vilcheze C, and London E.** Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (rafts). Comparison of cholesterol to plant, fungal, and disease-associated sterols and comparison of sphingomyelin, cerebrosides, and ceramide. *The Journal of biological chemistry* 276: 33540-33546, 2001.
222. **Xu X, and London E.** The effect of sterol structure on membrane lipid domains reveals how cholesterol can induce lipid domain formation. *Biochemistry* 39: 843-849, 2000.
223. **Zhou X, Nicoletti A, Elhage R, and Hansson GK.** Transfer of CD4(+) T cells aggravates atherosclerosis in immunodeficient apolipoprotein E knockout mice. *Circulation* 102: 2919-2922, 2000.
224. **Zidovetzki R, and Levitan I.** Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochimica et biophysica acta* 1768: 1311-1324, 2007.

225. **Zweifach A, and Lewis RS.** Mitogen-regulated Ca^{2+} current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca^{2+} stores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 6295-6299, 1993.

X. PUBLIKÁCIÓS LISTA



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



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

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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





További közlemények

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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 10,32

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

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

Debrecen, 2016.08.15.



XI. TÁRGYSZAVAK

T-sejt, Kv1.3, koleszterin, 7-dehidrokoleszterin, Smith-Lemli-Opitz szindróma, hiperkoleszterinémia, patch-clamp

KEYWORDS

T cell, Kv1.3, cholesterol, 7-dehydrocholesterol, Smith-Lemli-Opitz syndrome, hypercholesterolemia, patch-clamp

XII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként szeretném megköszönni Dr. Hajdu Péternek a TDK-s korom óta nyújtott témavezetést és a munkám során nyújtott segítséget.

Köszönöm Prof. Szöllősi Jánosnak, a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet igazgatójának, hogy lehetővé tette számomra az intézetben való kutatómunkát.

Köszönetemet fejezem ki Prof. Panyi Györgynek, aki lehetővé tette számomra, hogy bekapcsolódjak az általa vezetett Elektrofiziológiai Laboratórium kutatómunkájába.

Külön köszönet illeti Dr. Pethő Zoltán Dénest az elmúlt évek közös munkájáért.

Köszönettel tartozom a kollaborációs

Köszönettel tartozom a patch-clamp laboratóriumban dolgozó jelenlegi és korábbi kollégáimnak, Dr. Krasznai Zoltánnak, Dr. Varga Zoltánnak, Dr. Papp Ferencnek, Dr. Szántó G. Tibornak, Dr. Tóth Ágnesnek, Dr. Szilágyi Orsolyának, Dr. Bartók Ádámnak, Dr. Papp Pálnak, Dr. Mészáros Beátának, Csóti Ágotának, Vörös Orsolyának akik remek hangulatot teremtettek a közös munka során és akikhez bármikor fordulhattam kérdéseimmel.

Külön hálával tartozom Nagy Cecéliának, a mérések előkészítésében, sejtkezelésben nyújtott segítségéért.

Szeretnék köszönetet mondani a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet valamennyi dolgozójának, akik e dolgozat megírásában segítettek.

Szeretném megköszönni szüleimnek és hat testvéremnek, hogy mindig mellettem voltak, támogattak és inspiráltak tanulmányaim során. A legnagyobb hálával azonban Feleségemnek, Balajthy-Hidegh Bernadettnek tartozok, aki szeretetével és türelmes figyelmével minden nehézségen átsegített. Soli Deo Gloria!

XIII. FÜGGELÉK