

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Feszültségkapuzott káliumcsatornák kapuzásának
vizsgálata modern biofizikai módszerekkel**

dr. Zákány Florina

Témavezető: Prof. Dr. Panyi György



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2020

FESZÜLTÉSGKAPUZOTT KÁLIUMCSATORNÁK KAPUZÁSÁNAK VIZSGÁLATA MODERN BIOFIZIKAI MÓDSZEREKKEL

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

Írta: **dr. Zákány Florina** okleveles általános orvos

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

Témavezető: Prof. Dr. Panyi György, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Matkó János, az MTA doktora

Prof. Dr. Magyar János, az MTA doktora

A doktori szigorlat (online formátumban) időpontja: 2020. november 20. 10:00

Az értekezés bírálói:

Dr. Dienes Beatrix, PhD

Dr. Török Zsolt, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Matkó János, az MTA doktora

Prof. Dr. Magyar János, az MTA doktora

Dr. Dienes Beatrix, PhD

Dr. Török Zsolt, PhD

Az értekezés védésének (online formátumban) időpontja: 2020. november 20. 14:00

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben részt kíván venni, úgy jelezze a biophys@med.unideb.hu e-mail címre küldött üzenetben a vitát megelőző munkanap (2020. november 19.) 17 óráig. A határidő lejártát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

I. A doktori értekezés előzményei

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

Az ioncsatornák kapuzása igen összetett folyamat, több ponton befolyásolható különböző ioncsatornán kívüli, illetve azon belüli (intrinsic) kölcsönhatások által. Az ioncsatornán kívüli tényezők között kiemelendő a sejtmembránban található koleszterin, ami

az egyik fő meghatározója a membrán biofizikai tulajdonságainak, vertikális és laterális heterogenitásának, amely tényezők együttesen jelentősen hozzájárulnak a különböző funkcionális membrándomének kialakulásához. Mivel a transzmembrán fehérjék, így az ioncsatornák és a koleszterin közötti interakciók, vagy azok változásai számos fiziológiás és patológiás folyamatban jelentős tényezőként szerepelnek, a koleszterin és az ioncsatornák közötti kölcsönhatások vizsgálatával számos tanulmány foglalkozott. Az utóbbi években elterjedt új technikák (például a krio-elektronmikroszkópia (krio-EM), vagy a szuperrezolúciós mikroszkópia), valamint a molekuláris dinamikai (MD) szimuláció terén bekövetkező jelentős fejlődés egy teljesen új perspektívát nyitott a protein-koleszterin interakciók vizsgálatában, ami a téma iránt újra felkeltette az érdeklődést. A korábbi tanulmányok két típusú interakciót különböztettek meg a koleszterin és különböző transzmembrán fehérjék, így az ioncsatornák között: egy direkt, ligandszerű kölcsönhatást, ahol a koleszterin különböző kötőhelyekhez kötődve módosítja az ioncsatornák működését, illetve indirekt kölcsönhatást, ahol a koleszterin a membrán biofizikai tulajdonságainak (membránfluiditás, - rigiditás, - vastagság, laterális nyomás, lipid rendezettség, dipólpotenciál) módosításán, vagy a lipidtutajokon keresztül fejti ki hatását. Az ioncsatornák, azon belül is a feszültségkapuzott káliumcsatornák megfelelő modellfehérjék a transzmembrán fehérje-koleszterin kölcsönhatások vizsgálatához, ugyanis a kapuzás során mind a feszültség szenzor, mind pedig a pórust alkotó hélixek mozgása és konformációváltozása a környező lipidmembránban, így azzal kölcsönhatásban valósul meg, a membrán koleszterin pedig közvetlenül is képes a foszfolipid kettősréteg tulajdonságait módosítani. Az ioncsatornák esetén a koleszterin hatásainak funkcionális feltérképezése relatíve egyszerű, mivel az ionáramok mérésével számos olyan paraméter meghatározható (például egyensúlyi aktiváció és inaktiváció, nyitási valószínűség, egyedi csatorna konduktancia, áram aktivációs és inaktivációs kinetikák), amelyek jól leírják a koleszterin által okozott módosítások funkcionális következményeit. A témában megjelent korai tanulmányok a közvetlen elektrofiziológiai hatások leírására szorítkoztak, majd a lehetséges hatásmechanizmusok vizsgálata során először az indirekt, membránbiofizikai és lipidtutajokon keresztüli hatásmódokat valószínűsítették. A képképző és különböző számítógépes modellezési technikák elterjedésével ez az irányvonal átalakult és előtérbe került a direkt kölcsönhatások fontosságának hangsúlyozása. Függetlenül a direkt vagy indirekt hatásmechanizmustól nem ismert az, hogy az ioncsatorna működésében kialakuló funkcionális változások melyik doménen (VSD, PD vagy a két domén közti csatolási apparátuson) keresztül következnek be.

Az ioncsatornák kapuzását befolyásoló belső, az ioncsatorna fehérjén belüli intrinszik kölcsönhatások közül a figyelem középpontjába került az ioncsatornák egyes kapui közötti

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

A Disszertáció középpontjában a fentiekből következően két kérdéskör állt. Egyrészt vizsgáltuk, hogy a feszültségkapuzott káliumcsatornák esetén melyik funkcionális domén érintett elsődlegesen a koleszterin által létrehozott elektrofiziológiai hatások közvetítésében a pórus felé. A koleszterin elsősorban a feszültség szenzor domén működését befolyásolja, amely másodlagosan tevődik át a csatolási apparátuson keresztül a pórusra? Vagy ezzel ellentétben a pórus elsődlegesen érintett és így a feszültség szenzor működését nem befolyásolja a koleszterin? A kísérletekkel új oldalról vizsgálhatjuk a koleszterin-Kv ioncsatornák közötti interakciókat és közelebb kerülhetünk a koleszterin hatásmechanizmusának megértéséhez, ami számos, a membrán koleszterintartalmának megváltozásával járó betegség molekuláris alapjainak a megértését segítheti elő. A másik kérdéskör az volt, hogy a kapuzás során hogyan befolyásolja az aktivációs kapu aktuális állapota a C-típusú inaktivációs kapu mozgását, annak záródását, illetve nyitását, negatív membránpotenciálok mellett. Létrejöh-e az inaktiváció közvetlenül a zárt állapotból (C→CI átmenet), az aktivációs kapu kinyílása nélkül? Szükséges-e az aktivációs kapu bezáródása negatív membránpotenciálon ahhoz, hogy a csatorna az inaktivált állapotából visszatérjen a zárt állapotba? Mindkét esetben az inaktivációs kapu mozgása az aktivációs kapu rögzített (zárt ill. nyitott) állapota mellett valósulna meg, a két kapu közötti szoros allosztérikus csatolás ellenére. A negatív membránpotenciálok melletti kapuzási átmenetek tanulmányozásának az ad élettani jelentőséget, hogy a CI állapot betöltöttsége, azaz a CI állapot kialakulása és az inaktivációból történő visszatérés jelentősen meghatározza a potenciálisan aktiválható csatornák számát, ami a sejtek ingerelhetőségének egyik meghatározó tényezője.

A fent említett mindkét kérdéskör vizsgálatára olyan újszerű és érzékeny módszereket alkalmaztunk, amelyek révén olyan, eddig nem ismert eredményekre tehetünk szert, ami új

megvilágításba helyezi az ioncsatornák kapuzásának finomhangolásával kapcsolatos jelenlegi tudásunkat. Azt, hogy a Kv ioncsatornák esetében melyik funkcionális domént (VSD, PD, vagy a két domén közti csatolási apparátus) befolyásolja elsődlegesen a membránban levő koleszterin, kételektrodás voltage-clamp fluorimetriás (TEVCF) technikával vizsgáltuk. Ez a technika lehetővé teszi, hogy a feszültség-szenzor extracelluláris részére pontmutációval bevitt ciszteint szelektíven megjelöljük egy cisztein specifikus fluoreszcens festékkel, így a kapuzás során a VSD mozgása végig nyomonkövethetővé válik, míg a pórus aktuális állapotáról az egyidejű ionárammérések segítségével kapunk információt. Ahogy az a későbbiek során látható, mind az ionáramok, mind pedig a fluoreszcenciás jelek nagysága, valamint azok minősége (jó jel-háttér és jel-zaj arányok), lehetővé tették számunkra, hogy érzékeny és pontos betekintést nyerjünk a koleszterin ioncsatornán belüli elsődleges, eddig ismeretlen támadáspontját illetően. A C-típusú inaktivációval kapcsolatos kísérletek során az általunk alkalmazott, a kísérletek céljaihoz tervezetten alakított, többszörösen mutáns *Shaker* ioncsatornák lehetővé tették a zárt állapotból bekövetkező C-típusú inaktiváció (C→CI), valamint a nyitott aktivációs kapu melletti inaktivációból történő visszatérés (OI→O) lehetőségének szelektív tanulmányozását. A C→CI átmenet meglétét olyan kísérletes körülmények között vizsgáltuk, ahol az aktivációs kapu nyitását a negatív membránpotenciálokra tapasztalható kis hajtóerő és az alacsony nyitási valószínűség ellenére is érzékenyen tudtuk nyomonkövetni az általunk alkalmazott gyorsperfúziós rendszer, illetve állapotfüggő cisztein specifikus módosítási esszé segítségével. Az OI→O átmenet vizsgálatánál az aktivációs kapu nyitott állapotban történő rögzítésének alapja egy Cd²⁺-híd kialakulása volt a mutációval bevitt cisztein, illetve egy natív hisztidin aminosav között. Mindkét kísérletsorozatban az általunk beépített cisztein és a gyorsperfúzióval alkalmazott Cd²⁺ között létrejövő kémiai kölcsönhatás biztosította a kísérletek specifikusságát. A Cd²⁺-ot tartalmazó oldatok gyorsperfúziós rendszerrel történő precíz alkalmazása biztosította, hogy a Cd²⁺-ot szelektíven, csak a csatorna általunk kiválasztott kapuzási állapotaiban alkalmaztuk.

II. Célkitűzések

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

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

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

valószínűség, egyedi csatorna konduktancia, áram aktivációs és inaktivációs kinetikák). Ezentúl a TEVCF lehetőséget ad, hogy az ionáramok mérésével egyidőben a VSD mozgását leíró paramétereket is meghatározzuk ($F_{\text{norm}}-V$ görbe és fluoreszcenciás jel aktivációs kinetikája). Ehhez a VSD S3-S4 linkerébe pontmutációval bevitt ciszteint egy ciszteinre specifikus fluoreszcens festékkel jelöljük meg. Az aktivációs kapuzás során a VSD-ben található S4-es hélix a membrán síkjából kifelé mozdul el, ami révén megváltozik a festék kvantumhatásfoka. A fluoreszcens jel intenzitásváltozása ezáltal jól tükrözi a VSD mozgását. A kísérleteket afrikai karmosbéka petesejtjeiben expresszált A309C Kv1.3 és L322C Kv10.1 humán ioncsatornákon végeztük. Az oocita expressziós rendszer biztosította számunkra a TEVCF mérésekhez szükséges nagy csatornaexpressziót. A szterol moduláció ioncsatornán belüli célpontjának és a hatások csatorna specificitásának meghatározásához a különböző kapuzási mechanizmussal rendelkező Kv1.3 és Kv10.1 csatornák esetén hasonlítottuk össze a VSD aktivációt és pórusnyitást leíró feszültségfüggő egyensúlyi és kinetikai paramétereket kontroll sejtekben, valamint szterolokkal történő kezeléseket után. A szterol hatások specificitásának vizsgálatához a koleszterin által kiváltott változásokat összehasonlítottuk a 7-dehidrokoleszterin (7DHC) kezelés esetén megfigyelttel. Utóbbi vegyületet a koleszterinhez képest megfigyelhető kismértékű szerkezetbeli eltérése és a Smith-Lemli-Opitz-szindrómában leírt patofiziológiai jelentősége miatt választottuk. A kísérletekkel közelebb kerülhetünk a koleszterin hatásmechanizmusának megértéséhez, ami számos olyan betegség molekuláris alapjainak a megértését segíthetné elő, amelyek a sejtmembrán koleszterintartalmának megváltozásával járnak együtt (pl. hiperkoleszterinémia, SLO-szindróma, Niemann-Pick betegség, Gaucher-kór).

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

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

III. Anyagok és módszerek

3.1 Molekuláris biológia

Az S3-S4 linkerben cisztein mutációkat tartalmazó humán Kv1.3 (KCNA3, Uniprot B2RA23) csatornákat pontmutáció segítségével állítottuk elő a vad típusú csatornát tartalmazó pBSTA vektorban (QuikChange; Agilent, Santa Clara, CA). A pontmutáció sikerességét szekvenálással igazoltuk. A pSGEM vektorban található humán Kv10.1 (KCNH1, Isoform 1, Uniprot O95259-2) L322C mutáns csatorna L. A. Pardotól származik (Max Planck Institute, Göttingen, Németország). A plazmidokat HindIII (Kv1.3) vagy NheI (Kv10.1) enzimmel linearizáltuk, majd átírtuk mRNS-sé Invitrogen mMACHINE T7 Transcription Kit (ThermoFisher, Waltham, MA) segítségével.

A mikroszkópos méréseknél használt humán Kv1.3_{FLAG} ioncsatornát kódoló plazmidot Dr. Hajdú Péter (Debreceni Egyetem, Magyarország) állította elő, míg a Kv10.1_{FLAG} ioncsatornát kódoló pCMV6 plazmidot az OriGene-től vásároltuk (referencia szám: RC215104). A GFP-GPI plazmid Jennifer Lippincott-Schwartz (NIH, Bethesda, MD) ajándéka volt. A Kv1.3_{FLAG} és Kv10.1_{FLAG} csatornák a FLAG epitóp beépítésén kívül más mutációt nem tartalmaztak.

A Disszertációban bemutatott, a C-típusú inaktiváció természetére vonatkozó kísérletek alapjául szolgáló *Shaker*-IR konstruktban (a *Shaker*-IR ioncsatorna GW1-CMV plazmidban R. Horn ajándéka, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA) a 6-46 aminosavak hiánya miatt nincs N-típusú inaktiváció, a C301S és C308S pontmutációk pedig kivédtek a Cd²⁺ és az endogén ciszteinnek közötti kölcsönhatás zavaró hatását. A konstruktban a *Shaker* B számozás szerinti 449-es (T449A) és 474-es (V474C) vagy 476-os (V476C) pozícióban létrehozott aminosavcsereket QuikChange célzott mutagenézissel (Stratagene, San Diego, CA) állítottuk elő, végül szekvenálással ellenőriztük a mutációk sikerességét.

3.2 Expressziós rendszerek, transzfekció és mRNS injektálás

A kételektrodás voltage-clamp fluorimetriás (TEVCF) kísérletekhez a *Xenopus laevis* afrikai karmosbéka oocitákat az EcoCyte Bioscience-től (Dortmund, Németország) vásároltuk. A sejteket 30-50 nl mennyiségű, ~1 µg/µl koncentrációjú mRNS-sel injektáltuk, majd 1-3 napig 18°C-on inkubáltuk 93 mM NaCl-ot, 5 mM KCl-ot, 1,8 mM CaCl₂-ot, 1 mM MgCl₂-ot, 5 mM HEPES-t és 50 mg/l Gentamycint tartalmazó ND93 oldatban (pH=7,4). A Dolgozatban szereplő

összes oldat előállításához szükséges anyagot a Sigma-Aldrich-től (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) szereztük be.

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

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

3.3 A sejtmembrán szterol tartalmának módosítása

A sejtmembrán szterol tartalmának módosítása koleszterin (Sigma-Aldrich), 25-[N-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)metil]amino]-27-norkoleszterin (NBD-koleszterin, Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) vagy 7-dehidrokoleszterin (7DHC) (Sigma-Aldrich) vegyületek metil-béta-ciklodextrinnel (MβCD) képzett komplexei (CycloLab Cyclodextrin R&D Laboratory, Budapest, Magyarország) segítségével történt. A szterol-MβCD komplexek töltéshez használt koncentrációit úgy határoztuk meg, hogy azok 195 µM szterolt tartalmazzanak. Az elektrofiziológiai vagy mikroszkópos kísérletek előtt 60 percen keresztül kezeltük mind az oocitákat, mind a HEK-293 sejteket a komplexekkel szobahőmérsékleten. Elektrofiziológiai mérésekhez a szterol-MβCD komplexeket ND93-ban, míg mikroszkópiához 150 mM NaCl-ot, 5 mM KCl-ot, 1,5 mM CaCl₂-ot, 1 mM MgCl₂-ot és 10 mM HEPES-t tartalmazó 7,36-7,38 közötti pH-jú oldatban oldottuk fel. Mindkét esetben inkubáció után az oocitákat, illetve HEK-293 sejteket alaposan mostuk a komplexektől mentes oldatokkal.

3.4 Elektrofiziológia

3.4.1 Kételektródás voltage-clamp fluorimetria (TEVCF)

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

A TEVCF során az oocita membránpotenciál beállítását és az ionáramok mérését Oocyte Clamp OC-725C erősítővel (Warner Instruments, Hamden, CT) végeztük. A fluoreszcens jel intenzitását Nikon Eclipse FNI mikroszkóp (Nikon, Tokió, Japán), 40 \times , 0,8-NA CFI Plan Fluor Nikon víz immerziós objektív és fotodióda (PIN-040A; United Detector Technology, OSI Optoelectronics, Hawthorne, CA) segítségével mértük. A TAMRA-MTS jelének detektálásához 545/25 gerjesztési szűrőt, 565LP dikroikus tükröt és 605/70 emissziós szűrőt használtunk. A fotodióda jelét Axopatch 200A erősítővel amplifikáltuk, és az ionáramokkal együtt az adatokat pClamp10 programcsomag (Molecular Devices, San Jose, CA) által vezérelt Axon Digidata 1550 (Molecular Devices) illesztőegységgel digitalizáltuk. A megvilágításhoz M530L2-C1 zöld (530 nm-es) LED-et (ThorLabs, Newton, NJ) használtunk. A TEVCF mérések során az ionáramok és fluoreszcens jelek mérése esetén a mintavételezés 5 kHz frekvenciával történt. Az ábrákon a fluoreszcencia görbék egyedi mérések során nyert Gauss-szűrővel filterezett átlagolás nélküli adatokat mutatnak. Az online szűrőzés a mintavételezési frekvencia felénél kisebb frekvenciaértékkel történt, jellemzően a mintavételezés: szűrőzés aránya 2:1 volt. A fluoreszcens jelek analízise során további offline szűrőzést alkalmaztunk.

3.4.2 Patch-clamp mérések outside-out konfigurációban

Az egyedi csatorna paramétereket mechanikusan devitellinizált oociták outside-out konfigurációban történő patch-clamp méréseivel határoztuk meg. A 7,36-7,38 közötti pH értékre beállított standard intracelluláris oldat 105 mM KF-ot, 35 mM KCl-ot, 10 mM EGTA-

t és 10 mM HEPES-t tartalmazott. A 7,36-7,38 közötti pH értékre beállított standard extracelluláris oldat 150 mM NaCl-ot, 5 mM KCl-ot, 1,5 mM CaCl₂-ot, 1 mM MgCl₂-ot és 10 mM HEPES-t tartalmazott. A mérésekhez használt pipettákat GC 150 F-15 boroszilikát üvegapillárisokból (Harvard Apparatus, Kent, Egyesült Királyság) húztuk és ellenállásuk 8–9 MΩ volt. A mérések során Axopatch 200B és Multiclamp 700B erősítőket használtunk és az adatokat Axon Digidata 1550 segítségével digitalizáltuk.

3.4.3 Patch-clamp mérések inside-out konfigurációban

Az adatgyűjtéshez Axopatch 200B erősítőt (Molecular Devices) használtunk, az adatok digitalizálása Axon Digidata 1550 (Molecular Devices) illesztőegységgel történt. A mérés során a mintavételezés frekvenciája a szűrők sarokfrekvenciájának legalább kétszerese volt. A mérésekhez használt pipettákat GC 150 F-15 boroszilikát üvegapillárisokból (Harvard Apparatus) húztuk és ellenállásuk 8–9 MΩ volt. A mérések során csak azon patch-ek adatait vettük figyelembe, amelyek esetén az aspecifikus szivárgó áram nagysága a csúcsáram kevesebb, mint 5%-a volt. A méréseket minden esetben szobahőmérsékleten (20–24°C) végeztük.

Az inside-out méréseknél használt intracelluláris oldat 105 mM KF-ot, 35 mM KCl-ot, 10 mM EGTA-t és 10 mM HEPES-t tartalmazott. Az oldat pH-ját KOH-dal titráltuk 7,36-7,38-as értékre, így végül az összesített K⁺ koncentráció 160–165 mM-nak, az ozmolaritás pedig 285–295 mOsm/L-nek adódott. A perfúziós rendszer kinetikájának karakterizálása során használt belső oldat hasonló összetételű volt, annyi különbséggel, hogy az 50 mM K⁺-ot tartalmazott és a megfelelő káliumsókat 100 mM NaF-dal helyettesítettük. A Cd²⁺ modifikációs kísérletekhez az intracelluláris oldat a standard K⁺-bázisú oldathoz hasonló volt, azzal a módosítással, hogy 125 mM KF, 35 mM KCl és 10 mM HEPES mellett EGTA-t nem tartalmazott. A standard extracelluláris (az inside-out konfiguráció miatt a pipettában levő) oldat 150 mM NaCl-ot, 2 mM KCl-ot, 1,5 mM CaCl₂-ot, 1 mM MgCl₂-ot és 10 mM HEPES-t tartalmazott, ozmolaritása 290 mOsm/L, pH-ja 7,36-7,38 volt.

A mérések során a gyors oldatcseréhez egy három kimenettel rendelkező perfúziós fejvel ellátott Warner Instruments SF-77A Perfusion Fast-Step perfúziós rendszert használtunk. A mikroperfúzió kimenetein folyamatos volt a folyadékok áramlása, a precíziós motor az adatgyűjtéssel szinkronizálva pozícionálta a megfelelő kimenetet az inside-out patch intracelluláris felszínével szemben. Az inside-out patch-eket 0,5 ml/perc áramlási sebességgel perfundáltuk a megfelelő intracelluláris oldatokkal. Az oldatcsere sebességének

meghatározásához használt tesztprotokoll elvét és módját már korábban leírták. Az oldatcsere teljes mértékben végbement 30 ms alatt.

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

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

Az ioncsatornák jelöléséhez Kv1.3_{FLAG} vagy Kv10.1_{FLAG} fehérjéket expresszáló sejteket inkubáltunk 2 µg/ml anti-FLAG M2-Cy3 antitest (Sigma-Aldrich) jelenlétében 30 percig jégen. Mivel Kv10.1 esetén a FLAG epitóp a fehérje intracelluláris részén helyezkedik el, a sejteket előbb 3,7%-os formaldehidben fixáltuk, majd a jelölés 0,1% BSA-t és 0,1% Triton X-100-at tartalmazó PBS-ben történt.

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

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

3.6 Adatok elemzése

3.6.1 Kételektrodás voltage-clamp fluorimetriás (TEVCF) mérések elemzése

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

A TEVCF mérések során az ionáramok és fluoreszcens jelek mérése esetén a mintavételezés 5 kHz frekvenciával történt. A fluoreszcens jelek nagyságát a $\Delta F/F$ százalékos arányában fejeztük ki, ahol ΔF a jel amplitúdójának változását, míg F a tartófeszültségen az alap fluoreszcencia szintjét jelöli. A fotoelhalványítás okozta hatások korrekciójához a különböző membránpotenciálokon nyert fluoreszcencia adatokból kivontuk a -100 mV-os teszt feszültséghez tartozó fluoreszcens jelet. A $K_v1.3$ 309C F_{norm-V} értékeinek meghatározásához a fluoreszcens jelek egyensúlyi komponenseit normáltuk a maximális intenzitásra és a kapott értékeket a teszt potenciál függvényében ábrázoltuk. Az MTS-TAMRA fluorofórral jelölt $K_v10.1$ 322C a $K_v1.3$ ioncsatornával ellentétben komplex fluoreszcens jelet adott, amely felbontható hiperpolarizált (-180 és -90 mV közötti) és depolarizált (-80 és $+60$ mV közötti) membránpotenciál mellett mért komponensekre. A hiperpolarizált membránpotenciálok mellett mért jeleknek két azonos polaritású komponense volt, így azokat a $K_v1.3$ jeleihez hasonló módon elemeztük. Ezzel szemben a depolarizált membránpotenciál mellett mért jeleknek két ellentétes polaritású komponense volt. A jel abszolút értékének meghatározásához a második komponenst ellentétes polaritással hozzáadtuk az első komponenshez.

Az I-V görbék meghatározásához a szivárgó árammal korrigált csúcsáramokat a teszt potenciál függvényében ábrázoltuk. A $K_v1.3$ 309C és $K_v10.1$ 322C konduktancia-feszültség (G-V) görbéit jellemző $V_{1/2}$ és k paramétereinek meghatározásához a feszültség-áramerősség (I-V) görbékhez az

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

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

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

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

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

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

ahol $I(t)$ az áramamplitúdó az adott t időpillanatban, I_0 a maximális áramamplitúdó, τ_{act} az aktivációs időállandó, C pedig egy konstans, nem időfüggő áram komponens.

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

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

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

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

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

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

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

A Kv10.1 csatornák Cole-Moore shiftjének vizsgálatához 10 s hosszúságú -160 és -60 mV közötti tartományban változtatott tartófeszültségről $+40$ mV-ra depolarizáltuk a sejteket 500 ms-ig. Az ionáramok aktivációs időállandóinak meghatározásához elsőfokú exponenciális függvényt illesztettünk a különböző pulzus előtti potenciálok alkalmazása esetén kiváltott áramok esetén kapott adatokra. Az illesztés során nem vettük figyelembe az áramok első szigmoid fázisát.

A TEVCF mérések során a szterolokkal történő töltések által okozott áramcsökkenés meghatározásához a Kv1.3 esetén $+40$ mV-os, Kv10.1 esetén $+60$ mV-os depolarizáló pulzusok által kiváltott csúcsáramok adatait átlagoltuk az adott napon mért kontroll, koleszterinnel, illetve 7DHC-val kezelt oociták esetén, majd a számított értékeket normáltuk az adott napon mért kontroll sejtek csúcsáramainak átlagára. Ezáltal minden mérési napon számítottunk egy normált áramamplitúdót, a bemutatott SEM adatok pedig a normált amplitúdók napi variabilitásából származnak.

3.6.2 Outside-out konfigurációban történő patch-clamp mérések elemzése

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

$$\sigma^2 = i \langle I \rangle - (\langle I \rangle^2 / N)$$

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

3.6.3 Inside-out konfigurációban történő patch-clamp mérések elemzése

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

A mutáns *Shaker*-IR csatornák G_{norm} -V görbéinek meghatározásához az inside-out patch-eket -120 mV-os tartófeszültségről depolarizáltuk -100 és $+70$ mV közötti tesztfeszültségekre 10 mV-os léptékekkel 100 ms hosszan 60 s-onként. Az adott tesztpotenciálok (V) esetén a konduktancia értékeket a szivárgási árammal korrigált csúcsáramok (I_{peak}) és a K^+ egyensúlyi potenciálja (E_{ekv}) segítségével határoztuk meg a $G=I_{\text{peak}}/(V-E_{\text{ekv}})$ képlet alapján. Bár nem-inaktiválódó áramok esetén a G-V görbe meghatározásához az általános módszer az izokronális farokáram analízise, az általunk alkalmazott *Shaker*-IR/T449A csatornák inaktiválódnak, ami a farokáram analízisének értelmezését megbonyolítja, ezért nem ezt a módszert alkalmaztuk. Az adott G értékeket a maximális konduktancia nagyságára normáltuk (G_{norm}) és a tesztpotenciál függvényében ábrázoltuk. A G_{norm} -V görbéket Boltzmann-függvény illesztésével kvantifikáltuk:

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

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

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

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

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

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

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

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

Az inaktivációból való visszatérés kinetikájának méréséhez -120 mV-os tartófeszültségről kiinduló párban alkalmazott, ioncsatorna konstruktától függően 200, illetve 400 ms hosszúságú $+50$ mV-os pulzusokat használtunk. A pulzusok közötti -120 mV-os intervallumok (ipi) időtartamát $0,5$ és 60 s között változtattuk. A visszatérési hányadot az

$$\frac{I_2 - I_{SS1}}{I_1 - I_{SS1}}$$

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

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

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

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

3.6.4 Konfokális lézer pásztázó és STED mikroszkópiás mérések elemzése

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

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

3.7 Statisztika

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

A Disszertációban az adatokat átlag \pm SEM formában ábrázoltuk. Az adott elemzés során felhasznált sejtek számát (n) a szövegben jelöltük. Az eltérések statisztikai vizsgálata során a p értékeket ANOVA analízist követően Tukey's HSD teszt segítségével számítottuk ki. Az eltéréseket $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

IV. Eredmények

4.1 Szterolok hatása a vad típusú Kv1.3 feszültségfüggő kapuzásának egyensúlyi és kinetikai paramétereire

A Kv1.3 ioncsatorna szterolok iránti érzékenységének vizsgálata során kapott korábbi eredményeink alapján a sejtmembrán koleszterin vagy 7DHC tartalmának növelése lecsökkenti a teljessejt-áramok nagyságát, a konduktancia feszültségfüggését leíró $G_{\text{norm}}-V$ görbe jobbra tolódását eredményezi, valamint lelassítja a csatorna aktivációs kinetikáját mind humán limfocitákban, mind pedig CHO sejtekben. Kísérleteink kezdetekor a hagyományos emlőssejtes rendszerekben, illetve humán mintákban megfigyelt fenti eltéréseket kíséreltük meg reprodukálni *Xenopus laevis* afrikai karmosbéka oocita expressziós rendszerben kifejezett vad típusú Kv1.3 csatornákon. A nyert ionáramokból származtatott, a normált konduktancia feszültségfüggését ábrázoló grafikonok azt mutatják, hogy a sejtmembrán koleszterinnel és 7DHC-val történő töltése jelentősen módosítja ezt az összefüggést. A mérések során nyert adatok statisztikai analízise azt mutatja, hogy a $V_{1/2}$ érték szignifikánsan depolarizált koleszterin és 7DHC töltést követően, hasonlóan az emlős sejtekben tapasztaltakhoz. Az áramok aktivációs kinetikáját jellemző időállandókat szintén szignifikánsan megnövelte a sejtmembrán koleszterinnel vagy 7DHC-val történő töltése, azaz ilyen körülmények között az áramok lassabb kinetikával aktiválódtak a kezeletlen (kontroll) oocitákban mértekhez képest. Az egyensúlyi inaktiváció feszültségfüggése szintén depolarizáció irányába tolódott el a sejtmembrán szterollokkal történő töltésének hatására, a $V_{1/2}$ értékek kvantitatív analízise szignifikáns különbséget mutat a kontrollhoz képest mind koleszterin, mind pedig 7DHC töltést követően. Eredményeink azt mutatják, hogy a membránösszetételbeli eltérések ellenére a *Xenopus* rendszer megfelelően modellezi az emlős sejtekben megfigyelhető ilyen jellegű fehérje-membrán kölcsönhatásokat.

Ahhoz, hogy a Kv1.3 feszültség szenzorának mozgásait TEVCF technikával tanulmányozni tudjunk, a fluorofórral történő jelöléshez pontmutáció segítségével egy cisztein aminosavat kellett bevinnünk a csatorna extracellulárisan található S3-S4 linkerébe. Mivel korábban még nem írtak le a TEVCF mérésekhez leginkább megfelelő, cisztein mutációt hordozó Kv1.3 ioncsatornát, a mérésekhez legoptimálisabban használható (nagy amplitúdójú, könnyen elemezhető fluoreszcens jelet adó csatorna, amely konduktanciája és főbb elektrofiziológiai paraméterei nem térnek el a vad típusú csatorna megfelelő paramétereitől) cisztein szubsztitúciós hely megtalálásához az S3-S4 linker aminosavait pontmutációval egyenként ciszteinre cseréltük, majd az így létrehozott mindegyik mutáns csatornát leteszteltük

TEVCF-fel. Az S4-es hélix tetejéhez közeli 309-es pozíciójában létrehozott Ala (alanin) → Cys (cisztein) mutáció bizonyult a leginkább alkalmas választásnak a TEVCF mérések számára a konstrukt nagy és feszültségfüggő, egyfázisú fluoreszcens jele miatt.

Az A309C mutáns megőrizte a Kv1.3 alapvető kapuzási tulajdonságait, bár a legtöbb TEVCF méréshez létrehozott cisztein mutációhoz hasonlóan kissé módosította a konduktancia feszültségfüggését leíró $G_{\text{norm-V}}$ görbét. Az A309C jelölése MTS-TAMRA fluoreszcens festékkel adta a legnagyobb intenzitású fluoreszcens jelet, ezért a kísérletek során ezt a festéket használtuk AlexaFluor488 vagy tetrametilrodamin-maleimid (TMRM) helyett. A Kv1.3-ban nincsenek natív extracelluláris ciszteinek, ami ezáltal kizárja a csatorna nonspecifikus jelölődésének lehetőségét. Mivel a Disszertáció további része elsősorban az elektrofiziológiai kísérletekhez használt cisztein mutánsokkal nyert eredményeket írja le, a továbbiakban a Kv1.3 és Kv10.1 a módszer során használt mutánsokat (A309C a Kv1.3 esetén, illetve L322C a Kv10.1 esetén) jelölik, míg a ciszteineket nem tartalmazó variánsokra vad típusú (WT Kv1.3, illetve WT Kv10.1) csatornaként utalunk. A bemutatott cisztein mutációt hordozó csatornákkal kapott eredményeket MTS-TAMRA jelölés után kaptuk, a be nem mutatott mérések alapján ugyanakkor a festék alkalmazása nem befolyásolta szignifikáns módon a vizsgált elektrofiziológiai paramétereket vagy a szterolok hatását.

A Kv1.3 A309C csatornákat kifejező *Xenopus laevis* oocitákat -100 mV-os tartófeszültségről kiindulva különböző tesztpotenciálokra depolarizáltuk -140 és $+40$ mV között 10 mV-os lépésekben, 250 ms-on keresztül 30 s-onként. Az ekkor kialakuló ionáramokat és fluoreszcens jeleket TEVCF módszerrel egyidejűleg detektáltuk és így megkaptuk az áram-feszültség (I-V) és relatív fluoreszcencia intenzitás változásának feszültségfüggését leíró $\Delta F/F-V$ görbéket. Ezekből a görbékből az Anyagok és módszerek fejezetben részletezetteknek megfelelően a normált konduktancia-feszültség ($G_{\text{norm-V}}$) és normált fluoreszcencia változás-feszültség ($F_{\text{norm-V}}$) összefüggéseket számítottuk, és határoztuk meg azok félaktivációs feszültségét ($V_{1/2}$) és a meredekségi együtthatót (k). A várakozásoknak megfelelően az $F_{\text{norm-V}}$ görbét jellemző félaktivációs feszültség hiperpolarizáltabb volt a $G_{\text{norm-V}}$ görbe félaktivációs feszültségéhez képest ($V_{1/2} = -41,1 \pm 1,8$ mV ($n=12$) vs. $-15,8 \pm 0,5$ mV ($n=10$)), amely arra utalt, hogy a VSD aktivációja negatívabb potenciálokra kezdődik, mint a pórus nyitása.

A kísérleteket a kontroll mérések után koleszterinnel, illetve 7DHC-val töltött sejteken is elvégeztük. Mindkét szterol kismértékű, de szignifikáns hiperpolarizáció irányú eltolódást okozott a pórus nyitását jellemző $G_{\text{norm-V}}$ görbéken ($V_{1/2} = -15,8 \pm 0,5$ mV ($n=10$) kontroll; $-21,1 \pm 1,5$ mV ($n=11$), $p = 0,049$ koleszterin; és $-29,0 \pm 1,9$ mV ($n=12$), $p=0,001$ 7DHC esetén),

míg a VSD mozgását leíró $F_{\text{norm-V}}$ görbe félaktivációs feszültségértékét nem befolyásolta a szterollokkal történő előzetes kezelés ($V_{1/2} = -41,1 \pm 1,8$ mV, $n=12$ kontroll; $-41,5 \pm 1,8$ mV, $n=11$, $p = 0,992$ koleszterin; és $-42,1 \pm 2,4$ mV, $n=12$, $p=0,937$ 7DHC esetén). Ez arra utal, hogy a szterolok nem a VSD aktivációra, hanem közvetlenül a pórusra vagy a két domén közötti csatolási mechanizmusra hatnak. A kezelések az $F_{\text{norm-V}}$ görbék meredekségeit kismértékben megváltoztatták, a koleszterin a VSD feszültségfüggését leíró görbe szignifikáns ellapulását eredményezte ($k = 15,4 \pm 0,4$, $n=12$ kontroll; $22,2 \pm 1,8$, $n=11$, $p=0,002$ koleszterin; és $18,7 \pm 0,8$, $n=12$, $p=0,099$ 7DHC esetén).

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

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

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

A $K_v10.1$ -en végzett TEVCF mérésekhez a korábban mások által már használt és jellemzett L322C mutánst alkalmaztuk, azzal a különbséggel, hogy kísérleteink során MTS-TAMRA fluoreszcens festéket alkalmaztunk TMRM helyett. Ez az új mutáció-festék párosítás a korábbinál nagyobb amplitúdójú, többfázisú, feszültségfüggő fluoreszcens jel megjelenését eredményezte a csatorna kapuzási paramétereinek szignifikáns megváltozása nélkül. Az I-V és $\Delta F/F-V$ görbék felvételéhez -180 és $+60$ mV között 10 mV-os lépésekben növekvő, 800 ms-ig tartó depolarizáló impulzusokat alkalmaztunk. A pulzusokat -100 mV-os tartófeszültségről kiindulva alkalmaztuk 10 s-onként. A korábbi eredményekkel összehangban a VSD aktivációja $K_v10.1$ -ben már igen negatív potenciálok mellett megjelenik ($F_{\text{norm-V}}$: $V_{1/2} = -113,6 \pm 1,9$ mV; $n=9$), míg a pórus nyitása a $K_v1.3$ -ban megfigyeltekhez hasonló tartományban történik ($G_{\text{norm-V}}$: $V_{1/2} = -25,8 \pm 2,1$ mV; $n=8$). Emiatt a VSD aktivációja és a pórus nyitása közötti

feszültségkülönbség jóval nagyobb Kv10.1 esetén, mint Kv1.3-ban, amely a két funkcionális domén közötti, a bevezetésben is bemutatott lazább csatolási mechanizmusra utal. A szterolok Kv10.1-re gyakorolt hatása hasonlóan bizonyult a Kv1.3 esetén tapasztaltakhoz. Mind a koleszterin, mind pedig a 7DHC szignifikáns negatív irányú eltolódást okozott a $G_{\text{norm}}-V$ görbében ($V_{1/2} = -25,8 \pm 1,8$ mV (n=8) kontroll, $-33,2 \pm 1,8$ mV (n=8), $p = 0,043$ koleszterin töltés és $-38,2 \pm 2,2$ mV, $p=0,002$ (n=9) 7DHC töltés esetén), ugyanakkor egyik kezelés sem változtatta az $F_{\text{norm}}-V$ görbe félaktivációs feszültségét ($V_{1/2} = -113,6 \pm 1,9$ mV (n=9) kontroll, $-113,5 \pm 0,6$ mV (n=9), $p = 0,999$ koleszterin töltés és $-114,0 \pm 1,6$ mV (n=8), $p = 0,981$ 7DHC töltés esetén). Ezek alapján Kv10.1 esetén, Kv1.3-hoz hasonlóan, a szterolokkal történő töltés valószínűsíthetően nem a VSD aktiváció módosításán keresztül változtatja meg a PD működését.

4.3 Szterolok hatása a VSD és az ionáram aktivációs kinetikájára

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

A Kv10.1 áram aktivációs kinetikája a depolarizáló pulzus előtti tartófeszültségtől és a külső Mg^{2+} koncentrációtól függően komplex, szigmoid görbével írható le, szemben a Kv1.3 ionáram elsőfokú, egy exponenciális taggal jellemezhető aktivációs kinetikájával. Azért, hogy

a szterolok aktivációs kinetikára gyakorolt hatásait különböző csatornákon összehasonlíthatjuk, az irodalomban elfogadott eljárás szerint a $K_v10.1$ áram kezdeti szigmoid fázisát nem vettük figyelembe az illesztés során, csak az ionáram aktivációs kinetikájának elsőfokú, egy exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel jellemezhető részét karakterizáltuk. Mind a koleszterin, mind a 7DHC kezelés megnövelte az áram aktivációs időállandóját, különösen jelentős depolarizációk esetén. Ezután a szterolok VSD aktivációs kinetikára gyakorolt hatásait vizsgáltuk a -180 és $+60$ mV közötti tartományban. A hiperpolarizáló (-180 és -110 mV közötti) membránpotenciálokra a mélyebb zárt állapotok felé irányuló, a depolarizáció során tapasztalhatóhoz képest ellentétes irányú VSD mozgást jellemző fluoreszcens jelek két, erőteljesen feszültségfüggő kinetikai komponenssel rendelkeztek, amelyek egyike sem változott meg a szterol töltések hatására. Ezzel szemben a depolarizáló (-100 és $+60$ mV közötti) pulzusok két ellentétes polaritású komponensből álló bifázisos jelet váltottak ki, amelyben a negatív polaritású gyors komponens egyre prominensebbé vált a depolarizáció növekedésével. Valószínű, hogy ez a gyors komponens egy, a pórus nyitásához szorosan kapcsolt VSD átmenetet tükrözött a kinetikája és azon feszültségtartomány alapján, ahol a jel megfigyelhető. A lassú komponens időállandója jelentős feszültségfüggést mutatott és nem változott szterol kezelés hatására, míg a gyors komponens nagyon kis mértékben függött az alkalmazott feszültségtől, viszont szignifikáns mértékben lassult a koleszterin és a 7DHC alkalmazása esetén. Ezek a megfigyelések arra utaltak, hogy a szterolok nem befolyásolják a VSD mély zárt állapotok közötti átmeneteit, lassítják ugyanakkor a pórus nyitásával összefüggő konformációváltozásait.

A $K_v10.1$ csatornák karakterisztikus tulajdonsága a Cole-Moore shift jelensége, azaz az áram aktivációs kinetikájának módosulása a depolarizáció előtti tartófeszültség függvényében. Amikor a csatornák nagyon negatív tartófeszültségről aktiválódnak, több zárt állapotot kell áthaladniuk a nyitás előtt, amelynek hátterében strukturálisan a csatorna VSD és PAS doménjei közötti kölcsönhatás áll. A jelenség következményeként, amikor a csatornát negatívabb tartófeszültségekről depolarizáljuk, az áram aktivációs kinetikája lassabb és a kezdeti szigmoid fázis kifejezettebb, mivel a csatornák aktivációja ilyenkor a mélyebb zárt állapotokból indul. A jelenség vizsgálatához $+40$ mV-os depolarizáló pulzusok által kiváltott áramok aktivációs kinetikáját hasonlítottuk össze a pulzus előtti tartófeszültség függvényében. A tartófeszültség értékét -160 és -60 mV közötti tartományban változtattuk kontroll és szterolokkal töltött sejtekben. Míg a kezdeti legnegatívabb tartófeszültségek mellett (-160 és -140 mV) a kontroll és a szterolokkal töltött sejtekben az időállandók értékei hasonlóak voltak, addig -120 mV-os vagy annál pozitívabb tartófeszültség alkalmazása esetén az áramaktivációs kinetika

szignifikánsan lassabbnak bizonyult a szterolokkal kezelt esetekben. Ez arra utal, hogy a mély zárt állapotok közötti átmenetek nem változnak, viszont az utolsó, csatornanyitást eredményező átmenet lelassul szterol töltések hatására.

4.4 Szterolok által okozott áramcsökkenés mechanizmusának vizsgálata

Jóllehet a sejtek kapacitására vonatkozó információ hiányában az áramsűrűségek adatai nem hasonlíthatók össze közvetlenül egymással, mindkét szterol származék szignifikánsan lecsökkentette az oocitákban mért teljessejt-ionáramok nagyságát mind az A309C Kv1.3, mind pedig az L322C Kv10.1 ioncsatorna esetén azonos mennyiségű RNS injektálása és az injektálás után a mérésig eltelt azonos időtartamok alkalmazása mellett. A Kv1.3 esetében a koleszterin $71,1 \pm 8,2\%$ -ra, a 7DHC pedig $54,0 \pm 10,6\%$ -ra csökkentette az áramok nagyságát, míg a Kv10.1 esetén a szterolokkal történő kezeléseket után az amplitúdók rendre a kontroll érték $71,3 \pm 8,6\%$ és $58,5 \pm 1,3\%$ -ára csökkentek. Az áramredukció okának meghatározására, vagyis annak eldöntésére, hogy az egyedi csatornák vezetőképességének vagy nyitási valószínűségének csökkenése okozza a teljes sejt ionáramának csökkenését, a Kv10.1 csatornákat expresszázó oocitákon patch-clamp technika segítségével, outside-out konfigurációban az Anyagok és módszerek 3.6.2 fejezetében bemutatott feszültségprotokoll segítségével nyert ionáramokon nem-egyensúlyi zajanalízist végeztünk. A patch-clamp mérések során detektált áram időbeli fluktuációja az egyedi csatornák vezetőképességétől és azok nyitási valószínűségétől függ. Az ionáram varianciáját az egyes időpillanatokhoz tartozó átlag áramerősség függvényében ábrázolva egy parabolát kapunk, amelynek paraméterei segítségével meghatározhatók az egyedi csatornák fenti tulajdonságai. A zajanalízis eredményei alapján mindkét szterol szignifikánsan lecsökkentette az egyedi csatornák konduktanciáját (kontroll: $19,73 \pm 1,44$ pS, n=8; koleszterin: $13,30 \pm 1,11$ pS, n=6, p=0,009; 7DHC: $14,33 \pm 1,04$ pS, n=4, p=0,046) a nyitási valószínűségek szignifikáns módosítása nélkül (kontroll: $0,678 \pm 0,018$ n=8; koleszterin: $0,715 \pm 0,035$ n=6, p= 0,628; 7DHC: $0,573 \pm 0,044$ n=4, p=0,067).

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

Mind a Kv1.3, mind pedig a Kv10.1 csatornákról kimutatták korábban, hogy preferenciálisan a sejtmembrán szfingolipidekben és koleszterinben gazdag lipidtutaj mikrodoménjeiben helyezkednek el. Mivel a lipidtutajbeli lokalizáció befolyásolhatja a csatornák szerkezeti és funkcionális tulajdonságait, valamint a koleszterin a tutajok egyik legfontosabb alkotóeleme, a csatornák és tutajok szterol töltés hatására végbemenő átrendeződése szerepet játszhat a szterolok elektrofiziológiai hatásainak kialakulásában, ahogy azt a Bevezetésben is részletesen bemutattuk. Ennek alátámasztására megvizsgáltuk a Kv1.3 és Kv10.1 tutaj és nem-tutaj mikrodomének közötti megoszlásának szterol töltés hatására bekövetkező változását oly módon, hogy meghatároztuk az ioncsatornához kötődő antitest és a lipidtutaj jelölőként használt koleratoxin B alegység (CTX-B) fluoreszcencia intenzitásai közötti Pearson-féle korrelációs együttható nagyságát hagyományos konfokális lézer pásztázó és stimulált emisszió depléció (STED) mikroszkópia segítségével. A fluorofórral konjugált antitestek a Kv1.3 és Kv10.1 csatornába épített FLAG epitópot ismerték fel (Kv1.3_{FLAG} és Kv10.1_{FLAG}). A korábbi megfigyelésekkel összhangban markánsan pozitív Pearson-együtthatókat kaptunk a Kv1.3, illetve Kv10.1 és a CTX-B fluoreszcens jele között (Kv1.3 vs CTX-B: $0,416 \pm 0,013$, $n=27$ és Kv10.1 vs CTX-B: $0,298 \pm 0,019$, $n=30$). A számított együtthatók jelentősen kívül estek a korreláció feltételezett hiánya esetén várható 95%-os konfidencia intervallum határain és nagyságuk összemérhető volt a pozitív kontroll minta esetén számított értékkel, amelyet két általánosan elfogadott lipidtutaj marker, a GFP-GPI és a CTX-B fluoreszcencia intenzitásai közötti koefficiens kvantifikálásával kaptunk ($0,551 \pm 0,020$, $n=23$). A pozitív kolokalizáció jól látszik az egymásra vetített konfokális felvételeken és a pixelenkénti intenzitások korrelációját bemutató reprezentatív kontúr plot ábrán is. Mindkét ioncsatorna esetén a Pearson-együtthatók nagysága szignifikánsan megnőtt mind koleszterin, mind 7DHC kezelés hatására konfokális lézer pásztázó mikroszkópos vizsgálatok eredményei alapján (Kv1.3: $0,492 \pm 0,013$, $n=34$, $p=0,001$ koleszterin és $0,500 \pm 0,015$, $n=32$, $p=0,001$ 7DHC esetén; Kv10.1: $0,373 \pm 0,017$, $n=29$, $p=0,010$ koleszterin és $0,395 \pm 0,018$, $n=24$, $p=0,002$ 7DHC esetén). Kv1.3 esetén a szterolok hatására megnövekedett tutajbeli lokalizációt megerősítettük jobb (46-60 nm) feloldóképességű STED mikroszkópia alkalmazásával. Szterol töltés után a korrelációs koefficiens nagysága STED felvételekből számítva is szignifikánsan pozitívabb volt (koleszterin: $0,361 \pm 0,019$, $n=32$, $p=0,012$, 7DHC: $0,366 \pm 0,019$, $n=28$, $p=0,010$), mint a kontroll minták esetén ($0,274 \pm 0,025$, $n=25$). A fluoreszcens koleszterin analóg (NBD-koleszterin) beépülése a membránba nem volt egyenletes, a konfokális mikroszkópos képek alapján a számított markánsan pozitív Pearson-együtthatók arra utaltak,

hogy a fluoreszcens koleszterin analóg preferenciálisan a CTX-B által jelölt lipidtutaj mikrodoménekbe inkorporálódott ($0,234 \pm 0,025$, $n=24$), elsősorban a Kv1.3 csatornák közelébe ($0,358 \pm 0,023$, $n=24$). Ezen eredmények a fluorofórral konjugált és natív koleszterin korábban kimutatott hasonló viselkedése alapján arra utalhat, hogy az exogén módon bejuttatott koleszterin elsősorban a tutajokba épül be, azok közül is főleg azon mikrodoménekbe, amelyek Kv1.3 fehérjét tartalmaznak, lehetőséget adva a szterolok és ioncsatornák kölcsönhatására.

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

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

Az inaktiváció során az aktivációs kapu állapotának monitorozására szolgáló pulzusprotokoll megtervezéséhez először karakterizáltuk a T449A/V474C *Shaker-IR* konstrukt főbb elektrofiziológiai paramétereit patch-clamp technika segítségével, inside-out konfigurációban. A részletes protokollokat és kiértékelést az Anyagok és módszerek fejezet 3.6.3. pontja tartalmazza. Először különböző tesztpotenciálokra regisztráltuk az áramokat, majd a csúcsáramok és a hajtóerő ($V-E_{\text{ekv}}$) ismeretében az adott membránpotenciálon a csúcskonduktanciát (G), annak normálását követően pedig a normált konduktancia-feszültség ($G_{\text{norm}}-V$ görbe) összefüggését határoztuk meg. A félaktivációs feszültség ($V_{1/2} = -51,6 \pm 2,5$ mV) és meredekségi együttható ($k = 16,9 \pm 2,1$ mV) meghatározása az egyes sejtek normált konduktanciájának tesztpotenciáltól való függését leíró, adatpontokra illesztett Boltzmann-függvény alapján történt (átlag \pm SEM, $n=5$). A $G_{\text{norm}}-V$ görbét az egyes potenciálokra nyert G_{norm} értékek átlagolása (\pm SEM) alapján szerkesztettük, majd meghatároztuk az aktivációs és inaktivációs időállandók +50 mV-on mért értékeit. Mind az áram aktivációs, mind pedig az inaktivációs kinetikája elég gyorsnak bizonyult ahhoz, hogy a mérések racionális idő alatt elvégezhetőek legyenek, a protokollok időbeli lefutásának tervezésekor ezeket a paramétereket vettük figyelembe. Meghatároztuk továbbá az egyensúlyi inaktiváció (SSI) feszültségfüggését

(lásd 3.6.3 fejezet), aminek jellemzéséhez meghatároztuk a nem inaktivált csatornák hányadának (I/I_{-120}) depolarizáló pulzus előtti tartófeszültségtől való függését. Az egyedi sejtekre kapott pontsorokhoz a Boltzmann-függvényt illesztettük, és meghatároztuk a félaktivációs feszültséget ($V_{1/2} = -81,7 \pm 0,7$ mV) és meredekségi együtthatót ($k = -5,8 \pm 0,6$ mV) (\pm SEM, $n=4$). A görbét az egyes tartófeszültségeken mért I/I_{-120} értékek átlagolásával szerkesztettük (\pm SEM, $n=4$). +50 mV-os pulzuspárok alkalmazásával és a pulzusok közötti időintervallumok (i_{pi}) változtatásával meghatároztuk az inaktivációból való visszatérés kinetikáját -120 mV-on, ezt a potenciált később a kísérletek során a pulzusprotokollok közötti tartófeszültségnek használtuk. Ezen a tartófeszültségen az inaktivációból való visszatérés kinetikáját jellemző időállandó $4,4 \pm 0,6$ s-nak adódott ($n=5$).

A T449A/V474C csatorna biofizikai paramétereit figyelembe véve terveztük meg a kísérletes stratégiát az állapotfüggő cisztein modifikációs kísérletekhez, amellyel a zárt állapotból bekövetkező inaktiváció ($C \rightarrow CI$ átmenet) lehetőségét vizsgáltuk. A kísérletekhez a Cd^{2+} -ot az intracelluláris oldal felől alkalmaztuk. A protokoll három, egyenként 5 ms hosszúságú +50 mV-os depolarizáló pulzust tartalmazott, amelyek a biofizikai karakterizáció alapján teljesen aktiválják a K^+ áramot. Az első pulzus (P_1) során kontroll oldat alkalmazása mellett (150 mM K^+ , 0 μ M Cd^{2+}) határoztuk meg az adott inside-out patch-en mérhető maximális K^+ áramot (I_1). Ezt egy 30 ms-os -120 mV-ra történő hiperpolarizáció követte, amelynek hatására az aktivációs kapu bezáródott a Cd^{2+} applikáció előtt. Ezután a membránpotenciált olyan értékre, például -90 mV-ra állítottuk, ahol a csatorna kismértékű egyensúlyi inaktivációt mutat, makroszkópos áram viszont nem detektálható. Bár a módszer alábecsülheti a -90 mV-on mérhető egyensúlyi inaktiváció mértékét a viszonylag rövid (3s) tartási potenciálok miatt, a grafikon jól meghatározza azt a negatív membránpotenciál tartományt, ahol az állapotfüggő cisztein modifikációs kísérleteket végezhetjük. A -90 mV-on megfigyelhető egyensúlyi inaktiváció mértékét a második depolarizációs pulzus (P_2) által kiváltott áram (I_2) alapján határoztuk meg az I_2/I_1 hányados alapján, az inaktiválódó áramhányadot (IF) pedig $IF = 1 - (I_2/I_1)$ alapján. A 20 s hosszúságú pulzus alatt 20 μ M vagy 200 μ M Cd^{2+} -ot tartalmazó intracelluláris oldatot perfundáltunk a patch-ek citoszolikus felszínére. A patch-ek Cd^{2+} expozíciója közvetlenül a P_1 után kezdődött és a -90 mV-os tartófeszültséget alkalmazó lépés befejezésével, a P_2 előtt ért véget. A P_2 -t megelőzte egy 30 ms hosszúságú lépés -120 mV-ra, hogy elkerüljük a P_2 elején a nyitott állapotú csatornák Cd^{2+} -expozícióját (elektromechanikus késleltetés a perfúziós rendszerben). P_2 -t követően a patch-et -120 mV-on tartottuk 60 s-ig, amely elegendő volt ahhoz, hogy kontroll körülmények között biztosítsa az

inaktivált csatornák inaktivációból történő teljes visszatérését. Ezt követte a harmadik 5 ms hosszúságú depolarizációs pulzus (P_3), amelynek felhasználásával számoltuk a visszatért áramhányadot az $RCF = (I_3 - I_2) / (I_1 - I_2)$ képlet alapján, amelyben az I_1 , I_2 és I_3 rendre a három szekvenciális pulzus által kiváltott és aspecifikus szivárgó árammal korrigált amplitúdókat jelöli. Amennyiben az inaktiváció $C \rightarrow CI$ átmenettel jön létre, vagyis az aktivációs kapu nem nyílik ki inaktiváció előtt, az RCF elméletileg várható értéke 1, mert az aktivációs kapu zárt állapota megakadályozza a $474C$ Cd^{2+} általi modifikációját és az áram csökkenését. Ezzel szemben, ha az aktivációs kapu nyitása megelőzi az inaktivációt, a Cd^{2+} módosítja a $474C$ -t és áramcsökkenés látható. Ha az egyensúlyi inaktivációban részt vevő összes csatorna aktivációs kapuja nyitott -90 mV-on és a Cd^{2+} módosítja az összes ilyen csatornát, az RCF értéke 0. $0 < RCF < 1$ azt mutatja, hogy egyensúlyi inaktiváció során a csatornák a Cd^{2+} számára elérhető állapotban voltak.

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

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

Az RCF különböző negatív tartófeszültségtől való függésének vizsgálatához -90 , -80 vagy -70 mV-os tartófeszültségeket alkalmaztunk a P_1 és P_2 között $20 \mu M$ vagy $200 \mu M$

intracelluláris Cd^{2+} jelenlétében. Jóllehet makroszkópos áram nem mérhető -90 mV-on, kismértékű egyensúlyi inaktiváció megjelenik. -80 és -70 mV tesztpotenciálok teljessejt-áram már mérhető és ezzel párhuzamosan az inaktiváció egyre prominensebbé válik. Ennek megfelelően, az IF értéke nő depolarizáló tartófeszültségek mellett mind Cd^{2+} hiányában, mind annak jelenlétében. Ezzel ellentétben az RCF csak akkor csökkent szignifikáns mértékben, ha Cd^{2+} volt jelen a P_1 és P_2 közötti tartófeszültség során. Ez azt mutatja, hogy az aktivációs kapu nyitása a -90 és -70 mV közötti potenciáltartományban megtörténik. Ennek megfelelően a Cd^{2+} -90 mV-on módosítja a 474-es pozícióban levő ciszteint makroszkóposan megfigyelhető áram hiányában is. Az RCF szignifikánsan csökkent $20 \mu\text{M}$ és $200 \mu\text{M}$ Cd^{2+} jelenlétében minden tartófeszültségen. Cd^{2+} hiányában az RCF értékei gyakorlatilag megegyeznek minden tartófeszültség esetén.

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

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

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

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

Korábbi megfigyelések alapján a *Shaker-IR 476C* mutáns csatorna aktivációs kapuja nyitott állapotban rögzíthető az intracelluláris oldal felől alkalmazott Cd^{2+} segítségével. Ennek hátterében az egyik alegység 476C és egy szomszédos alegység natív H486 aminosavai között kialakuló Cd^{2+} -híd áll, amely gátolja a csatorna aktivációs kapujának zárását még negatív potenciálok esetén is. A HEK-293 sejtekben kifejezett T449A/V476C *Shaker-IR* csatorna inside-out patch-clamp konfigurációban végzett biofizikai karakterizálását ebben az esetben is elvégeztük a kísérletek során alkalmazott pulzusprotokollok tervezése előtt. A karakterizáció során a 474C mutánsal megegyező protokollokat, illetve azonos kiértékelési módszert használtunk.

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

A második kontroll kísérlet alapján 476C hiányában az intracellulárisan alkalmazott Cd^{2+} nem okoz csökkenést a csúcsáram nagyságában, nem okoz pórusblokkot. A mérések során a pulzusprotokoll ugyanolyan volt, mint a korábban ismertetett esetben, kivéve, hogy a patch citoszolikus felszínére (inside-out konfiguráció) $20 \mu\text{M}$ Cd^{2+} -ot tartalmazó oldatot áramoltattunk 1 s-on keresztül. Az áram inaktivációja teljes a Cd^{2+} perfúzió kezdetén, a

depolarizált membrán miatt viszont az aktivációs kapu nyitva van, ezért a Cd^{2+} alkalmazása az OI kapuzási állapotban lévő csatornákon történik. A T449A/V476 csatornáknál azonos csúcsáramokat tapasztaltunk még hosszú (akár 8 s-ig terjedő) kumulált Cd^{2+} expozíció mellett is, ami arra utal, hogy a Cd^{2+} nem befolyásolja az áramok nagyságát 476C hiányában.

A C-típusú inaktivációból való visszatérésnek az aktivációs kapu állapotától való függésének meghatározására a T449A/V476C *Shaker*-IR csatornák aktivációs kapuját nyitott állapotban rögzítettük 20 μM Cd^{2+} -ot tartalmazó oldat intracelluláris alkalmazása segítségével a +50 mV-os depolarizáció során, az áram teljes inaktivációját követően (azaz az OI állapotban). Először megismételtük a korábban bemutatott kontroll kísérletet, ezúttal a T449A/V476C *Shaker*-IR csatornán. A Cd^{2+} expozíció a 2 s hosszúságú depolarizáló pulzus utolsó 1000 ms-a alatt történt. A T449A/V476C konstrukt teljes mértékben inaktiválódik a Cd^{2+} kezelés kezdetére ($\tau_i = 136$ ms, a Cd^{2+} alkalmazása az inaktivációs időállandó több, mint 7-szeresének megfelelő idő elteltét követően történik). A fennmaradó időtartam alatt a patch-et standard intracelluláris oldattal perfundáltuk. A kezelés a csúcsáram teljes eltűnését eredményezte már egy impulzust követően, azaz a Cd^{2+} által nyitott állapotban rögzített aktivációs kapuval rendelkező csatornák nem képesek az inaktivációból való visszatérésre ($n=5$). Ezek alapján azt gondoljuk, hogy a csatornák a Cd^{2+} kezelés hatására az OI állapotban rögzültek, így vezetőképtelenek maradtak még a 60 s időtartamú -120 mV-os tartófeszültséget követően is, ami a kontroll körülmények között elegendőek bizonyult az inaktivációból történő visszatéréshez. Az áram csökkenése irreverzibilis volt. Az áramcsökkenés kinetikáját az OI állapotú csatornák rövidebb, egymás után ismétlődő 200 ms-os Cd^{2+} expozíciójával határoztuk meg. Ez a kezelés a kumulált expozíció során a csúcsáramok kvantált és szignifikáns mértékű csökkenését eredményezte. Az áramcsökkenés mértéke a kumulált modifikációs idő függvényében exponenciális csökkenést mutatott, amely a 476C pozícióban elhelyezkedő cisztein aminosav és a Cd^{2+} közötti specifikus kölcsönhatás jelenlétére utalt.

Annak igazolására, hogy az általunk használt inaktiválódó V449A konstruktban a funkcionálisan nem vezető OI állapotot a 476C és H486 aminosavak között kialakuló Cd^{2+} -híd hozza létre, megvizsgáltuk, hogy a Cd^{2+} által okozott áramcsökkenést kivédi-e a H486 alacsony pH-n végbemenő protonációja. A deprotonált állapotú H486 nélkülözhetetlen a 476C aminosavval Cd^{2+} segítségével alkotott fémhíd kialakulásához. Ennek vizsgálatához +50 mV-os depolarizáló pulzusokat alkalmaztunk 15 s-onként -120 mV-os tartófeszültségről indulva. A Cd^{2+} applikációja minden pulzus előtt 200 ms-mal kezdődött és a depolarizáció befejezésével egyidőben végződött. A Cd^{2+} -ot tartalmazó intracelluláris oldat pH-ját 7,36-ra vagy 5,3-ra

állítottuk. Az aktivációs kapu nyitott állapotban történő rögzítését 7,36-os pH-n a farokáramok megnövekedett relatív amplitúdója jelzi, ami ezt követően az inaktivációból fakadóan lassan csökkenni kezd. A mérések során a +50 mV-os pulzusok által kiváltott csúcsáramok pulzusról pulzusra bekövetkező folyamatos csökkenése azt mutatja, hogy a nyitott állapotban rögzített és inaktivált csatornák nem térnek vissza az inaktivációból. A nyitott állapotban rögzített aktivációs kapuval rendelkező *Shaker* csatornák inaktivációját, valamint az általunk megfigyelthez hasonló farokárammal rendelkező áramfenotípust már korábban leírták V476C mutációt hordozó *Shaker* esetén. Ezzel ellentétben 5,3-as pH-n, ahol a fémhíd kialakulása gátolt, a +50 mV-os pulzusok által kiváltott csúcsáramok amplitúdója nem változik az ismételt depolarizációk alatt. A normált csúcsáramok nagysága csökken a Cd²⁺ kumulált applikációja során 7,36-os pH-n, ezzel szemben 5,3-as pH jelenlétében a csúcsáramok nagysága állandó marad (n=4-5).

V. Összefoglalás

A Dolgozatban bemutatott kísérletek segítségével a K_v csatornák kapuzásának finomhangolását befolyásoló két tényező szerepét vizsgáltuk. Az egyik tényező a sejtmembránban található koleszterin, amelyről már korábban kimutatták, hogy befolyásolja a K_v ioncsatornák aktivációs kapuzását, viszont eddig nem tisztázták, hogy a koleszterin ezt pontosan milyen, az ioncsatornán belüli támadásponton keresztül valósítja meg. A Dolgozatban vizsgált másik kérdéskör a negatív membránpotenciálok melletti kapuzási átmenetek vizsgálata volt. Ezen kísérletek során azt vizsgáltuk, hogy egyrészt a C-típusú inaktiváció végbemenetelének szükséges feltétele-e az aktivációs kapu nyitása, másrészt az inaktivációból való visszatérés folyamatához szükség van-e az aktivációs kapu bezáródására.

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

A Disszertáció első felében bemutatott TEVCF technika az ionáramok mérése mellett lehetővé tette számunkra a VSD mozgásának nyomonkövetését a teljes kapuzási folyamat során. A módszert használva így a koleszterin klasszikus elektrofiziológiai paraméterekre gyakorolt hatásai mellett meg tudtuk határozni annak csatornán belüli elsődleges célpontját (VSD, PD vagy a két domén közti csatolási apparátus). Eredményeink alapján a koleszterin fő támadáspontja maga a PD, nem pedig a VSD vagy a csatolási apparátus, mind a lineáris kapuzási modellnek megfelelően kapuzó $K_v1.3$, mind pedig a komplex kapuzási modellel leírható $K_v10.1$ esetén.

A Disszertáció második részében bemutatott kísérleteink során az általunk megtervezett feszültségprotokollok és cisztein modifikációs stratégiák egy új kombinációját használtuk a *Shaker* ioncsatorna negatív membránpotenciálok mellett bekövetkező, egyensúlyi inaktivációját jellemző kapuzási sémájának leírására, valamint az inaktivációból való visszatérés előfeltételeinek meghatározására. A Cd^{2+} , illetve az általunk pontmutációval bevitt

ciszteinek között létrejövő specifikus kölcsönhatások lehetővé tették számunkra az aktivációs kapu nyitásának detektálását (474C), illetve annak rögzítését (476C) negatív membránpotenciálok mellett is. Eredményeinket összegezve, az egyensúlyi inaktiváció kialakulásának legvalószínűbb útvonala a $C \rightarrow O \rightarrow OI \rightleftharpoons CI$ átalakulás, következtetésünk az, hogy nem a direkt $C \rightarrow CI$ átmenet vezet az egyensúlyi inaktiváció kialakulásához *Shaker* ioncsatornában. Emellett az inaktivációból való visszatéréshez nélkülözhetetlen az aktivációs kapu záródása, azaz az $OI \rightarrow CI$ átmenet. Ebből az a következtetés is levonható, hogy a direkt $OI \rightarrow O$ átmenet sem lehetséges negatív membránpotenciálon. Legfontosabb következtetésünk az, hogy az aktivációs kapu aktuális helyzete kiemelten fontos az egyensúlyi inaktiváció és az inaktivációból történő visszatérés folyamatainak szabályozásában.

Eredményeink motivációt nyújthatnak a koleszterin-membránfehérje kölcsönhatások további tanulmányozásához, illetve perspektivikusak a későbbi szerkezet-funkció és farmakológiai vizsgálatok számára. Megfigyeléseink az indirekt koleszterin hatások és az azok háttérben álló molekuláris célpontok felderítésének fontosságát hangsúlyozzák. Ezek megismerése hozzájárulhat több olyan betegség patomechanizmusának mélyebb megértéséhez, amelyekben az egyik fontos eltérés a sejtmembránban található koleszterin koncentrációjának növekedése vagy megváltozása. Ilyen, a szterolok koncentrációjának eltéréseivel járó kórképek közé tartoznak különböző tumorok, anyagcsere, neurodegeneratív és immunológiai betegségek, illetve maga az öregedés folyamata is. A negatív membránpotenciálon végbemenő kapuzási átmenetek lehetőségének vizsgálata szintén biológiai szempontból is jelentős, ugyanis mind az egyensúlyi inaktiváció, mind az inaktivációból történő visszatérés jelentősen meghatározza a potenciálisan aktiválható csatornák számát, ami a sejtek ingerelhetőségének egyik meghatározó tényezője.

VI. Publikációk



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

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

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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





További közlemények

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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 21,826

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

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

Debrecen, 2020.05.28.

