

TDK PÁLYAMUNKA

A pórusban levő mutációk hatása a *Shaker*
káliumcsatorna kapuzására



Zákány Florina

DEBRECENI EGYETEM ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR VI. ÉVFOLYAM, 8-AS
CSOPORT

TÉMAVEZETŐK: Dr. Szántó G. Tibor
Egyetemi tanársegéd

Prof. Dr. Panyi György
Tanszékvezető egyetemi tanár

DEBRECENI EGYETEM ORVOS BIOFIZIKAI ÉS SEJTBIOLOGIAI INTÉZET

Bírálatra való beküldéséhez hozzájárulok:

Prof. Dr. Szöllősi János
Intézetigazgató,
Egyetemi tanár

Dr. Székvölgyi Lóránt
Intézeti TDK vezető,
Egyetemi adjunktus

Debrecen, 2014. június 04.



Nemzeti
Kiválóság
Program

TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001

TARTALOMJEGYZÉK

I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	1
II. ABSZTRAKT	2
III. BEVEZETÉS	4
III/ 1. AZ IONCSATORNÁKRÓL ÁLTALÁBAN	4
III/ 2. A <i>SHAKER</i> KÁLIUMCSATORNA SZERKEZETE	4
III/ 3. A C-TÍPUSÚ INAKTIVÁCIÓ JELLEMZŐI	6
III/ 4. A C-TÍPUSÚ INAKTIVÁCIÓ BIOLÓGIAI JELENTŐSÉGE	8
IV. PROBLÉMAFELVETÉS, CÉLKITŰZÉS	10
V. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	13
V/ 1. A MUTÁNS IONCSATORNÁK FELÉPÍTÉSE	13
V/ 2. A TSA-201 SEJTEK TENYÉSZTÉSE ÉS TRANSZFЕКЦИÓJA	13
V/ 3. FLUORESzcENS MIKROSKÓPIA	15
V/ 4. ELEKTROFIZIOLÓGIA	16
V/ 5. OLDATOK, PERFÚZIÓS RENDSZER	16
V/ 6. ADATOK ÉRTÉKELÉSE	17
V/ 7. IONCSATORNA SZERKEZETI ÁBRÁK	17
VI. EREDMÉNYEK	18
VI/ 1. AZ ÁRAM AKTIVÁCIÓS IDŐÁLLANDÓJÁNAK MEGHATÁROZÁSA	18
VI/ 2. A KONDUKTANCIA FESZÜLTSGFÜGGÉSÉNEK VIZSGÁLATA	19
VI/ 3. AZ ÁRAM INAKTIVÁCIÓS IDŐÁLLANDÓJÁNAK MEGHATÁROZÁSA	22
VI/ 4. AZ INAKTIVÁCIÓBÓL VALÓ VISSZATÉRÉS IDŐÁLLANDÓJÁNAK MEGHATÁROZÁSA	24
VI/5. AZ INAKTIVÁCIÓ FESZÜLTSGFÜGGÉSE	27
VII. MEGBESZÉLÉS	30
VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	31
IX. IRODALOMJEGYZÉK	33
X. FÜGGELÉK	36

I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EGFP	zöld fluoreszcens fehérje egyik származéka
E_m	az aktuális membránpotenciál értéke
E_{rev}	a Nernst-egyenlet alapján számított K^+ egyensúlyi potenciál
FBS	„fetal bovine serum”- főtális szarvasmarha szérum
G	az adott tesztpotenciálhoz tartozó konduktancia értéke
G_{norm}	a legnagyobb értékre normált konduktancia értéke
GYGD szekvencia	glicin-tirozin-glicin-aszpartát aminosavakat tartalmazó szekvencia
k	az aktiváció feszültségfüggésének meredeksége
k_{inact}	az inaktiváció feszültségfüggésének meredeksége
K_v	feszültség kapuzott káliumcsatornák jelölésének előtagja
n	mérési esetszám
PBS	„phosphate buffered saline”- foszfát puffer oldat
PDB	Protein Data Bank
SEM	az átlagérték közepes hibája
<i>Shaker</i> -IR csatorna	N-típusú inaktivációtól mentes <i>Shaker</i> csatorna
τ_{akt}	aktivációs időállandó
TEA^+	tetraetil-ammónium
τ_{inakt}	inaktivációs időállandó
τ_{rec}	inaktivációból való visszatérést jellemző időállandó
tsA-201 sejt	SV40 large T antigénnel transzformált humán embrionális vese sejtek
$V_{1/2}$	az 50%-os nyitási valószínűséghez tartozó félaktivációs feszültség
$V_{1/2inact}$	az 50%-os nyitási valószínűséghez tartozó félaktivációs feszültség

II. ABSZTRAKT

Ismert, hogy a feszültségkapuzott ioncsatornák közé sorolható *Shaker* káliumcsatorna aktivációs és C-típusú inaktivációért felelős inaktivációs kapui csatoltak. Korábbi eredményeink alapján ezt a csatolást a pórust közvetlenül határoló S6-os transzmembrán helikális szegmensek inaktiváció során bekövetkező forgása biztosíthatja. Kísérleteimben azt vizsgáltam, hogy az S6-os szegmensek pórus felé tekintő pozícióit érintő mutációk hatással vannak-e a két kapu közti csatolási mechanizmus befolyásolásán keresztül az ioncsatorna inaktivációs, illetve aktivációs kapuzására.

Méréseimhez olyan mutáns *Shaker*-IR (N-típusú inaktivációtól mentes) ioncsatornákat használtam, melyek az S6-os szegmensek 470-es pozíciójában különböző aminosavakat (A,W,E,D,K,R) tartalmaztak. A kísérleteket a tsA_201 sejtekbe tranziensen transzfektált mutáns ioncsatornákon a patch-clamp technika feszültség-zár üzemmódjában, inside-out konfigurációban végeztem. A transzfekciót követően a kontroll I470 ioncsatorna, illetve az alanint tartalmazó mutáns önmagában expresszáldott. A triptofánt, glutamátot és aszpartátot tartalmazó mutánsok csak a kontroll csatornával együttesen transzfektálva, azzal heteromereket alkotva adtak funkcionális csatornákat, míg a pozitív töltésű lizint és arginint tartalmazó mutánsok esetében egyik esetben sem kaptunk ionáramot. Az elektrofiziológiai mérések során a mutáns csatornák kapuzását jellemző biofizikai paramétereket határoztam meg (aktivációs- és inaktivációs időállandó; konduktancia- és inaktiváció feszültségfüggése, inaktivációból való visszatérés időállandója) és hasonlítottam össze a kontrollként használt T449A/I470 ioncsatorna megfelelő paramétereivel.

A vizsgált paraméterek közül a legjelentősebb eltérést az inaktivált állapot kialakulását jellemző inaktivációs időállandóban tapasztaltam. Míg az inaktivációs időállandó értéke a kontroll csatorna esetén ~70 ms, addig ez az érték a T449A/I470A ioncsatorna esetén ~315 ms. A 470-es pozícióba helyezett nagyobb méretű aminosavak, a szintén apoláris oldalláncú triptofán, valamint a negatív töltésű glutamát és aszpartát kevésbé lassította az inaktivációs kinetikát (az inaktivációs időállandók rendre ~110 ms, ~125 ms, ~145 ms). A mutáns ioncsatornák inaktivációs kapuzását jellemző további, valamint az aktivációs kapuzást jellemző paraméterek esetén kisebb mértékű változást tapasztaltam a kontrollhoz képest.

Az eredmények azt mutatják, hogy a pórusban levő aminosavak fizikokémiai tulajdonságai (méret, töltés, hidrofobicitás) együttesen képesek befolyásolni a *Shaker* csatorna

C-típusú inaktivációját, amely alátámasztja az S6-os szegmensek aktivációs és inaktivációs kapu közti csatolásban betöltött szerepét.

III. BEVEZETÉS

III/ 1. Az ioncsatornákról általában

Az ioncsatornák az élő szervezetek működése szempontjából kulcsfontosságú transzmembrán fehérjék. Speciális felépítésük révén a biológiai membránokon egy hidrofíl pórust képezve biztosítják az ionok koordinált áramlását. Ezt a szabályzó funkciót az ioncsatornák a membránfehérjék között egyedülálló felépítésük, pórusuk és kapuik révén képesek ellátni. Az egyes kapuk meghatározott koreográfia szerinti mozgásának (nyitásának és zárásának) megváltozása számos patológias folyamat kulcsfontosságú lépése, például abnormális akciós potenciálok kialakulásához, vagy kóros neurotranszmitter felszabaduláshoz vezethet a neuronokban.

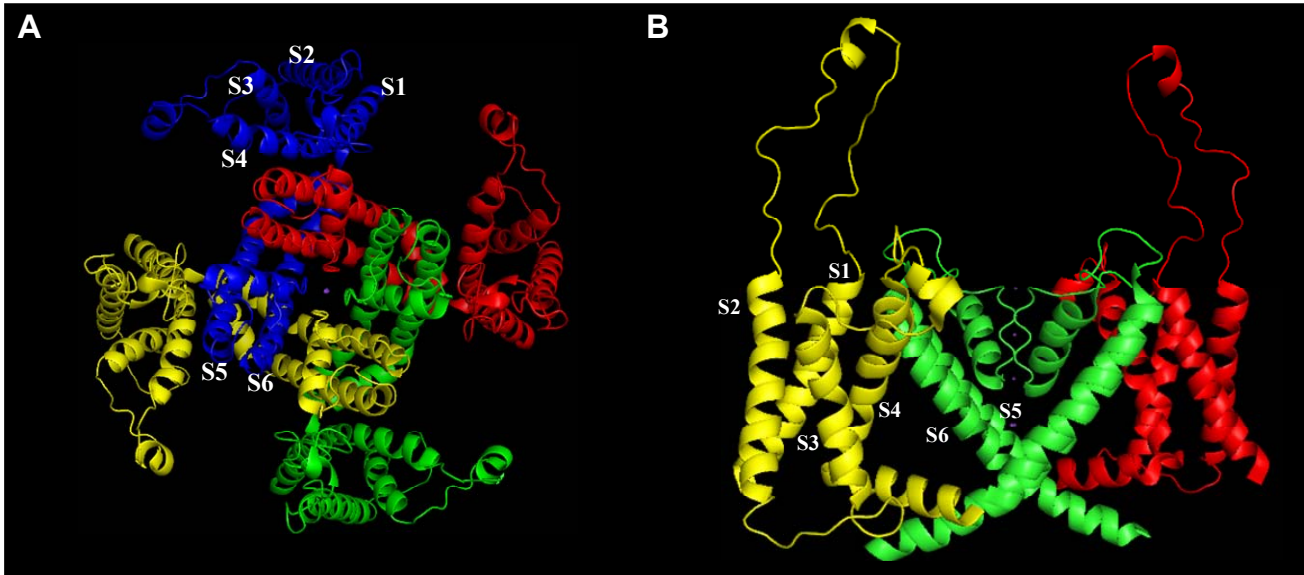
Az ioncsatornákra továbbá jellemző a szelektív permeabilitás, ami azt jelenti, hogy egy adott csatorna csak meghatározott ionok számára átjárható. További jellegzetesség a kapuzás, ami azt jelenti, hogy az egyes csatornák különféle ingerek hatására a funkcionálisan vezető nyitott, és a funkcionálisan nem vezető zárt és inaktivált strukturális állapotok közötti átmenetre képesek. Az általam tanulmányozott mutáns *Shaker* csatornák a fent említett tulajdonságok alapján a feszültségkapuzott kálium csatornák (K_v) közé sorolhatók.

III/ 2. A *Shaker* káliumcsatorna szerkezete

Shaker csatorna a *Drosophila melanogaster*-ben előforduló feszültség kapuzott kálium csatorna. A *Shaker* elnevezés a csatornát kódoló génekben -Shaker (Sh), Hyperkinetic (Hk), és ether a go-go (eag)- leírt mutációk eredményeképpen éter anesztéziában során jelentkező lábretegésből adódik.

A *Shaker* csatorna felépítését tekintve négy alegységből felépülő homotetramer ioncsatorna. Az egyes alegységeket nem-kovalens kölcsönhatások tartják össze. A négy alegység közel szimmetrikusan helyezkedik el az általuk körülhatárolt, centrális elhelyezkedésű pórus körül (MacKinnon,1991). Minden alegységet egyenként hat transzmembrán α -helikális szegmentum (S1-S6), és az ezeket összekötő számos intracelluláris és extracelluláris hurokszekvencia építi fel. Az alegységek N-és C- terminális vége intracellulárisan található (1. ábra A panel). Az alegységekben az S1-S4 szegmentumok építik

fel a membránpotenciál változást érzékelő feszültség szenzort. Az S5 és S6-os szegmentumok, valamint az ezeket összekötő hurok vesz részt a pórus kialakításában vesznek részt. (1. ábra B panel)



1. ábra: A Shaker típusú káliumcsatornák felépítése.

A panel: Az ábra a Kv1.2 ioncsatorna röntgenkristallográfiás kísérletek alapján meghatározott szerkezeti modelljén alapul (Chen és mtsai, 2010). Az ábrát a Pymol program segítségével szerkesztettem, a szerkezeti adatok PDB kódja: 3LUT.

A négy alegység piros, kék, sárga, zöld színekkel van jelölve, az egyes alegységek a 163-421. aminosavakkal bezárólag kerültek megábrázolásra. Az egyik alegység esetén jelölésre kerültek a felépítésében résztvevő transzmembrán helikális szegmentumok (S1-S6). A pórusban centrálisan egy káliumion található (lila színnel jelölve). Az ábra az ioncsatornát az extracelluláris oldal felől felülnézetben, nyitott strukturális állapotban ábrázolja.

A B panelen az egyes alegységek a 163-421. aminosavakkal bezárólag kerültek feltüntetésre. Az S1-S4-es szegmentumok az ábrán sárga, illetve piros színnel vannak jelölve, míg a pórus kialakításában részt vevő S5-S6-os szegmentum és az ezeket összekötő hurok mindkét alegység esetén zöld színnel vannak jelölve. A lila színnel jelölt gömbök a káliumionokat reprezentálják. A strukturális elemek pontos funkciójának magyarázatát lásd a szövegben.

A membránpotenciál változásainak érzékeléséért az úgynevezett feszültség szenzor domén felelős, amelyet minden alegység S1-S4-es transzmembrán szegmentumai építenek fel. A feszültség érzékelő funkció kialakítása szempontjából kiemelten fontosak a nettó negatív töltést hordozó S3 hélixek és a többszörös pozitív töltéseket hordozó S4 hélixek (Jiang és mtsai, 2003). Ezt jelzi, hogy az S4-es szegmentum négy pozitív töltésű argininje, jelentősen

konzerválódott a különböző feszültség kapuzott káliumcsatornák esetén (Seoh és mtsai, 1996). Kellő mértékű membrán depolarizáció hatására a feszültségszenzor a membránban az extracelluláris tér felé mozdul el (Aggarwal és mtsai, 1996), ami végül az aktivációs kapu megnyílásához vezet. Ez az alapja a csatornák membránpotenciál függő aktivációjának (Bezanilla, 2000).

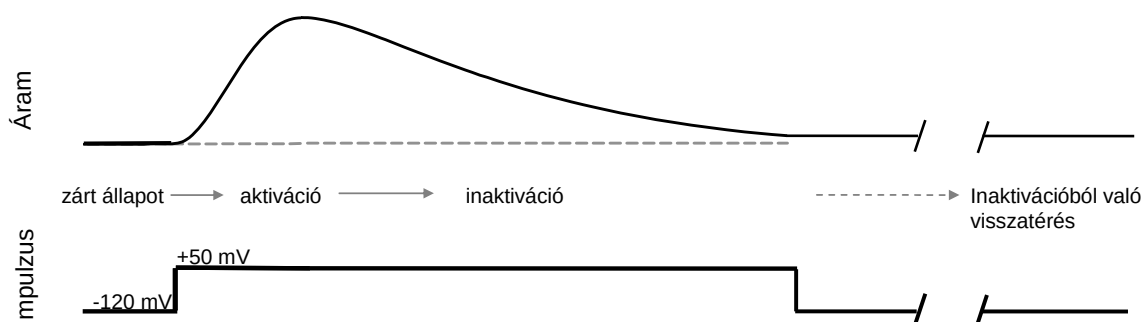
A csatorna pórusrégiója tartalmazza az egyéb predomináns kationokkal (pl. Na^+) szembeni K^+ szelektivitást biztosító, a különböző eredetű kálium csatornában igen konzervatíván megőrzött GYGD szekvenciát (úgynevezett „signature” szekvencia), amely a csatorna szelektivitási szűrőjét alkotja (Heginbotham, 1994). A KcsA és a feszültség kapuzott kálium csatornák kristályszerkezetének tanulsága szerint a csatornák pórusai négy szekvenciális kálium kötőhelyet tartalmaznak. Ezen felül egy szintén extracelluláris elhelyezkedésű rehidrációs-dehidrációs kötőhelyet is feltételeznek (Zhou és mtsai, 2001). Korábban más módszerrel, Ba^{2+} ionok póruson keresztüli áramlásának mérésével is négy K^+ kötőhelyet írtak le a pórusban (Neyton és mtsai, 1988a; 1988b).

A *Shaker* csatorna három széles körben tanulmányozott kapuval, egy aktivációs és két különböző inaktivációs kapuval rendelkezik. Az aktivációs kapu a pórus citoplazmatikus szájadékának megfelelően helyezkedik el, felépítésében a négy S6-os transzmembrán helikális szegmentum C-terminális régiójában elhelyezkedő, 475-478-as pozíciójú aminosavak által alkotott peptid szakaszok vesznek részt (Del Camino és mtsai, 2001). Az N-típusú inaktivációért felelős inaktivációs labdákat a csatorna alegységeinek N-terminális részét képező, *Shaker* csatorna esetén 6-46-os pozícióban található aminosavak építik fel. A C-típusú inaktivációért felelős inaktivációs kapu a pórus extracelluláris szájadékánál található.

III/ 3. A C-típusú inaktiváció jellemzői

Az általam tanulmányozott *Shaker*-IR (N-típusú inaktivációtól mentes) kálium csatornák két kapuval, egy aktivációs és egy, a C-típusú inaktivációért felelős inaktivációs kapuval rendelkeznek. Az inaktivációs kapu záródása következtében létrejövő C-típusú inaktiváció fontos szereppel bír a csatornán keresztüli ionáramlás szabályzásában. Az inaktivált állapotban levő ioncsatorna ugyanis funkcionálisan nem vezetőképes, így az impulzus során kapott áramgörbén az inaktiváció kinetikájától függő áramcsökkenés tapasztalható (2. ábra). Másrészt a depolarizációt követően meghatározott ideig, kellően negatív membránpotenciál jelenléte szükséges ahhoz, hogy az ioncsatornák inaktivációból való visszatérése

megvalósuljon, így egy következő depolarizáló impulzus hatására a csatornák újra a funkcionálisan vezető, nyitott állapotba kerülhessenek.



2. ábra: A C-típusú inaktiváció jelenségét szemléltető sematikus ábra.

Az ábrán egy depolarizáló impulzus alatt létrejövő ionáram sémája látható. A fenntartott depolarizáció során a *Shaker*-IR ioncsatorna a C-típusú inaktiváció révén a funkcionálisan nem vezető, inaktivált állapotba kerül. Az ioncsatornák inaktivációból való visszatérése csak megfelelő ideig kellően negatív tartófeszültség alkalmazása mellett lehetséges (bővebb magyarázat a szövegben).

A C-típusú inaktiváció pontos molekuláris mechanizmusa kiemelt biológiai jelentősége ellenére a mai napig sem tisztázott. Jelen ismereteink szerint a folyamat a pórus extracelluláris szájadékánál létrejövő konformációváltozás eredménye, az viszont, hogy ez a molekuláris átrendeződés pontosan milyen régiókat érint nem ismert. Az egyik feltételezés szerint a konformációváltozás csak a pórus extracelluláris bejáratát érinti, és a pórus összeesik, meggátolva ezzel az ionok áramlását (Yellen és mtsai, 1994). A másik modell szerint a konformációváltozás csak a szelektivitási szűrő régióját érinti, így a C-típusú inaktiváció a csatorna ionszelektivitásának megváltozását eredményezi. Ezáltal az inaktiváció során a csatornák csak a K^+ számra válnak átjárhatatlanná, míg egyéb ionok (pl. Na^+ , Li^+) számára átjárhatók maradnak (Starkus és mtsai, 1997). A mechanizmust tekintve egy dolog biztosnak látszik, mégpedig, hogy a C-típusú inaktivációt a csatornát alkotó négy alegység megfelelő részei kooperatív módon hozzák létre (Panyi és mtsai, 1995).

A C-típusú inaktiváció sebessége számos tényezővel mutat kapcsolatot. A C-típusú inaktiváció sebességét döntően meghatározza a pórus extracelluláris régiójának aminosav sorrendje, kiváltképp a *Shaker* csatorna 449-es pozíciójában található aminosav minősége. Ha az ebben a pozícióban eredetileg megtalálható treonint alaninra cserélik az inaktiváció jelentősen gyorsul, míg a hisztidinnel, vagy más aromás aminosavval történő csere az inaktiváció lassulását eredményezi (Lopez-Barneo és mtsai, 1993). A C-típusú inaktiváció

sebességét az inaktivációs kapunak megfelelően található, feltételezhetően a pórusban szekvenciálisan elhelyezkedő K^+ kötőhelyek közül a legkülső kötőhely telítettsége is befolyásolja. Ennek értelmében az inaktiváció csak abban az esetben mehet végbe, ha a legkülső K^+ kötőhely üres, míg ellenkező esetben a csatorna nem képes inaktiválódni (Baukowitz és mtsai, 1996). Így az N-típusú inaktiváció (Baurkowitz és mtsai, 1995) és bizonyos intracelluláris csatornapórus-blokkolók (pl. TEA) (Baurkowitz és mtsai, 1996) azáltal gyorsítják a C-típusú inaktiváció sebességét, hogy megakadályozzák a póruson kifelé irányuló kálium áramot, ezáltal csökkentve a külső kötőhely telítettségét. Továbbá ezzel a mechanizmussal magyarázhatóvá válik az a korábbi megfigyelés, miszerint az extracelluláris kálium koncentráció növelésével az inaktiváció lassabbá és kétfázisúvá válik (Grissmer és mtsai, 1989), ugyanis a legkülső kötőhely ebben az esetben nagyobb mértékben telítődhet az extracelluláris tér felől.

Érdekes az extracelluláris pH és a C-típusú inaktiváció sebességének kapcsolata, ugyanis míg a *Shaker* csatornában (Perez-Cornejo, 1999) és a legtöbb *Shaker* családba sorolható csatorna esetén az extracelluláris pH csökkenésekor az inaktiváció gyorsulása figyelhető meg, addig a szintén *Shaker* családba sorolható Kv1.3 esetén a C-típusú inaktiváció kinetikája lassul, melynek kulcsfontosságú szerepe lehet a limfociták gyulladásos szövetekben történő aktivációjának szabályzásában (Deutsch és mtsai, 1989).

III/ 4. A C-típusú inaktiváció biológiai jelentősége

A *Shaker* káliumcsatorna az emberi szervezetben nem fordul elő, mégis számos humán, a *Shaker* családba tartozó ioncsatorna szerkezet-funkció kapcsolatának kutatása a *Shaker* csatorna esetén kapott eredményeket veszi alapul. Erre az ad lehetőséget, hogy a *Shaker* csatorna nagymértékű szekvencia homológiát, ezáltal mind strukturális, mind pedig funkcionális hasonlóságot mutat a humán szervezetben előforduló *Shaker* típusú kálium csatornákkal. A *Shaker* csoportba tartozó káliumcsatornák egy része mindkét inaktivációs mechanizmus révén inaktiválódhat, míg bizonyos ioncsatornák, így például a limfociták egyik domináns káliumcsatornája a Kv1.3 ioncsatorna csak a C-típusú inaktivációs mechanizmust mutatja.

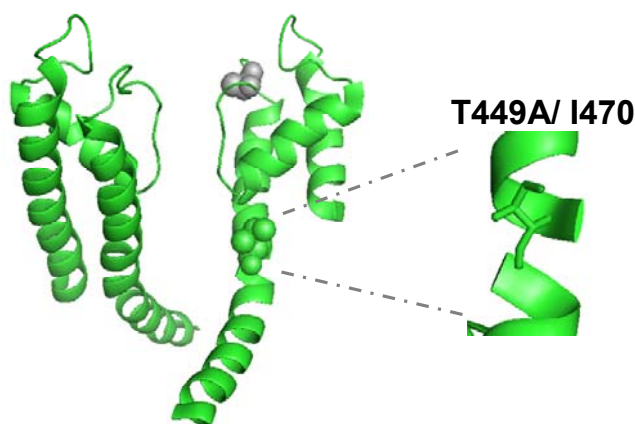
A T limfociták membránpotenciáljának szabályzásában kulcsfontosságú szerephez jut a *Shaker* családba tartozó feszültségkapuzott Kv1.3, valamint a Ca^{2+} -aktivált káliumcsatorna, az IKCa1 (Matteson és Deutsch, 1984). A két csatorna működése a nyugalmi membránpotenciál kialakítása mellett nélkülözhetetlen a limfocita aktivációhoz szükséges Ca^{2+} jel

kialakulásához, biztosítva a membrán hiperpolarizált állapotát a Ca^{2+} influx mellett is (Panyi és mtsai, 2004). Ezek alapján belátható, hogy mind a Kv1.3, mind pedig az IKCa1 ioncsatornák gátlószerei a sejtek proliferációját meggátolva képesek immunszuppressziót előidézni, amire mind in vitro (Leonard és mtsai, 1992), mind in vivo (Cahalan és Chandy, 1997) kísérletek utalnak. Számos olyan autoimmun betegség ismert, amelyben a limfociták kóros aktivációja mutatható ki, így e két ioncsatornát szelektíven és nagy affinitással gátló molekulák kifejlesztése forradalmasíthatná többek között a rheumatoid arthritis, a sclerosis multiplex, és számos más autoimmun betegségek kezelését egy, a mainál specifikusabb, kevesebb mellékhatással bíró terápiát biztosítva (Panyi és mtsai 2006 a; Feske és mtsai, 2012).

IV. PROBLÉMAFELVETÉS, CÉLKITŰZÉS

Kiemelt biológiai jelentőségének ellenére a C-típusú inaktiváció pontos mechanizmusa nem ismert. Ugyan a feszültség kapuzott káliumcsatornák szerkezet-funkció kutatása során szerzett strukturális ismeretek jelentős része röntgenkristallográfiás kísérletekből származik, ennek ellenére a C-típusú inaktiváció folyamatát ezzel a módszerrel ezidáig nem sikerült tanulmányozni. Ennek oka az, hogy az inaktivált állapotban levő káliumcsatornát többszöri próbálkozás ellenére sem lehetett a röntgenkristallográfiás kísérletekhez kristályosítani. Ebből adódik, hogy a pontos szerkezet és mechanizmus meghatározásában előtérbe került az általunk is alkalmazott patch-clamp technika, amely segítségével különböző mutáns csatornákat felhasználva az ionáramok mérésével a különböző szerkezeti változások indirekten nyomon követhetővé válnak.

Korábban bizonyítást nyert, hogy a *Shaker* csatorna aktivációs és a C-típusú inaktivációs kapui csatoltak egymással olyan módon, hogy az inaktivációs kapu zárt állapota gyorsítja az aktivációs kapu nyitását, és lassítja annak záródását, így mintegy a nyitott állapotban stabilizálja az aktivációs kaput (Panyi és mtsai, 2006 b). Korábbi, eddig le nem közölt eredményeink alapján ezt a csatolást a pórust közvetlenül határoló S6-os transzmembrán helikális szegmensek inaktiváció során bekövetkező forgása biztosíthatja. Ez adta a kiindulópontot jelen kísérleteimhez, amelyek során azt vizsgáltam, hogy az S6-os szegmensek pórus felé tekintő pozícióit érintő mutációk hatással vannak-e a két kapu közti csatolási mechanizmus befolyásolásán keresztül az ioncsatorna inaktivációs, illetve aktivációs kapuzására (3. ábra).



3. ábra: A kísérletek során alkalmazott T449A/ I474 mutáns *Shaker* csatorna felépítése.

A szerkezeti modell a „Bevezetés” részben bemutatott Kv1.2 ioncsatorna modell két egymással szemben fekvő, pórust közvetlenül határoló S5 és S6-os transzmembrán helikális szegmentumait és az ezeket összekötő huro szekvenciát mutatja (Kv1.2 ioncsatorna, 325-421. aminosav). Az egyik alegységen zöld színnel a *Shaker* csatorna 470-es pozíciójával homológ aminosavat jelöltem, míg a szürke szín a 449-es pozícióval homológ aminosavat emeli ki. Az előbbi pozíciókba helyezett különböző fizikokémiai tulajdonságú aminosavak révén a pórusbeli mutációk aktivációs, illetve inaktivációs kapuzásra kifejtett hatása vizsgálhatóvá válik.

A pályamunkában bemutatott kísérletek célja így kettős:

- 1) Az egyik fő kérdés, hogy a pórusbeli mutáció lokális hatása révén, a két kapu közti csatolási mechanizmus, tehát az S6-os szegmensek forgásának befolyásolásán keresztül képes-e megváltoztatni bizonyos inaktivációs kapuzást jellemző biofizikai paramétereket, úgymint az áram inaktivációs időállandóját (τ_{inakt}), illetve a csatornák inaktivációból történő visszatérését jellemző időállandót (τ_{rec}).
- 2) A másik kérdés pedig, hogy a pórusbeli mutációnak van-e retrográd hatása a feszültség-szenzor felé, amely esetben az áram aktivációs időállandójában (τ_{akt}) és az egyensúlyi paraméterekben (konduktancia, illetve inaktiváció feszültségfüggése) mutatkozna eltérés.

Méréseimhez olyan mutáns *Shaker* csatornákat használtam, melyek a pórus felé tekintő, 470-es pozíciójában különböző méretű, töltésű és hidrofobicitású aminosavakat (alanin- 470A, triptofán- 470W, glutamát- 470E, aszpartát- 470D, lizin- 470K és arginin- 470R) tartalmaztak. Az ioncsatornák pontos felépítését az „Anyagok és módszerek” fejezet egyes pontjában tettem közzé. A 4. ábrán az egyes ioncsatornák elkülönítésére alkalmazott színkód a pályamunka során egységesen került alkalmazásra, így ez a színkód az alapja a későbbiekben az eredmények közlésekor is használt jelölésnek.

Mutáns ioncsatorna (T449A/ I470X)	470A	470W	470E	470D	470K	470R
Töltés (pH=7,38)	semleges	semleges	negatív	negatív	pozitív	pozitív
Relatív méret (izoleucinhoz viszonyított)	0,686	1,771	1,146	1,125	1,229	1,333
Hidrofobicitás (Wimley-White skála)	3.	1.	7.	6.	5.	4.

4. ábra: A kísérletek során alkalmazott 470-es pozícióban különböző fizikokémiai tulajdonságú aminosavakat tartalmazó mutáns Shaker csatornák bemutatása.

A szerkezeti modell részletek az előző ábrán feltüntetett, kinagyított résznek megfelelő nézetből mutatják a pórusban található aminosavak szerkezetét. Az egyes ioncsatornák azonosítására használt színek a pályamunkában mindvégig az ábrán láthatóval azonos. A táblázatban továbbá feltüntetésre került az egyes aminosavak töltése, az eredetileg 470-es pozícióban található izoleucinhoz viszonyított relatív méret, továbbá a Wimley-White hidrofobicitási skála alapján az aminosavak egymáshoz viszonyított hidrofobicitási értékei.

A fentebb megfogalmazott célkitűzéseknek megfelelően az elektrofiziológiai mérések során a mutáns csatornák aktivációs és inaktivációs kapuzását jellemző biofizikai paramétereket határoztam meg, és hasonlítottam össze a kontrollként használt T449A/I470 ioncsatorna megfelelő paramétereivel.

V. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

V/ 1. A mutáns ioncsatornák felépítése

A kísérletek során használt mutáns ioncsatornát kódoló plazmidok előállítását Dr. Szilágyi Orsolya (DE Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet, limfocita elektrofiziológiai munkacsoport) végezte.

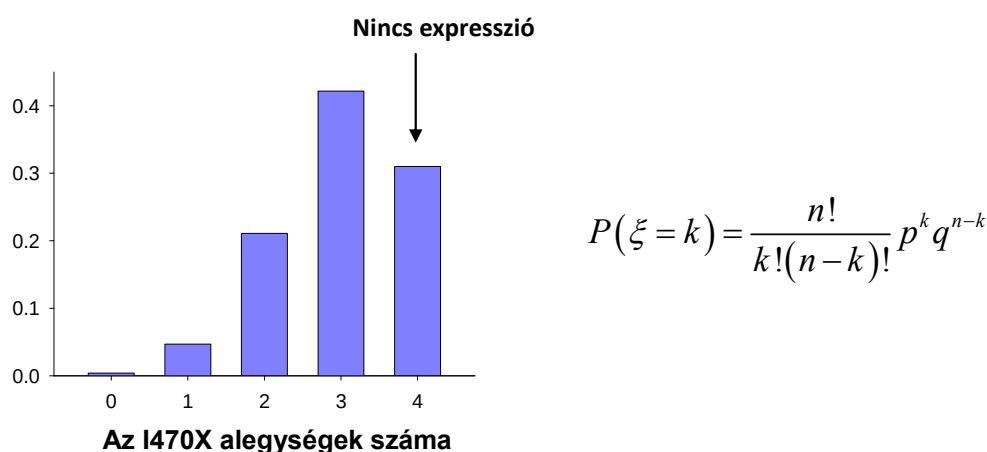
A kísérletekhez használt mutáns csatornák több mutációt tartalmaztak. Az ioncsatornák előállításakor a vad típusú *Shaker* csatornából eltávolításra kerültek az N-típusú inaktivációért felelős 6-46-os pozícióban található „inaktivációs labdát” kódoló aminosavak (Hoshi és mtsai, 1990). Az így nyert *Shaker*-IR csatornában ezt követően a 301-es és 308-as pozícióban található endogén ciszteineket szerinekkal helyettesítették. A következő mutáció a 449-es pozícióban található treonin alaninra történő cseréje volt, ami jelentősen gyorsítja a C-típusú inaktiváció sebességét (Lopez-Barneo és mtsai, 1993), lehetővé téve annak tanulmányozását. A későbbiekben kontrollként használt I470 jelzésű ioncsatorna a fentebbi mutációkat tartalmazta. A pórusbeli mutáció kapuzásra kifejtett hatásának tanulmányozására az I470 ioncsatornában a kísérleti stratégia szempontjából fontos 470-es pozícióban található izoleucint alaninnal, triptofánnal, glutamáttal, aszpartáttal, lizinnel, vagy argininnel helyettesítették (QuikChange kit; Stratagene). Így jöttek létre a kísérletek során használt 470A, 470W, 470E, 470D, 470K, 470R konstruktok.

V/ 2. A tsA-201 sejtek tenyésztése és transzfekciója

Az SV40 large T antigénnel transzformált humán embrionális vese sejteket (tsA-201 sejtek) magas glükóz tartalmú *Dulbecco's minimum essential medium* tápoldatban tenyésztettem, melynek összetétele a következő volt: 10% FBS, 2 mM L-glutamin, 100 U/ml, penicilin-G, és 100 µg/ml streptomycin. A sejtek tenyésztése 37°C-on, 5% CO₂-ot és 95%-os páratartalmat biztosító termosztátban, 25 cm²-es tenyésztőflaskában történt. A sejteket hetente kétszer passzáltam. A letapadó sejteket 5 perces 0,2 g/L EDTA-t tartalmazó PBS oldattal történő inkubációval választottam le a tenyésztőflaska aljáról.

A transzfekciót megelőző napon a sejteket 60 x 15 mm-es petrikbe helyeztem, hígítási sort készítve. Másnap a transzfekcióhoz mindig egy 70 %-os konfluenciájú petrit

választottam. A sejteket Ca-foszfát precipitációs módszerrel ko-transzfektáltam a mutáns ioncsatornát kódoló plazmiddal (10 µg), illetve EGFP plazmiddal (1 µg). A transzfektációt követően a kontroll I470 ioncsatorna, illetve az alanint tartalmazó 470A mutáns önmagában expresszáldott, míg a triptofánt, glutamátot és aszpartátot tartalmazó mutánsok csak a kontroll csatornával együttesen transzfektálva, azzal heteromereket alkotva adtak funkcionális csatornákat. A plazmidok keverési arányát úgy állítottuk be, hogy a binomiális eloszlásból levezethetően a heteromerek többsége 3:1 arányban expresszálja a mutáns alegységet (5. ábra). A mutáns alegységek ezen teoretikusan meghatározott arányát az egyexponenciális függvénnyel leírható inaktivációs kinetika is alátámasztja (további magyarázat az „Eredmények”, VI/3. egységén belül). Érdekes, hogy a pozitív töltésű lizint és arginint tartalmazó mutánsok esetén egyik módszerrel sem kaptunk áramot. Azt, hogy ezek a pozitív töltésű aminosavat tartalmazó ioncsatornák nem fejeződtek ki a membránban, vagy kifejeződtek és ezt követően nem adtak funkcionálisan vezető ioncsatornákat nem vizsgáltuk.



5. ábra: A 470W, 470E és 470D ioncsatornák binomiális eloszlás alapján levezethető alegység összetétele.

Ahogy azt korábban említettem a fentebbi három mutáns ioncsatorna esetén önmagukban transzfektálva azokat nem kaptam áramot. Ezek a mutánsok csak a kontroll csatornával együttesen transzfektálva, azzal heterotetramereket alkotva adtak funkcionális csatornákat. A mutáns plazmidokat 4:1 arányban transzfektáltam a kontroll I470 ioncsatorna plazmidjával. Ennek megfelelően a binomiális eloszlás segítségével levezethető a heterotetramer ioncsatornák domináns alegység összetétele. A bemutatott függvényben „n” az alegységek maximális számát jelöli, ami jelen esetben négygel egyenlő; „k” a 470-es pozícióban mutációt tartalmazó alegységek száma (0-4 között, beleértve a szélső értékeket is); „p” annak a valószínűsége, hogy az alegység a mutációt tartalmazza; „q” pedig annak a valószínűsége, hogy az alegység a mutációt nem tartalmazza. Az oszlopdiagram alapján jól

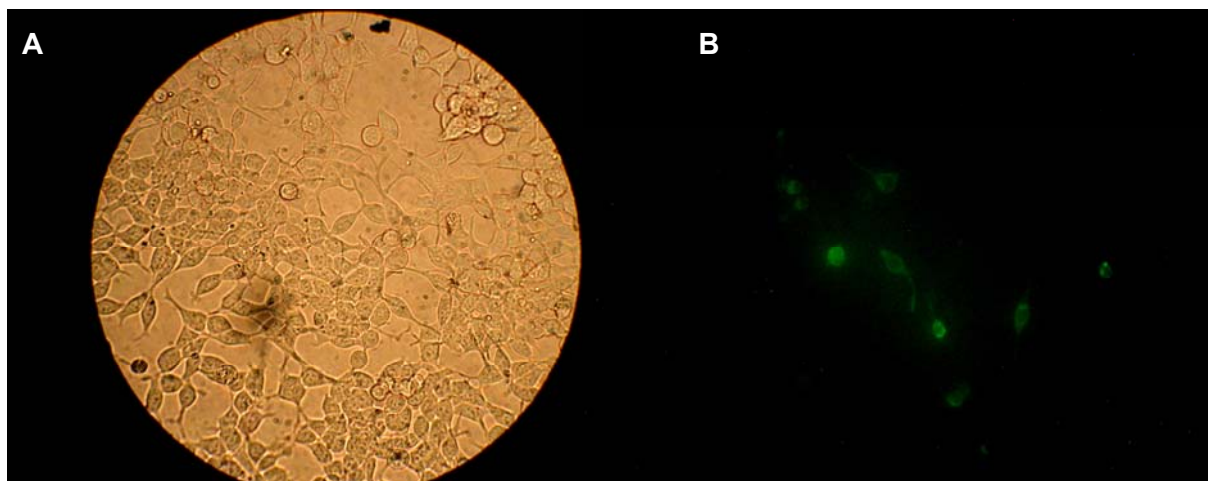
látható, hogy a 4:1-es keverési arány mellett az ioncsatornák túlnyomó része három 470X alegységet és egy I470 alegységet tartalmazott.

A transzfekciót követően a sejteket 35 mm-es, előzetesen poly-L-ornitinnel kezelt petrikbe helyeztem, melynek alkalmazását az inside-out konfigurációban történő mérés követelt meg. A méréseket mindig a transzfekciót követő 12-36 órás időablakban végeztem. Közvetlenül a mérés megkezdése előtt az adott petriben levő sejteket kétszer 1 ml külső oldattal (150 mM NaCl, 2 mM KCl, 1,5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES; pH= 7,38) mostam, majd végül a sejteket 2 ml külső oldatban inkubáltam.

A sejtek tenyésztése során, illetve a transzfekcióhoz Sigma Aldrich gyári készítményeket használtam, (Sigma Aldrich, Budapest, Magyarország).

V/ 3. Fluoreszcens mikroszkópia

Méréskor az EGFP pozitív, transzfektált sejtek egyéni azonosításához Nikon TE2000U invert fluoreszcens mikroszkópot használtam (6. ábra). Az excitációs szűrő a 455-495 nm-es, az emissziós szűrő a 515-555 nm-es hullámhosszúság tartomány számára volt átjárható. A plazmidok keverési aránya biztosította, hogy az EGFP pozitív sejtek több mint 60%-a kifejezte a ko-transzfektált mutáns ioncsatornákat a mérési időszámban. Ez egy „tapasztalati” arány, a transzfekció hatásfokát pontosan nem határoztam meg.



6. ábra: *A kísérletek során alkalmazott tsA-201 sejtek morfológiája fénymikroszkópia (A panel) és fluoreszcens mikroszkópia (B panel) során, 40x-es nagyítás mellett.*

A felvételeket Nikon Coolpix 4500-as digitális fényképezőgéppel készítettem. Az **A** és **B** panelek a petri azonos régióját mutatják. A fluoreszcens jelet adó, EGFP pozitív sejtek többsége kifejezte a mutáns ioncsatornát a mérési időszámban a plazmidok ko-transzfekció során alkalmazott aránya révén.

V/ 4. Elektrofiziológia

A méréseket a patch clamp technika (Hamill és mtsai, 1981) segítségével, inside-out konfigurációt alkalmazva végeztem. A depolarizáló impulzusok nagyságát és az ionáramok irányát munkám során didaktikai szempontból mindvégig az élettani konvencióknak megfelelően tüntettem fel. A mérésekhez Axopatch 200A és Multiclamp 700B patch-clamp erősítőket (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, USA) használtam, feszültség-zár üzemmódban, melynek eredményeképpen a vizsgált sejt membránpotenciálja konstans értéken tartható, miközben a sejtmembránon átfolyó áram nagysága meghatározhatóvá válik. A mérésekhez Burleigh PCS5000 mikromanipulátort Thorlabs Inc., Newton, New Jersey, USA) alkalmaztam. Az ingerlő feszültség-impulzusokat és az adatgyűjtést IBM kompatibilis személyi számítógép vezérelte Axon Digidata 1200 és 1322A illesztőegységen (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, USA) keresztül a pCLAMP8/10 programcsomag segítségével (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA). Az áramgörbéket 4 pólusú Bessel szűrővel szűrőztem. A mintavételezés frekvenciája, a Nyquist teória értelmében, a szűrők sávszélességének legalább kétszerese volt. A csúcsáramok értéke általában 600-1500 pA-nek adódott +50 mV-os tesztpotenciál érték mellett. A továbbiakban azon áramgörbéket értékeltem ki, melyek esetén az egyensúlyi áram nagysága a csúcsáram nagyságának 5%-nál kisebb volt.

A pipettákat boroszilikát üvegkapillárisokból húztam 5 fázisban, majd a pipetták hegyét hő alkalmazásával políroztam. A pipetták ellenállása az alkalmazott oldatok esetén 3-4 MΩ volt.

A méréseket minden esetben szobahőmérsékleten (22-25 °C) végeztem.

V/ 5. Oldatok, perfúziós rendszer

A pipettában az inside-out konfigurációnak megfelelően a külső oldat helyezkedett el, melynek pontos összetétele: 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 1,5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES. Belső oldatként pedig egy 105 mM KF, 35 mM KCl, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES tartalmú oldatot alkalmaztam. Mindkét oldat pH-ja 7,38 volt. A belső oldatot egy a

gravitáció által hajtott, manuálisan vezérelt perfúziós rendszer segítségével vezettem az inside-out patchre, 0,5 ml/perces ütemben, folyamatos elszívás mellett.

V/ 6. Adatok értékelése

Az eredmények értékeléséhez a pClamp8/10 program csomagot (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA) használtam. A mérés során kapott áramgörbékét a kiértékelés elején korrigáltam az ohmikus szivárgási áramra és digitálisan szűrőztem három pontos boxcar módszerrel.

A mért pontokhoz az egyes függvények (ismertetésüket lásd lentebb, az „EREDMÉNYEK” megfelelő fejezeteiben) illesztését a Marquardt-Levenberg algoritmus segítségével végeztem.

A mérési adatok közlésénél az átlagértéket és annak közepes hibáját (SEM) adtam meg adott mérési szám (n) mellett. A mérési eredményeket reprezentáló ábrák szerkesztéséhez a SigmaPlot 10.0 programot használtam.

Az eredmények statisztikai elemzése a pályamunkában mindvégig az ANOVA statisztikai próba elvégzésével történt, 5%-os szignifikancia szint mellett. A kontroll I470 ioncsatorna esetén meghatározott értékhez képest szignifikáns eltéréseket a pályamunkában csillaggal jelöltem.

V/ 7. Ioncsatorna szerkezeti ábrák

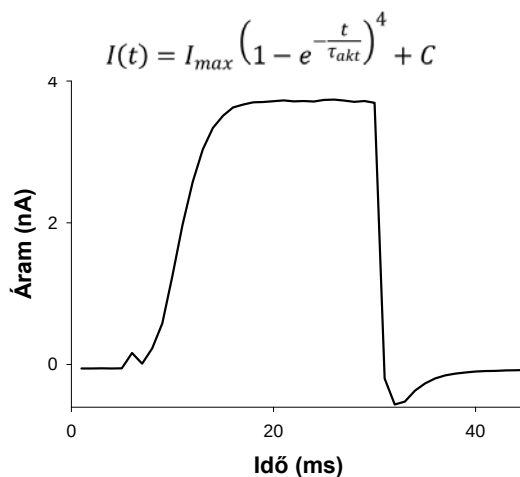
A pályamunka során bemutatott, a *Shaker* csatorna felépítését szemléltető szerkezeti ábrákat a Pymol program segítségével szerkesztettem. A szerkezeti adatok PDB adatbázisból elérhető kódja: 3LUT. Az ábrák a Kv1.2 ioncsatorna röntgenkristallográfiás kísérletek alapján meghatározott szerkezeti modelljén alapul (Chen és mtsai, 2010). Mivel jelenleg a *Shaker* csatorna teljes felépítését bemutató, hasonló szerkezeti modell nem áll rendelkezésre, ezért pályamunkámban mindvégig ezt a modellt használtam fel a mutáns *Shaker* csatorna és a *Shaker* típusú ioncsatornák felépítésének szemléltetésére. Ezt a *Shaker* csatorna és a Kv1.2 ioncsatorna közötti nagyfokú szekvencia homológia teszi lehetővé. Az aktuálisan ábrázolt szekvencia hosszát az egyes ábrák esetén külön jelöltem.

VI. EREDMÉNYEK

A pórusbeli mutációk lokális hatásának tanulmányozására az elektrofiziológiai kísérletek során meghatároztam az áram inaktivációs időállandóját, illetve az inaktivációból való visszatérést jellemző időállandót. A pórusbeli mutációk esetleges retrográd hatása a feszültség-szenzor felé leginkább az áram aktivációs időállandójának értékében, illetve az egyensúlyi paraméterekben, a konduktancia és az inaktiváció feszültségfüggésében mutatkozik. Didaktikai szempontból a mutáns ionsatornák biofizikai jellemzőinek bemutatásakor csoportosítva előbb az aktivációs, majd az inaktivációs paraméterek bemutatását teszem közzé, a kapott eredmények értelmezését pedig a „Megbeszélés” fejezetben teszem közzé.

VI/ 1. Az áram aktivációs időállandójának meghatározása

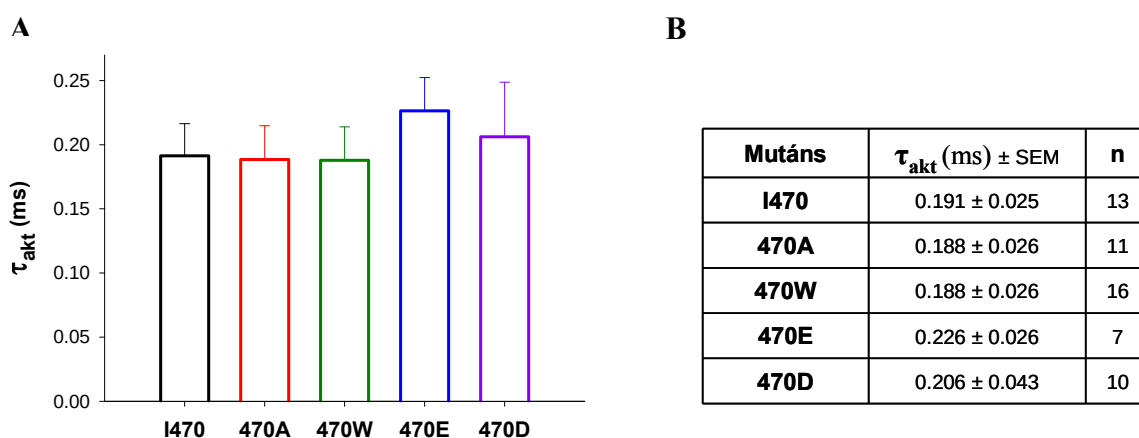
A csatornák biofizikai jellemzése szempontjából alapvető az áram egy adott membránpotenciálon mért időbeli változását jellemző kinetikai paraméter, az aktivációs időállandó meghatározása. Az áram aktivációs időállandójának (τ_{akt}) meghatározásához -120 mV-os tartófeszültségről kiindulva 25 ms hosszúságú, +50 mV-os depolarizáló impulzust alkalmaztam. Az aktivációs kinetika jellemzésére a τ_{akt} -t olyan módon határoztam meg, hogy az áramgörbe felszálló szárára a Hodgkin és Huxley által kidolgozott alábbi függvényt illesztettem: $I(t) = I_{max}(1 - e^{-t/\tau_{akt}})^4 + C$, ahol I az aktuális áramerősség, I_{max} az aktiválódó áram amplitúdója, a τ_{akt} az aktivációs időállandó, t az illesztés kezdetétől számított idő, C pedig az áram értéke a depolarizáló impulzus kezdetén (7. ábra).



7. ábra: 25 ms hosszúságú, +50 mV-os depolarizáló impulzus hatására kapott áramgörbe a kontroll I470 ioncsatorna esetén.

A görbék felszálló szárára a Hodgkin-Huxley modellnek megfelelő szövegben említett exponenciális függvényt illesztettem, a Marquardt-Levenberg algoritmus alkalmazásával, az áram aktivációs időállandójának (τ_{akt}) meghatározásához.

A különböző mutáns ioncsatornák esetén kapott aktivációs időállandó értékek az 8. ábrán kerültek feltüntetésre. Az elvégzett statisztikai próba egyik mutáns ioncsatorna esetében sem mutatott szignifikáns eltérést a kontroll I470 ioncsatorna esetén tapasztalható aktivációs időállandótól.



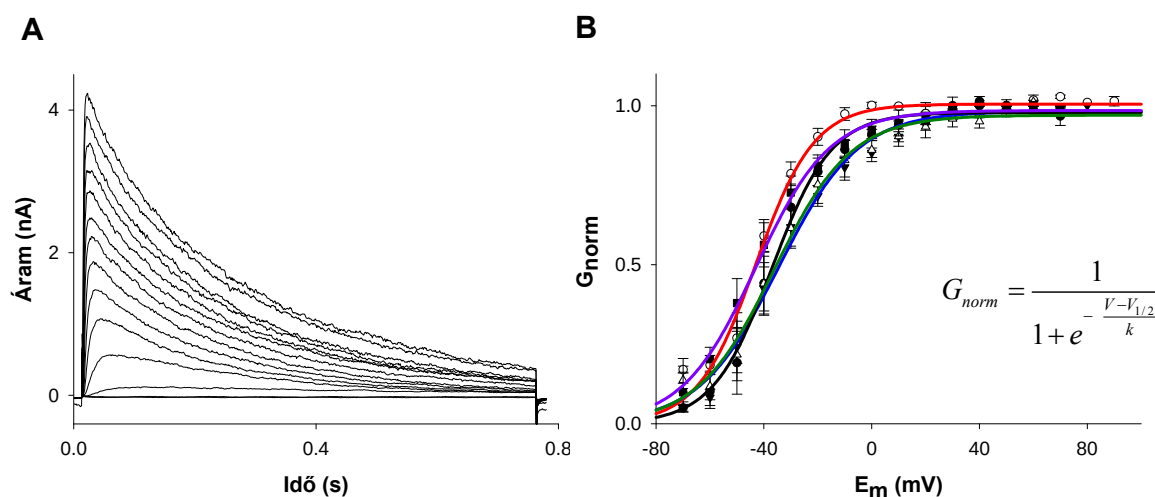
8. ábra: Az egyes ioncsatornák aktivációs időállandóit bemutató oszlopdiagram (A panel), illetve az aktivációs időállandókat bemutató táblázat (B panel).

A mérési adatok közlésénél mindegyik esetben az átlagértéket és annak közepes hibáját (SEM) adtam meg adott mérési szám (n) mellett. Az elvégzett statisztikai próba egyik esetben sem mutatott szignifikáns eltérést a kontroll ioncsatornához képest.

VI/ 2. A konduktancia feszültségfüggésének vizsgálata

Kísérleteim során meghatároztam a konduktancia feszültségfüggését. A konduktancia feszültségfüggésének vizsgálatakor először a csatornák áram-feszültség karakterisztikáját (I-V függvény) határoztam meg. Ennek során -80 mV-tól +90 mV-ig terjedő depolarizáló impulzusokat alkalmaztam 10 mV-os lépésközökkel. Az impulzusok között eltelt idő 45 s, míg a tartófeszültség értéke mindvégig -120 mV volt. A mérések során az I470 ioncsatorna esetén kapott egy reprezentatív áramgörbét az 9. ábra A panelén tüntettem fel.

Ezt követően az egyes tesztpotenciálokhoz tartozó, ohmikus szivárgási áramra előzetesen korrigált csúcsáramok értékeit határoztam meg az aktuális tesztpotenciál függvényében. Az így nyert áram-feszültség (I-V) függvény megfelelő értékeiből a $G = I/(E_m - E_{rev})$ összefüggés felhasználásával határoztam meg az adott tesztfeszültséghez tartozó konduktancia (G) értékét, ahol I az adott tesztfeszültséghez tartozó áram amplitúdója, E_m a membránpotenciál a depolarizáló impulzus alatt, E_{rev} pedig a Nernst-egyenletből számított K^+ egyensúlyi potenciál, amelynek értékét az alkalmazott oldatösszetétel alapján egységesen -85 mV-nak választottam. Az egyes tesztfeszültséghez tartozó konduktancia értékeket normáltam a legnagyobb vezetőképesség értékre, majd az így kapott adott tesztfeszültséghez tartozó normált konduktancia értékeket (G_{norm}) ábrázoltam a depolarizáló impulzus feszültségének függvényében (G_{norm} -V görbe). Az így kapott adatpontokra az alábbi Boltzmann-függvényt illesztettem (9. ábra B panel).



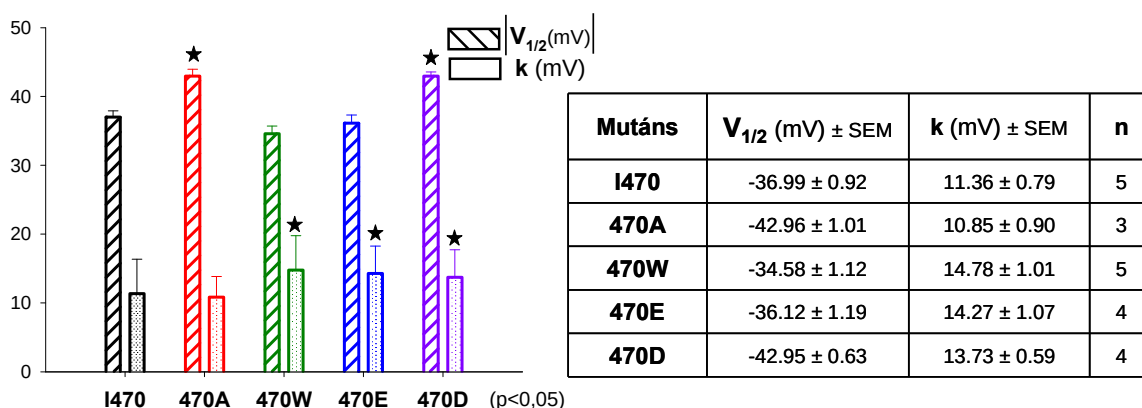
9. ábra: Az I470 ioncsatorna lentebb bemutatott protokoll szerinti vizsgálata során kapott reprezentatív áramgörbe (A panel), illetve a normált konduktancia (G_{norm}) tesztpotenciál (V) függése az egyes ioncsatornák esetén (B panel).

A csatornák áram feszültség karakterisztikájának meghatározásához -80 mV-tól +90 mV-ig terjedő depolarizáló impulzusokat alkalmaztam 10 mV-os lépésközzel. Az egyes depolarizáló impulzusok közötti tartófeszültség egységesen -120 mV, az impulzusok közti idő 45 s. A depolarizáló impulzusok alatt kapott áramgörbéket az kontroll, I470 ioncsatorna esetén egy reprezentatív mérés során az A panel mutatja.

A B panel a különböző tesztpotenciálok mellett meghatározott G_{norm} értékeket ábrázolja az alkalmazott tesztpotenciál függvényében, amit az áram- feszültség (I-V) függvényből vezettem le. Az I-V függvényen a mért K^+ csúcsáramokat ábrázoltam az azt kiváltó impulzus függvényében -80 mV-tól

+70 mV-ig, 10 mV-os lépésközökkel -120 mV-os tartófeszültségről. A vezetőképességeket minden feszültség-impulzus esetében a szövegben említett képlettel számoltam ki és ezt követően normáltam a maximális vezetőképességre azokat. Az ábrázolt adatpontokhoz mindegyik esetben az ábrán feltüntetett Boltzmann-függvényt illeszttem. Az egyes tesztfeszültségekhez tartozó normált konduktancia értékeknél az átlagértéket és annak közepes hibáját (SEM) adtam meg.

A Boltzmann-függvény paramétereivel a normált konduktancia feszültségfüggése jellemezhetővé válik, ahol a G_{norm} a mérési adatokból számított normált konduktancia, V az aktuális tesztpotenciál, $V_{1/2}$ a félaktivációs feszültség, k pedig az aktiváció feszültségfüggésének a meredeksége. Az egyes mutáns ioncsatornák esetén a konduktancia feszültségfüggését a fentebb említett módon meghatározott félaktivációs feszültség ($V_{1/2}$) és meredekség (k) jellemzi. Ezeken túl a protokollok tervezése szempontjából fontos információt hordoznak a csatornák aktivációs küszöbéhez és a maximális konduktancia eléréséhez tartozó feszültségértékek is. Az egyes ioncsatornák esetén kapott pontos értékeket az 10. ábrán tüntettem fel. Az elvégzett statisztikai próba alapján a kontrollhoz képest statisztikailag szignifikáns eltéréseket csillag jelöli.



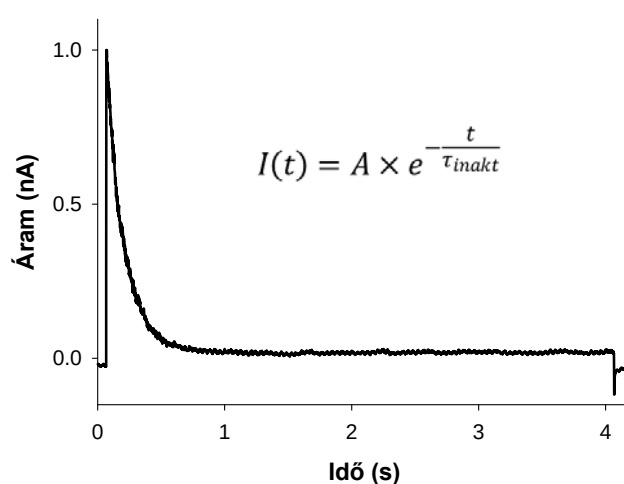
10. ábra: Az ioncsatornák félaktivációs feszültségét ($V_{1/2}$), illetve az aktiváció feszültségfüggésének meredekségét (k) bemutató oszlopdiagram, illetve az adott paraméterek pontos értékeit bemutató táblázat.

A mérési adatok közlésénél mindegyik esetben az átlagértéket és annak közepes hibáját (SEM) adtam meg adott mérési szám (n) mellett. Az elvégzett statisztikai próba a csillaggal jelölt esetekben mutatott szignifikáns eltérést a kontroll I470 ioncsatornához képest.

VI/ 3. Az áram inaktivációs időállandójának meghatározása

Az aktivációs paraméterek meghatározása során kapott eredmények után rátérek az inaktivációs kapuzást jellemző paraméterek bemutatására, kezdve az áram inaktivációs időállandójának meghatározásával.

Az N-típusú inaktivációs labdával nem rendelkező *Shaker*-IR csatornák egy hosszan tartó depolarizációs impulzus alatt a C-típusú inaktivációért felelős inaktivációs kapu záródása miatt inaktiválódnak. Az inaktivált állapotban levő csatornák funkcionálisan nem vezetőképesek, így az inaktiváció folyamata makroszkóposan abban nyilvánul meg, hogy az áram a csúcstértékről egy exponenciális összefüggéssel illeszthető kinetikával egy egyensúlyi értékre (egyensúlyi áram) csökken. (11. ábra).

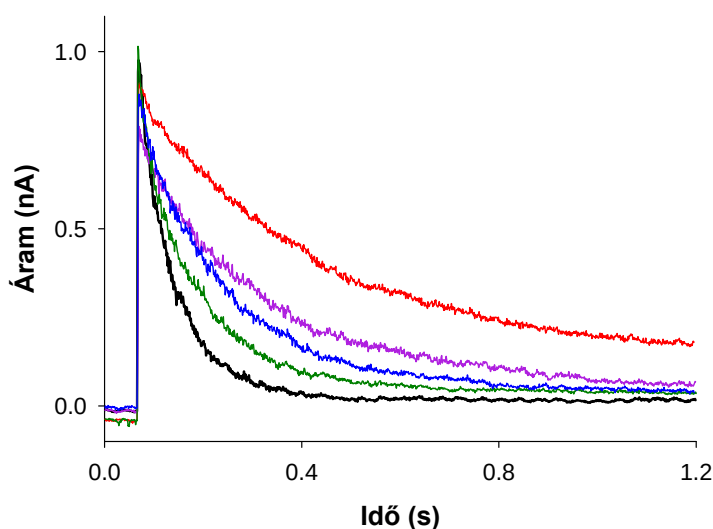


11. ábra: +50 mV-os, 4 s hosszúságú depolarizáló impulzus során kapott reprezentatív áramgörbe a kontroll I470 ioncsatorna esetén..

Az áramgörbe leszálló szárára az ábrán feltüntetett egyexponenciális függvényt illesztettem mindegyik ioncsatorna esetén. Az áram inaktivációs időállandójával (τ_{inakt}), mint illesztett paraméterrel az inaktiváció kinetikája jellemezhetővé válik.

Az inaktivációs kinetika jellemzésére az áram inaktivációs időállandóját (τ_{inakt}) használtam. Az áram inaktivációs időállandójának meghatározásához -120 mV-os tartófeszültségről 4000 ms hosszúságú +50 mV-ra történő depolarizáló impulzust alkalmaztam. A τ_{inakt} értékét az áramgörbe leszálló szárára illesztett alábbi egyexponenciális függvénnyel határoztam meg: $I(t) = A \times e^{-t/\tau_{inakt}} + C$, ahol I az aktuális áramerősség, C az egyensúlyi (steady-state) áram nagysága, A az inaktiválódó komponens amplitúdója, t pedig az illesztés kezdetétől számított idő.

Az ioncsatornák közül a kontroll I470, illetve a 470A ioncsatorna expresszáldott homotetramer csatornaként a transzfekció során. A másik három ioncsatorna esetén csak az I470 ioncsatornával együttesen transzfektálva, azzal heteromer ioncsatornákat alkotva sikerült áramot detektálnom. Az „Anyagok és módszerek” fejezetben bemutatott statisztikai elemzés alapján az általunk alkalmazott transzfekciós arány mellett a heteromer csatornák többsége 3:1 arányban tartalmazta a mutáns alegységet. Ezt támasztja alá a 12. ábra, amelyen az egyes mutáns ioncsatornák esetén kapott áramgörbék kezdeti szakaszát tüntettem fel. Irodalmi adatok alapján ugyanis ismert, hogy az inaktivációs kinetika egy exponenciális függvénnyel írható le homotetramer ioncsatornák esetén, illetve 3:1-es alegység összetétel mellett, míg ha a két alegység aránya közel egyenlő, akkor az inaktivációs kinetika nem írható le egyexponenciális függvénnyel (Panyi és mtsai, 1996). A 12. ábra alapján jól látható, hogy az áram inaktivációs kinetikája a heteromer ioncsatornák esetén is egyexponenciális függvénnyel írható le, az illesztéssel kapott, lentebb pontosan közölt τ_{inakt} értékek pedig különböznek a homotetramer I470 ioncsatorna esetén tapasztalhatótól. Mindez azt támasztja alá, hogy az ioncsatornák többsége valóban túlnyomó részt 3:1 arányban fejezte ki a mutáns alegységet.

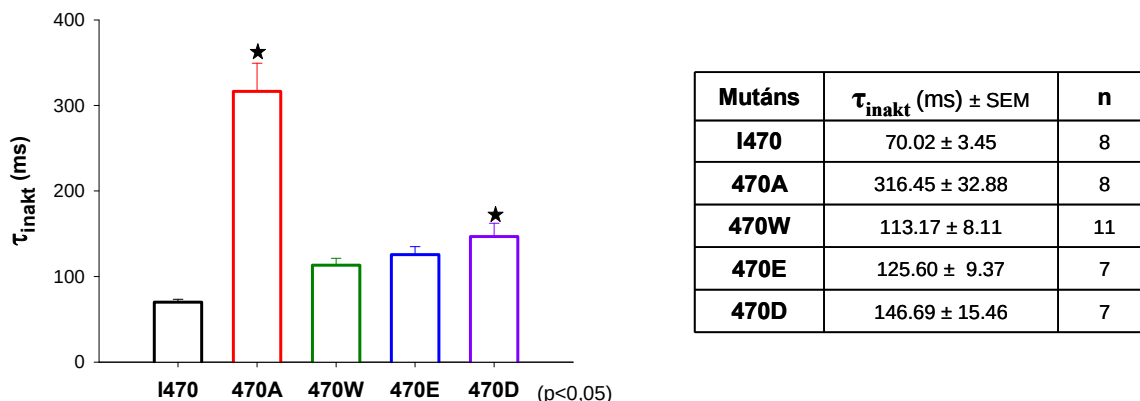


12. ábra: $A +50 \text{ mV}$ -os, 4 s hosszúságú depolarizáló impulzus során kapott reprezentatív áramgörbék kezdeti szakaszai a különböző ioncsatornák esetén.

Az ábra alapján jól látható, hogy az áram inaktivációs kinetikája a heteromer mutáns ioncsatornák esetén is a fentebb bemutatott egyexponenciális függvénnyel pontosan leírható. Az egyes ioncsatornák esetén alkalmazott színek megegyezik a korábban alkalmazottal.

A fentebb bemutatott módon meghatározott pontos τ_{inakt} értékeket a 13. ábrán tüntettem

fel adott mérési szám mellett (n). Az elvégzett statisztikai próba a csillaggal jelölt helyen mutatott szignifikáns eltérést az I470 ioncsatorna τ_{inakt} értékéhez képest.

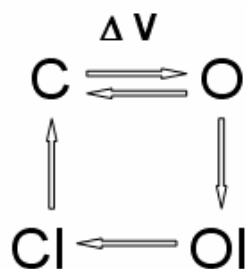


13. ábra: Az ioncsatornák inaktivációs időállandóit (τ_{inakt}) bemutató oszlopdiagram, illetve az adott paraméterek pontos értékeit bemutató táblázat.

A mérési adatok közlésénél mindegyik esetben az átlagértéket és annak közepes hibáját (SEM) adtam meg adott mérési szám (n) mellett. Az elvégzett statisztikai próba a csillaggal jelölt esetekben mutatott szignifikáns eltérést a kontroll I470 ioncsatornához képest.

VI/ 4. Az inaktivációból való visszatérés időállandójának meghatározása

Mint ahogy azt korábban is említettem a depolarizáló impulzus során az ioncsatorna aktivációs kapuja kinyit (O), majd ezt követően az inaktivációs kapu záródásával a funkcionálisan nem vezető inaktivált állapotba kerül (OI). Ahhoz, hogy a csatorna egy újabb depolarizáció hatására ismételen a funkcionálisan vezető nyitott állapotba kerüljön a 14. ábrán feltüntetett, egyszerűsített négy állapotos kapuzási modell alapján vissza kell térnie az inaktivált állapotból a kiindulási zárt (C) állapotba.



14. ábra: Az egyszerűsített négy állapotos kapuzási modell sémája.

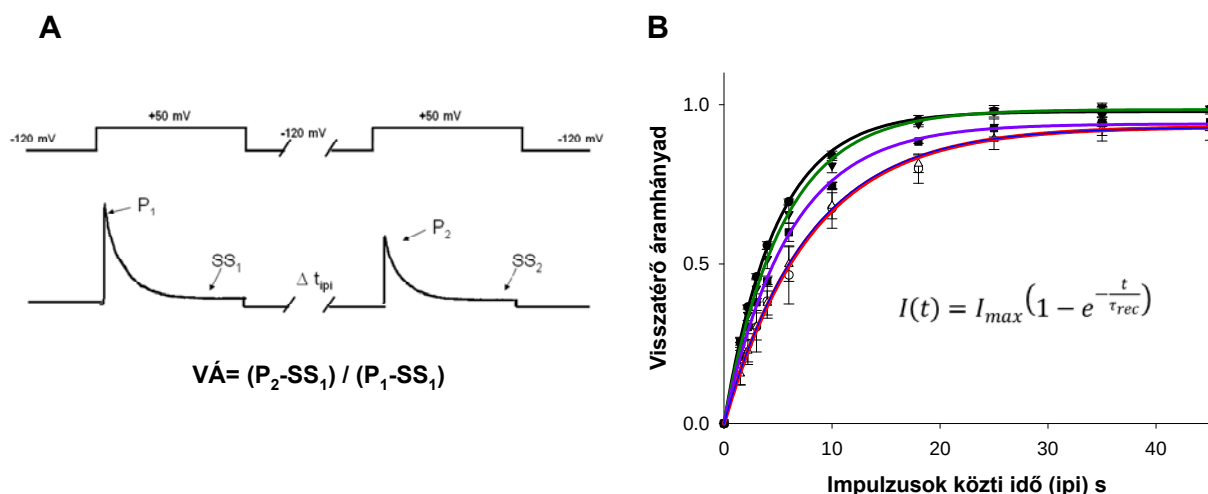
A C, illetve O az aktivációs kapu zárt, illetve nyitott állapotát jelöli, míg az I az inaktivációs kapu zárt állapotát jelöli. A -120 mV-os tartófeszültség esetén a csatornák a kiindulási zárt (C) állapotban vannak, majd a membrán +50 mV-os depolarizációja hatására (ΔV) a csatornák megnyitnak (O). A fenntartott depolarizáció hatására, a csatornák a C-típusú inaktivációs kapu záródásával a nyitott-inaktivált (OI) állapotba kerülnek. A depolarizációt követően, visszatérve a kiindulási -120 mV-os tartófeszültségre az aktivációs kapu bezáródik, ezáltal kialakul a zárt-inaktivált (CI) állapot. Ezt követően a csatornákat megfelelő ideig kell a -120 mV-os tartófeszültségen tartani ahhoz, hogy az inaktivációs kapu nyitásával a csatornák visszatérjenek az inaktivált állapotból a zárt (C) állapotba, amelyből a következő depolarizáló impulzus hatására a funkcionálisan vezető, nyitott (O) állapot elérhető.

A zárt (C) állapot újbóli eléréséhez, tehát az ioncsatornák inaktivációból történő visszatéréséhez megfelelő ideig kellően negatív membránpotenciál jelenléte szükséges. Amennyiben ez nem teljesül az érintett csatornák a zárt-inaktivált állapotban (CI) maradnak, így a következő impulzus alatt a csatornák a zárt inaktivációs kapu miatt nem képesek a káliumionok vezetésére.

Az inaktivációból való visszatérés időállandójának (τ_{rec}) meghatározásához mindig adott impulzuspárok hatására kialakuló csúcsáramokat hasonlítottam össze. A protokoll során mindvégig 1000 ms-ig tartó +50 mV-os depolarizáló impulzusokat alkalmaztam, az egyes impulzuspárok között eltelt idő pedig egységesen 60 s volt. A tartófeszültség értéke a protokollon belül -120 mV. Az impulzuspárokon belül csak az egyes impulzusok közötti idő (t_{ipi}) változott. A különböző impulzusok közti idők esetén (t_{ipi}) az alábbi képlet segítségével határoztam meg a visszatérő áramhányad ($V\acute{A}$) értékét: $V\acute{A} = (P_2 - SS_1) / (P_1 - SS_1)$, ahol P_1 az első impulzus során kapott csúcsáram, P_2 a második impulzus során kapott csúcsáram, SS_1 pedig az első impulzus során mért egyensúlyi (steady-state) áram értéke (15. ábra A panel).

Az adott t_{ipi} mellett meghatározott visszatérő áramhányadokat ezt követően az impulzusok közti idő függvényében ábrázoltam (15. ábra B panel). Kezdetben a második impulzus során kapott csúcsáram lényegesen kisebb, mint az első impulzus esetében. Ennek oka, hogy az első depolarizáció hatására a csatornák megnyitnak majd inaktiválódnak. A nem vezető inaktivált csatornáknak előbb be kell záródniuk ahhoz, hogy az újabb depolarizáció hatására a funkcionálisan vezető nyitott állapotba kerülhessenek. Ahhoz, hogy az inaktiváltból zárt állapotba történő átmenet bekövetkezzen megfelelő ideig kell a csatornákat a -120 mV membránpotenciálon tartani. Ahogy az impulzusok közti idő növekedett a csatornák egyre nagyobb hányada került zárt állapotba, ezáltal vált a második impulzus számára

„megnyithatóvá”, így a visszatérő áramhányad értéke egyre növekedett. Az így kapott adatpontokhoz ábrán feltüntetett exponenciális függvényt illesztettem, így határoztam meg az egyes ioncsatornák esetén a τ_{rec} értékeket.



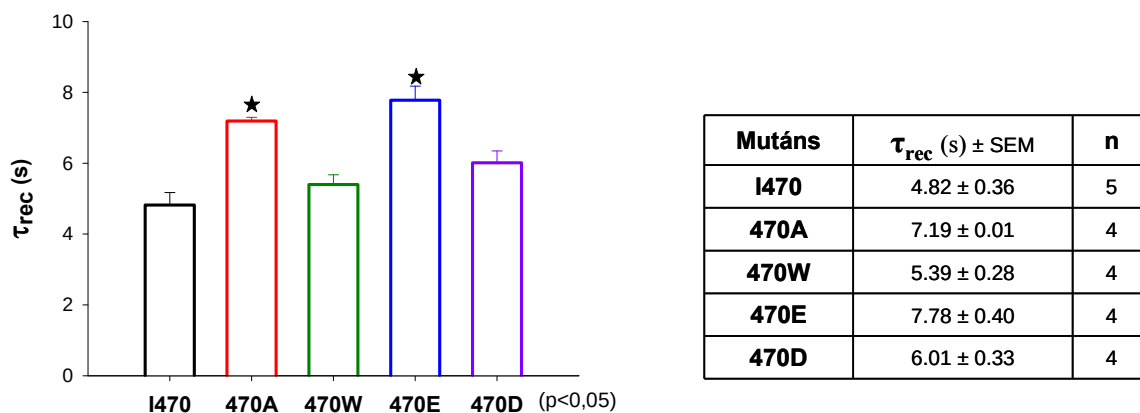
15. ábra: Az inaktivációból való visszatérés időállandójának meghatározására szánt protokoll részlete, alatta az adott impulzuspár hatására kialakuló áramgörbéket reprezentáló sémával (A panel), illetve A visszatérő áramhányad ($V\acute{A}$) ábrázolása az impulzusok közti idő (t_{ipi}) függvényében (B panel).

Az A panelen bemutatott protokoll +50 mV-os nagyságú, 1000 ms hosszúságú depolarizáló impulzuspárok sorozatából épült fel. Az egyes impulzuspárok közti idő egységesen 60 s, a tartófeszültség mindvégig -120 mV. A protokollon belül változó egyetlen paraméter az adott impulzuspáron belül az egyes impulzusok között eltelt idő (t_{ipi}) 1,1 s és 50 s közötti tartományban. A P_1 az impulzuspár első, a P_2 annak második impulzusa hatására kialakuló csúcsáramokat jelöli, az SS_1 és SS_2 az adott impulzus során mért egyensúlyi áramra utal. Az A panel alján az adott t_{ipi} esetén visszatérő áramhányad ($V\acute{A}$) számítására használt képlet került feltüntetésre.

A B panelen az adott t_{ipi} értékekhez tartozó visszatérő áramhányad értékeket tüntettem fel a különböző ioncsatornák esetén. Az ioncsatornák elkülönítéséhez használt színkód az eddig alkalmazottal megegyező. Az adatpontok megadásakor az átlagértéket és annak közepes hibáját adtam meg (SEM). A mérési esetszámok (n) lentebb kerülnek közlésre. Az illesztéshez használt függvényben a $I(t)$ a t időpontban visszatért áramhányad, I_{max} az áram értéke, miután az összes csatorna visszatért az inaktivált állapotból, τ_{rec} az az időállandó, ahol a csatornák 1/e-ed része visszatért az inaktivált állapotból a zárt állapotba.

A fentebb bemutatott módon meghatározott pontos τ_{rec} értékeket a 16. ábrán tüntettem

fel adott mérési szám mellett (n). Az elvégzett statisztikai próba a csillaggal jelölt helyen mutatott szignifikáns eltérést az I470 ioncsatorna τ_{inakt} értékéhez képest.

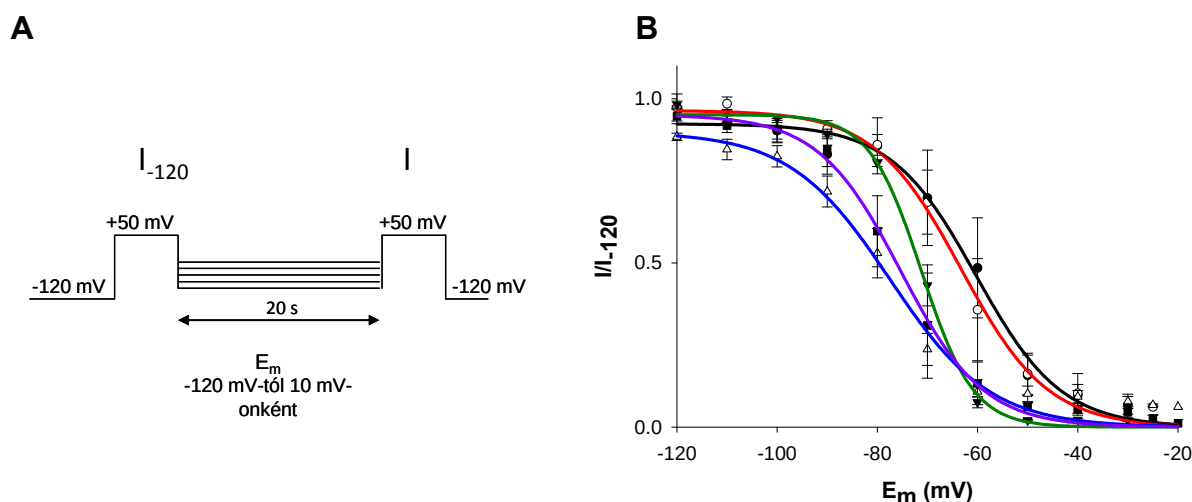


16. ábra: Az ioncsatornák inaktivációból történő visszatérését jellemző időállandóit (τ_{rec}) bemutató oszlopdiagram, illetve az adott paraméterek pontos értékeit bemutató táblázat.

A mérési adatok közlésénél mindegyik esetben az átlagértéket és annak közepes hibáját (SEM) adtam meg adott mérési szám (n) mellett. Az elvégzett statisztikai próba a csillaggal jelölt esetekben mutatott szignifikáns eltérést a kontroll I470 ioncsatornához képest.

VI/5. Az inaktiváció feszültségfüggése

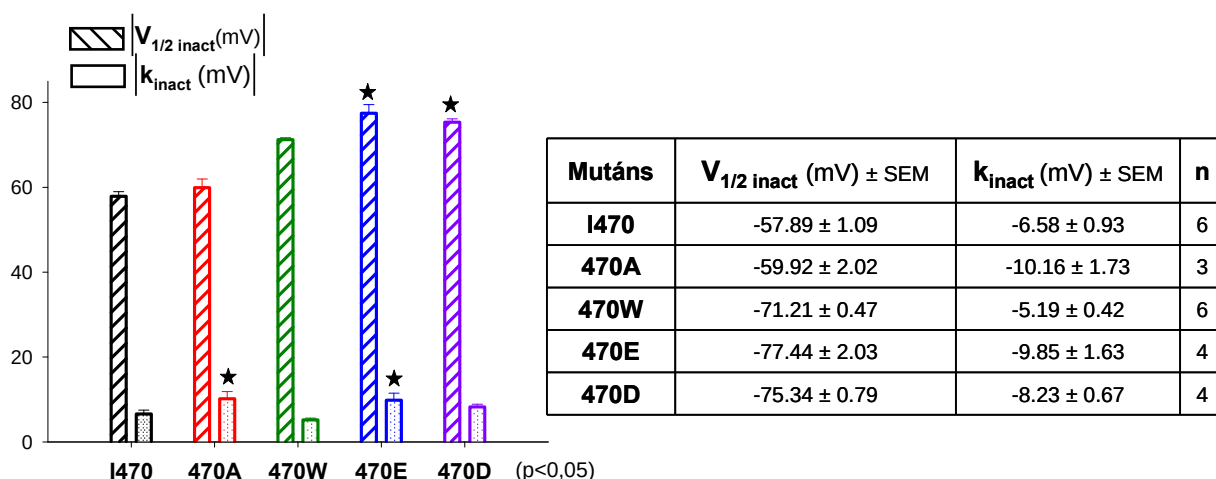
Az inaktiváció feszültségfüggésének vizsgálata során azt határoztam meg, hogy egy adott membránpotenciálon tartva a csatornák mekkora hányada kerül az inaktivált állapotba a -120 mV-on tapasztalhatóhoz képest. A kísérletek során alkalmazott protokoll felépítése a 17. ábra A panelén került sematikus bemutatásra. -120 mV-os tartófeszültségről kiindulva egy +50 mV-os depolarizáló impulzus után 20 s-ig -120 mV-tól +20 mV-ig változtattam a tartófeszültség értékét 10 mV-os lépésközökkel. Ezt követte a második +50 mV-os depolarizáló impulzus. Az impulzuspárok közti tartófeszültség mindvégig -120 mV, a köztük eltelt idő pedig 45 s volt.



17. ábra: Az inaktiváció feszültségfüggése során használt protokoll felépítése (**A panel**), illetve a második (**I**) és az első impulzus (**I₁₂₀**) során kapott csúcsáram hányadosának ábrázolása az impulzusok közti tartófeszültség (**E_m**) függvényében (**B panel**).

Az **A** panelen bemutatott impulzuspárokból felépülő protokoll során -120 mV-os tartófeszültségről kiindulva egy +50 mV-os depolarizáló impulzus után 20 s-ig -120 mV-tól +20 mV-ig változtattam a tartófeszültség értékét 10 mV-os lépésközökkel. Ezt követte a második +50 mV-os depolarizáló impulzus. Az aktuális tartófeszültségen (**E_m**) inaktiválódó és ezáltal funkcionálisan nem vezető ioncsatornák miatt a második impulzus során kapott csúcsáram értéke egyre inkább elmarad az első impulzus során tapasztalhatóhoz képest, ahogy a két impulzus közti tartófeszültség egyre pozitívabbá válik. A **B** panelen a második (**I**) és az első csúcsáram (**I₁₂₀**) hányadosát ábrázoltam a két impulzus közti tartófeszültség (**E_m**) függvényében. Az egyes adatpontok feltüntetésekor az átlagértéket és annak közepes hibáját (SEM) adtam meg az egyes ioncsatornák esetén. Az ábrán alkalmazott színek a fentebb alkalmazottal megegyezők.

Az eredmények kiértékeléséhez az első és a második impulzus során kapott csúcsáramokat vettem alapul. Ezt követően a második (**I**) és az első csúcsáram (**I₁₂₀**) hányadosát ábrázolva a két impulzus közti tartófeszültség (**E_m**) függvényében, így jutottam el a 17. ábra **B** panelén bemutatott ábrához. Az ábrán az átlagértékeket, illetve azoknak közepes hibáit (SEM) tüntettem fel az egyes ioncsatornák esetén. A mérési esetszámok (**n**) a későbbiekben kerülnek közlésre.



18. ábra: Az ioncsatornák félinaktivációs feszültségét ($V_{1/2 \text{ inact}}$), illetve az inaktiváció feszültségfüggésének meredekségét (k_{inact}) bemutató oszlopdiagram, valamint az adott paraméterek pontos értékeit bemutató táblázat.

A mérési adatok közlésénél mindegyik esetben az átlagértéket és annak közepes hibáját (SEM) adtam meg adott mérési szám (n) mellett. Az elvégzett statisztikai próba a csillaggal jelölt esetekben mutatott szignifikáns eltérést a kontroll I470 ioncsatornához képest.

A fentebb bemutatott módon meghatározott pontos $V_{1/2 \text{ inact}}$ és (k_{inact}) értékeket a 18. ábrán tüntettem fel adott mérési szám mellett (n). Az elvégzett statisztikai próba a csillaggal jelölt helyen mutatott szignifikáns eltérést az I470 ioncsatorna megfelelő értékeihez képest.

VII. MEGBESZÉLÉS

Összefoglalásképp elmondhatjuk, hogy mind az aktivációs kapuzást jellemző paraméterek, mind pedig az inaktivációs kapuzást jellemző paraméterek estén kaptam statisztikailag szignifikáns eltéréseket a kontroll I470 ioncsatorna megfelelő biofizikai jellemzőihez képest. A kapott eltérések közül viszont kiemelném az alanint taraltalmazó 470A mutáns ioncsatorna kontrollhoz képest közel 4,5-szer lassabb inaktivációs kinetikáját, ugyanis véleményünk szerint ez az eltérés a statisztikai szignifikancián túl valódi biológiai jelentőséggel is bírhat (13. ábra). A különbség jelentőségét tovább emeli, hogy a 470A ioncsatorna az I470 ioncsatornához hasonlóan a transzfekció során homotetramerként expresszáldott, így ebben az esetben a kapott eredmény értékelésekor nem kell számolnunk a különböző alegységek C-típusú inaktivációra gyakorolt egyéb heterogén hatásaival, szemben a másik három mutáns ioncsatornával.

A 470A ioncsatorna inaktivációjának kialakulásában bekövetkező jelentős lassulás egyrészt azt mutatja, hogy a pórusbeli mutáció leginkább lokális hatással bír és valószínűleg közvetlenül képes a két kapu közti csatolási mechanizmust, az S6-os szegmentumok forgását befolyásolni. Ezzel szemben a pórusbeli mutáció feszültségszenzor felé irányuló retrográd hatása nem jelentős. Az a tény, hogy méretét tekintve a legkisebb alanin lassítja leginkább az inaktiváció kialakulást arra utal, hogy a pórusbeli aminosavaknak, a várttal ellentétben, nem csak a mérete, hanem az aminosavak fizikokémiai tulajdonságai (méret, töltés és hidrofobicitás) együttesen képesek az inaktivációt befolyásolni. Ez arra utalhat, hogy a pórusbeli aminosavaknak az inaktivációra kifejtett hatása komplex. Az S6-os szegmentumok inaktiváció során bekövetkező forgásának direkt befolyásolása mellett a 470-es pozícióban található aminosavak közelségük révén hatással lehetnek a szelektivitási szűrőben található kálium kötőhelyek betöltöttségére is. A legkisebb méretű, semleges töltésű alanin esetén valószínűleg azonos kálium koncentráció mellett jobban lehetőség nyílik a káliumionok kötőhelyre történő bekötődésére, ami tovább lassíthatja a C-típusú inaktiváció kialakulásához vezető molekuláris átrendeződéseket.

A kísérletek eredményei közelebb vihetnek minket a humán *Shaker* típusú kálium csatornák C-típusú inaktivációs mechanizmusának pontosabb megismeréséhez, ezzel pedig számos betegség esetén a jelenleginél szelektívebb, ezáltal a betegek számára kedvezőtlen mellékhatásoktól mentes gyógyszerek kifejlesztéséhez.

VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Szöllősi János egyetemi tanárnak, a DE-ÁOK Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet igazgatójának, amiért lehetővé tette számomra, hogy az intézetben tudományos diákköri munkát végezhsek.

Szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Prof. Dr. Panyi Györgynek, a DE-ÁOK Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet tanszékvezető egyetemi tanárának, amiért bevezetett a tudományos kutatómunkába, felkeltette az érdeklődésem a téma iránt és lehetővé tette, hogy a munkacsoportjában a tudományos diákköri munka keretében kutatómunkát végezzek. Munkámat napi szinten irányította és felügyelte, példátlan szakmai tudásával mindig a rendelkezésemre állt.

Köszönettel tartozom másik témavezetőmnek, Dr. Szántó G. Tibor egyetemi tanársegédnek, aki mindennapos tanításaival bevezetett az elektrofiziológiai kísérletek tervezésének, kivitelezésének, az eredmények értelmezésének és azok tudományos színvonalú interpretálásának folyamatába biztosítva számomra a folyamatos szakmai fejlődés lehetőségét és mindvégig maximálisan támogatott. Külön köszönettel tartozom a pályamunka elkészítése során adott iránymutató tanácsaiért.

Köszönettel tartozom az elektrofiziológiai munkacsoportban dolgozó Dr. Krasznai Zoltánnak, Dr. Varga Zoltánnak, Dr. Hajdú Péternek, Dr. Papp Ferencnek, Dr. Telek Andreának, Dr. Tóth Ágnesnek, Nagy Cecíliának, Bartók Ádámnak, Matta-Domján Brigittának, Mészáros Beátának, akik minden kérdésem kapcsán készségesen segítettek, és akikkel mindig jó hangulatban zajlott a munka. Kiemelt köszönettel tartozom Dr. Szilágyi Orsolyának a pályamunkában bemutatott mutáns *Shaker* ioncsatorna konstruktok előállításáért.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani a DE-ÁOK Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet valamennyi dolgozójának, akik munkám során segítettek.



Nemzeti
Kiválóság
Program

TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001

„A kutatás a TÁMOP 4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 azonosító számú „Nemzeti Kiválóság Program – hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program” című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.”



SZÉCHENYI TERV



A projekt az Európai Unió támogatásával,
az Európai Szociális Alap
társfinanszírozásával valósul meg.

Zákány Florina

Pályázati azonosító: A2-ELMH-13-0006

IX. IRODALOMJEGYZÉK

1. Aggarwal, S. K., MacKinnon, R. (1996) Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K⁺ channel. *Neuron* 16, 1169–1177.
2. Baukrowitz, T., Yellen, G. (1995) Modulation of K⁺ current by frequency and external [K⁺] a tale of two inactivation mechanisms. *Neuron* 15, 951–960.
3. Baukrowitz, T., Yellen, G. (1996) Use-dependent blockers and exit rate of the last ion from the multi-ion pore of a K⁺ channel. *Science* 271, 653–656.
4. Bezanilla, F. (2000) The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiological Reviews* 80, 555–592.
5. Cahalan, M.D., Chandy, K.G. (1997) Ion channels in the immune system as targets for immunosuppression. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 749–756.
6. Chen, X., Wang, Q., Ni, F., Ma, J. (2010) Structure of the full-length Shaker potassium channel Kv1.2 by normal-mode-based X-ray crystallographic refinement. *PNAS* 107, 11352–11357.
7. Del Camino, D., Yellen, G. (2001) The steric closure at the intracellular activation gate of a voltage gated potassium channel. *Neuron* 32, 649–656.
8. Deutsch, C., Lee, S.C. (1989) Modulation of K⁺ currents in human lymphocytes by pH. *Journal of Physiology (London)* 413, 399–413.
9. Feske, S., Skolnik, E. Y., Prakriya, M. (2012) Ion channels and transporters in lymphocyte function and immunity. *Nature* 12, 532–547.
10. Grissmer, S., Cahalan, M.D. (1989) Divalent ion trapping inside potassium channels of human T lymphocytes. *J. of Gen. Physiol.* 93, 609–630.

11. Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391, 85-100.
12. Heginbotham, L., Lu, Z., Abrasom, T., MacKinnon, R. (1994) Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys. J.* 66, 1061-1067.
13. Hoshi, T., Zagotta, W.N., Aldrich, R.W. (1990) Biophysical and molecular mechanisms of *Shaker* potassium channel inactivation. *Science* 250, 533-538.
14. Jiang, Y., Ruta, V., Chen, J., Lee, A., MacKinnon, R. (2003) The principle of gating charge movement in a voltage dependent K⁺ channel. *Nature* 423, 42-48.
15. Leonard, R. J., Garcia, M. L., Slaughter, R. S. és Reuben, J. P. (1992) Selective blockers of voltage-gated K⁺ channels depolarize human T lymphocytes: mechanism of the antiproliferative effect of charybdotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 89(21), 10094-10098.
16. Lopez-Barneo, J., Hoshi, T., Heinemann, S.H., Aldrich, R.W. (1993) Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of *Shaker* potassium channels. *Receptors and Channels* 1, 61-71.
17. MacKinnon, R. (1991) Determination of the subunit stoichiometry of a voltage activated potassium channel. *Nature* 350, 232-235.
18. Matteson, D. R., Deutsch, C. (1984) K⁺ channels in T lymphocytes: a patch clamp study using monoclonal antibody adhesion. *Nature* 307, 468-471.
19. Neyton, J., Miller, C. (1988 a) Discrete Ba²⁺ block as a probe of ion occupancy and pore structure in the high conductance Ca²⁺ activated K⁺ channel. *J. Gen. Physiol.* 92, 569-586.
20. Neyton, J., Miller, C. (1988 b) Potassium blocks barium permeation through a calcium-activated potassium channel. *J. Gen. Physiol.* 92, 549-567.

21. Panyi, G., Deutsch, C., (2006 b) Cross Talk between activation and slow inactivation gates of *Shaker* potassium channels. J. Gen. Physiol. 128, 547-559.
22. Panyi, G., Deutsch, C. (1996) Assembly and suppression of endogenous Kv1.3 channels in human T cells. J. Gen. Physiol. 107, 409-420.
23. Panyi, G., Possani, L.D., Rodriguez de la Vega, R.C., Gaspar, R., Varga, Z. (2006 a) K⁺ channel blockers: novel tools to inhibit T cell activation leading to specific immunosuppression. Curr. Pharm. Des. 12, 2199-2220.
24. Panyi, G., Sheng, Z.-F., Tu, L.-W., Deutsch, C. (1995) C-type inactivation of a voltage-gated K⁺ channel occurs by a cooperative mechanism. Biophys. J. 69, 896-903.
25. Panyi, G., Varga, Z., Gaspar, R. (2004) Ion channels and lymphocyte activation. Immunol. Lett. 92, 55-66.
26. Perez-Cornejo, P. (1999) H⁺ modulation of C-type inactivation of *Shaker* K⁺ channels. Pflugers Arch. 437, 865-870.
27. Seoh, S. A., Sigg, D., Bezanilla, F. (1996) Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel. Neuron 16, 1159–1167.
28. Starkus, J.G., Kuschel, L. Rayner, M.D., Heinemann, S.H. (1997) Ion conduction through C-type inactivated *Shaker* channels. J. Gen. Physiol. 110, 539-550.
29. Yellen, G., Sodickson, D., Chen, T.-Y., Jurman, M.E. (1994) An engineered cysteine in the external mouth of a K⁺ channel allows inactivation to be modulated by metal binding. Biophys. J. 66, 1068-1075.
30. Zhou, Y., Morais Cabral J.H., Kaufman, A., MacKinnon, R., (2001) Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel- Fab complex at 2.0 Å resolution. Nature 414, 43-48.

X. FÜGGELÉK

Az alábbiakban a TDK pályamunka alapjául szolgáló, általam végzett kísérletes munka tételes felsorolása következik. Az alábbi feladatokat önállóan, témavezetőim lektorálása mellett végeztem:

- A kísérleteim során használt tsA-201 sejtek gondozása.
- A sejtek transzfekciója.
- A patch-clamp mérések során felhasznált oldatok elkészítése.
- A méréshez használt pipetták húzása, hővel történő polírozása.
- A pályamunkában bemutatott kontroll I470 ioncsatorna, illetve a mutáns ioncsatornák kapuzását jellemző biofizikai paraméterek (aktivációs- és inaktivációs időállandó; konduktancia- és inaktiváció feszültségfüggése, inaktivációból való visszatérés időállandója) meghatározását célzó patch-clamp mérések kivitelezése.
- A fentebb említett mérések során nyert adatok kiértékelése, a kapott paraméterek meghatározása, az eredmények értelmezése.
- Ábrák elkészítése.
- TDK pályamunka elkészítése.

Debrecen, 2014. június 04.

Zákány Florina

DE-ÁOK VI. évfolyam/ 8-as csoport

DE-ÁOK Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet