

TDK PÁLYAMUNKA

Mutáns *Shaker* kálium csatornák biofizikai jellemzőinek  
tanulmányozása



Zákány Florina

**DEBRECENI EGYETEM ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM ÁLTALÁNOS  
ORVOSTUDOMÁNYI KAR IV. ÉVFOLYAM, 8-AS CSOPORT**

**DEBRECENI EGYETEM ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM BIOFIZIKAI  
ÉS SEJTBiolóGIAI INTÉZET**

**TÉMAVEZETŐK:** Prof. Dr. Panyi György  
Tanszékvezető egyetemi tanár

Dr. Szántó G. Tibor  
Egyetemi tanársegéd

# TARTALOMJEGYZÉK

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....                                                         | 1  |
| II. ABSZTRAKT.....                                                                   | 2  |
| III. BEVEZETÉS.....                                                                  | 3  |
| III/ 1. Általános bevezetés.....                                                     | 3  |
| III/ 2. A <i>Shaker</i> típusú kálium csatornák.....                                 | 3  |
| III/ 3. A <i>Shaker</i> csatorna szerkezete.....                                     | 4  |
| III/ 4. Az inaktiváció lehetséges mechanizmusai.....                                 | 6  |
| III/ 5. Molekuláris átrendeződések a <i>Shaker</i> csatorna inaktivációja során..... | 9  |
| IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....                                                        | 11 |
| IV/ 1. A T449A/ A471C és T449A/ L472C mutáns csatornák felépítése.....               | 11 |
| IV/ 2. A tsA-201 sejtek tenyésztése és transzfekciója.....                           | 11 |
| IV/ 3. Fluoreszcens mikroszkópia.....                                                | 12 |
| IV/ 4. Elektrofiziológia.....                                                        | 12 |
| IV/ 5. Oldatok, perfúziós rendszer.....                                              | 13 |
| IV/ 6. Adatok kiértékelése.....                                                      | 13 |
| V. EREDMÉNYEK.....                                                                   | 14 |
| V/ 1. A konduktancia feszültségfüggésének vizsgálata.....                            | 14 |
| V/ 2. Az áram aktivációs időállandójának meghatározása.....                          | 17 |
| V/ 3. Az áram inaktivációs időállandójának meghatározása.....                        | 18 |
| V/ 4. Az inaktivációból való visszatérés időállandójának meghatározása.....          | 19 |
| VI. MEGBESZÉLÉS.....                                                                 | 23 |
| VI/ 1. A vizsgált biofizikai jellemzők összegzése.....                               | 23 |
| VI/ 2. A vizsgált biofizikai jellemzők további alkalmazása.....                      | 24 |
| VII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....                                                        | 26 |
| VIII. IRODALOMJEGYZÉK.....                                                           | 27 |
| IX. FÜGGELÉK.....                                                                    | 32 |

# I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

|                            |                                                                     |
|----------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| EGFP                       | zöld fluoreszcens fehérje egyik származéka                          |
| GYGD szekvencia            | glicin-tirozin-glicin-aszpartát aminosavakat tartalmazó szekvencia  |
| k                          | az aktiváció feszültségfüggésének meredeksége                       |
| MTS reagens                | metántioszulfonát reagens                                           |
| n                          | mérések száma                                                       |
| SEM                        | az átlagérték közepes hibája                                        |
| <i>Shaker</i> -IR csatorna | N-típusú inaktivációtól mentes <i>Shaker</i> csatorna               |
| $\tau_{akt}$               | aktivációs időállandó                                               |
| TEA                        | tetraetil-ammónium                                                  |
| $\tau_{inakt}$             | inaktivációs időállandó                                             |
| $\tau_{rec}$               | 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  |

## II. ABSZTRAKT

A *Shaker* családba tartozó káliumcsatornákra jellemző, hogy a csatornák aktivációs és a C-típusú inaktivációért felelős inaktivációs kapui csatoltak. Feltételezésünk szerint ebben döntő szerepe lehet a két kapu kialakításában részt vevő, a pórust közvetlenül határoló S6 transzmembrán helikális szegmentumok mozgásának.

Az S6 hélixek mozgása olyan mutáns csatornák felhasználásával vizsgálhatók, melyek az S6 szegmentumok megfelelő pozícióiban ciszteinek tartalmaznak, amely ciszteinek metántioszulfonát reagensekkel való módosíthatósága a csatorna különböző állapotaiban eltérő. A célom a *Shaker* T449A/ A471C és a T449A/ L472C csatornák azon alapvető biofizikai paramétereinek a meghatározása volt, amelyek alapján az állapot-függő cisztein modifikációs kísérletek protokolljai pontosan megtervezhetők. A tsA-201 sejtekbe transzfektált *Shaker*-IR csatornák biofizikai sajátosságait a patch clamp technika inside-out konfigurációjában tanulmányoztam.

A T449A/ A471C csatorna nyitási küszöbe  $\sim -40$  mV, a maximális konduktancia elérése pedig  $\sim +50$  mV-nál következik be. Az 50 %-os nyitási valószínűséghez tartozó feszültség értéke  $V_{1/2} = 9 \pm 4$  mV ( $n=5$ ). Az inaktivációs időállandó  $19,8 \pm 3,6$  ms-nak adódott ( $n=5$ ), míg az inaktivációból való visszatérés időállandója  $9,20 \pm 0,02$  s ( $n=4$ ). Az aktivációs időállandó  $1,15 \pm 0,34$  ms ( $n=6$ ). A T449A/ L472C csatorna karakterizálása során kapott eredmények alapján a csatorna kapuzását jellemző  $V_{1/2}$  érték  $-32 \pm 11$  mV ( $n=7$ ), a csatorna aktivációs küszöbe  $\sim -50$  mV, míg a maximális konduktancia elérése már  $\sim +10$  mV-nál bekövetkezik. Az áram inaktivációs időállandója  $34,8 \pm 3,1$  ms ( $n=5$ ), a csatornák inaktivációból való visszatérését jellemző időállandója  $5,20 \pm 0,06$  s ( $n=4$ ). Az aktivációs időállandó  $0,63 \pm 0,08$  ms ( $n=6$ ).

A célkitűzésemnek megfelelően a csatorna kapuzását jellemző paramétereket figyelembe vettük a folyamatban levő cisztein modifikációs kísérletek során alkalmazott protokollok tervezésénél.

### III. BEVEZETÉS

#### III/ 1. Általános bevezetés

Az ioncsatornák a sejtmembránban található speciális felépítésű transzmembrán fehérjék, melyek a biológiai membránokon egy hidrofil 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. A speciális felépítésen túl az ioncsatornákra jellemző a szelektív permeabilitás, ami értelmében 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 közé sorolhatók.

#### III/ 2. A *Shaker* típusú kálium csatornák

A *Shaker* csatorna a *Drosophila melanogaster* egyik tipikus feszültség kapuzott kálium csatornája, ami az úgynevezett tranziens A-típusú  $K^+$  áram szabályozásában vesz részt a kifejlett rovar és az azt megelőző fejlődési alakok harántcsíkolt izom, illetve idegszövetében. Így a csatornának bizonyítottan szerepe van többek között a lárvák neuromuszkuláris junkciójában a preszinaptikus neurotranszmitter felszabadulás terminálásában (Wang és mtsai, 1996) és a perisztaltikus mozgás kontrollálásában (Wang és mtsai, 1997). A csatorna pórusrégióját, illetve a kiegészítő alegységeket kódoló *Shaker* (Sh), *Hyperkinetic* (Hk), és *ether a go-go* (eag) gének kódolják. A csatorna a nevét onnan kapta, hogy ezen génekben számos különböző mutációt írtak le, aminek eredményeképpen a rovarok éter anesztéziája során végtag remegés (leg shaking) jelentkezik. Továbbá az ilyen rovarokat az átlagoshoz képest fokozott metabolizmus és rövidebb élettartam jellemzi (Trout és mtsai, 1970), illetve fokozott érzékenységet mutatnak a reaktív oxigén gyökökkel szemben (Wang és mtsai, 2000).

A humán szervezetben előforduló feszültségkapuzott kálium csatornákon belül elkülöníthető egy, a *Shaker* csatornával nagymértékű szekvencia homológiát mutató, ezáltal számos strukturális és funkcionális hasonlósággal bíró csoport, a *Shaker* típusú kálium

csatornák családja. Ezen csoport tagjai ingerelhető és nem ingerelhető sejtekben egyaránt kifejeződnek, és számos élettani folyamat szabályozásában kulcsfontosságú szerepet játszanak. A csoport kiemelkedő tagja a Kv1.3 csatorna, ami megtalálható többek között a B- és T-limfocitákban, a progenitor B-sejtekben, makrofágokban, a hasnyálmirigy Langerhans sejtjeiben, neuronokban, oligodendrocitákban, mikrogliaokban, oszteoklasztokban, fibroblasztokban és vérlemezkékben is (Gutman és mtsai, 2005). A Kv1.3 csatorna a limfociták domináns kálium csatornája, melynek fiziológiai funkciója a membránpotenciál szabályozása mellett a sejtek  $\text{Ca}^{2+}$  függő jelátviteli folyamatainak szabályozása (Panyi és mtsai, 2004 a; 2004 b). Ezáltal a csatornának kiemelkedő szerepe van a T-sejtek antigénekkal és mitogénekkal kiváltott aktivációjának és proliferációjának szabályozásában is (Matteson és mtsai, 1984). Bizonyos kórképek hátterében éppen ezen sejtek kóros aktivációja áll, ennek eredményeképpen a Kv1.3 csatornát szelektíven gátló, nagy affinitású peptid toxinok és egyéb úgynevezett kis-molekula Kv1.3 inhibitorok kifejlesztése számos kutatás célkitűzése. Az ilyen molekulák terápiás célú felhasználása ugyanis forradalmasítaná bizonyos autoimmun betegségek, például a rheumatoid arthritis és a sclerosis multiplex kezelését egy hatékony, mellékhatásoktól mentes, modern terápiát biztosítva (Beeton és mtsai, 2005; Panyi és mtsai 2006 a).

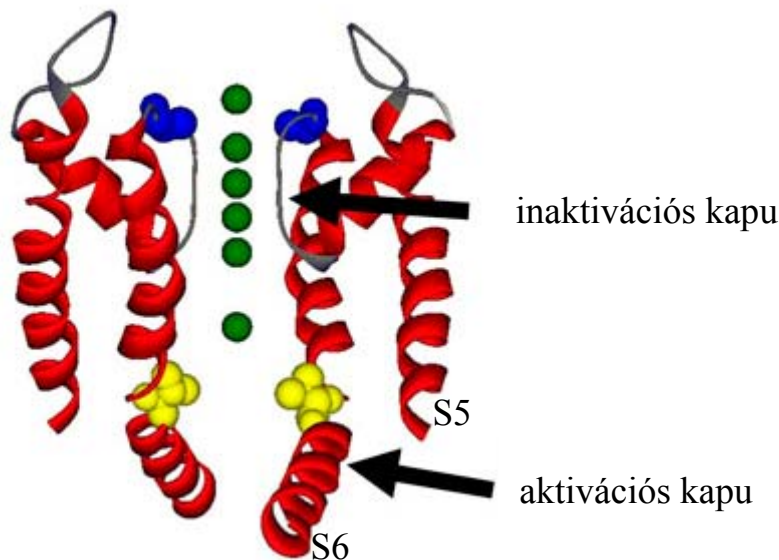
### III/ 3. A *Shaker* csatorna szerkezete

A feszültség kapuzott kálium csatornák funkciójával és felépítésével kapcsolatos jelenlegi ismereteink döntő része a *Streptomyces lividans* prokarióta baktérium KcsA kálium csatornájának, a *Drosophila melanogaster Shaker* csatornájának, illetve a humán szervezetben előforduló *Shaker* típusú kálium csatornák tanulmányozásából származnak. Ezek az ioncsatornák annak ellenére, hogy más és más szervezetekben vannak jelen, számos közös tulajdonsággal rendelkeznek.

A *Shaker* csatorna, a *Shaker* családba sorolható kálium csatornákhöz hasonlóan, egy négy alegységből felépülő homotetramer csatorna, amelyben az egyes alegységek megközelítőleg szimmetrikusan helyezkednek el az általuk együttesen létrehozott, centrális elhelyezkedésű pórus körül. Az egyes alegységeket nem-kovalens kölcsönhatások tartják össze (MacKinnon, 1991). Mindegyik alegységet 6 transzmembrán  $\alpha$ -helikális szegmentum és az ezeket összekötő intra- és extracelluláris hurkok építik fel.

A csatorna pórusát a 6. transzmembrán helikális szegmentumuk (S6) egyes részei, illetve az S5 és S6 szegmentumokat összekötő hurkok hozzák létre, biztosítva a kálium ionok

membránon keresztüli átjutását (1. ábra). A csatorna ugyanezen régiója felelős számos fentebb említett peptid típusú és kis-molekula gátlószer kötődéséért is, amely kísérletek számos indirekt információt nyújtottak a pórusrégió és a szelektivitási filter struktúrájáról. Ezen következtetéseket röntgenkristallográfiás kísérletekkel igazolták mind a KcsA csatorna (Doyle és mtsai, 1998), mind pedig a *Shaker* családba sorolható Kv1.2 csatorna esetén (Long és mtsai, 2005).



**1. ábra:** A *Shaker* családba tartozó Kv1.2 csatorna két egymással szemben fekvő, pórust közvetlenül határoló szegmentuma Panyi és mtsai szerint (Panyi és mtsai, 2006 b).

Az ábra a Long és mtsai által röntgenkristallográfiás módszerekkel meghatározott strukturális eredményeken alapul (Long és mtsai, 2005). Az ábrán az egyes alegységek 322-450-es pozíciójú aminosavai kerültek feltüntetésre (a citoszolikus oldal felől kiindulva rendre: S6-os szegmentum, S5-S6 hurok, S5-ös szegmentum). A jobb szemléltetés érdekében késsel a *Shaker* csatorna 449-es pozíciójával homológ aminosav van ábrázolva, míg a sárga szín a *Shaker* csatorna 474-es pozíciójával homológ aminosavat jelöli. A csatorna pórusában a K<sup>+</sup> ionokat zöld színű gömbök reprezentálják. Az aktivációs kapu a pórus citoplazmatikus szájadékának megfelelően helyezkedik el, felépítésében mind a négy alegység S6 -os szegmentumának C-terminális régiójában elhelyezkedő, 475-478-as pozíciójú aminosavak vesznek részt. A C-típusú inaktivációért felelős inaktivációs kapu a pórus extracelluláris régiójában helyezkedik el.

A csatorna pórusrégiója tartalmazza az egyéb predomináns kationokkal (pl. Na<sup>+</sup>) szembeni K<sup>+</sup> szelektivitást biztosító, a különböző eredetű kálium csatornáknál 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 tanulása 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 jellegzetes, 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 6-46-os pozícióban található aminosavak építik fel. A C-típusú inaktivációért felelős inaktivációs kapu pedig a pórus extracelluláris szájadékánál található.

A *Shaker* típusú kálium csatornák feszültségkapuzott kálium csatornák, ennek megfelelően a sejtek membránpotenciáljának megváltozása, nevezetesen depolarizációja jelenti azt a szignált, melynek hatására a csatornák aktiválódnak. A membránpotenciál változásainak érzékeléséért az úgynevezett feszültségszenzor a felelős, amelyet a nettó negatív töltést hordozó S3 hélixek és a többszörös pozitív töltéseket hordozó S4 hélixek közösen alkotnak (Jiang és mtsai, 2003). Kellő mértékű membrán depolarizáció hatására a feszültségszenzor elmozdulása az aktivációs kapu megnyílásához vezet, ez az alapja a csatornák membránpotenciál függő aktivációjának (Bezanilla, 2000).

### III/ 4. Az inaktiváció lehetséges mechanizmusai

Negatív tartófeszültségről történő fenntartott depolarizáció során a csatornák az aktivációt követően számos különböző, összefoglalóan inaktivációnak nevezett mechanizmus révén egy stabil strukturális állapotba kerülnek. Ezt az állapotot nevezzük inaktivált állapotnak. Az inaktivált állapotban levő csatorna funkcionálisan nem vezetőképes, így az impulzus során az áramgörbén az inaktiváció kinetikájától függő áramcsökkenés tapasztalható. Az inaktivált állapotban levő csatornára továbbá az is jellemző, hogy a depolarizációt követően meghatározott ideig, kellően negatív membránpotenciál jelenléte szükséges ahhoz, hogy egy következő depolarizáló impulzus hatására a csatornák újra a funkcionálisan vezető, nyitott állapotba kerülhessenek. Ezek alapján belátható, hogy az inaktiváció folyamatának

kiemelkedő szerepe van egy adott ingerre kialakuló kálium áram megváltoztatása révén, számos jelátviteli folyamat finomszabályozásában, így például a neuronok ingerületátvitelének szabályozásában is. A különböző típusú feszültség kapuzott kálium csatornák esetén az áram inaktivációs időállandói, illetve a csatornák inaktivációból való visszatérésének időállandói akár nagyságrendekkel is különbözhetnek, ami jól jelzi, hogy az inaktiváció folyamata számos különböző mechanizmus révén következhet be (Kurata és mtsai, 2006).

A *Shaker* csatorna, a két különböző inaktivációs kapujának megfelelően, alapvetően két különböző mechanizmussal inaktiválódhat. Az N-típusú inaktiváció folyamatában a csatorna alegységeinek N-terminális részét képező inaktivációs labdák játsszák a kulcsszerepet, amely egy kinetikailag igen gyors inaktivációt tesz lehetővé (Hoshi és mtsai, 1990). A folyamatban az inaktivációs labdák szerepét az teszi egyértelművé, hogy ezen peptidszakaszok enzimatisztas eltávolításával az N-típusú inaktiváció folyamata meggátolható (Zagotta és mtsai, 1990). A *Shaker* csatorna homotetramer felépítése révén mindegyik alegységén rendelkezik egy inaktivációs labdával. Bizonyítottan mindig csak az egyik inaktivációs labda játszik szerepet az inaktivált állapot kialakításában (MacKinnon és mtsai, 1993). Az inaktivációs domének egyesek szerint egymástól függetlenül képesek működni (Gomez-Lagunas és mtsai, 1995), míg mások szerint közöttük bizonyos fokú negatív kooperáció figyelhető meg (Hashimoto és mtsai, 2000). Az N-típusú inaktiváció további jellegzetessége, hogy az intracellulárisan alkalmazott tetraetil-ammónium (TEA) képes gátolni az inaktiváció folyamatát, míg ugyanezen anyag extracelluláris alkalmazása nem befolyásolja annak mechanizmusát (Choi és mtsai, 1991).

A másik mechanizmus, a C-típusú inaktiváció pontos molekuláris mechanizmusa a mai napig sem tisztázott. Jelen ismereteink szerint a C-típusú inaktiváció 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). Talán ezzel is magyarázható,

hogyan az N-típusú inaktiváció kinetikáját tekintve egy gyorsabb, míg a C-típusú inaktiváció kinetikáját tekintve lassabb folyamat.

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 (Baurkowitz 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 Kv1.3 esetén a C-típusú inaktiváció kinetikája lassul, melynek kulcsfontosságú szerepe lehet a limfociták gyulladásos szövetekben történő aktivációjának szabályzásában (Deutsch és mtsai, 1989).

A *Shaker* családba tartozó kálium csatornák egy része mindkét inaktivációs mechanizmus révén inaktiválódhat, míg bizonyos csatornák, így például a Kv1.3, csak a C-típusú inaktivációs mechanizmust mutatják. Az inaktiváció sebességét mindig a gyorsabb mechanizmus sebessége határozza meg, így a csak C-típusú inaktivációt mutató csatornák inaktivációja lényegesen lassabb, mint a mind a két inaktivációt mutató csatornáké.

### III/ 5. Molekuláris átrendeződések a *Shaker* csatorna inaktivációja során

Korábban bizonyítást nyert, hogy a *Shaker* csatorna aktivációs és a C-típusú inaktivációért felelős inaktivációs kapui csatoltak: 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). Feltételezésünk szerint a két kapu közti kapcsoltságban döntő szerepe lehet a két kapu kialakításában részt vevő, a pórust közvetlenül határoló S6-os transzmembrán helikális szegmentumok mozgásának. A kapcsoltság mechanizmusának tisztázása két dolog miatt is fontos lehet. Egyrészt közelebb kerülünk vele a C-típusú inaktiváció során bekövetkező molekuláris változások pontos megismeréséhez, másrészt az inaktivált állapotban levő csatorna szerkezetének megismerésével megnyílik a lehetőség a csatorna ezen állapotára specifikus gyógyszermolekulák tervezésére (Panyi és mtsai, 2007).

Az S6-os szegmentum lehetséges mozgásának tanulmányozására olyan mutáns csatornák használhatók, melyekben az S6-os hélixek aktivációs és inaktivációs kapu között elhelyezkedő adott pozíciójú aminosavait - esetünkben a 471-es pozíciójú alanint, illetve 472-es pozícióban található lizint - ciszteinekre cserélték. Ez azért fontos, mivel az S6-os hélixek feltételezett mozgása esetén változik ezen pozícióknak a pórushoz viszonyított helyzete a csatorna zárt, nyitott és inaktivált állapotának megfelelően. Ezáltal ezen ciszteinek különböző metántioszulfonát reagensekkel (MTS) való módosíthatósága is változik a csatorna kapuzási állapotától függően, ugyanis mindig csak az aktuálisan a pórus felé néző ciszteinek modifikálhatóak. Így amennyiben az aktivációs és a C-típusú inaktivációért felelős inaktivációs kapuk kapcsoltságának hátterében az S6-os szegmentumok mozgása áll, az állapotfüggő cisztein modifikációs kísérletekkel a *Shaker*-típusú kálium csatornák struktúra-funkció kapcsolatának egy minden eddigénél részletesebb megismerése válik lehetővé. Feltételezésünk szerint a 471-es pozícióba épített cisztein, ami a csatorna zárt és nyitott állapotában a pórustól elfelé tekint, az S6-os hélix mozgása esetént az inaktivált állapotban néz a pórus felé, így szelektíven a csatorna inaktivált állapotában modifikálható. Ezzel szemben a 472-es pozícióban levő cisztein, a feltételezett mozgás ellenére, a csatorna egyik kapuzási állapotában sem tekint a pórus felé, így nem modifikálható az általunk alkalmazott MTS reagensekkel. A reagensek kovalens kötés révén, irreverzibilisen kötődnek a ciszteinekhez. A kötődés a csatorna konduktanciájának elvesztését eredményezi, így a sikeres cisztein modifikáció az ionáramok mérésével nyomon követhetővé válik.

Az állapotfüggő cisztein modifikációs kísérletek kivitelezése során fontos a megfelelő tartófeszültségnek, a depolarizáló impulzusok nagyságának, és a köztük eltelt időnek a helyes megválasztása, ami csak a mutáns csatornák biofizikai jellemzőinek pontos ismerete esetén lehetséges. Éppen ezért céлом a két mutáns csatorna azon alapvető biofizikai jellemzőinek a meghatározása volt, melyek alapján a modifikációs kísérletek protokolljai pontosan megtervezhetők. Ennek megfelelően kísérleteim során meghatároztam a konduktancia feszültségfüggését, az áram aktivációs és inaktivációs időállandóját, illetve az inaktivációból való visszatérést jellemző időállandót.

## IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### IV/ 1. A T449A/ A471C és T449A/ L472C mutáns csatornák felépítése

A kísérletekhez használt mutáns csatornák több mutációt tartalmaztak. A mutáns ioncsatornákat kódoló plazmidokat Prof. Carol Deutsch és munkatársai biztosították számunkra (Department of Physiology, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA).

A mutáns csatornák előállításakor a kiindulási alap a *Shaker*-IR kálium csatorna volt, amely jellemzője, hogy a C-típusú inaktiváció mechanizmusának vizsgálata érdekében eltávolításra kerültek belőle a *Shaker* csatornára jellemző N-típusú inaktivációért felelős 6-46-os pozícióban található, „inaktivációs labdát” kódoló aminosavak (Hoshi és mtsai, 1990). Ezt követően a *Shaker*-IR csatornában a 301-es és 308-as pozícióban található endogén ciszteineket szerinekkal helyettesítették, ezáltal elkerülhető ezek esetleges MTS reagensekkel való zavaró modifikációja az állapotfüggő cisztein modifikációs kísérletek során (Holmgren és mtsai 1996). A harmadik mutáció a 449-es pozícióban található treonin alaninra történő cseréje volt, ami jelentősen gyorsítja a C-típusú inaktiváció sebességét (Lopez-Barneo és mtsai, 1993). Az így felépülő *Shaker*-IR konstruktnak a kísérleti stratégia szempontjából fontos 471-es vagy 472-es pozícióban található aminosavakat ciszteinekre cserélték (QuikChange kit; Stratagene), így jöttek létre a kísérleteim során vizsgált T449A/ A471C és T449A/ L472C mutáns csatornák.

### IV/ 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 (Invitrogen). A sejtek tenyésztése 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub>-ot és 95%-os páratartalmat biztosító termosztátban, 25 cm<sup>2</sup>-es tenyésztőflaskában (Corning Flask) 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 (Sarstedt), hígítási sort készítve. Másnap a transzfekcióhoz mindig egy 70 %-os konfluenciájú petrit választottam. A sejteket Ca-foszfát precipitációs módszerrel (Invitrogen) ko-transzfectáltam a T449A/A471C vagy T449A/L472C mutáns ioncsatornát kódoló plazmiddal (10 µg), illetve

EGFP plazmida (1  $\mu$ g). A transzfekciót követően a sejteket 35 mm-es, előzetesen poly-L-ornitinnel (Sigma-Aldrich) kezelt petrikbe helyeztem, melynek alkalmazását az inside-out konfigurációban történő mérés követelt meg. A méréseket 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  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM HEPES; pH= 7,38) mostam, majd végül a sejteket 2 ml külső oldatban inkubáltam.

#### IV/ 3. Fluoreszcens mikroszkópia

Méréskor az EGFP pozitív, transzfektált sejtek egyéni azonosításához Nikon TE2000U invert fluoreszcens mikroszkópot használtam. 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.

#### IV/ 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 cisztein modifikációs kísérletek technikailag megkövetelik az inside-out konfiguráció alkalmazását, ugyanis az adott pozíciójú ciszteinek kizárólag a csatorna citoszolikus oldala felől hozzáférhetők az MTS reagensek számára. A biofizikai karakterizációs méréseket a kapott paraméterek pontos összevethetősége miatt végeztem hasonló konfigurációt alkalmazva. A mérésekhez Axopatch 200A és Multiclamp 700B patch clamp erősítőket 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 alkalmaztam. Az ingerlő feszültség-impulzusokat és az adatgyűjtést IBM kompatibilis személyi számítógép vezérelte Axon Digidata 1200 és 1322A illesztőegységen keresztül a pCLAMP8/10 programcsomag segítségével (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA). Az áramgörbék 4 pólusú Bessel szűrővel szűröztem. A mintavételezés frekvenciája, a Nyquist teória értelmében, a szűrők sárvetési frekvenciájának legalább kétszerese volt. A csúcsáramok értéke általában 400-1200 pA-nek adódott +50 mV-os tesztpotenciál érték

mellett. A továbbiakban azon áramgörbékét értékeltem ki, melyek esetén az egyensúlyi áram nagysága a csúcsáram nagyságának 5%-nál kisebb volt.

A pipettákat boroszilikát üvegkapillárisokból (Warner Instruments) húztam 5 fázisban, majd a pipetták hegyét hő alkalmazásával políroztam. A pipetták ellenállása az alkalmazott oldatok esetén 3-4 M $\Omega$  volt.

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

#### IV/ 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 CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 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 vezetem az inside-out patchre, 0,5 ml/perces ütemben, folyamatos elszívás mellett.

#### IV/ 6. Adatok kiértékelése

Az eredmények kiértékeléséhez a pClamp8/10 program csomagot (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA) használtam. A mérés során kapott áramgörbékét 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.

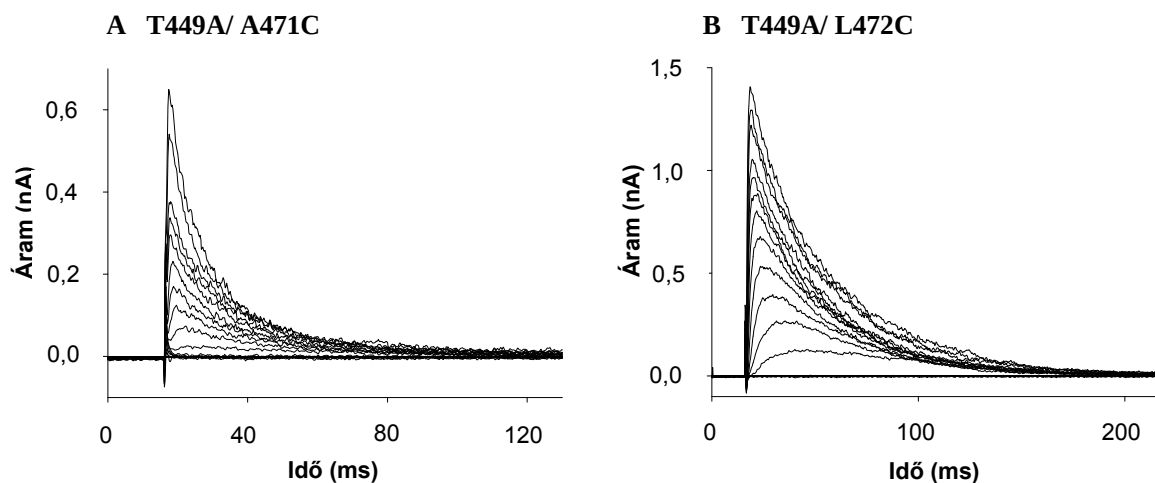
A mérési eredményeket reprezentáló ábrák szerkesztéséhez a SigmaPlot 10.0 programot használtam.

## V. EREDMÉNYEK

### V/ 1. A konduktancia feszültségfüggésének vizsgálata

Kísérleteim során meghatároztam a konduktancia feszültségfüggését, melynek ismerete esszenciális a cisztein modifikációs kísérletek protokolljainak tervezéséhez. Az így meghatározott félaktivációs feszültség értéke ( $V_{1/2}$ ), és az aktiváció feszültségfüggésének meredeksége ( $k$ ) alapján egy ioncsatorna jól azonosíthatóvá válik. Továbbá a csatornák aktivációs küszöbéhez és a maximális konduktancia eléréséhez tartozó feszültségértékek is meghatározhatók ezáltal, így a modifikációs kísérletek során alkalmazandó tartófeszültség és tesztfeszültség értéke pontosan megválaszthatóvá válik.

A konduktancia feszültségfüggésének vizsgálatakor először a csatornák áram-feszültség karakterisztikáját (I-V függvény) határoztam meg. Ennek során 300 ms időtartamú, -80 mV-tól +70 mV-ig terjedő depolarizáló impulzusokat alkalmaztam 10 mV-os lépésközökkel, úgy hogy az egyes impulzusok közti idő mindvégig 60 s volt. A protokollon belül az impulzusok között a tartófeszültség értéke mindvégig -120 mV volt. A mérések során kapott egy-egy reprezentatív áramgörbét a 2. ábrán tüntettem fel.



**2. ábra:** A T449A/ A471C (A panel) és T449A/ L472C (B panel) mutáns ioncsatornák lentebb részletezett protokoll szerinti vizsgálata során kapott áramgörbék.

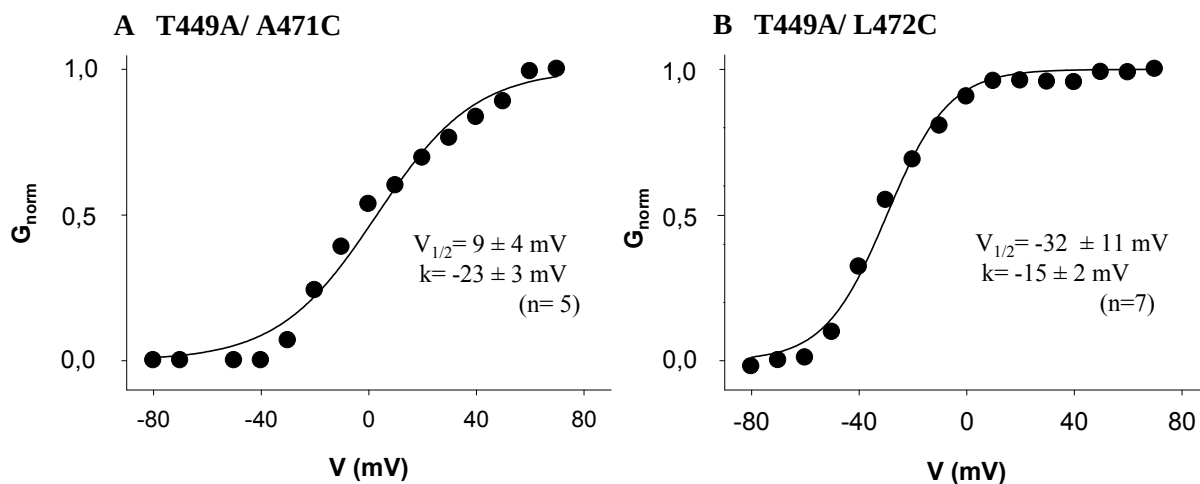
A csatornák áram feszültség karakterisztikájának meghatározásához 300 ms hosszúságú, -80 mV-tól +70 mV-ig terjedő depolarizáló impulzusokat alkalmaztam 10 mV-os lépésközökkel. Az egyes depolarizáló impulzusok közötti tartófeszültség egységesen -120 mV. A depolarizáló impulzusok alatt

kapott áramgörbék egyensúlyi áram kialakulásáig ábrázolt szakaszát a T449A/ A471C csatorna esetén a **A** panel, míg a T449A/ L472C csatorna esetében a **B** panel mutatja.

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:

$$G_{norm} = \frac{1}{1 + e^{-\frac{V - V_{1/2}}{k}}}$$

A 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 illesztést a különböző sejteken felvett  $G_{norm}$ -V görbék esetén külön-külön végeztem el, és ezt követően határoztam meg az átlagértéket és annak közepes hibáját (SEM). Az egyes mutáns ioncsatornák esetén a konduktancia feszültségfüggését a fentebb említett módon meghatározott félaktivációs feszültség ( $V_{1/2}$ ) és meredekség ( $k$ ) jellemzik. Ezeken túl a protokollok tervezése szempontjából fontos információt hordoznak a csatornák aktivációs küszöbéhez és a maximális konduktancia eléréséhez tartozó feszültségértékek is.



**3. ábra:** A normált konduktancia ( $G_{\text{norm}}$ ) tesztpotenciál ( $V$ ) függése a T449A/ A471C csatorna (A panel) és a T449A/ L472C mutáns csatorna (B panel) esetén.

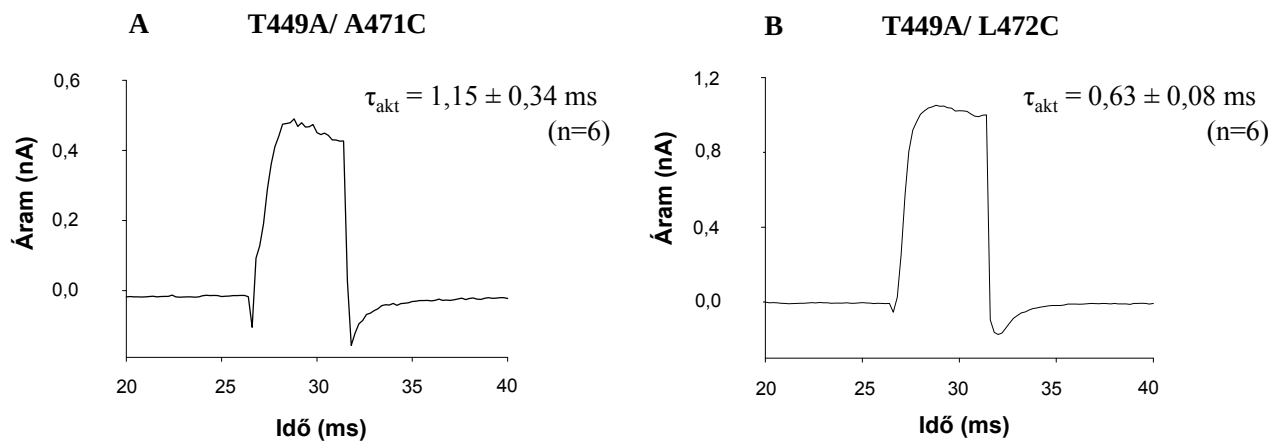
Az ábra az egyes mutáns csatornák esetén egy-egy reprezentatív mérés kapcsán, a különböző tesztpotenciálok mellett meghatározott  $G_{\text{norm}}$  értékeket ábrázolja az alkalmazott tesztpotenciál függvényében, amit az áram- feszültség (I-V) függvényből vezettem le. Az I-V függvényen a mért  $K^+$  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 mindkét esetben Boltzmann-függvényt illesztettem. Az illesztést a különböző sejteken kapott eredményekhez egyenként végeztem el, majd ezt követően határoztam meg a félaktivációs feszültségnek ( $V_{1/2}$ ) és az aktiváció feszültségfüggésének a meredekségének ( $k$ ) az átlagértéket és azok közepes hibáját (SEM) az egyes mutáns csatornák esetében, adott mérési szám ( $n$ ) mellett.

A T449A/ A471C mutáns csatorna esetén a nyitási küszöb  $\sim -40$  mV-nak tekinthető, a maximális konduktancia elérése pedig  $\sim +50$  mV-nál következik be. Az 50%-os nyitási valószínűséghez tartozó félaktivációs feszültség értéke  $V_{1/2} = 9 \pm 4 \text{ mV}$  ( $n=5$ ), az aktiváció feszültségfüggésének a meredeksége  $k = -23 \pm 3 \text{ mV}$  ( $n=5$ ) (3. ábra, A panel).

A T449A/ L472C csatorna karakterizálása során kapott eredmények alapján a csatorna kapuzását jellemző félaktivációs feszültség értéke  $V_{1/2} = -32 \pm 11 \text{ mV}$ -nak adódott ( $n=7$ ), az aktiváció feszültségfüggésének a meredeksége  $k = -15 \pm 2 \text{ mV}$  ( $n=7$ ). A csatornák aktivációja már  $\sim -50$  mV-nál elkezdődik, míg a maximális konduktancia elérése  $\sim +10$  mV-nál következik be (3. ábra, B panel).

## V/ 2. Az áram aktivációs időállandójának meghatározása

A csatornák biofizikai jellemzéséhez a konduktancia feszültségfüggését jellemző paramétereken túl az áram egy adott membránpotenciálon mért időbeli változását jellemző kinetikai paramétereket használtam. Az áram aktivációs időállandójának ( $\tau_{akt}$ ) meghatározásához -120 mV-os tartófeszültségről kiindulva 5 ms időtartamú, +50 mV-os depolarizáló impulzust alkalmaztam. Az aktivációs kinetika jellemzésére a  $\tau_{akt}$ -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  $\tau_{akt}$  az aktivációs időállandó,  $t$  az illesztés kezdetétől számított idő,  $C$  pedig az áram értéke a depolarizáló impulzus kezdetén (4. ábra).



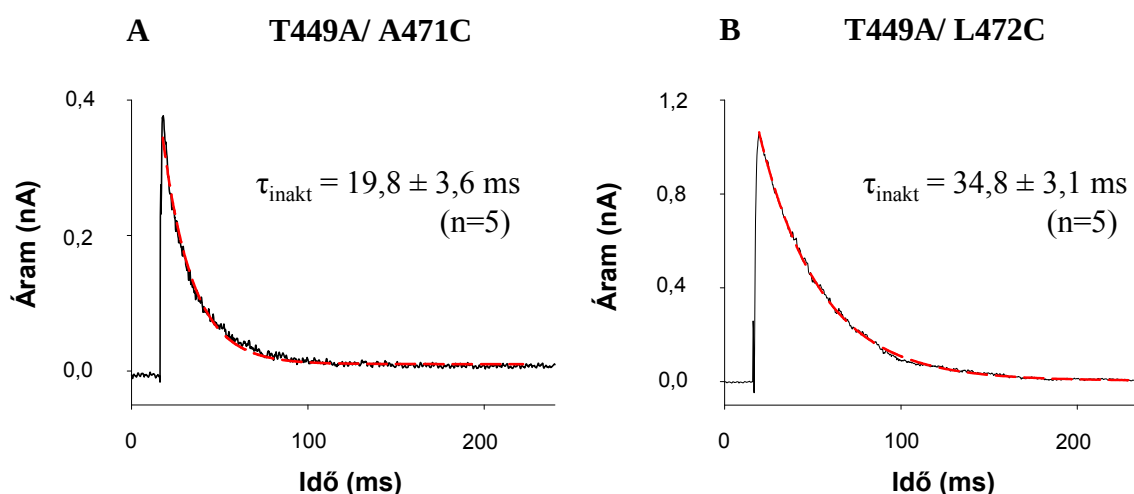
**4. ábra:** 5 ms hosszúságú, +50 mV-os depolarizáló impulzus hatására kapott tipikus áramgörbe a T449A/ A471C csatorna (**A panel**) és a T449A/ L472C mutáns csatorna (**B panel**) esetén.

A görbék felszálló szárára a Hodgkin-Huxley modellnek megfelelő szövegben említett exponenciális függvényt illesztettem, a Marquardt-Levenberg algoritmus alkalmazásával, az áram aktivációs időállandójának ( $\tau_{akt}$ ) meghatározásához. Az egyes mutánsok esetén  $\tau_{akt}$  átlagértéke és annak közepes hibája került feltüntetésre adott mérési szám (n) esetén.

A T449A/ A471C csatorna esetén az áram aktivációs időállandója  $1,15 \pm 0,34$  ms-nak adódott (n=6), míg ugyanezen paraméter értéke a T449A/ L472C mutáns csatorna esetén  $0,63 \pm 0,08$  ms (n=6).

### V/ 3. Az áram inaktivációs időállandójának meghatározása

Ismert, hogy a *Shaker*-IR csatornák egy hosszan tartó depolarizációs impulzus alatt a C-típusú inaktivációért felelős inaktivációs kapu záródása miatt inaktíválódnak. Az inaktívált állapotban levő csatornák funkcionálisan nem vezetőképesek, így az inaktiváció folyamata makroszkóposan abban nyilvánul meg, hogy az áram a csúcsértékről egy exponenciális összefüggéssel illeszthető kinetikával egy egyensúlyi értékre (egyensúlyi áram) csökken. (5.ábra).



**5. ábra:** +50 mV-os 1000 ms hosszúságú depolarizáló impulzusok alatt kapott áramgörbék egyensúlyi áram kialakulásáig ábrázolt szakaszai a T449A/ A471C csatorna (**A panel**) és a T449A/ L472C mutáns csatorna (**B panel**) esetén.

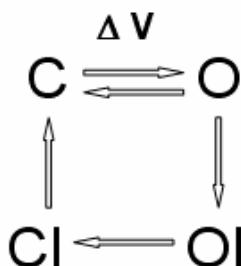
Az áramgörbék leszálló szárára a lentebb részletesen bemutatásra kerülő exponenciális függvényt illesztettem. Az illesztés eredménye az ábrákon piros szaggatott vonallal került feltüntetésre. Az áram inaktivációs időállandójával ( $\tau_{\text{inakt}}$ ), mint illesztett paraméterrel az inaktiváció kinetikája jellemezhetővé válik. A  $\tau_{\text{inakt}}$  átlagértéke és annak közepes hibája került feltüntetésre adott mérési szám (n) mellett az egyes mutáns csatornák esetén.

Az inaktivációs kinetika jellemzésére az áram inaktivációs időállandóját ( $\tau_{\text{inakt}}$ ) használtam. Az áram inaktivációs időállandójának meghatározásához -120 mV-os tartófeszültségről 1000 ms hosszúságú +50 mV-ra történő depolarizáló impulzust alkalmaztam. A  $\tau_{\text{inakt}}$  értékét az áramgörbe leszálló szárára illesztett alábbi egyexponenciális függvényel határoztam meg:  $I(t) = A \times e^{-t/\tau_i} + C$ , ahol  $I$  az aktuális áramerősség,  $C$  az egyensúlyi (steady-state) áram nagysága,  $A$  az inaktíváló komponens amplitúdója,  $t$  pedig az illesztés kezdetétől számított idő.

Az így meghatározott  $\tau_{\text{inakt}}$  értéke a T449A/ A471C csatorna esetén  $19,8 \pm 3,6$  ms- nak adódott (n=5), míg a T449A/ L472C mutáns ioncsatorna esetén értéke  $34,8 \pm 3,1$  ms (n=5).

#### V/ 4. Az inaktivációból való visszatérés időállandójának meghatározása

A cisztein modifikációs kísérletek helyes kivitelezése szempontjából kulcsfontosságú az egyes depolarizáló impulzusuk között eltelt időnek a megválasztása. Mint ahogy azt korábban is említettem a depolarizáció során az ioncsatornák előbb kinyitnak (O), majd ezt követően az inaktivációs kapu záródásával a funkcionálisan nem vezető inaktivált állapotba kerülnek (OI).



**6. ábra:** Az egyszerűsített négy állapotos kapuzási modell sémája.

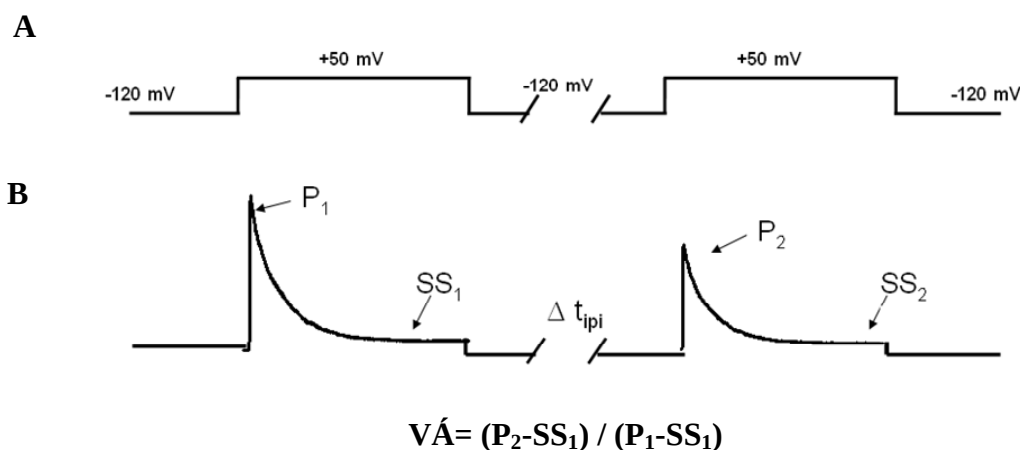
A C, illetve O az aktivációs kapu zárt, illetve nyitott állapotát jelöli, míg az I az inaktivációs kapu zárt állapotára utal. -120 mV-os tartófeszültség esetén a csatornák a kiindulási zárt (C) állapotban vannak. A membrán +50 mV-os depolarizációja hatására ( $\Delta V$ ) a csatornák megnyitnak (O), majd a fenntartott depolarizáció alatt, annak hatására, az 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. A csatornákat megfelelő ideig kell ezen a tartófeszültségen tartani ahhoz, hogy az inaktivációs kapu nyitásával a zárt (C) állapotba jussanak, ami a következő depolarizáló impulzus hatására a funkcionálisan vezető, nyitott (O) állapotba vihető.

Ahhoz, hogy az újabb depolarizáció hatására ismételt a funkcionálisan vezető nyitott állapotba kerüljenek, a 6. ábrán feltüntetett, egyszerűsített négy állapotos kapuzási modell alapján először a zárt (C) állapotba kell kerülniük, aminek eléréséhez 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 zárt inaktivációs kapu miatt nem képesek a kálium ionok vezetésére. Ez megtévesztő lehet a cisztein modifikációs kísérletek értelmezésénél, ugyanis az inaktivált csatornák jelenléte miatti áramvesztés az áramok mérésével nem különböztethető meg a mutált ciszteinek MTS reagensekkel történő sikeres modifikációja miatt bekövetkező csúcsáram csökkenéstől.

Ennek elkerülése érdekében határoztam meg mindkét mutáns csatorna esetén az inaktivációból való visszatérés kinetikáját jellemző időállandót ( $\tau_{rec}$ ) -120 mV-os tartófeszültség alkalmazása mellett, melynek ismeretében az depolarizáló impulzusok között szükséges idő helyesen megválasztható.

Az inaktivációból való visszatérés időállandójának meghatározásához mindig adott impulzuspárok hatására kialakuló csúcsáramokat hasonlítottam össze (7. ábra). 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 egységesen -120 mV volt. Az impulzuspárokon belül csak az egyes impulzusok közötti idő ( $t_{ipi}$ ) változott.

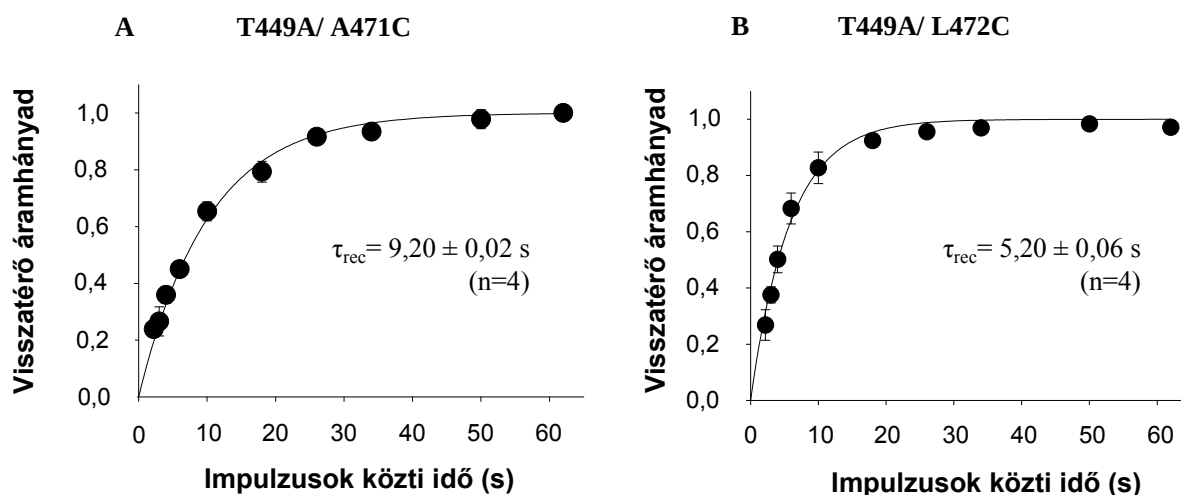
A különböző impulzusok közti idők esetén ( $t_{ipi}$ ) az alábbi képlet segítségével határoztam meg a visszatérő áramhányad ( $V\acute{A}$ ) értékét:  $V\acute{A} = (P_2 - SS_1) / (P_1 - SS_1)$ , ahol  $P_1$  az első impulzus során kapott csúcsáram,  $P_2$  a második impulzus során kapott csúcsáram,  $SS_1$  pedig az első impulzus során mért egyensúlyi (steady-state) áram értéke.



**7. ábra:** Az inaktivációból való visszatérés időállandójának meghatározására szánt protokoll részlete (A panel) alatta az adott impulzuspár hatására kialakuló áramgörbéket reprezentáló sémák (B panel). A 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 60 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. A B panel alján az adott  $t_{ipi}$  esetén visszatérő áramhányad ( $V\acute{A}$ ) számítására használt képlet került feltüntetésre.

Az adott  $t_{ipi}$  mellett meghatározott visszatérő áramhányadokat ezt követően az impulzusok közti idő függvényében ábrázoltam (8. ábra). 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 az alábbi exponenciális függvényt illesztettem:  $I(t) = I_{\max} \left( 1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \right)$ .

$I(t)$  a  $t$  időpontban visszatért áramhányad,  $I_{\max}$  az áram értéke, miután az összes csatorna visszatért az inaktivált állapotból,  $\tau$  az az időállandó, ahol a csatornák 1/e-ed része visszatért az inaktivált állapotból a zárt állapotba.



**8. ábra:** A visszatérő áramhányad (VÁ) ábrázolása az impulzusok közti idő ( $t_{ipi}$ ) függvényében a T449A/ A471C csatorna esetén (**A** panel), és a T449A/ L472C mutáns csatorna (**B** panel) esetén.

Az ábrákon minden feltüntetett pont 4-4 független kísérlet során a szövegben részletezett módon meghatározott eredmény átlaga, a hibajelek az átlagértékek közepes hibáit (SEM) mutatják. Az adatpontokra illesztett exponenciális függvény paraméterei a szövegben kerültek feltüntetésre.

Az inaktivációból való visszatérés időállandójának ( $\tau_{\text{rec}}$ ) átlagértékei és azok közepes hibája (SEM) az egyes mutáns csatornák esetén az ábra alján kerültek feltüntetésre adott mérési szám mellett (n). Ezen időállandók meghatározásához a különböző sejteken végzett mérések eredményeihez az illesztést

egyenként végeztem el, majd ezt követően határoztam meg a feltüntetett  $\tau_{\text{rec}}$  átlagértékeket és a hozzájuk tartozó SEM értékeket.

Ezek alapján inaktivációból való visszatérés időállandója ( $\tau_{\text{rec}}$ ) a T449A/ A471C csatorna esetén  $9,20 \pm 0,02$  s -nak adódott (n=4), míg ugyanennek a paraméternek az értéke a T449A/ L472C mutáns csatorna esetén  $5,20 \pm 0,06$  s (n=4).

## VI. MEGBESZÉLÉS

### VI/ 1. A vizsgált biofizikai jellemzők összegzése

Az általam tanulmányozott mutáns *Shaker* T449A/ A471C és T449A/ L472C csatornák biofizikai jellemzőit az alábbi táblázatban (1. táblázat) összegeztem.

| Vizsgált biofizikai jellemzők                                 | T449A/ A471C       | T449A/ L472C       |
|---------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------|
| Félaktivációs feszültség ( $V_{1/2}$ )                        | $9 \pm 4$ mV       | $-32 \pm 11$ mV    |
| Aktiváció feszültségfüggésének meredeksége (k)                | $-23 \pm 3$ mV     | $-15 \pm 2$ mV     |
| Aktivációs küszöb                                             | $\sim -40$ mV      | $\sim -50$ mV      |
| Maximális konduktancia eléréséhez tartozó feszültség          | $\sim +50$ mV      | $\sim +10$ mV      |
| Áram aktivációs időállandója ( $\tau_{akt}$ )                 | $1,15 \pm 0,34$ ms | $0,63 \pm 0,08$ ms |
| Áram inaktivációs időállandója ( $\tau_{inakt}$ )             | $19,8 \pm 3,6$ ms  | $34,8 \pm 3,1$ ms  |
| Inaktivációból való visszatérés időállandója ( $\tau_{rec}$ ) | $9,20 \pm 0,02$ s  | $5,20 \pm 0,06$ s  |

**1. táblázat:** A T449A/ A471C és T449A/ L472C mutáns csatornák biofizikai jellemzői.

Az egyes biofizikai paraméterek rövidítése, és a megfelelő mértékegységek a táblázatban kerültek feltüntetésre. A mérési adatok közlésénél az átlagértéket és annak közepes hibáját (SEM) adtam meg adott mérési szám mellett (n). Az egyes értékekhez tartozó mérési számok (n) korábban, az „EREDMÉNYEK” megfelelő részeinél kerültek feltüntetésre.

## VI/ 2. A vizsgált biofizikai jellemzők további alkalmazása

Az állapotfüggő cisztein modifikációs kísérletek helyes kivitelezése érdekében kulcsfontosságú a csatornák általam meghatározott biofizikai jellemzőinek a pontos ismerete, ugyanis csak ezek tudatában lehetséges a modifikációs kísérletek protokolljait megtervezni.

A konduktancia feszültségfüggésének vizsgálata alapján megállapítható, hogy a T449A/ L472C mutáns csatorna aktivációja már negatívabb membránpotenciál értékeknél elkezdődik, a maximális konduktancia elérése pedig alacsonyabb membránpotenciál értéken következik be, mint a T449A/ A471C mutáns esetében. Ennek megfelelően a csatornára jellemző 50%-os nyitási valószínűséghez tartozó félaktivációs feszültség értéke is a negatívabb membránpotenciál értékek felé tolódik el a T449A/ L472C mutáns csatorna esetén. Ezen adatok birtokában megállapítható, hogy a cisztein modifikációs kísérletek protokolljában -120 mV-os tartófeszültség alkalmazása mellett a csatornák zárt állapotban tarthatók. Továbbá +50 mV-os tesztpotenciál értékeknél már mindkét mutáns csatorna konduktanciája maximális, ennek megfelelően +50 mV-os depolarizáló impulzusokat kell alkalmazni a modifikációs kísérletek során, ugyanis ebben az esetben lesz a csatornák nyitási valószínűsége 1-gyel egyenlő.

Az 1. táblázat továbbá jól tükrözi, hogy a T449A/ L472C mutáns ioncsatorna esetén az áram aktivációs kinetikája gyorsabb, míg az áram inaktivációs kinetikája lassabb, mint a T449A/ A471C esetén, amit a megfelelő időállandók ( $\tau_{akt}$  és  $\tau_{inakt}$ ) értékei jeleznek.

A mérési eredmények alapján megállapítható, hogy az ioncsatornák inaktivációból való visszatérési kinetikáját jellemző időállandók ( $\tau_{rec}$ ) közel négyszeresét, azaz a két mutáns csatorna esetén egységesen 50 s-ot várva az egyes depolarizáló impulzusok között biztosan bekövetkezik a csatornák inaktivált állapotból zárt állapotba való visszatérése.

A megfelelő tartófeszültség, a depolarizáló impulzusok nagyságának, és a köztük eltelt időnek a helyes megválasztása alapvető feltétele az állapotfüggő cisztein modifikációs kísérletek helyes kivitelezésének, ugyanis csak ebben az esetben lehetséges a homogén csatornapopulációk vizsgálata.

A célkitűzésemnek megfelelően az általam meghatározott, csatornák kapuzását jellemző biofizikai paramétereket figyelembe vettük az állapotfüggő cisztein modifikációs kísérletek során alkalmazott protokollok tervezésénél. A modifikációs 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.

## VII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenek előtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof. Dr. Panyi György egyetemi tanárnak, a DEOEC Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet Biofizikai Tanszékének a vezetőjének, amiért felkeltette az érdeklődésemet a tudományos kutatómunka iránt, lehetővé tette, hogy a munkacsoportjában a tudományos diákköri munka keretében kutatómunkát végezzek, segített a témaválasztásban, nagy szakmai tudásával mindig a rendelkezésemre állt, szakmai munkámat napi szinten is irányította és felügyelte, mindig maximálisan támogatta.

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

Hálás köszönettel tartozom másik témavezetőmnek, Dr. Szántó G. Tibor egyetemi tanársegédnek, aki a munkámat folyamatosan nyomon követve biztosította számomra a folyamatos szakmai fejlődés lehetőségét és a mindennapok során nagy segítséget nyújtott a kísérletek tervezésében, kivitelezésében, az eredmények értelmezésében és azok tudományos színvonalú interpretálásában.

Köszönettel tartozom a patch clamp munkacsoportban dolgozó Dr. Krasznai Zoltánnak, Dr. Varga Zoltánnak, Dr. Hajdú Péternek, Dr. Papp Ferencnek, Nagy Cecíliának, Bartók Ádámnak, Szilágyi Orsolyának, Domján Brigittának, Tóth Ágnesnek, akik minden kérdésem kapcsán készségesen segítettek, és akikkel mindig jó hangulatban, kellemes légkörben zajlott a közös munka.

Szeretnék köszönetet mondani a DEOEC Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet valamennyi dolgozójának, akik ezen pályamunka megírásában segítettek.

## VIII. IRODALOMJEGYZÉK

1. Baukrowitz, T., Yellen, G. (1995) Modulation of  $K^+$  current by frequency an external  $[K^+]$  a tale of two inactivation mechanisms. *Neuron* 15, 951-960.
2. 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.
3. Beeton, C., Pennington, M.W., Wulff, H., Singh, S., Nugent, D., Crossley, G., Khaytin, I., Calabresi, P.A., Chen, C.Y., Gutman, G.A., Chandy, K.G. (2005) Targeting effector memory T cells with a selective peptide inhibitor of Kv1.3 channels for therapy of autoimmune diseases. *Mol. Pharmacol.* 67, 1369-1381.
4. Bezanilla, F. (2000) The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiological Reviews* 80, 555-592.
5. Choi, K.L., Aldrich, R.W., Yellen, G. (1991) Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated  $K^+$  channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 5092-5095.
6. Del Camino, D., Yellen, G. (2001) The steric closure at the intracellular activation gate of a voltage gated potassium channel. *Neuron* 32, 649-656.
7. Deutsch, C., Lee, S.C. (1989) Modulation of  $K^+$  currents in human lymphocytes by pH. *Journal of Physiology (London)* 413, 399-413.
8. Doyle, D.A., Cabral, J.M., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbins, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., MacKinnon, R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of  $K^+$  conduction and selectivity. *Science* 280, 69-77.
9. Grissmer, S., Cahalan, M.D. (1989) Divalent ion trapping inside potassium channels of human T lymphocytes. *J. of Gen. Physiol.* 93, 609-630.

10. Gomez-Lagunas, F., Armstrong, C.M. (1995) Inactivation in *Shaker* B K<sup>+</sup> channels: A test for the number of inactivating particles on each channel. *Biophys. J.* 86, 210-223.
11. Gutman, G.A., Chandy, K.G., Grissmer, S., Lazdunski, M., Mckinnon, D., Pardo, L.A., Robertson, G.A., Rudy, B., Sanguinetti, M.C., Stuhmer, W., Wang W.L. (2005) International Union of Pharmacology LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacological Reviews* 57, 473-508.
12. 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.
13. Hashimoto, Y., Nunoki, K., Kudo, H., Ishii, K., Taira, N., Yanagisawa, T. (2000) Changes in the inactivation of rat Kv1.4 K<sup>+</sup> channels induced by varying the number of inactivation particles. *J. Biol. Chem.* 275, 9358-9362.
14. Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T., MacKinnon, R. (1994) Mutations in the K<sup>+</sup> channel signature sequence. *Biophys. J.* 66, 1061-1067.
15. Holmgren, M., Jurman, M. E., Yellen, G. (1996) N-type inactivation and the S4-S5 region of the *Shaker* K<sup>+</sup> channel. *J. Gen. Physiol.* 108, 195-206.
16. Hoshi, T., Zagotta, W.N., Aldrich, R.W. (1990) Biophysical and molecular mechanisms of *Shaker* potassium channel inactivation. *Science* 250, 533-538.
17. Jiang, Y., Ruta, V., Chen, J., Lee, A., MacKinnon, R. (2003) The principle of gating charge movement in a voltage dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature* 423, 42-48.
18. Kurata, H.T., Fedida, D. (2006) A structural interpretation of voltage-gated potassium channel inactivation. *Progress in Biophysics & Molecular biology* 92, 185-208.
19. Long, S.B., Campbell, E.B., MacKinnon, R. (2005) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent *Shaker* family K<sup>+</sup> channel. *Science* 309, 897-903.

20. 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.
21. MacKinnon, R. (1991) Determination of the subunit stoichiometry of a voltage activated potassium channel. *Nature* 350, 232-235.
22. MacKinnon, R., Aldrich, R.W., Lee, A.W. (1993) Functional stoichiometry of *Shaker* potassium channel inactivation. *Science* 262, 757-759.
23. Matteson, D. R., Deutsch, C. (1984) K<sup>+</sup> channels in T lymphocytes: a patch clamp study using monoclonal antibody adhesion. *Nature* 307, 468-471.
24. Neyton, J., Miller, C. (1988 a) Discrete Ba<sup>2+</sup> block as a probe of ion occupancy and pore structure in the high conductance Ca<sup>2+</sup> activated K<sup>+</sup> channel. *J. Gen. Physiol.* 92, 569-586.
25. Neyton, J., Miller, C. (1988 b) Potassium blocks barium permeation through a calcium-activated potassium channel. *J. Gen. Physiol.* 92, 549-567.
26. Panyi, G., Deutsch, C., (2006 b) Cross Talk between activation and slow inactivation gates of *Shaker* potassium channels. *J. Gen. Physiol.* 128, 547-559.
27. Panyi, G., Deutsch, C. (2007) Probing the cavity of the slow inactivated conformation of *Shaker* potassium channels. *J. Gen. Physiol.* 129, 403-418.
28. Panyi, G., Possani, L.D., Rodriguez de la Vega, R.C., Gaspar, R., Varga, Z. (2006 a) K<sup>+</sup> channel blockers: novel tools to inhibit T cell activation leading to specific immunosuppression. *Curr. Pharm. Des.* 12, 2199-2220.
29. Panyi, G., Sheng, Z.-F., Tu, L.-W., Deutsch, C. (1995) C-type inactivation of a voltage-gated K<sup>+</sup> channel occurs by a cooperative mechanism. *Biophys. J.* 69, 896-903.
30. Panyi, G., Vamosi, G., Bodnar, A., Gaspar, R.J., Damjanovich, S. (2004, a) Looking through ion channels: recharged concepts in T cell signalling. *Trends. Immunol.* 25, 565-569.

31. Panyi, G., Varga, Z., Gaspar, R. (2004, b) Ion channels and lymphocyte activation. *Immunol. Lett.* 92, 55-66.
32. Perez-Cornejo, P. (1999) H<sup>+</sup> modulation of C-type inactivation of *Shaker* K<sup>+</sup> channels. *Pflugers Arch.* 437, 865-870.
33. 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.
34. Trout, W.E., Kaplan, W.D. (1970) A relation between longevity, metabolic rate, and activity in *Shaker* mutants of *Drosophila melanogaster*. *Exp. Gerontol.* 5, 83-92.
35. Wang, J.W., Humphreys, J.M., Phillipps, J.P., Hilliker, A.J., Wu, C.-F. (2000) A novel leg shaking *Drosophila* mutant defective in voltage-gated potassium current and hypersensitive to reactive oxygen species. *The Journal of Neuroscience* 20(16), 5958-5964.
36. Wang, J.W., Sylwester, A.W., Reed, D., Wu, D.-A. J., Soll, D.R., Wu, C.-F. (1997) Morphometric description of the wandering behavior in *Drosophila* larvae: aberrant locomotion in Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> channel mutants revealed by computer -assistant motion analysis. *J Neurogenet.* 11, 231-254.
37. Wang, J.W., Wu, C.-F. (1996) In vivo functional role of the *Drosophila* Hyperkinetic  $\beta$  subunit in gating and inactivation of *Shaker* K<sup>+</sup> channels. *Biophys. J.* 71, 3167-3176.
38. Yellen, G., Sodickson, D., Chen, T.-Y., Jurman, M.E. (1994) An engineered cysteine in the external mouth of a K<sup>+</sup> channel allows inactivation to be modulated by metal binding. *Biophys. J.* 66, 1068-1075.
39. Zagotta, W.N., Hoshi, T., Aldrich, R.W. (1990) Restoration of inactivation in mutants of *Shaker* potassium channels by a peptide derived from ShB. *Science* 250, 568-571.

40. Zhou, Y., Morais Cabral J.H., Kaufman, A., MacKinnon, R., (2001) Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K<sup>+</sup> channel- Fab complex at 2.0Å resolution. Nature 414, 43-48.

## IX. FÜGGELÉK

Az alábbiakban a jelen TDK pályamunkám alapjául szolgáló, általam önállóan végzett kísérletes munka tételes felsorolása következik:

- 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 biofizikai karakterizációt szolgáló protokollok (a konduktancia feszültségfüggését vizsgáló protokoll, az áram aktivációs és inaktivációs kinetikáját vizsgáló protokoll, és a csatornák inaktivációból való visszatérési kinetikáját vizsgáló protokoll) megtervezése.
- A konduktancia feszültségfüggésének, az áram aktivációs és inaktivációs kinetikájának, és a csatornák inaktivációból való visszatérési kinetikájának vizsgálata céljából végzett patch clamp mérések kivitelezése.
- A fentebb említett mérések során nyert adatok kiértékelése, a kapott paraméterek meghatározása, az eredmények értelmezése.
- A pályamunkában közzétett ábrák elkészítése.
- Jelen TDK pályamunka elkészítése.

Debrecen, 2012. július. 09.

Zákány Florina

DEOEC-ÁOK IV. évfolyam/ 8-as csoport  
DEOEC Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

**Zákány Florina: „Mutáns *Shaker* kálium csatornák biofizikai jellemzőinek tanulmányozása” című TDK pályamunkájának bírálata**

**(azonosítási szám: 1323/A)**

A benyújtott pályamunka célkitűzése mutáns *Shaker* kálium csatornák azon biofizikai paramétereinek kísérleti meghatározása melyek segítségével optimálisan megtervezhetők a csatorna kémiai reagensekkel történő módosításának protokolljai.

A pályamű teljes terjedelme 33 oldal, mely tartalmazza a fedőlapot, tartalomjegyzéket, absztraktot, rövidítések jegyzékét, bevezetést (8 oldal), valamint az anyag és módszer- (3 oldal), eredmények- (9 oldal), megbeszélés- (2 oldal) fejezeteket. A pályamunkát a köszönetnyilvánítás, irodalomjegyzék és a kötelező függelék zárja. A pályamű szerzője célkitűzéseit a bevezetésben ismerteti.

A dolgozat fogalmazása világos és érthető, szerkezete logikus és jól tagolt, ábrái gondosan szerkesztettek. Csupán néhány, valószínűleg a szövegszerkesztő szoftver előtt is rejtve maradó elgépelés lelhető fel a szövegben, mint pl. a nyolcadik oldalon (12. sor) ”..., míg ellenkező esetben a csatorna nem képes az inaktiválódni”.

Kiemelendő az alaposan és érthetően megírt „Bevezetés” szakasz, amely a téma iránt csak érdeklődő, de abban nem járatos szakember számára is jól összefoglalja a „*Shaker*” típusú ioncsatornák eddig feltárt összefüggéseit. A megadott irodalom elegendő támpontot nyújt az olvasó számára, hogy a terület legfontosabb közleményein elindulva további lényeges ismeretek birtokába jusson.

Az anyagok és módszerek fejezetben lényegre törően ismerteti a mérések tervezését és kivitelezését és az eredmények kiértékelését. Egyetlen apró megjegyzés: ha a pályamű szerzője saját maga által írt Marquard-Levenberg algoritmust használó illesztőprogramot írt, akkor azt büszkén vállalni kell (és a szövegben meg kell említeni). Amennyiben a szoftver „külső” forrásból származik, azt is kívánatos lenne megemlítenie. A Marquard-Levenberg algoritmust általában Levenberg-Marquard algoritmusként említik, pl. a „Numerical Recipes” című könyvben is így szerepel.

Hasonlóan az előző részekhez, az „Eredmények” című fejezet is szépen és érthetően foglalja össze a pályamű szerzője által (a függelék tanulsága szerint) elvégzett és kiértékelt kísérletek eredményeit. Az eredmények ismertetéséből kiderül, hogy a szerző érti és helyesen értelmezi a kísérleti eredményeket.

Végezetül a „Megbeszélés” című fejezetben összefoglalja kísérleti eredményeit és áttekinti azok alkalmazási lehetőségeit a tervezett cisztein modifikációs kísérletekben.

Összefoglalásképpen megállapítható, hogy a pályamunka szerzője alapos ismeretekkel rendelkezik a „*Shaker*” típusú ioncsatornák szerkezet-funkció összefüggéseiről, képes megtervezni és kivitelezni elektrofiziológiai méréseket és a mérési eredményeket kritikusan ki is tudja értékelni. Természetesen a TDK pályamunkák szerzői témavezetőik útmutatásai alapján dolgoznak. A jelen dolgozat esetében azonban az is érződik, hogy a szerzője tudja és érti, hogy mit, miért és hogyan kell csinálni.

**A pályamunkát változtatások nélkül, jelen formában javasolom elfogadásra. (1).**

**Válasz Zákány Florina „Mutáns *Shaker* kálium csatornák biofizikai jellemzőinek tanulmányozása” című TDK pályamunka 1323/A azonosítási számú bírálatára**

Tisztelettel szeretném megköszönni a bírálónak a pályamunkámmal kapcsolatos munkáját. Megtisztelő volt számomra olvasni a bírálatokban leírt elismerő észrevételeit. A munkámmal kapcsolatos bíráló formai és tartalmi észrevételeit megalapozottnak tartom. Úgy érzem, hogy munkám ezen észrevételeknek megfelelően történő korrekciója következtében mind tartalmi, mind formai szempontból értékesebb lett.

Debrecen, 2012. július. 09.

Zákány Florina  
DEOEC-ÁOK IV. évfolyam/ 8-as csoport  
DEOEC Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

## Bírálat

Zákány Florina Mutáns *Shaker* kálium csatornák biofizikai jellemzőinek tanulmányozása  
című TDK dolgozatáról

**Referenciaszám: 1323/B**

*Általános megjegyzéseim a dolgozattal kapcsolatban:*

A dolgozat összességében jól kidolgozott, megfelelő gonddal megírt szép munka. Az egyes részek terjedelme önmagában és egymáshoz képest is megfelelő. A *Rövidítések jegyzéke* a dolgozat olvasása közben sokat segít a témában kevésbé járatos olvasónak. Az *Absztrakt* megfelel a TDK pályamunkákkal szemben támasztott formai követelményeknek. A kellően részletes és egy színes ábrával kiegészített *Bevezetés* alapján az olvasó tiszta képet alkothat a dolgozat témájának háttérében álló feszültség-kapuzott Shaker kálium ioncsatornák működéséről. Ezen rész végén kap helyet a célkitűzés definiálása, a Szerző nem tette azt külön fejezetbe. Az *Anyagok és módszerek* fejezet jól szemlélteti, hogy a Szerző tisztában van az általa alkalmazott kísérletes technikák alapelvével. Az *Eredmények* fejezet lényegretörő és alapvetően jól érthető, a nyolc ábra szemléletes. A *Megbeszélés* részben a Szerző először egy rendkívül hasznos táblázat formájában foglalja össze az eredményeit, majd a kapott eredmények alapján röviden leírja az állapotfüggő cisztein modifikációs kísérletekhez tervezett feszültség protokollokat. Az eredmények összevetése korábbi irodalmi adatokkal (ha vannak ilyenek) pl. egyéb feszültség-kapuzott ioncsatornákon végzett aminosavcserék biofizikai paraméterekre kifejtett hatásaival. A *Köszönetnyilvánítás*-ból és a *Függelék*-ből egyértelműen kiderül, hogy a pályamunka mely részeiben vett részt a Szerző önállóan és miben támaszkodott témavezetője, illetve kollégái segítségére. Kiemelendő és dicséretes, hogy a *Függelék* alapján a pályamunka teljes egészében a kísérletek tervezésétől az utolsó betű begépeléséig a Szerző saját munkája. A *Hivatkozások* fejezetben (a bíráló munkáját segítve) a referenciák beszámozásra kerültek és 40 releváns és nagyrészt a TDK pályamunka készítésének szabályai szerint rendezett referencia segíti az olvasót.

*Részletes megjegyzéseim, kritikai észrevételeim a dolgozattal kapcsolatban:*

A dolgozatban bejelöltem a javítani javasolt hibákat.

1. A pályamunka legnagyobb problémája, hogy a Szerző a szóközökkel nem jól bánik. Egyszer ott alkalmazza, ahol nem kellene, máskor pedig oda nem tesz, ahova a bíráló szerint indokolt lenne. Amennyiben adott paraméterhez számérték mellett

mértékegység is tartozik a kettő közé indokolt szóközt tenni, de a mértékegység és annak ragja közötti kötőjel elé és mögé sem kell szóközt tenni. A mért paraméterek átlaga és annak közepes hibája közötti  $\pm$  szimbólum elé és mögé sem egységesen tett szóközt a Szerző.

2. Az átlag és annak közepes hibája megadásánál célszerű mindkettő esetben ugyanannyi tizedesjegyet feltüntetni és a pályamunkában volt, hogy eltérően szerepelt a mennyiség az ábrán és a szövegben.
3. A szabályozás ill. szabályzás szavakat sem egységesen használta a Szerző a pályamunkában.
4. A rövidítések is volt, hogy többféleképpen szerepeltek a munkában: pl.  $\tau_{akt}$ ,  $\tau_{akt}$ .
5. Az ábrákat egységesíteni kellene, pl. a tengelyfeliratokat nagybetűvel kezdeni a magyar nyelvnek megszokott módon tizedesvesszőt alkalmazni, az y tengelyeken azonos számú számot feltüntetni ahol az ábrázolás ugyanúgy 0-1-ig tart.
6. A 12. oldalon a IV/3. alfejezet „Fluoreszcens mikroszkóp” címe helyett javasolom inkább a „Fluoreszcens mikroszkópia” címet.
7. A 3. és 4. ábrát javasolnám összevonni és hasonlóan mutatni az 5. ábrához.
8. A 16. oldalon a szövegben az ábrahivatkozás helytelen, mert a 3. ábrára kellene hivatkozni.
9. Az *Irodalomjegyzék*-et átnézésre javaslom, mert nem egységes, van ahol az újság neve rövidítve szerepel, néhol pedig nem.

#### *Kérdéseim a dolgozattal kapcsolatban:*

- 1) Az élettani folyamatok tisztázására végzett kísérletekben igyekeznek a kutatók minél inkább az élettani körülményeket modellezni (37 °C). Ennek tükrében miért végezték a méréseket szobahőmérsékleten? Van-e adat arról, hogy a vizsgált csatornák kapuzása vagy a T-sejtek működése változik a hőmérséklettel?
- 2) Milyen transzfekciót használtak (tranzienst vagy stabil) és mennyire biztos, hogy ha egy zöld sejt fluoreszkált, akkor tényleg kifejezte a mutáns ioncsatornát? Kellett „megfogott” sejtet a mérésből kizárni amiatt, hogy nem volt rajta áram?
- 3) A 2. ábrán a kétféle csatornán átfolyó áram nagysága között 2x-es különbség van a T449A/ L472C fehérje javára. Mi állhat ennek a hátterében? A transzfekció során pl. az utóbbi csatornából kétszer annyit expresszált a HEK sejt, vagy ezen csatorna árama nagyobb, mint a másik mutánsé? Szóba jön-e egyáltalán az első lehetőség inside-out mérésnél?

- 4) Mennyi volt a tartófeszültség az áram-feszültség, az aktivációs és inaktivációs időállandó vizsgálatánál? Amennyiben 0 mV csak akkor helyes a 15. oldalon leírt „...ábrázoltam a depolarizációs impulzus **amplitúdójának** függvényében... „, ha nem 0 mV, akkor a kiemelt szó helyett „feszültségének” kellene állni.
- 5) A 22. oldalon a recovery illesztésére használt képletben a C definíciója hiányzik. Kell egyáltalán a képletbe ez a paraméter?

### *Összefoglalás*

Jelen dolgozatot a sok formai megjegyzés ellenére tartalmi és szerkezeti szempontból is nagyon szép munkának tartom. A Szerző által végrehajtott kísérletek minősége és mennyisége is messzemenően megfelel egy TDK pályamunka követelményeinek. Kérdéseim inkább tudományos kíváncsiságból fakadnak és javító szándék vezérelt a kérdések megfogalmazásakor, nem feltétlenül a pályamunka hiányosságaira kívánnak rávilágítani. A dolgozatot az általam javasolt módosítások végrehajtása után fogadom el (**kód: 2B**).

Debrecen, 2012. június 13.

**Válaszok Zákány Florina „Mutáns Shaker kálium csatornák biofizikai jellemzőinek tanulmányozása” című TDK pályamunka 1323/B azonosítási számú bírálati kérdéseire**

*1. Az élettani folyamatok tisztázására végzett kísérletekben igyekeznek a kutatók minél inkább az élettani körülményeket modellezni (37 °C). Ennek tükrében miért végezték a méréseket szobahőmérsékleten? Van-e adat arról, hogy a vizsgált csatornák kapuzása vagy a T-sejtek működése változik a hőmérséklettel?*

A biofizikai karakterizációs méréseket a kapott paraméterek pontos összevethetősége miatt végeztem a cisztein modifikációs kísérletekhez teljes mértékben hasonló kísérleti körülmények között, 22-25 °C-on. A modifikációs kísérletekben alkalmazott reagensek többsége (MTSEA, MTSET) nagyfokú hőmérséklet-érzékenységet mutat, szobahőmérsékleten is átlagosan 10-12 perc felezési idővel bomlik, így a hőmérséklet növelése teljesen kedvezőtlené tenné a modifikációs reakció körülményeit. Mindezeket figyelembe véve inkább az alacsonyabb hőmérsékleteken végzett mérések tanulmányozása lenne célszerű. Ellenben a szobahőmérsékletnél magasabb állandó hőmérséklet biztosítása a perfúziós rendszer termosztálását is megkívánja, amely azonban technikailag egyelőre nem valósítható meg laboratóriumunkban.

Arra, hogy az általam vizsgált, cisztein modifikációs kísérletekhez is használt T449A/ A471C és T449A/ L472C mutáns ioncsatornák kapuzását befolyásolná a hőmérséklet nincs korábbi irodalmi adat, mivel a két mutáns ioncsatornát a cisztein modifikációs kísérletek kivitelezéséhez hozták létre. Észrevételének megfelelően ennek vizsgálata a későbbiekben érdekes és értékes információkat jelenthetne számunkra a vizsgált ioncsatornák működésének pontosabb megértésének tekintetében.

A T-sejtek és egyes ioncsatornáik működésének hőmérsékletfüggésére számos korábbi irodalmi adat utal. Így többek között a célsejt citotoxikus T-sejt általi lízise csak 37 °C fölötti hőmérsékleten mehet végbe (Engelhard, V. H., Gnarr J. R., Sullivan J., Mandell, G. L., Gray L. S. (1988) Early events in target-cell lysis by cytotoxic T cells. Ann. NY Acad. Sci. 532, 303-313.). Ezen kívül a hőmérséklet jelentősen befolyásolja a T-sejtek Kv1.3 csatornájának biofizikai jellemzőit, így a csatorna inaktivációból való visszatérése jelentősen gyorsul a 37 °C-os hőmérsékleten a 22°C-on tapasztalhatóhoz képest, míg az áram aktivációs és inaktivációs időállandói kevésbé mutatnak hőmérsékletfüggést (Lee, S. C., Deutsch, C. (1990)

Temperature dependence of  $K^+$ -channel properties in human T lymphocytes. Biophys. J. 57, 49-62.). Így a hőmérséklet szisztémás változása láz esetén, vagy lokális változása például egy ízületi gyulladás során szerepet játszhat a T-sejt mediált immunválasz finomszabályozásában.

*2. Milyen transzfekciót használtak (tranzienst vagy stabil) és mennyire biztos, hogy ha egy zöld sejt fluoreszkált, akkor tényleg kifejezte a mutáns ioncsatornát? Kellett „megfogott” sejtet a mérésből kizárni amiatt, hogy nem volt rajta áram?*

A kísérletek során tranziens transzfekciót használtam. A sejtek ko-transzfekcióját a T449A/A471C vagy T449A/L472C mutáns ioncsatornát kódoló plazmiddal, illetve EGFP plazmiddal a mérések előkészítése során a pályamunkában részletesen bemutatott módon végeztem el, a kísérleteket pedig az aktuális transzfekciót követő 12-36 órás időablakban végeztem. Az plazmidok transzfekció során alkalmazott aránya (mutáns csatorna plazmid 10  $\mu$ g; EGFP plazmid 1  $\mu$ g) biztosította, hogy az EGFP pozitív sejtek több mint 60%-a kifejezte a ko-transzfektált mutáns ioncsatornát a mérési időszámban. Ez egy „tapasztalati” arány, a transzfekció hatásfokát pontosan nem határoztam meg. Ebből fakadóan előfordult, hogy a kiválasztott sejtől kitépelt patch-en nem volt áram.

Éppen ezért a pályamunkában bemutatott kísérleti protokollok elvégzése előtt minden esetben egy rövid kísérleti protokollal (-120 mV-os tartófeszültségről történő 5ms hosszúságú +50 mV-os depolarizáló impulzussal) győződtem meg arról, hogy az adott sejtben van áram. A csúcsáramok értéke általában 400-1200 pA- nek adódott a +50 mV-os tesztpotenciál érték mellett. Kísérleteimben csak azokat a patcheket használtam fel, amelyek esetén az áram amplitúdó nagysága meghaladta a 200 pA-t. Továbbá a későbbiekben csak azok a patch-ek kerültek felhasználásra, ahol az egyensúlyi áram nagysága a csúcsáram nagyságának 5%-ánál kisebb volt.

*3. A 2. ábrán a kétféle csatornán átfolyó áram nagysága között 2x-es különbség van a T449A/L472C fehérje javára. Mi állhat ennek a hátterében? A transzfekció során pl. az utóbbi csatornából kétszer annyit expresszált a HEK sejt, vagy ezen csatorna árama nagyobb, mint a másik mutánsé? Szóba jön -e egyáltalán az első lehetőség inside-out mérésnél?*

A 2. ábra alapján valóban úgy tűnhet, hogy a két csatornán átfolyó áram nagysága jelentősen különbözik, a T449A/ L472C mutáns ioncsatorna javára. Ez az ábra viszont csak egy-egy mérés során kapott reprezentatív áramgörbét mutat, nem több mérés átlagát. Több mérés eredményét is figyelembe véve ilyen markáns különbség nem mutatkozik. Az esetleges kisebb mértékű eltérést nem határoztuk meg. Azt, hogy a két csatorna tsA-201 (HEK) sejtekben történő expressziója között pontosan van-e különbség, és ha igen akkor ez mekkora nem vizsgáltuk. Egy (idegen) fehérje kifejezése a membránban összetett dolog, így elképzelhetőnek tartom, hogy a két fehérje szekvenciájának különbözősége miatt a kétféle csatorna expressziója ugyanazon rendszerben eltérő lehet. Így ha az adott csatornából több fejeződik ki a membránban, akkor az egy adott membrán darabon elhelyezkedő nagyobb számú csatorna révén az inside-out mérések során nagyobb áramot jelenthet. Arra vonatkozóan viszont nincs adat, hogy ezzel a tényezővel jelen esetben lényegesen számolnunk kéne.

*4. Mennyi volt a tartófeszültség az áram-feszültség, az aktivációs és inaktivációs időállandó vizsgálatánál? Amennyiben 0 mV csak akkor helyes a 15. oldalon leírt „...ábrázoltam a depolarizációs impulzus **amplitúdójának** függvényében...”, ha nem 0 mV, akkor a kiemelt szó helyett „feszültségének” kellene állni.*

Az észrevétele teljes mértékben helytálló, az általam alkalmazott eredeti megfogalmazás megtévesztő, ugyanis a konduktancia feszültségfüggésének vizsgálatához, valamint az áram aktivációs és inaktivációs időállandójának vizsgálatához alkalmazott protokollokban mindvégig -120 mV-os tartófeszültséget alkalmaztam. Így a depolarizáló impulzusok feszültségének értéke valóban nem egyenlő azok amplitúdójának értékével. Ennek megfelelően az illető mondat javaslatának megfelelően lett módosítva a pályamunka jelen, átdolgozott változatában.

*5. A 22. oldalon a recovery illesztésére használt képletben a C definíciója hiányzik. Kell egyáltalán a képletbe ez a paraméter?*

Az eredmények kiértékelése során általam alkalmazott képlet nem tartalmazta a fentebb említett C paramétert. A pályamunkában található képletbe utólagos szerkesztési hiba révén

került közlésre valóban hibásan ez a paraméter, ezért sem lett az a későbbiekben definiálva. Az illető függvény helyes formában a pályamunka átdolgozott változatában került közlésre a 21. oldal 11. sorában. Észrevételét köszönöm.

Végezetül tisztelettel szeretném megköszönni a bírálóknak a pályamunkámmal kapcsolatos munkáját. Megtisztelő volt számomra olvasni a bírálatokban leírt elismerő észrevételeiket. A munkámmal kapcsolatos bíráló formai és tartalmi észrevételeiket megalapozottnak tartom. Úgy érzem, hogy munkám ezen észrevételeknek megfelelően történő korrekciója következtében mind tartalmi, mind formai szempontból értékesebb lett. A pályamunkához fűzött kérdéseikkel pedig hozzájárultak a kutatói gondolkodásmódom további fejlesztéséhez.

Debrecen, 2012. július. 09.

Zákány Florina

DEOEC-ÁOK IV. évfolyam/ 8-as csoport

DEOEC Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

## **Bírálat**

Zákány Florina Mutáns *Shaker* kálium csatornák biofizikai jellemzőinek tanulmányozása  
című TDK dolgozatáról

**Referenciaszám: 1323/B**

A pályamunkában kijavításra kerültek az elgépelések. A feltett kérdésekre a Szerző adekvátan és tömören válaszolt, ismételten meggyőzve a bírálót a témában és az alkalmazott technikában való jártasságáról. A pályamunkát jelen formájában elfogadom (**kód: 1**).

Debrecen, 2012. július 10.