

TDK PÁLYAMUNKA

Zárt állapotból történő inaktiváció lehetőségének
vizsgálata mutáns *Shaker* kálium ioncsatorna esetén
patch-clamp módszerrel



Zákány Florina

DEBRECENI EGYETEM ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR

VI. ÉVFOLYAM, 8-AS CSOPORT

DEBRECENI EGYETEM ÁOK BIOFIZIKAI ÉS SEJTBOLÓGIAI INTÉZET

TÉMAVEZETŐK: Dr. Szántó G. Tibor
Egyetemi tanársegéd

Prof. Dr. Panyi György
Tanszékvezető egyetemi tanár

TARTALOMJEGYZÉK

I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	2
II. ABSZTRAKT	3
III. BEVEZETÉS	4
III/ 1. AZ IONCSATORNÁKRÓL ÁLTALÁBAN	4
III/ 2. A <i>SHAKER</i> KÁLIUMCSATORNA ÉS A HUMÁN <i>SHAKER</i> TÍPUSÚ KÁLIUMCSATORNÁK.....	4
III/ 3. A <i>SHAKER</i> CSATORNA SZERKEZETE	6
III/ 4. AZ N-TÍPUSÚ ÉS A C-TÍPUSÚ INAKTIVÁCIÓ BEMUTATÁSA.....	9
IV. PROBLÉMAFELVETÉS, CÉLKITŰZÉS	12
V. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	16
V/ 1. A T449A/V474C MUTÁNS IONCSATORNA FELÉPÍTÉSE	16
V/ 2. A TSA-201 SEJTEK TENYÉSZTÉSE ÉS TRANSZFEKCIÓJA	16
V/ 3. FLUORESzcENS MIKROSKÓPIA	17
V/ 4. ELEKTROFIZIOLÓGIA	18
V/ 5. OLDATOK, PERFÚZIÓS RENDSZER.....	19
V/ 6. ADATOK ÉRTÉKELÉSE.....	20
V/ 7. MOLEKULA SZERKEZETI ÁBRÁK	21
VI. EREDMÉNYEK	22
VI/ 1. A PATCH-CLAMP MÉRÉSEK SORÁN ALKALMAZOTT KÍSÉRLETI PROTOKOLL FELÉPÍTÉSE.....	22
VI/ 2. A T449A/V474C MUTÁNS IONCSATORNA BIOFIZIKAI JELLEMZÉSE.....	24
VI/ 3. KONTROLL KÖRÜLMÉNYEK SORÁN KAPOTT EREDMÉNYEK.....	25
VI/ 4. CD^{2+} ALKALMAZÁSA MELLETT KAPOTT EREDMÉNYEK	28
VII. MEGBESZÉLÉS.....	30
VII/ 1. AZ ELEKTROFIZIOLÓGIAI MÉRÉSEK SORÁN KAPOTT EREDMÉNYEK ÖSSZEGZÉSE	30
VII/ 2. TOVÁBBI CÉLKITŰZÉSEK	31
VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	33
IX. IRODALOMJEGYZÉK	35
X. FÜGGELÉK	40

I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Cd^{2+}	kadmiumion
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
GYGD szekvencia	glicin-tirozin-glicin-aszpartát aminosavakat tartalmazó szekvencia
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
t_d	a gyorsperfúziós rendszer pozícióváltásának késési ideje
TEA^+	tetraetil-ammónium
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*-IR káliumcsatornák egy aktivációs és egy a C-típusú inaktivációért felelős inaktivációs kapuval rendelkeznek. A két kapu egymással csatolt, de a C-típusú inaktiváció molekuláris mechanizmusának részletei máig sem tisztázottak. 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. Munkám során arra kerestem a választ, hogy az inaktivációs kapu képes-e az aktivációs kaputól függetlenül mozogni, azaz megvalósulhat-e a csatornák inaktivációja közvetlenül a zárt állapotból.

Méréseimhez olyan mutáns csatornát használtam, amelyben az S6-os transzmembrán helikális szegmensek 474-es pozíciójú aminosavait ciszteinekre cserélték. Ezek a ciszteinek kizárólag nyitott aktivációs kapu mellett hozzáférhetőek az intracelluláris oldal felől alkalmazott Cd^{2+} számára. A Cd^{2+} irreverzibilis kötődése a konduktancia elvesztését eredményezi, így a modifikációs reakció az ionáramok mérésével jól monitorozható. A méréseket tsA-201 sejtekbe (SV40 large T antigénnel transzformált humán embrionális vese sejtek) transzfektált T449A/V474C csatornákon végeztem a patch-clamp technika feszültség-zár üzemmódjában, inside-out konfigurációban.

A kísérleteim során alkalmazott protokoll három, egyenként 5 ms hosszúságú depolarizáló impulzust tartalmazott. Az első és a második impulzus között 20 s-ig a patchet előbb Cd^{2+} hiányában, majd különböző Cd^{2+} koncentráció jelenlétében olyan membránpotenciálon tartottam, ahol az előzetesen elvégzett biofizikai karakterizálás alapján makroszkópos áram nem volt detektálható, de a csatornák inaktivációja már megfigyelhető volt. A második depolarizáló impulzust követően 60 s-on keresztül -120 mV-os tartófeszültséget alkalmaztam.

Az így kapott csúcsáramok felhasználásával meghatározott relatív visszatérő áramhányad a kontroll mérések esetében ~ 1 , 20 μM -os Cd^{2+} koncentráció mellett $0,84 \pm 0,04$ ($n=6$), míg 200 μM -os Cd^{2+} koncentráció mellett $0,19 \pm 0,12$ ($n=3$). Látható, hogy Cd^{2+} jelenlétében a csatornák kisebb hányada tér vissza az inaktivált állapotból, mint a kontroll mérések esetén. Ez a jelenség egyre kifejezettebb a Cd^{2+} koncentráció növelésével. Mindez azt támasztja alá, hogy a csatorna aktivációja megelőzi az inaktivációs kapu záródását, azaz inaktiváció közvetlenül zárt állapotból nem valósulhat meg.

III. BEVEZETÉS

III/ 1. Az ioncsatornákról általában

Az ioncsatornák az élő szervezetek működése szempontjából kulcsfontosságú transzmembrán fehérjék, melyek számos élettani folyamat szabályzásában részt vesznek, valamint meghatározó szerephez jutnak különböző pathológiás folyamatok kialakulásában és fenntartásában is. Az ioncsatornák a biológiai membránokon egy hidrofil pórust képezve biztosítják az ionok koordinált áramlását. Ezt a funkciót a membránfehérjék között egyedülálló felépítésük, pórusuk és kapuik révén képesek ellátni. A pórus biztosítja az ionok átjutását a membránon keresztül, míg a csatorna kapuinak meghatározott koreográfia szerinti mozgása (nyitása, zárása) felelős a koordinált ionáramlás kialakításáért.

A pórus nem csak passzív útvonalként szerepel az ionok membránon keresztüli átjutása során. A pórusban található szelektivitási szűrő révén egy adott ioncsatorna csak meghatározott ionok számára átjárható. Az ioncsatornák további jellemzője a kapuzás, ami révén az egyes ioncsatornák különféle ingerek (membránpotenciál változás, extracelluláris, vagy intracelluláris ligand bekötődése, mechanikai ingerek, stb.) hatására a funkcionálisan vezető nyitott, és a funkcionálisan nem vezető zárt és inaktivált strukturális állapotok közötti átmenetre képesek. A kísérleteim során használt, későbbiekben bemutatandó mutáns *Shaker* csatorna ezek alapján a feszültség kapuzott káliumcsatornák (K_v) közé sorolható.

III/ 2. A *Shaker* káliumcsatorna és a humán *Shaker* típusú káliumcsatornák

Az általam tanulmányozott *Shaker* csatorna a *Drosophila melanogaster*-ben előforduló feszültség kapuzott káliumcsatorna, amelyek fontos szerepet játszik a kifejlett rovar és az azt megelőző fejlődési alakok harántcsíkolt izom, illetve idegszövetének működésében. A csatornákon átfolyó gyorsan inaktiválódó, tranziens A-típusú káliumáram részt vesz többek között a lárvák neuromuszkuláris junkciójában a preszinaptikus neurotranszmitter felszabadulás terminálásában (Wang és mtsai, 1996). A *Shaker* elnevezés a csatornát kódoló génekben -*Shaker* (Sh), *Hyperkinetic* (Hk), és *ether a go-go* (eag)- leírt mutációk eredményeképpen éter anesztéziában jelentkező lábremegésből adódik.

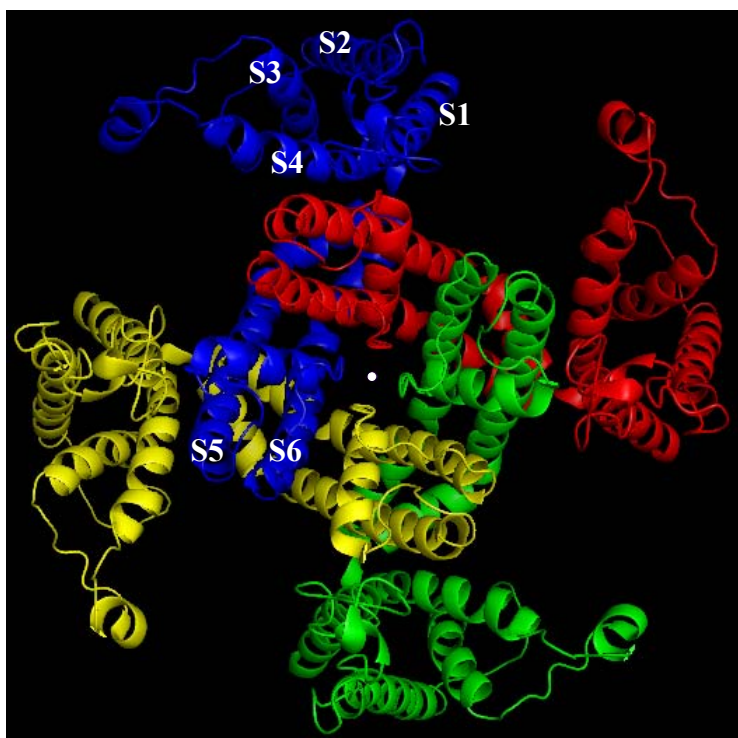
A *Shaker* csatorna humán szervezetben nem fordul elő, mégis kiemelt szerepet kap számos humán ioncsatorna szerkezet-funkciójának tanulmányozásában. Ennek oka, hogy a csatorna nagymértékű szekvencia homológiát, ezáltal mind strukturális, mind pedig funkcionális hasonlóságot mutat a humán szervezetben előforduló szintén feszültség kapuzott káliumcsatornák egyik csoportjával, a *Shaker* típusú káliumcsatornákkal. Ezen csatornák kapuzásának, szerkezet-funkciójának megismerésére vonatkozó korábbi kutatások nagy része a *Shaker* csatornát használta fel modellként, ezért a kísérletes munkánk során mi is ezt az ioncsatornát alkalmaztuk.

A *Shaker* típusú káliumcsatornák ingerelhető és nem ingerelhető sejtekben egyaránt előfordulnak. A feszültség kapuzott káliumcsatornák egyezményes jelölését tekintve a Kv1.1-Kv1.8 jelölésű ioncsatornák sorolhatók a *Shaker* csoportba. Munkacsoportunk érdeklődésének középpontjában a Kv1.3 jelölésű ioncsatorna áll, ami többek között megtalálható a B és T-limfocitákban (a későbbiekben B- és T-sejtek), a progenitor B-sejtekben, makrofágokban, a hasnyálmirigy Langerhans sejteiben, neuronokban, oligodendrocitákban, mikrogliákban, oszteoklasztokban, fibroblasztokban és vérlemezkékben is (Gutman és mtsai, 2005). A Kv1.3 ioncsatorna a limfociták domináns kálium csatornájaként részt vesz a nyugalmi membránpotenciál kialakításában és fenntartásában, valamint a sejtek Ca^{2+} függő jelátviteli folyamatainak szabályozásában is lehetővé téve a kalcium jel kialakulását (Panyi és mtsai, 2004 a; 2004 b). Ezáltal a csatornának kiemelkedő szerepe van a T-sejtek antigénekkal és más mitogénekkal kiváltott aktivációjának és proliferációjának szabályozásában (Matteson és mtsai, 1984).

A Kv1.3 ioncsatorna különböző típusú gátlószerekkel történő gátlása depolarizálja a T-sejteket, ami csökkenti a kalcium beáramlásához szükséges elektrokémiai gradienst megakadályozva a sejtek proliferációját in vitro (Leonard és mtsai, 1992), és immunszuppresszióhoz vezet in vivo (Cahalan és Chandy, 1997). Számos olyan autoimmun betegség ismert, amelyekben ezen sejtek kóros aktivációja mutatható ki, így a Kv1.3 csatornát szelektíven gátló, nagy affinitású peptid toxinok és egyéb úgynevezett kis-molekula Kv1.3 inhibitorok kifejlesztése forradalmasíthatná többek között a rheumatoid arthritis, a sclerosis multiplex, és más autoimmun betegségek kezelését, egy a mainál specifikusabb, kevesebb mellékhatással bíró terápiát biztosítva (Beeton és mtsai, 2005; Panyi és mtsai 2006 a; Feske és mtsai, 2012).

III/ 3. A *Shaker* csatorna szerkezete

A *Shaker* csatorna és a *Shaker* típusú káliumcsatornák felépítésüket tekintve négy alegységből felépülő homotetramer csatornák. 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).

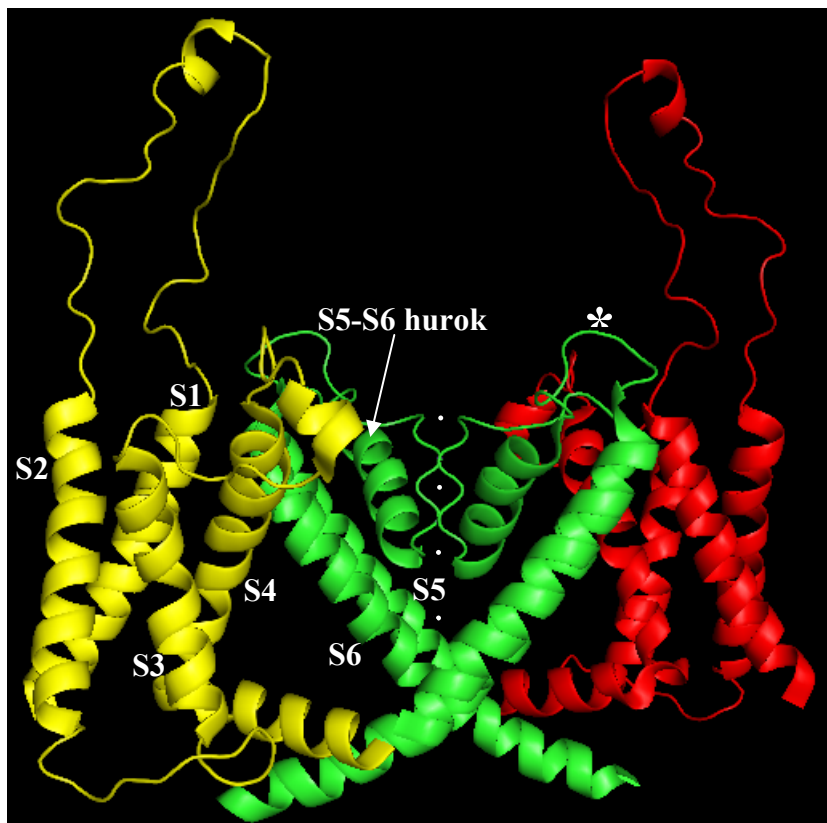


1. ábra: A *Shaker* típusú káliumcsatornák felépítése.

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 (fehér színnel jelölve). Az ábra az ioncsatornát az extracelluláris oldal felől felülnézetben, nyitott strukturális állapotban ábrázolja.

Az alegységekben az S1-S4 szegmentumok építik fel a membránpotenciál változást érzékelő feszültség szenzort, míg az S5 és S6-os szegmentumok, valamint az ezeket összekötő hurok vesz részt a pórus kialakításában. (2. ábra)



2. ábra: A Shaker típusú káliumcsatornák két egymással szemben fekvő alegységének szerkezete oldalnézetből.

Szerkezeti adatok PDB kódja: 3LUT, 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 fehér színnel jelölt gömbök a káliumionokat reprezentálják. A csillag az úgynevezett „torony régiót” (turret) jelöli, ami kiemelten fontos számos skorpió toxin megkötésében. A strukturális elemek pontos funkciójának magyarázatát lásd a szövegben.

A Shaker csatornák feszültségkapuzott ioncsatornák, ennek megfelelően a depolarizáció jelenti azt a szignált, melynek hatására a csatornák aktiválódnak. 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 feszültség szenzor 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).

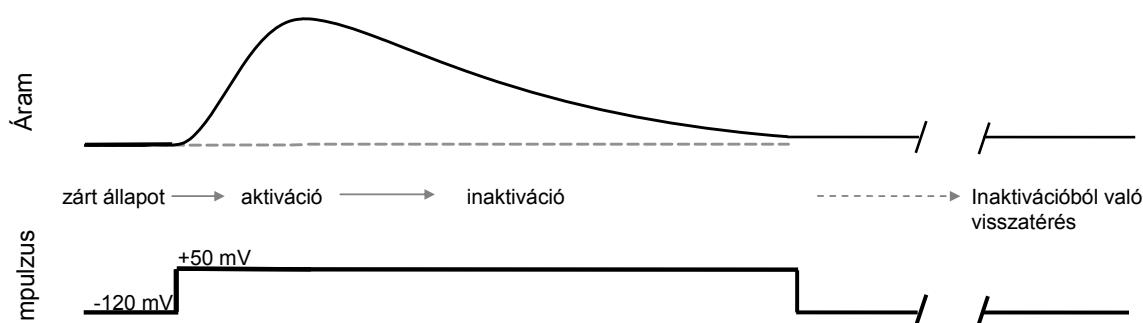
A csatorna pórusát az S5-S6-os szegmentumok és az ezeket összekötő hurok hozza létre. A csatorna pórusrégiója tartalmazza az egyéb kationokkal (pl. Na^+) szembeni K^+ szelektivitást biztosító, GYGD szekvenciát amely a csatorna szelektivitási szűrőjét alkotja (Heginbotham, 1994). Ezt a szekvenciát „signature” szekvenciának is nevezik, mivel ez alapján a különböző káliumcsatornák egyértelműen elkülöníthetők a más ionokra szelektív ioncsatornáktól. A feszültség kapuzott káliumcsatornák kristályszerkezetének tanulsága szerint a csatornák pórusai négy szekvenciális káliumkötőhelyet tartalmaznak (Neyton és mtsai, 1988a; 1988b). Ezen felül egy szintén extracelluláris elhelyezkedésű rehidrációs-dehidrációs kötőhelyet is feltételeznek (Zhou és mtsai, 2001).

Az S5-S6-os szegmentumokat összekötő hurokszekvencia további érdekessége, hogy a csatorna ezen régióján található „torony régió” (2. ábra, csillag) felelős számos peptid típusú gátlószer (skorpió toxin) kötődéséért is, amely kísérletek számos indirekt információt nyújtottak a pórusrégió és a szelektivitási filter struktúrájáról (MacKinnon, 1988; Swartz, 2013). Az így nyert következtetéseket röntgenkristallográfiás kísérletekkel igazolták a *Shaker* családba sorolható Kv1.2 csatorna esetén (Long és mtsai, 2005).

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/ 4. Az N-típusú és a C-típusú inaktiváció bemutatása

Ismert, hogy 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 vezetőképese, így az impulzus során az áramgörbén az inaktiváció kinetikájától függő áramcsökkenés tapasztalható (3. ábra).



3. ábra: Az inaktiváció jelenségét szemléltető sematikus ábra.

Az ábrán egy depolarizáló impulzus alatt létrejövő ion áram sémája látható. A fenntartott depolarizáció során létrejövő strukturális változások révén a csatorna a funkcionálisan nem vezető, inaktivált állapotba kerül. Az inaktivációból való visszatérés csak megfelelő ideig kellően negatív tartófeszültség alkalmazása mellett lehetséges (bővebb magyarázat a szövegben).

Az inaktivált állapotban levő csatornára továbbá az is jellemző, hogy a depolarizációt követően meghatározott ideig, kellően negatív membránpotenciál jelenléte szükséges ahhoz, hogy az inaktivációból való visszatérés megvalósuljon, így 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 káliumáram megváltoztatása révén számos jelátviteli folyamat szabályzásában, így például az akciós potenciálok alakjának és frekvenciájának (Geiger és mtsai, 2000) szabályzásában, vagy a T-limfociták aktivációjának szabályzásában is. A vad típusú *Shaker* csatorna, illetve a *Shaker* típusú csatornák döntő többsége esetén az inaktiváció alapvetően két különböző módon jöhet létre, N-típusú, vagy C-típusú inaktiváció révén. A

kétféle inaktiváció mechanizmusa jelentősen különbözik egymástól, ezt jelzi az is, hogy az inaktiváció kinetikáját jellemző inaktivációs időállandók, illetve a csatornák inaktivációból való visszatérését jellemző időállandók nagyságrendekkel különböznek egymástól (Zagotta és mtsai, 1990).

Először az N-típusú inaktiváció folyamatát mutatom be, amely egy kinetikailag igen gyors inaktivációt tesz lehetővé. Az N-típusú inaktiváció folyamatában a csatorna alegységeinek N-terminális részét képező inaktivációs labdák játsszák a kulcsszerepet, melyeket a 6-46-os pozícióban található aminosavak hoznak létre (Hoshi és mtsai, 1990). Shaker csatorna homotetramer felépítése révén mindegyik alegységén rendelkezik egy inaktivációs labdával. Bizonyítottan mindig csak az egyik inaktivációs labda vesz részt az inaktivált állapot kialakításában, mintegy belülről eltömítve a csatorna pórusát (MacKinnon és mtsai, 1993). Az egyes inaktivációs labdák között negatív kooperáció figyelhető meg (Hashimoto és mtsai, 2000). A folyamatban az inaktivációs labdák szerepét az teszi egyértelművé, hogy ezen peptid szakaszok enzimatisztikus eltávolításával az N-típusú inaktiváció folyamata meggátolható, illetve ezt követően a rendszerhez kívülről visszaadva az inaktivációs labdákat, az újból kialakítható (Antz és mtsai 1999). További jellegzetesség, hogy intracellulárisan alkalmazott pórusblokkolókkak (pl. TEA⁺) az N-típusú inaktiváció folyamata lassítható, illetve meggátolható, ami az inaktivációs labda és az adott pórusblokkoló szomszédos, részben átfedő pórusbeli kötőhelyeivel magyarázható (Choi és mtsai 1991). Az inaktivációs labdán kívül bizonyos csatornához kapcsolódó béta alegységeken található inaktivációs domének is képesek N-típusú inaktivációt létrehozni, a fentebb részletezett mechanizmushoz hasonlóan (Morales és mtsai, 1995).

Az N-típusú inaktivációval szemben a C-típusú inaktivációhoz vezető pontos molekuláris mechanizmusok nem ismertek. 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. Valószínűnek látszik, hogy a konformációváltozás a szelektivitási szűrő régióját érinti, ezáltal a C-típusú inaktiváció során a csatorna ion szelektivitásának megváltozik. Ezt támasztja alá számos korábbi kísérlet, amely során az inaktivált állapotban levő csatornán jelentős Na⁺ áramot tapasztaltak (Starkus és mtsai, 1997). Így egyre inkább háttérbe szorul az az elképzelés, ami szerint az inaktiváció a csatorna pórusának összeeséséhez vezet (Yellen és mtsai, 1994). A mechanizmust tekintve bizonyítást nyert, hogy a C -típusú inaktivációt a csatornát alkotó négy alegység megfelelő részei kooperatív módon hozzák létre (Panyi és mtsai, 1995), ami magyarázatot adhat arra,

hogy a C -típusú inaktiváció kinetikáját tekintve lényegesen lassabb folyamat, mint a fentebb bemutatott N-típusú inaktiváció.

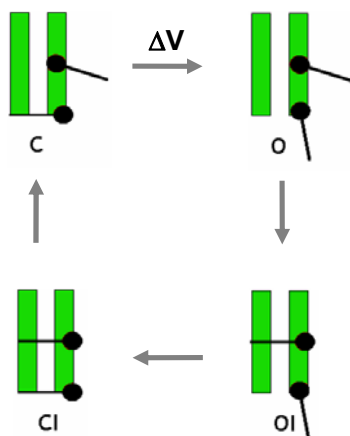
A C-típusú inaktiváció sebessége számos tényezővel mutat összefüggést. Ezek közül kiemelendő a *Shaker* csatorna 449-es pozíciójában található aminosav minősége. Ha az ebben a pozícióban eredetileg megtalálható treonint alaninra cserélik az inaktiváció jelentősen gyorsul, míg a hisztidinnel, vagy más aromás aminosavval történő csere az inaktiváció lassulását eredményezi (Lopez-Barneo és mtsai, 1993). Továbbá ismert tény, hogy az N-típusú inaktiváció (Baurkowitz és mtsai, 1995) és bizonyos intracelluláris pórusblokkolók (Baurkowitz és mtsai, 1996) gyorsítják a C-típusú inaktiváció sebességét, míg az extracelluláris kálium koncentráció növelésével az inaktiváció lassulása figyelhető meg (Grissmer és mtsai, 1989). Ezek a megfigyelések azzal magyarázhatók, hogy a csatorna a pórusban szekvenciálisan elhelyezkedő K^+ kötőhelyek közül a legkülső kötőhely telítettsége gátolja a C-típusú inaktivációhoz vezető molekuláris átrendeződéseket, egy hasonlattal élve úgy, mint egy láb az ajtó becsukódását („foot-in-the-door” mechanizmus) (Baurkowitz és mtsai, 1996).

A *Shaker* családba sorolható ioncsatornák egy része, mindkét inaktivációs mechanizmus révén inaktiválódhat, míg kiemelendő, hogy a limfociták domináns kálium csatornája, a Kv1.3 ioncsatorna kizárólag C-típusú inaktivációt mutat, ugyanis nem rendelkezik N-terminális inaktivációs labdákkal. Ezek alapján belátható, hogy a *Shaker* típusú káliumcsatornák kapuzásának és a C-típusú inaktiváció folyamatának pontos megértése miatt áll számos kutatás középpontjában.

IV. PROBLÉMAFELVETÉS, CÉLKITŰZÉS

A feszültség kapuzott káliumcsatornák szerkezet-funkció kutatása során szerzett strukturális ismeretek jelentős része röntgenkristallográfiás kísérletekből származik, így logikus lenne a C-típusú inaktiváció során létrejövő molekuláris változásokat is ezzel a módszerrel tanulmányozni. Ezeknek a kísérleteknek a kivitelezését meggátolja az a tény, hogy az inaktivált állapotban levő káliumcsatornát többszöri próbálkozás ellenére sem lehetett a röntgenkristallográfiás kísérletekhez kristályosítani. Így került előtérbe a pontos szerkezet meghatározásában az általunk is alkalmazott patch-clamp technika, amely segítségével különböző mutáns csatornákat felhasználva az ionáramok mérésével a különböző szerkezeti változások indirekten nyomon követhetővé válnak.

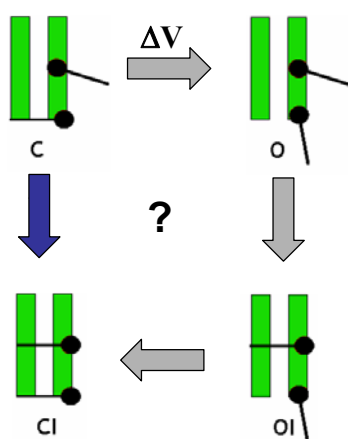
A C-típusú inaktiváció tanulmányozása céljából az általam használt, „Anyagok és módszerek fejezetben” részletesen bemutatandó, több mutációt is tartalmazó T449A/V474C *Shaker* csatorna két kapuval, az aktivációs és a C-típusú inaktivációért felelős inaktivációs kapuval rendelkezik. Méréstechnikai szempontból fontos, hogy N-típusú inaktiváció kialakításáért felelős inaktivációs labdákat alkotó aminosavakat kódoló részek a csatorna kialakításakor eltávolításra kerültek, ennek megfelelően a csatorna kizárólag C-típusú inaktiváció révén inaktíválódhat. Ezek alapján a csatorna aktivációs és inaktivációs kapujának aktuális állapotát figyelembe véve a legegyszerűbb esetben egy összesen négy strukturális állapotot tartalmazó kapuzási modell állítható fel. A 4. ábrán az „O” az aktivációs kapu nyitott (open) állapotát, a „C” annak zárt (closed) állapotát jelöli, míg az „I” jelölés mellett az inaktivációs kapu zárva van, a csatorna így inaktivált állapotban található. Ezen állapotok közül egyedül a nyitott strukturális állapot vezető, ugyanis bármelyik kapu záródása meggátolja a csatornán keresztüli káliumion áramlást.



4. ábra: Az egyszerűsített négy állapotos kapuzási modell.

Az ábra a zárt (C), nyitott (O), nyitott inaktívált (OI), és zárt inaktívált (CI) állapotok közti átmenetet mutatja. A zárt és nyitott állapot közti átmenetet az adott ioncsatorna aktivációs küszöbének megfelelő depolarizáció jelenti (ΔV). Fenntartott depolarizáció hatására a csatorna az inaktívációs kapu záródásával inaktíválódik, majd ezt követően meghatározott ideig, kellően negatív membránpotenciál mellett a csatornák az inaktívációs kapu nyitásával visszatérnek a kiindulási zárt állapotba.

Korábban bizonyítást nyert, hogy a *Shaker* csatorna aktivációs és a C-típusú inaktívációs kapui csatoltak egymással olyan módon, hogy az inaktívációs 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). Azért, hogy közelebb kerüljünk a C-típusú inaktívációs kapuzás folyamatának pontos megértéséhez, jelen munkám során arra kerestem a választ, hogy az inaktívációs kapu képes-e az aktivációs kaputól függetlenül mozogni, azaz létrejöhet-e az inaktíváció közvetlenül a zárt állapotból (5. ábra kék nyíl), vagy a másik út járható, melynek értelmében az aktivációs kapu nyitása megelőzi az inaktívációs kapu záródását (5. ábra szürke nyilak). Ez több tényező miatt is fontos kérdés, ugyanis azon túl, hogy hozzájárul a C-típusú inaktíváció során bekövetkező molekuláris változások pontosabb megismeréséhez, az inaktívált állapotban levő csatorna szerkezetének megismerésével megnyílik a lehetőség a csatorna ezen állapotára specifikus gyógyszermolekulák tervezésére (Panyi és mtsai, 2007).

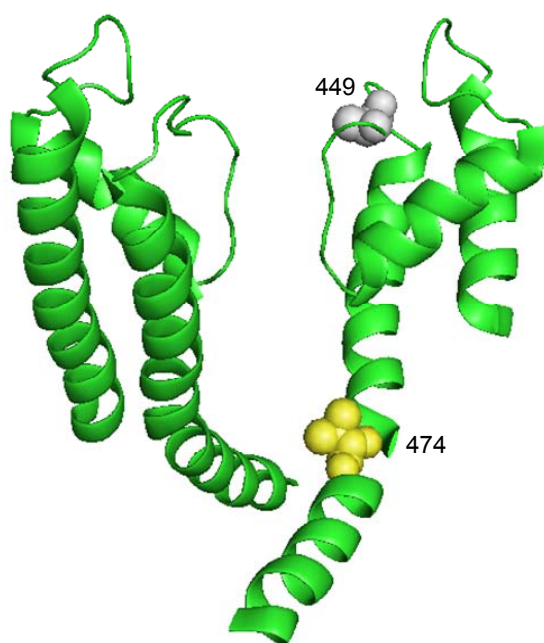


5. ábra: Célkitűzésem összegzése.

A pályamunkában bemutatott kísérletek központi kérdése az, hogy a C-típusú inaktívációs kapuzáshoz vezető molekuláris átrendeződések csak az aktivációs kapu mozgása mellett (szürke nyilak) jöhetnek létre, vagy az aktivációs kapu mozgásától függetlenül is bekövetkezhettek (kék nyíl).

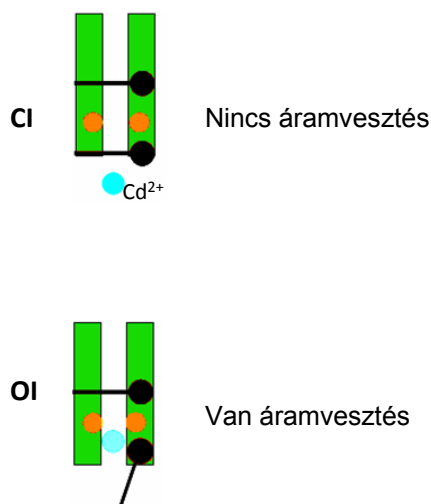
Azért, hogy pontosan tudjuk az aktivációs kapu nyitását vizsgálni, a méréseinkhez használt T449A/V474C mutáns *Shaker* csatornában az S6-os transzmembrán helikális szegmentumok aktivációs és inaktivációs kapu között elhelyezkedő, 474-es pozíciójú aminosavait ciszteinekre cserélték (6.ábra, A panel). Ez a pozíció a nyitott állapotú csatornában a pórus felé tekint. Kísérleteink alapja, hogy ezek a ciszteinek kizárólag nyitott aktivációs kapu mellett hozzáférhetők az intracelluláris oldal felől alkalmazott anorganikus Cd^{2+} számára (6.ábra, B panel).

A panel



T449A/ V474C

B panel



6. ábra: A kísérletek során alkalmazott T449A/ V474C mutáns *Shaker* csatorna felépítése (A panel); a cisztein modifikációs kísérletek elve (B panel).

A panel: 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 hurokszekvenciát mutatja (Kv1.2 ioncsatorna, 325-421. aminosav). Az egyik alegységen sárga színnel a *Shaker* csatorna 474-es pozíciójával homolog aminosavat jelöltem, míg a szürke szín a 449-es pozícióval homolog aminosavat emeli ki. Az előbbi pozíciókba helyezett ciszteinek biztosítják a Cd^{2+} kötődését, míg az utóbbi mutáció a C-típusú inaktiváció kinetikájának gyorsítása céljából került alkalmazásra. **B panel:** A homotetramer mutáns csatorna 474-es pozíciójú ciszteinjeihez a Cd^{2+} kizárólag az aktivációs kapu nyitása mellett képes kötődni, zárt aktivációs kapu mellett nem. A kötődés következtében az érintett csatornák

konduktanciája irreverzibilisen megszűnik, így az aktivációs kapu nyitása esetén áramvesztést tapasztalunk, míg a zárt állapotból közvetlenül végbemenő inaktiváció esetén ez az áramvesztés elmarad.

A Cd^{2+} kötődése a cisztein oldalláncokhoz irreverzibilis és a konduktancia elvesztését eredményezi, így a létrejövő modifikáció, ami csak az aktivációs kapu nyitása mellett lehetséges, az ionáramok mérésével monitorozhatóvá válik. A Cd^{2+} kötődéséhez legalább három 474-es pozíciójú ciszteinre van szükség (Liu és mtsai, 1997). Az elektrofiziológiai kísérletek során alkalmazott mérési protokoll felépítését lásd az „Eredmények” egységben.

V. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

V/ 1. A T449A/V474C mutáns ioncsatorna felépítése

A kísérletek során használt T449A/V474C mutáns ioncsatornát kódoló plazmidot Prof. Carol Deutsch és munkatársai biztosították számunkra (Department of Physiology, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA).

A mutáns csatorna 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, ezáltal elkerülhető ezek Cd^{2+} -mal történő zavaró reakciója a cisztein modifikációs kísérletek során (Holmgren és mtsai 1996). A következő mutáció a C-típusú inaktiváció kinetikáját nagymértékben meghatározó 449-es pozícióban található treonin alaninra történő cseréjét jelentette, ami jelentősen gyorsítja a C-típusú inaktiváció sebességét, lehetővé téve annak tanulmányozását (Lopez-Barneo és mtsai, 1993). Az így felépülő konstruktban a kísérleti stratégia szempontjából fontos 474-es pozíciójú valinokat ciszteinekre cserélték, így jött létre a kísérleteim során alkalmazott homotetramer T449A/V474C mutáns *Shaker* csatorna.

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

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

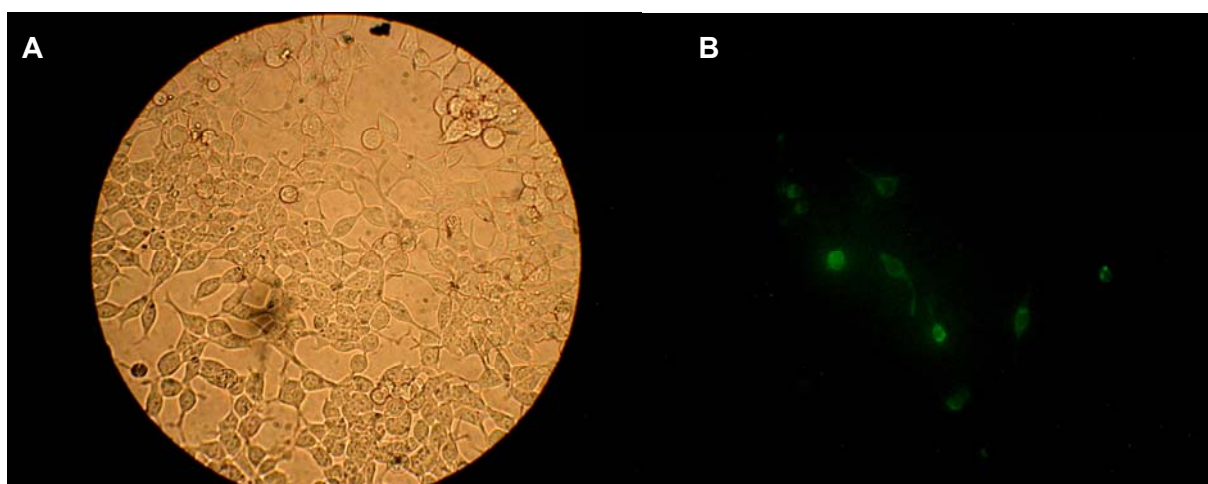
A transzfekciót megelőző napon a sejteket 60x15 mm-es petrikbe helyeztem, hígítási sort készítve. Másnap a transzfekcióhoz mindig egy 75 %-os konfluenciájú petrit választottam. A sejteket Ca-foszfát precipitációs módszerrel ko-transzfektáltam a T449A/V474C mutáns ioncsatornát kódoló plazmiddal (10 µg), illetve EGFP plazmiddal (1 µg). Mivel tranziens

transzfekciót alkalmaztam a méréseket mindig a transzfekciót követő 12-36 órás időablakban végeztem el. A transzfekciót követően a sejteket 35 mm átmérőjű, a folyamat előtt egy órával előzetesen poly-L-ornitinnel kezelt, majd desztillált vízzel átmosott petrikbe helyeztem, 2 ml tápoldat kíséretében. A poly-L-ornitin alkalmazását az inside-out konfigurációban történő mérés követelte meg. 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 TS-100 invert fluoreszcens mikroszkópot (Nikon Instruments, Melville NY, USA) használtam (7. ábra). Az excitációs szűrő a 455-495 nm-es, az emissziós szűrő az 515-555 nm-es hullámhosszúság tartomány számára volt átjárható. A plazmidok transzfekció során alkalmazott aránya 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.



7. 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.

A mérés során minden esetben igyekeztem olyan sejtet kiválasztani, ami lehetőleg jól elkülönült a környezetében levő sejtektől, mutatta a letapadt tsA-201 sejtekre jellemző nyúlványos morfológiát, továbbá megfelelő fluoreszcens jelet adott.

V/ 4. Elektrofiziológia

A méréseket a patch-clamp technika (Hamill és mtsai, 1981) segítségével, inside-out konfigurációt alkalmazva végeztem. A depolarizáló impulzusok nagyságát munkám során az általam alkalmazott inside-out konfiguráció ellenére, didaktikai szempontból mindvégig az élettani konvencióknak megfelelően tüntettem fel. A cisztein modifikációs kísérletek technikailag megkövetelik az inside-out konfiguráció alkalmazását, mivel a Cd^{2+} nem képes átjutni az ioncsatorna szelektivitási szűrőjén, így az aktivációs és inaktivációs kapu között elhelyezkedő, az S6-os szegmentumok 474-es pozícióiban elhelyezkedő ciszteinek kizárólag a csatorna citoszolikus oldala felől, nyitott aktivációs kapu mellett hozzáférhetők a Cd^{2+} számára.

A mérésekhez Axopatch 200A patch-clamp erősítőt (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, USA) használtam, feszültség-zár üzemmódban, ezáltal a vizsgált sejt membránpotenciálja konstans értéken tartható, miközben a sejtmembránon átfolyó áram nagysága meghatározható. A mérések során Burleigh PCS5000 (Thorlabs Inc., Newton, New Jersey, USA) mikromanipulátort használtam. Az ingerlő feszültség-impulzusokat és az adatgyűjtést IBM kompatibilis személyi számítógép vezérelte Axon Digidata 1200 és 1322A (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, USA) illesztőegységen keresztül a pCLAMP8/10 programcsomag (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, USA) segítségével. Az áramgörbéket 4 pólusú Bessel szűrővel szűrőztem. A mintavételezés frekvenciája, a Nyquist teória értelmében, a szűrők sarkfrekvenciájának legalább kétszerese volt.

Mivel nem minden EGFP pozitív sejt fejezte ki a mutáns ioncsatornákat, 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 sejten van áram. A csúcsáramok értéke általában 400-2000 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 az áramgörbék kerültek kiértékelésre, melyek esetén az egyensúlyi áram nagysága a csúcsáram nagyságának 5%-ánál kisebb volt.

A pipettákat boroszilikát üvegapillárisokból húztam 5 fázisban. A pipetták ellenállása az alkalmazott oldatok esetén 3-4 M Ω volt.

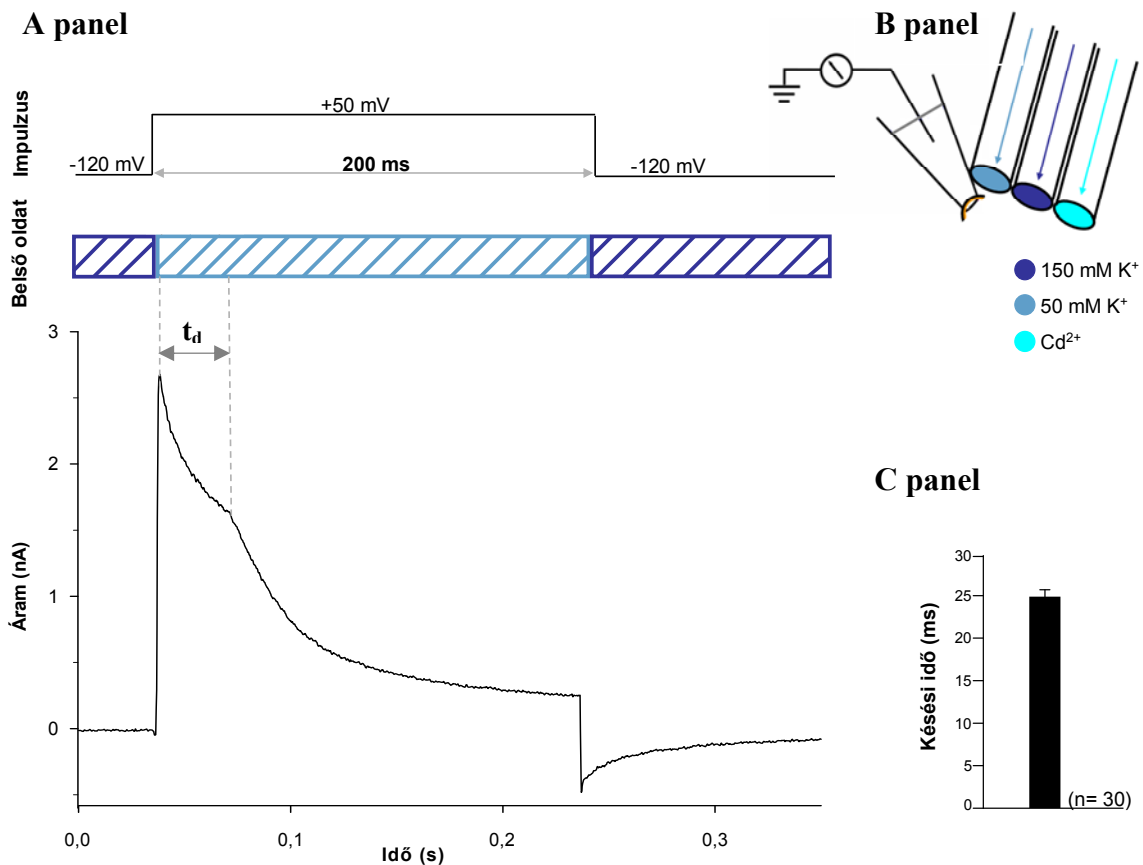
A méréseket minden esetben szobahőmérsékleten (22-25 °C) végeztem.

V/ 5. Oldatok, perfúziós rendszer

Az általam alkalmazott inside-out konfigurációnak megfelelően a pipetta tartalmazta a külső oldatot, melynek pontos összetétele mind a kontroll, mind a Cd²⁺ jelenlétében történő mérések során az alábbi volt: 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 1,5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES. A kontroll mérések során belső oldatként (●) egy 105 mM KF, 35 mM KCl, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES tartalmú oldatot alkalmaztam. A Cd²⁺ alkalmazása mellett történő mérések során a belső oldat (●) összetétele az alábbi volt: 105 mM KF, 35 mM KCl, 10 mM HEPES, illetve 20 μ M Cd²⁺ vagy 200 μ M Cd²⁺. Az EGTA ebben az esetben azért került kihagyásra, mivel az képes megkötni a Cd²⁺-ot. A Cd²⁺-ot tartalmazó oldatokat a mérések megkezdése előtt egy 4°C-on tárolt, 100 mM-os koncentrációjú törzsoldatból a méréseket megelőzően frissen keverttem ki. Minden oldat pH-ját egységesen 7,38-ra állítottam be.

Az intracelluláris oldatokat egy a gravitáció által hajtott, gyorsperfúziós rendszer (SF-77A Perfusion Fast-Step system; Warner Instruments, Hamden, USA) segítségével vezetem az inside-out patchre, 0,5 ml/perces ütemben, folyamatos elszívás biztosítása mellett. A perfúziós rendszer kimeneti oldalát egy hasáb alakú, három részre osztott perfúziós fej adta.

A mérések során minden egyes patch esetén először egy perfúzió tesztet végeztem, amely révén a perfúziós rendszer oldatváltásának a ténye, illetve az oldatcsere késési ideje az adott mérés esetén pontosan meghatározhatóvá válik. A perfúzió teszt lényege, hogy a +50 mV-os impulzus alatt a kontroll belső oldathoz képest kisebb K⁺ koncentrációjú belső oldatra (●) (50 mM KF, 65 mM NaCl, 35 mM NaF, 10 mM HEPES, pH= 7,38) váltva megváltozik a kémiai hajtóerő, így az impulzus alatt kapott áramgörbe alapján az oldatváltás ténye és a depolarizáló impulzussal egy időben elindított perfúziós rendszer pozíció váltásának késési ideje meghatározhatóvá válik (8. ábra).



8. ábra: A perfúzió teszt során alkalmazott kísérleti protokoll felépítése az aktuálisan alkalmazott belső oldatok feltüntetésével.

Az impulzus során kapott áramgörbén jól látható az oldatváltás valós ideje, illetve az oldatváltás ténye az ionáramlást meghatározó elektrokémiai gradiens változása révén (A panel). A perfúziós rendszer kimeneti oldalát egy három részre osztott perfúziós fej adta (B panel). A C panelen levő oszlopdiagrammon a perfúziós rendszer pozícióváltásának késési idejét (t_d) tüntettem fel, az átlagérték közepes hibájával adott esetszám mellett (n).

Az oldatok elkészítése során Sigma Aldrich gyári készítményeket használtam, (Sigma Aldrich, Budapest, Magyarország).

V/ 6. Adatok értékelése

Az eredmények kiértékeléséhez a pClamp8/10 program csomagot használtam (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, USA). A mérés során kapott áramgörbéket kiértékelés során először korrigáltam az adott impulzus előtti -120 mV-os tartófeszültség mellett meghatározott ohmikus szivárgási áram értékével.

Az „Eredmények” fejezet V/2. alfejezetében az egyes függvények illesztése a Marquardt-Levenberg-algoritmus segítségével történt.

A mérési adatok közlésénél az átlagértéket és annak közepes hibáját (SEM) adtam meg adott mérési szám (n) mellett. A mérési eredményeket reprezentáló ábrákat a SigmaPlot 10.0 programmal szerkesztettem.

Az eredmények statisztikai elemzése a pályamunkában mindvégig a Student-féle kétoldali egymintás t-próba elvégzésével történt, 5%-os szignifikancia szint mellett. Az aktuális p értékek minden statisztikai próbánál külön megjelölésre kerültek. A szignifikáns eltéréseket a pályamunkában csillaggal (★) jelöltem.

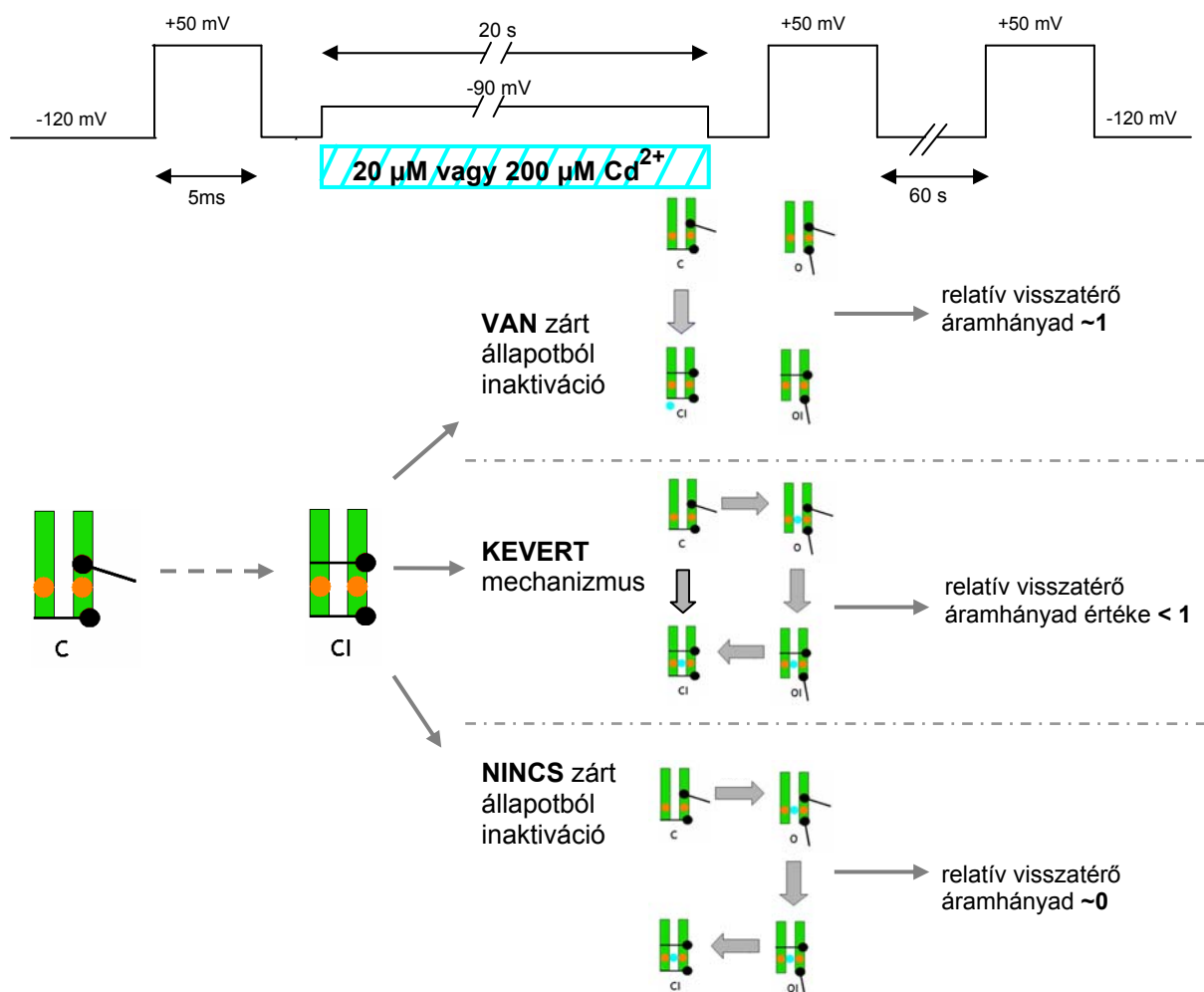
V/ 7. Molekula szerkezeti ábrák

A pályamunka során bemutatott, a *Shaker* csatorna felépítését szemléltető szerkezeti ábrákat a Pymol program segítségével szerkesztettem. A szerkezeti adatok PDB 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

VI/ 1. A patch-clamp mérések során alkalmazott kísérleti protokoll felépítése

A kontroll és az aktivációs kapu nyitását monitorozó Cd^{2+} -os mérések során alkalmazott kísérleti protokollok alapja három „lépcső”, ami három, egyenként 5 ms hosszúságú +50 mV-os depolarizáló impulzust jelent (9. ábra). Az első és a második impulzus között 20 s-ig a patchet a kontroll mérések során előbb Cd^{2+} hiányában, majd a modifikációs mérések során 20 μM , vagy 200 μM -os Cd^{2+} koncentráció mellett -90 mV-os tartófeszültségen tartottam, amely membránpotenciálon az előzetes biofizikai karakterizálás alapján makroszkópos áram nem volt detektálható, viszont a csatornák inaktivációja már megfigyelhető (lásd még a 10. ábrán). A második impulzust követően, mindkét esetben 60 s-on keresztül -120 mV-os tartófeszültséget alkalmaztam, ami elegendő a csatornák inaktivált állapotból zárt állapotba való visszatéréséhez. Ezt követte a harmadik depolarizáló impulzus.



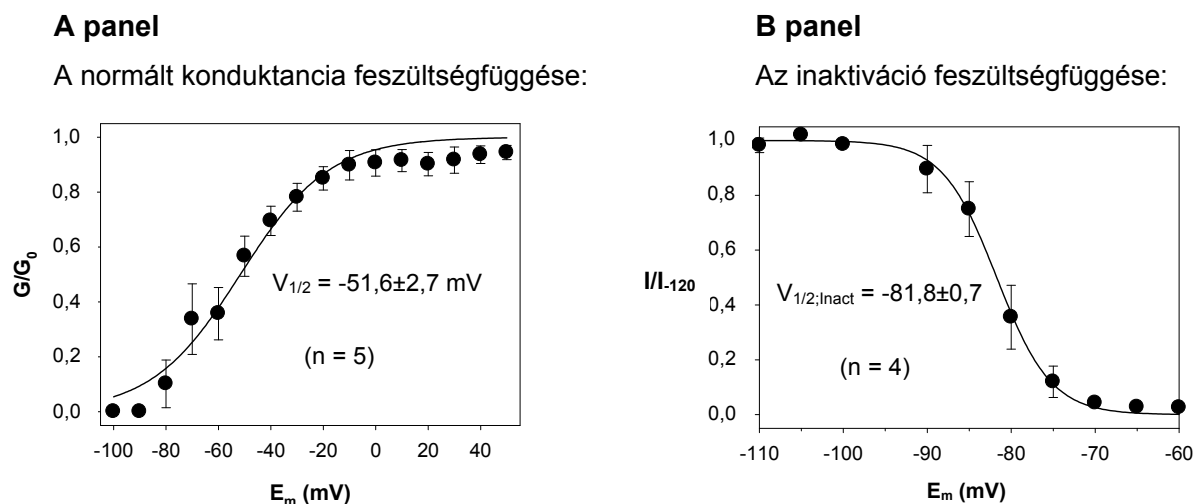
9. ábra: A kontroll és az aktivációs kapu nyitását monitorozó Cd^{2+} -os kísérletek során alkalmazott mérési protokollok felépítése, a kísérleti stratégia bemutatása mellett.

Az egyes depolarizáló impulzusok során kapott csúcsáramok (I_1 , I_2 és I_3) felhasználásával a későbbiekben az $(I_3 - I_2) / (I_1 - I_2)$ képlet segítségével határoztam meg a relatív visszatérő áramhányad értéket, amely paraméter jól reprezentálja azt, hogy az első és második impulzus közötti csúcsáram veszteség mekkora hányadát kapjuk vissza a harmadik impulzus során. Ezáltal az ábrán bemutatott módon a relatív visszatérő áramhányad értéke alapján következtethetünk az első és második impulzus közötti inaktiváció mechanizmusára. Amennyiben az inaktivációs kapu záródása az aktivációs kapu nyitása nélkül bekövetkezhet a Cd^{2+} nem tud bekötődni, így nem tapasztalunk csúcsáram veszteséget, a relatív visszatérő áramhányad értéke közel 1. Ellenkező esetben, ha zárt állapotból az inaktiváció nem lehetséges, a 474-es pozíciójú ciszteinekhez kötődő Cd^{2+} a mutáns ioncsatornák konduktanciájának irreverzibilis elvesztését eredményezi, ami a harmadik impulzus során csúcsáram veszteséghoz vezet, a relatív visszatérő áramhányad értéke pedig a 0-hoz közelít. A harmadik lehetőség, hogy az inaktiváció a zárt és a nyitott állapotból egyaránt megvalósulhat. Ebben az esetben a harmadik impulzus során szintén csúcsáram veszteséget tapasztalunk, aminek a mértéke kisebb, összevetve a kizárólag nyitott állapotból megvalósuló inaktiváció esetén tapasztalhatóval.

A harmadik impulzus során kapott csúcsáram nagyságából következtethetünk az első és a második impulzus között kialakuló inaktiváció mechanizmusára. Amennyiben az inaktivációs kapu záródása az aktivációs kapu nyitása nélkül is bekövetkezhet a Cd^{2+} nem tud bekötődni, így nem tapasztalunk csúcsáram veszteséget. Ha az inaktiváció csak az aktivációs kapu nyitása mellett lehetséges, a 474-es pozíciójú ciszteinekhez kötődő Cd^{2+} a mutáns ioncsatornák konduktanciájának irreverzibilis elvesztését eredményezi, ami a harmadik impulzus során jelentős csúcsáram veszteséghoz vezet. A harmadik lehetőség egy olyan kevert mechanizmus, amely során az inaktiváció mind a zárt, mind pedig a nyitott állapotból bekövetkezhet. Ebben az esetben a Cd^{2+} bizonyos inaktivált csatornákhöz képes hozzákötődni, míg más csatornákhöz nem, így ebben az esetben is tapasztalunk csúcsáram csökkenést a harmadik impulzus során, aminek mértéke viszont kisebb lesz összevetve a kizárólag nyitott állapotból megvalósuló inaktiváció esetén tapasztalhatóval. Az eredmények értékelése során mind a kontroll, mind pedig a Cd^{2+} alkalmazása mellett végzett mérések esetén az $(I_3 - I_2) / (I_1 - I_2)$ képlet segítségével (ahol I_1 , I_2 és I_3 az impulzusok során kapott csúcsáramokat jelölik) határoztam meg a relatív visszatérő áramhányad értékét, amely jól reprezentálja azt, hogy az első és második impulzus közötti áramvesztés mekkora hányadát nyerjük vissza a harmadik impulzus során. Ezáltal ennek a paraméternek az értéke jól mutatja az első és második impulzus közötti inaktiváció mechanizmusát. Ha van zárt állapotból inaktiváció a relatív visszatérő áramhányad értéke közel 1, ha nincs zárt állapotból inaktiváció akkor közel 0, míg egy esetleges kevert mechanizmus esetén egy köztes értéket vesz fel.

VI/ 2. A T449A/V474C mutáns ioncsatorna biofizikai jellemzése

A fentebb bemutatott kísérleti protokoll tervezésekor mindvégig figyelembe vettük a T449A/V474C mutáns ioncsatorna kapuzását jellemző biofizikai paramétereket. A mutáns csatorna biofizikai karakterizációját a kísérleteimet megelőzően témavezetőim, Dr. Szántó G. Tibor és Prof. Dr. Panyi György, végezték el (lásd „Függelék” megfelelő része). Pályamunkámban a konduktancia feszültségfüggését és az inaktiváció feszültségfüggését jellemző paraméterek részletes bemutatását azzal indoklom, hogy ezek alapján került kiválasztásra az első és második impulzus között alkalmazott -90 mV-os tartófeszültség, amely membránpotenciálon az biofizikai karakterizálás alapján makroszkópos áram nem detektálható, viszont a csatornák inaktivációja megfigyelhető. Ezt a 10. ábra szemlélteti. Ezen a membránpotenciálon makroszkópos áramot a csatornák alacsony nyitási valószínűsége, illetve az alacsony elektrokémiai potenciál miatt nem látunk, így az aktivációs kapu nyitása során létrejövő ionáramot közvetlenül nem tudjuk mérni. Ezért szükséges a „Célkitűzésekben” bemutatott kísérleti stratégiát alkalmaznunk, amikor is az aktivációs kapu nyitását indirekten, a 474-es pozíciójú ciszteinek Cd^{2+} általi sikeres modifikációja révén mérjük. A biofizikai jellemzők meghatározását szolgáló kísérletek során alkalmazott mérési körülmények (sejt, transzfekció, inside-out konfiguráció, külső oldat, kontroll belső oldat) az „Anyagok és módszerek” részben bemutatottakhoz hasonlóak voltak.



10. ábra: A T449A/V474C mutáns ioncsatorna konduktanciájának és inaktivációjának feszültségfüggése.

A panel: A normált konduktancia feszültségfüggésének meghatározásához -100-tól +50 mV-ig terjedő 300 ms hosszúságú impulzusokat alkalmaztak 10 mV-os lépésközökkel, az impulzusok közti idő pedig 60 s volt. Az így kapott áramgörbékből a $G = I/(E_m - E_{rev})$ összefüggés segítségével határozták meg az

adott tesztpotenciálhoz tartozó konduktancia értéket (G), ahol E_m a membránpotenciál a depolarizáló impulzus alatt, E_{rev} pedig a Nernst-egyenletből számított K^+ egyensúlyi potenciál, majd az egyes konduktancia értékeket a legnagyobb értékre (G_0) normálták. Ezt követően ábrázolták a normált konduktancia értékeket az alkalmazott tesztpotenciál függvényében. Az ábrázolt adatpontokhoz Boltzmann-függvényt, $G_{norm} = \frac{1}{1 + e^{-\frac{V - V_{1/2}}{k}}}$ illetve határozták meg a félaktivációs feszültség ($V_{1/2}$)

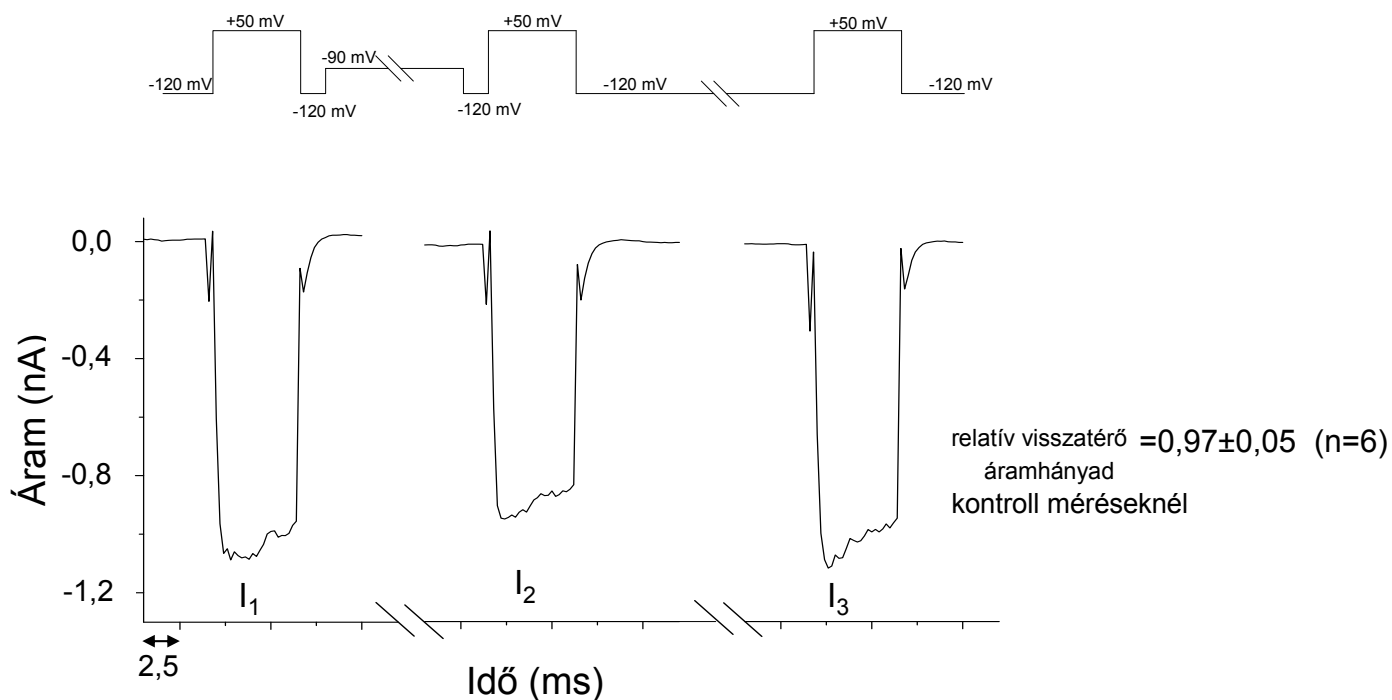
átlagértékét és annak közepes hibáját (SEM) adott mérési szám (n) mellett.

B panel: Az inaktiváció feszültségfüggésének meghatározása során azt határozták meg, hogy adott membránpotenciálon tartva a csatornák mekkora hányada kerül az inaktivált állapotba. Az alkalmazott protokoll alapja két +50 mV-os impulzus pár. Köztük 20 s-ig a tartófeszültséget -110 mV-tól -60 mV-ig, 5 mV-onként változtatták, az impulzuspárok között 60 s-ig -120 mV-os tartófeszültséget alkalmaztak. Ezt követően, az így kapott csúcsáramokból (az impulzuspár első impulzusa I_{120} , második impulzus I) képzett hányadost az aktuális tartófeszültség függvényében ábrázolták. Az ábrán a félinaktivációs feszültség ($V_{1/2, \text{inact}}$) átlagértékét és annak közepes hibája (SEM) került feltüntetésre, adott mérési szám (n) mellett. Az adatpontokhoz a $I/I_{120} = \frac{1}{1 - e^{-\frac{V - V_{1/2, \text{inact}}}{k}}}$ függvény került illesztésre.

A két ábra alapján jól látható, hogy -90 mV-os membránpotenciálon makroszkópos áram még nem látható, viszont a csatornák inaktivációja már megfigyelhető, ezért a későbbiekben ezt a tartófeszültséget alkalmaztuk kísérleteink során az első és második impulzus között az inaktivált állapot létrehozásához.

VI/ 3. Kontroll körülmények során kapott eredmények

A kísérletek elvégzése során először a kontroll méréseket végeztem el. A 11. ábra az egyes depolarizáló impulzusok során kapott áramgörbéket mutatja. Látható, hogy a második impulzus során áramcsökkenés következik be a csatornák bizonyos hányadának -90 mV-os tartófeszültségen bekövetkező inaktivációja miatt. Ezt az inaktivációt viszont a második és harmadik impulzus között 60 s-ig alkalmazott -120 mV-os tartófeszültség megszünteti, így az előzetes várakozásoknak megfelelően a harmadik impulzus során megközelítőleg visszakapjuk az első impulzus során tapasztalt csúcsáramot.



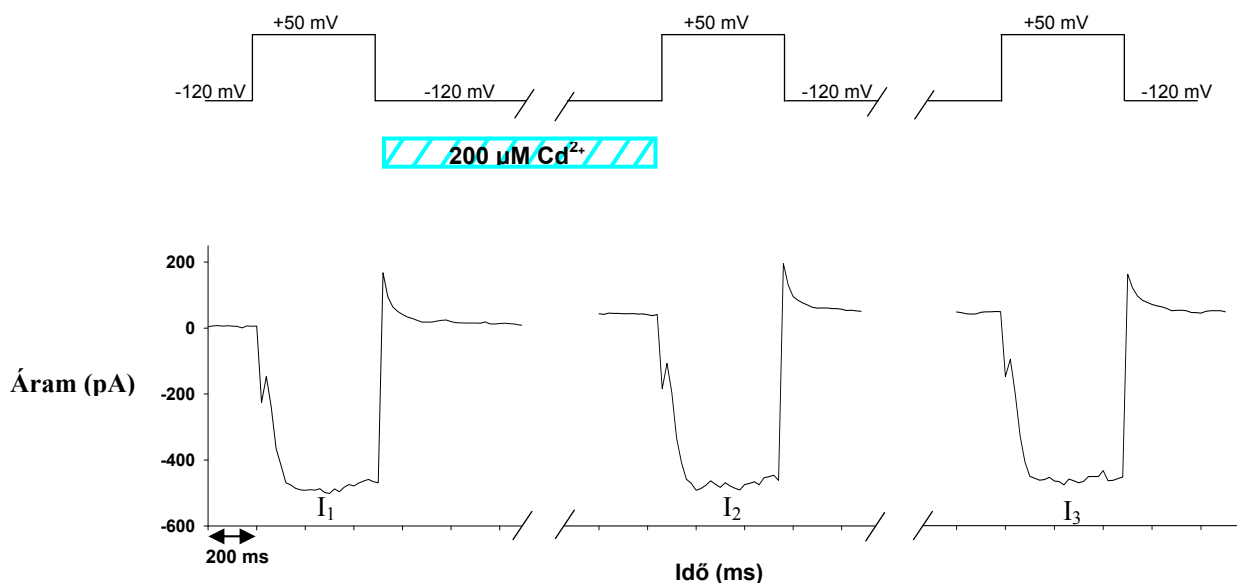
11. ábra: A kontroll körülmények során kapott eredmények.

Az ábrán a fentebb bemutatott mérési protokoll során kapott áramgörbéket tüntettem fel kontroll körülmények között. Az egyes depolarizáló impulzusok során kapott csúcsáramokat I_1 , I_2 és I_3 jelöli. Ezeket felhasználva az $(I_3 - I_2) / (I_1 - I_2)$ képlet segítségével határoztam meg a relatív visszatérő áramhányad értéket. Az eredmény megadásánál feltüntettem az átlagérték közepes hibáját (SEM) adott mérési esetszám (n) mellett.

Az eredmények kiértékelése során az impulzusok alatt kapott csúcsáramokat az ohmikus szivárgási áram aktuális értékével korrigáltam, majd az így nyert adatok felhasználásával az $(I_3 - I_2) / (I_1 - I_2)$ összefüggés segítségével határoztam meg a relatív visszatérő áramhányad értékét. A képletben I_1 , I_2 és I_3 rendre az egyes depolarizáló impulzusok során kapott, ohmikus szivárgási áramra korrigált csúcsáramok nagyságát jelölik mind a kontroll, mind pedig a később bemutatandó, aktivációs kapu nyitását monitorozó Cd^{2+} -os mérések során. A relatív visszatérő áramhányad értéke jól reprezentálja azt, hogy az első és második csúcsáram közötti áramveszteség mekkora hányadát nyerjük vissza a harmadik impulzus során. Mivel a kontroll mérések esetén a második impulzus során tapasztalt csúcsáram veszteség csak az inaktiváció révén jöhet létre, amit a második és harmadik impulzus között alkalmazott negatív tartófeszültség megszüntet, így a relatív visszatérő áramhányad értéke a kontroll mérések során közel 1-nek adódott. Ezt igazolta az elvégzett kétoldali egymintás t-próba is, ami

alapján kijelenthető, hogy 5 %-os szignifikancia szint mellett a kontroll mérések során a relatív visszatérő áramhányad értéke szignifikánsan nem különbözik az 1-től ($p > 0,25$).

A későbbiekben egy másik kontroll kísérletet is elvégeztem, amelynek célja annak bizonyítása, hogy a Cd^{2+} kizárólag a nyitott állapotú ioncsatornához képes hozzákötődni. A 12. ábra alapján látható, hogy amennyiben a csatornákat egy olyan membránpotenciálon, esetünkben -120 mV -on tartjuk, ahol a csatorna aktivációja a konduktancia feszültségfüggésének alapján nem valósul meg, a csatornák zárt állapotban vannak. Ennek megfelelően a második impulzus során inaktivált állapot levő csatornák arányát reprezentáló I_2/I_1 arány $0,923 \pm 0,071$ ($n=2$). Azt, hogy a Cd^{2+} a zárt állapotban levő csatornához nem képes hozzákötődni az I_2/I_1 arányon túl, az I_3/I_1 arány, $0,982 \pm 0,016$ ($n=2$) jelzi. Ezen túl ez a kísérlet biztosít minket arról, hogy a Cd^{2+} az általunk alkalmazott legmagasabb koncentrációban nem „toxikus” az ioncsatorna fehérjére. Az eredmények kiértékelése a pályamunkában bemutatottakhoz hasonlóan történt. Ez a kísérlet a pályamunka Bíráló javaslatára került be a pályamunka törzsszövegébe, a mérési esetszámok növelését a későbbiekben tervezzük.

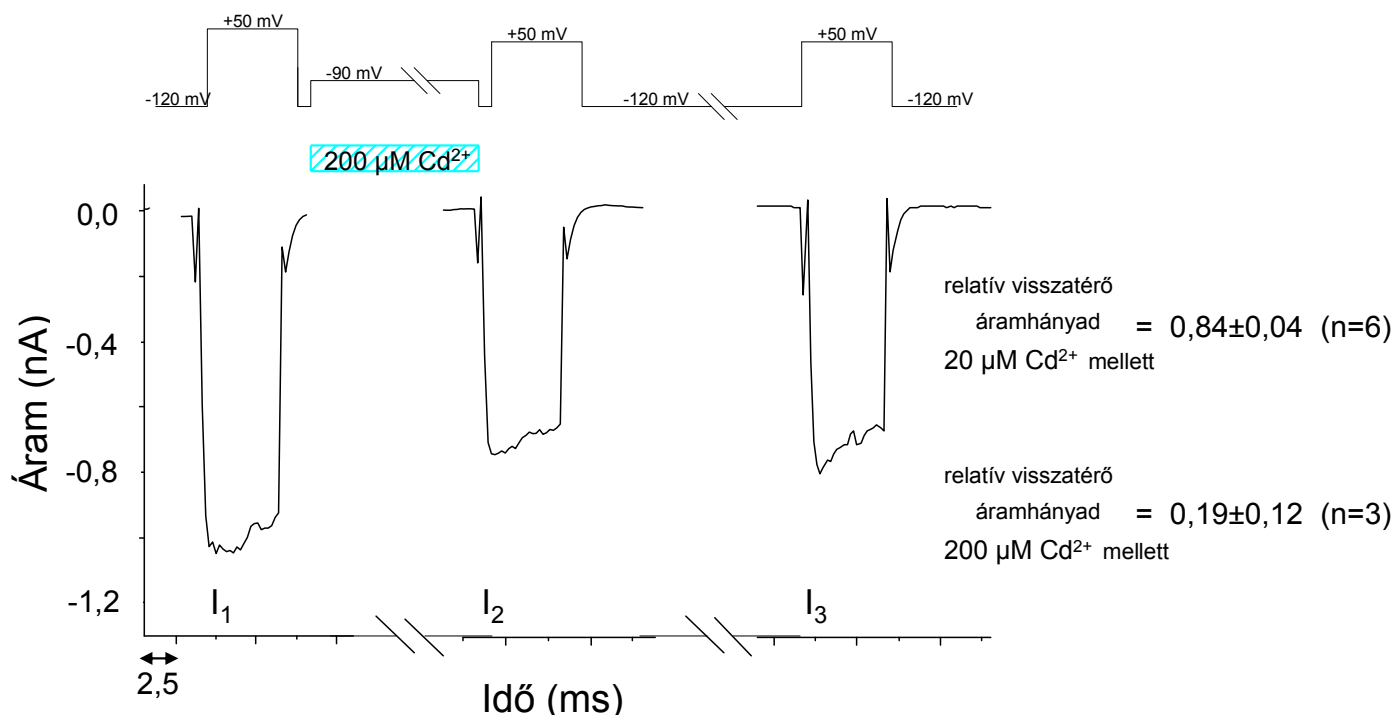


12. ábra: A Cd^{2+} kötődésének vizsgálata zárt állapotú T449A/V474C mutáns Shaker csatornához.

Az ábrán a depolarizáló impulzusok során kapott áramgörbéket tüntettem fel, a kapott csúcsáramok nagyságát I_1 , I_2 és I_3 jelöli. Az ábrázolt esetben az első és a második impulzus között 20 s-ig $200 \mu\text{M}$ -os Cd^{2+} koncentrációjú belső oldatot vezettem a patchre. A tartófeszültség a protokollon belül mindvégig -120 mV volt, míg a depolarizáló impulzusok 5 ms hosszúságú $+50 \text{ mV}$ -os nagyságúak, hasonlóan a pályamunkában bemutatott mérési protokollhoz. Az eredmények a bírálati válasz törzsszövegében kerültek közlésre.

VI/ 4. Cd^{2+} alkalmazása mellett kapott eredmények

A kontroll kísérleteket követően az inaktivációval egyidejűleg 20 μM -os vagy 200 μM -os Cd^{2+} koncentrációjú belső oldatot vezettem a patchre. Az 13. ábrán egy 200 μM -os Cd^{2+} koncentráció melletti mérés során kapott áramgörbéket tüntettem fel. A második impulzus során itt is tapasztalható áramcsökkenés, amelyet a kontroll mérésekhez hasonlóan egyszerűen az inaktiváció, vagy a Cd^{2+} bekötődése is eredményezhet. A kérdés megválaszolása szempontjából a harmadik impulzus a döntő. Amennyiben van közvetlen átmenet a zárt állapotból az inaktivált állapotba, a Cd^{2+} nem tud bekötődni, ezáltal a harmadik impulzus során vissza kell kapnunk az első impulzus során tapasztalt csúcsáramot, mivel az inaktivációból való visszatérés a második és harmadik között alkalmazott negatív tartófeszültség révén lehetséges. Ellenkező esetben, ha az inaktiváció az aktivációs kapu nyitása mellett következik be, a Cd^{2+} hozzá tud kötődni a 474-es pozíciójú ciszteinekhez. Ez az érintett csatornák estén a konduktancia irreverzibilis elvesztését eredményezi, így a harmadik impulzus során áramvesztést tapasztalhatunk az első impulzushoz képest.



13. ábra: Az aktivációs kapu nyitását monitorozó Cd^{2+} -os mérések során kapott eredmények.

Az ábrán a depolarizáló impulzusok során kapott áramgörbéket tüntettem fel, a kapott csúcsáramok nagyságát I_1 , I_2 és I_3 jelöli. Az ábrázolt esetben az első és a második impulzus között 20 s-ig 200 μM -os Cd^{2+} koncentrációjú belső oldatot vezettem a patchre. Az $(I_3 - I_2) / (I_1 - I_2)$ képlet segítségével meghatározott a relatív visszatérő áramhányad értéke mindkét Cd^{2+} koncentráció esetén jól reprezentálja azt az irreverzibilis csúcsáram veszteséget, ami a Cd^{2+} bekötődésével magyarázható. Az

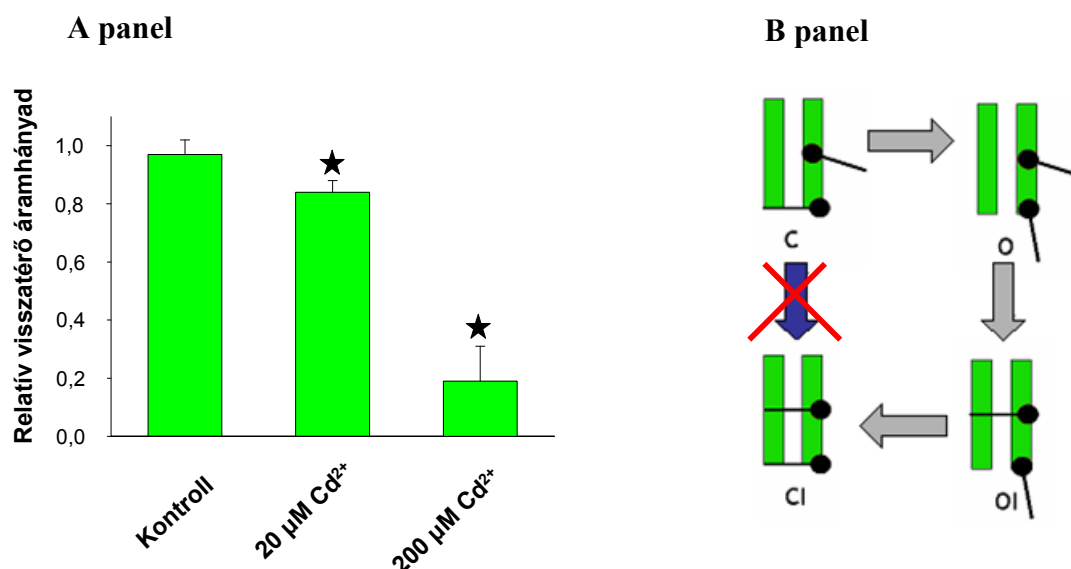
eredmények megadásánál feltüntettem az átlagértékek közepes hibáját (SEM) adott mérési esetszámok (n) mellett.

A kontroll mérésekhez hasonlóan a Cd^{2+} -os méréseknél is meghatároztam a relatív visszatérő áramhányadot. Mind a 20 μM -os ($0,01 > p > 0,005$), mind pedig a 200 μM -os ($0,02 > p > 0,01$) Cd^{2+} koncentráció mellett kapott relatív visszatérő áramhányad értékek az 5%-os szignifikancia szint mellett elvégzett kétoldali egymintás t-próba alapján szignifikánsan különböznek az 1-től. Tehát Cd^{2+} hatására egy jól látható áramvesztést tapasztaltunk, ami a Cd^{2+} bekötődésével magyarázható (13. ábra).

VII. MEGBESZÉLÉS

VII/ 1. Az elektrofiziológiai mérések során kapott eredmények összegzése

A kontroll és az aktivációs kapu nyitását monitorozó Cd^{2+} -os mérések során kapott mérési eredményeket az alábbi oszlopdiagrammon összegeztem (14. ábra, A panel). Az ábra jól szemlélteti, hogy míg a relatív visszatérő áramhányad értéke a kontroll mérések esetén $0,97 \pm 0,05$ ($n=6$), tehát közel 1-nek adódott, addig a Cd^{2+} -os mérések esetén a paraméter értéke 1-nél mindkét Cd^{2+} koncentráció esetén szignifikánsan kisebb. 20 μM -os Cd^{2+} koncentráció jelenlétében a relatív visszatérő áramhányad értéke $0,84 \pm 0,04$ ($n=6$), 200 μM -os Cd^{2+} koncentráció esetén $0,19 \pm 0,12$ ($n=3$).



14. ábra: Az eredmények összegzése.

A panel: A relatív visszatérő áramhányad értéke a kontroll körülmények, illetve a 20 μM -os és 200 μM -os Cd^{2+} koncentráció mellett. A feltüntetett hiba az átlagérték közepes hibája (SEM), a mérési esetszámok (n) a szövegben kerültek feltüntetésre. Az 1-től szignifikáns eltéréseket az ábrán csillagokkal jelöltem (lásd még „Eredmények” megfelelő része).

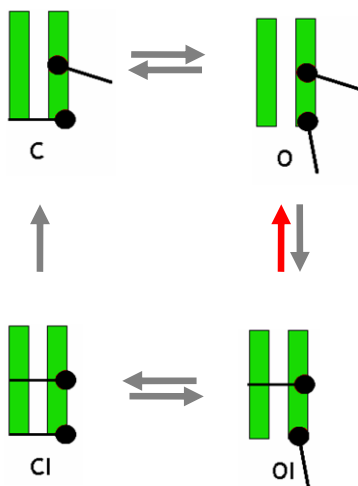
B panel: A pályamunkában közzétett eredmények arra utalnak, hogy a C-típusú inaktivációhoz vezető molekuláris változások az aktivációs kapu nyitása mellett következhetnek be (szürke nyilak).

Ezek alapján megállapítható, hogy Cd^{2+} jelenlétében a csatornák kisebb hányada tér vissza az inaktívált állapotból, mint a kontroll mérések esetén, ami fokozódik a Cd^{2+} koncentráció növelésével. Ezen túl a 200 μM -os Cd^{2+} koncentráció mellett meghatározott relatív visszatérő

áramhányad értéke 5%-os szignifikancia szint mellett ($0,15 > p > 0,1$) elvégzett kétoldali egymintás t-próba alapján szignifikánsan nem különbözik a 0-tól. Mindez azt támasztja alá, hogy az aktivációs kapu nyitása megelőzheti az inaktivációs kapu záródását. A fentebb bemutatott statisztikai próba eredménye alapján véleményünk szerint az inaktiváció közvetlenül a zárt állapotból nagy valószínűséggel nem valósulhat meg (14. ábra, B panel).

VII/ 2. További célkitűzések

A 4. ábrán bemutatott egyszerűsített négyállapotos kapuzási modellben nincs feltüntetve az egyes strukturális állapotok közötti összes elméletileg lehetséges átmenet. Eddig egyrészt a zárt (C)-nyitott (O)-nyitott inaktivált (OI) állapotok közti átmenet egyértelmű, ami fenntartott depolarizáló impulzus hatására jön létre. A zárt inaktivált (CI) és zárt (C) állapotok közti átmenet a kellően negatív tartófeszültségek mellett végbemenő inaktivációból való visszatérés révén lehetséges. Mivel az aktivációs kapu mozgását az aktuális membránpotenciál érték határozza meg a nyitott (O) és zárt állapot (C) közti átmenet egy rövid depolarizáló impulzus esetén szintén bekövetkezhet, hasonlóan a zárt inaktivált (CI)- nyitott inaktivált (OI) állapotok közti átmenetekhez. A pályamunkában bemutatott kísérletek alapján a zárt (C)- zárt inaktivált (CI) átmenet valószínűen nem lehetséges. Az, hogy a nyitott inaktivált (OI)- nyitott (O) állapot közti átmenet létrejöhet-e még nem tisztázott (15. ábra).



15. ábra: Az egyszerűsített négyállapotos kapuzási modell kiegészítve az egyes strukturális állapotok közötti lehetséges átmenetekkel (szürke nyilak).

Az ábra a zárt (C), nyitott (O), nyitott inaktivált (OI), és zárt inaktivált (CI) strukturális állapotok és a köztük létrejövő lehetséges átmenetek vannak feltüntetve. A szürke nyilak a már bizonyított

átmeneteket jelölik, míg az nyitott inaktivált (OI) és nyitott (O) állapotok közti átmenet lehetőségének vizsgálata jövőbeli munkánk központi kérdése (piros nyíl).

A kérdés megválaszolása viszont érdekes új információt jelente számunkra az aktivációs és az inaktivációs kapu közti kapcsoltság folyamatának tisztázásában, ugyanis ha a nyitott inaktivált (OI) és a nyitott állapot (O) közti átmenet lehetséges (14. ábra, piros nyíl) az azt jelentené, hogy az inaktivációból való visszatérés során nincs szükség az aktivációs kapu mozgására. A folyamat tisztázása segítene a C-típusú inaktivációs kapuzás során bekövetkező molekuláris mechanizmusok pontosabb megismerésében, ami alapvető feltétele a bevezetésben is említett, később terápiásan is felhasználható gyógyszermolekulák tervezésének.

VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

Szeretném hálámat kifejezni témavezetőmnek, Prof. Dr. Panyi Györgynek, a DEOEC 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, Szilágyi Orsolyának, Matta-Domján Brigittának, Mészáros Beátának, akik minden kérdésem kapcsán készségesen segítettek, és akikkel mindig jó hangulatban zajlott a munka.

Szeretnék köszönetet mondani a DEOEC 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.”



Zákány Florina

Pályázati azonosító: A2-ELMH-13-0006

IX. IRODALOMJEGYZÉK

1. Antz, C., Bauer, T., Kalbacher, H., Frank, R., Covarrubias, M., Kalbitzer, H.R., Ruppersberg, J.P., Baukrowitz, T., Fakler, B. (1999) Control of K⁺ channel gating by protein phosphorylation: structural switches of the inactivation gate. *Nat. Struct. Biol.* 6, 146–150.
2. Aggarwal, S. K., MacKinnon, R. (1996) Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K⁺ channel. *Neuron* 16, 1169–1177.
3. Baukrowitz, T., Yellen, G. (1995) Modulation of K⁺ current by frequency and external [K⁺] a tale of two inactivation mechanisms. *Neuron* 15, 951–960.
4. 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.
5. 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.
6. Bezanilla, F. (2000) The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol. Rev.* 80, 555–592.
7. Cahalan, M.D., Chandy, K.G. (1997) Ion channels in the immune system as targets for immunosuppression. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 749–756.
8. 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.
9. 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.

10. Del Camino, D., Yellen, G. (2001) The steric closure at the intracellular activation gate of a voltage gated potassium channel. *Neuron* 32, 649-656.
11. Feske, S., Skolnik, E. Y., Prakriya, M. (2012) Ion channels and transporters in lymphocyte function and immunity. *Nature* 12, 532-547.
12. Geiger, J.R., Jonas, P. (2000) Dynamic control of presynaptic Ca^{2+} inflow by fast-inactivating K^{+} channels in hippocampal mossy fiber boutons. *Neuron* 28, 927-939.
13. Grissmer, S., Cahalan, M.D. (1989) Divalent ion trapping inside potassium channels of human T lymphocytes. *J. Gen. Physiol.* 93, 609-630.
14. 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. *Pharmacol. Rev.* 57, 473-508.
15. 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.
16. Hashimoto, Y., Nunoki, K., Kudo, H., Ishii, K., Taira, N., Yanangisawa, T. (2000) Changes in the inactivation of rat Kv1.4 K^{+} channels induced by varying the number of inactivation particles. *J. Biol. Chem.* 257, 9358-9362.
17. Heginbotham, L., Lu, Z., Abrasom, T., MacKinnon, R. (1994) Mutations in the K^{+} channel signature sequence. *Biophys. J.* 66, 1061-1067.
18. Holmgren, M., Jurman, M. E., Yellen, G. (1996) N-type inactivation and the S4 –S5 region of the *Shaker* K^{+} channel. *J. Gen. Physiol.* 108, 195-206.
19. Hoshi, T., Zagotta, W.N., Aldrich, R.W. (1990) Biophysical and molecular mechanisms of *Shaker* potassium channel inactivation. *Science* 250, 533-538.

20. 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.
21. 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.
22. Liu Y., Holmgren, M., Jurman., M.E., Yellen, G. (1997) Gated access to the pore of a voltage-dependent K⁺ channel. *Neuron* 19, 175-184.
23. Long, S.B., Campbell, E.B., MacKinnon, R. (2005) Crystal structure of a mammalian voltage –dependent *Shaker* family K⁺ channel. *Science* 309, 897-903.
24. 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.
25. MacKinnon, R. (1991) Determination of the subunit stoichiometry of a voltage activated potassium channel. *Nature* 350, 232-235.
26. MacKinnon, R., Aldrich, R.W., Lee, A.W. (1993) Functional stoichiometry of *Shaker* potassium channel inactivation. *Science* 262, 757-759.
27. MacKinnon, R., Miller, C. (1988) Mechanism of charybdotoxin block of the high-conductance Ca²⁺- activated K-channel. *J. Gen. Physiol.* 91,335–49.
28. Matteson, D. R., Deutsch, C. (1984) K⁺ channels in T lymphocytes: a patch clamp study using monoclonal antibody adhesion. *Nature* 307, 468-471.
29. Morales, M.J., Castellino, R.C., Crews, A.L., Rasmusson, R.L., Strauss, H.C. (1995) A novel β subunit increases rate of inactivation of specific voltage-gated potassium channel α subunits. *J. Biol. Chem.* 270, 6272–6277.

30. Neyton, J., Miller, C. (1988 a) Discrete Ba^{2+} block as a probe of ion occupancy and pore structure in the high conductance Ca^{2+} activated K^{+} channel. *J. Gen. Physiol.* 92, 569-586.
31. Neyton, J., Miller, C. (1988 b) Potassium blocks barium permeation through a calcium-activated potassium channel. *J. Gen. Physiol.* 92, 549-567.
32. Panyi, G., Deutsch, C., (2006 b) Cross Talk between activation and slow inactivation gates of *Shaker* potassium channels. *J. Gen. Physiol.* 128, 547-559.
33. Panyi, G., Deutsch, C. (2007) Probing the cavity of the slow inactivated conformation of *Shaker* potassium channels. *J. Gen. Physiol.* 129, 403-418.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. Panyi, G., Varga, Z., Gaspar, R. (2004, b) Ion channels and lymphocyte activation. *Immunol. Lett.* 92, 55-66.
38. 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.
39. 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.
40. Swartz, K.J. (2013) Ion channels: The scorpion toxin and the potassium channel. *eLife* 2013;2:e00873. DOI: 10.7554/eLife.00873 1

41. Wang, J.W., Wu, C.-F. (1996) In vivo functional role of the *Drosophila* Hyperkinetic β subunit in gating and inactivation of *Shaker* K^+ channels. *Biophys. J.* 71, 3167-3176.
42. 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.
43. 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.
44. 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, illetve a Cd^{2+} -ot felhasználó cisztein modifikációs patch-clamp mérések, illetve a pályamunka 1492/A referenciaszámú bírálatára adott válaszában szereplő kiegészítő ábrán bemutatott patch-clamp mérések kivitelezése.
- A fentebb említett mérések során nyert adatok kiértékelése, a kapott paraméterek meghatározása, az eredmények értelmezése.
- Ábrák elkészítése.
- TDK pályamunka elkészítése.

Témavezetőim, Dr. Szántó G. Tibor és Prof. Dr. Panyi György által korábban elvégzett kísérletek, amelyek az általam végzett mérések alapjául szolgálva, a kísérletek során általam alkalmazott megfelelő tartófeszültség meghatározásában nyújtottak segítséget. Ezen kísérletes eredmények pályamunkámban való közlésének célja a kísérletes munkám során általam levont következtetések hitelességének és helyességének a biztosítása:

- A T449A/V474C mutáns ioncsatorna biofizikai karakterizációját szolgáló paraméterek, a konduktancia feszültségfüggésének, az inaktiváció feszültségfüggésének vizsgálata céljából végzett patch-clamp mérések kivitelezése, a kísérletek során nyert adatok kiértékelése, a kapott paraméterek meghatározása.

Debrecen, 2014. január 29.

Zákány Florina

DE-ÁOK VI. évfolyam/ 8-as csoport

DE- ÁOK Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

Bírálatok

1492/A jelű bírálat Zákány Florina “Zárt állapotból történő inaktiváció lehetőségének vizsgálata mutáns *Shaker* kálium ioncsatorna esetén patch-clamp módszerrel” című TDK dolgozatáról

A Szerző a Címlapot, az Irodalomjegyzéket, a Köszönetnyilvánítást és a kötelező Függelékét is beleszámítva 37 oldal terjedelemben számol be Tudományos Diákköri munkájáról: káliumáram méréseket végzett SV40 large T antigénnel transzformált humán embrionális vese sejteken és Cd^{2+} adagolásával próbálta meghatározni az inaktivációból való visszatérés lehetséges útvonalait a *Shaker* káliumcsatornák esetében. A pályamunka bemutatja a kapott eredményeket és a *Shaker* káliumcsatornához kapcsolódó elméleti alapokat. A pályázó témaválasztását nagyon érdekesnek találom. A feladat megvalósítása gondos és látszik, hogy sok munka áll mögötte. Részletes véleményemet az alábbiakban foglalom össze.

A pályamunka felépítése világos, kielégíti a formai követelményeket. A pályamunka nyelvezete, stílusa gördülékeny. A beadott munka külsőre igényes, szép, elírásokat, tartalmi hibákat csak elvétve tartalmaz. De itt felhívnom arra a nyelvtani szabályra a Szerző figyelmét, hogy a két egyszerű szóból alakult összetételeket a szótagszámtól függetlenül egybeírjuk. Így például a káliumcsatorna, káliumkoncentráció, káliumkötőhely, stb. egybeírandó. Az ábrák jólszerkesztettek, segítik a szöveg pontos megértését. Itt javaslom, hogy a pályamunka szövegét úgy kellene áttördelni, hogy az ábraszövegek lehetőleg egy oldalra kerüljenek az ábrával. A mérések kivitelezése magasszintű elektrofiziológiai jártasságról tesz tanúbizonyságot, bár itt megjegyzem, hogy a Függelék megfogalmazása alapján nem egyértelmű, hogy a Szerző végezte-e a patch-clamp méréseket. Az adatok statisztikai elemzése azonban teljesen hiányzik és ezt pótolni kell.

A továbbiakban az Pályamunka olvasása közben felmerült kérdéseimet és észrevételeimet sorolom fel az előfordulásuk sorrendjében.

A Rövidítések jegyzékébe én még beírnám az FBS és PBS oldatokat. Valamint pontosítani kellene, hogy a Cd^{2+} a kadmiumiont jelöli.

Az Absztraktban a C-típusú inaktivációt definiálni kellene. Ugyanitt a tsA-201 sejteknek legalább az eredetét meg kellene adni. A második bekezdés utolsó mondatában a magyar és angol írásmód keveredik. El kellene döntenie a Szerzőnek, és ezt konzekvensen végigvinni az egész dolgozaton, hogy melyiket használja. Az Absztrakt utolsó előtti mondatában a jobb érthetőség kedvéért javaslom a „fokozódik” szót „tovább csökken”-re cserélni.

A Bevezetés a pályamunka egyik legjobban megírt része. Itt az első mondatban a két utolsó szó sorrendjét javaslom felcserélni. Az „A-típusú káliumáram” első említésénél definiálni kellene, hogy itt a gyorsan inaktiválódó áramról van szó. A 4. oldal utolsó sorából a „során” szót törölni kellene. Én úgy tudom, hogy 8 fajta Kv1 csatorna van. Ha ezzel egyetért a Szerző akkor ezt javítani kellene az 5. oldal 2. bekezdésében. Ugyanitt a T-limfociták említésénél zárójelben meg kellene adni a „T-sejtek” elnevezést, mert a szöveg további részében már ezt használja a Szerző. A következő bekezdésben az „elektrokémiai” szó hibásan van írva. Ugyanebben a mondatban a „vezet” szót az „immunszuppresszióhoz” után kellene áthelyezni. Az utolsó sorban a referencia előtti pontot törölni kellene. Az 1. és 2. ábra szövege nincs sorkizárva. A „megábrázolás” kifejezést kerülni kellene, mert ilyen szó nincs a magyar nyelvben. Javaslom továbbá, hogy mindkét ábrán a káliumionokat ne lila, hanem más (pl. fehér) színnel jelölje a Szerző, mert most alig látszanak a pontok. A 8. oldal harmadik bekezdésében „számos fentebb említett peptid típusú gátlószer”-ről ír a Szerző. Sajnos nem találtam meg ezeket a korábbi szövegben. A 3. ábrához kapcsolódik az első kérdésem: hogyan lehet meghatározni az áramjelből az inaktiváció fajtáját? A 10. oldalon MacKinnon citálása után hiányzik egy pont. Két mondattal később az „N-típusú” kifejezésben egy felesleges szóköz van. Majd ugyanebben a mondatban egy felesleges „a” és egy „az”, ami helyett „a” kell. A 11. oldal tetején az első „lassabb” törlendő.

A Célkitűzések mértéktartóak. A 4. ábrán javaslom, hogy az OI → CI átmenetet jelölő nyíl fölé is kerüljön ΔV , mert szerintem ez is csak membránpotenciálváltozás hatására jön létre. A 6. ábra B paneljén az „áramvesztés” kifejezést az ábra szövegében meg kellene magyarázni.

Az Anyagok és módszerek fejezet világosan bemutatja, hogy a Szerző milyen módszerekkel nyerte az eredményeit. Itt is találtam azonban javítandókat. Számos helyen a Szerző gyári készítményeket, vegyszereket, programot említ, de csak kevés helyen és ott is hiányosan adja meg a gyártót és a származási helyet. Ezeket pótolni és egységesíteni kellene. A 17. oldal első bekezdésének utolsó mondatában a Szerző említi, hogy a sejteket 2 ml külső oldatban inkubálta. Miért és mennyi ideig? A következő bekezdésben megadhatná a Szerző a

transzfekció átlagos mértékét. Itt megfontolásra ajánlanám egy fluoreszcens kép bemutatását, hogy az olvasó el tudja képzelni milyen sejteken is folytak a mérések és lássa a transzfekció hatását. A következő kérdésem, hogy mi indokolta a belső oldatokban a KF használatát Cd^{2+} esetében? A 7. ábra szerintem eltér az átlagtól a késés szempontjából, mert az én becslésem szerint ezen a rekordon 33 ms volt a késési idő. Az ábraszöveg utolsó mondatában egy „az” van „a” helyett. A 19. oldal alján a Szerző nagyon röviden említi az áramjelek ohmikus komponensre történő korrekcióját. Erről itt részletesebben kellene írni, hogy az olvasó elképzelhesse, hogyan történt ez a bemutatott 5 ms hosszú áramjelek esetében. Így jobban érthetővé válnának az eredményekben bemutatott áramjelek. Ahogy azt a bírálóat elején is írtam, hiányolom az adatok statisztikai elemzését, amelyet itt kellene leírni, majd az ábrákon és az Eredményekben bemutatni.

Az Eredmények tárgyyszerűen bemutatja a mérések adatait. A fejezet elején a Szerző ismerteti a használt mérési protokollt. Itt azt szeretném megkérdezni, hogy a -90 mV-ra történő depolarizáció milyen mértékű inaktivációt okoz átlagosan? A 22. oldal második bekezdésének utolsó mondatában megfogalmazott kizárólagossággal (a „csak” szó) nem értek egyet. Az inaktiváció nem csak így következhet be, de a Cd^{2+} csak nyitott csatornához tud kötődni. Ez a logikai hiba a Megbeszélésben újra előfordul és a Szerzőt téves következtetés levonásához vezette. A 9. ábrához kapcsolódik következő kérdésem. Mennyi volt az I_1/I_3 arány átlaga? Volt-e olyan kritérium, amelyben ezt az arányt használták a rossz (gyors rundown-al rendelkező) sejtek kiszűrésére? Az I_2/I_1 arány átlaga kontroll esetben megadhatná egy korábbi kérdésemre a választ, nevesen, hogy mennyi a -90 mV-ra történő depolarizáció alatt az inaktiváció? Ezt az arányt érdemes lenne megadni a 10. ábrával kapcsolatosan a Cd^{2+} -os kísérletek esetében is. A 200 μM Cd^{2+} -al végzett mérések esetszámát kicsit kevésnek találom. Volt valami technikai akadálya több sejt vizsgálatának? Az ábrán és később a szövegben megadott átlagos relatív visszatérő áramhányad értékek kontroll értékekhez képesti statisztikai vizsgálatát itt feltétlenül pótolni kell. Hiányolom továbbá, hogy a Cd^{2+} kizárólag nyitott csatornához való kötődésének bizonyítására egy olyan protokoll elvégzését, amelyben az első két impulzus között -120 mV-ra tér vissza a membránpotenciál. Tekintve Liu és munkatársai (1997) által bemutatott 7. ábrát, a Cd^{2+} képes növelni az áram nagyságát. Ebben az esetben pedig a Szerző által számolt I_2/I_3 arány alábecsüli a valós csökkenést.

A Megbeszélés első bekezdésében a Szerző a relatív visszatérő áramhányad kontroll értékét közel 1-nek mondja. Ebben az esetben is el kellene végezni a statisztikai elemzést, ami

bizonyítja ennek az értéknek nem szignifikáns különbségét 1-től. A 26. oldal utolsó bekezdésének megállapítását nem tartom teljes mértékben megalapozottnak. Véleményem szerint a mondat így lenne helyes: „Mindez azt támasztja alá, hogy az aktivációs kapu nyitása megelőzheti az inaktivációs kapu záródását.” A bemutatott eredményekből nem következik, hogy „az inaktiváció közvetlenül a zárt állapotból nem valósulhat meg”. Ezért nem látom megalapozottnak a További célkitűzések azon mondatát sem, hogy „A pályamunkában bemutatott kísérletek alapján egyértelműnek látszik, hogy a zárt (C)- zárt inaktivált (CI) átmenet nem lehetséges.” A 12. ábra szövegében egy „a” betű hiányzik. A 27. oldal utolsó mondatában nem világos, hogy a Szerző melyik átmenetről beszél.

Az irodalomjegyzékben a 6. és 14. referenciában az újság neve nincs rövidítve úgy, mint a többi helyen. A 13. referenciában pedig felesleges az „of” az újság nevében.

A fent kifejtett véleményem alapján - elsősorban a statisztikai elemzés hiánya és az eredményekből levont téves következtetés miatt - az egyébként magas színvonalú pályamunka elfogadását a hiányosságok pótlásától és a következtetések felülvizsgálatától teszem függővé (2C).

Debrecen, 2013. november 21.

(A) Lényegi változtatások elvégzése után fogadja el. (kód: 2C).

**Válasz Zákány Florina „Zárt állapotból történő inaktiváció lehetőségének vizsgálata
mutáns *Shaker* kálium ioncsatorna esetén patch-clamp módszerrel” című TDK
pályamunka 1492/A referenciaszámú bírálatára**

A pályamunkában a Bíráló észrevételeinek megfelelően javításra kerültek az elgépelések, helyesírási és formai hibák. A Bíráló által kért fogalmazásbeli pontosítások, értelmezést megkönnyítő változtatások az aktualizált pályamunkában olvashatók.

A Bíráló a pályamunka értékelésénél egyik fő hiányossággként az eredmények statisztikai elemzésének hiányát emelte ki. Ennek megfelelően, a Bíráló ezen észrevételével teljes mértékben egyetértve, a pályamunka jelen formájában az eredmények bemutatását kiegészítettem a kért statisztikai elemzésekkel. Ezek a kiegészítések az „Anyagok és módszerek” fejezet 6. pontjának utolsó bekezdésében, továbbá az „Eredmények”, illetve a „Megbeszélés” eredményeket bemutató megfelelő részeiben kerültek közlésre.

A Bíráló talán legfőbb kritikai észrevétele a pályamunkával kapcsolatban az, hogy a Bíráló szerint az eredmények alapján levont végső konklúzió, miszerint „az aktivációs kapu nyitása megelőzi az inaktivációs kapu záródását, így az inaktiváció közvetlenül a zárt állapotból nem valósulhat meg”, téves. A bírálatot idézve „... *Véleményem szerint a mondat így lenne helyes: „Mindez azt támasztja alá, hogy az aktivációs kapu nyitása megelőzheti az inaktivációs kapu záródását.” A bemutatott eredményekből nem következik, hogy „az inaktiváció közvetlenül a zárt állapotból nem valósulhat meg”. Ezért nem látom megalapozottnak a További célkitűzések azon mondatát sem, hogy „A pályamunkában bemutatott kísérletek alapján egyértelműnek látszik, hogy a zárt (C)- zárt inaktivált (CI) átmenet nem lehetséges.”* A Bíráló ennek megfelelően kéri a későbbiekben a következtetéseim felülvizsgálatát.

A pályamunka jelen változatában a 9. ábrán került bemutatásra a kísérleti protokoll felépítése és a kísérleti stratégia lényege. Ez az ábra a Bíráló észrevételének megfelelően, a korábbiakhoz képest kiegészült egy új lehetséges kimenetelt bemutató résszel, amely egy olyan kevert mechanizmust mutat be, amely során mind a zárt állapotból, mind pedig a nyitott állapotból lehetséges az inaktiváció. Ahogy a 9. ábrán is megfogalmaztam, az inaktiváció mechanizmusára a relatív visszatérő áramhányad értéke alapján következtethetünk. A pályamunka aktualizált verziójában közzétett kiegészítéseket összegezve, abban az esetben,

amennyiben létrejöhet a zárt állapotból az inaktiváció, a relatív visszatérő áramhányad értéke ~ 1 ; ha az inaktiváció csak az aktivációs kapu nyitását követően jöhet létre ez az érték ~ 0 ; míg egy esetleges kevert mechanizmus esetén a paraméter értéke 0 és 1 között változik.

Eredményeimet összegezve, a 20 μM -os, illetve a 200 μM -os Cd^{2+} koncentráció mellett végzett kísérletek során kapott relatív visszatérő áramhányad értékek szignifikánsan különböznek 1-től (a statisztikai próbát lásd a pályamunka VI/4. alfejezetének utolsó bekezdésében), tehát Cd^{2+} hatására egy jól látható, koncentrációfüggő áramvesztést tapasztaltunk, ami a Cd^{2+} bekötődésével magyarázható. Ezen túl a 200 μM -os Cd^{2+} koncentráció mellett meghatározott relatív visszatérő áramhányad értéke szignifikánsan nem különbözik a 0-tól (a statisztikai próba a VII/1. alfejezet utolsó bekezdésében). Ez az eredmény a pályamunka 9. ábrájának megfelelően számunkra azt támasztja alá, hogy az aktivációs kapu nyitása megelőzi az inaktivációs kapu záródását, így az inaktiváció közvetlenül a zárt állapotból nem valósulhat meg. Ezáltal a pályamunkában eredetileg levont végső következtetést nem változtattuk meg.

Az, hogy az általunk meghatározott relatív visszatérő áramhányad értéke 0-tól különbözik vagy azzal magyarázható, hogy -90 mV-on a csatornák nyitása olyan rövid ideig tart, hogy a Cd^{2+} nem képes hozzákötődni az expozíciós idő alatt az összes inaktiválódó csatornához, vagy a másik lehetőség, hogy a csatornák kis hányada mégis közvetlenül a zárt állapotból inaktiválódik. A továbbiakban e két lehetséges magyarázat közötti differenciálás céljából 200 μM -osnál nagyobb Cd^{2+} koncentrációk melletti kísérletek elvégzését tervezzük. Az előző esetben ugyanis a Cd^{2+} koncentráció növelésével a relatív visszatérő áramhányad értékének a 0-hoz kell közelítenie (ahogy azt már a 20 μM -os, illetve a 200 μM -os koncentrációk mellett tapasztaltuk), illetve ideális esetben el kell érnie azt; míg a közvetlenül zárt állapotból bekövetkező inaktiváció esetén ilyen tendenciát nem figyelhetünk meg.

A továbbiakban a Bíráló által feltett kérdésekre, főbb észrevételeire adott részletes válaszaim következnek a bírálatban való előfordulásuk sorrendjében.

1. „A mérések kivitelezése magasszintű elektrofiziológiai jártasságról tesz tanúbizonyságot, bár itt megjegyzem, hogy a Függelék megfogalmazása alapján nem egyértelmű, hogy a Szerző végezte-e a patch-clamp méréseket.”

A pályamunka bírálat előtti változatában bemutatott patch-clamp mérések a szerző által végzett kísérletek, melyek a korábbi függelékben mint „kontroll, illetve a Cd^{2+} -ot felhasználó

cisztein modifikációs kísérletek kivitelezése” szerepeltek. Ezek a kísérletek a pályamunka jelen változatában kiegészültek a pályamunka 1492/A referenciaszámú bírálatára adott válaszában szereplő kiegészítő ábrán bemutatott, a Bíráló által kért mérésekkel. Ezek szintén a szerző által elvégzett patch-clamp mérések a függelék jelen változatában megjelölésre kerültek. A bírálatot követően a kísérleti stratégiánk, illetve az általunk levont konklúzió további magyarázata céljából indokoltnak tartottuk a pályamunkában közzétenni a T449A/V474C mutáns *Shaker* csatorna biofizikai karakterizációját célzó méréseket, illetve az ennek során nyert eredményeket. Ezeket a karakterizációs méréseket a témavezetőim korábban elvégezték, ami a függelék és a törzsszöveg aktuális formájában is megjelölésre került.

2. „A második bekezdés utolsó mondatában (Absztrakt) a magyar és angol írásmód keveredik. El kellene döntenie a Szerzőnek, és ezt konzekvensen végigvinni az egész dolgozaton, hogy melyiket használja.”

A pályamunkában mindvégig törekedtem arra, hogy az egyes szakkifejezések magyar írásmódját használjam, ahol van megfelelő, a megértést nem zavaró, irodalomban is elterjedt ilyen magyar kifejezés. Ezzel indokolom a „voltage clamp” helyett a „feszültség-zár” megfogalmazás használatát. Az „inside-out” kísérleti konfigurációnak viszont nem ismerem hasonló, megértést nem zavaró magyar megfelelőjét, ezért a dolgozatban a későbbiekben is ezt a megfogalmazást használtam.

3. „A 3. ábrához kapcsolódik az első kérdésem: hogyan lehet meghatározni az áramjelből az inaktiváció fajtáját?”

Ahogy azt a bevezetésben is említettem az N-típusú inaktiváció egy kinetikailag gyors, míg a C-típusú inaktiváció egy kinetikailag lassú folyamat. Egy adott áramjel esetén az áram inaktivációs időállandója révén lehet számszerűen jellemezni az inaktiváció kinetikáját. Ennek a paraméternek az értéke alapján a kétféle inaktiváció egymástól jól elkülöníthetővé válik. Az áram inaktivációs időállandójának értéke a vad típusú, N-típusú inaktivációval inaktiválódó *Shaker* ioncsatornák esetén néhány ms-os nagyságrendű, míg a kizárólag C-típusú inaktivációt mutató ioncsatornák esetén ennek értéke több 10 ms, tehát nagyságrendekkel több.

4. „A 17. oldal első bekezdésének utolsó mondatában a Szerző említi, hogy a sejteket 2 ml külső oldatban inkubálta. Miért és mennyi ideig?”

A patch-clamp mérések során a sejteket nem a sejtenyésző tápfolyadékban, hanem a külső folyadékban tartottam. Ennek oka, hogy a patch-clamp mérés elején, szükség van egy megfelelő ionkoncentrációjú közegre, amiben a pipetta és a sejtmembrán közötti gigaohmos nagyságrendű kontaktus kialakulhat.

Mivel a tsA-201 sejtek letapadó sejtek, így egy adott 35 mm-es átmérőjű „kispetri” mérésének kezdetekor a tápfolyadék leszívását követően a sejteket először kétszer 1 ml külső oldattal mostam át, ezt követően a sejtek életképességének megőrzése érdekében a petribe 2 ml külső oldatot tettem. Erre vonatkozik a pályamunkában az „inkubálás” kifejezés, ami ebben az esetben valóban megtévesztő lehet, ugyanis az oldat alkalmazásának időtartama változó volt, attól függően, hogy hányadik „megfogott” sejt esetén sikerült kialakítani a mérési körülményeket. Ezt követően az inside-out konfigurációnak megfelelően a patchet a megfelelő összetételű belső oldattal perfundáltam, amelyek aktuális összetétele a pályamunkában pontosan megjelölésre kerültek.

5. „A következő kérdésem, hogy mi indokolta a belső oldatokban a KF használatát Cd^{2+} esetében?”

A Cd^{2+} melletti mérések során alkalmazott belső oldat a kontroll belső oldattól abban különbözött, hogy Cd^{2+} tartalmazott, míg EGTA-t nem a Cd^{2+} aspecifikus kötődésének elkerülése végett. A KF alkalmazására a Cd^{2+} -os és a kontroll belső oldat esetében is az intracelluláris tér káliumkoncentrációjának reprezentálása, és az oldat megfelelő ozmolaritásának beállítása végett került sor, mivel a Cd^{2+} -ot tartalmazó belső oldattal viszonylag hosszú ideig, 20 s-ig perfundáltam a patchet. Erre a célra elméletileg a KCl is használható lenne, de kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy KF alkalmazása mellett ideálisabb mérési körülményeket tudtunk létrehozni, stabilabb áramokat sikerült detektálnunk, így a belső oldataink esetében mindvégig KF-ot alkalmaztunk.

6. „A fejezet (Eredmények) elején a Szerző ismerteti a használt mérési protokollt. Itt azt szeretném megkérdezni, hogy a -90 mV-ra történő depolarizáció milyen mértékű inaktivációt okoz átlagosan?”

A pályamunka aktuális változatában újonnan közzétett 10. ábra B panele az inaktiváció feszültségfüggését mutatja. Az ábra y tengelyéről az adott membránpotenciál érték mellett a nem inaktiválódó csatornák hányada leolvasható, ezt az arányt 1-ből kivonva pedig meghatározható az inaktiválódó csatornák pontos hányada. A mérési protokoll, illetve az eredmények értékelésének további magyarázata a pályamunkában olvasható. A -90 mV-os tartófeszültség mellett a nem inaktiválódó csatornák relatív hányada ezáltal $0,89 \pm 0,17$ -nek ($n=4$) adódott.

7. „A 9. ábrához kapcsolódik következő kérdésem. Mennyi volt az I_1/I_3 arány átlaga? Volt-e olyan kritérium, amelyben ezt az arányt használták a rossz (gyors rundown-al rendelkező) sejtek kiszűrésére? Az I_2/I_1 arány átlaga kontroll esetben megadhatná egy korábbi kérdésemre a választ, nevesen, hogy mennyi a -90 mV-ra történő depolarizáció alatt az inaktiváció? Ezt az arányt érdemes lenne megadni a 10. ábrával kapcsolatosan a Cd^{2+} -os kísérletek esetében is.”

A 20, illetve 200 μM Cd^{2+} mellett végzett kísérletek előtt minden esetben elvégeztem a pályamunkában bemutatott kontroll mérési protokollt. Az eredmények értékelése során csak azok a méréseket vettem a későbbiekben figyelembe, amelyek esetén a kontroll mérés során kapott I_3 csúcs a kontroll I_1 csúcs 90%-ánál nem volt kisebb. Ez volt az általam alkalmazott módszer a gyors rundown-nal rendelkező patchek kizárására, az I_1/I_3 arány átlagát külön nem határoztam meg.

A kérdés második felében szereplő I_2/I_1 arány átlagát a kontroll és a Cd^{2+} mellett végzett kísérletek esetén nem határoztam meg, a -90 mV-ra történő depolarizáció hatására létrejövő inaktiváció mértéke az aktualizált pályamunka 7. ábrájára utalok, illetve a Bíráló 6. kérdésére adott válaszomra.

8. „Tekintve Liu és munkatársai (1997) által bemutatott 7. ábrát, a Cd^{2+} képes növelni az áram nagyságát. Ebben az esetben pedig a Szerző által számolt I_2/I_3 arány alábecsüli a valós csökkenést.”

A Bíráló által említett cikk 7. ábráján egy másik mutáns ioncsatornán, a 476-os pozícióban ciszteint tartalmazó mutáns csatornán végzett mérést tettek közzé. Mi a pályamunkában közzétett minden mérésünket a T449A/V474C mutáns *Shaker* csatornán

végeztük, ami a 476-os pozícióban nem tartalmazott ciszteint, így az ábrán bemutatott ún. „lock-open” állapot sem tud kialakulni az általunk alkalmazott mutáns csatorna esetében.

A két ioncsatorna esetén a Cd^{2+} kötődése más mechanizmus alapján történik, így más hatást hoz létre. Ahogy a Bíráló által említett Liu-féle cikk egy másik, 5. ábráján is látszik a V474C csatornák esetén a Cd^{2+} kötődése lényegében egy pórusblokkot hoz létre. Az 5. ábra A panele azt mutatja, hogy ez a kötődés az áram nagyságát csökkenti. Így esetünkben az általunk számolt I_2/I_3 arány nem becsüli alá csúcsáram valós csökkenését.

A Bíráló által említett 7. ábrán szereplő mutáns V476C *Shaker* csatorna esetén az alegységek 476-os pozícióban levő ciszteinje és az egyik szomszédos alegység 486-os pozíciójában található natív hisztidinje között létrejövő Cd^{2+} -hidak révén az aktivációs kapu a nyitott állapotban (lock-open állapot) rögzíthető (Holmgren, M., Soon Shin, K., Yellen, G. (1998) Neuron 21, 617-621.). Ennek az elektrofiziológiai hatásait mutatja a Liu-féle ábra B része. Az ábra A részében egy, az ábrán megjelölt impulzusprotokoll során kapott reprezentatív áramgörbét tüntettek fel a szerzők. Ezen valóban úgy látszik, hogy a Cd^{2+} alkalmazása alatt kapott második csúcs nagyobb a kontroll csúcsnál. Mivel az ábrán egy egyedi mérés során kapott áramgörbét tüntettek fel, így az nem több mérés átlagából származik, elképzelhető, hogy a protokoll elindítása előtt nem várták meg a csúcsáram stabilizálódását, ezért a második csúcs során hamisan magasabb értéket kaptak, a cikkben ugyanis nem jelölik hasonló protokoll elvégzését. Ennek a jelenségnek viszont valóban egyik érdekes oka lehet, hogy a Cd^{2+} képes növelni az áram nagyságát a V476C *Shaker* csatorna esetén, ahogy azt a Bíráló is megfogalmazta.

Ezek az eshetőségek viszont, ahogy fentebb is említettem nem befolyásolják az általunk kapott eredményeket, mivel a T449A/V474C ioncsatorna esetén a Cd^{2+} a csatorna pórusába kötődik, így a „lock-open” állapot kialakulásával nem kell számolnunk.

9. „A $200\ \mu\text{M}\ \text{Cd}^{2+}$ -al végzett mérések esetszámát kicsit kevésnek találom. Volt valami technikai akadálya több sejt vizsgálatának?”

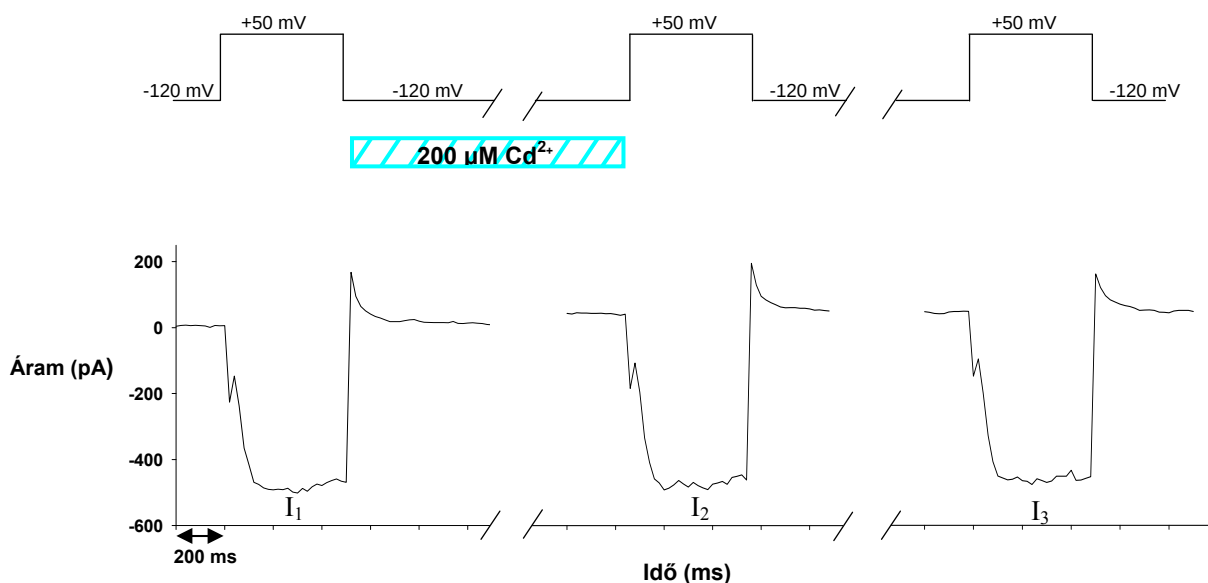
A pályamunkában bemutatott patch-clamp mérések technikai megvalósítása igen összetett. Mindegyik kísérlet tranziens transzfekció mellett, inside-out konfigurációban, gyorsperfúziós rendszert alkalmazva került kivitelezésre. Ezáltal a kísérletek technikai kivitelezésének nehézsége, a mérés során fellépő esetleges komplikációk száma messze túlmutat egy „hagyományosnak” mondható teljes sejt mérés esetén tapasztalhatótól. A

pályamunkában bemutatott kísérletek száma összehasonlítva az irodalomban előforduló, hasonló mérési körülmények mellett végzett patch-clamp kísérletek mérési számával nem mondható kevésnek. Ez viszont nem cáfolja meg azt az elvet, amit mi is követünk, miszerint minden kísérlet esetén a minél nagyobb mérési szám elérése a cél.

10. *„Hiányolom továbbá, hogy a Cd^{2+} kizárólag nyitott csatornához való kötődésének bizonyítására egy olyan protokoll elvégzését, amelyben az első két impulzus között -120 mV-ra tér vissza a membránpotenciál.”*

A Bíráló által kért kísérletet elvégeztem, ennek eredményét az alábbi kiegészítő ábrával szemléltetem. A lentebb bemutatott kiegészítő ábra alapján látható, hogy amennyiben a csatornákat egy olyan membránpotenciálon, esetünkben -120 mV-on tartjuk, ahol a csatorna aktivációja a konduktancia feszültségfüggésének alapján nem valósul meg, a csatornák zárt állapotban vannak. Ennek megfelelően a második impulzus során inaktivált állapot levő csatornák arányát reprezentáló I_2/I_1 arány $0,923 \pm 0,071$ ($n=2$). Azt, hogy a Cd^{2+} a zárt állapotban levő csatornákhöz nem képes hozzákötődni az I_2/I_1 arányon túl, az I_3/I_1 arány, $0,982 \pm 0,016$ ($n=2$) jelzi. Az eredmények kiértékelése a pályamunkában bemutatottakhoz hasonlóan történt. Az alacsony mérési számot ebben az esetben azzal indokolom, hogy a plusz kísérletek kivitelezésére, a pályamunka bírálatban kért módosításaira, a kérdések megválaszolására hivatalosan viszonylag rövid határidő, két hét áll a pályamunkát benyújtó rendelkezésére. A későbbiekben tervezzük a mérési esetszámok növelését ebben az esetben is.

Ezen túl ez a kísérlet biztosít minket arról, hogy a Cd^{2+} az általunk alkalmazott legmagasabb koncentrációban nem „toxikus” az ioncsatorna fehérjére. Ezáltal a pályamunka 12. ábrájában közzétett kísérlet esetén a harmadik impulzus során létrejövő csúcsáram-csökkenés magyarázatának keresésekor ezekkel a fentebb említett eshetőségekkel nem kell számolnunk.



Kiegészítő ábra: A Cd²⁺ kötődésének vizsgálata zárt állapotú T449A/V474C mutáns Shaker csatornához.

Az ábrán a depolarizáló impulzusok során kapott áramgörbéket tüntettem fel, a kapott csúcsáramok nagyságát I₁, I₂ és I₃ jelöli. Az ábrázolt esetben az első és a második impulzus között 20 s-ig 200 μM-os Cd²⁺ koncentrációjú belső oldatot vezettem a patchre. A tartófeszültség a protokollon belül mindvégig -120 mV volt, míg a depolarizáló impulzusok 5 ms hosszúságú +50 mV-os nagyságúak, hasonlóan a pályamunkában bemutatott mérési protokollhoz. Az eredmények a bírálati válasz törzsszövegében kerültek közlésre.

Végezetül tisztelettel szeretném megköszönni a Bírálónak a pályamunkámmal kapcsolatos munkáját. Megtisztelő volt számomra olvasni a bírálatában 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. A pályamunkához fűzött releváns kérdéseivel pedig hozzájárult a kutatói gondolkodásmódom további fejlesztéséhez.

Debrecen, 2013. december 11.

Tisztelettel,

Zákány Florina

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

**Bírálat Zákány Florina VI. éves orvostanhallgató „Zárt állapotból történő inaktiváció
lehetőségének vizsgálata mutáns *Shaker* kálium ioncsatorna esetén patch-clamp
módszerrel” című Tudományos Diákköri Pályamunkájáról**

Referenciaszám: 1492/B

A szerző 36 oldalas dolgozatában, illetve tudományos diákköri tevékenysége alatt arra kereste a választ, hogy mutáns, Shaker kálium ioncsatorna esetén létrejöhet-e a csatorna inaktivációja közvetlenül zárt állapotból. A pályamunkában kiválóan dokumentált és szemléltetett kísérletek elvégzését követően arra a következtetésre jutott, hogy az adott kísérletes körülmények között a többszörösen mutáns Shaker kálium ioncsatornák esetében ez a folyamat nem figyelhető meg.

A pályamunka világos felépítésű, könnyen olvasható, gördülékeny, a témában kevésbé járatos olvasó számára is egyértelmű. Az elvétve található gépelési hibák nem akadályozzák a munka megértését, azonban fel szeretném hívni a figyelmet arra, hogy néhány ábra (9. és 10.) egy-egy részlete sajnos lemaradt a nyomtatás során.

Mivel a mű kielégíti a TDK pályamunka írására vonatkozó szabályok minden formai és tartalmi követelményét, így a pályamunkát változtatások nélkül, jelen formában elfogadom.

Kód: 1

Debrecen, 2013. november 26.

(B) Változtatás nélkül elfogadja (kód: 1)

**Válasz Zákány Florina „Zárt állapotból történő inaktiváció lehetőségének vizsgálata
mutáns *Shaker* kálium ioncsatorna esetén patch-clamp módszerrel” című TDK
pályamunka 1492/B referenciaszámú 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, 2013. december. 11.

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

1492/A jelű 2. bírálathoz Zákány Florina “Zárt állapotból történő inaktiváció lehetőségének vizsgálata mutáns *Shaker* kálium ioncsatorna esetén patch-clamp módszerrel” című TDK dolgozatáról

A Szerző az első bírálatom majdnem minden kérését elvégezte és kérdéseimre kielégítő választ adott, amit ezúton is köszönök. Azonban maradt némi javítandó a dolgozatban és az eredmények értelmezésében általam vélt ellenmondás feloldása sem sikerült maradéktalanul.

Sajnálom, hogy a kért és elkészített új ábrát csak a válasz mellékleteként juttatta el és ahogy írta „technikai okok miatt” nem illesztette be a pályamunkába. Valamint az is furcsa, hogy a Szerző a gyári készítmények, vegyszerek, mérőeszközök és programok említésénél a javasolt kiegészítés helyett inkább az összes gyártói és a származási hely adatot törölte. Ez a gyakorlat kerülendő, mivel ha a Szerző a későbbiekben tudományos pályán kíván dolgozni, a közleményekben ezeknek szerepelnie kell. Ezért ezeket pótolni és egységesíteni kellene.

Az új 10. ábra szövegében a 100 mV elől hiányzik egy – jel.

Végezetül továbbra is fenntartom azt a megállapításomat, hogy a bemutatott eredményekből nem következik maradéktalanul, hogy „az inaktiváció közvetlenül a zárt állapotból nem valósulhat meg”. Idézet a Szerző bírálatomra adott válaszából: „Az, hogy az általunk meghatározott áramhányad értéke 0-tól különbözik vagy azzal magyarázható, hogy -90 mV-on a csatornák nyitása olyan rövid ideig tart, hogy a Cd^{2+} nem képes hozzákötődni az expozíciós idő alatt az összes inaktíválódó csatornához, **vagy a másik lehetőség, hogy a csatornák kis hányada mégis közvetlenül a zárt állapotból inaktíválódik.**” Tehát a Szerző sem tekint el ettől a lehetőségtől, sőt ennek tisztázására újabb kísérleteket tervez. Ezért azt javaslom, hogy a 30. oldal tetején az utolsó mondat állítását egy kicsit gyengíteni kellene.

A fent kifejtett véleményem alapján a javított **pályamunka elfogadását a javítások elvégzésétől teszem függővé (2B).**

Debrecen, 2014. január 6.

(A) Változtatások elvégzése után fogadja el. (kód: 2B).

**Válasz Zákány Florina „Zárt állapotból történő inaktiváció lehetőségének vizsgálata
mutáns *Shaker* kálium ioncsatorna esetén patch-clamp módszerrel” című TDK
pályamunka 1492/A referenciaszámú 2. bírálatára**

A Bíráló által kért formai és tartalmi javításokat (10. ábra ábraszövege; új ábra -jelenleg 12. ábra- pályamunkába történő beillesztése; gyári készítmények és mérőeszközök gyártóinak pontos megjelölése) részletesen a pályamunka jelen változata tartalmazza. Továbbá a pályamunka korábbi változatában a 30. oldal tetején található utolsó mondat állítását a Bíráló javaslatának megfelelően egy „kicsit gyengítettem”. A módosított pályamunkában ez a mondat az 31. oldal, 2. sorában így olvasható: *„Mindez azt támasztja alá, hogy az aktivációs kapu nyitása megelőzheti az inaktivációs kapu záródását. A fentebb bemutatott statisztikai próba eredménye alapján véleményünk szerint az inaktiváció közvetlenül a zárt állapotból nagy valószínűséggel nem valósulhat meg”*.

Végezetül ezúton is tisztelettel szeretném megköszönni a Bírálónak a pályamunkámmal kapcsolatos munkáját. Úgy gondolom, hogy munkám a Bíráló magas szintű szakmai tudásának megfelelő észrevételei alapján történő korrekcióját követően mind tartalmi, mind formai szempontból értékesebb lett.

Debrecen, 2014. január 29.

Tisztelettel,

Zákány Florina

DE-ÁOK VI. évfolyam/ 8-as csoport

DE-ÁOK Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

**Bírálat Zákány Florina VI. éves orvostanhallgató „Zárt állapotból történő inaktiváció
lehetőségének vizsgálata mutáns *Shaker* kálium ioncsatorna esetén patch-clamp
módszerrel” című Tudományos Diákköri Pályamunkájáról**

Referenciaszám: 1492/B

A pályamunkát változtatások nélkül, jelen formában elfogadom.

Kód: 1

Debrecen, 2014. január 09.

(B) Változtatás nélkül elfogadja (kód: 1)

**Válasz Zákány Florina „Zárt állapotból történő inaktiváció lehetőségének vizsgálata
mutáns *Shaker* kálium ioncsatorna esetén patch-clamp módszerrel” című TDK
pályamunka 1492/B referenciaszámú 2. bírálatára**

Tisztelettel szeretném megköszönni a bírálónak a pályamunkámmal kapcsolatos munkáját.
Megtisztelő volt számomra olvasni a bírálatokban leírt elismerő észrevételeit.

Debrecen, 2014. január 29.

Tisztelettel:

Zákány Florina

DE-ÁOK VI. évfolyam/ 8-as csoport
DE-ÁOK Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

**Bírálat Zákány Florina VI. éves orvostanhallgató „Zárt állapotból történő inaktiváció
lehetőségének vizsgálata mutáns *Shaker* kálium ioncsatorna esetén patch-clamp
módszerrel” című Tudományos Diákköri Pályamunkájáról**

Referenciaszám: 1492/A

A kijavított pályamunkát elfogadom (A).

(A) Változtatás nélkül elfogadja (kód: 1)

**Válasz Zákány Florina „Zárt állapotból történő inaktiváció lehetőségének vizsgálata
mutáns *Shaker* kálium ioncsatorna esetén patch-clamp módszerrel” című TDK
pályamunka 1492/A referenciaszámú 3. bírálatára**

Tisztelettel szeretném megköszönni a bírálónak a pályamunkámmal kapcsolatos munkáját. Az elismerő észrevételei mellett a bírálatok során leírt bíráló formai és tartalmi észrevételeit megalapozottnak tartom. Úgy érzem, hogy munkám ezen észrevételeknek megfelelően történő korrekciója következtében mind tartalmi, mind formai szempontból értékesebb lett és hozzájárul a későbbiekben tudományos szemléletem fejlődéséhez.

Debrecen, 2014. március 03.

Tisztelettel:

Zákány Florina

DE-ÁOK VI. évfolyam/ 8-as csoport
DE-ÁOK Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

**Bírálat Zákány Florina VI. éves orvostanhallgató „Zárt állapotból történő inaktiváció
lehetőségének vizsgálata mutáns *Shaker* kálium ioncsatorna esetén patch-clamp
módszerrel” című Tudományos Diákköri Pályamunkájáról**

Referenciaszám: 1492/B

A pályamunkát változtatások nélkül, jelen formában elfogadom.

Kód: 1

Debrecen, 2014. január 09.

(B) Változtatás nélkül elfogadja (kód: 1)

**Válasz Zákány Florina „Zárt állapotból történő inaktiváció lehetőségének vizsgálata
mutáns *Shaker* kálium ioncsatorna esetén patch-clamp módszerrel” című TDK
pályamunka 1492/B referenciaszámú 3. bírálatára**

Tisztelettel szeretném megköszönni a bírálónak a pályamunkámmal kapcsolatos munkáját. Az elismerő észrevételei mellett a bírálatok során leírt bíráló formai és tartalmi észrevételeit megalapozottnak tartom. Úgy érzem, hogy munkám ezen észrevételeknek megfelelően történő korrekciója következtében mind tartalmi, mind formai szempontból értékesebb lett és hozzájárul a későbbiekben tudományos szemléletem fejlődéséhez.

Debrecen, 2014. március 03.

Tisztelettel:

Zákány Florina

DE-ÁOK VI. évfolyam/ 8-as csoport
DE-ÁOK Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet