

A sejtmembrán szterol tartalmának változtatása módosítja a Kv1.3 ioncsatorna lipidtutajok és egyéb membrán mikrodomének közötti megoszlását

Cs. Szabó Bence

Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar V. évfolyam



Témavezetők:

Dr. Kovács Tamás tudományos munkatárs

Dr. Zákány Florina tudományos segédmunkatárs

Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

Aláírással a pályamunka beküldéséhez hozzájárulok.

Prof. Dr. Panyi György

Intézetvezető

Dr. Varga Zoltán

Intézeti TDK felelős

Tartalomjegyzék

1.	Absztrakt.....	3
2.	Rövidítések jegyzéke	4
3.	Bevezetés.....	5
3.1.	A feszültségfüggő káliumcsatornák általános jellemzői	5
3.2.	A $K_v1.3$ funkciója és patofiziológiai jelentősége.....	7
3.3.	A koleszterin hatása a $K_v1.3$ ioncsatornára	7
3.4.	A sejtmembrán lipidtutaj mikrodoménjei	8
3.5.	A K_v ioncsatornák és lipidtutajok kapcsolata	10
4.	Célkitűzés.....	11
5.	Anyagok és módszerek	12
5.1.	Alkalmazott sejtvonalak és tenyésztésük.....	12
5.2.	A sejtek transzfekciója és a kísérletek során használt plazmidok	12
5.3.	A sejtek kezelése	13
5.4.	A sejtmembránban található lipidtutajok, illetve $K_v1.3$ ioncsatornák jelölése	13
5.5.	Konfokális és STED mikroszkópos képalkotás	14
5.6.	A mikroszkópos felvételek kiértékelése	18
5.7.	Statisztikai elemzés	19
6.	Eredmények.....	20
6.1.	A kolokalizáció meghatározására használt módszer tesztelése kétféle lipidtutaj markerrel	20
6.2.	Koleszterin és 7DHC hatása a $K_v1.3$ lipidtutaj lokalizációjára (konfokális lézer-pásztázó mikroszkópia)	21
6.3.	Koleszterin és 7DHC hatása a $K_v1.3$ lipidtutaj lokalizációjára (STED mikroszkópia).....	24
6.4.	Az exogén módon bejuttatott fluoreszcens koleszterin analóg kolokalizációja a lipidtutajokkal és $K_v1.3$ ioncsatornákkal	25
7.	Megbeszélés	28
8.	Köszönetnyilvánítás.....	30
9.	Irodalomjegyzék	31
10.	Függelék.....	36

1. Absztrakt

A limfociták aktivációjában szerepet játszó feszültségkapuzott Kv1.3 ioncsatornáról ismert, hogy preferenciálisan a lipidtutajokban helyezkedik el. Ezen mikrodomének által biztosított jelátviteli környezet fontos szerepet tölthet be az ioncsatorna működésének szabályozásában. Munkacsoportunkban korábban kimutatták, hogy a membrán szterol tartalmának szelektív növelése megváltoztatja a Kv1.3 elektrofiziológiai jellemzőit (kinetikai és egyensúlyi paraméterek). A töltések során bevitt szterolok és a csatorna kölcsönhatásának pontos mechanizmusa (direkt és /vagy indirekt hatások) azonban nem ismert.

Kísérleteink során célunk volt a membrán szterol tartalmának szelektív manipulálása után a Kv1.3 és a lipidtutajok közötti kolokalizáció vizsgálata. Ehhez HEK-293 sejtekben a koleszterin vagy 7-dehidrokoleszterin (7DHC) mennyiségét növeltük a megfelelő szterol/metil-béta-ciklodextrin (M β CD) komplexekkel, illetve koleszterint vontunk ki a sejtek membránjából M β CD alkalmazásával. Ezután jelöltük a sejtekbe transzfektált FLAG epitópot hordozó Kv1.3 csatornákat anti-FLAG antitesttel és a lipidtutajokat koleratoxin B alegységével, majd konfokális, illetve stimulált emisszió kioltás (STED) mikroszkóp segítségével felvételeket készítettünk. Kvantitatív képanalízis során meghatároztuk a Kv1.3, illetve tutaj jelölők intenzitásai közötti Pearson-féle korrelációs koefficiens (r) értékét.

Méréseink alapján a kontrollhoz ($r=0,416\pm0,013$, $n=27$) képest a membrán koleszterin, illetve 7DHC tartalma növelésének hatására a Kv1.3 tutajokkal történő kolokalizációja szignifikánsan ($p<0,05$) növekedett (koleszterin esetén $r=0,492\pm0,013$, $n=34$; 7DHC mellett $0,500\pm0,015$, $n=32$), míg M β CD kezelés után szignifikánsan csökkent ($r=0,338\pm0,014$, $n=30$). Konfokális mikroszkópos eredményeinket a nagyobb feloldóképességgel (46-60 nm) bíró STED mikroszkópiával is megerősítettük (kontroll: $r=0,274\pm0,025$, $n=25$; koleszterin: $r=0,361\pm0,019$, $n=32$; 7DHC: $r=0,366\pm0,019$, $n=28$; M β CD: $r=0,219\pm0,022$, $n=24$).

Kísérleteink során kimutattuk, hogy a Kv1.3 membrán mikrodomének közötti megoszlása függ a sejtmembrán szterol tartalmától, ami mediálhatja a szterolok ioncsatornákra kifejtett elektrofiziológiai hatásait.

2. Rövidítések jegyzéke

- 7DHC: 7-dehidrokoleszterin
- ANOVA: varianciaanalízis angol megfelelőjéből képződő betűszó (ANalysis Of Variance)
- ATCC: American Type Culture Collection
- CRAC: Ca^{2+} release aktivált Ca^{2+} ioncsatorna
- CTX- β : koleratoxin β alegysége
- DMEM: Dulbecco's minimum essential medium
- EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav
- FCS: fetális borjú szérum
- FLAG: DYKDDDDK peptid szekvencia motívum (D=aszpartát, Y=tirozin és K=lizin)
- GAMIG: Goat Anti-Mouse ImmunoGlobulin
- GFP: zöld fluoreszcens fehérje
- GFP-GPI: glikozil-foszfátid-ilinozitol horgonyt tartalmazó zöld fluoreszcens fehérje
- GM1: monoszialotetrahexozilgangliozid
- GPI: glikozil-foszfátid-ilinozitol
- HEK-293: humán embrionális vesesejtkultúra
- IP3: inozitol 1, 4, 5-trifoszfát
- K^+ : Kálium ion
- K_V : Feszültségfüggő káliumcsatorna
- M β CD: metil-béta-ciklodextrin
- NBD-koleszterin: 25-[N-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)metil]amino]-27-norkoleszterin
- PBS: foszfát puffer oldat
- PD: pórus domén
- SEM: középérték közepes hibája
- STED mikroszkópia: stimulált emisszió kioltás mikroszkópia
- T_{CM} : centrális memória T-sejt
- T_{EM} : effektor memória T-sejt
- VSD: feszültség szenzor domén

3. Bevezetés

3.1. A feszültségfüggő káliumcsatornák általános jellemzői

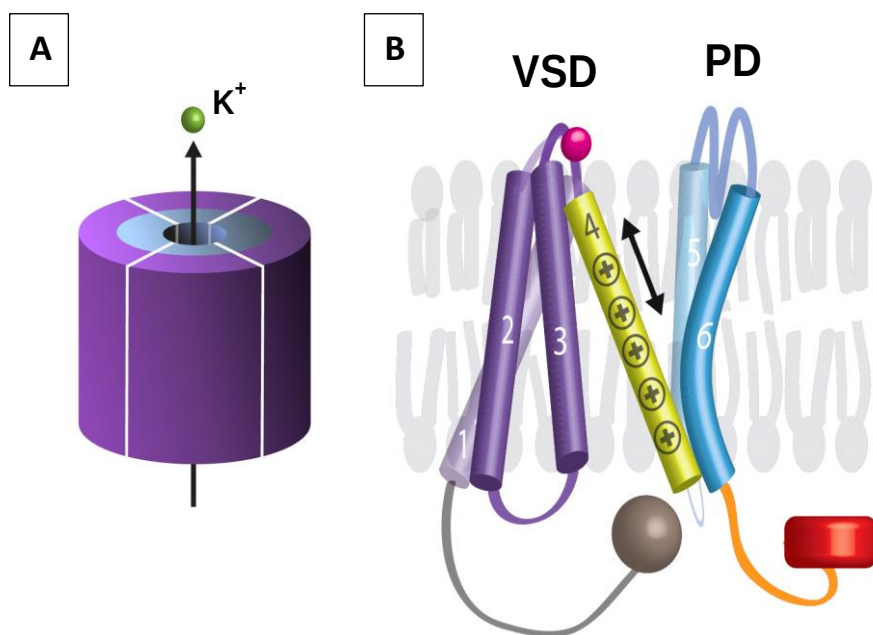
Az ioncsatornák olyan transzmembrán fehérjék, amelyek feladata ionok koordinált passzív transzportja biológiai membránok két oldala között. A fehérjecsalád számos tagja ismert, amelyek csoportosíthatók permeabilitásuk szelektivitása szerint, amely felosztás alapja, hogy milyen típusú ionok számára átjárható az általuk kialakított hidrofób pórus. Eszerint elkülönítünk nagy szelektivitású, kis szelektivitású és nem szelektív csatornákat. Ezen fehérjék másik fontos jellemzője a kapuzási mechanizmus, amely alatt a megfelelő inger hatására bekövetkező konformációváltozást értjük, ami a csatornák különböző szerkezeti (nyitott, zárt, inaktivált) és funkcionális (van ionáramlás vagy nincs) állapotainak kialakulásához vezet. A konduktív állapothoz vezető inger alapján megkülönböztetünk intra- illetve extracelluláris ligand, mechanikus feszülés, valamint feszültség által kapuzott ioncsatornákat [1].

A feszültségfüggő káliumcsatornák (K_v) a fenti osztályozás szerint nagy szelektivitású (csak káliumionra permeábilis), a membránpotenciál változásai által kapuzott (depolarizációra nyitó) ioncsatornák. A család tagjaira általánosságban jellemző, hogy tetramer szerkezetűek, azaz négy alegység alkot egy funkcionális csatornát. Az alegységek aminosavszekvenciái alapján 12 családban összesen 40 tagot írtak le ($K_v1.1$ -től $K_v12.3$ -ig), amelyek egymással homo- illetve heterotetramer csatornákat alkotnak, rendkívül diverzifikált funkcióval rendelkező molekulák sokféleségét létrehozva [2]. A K_v ioncsatornák nyitási valószínűsége a sejtmembrán depolarizációjának hatására megnő, ami K^+ effluxot és a sejtmembrán következményes hiperpolarizációját okozza. Utóbbi negatív visszacsatolás formájában felelős a csatorna bezárulásáért. Ha a depolarizáció hosszabb ideig áll fenn, egyes K_v csatornák egy nem-vezető konformációt vesznek fel, inaktiválódnak, amely funkcionálisan nem vezetőképessé, nem aktiválható állapotot jelent [1].

A K_v csatornákra általánosságban jellemző, hogy a tetramer minden alegysége hat transzmembrán α -helikális szegmensből (S1-S6), valamint intra- és extracelluláris hurkokból áll, amelyekkel a szegmensek kapcsolódnak egymáshoz (**1. ábra**). Az ionok vezetéséért felelős pórus domént (PD) az S5 és S6 szegmensek, valamint a közöttük lévő extracelluláris hurok alkotja. A pórus régióban található a csatorna szelektivitásáért felelős filter, amely biztosítja,

hogy más ionok ne juthassanak át a csatornán. A membránpotenciál változásait a feszültség érzékelő domén detektálja (voltage-sensor domain – VSD), amelyet az alegységek S1-S4 helikális szegmensei hoznak létre [3-5]. A VSD működésében kiemelten fontosak az S4 hélixeiben található pozitívan töltött arginin aminosavak. Depolarizáció hatására ugyanis ezek a sejtmembrán síkjához képest kifelé mozdulnak, amely a PD konformációváltozását és ezáltal az S6 szegmensek intracelluláris végei által kialakított aktivációs kapu nyitását eredményezi (csatolási mechanizmus) [6, 7].

A K_v csatornák jelentős diverzitásával összhangban számos sejtfunkcióban, így neuronok és izomsejtek ingerelhetőségében [8, 9], limfociták antigén dependens aktivációjában [10], illetve tumoros sejtek proliferációjában is kimutatták azok meghatározó jelentőségét [11].



1. Ábra: A feszültség kapuzott $K_v1.3$ ioncsatorna szerkezete. A feszültség kapuzott $K_v1.3$ káliumcsatorna 4 alegységből épül fel (A). Egy alegységen belül az S1-S4 helikális szegmensek hozzák létre a feszültség szenzor domént (VSD), míg az S5 és S6 szegmensek a pórus domén (PD) kialakításában vesznek részt. Depolarizáció hatására az S4 a hélixeiben található pozitív töltéssel rendelkező aminosavak jelenléte miatt a membrán síkjához képest kifelé mozdul, aminek eredményeképpen a pórus kinyílik, lehetővé téve a K^+ átjutását (B).

Forrás: Zákány F és mtsai, Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids. 2019 Mar; 1864 (3):312-325.

3.2. A $K_v1.3$ funkciója és patofiziológiai jelentősége

A feszültségfüggő káliumcsatornák *Shaker* családjába tartozó $K_v1.3$ legfontosabb szerepe a T limfociták membránpotenciáljának szabályozása. Mivel a csatorna aktivációs küszöbe a T sejt nyugalmi potenciáljához közel van, így a depolarizáció nagyban megnöveli a csatorna nyitási valószínűségét, az ennek eredményeképpen kialakuló K^+ efflux pedig a membránpotenciál pozitív irányba történő elmozdulását ellensúlyozza [12, 13]. A csatorna működésének fő fiziológias következménye, hogy a T sejt aktivációja során – például antigén prezentációt követően keletkező inozitol 1,4,5-triszfoszfát (IP_3) hatására – bekövetkező citoszolikus Ca^{2+} koncentráció növekedésből fakadó membránpotenciál változás ellen hat, azaz biztosítja a negatív membránpotenciált. Ez pedig fenntartja az elektrokémiai hajtóerőt a további hosszantartó Ca^{2+} influx számára a megfelelő CRAC (Ca^{2+} release aktivált Ca^{2+}) ioncsatornákon keresztül és ezáltal lehetővé teszi a jelátviteli folyamatok beindulását eredményező Ca^{2+} -jel kialakulását [14, 15]. Ezzel összhangban már régóta ismert, hogy a $K_v1.3$ gátlószereinek hatására lecsökken T limfociták aktivációja esetén a sejtek proliferációja, illetve citokin szekréciója [16, 17]. A $K_v1.3$ expressziója a különböző típusú T sejteket összehasonlítva jóval magasabb az ún. effektor memória (T_{EM}) sejtekben a naiv, illetve centrális memória (T_{CM}) sejtekhez képest, így főleg a T_{EM} sejtek érzékenyek a csatorna gátlószerei iránt [18]. Mivel bizonyos típusú autoimmun betegségekben, így rheumatoid arthritisben, sclerosis multiplexben vagy 1-es típusú diabetes mellitusban patogenetikai szempontból jelentős tényező a T_{EM} limfociták fokozott aktivációja, amely folyamatban alapvető a $K_v1.3$ szerepe, a csatorna gátlószerei hatásosnak bizonyultak állatkísérletes modellekben ezen kóros állapotok megelőzésében, illetve terápiájában [19, 20].

3.3. A koleszterin hatása a $K_v1.3$ ioncsatornára

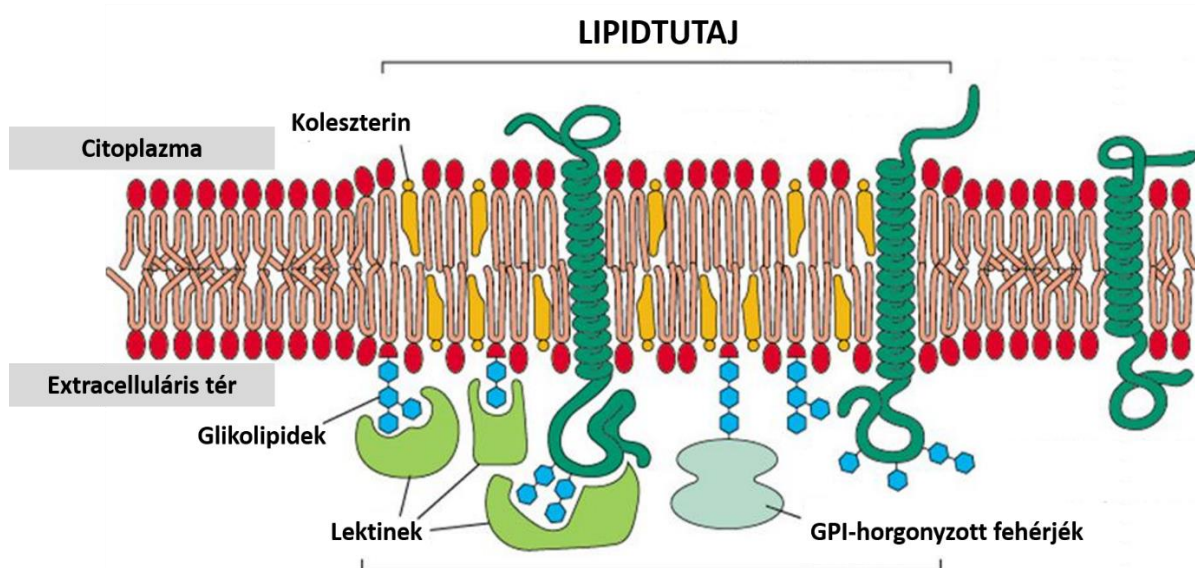
A sejtmembrán lipid összetétele jelentősen befolyásolja a transzmembrán fehérjék, így az ioncsatornák szerkezetét és funkcióját. A lipidek által a fehérjékre gyakorolt hatások történhetnek indirekt, nem specifikus módon, azaz a membrán biofizikai paramétereiben (membrán fluiditás, görbület, laterális nyomás) bekövetkező változások hatnak a csatornára,

de megvalósulhatnak specifikus, direkt, ligand – receptor interakcióhoz hasonló kölcsönhatásokon keresztül [21]. A sejtmembrán nélkülözhetetlen alkotójaként a koleszterinről is ismert korábbi irodalmi adatok alapján, hogy módosítja számos ioncsatorna működését direkt vagy indirekt hatásokon keresztül [22]. Ezzel összhangban kimutatták, hogy a sejtmembrán koleszterin tartalmának növelése gátolja, míg annak csökkentése serkenti különböző K_v csatornák aktivitását, amely megnyilvánul a csatornák nyitási valószínűségének, egyedi konduktanciájának, illetve az ionáramok kinetikai és egyensúlyi paramétereinek megváltozásában. A hatások hátterében leírtak direkt, azaz specifikus kötőhelyre kapcsolódás útján történő hatásokat, indirekt mechanizmust, amely szerint a sejtmembrán koleszterin molekulák miatt megnövekedett rigiditása egyfajta energetikai barriert képez a konformáció változás során, illetve leginkább ezek kombinációját valószínűsítették, valamint felvetődött a lipiddutajok szerepe is [23-27].

3.4. A sejtmembrán lipiddutaj mikrodoménjei

Az eukarióta sejtmembrán komplexitásának egyik megnyilvánulása a szerkezet laterális heterogenitása, azaz a membrán mikrodomének kialakulása (**2. ábra**). Kezdetben azt gondolták, hogy a membrán homogén kétdimenziós folyadéknak tekinthető a fő membránalkotó foszfolipidek oldalláncainak folyékony fázisa miatt és a membránfehérjék ebben a „tengerben” helyezkednek el oly módon, hogy szabad diffúziójuk véletlenszerű fehérje elrendeződést hoz létre (Singer-Nicolson folyékony-mozaik membránmodell [28]). Későbbi kutatásokból azonban kiderült, hogy a sejtmembránban található lipidek rendezett, inhomogén eloszlást mutatnak. Különböző lipidek, elsősorban szfingolipidek és koleszterin molekulák preferenciális kölcsönhatása révén ugyanis speciális nanométeres nagyságrendű mikrodomének, ún. lipiddutajok jönnek létre, amelyeknek a fehérje- és lipidösszetétele, valamint a szupramolekuláris felépítése eltér a membrán többi régiójától [29, 30]. A 2006-ban megalkotott lipiddutaj definíció szerint: „a lipiddutajok kicsi (10-200 nm-es), heterogén, nagyon dinamikus, szterolban és szfingolipidekben gazdag mikrodomének, melyek kompartmentalizálják a sejtes folyamatokat. A kis dutajok egyes esetekben fehérje-fehérje és fehérje-lipid kölcsönhatások révén nagyobb platformokká állhatnak össze” [31]. A lipiddutajokkal kapcsolatos korai kutatásokat számos ellentmondás övezte, különös tekintettel

a vizsgálatukban alkalmazott módszerek tekintetében, illetve a transzmembrán fehérjék, valamint a kortikális aktin hálózat szerepére vonatkozóan [32, 33]. A jelenleg leginkább elfogadott elmélet szerint a lipidtutajok termodinamikusan instabil, koleszterinben és szfingolipidekben dús, a membrán egyéb régióihoz képest rendezettebb és nagyobb membránvastagságú mikrodomének. Kialakulásukban a preferenciális lipidek közötti kölcsönhatások mellett azonban meghatározó szerepet játszanak a citoszkeletális hálózatok és a membránfehérjék, illetve azok lipidekkel való kölcsönhatásai is [34-36].



2. Ábra: A lipidtutajok szerkezete. Az eukarióta sejtmembránban koleszterinben, gliko- és szfingolipidekben dús mikrodomének találhatók, amelyeket lipidtutajoknak nevezünk. Ezek a termodinamikusan instabil mikrodomének speciális membránbiofizikai tulajdonságokkal, így nagy rigiditással, megnövekedett membránvastagsággal, magasabb dipólpotenciállal és lecsökkent fluiditással rendelkeznek, ezáltal jelentősen befolyásolhatják a bennük elhelyezkedő transzmembrán fehérjék szerkezetét, egymással való kölcsönhatásainak hatékonyságát, ezáltal a fehérjék funkcióját is.

Forrás: Figure 13-63. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

A transzmembrán fehérjék lipidtutaj mikrodomének és egyéb membrán régiók közötti megoszlása laterális diffúzió révén dinamikusan változik, amely funkcionális jelentőséggel bír. A tutajok ugyanis a molekulákat egymás közelében tartva növelhetik kölcsönhatásaik valószínűségét, miközben más molekulákat szegregálnak egymástól, csökkentve interakciójuk hatékonyságát. Emellett a tutajok rigiditása befolyásolhatja a transzmembrán fehérjék

különböző konformációinak stabilitását, a konformáció változások sebességét, egyensúlyát. Ennek megfelelően a lipidtutajok szerepét kimutatták a membrán trafficking, jelátvitel, sejt migráció, adhézió és aktiváció, a patogének sejtbe jutása, valamint a citoskeletális organizáció folyamataiban, így hozzájárulhatnak akár tumoros, immunológiai, metabolikus vagy neurodegeneratív betegségek pathomechanizmusához is [37-39].

3.5. A K_v ioncsatornák és lipidtutajok kapcsolata

Számos csatorna, így feszültségfüggő káliumcsatornák, mint a $K_v1.3$, $K_v1.4$, $K_v2.1$, $K_v4.2$, $K_v7.1$, $K_v10.1$ és $K_v11.1$ esetén is kimutatták, hogy előfordulnak a sejtmembrán lipidtutaj régióiban, illetve ezen mikrodomének hatást gyakorolnak a csatornák funkciójára [24, 40-44]. A lipidtutajbeli lokalizáció jelentősen befolyásolhatja ugyanis az ioncsatornák működését különböző, általában egyszerre jelen levő mechanizmusokon keresztül. Egyrészt a tutajokban dúsuló koleszterin, illetve szfingolipid molekulák direkt fehérje-lipid kölcsönhatásokon keresztül módosíthatják a fehérjék konformációját, stabilitását; másrészt a hatás hátterében ezen mikrodoménekre jellemző speciális membránbiofizikai paraméterekkel (alacsonyabb fluiditás és hidráció, nagyobb lipidrendezettség és magasabb membránvastagság) jellemezhető mikrokörnyezet állhat; harmadrészt pedig a lipidtutajokban dúsuló, illetve onnan szegregált fehérjék (kölcsönható jelátviteli partnerek, szabályozó vagy scaffolding proteinek) megváltozott lokális koncentrációja is eredményezheti a fehérje módosult funkcionális aktivitását [45]. Ezzel összhangban több kutatás felvetette a lipidtutajok szerepét a $K_v1.3$ funkciójának szabályozásában. Kimutatták, hogy limfociták aktivációja során a $K_v1.3$ akkumulálódik a lipidtutajok aggregációjából kialakuló, jelátviteli folyamatok elindításáért felelős immunológiai szinapszis területén [46]. A $K_v1.3$ limfocita aktiváció során történő laterális redisztribúciója pedig fontos a csatorna aktivációjának, valamint a következményes Ca^{2+} -jel hosszának és nagyságának szabályozásában. A $K_v1.3$ szinapsziszból történő korai kikerülése, ami például szisztémás lupus erythematosus mintákból származó limfocitákban megfigyelhető, túlságosan nagy Ca^{2+} -jel kialakulását és ezáltal a limfociták hiperaktivitását eredményezheti, amely a csatorna aktivitásának lipidtutajok általi szabályozására utal [47, 48].

4. Célkitűzés

Az előző fejezetekben leírtak alapján a sejtmembránban található koleszterin jelentősen befolyásolja a Kv1.3 ioncsatorna funkcióját, elektrofiziológiai paramétereit. Ennek hátterében állhatnak direkt, indirekt és lipidtutajok által mediált hatások. Bár azt valószínűsítik, hogy mindhárom tényező szerepet játszik a koleszterin Kv1.3-ra gyakorolt hatásában, ezek pontos mechanizmusa nem ismert. Kísérleteinkben azt kívántuk vizsgálni, hogy a sejtmembrán koleszterin tartalmának módosítására hogyan változik a Kv1.3 membrán mikrodomének közötti megoszlása. Ennek vizsgálatára célul tűztük ki az ioncsatorna és a lipidtutajok közötti kolokalizáció meghatározását a sejtmembrán szterol tartalmának szelektív manipulálását követően. Kutatómunkánk során e célból humán embrionális vesesejteket (HEK-293) transzfektáltunk FLAG epitópot hordozó Kv1.3 fehérjét kódoló plazmiddal, majd a szterol tartalom módosítása és fluoreszcens jelölés után konfokális lézer-pásztázó mikroszkópot alkalmazva vizualizáltuk a csatornákat és a lipidtutajokat, végül pedig kvantitatív képanalízis segítségével meghatároztuk a kolokalizációt jellemző Pearson-féle korrelációs koefficiens értékét, illetve annak változását a kezelések hatására. A koleszterin által okozott hatás specifikus voltának vizsgálatára méréseinket elvégeztük egy hasonló vegyület, a 7-dehidrokoleszterin alkalmazásával is. Mivel a lipidtutajok mérete kisebb, mint a hagyományos mikroszkópia során elérhető minimális feloldható távolság, kísérleteinket megismételtük a jobb feloldóképességű STED mikroszkópia alkalmazásával. Az exogén módon bevitt koleszterin molekulák laterális membránbeli megoszlásának vizsgálatára a kolokalizáció elemzését elvégeztük fluoreszcensen jelzett koleszterin használatával is.

5. Anyagok és módszerek

5.1. Alkalmazott sejtvonalak és tenyésztésük

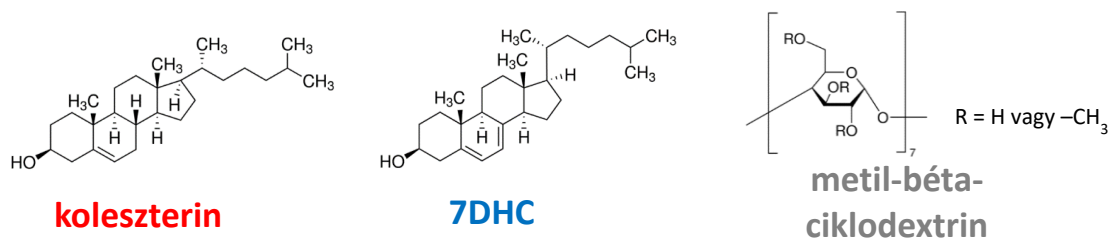
Kísérleteinket HEK-293 humán embrionális vese sejtvonalon végeztük, amelyet az American Type Culture Collections-től (ATCC, Manassas, VA) vásároltunk. A sejteket az ATCC ajánlásainak megfelelően tenyésztettük 25 cm²-es tenyésztőflaskában (Eppendorf, Hamburg, Németország) korai konfluens állapotig 10% fetális borjú szérumot (FCS), gentamicint (50 µg/ml) és L-glutamint (2 mmol/l) tartalmazó Dulbecco's minimum essential medium (DMEM) tápoldatban 37°C-on 95%-os páratartalom mellett 5% CO₂-ot tartalmazó gázelegyenben.

5.2. A sejtek transzfekciója és a kísérletek során használt plazmidok

A sejtek transzfekciójához kationos liposzómákon alapuló módszert használtunk, amely során a negatív töltésű DNS komplexet képez a pozitív töltésű lipidekből felépülő liposzómákkal, amelyet a sejtek jó hatékonysággal felvesznek. A transzfekció előtt 24 órával a letapadó sejteket 0,2 g/l EDTA-t tartalmazó PBS oldattal leválasztottuk a tenyésztőflaska aljáról, majd Bürker-kamrával történő sejtszámolás után 8 cellás fedőlemez aljú kamrákba (Lab-Tech™ II, Nalge Nunc International, Rochester, NY) helyeztük át 30000 sejt/lyuk koncentrációban. A sejteket 24 óra múlva cellánként 0,25 µg FLAG epitóppal jelzett Kv1.3 (Kv1.3-FLAG) fehérjét kódoló plazmiddal (Hajdú Péter Béla ajándéka, Debreceni Egyetem) vagy 0,25 µg glikozil-foszfatidil-inozitol horgonyt tartalmazó zöld fluoreszcens fehérjét (GFP-GPI) kódoló plazmiddal (Jennifer Lipincott-Schwartz ajándéka, NIH, Bethesda, MD) transzfektáltuk Lipofectamine 2000 (ThermoFisher) segítségével 2:1 (µl/µg) lipid – DNS arány mellett. A transzfekciós hatékonyság növelése céljából a sejteket erre a célra optimalizált Gibco Opti-MEM médiumban (ThermoFisher) inkubáltuk 6 órán át, majd oldatcsere után a tenyésztést DMEM tápoldatban folytattuk.

5.3. A sejtek kezelése

A transzfekció után 24 órával történt a sejtek koleszterinnel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 7-dehidrokoleszterinnel (Sigma-Aldrich), illetve NBD-koleszterinnel (25-[N-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)metil]amino]-27-norkoleszterin, Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) való töltése, illetve a koleszterint kivonó kezelés is. Az extrakcióhoz natív metil-béta-ciklodextrint (M β CD) alkalmaztunk 3 mg/ml koncentrációban, míg a szterol tartalom növeléséhez gyárilag szintetizált szterol – M β CD komplexeket (CycloLab Cyclodextrin R&D Laboratory, Budapest) használtunk. A kezelések során a koleszterin, 7-dehidrokoleszterin, illetve NBD-koleszterin koncentrációja 195 μ M volt és a megfelelő vegyületekkel 60 percig inkubáltuk a sejteket szobahőmérsékleten (**3. ábra**).



3. Ábra: A sejtek kezeléséhez használt vegyületek. Méréseink során a sejteket koleszterin illetve 7-dehidrokoleszterin (7DHC) metil-béta-ciklodextrinnel (M β CD) alkotott komplexével kezeltük. A 7DHC a koleszterintől csupán annyiban különbözik, hogy egy extra kettős kötést tartalmaz a molekula gyűrűrendszerének 7-es és 8-as pozíciója között. Az M β CD molekulák belül hidrofób csónakápu alakú szerkezetet képeznek, amelyek ezáltal képesek a szterollokkal komplexet képezni, így alkalmasak a sejtmembrán szterol tartalmának módosítására.

5.4. A sejtmembránban található lipidutajok, illetve Kv1.3 ioncsatornák jelölése

A sejtek kezelése és PBS-sel történő mosása után történt a lipidutajok és a Kv1.3 ioncsatornák jelölése. A sejtmembránban található utajok jelölésére kétféle módszert használtunk: (i) A lipidutajokban található GM1 gangliozid molekulákat jelöltük AlexaFluor647 flouorórral konjugált koleratoxin β alegység (CTX-B, ThermoFisher) segítségével, melyet 8 μ g/ml koncentrációban alkalmaztunk 20 percig. A jelölést jégen végeztük, hogy a CTX-B internalizációját elkerüljük. Stimulált emisszió kioltás (stimulated emission depletion, STED)

mikroszkópia során a jelölés AlexaFluor594 festékkel jelzett CTX-B-vel (ThermoFisher) történt.

(ii) A módszer alternatívájaképpen a lipidtutajok GFP-GPI-vel történő jelöléséhez a sejteket kationos liposzóma és a megfelelő plazmid segítségével transzfekáltuk a fentebb részletezett módon.

A hagyományos konfokális mikroszkópos vizsgálatoknál a sejtmembránban található $K_v1.3$ molekulákat a csatorna extracelluláris részén elhelyezkedő FLAG epitópjain jelöltük 2 $\mu\text{g/ml}$ Cy3 fluorofórral konjugált anti-FLAG M2 antitesttel (Sigma-Aldrich), jégen, 20 perces inkubáció mellett. A STED mikroszkópos vizsgálatoknál a $K_v1.3$ -FLAG fehérjét expresszáló sejteket először 2 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban használt konjugátlan anti-FLAG M2 antitesttel (Sigma-Aldrich) jelöltük 30 percig szobahőmérsékleten, majd kétszeri mosást követően 1 $\mu\text{g/ml}$ StarRed-GAMIG antitestet (Goat Anti-Mouse ImmunoGlobulin; Abberior, Göttingen, Németország) alkalmaztunk 20 percig jégen. A festékkel konjugált antitestekkel történő jelölés a megfelelő CTX-B-vel egyidejűleg zajlott.

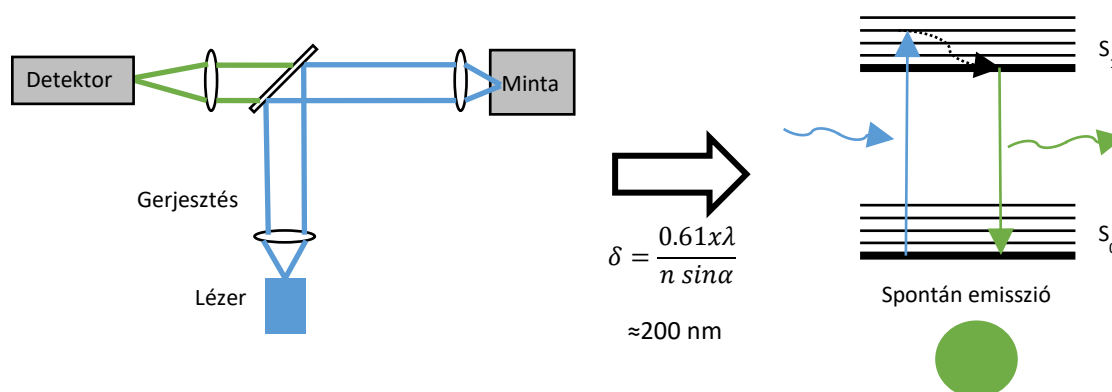
5.5. Konfokális és STED mikroszkópos képalkotás

A megfelelő kezelések és jelölések elvégzése után a sejtek vizsgálatához LSM880 konfokális lézer-pásztázó mikroszkópot (Carl Zeiss AG, Jena, Németország) használtunk. A sejtek fedőlemezhez tapadó membránrégióiról készítettünk felvételeket 1 Airy egységre állított pinhole nagysággal, Zeiss C-Apochromat 40x/1,2 W Korr FCS M27 vízimmerziós objektívet alkalmazva, 83 nm-es pixelméret és 512×512 pixeles felbontás mellett.

Az NBD, GFP, Cy3 és AlexaFluor647 fluorofórok gerjesztése rendre 458 nm-en, 488 nm-en, 543nm-en és 633nm-en történt, míg az általuk emittált fotonokat rendre a 482-696 nm-es, 493-598 nm-es, 548-629 nm-es és 638-756 nm-es tartományokban detektáltuk.

A STED mikroszkópos vizsgálatainkat BX53 (Olympus, Tokió, Japán) STED modullal felszerelt konfokális mikroszkóppal (Abberior) végeztük Olympus 100x/1,4 objektív használatával. Az AlexaFluor594, illetve StarRed fluorofórok gerjesztése 594 nm-en, illetve 640 nm-en történt, míg az emissziót 608 és 627 nm, illetve 650 és 700 nm között mértük. Depléciónhoz 775 nm-es hullámhosszúságú fotonokat alkalmaztunk.

A STED mikroszkópia használata során a lényegesen jobb felbontást a stimulált emisszió depléciónak köszönheti, amely révén a képző elve különbözik a fluoreszcenciás mikroszkóp esetén megszokottól, ugyanis a hagyományos fluoreszcenciás mikroszkóp működése a spontán emisszió jelenségén alapul (4. ábra).



4. Ábra: Fluoreszcenciás mikroszkóp működési elve: spontán emisszió. A hagyományos fluoreszcenciás mikroszkóp a spontán emisszió jelenségén alapul, amely során az általunk választott fluorofór egy elektronja a gerjesztő lézer hatására a nyugalmi S_0 állapotból, gerjesztett S_1 szintre kerül (függőleges kék nyíl), majd belső konverzió (ferde fekete nyíl) után spontán módon visszaesik az S_0 állapotba (függőleges zöld nyíl), miközben egy, a gerjesztő fotonhoz képest alacsonyabb energiájú fotont bocsát ki, amit detektálunk. Itt a feloldás határát az Abbe képletből ismerhetjük, mely értéke 200 nm körül van.

Spontán emisszióval az általunk választott fluorofór egy elektronja a gerjesztő lézer hatására a nyugalmi S_0 alapállapotból gerjesztett S_1 szintre kerül. Ezután belső konverzió történik, majd az S_1 állapot legalsó szintjéről spontán módon visszakerül az S_0 állapotba, miközben egy, a gerjesztő fotonhoz képest alacsonyabb energiájú (így magasabb hullámhosszú) fotont bocsát ki, amit detektálunk. A konfokális pásztázó mikroszkópban elérhető legkisebb feloldható távolság nagyságát az Ernst Abbe által leírt képlet határozza meg ($\delta = 0,61 \frac{\lambda}{n \sin \alpha}$; ahol δ a még éppen megkülönböztethető két tárgypont legkisebb távolsága; λ az alkalmazott lézerfény hullámhossza vákuumban; α az objektív fókuszponttól mért nyílásszöge; n a tárgy és az objektív közötti közeg törésmutatója). Ennek minimális értéke a hagyományos képző során 200 nm körül van.

A STED mikroszkóp működési elve ettől kissé eltérő (5. ábra). Itt nagy jelentőséget kap a stimulált emisszió jelensége, ahol a gerjesztés és belső konverzió után a fluorofór elektronja

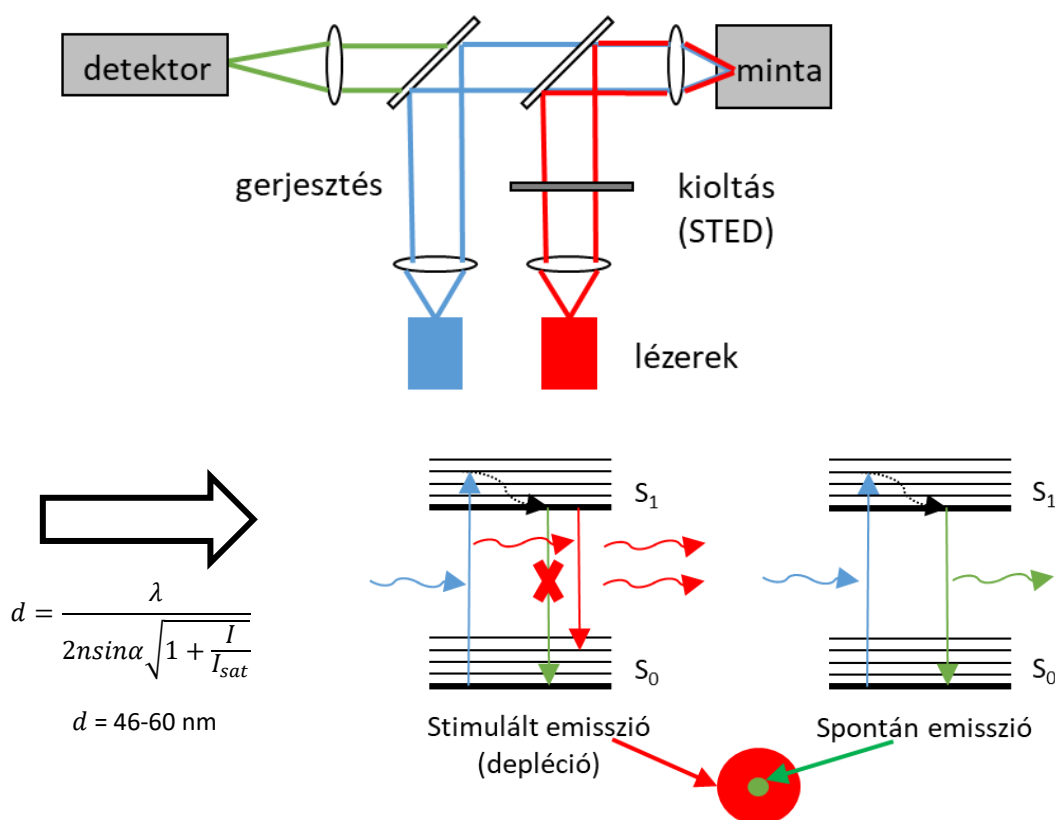
egy második foton hatására relaxálódik. A második, a hagyományos emisszió esetén megfigyeltnél magasabb hullámhosszúságú fotont a STED impulzus lézer biztosítja. A folyamat során egy másik foton emittálódik, amelynek energiája megegyezik a stimulált emissziót kiváltó foton energiájával. Az emittált foton energiája jellemzően alacsonyabb, mint a korábban említett spontán emisszióé, ugyanis itt a relaxáció az S_0 egy magasabb rotációs-vibrációs szintjére történik. Az elektron relaxációja miatt ebben az esetben nem történik spontán emisszió és a stimulált emisszióval egy magasabb hullámhosszú (és alacsonyabb energiájú) foton keletkezik.

A STED mikroszkóp működésénél a stimulált és a spontán emisszió egymással párhuzamosan zajlik le. A gerjesztési pontot előbb megvilágítjuk a gerjesztő impulzus lézerrel, majd időben késleltetve a depletáló STED impulzus lézerrel. A mikroszkóp speciális optikai rendszere (ún. vortex phase plate, amely gyakorlatilag egy erre a célra kialakított üveglemez) a STED lézer gyűrűszerűen világítja meg az adott pontot, így a pont széli részén stimulált, közepén pedig spontán emisszió történik. Megfelelő optikai filterekkel így elérhető, hogy csak a gerjesztési pont középső régióiból érkező alacsonyabb hullámhosszúságú fotonokat detektáljuk, a széli zónából érkezőket nem. Így a már említett Abbe-képlet módosul: a numerikus apertúra a STED lézer intenzitását jellemző taggal egészül ki:

$$\delta = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \sqrt{1 + \frac{I}{I_{sat}}}}$$

Ahol δ a még éppen megkülönböztethető két tárgy pont legkisebb távolsága; λ a lézerfény hullámhossza vákuumban; n a tárgy és az objektív közötti közeg törésmutatója; α az objektív fókuszponttól mért félnyílásszöge; I_{sat} a STED lézert jellemző intenzitás, melyet alkalmazva a molekulák 50%-a deexcitált állapotba kerül; I pedig a STED lézer intenzitását jelöli. Így a

feloldás határa jóval az Abbe képlet által jósolt minimum alá csökken, ami esetünkben 46 nm (StarRed fluorofór esetében), illetve 60 nm (AlexaFluor594 esetében) volt.



5. Ábra: A Stimulált Emisszió Depléción (STED) mikroszkópia elve. A STED mikroszkóp esetében a stimulált emissziót használjuk ki. Stimulált emissziónál a gerjesztés és belső konverzió után az elektron egy második foton hatására relaxálódik. A folyamat során egy másik foton emittálódik, melynek energiája megegyezik az emissziót kiváltó fotonéval és jellemzően alacsonyabb, mint a korábban említett spontán emisszió, mivel a relaxáció az S₀ egy magasabb rotációs-vibrációs szintjére történik. Vagyis ebben az esetben nem történik spontán emisszió és így stimulált emisszióval egy magasabb hullámhosszú foton keletkezik. STED esetén a stimulált és spontán emisszió egymással párhuzamosan zajlik. Először megvilágítjuk a gerjesztési pontot egy gerjesztő impulzuslézerrel, majd időben késleltetve egy depletáló STED impulzus lézerrel. A mikroszkóp speciális optikai rendszere révén a STED lézer gyűrűszerűen világítja meg az adott pontot. Így a pont széli részén stimulált, míg a közepén spontán emisszió történik, amit – mivel hullámhosszuk különbözik – megfelelő optikai filterekkel elkülöníthetünk.

5.6. A mikroszkópos felvételek kiértékelése

Mikroszkópia során az alkalmazott fluorofórok spektrális tulajdonságainak megfelelően külön csatornában, a festékekre jellemző beállításokkal készítettünk felvételeket a sejtmembrán fedőlemezhez tapadó lapos membránrégiójáról. A kolokalizáció jól ábrázolódott az egyes csatornában nyert felvételek egymásra vetítésével készült „overlay” képeken. Felvételeinken azonban kvantitatív képanalízist is végeztünk Matlab (Mathworks, Natick, MA) programkörnyezetben a DiplImage toolbox (Delft University of Technology, Delft, Hollandia) segítségével. A kiértékelés során a felvételeken a sejteket egyesével vizsgálva manuálisan jelöltük ki a membránrégióknak megfelelő területeket („membrán maszk”), majd a területhez tartozó pixelenkénti intenzitásadatok közötti Pearson-féle korrelációs koefficiens nagyságát határoztuk meg egy erre a célra készített Matlab algoritmus segítségével az alábbi képlet alapján:

$$r_{xy} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

ahol n a vizsgált pixelek száma, x_i és y_i a két fluoreszcens jel egyedi pixelekből mért intenzitása, $\bar{x}$ és $\bar{y}$ a két jel átlagos fluoreszcencia intenzitása; r_{xy} pedig a két jel értékei közötti Pearson-féle korrelációs koefficiens értéke.

Az együttható -1 és 1 közötti értékeket vehet fel, -1 a tökéletes negatív korrelációt, $+1$ a tökéletes pozitív korrelációt jelzi (azaz azt a szituációt, amikor az adatokra tökéletesen illeszthető egy egyenes, aminek a meredeksége negatív, ill. pozitív), míg a 0 érték a korreláció hiányára (azaz a két jel véletlenszerű előfordulására) utal.

A korrelációs koefficiensnek a korreláció feltételezett hiánya esetén várható konfidencia intervallumát Costes módszere alapján számítottuk ki minden kép esetén a korábban leírt módon [49]. Ehhez az algoritmus a különböző csatornában az adott membránrégióról készült felvételek pixeljeit véletlenszerűen összekeveri, majd ezen adatokból számolja ki a korrelációs koefficiens értékét. Ezt a műveletet a program 100 alkalommal megismétli és az értékekből meghatározza az együttható 95%-os konfidencia intervallumát. A valós intenzitásokból számított korrelációs koefficiens értéke akkor jelez statisztikai értelemben pozitív vagy negatív

korrelációt, ha értéke a Costes módszere alapján meghatározott konfidencia intervallum határain kívül esik.

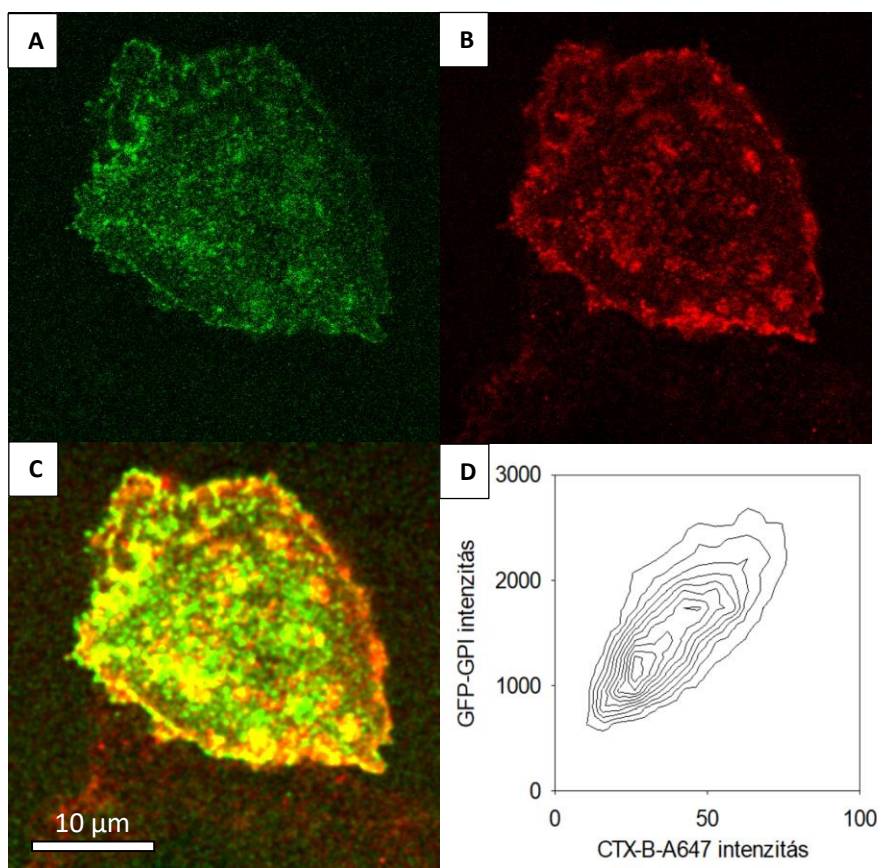
5.7. Statisztikai elemzés

Pályamunkám ábráin az adatok átlagértékeit és azok közepes hibáját ($\pm$ SEM) ábrázoltuk a kiértékelt sejtek száma (n) mellett. A mérési eredményeket reprezentáló ábrák szerkesztéséhez a SigmaPlot 12.0 programot (Systat Software, San Jose, CA) használtuk. A kezelt és kontroll minták közötti statisztikai különbség meghatározásához egyszempontos variancia analízist (ANOVA, one-way analysis of variance), majd Tukey-féle HSD tesztet végeztünk. Az eltéréseket 5%-os szignifikancia szint mellett vizsgáltuk ($p < 0,05$).

6. Eredmények

6.1. A kolokalizáció meghatározására használt módszer tesztelése kétféle lipidtutaj markerrel

Munkánk során a Kv1.3 membrán mikrodomének, azaz a sejtmembrán lipidtutaj és non-raft régiói közötti megoszlását kívántuk tanulmányozni a membrán szterol tartalmának módosítása után konfokális mikroszkópos módszerrel és a Pearson-féle korrelációs koefficiens meghatározásával. Módszerünk alkalmazhatóságának tesztelésére pozitív kontrollként először megvizsgáltunk két, a szakirodalomban gyakran használt lipidtutaj marker közötti kolokalizáció mértékét a jelölők fluoreszcencia intenzitása közötti együttható kiszámításával (**6. ábra**). Ezen méréseinkhez HEK-293 sejteket transzfektáltunk GFP-GPI-t kódoló plazmiddal, a kifejeződő fehérjékben ugyanis a glikozil-foszfatidil-inozitol horgony szignálként szolgál a sejten belüli transzportfolyamatok számára és a fehérje tutajbeli dúsulását eredményezi, a GFP rész által kibocsátott fluoreszcencia pedig kijelöli a lipidtutajok helyét [50, 51]. A transzfektáció után a sejteket *Vibrio cholerae* toxinjának β alegységével (CTX-B) jelöltük, amely a sejtek felszínén a GM1 gangliozidhoz kötődik és mivel ez a molekula elsősorban a lipidtutajokban fordul elő, a fluoreszcensen jelzett CTX-B szintén alkalmas ezen mikrodomének vizualizációjára [52]. A 8 cellás fedőlemez aljú kamrákban növesztett sejtek jelölése után a sejtmembrán fedőlemezhez tapadó lapos régiójáról konfokális lézerpásztázó mikroszkóppal felvételeket készítettünk és kvantitatív kép analízis során az egyes sejtekben a membránpixelek adatainak használatával kiszámítottuk a két jel intenzitása közötti Pearson-együttható nagyságát. Várakozásainknak megfelelően erőteljesen pozitív értéket kaptunk ($r=0,551 \pm 0,020$), amely statisztikailag szignifikánsnak bizonyult, hiszen jóval a korreláció feltételezett hiánya esetén számított 95%-os konfidencia intervallum határain kívülre esett $([-0,017; 0,039])$ (**1. táblázat**). A pozitív korreláció jól látható a reprezentatív overlay felvétel döntően sárga színén, valamint a pixelenkénti intenzitásokat mutató kontúrplot ábrán is. A statisztikailag szignifikáns kolokalizáció a két lipidtutaj marker között megerősítette módszerünk használhatóságát, az együttható így számolt értéke pedig jó viszonyítási alapként szolgált a későbbi ioncsatorna-lipidtutaj kolokalizációs méréseinkhez.

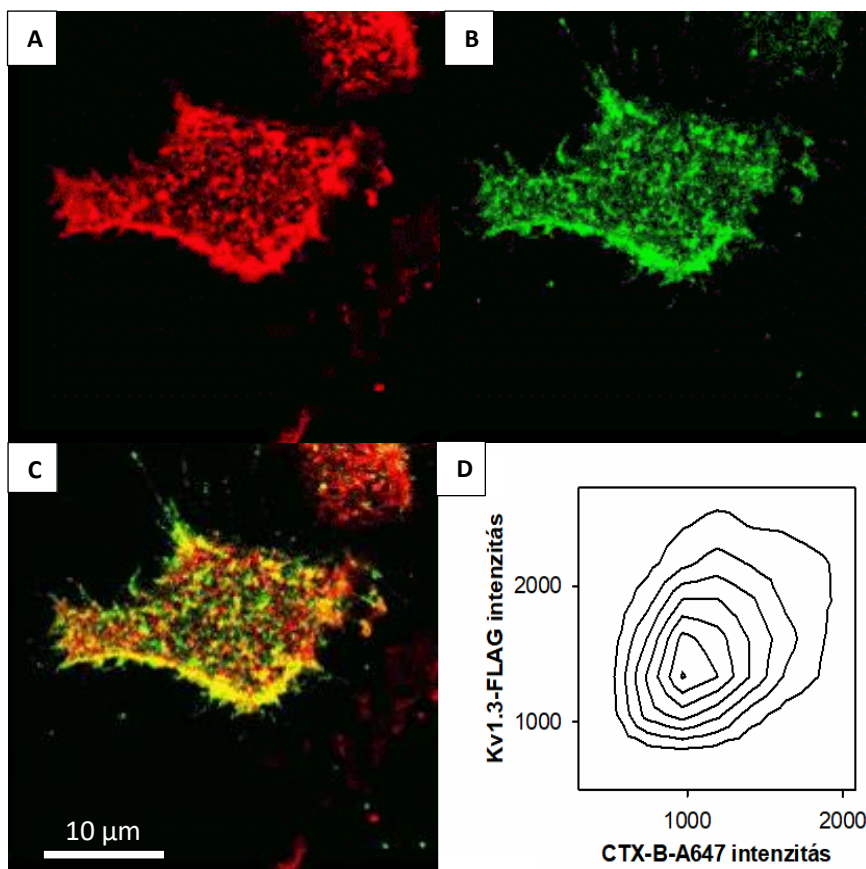


6. Ábra: A módszer vizsgálata kétféle lipidtutaj markerrel. Módszerünk alkalmazhatóságának vizsgálatára két ismert lipidtutajmarker (GFP-GPI és CTX-B-A647) intenzitása közötti korrelációt határoztuk meg: GFP-GPI-vel transzfectált HEK-293 sejteket jelöltünk AlexaFluor647 fluorofórral konjugált CTX-B segítségével, majd a sejtek fedőlemezhez tapadó membránrégióiról felvételeket készítettünk konfokális lézerpásztázó mikroszkópot használva, és meghatároztuk a két jel közötti korrelációs koefficiens értékét. A reprezentatív felvétel zöld színnel mutatja a GFP-GPI által jelölt régiókat (A), pirossal a CTX-B-A647 által jelölt mikrodoméneket (B), valamint az egymásra vetített képen jól látható a kolokalizációra utaló sárga szín (C). A két jel közötti kolokalizációt mértékét jellemzi a fluorofórok pixelenkénti intenzitásadatainak korrelációját bemutató kontúrplot ábra (D).

6.2. Koleszterin és 7DHC hatása a Kv1.3 lipidtutaj lokalizációjára (konfokális lézerpásztázó mikroszkópia)

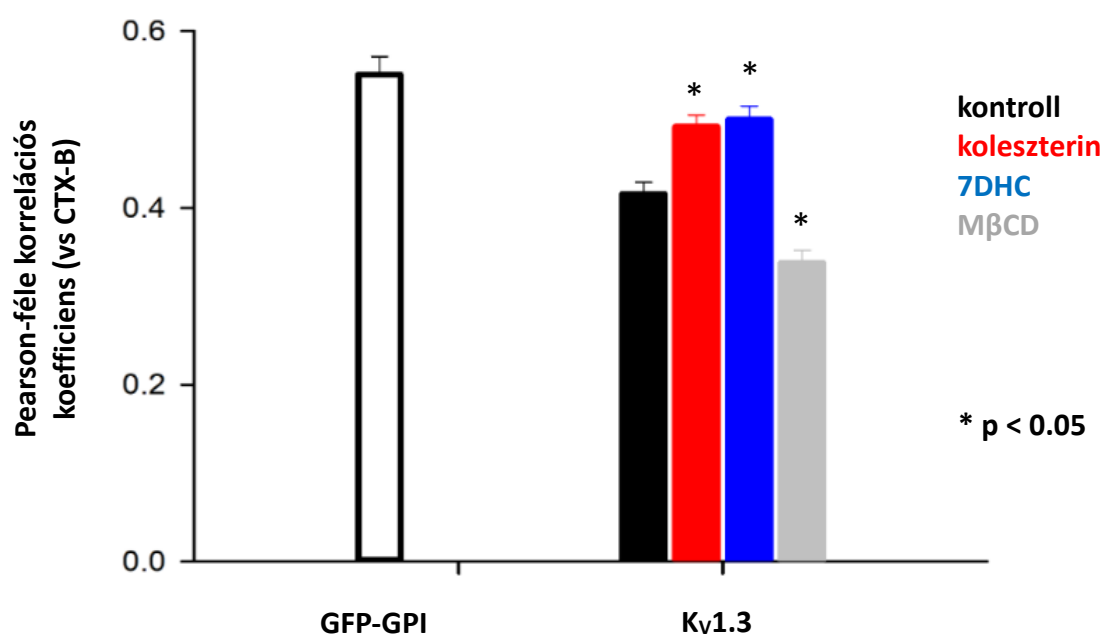
A szterol vegyületek Kv1.3 sejtmembrán mikrodomének közötti megoszlására gyakorolt hatásának vizsgálatához a HEK-293 sejteket Kv1.3-FLAG fehérjét kódoló plazmiddal transzfectáltuk, majd koleszterin és 7DHC M β CD-vel alkotott komplexével való kezelést követően a csatornákat anti-FLAG-Cy3 antitesttel, a lipidtutajokat pedig CTX-B-AF647 vegyülettel jelöltük és konfokális lézerpásztázó mikroszkóppal felvételeket készítettünk a

sejtmembrán fedőlemezhez tapadó régiójáról (**7. ábra**). Ezután kvantitatív kép analízis során a korábban leírtak szerint a két jel pixelenkénti fluoreszcencia intenzitás adataiból kiszámítottuk a közöttük levő Pearson-koefficiens nagyságát a különböző mintákban (**8. ábra**). Kezeletlen sejtekben a Kv1.3 ioncsatorna preferenciális lipidtutajbeli lokalizációjára utaló erőteljes pozitív korrelációt találtunk ($r=0,416 \pm 0,013$), amely statisztikailag szignifikáns, hiszen kívül esik a korreláció hiányát jellemző 95%-os konfidencia intervallumon ($[-0,017; 0,036]$). Az eredmény biológiai szignifikanciájára pedig az utal, hogy a kapott együtttható mértéke nagyságrendileg hasonló volt a pozitív kontrollnál (GFP-GPI vs. CTX-B-AF647) számított értékhez ($r=0,551 \pm 0,020$) (**1. táblázat**).



7. Ábra: A koleszterin és a 7DHC töltés hatása a Kv1.3 és a lipidtutajok lokalizációjára – konfokális mikroszkópia I. Méréseink során HEK-293 sejteket transzfektáltunk Kv1.3-FLAG fehérjét kódoló plazmiddal, majd a lipidtutajokat koleratoxin β alegységével (CTX-B-A647) jelöltük. A sejtek fedőlemezhez tapadó membránrégióiról konfokális mikroszkóppal felvételeket készítettünk és a két jel intenzitásai közötti korrelációs koefficiens nagyságát számítottuk ki kezeletlen, valamint kezelt HEK-293 sejt kultúrákon. A reprezentatív mérési felvételeken pirossal a CTX-B-vel jelölt tutajrégiókat (**A**); zölddel a Kv1.3 ioncsatornát ábrázoltuk (**B**); míg az overlay felvételen a sárga szín a kolokalizációt jelzi (**C**). A felvételek kvantitatív elemzése során a pixelenkénti intenzitások közötti korrelációt jól mutatja az adatokból készített kontúrplot ábra (**D**).

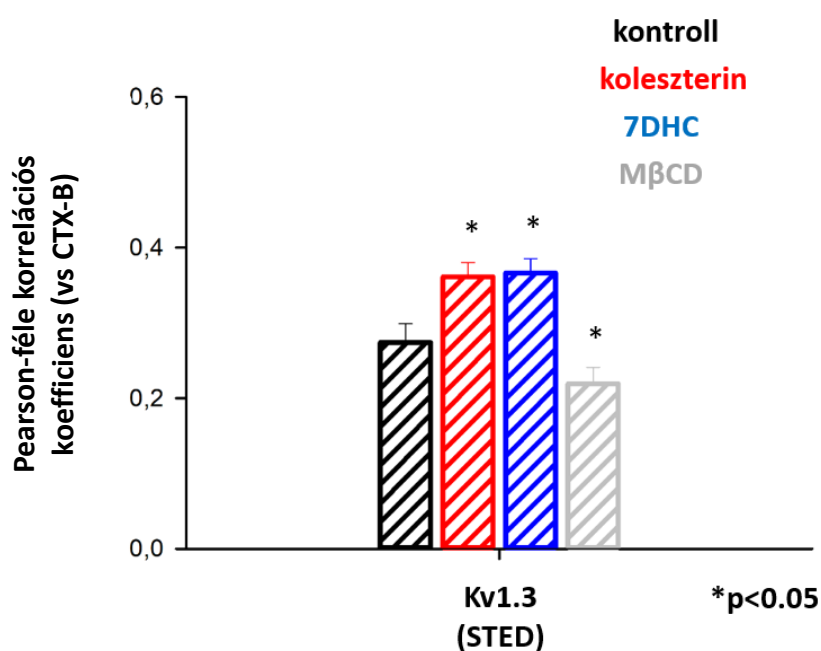
A korrelációs koefficiens értéke szignifikáns mértékben megnőtt mind koleszterin ($r=0,492 \pm 0,013$), mind pedig 7DHC kezelés hatására ($r=0,500 \pm 0,015$), amely arra utal, hogy szterolok hatására még több Kv1.3 fordul elő a tutaj mikrodoménekben. A vivőanyagként használt M β CD kolokalizációra gyakorolt hatásának vizsgálatához méréseinket elvégeztük üres komplexek jelenlétében is. Ebben az esetben a várakozásainkkal összhangban a korrelációs koefficiens szignifikáns mértékben lecsökkent ($r=0,338 \pm 0,014$), vagyis a szterolok hatására megnövekedett kolokalizációt nem az M β CD okozza (**1. táblázat**).



8. Ábra: A koleszterin és a 7DHC töltés hatása a Kv1.3 és a lipidtutajok lokalizációjára – konfokális mikroszkópia II. Konfokális mikroszkópos méréseinkhez HEK-293 sejteket Kv1.3-FLAG fehérjét hordozó plazmiddal transzfektáltuk. Az ioncsatorna jelölésére FLAG epitópot felismerő fluoreszcensen jelölt antitestet használtunk (anti-FLAG-Cy3), míg a lipidtutajokat koleratoxin β alegységéhez konjugált fluoreszcens festékkel jelöltük (CTX-B-AF647). Kvantitatív képanalízis folyamán meghatároztuk a fluorofórok jele közötti Pearson-féle együtttható nagyságát **kontroll** sejtekben, valamint **koleszterin**, **7DHC**, illetve natív **M β CD** kezelést követően is. A diagramon a különböző minták esetén számított Pearson-együtthatók átlagos értékeit $\pm$ SEM ábrázoltuk, illetve a kontrollhoz képest szignifikáns eltéréseket jelöltük (*), amennyiben $p < 0,05$. Az ábrán pozitív kontrollként és összehasonlítási alapként feltüntetettük a két lipidtutaj marker között számított együtttható értékét.

6.3. Koleszterin és 7DHC hatása a Kv1.3 lipidtutaj lokalizációjára (STED mikroszkópia)

Mivel az általános elfogadott vélekedés szerint a lipidtutajok mérete kisebb, mint a hagyományos mikroszkópok esetén a legkisebb feloldható távolság nagysága, elméletileg lehetséges olyan helyzet, amikor mind a lipidtutajokat, mind pedig az ioncsatornákat jelölő fluorofórok jele ugyanabból a pixelből származik, mégis a csatorna a tutajon kívül helyezkedik el, ami a korrelációs koefficiens értékét a valósnál pozitívabb értékek felé tolja el. Bár valószínűtlen, hogy az általunk kapott pozitív kolokalizációt ez okozta, kísérleteinket elvégeztük a jobb feloldóképességet biztosító szuperrezolúciós STED mikroszkópia alkalmazásával is.



9. Ábra: A koleszterin és a 7DHC töltés hatása a Kv1.3 és a lipidtutajok lokalizációjára – STED mikroszkópia. STED (stimulált emisszió kioltás) mikroszkópos vizsgálatainknál HEK-293 sejteket Kv1.3-FLAG fehérjét hordozó plazmiddal transzfektáltuk. Az ioncsatornák jelölésére FLAG epitópot felismerő antitesttel történő inkubációt követően másodlagos antitestként StarRed fluorofórral konjugált GAMIG (Goat Anti-Mouse ImmunoGlobulin) jelölést alkalmaztunk, míg a lipidtutajokat Alexa594-gyel konjugált CTX-B-vel vizualizáltuk. Kvantitatív képanalízis során meghatároztuk a fluorofórok jele közötti Pearson-együttható nagyságát **kontroll** sejtekben, valamint **koleszterin**, **7DHC**, illetve natív **MβCD** kezelést követően is. A diagramon a különböző minták esetén számított Pearson-együtthatók átlagos értékeit ± SEM ábrázoltuk, illetve a kontrollhoz képest szignifikáns eltéréseket jelöltük (*), amennyiben $p < 0,05$.

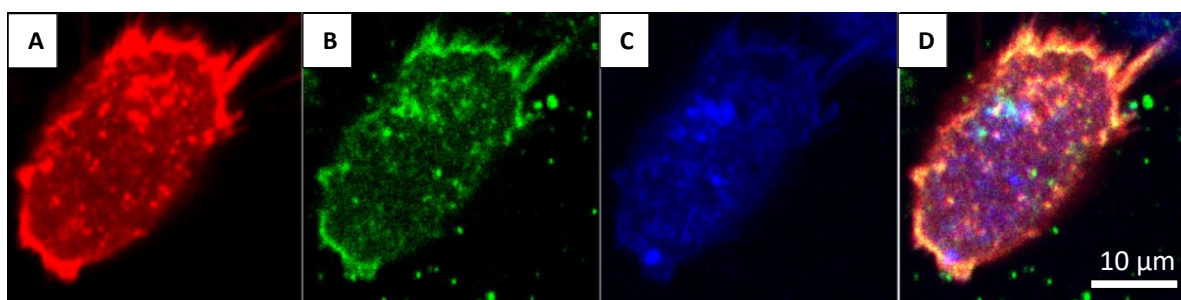
STED mikroszkóppal végzett méréseink előtt a sejtek kezelése és jelölése a hagyományos fluoreszcenciás mikroszkópiánál leírtakhoz hasonlóan történt, annyi különbséggel, hogy a jelöléshez az általunk használt STED modulhoz optimalizált fluorofórok kombinációját kellett használnunk, amelyek emissziós tartománya megfelelően közel esik a depletáló lézer által kibocsátott fotonok 775 nm-es hullámhosszához. Így a lipidtutajokat AlexaFluor594-gyel konjugált CTX-B-vel vizualizáltuk, míg a csatornákat anti-FLAG M2 mellett StarRed fluorofórral konjugált GAMIG (Goat Anti-Mouse ImmunoGlobulin) antitesttel tettük láthatóvá. A képalkotás és kvantitatív képanalízis a korábbiakban leírtak szerint történt.

Eredményeink (9. ábra) a kontroll mintákban a jobb térbeli felbontású STED mikroszkópia alkalmazásával is megerősítették a $K_v1.3$ ioncsatorna dúsulását a lipidtutajokban ($r=0,274 \pm 0,025$), amely szintén szignifikánsnak bizonyult (95%-os konfidencia intervallum: $[-0,006; 0,013]$) (1. táblázat).

A konfokális mikroszkóppal kapott eredményeinknek megfelelően a lipidtutaj – ioncsatorna kolokalizációját jellemző együttható értéke szignifikánsan megnőtt koleszterin ($r=0,361 \pm 0,019$) vagy 7-dehidrokoleszterin ($r=0,366 \pm 0,019$) hatására, míg szignifikánsan csökkent M β CD-vel történő inkubáció esetén ($r=0,219 \pm 0,022$) a kontroll, kezeletlen mintákhoz képest (1. táblázat).

6.4. Az exogén módon bejuttatott fluoreszcens koleszterin analóg kolokalizációja a lipidtutajokkal és $K_v1.3$ ioncsatornákkal

A koleszterin-M β CD komplexek sejtmembránbeli töltési mintázatának vizsgálatára kísérleteinket elvégeztük úgy, hogy NBD fluorofórral konjugált koleszterin M β CD-vel alkotott komplexével kezeltük a sejteket, majd a korábbiakban leírt konfokális lézer-pásztázó mikroszkópia és kvantitatív képelemzés segítségével kvantifikáltuk a fluoreszcensen jelzett koleszterin analóg és a lipidtutajok, illetve $K_v1.3$ csatornák közötti kolokalizáció mértékét (10. ábra).



10. Ábra: Exogén módon bejuttatott fluoreszcens koleszterin analóg kolokalizációja lipidtutajokkal és Kv1.3 csatornákkal. HEK-293 sejteket transzfektáltunk Kv1.3-FLAG fehérjét hordozó plazmiddal, majd inkubáltunk fluoreszcens NBD-koleszterin jelenlétében. Az ioncsatornákat anti-FLAG-Cy3 antitestekkel, míg a lipidtutajokat CTX-B-AF647-tel jelöltük, majd konfokális mikroszkóppal felvételeket készítettünk a sejtmembrán fedőlemezhez tapadó lapos régióiról. A reprezentatív képeken a lipidtutajok (A), Kv1.3 ioncsatornák (B), illetve az NBD-koleszterin (C) sejtmembránbeli megoszlása látható, valamint az egymásra vetített felvételen (D) megítélhető a fluoreszcens jelek közötti kolokalizáció, amelynek mértékét meghatároztuk kvantitatív képanalízis során a megfelelő pixelenkénti intenzitásadatok közötti Pearson-féle korrelációs koefficiens kiszámításával.

Az NBD-koleszterin és a lipidtutaj marker fluoreszcens jele között számított pozitív ($r=0,234 \pm 0,025$) és statisztikailag szignifikáns (95%-os konfidencia intervallum: $[-0,024; 0,040]$) együtttható arra utalt, hogy az exogén koleszterin beépülése elsősorban a lipidtutaj mikrodoménekbe történik. Emellett a fluoreszcensen jelzett koleszterin és az ioncsatornához kötődő antitest fluoreszcencia intenzitásai között meghatározott együtttható is erőteljesen pozitívnak ($r=0,358 \pm 0,023$) és szignifikánsnak adódott (95%-os konfidencia intervallum: $[-0,024; 0,040]$), ami pedig azt mutatta, hogy a bejuttatott koleszterin előszeretettel helyezkedik el a Kv1.3 fehérjék közelében (1. táblázat).

Jelölés	Kezelés	Átlag $\pm$ SEM	Konfidencia intervallum, ha $r=0$		N
GFP-GPI vs. CTX-B	kontroll	0,551 $\pm$ 0,020	-0,017	0,039	23
Kv1.3-FLAG vs. CTX-B	kontroll	0,416 $\pm$ 0,013	-0,017	0,036	27
	koleszterin	0,492 $\pm$ 0,013	-0,019	0,038	34
	7DHC	0,500 $\pm$ 0,015	-0,019	0,035	32
	M β CD	0,338 $\pm$ 0,014	-0,021	0,033	30
Kv1.3-FLAG vs. CTX-B (STED)	kontroll	0,274 $\pm$ 0,025	-0,006	0,013	25
	koleszterin	0,361 $\pm$ 0,019	-0,007	0,011	32
	7DHC	0,366 $\pm$ 0,019	-0,009	0,016	28
	M β CD	0,219 $\pm$ 0,022	-0,008	0,014	24
Kv1.3-FLAG vs. CTX-B	NBD-koleszterin	0,532 $\pm$ 0,038	-0,022	0,045	24
Kv1.3-FLAG vs. NBD-koleszterin	NBD-koleszterin	0,358 $\pm$ 0,023	-0,024	0,040	24
CTX-B vs. NBD-koleszterin	NBD-koleszterin	0,234 $\pm$ 0,025	-0,024	0,040	24

1. Táblázat: A Kv1.3, lipidutajok és fluoreszcens koleszterin analóg kolokalizációját jellemző Pearson-féle korrelációs együtthatók. HEK-293 sejteket jelöltünk a táblázat első oszlopában szereplő fluoreszcens markerekkel, majd meghatároztuk a két jel közötti Pearson-féle korrelációs koeficiens értékét az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírt módon. A táblázat az n darab különböző sejt adataiból számított korrelációs koeficiensok átlagait ($\pm$ SEM), valamint a korreláció feltételezett hiánya ($r=0$) esetén meghatározott 95%-os konfidencia intervallumok határainak átlagos értékeit tartalmazza.

7. Megbeszélés

Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy a sejtmembrán koleszterin mennyiségének növelése befolyásolja-e a Kv1.3 ioncsatorna membrán mikrodomének közötti megoszlását. E célból a Kv1.3 fehérjét HEK-293 sejtekben expresszáztattuk, majd fluorofórok segítségével jelöltük a csatornákat, illetve a lipidtutaj mikrodoméneket. Ezután a sejtek membránjáról konfokális mikroszkóppal felvételeket készítettünk és kvantitatív képanalízis során kiszámítottuk a kolokalizációt jellemző Pearson-féle korrelációs együtthatók értékeit a pixelenkénti fluoreszcencia intenzitás adatokból.

A korábbi irodalmi adatoknak megfelelően azt találtuk, hogy a Kv1.3 preferenciálisan a lipidtutajokban dúsul. Koleszterin hatására a csatornák lipidtutajbeli lokalizációja szignifikáns mértékben tovább fokozódott, ami felveti annak a lehetőségét, hogy a koleszterin Kv1.3 ioncsatornákra gyakorolt, korábban leírt funkcionális hatásainak mechanizmusában szerepet játszhatnak ezen mikrodomének. A korábban leírt, koleszterintöltéssel ellentétes elektrofiziológia hatásokkal összhangban M β CD kezelés, azaz koleszterin kivonás hatására a korrelációs koeficiens nagysága lecsökkent. A koleszterin által kiváltott hatás specifikusságának tesztelésére méréseinket elvégeztük 7DHC alkalmazásával is, amely a koleszterinnel azonos irányú és hasonló mértékű változásokat eredményezett.

Ezeket az eredményeinket hagyományos konfokális fluoreszcenciás mikroszkóp alkalmazásával nyertük, amely esetén a legkisebb feloldható távolság értéke magasabb, mint a lipidtutajok definíció szerinti mérettartománya. Emiatt a kolokalizáció elvileg létrejöhét úgy is, hogy mind a csatorna, mind pedig a lipidtutaj adott pixelen belül, viszont egymás mellett helyezkednek el, ami az együttható hibás pozitív értékeit eredményezheti. Ennek kizárására kísérleteinket elvégeztük a jobb (46-60 nm-es) felbontást biztosító stimulált emisszió depléciós mikroszkópia segítségével is. A hagyományos mikroszkópiával összhangban azt találtuk, hogy a Kv1.3 jele szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a lipidtutaj marker fluoreszcenciájával, illetve a kolokalizációt jellemző együttható értéke szignifikáns mértékben megnőtt mind koleszterin, mind pedig 7DHC hatására, vagyis a szterolok tovább növelték a csatorna preferenciális lipidtutaj lokalizációjának mértékét. Bár a számítások során a Pearson-koeficiens értékek alacsonyabbak voltak STED esetén (amint az várható is korábbi irodalmi adatok alapján), egyértelműen szignifikánsan pozitív maradtak. A két módszer során kapott

értékek közötti különbségeket magyarázhatja, hogy STED esetén nem jelenik meg a korábban leírt incidentális kolokalizáció, ugyanakkor azokat a két módszer során alkalmazott különböző fluorofórok, valamint a jelölési módszer eltérései (direkt vs. indirekt Kv1.3 jelölés) is okozhatják, így összességében a STED mérések egyértelműen alátámasztják a hagyományos technikával nyert adatok alapján levont következtetéseinket.

Fluoreszcens koleszterin analóggal azt is kimutattuk, hogy az exogén módon bevitt koleszterin elsősorban a lipidtutajokba épül (statisztikailag szignifikáns mértékben pozitív együttható az NBD-koleszterin és a CTX-B-AF647 között). Az exogén koleszterin emellett jelentős pozitív kolokalizációt mutatott a Kv1.3 fehérjével is, sőt, az így kapott koefficiens értéke magasabb volt, mint a fluoreszcens koleszterin és lipidtutajok között meghatározott, amely arra utalhat, hogy a koleszterin előszeretettel épül be azon lipidtutajokba, amelyek Kv1.3 csatornát is tartalmaznak, alátámasztva a koleszterin és a csatorna közötti kölcsönhatás meglétét.

Mivel ismert, hogy a lipidtutajok a speciális összetételükből fakadó, egyéb membránrégióktól eltérő membránbiofizikai tulajdonságaik, valamint az interakciós partnerek közötti kölcsönhatások valószínűségét befolyásoló képességük révén jelentősen módosíthatják a transzmembrán fehérjék, így a Kv1.3 funkcióját is, a csatorna kísérletes eredményeink által megerősített lipidtutajbeli lokalizációja, illetve laterális megoszlásának szterolok hatására történő módosulása a Kv1.3 jelentős működésbeli eltéréseit eredményezheti. Figyelembe véve ezen csatornák biológiai relevanciáját, illetve a szterolok mennyiségének, valamint a lipidtutajok mennyiségének és tulajdonságainak különböző tumoros, anyagcsere, immunológiai vagy neurodegeneratív betegségekben megfigyelhető eltéréseit, a leírt változások akár ezen kóros állapotok pathomechanizmusa szempontjából is jelentősek lehetnek.

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Kovács Tamásnak és Dr. Zákány Florinának, akik témavezetőimként önzetlen, fáradhatatlan munkájukkal, elméleti és gyakorlati tanácsaikkal segítették kutatásom, előadásaim és e pályamunka elkészülését. További kutatásaimban, tudományos előre haladásomban is példaképként tekintek rájuk.

Szeretném megköszönni a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet vezetőjének, Prof. Dr. Panyi Györgynek és a Kvantitatív Receptor Analízis munkacsoport vezetőjének, Prof. Dr. Nagy Péternek, hogy lehetőséget adtak arra, hogy az Intézetben, illetve a Munkacsoportban dolgozhassak és biztosították számomra a folyamatos magas színvonalú munka és szakmai fejlődés lehetőségét.

Köszönet illeti Vágóné Toldi Hajnalka, Farkasné Santa Gyöngyi és Szilágyi Anikó kollégáimat, valamint Szabó Máté kutatótársamat a kísérletek technikai kivitelezésében nyújtott segítségükért, tanácsaikért, baráti támogatásukért.

Végezetül szeretném megköszönni Családomnak, Édesanyámnak, Édesapámnak, Nagyszüleimnek valamint a barátnőmnek, Borics Fanninak azt a mérhetetlen szeretetet, támogatást és türelmet, amelyet a munkám során kaptam és amely nélkül ez a kutatás, valamint e pályamunka nem valósulhatott volna meg.

A pályamunka elkészítése valamint a kísérletek kivitelezése az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-19-2-I-DE-348 valamint ÚNKP-20-2-I-DE-325 kódszámú Új Nemzetiségi Kiválóság Program pályázatainak, illetve az Emberi Erőforrások Minisztériumának NTP-NFTÖ-20-B-0115 kódszámú pályázatának szakmai támogatásával készült.



9. Irodalomjegyzék

- [1] B. Hille, Ion channels of excitable membranes, Third edition ed., Sinauer Associates is an imprint of Oxford University Press, Sunderland, MA, USA, 2001.
- [2] G.A. Gutman, K.G. Chandy, S. Grissmer, M. Lazdunski, D. McKinnon, L.A. Pardo, G.A. Robertson, B. Rudy, M.C. Sanguinetti, W. Stuhmer, X. Wang, International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels, *Pharmacol Rev*, 57 (2005) 473-508.
- [3] D.A. Doyle, J. Morais Cabral, R.A. Pfuetzner, A. Kuo, J.M. Gulbis, S.L. Cohen, B.T. Chait, R. MacKinnon, The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity, *Science*, 280 (1998) 69-77.
- [4] S.B. Long, E.B. Campbell, R. Mackinnon, Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel, *Science*, 309 (2005) 897-903.
- [5] V. Pau, Y. Zhou, Y. Ramu, Y. Xu, Z. Lu, Crystal structure of an inactivated mutant mammalian voltage-gated K(+) channel, *Nat Struct Mol Biol*, 24 (2017) 857-865.
- [6] F. Bezanilla, How membrane proteins sense voltage, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9 (2008) 323-332.
- [7] S.B. Long, E.B. Campbell, R. Mackinnon, Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling, *Science*, 309 (2005) 903-908.
- [8] P.D. Dodson, I.D. Forsythe, Presynaptic K⁺ channels: electrifying regulators of synaptic terminal excitability, *Trends Neurosci*, 27 (2004) 210-217.
- [9] C. Gonzalez, D. Baez-Nieto, I. Valencia, I. Oyarzun, P. Rojas, D. Naranjo, R. Latorre, K(+) channels: function-structural overview, *Compr Physiol*, 2 (2012) 2087-2149.
- [10] S. Feske, H. Wulff, E.Y. Skolnik, Ion channels in innate and adaptive immunity, *Annu Rev Immunol*, 33 (2015) 291-353.
- [11] L.A. Pardo, W. Stuhmer, The roles of K(+) channels in cancer, *Nat Rev Cancer*, 14 (2014) 39-48.
- [12] M.D. Cahalan, K.G. Chandy, T.E. DeCoursey, S. Gupta, A voltage-gated potassium channel in human T lymphocytes, *J Physiol*, 358 (1985) 197-237.
- [13] T.E. DeCoursey, K.G. Chandy, S. Gupta, M.D. Cahalan, Voltage-gated K⁺ channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis?, *Nature*, 307 (1984) 465-468.

- [14] M.D. Cahalan, K.G. Chandy, The functional network of ion channels in T lymphocytes, *Immunol.Rev.*, 231 (2009) 59-87.
- [15] S. Feske, E.Y. Skolnik, M. Prakriya, Ion channels and transporters in lymphocyte function and immunity, *Nat Rev Immunol*, 12 (2012) 532-547.
- [16] K.G. Chandy, T.E. DeCoursey, M.D. Cahalan, C. McLaughlin, S. Gupta, Voltage-gated potassium channels are required for human T lymphocyte activation, *J Exp Med*, 160 (1984) 369-385.
- [17] M. Price, S.C. Lee, C. Deutsch, Charybdotoxin inhibits proliferation and interleukin 2 production in human peripheral blood lymphocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86 (1989) 10171-10175.
- [18] H. Wulff, C. Beeton, K.G. Chandy, Potassium channels as therapeutic targets for autoimmune disorders, *Curr.Opin.Drug Discov.Devel.*, 6 (2003) 640-647.
- [19] C. Beeton, H. Wulff, J. Barbaria, O. Clot-Faybesse, M. Pennington, D. Bernard, M.D. Cahalan, K.G. Chandy, E. Beraud, Selective blockade of T lymphocyte K(+) channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (2001) 13942-13947.
- [20] C. Beeton, H. Wulff, N.E. Standifer, P. Azam, K.M. Mullen, M.W. Pennington, A. Kolski-Andreaco, E. Wei, A. Grino, D.R. Counts, P.H. Wang, C.J. LeeHealey, S.A. B, A. Sankaranarayanan, D. Homerick, W.W. Roeck, J. Tehranzadeh, K.L. Stanhope, P. Zimin, P.J. Havel, S. Griffey, H.G. Knaus, G.T. Nepom, G.A. Gutman, P.A. Calabresi, K.G. Chandy, Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (2006) 17414-17419.
- [21] V. Corradi, B.I. Sejdiu, H. Mesa-Galloso, H. Abdizadeh, S.Y. Noskov, S.J. Marrink, D.P. Tieleman, Emerging Diversity in Lipid-Protein Interactions, *Chem Rev*, 119 (2019) 5775-5848.
- [22] I. Levitan, Y. Fang, A. Rosenhouse-Dantsker, V. Romanenko, Cholesterol and ion channels, *Sub-cellular biochemistry*, 51 (2010) 509-549.
- [23] J. Abi-Char, A. Maguy, A. Coulombe, E. Balse, P. Ratajczak, J.L. Samuel, S. Nattel, S.N. Hatem, Membrane cholesterol modulates Kv1.5 potassium channel distribution and function in rat cardiomyocytes, *J Physiol*, 582 (2007) 1205-1217.
- [24] R.C. Balijepalli, B.P. Delisle, S.Y. Balijepalli, J.D. Foell, J.K. Slind, T.J. Kamp, C.T. January, Kv11.1 (ERG1) K⁺ channels localize in cholesterol and sphingolipid enriched membranes and are modulated by membrane cholesterol, *Channels (Austin)*, 1 (2007) 263-272.

- [25] P. Hajdu, Z. Varga, C. Pieri, G. Panyi, R. Gaspar, Jr., Cholesterol modifies the gating of Kv1.3 in human T lymphocytes, *Pflugers Arch*, 445 (2003) 674-682.
- [26] J.R. Martens, R. Navarro-Polanco, E.A. Coppock, A. Nishiyama, L. Parshley, T.D. Grobaski, M.M. Tamkun, Differential targeting of Shaker-like potassium channels to lipid rafts, *The Journal of biological chemistry*, 275 (2000) 7443-7446.
- [27] J.R. Martens, N. Sakamoto, S.A. Sullivan, T.D. Grobaski, M.M. Tamkun, Isoform-specific localization of voltage-gated K⁺ channels to distinct lipid raft populations. Targeting of Kv1.5 to caveolae, *The Journal of biological chemistry*, 276 (2001) 8409-8414.
- [28] S.J. Singer, G.L. Nicolson, The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science*, 175 (1972) 720-731.
- [29] D.A. Brown, E. London, Functions of lipid rafts in biological membranes, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 14 (1998) 111-136.
- [30] K. Simons, E. Ikonen, Functional rafts in cell membranes, *Nature*, 387 (1997) 569-572.
- [31] L.J. Pike, Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function, *J Lipid Res*, 47 (2006) 1597-1598.
- [32] J.F. Hancock, Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7 (2006) 456-462.
- [33] E. Sevcsik, G.J. Schutz, With or without rafts? Alternative views on cell membranes, *Bioessays*, 38 (2016) 129-139.
- [34] C. Eggeling, C. Ringemann, R. Medda, G. Schwarzmann, K. Sandhoff, S. Polyakova, V.N. Belov, B. Hein, C. von Middendorff, A. Schonle, S.W. Hell, Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell, *Nature*, 457 (2009) 1159-1162.
- [35] A. Honigsmann, V. Mueller, H. Ta, A. Schoenle, E. Sezgin, S.W. Hell, C. Eggeling, Scanning STED-FCS reveals spatiotemporal heterogeneity of lipid interaction in the plasma membrane of living cells, *Nat Commun*, 5 (2014) 5412.
- [36] M.L. Kraft, Plasma membrane organization and function: moving past lipid rafts, *Mol Biol Cell*, 24 (2013) 2765-2768.
- [37] E. Sezgin, I. Levental, S. Mayor, C. Eggeling, The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18 (2017) 361-374.
- [38] K. Simons, R. Ehehalt, Cholesterol, lipid rafts, and disease, *J Clin Invest*, 110 (2002) 597-603.

- [39] K. Simons, D. Toomre, Lipid rafts and signal transduction, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1 (2000) 31-39.
- [40] J. Bock, I. Szabo, N. Gamper, C. Adams, E. Gulbins, Ceramide inhibits the potassium channel Kv1.3 by the formation of membrane platforms, *Biochemical and biophysical research communications*, 305 (2003) 890-897.
- [41] A.M. Jimenez-Garduno, M. Mitkovski, I.K. Alexopoulos, A. Sanchez, W. Stuhmer, L.A. Pardo, A. Ortega, KV10.1 K(+)-channel plasma membrane discrete domain partitioning and its functional correlation in neurons, *Biochimica et biophysica acta*, 1838 (2014) 921-931.
- [42] K.M. O'Connell, R. Loftus, M.M. Tamkun, Localization-dependent activity of the Kv2.1 delayed-rectifier K⁺ channel, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (2010) 12351-12356.
- [43] M. Roura-Ferrer, L. Sole, A. Oliveras, R. Dahan, J. Bielanska, A. Villarroel, N. Comes, A. Felipe, Impact of KCNE subunits on KCNQ1 (Kv7.1) channel membrane surface targeting, *J Cell Physiol*, 225 (2010) 692-700.
- [44] W. Wong, L.C. Schlichter, Differential recruitment of Kv1.4 and Kv4.2 to lipid rafts by PSD-95, *The Journal of biological chemistry*, 279 (2004) 444-452.
- [45] C. Dart, Lipid microdomains and the regulation of ion channel function, *J Physiol*, 588 (2010) 3169-3178.
- [46] G. Panyi, G. Vamosi, Z. Bacso, M. Bagdany, A. Bodnar, Z. Varga, R. Gaspar, L. Matyus, S. Damjanovich, Kv1.3 potassium channels are localized in the immunological synapse formed between cytotoxic and target cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (2004) 1285-1290.
- [47] S.A. Nicolaou, L. Neumeier, K. Takimoto, S.M. Lee, H.J. Duncan, S.K. Kant, A.B. Mongey, A.H. Filipovich, L. Conforti, Differential calcium signaling and Kv1.3 trafficking to the immunological synapse in systemic lupus erythematosus, *Cell Calcium*, 47 (2010) 19-28.
- [48] S.A. Nicolaou, P. Szigligeti, L. Neumeier, S.M. Lee, H.J. Duncan, S.K. Kant, A.B. Mongey, A.H. Filipovich, L. Conforti, Altered dynamics of Kv1.3 channel compartmentalization in the immunological synapse in systemic lupus erythematosus, *J Immunol*, 179 (2007) 346-356.
- [49] T. Kovacs, G. Batta, F. Zakany, J. Szollosi, P. Nagy, The dipole potential correlates with lipid raft markers in the plasma membrane of living cells, *J Lipid Res*, 58 (2017) 1681-1691.
- [50] D.A. Brown, J.K. Rose, Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface, *Cell*, 68 (1992) 533-544.
- [51] R. Varma, S. Mayor, GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface, *Nature*, 394 (1998) 798-801.

[52] T. Harder, P. Scheiffele, P. Verkade, K. Simons, Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components, *J Cell Biol*, 141 (1998) 929-942.

10. Függelék

Kutatómunkánk során az én önálló munkám volt a sejtek gondozása, transzfekciója a megfelelő plazmidokkal (GFP-GPI, valamint a Kv1.3-FLAG). Ezután a sejtek kezelése a megfelelő vegyületekkel (koleszterin, 7DHC, M β CD). A fluoreszcenciás mikroszkópos mérések során a sejtek jelölésétől a felvételek készítéséig önállóan, míg a STED mikroszkópos mérésekben a sejtek jelölésében önállóan, a felvételek készítésében témavezetői segítséggel vettem részt. A kapott képek kiértékelését, majd a megfelelő statisztikai próbákat önállóan végeztem el. Ezen felül a kapott eredmények összegzése, valamint e pályamunka megírását is önállóan végeztem, amiben természetesen hatalmas segítséget kaptam Dr. Kovács Tamás és Dr. Zákány Florina témavezetőimtől, akik önzetlenül és fáradhatatlanul segítettek a kutatásaim, előadásaim és a pályamunkám elkészítése során.