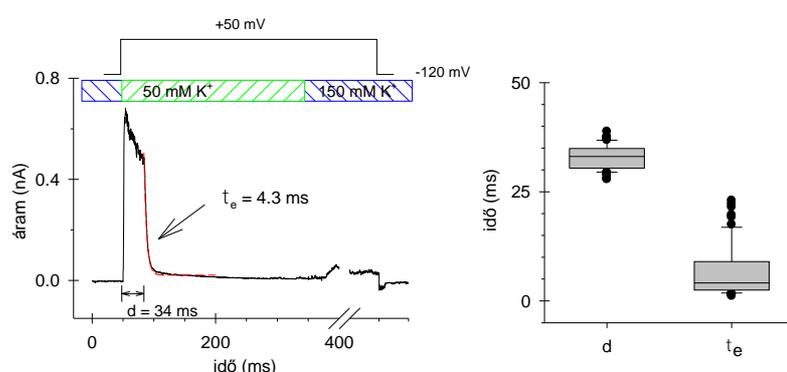


A projekt célja a feszültség-kapuzott *Shaker*-típusú K^+ csatornák inaktivációs kapuzását befolyásoló molekuláris mechanizmusok tisztázása különös tekintettel az aktivációs és inaktivációs kapuk közötti kapcsolatra és az inaktivációból történő visszatérés elemi lépéseire.

A projekt konkrét céljaitól független eredmény az állapot-függő cisztein modifikációs assay meghonosítása a laboratóriumban, a szükséges infrastruktúra kiépítése, a szupergyors perfúziós rendszer beállítása (folyadékcsere 4 ms időállandóval a vizsgált membrán folt környezetében), és a szükséges molekuláris biológiai háttér megteremtése. Ezeket a célokat a sikeresen teljesítettük, két, egymástól független mérőállomást építettünk ki a hatékonyabb munkavégzés céljából. Ehhez egy második perfúziós rendszer kiépítés vált szükségessé, az ehhez szükséges berendezést a project terhére szereztük be (ld. indoklást korábban az eszközbeszerzésben).

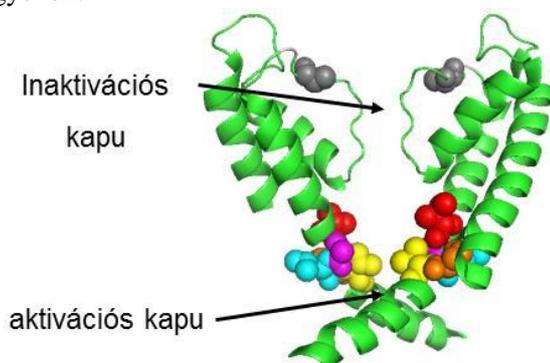


1. ábra: Gyors perfúziós rendszer jellemzése. az inside-out patch intracelluláris oldalán az oldatcsere a szatírozott sávnak megfelelően történt 50 mM és 150 mM K^+ koncentrációjú oldatok között. Az ábra jobb oldala az oldatcsere késleltetését (d) és az oldatcsere időállandóját mutatja.

A kísérleti eredmények bemutatása:

3.2 feladat: Az aktivációs és inaktivációs kapuk közötti kapcsolat molekuláris mechanizmusa. E feladat konkrét célkitűzése annak vizsgálata, hogy az S6 hélix milyen mozgást végez az inaktiváció kialakulása során.

3.21.1 A kísérletek elvégzéséhez szükség volt az S6 hélixbenelhelyezkedő ciszteinszubsztituált mutációk kialakítására (T449A/A471C, T449A/L472C, T449A/P473C) és a mutáns ioncsatornák biofizikai jellemzésére: biofizikai jellemzését (aktivációs küszöb, egyensúlyi aktiváció feszültségfüggése, inaktivációs kinetika vizsgálata, inaktivációból történő visszatérés kinetikájának meghatározása). E vizsgálatok, tekintve az inside/out patch konfigurációban történő mérést, igen időigényesek voltak de mindenképp szükségesek voltak abból a célból, hogy az MTS modifikációs kísérletek protokolljai pontosan tervezhetőek legyenek.



2. ábra. A csatorna pórusának sematikus képe. Az inaktiváció sebességét szabályozó aminosav a 449-es pozícióban található (szürke) az egyes cisztein szubsztitúciók pedig rendre 471 (piros), 472 (narancs), 473 (sárga). A szelektív szűrőben lévő inaktivációs kaput és a pórus citoszolikus oldalán található, az S6 hélixek találkozásával alkotott intracelluláris aktivációs kaput nyílak mutatják.

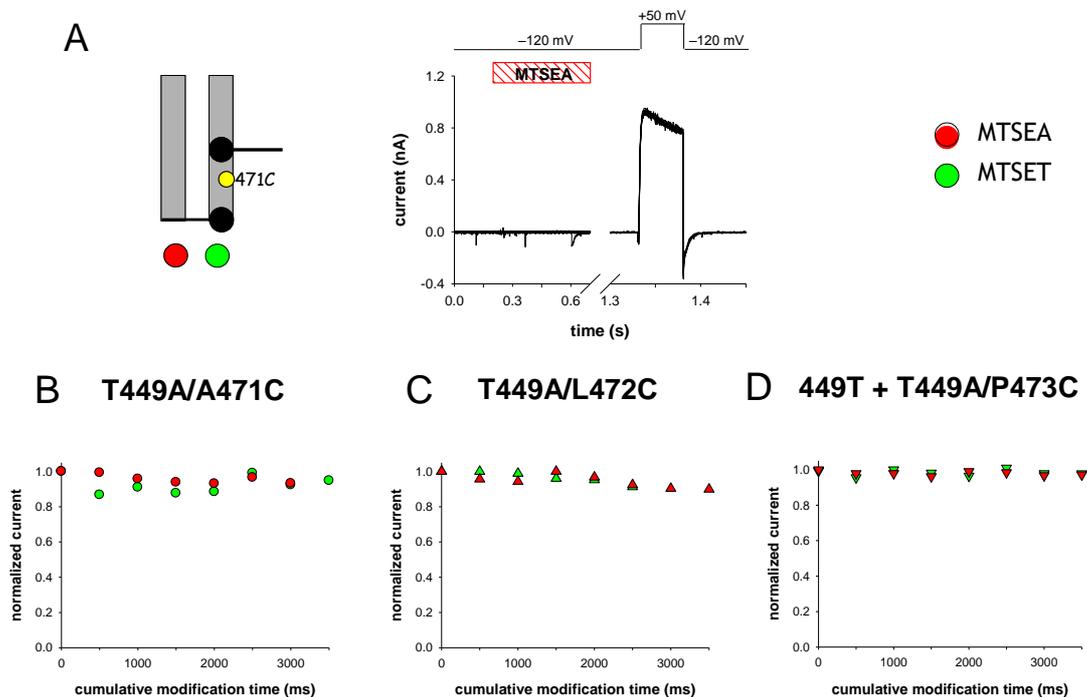
3.2.2, a T449A/P473C mutáns csatornákkal transzfektált sejteken nem tudtunk K^+ áramot mérni semmilyen expressziós rendszerben sem. Ennek oka az lehet, hogy a P473C mutáció vagy a csatorna vezetőképességét változtatja drasztikusan (pl. nem vezető, vagy nagyon

gyorsan inaktiválódó) vagy a mutáció foldingdefect-et okoz és a mutáns csatornák nem fejeződnek ki. Mivel az S6 teljes feltérképezésére szükségünk van, ezért a mutáns csatornák vad típusú (nem inaktiválódó) csatornákkal történő koexpresszióját végeztük el. A koexpresszió inaktiválódó áramot okoz, ami vad és mutáns csatorna alegységek által kialakított heterotetramer csatornák jelenlétére utal.

3.2.3, Az MTS modifikációs esszét elvégeztük a T449A/A471C és T449A/L472C mutánsok ill. (T449A/P473C-T449) heterotetramerekkel esetén Nyitott, Zárt és Inaktivált állapotban, mind MTSET mind pedig MTSEA reagenssekkel.

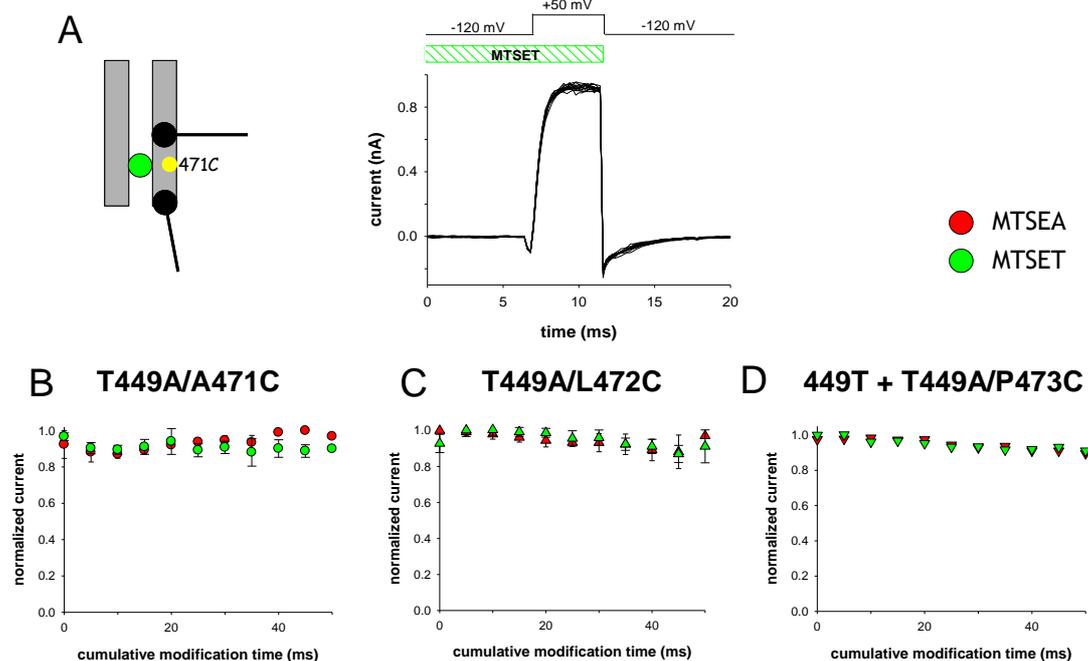
Eredményink a következők voltak:

Zárt állapotban egyik mutáns sem reagált az MTS modifikáló reagenssel:



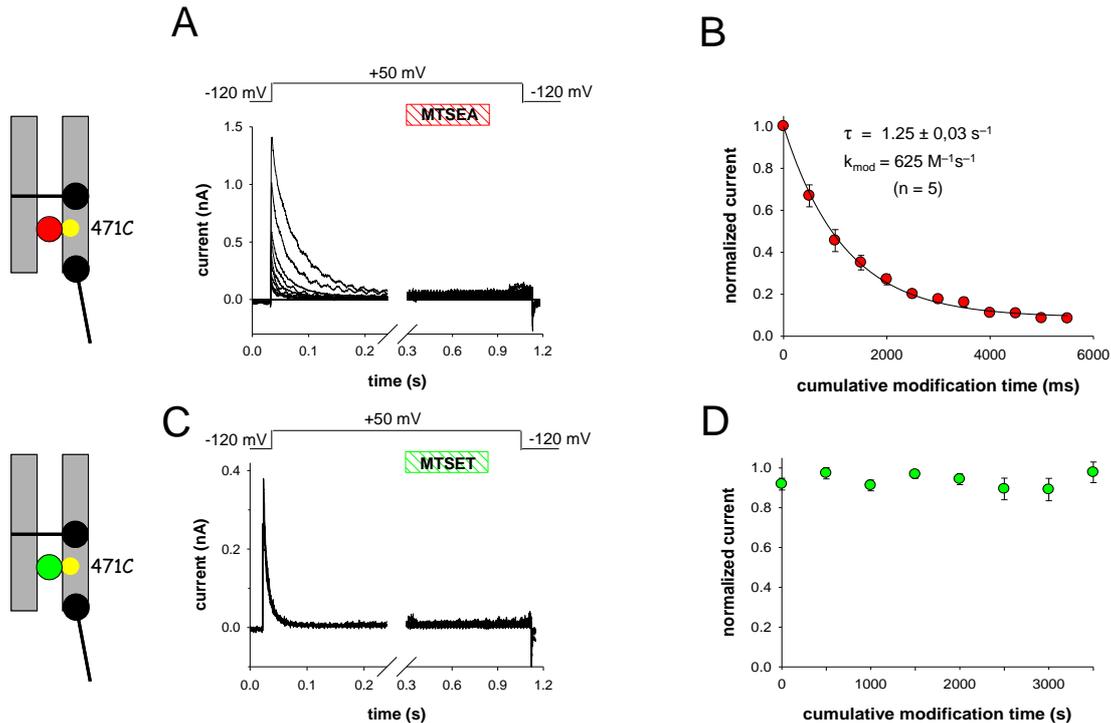
3. ábra: (A) Zárt állapotban történő MTSEA modifikáció protokollja. Az inside-out patch-et +50 mV-ra sorozatosan depolarizáltuk úgy, hogy a depolarizáció előtt 0.5 s-al 400ms időtartamra elindítottuk az MTSEA perfúziót (piros sátozott sáv). A depolarizációk közt a csatornát -120 mV tartási feszültségen tartottuk. (B-D). A különböző pozícióban ciszteint tartalmazó zártcsatornák (471C (B), 472 (B), 473C heterotetramer(D)) reakcióját MTSET (zöld) ill. MTSEA (piros) reagenssel az idő függvényében követtük. Sem az MTSET sem pedig az MTSEA nem reagált egyik csatorna konstrukttal sem, ami azt jelenti, hogy ezek a ciszteinek az aktivációs kapu mögött helyezkednek el.

Nyitott állapotban egyik mutáns sem reagált az MTS modifikáló reagenssel:



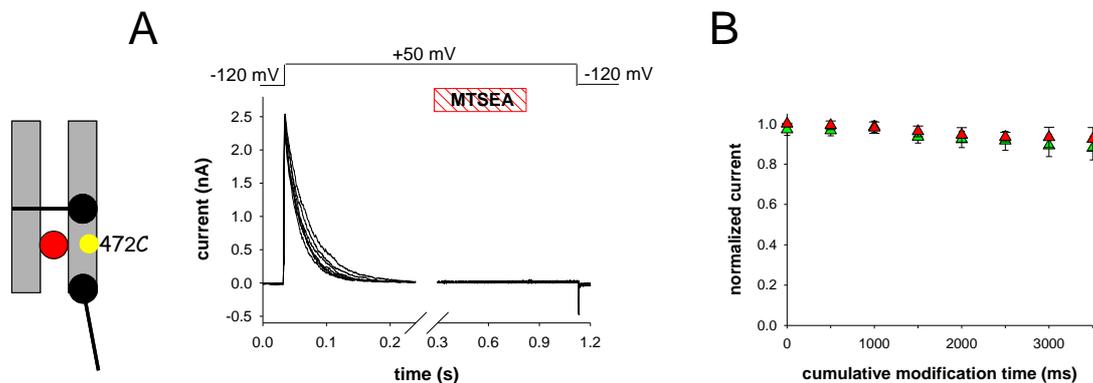
4. ábra: (A) A nyitott állapotban történő MTSET modifikáció protokollja. Az inside-out patch-et +50 mV-ra sorozatosan depolarizáltuk úgy, hogy a depolarizáció előtt 20 ms-al elindítottuk az MTSET perfúziót (zöld sátozott sáv). A depolarizációk közt a csatornát -120 mV tartási feszültségen tartottuk. (B-D). A különböző pozícióban ciszteint tartalmazó nyitott csatornák (471C (B), 472C (C) és 473C heterotetramer (D)) reakcióját MTSET (zöld) ill. MTSEA (piros) reagenssel az idő függvényében követtük. Sem az MTSET sem pedig az MTSEA nem reagált egyik csatorna konstrukttal sem, ami azt jelenti, hogy ezek a ciszteinek az S6 hélix azon felszínén vannak, melyek nem elérhetők a cisztein reagensek számára. Nyitott állapotban egyébként a 474C és a 470C ciszteinek gyors reakciót mutatnak MTS reagenssel (Panyi és Deutsch, JGP, 2007)

A **T449A/ A471C** mutáns esetén sem a töltéssel rendelkező MTSET sem pedig a töltés nélküli MTSEA nem okozott cisztein modifikációt sem a csatorna Zárt (3. ábra), sem pedig a Nyitott (4. ábra) állapotban. Míg az MTSET az inaktivált állapotot nem módosította, addig az MTSEA-val különböző impulzus hosszúságok mellett is következetes cisztein modifikációt kaptunk (5. ábra) ami arra utal, hogy a 471 pozíció a csatorna ürege felé fordul az inaktiváció során, ami hipotézisünket támasztja alá. Ebben az esetben is az MTSET és az MTSES eltérő hatása jó belső kontrollnak bizonyul a hatás specifikussága miatt.



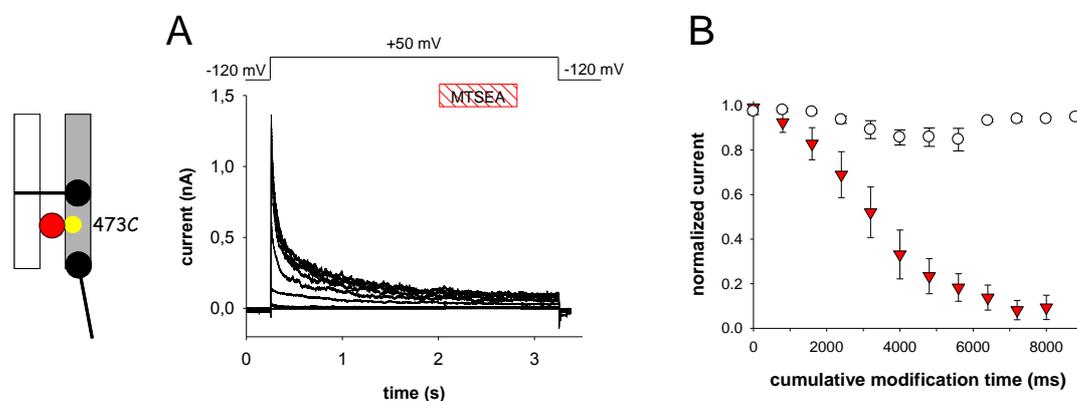
5. ábra (A és C) Az inaktivált állapotban történő MTSET és MTESEA modifikáció protokollja T449A/ A471C mutáns esetén. Az inside-out patch-et +50 mV-ra sorozatosan depolarizáltuk, az MTSET (zöld sátozított sáv) és MTSEA (piros sátozított sáv) perfúziót a csatornák inaktivációját követően indítottuk el úgy, hogy az be is fejeződött a patch repolarizációját megelőzően. A depolarizációk közt a csatornát -120 mV tartási feszültségen tartottuk. A 471C aminosav ciszteinje az inaktivált állapotban MTSEA-val módosítható (B), amit a sorozatos impulzusok alatt bekövetkező csúcsáram csökkenés mutat. Ugyanilyen körülmények között a 471C nem módosítható MTSET-vel, amit a konstans csúcsáramok mutatnak a D panelen. Inaktivált állapotban egyébként a 474C és a 470C ciszteinek gyors reakciót mutatnak MTS reagensekkel (Panyi és Deutsch, JGP, 2007)

A **T449A/L472C** mutáns esetén sem a töltéssel rendelkező MTSET sem pedig a töltés nélküli MTSEA nem okozott cisztein modifikációt sem a csatorna Zárt (3. ábra), sem a Nyitott (4. ábra) sem pedig a Inaktivált állapotában (6. ábra). A kísérlet nagyon jó negatív kontrollnak bizonyul, ugyanis a negatív eredmény kizárja az MTS reagensek aspecifikus hatásait a csatorna különböző állapotaiban. Eredményünk azt is jelenti, hogy a 472 pozíció nem fordul a csatorna ürege felé az inaktiváció során.



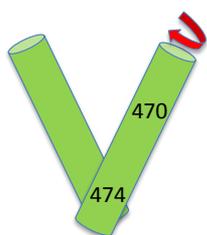
6. ábra (A) Az inaktivált állapotban történő MTSET és MTESEA modifikáció protokollja T449A/ A472C mutáns esetén. Az inside-out patch-et +50 mV-ra sorozatosan depolarizáltuk, az MTSEA (piros sátozított sáv) a csatornák inaktivációját követően indítottuk el úgy, hogy az be is fejeződött a patch repolarizációját megelőzően. A depolarizációk közt a csatornát -120 mV tartási feszültségen tartottuk. A 472C aminosav ciszteinje az inaktivált állapotban sem MTSEA-val sem pedig MTSET-vel nem módosítható. módosítható (B), amit a sorozatos impulzusok alatti stabil csúcsáramok mutatnak. Inaktivált állapotban egyébként a 474C és a 470C ciszteinek gyors reakciót mutatnak MTS reagensekkel (Panyi és Deutsch, JGP, 2007)

A **T449A/P473C** mutáns mint fentebb említettem nem adott önmagában áramot, ezért koexpresszáltuk a nem inaktiválódó 449T csatornával. Az eredményül kapott inaktiválódó áram heterotetramerek jelenlétére utal, és ezek MTS reagenssel történő vizsgálata azt mutatta, hogy MTSEA-val a 473 pozíciójú cisztein reagál a csatorna inaktivált állapotában (7. ábra), amiből az a következtetés vonható le, hogy a P473C ciszteinje a csatorna vízzel telt ürege felé fordul az inaktiváció során.



7. ábra (A) Az inaktivált állapotban történő MTESEA modifikáció protokollja T449A/ P473C mutáns esetén (heterotetramer T449 vad típusú alegységgel). Az inside-out patch-et +50 mV-ra sorozatosan depolarizáltuk, az MTSEA (piros sáv) perfúziót a csatorna inaktivációját követően indítottuk el úgy, hogy az be is fejeződött a patch repolarizációját megelőzően. A depolarizációk között a csatornát -120 mV tartási feszültségen tartottuk. A 473C aminosav ciszteinje az inaktivált állapotban MTSEA-val módosítható (B), amit a sorozatos impulzusok alatt bekövetkező csúcstartás csökkenés mutat.

Eredményeként alátámasztják azt a hipotézist, hogy az S6 hélix olyan mozgást végez az inaktiváció kialakulása során, ami összeegyeztethető az S6 saját tengelye körüli rotációval. Ebből az a következtetés vonható le, hogy az inaktivációs kapu záródása által az aktivációs kapu mozgására kifejtett hatás közvetítője az S6 hélix lehet. Az eredmények táblázatos összefoglalását és a modellt sematikusán a 8. ábra mutatja.

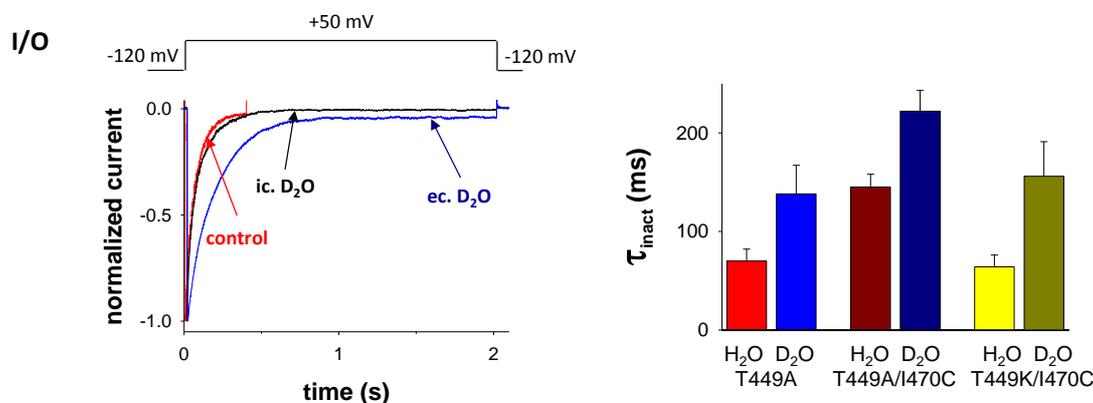


pozíció	Zárt állapot (C)	Nyitott állapot (o)	Inaktivált állapot (OI)
470	nem	igen	igen
471	nem	nem	igen
472	nem	nem	nem
473	nem	nem	igen
474	nem	igen	igen

8. ábra: A táblázatban az igen/nem megjelölések az mutatják, hogy az adott pozíció és csatorna állapot kombináció mellett történt-e cisztein modifikáció (igen) vagy nem (nem). A rajz az S6hélix forgását mutatja az inaktivációs lépés során.

3.3 feladat Aminosav oldalláncok közötti kölcsönhatások az inaktivációs kinetika szabályozásában. A kísérleti tervben eredetileg az aminosav oldalláncok közötti kölcsönhatások mutációs analízisét terveztük elvégezni. A munkaterv végrehajtása közben kiderült, hogy kompetitív laboratóriumok leközltek ezeket a kölcsönhatásokat. Molekuláris modellezés alapján arra a következtetésre jutottak, hogy nem közvetlenül az aminosav oldalláncok állnak egymással kapcsolatban, hanem ún-strukturális vízmolekulákon keresztül egy hidrogénhíd hálózat kiépítésével alakul ki az inaktivált állapot. Kísérleteink során éppen ezért ezen újdonság vizsgálatával foglalkoztunk. A rendelkezésünkre álló biofizikai és molekuláris biológiai eszköztár alkalmazásával ezen strukturális vízmolekulák jelentőségének kísérletes vizsgálatát végeztük el nehézvíz (D₂O) alkalmazásával, kihasználva azt, hogy a D₂O által kialakított hidrogén kötés hálózat energetikailag és kinetikailag is különbözik a H₂O hidrogénkötés hálózatától. A kísérletek során a fentebb pontban már említett, különböző sebességgel inaktiválódó csatornákat (T449A, T449K, T449A/I470C). Megfigyeléseink és következtetéseink az alábbiak voltak:

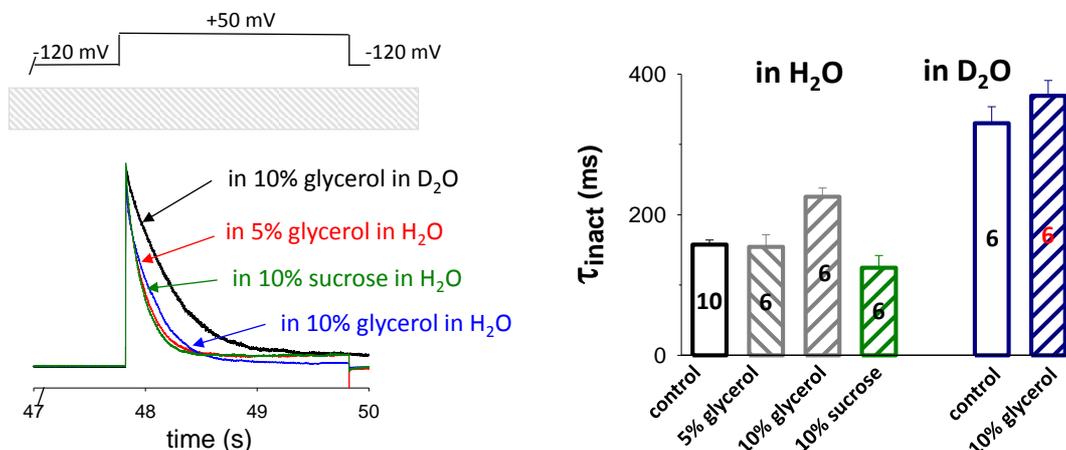
3.3.1. Extracelluláris D₂O jelenlétében lassabb az inaktiváció. A kísérleteke inside-out és outside-out patch konfigurációban végeztük, a H₂O→D₂O helyettesítést az extracelluláris térben vagy az intracelluláris térben. A kísérletekből kiderült, hogy csak és kizárólag az extracelluláris térben alkalmazott D₂O esetén lassul az inaktivációs kinetika.



9. ábra: *Bal oldali panel:* Inside-out patch mérés kontroll oldatban (mindkét oldal H₂O, piros vonal) ill. amikor az intracelluláris oldalon (fekete) vagy az extracelluláris oldalon (kék) D₂O alapú oldatot alkalmaztunk. A feszültség protokoll a panel felső részében látható. A görbék összehasonlítása egyértelműen azt mutatja, hogy inaktivációs kinetika lassulás csak akkor volt, ha az extracelluláris oldat volt D₂O alapú. *Jobb oldali panel:* extracelluláris H₂O-ban ill. D₂O-ban mért inaktivációs kinetikák összehasonlítása különböző mutánsokon. Az ábra azt mutatja, hogy nem mutáció-függő hatásról van szó, függetlenül az inaktiváció sebességétől a D₂O lassítja a folyamatot.

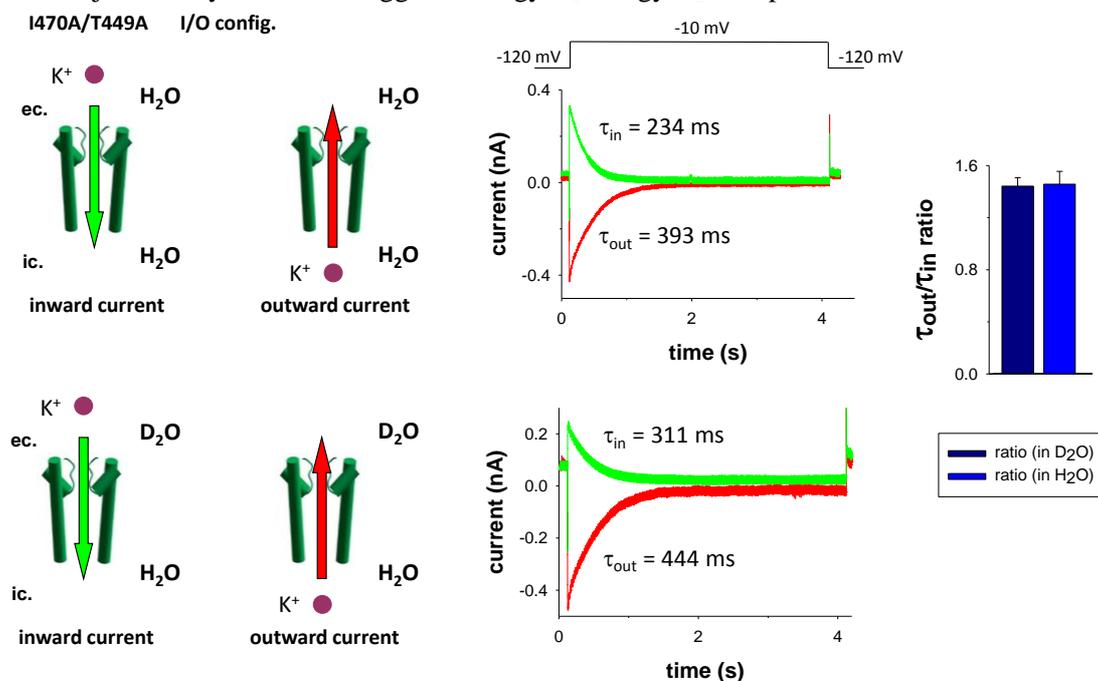
A bemutatott eredmények alapján arra lehetne következtetni, hogy a D₂O esetében lassabban alakul ki az a hidrogén kötés hálózat, ami a csatorna inaktívált állapotát kialakítja. Ehhez a következtetéshez két potenciális hibaforrást ki kellett zárni. Egyrészt a D₂O-nak nagyobb a viszkozitása mint a H₂O-nak, ezért a viszkozitás növelésének nem specifikus hatása is okozhatja a jelenséget. Másrészt a szelektivitási filtert elhagyó K⁺ ionok is lassabban alakíthatják ki a hidrátburkukat (pont olyan megfontolásokból, mint a lassabban kialakuló H-kötés hálózat, ún. kinetikus izotóp hatás), azaz az inaktiváció lassulásának az az oka, hogy megnő a K⁺ tartózkodási ideje pórusban, ami önmagában is lassítja az inaktivációt. Ezen alternatív magyarázatokat kísérletesen kizártuk az alábbiak szerint.

3.3.2. Az extracelluláris tér viszkozitásának emelése nem jár jelentős inaktivációs kinetika változással. A kísérleteket megismételtük olyan oldatokkal, ahol az extracelluláris tér viszkozitását a D₂O-hoz hasonlóvá (1.245 mPas) tettük glicerinnel vagy szacharózzal. Egyik esetben sem láttunk jelentős inaktivációs kinetika változást, ami kizárja azt, hogy a D₂O helyettesítés ilyen mechanizmuson keresztül fejtené ki hatását.



10. ábra: *Bal oldali panel:* outside-out patch mérések különböző viszkozitású extracelluláris oldatokban. Az extracelluláris oldatot a nyilak mellett feltüntetett koncentrációban glicerolt vagy szacharózt tartalmaztak. A különböző kísérleteket a csúcsáramra normáltuk. *Jobb oldali panel:* extracelluláris H₂O-ban ill. D₂O-ban mért inaktivációs kinetikák összehasonlítása különböző extracelluláris oldatokban. Az ábra azt mutatja, hogy pusztán az oldat viszkozitásának emelése nem okoz jelentős változást az inaktivációs kinetikában, ill. hogy a D₂O-ban mért lassabb inaktivációs kinetikát 10% glicerolextracelluláris oldathoz adása nem lassítja tovább.

3.3.3. A K⁺ ionok távozási sebessége a pórusból (~tartózkodási idejük a pórusban). Ennek vizsgálatához olyan ion összetételű oldatokat és feszültség protokollokat kellett kialakítani amelyekkel összehasonlítható a sejtből kifelé irányuló és befelé irányuló K⁺ áramok inaktivációs kinetikája, és meg lehet állapítani, hogy ezen időállandók hányadosát befolyásolja-e az extracelluláris D₂O. Ha a hányados D₂O szenzitív, akkor 3.3.1-pontban leírt jelenség magyarázható egyszerűen azzal, hogy a K⁺ ionok lassabban távoznak a pórusból. Amennyiben az inaktivációs kinetikák hányadosa nem érzékeny D₂O-ra, úgy ez a mechanizmus kizárható a nehézvíz jelenlétében mért inaktivációs kinetika lassulás magyarázatából. (Egész pontosan azt határozzuk meg, hogy függ-e az inaktivációs kinetika attól, hogy a K⁺ D₂O→H₂O közeg irányába mozog, vagy H₂O→D₂O irányba). Eredményeink azt mutatták, hogy a sejtbe befelé vagy onnan kifelé folyó K⁺ áramok inaktivációs kinetikájának hányadosa nem függ attól, hogy D₂O vagy H₂O alapú az extracelluláris oldat.

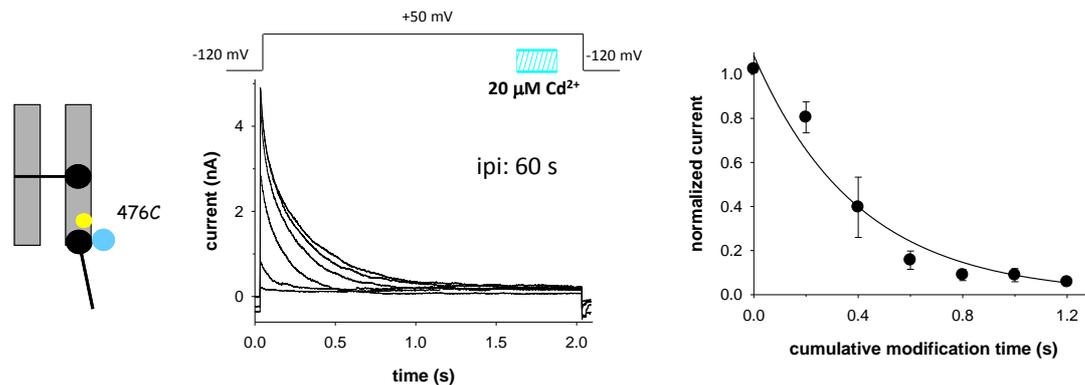


11. ábra: Befelé és kifelé folyó K⁺ áramok vizsgálata inside-out patch konfigurációban. Felső sor: Szimmetrikus H₂O környezetben az kísérleti elrendezés grafikus szemléltetése, és a mért ionáramok. *Alsó sor:* Aszimmetrikus H₂O//D₂O környezetben az kísérleti elrendezés grafikus szemléltetése, és a mért ionáramok. Az oszlopdiaagram az inaktivációs kinetikát jellemző időállandók hányadosa szimmetrikus (H₂O) és aszimmetrikus (D₂O) környezetben. Az ábra azt mutatja, hogy az időállandók hányadosa nem függ attól, hogy szimmetrikus vagy aszimmetrikus H₂O környezetben történt a mérés.

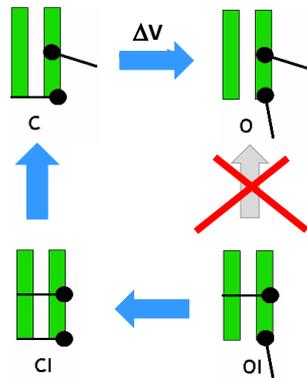
3.5 feladat Az inaktivációból történő visszatérés vizsgálata nyitott állapotban rögzített aktivációs kapu mellett. A feladat elvégzése során arra kerestük a választ, hogy a fentebb említett, aktivációs és inaktivációs kapu közötti kommunikáció kétirányú, azaz nem csak az inaktivációs kapu állapota határozza meg az aktivációs kapu mozgását, hanem az aktivációs kapu állapota is befolyásolja az inaktivációból történő visszatérést. Konkrét kísérleteinkben

azt vizsgáltuk, hogy az aktivációs kapu nyitott állapotban való rögzítése befolyásolja-e az inaktivációs kapu nyitását, így a csatornák inaktivált állapotból való visszatérését.

A kísérletekhez a (T449A/V476C) mutáns Shaker IR csatornát használtuk, ugyanis e mutánsnál a 476C és hozzá közeli alegység H486 aminosava között kinyitott aktivációs kapu mellett egy olyan Cd^{2+} híd alakítható ki mely nyitott állapotban rögzíti az aktivációs kaput. A kísérleteket inside-out patch konfigurációban végeztük. Megállapítottuk, hogy az inaktivált csatorna aktivációs kapujának nyitott állapotba rögzítése (Cd^{2+} hidak kialakítása az inaktivált csatornában) meggátolta azt, hogy az inaktivációból történő visszatérés bekövetkezhesen, azaz az inaktivációból történő visszatérés szükséges (de nem elégséges feltétele) az, hogy az aktivációs kapu bezáródjon.



12. ábra: Az aktivációs kapu rögzítése nyitott állapotban inaktivált csatornán. A bal oldali panel inside-out patch mérésáramregisztrációit mutatja. A feszültség protokoll a panel felső részében látható. A patch-et sorozatosan depolarizáltuk 2 s időtartamon keresztül, a világoskék sátrózott sávnak megfelelően 20 μM Cd^{2+} -t tartalmazó extracelluláris oldattal perfundáltuk a mérőkamrát úgy, hogy kizárólag a nyitott aktivációs kapujú, de inaktivált csatornákat érje a Cd^{2+} expozíció. A csúcsáram impulzusról-impulzusra történő csökkenése azt jelenti, hogy azok a csatornák, amelyek aktivációs kapuja nyitott állapotban rögzült nem tudnak visszatérni az inaktivációból. A jobb oldali panel a csúcsáramok csökkenésének kinetikáját mutatja a kumulatív Cd^{2+} expozíció függvényében.



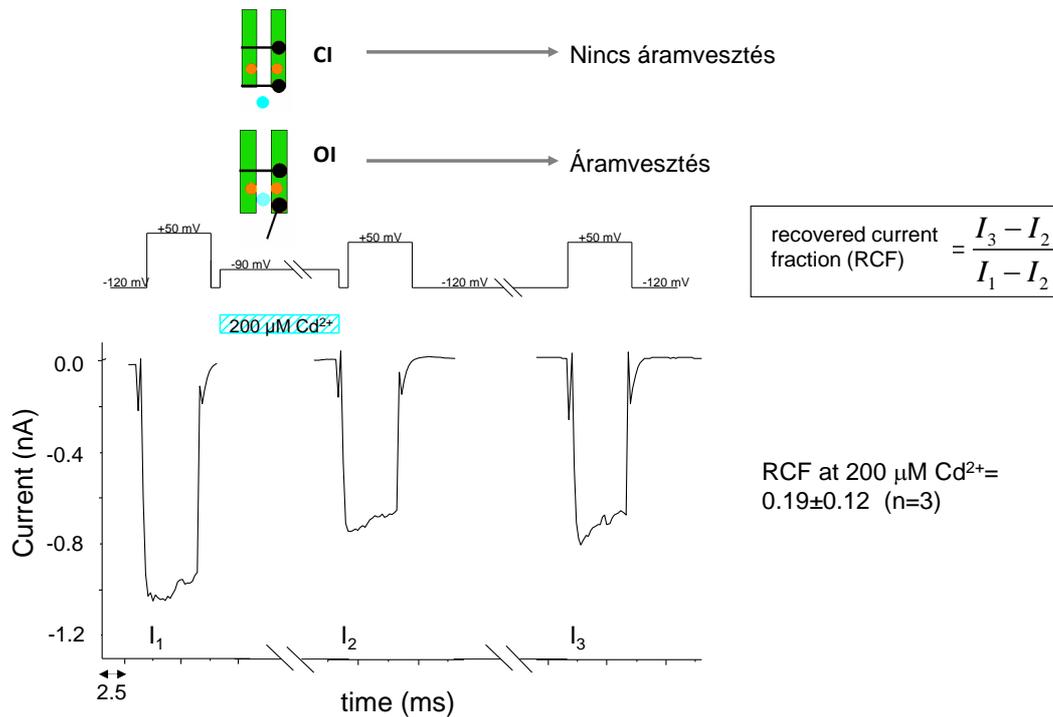
A fenti eredmények alapján a Kv csatornák egyes kapui közötti tranzíciókra az alábbi kapuzási sémát javasoljuk, amely szerint az aktivációs kapunak be kell záródnia mielőtt az inaktivációból történő visszatérés bekövetkezik.

13. ábra: A csatorna zárt állapotában (bal felső) a citoszolikus oldalon található aktivációs kapu zárva míg az extracelluláris oldalhoz közeli, a szelektivitási szűrőben található inaktivációs kapu pedig nyitott állapotban van. A kapuk állapotai membránpotenciál változás (ΔV)-függő, vagy idő-függő módon változnak. A piros kereszt a jelen kísérleti eredményt mutatja, nyitott aktivációs kapu mellett nem történik meg az inaktivációból történő visszatérés.

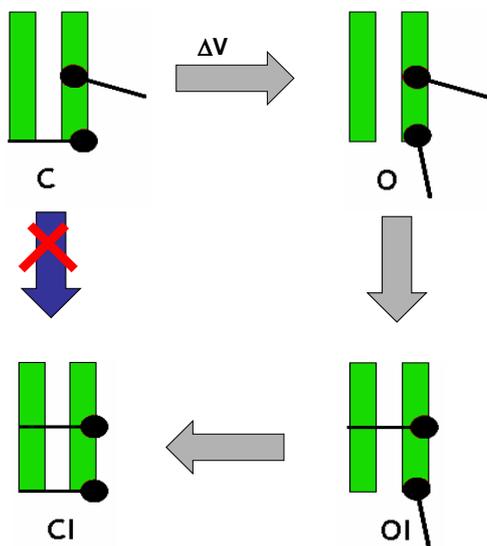
Az inaktivációkihalkulásának egyik fontos kérdése, hogy mely csatornák esetén következhet be a zárt állapotból közvetlenül az inaktiváció, azaz van-e átmenet közvetlenül a zárt (C) és a CI kapuzási állapotok között. Ez a kérdés azt is jelenti egyben, hogy tud-e az inaktivációs kapu mozogni az aktivációs kaputól függetlenül.

Méréseinkhez olyan mutáns Shaker-IR csatornákat használtunk, amelyekben az S6-os szegmens, közvetlenül az aktivációs kapu felett elhelyezkedő 474-es pozíciójában található aminosav (valin) helyére ciszteineket építettünk, amelyek nyitott aktivációs kapu mellett hozzáférhetőek az intracelluláris oldal felől alkalmazott modifikációs reagensek, pl. Cd^{2+} számára. Az irreverzibilis modifikáció a csatorna funkciójának elvesztését jelenti, így a reakció azaz az aktivációs kapu állapota ionáram mérésével nyomon követhető. A meglehetősen bonyolult kísérleti protokoll lényege az volt (14. ábra), hogy a Cd^{2+} expozíció olyan membránpotenciálon történt, ahol makroszkópikus ionáram még nem mérhető, de az áram egyensúlyi inaktivációja már elkezdődik. Ha az inaktiváció kialakulását megelőzi a csatornák rövid, makroszkópikus áramot nem adó nyitása, akkor a nyitott csatorna Cd^{2+} általi

módosítása a +50 mV tesz potenciálán mért teszt áram csökkenését okozza. Ha a csatorna zárt aktivációs kapu mellett inaktiválódik akkor a Cd^{2+} nem fér hozzá a 474C-hez, így a tesztpotenciálán mért áram nem csökken.



14. ábra: A zárt állapotból történő inaktiváció lehetőségének vizsgálata. Az ábra felső része a kísérletet értelmezését szemlélteti grafikusán. A narancsszínű kör a 474C pozíciót mutatja, a világoskék kör a Cd^{2+} ionokat jelenti, a kapuk sematikus elhelyezkedését és állapotát a 13. ábrának megfelelően szemléltettük. Az ábra alsó része a feszültségprotokollt, a Cd^{2+} expozíció időzítését (világoskék sátirozott sáv) és a mért áramokat (inside-out patch) mutatja. A Cd^{2+} expozíció alatt a membránpotenciál -90 mV volt, ahol makroszkópikus áram még nem mérhető, de a csatornák egyensúlyi inaktivációja már elkezdődik. Ezen a membránpotenciálán a csatornák 10%-a kerül inaktivált állapotba (független mérés, nem került itt bemutatásra). A mérési görbék egyértelműen azt mutatják, hogy -90 mV-on inaktiválódott csatornák Cd^{2+} jelenlétében nem térnek vissza inaktivált állapotukból. Ez azt jelenti, hogy az inaktivációt rövid csatorna nyitások előzték meg, és ekkor a Cd^{2+} a 474C csatornákat vezetésképtelen állapotba hozta (A Cd^{2+} keresztkötetést ún. Cd^{2+} -hidat alakítja ki a csatorna pórusában, emiatt a K^+ konduktancia megszűnik). A statisztikai kiértékelés azt mutatja, hogy a csatornák 80%-a viselkedik így, 20%-ában valószínűleg nem volt elég idő arra, hogy a Cd^{2+} hidak kialakuljanak.



Kísérleti eredményinkből azt a következtetést vontuk le (15. ábra), hogy az aktivációs kapu nyitása mindenképp megelőzi az inaktivációs kapu záródását, azaz a csatornák egyes állapotai közötti átmenet szigorúan szabályozott.

15. ábra. A csatorna zárt állapotában (bal felső) a citoszolikus oldalán található aktivációs kapu zárva míg az extracelluláris oldalhoz közeli, a szelektivitási szűrőben található inaktivációs kapu pedig nyitott állapotban van. A kapuk állapotai membránpotenciál változás (ΔV)-függő, vagy idő-függő módon változnak. A piros kereszt a jelen kísérleti eredményt mutatja, a csatorna zárt állapotából nem következhet be az inaktiváció.

Összegezve a bemutatott adatokat úgy gondoljuk, hogy kísérleti eredményink lényegesen hozzájárulnak az ioncsatornák egyes kapuzási állapotai közötti átmenetek pontos megértéséhez, és az inaktivációs lépés molekuláris mechanizmusának tisztázásához. Sajnos a kísérleti terv túl ambíciózus lett, nagyon sok vállalás volt, amelyek teljesítése sokkal hosszabb időt vett igénybe, mint az eredetileg gondoltuk. Az igen jelentős késésért az OTKA bizottság elnézését kérem.

A 3.1. feladat végrehajtásával kapcsolatosan korábbi jelentéseimben jeleztem, a Perozo labor a kísérleti terv 3.1-es pontjához hasonló kísérleteket végeztet el (USA Biophysics meeting, 2009). Emiatt a kísérleteket mi nem végeztük el. A 3.4 programponntal kapcsolatosan szintén hasonló a helyzet, a röntgenkristallográfia robbanásszerű fejlődése miatt olyan új információkra tettünk szert az irodalomból, ami miatt a kísérletek elvégzése okafogyottá vált. Az eredeti tervhez képest igen munkaigényes kísérleti programot végeztünk el a csatornák kapuzási állapotainak leírásával kapcsolatosan, melyeket a 3.5 pont alatt részleteztem.