

Peningkatan Konduktansi Maksimal Ion Kalium Setelah Pemberian 7-Ketokolesterol pada sel PC-12 Secara *In vitro*

Increased Potassium Conductance following the addition of 7-ketocholesterol in PC-12 cell Cultured In vitro

Indra Kusuma^{1,2}, Prasadhyia Astagiri Yusuf³, Nurhadi Ibrahim⁴

¹Magister Program of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, University of Indonesia

²Department of Physiology, Faculty of Medicine, YARSI University, Jakarta

³Department of Medical Physics, Faculty of Medicine, University of Indonesia

⁴Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Indonesia

KATA KUNCI 7-ketokolesterol; Kanal Kv; Lipid raft; Patch clamp
KEYWORDS 7-ketocholesterol; Kv channel; Lipid raft; Patch clamp

ABSTRAK Stroke menyebabkan kondisi hipoksia-iskemia yang menimbulkan berbagai kerusakan. Perubahan neurokimia otak pada stroke menyebabkan oksidasi kolesterol. Produk oksidasi kolesterol yaitu 7-ketokolesterol diketahui mengubah komposisi lipid raft, sifat protein membran dan meningkatkan eksositosis neurotransmitter. Kanal Kv berperan pada terminasi eksositosis dan mempertahankan keseimbangan ionik sel saraf. Pemberian 7-ketokolesterol pada sel PC-12 bertujuan melihat respon kanal Kv. Perekaman patch clamp dilakukan dengan tehnik whole-cell secara voltage clamp. Hasil eksperimen terekam kenaikan arus listrik ($p < 0.05$) pada potensial membran negatif, penurunan reversal potensial ($p > 0.05$) dan peningkatan konduktansi maksimal ion kalium ($p < 0.05$). Hasil eksperimen berupa perubahan konduktansi maksimal menunjukkan pengaruh 7-ketokolesterol pada kinetika dan fungsi kanal Kv yang diperkirakan sebagai akibat perubahan interaksi lipid-protein pada lipid raft. Pada konteks stroke respon kanal Kv turut berkontribusi pada proses neurotoksisitas yang berujung pada kematian sel.

ABSTRACT Stroke causes a harmful hypoxic-ischaemic condition of the brain. Neurochemical changes following stroke increases cholesterol oxidation products. One of such products e.g. 7-ketocholesterol is able to change lipid raft composition and transmembrane proteins behaviour. Kv channels play a role in exocytosis termination and regulate ionic homeostasis of a nerve cell. This study was aimed to observe Kv channels responses following the addition of 7-ketocholesterol to PC-12 cell. Whole-cell and voltage clamp configuration were used for patch clamp recording. Results showing an increase in efflux current was detected ($p < 0,05$) around negative membrane potentials. Decrease of reversal potentials ($p > 0,05$) and increase of potassium ion maximal conductance ($p < 0,05$) were also recorded. The change in maximal conductance amplitude showed the effect of 7-ketocholesterol to channel kinetics and behaviour that was likely caused by change in lipid-protein interaction at the lipid raft. These findings showed that Kv channels responded to 7-ketocholesterol involved in neurotoxicity that lead to cell death in stroke.

Stroke adalah penyakit yang menimbulkan hipoksia-iskemia pada otak. Stroke menimbulkan perubahan neurokimia otak berupa akumulasi glutamat dan radikal bebas. Radikal bebas menyebabkan oksidasi kolesterol. Salah satu produk oksidasi kolesterol yang terdeteksi setelah injeksi kainate adalah 7-ketokolesterol (Kim *et al.*, 2010; Zheng *et al.*, 2011).

7-ketokolesterol bersifat sitotoksik, apoptosis yang terjadi melalui jalur mitokondria (Neekhira *et al.*, 2007). Studi lain menunjukkan bahwa 7-ketokolesterol mempengaruhi protein connexin 43 secara langsung dan spesifik melalui perubahan komposisi *lipid raft* sehingga akumulasi protein ini pada membran sel meningkatkan komunikasi interseluler melalui *gap junction* (Girao *et al.*, 2004). Pada sel PC-12 7-ketokolesterol ditemukan meningkatkan proses eksositosis (Ma *et al.*, 2010).

Pada konteks stroke eksositosis neurotransmitter glutamat berlebihan akan menyebabkan stimulasi berlebihan berupa kaskade eksitotoksitas. Kanal Kv berperan pada mekanisme terminasi eksositosis (Sperelakis, 2001; Guyton & Hall, 2006). Kanal Kv adalah protein kanal ion yang peka terhadap perubahan potensial listrik transmembran. Pada keadaan teraktifasi ion kalium akan bergerak keluar dari sel melalui kanal Kv. Kanal Kv pada membran terlokalisasi pada *lipid raft* (Wong & Schichter, 2004). Peran sentral Kanal Kv pada terminasi eksositosis neurotransmitter khususnya neurotransmitter glutamat pada peristiwa stroke menarik untuk dikaji terutama responsnya terhadap 7-ketokolesterol.

BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian dilakukan terhadap kanal ion *voltage-gated* menggunakan sel PC-12, 7-ketokolesterol diberikan secara *in vitro* pada sel. Pengambilan data dilakukan sebelum dan

sesudah pemberian 7-ketokolesterol. Sel PC-12 digunakan karena mudah dikultur dan pada keadaan belum terdiferensiasi berbentuk bulat hingga relatif mudah mencapai *gigaseal*. Studi pendahuluan pada sel PC-12 menunjukkan pengukuran *whole-cell* akan menghasilkan pola arus listrik yang menyerupai aktivitas kanal ion kalium *voltage-gated* (Kv).

Prosedur penelitian kemudian disesuaikan dengan standar pengukuran untuk aktivitas listrik kanal ion Kv. Sel PC-12 adalah sel neuroendokrin pheochromocytoma yang berasal dari adrenal tikus. Sel ini biasa dipergunakan dalam studi proses eksositosis dan hipoksia hingga menjadi model untuk neurosekresi. Eratnya hubungan eksositosis dengan fungsi membran sel menjadi alasan dipergunakannya sel ini untuk studi ini.

Sebanyak 2 ul 7-ketokolesterol (*In vitro*) diberikan pada 2 ml larutan eksternal hingga didapat konsentrasi 2uM yang telah diketahui meningkatkan eksositosis. Pengambilan data menggunakan tehnik *Patch clamp* dengan konfigurasi *whole-cell*. Aktivasi kanal ion menggunakan protokol perekaman *voltage ramp* -70 mV - + 50 mV sebanyak 10 mV selama 20 ms (Gambar 1).

Sebagai medium kultur sel digunakan DMEM dengan 10% FBS, subkultur menggunakan Trypsin/EDTA 0,25%. Kultur dilakukan pada *culture dish* 35 mm, pada perekaman dish dibawa ke ruang perekaman, medium diganti dengan larutan ekstraseluler. Larutan intraseluler digunakan pada pipet borosilikat yang berisi filamen (FB330B). Data yang didapat dilakukan uji normalitas untuk melihat distribusi yang normal atau tidak. Pada keseluruhan data dilakukan perhitung-

Correspondence:

Dr. Indra Kusuma, Department of Fisiology, Faculty of Medicine, YARSI University, Jakarta, Jalan Letjen. Suprpto, Cempaka Putih, Jakarta Pusat 10510, Tel. 021-4206674-76, Facksimile: 021-4244574, indra.kusuma@yarsi.ac.id

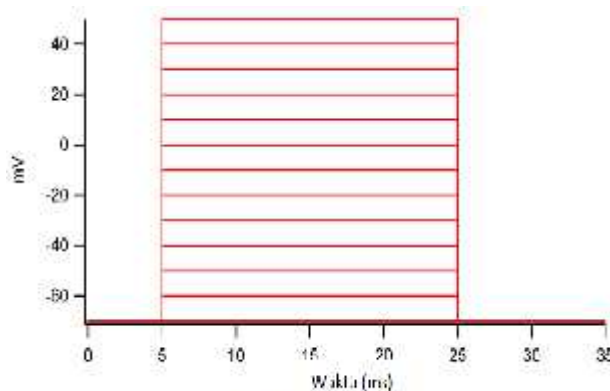
an rerata dan simpangan baku. Uji hipotesis menggunakan uji Wilcoxon pada perangkat lunak SPSS. Grafik dan kurva dibuat menggunakan perangkat lunak IGORpro, SPSS dan Microsoft Office Excell.

Tabel 1. Komposisi Larutan Internal dan Eksternal

Bahan	Larutan Internal (mM)	Larutan Eksternal (mM)
NaCl	2	150
KCl	-	2,8
K-Gluconate	130	-
CaCl ₂	-	10
MgCl ₂	4	1
Na ₂ GTP	0,4	-
EGTA	1	-
Clucose	-	2 mg/ml
HEPES	2	10

Tabel 2. Medium Kultur Komplit (50 ml)

Komponen	Konsentrasi
DMEM High Glucose	Add 50 ml
Fetal Bovine Serum	10%
L-Glutamin	2mM
Penisilin-Stereptomycin	1%
Amphotericin-B	2,5 ug/ml



Gambar. 1a Voltage ramp



Gambar. 1b Kurva I-V Pendahuluan

HASIL

Studi pendahuluan dilakukan dengan menggunakan *voltage ramp* yang disediakan oleh HEKA yaitu dari -80 mV sampai 52 mV dengan interval 12 mV selama masing-masing 20 ms. *Voltage ramp* tersebut menghasilkan arus ion makroskopik seperti pada gambar 1b. Kurva I-V dari hasil pendahuluan perekaman dilakukan dengan tehnik *voltage clamp* dengan konfigurasi *whole-cell*. Hal ini berarti arus listrik yang muncul bersifat makroskopik yaitu merupakan sumasi dari seluruh aktivitas listrik yang dihasilkan berbagai kanal ion yang ada dalam sel tersebut.

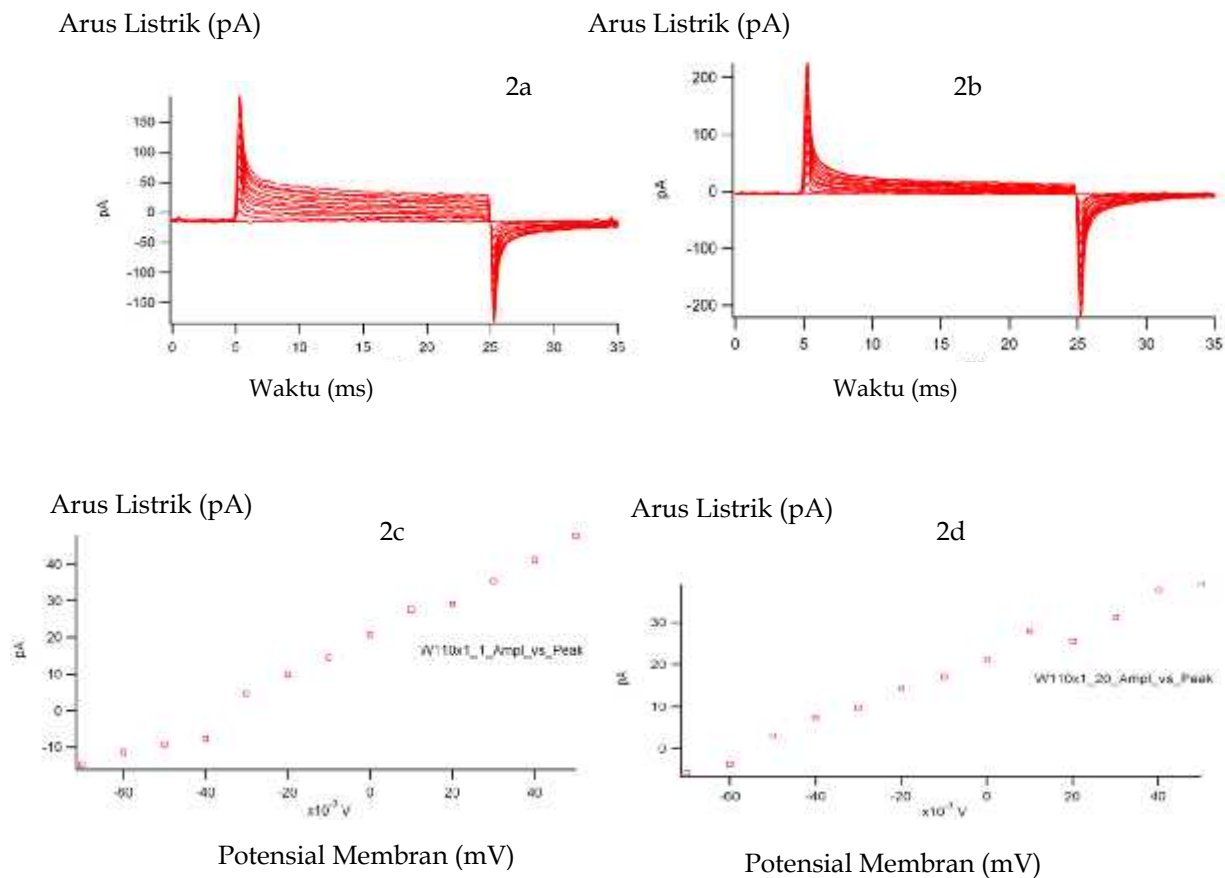
Arus listrik yang terekam menunjukkan perpotongan dengan aksis x pada potensial membran (V) negatif sehingga diperkirakan arus listrik dibawa terutama oleh ion kalium keluar sel. Hal ini sesuai teori bahwa *zero-current potential* (V_r) tiap ion berbeda dan untuk ion kalium berada pada potensial membran negatif sekitar -70 mV. Pada kurva 1b nilai V_r sekitar -20 sampai -30 mV, angka ini muncul akibat sumasi dari ion kalium, natrium, kalsium dan lain-lain.

Gambar 1b. juga menunjukkan adanya arus listrik negatif yang sesuai konsensus diartikan sebagai gerakan ion ke dalam sel yang dapat dibawa oleh ion natrium. Perubahan potensial membran menyebabkan arus listrik berubah menjadi positif menunjukkan aktivitas kanal ion

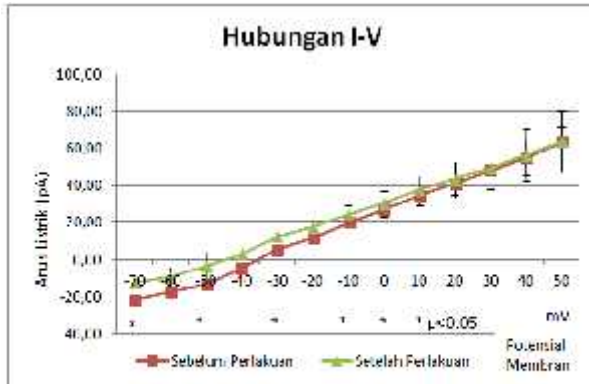
Kalium yang peka terhadap perubahan potensial membran semakin mendominasi dibandingkan kanal ion lainnya. Pada kedua Gambar 2c & 2d amplitudo maksimal arus listrik yang timbul setelah pemberian 7-ketokolesterol tampak lebih tinggi meski tidak banyak perbedaan. Dari kurva I-V ini terlihat lebih jelas bahwa arus listrik maksimal yang timbul untuk kedua kelompok tidak nampak perbedaan, yaitu disekitar 50 pA.

Kurva I-V yang dihasilkan memberikan informasi penting yaitu konfirmasi bahwa protokol perekaman untuk penelitian ini mengaktifkan kanal ion Kv. Seluruh data di buat rerata dan dibuat kurva I-V tampak setelah pemberian 7-ketokolesterol ($n=7$) terjadi peningkatan arus listrik terutama pada

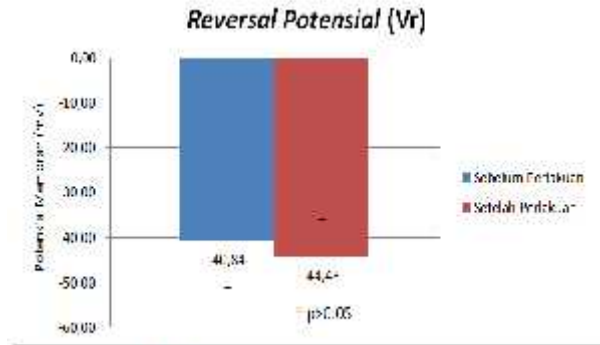
potensial membran negatif (<0 mV). Pada potensial membran positif (>0 mV) relatif tidak banyak perbedaan. Data dari kurva I-V digunakan untuk mencari *reversal potensial* sehingga dapat dihitung konduktansinya. Rerata *reversal potensial* dari setiap perekaman sebelum perlakuan didapatkan sebesar $-40,84$ mV dan setelah penambahan 7-ketokolesterol berubah menjadi $-44,48$ mV atau terjadi penurunan menjadi lebih negatif dari sebelum penambahan 7-ketokolesterol. Hasil uji statistik tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna. Hal ini berarti terjadi peningkatan aktivitas kanal ion kalium yang peka terhadap perubahan potensial membran (Kv). Pemberian 7-ketokolesterol menyebabkan peningkatan respon kanal Kv.



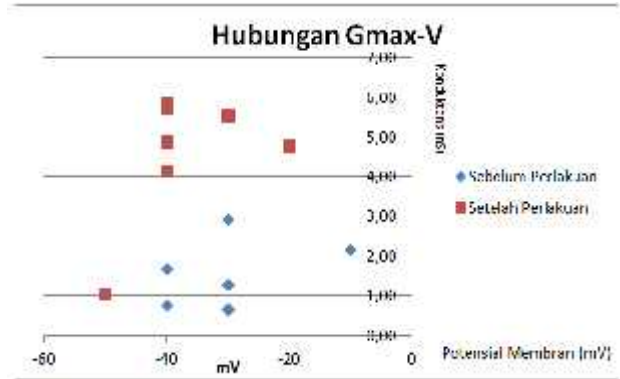
Gambar 2. Kurva 2a&2c sebelum perlakuan, Kurva 2b&2d setelah perlakuan, Kurva I-t (2a&2b), Kurva I-V (2c&2d)



Gambar 3. Kurva rerata I-V sebelum dan sesudah perlakuan dengan 7-ketokolesterol



Gambar 4. Kurva rerata reversal potensial (Vr)



Gambar 5. Kurva rerata konduktansi maksimal & Hubungan Gmax-V

Sesuai hukum Ohm dengan memiliki data *reversal potensial* maka data tersebut dapat digunakan untuk mendapatkan data konduktansi ion kalium (g). Konduktansi dihitung dari setiap data, kemudian data amplitudo maksimal dibuat rerata. Sebelum perlakuan didapatkan amplitudo maksimal konduktansi sebesar 1,45 nS dan sesudah penambahan 7-ketokolesterol sebesar 4,56 nS. Terjadi peningkatan konduktansi maksimal lebih dari 2x lipat. Besarnya peningkatan konduktansi ini sesuai dengan hasil uji statistik yang menunjukkan perbedaan bermakna.

Hubungan Gmaks-V pada Gambar 5. menunjukkan perbedaan konduktansi maksimal sebelum dan setelah perlakuan dalam hubungannya dengan potensial membran. Tampak bahwa konduktansi maksimal terjadi pada potensial membran sekitar -30 dan -40 mV baik sebelum dan sesudah perlakuan. Penambahan 7-ketokolesterol menyebabkan perubahan nilai konduktansi maksimal namun tidak mempengaruhi potensial membran saat konduktansi maksimal terjadi.

Tabel 1. Nilai normal konsentrasi ion utama intrasel-ekstrasel

Jenis Ion	Cairan ekstraseluler (mEq/L)	Cairan Intraseluler (mEq/L)	Potensial Ekuilibrium (mV)
Na+	142	10	+60
K+	4	140	-80
Ca ⁺⁺	2.4	0.001	+120
Mg ⁺⁺	1.2	58	0
Cl-	103	4	-80
Protein (A-)	2 g/dl	16 g/dl	-
Asam Amino	30 mg/dl	200 mg/dl	-

PEMBAHASAN

Studi pendahuluan pada sel PC-12 menunjukkan adanya aktivitas kanal ion yang teraktivasi oleh perubahan potensial listrik membran sel. Hubungan arus listrik yang timbul dengan *voltage ramp* pada kurva I-V Gambar 1 memperlihatkan arus listrik yang sesuai konsensus bergerak keluar dari sel (*outward*). Ion utama sel yang bergerak keluar dari sel adalah ion kalium. Pergerakan ion kalium yang melewati kanal akibat adanya perubahan potensial listrik membran sel menunjukkan aktivitas kanal ion Kv. Adanya kanal Kv pada sel PC-12 sesuai dengan Westerink yang menyatakan bahwa sel PC-12 memiliki populasi kanal Kv 1.2. Hal ini yang menyebabkan sel PC-12 digunakan pada penelitian seputar perubahan neurokimia otak akibat cedera saraf akut dan kronik pada penyakit seperti stroke dan Alzheimer (Westerink & Ewing, 2008).

Perekaman dilakukan dalam konfigurasi *whole-cell* sehingga arus listrik yang direkam mewakili seluruh kanal ion yang aktif. Pada Gambar 1 tampak arus listrik yang bernilai negatif, hal ini dapat difahami sebagai arus ion natrium yang masuk kedalam sel pada saat potensial membran berubah. Perubahan lebih lanjut potensial membran menyebabkan lebih banyak kanal

ion Kv yang terbuka sehingga arus listrik didominasi oleh ion kalium yang bergerak keluar dari sel. Hubungan kurva I-V yang relatif linear pada potensial membran yang positif menunjukkan adanya arus listrik yang melalui kanal ion kalium yang tidak peka terhadap perubahan potensial membran, contohnya adalah kanal ion K_{ir} (Kornreich, 2007).

Hasil perekaman sel PC-12 menggunakan depolarisasi oleh *voltage ramp*, menghasilkan kurva hubungan antara arus listrik dan waktu (I-t) seperti pada Gambar 2 (atas) Kurva tersebut menunjukkan segera setelah depolarisasi diberikan timbul lonjakan arus listrik yang tiba-tiba dan segera melemah. Pada keadaan depolarisasi, kenegatifan intrasel berkurang akibat adanya influks ion positif seperti natrium dan kalsium. Depolarisasi membran mengaktifkan kanal Kv sehingga ion kalium intrasel akan bergerak keluar akibat adanya perbedaan gradien elektrokimia (Sperelakis, 2001; Guyton, 2006).

Aktivitas kanal ion Kv ini bertujuan mengembalikan kenegatifan intrasel melalui repolarisasi. Repolarisasi pada sel saraf seringkali dimediasi oleh kanal ion Kv jenis *delayed rectifier*. SH-SY5Y adalah jenis lain dari galur sel saraf juga menunjukkan aktivitas kanal ion Kv *delayed rectifier* setelah depolarisasi menggunakan *voltage ramp* pada

rentang -90 mV sampai -30 mV dan +80 mV dimana aktivasi terjadi pada potensial sekitar -30 mV dan -20 mV (Tossetti *et al.*, 1998).

Kurva hubungan arus listrik dan potensial membran (I-V) pada Gambar 2 (bawah) memotong aksis x. Hubungan seperti ini menunjukkan bahwa *reversal potensial* berada pada potensial membran negatif. *Reversal potensial* adalah sumasi dari aktivitas ion yang bergerak pada membran sel. Setiap ion memiliki potensial ekuilibrium masing-masing seperti yang dapat dilihat pada Tabel 2. Perhitungan *reversal potensial* yang menghasilkan potensial listrik pada rentang negatif mengindikasikan arus listrik tersebut dibawa oleh ion kalium yang keluar dari sel dengan melewati kanal Kv.

Hasil perhitungan *reversal potensial* sebelum dan sesudah penambahan 7-ketokolesterol masih berada pada rentang negatif dan terjadi penurunan meski tidak bermakna secara statistik. Hasil ini menunjukkan bahwa memang arus listrik sebagian besar dibawa oleh ion kalium. Penurunan yang terjadi berarti *reversal potensial* menjadi semakin negatif atau mendekati potensial ekuilibrium ion kalium. Penambahan 7-ketokolesterol menyebabkan semakin banyak kanal ion Kv yang teraktivasi sehingga aktivitasnya meningkat relatif terhadap ion-ion lainnya.

Konduktansi maksimal ion kalium yang direkam setelah penambahan 7-ketokolesterol menunjukkan peningkatan yang bermakna. Peningkatan konduktansi maksimal lebih dari 2x lipat menegaskan penambahan 7-ketokolesterol menyebabkan ion kalium lebih mudah melewati kanal Kv. Peningkatan konduktansi maksimal dapat berarti lebih banyak kanal ion Kv yang teraktivasi, mengalami insersi atau tidak mengalami *uptake* dari membran. Hal ini dapat dikaitkan dengan studi pada *gap junction* yang menunjukkan 7-ketokolesterol

meningkatkan stabilisasi protein connexin 43 pada membran.

Stabilisasi connexin 43 oleh 7-ketokolesterol bersifat spesifik dan diperkirakan akibat pengaruh insersi 7-ketokolesterol pada *lipid raft* yang menyebabkan perubahan interaksi lipid-protein protein connexin 43 pada *lipid raft*. Connexin 43 mengalami perubahan kinetika sehingga terjadi peningkatan komunikasi antarsel melalui *gap junction* (Girao H *et al.*, 2004; Dart, 2010).

Sebagai produk oksidasi kolesterol sebelumnya 7-ketokolesterol diketahui memiliki efek sitotoksik melalui pengaruhnya terhadap proses apoptosis dan inflamasi (Berthier *et al.*, 2005; Neekhra *et al.*, 2007; Larrayoz *et al.*, 2010). Hasil penelitian ini mendapati 7-ketokolesterol tidak menghambat aktivitas kanal ion Kv bahkan meningkatkan konduktivitas ion melalui kanal-nya. Peningkatan konduktansi ion kalium juga dapat dijelaskan dengan keterlibatan ion kalsium. Torres *et al.* (2007) menunjukkan bahwa subunit beta intraseluler dari jenis kanal ion Maxi-K/BKCa mampu mengikat ion kalsium. Kanal Maxi-K sendiri selain ditemukan di otak juga ditemukan pada sel kromafin pada kelenjar adrenal hingga dapat difahami bila sel PC-12 yang berasal dari adrenal tikus juga memiliki populasi kanal ion ini (Torres *et al.*, 2007). Sehingga pemberian 7-ketokolesterol yang meningkatkan kadar ion kalsium intraseluler juga dapat menyebabkan aktivasi kanal Kv khususnya kanal Maxi-K.

Ma *et al.* (2010) mendapatkan bahwa peningkatan eksositosis sel PC-12 setelah penambahan 7-ketokolesterol bergantung pada adanya peningkatan influks ion kalsium dan pelepasan cadangan kalsium intrasel secara bersama-sama (Ma *et al.*, 2010). Mekanisme 7-ketokolesterol untuk menyebabkan peningkatan influks kalsium belum diketahui. Meski demikian hal ini

memperkuat penjelasan bahwa peningkatan konduktansi ion kalium setelah penambahan 7-ketokolesterol akibat pengaruh kadar ion kalsium intraseluler pada kanal Kv.

Protein syntaxin 1A salah satu protein yang terlibat pada proses eksositosis diketahui pula berperan sebagai regulator kanal Kv dan Cav sehubungan dengan proses eksositosis. Protein eksositosis lain adalah VAP-2 yang diketahui berinteraksi dengan OSBP, suatu protein reseptor oxysterol di sitoplasma. Interaksi ini diketahui mempengaruhi transport vesikel pada retikulum endoplasma dan badan golgi (Wylest *et al.*, 2002; Leung, 2007). Hubungan berbagai protein ini menunjukkan eratnya hubungan oxysterol dengan proses eksositosis yang diregulasi oleh kanal Kv dan Cav.

Pengeluaran ion kalium secara berlebihan di sisi lain menimbulkan kerugian pada kondisi organ yang mengalami hipoksia. Proses ambilan ion kalium kembali ke dalam sel menggunakan pompa ion Na-K ATPase membutuhkan ATP dan pasokan oksigen, proses ini akan terhambat pada keadaan hipoksia. Pada satu titik akan terjadi penurunan eksitabilitas sel akibat gangguan keseimbangan ionik dan berujung pada kematian sel. Pada konteks eksitotoksitas munculnya 7-ketokolesterol akibat oksidasi kolesterol menimbulkan peningkatan konduktivitas kanal ion dan eksositosis yang berkontribusi pada timbulnya lingkaran setan perubahan neurokimia sel saraf dan mengakibatkan kematian sel (Ong *et al.*, 2010).

SIMPULAN

Hasil penelitian ini mendapatkan pemberian 7-ketokolesterol pada sel PC-12 secara *in vitro* meningkatkan konduktansi ion kalium. Peningkatan amplitudo konduktansi maksimal ion kalium diperkirakan akibat pengaruh langsung 7-ketokolesterol pada komposisi *lipid raft*. Perubahan ini kemudian

mempengaruhi kinetika (proses buka-tutup) dan perilaku kanal Kv. Pada konteks stroke peningkatan respons kanal ion Kv terhadap stimulasi turut menambah lingkaran setan yang berujung pada kematian sel.

Penelitian berikutnya dapat dilakukan untuk identifikasi molekul sinyal intraseluler yang berperan mempengaruhi kanal ion Kv setelah pemberian 7-ketokolesterol atau penelitian lanjutan terhadap kanal ion Kv juga dapat menggunakan isolasi farmakologis untuk mendapatkan data *single channel*. Penelitian serupa dapat dilakukan untuk mempelajari respon kanal ion natrium dan kalsium.

Ucapan Terimakasih

Kami ucapkan terima kasih pada Ketua Yayasan YARSI Prof. dr H. Jornalis Uddin, MS, PAK untuk dukungan yang diberikan hingga penelitian ini dapat terlaksana. Terima kasih juga kami ucapkan untuk A/Prof. Ong Wei Yi yang telah mengizinkan kami menggunakan fasilitas laboratorium yang dipimpinnya serta tim laboratorium *in vitro* elektrofisiologi NUS khususnya Ma May Thu hingga penelitian ini dapat terselesaikan.

KEPUSTAKAAN

- Berthier A, Lemaire-Ewing S, Prunet C, Montage T, Vejux A, Pais de Barros J, Monier S, Gambert P, Lizard G & DN 2005. 7-ketocholesterol-induced apoptosis: Involvement of several pro-apoptotic but also anti-apoptotic pathway calcium-dependent transduction pathway. *The FEBS Journal* **272**, h.3093-3104.
- Dart C 2010. Lipid microdomain and the regulation of channel function. *J Physiol* **588**, h.3169-3178.
- Girao H, Catarino S & Pereira P 2004. 7-Ketocholesterol modulates intercellular communication through gap-junction in bovine lens epithelial cells. *Cell Communication and Signalling* **2**, h1-10.
- Guyton AC & Hall JE 2006. *Textbook of Medical Physiology*. Elsevier Saunders, Philadelphia.
- Kim JH, Jittiwat J, Ong WY, Farooqui AA & Jennert AM 2010. Changes in cholesterol biosynthetic and

- transport pathway after excitotoxicity. *Journal of Neurochemistry*, h34-41.
- Kornreich BG 2007. The patch clamp technique: Principles and technical considerations. *Journal of veterinary cardiology* **9**, h.25-37.
- Larrayoz IM, Huang J-D, Lee JW, Pascual I & Rodriguez IR 2010. 7-ketocholesterol- induced inflammation : involvement of multiple kinase signalling pathways via NFkB but independently of reactive oxygen species formation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**, h4942-4955.
- Leung YM KE, Ng B, Kang Y, Gaisano HY 2007. SNAREing voltage-gated K⁺ and ATP-sensitive K⁺ channels: Tuning beta-cell excitability with syntaxin-1A and other exocytotic proteins. *Endocrine reviews* **28**, h653-663.
- Ma MT, Zhang J, Farooqui AA, Chen P & Ong WY 2010. Effects of cholesterol oxidation products on exocytosis. *Neuroscience Letters* **476**, 36-41.
- Neekhra A, Luthra S, Chwa M, Seigel G, Gramajo AI, Kuppermann BD & MC K 2007. Caspase-8,-12,-3 activation by 7-ketocholesterol in retinal neurosensory cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **57**, h1362-1367.
- Ong WY, Kim JH, He X, Chen P, Farooqui AA & Jenner AM 2010. Changes in Brain Cholesterol Metabolome after excitotoxicity. *Mol Neurobiol* **41**, h.299-313.
- Sperelakis N 2001. Cell physiology sourcebook: A molecular approach 3rd. ed. Academic Press.
- Torres YP, Morera FJ, Carvacho I & Latorre R 2007. A Marriage of Convenience : Beta subunits and Voltage-dependent K⁺ Channels. *The Journal of Biological Chemistry* **282**, h.24485-24489.
- Tossetti P, Taglietti V & Toselli M 1998. Functional changes in potassium conductances of the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y during in vitro differentiation. *J Neurophysiol* **79**, h.997-1007.
- Westerink RHS & Ewing AG 2008. The PC12 cell as model of neurosecretion. *Acta Physiol (Oxf)* **192**, h.273-285.
- Wong W & Schichter LC 2004. Differential recruitment of Kv 1.4 and Kv 4.2 to lipid rafts by PSD-95. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, h.444-452.
- Wylest JP, McMaster CR & Ridgway ND 2002. Vesicle-associated Membrane Protein-associated Protein-A (VAP-A) Interacts with the Oxysterol-binding Protein to Modify Export from the Endoplasmic Reticulum. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, h.29908-29918.
- Zheng XY, Zhang HL, Luo Q & Zhu J 2011. Kainic acid-induced neurodegenerative model : Potential and limitation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, h.1-10.