

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

A Kv1.3 csatornák inaktivációjának és farmakológiai tulajdonságainak vizsgálata



Dr. Somodi Sándor

Témavezetők: Dr. Panyi György és Dr. Varga Zoltán

DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
BIOFIZIKAI ÉS SEJTBOLÓGIAI INTÉZET
DEBRECEN, 2007

1	BEVEZETÉS.....	1
2	TUDOMÁNYOS HÁTTÉR.....	2
2.1	Ioncsatornák szerepe a lymphocyták aktivációjában.....	2
2.2	A feszültség kapuzott Kv1.3 csatorna főbb biofizikai tulajdonságai.....	3
2.3	A C-típusú inaktiváció mechanizmusa és kapcsolata az extracelluláris tér ionösszetételével.....	6
2.4	A Ca ²⁺ aktivált IKCa1 K ⁺ csatorna főbb biofizikai tulajdonságai.....	11
2.5	A Kv1.3 és IKCa1 csatornák lymphocytaltípus-függő expressziója: a Kv1.3 csatornák farmakológiai jelentősége	11
2.6	A Kv1.3 csatornák peptid-típusú gátlószerei.....	13
3	CÉLKITŰZÉSEK.....	16
4	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	17
4.1	Humán perifériás vérből izolált lymphocyták	17
4.2	CTLL-2 sejtek tenyésztése és transzfekciója.....	17
4.3	HEK 293 sejtek tenyésztése és transzfekciója.....	18
4.4	Molekuláris biológia	18
4.5	Monoklonális antitest adhéziós módszer.....	18
4.6	Skorpió toxinok preparálása	19
4.7	Patch-clamp	19
4.8	Oldatok.....	20
4.9	Adatok kiértékelése.....	21
5	EREDMÉNYEK.....	22
5.1	A Kv1.3 csatornák inaktivációjának pH-függő szabályozása: a His399 szerepe....	22
5.1.1	A Kv1.3 inaktivációja lassul alacsony pH _o mellett.....	22
5.1.2	Az extracelluláris pH befolyásolja az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggését 23	
5.1.3	Magas extracelluláris [K ⁺] mellett a pH _o csökkentése gyorsítja az inaktivációt 26	
5.1.4	40 mM [K ⁺] _e esetén a pH _o csökkentése nem változtatja meg az inaktiváció sebességét.....	28
5.1.5	Az inaktiváció pH _o -függése a His399 protonációjával függ össze	30
5.1.6	Magas ionerősségű oldat alkalmazása: az elektrosztatikus barrier megszüntetése.....	34
5.1.7	Az alacsony pH _o lassítja a bárium bemosódását és kimosódását.....	37
5.1.8	Az intracelluláris káliumkoncentráció csökkentése: az extracelluláris tér felől való töltődés szerepének növelése.....	41
5.2	A <i>Centruroides elegans</i> skorpió mérgéből izolált peptidok Kv1.3 csatornákra gyakorolt hatásának vizsgálata.....	44
5.2.1	A <i>Centruroides elegans</i> peptidok szétválasztása, szekvenálása.....	44
5.2.2	A Ce1, Ce2 és a Ce4 toxinok a Kv1.3 csatornák hatékony gátlószerei	45
5.2.3	A Ce1, Ce2 és a Ce4 toxinok szelektíven blokkolják a Kv1.3 csatornákat.....	47
6	MEGBESZÉLÉS	50
6.1	A Kv1.3 csatornák inaktivációjának pH-függő szabályozása: a His399 szerepe....	50
6.1.1	A vad típusú és mutáns Kv1.3 csatornák karakterizálása: a membránfelszíni töltésárnýékolás szerepe és az aktiváció és inaktiváció kapcsolása	50
6.1.2	A vad- típusú és H399 mutáns csatornák karakterizálása: az inaktiváció pH- függése 52	
6.1.3	Magas extracelluláris [K ⁺] hatása az inaktiváció pH-függő lassulására a vad- típusú Kv1.3 csatornák esetén	54

6.1.4	Modell: A K^+ és a 399-es helyzetű aminosavoldallánc közötti elektrosztatikus kölcsönhatás szerepe.....	55
6.1.5	A 399-es helyzetben elhelyezkedő pozitívan töltött aminosav jelenléte az inaktivációt érzékenyebbé teszi az ionerősség változtatására.....	56
6.1.6	A 399-es helyzetű pozitív töltésű aminosavoldallancok akadályozzák a bárium ionok mozgását az extracelluláris tér és a csatorna pórusa között	57
6.1.7	Az inaktivációs kinetika pH_o -függését az intra- és extracelluláris K^+ koncentráció együttesen határozza meg.....	58
6.2	A <i>Centruroides elegans</i> peptidok a Kv1.3 csatornák szelektív gátlószerei	62
	ÖSSZEFOGLALÁS	65
7	SUMMARY	66
8	PUBLIKÁCIÓS LISTA.....	67
8.1	Az értekezésben idézett közlemények	67
8.2	Saját közlemények jegyzéke.....	76
9	TÁRGYSZAVAK JEGYZÉKE	78
10	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	79

A gyakran előforduló rövidítések jegyzéke:

ANOVA	variancia analízis (analysis of variance)
APPR	a görbe alatti terület és a csúcsáram hányadosa (area/peak ratio)
Ce	Centruroides elegans
ChTx	charybdotoxin
CRAC	Ca ²⁺ felszabadulás aktiválta Ca ²⁺ csatorna
CTLL-2	egér leukaemiás sejtekből kiinduló sejtvonal
IL-2	interleukin-2
HIS	magas ionerősségű oldat (high ionic strength)
HEK	embrionális vesesejtekből kiinduló sejtvonal (human embrionic kidney)
[K ⁺] _e	intracelluláris káliumkoncentráció
[K ⁺] _i	extracelluláris káliumkoncentráció
H[K ⁺] _i	magas (140 mM) intracelluláris K ⁺ koncentráció
IKCa1	Ca ²⁺ aktivált K ⁺ csatorna
K _d	disszociációs állandó
K-ECS	150 mM K ⁺ -t tartalmazó extracelluláris oldat
Kv1.3	feszültség kapuzott K ⁺ csatorna
L[K ⁺] _i	alacsony (5 mM) intracelluláris K ⁺ koncentráció
MHC	fő hisztokompatibilitási complex
NTx	noxiustoxin
pH _o	extracelluláris pH
PLC γ	foszfolipáz C γ enzim
S-ECS	standard extracelluláris oldat (standard extracellular solution)
TCR/CD3	T sejt receptor/CD3 komplex
T _{CM}	centrális memória T sejtek
TEA	tetraetil-ammónium
T _{EM}	effektor memória T sejtek
20/40 mM K-ECS	20 ill. 40 mM K ⁺ -t tartalmazó extracelluláris oldat

1 BEVEZETÉS

A specifikus antigén hatására *in vivo* kialakuló hatékony és fajlagos immunválasz alapfeltétele a sejtosztódást és differenciálódást magában foglaló lymphocyta klón expanzió. A T-sejt receptor (TCR/CD3 komplex) stimulációját követően (2-3 óra) a lymphocyták akkor is a proliferáció útjára lépnek, ha a kezdeti stimulust megszüntetjük (McCarthy és mtsai, 1988). Ez alatt a membrántranszport folyamatok hatására megváltoznak az intracelluláris ion (pl. Ca^{2+} , Na^+ , pH (Grinstein és Dixon, 1989; Cahalan és mtsai, 2001)) és metabolit (glükóz, aminosavak) koncentrációk (Jacobs és mtsai, 1989; Bental és Deutsch, 1993). Ezt követően számos aktivációval összefüggő gén kerül átírásra, beleértve az interleukin-2 autokrin növekedési faktor génjét (Shaw és mtsai, 1988).

A lymphocyták domináns feszültségfüggő K^+ csatornájának, a Kv1.3 csatornának a felfedezésével egyidőben derült ki, hogy ezek a csatornák központi szerepet játszanak a T sejtek antigénekkal és mitogénekkal kiváltott aktivációjának és proliferációjának szabályozásában (Matteson és Deutsch, 1984). A Kv1.3 csatornák aktivitása döntően befolyásolja a T sejtek membránpotenciálját, s ezen keresztül a sejtek aktivációjában kulcsszerepet játszó Ca^{2+} -függő jelátviteli folyamatokat (Leonard és mtsai, 1992; Cahalan és mtsai, 2001). A Kv1.3 csatorna lymphocyták jelátviteli folyamataiban betöltött szerepének tisztázásában fontos szerepe volt a Kv1.3 csatornát gátló peptid toxinoknak és az igen sokféle kémiai szerkezetű ún. kis-molekula Kv1.3 inhibitoroknak (Panyi és mtsai, 2004c; Chandy és mtsai, 2004). A Kv1.3 csatornák specifikus, nagy affinitású gátlószereinek felfedezését célzó vizsgálatok fontosságát jelzi az is, hogy küszöbön áll az ilyen molekulák terápiás célú felhasználása egyes autoimmun betegségek (sclerosis multiplex, rheumatoid arthritis) kezelésében (Wulff és mtsai, 2003a; Beeton és mtsai, 2006b; Panyi és mtsai, 2006). A Kv1.3 csatornák aktivitása a gátlószereken felül befolyásolható a csatorna kapuzását jellemző biofizikai paraméterek módosításával is. A csatornák kapuzását befolyásoló hatás érkezik a sejtek környezetéből, ami többek között a sejteket körülvevő folyadék ionösszetételének vagy pH-jának változása lehet (López-Barneo és mtsai, 1993).

Mindezek alapján világos, hogy a Kv1.3 csatornák farmakológiai és biofizikai tulajdonságainak vizsgálata lényeges új információkkal szolgálhat a T sejtek és az immunrendszer élettani és pathológiás működésére vonatkozólag, az így nyert ismeretek pedig felhasználhatók az alternatív immunszuppresszív terápia kifejlesztését célzó farmakológiai kutatásokban.

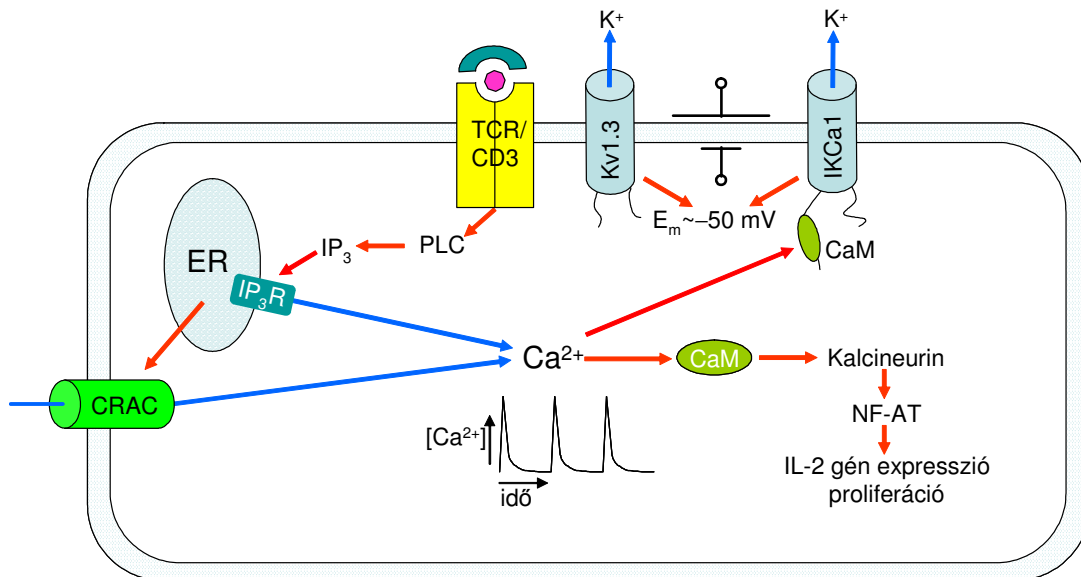
2 TUDOMÁNYOS HÁTTÉR

2.1 Ioncsatornák szerepe a lymphocyták aktivációjában

Az antigén prezentáló sejt fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) fehérjéjéhez kötődő antigén aktiválja a TCR/CD3 molekulakomplexet, amely számos intracelluláris protein kináz transzlokációját és aktivitásának fokozódását vonja maga után (pl. az Src kinázok csoportjába tartozó Lck és Fyn; ZAP-70; Tec) (Janeway és *mtsai*, 2001). Az ennek következtében aktiválódó jelátviteli útvonalak közül kiemelendő a Ca^{2+} jel kialakulása (1. ábra). Ez a foszfolipáz $\text{C}\gamma$ enzim ($\text{PLC}\gamma$) foszforilált adapter proteinekhez történő kapcsolódásával és Tec kinázok általi foszforilációjával kezdődik, ami aktiválja a $\text{PLC}\gamma$ -t. A $\text{PLC}\gamma$ enzim a foszfatidilinozitol-biszfoszfát membránlipidet inozitol-triszfoszfátra (IP_3) és diacilglicerolra (DAG) hasítja. A keletkező molekulák két jól elkülöníthető, de szorosan összefüggő jelátviteli kaszkádot indítanak el. A diacilglicerol a protein-kináz C (PKC) útvonalat aktiválja. Az aktivált PKC izoenzimek közül kiemelendő a $\text{PKC}\theta$, amely számos intracelluláris szubsztrát foszforilációjához vezet és transzkripciót triggerel a Fos/Jun transzkripció faktor komplexen keresztül számos gén AP1 elemén (Northrop és *mtsai*, 1993; Acuto és Cantrell, 2000). A másik jelátviteli út magába foglalja az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció legtöbb esetben oszcilláló emelkedését, amely a kalmodulinon keresztül a kalcineurin nevű foszfatázt aktiválja. A kalcineurin defoszforilálja az NF-AT transzkripció faktor, előidézve ezáltal annak a magba történő transzlokációját, és az interleukin 2 gén promoter eleméhez kötődését, amely által IL-2 termelést indít el, és a többi jelátviteli mechanizmussal (MAP kináz, Ras, Fos) szorosan együttműködve a sejtek proliferációját beindítja (Rao és *mtsai*, 1997; Crabtree, 1999).

Az előzőekben vázolt Ca^{2+} -dependens jelátviteli útvonal jelentős mértékben függ a plazmamembránban elhelyezkedő K^+ és Ca^{2+} ioncsatornák aktivációjától (Panyi és *mtsai*, 2004b; Panyi és *mtsai*, 2004c; Cahalan és *mtsai*, 2001). Amíg a Ca^{2+} jel kezdeti szakaszának kialakulásáért az endoplazmatikus retikulumból történő, IP_3 receptoron keresztül bekövetkező Ca^{2+} felszabadulás felelős, a Ca^{2+} jel fenntartott fázisában a Ca^{2+} plazmamembránon át történő beáramlása a döntő. Ez Ca^{2+} szelektív csatornákon keresztül történik, amelyek az endoplazmatikus retikulum Ca^{2+} raktárának kiürülését követően aktiválódnak (1. ábra). A kapcsolatot a raktárak kiürülése és a plazmamembrán csatornák között valószínűleg a STIM1 Ca^{2+} szenzor fehérje biztosítja (Zhang és *mtsai*, 2005). A plazmamembrán Ca^{2+} szelektív csatornát "store-operated" Ca^{2+} csatornának, vagy kalcium felszabadulás aktiválta Ca^{2+} csatornának (angol rövidítés: CRAC) nevezik (Zweifach és Lewis, 1993; Prakriya és Lewis, 2003), melynek molekuláris azonosítása a múlt évben történt meg (Yeromin és *mtsai*, 2006; Prakriya és *mtsai*, 2006). A CRAC csatorna egyik jellemző tulajdonsága, hogy nyitási valószínűsége nem függ a membránpotenciáltól. A nyitott CRAC

csatornákon keresztül folyó áram elektrokémiai hajtóerejéhez komoly hozzájárulást ad a sejtek membránpotenciálja (Lewis és Cahalan, 1995; Lewis, 2001). A T sejtek membránpotenciálja -50 és -60 mV közötti érték, melyet a lymphocyták két domináns K^+ csatornája, a feszültség-függő depolarizáció-aktivált Kv1.3 és a Ca^{2+} -aktivált K^+ csatorna (IKCa1) határoz meg (Matteson és Deutsch, 1984; Fanger és mtsai, 2000). E két ioncsatorna által létrehozott kation kiáramlás még a depolarizáló hatást okozó Ca^{2+} influx mellett is biztosítja a sejtmembrán hiperpolarizált állapotát, létrehozva ezzel a Ca^{2+} beáramláshoz szükséges hajtóerőt, és így a megfelelő Ca^{2+} -mediált jelátvitelt (1. ábra).



1. ábra A Kv1.3 és IKCa1 csatornák szerepe a T sejt receptor jelátvitelében (Panyi és mtsai, 2004 alapján)

2.2 A feszültség kapuzott Kv1.3 csatorna főbb biofizikai tulajdonságai

A lymphocyták domináns feszültségvezérelt K^+ csatornáját, a hKCNA3 gén által kódolt Kv1.3 csatornát (<http://www.iuphar-db.org/iuphar-ic/KV1x.html>) 1984-ben írták le (Matteson és Deutsch, 1984; Decoursey és mtsai, 1984). A Kv1.3 ioncsatorna a szekvencia homológia alapján a feszültségvezérelt ioncsatornák *Shaker* családjába tartozik. A csatornát négy azonos alegység alkotja, melyek elrendeződése megközelítőleg szimmetrikus az általuk létrehozott pórus körül. Az egyes alegységek kb. 500 aminosavból állnak, a tetramer csatornát az alegységek közötti nem-kovalens kötések tartják össze (MacKinnon, 1991). Minden egyes alegység 6 transzmembrán α -helikális szegmensből és az őket összekötő intra-

és extracelluláris hurkokból tevődik össze (2. ábra A rész). A csatorna pórusát az 5. és 6. transzmembrán szegmensek (S5 és S6) közötti extracelluláris hurkok valamint az S6 szegmensek egyes részei együttesen hozzák létre. A csatorna ugyanezen régiójához kötődik a Kv1.3 csatornák számos peptid és kis-molekula gátlószere is. A pórusrégió tartalmazza a K^+ szelektivitást biztosító különösen konzervatív szelektivitási filter (GYGD) szekvenciát is.

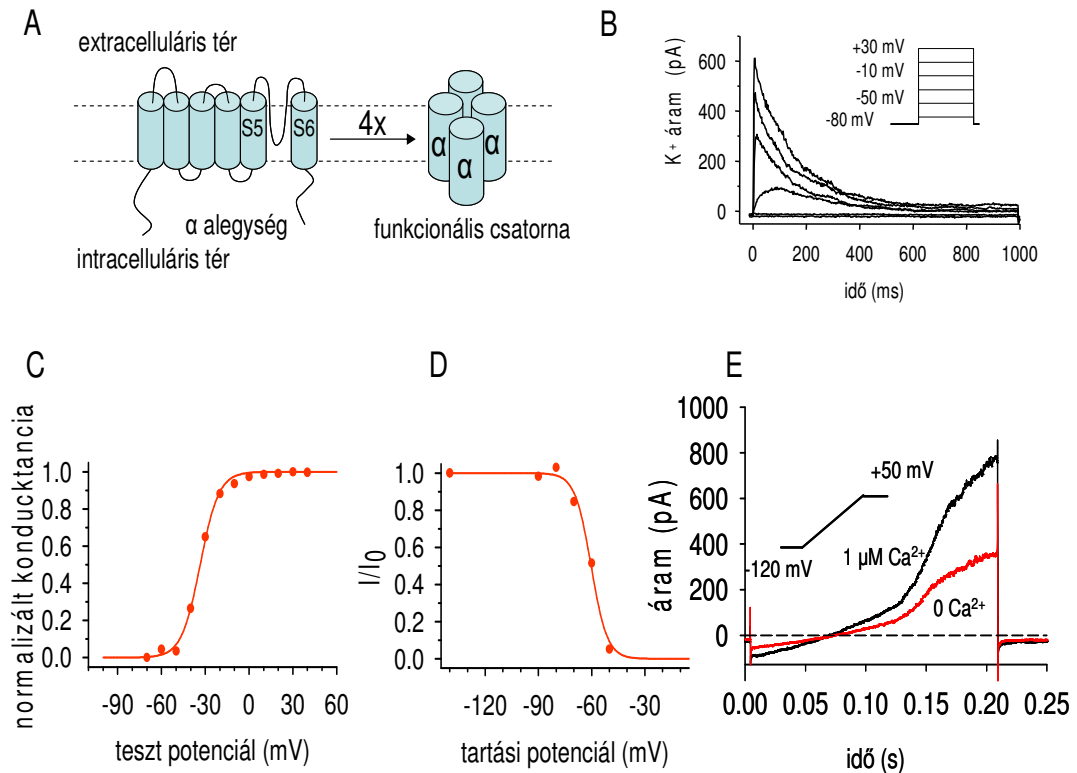
A Kv1.3 csatornák feszültségfüggő ioncsatornák, amelyek a membrán depolarizációjára nyitnak ki. A membránpotenciál változásait a csatorna feszültség-szenzora érzékeli, melyet a több pozitív töltést hordozó S4 hélixek ill. a nettó negatív töltéssel bíró S3 hélixek közösen alkotnak (Jiang és mtsai, 2003b; Long és mtsai, 2005a; Long és mtsai, 2005b). A feszültség-szenzornak a membrán depolarizációját követő elmozdulása a csatorna aktivációs kapujának megnyílásához vezet.

Az előzőekben tárgyalt, főként strukturális információkat a *Shaker* csatornák mutagenézise, ill. peptid toxinok és a csatorna pórusa közötti interakciók vizsgálata alapján határozták meg. A pórus és a szelektivitási filter szerkezetére ezen adatok alapján levont indirekt következtetéseket MacKinnon röntgen-kristallográfiás kísérletekkel igazolta. A KcsA és a feszültségfüggő K^+ csatornák kristályszerkezete alapján a csatornák extracelluláris pórusa négy szekvenciális K^+ kötőhelyet tartalmaz, ezen kívül egy extracelluláris rehydrációs/dehydrációs kötőhelyet is feltételeznek (Doyle és mtsai, 1998; Zhou és mtsai, 2001; Jiang és mtsai, 2003a).

A pórusban található K^+ kötőhelyek feltérképezésének másik módszere az ionok póruson keresztüli áramlásának mérésén alapul. Ezen kísérletekhez ideális a Ba^{2+} -ok használata, amelyekre a feszültségfüggő K^+ csatornák permeábilisak, de a Ba^{2+} nagyobb töltése miatt erősebben kötődik az egyes kötőhelyekhez, így a póruson keresztüli mozgása lassabb. Neyton és Miller BK K^+ csatornák esetén ezzel a módszerrel a röntgenkristallográfiás módszerhez hasonlóan szintén négy K^+ kötőhelyet térképezett fel (Neyton és Miller, 1988b; Neyton és Miller, 1988a). Harris és munkatársai *Shaker* csatornáknak a Ba^{2+} -ok felhasználásával három kötőhelyet azonosítottak a pórusban (Harris és mtsai, 1998).

A feszültségfüggő K^+ csatornák kapuzásának szabályozásában több ionkötőhely szerepét bizonyították. Grissmer és Cahalan írták le Kv1.3 csatornák extracelluláris bejáratánál lévő K^+ kötőhelyet, amelynek telítődése a C-típusú inaktiváció lassulását eredményezik. A szintén általuk leírt Ca^{2+} kötőhely ionkötése a csatorna blokkolását és inaktivációjának gyorsulását eredményezi (Grissmer és Cahalan, 1989). Levy és Deutsch a Kv1.3 csatornák inaktivált állapotból zárt állapotba történő visszatérését befolyásoló alacsony affinitású K^+ kötőhelyet azonosítottak (Levy és Deutsch, 1996). Baukrovitz és Yellen *Shaker* csatornákon vizsgálták az N-típusú és a C-típusú inaktiváció egymásra gyakorolt hatását, és egy, az inaktiváció sebességét befolyásoló K^+ -kötőhelyet azonosítottak, amelynek K^+ kötése az inaktiváció lassulását eredményezte, a kötőhely K_d értéke 2 mM (Baukrovitz és Yellen, 1995; Baukrovitz és Yellen, 1996).

A többek által leírt, a C-típusú inaktivációt befolyásoló K^+ kötőhely nagy valószínűséggel a csatorna pórusában elhelyezkedő K^+ kötőhelyek közül a legkülső kötőhelynek, az ún. „external lock in site”-nak felel meg (Neyton és Miller, 1988a). Elképzelhető ugyanakkor, hogy egy felületesebben elhelyezkedő kötőhely K^+ kötése akadályozza az ionok kilépését egy, a pórusban mélyebben elhelyezkedő, az inaktivációt közvetlenül befolyásol kötőhelyről, és így több kötőhely kölcsönhatása határozza meg az inaktiváció sebességét (Kiss és mtsai, 1999).



2. ábra A Kv1.3 és IKCa1 csatornák jellemző tulajdonságai

A: a tetramer csatorna összeszerelődése alegységekből. B: 1000 ms hosszú depolarizáló impulzusokkal kiváltott Kv1.3 áram human perifériás vérből izolált T lymphocytákban. A belső ábra a feszültség protokollt mutatja. C: a Kv1.3 csatornák egyensúlyi aktivációjának feszültségfüggése. D: a Kv1.3 csatornák egyensúlyi inaktivációjának feszültségfüggése. E: az IKCa1 csatornák feszültség rámpa protokoll (betét ábra) által kiváltott jellemző árama. A tiszta IKCa1 áram a Kv1.3 csatornák aktivációs küszöbénél negatívabb membránpotenciálokon mérhető.

A Kv1.3 csatornák aktivációs küszöbe kb. $-50 - -60$ mV, ami megegyezik a T sejtek nyugalmi membránpotenciáljával. Az aktivációs küszöbtől pozitívabb membránpotenciálokon a csatornák nyitási valószínűsége meredeken emelkedik (Cahalan és mtsai, 1985). A csatornák egyensúlyi inaktivációja a T sejtek nyugalmi potenciáljánál nem teljes (Pahapill és Schlichter, 1992; Verheugen és mtsai, 1995). Az egyensúlyi aktiváció és

inaktiváció feszültségfüggése (2. ábra C és D rész) egy olyan membránpotenciál-ablakot határoz meg, ahol a Kv1.3 csatornák aktívak. Ezen ablak a lymphocyták nyugalmi membránpotenciál-értékének megfelelő feszültségeknél van, így az aktív Kv1.3 csatornákon keresztüli K^+ fluxus hozzájárul a diffúziós membránpotenciál kialakításához (Panyi és mtsai, 1994; Pahapill és Schlichter, 1992). Tartós depolarizáció során a csatornák az aktivált állapotból egy nem-vezető ún. inaktivált állapotba kerülnek (Panyi és mtsai, 1995; Marom és Levitan, 1994). Ebből az állapotból a Kv1.3 csatornák még -120 mV membránpotenciál mellett is hosszú idő alatt (~ 50 s) térnek vissza nyugalmi (zárt) állapotukba. Az inaktiváció alapjában véve csökkenti a membránpotenciál kontrollhoz rendelkezésre álló, aktiválható K^+ csatornák számát. A Kv1.3 inaktivációjáért kizárólag a lassú, ún. C-típusú inaktiváció felelős, amely azonban sokkal lassabb, mint a többi Kv1.x csatorna inaktivációja, így az aktivált Kv1.3 csatornák jelentős K^+ fluxust képesek létrehozni mielőtt a nem-vezető inaktivált állapotba kerülnek. A Kv1.3 csatornák lassú inaktivációja, valamint a lymphocyták membránjának rendkívülien magas ellenállása ($10-20$ G Ω) biztosítják azt, hogy a T sejtek membránpotenciálját kevés számú aktív csatorna is képes fenntartani (Verheugen és mtsai, 1995; Defarias és mtsai, 1995).

2.3 A C-típusú inaktiváció mechanizmusa és kapcsolata az extracelluláris tér ionösszetételével

Az inaktiváció egy fiziológias folyamat, mely kontrollálja a csatornán áthaladó ionok számát. A *Shaker* családba tartozó K^+ csatornák két alapvetően különböző mechanizmus révén inaktiválódhatnak. Az N-típusú inaktiváció során a csatorna alegységeinek N-terminális részét képező ún. „inaktivációs labdák” egyike eltömíti a csatornapórust az intracelluláris oldal felől, s így akadályozza meg a további ionáramlást (Hoshi és mtsai, 1990; Zagotta és mtsai, 1990).

Ellentétben az N-típusú inaktivációval, a lassú, korábban C-típusúnak nevezett inaktiváció molekuláris mechanizmusa még ma sem pontosan ismert. Abban mindenki egyetért, hogy a C-típusú inaktiváció a pórus extracelluláris bejáratában bekövetkező konformációváltozás következménye. Az, hogy ez a konformációváltozás milyen kiterjedésű, már nem egyértelmű. Az inaktiváció kialakulásának leírására kezdetben két modell alakult ki. Az egyik szerint a csatorna pórusának extracelluláris bejáratában bekövetkező konformációváltozás az ionok vezetésére szolgáló pórus összeeséséhez vezet (Yellen és mtsai, 1994), meggátolva ezzel a K^+ és egyéb ionok áramlását (3. ábra). A másik modell szerint a lassú inaktiváció a csatorna ion-szelektivitásának megváltozását jelenti a nyitott állapot kialakulását követően (Starkus és mtsai, 1997). Ez utóbbi modell szerint molekuláris átrendeződés csak a szelektív filterben következik be, és az inaktiváció során a csatornák

csak K^+ számára válnak átjárhatatlanná, míg Na^+ és Li^+ számára a pórus átjárható marad. A modellektől függetlenül általánosan elfogadott nézet az, hogy a csatornát alkotó négy alegység kooperatív módon határozza meg az inaktiváció sebességét (Panyi és *mtsai*, 1995; Panyi és Deutsch, 1996).

A *Shaker* családba tartozó csatornák egy részében jelen van mind az N-típusú, mind a lassú inaktiváció, míg bizonyos csatornák csak az utóbbi mechanizmussal inaktiválódnak. Ez utóbbi csoportba tartozik a Kv1.3 csatorna is. Az N-típusú inaktiváció hiánya ezen csatornáknak arra vezethető vissza, hogy a csatornaalegység N-terminális részén lévő „inaktivációs labda” hiányzik. Mivel az inaktiváció sebességét a gyorsabb mechanizmus sebessége határozza meg, a csak lassú inaktivációs mechanizmussal rendelkező ioncsatornák inaktivációja lényegesen lassabb azon csatornákhöz képest, amelyekben jelen van az N-típusú inaktiváció is.

A C-típusú inaktiváció sebességét az inaktivációs kapunak megfelelően található K^+ kötőhely telítettsége határozza meg. A kötőhely telítettségének növekedése lassítja az inaktivációt a „láb az ajtóban” (foot-in-the-door) mechanizmusnak megfelelően. Ennek lényege, hogy az inaktiváció csak akkor mehet végbe, ha az inaktivációs kapunak megfelelően található K^+ kötőhely üres, az ezen a kötőhelyen K^+ -t kötött csatorna pedig nem képes inaktiválódni (López-Barneo és *mtsai*, 1993; Baukrowitz és Yellen, 1996). A fent említett K^+ kötőhely valószínűleg a pórusban egymás után elhelyezkedő 3-4 kötőhely közül a legkülső, az ún. „external-lock-in site”.

A „foot in the door” mechanizmus helyességét több kísérleti eredmény is alátámasztja: 1. Az N-típusú inaktiváció gyorsítja a C-típusú inaktivációt azáltal, hogy az inaktivációs labda bekötődése megakadályozza a kifelé irányuló káliumáramot, és így lecsökkenti a kötőhely káliumionok számára való hozzáférhetőségét és telítettségét (Baukrowitz és Yellen, 1995). 2. Úgynevezett “use-dependent” intracelluláris csatornablokkolók (pl.: TEA, C3-TEA, C4-TEA, C10-TEA) a C-típusú inaktiváció gyorsulását okozzák. A gyorsulás mértéke jó egyezést mutat a gátlószerek csatornához kötött állapotának élettartamával. Minél nagyobb ez az idő, annál jelentősebb a C-típusú inaktiváció gyorsulása annak megfelelően, hogy hosszabb időt tölt a gátlószer a pórusba kötődve, így kisebb a káliumkötőhely káliumionok számára való hozzáférhetősége az intracelluláris tér felől (Baukrowitz és Yellen, 1996). 3. Magas extracelluláris káliumkoncentráció mellett a C-típusú inaktiváció lassabbá és kétfázisúvá válik (Grissmer és Cahalan, 1989), mivel a kötőhely nagyobb mértékben töltődik K^+ -nal az extracelluláris tér felől.

A C-típusú inaktiváció sebességét döntően befolyásolja az extracelluláris pórusrégió aminosav sorrendje, különösképpen a *Shaker* B csatorna 449-es pozíciójának megfelelő helyen található aminosav minősége. A *Shaker* B csatornáknak 449-es pozícióban elhelyezkedő threonin alaninra való cseréje az inaktiváció jelentős gyorsulását, míg hisztidinre vagy egyéb aromás aminosavra való cseréje az inaktiváció lassulását eredményezte (López-Barneo és *mtsai*, 1993). Ezen felül az inaktiváció sebessége

módosítható gátlószerekkel (pl. tetraetil-ammónium), valamint az extracelluláris oldat kation összetételének és pH-jának változtatásával (Kurata és Fedida, 2006).

Az extracelluláris tér pH-ja (pH_o) két módon befolyásolhatja az ioncsatornák működését. Egyik hatás az angol szakirodalom által "shielding" mechanizmusnak nevezett úgynevezett "töltésárnyékolás". Ennek tisztázásához két fogalom, a membránpotenciálkülönbség és a membránfelszíni potenciálkülönbség bevezetésére van szükség. A membránpotenciálkülönbség a membrán két oldalán lévő oldatok közötti potenciálkülönbség. Membránfelszíni potenciálkülönbségnek a membrán extra- és intracelluláris felszíne közötti potenciálkülönbséget nevezük, amelynek kialakításában az extra- és intracelluláris oldat összetételén kívül a membrán felszínén elhelyezkedő töltött molekulák és molekularészek (disszociábilis aminosavdallancok, töltéssel rendelkező foszfolipidek stb.) is fontos szerepet játszanak. A káliumcsatornák feszültségfüggő kapuzásának szabályozásában nem a membránpotenciálkülönbség, hanem a membránfelszíni potenciálkülönbség vesz részt. Az úgynevezett töltésárnyékolást Frankenhaeuser és Hodgkin írták le divalens ionokkal, elsősorban Ca^{2+} -mal kapcsolatban (Frankenhaeuser és Hodgkin, 1957). Az elmélet alapja, hogy a kalciumionok képesek kapcsolódni a membrán felszínén elhelyezkedő negatív töltésű csoportokhoz, és árnyékolni ezek töltését. Az extracelluláris Ca^{2+} koncentráció növelése fokozza ezt a töltésárnyékolást, vagyis egyre több negatív töltésű csoporthoz fog kapcsolódni Ca^{2+} , ami a membrán extracelluláris oldalán a nettó töltés pozitívabbá válásához vezet, aminek következtében a membrán hiperpolarizálódik. Az extracelluláris kalciumkoncentráció csökkentése csökkenti a töltésárnyékolást, és az extracelluláris membránfelszín nettó töltése negatívabbá válik, a membrán depolarizálódik. Az extracelluláris pH változtatása ugyancsak befolyásolja a töltéssel rendelkező molekulák, molekularészek viselkedését azok protonációja-deprotonációja révén. Az extracelluláris pH csökkentése, fokozza a disszociábilis csoportok protonációját, így hasonlóan az extracelluláris kalciumkoncentráció növeléséhez hiperpolarizációt eredményez. Hasonló okok miatt a pH növelése depolarizációt hoz létre (Hille, 1992; Sperelakis, 1998).

Az extracelluláris pH a csatornaműködést magán a csatornafehérjén, annak extracelluláris felszínén lévő disszociábilis aminosavdallancok módosításán keresztül is befolyásolja, amely a töltésárnyékolással ellentétben specifikus kölcsönhatást jelent. Ebből a szempontból főleg az S5 és az S6 szegmenst összekötő, a pórus kialakításában fontos szerepet játszó, úgynevezett P-régió disszociábilis aminosavai bírnak jelentőséggel. Ezek közül Kv1.3 csatornában kiemelkedik a 399-es helyzetben lévő hisztidin szerepe. A hisztidin

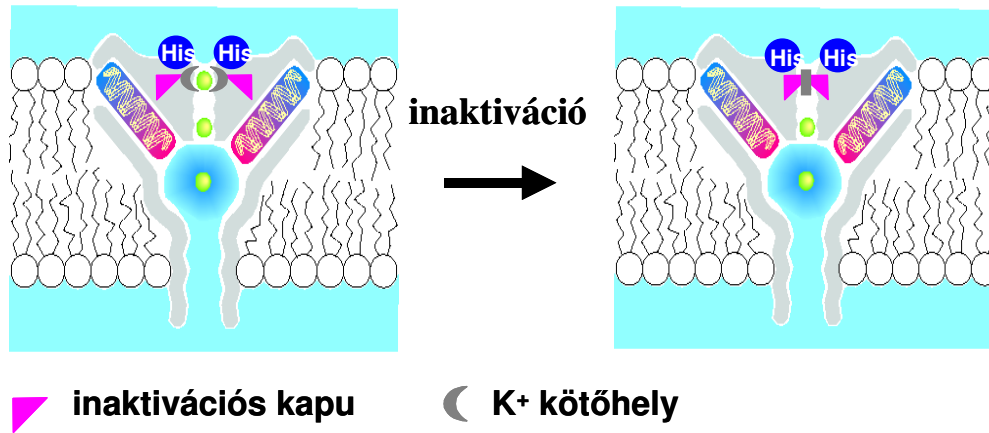
reverzibilisen protonálható, a reakció pK értéke oldatban 6,5. Ezt mikrokörnyezeti hatások módosíthatják, így a fehérjében lévő hisztidin pK értéke az oldatban meghatározott értéktől jelentősen eltérhet.

Alacsony extracelluláris pH mellett a membránfelszíni töltésáryékolással magyarázható a Kv1.3 csatornák egyensúlyi aktivációjának pozitívabb membránpotenciálok irányába való eltolódása, ugyanakkor az egyensúlyi inaktiváció eltolódásának háttérben feltételezhető a pórusban vagy annak közelében elhelyezkedő aminosavdallancok (pl. A His399) módosítása is (Deutsch és Lee, 1989; Teisseyre és Mozrzymas, 2007; Teisseyre és Mozrzymas, 2006).

Az irodalomból ismert, hogy több, a *Shaker* családba tartozó csatorna inaktivációs kinetikáját módosítja az extracelluláris pH. A legtöbb csatorna esetén az extracelluláris pH csökkenésekor a C-típusú inaktiváció gyorsulását tapasztalták. Amennyiben az S5 és S6 régiót összekötő peptidszakasz hisztidinoldallancot tartalmazott, a csatorna pH-érzékenysége jelentősen megnövekedett. A vad-típusú *Shaker* csatornák C-típusú inaktivációját az extracelluláris pH csökkentése gyorsította (Perez-Cornejo, 1999a). Ez a gyorsulás a legtöbb T449X mutáns esetén észlelhető volt, a legkifejezettebb hatás a T449H csatornánál jelentkezett (López-Barneo és mtsai, 1993). Az ún. „turret” régióban elhelyezkedő 425-ös helyzetű fenilalanin hisztidinre való cseréje is megnövelte az inaktiváció pH-szenzitivitását (Perez-Cornejo, 1999a). Az extracelluláris pH csökkentése gyorsította az rKv1.5 csatornák C-típusú inaktivációját, amelyben fontos szerepe van a *Shaker* csatornák 425-ös aminosavával ekvivalens pozícióban elhelyezkedő hisztidinnek (His452). Ugyanakkor a hisztidint kritikus pozícióban nem tartalmazó rKv1.2 csatornák C-típusú inaktivációja pH-inszenzitív (Steidl és Yool, 1999), míg az ún. „turret” régióban hisztidint (His508) tartalmazó fKv1.4 csatornák C-típusú inaktivációja gyorsult alacsony pH-n (Li és mtsai, 2003). A K532Y mutáció (a *Shaker* T449 ill. a Kv1.3 H399 aminosavakkal ekvivalens pozíció) az fKv1.4 csatornák esetén lassította és pH-inszenzitívvé tette az inaktivációt. Kehl és munkatársai kísérleteiben az extracelluláris pH csökkentése a hKv1.5 csatornák áramát blokkolta, a hatás magas $[K^+]$ mellett csökkent. Az inaktiváció gyorsulása a szerzők számításai alapján nem okozhatta az áramamplitúdó csökkenését (Kehl és mtsai, 2002). Az inaktiváció pH_o függését magyarázó molekuláris mechanizmus a fentebb felsorolt kísérletes eredmények ellenére nem pontosan tisztázott.

Az előzőek alapján különösen figyelemreméltó, hogy míg minden más csatornánál a kinetika gyorsulása figyelhető meg a pH csökkenésével, addig a Kv1.3 csatorna esetében

lassul a C-típusú inaktiváció (Deutsch és Lee, 1989). A Kv1.3 fontos és egyedülálló tulajdonsága a pH érzékenység szempontjából, hogy a kritikus (*Shaker* 449-cel ekvivalens) pozícióban egy titrálható hisztidin található (H399) (3. ábra).



3. ábra A C-típusú inaktiváció modellje

A C-típusú inaktiváció során a csatorna pórúsának extracelluláris bejárata összeesik, ami az inaktivációs kapu záródását eredményezi. Az inaktiváció szempontjából kritikus helyzetben az ún. „external lock-in site” van, amelynek káliumtelítettsége lényegesen befolyásolja az inaktiváció sebességét. Minél nagyobb ezen kötőhely telítettsége, annál lassabb az inaktiváció. A kötőhely káliumionok számára való hozzáférhetőségét a 399-es helyzetű aminosav (vad-típusú Kv1.3 csatornában hisztidin) minősége lényegesen befolyásolja.

A lassú inaktiváció pH-függése fontos szabályozó mechanizmus lehet például gyulladáscsökkentő területeken, ahol a környezet pH-ja jelentősen eltérhet a fiziológiás értéktől. Mivel a humán lymphocyták membránpotenciálját elsősorban a Kv1.3 csatornák határozzák meg, ezek működésének a pH_o változása által okozott módosulása befolyásolja a sejtek membránpotenciálját és ezen keresztül számos sejtfunkciót. Nevezetesen, gyulladáscsökkentő, alacsony pH-jú területen a Kv1.3 csatornák lassabb inaktivációja miatt átlagosan hosszabb ideig tartanak nyitva e csatornák. Ez negatívabb membránpotenciált eredményez, ami kedvez a lymphocyták aktivációja során kialakuló jelátviteli folyamatoknak. Éppen ezért fontosnak tartottuk annak vizsgálatát, hogy a lassú inaktiváció sebességét milyen molekuláris mechanizmussal csökkenti az extracelluláris pH csökkenése.

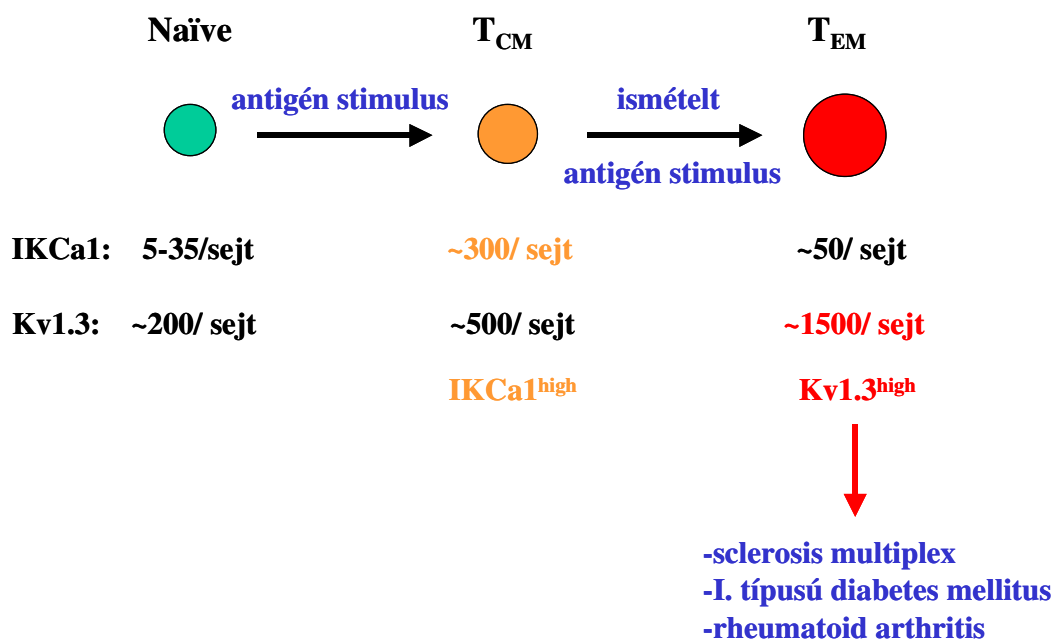
2.4 A Ca^{2+} aktivált IKCa1 K^+ csatorna főbb biofizikai tulajdonságai

A Kv1.3 csatornák mellett a humán T lymphocyták másik domináns káliumcsatornája a közepes vezetőképességű (11-35 pS) Ca^{2+} aktivált kálium csatorna (IKCa1, vagy más néven $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$, <http://www.iuphar-db.org/iuphar-ic/KCa.html>), amely a hKCNN4 gén terméke (Logsdon és mtsai, 1997). Szerkezete a Kv1.3 csatornákéhoz hasonló, négy egymással nem kovalensen kötődő alegységből áll, amelyek mindegyike 6 transzmembrán szegmenst tartalmaz. A két csatorna pórusának toxin receptorként is funkcionáló extracelluláris bejárata szintén nagy hasonlóságot mutat, ennek megfelelően a peptid toxinok hasonló jelleggel kötődnek a két csatornához (Rauer és mtsai, 1999). A két csatorna között két lényeges szerkezetbeli eltérés van: 1) Az IKCa1 csatornaalegységeinek C-terminálisához Ca^{2+} -tól függetlenül 1:1 sztöchiometriával kalmodulin asszociálódik, amely a csatorna Ca^{2+} érzékelője (Fanger és mtsai, 1999). A csatornák működését az intracelluláris szabad Ca^{2+} koncentráció vezérli, annak ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 200nM feletti szintre emelkedése után nyitnak ki, fél-maximális aktiváció 300-450 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mellett következik be, míg a maximális nyitási valószínűség eléréséhez 1 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ szükséges (Grissmer és mtsai, 1993). 2) Az IKCa1 csatornák S4 szegmensében (a Kv1.3 csatornák feszültség-szenzora) nem találhatóak meg a feszültségfüggő kapuzáshoz szükséges pozitív töltésű aminosav-oldalláncok, így a csatorna kapuzását a membránpotenciáltól függetlenül csak a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ határozza meg.

2.5 A Kv1.3 és IKCa1 csatornák lymphocytaltípus-függő expressziója: a Kv1.3 csatornák farmakológiai jelentősége

Nyugvó lymphocyták jóval nagyobb számban fejezik ki a Kv1.3, mint az IKCa1 csatornákat, így e sejtekben a membránpotenciál szabályzásában elsősorban a Kv1.3 csatornák vesznek részt (Cahalan és mtsai, 2001; Panyi és mtsai, 2004c). Ennek bizonyítása a Kv1.3, ill. az IKCa1 csatornákat specifikusan blokkoló peptidtoxinokkal történt. A Kv1.3 specifikus Margatoxin (MgTx) hatására a Kv1.3 csatornák blokkolása következtében a nyugvó T sejtek membránja depolarizálódik, ami következményesen gátolja a CRAC csatornákon keresztüli Ca^{2+} influxot, amely a sejtaktiváció elmaradását vonja maga után (Leonard és mtsai, 1992). Hasonló kísérleti elrendezésben az IKCa1-sepcifikus TRAM-34 toxin nem befolyásolta a nyugvó T sejtek működését az alacsony IKCa1 expresszióknak megfelelően (Wulff és mtsai, 2000; Ghanshani és mtsai, 2000). A T-sejt aktiváció alatt az IKCa1 csatornák expressziós szintje megnő, így az aktivált lymphocytákban a Kv1.3 csatornák mellett az IKCa1 csatornák is hozzájárulnak a Ca^{2+} beáramlás fokozásához a membránt hiperpolarizáló hatásuk révén (Fanger és mtsai, 2001). Ennek megfelelően ezen sejtek membránpotenciálja, Ca^{2+} jelátvittele és ennek következtében proliferációja IKCa1 gátlószerekre érzékenyebbé válik (Ghanshani és mtsai, 2000).

Az elmúlt években vált ismertté, hogy az egyes T sejt altípusok különböző mértékben expresszálják a Kv1.3 és az IKCa1 csatornákat, ami lehetővé teszi a Kv1.3 csatornát gátló toxinok terápiás célú felhasználását (Wulff és mtsai, 2003b). A nyugvó T sejtek átlagosan ~200 - 400 Kv1.3 csatornát és 8–10 IKCa1 csatornát fejeznek ki. A sejtaktiváció után a sejt felszíni antigénexpressziótól, és az ezzel párosuló élettani funkciótól függően (Sallusto és mtsai, 2000) különböző mértékben változik a sejtek által expresszált Kv1.3 és IKCa1 csatornák száma (4. ábra). Az érett, de antigénnel még nem stimulált naíve T sejtek antigén stimulációja a Kv1.3 csatornák expressziójának enyhe (~250/sejt → ~400/sejt), ugyanakkor az IKCa1 csatornák expressziójának jelentős fokozódásával (8-10/sejt → 500/sejt) jár együtt, amely Kv1.3^{low}IKCa1^{high} csatorna fenotípust eredményez. Az antigén stimulációt követően a T-sejtek nagy része rövid élettartamú ún. "armed effektor" sejt, kis része pedig különböző típusú memória T sejté differenciálódik. A centrális memóriasejtek (T_{CM}) a nyirokcsomókba vándorolnak, ahol a megfelelő antigént prezentáló sejtekkel történő stimulációjukat követően viszonylag hosszú idő alatt differenciálódnak effektor sejtekké és kerülnek ki a gyulladás helyére. Az aktivált T_{CM} sejteket a naíve T sejtekhez hasonlóan a Kv1.3^{low}IKCa1^{high} csatornafenotípus jellemzi. Ezzel szemben az effektor memória sejtek (T_{EM}), melyek közvetlenül eljutnak a gyulladás helyszínére és azonnali effektorfunkcióval rendelkeznek, aktivációjukat követően igen nagy számban fejeznek ki Kv1.3 csatornákat (kb. 1500/sejt), míg IKCa1 csatorna expressziójuk nem jelentős (Kv1.3^{high}IKCa1^{low} csatorna fenotípus) (4. ábra).



4.ábra A nyugvó és aktivált T lymphocyták Kv1.3 és IKCa1 csatorna expressziója

A kisméretű sejtek a nyugvó, a nagyméretű sejtek az aktivált T lymphocytákat szimbolizálják. A nyilak a differenciálódást és a sejtaktivációt mutatják.

Mivel az IKCa1 csatornák expressziójának fokozása a protein kináz C útvonalon, a Ca^{2+} jelátviteltől nagymértékben függetlenül történik (Ghanshani és *mtsai*, 2000), az IKCa1 csatornák számának növekedése akkor is bekövetkezik, ha a Ca^{2+} jelátvitel elsődlegesen blokkolt Kv1.3 inhibátorokkal. Így az IKCa1 csatornák up-regulációját követően a naíve és T_{CM} sejtek proliferációja Kv1.3 inhibátoroktól függetlenné válik, szemben a T_{EM} sejtek proliferációjától, ami kizárólag Kv1.3-függő (Wulff és *mtsai*, 2003b). A csatornaexpresszió különbözősége tehát lehetővé teszi, hogy a különböző funkcióval rendelkező T-sejt altípusok proliferációját a Kv1.3 (T_{EM} sejtek) vagy az IKCa1 (naíve és T_{CM} sejtek) specifikus blokkolásával gátoljuk meg (Chandy és *mtsai*, 2004).

Chandy és munkatársai azt találták, hogy sclerosis multiplexben, I. típusú diabetes mellitusban ill. rheumatoid arthritisben szenvedő betegekben a betegség kialakulásáért felelős autoreaktív T sejtek főleg effektor memória (T_{EM}) sejtek, amelyek nagy számban expresszálnak Kv1.3 csatornákat (Wulff és *mtsai*, 2003b; Beeton és *mtsai*, 2006b). Ezzel szemben a betegekből származó, más antigén specificitással bíró T sejtek, ill. az egészséges kontroll személyekből származó autoreaktív T sejtek főleg naíve ill. centrális memória (T_{CM}) sejtek, amelyek kisebb számban expresszálnak a Kv1.3 csatornákat. A T_{EM} sejtekben az antigén prezentációt követően a Kv1.3 csatornák az immunológiai szinapszisba vándorolnak (Panyi és *mtsai*, 2004a). Specifikus Kv1.3 csatorna blokkolók nem akadályozzák meg az immunológiai szinapszis létrejöttét, azonban gátolják a Ca^{2+} jelátvitelt, a citokin termelést és végső soron a T_{EM} sejtek proliferációját. Ez a hatás specifikus volt a T_{EM} sejtekre, mivel a nyugvó (naíve) és T_{CM} sejtek az IKCa1 csatornák fokozott expressziójával mentesülnek a Kv1.3 blokkolás mediált proliferáció gátlás alól. Patkányokban a Kv1.3 csatorna gátlószerei hatékonyan csökkentették a kísérletes autoimmun encephalomyelitis tüneteit, megakadályozták a pristin indukált arthritis kialakulását és csökkentették az experimentális autoimmun diabetes incidenciáját arra hajlamos (DP-BB/W) törzsekben. A Kv1.3 csatornát gátló toxinok ugyanakkor az eddigi vizsgálatok szerint nem rendelkeznek szisztémás toxicitással, nem mutagének. Mindezek alapján várható a Kv1.3 csatornablokkolók therapiás célú felhasználása autoimmun betegségek esetében (Panyi és *mtsai*, 2004b; Panyi és *mtsai*, 2004c; Chandy és *mtsai*, 2004; Wulff és *mtsai*, 2003a; Beeton és *mtsai*, 2006a).

A Kv1.3 csatornák fentebb vázolt központi szerepe a T sejtek fiziológias és patofiziológias körülmények közötti aktivációjában indokolta a csatorna biofizikai és farmakológiai karakterizálásának a disszertációban foglalt vizsgálatát.

2.6 A Kv1.3 csatornák peptid-típusú gátlószerei

A Kv1.3 csatorna felfedezését követően hamarosan kiderült, hogy a csatorna gátlószerei mind *in vitro*, mind pedig *in vivo* megakadályozzák a T sejt aktivációt, beleértve a

lymphokin szekréciót, sejtproliferációt és a target sejtek elpusztítását (Panyi és mtsai, 1996; Deutsch, 1990; Koo és mtsai, 1997).

Ezen felfedezések nyomán intenzív kutatások indultak meg specifikus és nagy affinitású Kv1.3 blokkolók felfedezésére. Számos Kv1.3 csatornagátlószert állítottak elő állatok, elsősorban skorpiók mérgeanyagából (Leonard és mtsai, 1992; Price és mtsai, 1989). Más kutatócsoportokkal párhuzamosan a mi laborunk is több nagy affinitású Kv1.3 és IKCa1 csatornablokkoló vegyületet állított elő skorpiómérgekből (Péter és mtsai, 1998; Péter és mtsai, 2000; Péter és mtsai, 2001; Batista és mtsai, 2002; Bagdany és mtsai, 2005). Az 1. táblázatban a néhány Kv1.3 és IKCa1 csatornákra blokkoló peptidtoxint és azok legfontosabb tulajdosságait foglaltuk össze.

toxin	Kv1.3 K_d	IKCa1 K_d	referencia
Charybdotoxin (ChTx)	3 nM	5 nM	(Grissmer és mtsai, 1993)
Noxiustoxin (NxTx)	1 nM	>> 100 nM	(Leonard és mtsai, 1992)
Margatoxin (MgTx)	50 pM	>> 5 nM	(Leonard és mtsai, 1992)
<i>Pandinus Imperator</i> toxin 1 (Pi1)	11 nM	-	(Péter és mtsai, 2000)
<i>Pandinus Imperator</i> toxin 2 (Pi2)	44 pM	-	(Péter és mtsai, 1998)
<i>Pandinus Imperator</i> toxin3 (Pi3)	795 pM	-	(Péter és mtsai, 2001)
<i>Tityus cambridgei</i> toxin 32 (Tc32)	10 nM	-	(Batista és mtsai, 2002)
<i>Stichodactyla hel.</i> toxin (ShK)	11 pM	30 nM	(Kalman és mtsai, 1998)
módosított ShK toxin (Shk-Dap ²²)	52 pM	2.6 μ M	(Kalman és mtsai, 1998)
Anuroctoxin (AnTx)	730 pM	>> 10 nM	(Bagdany és mtsai, 2005)
módosított ShK toxin (Shk-L5)	69 pM	115 nM	(Beeton és mtsai, 2005)

1. táblázat Néhány peptid toxin Kv1.3 és IKCa1 csatornákra vonatkozó egyensúlyi disszociációs állandója (K_d)

A különböző skorpiók mérgeből előállított K^+ csatorna toxinok 30-40 vagy 60-70 aminosavból állnak, amelyeket 3 vagy 4 diszulfid híd stabilizál. Az elsődleges szerkezet homológiája alapján a skorpiótoxinokat 23 alcsoportba sorolták be, amelyek összesen 120 különböző peptidet tartalmaznak (Rodriguez de la Vega és Possani, 2004). A csatornablokkoló skorpiótoxinok felfedezése a csatornák szerkezetének megismerése szempontjából is nagy jelentőségű, ugyanis a relatíve kis méretük és merev struktúrájuk miatt NMR módszerrel ezek szerkezete pontosan meghatározható. Mivel a toxinok a csatorna pórusának extracelluláris bejáratába kötődnek és pórusblokkolóként zárják el a K^+ ionok áramlását, az ismert struktúrájú inhibitor molekulák szerkezetéből logikus következtetéseket lehet levonni az általuk lezárt pórus molekuláris szerkezetére (Gross és Miller, 1996). Ilyen számítások alapján sikerült először meghatározni a Kv1.3 és más Kv csatornák pórusszerkezetét. A K^+ csatornák pórusa röntgen-krisztallográfiás szerkezetének megismeréséig a toxinokkal történő kölcsönhatás alapján kapott pórusszerkezet volt az

irányadó (Kalman és mtsai, 1998; Aiyar és mtsai, 1995; Garcia és mtsai, 2001). A Kv1.3-hoz hasonló bakteriális eredetű KcsA csatorna kristályszerkezetének meghatározásával ugyanakkor a csatorna-toxin kötődés molekuláris szintű modellezése is lehetővé vált (Doyle és mtsai, 1998). Az így nyert adatok alapján lehetővé vált a toxin és az ioncsatorna kölcsönhatását befolyásoló tényezők meghatározása is (Giangiacomo és mtsai, 2004; Panyi és mtsai, 2006).

A toxinok csatornához való kötődésében az S5 és az S6 hélix közötti hurok S5-höz közeli ún. „turret” régiója valamint a pórus szelektivitási filterében elhelyezkedő aminosavak oldalláncai a legfontosabbak, ezek szerepelnek a toxinok receptoraként. A toxinok K⁺ csatornák gátlásáért felelős aminosavoldalláncai a referenciaként választott, a ChTx 27-es pozíciójának megfelelő helyen lévő lizin, ill. a ChTx 36-os pozíciónak megfelelően elhelyezkedő aromás aminosav, amelynek aromás gyűrűje ~7 Å távolságra helyezkedik el a centrális lizin α szénatomjától. E két aminosav-oldallancot „esszenciális diád”-nak is nevezzük (Tytgat és mtsai, 1999; Dauplais és mtsai, 1997). A toxin-csatorna kötődésben fontos szerepet játszik az ún. sztérikus kölcsönhatás, mely az aminosav-oldallancok méretével arányos hatást gyakorol a toxin-receptor komplex stabilitására. Az aminosav-oldallanc méretének növelése a disszociációs sebességi állandó növekedését eredményezi az asszociációs sebességi állandó lényeges változása nélkül (Goldstein és mtsai, 1994). A csatornapórus és a toxinok között rövid és hosszú távú elektrosztatikus kölcsönhatások alakulnak ki, amelyek a toxin-csatorna kötődés különböző fázisaiban lépnek fel. A toxin csatornához való kötődése két lépésre bontható, először egy aktivációs komplex alakul ki, majd létrejön a kötött toxin-csatorna állapot (Escobar és mtsai, 1993). Amíg az aktivációs komplex kialakulásában a nagytávolságú elektrosztatikus kölcsönhatások, a toxin-csatorna komplex kialakulásában a rövid hatótávolságú elektrosztatikus kölcsönhatások játszanak szerepet. A hosszú távú, nem-specifikus elektrosztatikus kölcsönhatások az oldat ionerősségének emelésével jelentősen csökkenthetőek (Peter és mtsai, 2001), a specifikus elektrosztatikus kölcsönhatások viszont a csatornapórus és a toxin komplementer mutagenézisével vizsgálhatóak. Ilyen módon határozták meg a toxin-csatorna kötődés szempontjából kritikus aminosav-oldallanc párokat is (Aiyar és mtsai, 1995; Rauer és mtsai, 2000).

A K⁺ csatorna blokkolók kutatása terén történt jelentős előrehaladás ellenére továbbra is sok laboratórium foglalkozik világszerte a jelenleginél hatékonyabb, specifikus peptid és nem-peptid típusú csatornablokkoló vegyületek előállításával. Az ilyen irányú kutatásokat erősen motiválja a gyógyszergyárak részéről fennálló érdeklődés minimális mellékhatással rendelkező, immunszuppresszív terápiában alkalmazható csatornablokkoló vegyületek iránt. Ezek alapján indokoltnak láttuk új Kv1.3 gátló skorpiótoxinok keresését, illetve az általunk felfedezett skorpiótoxinok csatornaspecificitásának vizsgálatát.

3 CÉLKITŰZÉSEK

1. A *Shaker* családba tartozó K^+ csatornák inaktivációjának sebességét befolyásolja az extracelluláris tér ionösszetétele, ezen belül is az extracelluláris pH. Amíg minden eddig vizsgált rokon K^+ csatorna esetén az inaktivációs kinetika gyorsulása figyelhető meg a pH csökkenésekor, addig a Kv1.3 csatorna esetében lassul a C-típusú inaktiváció. Kísérleteink során azt kívántuk meghatározni, hogy a Kv1.3 csatornák inaktivációját milyen molekuláris mechanizmuson keresztül lassítja az extracelluláris pH csökkentése.
2. A Kv1.3 csatorna specifikus, nagy affinitású gátlószereinek szelektív immunszuppressziót okozó hatása kilátásba helyezi azok therápiás célú felhasználását különböző autoimmun betegségekben. Ennek megfelelően a specifikus, nagy affinitású, minimális mellékhatással rendelkező, therápiás célra is alkalmazható csatornablokkoló vegyületek iránti igény indokolta új Kv1.3 csatorna gátlószerek keresését. Kísérleteink során vizsgáltuk a *Centruroides elegans* skorpió mérgéből izolált peptidek (Ce1-5) Kv1.3 csatornákra gyakorolt hatását és a blokkoló hatás specifikusságát.

4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Humán perifériás vérből izolált lymphocyták

A mononukleáris sejteket Ficoll gradiens centrifugálással nyertük heparinózott humán vérből. A vért egészséges donoroktól nyertük, a lymphocytákat frissen használtuk vagy tenyésztettük. Az utóbbi esetben a sejteket kétszer mostuk Ca^{2+} és Mg^{2+} mentes Hanks' oldattal, mely 25 mM HEPES-t is tartalmazott (pH: 7,4). A sejteket $0,5 \times 10^6/\text{ml}$ koncentrációban 3-4 napig inkubáltuk 5% CO_2 mellett 37°C -on 24 lyukú tenyésztőedényekben. RPMI-1640 médiumot használtunk, mely tartalmazott 10% fetális borjú savót (Hyclone, Logan, Utah), 100 IU/l penicillint, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycint és 2 mM L-glutamint. A tenyésztő médiumhoz különböző koncentrációjú (2,5, 5, 7,5 és 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) phytohemagglutinint (PHA-P, Sigma-Aldrich Kft, Hungary) adtunk a K^+ csatorna expresszió növelése érdekében (Deutsch és *mtsai*, 1986).

4.2 CTLL-2 sejtek tenyésztése és transzfekciója

Az endogén feszültségfüggő K^+ csatornákkal nem rendelkező egér cytotoxikus sejteket [CTLL-2, (Deutsch és Chen, 1993)] folyamatos kultúrában, 10% fetális borjú savót, 2 mM Na-piruvátot, 10 mM HEPES-t, 4 mM L-glutamint, 50 μM 2-merkaptóetanolt, és 100 CU/ml IL-2-t tartalmazó RPMI-1640 tápfolyadékban, párásított széndioxid termosztátban (37°C , 5% CO_2) tenyésztettük. A CTLL-2 sejteket elektroporációval két különböző proteint kódoló DNS plazmiddal ko-transzfektáltuk, melyek közül az egyik egy sejt felszíni marker molekulát kódolt (humán CD4, Ccd4neo plazmid), a másik pedig az ioncsatorna alegység kódolásáért felelős DNS szekvenciát tartalmazta (pRc/CMV/Kv1.3 WT, Dr. Carol Deutsch, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA ajándéka; ill. a 399-es pozícióban különböző mutációkat tartalmazó pRc/CMV/Kv1.3_H399X) (Deutsch és Chen, 1993). A sejt felszíni markert expresszáló sejtek jó ko-transzfekciós hatásfoka a plazmidok moláris arányának helyes beállításával volt elérhető (1:5 = felszíni marker : csatorna alegység). A sejteket centrifugálást követően 2×10^7 sejt/ml koncentrációban vettük fel Hanks'-20 mM HEPES oldatban, és a megfelelő plazmid DNS sejtekhez adását követően a sejt szuszpenziót 4 mm réssel rendelkező elektroporátor küvettába helyeztük és a mintákat 10 percig jégen

inkubáltuk. Az elektroporációt BTX ECM 600 típusú elektroporátorral végeztük 725 V/cm elektromos térerősség mellett, a kisülés időállandója ~24-25 ms volt. Ezt követően a mintát újabb 10 percre jégre helyeztük, majd a sejteket a küvetákból tápfolyadékba helyezés után 8-72 órán keresztül tenyésztettük. A sejtek életképessége a transzfekeciót követő 24 óra múlva ~50 % volt.

4.3 HEK 293 sejtek tenyésztése és transzfekeciója

A HEK 293 sejteket 10% fetális borjú savót (FCS-t) tartalmazó DMEM-ben tenyésztettük párasított széndioxid termosztátban (37°C, 5% CO₂). A sejteket Ca-foszfát precipitációs módszerrel ko-transzfekektáltuk hCD4 sejt felszíni markert ill. patkány Kv2.1 csatornát (Dr. S. Korn, U. of Connecticut ajándéka) vagy Shaker IR csatornát (Dr. G. Yellen, Harvard Medical School ajándéka) kódoló plazmidokkal. A CD4 pozitív sejtek jó ko-transzfekeciós hatásfokát úgy biztosítottuk, hogy a csatornakódoló plazmidot 5-10-szeres feleslegben alkalmaztuk a CD4-et kódoló plazmidhoz képest. A transzfekektált sejteket 72 órán keresztül tenyésztettük.

4.4 Molekuláris biológia

A Kv1.3 csatorna H399X pontmutációit a QuickChange PCR mutagenzis kit (Stratagene, La Jolla CA) felhasználásával végeztük. Templátként a vad típusú Kv1.3 csatornát kódoló pRc/CMV/Kv1.3 WT plazmidot használtuk. Az oligonukleotid primerek hossza 35 bp volt, a tervezett mutációra szimmetrikusan. A mutációk helyességét szekvencia analízissel ellenőriztük.

4.5 Monoklonális antitest adhéziós módszer

Elektrofiziológiai mérésekhez (patch-clamp) a T sejteket szelektív antitest adhézióval szeparáltuk Matteson és Deutsch módszerével (Matteson és Deutsch, 1984). A tenyésztés végén nyert sejtuszpenziót egér-anti-humán CD2 IgG-vel (Beckton-Dickinson, San Jose,

CA), egy specifikus T lymphocytá ellenes antitesttel jelöltük meg. Az így megjelölt sejteket 22 percig inkubáltuk jégen egy olyan Petri csészében, melynek az aljára kecskében termelt egér IgG ellenes antitesteket adszorbeáltunk. Az inkubálás után a Petri csészét ötször 1 ml normál extracelluláris oldattal körkörös mozdulatokkal mostuk, így az elsődleges antitesttel nem jelölt sejteket eltávolítottuk, míg a kitapadt anti-humán CD2-vel jelzett T lymphocyták a Petri csészében maradtak. Hasonló eljárással választottuk ki a sikeresen transzfektált, CD4 sejtfelszíni markert expresszáló CTLL-2 és HEK 293 sejteket is. Ezekben az esetekben elsődleges antitestként természetesen egér-anti-humán CD4 IgG-t használtunk.

4.6 Skorpió toxinok preparálása

A *Centruroides elegans* toxinok preparálása során a teljes venomot a skorpióktól elektromos stimulációval nyertük. A felhasznált toxinok tisztítása kromatográfiás eljárással történt. A skorpióméreg oldható frakcióit először Sephadex G-50-nel töltött oszlopon szeparáltuk. A II. számú frakciót, amely az aktív peptid komponenseket tartalmazta, carboxymethyl-cellulózt tartalmazó oszlopon ioncserélő kromatográfiával tisztítottuk tovább. Az így nyert szubfrakciók közül a 9-11-es szubfrakciókat (II-9, II-10 és II-11, mivel a Sephadex G-50 oszlopon nyert II. frakció elválasztása során nyertük őket) nagynyomású folyadék kromatográfiával többlépésben szubfrakciókra bontottuk analitikai C4 reverz-fázis Vydac oszlopon (Hisperia, CA, USA). Az így nyert szubfrakciók közül 5 (Ce1-5) teljes karakterizálása történt meg. A tisztított peptid toxinok molekulatömegét tömegspektrométer (Finnigan LCQ^{DUO}, San Jose, CA, USA), szekvenciáját pedig automatikus ProSequencer készülék (Millipore, USA) segítségével határoztuk meg (Valdez-Cruz et al., 2004; Batsta et al., 2004). A toxinok izolálását és a szekvencia analízist kollaborációs partnerünk (Dr. Possani, Cuernavaca, Mexikó) laboratóriumában végezték.

4.7 Patch-clamp

Az értekezés eredményeit szolgáltató kísérletes munka nagy része a Hamill, Marty, Neher, Sakmann és Sigworth által 1981-ben bevezetett patch-clamp technikán alapul (Hamill és *mtsai*, 1981).

Méréseinket a patch-clamp technika teljes-sejt (whole-cell) konfigurációjában végeztük. A mérések a teljes-sejt konfiguráció elérése után 5-10 perc múlva kezdődtek. A méréseket minden esetben szobahőmérsékleten (22-25 °C) végeztük.

A pipettákat GC 150 F-15 boroszilikát (Clark) üvegapillárisokból húztuk öt fázisban, majd hő alkalmazásával políroztuk a pipetták hegyét. A pipetták ellenállása normál extra- és intracelluláris oldat esetén 2-4 M Ω volt.

Méréseinkhez Axopatch 200 és 200A patch-clamp erősítőket használtunk feszültségzár üzemmódban (Hamill és mtsai, 1981). Ez azt jelenti, hogy a vizsgált sejt membránpotenciálját konstans értéken tartjuk, miközben a sejtmembránon átfolyó áram nagyságát meghatározzuk. Az ingerlő feszültség-impulzusokat és az adatgyűjtést IBM kompatibilis személyi számítógép vezérelte Labmaster TL-1 illetve Digidata 1200 illesztőegységen keresztül a pCLAMP programcsomag segítségével (6.0 és 8.0 verziók). Méréseink során szükség esetén soros ellenállás kompenzációt alkalmaztunk egészen 85 %-ig a soros ellenálláson eső hiba korrekációjának érdekében, így a feszültséghibát minden esetben 5 mV alá csökkentettük.

Az áramgörbéket 4 pólusú Bessel szűrővel szűrőztük. A mintavételezés frekvenciája a szűrők sarokfrekvenciájának legalább kétszerese volt, a Nyquist teória értelmében.

4.8 Oldatok

A pipettaoldat összetétele a legtöbb esetben (mM-ban): 140 KF, 11 K₂EGTA, 1 CaCl₂, 2 MgCl₂, és 10 HEPES (pH 7,20, 295 mOsm) volt. A normál extracelluláris oldat (S-ECS) összetétele (mM-ban): 145 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 2,5 CaCl₂, 5,5 glükóz, 10 HEPES (pH 7,35, 305 mOsm) volt. A magas ionerősségű (HIS) oldat összetétele (mM-ban) 10 NaCl, 5 KCl, 96,25 MgCl₂, 2,5 CaCl₂, 5,5 glükóz, 10 HEPES (pH 7,35, ~320 mOsm). Az alacsony pH-jú extraceluláris oldat esetén HEPES helyett MES-t alkalmaztunk pH pufferként. A különböző tetraetil-ammónium-Cl (TEA) oldatokat és BaCl₂ oldatokat úgy készítettük, hogy a NaCl-ot azonos koncentrációban helyettesítettük ezekkel az anyagokkal. A magas K⁺ koncentrációjú külső oldatokban [20, 40 vagy 150 mM K⁺ (20 mM K-ECS, 40 mM K-ECS ill. K-ECS)] a NaCl-ot részben vagy egészben KCl-dal helyettesítettük. Az alacsony [K⁺]_i hatásának tesztelésékor a pipettaoldatban a KF-ot részben NaF-dal helyettesítettük (5 mM K⁺ végkoncentráció). Az IKCa1 csatornák áramának mérése során alkalmazott pipettatöltő folyadék összetétele a következő volt: 150 K-aszpartát, 5 HEPES, 10 EGTA, 8,7 CaCl₂, 2

MgCl₂, (pH 7,2, 295 mOsm), ami 1 μM szabad Ca²⁺ koncentrációt eredményezett. A peptid toxin tartalmú külső oldatokat 0,1 mg/ml borjú szérum albuminnal (BSA) egészítettük ki, hogy megakadályozzuk a toxinok nem specifikus kötődését a Petri edényhez és a perfúziós rendszer műanyag csöveihez.

Az oldatok cseréjét a sejtek környezetében PE10-es polietilén csövekből épített perfúziós rendszer segítségével biztosítottuk. A perfúziós fejet a vizsgált sejt közvetlen közelébe helyeztük el a sejttől kevesebb, mint 0,5 mm-re. Először mindig a kontroll oldattal perfundáltunk, majd pedig a megfelelő tesztvegyületet tartalmazó oldattal. A blokkolási kinetika vizsgálatánál számítógép által vezérelt mágnesszelepes rendszerrel biztosítottuk a mérőszoftver és az oldatcsere szinkronizálását. A referencia elektródát agar híd segítségével kapcsoltuk a mérőedényhez, hogy az oldatcserékből adódó elektróda potenciálhibákat kiküszöböljük.

4.9 Adatok kiértékelése

A mérések során nyert áramgörbéket a kiértékelés kezdetén szoftveresen korigáltuk ohmikus szivárgási áramra, amennyiben ennek nagysága nem volt elhanyagolható. A görbéket digitálisan szűrőztük három pontos boxcar módszerrel.

A mért pontokhoz az egyes függvények illesztését a Marquardt-Levenberg algoritmus segítségével végeztük. Az illesztéseket a mért és számított adatpontok közötti különbségek négyzetének összegével jellemeztük.

A kísérleteink során kapott adatok statisztikai összehasonlítását önkontrollos ill. kétmintás t-próbával, vagy varianciaanalízissel (One-Way ANOVA) végeztük el, p = 0,05 szignifikanciaszint mellett. A varianciaanalízis kiegészítésére a Dunnett tesztet vagy a Bonferroni t-tesztet alkalmaztuk annak megfelelően, hogy kontroll csoporthoz képesti vagy pedig páronkénti összehasonlítás történt. A mérési adatoknál az átlagértéket és annak közepes hibáját (SEM) adtuk meg legalább n=4 esetén.

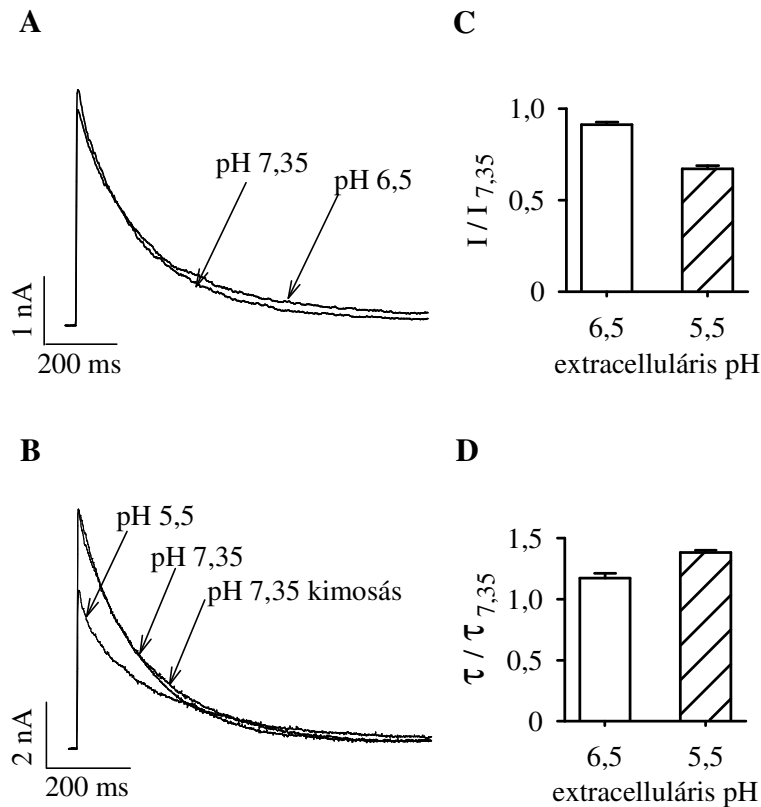
5 EREDMÉNYEK

5.1 A Kv1.3 csatornák inaktivációjának pH-függő szabályozása: a His399 szerepe

5.1.1 A Kv1.3 inaktivációja lassul alacsony pH_o mellett

A Kv1.3 inaktivációjának pH_o-függő változásait humán perifériás vérből izolált T lymphocytákon mutatták ki, ahol a Kv1.3 natív körülmények között expresszálódik (Deutsch és Lee, 1989). A mutáns ioncsatornák tervezett vizsgálata szükségessé tette a csatornák heterológ expressziós rendszerben történő kifejezését, és a már korábban ismert eredmények megerősítését a CTLL-2 sejtekben kifejezett Kv1.3 csatornákon.

A 5. ábra A és B panelje teljes-sejt Kv1.3 áramokat mutat normál extracelluláris pH (pH_o=7,35), pH_o=6,5 és pH_o=5,5 mellett. Az áramgörbéken megfigyelhető, hogy pH_o=5,5 mellett az inaktivációs kinetika jelentős lassulása következik be, ami a csúcsáram redukciójával jár együtt, míg pH_o=6,5 mellett a változások jóval kisebbek. Az inaktivációs kinetikát az inaktivációs időállandóval (τ) jellemeztük, mely az áramgörbe leszálló szárához illesztett, egy exponenciális tagot tartalmazó függvény jellemző paramétere ($I=A \times e^{-t/\tau} + C$, ahol I az aktuális áramerősség, C az egyensúlyi (steady-state) áram nagysága, A az inaktiválódó komponens amplitúdója, t pedig az illesztés kezdetétől számított aktuális idő). A τ sejtenkénti variabilitásának kiküszöbölése érdekében önkontrollos kísérleteket végeztünk. Mivel a kontroll oldattal történő perfúzió során az inaktivációs kinetika gyorsulását tapasztaltuk, kontrollként a kezelés előtt és a kontrolloldattal történő visszamosást követően mért τ értékek átlagát vettük és ehhez hasonlítottuk a kezelés során mért τ értékeket. Amennyiben a sejtet pH=6,5 extracelluláris oldattal perfundáltuk, az áramamplitúdó a kontroll érték $91,2 \pm 1,4$ %-ára csökkent ($n=7$, $p<0.001$), míg az inaktivációs időállandó a kontroll $117,2 \pm 3,9$ %-ára ($n=7$, $p<0,001$; pH=7,35: $\tau= 167 \pm 20$ ms; pH=6,5: $\tau= 184 \pm 25$ ms) növekedett. Az extracelluláris pH 5,5-re való csökkentése az áramamplitúdó további csökkenését és az inaktiváció további lassulását eredményezte. Az áramamplitúdó a kontroll (pH_o=7,35-n mért) érték $67,1 \pm 1,8$ %-ára csökkent ($n=5$, $p<0,001$), míg az inaktivációs időállandó a kontroll $138,1 \pm 1,9$ %-ára ($n=5$, $p<0,001$; pH= 7,35: $\tau= 167 \pm 20$ ms; pH 5,5: $\tau= 198 \pm 23$ ms) növekedett. Az áramamplitúdó és az inaktivációs időállandó kontrollhoz képesti változását a 5. ábra C és D panelje mutatja be.



5. ábra Az extracelluláris pH csökkentése reverzibilisen lassítja a Kv1.3 csatornák áramának inaktivációját és csökkenti az áramamplitúdót

(A) Vad típusú Kv1.3 csatornákat expresszáló CTLL-2 sejten 2 s hosszú depolarizáló impulzusok alatt kontroll körülmények között (pH=7,35), valamint pH=6,5 esetén mért teljes-sejt áramok. A tartófeszültség -120 mV volt, +50 mV-os tesztimpulzusokat alkalmaztunk, és 60 s volt az egyes depolarizáló impulzusok között eltelt idő. Az inaktivációs időállandó rendre 186 ms ill. 210 ms volt pH=7,35 ill. pH=6,5 esetén. A kimosás után mért áramgörbét a jobb láthatóság kedvéért nem ábrázoltuk. (B) A sejtet S-ECS pH=7,35 ill. S-ECS pH=5,5 oldatokkal perfundáltuk. Az inaktivációs időállandók 197 ms (pH=7,35, kontroll), 233 ms (pH=5,5) és 172 ms (pH=7,35, kimosás) voltak. (C) A kezelés hatására mért áramamplitúdó (I) és a pH=7,35 mellett mért áramamplitúdó ($I_{7,35}$) hányadosa pH=6,5 (üres oszlopok), és pH=5,5 esetén (sátirozott oszlopok). A hibajelek a középérték közepes hibáját mutatják. (D) A kezelés hatására mért inaktivációs időállandó (τ) és a pH=7,35 mellett mért inaktivációs időállandó ($\tau_{7,35}$) hányadosa pH=6,5 (üres oszlopok), és pH=5,5 esetén (sátirozott oszlopok). A hibajelek a középérték közepes hibáját mutatják.

5.1.2 Az extracelluláris pH befolyásolja az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggését

Ismert, hogy az extracelluláris pH csökkentése az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggését (G-V görbe) a pozitívabb membránpotenciálok irányába tolja el a

membránfelszíni töltésáryékolásnak köszönhetően. A jelenséget Kv1.3 csatornákra vonatkozóan a 6A ábra mutatja. A különböző sejteken mért G-V összefüggések összehasonlíthatóságához a különböző tesztfeszültségeken mért csúcskonduktanciákat a maximális teljes sejt K⁺ konduktanciára normáltuk ($G_{norm}=G_K/G_{max}$) majd az adott tesztpotenciálhoz tartozó, de különböző sejteken felvett G_{norm} értékeket átlagoltuk. Az így kapott normált és tesztpotenciálként átlagolt teljes sejt konduktancia – tesztpotenciál összefüggéshez Boltzmann függvényt illesztettünk:

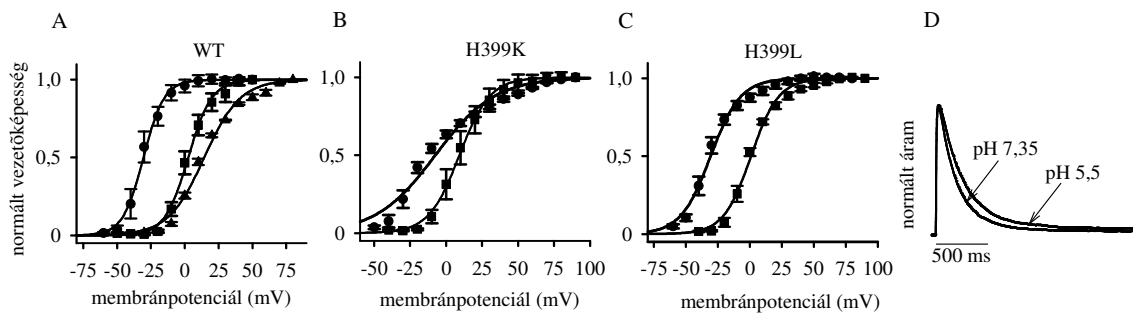
$$G_{norm} = \frac{1}{1 + e^{-\frac{V-V_{1/2}}{s}}}$$

ahol az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggését a félaktivációs feszültség ($V_{1/2}$) és a meredekség (s) illesztett paraméterek jellemezik. Az ábra világosan mutatja, hogy az extracelluláris pH csökkentése ($pH_0=5,5$) a $V_{1/2}$ érték pozitív membránpotenciálok irányába való mintegy 30 mV-os eltolódását okozza a görbe meredekségének változatlan volta mellett. Az eredmények statisztikai analíziséhez a $V_{1/2}$ és s értékeket az egyes sejtekről különböző pH_0 mellett felvett G_{norm} -V összefüggésekhez legjobban illeszkedő Boltzmann függvények paramétereiként kaptuk meg, majd az azonos körülmények között kapott értékeket átlagoltuk (2. táblázat). Az így nyert adatokon elvégzett statisztikai analízis azt mutatta, hogy a pH_0 csökkentése $pH_0=6,5$ és $pH_0=5,5$ -re a $V_{1/2}$ értékek depolarizáció irányába való szignifikáns eltolódását eredményezte ($p<0,001$, ANOVA, 2. táblázat), míg az s értékek a három vizsgált pH_0 esetén statisztikailag nem különböztek ($p<0,72$, ANOVA, 2. táblázat).

Az alacsony pH_0 miatti töltésáryékolás és a G_{norm} -V görbék pozitív membránpotenciálok irányába történő eltolódása az aktiváció sebességét is befolyásolja, hiszen a csatorna nyitási kinetikáját szabályozó feszültség érzékelőre a töltésáryékolás miatt kisebb effektív membránpotenciál hat, s így azonos tesztpotenciálok mellett az alacsony pH_0 -jú oldatban az áram aktivációs kinetikája lassabb.

Mivel az aktiváció és inaktiváció kapcsolt folyamatok (Marom és Abbott, 1994), az alacsony pH_0 mellett mért lassabb inaktivációs kinetika elvileg a lassabb aktivációs kinetika eredménye is lehet. Annak érdekében, hogy kizárjuk ennek a lehetőségét, a különböző pH_0 -kon mért $V_{1/2}$ értékeknek megfelelő tesztfeszültségeken hasonlítottuk össze az inaktivációs kinetikát. A $V_{1/2}$ -nek megfelelő tesztpotenciál biztosítja, hogy a teljes sejt áram a pH_0 -tól függetlenül az azonos nyitási valószínűséghez tartozó aktivációs kinetikát mutassa, azaz a töltésáryékolás aktivációs kinetikát befolyásoló hatását ezzel kiküszöbölhetjük, és az inaktivációs kinetikákat így azonos aktivációs kinetika mellett vizsgálhatjuk. A 6D ábra a

pH_o=7,35 mellett -27 mV-os és a pH_o=5,5 oldatban +4 mV-os tesztpotenciálokra mért normált áramokat mutatja be. Látható, hogy az alacsony pH_o-n mért inaktivációs kinetika lassabb, az inaktivációs időállandó a kontroll érték 136 ± 8 %-ára növekedett (n=4, p<0,022; pH_o 7,35: τ= 166 ± 27 ms; pH_o 5,5: τ= 207 ± 36 ms), amely a +50 mV-os tesztpotenciálon mért értékekhez hasonló eredmény. Hasonló eredményeket kaptunk pH=6,5 esetén is. Ennek megfelelően tehát az inaktivációs kinetikának az extracelluláris pH_o csökkentésekor mért változása az inaktivációra gyakorolt közvetlen hatás eredménye, nem pedig a lassabb aktivációs kinetika következménye.



6. ábra Az extracelluláris pH csökkentése megváltoztatja az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggését a vad típusú (WT) valamint a H399K és H399L mutáns csatornák esetén

A normált vezetőképesség és a tesztpotenciál összefüggése (G-V görbék) a vad típusú (A), a H399K (B) és a H399L (C) mutáns csatornák esetén pH= 7,35 (●) és pH=5,5 (■) esetén. A WT csatornák esetén a magas ionerősségű oldatban (HIS) pH=7,35-n mért adatokat is bemutatjuk (▲). A G-V görbéket az I-V (áram-feszültség) görbékből nyertük, ennek érdekében előbb meghatároztuk a megfordítási potenciált és ennek ismeretében az ionokra ható hajtóerőt. A teljes sejt K⁺ konduktanciát az áramamplitúdó és az elektromos hajtóerő hányadosaként kapjuk, és ennek G_{max}-ra (lásd a szöveget) való normálása adja a membránpotenciál függő kapuzást ténylegesen jellemző nyitási valószínűséget. Az I-V görbék meghatározásához a sejtet a megfelelő pH-jú oldattal való perfúzió mellett -120 mV-ról -70 mV és 50 mV között 10 mV-os lépésekben különböző feszültségekre depolarizáltuk. Az egyes tesztimpulzusok között 60 s telt el. Az adatpontokra Boltzmann függvényt illesztettünk, a kapott görbéket a félaktivációs feszültséggel (V_{1/2}) valamint a meredekséggel (s) jellemeztük (az értékeket lásd az 2. táblázatban). (D): vad típusú Kv1.3 csatornák expresszálo CTLL-2 sejtek áramai, amennyiben a sejtet pH=7.35 és pH=5.5 esetén az 50%-os nyitási valószínűségnek megfelelő feszültségre depolarizáltuk. Az egyes pH-kon alkalmazott tesztpotenciálokra a G-V görbék alapján határoztuk meg, pH=7.,5-n -27 mV-os, míg pH=5,5-n +4 mV-os tesztimpulzust kellett alkalmaznunk, hogy a csatornák nyitási valószínűsége azonos legyen. Az inaktivációs időállandó rendre 184 és 234 ms volt pH=7,35 és 5,5 esetén.

csatorna	pH=7,35		pH=6,5		pH=5,5	
	$V_{1/2}$ (mV)	s (mV)	$V_{1/2}$ (mV)	s (mV)	$V_{1/2}$ (mV)	s (mV)
WT	$-33,6 \pm 2,6$	$6,2 \pm 0,9$	$-20,1 \pm 2,8$	$7,0 \pm 0,8$	$-1,5 \pm 1,6$	$6,4 \pm 0,3$
H399K	$-7,8 \pm 2,9$	$20,5 \pm 1,1$			$9,7 \pm 5,1$	$10,3 \pm 1,2$
H399R	$-17,6 \pm 5,6$	$20,1 \pm 3,8$			$6,4 \pm 1,8$	$13,2 \pm 0,5$
H399L	$-30,5 \pm 2,4$	$11,4 \pm 0,9$			$0,9 \pm 1,2$	$10,7 \pm 1,1$
H399V	$-34,0 \pm 1,8$	$9,1 \pm 0,6$			$-0,0$ (n=1)	$6,7$ (n=1)
H399Y	$-28,2 \pm 2,3$	$10,0 \pm 0,7$			$7,2 \pm 2,8$	$8,2 \pm 0,6$

2. táblázat Vad típusú és mutáns Kv1.3 csatornák különböző pH_o-n mért egyensúlyi aktivációját (G-V görbe) jellemző paraméterek

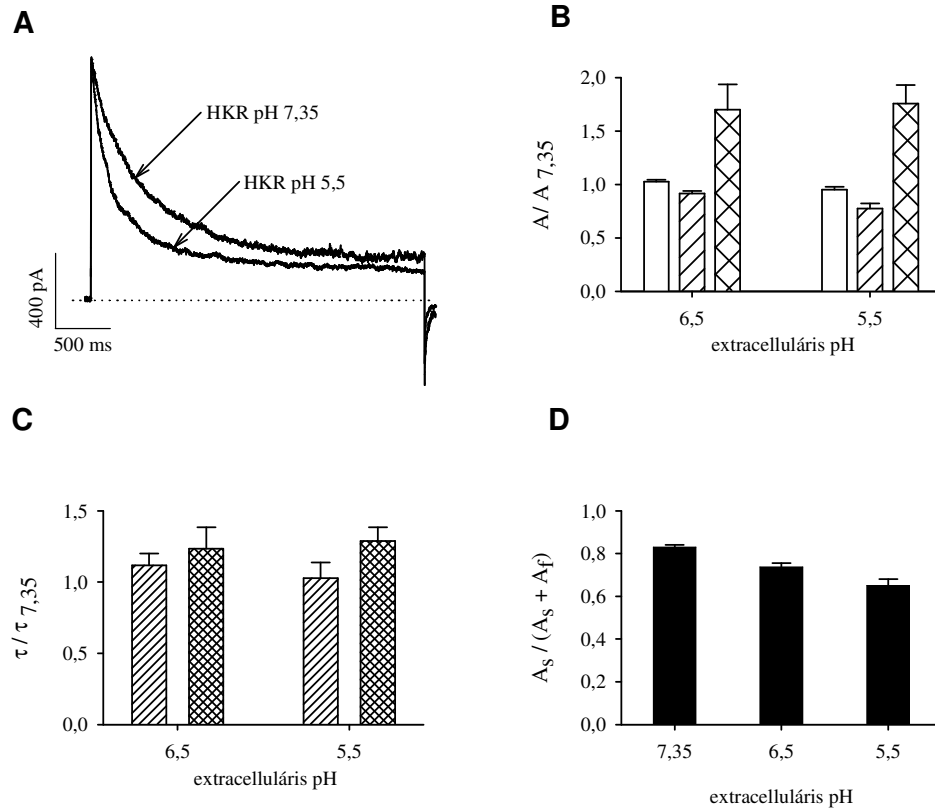
A G-V görbékhez illesztett Boltzmann függvényeket jellemző paramétereket ($V_{1/2}$ és s) adtuk meg mV-ban. A feltüntetett értékek az átlagértéket és annak közepes hibáját (SEM) jelentik. A független kísérletek száma 2-7 volt a H399V pH=5,5 esetét kivéve, ahol 1 mérés történt.

5.1.3 Magas extracelluláris [K⁺] mellett a pH_o csökkentése gyorsítja az inaktivációt

Az extracelluláris [K⁺] növelése a legtöbb káliumcsatorna esetén az inaktivációs kinetika lassulását eredményezi a csatorna extracelluláris szájadékkában elhelyezkedő, az inaktiváció szempontjából kritikus káliumkötőhely telítettségének növelése révén. A Kv1.3 csatornák esetén 140 mM [K⁺]_e mellett az inaktivációs kinetika kétfázisúvá válását észleljük, a mért áramgörbék leszálló szára két exponenciális tagot tartalmazó függvény segítségével illeszthető, az inaktivációs kinetikát a gyors és a lassú komponensek inaktivációs időállandójával, rendre τ_f és τ_s , valamint azok súlyfaktorával, rendre A_f és A_s , lehet jellemezni (7A ábra). Amennyiben a sejtet K-ECS pH=7,35 oldattal perfundáljuk, τ_f alacsonyabb, mint az S-ECS oldatban mért inaktivációs időállandó ($60,5 \pm 3,8$ ms, n=11), míg τ_s annál magasabb értéket vesz fel: 610 ± 46 ms (n=11). A lassan inaktiválódó komponens relatív súlyfaktora magasabb, az $A_s/(A_s + A_f)$ értéke $0,83 \pm 0,01$ (n=11). Összességében K-ECS pH=7,35 oldatban az inaktiváció lassulását tapasztaljuk.

Szemben az S-ECS-ben tapasztaltakkal magas extracelluláris [K⁺] mellett a pH_o csökkentése az inaktiváció gyorsulását eredményezte. Az 7A ábra CTLL-2 sejteken mért teljes-sejt K⁺ áramokat mutat K-ECS pH=7,35 és K-ECS pH=5,5 esetén. Látható, hogy

alacsony pH_o-n az áram inaktivációja gyorsabb. Az inaktivációt két exponenciális tagot tartalmazó függvény segítségével illesztettük és a két exponenciális tagot jellemző amplitúdóértékek és időállandók változását a kontroll (a K-ECS pH=7,35 oldatban mért érték) százalékában fejeztük ki.



7. ábra Az extracelluláris pH hatása a Kv1.3 csatornák inaktivációjára magas $[K^+]_e$ esetén

(A) Kv1.3 csatornákat expresszálok CTLL-2 sejten K-ECS pH=7,35 és K-ECS pH=5,5 oldattal történő perfúzió során regisztrált áramgörbék. A sejtet -120 mV-on tartottuk és 3 másodperc hosszú $+50$ mV-os tesztimpulzusokat alkalmaztunk, az egyes tesztimpulzusok között 60 másodperc telt el. Az áramgörbék leszálló szárát két exponenciális tagot tartalmazó függvény segítségével illesztettük (részleteket lásd a szövegben). Az illesztés során kapott időállandók a következők voltak: pH=7,35: $\tau_s = 506$ ms, $\tau_f = 76$ ms, pH=5,5: $\tau_s = 437$ ms, $\tau_f = 94$ ms. (B) A K-ECS pH=7,35 oldatban mért áramamplitúdók ($A_{7,35}$) és az alacsony pH-jú K-ECS oldatokban mért áramamplitúdók (A) valamint a gyorsan és lassan inaktiválódó áramkomponensek kontroll és alacsony pH-jú oldatokban mért amplitúdóinak hányadosát ábrázoltuk. Az áramamplitúdók változását üres oszlopok, a gyorsan ill. lassan inaktiválódó áramkomponensek változását rendre satírozott ill. keresztsatírozott oszlopok mutatják. A hibajelek a középérték közepes hibáját (SEM) mutatják. (C) A K-ECS pH=7,35 oldatban mért ($\tau_{7,35}$) és az alacsony pH-jú K-ECS oldatokban mért inaktivációs időállandók (τ) hányadosát ábrázoltuk a gyorsan (satírozott oszlopok) és lassan (keresztsatírozott oszlopok) inaktiválódó áramkomponensek esetén. (D) A lassan inaktiválódó áramkomponens súlyfaktora $[A_s / (A_s + A_f)]$ a különböző pH-jú K-ECS oldatokban.

Amennyiben a sejtet K-ECS pH=6,5 oldattal perfundáljuk, a csúcsáram nem változott, a kontroll $102,6 \pm 1,8$ %-ának adódott ($n=7$, $p=0,2$) (7B ábra), és az inaktivációs időállandók értékében sem volt jelentős változás (τ_s : $111,8 \pm 8,4$ % , τ_f : $123,4 \pm 15,0$ % , $n=7$, $p=0,21$ és $0,17$, 7C ábra). A két exponenciális tag amplitúdója ugyanakkor szignifikáns változást mutatott, a lassú komponens amplitúdója (A_s) a kontroll $91,7 \pm 2,2$ %-ára csökkent, míg a gyorsé (A_f) a $pH_o=7,35$ -n mért érték $169,9 \pm 23,7$ %-ára növekedett ($n=7$, $p=0,008$ és $0,026$, 7B ábra). K-ECS pH=5,5 oldattal történő perfúzió esetén a csúcsáram szignifikánsan csökkent a kontroll $94,7 \pm 2,3$ %-ára ($n=10$, $p=0,044$, 7B ábra). A csökkenés jelentősen kisebb, mint S-ECS-ben a pH_o hasonló csökkenésekor. A gyors komponens időállandója (τ_s) nem változott ($102,2 \pm 11,1$ % , $n=10$, $p=0,84$), míg a τ_f a kontroll $127,7 \pm 10,9$ %-ára növekedett ($n=10$, $p=0,024$, 7C ábra). Az egyes komponensek amplitúdó értékei a $pH_o=6,5$ esetén tapasztaltakhoz hasonlóan változtak, A_s a $pH_o=7,35$ -ön mért érték $77,4 \pm 4,6$ %-ára csökkent ($n=10$, $p<0,001$), míg A_f a kontroll $173,7 \pm 17,9$ %-ára növekedett ($n=10$, $p=0,0026$, 7B ábra). A lassan inaktiválódó komponens súlyfaktora szignifikánsan csökkent az extracelluláris pH csökkentésének hatására, a $A_s/(A_s + A_f)$ hányados értéke $pH_o=6,5$ esetén $0,74 \pm 0,02$ ($n=7$), $pH_o=5,5$ esetén pedig $0,65 \pm 0,03$ ($n=9$) volt (7D ábra). Az inaktivációs kinetika gyorsulása tehát elsősorban a lassan inaktiválódó komponens súlyfaktorának csökkenésével magyarázható az inaktivációt jellemző időállandók viszonylagos állandósága mellett.

5.1.4 40 mM $[K^+]_e$ esetén a pH_o csökkentése nem változtatja meg az inaktiváció sebességét

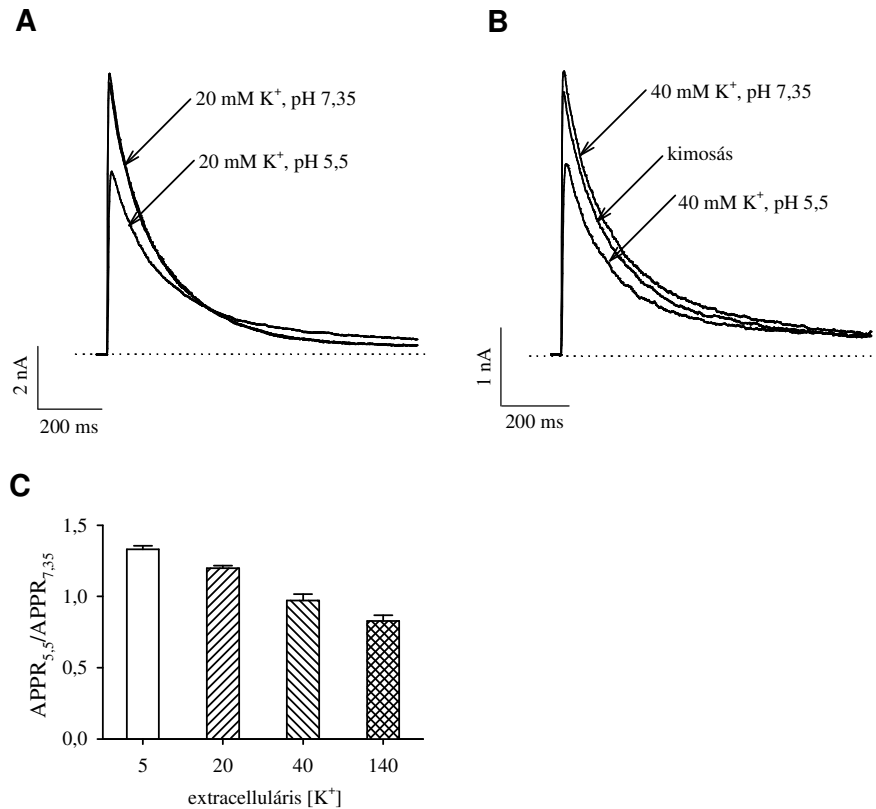
Mivel az extracelluláris pH csökkentése 5mM és 150 mM $[K^+]_e$ esetén ellentétes módon befolyásolta az inaktiváció sebességét, köztes $[K^+]_e$ -k, nevezetesen 20 mM és 40 mM esetén is elvégeztük a kísérletet (8A és 8B ábra). Ezen esetekben az áramgörbe leszálló szára sem egy, sem pedig két exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel nem volt illeszthető megbízhatóan, ezért az inaktiváció jellemzésére egy alternatív módszert kellett választanunk. Ennek lényege a következő: első lépésben kiszámoltuk a szivárgási (ún. leak) áramra korrigált áramgörbék görbe alatti területét, majd kivontuk belőle a nem inaktiválódó áramhányadnak megfelelő területet, így megkaptuk az inaktiválódó áramhányadnak megfelelő görbe alatti területet. Ennek és az inaktiválódó áramhányad amplitúdójának a hányadosa egy idő dimenziójú mennyiséget ad, amely egyfázisú inaktiváció esetén az

inaktivációs időállandót adja meg, kétfázisú inaktiváció esetén pedig az inaktiváció sebességével fordítottan arányos az értéke. A módszer előnye, hogy az inaktivációt egyetlen számérték segítségével írja le az inaktivációs kinetika milyenségétől függetlenül. A képzett hányadost annak angol nevéből (area/peak ratio) APPR-nek neveztük el.

Az inaktivációs kinetika APPR-el történő jellemzésének helyességét úgy ellenőriztük, hogy az APPR értékét olyan körülmények között kapott áramgörbék elemzésekor is kiszámoltuk, ahol az inaktivációs időállandók egyértelmű jellemzést adtak a kinetikára. S-ECS pH=7,35 oldatban az APPR értéke $131,6 \pm 13,1$ ms volt (n=16). Az extracelluláris pH 6,5-re, ill. 5,5-re való csökkentése az APPR értékét a pH=7,35-n mért érték $116,1 \pm 3,8$ %-ára (n=7), ill. $133,2 \pm 2,5$ %-ára (n=5) növelte (8C ábra). Az APPR értéke tehát azonos arányban nő a pH_o csökkenésékor, mint az inaktivációs kinetikát jellemző időállandók (v.ö. 5D ábra), ami az APPR alkalmazhatóságát mutatja az inaktivációs kinetika jellemzésére.

Bár APPR értékének K-ECS-ben történő kiszámított értéke és az inaktivációs időállandók között már nincs egyértelmű megfeleltetés, mégis, erre szükség volt a különböző K⁺ koncentrációk mellett mért APPR-ek értelmezéséhez és az adatok összevethetőségének biztosításához. K-ECS/pH=7,35 oldatban az APPR értéke $308,9 \pm 9,7$ ms (n=12) volt. Az extracelluláris pH csökkentése az APPR csökkenését eredményezte, pH=6,5-n értéke a kontroll $92,1 \pm 1,5$ %-a (n=7, p=0,001), míg pH=5,5-n annak $82,5 \pm 3,9$ %-a (n=9, p=0,005) volt (8C ábra). Az APPR csökkenése tehát egy mérőszámmal jól szemlélteti azt a négyparaméteres összefüggést, amit elsősorban a különböző sebességgel inaktiválódó komponensek súlyfaktora és kismértékben az inaktivációs időállandók változása mutat pH_o csökkenésekor (v.ö. 7. ábra).

Amennyiben a sejtet 20 mM [K⁺]_e pH=7,35 oldattal perfundáltuk, az APPR értéke $201,1 \pm 23,6$ ms (n=8), míg 40 mM [K⁺]_e esetén $229,4 \pm 22,0$ ms (n=6) volt, ami jól jellemzi azt a 8A és 8B ábrán felismerhető ténytet, hogy az inaktivációs kinetika 40 mM K⁺ koncentráció mellett lassabb, mint 20 mM K⁺ mellett. Az extracelluláris pH 7,35-ről 5,5-re való csökkentése 20 mM [K⁺]_e esetén az APPR értékét a pH=7,35-n mért érték $120,0 \pm 4,7$ %-ára növelte (n=9, p=0,0027), míg 40 mM [K⁺]_e esetén nem változtatta meg szignifikánsan az APPR értékét ($97,2 \pm 4,4$ %, n=8, p=0,55, 8C ábra). Ez azt jelenti, hogy a 40 mM K⁺ koncentráció mellett kerülnek egyensúlyba azok a molekuláris kölcsönhatások, melyek a pH_o csökkenésekor normál K⁺ mellett az inaktiváció lassulását, míg 150 mM K⁺ mellett az inaktiváció gyorsulását okozzák (ld. részletesen később a Megbeszélés fejezetben).



8. ábra Az extracelluláris pH csökkentése 40 mM [K⁺]_e esetén nem változtatja meg az inaktivációs kinetikát

(A és B) Kv1.3 csatornákat expresszáló CTLL-2 sejteken mért áramok 20 mM K-ECS (A) ill 40 mM K-ECS oldatban (B) pH=7.35 és pH=5.5 esetén. A sejteket -120 mV-os tartási potenciálról 2 másodperc időtartamra +50 mV-ra depolarizáltuk, az egymást követő depolarizáló impulzusok között 60 másodperc telt el. (C) Az áramamplitúdókat és a görbe alatti területet meghatározva kiszámoltuk a görbe alatti terület és a csúcsáramok hányadosát. Az ábrán az APPR_{5,5}/APPR_{7,35} értékeket ábrázoltuk különböző [K⁺]_e-k esetén. A hibajelek a középérték közepes hibáját (SEM) mutatják.

5.1.5 Az inaktiváció pH_o-függése a His399 protonációjával függ össze

A lassú inaktiváció szabályozásában Kv1.3 csatornák esetén a legfontosabb szerepe a csatorna extracelluláris szájadékában elhelyezkedő, 399-es helyzetű hisztidinnek lehet. A hisztidin aminosavdallánca reverzibilisen protonálható, a reakció pK értéke oldatban 6,5, melynek alapján a vizsgált pH_o tartományban a His399 protonáltsága, és ezáltal töltése a pH_o-tól függően jelentősen változik. A hisztidin alacsony pH_o-n bekövetkező protonációját a csatornablokkoló TEA segítségével ellenőriztük.

Kavanaugh és mtsai bizonyították, hogy a TEA patkány (rat) Kv1.3 (rKv1.3) csatornák iránti affinitása jelentősen csökken, ha a 401-es helyzetű hisztidin (a humán Kv1.3 csatorna H399 aminosavával ekvivalens helyzetű aminosav) alacsony extracelluláris pH-n protonálódik (Kavanaugh és mtsai, 1991). Hasonló, pH_o-függő csökkenés nem mutatható ki H401Y mutáns csatornák TEA affinitásában, ami egyértelműsítette azt, hogy a vad típusú csatornában a hisztidin protonálódása gátolja a TEA kötőhely kialakítását alacsony pH_o-n. Mivel az aminosavak oldatban mért pK értékét jelentősen módosíthatja a funkciócsoportok kémiai környezete, szükség volt annak igazolására, hogy a humán Kv1.3 klón esetén is protonálódik a His399 a pH_o csökkenésével. Ehhez a fentebb említett, pH_o-függő TEA affinitás változás mérését használtuk fel. Az extracellulárisan alkalmazott 10 mM TEA pH_o=7,35 esetén az áramamplitúdót a kontroll 47 ± 3 %-ára (n=4), míg pH_o=6,5 esetén a kontroll 94 ± 4 %-ára (n=5) csökkentette. Ennek megfelelően tehát pH_o=6,5-n a His399 protonálódik.

A 399-es helyzetű hisztidinnek az inaktiváció pH-függő szabályozásában betöltött kulcsszerepét bizonyítják a különböző H399X mutáns Kv1.3 csatornákkal végzett kísérleteink is. A titrálható hisztidint a vizsgált pH_o tartományban permanens töltetlen ill. pozitív töltésű aminosavakkal helyettesítettük, így elkülöníthetővé vált a 399-es helyzetű aminosav protonációjának-deprotonációjának a hatása egyéb nem specifikus pH-függő hatásoktól. Azt vizsgáltuk, hogy az extracelluláris pH csökkentése hogyan befolyásolja a H399L, H399V, H399Y, H399K és a H399R mutánsok inaktivációját. Mindegyik mutáns csatorna nagy számban fejeződött ki transzfektált CTLL-2 sejtekben, és funkcionáló ioncsatornáként viselkedett. Először a mutáns csatornák alapvető biofizikai tulajdonságait vizsgáltuk és hasonlítottuk össze a vad típusú csatorna hasonló tulajdonságaival.

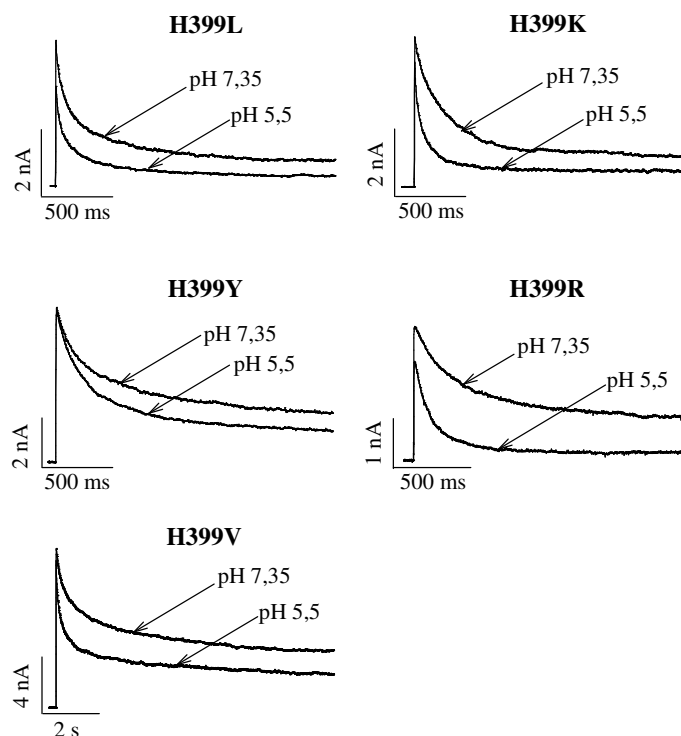
A 399-es helyzetben neutrális aminosavat tartalmazó mutánsok (L, Y és V) esetén az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggése (G-V görbe) pH_o=7,35-n a vad típusú csatornáéhoz volt hasonló (6C ábra). A G-V görbét jellemző V_{1/2} és s értékeket a különböző mutánsokra a 2. táblázat tartalmazza. A töltött mutánsok (R és K) G-V görbéi a mutánsokhoz képest kevésbé voltak meredekék és a pozitívabb membránpotenciálok felé tolódtak (6B ábra). Ezek az eredmények a 399-es helyzetű aminosav és az aktivációs kapuzás közötti kölcsönhatás lehetőségét vetik fel, melynek részleteit nem vizsgáltuk. Alacsony pH_o-jú oldatban a vad típusú csatornához hasonlóan a G-V görbék pozitív membránpotenciálok irányába való eltolódása figyelhető meg valamennyi vizsgált mutáns esetén. Ezen kívül a H399K és H399R mutánsok esetén a G-V görbék meredekebbé váltak a pH_o csökkenésével.

A mutációk a csatornák aktivációs kinetikáját nem befolyásolták ($p=0,232$), ugyanakkor az inaktivációs kinetika valamennyi mutáns esetén drámaian megváltozott. Minden mutáns kétfázisú inaktivációt mutatott, az áramgörbék leszálló szára két exponenciális tagot tartalmazó függvény segítségével volt illeszthető (9. ábra). A 3. táblázat az egyes mutánsokra jellemző inaktivációs időállandókat és a lassan inaktiválódó komponens súlyfaktorát tartalmazza $pH_0=7,35$ -n. Az extracelluláris pH 5,5-re való csökkentése különböző mértékben bár, de az összes mutáns csatorna inaktivációját gyorsította. A H399Y csatornánál az inaktivációs időállandó nem csökkent szignifikánsan, azonban a gyorsan inaktiválódó áramkomponens súlyfaktora megnőtt. A többi mutáns esetén a gyorsan inaktiválódó komponens súlyfaktora szintén nőtt és az azt jellemző inaktivációs időállandó (τ_f) is szignifikánsan csökkent. A H399R és H399L mutánsok esetén a lassú komponens inaktivációs időállandója (τ_s) is szignifikánsan csökkent. A két áramkomponenst jellemző amplitúdóértékek és inaktivációs időállandók pH_0 csökkentés hatására bekövetkező változását az egyes mutánsok esetén a 3. táblázat tartalmazza. Ezek az eredmények az inaktivációs kinetika tekintetében ellentétesek a vad típusú csatornák esetén tapasztaltakkal.

csatorna	pH 7,35			pH 5,5 / pH 7,35			
	τ_s (ms)	τ_f (ms)	$A_s/(A_s+A_f)$ (%)	τ_s hányados (%)	τ_f hányados (%)	A_s hányados (%)	A_f hányados (%)
WT		167 ± 20			138 ± 2		67 ± 2
H399K	2490 ± 296	164 ± 11	17 ± 1	100 ± 6	65 ± 5	48 ± 4	90 ± 3
H399R	960 ± 100	218 ± 36	43 ± 2	59 ± 2	59 ± 3	57 ± 7	114 ± 9
H399L	591 ± 64	75 ± 5	48 ± 4	86 ± 5	61 ± 5	54 ± 4	106 ± 7
H399V	3048 ± 344	237 ± 11	35 ± 6	108 ± 3	59 ± 6	60 ± 6	99 ± 11
H399Y	2185 ± 219	180 ± 20	37 ± 3	114 ± 11	79 ± 9	68 ± 7	112 ± 3

3. táblázat Vad típusú és mutáns Kv1.3 csatornák inaktivációját jellemző paraméterek és azok változása a pH_0 csökkentésének hatására

τ_s és τ_f a gyorsan és lassan inaktiválódó áramkomponenst jellemző inaktivációs időállandókat, A_s és A_f a gyorsan ill. lassan inaktiválódó áramkomponens amplitúdóját jelentik. $A_s/(A_s+A_f)$ a lassan inaktiválódó áramkomponens súlyfaktora %-ban kifejezve. A hányados értékek az adott paraméter $pH_0=5,5$ -n mért értékét jelentik a kontroll (a $pH_0=7,35$ -n mért érték) %-ában kifejezve. A feltüntetett értékek az átlagértéket és annak közepes hibáját (SEM) jelentik.

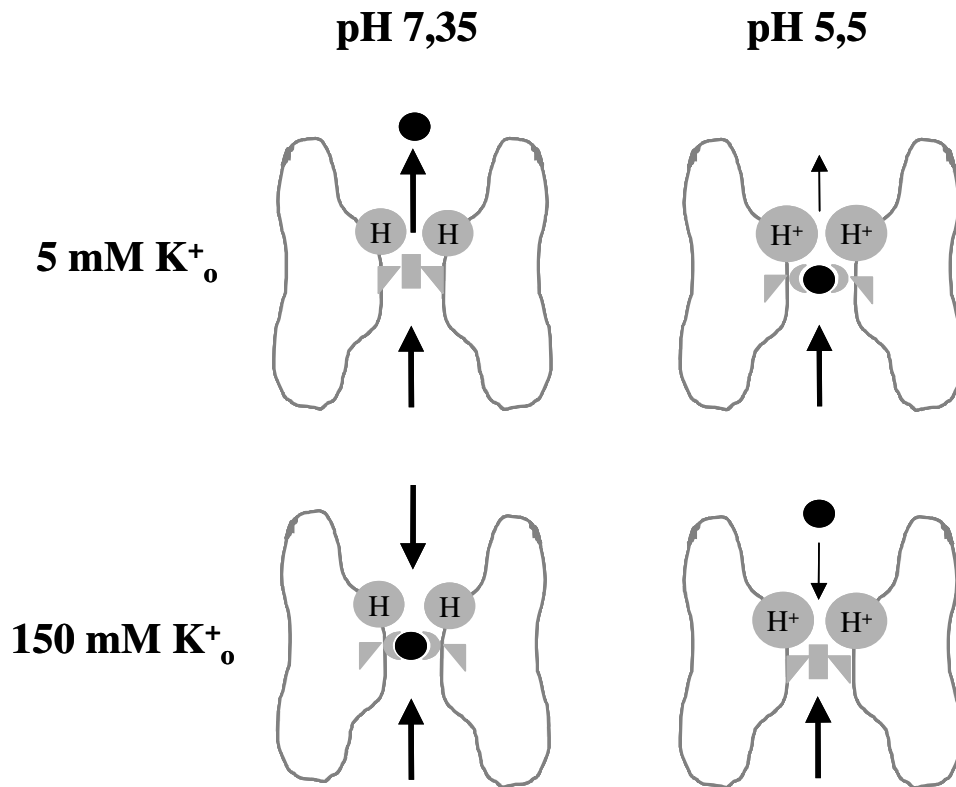


9. ábra Az extracelluláris pH csökkentésének hatása mutáns Kv1.3 csatornák C-típusú inaktivációjára

Az adott mutáns Kv1.3 csatornát kifejező CTLL-2 sejteken 2 s vagy 10 s hosszú depolarizáló impulzusok alatt kontroll körülmények között (pH=7,35), valamint pH=5,5 esetén mért teljes-sejt áramok. A tartófeszültség -120 mV volt, +50 mV-os teszimpulzusokat alkalmaztunk, és 60 s volt az egyes depolarizáló impulzusok között eltelt idő. Az áramgörbék leszálló szára két exponenciális tagot tartalmazó függvény segítségével jól illeszthető. Az ábrán látható áramgörbék esetén az inaktivációs időállandók a következők voltak: H399L, pH 7,35: $\tau_f = 56$ ms, $\tau_s = 481$ ms; H399L, pH 5,5: $\tau_f = 41$ ms, $\tau_s = 349$ ms; H399K, 7,35: $\tau_f = 197$ ms, $\tau_s = 2916$ ms; H399K, 5,5: $\tau_f = 83$ ms, $\tau_s = 1590$ ms; H399Y, 7,35: $\tau_f = 272$ ms, $\tau_s = 3053$ ms; H399Y, 5,5: $\tau_f = 238$ ms, $\tau_s = 3334$ ms; H399R, 7,35: $\tau_f = 178$ ms, $\tau_s = 905$ ms; H399R, 5,5: $\tau_f = 70$ ms, $\tau_s = 244$ ms; H399V, 7,35: $\tau_f = 315$ ms, $\tau_s = 3492$ ms; H399V, 5,5: $\tau_f = 208$ ms, $\tau_s = 3309$ ms.

Az irodalomból jól ismert, hogy számos feszültség kapuzott K^+ csatorna inaktivációját a csatorna extracelluláris szájadéka közelében, a szelektivitási szűrőben elhelyezkedő káliumkötőhely telítettsége szabályozza. Ennek tükrében a vad típusú és mutáns Kv1.3 csatornák inaktivációjában alacsony pH_o -n bekövetkező változások magyarázatára egy

modellt alkottunk. Ennek lényege, hogy a protonált 399-es helyzetű hisztidin a csatorna extracelluláris szájadékaiban egy elektrosztatikus potenciálgát képez, amely akadályozza a K^+ -ok extracelluláris tér felől történő bejutását a K^+ kötőhelyre valamint a kötőhelyről a K^+ távozását az extracelluláris tér felé. Ennek megfelelően tehát a H399 protonációja csökkenti a K^+ kötőhely extracelluláris tér felől való töltődésének határfokát és elősegíti annak intracelluláris tér felől való töltődését (10. ábra).



10. ábra A kísérleti eredményeket magyarázó modell lényege

A 399-es helyzetű hisztidin alacsony pH-n protonálódik, és az így keletkező elektrosztatikus potenciálgát akadályozza a K^+ -ok mozgását a csatornapórus extracelluláris bejáratán keresztül. S-ECS oldatban a K^+ -ok „external lock-in site”-ről az extracelluláris tér felé való távozása akadályozott, ami a kötőhely telítettségét megnövelve az inaktiváció lassulását eredményezi a „foot in the door” mechanizmusnak megfelelően. K-ECS oldatban a $pH_o=5,5$ -n kialakuló elektrosztatikus erőter a kritikus kötőhely extracelluláris tér felőli töltődését akadályozza, amely az inaktivációs kinetika gyorsulásában nyilvánul meg.

5.1.6 Magas ionerősségű oldat alkalmazása: az elektrosztatikus barrier megszüntetése

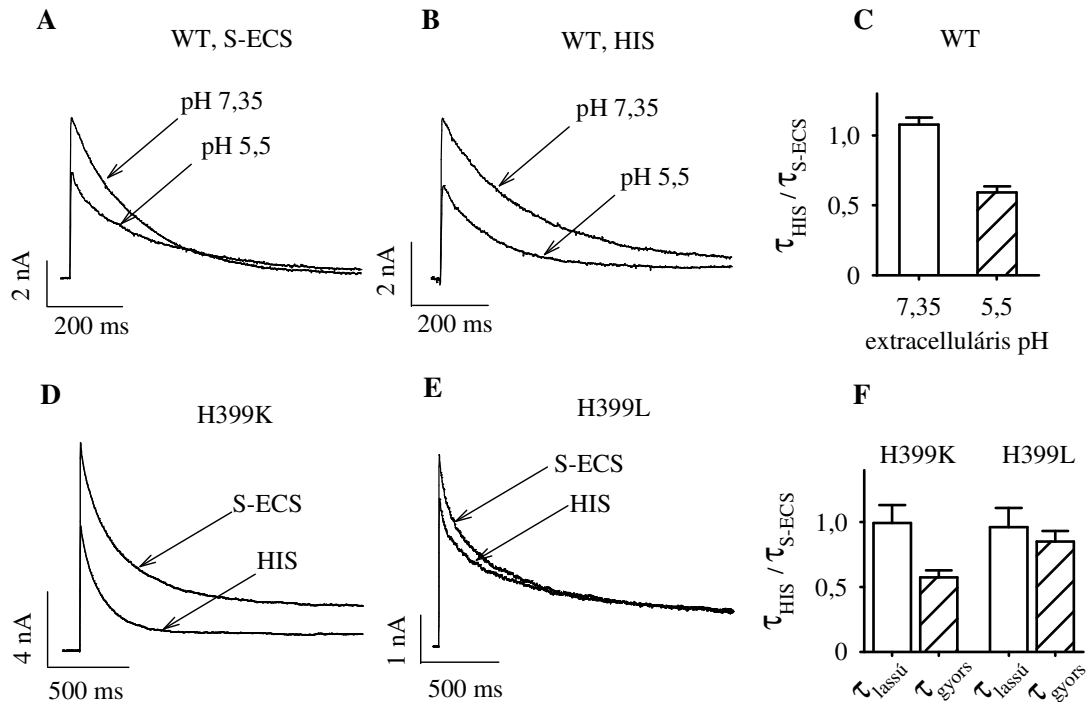
Az előzőekben leírt modell tesztelésére magas ionerősségű extracelluláris oldatot (HIS) alkalmaztunk, amellyel csökkenthetők a nagy hatótávolságú elektrosztatikus

kölcsönhatások. Alacsony pH_o -n normál ionerősségű extracelluláris oldatban (S-ECS-ben) a pozitívan töltött hisztidinek elektromos erőtere által létrehozott potenciálgát akadályozza a K^+ -ok kijutását a pórusból, ami az inaktiváció lassításához vezet. Magas ionerősségű oldatban az elektrosztatikus kölcsönhatások csökkenése miatt az elektromos potenciálgát csökken, ami az inaktiváció gyorsulását eredményezi olyan csatornák esetén, melyek a kritikus pozícióban (399) töltött aminosavat tartalmaznak.

A 11. ábrán bemutatott eredmények hipotézisünk helyességét igazolják. Amennyiben S-ECS oldatban az extracelluláris pH-t 7,35-ről 5,5-re csökkentettük, az inaktiváció lassulását tapasztaltuk (11A ábra), HIS oldatban viszont a pH_o hasonló csökkentése az inaktiváció gyorsulását eredményezte (11B ábra). A 11C ábra egy másfajta összehasonlítást mutat, mely hipotézisünkkel szintén összhangban van. Amennyiben a sejtet S-ECS/pH=7,35 oldattal perfundáltuk, a HIS/pH=7,35 oldatra való váltás az áramamplitúdó csökkenését ($59,2 \pm 4,5$ %; $n=5$, $p<0,001$) és az egyensúlyi (steady-state) áram növekedését eredményezte, az inaktiváció sebessége ugyanakkor nem változott (önkontrollos összehasonlítás: $107,9 \pm 4,9$ %; $n=5$, $p=0,182$, kontroll: $\tau= 167 \pm 20$ ms; HIS: $\tau= 179 \pm 20$ ms). Ezzel szemben $pH_o=5,5$ -n az S-ECS oldatról HIS-re való váltás az inaktiváció gyorsulását okozta (önkontrollos összehasonlítás: $62,1 \pm 5,8$ %; $n=4$, $p=0,007$, kontroll: $\tau= 198 \pm 23$ ms; HIS: $\tau= 122 \pm 15$ ms) az áramamplitúdó csökkenése mellett ($71,6 \pm 4,6$ %; $n=4$, $p<0,009$). Az áramamplitúdó HIS oldat által okozott csökkenését a továbbiakban nem vizsgáltuk.

Hipotézisünk helyességét a továbbiakban mutáns ioncsatornák felhasználásával igazoltuk. A rendelkezésre álló, és a korábban bemutatott mutánsok közül azokat választottuk ki, melyek tulajdonságai legjobban hasonlítanak a vad típusú Kv1.3 biofizikai jellemzőire. A H399K és H399L mutánsok használatának az az előnye, hogy az aminosavak oldalláncai a vizsgált pH_o tartományban vagy permanens pozitív töltéssel rendelkeznek (H399K) vagy neutrálisak (H399L). Modellünk szerint a H399K a vad típusú csatorna $pH_o=5,5$ -ön mért tulajdonságait, míg a H399L a vad típusú csatorna $pH_o=7,35$ -ön mért jellemzőit kell hogy mutassa a pH_o -tól függetlenül annak megfelelően, hogy ezen csatornák esetén 399-es helyzetű aminosav töltése a vizsgált pH_o -tartományban nem változik meg. Ezen mutánsok felhasználásával pl. a HIS oldat hatásai állandó pH_o értéken vizsgálhatók. Amennyiben a 399-es pozícióban töltött aminosavat tartalmazó H399K mutánst expresszálok CTLL-2 sejtet S-ECS/pH=7,35 oldattal való perfúzió után HIS/pH=7,35 oldattal perfundáltunk, ugyanazt tapasztaltuk, mint a vad típusú csatornák esetén pH=5,5-nél S-ECS-ről HIS oldatra való váltás esetén, vagyis az inaktivációs kinetika gyorsult (11D és 11F ábrák; τ_{slow} : $99,2 \pm 13,7$

%, $p < 0,955$; τ_{fast} : $57,2 \pm 5,4$ %, $p < 0,001$). A 399-es helyzetben neutrális aminosavat tartalmazó H399L mutáns esetén a HIS oldatra való váltás ugyanakkor nem befolyásolta az inaktivációs időállandót (11E és 11F ábra; τ_{slow} : $95,9 \pm 14,9$ %, $p < 0,795$; τ_{fast} : $84,9 \pm 8,1$ %, $p < 0,124$), azaz ugyanazt tapasztaltuk, mint a vad típusú csatornák esetén $pH_0=7,35$ -nél S-ECS-ről HIS oldatra való váltás esetén.



11. ábra Magas ionerősségű extracelluláris oldat (HIS) hatása vad típusú, illetve H399K és H399L mutáns Kv1.3 csatornák inaktivációjára

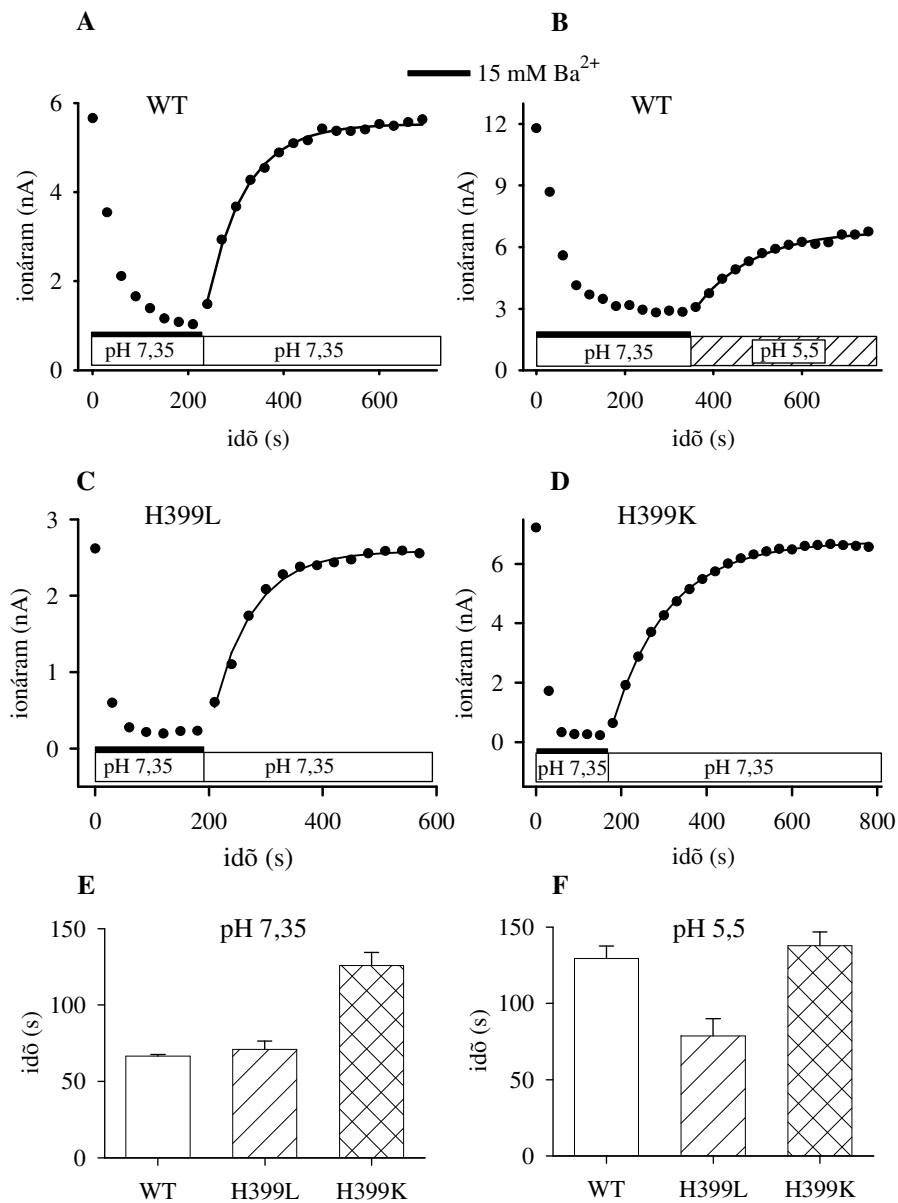
(A és B) Vad típusú Kv1.3 csatornát expresszáló CTLL-2 sejteken 2 s hosszú depolarizáló impulzusok alatt mért teljes-sejt áramok. A tartófeszültség -120 mV volt, $+50$ mV-os teszimpulzusokat alkalmaztunk, és 60 s volt az egyes depolarizáló impulzusok között eltelt idő. (A) A sejtet S-ECS $pH=7,35$, illetve S-ECS $pH=5,5$ oldattal perfundáltuk. Az inaktivációs időállandók $171,1$ ms ($pH=7,35$) és $233,2$ ms ($pH=5,5$) voltak. (B) A sejtet HIS $pH=7,35$, illetve HIS $pH=5,5$ oldattal perfundáltuk. Az inaktivációs időállandók $220,6$ ms ($pH=7,35$) és $127,4$ ms ($pH=5,5$) voltak. (C) A HIS oldatban mért inaktivációs időállandó (τ_{HIS}) és az S-ECS oldatban mért inaktivációs időállandó (τ_{S-ECS}) hányadosa $pH=7,35$ (üres oszlopok), és $pH=5,5$ (sátozott oszlopok) esetén. A hibajelek a középérték közepes hibáját mutatják. (D) H399K mutáns csatornákat expresszáló CTLL-2 sejt teljes-sejt áramai. A kísérleti körülmények hasonlóak, mint a vad típusú csatornák esetén (A és B panel), de a sejtet S-ECS $pH=7,35$ illetve HIS $pH=7,35$ oldattal perfundáltuk. Az inaktivációs időállandók a következők voltak: $\tau_{lassú} = 2714$ ms és $\tau_{gyors} = 212$ ms (S-ECS) illetve $\tau_{lassú} = 2172$ ms és $\tau_{gyors} = 127$ ms (HIS). (E) Ugyanaz a kísérlet, mint a D panel esetén, de a sejt H399L csatornákat expresszált. Az inaktivációs időállandók $\tau_{lassú} = 577$ ms és $\tau_{gyors} = 74$ ms (S-ECS) illetve és $\tau_{lassú} = 557$ ms és $\tau_{gyors} = 55$ ms (HIS) voltak. (F) A HIS $pH=7,35$ oldatban mért inaktivációs időállandó (τ_{HIS}) és az S-ECS $pH=7,35$ oldatban mért inaktivációs időállandó (τ_{S-ECS}) hányadosa a H399K és a H399L mutánsok esetén.

A HIS oldat a csatornák egyensúlyi aktivációját jellemző G-V görbét a pozitívabb feszültségek irányába tolja el. A G-V görbét jellemző $V_{1/2}$ és s értékek a vad típusú csatornák esetén $pH_0=7,35$ -n $14,4 \pm 0,7$ és $13,4 \pm 0,5$ mV voltak ($n=3$).

5.1.7 Az alacsony pH_0 lassítja a bárium bemosódását és kimosódását

Hipotézisünk tesztelésére vizsgáltuk az ionok különböző extracelluláris pH_0 melletti átjutását a csatorna pórusának extracelluláris bejáratán keresztül. Modellünk szerint az ionok átjutása lassabb akkor, ha a 399-es pozícióban töltött aminosav oldallánc található. Az ionok átjutásának vizsgálatához egy olyan ionra volt szükség, amelyre a Kv1.3 csatorna permeábilis, de az ion mozgása elég lassú ahhoz, hogy mérni tudjuk az ionmozgás sebességében bekövetkező változásokat. Erre a célra kiválóan alkalmasak a báriumionok, amelyek hasonló méretűek, mint a káliumionok, de kétszeres pozitív töltésüknél fogva erőteljesebben kötődnek a szelektivitási szűrőben lévő kötőhelyekhez, megakadályozva ezzel a jóval gyorsabban mozgó káliumionok áramlását a csatorna látszólagos blokkolását okozva. Hurst és mtsai két szekvenciális báriumkötőhelyet írtak le *Shaker* csatornák esetén: egy külső kötőhelyet, amelyre a gyors asszociációs és disszociációs sebességek jellemzőek, és egy belső kötőhelyet, amely nagyobb affinitású és lassú asszociációs és disszociációs sebességekkel jellemezhető (Hurst és mtsai, 1995). A külső báriumkötőhely a Neyton és Miller által leírt „external lock-in site”-nak felel meg és ezen kötőhely telítettsége határozza meg elsősorban az inaktiváció sebességét (Harris és mtsai, 1998; Kiss és mtsai, 1999; Kiss és Korn, 1998; Neyton és Miller, 1988b).

A bárium ionok pórusból történő kimosódásának kinetikai vizsgálatok a sejtet -120 mV-os membránpotenciálon tartottuk és 15 ms hosszú $+50$ mV-os tesztimpulzusokat alkalmaztunk. Az egymást követő tesztimpulzusok között 30 másodperc telt el. Ilyen körülmények között 15 mM Ba^{2+} a Kv1.3 csatornák áramát S-ECS/ $pH=7,35$ oldatban a kontroll $18,47 \pm 1,28$ %-ára csökkentette ($n=10$). A steady-state blokk elérése után báriummentes S-ECS/ $pH=7,35$ ill. $5,5$ oldattal perfundáltuk a sejtet és mértük a Ba^{2+} kimosódási kinetikáját. A 12A és 12B ábra mutatja, hogy alacsony extracelluláris pH -n a Ba^{2+} disszociációja lassabb. A kimosódás sebességét jellemző időállandók rendre $66,49 \pm 1,17$ s ($n = 5$) és $129,42 \pm 8,28$ s ($n = 5$) voltak $pH_0=7,35$ ill. $5,5$ esetén (12E és F ábra).



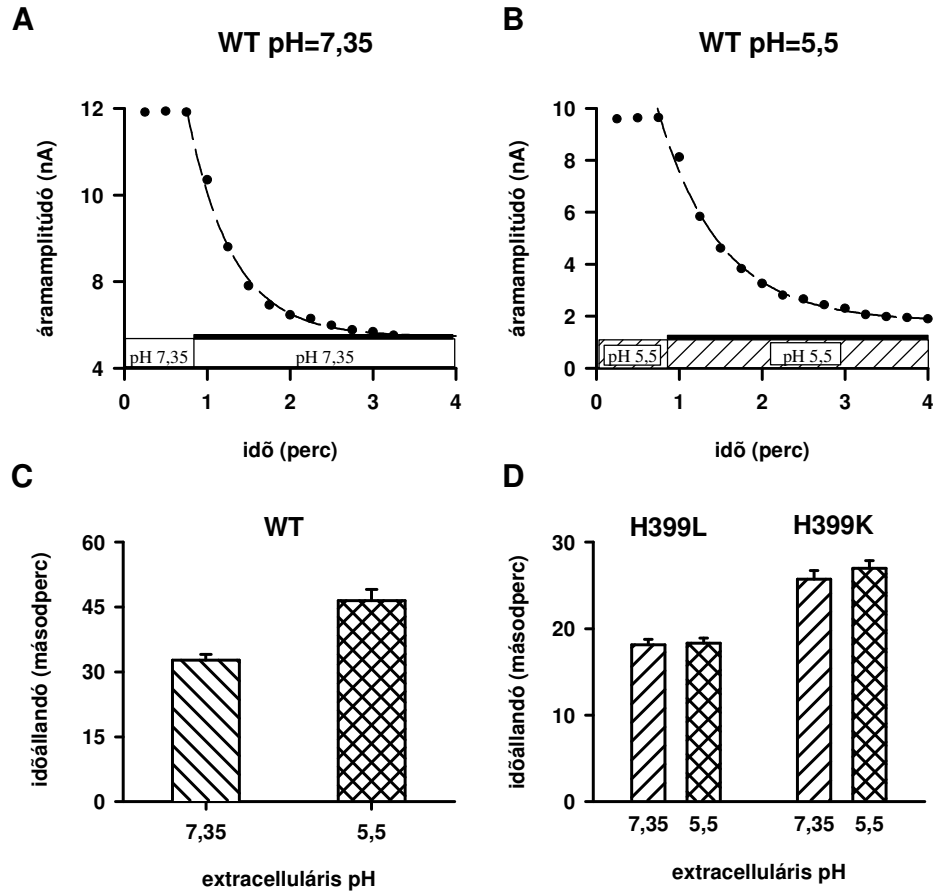
12. ábra A vad típusú, valamint a H399K és H399L mutáns Kv1.3 csatornák áramainak Ba^{2+} ionokkal való blokkolás utáni kimosási kinetikái

(A és B) Az extracelluláris pH csökkentése lassítja a Ba^{2+} ionok kimosódását vad típusú Kv1.3 csatornák esetén. Az áramokat CTLL-2 sejteken 15 ms hosszú depolarizáló impulzusok alatt mértük teljes-sejt konfigurációban. A tartófeszültség -120 mV volt, +50 mV-os tesztimpulzusokat alkalmaztunk, és 30 s volt az egyes depolarizáló impulzusok között eltelt idő. Az ábrán az egyes impulzusok alatt mért maximális áramot tüntettük fel. Az áramokat 15 mM Ba^{2+} -ot tartalmazó S-ECS pH=7,35 oldattal blokkoltuk (üres téglalap és fekete vonal), a kimosást pedig S-ECS pH=7,35 (üres téglalap az A panelen), illetve S-ECS pH=5,5 (sáírozott téglalap a B panelen) oldattal végeztük. A kimosási kinetikát exponenciális függvény segítségével illesztettük (fekete vonal). A kimosási időállandók az ábrán látható kísérletben 80,6 s (pH=7,35) és 131,2 s (pH=5,5) voltak. A H399L mutáns csatornák esetén (C panel) a pH=7,35 mellett mért kimosási kinetika ($\tau = 70,4$ s) hasonló a vad típusú csatornákon ugyanilyen pH-n mért kintikához, míg a H399K mutáns csatornák (D panel) pH=7,35 esetén mért kimosási kinetikája ($\tau = 131,9$ s) a vad típusú csatornák pH=5,5 mellett mért kinetikájával mutat jó egyezést. Az E és az F panelen a vad típusú, valamint a H399K és H399L mutáns Kv1.3 csatornákon mért kimosási időállandók láthatók pH=7,35 és pH=5,5 esetén. A hibajelek a középérték közepes hibáját mutatják.

A Ba^{2+} kimosódási kísérleteket egy-egy, a kritikus, 399-es pozícióban neutrális (L) és pozitív (K) töltésű aminosavat tartalmazó mutáns Kv1.3 csatorna esetén is elvégeztük, a vad típusú csatornáknál használt protokollt alkalmaztuk. A H399L csatorna esetén a Ba^{2+} disszociációját nem befolyásolta az extracelluláris pH változása, és a kimosódási időállandó a vad típusú csatornák esetén $pH_0=7,35$ -n kapott értékkel egyezett meg (H399L, $pH_0=7,35$: $71,04 \pm 5,37$ s; H399L, $pH_0=5,5$: $78,67 \pm 11,20$ s; 12C, E és F ábrák). A H399K mutáns csatornák esetén a Ba^{2+} kimosódása szintén pH-inszenzitívnek bizonyult és a kimosódási időállandók a vad típusú ioncsatornák esetén $pH_0=5,5$ -n kapott értékekkel egyeztek meg (H399K, pH_0 7,35: $125,99 \pm 8,55$ s; H399K, pH_0 5,5: $137,89 \pm 8,91$ s; 12D, E és F ábrák). A statisztikai elemzés (Bonferroni t-teszttel kiegészített ANOVA) két különböző, gyors (vad típus $pH_0=7,35$ -n és H399L mindkét pH_0 -n) ill. lassú (vad típus $pH_0=5,5$ -n és H399K mindkét pH_0 -n) kimosódási sebességekkel jellemezhető csoportot különített el. A páronkénti összehasonlítás a csoportokon belül nem mutatott különbséget az időállandókban ($p>0,05$), míg a csoportok közötti bármely páronkénti összehasonlítás szignifikáns különbséget mutatott ($p<0,05$).

A 12. ábrán bemutatott kísérletekben használt protokoll esetén a Ba^{2+} bemosódás igen gyors, az egyensúlyi blokk 1-2 depolarizáló impulzus alatt kialakul, amely nem teszi lehetővé a bemosódási kinetikák esetleges különbségeinek feloldását. A jobb feloldás érdekében tehát módosítanunk kellett az alkalmazott kísérleti protokollt. Két célunk volt: egyrészt lassítani kellett a Ba^{2+} -k extracelluláris térből a pórusba történő bemosódásának sebességét. Ennek érdekében kevésbé negatív membránpotenciált és nagyobb depolarizáló impulzusokat alkalmaztunk és mivel a Ba^{2+} bemosódása nyitott csatornák mellett gyorsabb, csökkentettük a depolarizáló impulzusok hosszát. Másik célunk a kísérletek időbeli felbontásának növelése volt. Ennek érdekében úgy csökkentenünk az egymást követő tesztimpulzusok között eltelt időt, hogy ne alakuljon ki kumulatív inaktiváció. Kísérleteinkben 15 másodpercenként alkalmaztuk a tesztimpulzusokat.

A módosított protokollt alkalmazva a Ba^{2+} 15 mM koncentrációban a vad-típusú Kv1.3 csatornák esetén az áramamplitúdót rendre a kontroll érték $39,1 \pm 2,9$ %-ára ($n=6$) és $17,9 \pm 1,4$ %-ára ($n=6$) csökkentette $pH_0=7,35$ és 5,5 esetén. A 13A és B ábra mutatja, hogy a bemosódási kinetika alacsony pH_0 -n lassúbb. A bemosódási időállandók rendre $32,8 \pm 1,4$ s ($n=7$) és $46,5 \pm 2,6$ s ($n=6$) voltak $pH_0=7,35$ és 5,5 esetén ($p=0,0005$, 13C ábra). A mért időállandókat sejtenként is összehasonlítottuk. A pH_0 csökkentése a bemosódási időállandót a $pH_0=7,35$ -n mért érték $137,3 \pm 2,8$ %-ára növelte ($n=6$, $p<0,0001$).



13. ábra A Ba^{2+} által okozott blokk bemosási kinetikái vad típusú és H399L ill. H399K mutáns Kv1.3 csatornák esetén

(A és B) Az extracelluláris pH csökkentése lassítja a Ba^{2+} blokk bemosódási kinetikáját a vad típusú Kv1.3 csatornák esetén. A sejteket -90 mV-os tartási potenciálról 10 ms időtartamra $+70$ mV-ra depolarizáltuk, az egyes depolarizáló impulzusok között 15 másodperc telt el. Az ábrán az áramamplitúdók változását tüntettük fel az adott oldatokkal való perfúzió során. A sejteket először kontroll oldattal (S-ECS pH=7,35 az A panel és S-ECS pH=5,5 a B panel esetén), majd 15 mM Ba^{2+} -t tartalmazó azonos összetételű oldattal perfundáltuk (üres téglalap és fekete vonal az A panelen és satírozott téglalap és fekete vonal a B panelen). A szaggatott vonalak az adatpontokra legjobban illeszkedő exponenciális függvényeket mutatják. Az ábrán bemutatott kísérlet esetén a bemosási kinetikát jellemző időállandók rendre 31,98 és 44,96 s voltak pH=7,35 és pH=5,5 esetén. (C és D) A bemosási időállandók a vad típusú (C) és a H399L ill. H399K mutáns csatornák (D) esetén pH=7,35 és pH=5,5 alkalmazásakor. A mutáns csatornák esetén a kísérleti körülmények a vad típusú csatornák vizsgálatakor alkalmazottakhoz voltak hasonlóak, azzal a különbséggel, hogy a sejteket -120 mV-os feszültségen tartottuk és a $[Ba^{2+}]$ 5 mM volt. A hibajelek a középérték közepes hibáját (SEM) mutatják.

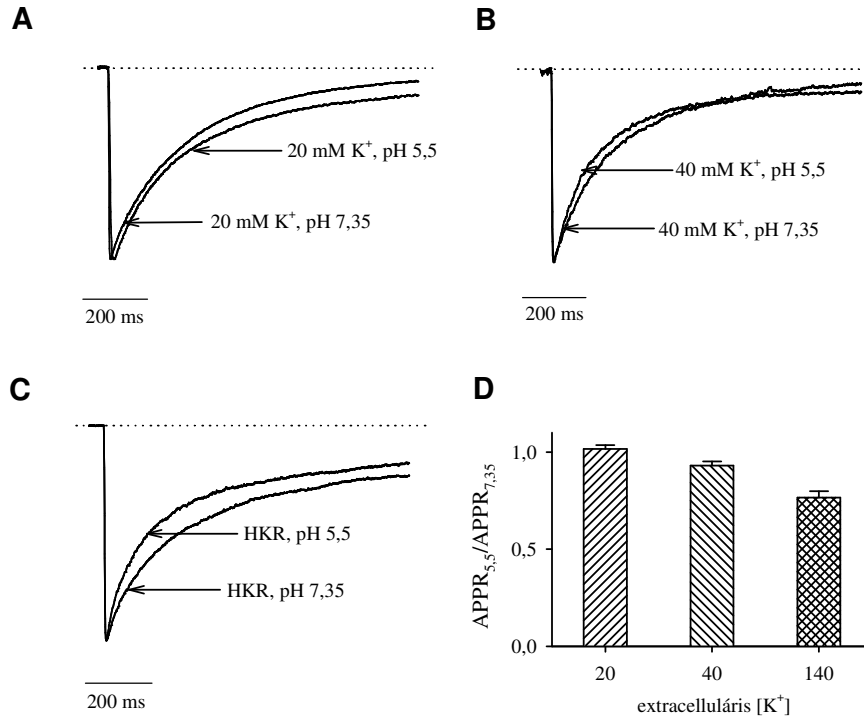
A Ba^{2+} kimosási kísérletekhez hasonlóan a Ba^{2+} bemosódási kinetikájának pH_o-függését is megvizsgáltuk egy, a 399-es pozícióban neutrális (L), ill. pozitív töltésű (K) aminosavat tartalmazó Kv1.3 mutáns esetén is. A vad típusú csatornák bemosódási

kinetikájának vizsgálatakor alkalmazott protokollal 15 mM Ba²⁺ mindkét vizsgált mutáns csatorna esetén szignifikánsan nagyobb blokkot okozott és a bemosódási kinetika nagyon gyors volt, az egyensúlyi blokk egy-két depolarizáló impulzus alatt kialakult, ami lehetetlenné tette a bemosódási kinetika pontos meghatározását. Emiatt módosítanunk kellett a kísérleti körülményeket. A Ba²⁺ koncentrációját 15 mM-ról 5 mM-ra csökkentettük, mivel a bemosódási kinetika az ionok koncentrációjával egyenesen arányos és 5 mM Ba²⁺ mellett még mindig elegendő mértékű blokkot kapunk. Az alkalmazott feszültségprotokoll a vad típusú csatornák bemosási kísérleteiben alkalmazottal egyezett meg, kivéve a tartási potenciált, amely -120 mV volt, s így a mutánsoknál pozitívabb tartási potenciálokon jelentkező kumulatív inaktiváció kivédhető.

A megmaradó áramhányad a H399L csatornákra 5 mM Ba²⁺ jelenlétében rendre 34,3 ± 1,28 % (n=6) és 32,1 ± 1,04 % (n=6) volt pH_o=7,35 és 5,5 esetén. A H399K csatornák áramát a Ba²⁺ ugyanilyen koncentrációban nagyobb mértékben blokkolta, a megmaradó áramhányad rendre 17,4 ± 0,71 % (n=6) és 13,0 ± 1,2 % (n=5) volt a két vizsgált (7,35 és 5,5) pH_o-n. Az extracelluláris pH változtatása nem befolyásolta a bemosódási kinetikát egyik mutáns csatorna esetén sem, ugyanakkor a neutrális aminosavat tartalmazó mutáns (H399L) bemosódási kinetikája gyorsabb volt. A pH_o=7,35-n és 5,5-n mért bemosódási időállandó a H399L esetén rendre 18,13 ± 0,61 s (n=5) és 18,33 ± 0,56 s (n=6), míg a H399K esetén 25,51 ± 1,12 s (n=6) és 26,95 ± 0,92 s (n=5) volt (13D ábra).

5.1.8 Az intracelluláris káliumkoncentráció csökkentése: az extracelluláris tér felől való töltődés szerepének növelése

Hipotézisünk tesztelésére olyan kísérleteket is végeztünk, amelyekben alacsony intracelluláris káliumkoncentrációt alkalmaztunk. Ilyen körülmények között a csatorna pórusának extracelluláris bejáratában lévő, az inaktiváció sebességének meghatározása szempontjából meghatározó kötőhely intracelluláris oldal felől való töltődése lecsökken és az extracelluláris tér felől való töltődés válik meghatározóvá. Különösen igaz ez akkor, ha olyan K⁺ koncentráció és tesztpotenciál kombinációt alkalmazunk, ahol az áramirány megfordul, és a Kv1.3 csatornákon a sejtbe befelé folyó (inward) áram folyik. Várakozásunk az volt, hogy az extracelluláris tér felől való töltődés jelentőségének növekedése miatt az inaktiváció pH_o érzékenysége módosul, vagy meg is fordulhat, azaz 399-es helyzetű hisztidin protonációja következtében létrejövő elektrosztatikus potenciálgát jelenléte az inaktiváció gyorsulását okozhatja a pH_o csökkentésekor.



14. ábra 5mM K⁺-t tartalmazó pipettaoldat alkalmazásakor az extracelluláris pH csökkentése 20 mM [K⁺]_e esetén nem változtatja meg a Kv1.3 csatornák inaktivációs kinetikáját

(A, B és C) Kv1.3 csatornákat expresszáló CTLL-2 sejteken mért normált áramok 5mM K⁺-t tartalmazó pipettaoldat alkalmazása esetén. A sejteket -120 mV-os tartófeszültségtől 2 s időtartamra +20 mV-ra depolarizáltuk, az egyes depolarizáló impulzusok között 60 s telt el. A sejtet 7,35-s és pH=5,5-s pH-jú 20 mM K-ECS (A panel), 40 mM K-ECS (B panel) és K-ECS (C panel) oldatokkal perfundáltuk. (D) Az áramamplitúdók és a görbe alatti területek hányadosait kiszámítottuk minden [K⁺]_e-jú oldat esetén a különböző pH-kon. Az ábrán a pH=7,35 és pH=5,5 esetén mért APPR értékek hányadosait ábrázoltuk különböző [K⁺]_e-k mellett. A hibajelek a középérték közepes hibáját (SEM) mutatják.

Kísérleteinkben a pipettatöltő folyadék 5 mM K⁺-t tartalmazott, így a K⁺-ra vonatkozó egyensúlyi potenciál különbözött a konvencionális -85 mV-tól. Amennyiben a sejtet 20, 40 vagy 150 K-ECS oldattal perfundáltuk, a K⁺-ra vonatkozó egyensúlyi potenciál rendre +35,4, +53,1 és +87,3 mV volt. Ezek az értékek igen közel vannak a + 50 mV-hoz, így a K⁺-ra ható elektrokémiai hajtóerő +50 mV-on igen kicsi. Annak érdekében, hogy nagyobb legyen a hajtóerő és ennek következtében az áramamplitúdó, kísérleteinkben +20 mV-os teszimpulzusokat alkalmaztunk. Mivel a +20 mV negatívabb, mint a kísérleteinkben alkalmazott extracelluláris káliumkoncentrációkra kiszámolt egyensúlyi potenciál értékek, a teszimpulzusok alatt befelé irányuló (inward) inaktiválódó ionáramokat kaptunk. Az áramgörbe leszálló szára 20 és 40 mM [K⁺]_e-k esetén jól illeszthető egy exponenciális tagot

tartalmazó függvény segítségével, az inaktivációs időállandók rendre $160,3 \pm 9,6$ ms ($n=14$) és $199,9 \pm 11,2$ ms ($n=17$) voltak 20 mM és 40 mM K-ECS-ben. 20 mM K-ECS-ben a pH_0 7,35-ről 5,5-re való csökkentése nem befolyásolta az inaktivációs kinetikát, a $pH_0=5,5$ -n mért inaktivációs időállandó a $pH_0=7,35$ -n mért érték $97,4 \pm 3,2$ %-a volt ($n=13$, $p=0,425$, 14A ábra). 40 mM K-ECS-ben ugyanakkor a pH_0 hasonló csökkentése az inaktiváció gyorsulását eredményezte, az inaktivációs időállandót a kontroll ($pH_0=7,35$ -n mért) érték $84,9 \pm 2,7$ %-ára ($n=15$, $p<0,0001$) csökkentette (14B ábra). Annak érdekében, hogy az eredmények összehasonlíthatók legyenek a 150 mM KF-ot tartalmazó pipettatöltő oldattal hasonló extracelluláris oldatok alkalmazásakor kapott eredményekkel, a mért áramgörbét alternatív módszerrel (area/peak ratio) is kiértékeljük. 20 mM K-ECS oldatban az extracelluláris pH csökkentése az APPR értékét nem változtatta meg hasonlóan az áramgörbék illesztésével kapott eredményekhez, $pH_0=5,5$ -n az APPR a $pH_0=7,35$ -n mért érték $101,7 \pm 1,9$ %-ának adódott ($n=13$, $p=0,404$, 14D ábra). 40 mM K-ECS oldatban az extracelluláris pH hasonló csökkentése az APPR értékét a kontroll érték $93,0 \pm 2,1$ %-ára csökkentette ($n=15$, $p=0,005$, 14D ábra).

Amennyiben a sejtet 5 mM K^+ tartalmú pipettatöltő oldat alkalmazása mellett 150 mM K-ECS oldattal perfundáltuk, kétfázisú inaktivációs kinetikát kaptunk, az inaktivációs időállandók 1186 ± 217 ms és 131 ± 30 ms ($n=3$) voltak, a lassan inaktíváló komponens súlyfaktora pedig $0,51 \pm 0,02$ ($n=3$) volt. Az extracelluláris pH 7,35-ről 5,5-re való csökkentése az inaktivációs kinetika gyorsulását eredményezte (14C ábra), azonban az inaktivációs időállandók nem változtak szignifikánsan [$\tau_{s,5,5}/\tau_{s,7,35}=122,0 \pm 29,0$ % ($p=0,527$), $\tau_{f,5,5}/\tau_{f,7,35}=84,6 \pm 10,3$ % ($p=0,273$), ($n=3$)]. A lassan inaktíváló áramkomponens amplitúdója (A_s) a kontroll $47,9 \pm 6,3$ %-ára csökkent ($n=3$, $p=0,014$), míg a gyorsan inaktíváló komponens amplitúdója nem változott (A_f : $99,3 \pm 5,6$ %, $n=3$, $p=0,908$). A lassan inaktíváló komponens súlyfaktora $pH_0=5,5$ -n a $pH_0=7,35$ -n mért értéknél jóval kisebb, $0,378 \pm 0,020$ volt. A lassan inaktíváló komponens súlyfaktorának csökkenése magyarázza az inaktiváció pH_0 csökkentésének hatására bekövetkező gyorsulását. A kapott áramgörbét természetesen az „area/peak ratio” módszerrel is kiértékeljük, az APPR értéke $pH_0=7,35$ -n $271,3 \pm 16,8$ ms volt, amely $pH_0=5,5$ -n a kontroll $76,6 \pm 3,2$ %-ára csökkent ($n=3$, $p=0,018$, 14D ábra).

5.2 A *Centruroides elegans* skorpió mérgéből izolált peptidok Kv1.3 csatornákra gyakorolt hatásának vizsgálata

5.2.1 A *Centruroides elegans* peptidok szétválasztása, szekvenálása

A *Centruroides elegans* skorpió venomjának Sephadex G-50 oszlopon történő szétválasztása során nyert 3 frakció közül az egerekre egyedül toxikus II. frakció komponenseit CMC oszlopon választottuk szét. Az így nyert szubfrakciók közül Noxiustoxin (NTx) ellenes antitestek a II-9, II-10 és II-11 szubfrakciókhoz kötődtek, tehát ezen szubfrakciók noxiustoxinhoz hasonló szerkezetű fehérjéket tartalmaztak. E három szubfrakciót HPLC-vel további alfrakciókra bontottuk. A II-9 frakcióból 3 noxiustoxinhoz hasonló szerkezetű peptidet izoláltunk, melyeket Ce1, Ce2, ill. Ce3 –nak neveztünk el. A II-10 frakcióból a Ce4, a II-11 frakcióból pedig a Ce5 jelű peptidet nyertük. A 15. ábra az így nyert peptidok (Ce1-Ce5) aminosav-szekvenciáját mutatja. A peptidok tömegspektrométerrel meghatározott molekulatömege rendre 4255, 4267, 4249, 4295 és 4255 atomi tömegegység.

	10	20	30
Ce1	TVINVKCTSPKQCLKPKDLYGPHAGAKCMNGKCKCYNN		
Ce2	TIINVKCTSPKQCLKPKDLYGPHAGAKCMNGKCKCYNN*		
Ce3	IFINVKCSLPQQCLRPCKDRFGQHAGGKCINGKCKCYP		
Ce4	TIINVKCTSPKQCLLPCKEIIYGIHAGAKCMNGKCKCYKI*		
Ce5	TIINVKCTSPKQCLPPCKEIIYGRHAGAKCMNGKCHCSKI*		

15. ábra A Ce 1-5 toxinok aminosav-szekvenciája

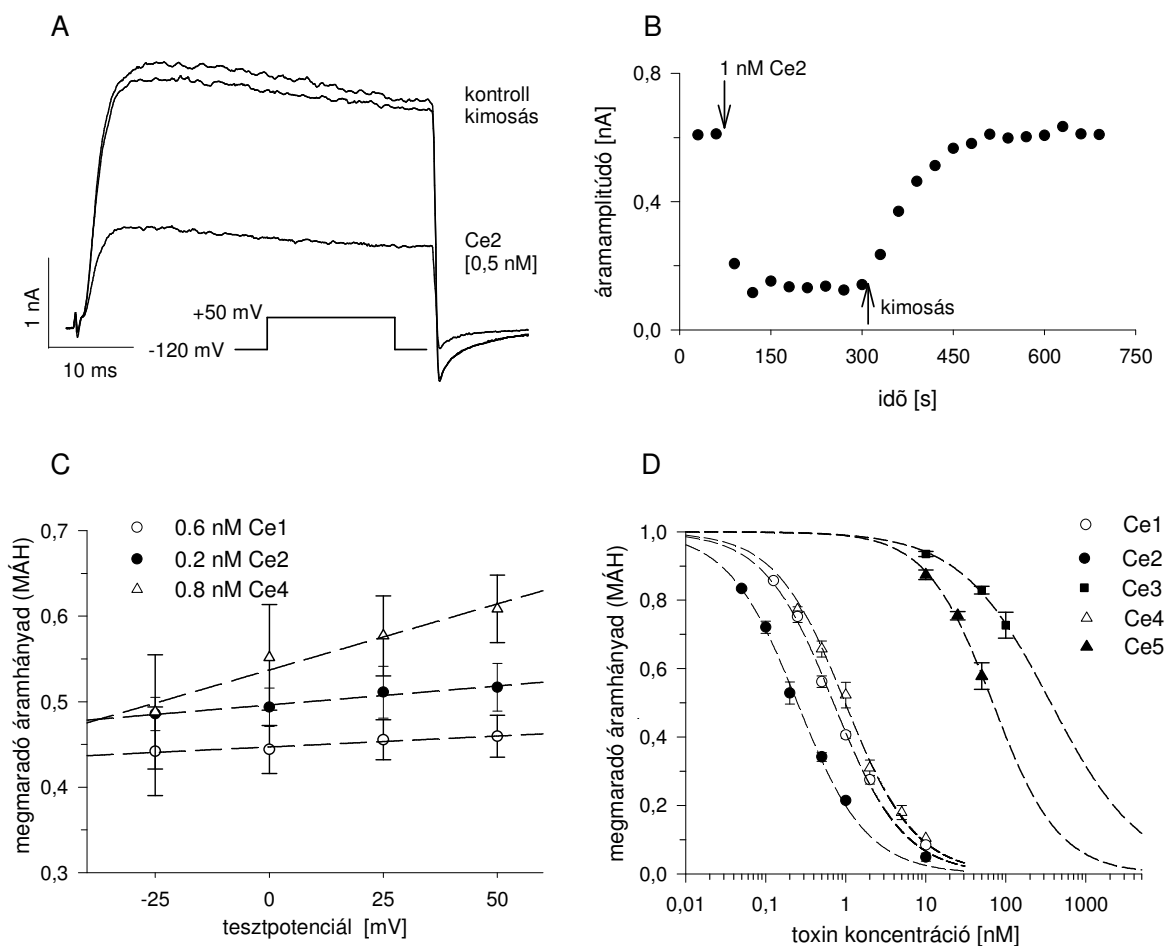
A peptidok aminosav-szekvenciáinak a többi skorpiótoxin szekvenciájával való összehasonlítása alapján a Ce1...Ce5 peptidok az α -KTx 2 családba (a család alapvagyülete a Noxiustoxin) tartoznak, szisztematikus nevük rendre α -KTx 2.8, α -KTx 2.9... α -KTx 2.12. Aminosav-szekvenciájuk a Noxiustoxinnal 59-87 %-os homológiát mutat. A Ce1 és Ce2 toxinok mutatják a legnagyobb egyezést a Noxiustoxinnal, csak 5 ill. 4 aminosavban térnek el attól. A Ce4 szekvenciája már nagyobb eltérést mutat, 7 aminosavban különbözik az NTx-től.

Ezzel szemben a Ce3 és Ce5 peptidok szekvenciája nagyobb különbözőséget mutat, 9 ill. 15 aminosavban térnek el az NTx-től.

5.2.2 A Ce1, Ce2 és a Ce4 toxinok a Kv1.3 csatornák hatékony gátlószerei

A tisztított peptidtoxinok Kv1.3 csatornákra gyakorolt gátló hatását humán perifériás vérből izolált T lymphocytákon vizsgáltuk patch-clamp technika segítségével. Először 10 nM koncentráció mellett vizsgáltuk a toxinokat, a gátló hatást a teljes-sejt káliumáram +50 mV-os tesztpotenciálon toxin jelenlétében mért százalékos csökkenésével jellemeztük. A Ce1, Ce2 és Ce4 toxinok a Kv1.3 csatornák áramának 85-95 %-át gátolták, míg a Ce3 és Ce5 toxinok az áram kevesebb, mint 15%-át ($6,5 \pm 0,7\%$ a Ce3, és $12,6 \pm 1,4\%$ a Ce5 esetén). Részletesen csak a Kv1.3 csatornákat hatékonyan blokkoló három peptidet vizsgáltuk.

A 16. ábra a Ce toxinok lymphocyták Kv1.3 áramára gyakorolt hatását mutatja be. Az alkalmazott kísérleti körülmények között a mért teljes-sejt áram teljes egészében a Kv1.3 csatornákon átfolyó áramnak felel meg (Péter és *mtsai*, 2001). Az 16. ábra A panelje a toxinmentes oldatban (kontroll) és a 0,5 nM Ce2 toxin jelenlétében az egyensúlyi gátlás kialakulása után lymphocytán mért teljes-sejt áramokat mutatja be. A toxin az alkalmazott kísérleti körülmények között a kontroll áram kb. 65 %-át gátolta. A sejt toxinmentes oldattal történő perfúziójával a toxinhatás teljesen kimoshatónak bizonyult. Az ábra a teljes kimosódás után mért áramgörbét is mutatja. Hasonló eredményeket kaptunk a Ce1 és Ce4 toxinok esetén is, azzal a különbséggel, hogy ezek kisebb mértékben gátolták a Kv1.3 csatornákat, mint a Ce2. Az 16. ábra B panelje mutatja be a Ce2 toxin bemosódási és kimosódási kinetikáját. Az egyensúlyi blokk közel félhatásos koncentrációban a toxintartalmú oldat perfúzióját követően 60-90 másodperccel alakul ki. A blokk utáni teljes kimosódás a toxinmentes oldattal történő perfúzió kezdete után 180 és 210 s között történik meg. A ki- és bemosódási kinetikák pontosabb meghatározását lehetetlenné tette az, hogy az egyes depolarizáló impulzusok között 30 másodpercnek kellett eltelnie, mivel a Kv1.3 csatornák a depolarizáció során kialakult inaktívált állapotukból igen lassan térnek vissza a zárt állapotba (Cahalan és *mtsai*, 1985). Az 16. ábra C részén a három hatásos Ce toxin által okozott blokk feszültségfüggése látható. Mindhárom toxin esetében kismértékű feszültségfüggés figyelhető meg, az áramblokkoló hatás pozitívabb tesztpotenciáloknál kisebb.



16. ábra A Ce1, Ce2, és Ce4 toxinok nagy affinitással gátolják a humán T lymphocyták Kv1.3 áramait

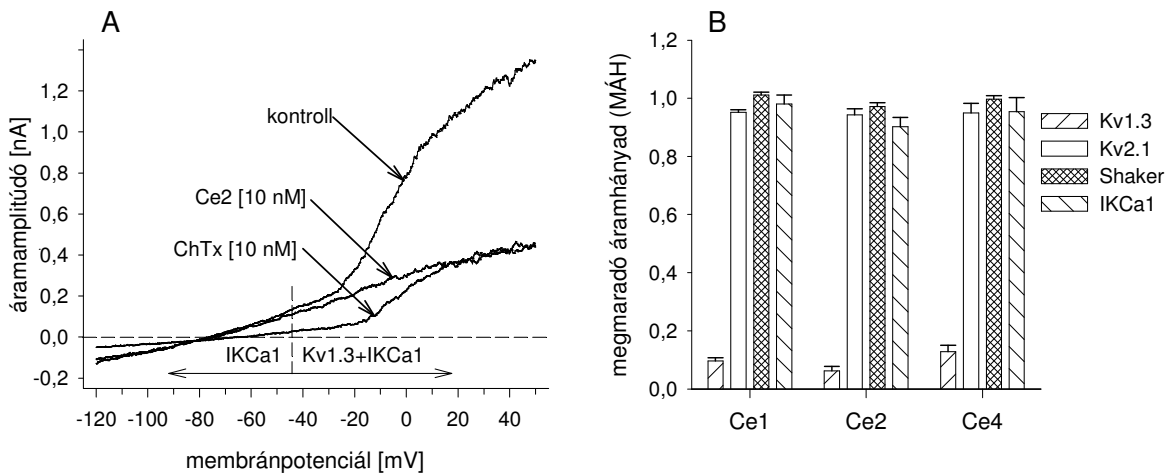
(A) A humán perifériás T lymphocyták K^+ áramait teljes-sejt konfigurációban mértük, a sejteket -120 mV tartófeszültségről 40 ms időtartamra $+50$ mV-ra depolarizáltuk, az egymást követő depolarizáló impulzusok között 30 másodperc telt el. A sejteket folyamatosan perfundáltuk. Az ábra a kontroll körülmények között, a $0,5$ nM Ce2 toxin jelenlétében és a toxinmentes kontroll oldattal történő kimosás után mért áramgörbéket mutatja. (B) A Ce2 által okozott blokk kialakulásának és a toxin kimosódásának időkinetikája. A feszültségprotokoll és a kísérleti körülmények az A panelen bemutatott kísérletnél alkalmazottakkal azonosak. Az ábrán az áramamplitúdó időbeli változását ábrázoltuk. A nyilak az 1 nM Ce2 toxint tartalmazó oldat alkalmazásának kezdetét és végét mutatják. (C) A Kv1.3 áram gátlásának feszültségfüggése. A sejteket -120 mV-os tartófeszültségről 150 ms időtartamra a megadott tesztpotenciálokra depolarizáltuk, az egyes tesztimpulzusok között 50 másodperc telt el. A megmaradó áramhányadot (MÁH) az I/I_0 képlettel számítottuk, ahol I_0 a kontroll körülmények között, I pedig a toxin jelenlétében mért csúcsáramot jelenti. A hibajelek a középérték közepes hibáját (SEM) mutatják ($n=4-5$). (D) A Ce1-5 toxinok által okozott Kv1.3 csatorna gátlás dózis-hatás görbéi. Az egyes toxinkoncentrációknál kiszámított megmaradó áramhányadot a koncentráció függvényében ábrázoltuk (Ce1: üres körök, Ce2: teli körök, Ce3: teli négyszög, Ce4: üres háromszög, Ce5: teli háromszög). A feszültségprotokoll és a kísérleti körülmények az A panelen bemutatott kísérletnél alkalmazottakkal azonosak. A szaggatott vonalak az adatpontokra legjobban illeszkedő Hill-függvényeket mutatják: $MÁH = A \times K_d^n / (K_d^n + [Tx]^n)$, ahol $[Tx]$ a toxinkoncentrációt, K_d disszociációs állandót, n a Hill koefficiens, A pedig a toxinmentes oldatban mért relatív áramamplitúdót jelenti. A legjobban illeszkedő függvények paraméterei: $K_d = 0,71$ nM és $n = 0,98$ a Ce1, $K_d = 0,25$ nM és $n = 0,96$ a Ce2, $K_d = 366$ nM és $n = 0,77$ a Ce3, $K_d = 0,98$ nM és $n = 0,95$ a Ce4, ill. $K_d = 69$ nM és $n = 1,05$ a Ce5 toxin esetén. Az A értéke minden esetben 1 volt. A hibajelek a középérték közepes hibáját (SEM) jelenti ($n=3-6$).

Az ábra D része az öt vizsgált peptid dózis-hatás görbét mutatja be Kv1.3 csatornára. A Ce1, Ce2 és Ce4 hatását 0.01-10 nM koncentrációtartományban vizsgáltuk, az adatpontokra 3 paraméteres Hill függvényt illesztettünk (a részleteket lásd az ábraszövegben). A disszociációs konstans (K_d) és Hill koefficiens értéke a Ce1 esetén 0,71 nM és 0,98, a Ce2 esetén 0,25 nM és 0,96, a Ce4 esetén 0,98 nM és 0,95. A Ce3 és Ce5 peptidek esetén a kicsiny blokkoló hatás miatt a teljes-dózis hatás görbe meghatározása nem volt lehetséges, mivel olyan nagy mennyiségű toxin lett volna szükséges hozzá, amely nem állt rendelkezésre. A meglévő adatpontokra illesztett dózis-hatás görbe alapján a K_d és a Hill koefficiens értéke a Ce3 esetén 366 nM és 0,77, míg Ce5 esetén 69 nM és 1,05.

5.2.3 A Ce1, Ce2 és a Ce4 toxinok szelektíven blokkolják a Kv1.3 csatornákat

A humán lymphocyták aktivációjában a Kv1.3 mellett fontos szerepet játszanak a Ca^{2+} aktivált K^+ csatornák családjába tartozó IKCa1 csatornák is (Chandy és *mtsai*, 2004). Mivel a Kv1.3 és IKCa1 csatornák blokkolása különbözőképpen gátolja az egyes T lymphocytá-altípusok proliferációját (Wulff és *mtsai*, 2003b), fontosnak tartottuk a Ce toxinok hatásának tesztelését IKCa1 csatornákon is. A pipettatöltő folyadék szabad Ca^{2+} koncentrációját ezen kísérletekben 1 μ M-ra állítottuk be, amely az IKCa1 csatornák teljes aktivációját okozza, így lehetővé vált a toxinok IKCa1 csatornákra gyakorolt hatásának tesztelése (Grissmer és *mtsai*, 1993). Az alkalmazott, -120 mV-tól $+50$ mV-ig terjedő feszültségrámpa protokollokkal a Kv1.3 csatornák aktivációs küszöbénél alacsonyabb feszültségeken mért áramok kizárólag az IKCa1 csatornáknak tulajdoníthatóak. Az IKCa1 csatornákra kifejtett gátló hatás a mért áramgörbék kezdeti, a Kv1.3 csatornák aktivációs küszöbénél alacsonyabb feszültségeknél megfelelő, egyenes szakaszára illesztett egyenesek meredekségének változása alapján számolható ki (Grissmer és *mtsai*, 1993). A 17A ábrán látható, hogy a kontroll körülmények között és a 10 nM Ce2 jelenlétében mért áramgörbék kezdeti egyenes szakaszának meredeksége lényegében azonos. Ezzel szemben 10 nM ChTx az áramgörbék kezdeti szakaszának meredekségét lényegesen csökkentette. Ennek megfelelően kísérleteink során pozitív kontrollként a ChTx-t alkalmaztuk. A ChTx 10 nM koncentrációban az áramgörbék kérdéses szakaszának meredekségét a kontroll érték 54 ± 9 %-ára csökkentette ($n=3$). A 17A ábrán látható, hogy 10 nM Ce2 toxin a Kv1.3 csatornák áramát (az áramgörbének a jobb oldali, a Kv1.3 csatornák aktivációs küszöbénél pozitívabb membránpotenciál értékeknek megfelelő szakasza) jelentősen gátolta, annak megfelelően,

hogy a Kv1.3 csatornákra vonatkozó K_d értéke 0.25 nM. A 10 nM ChTx jelenlétében a pozitív membránpotenciál értékeknél mért áramcsökkentő hatás egyrészt a Kv1.3, másrészt az IKCa1 csatornák áramának blokkolásából adódik [$K_d \sim 3$ nM a Kv1.3 csatornákra, ill. 5 nM az IKCa1 csatornákra (Chandy és mtsai, 2004)]. A Ce1 és Ce4 toxinok szintén nem blokkolták az IKCa1 csatornákat (lásd 17B ábra).



17. ábra A Ce toxinok farmakológiai jellemzői

(A) A Ce2 toxin nem gátolja a humán perifériás T lymphocyták IKCa1 áramait. A teljes-sejt áramokat feszültséggrampa protokoll (-120 mV-től +50 mV-ig 1,176 mV/ms sebességgel) alkalmazása során rögzítettük. A sejteket -80 mV-on tartottuk és az egymást követő feszültséggrampa impulzusok között 30 másodperc telt el. Az áramgörbék függőleges szaggatott vonaltól (a Kv1.3 csatornák aktivációs küszöbe) balra eső szakasza az IKCa1 csatornák áramát reprezentálja, míg a szaggatott vonaltól jobbra eső szakasz az IKCa1 és a Kv1.3 csatornák áramának összegét mutatja. Az IKCa1 csatornák gátlásának hatásosságát a görbék meredekségének változásából határoztuk meg. Pozitív kontrollként 10 nM charybdotoxint alkalmaztunk, mely gátolja mind a Kv1.3, mind pedig az IKCa1 csatornákat. (B) Az egyes *C. elegans* toxinfrakciók hatása Kv1.3, rKv1.2, Shaker IR és IKCa1 csatornákra. A Kv1.3 és IKCa1 áramokat humán perifériás T lymphocytákban mértük a korábban már leírt módszerrel. A teljes-sejt rKv2.1 és Shaker IR áramokat a megfelelő csatornát kódoló plazmidokkal transzfektált HEK293 sejtekben mértük. A sejteket -120 mV-os feszültségen tartottuk és +50mV-os, 40 ms (Shaker IR) ill. 90 ms (rKv1.2) hosszú tesztimpulzusokat alkalmaztunk. Az ábrán a 10 nM Ce1, Ce2 és Ce4 toxin jelenlétében mért megmaradó áramhányadot (MÁH) tüntettük fel. A hibajelek a középérték közepes hibáját (SEM) jelentik (n=3-5).

A Ce toxinok szelektivitását HEK 293 sejtekben transzfektált Kv2.1 ill. Drosophila Shaker IR csatornákon vizsgáltuk. A 17B ábra foglalja össze a 10 nM Ce1, Ce2, ill. Ce4 jelenlétében kapott eredményeket. Az ábrán látható, hogy a Shaker IR csatornák esetén a +50 mV tesztpotenciálon mért megmaradó áramhányad mindhárom peptid esetén 1-hez közeli érték. Kv2.1 csatornák esetén hasonló körülmények között az áram kismértékű csökkenését tapasztaljuk.

6 MEGBESZÉLÉS

6.1 A Kv1.3 csatornák inaktivációjának pH-függő szabályozása: a His399 szerepe

Számos tanulmány vizsgálta az extracelluláris pH és a lassú inaktiváció közötti összefüggést több különböző káliumcsatorna esetén. A vad típusú Kv1.3 csatorna kivételével az összes vizsgált káliumcsatornánál az extracelluláris pH csökkentése a lassú inaktiváció gyorsulását eredményezte. López-Barneo és munkatársai a vad típusú *Shaker* csatorna és több T449 mutáns *Shaker* csatorna esetén is hasonló eredményeket kaptak, a legkifejezettebb gyorsulást pedig a T449H mutáns esetén tapasztalták (López-Barneo és *mtsai*, 1993). Starkus és *mtsai* is hasonló eredményeket kaptak (Starkus és *mtsai*, 2003). A pH csökkentés lassú inaktivációra gyakorolt hatásának pK értéke *Shaker* csatornák esetén 4,7, amely alapján az inaktiváció pH-függő változása valószínűleg egy, a csatorna extracelluláris szájadéka közelében elhelyezkedő savas aminosav-oldallánc (pl. Asp447) titrálásának az eredménye. Az extracelluláris pH csökkentése a Kv1.4 és Kv1.5 csatornák esetén is az inaktiváció gyorsulását eredményezte (Steidl és Yool, 1999; Zhang és *mtsai*, 2003; Claydon és *mtsai*, 2002).

Jelen tanulmányban a 399-es helyzetű hisztidin szerepét vizsgáltuk a Kv1.3 csatornák inaktivációjának pH_o-függő szabályozásában. Ennek érdekében olyan mutáns csatornákat hoztunk létre, amelyek a 399-es helyzetben neutrális (L, V, Y), ill. pozitívan töltött (K, R) aminosavat tartalmaznak és ezen mutáns csatornák tulajdonságait hasonlítottuk össze a vad-típusú csatornákéval. Vizsgáltuk az extra- és intracelluláris káliumkoncentráció és az ionerősség változtatásának az inaktivációs kinetikára gyakorolt hatását, valamint a báriumionok csatornapórusba való bemosódásának és onnan való kimosódásának sebességét.

6.1.1 A vad típusú és mutáns Kv1.3 csatornák karakterizálása: a membránfelszíni töltésárnékolás szerepe és az aktiváció és inaktiváció kapcsolása

Az egyensúlyi aktiváció alacsony extracelluláris pH-n történő, pozitív membránpotenciálok irányába való eltolódását humán perifériás T lymphocytákon Deutsch és Lee már korábban leírták (Deutsch és Lee, 1989). Az extracelluláris pH 7,4-ről 5,5-re való csökkentése ezen sejteken a Kv1.3 csatornák aktivációs küszöbét 35 mV-tal a pozitívabb

membránpotenciálok irányába tolta el, az eltolódás a membránfelszíni töltésárnyékolással volt magyarázható. A humán perifériás T lymphocytaikon mért értékek hasonlóak a CTLL-2 sejtekben expresszált Kv1.3 csatornák esetén általunk mért értékekhez, kísérleteinkben a pH csökkentése a G-V görbét jellemző $V_{1/2}$ értékeket 30 mV-tal tolta el a pozitívabb membránpotenciálok irányába. A 399-es helyzetű hisztidin neutrális aminosavra való cseréje normál pH-n nem befolyásolja az egyensúlyi aktivációt és a pH csökkentésekor bekövetkező feszültség eltolódás is változatlan. Ezzel szemben a 399-es helyzetben pozitív töltésű aminosavat (arginin vagy lizin) tartalmazó mutánsok esetén normál pH-n a G-V görbék pozitívabb membránpotenciálok irányába való eltolódását és a görbék meredekségének csökkenését (a görbe ellaposodását) tapasztaljuk. A görbék eltolódása a hKv1.5 csatornák esetén tapasztaltakhoz hasonló annak megfelelően, hogy ezen csatornák ekvivalens pozícióban arginint tartalmaznak (Kehl és mtsai, 2002). Ezen eredmények felvetik a pórus és a kapuzásért felelős struktúrák közötti interakció lehetőségét, amelyet Molina és mtsai más szempontból korábban már vizsgáltak (Molina és mtsai, 1998). Az extracelluláris pH csökkentésekor eltűnnek a 399-es helyzetben neutrális ill. pozitív töltésű aminosavat tartalmazó mutánsok G-V görbéi között normál pH-n észlelt különbségek.

Az egyensúlyi aktiváció extracelluláris pH csökkentésekor észlelt eltolódása magyarázhatja az aktivációs kinetika lassulását és az áramamplitúdó csökkenését olyan tesztpotenciálokra, ahol a különböző pH_o -n felvett G-V görbék jeletősen eltérnek egymástól, azonban az inaktivációs kinetika S-ECS oldatban alacsony pH-n mért lassulása nem lehet ennek a következménye. Ezen következtetésünket több érv is alátámasztja: 1. Bár az aktiváció és az inaktiváció kapcsolt folyamatok, a sebességükben megfigyelhető néhány százszoros különbség elvileg kizárja a lehetőségét annak, hogy alacsony pH-n a lassabb aktivációs kinetika az inaktivációs kinetika lassulását eredményezze. 2. A Kv1.3 csatornák inaktivációjának sebessége feszültség-független azon membránpotenciálokra, ahol az áram aktivációs kinetikája gyors. A kísérletek zömét +50 mV tesztpotenciálon végeztük, ahol a G-V görbék pH_o -tól függetlenül maximális értéket mutatnak, azaz az áram aktivációs kinetikáját a csatorna nyitását jellemző nagyon gyors sebességi állandó határozza meg, a zárás sebességi állandója elhanyagolható. Ilyen tesztpotenciálon az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggésének eltolódása nem befolyásolja az inaktivációs kinetikát. 3. A G-V görbék pozitív membránpotenciálok irányába történő eltolódása nagyobb volt magas ionerősségű (HIS) oldatban, mint a pH 5.5-re való csökkentésekor. Ennek ellenére azonban HIS oldatban az inaktivációs kinetika változatlanságát vagy gyorsulását tapasztaltuk a vad típusú és a mutáns csatornák esetén egyaránt. Összességében tehát az inaktivációs kinetika alacsony

pH₀-n mért lassulását a pH₀ változtatásának az inaktivációra gyakorolt közvetlen hatása okozza.

6.1.2 A vad- típusú és H399 mutáns csatornák karakterizálása: az inaktiváció pH-függése

Jól ismert, hogy a *Shaker* csatornában a 449-es helyzetű aminosav minősége jelentősen befolyásolja az inaktivációs kinetikát (López-Barneo és *mtsai*, 1993). Kísérleteinkben ezen tapasztalatokkal összhangban azt tapasztaltuk, hogy Kv1.3 csatornák esetén a *Shaker* csatornák 449-es aminosavával ekvivalens pozíciójú hisztidin (H399) más aminosavra való cseréje jelentősen megváltoztatja az inaktivációt. A vad-típusú és mutáns csatornák inaktivációs kinetikáinak közvetlen összehasonlítása nem volt lehetséges, mivel a mutáns csatornák kétfázisú inaktivációt mutattak, az áramgörbék leszálló szárjai két exponenciális tagot tartalmazó függvény segítségével voltak illeszthetőek, míg a vad-típusú csatornák egyfázisú inaktivációs kinetikát mutattak, melyet egy exponenciális tagot tartalmazó függvény segítségével illesztettünk (5. és 9. ábra). A H399L csatornák inaktivációjának sebessége összességében a vad-típusú csatornák pH=7,35-n mért inaktivációjához volt hasonló, ezért további kísérleteinkben ezt a mutánst használtuk a vad-típusú Kv1.3 csatorna pH₀=7,35 melletti viselkedésének modellezésekor. Ezen pH₀ értéken a H399 zömében töltetlen, hasonlóan a H399L mutánsban kulcspozícióban lévő leucinhez. A H399R és H399K mutánsok szignifikánsan lassabb inaktivációs kinetikát mutattak, erősítve azt az elképzelést, miszerint ebben a pozícióban a töltött aminosavak lassítják az inaktivációt. Ez ellentétes a *Shaker* csatornák esetén tapasztaltakkal, ahol a kérdéses pozícióban töltött aminosavat tartalmazó mutánsok inaktivációs kinetikája nagyon gyors volt (López-Barneo és *mtsai*, 1993). A 399-es pozícióban permanens pozitív töltéssel rendelkező mutánsok közül a H399K mutáns választottuk a további kísérleteinkben, mivel a lizin rövidebb oldallánccal rendelkezik, mint az arginin és így valószínűleg kisebb a fellépő sztérikus hatás. A H399K mutánssal a vad-típusú Kv1.3 csatorna pH₀=5,5 melletti viselkedését modelleztük, mivel ezen a pH₀-n a hisztidin az idő nagy részében pozitív töltéssel rendelkezik. A többi két, neutrális aminosavat tartalmazó mutáns (H399Y és H399V) inaktivációja a hasonló *Shaker* mutánsoknál tapasztaltakkal egyezően (López-Barneo és *mtsai*, 1993) igen lassú volt. Az egyes mutánsok inaktivációs kinetikájában tapasztalt különbségek megfelelnek az ekvivalens mKv1.3 mutánsoknál tapasztaltaknak (Nguyen és *mtsai*, 1996). Az a tény, hogy a *Shaker* T449H mutáns a pH csökkentésre ellentétesen viselkedik, mint a vad-típusú Kv1.3 csatorna,

továbbá, hogy a pozitívan töltött aminosavat tartalmazó Kv1.3 és *Shaker* mutánsok inaktivációja jelentősen különbözik, ugyanakkor a valint és tirozint tartalmazó mutánsok inaktivációja mindkét csatorna esetén igen lassú, azt mutatják, hogy az inaktiváció sebességét nem egyedül a 399-es (*Shaker* csatornában 449-es) pozíciójú aminosav tulajdonságai határozzák meg. Számos tanulmány bizonyította egyéb, a pórus közelében elhelyezkedő aminosav-oldalláncok lassú inaktivációra gyakorolt hatását. Ilyen aminosavak például a *Shaker* csatornában 425-ös helyzetű, az ún. „turret” régióban elhelyezkedő fenilalanin (Perez-Cornejo, 1999b), illetve a Kv1.5 csatornában az ekvivalens pozícióban lévő His463 (Kehl és mtsai, 2002), valamint a hKv1.3 csatornák S6 hélixében elhelyezkedő Ala413 (Panyi és mtsai, 1995) és az mKv1.3 pórusrégiójában lévő Asp386 (Nguyen és mtsai, 1996).

Amennyiben a sejtet $pH_o=5,5/S$ -ECS-sel perfundáltuk, a vad típusú Kv1.3 csatorna inaktivációja lassult, ezzel szemben hasonló kísérleti körülmények között az összes mutáns csatorna esetén az inaktivációs kinetika gyorsulását tapasztaltuk (5. és 9. ábra). Az inaktiváció sebességének növekedése mutáns csatornák esetén a gyorsan inaktiválódó komponens szignifikánsan gyorsabb kinetikájának volt köszönhető. Ez alól kivétel a H399Y csatorna, ahol az inaktivációs időállandó nem csökkent szignifikánsan. A kinetika gyorsulásához hozzájárult továbbá a lassan inaktiválódó komponens áramamplitúdójának csökkenése, amely a H399Y kivételével minden mutáns esetén megfigyelhető volt (3. táblázat). Az inaktiváció gyorsulásának mechanizmusát jelen kísérleteinkben nem vizsgáltuk, azonban valószínűleg a *Shaker* csatornacsalád több tagja esetén már leírt jelenségről van szó, melynek háttérében Starkus és mtsai a szelektívítási filterben elhelyezkedő aszpartátoldallánc szerepét valószínűsítik (Starkus és mtsai, 2003). Az áramamplitúdó a H399Y csatornák kivételével az összes mutáns és a vad típusú csatorna esetén csökkent alacsony pH_o -n. Vitatott kérdés az, hogy az áramamplitúdó csökkenésében az inaktivációs kinetika változása szerepet játszik-e. *Shaker* csatornák esetén az áramamplitúdó csökkenést a gyorsabb inaktiváció következményének tartják (Starkus és mtsai, 2003), ugyanakkor hKv1.5 csatornákon végzett kísérletek azt igazolták, hogy a gyorsabb inaktivációs kinetika önmagában nem okozhatja az áramamplitúdó csökkenését (Kehl és mtsai, 2002).

6.1.3 Magas extracelluláris $[K^+]$ hatása az inaktiváció pH-függő lassulására a vad-típusú Kv1.3 csatornák esetén

Az irodalomból jól ismert, hogy az extracelluláris $[K^+]$ növelése a *Shaker* családba tartozó csatornák inaktivációjának lassulásához vezet (López-Barneo és *mtsai*, 1993; Grissmer és Cahalan, 1989; Baukrowitz és Yellen, 1995). Magas extracelluláris $[K^+]$ ugyanakkor megváltoztatta a vad-típusú csatorna extracelluláris pH csökkentésére adott válaszát, ugyanis ilyen körülmények között az extracelluláris pH csökkentése az inaktivációs kinetika gyorsulását eredményezte. Az inaktivációs kinetika gyorsulásának érdekessége az volt, hogy az időállandók lényegében változatlanul maradása mellett a gyorsabban inaktiválódó komponens relatív súlyának növekedése tehető felelőssé a jelenségért. A csatorna S-ECS-ben és K-ECS-ben való ellentétes viselkedése háttérnek pontosabb tanulmányozása érdekében köztes $[K^+]_i$ esetén is elvégeztük a kísérletet. Mivel a 20 mM és 40 mM K-ECS-ben mért áramgörbéket sem egy-, sem pedig két exponenciális tagot tartalmazó függvény segítségével sem lehetett illeszteni, egy alternatív kiértékelési módszert kellett választani. Ennek során az inaktiválódó áramhányadnak megfelelő görbe alatti terület és az inaktiválódó áram amplitúdójának hányadosával jellemeztük az inaktiváció sebességét. A képzett hányadost annak angol nevéből (area/peak ratio) APPR-nek neveztük el. Ennek a módszernek az a nagy előnye, hogy az inaktiváció sebességét egyetlen számértékkel jellemzi, szemben a két exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel való illesztéssel, ahol az inaktiváció sebességét több adat jellemzi egyszerre (A_f , A_s , τ_s , τ_f , $A_s/(A_s + A_f)$), és ezek értelmezése esetenként (különösen azok ellentétes irányú változásakor) igen nehézkes. A módszer megbízhatóságát jelzi, hogy az S-ECS-ben regisztrált áramgörbék ezen módszerrel való kiértékelése során nyert adatok az áramgörbék illesztésével kapott értékekkel jó egyezést mutatnak. Nagy előny ugyanakkor, hogy az egy ill. kétfázisú inaktiváció változása is közvetlenül összehasonlítható. A köztes $[K^+]_o$ mellett kapott eredményekből megállapítható, hogy 40 mM K-ECS-ben az inaktiváció inszenzitív a pH_o csökkentésére, míg 20 mM $[K^+]_o$ mellett az inaktiváció lassulása figyelhető meg a pH_o csökkenésekor.

Kv1.3 csatornák esetén leírtak számos olyan, az inaktivációs kapuzást jellemző paramétert, melyek egyszerűen az extracelluláris $[K^+]_o$ -tól függnék, a K^+ koncentrációval monoton változnak. Ilyen pl. az inaktiváció sebességének (Baukrowitz és Yellen, 1995) valamint az inaktivációból történő visszatérés K_o függése (Levy és Deutsch, 1996). Ezzel szemben a különböző $[K^+]_o$ mellett a pH_o csökkentésekor kapott eredmények nem

magyarázhatók egy egyszerű, pusztán a $[K^+]_o$ -tól függő kötőhely telítettség változással, ugyanis a koncentráció-függés nem monoton.

6.1.4 Modell: A K^+ és a 399-es helyzetű aminosavoldallánc közötti elektrosztatikus kölcsönhatás szerepe

Az eddigi eredmények alapján egy munkahipotézist állítottunk fel, melynek segítségével a kapott kísérleti eredmények értelmezhetőek. Ennek lényege, hogy a 399-es helyzetű aminosav töltött oldalláncai egy olyan elektrosztatikus potenciálgátt hoznak létre, amely akadályozza a K^+ -ok mozgását az „external lock-in site” és az extracelluláris tér között. Az inaktiváció sebességét valószínűleg az „external lock-in site” telítettsége határozza meg (Kiss és *mtsai*, 1999; Kiss és Korn, 1998; Harris és *mtsai*, 1998). Minél telítettebb a kötőhely, annál lassabb az inaktiváció, annak megfelelően, hogy a K^+ kötődése akadályozza a csatornapórus inaktiváció során történő összeesését. A kötőhely K^+ -nal mind az extra-, mind pedig az intracelluláris tér felől töltődhet. A 399-es helyzetű töltéssel rendelkező aminosavoldallánccok elektrosztatikus erőtere akadályozza a K^+ kilépését a pórusból ami az intracelluláris tér felől való töltődés mértékét fokozza és így önmagában lassítja az inaktivációt. Ugyanakkor a töltött 399-es pozíciójú aminosav a K^+ kötőhely extracelluláris tér felől való töltődését csökkenti, aminek önmagában az inaktiváció gyorsulása lenne a hatása. Az, hogy az elektrosztatikus potenciálgát kialakulásakor az inaktivációt gyorsító vagy az azt lassító hatás dominál-e, az határozza meg, hogy az „external lock-in site” az extra- vagy az intracelluláris oldalról töltődik-e nagyobb mértékben. Amennyiben a kötőhely az intracelluláris oldal felől töltődik nagyobb mértékben (pl. S-ECS oldatban), az a kötőhely telítettségének nettó növekedését jelenti, vagyis az inaktiváció lassul. Ezzel szemben, ha a kötőhely extracelluláris tér felől való töltődése nagyobb mértékű (pl. K-ECS oldatban), a potenciálgát kialakulásakor az extracelluláris oldal felől való töltődés csökkenése dominál, s így a kritikus kötőhely K^+ telítettsége csökken, ami az inaktivációs kinetika gyorsulásában nyilvánul meg.

Modellünk helyességét több megfigyelés és célzott kísérleti eredmény is alátámasztja. Ezen eredmények egy része közvetlenül, más része követve utal modellünk helyességére. 1, $pH_o=7,35$ mellett a 399-es pozícióban permanens pozitív töltéssel rendelkező mutánsok (H399K, H399R) inaktivációja lassabb, mint a vad típusú, 399-es pozícióban töltetlen His-t tartalmazó csatornáké, ill. a töltetlen oldallánccal rendelkező mutáns csatornáké. 2, A töltött aminosavoldallánccal rendelkező mutánsok inaktivációja alacsony pH_o -n gyorsabb, mint

$pH_o=7,35$ mellett, ami szöges ellentétben áll a vad típusú csatorna viselkedésével. Ez a megfigyelés azt jelentheti, hogy az inaktiváció *Shaker* csatornák esetén alacsony pH_o -n látott gyorsulása mind a vad típusú, mind pedig a mutáns Kv1.3 csatornák esetén jelen lehet, azonban a vad-típusú csatornánál a hisztidinoldallánc töltésváltozása miatti hatások dominánsabbak. A H399K és H399R csatornák esetén a pH_o csökkentésekor egyébként nem változik meg ezen aminosavoldalláncok töltése, az inaktiváció ilyen körülmények közötti gyorsulásáért más, feltehetően a szelektivitási filterben létrejövő változások tehetők felelőssé (Starkus és *mtsai*, 2003) 3. A 399-es helyzetben pozitív töltésű aminosavoldalláncot tartalmazó csatornák (mutánsok vagy vad típus $pH_o=5,5$ mellett) inaktivációja érzékeny az extracelluláris ionerősség változásaira. 4. A 399-es helyzetben lévő pozitívan töltött aminosavoldalláncok lassítják a Ba^{2+} kijutását a pórusból az extracelluláris tér felé, ill. onnan a csatornapórusba való belépését. 5. Alacsony K^+ -tartalmú intracelluláris oldat alkalmazásakor az extracelluláris pH csökkentése nem okozott inaktiváció lassulást semmilyen $[K^+]_o$ esetén, mivel a befelé irányuló ionáram miatt a kötőhely töltődése döntően az extracelluláris tér felől történt.

A 3. 4. és 5. pontban felsorolt kísérletes bizonyítékok részletes tárgyalása a 4.1.5-4.1.7 fejezetekben található.

A kapott eredmények mind alátámasztják azt az elképzelést, miszerint a 399-es helyzetben lévő pozitívan töltött aminosavoldalláncok akadályozzák a K^+ extracelluláris tér és a csatornapórus közötti mozgását mindkét irányban.

6.1.5 A 399-es helyzetben elhelyezkedő pozitívan töltött aminosav jelenléte az inaktivációt érzékennyé teszi az ionerősség változtatására

A hisztidinek protonációjának inaktivációra gyakorolt hatását magas ionerősségű oldat alkalmazásával vizsgáltuk (11. ábra). Normál extracelluláris pH-n bár a steady-state áram növekedett, az inaktivációs kinetika nem változott meg az extracelluláris ionerősség növelésének hatására (11C ábra). Ez érthető, hiszen a hisztidinek protonációja ezen a pH-n elhanyagolható

A HIS oldat hatását vizsgáltuk a 399-es helyzetben semleges és pozitívan töltött aminosavat tartalmazó mutánsok esetén is $pH_o=7,35$ mellett (11D, E és F ábra). A kritikus pozícióban neutrális aminosavat tartalmazó H399L mutáns csatorna inaktivációját az ionerősség növelése nem befolyásolta (11E ábra), hasonlóan ahhoz, amit a vad-típusú csatornán $pH_o=7,35$ esetén tapasztaltunk. Ezzel szemben a pozitív töltésű aminosavat

tartalmazó H399K mutáns inaktivációját az ionerősség növelése gyorsította (11D ábra) annak megfelelően, hogy az elektrosztatikus potenciálgát leárnnyékolása elősegíti a K^+ ionoknak a pórusból az extracelluláris tér felé való kilépését, ami az „external lock-in site” káliumtelítettségének csökkenéséhez vezet.

A magas ionerősségű oldat nagy koncentrációban tartalmazott Mg^{2+} -ot, amelynek amellet, hogy csökkenti a lokális elektrosztatikus erőhatásokat, más, specifikus vagy nem-specifikus hatása is lehet a csatornák inaktivációjára. Az extracelluláris Mg^{2+} koncentráció növelése a csatornák egyensúlyi aktivációját a pozitívabb membránpotenciálok irányába toltta el, hasonlóan az alacsony pH-jú S-ECS oldatban tapasztaltakhoz. A jelenség hátterében a Mg^{2+} -ok által okozott membránfelszíni töltésárnnyékolás áll, ami mint nem-specifikus hatás befolyásolhatja a Kv1.3 inaktivációs kapuzását. Eredményeink szerint azonban a töltésárnnyékolás nem okozhat ilyen hatást. Egyrészt az alkalmazott tesztpotenciálok mellett (+50 mV) az aktivációs kinetika két nagyságrenddel gyorsabb mint az inaktivációs kinetika, ami a 6.1.1 fejezetben részletezetteknek megfelelően kizárja az inaktiváció sebességének aktivációs kinetika-függését. Másrészt kísérletesen is bizonyítottuk, hogy a töltésárnnyékolás nem okoz inaktivációs kinetika változást: az inaktiváció sebessége ugyanis +50 mV-on a vad típusú csatornák esetén S-ECS és HIS oldatokban nem különbözött szignifikánsan (11C ábra). Az irodalomban extracelluláris Mg^{2+} -ra vonatkozóan nem találtunk olyan utalást, hogy specifikus kölcsönhatáson keresztül módosítaná az inaktivációs kinetikát. Logikus kísérlet lett volna magas extracelluláris Ca^{2+} alkalmazásával növelni az ionerősséget, és ezzel az esetleges ionspecifikus hatásokat kiszűrni, azonban az extracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelése specifikusan, a töltésárnnyékolástól függetlenül módosítja a Kv1.3 inaktivációs kinetikáját (Grissmer és Cahalan, 1989).

6.1.6 A 399-es helyzetű pozitív töltésű aminosavoldallancok akadályozzák a bárium ionok mozgását az extracelluláris tér és a csatorna pórusa között

Kísérleteinkben a Kv1.3 csatornák inaktivációjának szabályozása szempontjából lényeges ún. „external lock-in site” K^+ telítettségét Ba^{2+} segítségével vizsgáltuk. A Ba^{2+} -ról korábban kimutatták, hogy a kálium ionokkal azonos helyekre kötődnek be az ionszelektív szűrőben (Neyton és Miller, 1988a; Hurst és *mtsai*, 1995), kötődésük azonban sokkal szorosabb, ezért a Ba^{2+} mozgása (asszociációja és disszociációja) az áram gátlása miatt elektrofiziológiai technikákkal követhető. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy mind a Ba^{2+} bemosási, mind pedig kimosási kinetikája lassabb alacsony extracelluláris pH-n (12. és 13.

ábra). Ez azzal magyarázható, hogy pH=5,5 esetén a kritikus pozícióban elhelyezkedő hisztidinoldallánccok protonálódnak, és az így kialakult elektrosztatikus erőter akadályozza a Ba^{2+} -ok pórusba történő belépését és az onnan az extracelluláris tér felé való távozását. A mutáns csatornákkal végzett kísérleteink szintén a modell helyességét bizonyítják: A H399L csatornák esetén a Ba^{2+} kimosási időállandója pH-függetlennek bizonyult, értéke pedig a vad típusú Kv1.3 csatornák esetén pH=7,35-n mért értékkel egyezett meg annak megfelelően, hogy nem alakul ki elektrosztatikus potenciálgát. A H399K mutánsok esetén a kimosódási időállandó szintén pH-független volt, de értéke a vad típusú csatornákon alacsony pH-n mért időállandóval egyezett meg. Ez bizonyítja a 399-es helyzetű, töltéssel rendelkező aminosavoldallánccok és a Ba^{2+} közötti kölcsönhatást, amely akadályozza az utóbbiak pórusból történő kilépését. A Ba^{2+} bemosódási kinetikája mind a H399L, mind pedig a H399K csatornák esetén pH-inszenzitívnek bizonyult annak megfelelően, hogy a pH változásakor a 399-es helyzetű aminosavoldallanc töltése nem változik. A H399K mutáns esetén azonban a bemosódási kinetika lassabb, mint a H399L mutánsnál a lizinoldallánccok elektrosztatikus erőterének a Ba^{2+} pórusba történő belépését akadályozó hatása miatt.

Modellünk szerint a Ba^{2+} esetén bizonyított elektrosztatikus erőhatás akadályozza a kálium ionoknak a csatornapórusból az extracelluláris tér felé történő kilépését, valamint az oda való belépését, amely felelős a Kv1.3 csatornák inaktivációjának alacsony pH-n tapasztalt lassulásáért. Lehetséges ugyanakkor, hogy a Ba^{2+} kimosódása során a sebességmeghatározó lépés nem a Ba^{2+} „external lock-in site”-ről az extracelluláris tér felé való kilépése, hanem a pórus citoszolikus oldalához közelebb elhelyezkedő kötőhelyről (az ún. „deep site”-ről) az „external lock-in site”-ra való ugrása (Kiss és Korn, 1998). A 399-es helyzetű töltött hisztidinek vagy lizinek inaktivációs kinetikát lassító hatása ebben az esetben is érvényesül, ugyanis a Ba^{2+} „external lock-in site”-ről való kilépésének akadályozása révén indirekt módon gátolják a Ba^{2+} -nak a „deep site”-ről az „external lock-in site”-ra való ugrását. Ez a „deep site” telítettségének növekedéséhez vezet.

6.1.7 Az inaktivációs kinetika pH_o-függését az intra- és extracelluláris K⁺ koncentráció együttesen határozza meg

Az alacsony K⁺ tartalmú intracelluláris oldat alkalmazásával végzett kísérleteinkkel eredetileg az volt a célunk, hogy az „external lock-in site” töltődése főként az extracelluláris oldal felől történjen anélkül, hogy az extracelluláris K⁺ koncentrációt megnövelnénk. Ideális kísérleti elrendezést az biztosított volna, ha S-ECS oldatban (5 mM K⁺) olyan alacsony

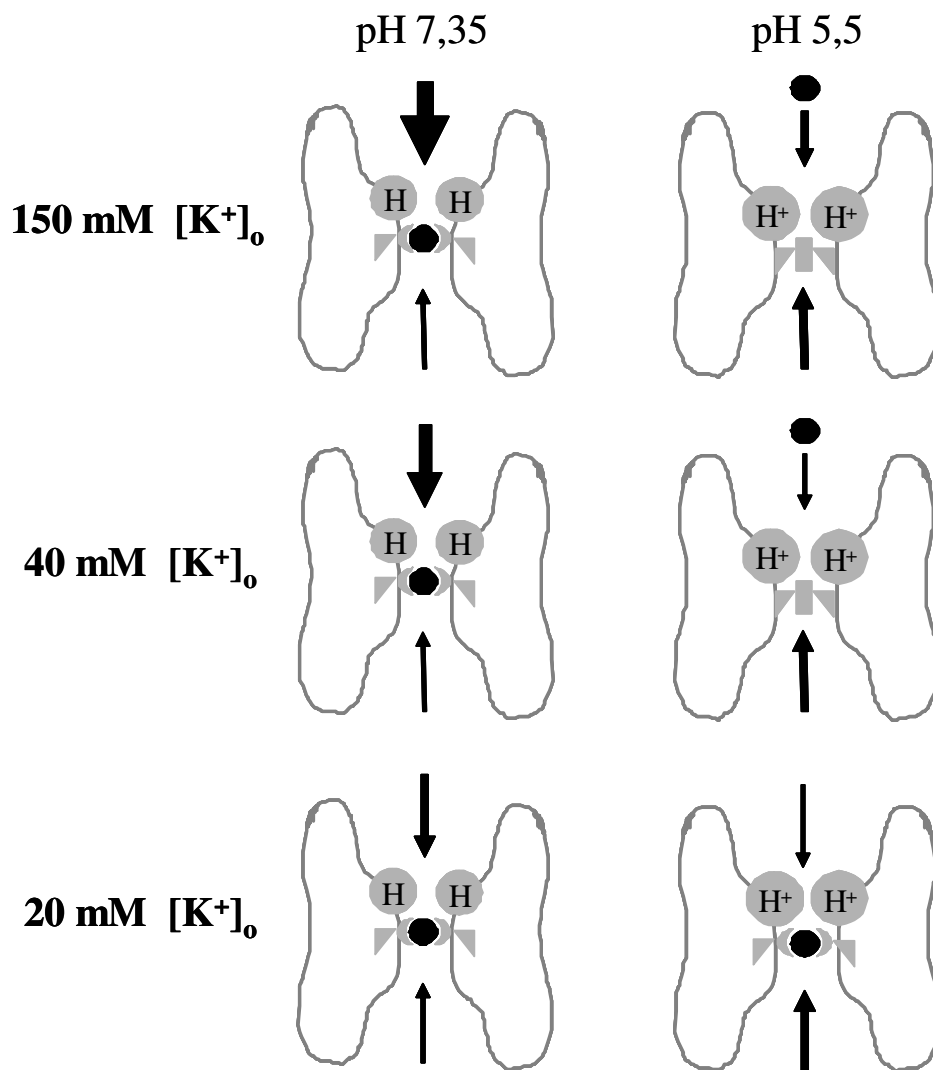
intracelluláris K^+ koncentráció mellett tudunk volna áramgörbékét mérni, ahol depolarizált tesztfeszültségek mellett még a sejtbe befelé folyó (inward) áramot mérünk. 5 mM-nál alacsonyabb intracelluláris K^+ koncentráció mellett azonban a *Shaker* típusú K^+ csatornák pórusa összesik és a csatonra nem vezető állapotba kerül (Gomez-Lagunas, 1999; Gomez-Lagunas, 2001), amit kísérleteinkben mi is tapasztaltunk. Emiatt az extracelluláris K^+ koncentrációt emelni kellett, ami viszont mind a Kv1.3 inaktivációs kinetikáját, mind pedig annak pH_o -függését jelentősen befolyásolta (ld. fentebb). Éppen ezért a következtetések levonásához azonos $[K^+]_o$ mellett kell összehasonlítani a 140 mM ($H[K^+]_i$) és 5 mM $[K^+]_i$ ($L[K^+]_i$) alkalmazásakor, különböző pH_o -n kapott eredményeket. Az egy- ill. kétkomponensű áramgörbék kinetikai változásának összehasonlítása az 5.1.4 fejezetben említettek szerint az APPR paraméter felhasználásával lehetséges. A kapott eredményeket a 4. táblázat foglalja össze. Ezek figyelembevételével a következő megállapítások tehetők és következtetések vonhatók le:

1, K-ECS oldatban $[K^+]_i$ -től függetlenül az inaktiváció gyorsul, ha a pH_o 7,35-ről 5,5-re csökken. Ez azt jelenti, hogy az inaktiváció sebességét meghatározó K^+ kötőhely elsősorban az extracelluláris tér felől töltődik be mindkét $[K^+]_i$ mellett (18. ábra).

2, 40 mM K-ECS oldatban 5 mM $[K^+]_i$ mellett az inaktiváció kismértékben, de szignifikánsan gyorsul ha a pH_o 7,35-ről 5,5-re csökken. Ugyanilyen pH_o csökkenés 140 mM $[K^+]_i$ mellett nem okoz változást az inaktivációs kinetikában. Modellünk szerint ez a következőképp magyarázható: 40 mM K-ECS-ben az „external lock-in site” extracelluláris oldalról való töltődésének jelentősége nagy a magas $[K^+]_o$ miatt. Magas $[K^+]_i$ alkalmazásakor a pH_o -csökkenés hatására ugyanolyan mértékben nő az intracelluláris oldal felől való töltődés, mint csökken az extracelluláris oldal felől való hozzáférhetőség, így az inaktivációs kinetika nem változik meg szignifikáns mértékben. Alacsony $[K^+]_i$ alkalmazásakor azonban a pH_o csökkenésekor jelentősebb az extracelluláris tér felől való hozzáférhetőség-csökkenés, mint az intracelluláris tér felől való hozzáférhetőség-növekedés, így a kötőhely telítettsége végeredményben csökken, az inaktiváció gyorsul (18. ábra).

3, 20 mM K-ECS oldatban 5 mM $[K^+]_i$ mellett az inaktivációs kinetika nem változik, ha a pH_o 7,35-ről 5,5-re csökken. Ugyanilyen pH_o csökkenés 140 mM $[K^+]_i$ mellett az inaktiváció szignifikáns lassulásával jár együtt. Modellünk szerint ez a következőképp magyarázható: 20 mM K-ECS//140 mM $[K^+]_i$ esetén a pH_o csökkentésekor kialakuló elektrosztatikus potenciálgát a magasabb $[K^+]_i$ miatt nagyobb mértékben növeli az „external lock-in site” intracelluláris oldalról történő töltődését, mint csökkenti annak az extracelluláris tér felől való hozzáférhetőségét a K^+ számára. Ez a kötőhely telítettségének nettó növekedését

jelenti, amely az inaktiváció lassulásában nyilvánul meg. 20 mM K-ECS//L[K⁺]_i mellett azonban egyensúlyba kerülnek azok a molekuláris kölcsönhatások, melyek az inaktiváció sebességét befolyásoló K⁺ kötőhely telítettségét szabályozzák: a pH_o csökkenésekor kialakuló elektrosztatikus potenciálgát a kötőhely intracelluláris oldal felől való töltődésének növekedését okozza, ami összemérhető az extracelluláris tér felől való töltődés csökkenésével, így a K⁺-telítettség nem változik meg, és az inaktivációs kinetika is változatlan (18. ábra).



18. ábra Az 5 mM [K⁺]_i alkalmazásakor kapott eredményeinket magyarázó modell

20 mM K-ECS-ben a pH csökkentésekor a protonálódó hisztidinek elektromos erőtere hatására az extracelluláris tér felől való töltődés csökkenésének és az intracelluláris tér felőli töltődés fokozódásának mértéke egyforma, így a pórusban lévő kritikus K⁺ kötőhely telítettsége nem változik.

40 mM K-ECS-ben és K-ECS-ben az extracelluláris tér felőli töltődés csökkenése nagyobb mértékű, mint az intracelluláris tér felőli töltődés mértékének növekedése, ami a kötőhely telítettségének csökkenéséhez vezet. Ez az inaktiváció gyorsulásában nyilvánul meg.

	[K ⁺] _i = 5 mM	[K ⁺] _i = 140 mM
K-ECS	76,6 ± 3,2 % (n=3)	82,5 ± 3,9 %-a (n=9)
40 mM K-ECS	93,0 ± 2,1 % (n=15)	97,2 ± 4,4 % (n=8)
20 mM K-ECS	101,7 ± 1,9 % (n=13)	120,0 ± 4,7 % (n=9)

4. táblázat A pH_o=5,5 és pH_o=7,35 esetén mért APPR értékek hányadosai (APPR_{5,5}/APPR_{7,35}) különböző intra- és extracelluláris [K⁺]-k esetén.

Összességében tehát a kísérleti eredmények alátámasztják az előzőekben vázolt modellt, mely szerint a 399-es helyzetű hisztidinek elektrosztatikus erőtere lassítja a K⁺-ok mozgását az „external lock-in site” és az extracelluláris tér között. Kiss és Korn kísérletei alapján (Kiss és Korn, 1998) ugyanakkor elképzelhető, hogy a 399-es helyzetű hisztidinek közvetlenül nem az „external lock-in site” K⁺-telítettségét befolyásolják, hanem egy attól extracellulárisan elhelyezkedő kisebb affinitású K⁺-kötőhelyét. Ebben az esetben ezen kötőhely telítettségének változása változtatná meg a pórus K⁺-telítettségét, és így közvetve befolyásolná az inaktivációs kinetikát. Ez nem változtatná meg lényegesen az általunk vázolt modellt, és az így is összhangban lenne a kísérleti eredményekkel.

A Kv1.3 csatornák specifikus tulajdonsága, nevezetesen hogy az inaktivációs kinetika az extracelluláris pH csökkenésekor lassul, nagy jelentőségű lehet pathológiás körülmények között. Például gyulladásos szövetben az extracelluláris oldat pH-ja jóval alacsonyabb, mint fiziológiás körülmények között. Amennyiben a pH csökkenésekor a Kv1.3 csatornák inaktivációs kinetikája a többi *Shaker*-családba tartozó ioncsatornához hasonlóan gyorsulna, a T-sejtek membránpotenciáljának szabályozásában rendelkezésre álló K⁺-áram mértéke csökkenne, amely gátolná a T lymphocyták aktivációját.

6.2 A *Centruroides elegans* peptidok a Kv1.3 csatornák szelektív gátlószerei

A kísérleteinkben vizsgált öt peptid közül a Ce1, Ce2 és Ce4 peptidok szelektíven gátolják a Kv1.3 csatornákat, mindhárom peptid Kv1.3 csatornára vonatkozó K_d értéke 1 nM alatti. A Hill koefficiens értéke mindhárom peptid esetén közel 1, tehát ezek a toxinok a többi skorpiótoxinhoz hasonlóan pórusblokkolóként hatnak, 1:1 sztöchiometriával gátolják a Kv1.3 csatornákat. A toxinok által okozott blokk kismértékű feszültségfüggése valószínűleg annak a következménye, hogy a toxinok csatornához történő kötődése során egy pozitív töltésű aminosav-oldallánc, a ChTx Lys27-el ekvivalens pozícióban lévő lizin mélyen benyúlik a pórusba, és a szelektivitási szűrőt alkotó aminosavakkal lép kölcsönhatásba. Mivel a kölcsönhatás helye a membrán elektromos erőterében van, valamint a lizin oldallánc töltése és a szelektivitási szűrőben található K^+ között is van elektrosztatikus kölcsönhatás, a gátlás feszültségfüggése magyarázható (Goldstein és Miller, 1993). A Kv1.3 feszültségfüggő kapuzásának megváltozása a kötőhely ismeretében és irodalmi adatok alapján nem képzelhető el. Így a különböző tesztpotenciálok mellett mért igen kismértékű feszültségfüggő blokk magyarázataként egyedül a toxin és a csatorna közötti feszültségfüggő kölcsönhatás merül fel, a toxin jelenlétében mért áramcsökkenést pedig kizárólag a csatorna pórusának toxin általi blokkolása okozza.

A toxinok IKCa1 csatornákat blokkoló képességét humán T sejtekben kifejeződő endogén csatornákon vizsgáltuk. Annak ellenére, hogy a pipetta töltő folyadékban beállított 1 μM Ca^{2+} koncentráció az IKCa1 csatornák maximális aktiválását okozza, az IKCa1 áramok mérése így is komoly problémát jelent T sejteken. Ennek okait az alábbiakban részletezzük: 1, Depolarizált membránpotenciálok mellett, ahol a K^+ számára nagy elektrokémiai gradiens van, a Kv1.3 csatornák is kinyílnak, így csak a Kv1.3 aktivációs küszöbe alatti membránpotenciálon mérhető az IKCa1 áram, ahol kicsi a hajtóerő. 2, Az IKCa1 csatornák feszültségfüggetlenül aktiválódnak 1 μM Ca jelenlétében a teljes-sejt konfiguráció kialakulását követően. Mivel a csatornák nyitási valószínűségét a teljes-sejt konfigurációban elvégzett kísérletek alatt nem tudjuk szabályozni, különös figyelmet kell fordítani az IKCa1 áram más áramoktól történő elválasztására. Az említett problémák egy része feszültség rámpa protokollok alkalmazásával küszöbölhető ki, ahol az áram-feszültség összefüggések lineáris szakasza, azaz a Kv1.3 csatornák aktivációs küszöbe alatti membránpotenciáltartomány könnyen meghatározható. Ezen felül az áram egyensúlyi potenciálja is meghatározható az áram-feszültség összefüggésekből, ami -80 mV körüli értéknek adódott kísérleteink során.

Az egyensúlyi potenciál igen negatív értékéből arra lehetett következtetni, hogy a Kv1.3 aktivációs küszöbe alatt mért teljes-sejt áram döntően K^+ szelektív pórusokon keresztül folyik, a nonspecifikus szivárgási áram elhanyagolható. Ezeken felül farmakológiai úton is megtörtént az IKCa1 áramok „pozitív” azonosítása. Ehhez a ChTx-et alkalmaztunk, mely 10 nM koncentrációban a Kv1.3 aktivációs küszöbe alatti teljes-sejt áram kb 50%-át gátolta, ami jól megfelel a ChTx IKCa1 csatornákat gátló képességének. Mindezek alapján kijelenthetjük, hogy a vizsgált toxinok IKCa1 csatornákat gátló képességét megfelelő kísérleti körülmények között tudtuk vizsgálni.

A toxinok limitált mennyisége miatt nem tudtuk dózis-hatás görbét meghatározni az IKCa1 csatornára, de abból, hogy 10 nM koncentrációban egyik toxinnak sem volt hatása az IKCa1 csatornára, a toxinok hatását legalább 1000x szelektívebbnek becsüljük Kv1.3-ra, mint az IKCa1 csatornára. A kísérleteinkben vizsgált egyéb ioncsatornák közül a *Shaker*-IR csatornákra a toxinok nem fejtettek ki gátló hatást, míg az rKv2.1 csatornák esetén 10 nM koncentrációban minimális gátlóhatást észleltünk, amely alapján a peptidek rKv2.1 csatornára vonatkozó K_d értéke jóval 100 nM felett van. Ez utóbbi két csatornát az alapján választottuk ki a szelektivitás vizsgálatához, hogy a Shaker-IR csatornák és toxinok közötti kölcsönhatás molekuláris mechanizmusa legjobban ismert (Stocker és Miller, 1994; Escobar és *mtsai*, 1993), így e csatornák vizsgálata a kötődést meghatározó molekuláris kölcsönhatások tisztázásában segíthet. A Kv2.1 csatornák esetén több olyan toxin (elsősorban póktoxin) ismert, mely nem a csatorna pórusába, hanem annak feszültség érzékelőjéhez kötődve fejt ki hatását (Swartz és MacKinnon, 1995), így e csatornák vizsgálata a hatásmechanizmus tisztázásához nyújthat segítséget. A vizsgált másik két peptid, a Ce3 és Ce5 Kv1.3 csatornára vonatkozó K_d értéke 50 nM feletti, amely alapján ezen peptideket a Kv1.3 csatorna kis affinitású gátlószereként kezeltük.

Szoros összefüggés figyelhető meg a Ce toxinok Kv1.3 csatornákra kifejtett gátlóhatása és az NTx-nal való szekvenciahomológia mértéke között. A Kv1.3 csatornát nagy affinitással blokkoló három peptid (Ce1, Ce2 és Ce5) szekvenciája ugyanis csak 5,4 ill. 7 aminosavban különbözik az NTx-étől, a Kv1.3 csatornát kismértékben blokkoló peptideknél pedig jelentősebb különbség figyelhető meg az aminosavsorrendben. Amennyiben a toxinok aminosavszekvenciáját páronkénti összehasonlításban vizsgáljuk, a legérdekesebb, hogy a Ce4 és Ce5 toxinok csak kismértékben térnek el egymástól, ugyanakkor a Kv1.3 csatornára kifejtett hatásukban éles különbség figyelhető meg. Az észlelt eltérésekért elsősorban 2 aminosav különbsége tehető felelőssé. Az egyik a Ce5 esetén 15-ös és 16-os helyzetben lévő két prolinoldallanc, amelyek az NTx szerkezete alapján egy feltételezett α -helikális

szerkezetű peptidrégióban találhatóak. A két szomszédos prolin valószínűleg megbontja az α -helikális szerkezetet, amely felelős lehet a csökkent csatornagátló képességért. A másik fontos különbséget a két peptid szerkezetében a 23-as helyzetű aminosav esetében észleljük, amely a Ce4 esetén izoleucin, a Ce5 esetén pedig arginin. Azonos pozícióban a Kv1.3 csatornákat hatékonyan blokkoló Ce1 és Ce2 esetén prolin található.

Amint a bevezetőben már említettem, napjainkban komoly kutatás folyik terápiásan is alkalmazható hatékony, de a szervezetre káros hatással nem rendelkező Kv1.3 csatornagátló szerek után, melyekkel immunszuppresszív hatást lehetne elérni. A Ce1, Ce2 és Ce4 toxinok azon képessége, hogy szelektíven képesek gátolni a nagy számú Kv1.3, de kevés IKCa1 csatornát expresszáló T_{EM} sejtek proliferációját anélkül, hogy a naïve vagy a T_{CM} sejtek osztódását gátolnák, alkalmassá tehetik őket bizonyos T sejt mediált immunbetegségek (pl. sclerosis multiplex, diabetes mellitus) kezelésére és a szervátültetés utáni kilökődés megelőzésére. A toxinok új alternatívát nyújthatnak a Kv1.3 csatorna struktúrájának, funkciójának kutatásában is.

ÖSSZEFOGLALÁS

A T sejtek aktiválásához és klonális proliferációjához nélkülözhetetlen, hogy a sejtmembrán K^+ vezetőképessége biztosítsa a jelátvitelhez szükséges membránpotenciált, amelyben döntő szerepe van a Kv1.3 K^+ csatornának. A csatorna működése függ a csatorna kapuzását jellemző biofizikai paramétereiktől, ill. a csatornákat specifikusan gátló molekuláktól. E lehetőségek közül az inaktivációs kinetika extracelluláris pH és K^+ koncentráció függésének molekuláris mechanizmusát és a *Centruroides elegans* skorpió mérgéből származó toxinok Kv1.3 gátló képességét és szelektivitását vizsgáltuk.

A Kv1.3 csatornák kizárólag a lassú, ún. C-típusú mechanizmussal inaktiválódnak, melynek sebessége többek között a 399-es helyzetű aminosav tulajdonságától függ. Eredményeink szerint a H399 reverzibilis protonációja az alábbi molekuláris mechanizmussal befolyásolja az inaktivációt: A protonált hisztidinek elektrosztatikus kölcsönhatások révén szabályozzák a szelektivitási filterben található azon K^+ kötőhely betöltöttségét, mely az inaktiváció sebességét meghatározza. A K^+ kötőhely telítettségét az intra- és az extracelluláris tér felőli töltődés egyaránt befolyásolja, melyet a H399 protonációja ellenkezően érint, az intracelluláris oldal felőli töltődést fokozza (inaktivációt lassító hatás) míg az extracelluláris oldal felőli töltődést gátolja (inaktivációt gyorsító hatás). E modell helyességének bizonyításához megvizsgáltuk az inaktiváció sebességének extracelluláris pH és K^+ koncentráció függését, a pH_o hatását az inaktivációra különböző ionerősségű oldatokban, valamint a K^+ kötőhely telítődésének kinetikáját a Ba^{2+} asszociációs és disszociációs sebességének mérésén keresztül. A deprotonált és protonált H399-et tartalmazó vad típusú csatorna viselkedését rendre a H399L és H399K mutáns csatornák segítségével modelleztük. Az inaktiváció sebességének általunk leírt pH_o és K^+ -függése jelentőséggel bírhat a *Shaker* típusú K^+ csatornák inaktivációjának megértése szempontjából. Ezen felül e mechanizmus segítheti a T sejtek alkalmazkodását olyan körülményekhez, ahol a pH_o és K^+ koncentráció jelentősen eltér a normáltól (pl. gyulladáscsökkentő szövetekben).

A *Centruroides elegans* skorpió venomjából izolált, a Noxiustoxin alcsaládba tartozó peptidtoxinok (Ce 1-5) közül a Ce1, Ce2 és Ce4 hatékonyan blokkolta a Kv1.3 csatornákat, azonban a három hatásos peptid közül egyik sem gátolta az IKCa1 csatornákat. Egyik Kv1.3 csatornát hatékonyan blokkoló peptid sem blokkolta sem a *Shaker*, sem pedig a *Shab* családba tartozó Kv2.1 csatornákat. A Kv1.3 csatornákat az IKCa1 csatornákkal szemben szelektíven blokkoló peptidek nagy jelentőségűek lehetnek azon T lymphocytá-altípusok terápiás gátlásában, amelyek proliferációja szelektíven függ a Kv1.3 csatornáktól.

7 SUMMARY

It is essential for the activation and clonal proliferation of T cells that the membrane potential required for signal transduction be provided by the K^+ conductance of the cell membrane, in which the Kv1.3 channel has a major role. The operation of the channel depends on the biophysical parameters characterizing the gating of the channel and on molecules specifically blocking the channel. Of these factors we studied the molecular mechanism of the dependence of inactivation kinetics on the extracellular pH and K^+ concentration and the Kv1.3 blocking ability and selectivity of toxins purified from the venom of the scorpion *Centruroides elegans*.

The Kv1.3 channel inactivates exclusively by the slow, so-called C-type mechanism, the rate of which is influenced by, among other factors, the properties of the amino acid residue at position 399. Based on our results the reversible protonation of H399 affects inactivation via the following molecular mechanism: Through an electrostatic interaction the protonated histidines regulate the occupancy of the K^+ binding site in the selectivity filter that determines the rate of inactivation. The occupancy of the K^+ binding site is influenced by filling from both the intra- and extracellular sides. The protonation of H399 has opposite effects on these two processes: it enhances filling from the intracellular side (slowing of inactivation) while it inhibits filling from the extracellular side (acceleration of inactivation). In order to verify the validity of our model we examined the dependence of the rate of inactivation on the extracellular pH and K^+ concentration, the effect of pH_o on inactivation in solutions of various ionic strengths, as well as the kinetics of the filling of the K^+ binding site by measuring the association and dissociation rates of Ba^{2+} ions. We modeled the properties of the wild type channel containing deprotonated or protonated H399 residues with H399L and H399K mutants, respectively. Our findings about the pH_o and K^+ dependence of inactivation have significance in the understanding of the inactivation mechanism of *Shaker* K^+ channels. This mechanism may also help the adaptation of T cells to conditions in which the pH_o and K^+ concentration differ from normal conditions (e.g. in areas of inflammation).

Toxins Ce1, Ce2 and Ce4 of the five (Ce1-5) toxins purified from the venom of the scorpion *Centruroides elegans* that belong in the Noxiustoxin subfamily blocked Kv1.3 with high affinity without blocking IKCa1. None of the effective toxins blocked *Shaker* channels or Kv2.1 belonging to the *Shab* family. Peptides selectively blocking Kv1.3 over IKCa1 may have great significance in the therapeutical inhibition of T cell subtypes whose proliferation is dependent on Kv1.3 channels.

8 PUBLIKÁCIÓS LISTA

8.1 Az értekezésben idézett közlemények

1. Acuto,O. & Cantrell,D. (2000) T cell activation and the cytoskeleton. *Annu.Rev.Immunol.*, **18**, 165-184.
2. Aiyar,J., Withka,J.M., Rizzi,J.P., Singleton,D.H., Andrews,G.C., Lin,W., Boyd,J., Hanson,D.C., Simon,M., & Dethlefs,B. (1995) Topology of the pore-region of a K⁺ channel revealed by the NMR-derived structures of scorpion toxins. *Neuron*, **15**, 1169-1181.
3. Bagdany,M., Batista,C.V., Valdez-Cruz,N.A., Somodi,S., Rodriguez de la Vega RC, Licea,A.F., Varga,Z., Gaspar,R., Possani,L.D., & Panyi,G. (2005) Anuroctoxin, a new scorpion toxin of the alpha-KTx 6 subfamily, is highly selective for Kv1.3 over IKCa1 ion channels of human T lymphocytes. *Mol.Pharmacol.*, **67**, 1034-1044.
4. Batista,C.V., Gomez-Lagunas,F., Rodríguez de la Vega RC, Hajdu,P., Panyi,G., Gaspar,R., & Possani,L.D. (2002) Two novel toxins from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* that block Kv1.3 and Shaker B K⁺-channels with distinctly different affinities. *Biochim.Biophys.Acta*, **1601**, 123-131.
5. Baukrowitz,T. & Yellen,G. (1995) Modulation of K⁺ current by frequency and external [K⁺]: a tale of two inactivation mechanisms. *Neuron*, **15**, 951-960.
6. Baukrowitz,T. & Yellen,G. (1996) Use-Dependent Blockers and Exit Rate of the Last Ion from the Multi-Ion Pore of a K⁺ Channel. *Science*, **271**, 653-656.
7. Beeton,C., Pennington,M.W., Wulff,H., Singh,S., Nugent,D., Crossley,G., Khaytin,I., Calabresi,P.A., Chen,C.Y., Gutman,G.A., & Chandy,K.G. (2005) Targeting effector memory T cells with a selective peptide inhibitor of Kv1.3 channels for therapy of autoimmune diseases. *Mol Pharmacol.*, **67**, 1369-1381.
8. Beeton,C., Wulff,H., Standifer,N.E., Azam,P., Mullen,K.M., Pennington,M.W., Kolski-Andreaco,A., Wei,E., Grino,A., Counts,D.R., Wang,P.H., LeeHealey,C.J., Andrews,B.S., Sankaranarayanan,A., Homerick,D., Roeck,W.W., Tehranzadeh,J., Stanhope,K.L., Zimin,P., Havel,P.J., Griffey,S., Knaus,H.G., Nepom,G.T., Gutman,G.A., Calabresi,P.A., & Chandy,K.G. (2006b) Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 17414-17419.
9. Beeton,C., Wulff,H., Standifer,N.E., Azam,P., Mullen,K.M., Pennington,M.W., Kolski-Andreaco,A., Wei,E., Grino,A., Counts,D.R., Wang,P.H., LeeHealey,C.J., Andrews,B.S., Sankaranarayanan,A., Homerick,D., Roeck,W.W., Tehranzadeh,J., Stanhope,K.L., Zimin,P., Havel,P.J., Griffey,S., Knaus,H.G., Nepom,G.T., Gutman,G.A., Calabresi,P.A., & Chandy,K.G. (2006a) Kv1.3 channels are a

- therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 17414-17419.
10. Bental,M. & Deutsch,C. (1993) Metabolic changes in activated T cells: An NMR study of human peripheral blood lymphocytes. *Magn.Reson.Med.*, **29**, 317.
 11. Cahalan,M.D., Chandy,K.G., Decoursey,T.E., & Gupta,S. (1985) A voltage-gated potassium channel in human T lymphocytes. *Journal of Physiology (London)*, **358**, 197-237.
 12. Cahalan,M.D., Wulff,H., & Chandy,K.G. (2001) Molecular properties and physiological roles of ion channels in the immune system. *J.Clin.Immunol.*, **21**, 235-252.
 13. Chandy,K.G., Wulff,H., Beeton,C., Pennington,M., Gutman,G.A., & Cahalan,M.D. (2004) K⁺ channels as targets for specific immunomodulation . *Trends Pharmacol.Sci.*, **25**, 280-289.
 14. Claydon,T.W., Boyett,M.R., Sivaprasadarao,A., & Orchard,C.H. (2002) Two pore residues mediate acidosis-induced enhancement of C-type inactivation of the Kv1.4 K(+) channel. *Am.J.Physiol Cell Physiol*, **283**, C1114-C1121.
 15. Crabtree,G.R. (1999) Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca²⁺, calcineurin, and NF-AT. *Cell*, **96**, 611-614.
 16. Dauplais,M., Lecoq,A., Song,J., Cotton,J., Jamin,N., Gilquin,B., Roumestand,C., Vita,C., de Medeiros,C.L., Rowan,E.G., Harvey,A.L., & Menez,A. (1997) On the convergent evolution of animal toxins. Conservation of a diad of functional residues in potassium channel-blocking toxins with unrelated structures. *J Biol Chem*, **272**, 4302-4309.
 17. Decoursey,T.E., Chandy,K.G., Gupta,S., & Cahalan,M.D. (1984) Voltage-gated K⁺ channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? *Nature*, **307**, 465-468.
 18. Defarias,F.P., Stevens,S.P., & Leonard,R.J. (1995) Stable expression of human Kv1.3 potassium channels resets the resting membrane potential of cultured mammalian cells. *Receptors.Channels*, **3**, 273-281.
 19. Deutsch,C. (1990) K⁺ channels and mitogenesis. *Prog.Clin.Biol.Res.*, **334**, 251-271.
 20. Deutsch,C. & Chen,L.-Q. (1993) Heterologous expression of specific K⁺ channels in T lymphocytes: Functional consequences for volume regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **90**, 10036-10040.
 21. Deutsch,C., Krause,D., & Lee,S.C. (1986) Voltage-gated potassium conductance in human T lymphocytes stimulated with phorbol ester. *Journal of Physiology (London)*, **372**, 405-423.
 22. Deutsch,C. & Lee,S.C. (1989) Modulation of K⁺ currents in human lymphocytes by pH. *Journal of Physiology (London)*, **413**, 399-413.
 23. Doyle,D.A., Morais,C.J., Pfuetzner,R.A., Kuo,A., Gulbis,J.M., Cohen,S.L., Chait,B.T., & MacKinnon,R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*, **280**, 69-77.

24. Escobar,L., Root,M.J., & MacKinnon,R. (1993) Influence of protein surface charge on the bimolecular kinetics of a potassium channel peptide inhibitor. *Biochemistry*, **32**, 6982-6987.
25. Fanger,C.M., Ghanshani,S., Logsdon,N.J., Rauer,H., Kalman,K., Zhou,J., Beckingham,K., Chandy,K.G., Cahalan,M.D., & Aiyar,J. (1999) Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance KCa channel, IKCa1. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 5746-5754.
26. Fanger,C.M., Neben,A.L., & Cahalan,M.D. (2000) Differential Ca²⁺ influx, K-Ca channel activity, and Ca²⁺ clearance distinguish Th1 and Th2 lymphocytes. *Journal of Immunology*, **164**, 1153-1160.
27. Fanger,C.M., Rauer,H., Neben,A.L., Miller,M.J., Wulff,H., Rosa,J.C., Ganellin,C.R., Chandy,K.G., & Cahalan,M.D. (2001) Calcium-activated potassium channels sustain calcium signaling in T lymphocytes. Selective blockers and manipulated channel expression levels. *J Biol Chem*, **276**, 12249-12256.
28. Frankenhaeuser,B. & Hodgkin,A.L. The action of calcium on the electrical properties of squid axons. *137*, 218-244. 1957. *J. Physiol. (Lond)* .
29. Garcia,M.L., Gao,Y., McManus,O.B., & Kaczorowski,G.J. (2001) Potassium channels: from scorpion venoms to high-resolution structure. *Toxicon*, **39**, 739-748.
30. Ghanshani,S., Wulff,H., Miller,M.J., Rohm,H., Neben,A., Gutman,G.A., Cahalan,M.D., & Chandy,K.G. (2000) Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 37137-37149.
31. Giangiacomo,K.M., Ceralde,Y., & Mullmann,T.J. (2004) Molecular basis of alpha-KTx specificity. *Toxicon*, **43**, 877-886.
32. Goldstein,S.A., Pheasant,D.J., & Miller,C. (1994) The Charybdotoxin receptor of a Shaker K⁺ channel: peptide and channel residues mediating molecular recognition. *Neuron*, **12**, 1377-1388.
33. Goldstein,S.A. & Miller,C. (1993) Mechanism of Charybdotoxin block of a voltage-gated K⁺ channel. *Biophysical Journal*, **65**, 1613-1619.
34. Gomez-Lagunas,F. (1999) Barium inhibition of the collapse of the Shaker K(+) conductance in zero K(+). *Biophysical Journal*, **77**, 2988-2998.
35. Gomez-Lagunas,F. (2001) Na(+) interaction with the pore of Shaker B K(+) channels: zero and low K(+) conditions. *J.Gen.Physiol*, **118**, 639-648.
36. Grinstein,S. & Dixon,S.J. (1989) Ion transport, membrane potential, and cytoplasmic pH in lymphocytes: changes during activation. *Physiological Reviews*, **69**, 417-481.
37. Grissmer,S. & Cahalan,M.D. (1989) Divalent ion trapping inside potassium channels of human T lymphocytes. *Journal of General Physiology*, **93**, 609-630.

38. Grissmer,S., Nguyen,A.N., & Cahalan,M.D. (1993) Calcium-activated potassium channels in resting and activated human T lymphocytes. Expression levels, calcium dependence, ion selectivity, and pharmacology. *Journal of General Physiology*, **102**, 601-630.
39. Gross,A. & Miller,C. (1996) Agitoxin footprinting the *Shaker* potassium channel pore. *Neuron*, **16**, 399-406.
40. Hamill,O.P., Marty,A., Neher,E., Sakmann,B., & Sigworth,F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.*, **391**, 85-100.
41. Harris,R.E., Larsson,H.P., & Isacoff,E.Y. (1998) A permanent ion binding site located between two gates of the Shaker K⁺ channel. *Biophys J*, **74**, 1808-1820.
42. Hille,B. (1992) *Ion channels of excitable membranes*, 2 edn, Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA.
43. Hoshi,T., Zagotta,W.N., & Aldrich,R.W. (1990) Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation [see comments]. *Science*, **250**, 533-538.
44. Hurst,R.S., Latorre,R., Toro,L., & Stefani,E. (1995) External barium block of Shaker potassium channels: evidence for two binding sites. *J Gen Physiol*, **106**, 1069-1087.
45. Jacobs,D.B., Lee,T.-P., Jung,C.Y., & Mookerjee,B.K. (1989) Mechanism of mitogen-induced stimulation of glucose transport in human peripheral blood mononuclear cells. *J.Clin.Invest.*, **83**, 437.
46. Janeway,C.A., Travers,P., Walport,M., & Shlomchik,M.J. (2001) *Immunobiology*, 5 edn, pp. 187-220. Garland Publishing, New York.
47. Jiang,Y., Lee,A., Chen,J., Ruta,V., Cadene,M., Chait,B.T., & MacKinnon,R. (2003a) X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature*, **423**, 33-41.
48. Jiang,Y., Ruta,V., Chen,J., Lee,A., & MacKinnon,R. (2003b) The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature*, **423**, 42-48.
49. Kalman,K., Pennington,M.W., Lanigan,M.D., Nguyen,A., Rauer,H., Mahnir,V., Paschetto,K., Kem,W.R., Grissmer,S., Gutman,G.A., Christian,E.P., Cahalan,M.D., Norton,R.S., & Chandy,K.G. (1998) ShK-Dap22, a potent Kv1.3-specific immunosuppressive polypeptide. *J Biol Chem*, **273**, 32697-32707.
50. Kavanaugh,M.P., Varnum,M.D., Osborne,P.B., Christie,M.J., Busch,A.E., Adelman,J.P., & North,R.A. (1991) Interaction between tetraethylammonium and amino acid residues in the pore of cloned voltage-dependent potassium channels. *Journal of Biological Chemistry*, **266**, 7583-7587.
51. Kehl,S.J., Eduljee,C., Kwan,D.C., Zhang,S., & Fedida,D. (2002) Molecular determinants of the inhibition of human Kv1.5 potassium currents by external protons and Zn(2+). *J Physiol*, **541**, 9-24.

52. Kiss,L. & Korn,S.J. (1998) Modulation of C-type inactivation by K⁺ at the potassium channel selectivity filter. *Biophys J*, **74**, 1840-1849.
53. Kiss,L., LoTurco,J., & Korn,S.J. (1999) Contribution of the selectivity filter to inactivation in potassium channels. *Biophys J*, **76**, 253-263.
54. Koo,G.C., Blake,J.T., Talento,A., Nguyen,M., Lin,S., Sirotina,A., Shah,K., Mulvany,K., Hora,D., Cunningham,P., Wunderler,D.L., McManus,O.B., Slaughter,R., Bugianesi,R., Felix,J., Garcia,M.L., Williamson,J., Kaczorowski,G.J., Sigal,N.H., Springer,M.S., & Feeny,W. (1997) Blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 inhibits immune responses in vivo. *Journal of Immunology*, **158**, 5120-5128.
55. Kurata,H.T. & Fedida,D. (2006) A structural interpretation of voltage-gated potassium channel inactivation. *Prog.Biophys.Mol.Biol.*, **92**, 185-208.
56. Leonard,R.J., Garcia,M.L., Slaughter,R.S., & Reuben,J.P. (1992) Selective blockers of voltage-gated K⁺ channels depolarize human T lymphocytes: mechanism of the antiproliferative effect of charybdotoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **89**, 10094-10098.
57. Levy,D.I. & Deutsch,C. (1996) Recovery from C-type inactivation is modulated by extracellular potassium. *Biophysical Journal*, **70**, 798-805.
58. Lewis,R.S. (2001) Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu.Rev.Immunol.*, **19**, 497-521.
59. Lewis,R.S. & Cahalan,M.D. (1995) Potassium and calcium channels in lymphocytes. *Annu.Rev.Immunol*, **13:623-53.**, 623-653.
60. Li,X., Bett,G.C., Jiang,X., Bondarenko,V.E., Morales,M.J., & Rasmusson,R.L. (2003) Regulation of N- and C-type inactivation of Kv1.4 by pHo and K⁺: evidence for transmembrane communication. *Am.J Physiol Heart Circ.Physiol*, **284**, H71-H80.
61. Logsdon,N.J., Kang,J., Togo,J.A., Christian,E.P., & Aiyar,J. (1997) A novel gene, hKCa4, encodes the calcium-activated potassium channel in human T lymphocytes. *J Biol Chem*, **272**, 32723-32726.
62. Long,S.B., Campbell,E.B., & MacKinnon,R. (2005a) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science*, **309**, 897-903.
63. Long,S.B., Campbell,E.B., & MacKinnon,R. (2005b) Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science*, **309**, 903-908.
64. López-Barneo,J., Hoshi,T., Heinemann,S.H., & Aldrich,R.W. (1993) Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of *Shaker* potassium channels. *Receptors and Channels*, **1**, 61-71.
65. MacKinnon,R. (1991) Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature*, **350**, 232-235.
66. Marom,S. & Abbott,L.F. (1994) Modeling state-dependent inactivation of membrane currents. *Biophysical Journal*, **67**, 515-520.

67. Marom,S. & Levitan,I.B. (1994) State-dependent inactivation of the Kv3 potassium channel. *Biophysical Journal*, **67**, 579-589.
68. Matteson,D.R. & Deutsch,C. (1984) K channels in T lymphocytes: a patch clamp study using monoclonal antibody adhesion. *Nature*, **307**, 468-471.
69. McCardy,C.W., Ely,C.M., Westin,E., & Carchman,R.A. (1988) Coordination and reversibility of signs for proliferative activation and IL2 mRNA production in human T lymphocytes by phorbol ester and calcium ionophore. *Journal of Biological Chemistry*, **263**, 18537-18544.
70. Molina,A., Ortega-Saenz,P., & Lopez-Barneo,J. (1998) Pore mutations alter closing and opening kinetics in Shaker K⁺ channels. *J.Physiol*, **509 (Pt 2)**, 327-337.
71. Neyton,J. & Miller,C. (1988a) Discrete Ba²⁺ block as a probe of ion occupancy and pore structure in the high-conductance Ca²⁺ -activated K⁺ channel. *J Gen Physiol*, **92**, 569-586.
72. Neyton,J. & Miller,C. (1988b) Potassium blocks barium permeation through a calcium-activated potassium channel. *J Gen Physiol*, **92**, 549-567.
73. Nguyen,A.N., Kath,J.C., Hanson,D.C., Biggers,M.S., Cannif,P.C., Donovan,C.B., Mather,R.J., Bruns,M.J., Rauer,H., Aiyar,J., Lepple-Wienhues,A., Gutman,G.A., Grissmer,S., Cahalan,M.D., & Chandy,K.G. (1996) Novel nonpeptide agents potently block the C-type inactivated conformation of Kv1.3 and suppress T cell activation. *Mol.Pharmacol.*, **50**, 1672-1679.
74. Northrop,J.P., Ullman,K.S., & Crabtree,G.R. (1993) Characterization of the Nuclear and Cytoplasmic Components of the Lymphoid-specific Nuclear Factor of Activated T Cells (NF-AT) Complex. *Journal of Biological Chemistry*, **268**, 2917-2923.
75. Pahapill,P.A. & Schlichter,L.C. (1992) Modulation of potassium channels in intact human T lymphocytes. *Journal of Physiology (London)*, **445**, 407-430.
76. Panyi,G., Berecki,G., Gáspár,R., Seres,I., Fülöp,T., & Damjanovich,S. (1994) Peripheral blood lymphocytes display reduced K⁺ channel activity in aged humans. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **199**, 519-524.
77. Panyi,G. & Deutsch,C. (1996) Assembly and suppression of endogenous Kv1.3 channels in human T cells. *Journal of General Physiology*, **107**, 409-420.
78. Panyi,G., Gáspár,R., Krasznai,Z., ter Horst,J.J., Ameloot,M., Aszalós,A., Steels,P., & Damjanovich,S. (1996) Immunosuppressors inhibit voltage-gated potassium channels in human peripheral blood lymphocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **221**, 254-258.
79. Panyi,G., Possani,L.D., Rodriguez de la Vega RC, Gaspar,R., & Varga,Z. (2006) K⁺ channel blockers: novel tools to inhibit T cell activation leading to specific immunosuppression. *Curr.Pharm.Des*, **12**, 2199-2220.

80. Panyi,G., Sheng,Z.-F., Tu,L.-W., & Deutsch,C. (1995) C-type inactivation of a voltage-gated K⁺ channel occurs by a cooperative mechanism. *Biophysical Journal*, **69**, 896-904.
81. Panyi,G., Vamosi,G., Bacso,Z., Bagdany,M., Bodnar,A., Varga,Z., Gaspar,R., Matyus,L., & Damjanovich,S. (2004a) Kv1.3 potassium channels are localized in the immunological synapse formed between cytotoxic and target cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **101**, 1285-1290.
82. Panyi,G., Vamosi,G., Bodnar,A., Gaspar,R.J., & Damjanovich,S. (2004b) Looking through ion channels: recharged concepts in T cell signaling. *Trends Immunol.*, **25**, 565-569.
83. Panyi,G., Varga,Z., & Gaspar,R. (2004c) Ion channels and lymphocyte activation. *Immunol.Lett.*, **92**, 55-66.
84. Perez-Cornejo,P. (1999a) H⁺ ion modulation of C-type inactivation of Shaker K⁺ channels. *Pflugers Arch.*, **437**, 865-870.
85. Perez-Cornejo,P. (1999b) H⁺ ion modulation of C-type inactivation of Shaker K⁺ channels. *Pflugers Arch*, **437**, 865-870.
86. Péter,M., Hajdú,P., Varga,Z., Damjanovich,S., Possani,L.D., Panyi,G., & Gaspar,R.J. (2000) Block of human T lymphocyte Kv1.3 channels by Pi1, a novel class of scorpion toxin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **278**, 34-37.
87. Péter,M., Varga,Z., Hajdú,P., Gaspar,R., Jr., Damjanovich,S., Horjales,E., Possani,L.D., & Panyi,G. (2001) Effects of toxins Pi2 and Pi3 on human T lymphocyte Kv1.3 channels: the role of Glu7 and Lys24. *J.Membr.Biol.*, **179**, 13-25.
88. Péter,M., Varga,Z., Panyi,G., Bene,L., Damjanovich,S., Pieri,C., Possani,L.D., & Gáspár,R. (1998) *Pandinus imperator* scorpion venom blocks voltage-gated K⁺ channels in human lymphocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **242**, 621-625.
89. Peter,M.J., Varga,Z., Hajdu,P., Gaspar,R.J., Damjanovich,S., Horjales,E., Possani,L.D., & Panyi,G. (2001) Effects of toxins Pi2 and Pi3 on human T lymphocyte Kv1.3 channels: the role of Glu7 and Lys24. *J Membr.Biol*, **179**, 13-25.
90. Prakriya,M., Feske,S., Gwack,Y., Srikanth,S., Rao,A., & Hogan,P.G. (2006) Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature*, **443**, 230-233.
91. Prakriya,M. & Lewis,R.S. (2003) CRAC channels: activation, permeation, and the search for a molecular identity. *Cell Calcium*, **33**, 311-321.
92. Price,M., Lee,S.C., & Deutsch,C. (1989) Charybdotoxin inhibits proliferation and interleukin 2 production in human peripheral blood lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **86**, 10171-10175.
93. Rao,A., Luo,C., & Hogan,P.G. (1997) Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu.Rev.Immunol*, **15:707-47.**, 707-747.

94. Rauer,H., Lanigan,M.D., Pennington,M.W., Aiyar,J., Ghanshani,S., Cahalan,M.D., Norton,R.S., & Chandy,K.G. (2000) Structure-guided transformation of charybdotoxin yields an analog that selectively targets Ca(2+)-activated over voltage-gated K(+) channels. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 1201-1208.
95. Rauer,H., Pennington,M., Cahalan,M., & Chandy,K.G. (1999) Structural conservation of the pores of calcium-activated and voltage-gated potassium channels determined by a sea anemone toxin. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 21885-21892.
96. Rodriguez de la Vega,R.C. & Possani,L.D. (2004) Current views on scorpion toxins specific for K+-channels. *Toxicon*, **43**, 865-875.
97. Sallusto,F., Langenkamp,A., Geginat,J., & Lanzavecchia,A. (2000) Functional subsets of memory T cells identified by CCR7 expression. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*, **251**, 167-171.
98. Shaw,J.P., Utz,P.J., Durand,D.B., Toole,J.J., Emmel,E.A., & Crabtree,G.R. (1988) Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science*, **241**, 202-205.
99. Sperelakis,N. (1998) Origin of Resting Membrane Potentials. Cell Physiology Source Book (ed. by N. Sperelakis), pp. 178-201. Academic Press, San Diego.
100. Starkus,J.G., Kuschel,L., Rayner,M.D., & Heinemann,S.H. (1997) Ion conduction through C-type inactivated Shaker channels. *Journal of General Physiology*, **110**, 539-550.
101. Starkus,J.G., Varga,Z., Schonherr,R., & Heinemann,S.H. (2003) Mechanisms of the inhibition of Shaker potassium channels by protons. *Pflugers Arch.*, **447**, 44-54.
102. Steidl,J.V. & Yool,A.J. (1999) Differential sensitivity of voltage-gated potassium channels Kv1.5 and Kv1.2 to acidic pH and molecular identification of pH sensor. *Mol Pharmacol*, **55**, 812-820.
103. Stocker,M. & Miller,C. (1994) Electrostatic distance geometry in a K+ channel vestibule. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **91**, 9509-9513.
104. Swartz,K.J. & MacKinnon,R. (1995) An inhibitor of the Kv2.1 potassium channel isolated from the venom of a Chilean tarantula. *Neuron*, **15**, 941-949.
105. Teisseyre,A. & Mozrzymas,J.W. (2006) Influence of extracellular pH on the modulatory effect of zinc ions on Kv1.3 potassium channels. *J.Physiol Pharmacol.*, **57**, 131-147.
106. Teisseyre,A. & Mozrzymas,J.W. (2007) The influence of protons and zinc ions on the steady-state inactivation of Kv1.3 potassium channels. *Cell Mol.Biol.Lett.*, **12**, 220-230.
107. Tytgat,J., Chandy,K.G., Garcia,M.L., Gutman,G.A., Martin-Eauclaire,M.F., van der Walt,J.J., & Possani,L.D. (1999) A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies. *Trends.Pharmacol Sci*, **20**, 444-447.

108. Verheugen, J.A., Vijverberg, H.P., Oortgiesen, M., & Cahalan, M.D. (1995) Voltage-gated and Ca(2+)-activated K⁺ channels in intact human T lymphocytes. Noninvasive measurements of membrane currents, membrane potential, and intracellular calcium. *J.Gen.Physiol*, **105**, 765-794.
109. Wulff, H., Beeton, C., & Chandy, K.G. (2003a) Potassium channels as therapeutic targets for autoimmune disorders. *Curr.Opin.Drug Discov.Devel.*, **6**, 640-647.
110. Wulff, H., Calabresi, P.A., Allie, R., Yun, S., Pennington, M., Beeton, C., & Chandy, K.G. (2003b) The voltage-gated Kv1.3 K⁺ channel in effector memory T cells as new target for MS. *J.Clin.Invest*, **111**, 1703-1713.
111. Wulff, H., Miller, M.J., Hansel, W., Grissmer, S., Cahalan, M.D., & Chandy, K.G. (2000) Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel, IKCa1: a potential immunosuppressant. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **97**, 8151-8156.
112. Yellen, G., Sodickson, D., Chen, T.-Y., & Jurman, M.E. (1994) An engineered cysteine in the external mouth of a K⁺ channel allows inactivation to be modulated by metal binding. *Biophysical Journal*, **66**, 1068-1075.
113. Yeromin, A.V., Zhang, S.L., Jiang, W., Yu, Y., Safrina, O., & Cahalan, M.D. (2006) Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature*, **443**, 226-229.
114. Zagotta, W.N., Hoshi, T., & Aldrich, R.W. (1990) Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB. *Science*, **250**, 568-571.
115. Zhang, S., Kurata, H.T., Kehl, S.J., & Fedida, D. (2003) Rapid induction of P/C-type inactivation is the mechanism for acid-induced K⁺ current inhibition. *J.Gen.Physiol*, **121**, 215-225.
116. Zhang, S.L., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J.A., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H., Stauderman, K.A., & Cahalan, M.D. (2005) STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane. *Nature*, **437**, 902-905.
117. Zhou, Y., Morais-Cabral, J.H., Kaufman, A., & MacKinnon, R. (2001) Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature*, **414**, 43-48.
118. Zweifach, A. & Lewis, R.S. (1993) Mitogen-regulated Ca²⁺ current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca²⁺ stores. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 6295-6299.

8.2 Saját közlemények jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Somodi S, Varga Z, Hajdu P, Starkus JG, Levy DI, Gaspar R, Panyi G.: pH-dependent modulation of Kv1.3 inactivation: role of His399. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004 Oct;287(4):C1067-76. Epub 2004 Jun 16.

IF: 3.942 (JCR 2005)

Olamendi-Portugal T, **Somodi S**, Fernández JA, Zamudio FZ, Becerril B, Varga Z, Panyi G, Gáspár R and Possani LD.: Novel α -KTx peptides from the venom of the scorpion *Centruroides elegans* selectively block Kv1.3 over IKCa1 K⁺ channels of T cells. *Toxicon* 2005;46:418-429.

IF: 2.255 (JCR 2005)

Somodi S, Hajdu P, Gaspar R, Panyi G, Varga Z.: Potassium occupancy of the modulatory site regulating Kv1.3 inactivation kinetics depends on extracellular pH and potassium concentration.

(kézirat)

Az értekezés témájához közvetlenül nem kapcsolódó közlemények:

Szűcs A[#], **Somodi S**[#], Batta TJ, Tóth A, Szigeti PG, Csernoch L, Panyi G, Sziklai I.: Differential expression of potassium currents in Deiters cells of the guinea pig cochlea. *Pflugers Arch*. 2006;452:332-341.

[#]megosztott elsőszerzők

IF: 3.564 (JCR 2005)

Hajas G, Zsiros E, Laszlo T, Hajdu P, **Somodi S**, Rethi B, Gogolak P, Ludanyi K, Panyi G, Rajnavolgyi E.: New phenotypic, functional and electrophysiological characteristics of KG-1 cells. *Immunol Lett*. 2004 Mar 29;92(1-2):97-106.

IF: 2.301 (JCR 2005)

Bagdany M, Batista CV, Valdez-Cruz NA, **Somodi S**, Rodriguez de la Vega RC, Licea AF, Varga Z, Gaspar R, Possani LD, Panyi G.: Anuroctoxin, a new scorpion toxin of the {alpha}-KTx 6 subfamily is highly selective for Kv1.3 over IKCa1 ion channels of human T lymphocytes. Mol Pharmacol. 2004 Dec 22;

IF: 4.612 (JCR 2005)

Az értekezés témájához közvetlenül nem kapcsolódó könyvfejezet:

Panyi G, **Somodi S**, Varga Z, Pieri C, Pandi-Perumal SR, Damjanovich S and Gáspár R Jr.: Pharmacological effects of melatonin on ion channels. In: The pineal organ: A comparative perspective in 2000.

9 TÁRGYSZAVAK JEGYZÉKE

lymphocyta, káliumcsatorna, Kv1.3, extracelluláris pH, hisztidin, bárium, magas ionerősség
Centruroides elegans, skorpiótoxin, α -KTx

lymphocyte, potassium channel, Kv1.3, extracellular pH, histidine, barium, high ionic
strength, Centruroides elegans, scorpion toxin, α -KTx

10 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Dr. Gáspár Rezső Professzor Úrnak, a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet jelenlegi igazgatójának, az elektrofiziológiai laboratórium vezetőjének, hogy lehetővé tette, hogy az intézetben és munkacsoportjában kutatómunkát végezhsek, és tanácsaival tudományos munkámat segítette, irányította.

Köszönetem fejezem ki Prof. Dr. Damjanovich Sándor akadémikusnak, a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet előző igazgatójának, amiért felkeltette érdeklődésemet a biofizika iránt és lehetővé tette számomra, hogy az intézetben orvostanhallgatóként TDK munkát végezhsek.

Hálásan köszönöm témavezetőmnek, Dr. Panyi György egyetemi docensnek, amiért még a tudományos diákköri munka keretében bevezetett a tudományos kutatómunkába, segített a témaválasztásban, munkámat nagy szakmai tudásával és tapasztalatával irányította és felügyelte, valamint barátilag mindig maximálisan támogattott.

Köszönetet mondok másik témavezetőmnek, Dr. Varga Zoltán egyetemi adjunktusnak, aki a mindennapok során nagy segítséget nyújtott a kísérletek tervezésében, kivitelezésében, az eredmények interpretálásában.

Köszönettel tartozom a patch-clamp laboratóriumban dolgozó kollégáimnak, barátaimnak, Dr. Hajdú Péternek, Dr. Bagdány Miklósnak, Papp Ferencnek és Dr. Zsiros Emesének, akikkel együtt mindig jó hangulatú légkört teremtettünk a közös munkához, és akik mindig rendelkezésemre álltak, ha munkám során segítségre volt szükségem.

Hálával tartozom Nagy Cecilia, Harangi Istvánné, Szentesi Gergelyné és Pásztorné Tóth Enikő asszisztenseknek a mérések előkészítésében nyújtott segítségükért. Szeretnék köszönetet mondani a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet valamennyi dolgozójának, akik a dolgozat megírásában segítettek.