

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

A Kv1.2 és Kv1.3 K⁺-csatornák toxin-szelektivitásának molekuláris meghatározói

Papp Ferenc

Témavezető: Prof. Dr. Panyi György



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2009

Az értekezés címe:

A Kv1.2 és Kv1.3 K⁺-csatornák toxin-szelektivitásának molekuláris meghatározói

Doktori Iskola:

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Doktori Program:

Membránbiofizikai kérdések és vizsgálómódszerek

Témavezető:

Prof. Dr. Panyi György, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

Elnöke: Prof. Dr. Gergely Pál, akadémikus

Tagok: Prof. Dr. Garab Győző, az MTA doktora
Dr. Rusznák Zoltán, Ph.D.

A bíráló bizottság:

Elnöke: Prof. Dr. Gergely Pál, akadémikus

Opponensek: Prof. Dr. Enyedi Péter, az MTA doktora
Dr. Magyar János, Ph.D.

Tagok: Prof. Dr. Garab Győző, az MTA doktora
Dr. Rusznák Zoltán, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja és helye:

2009. december 15-én, 13:00 órakor, I. sz. Belgyógyászati Klinika tanterme.

Általános bevezetés

Az adaptív immunrendszer sejtjeinek zömét a T- és B-limfociták alkotják. Ezen sejtek legfőbb jellemzője, hogy antigéneket fajlagosan felismerni képes receptorokat hordoznak a felszínükön. Az antigénnel közvetve (T-sejt) vagy közvetlenül (B-sejt) kölcsönhatásba kerülő sejtek aktiválódnak. Ez a folyamat az antigénre nézve fajlagos (specifikus) és klonális, azaz csak az adott antigén felismerésére alkalmas receptort hordozó sejtek vesznek részt benne. Az aktiválódás eredményeképpen a sejtek osztódnak, majd effektor sejtekké és hosszú életű emlékezősejtekké differenciálódnak. A T-sejt receptor (TCR/CD3 komplex) stimulációját követően (2-3 óra) a limfociták akkor is osztódnak, ha a kezdeti stimulust megszüntetjük. Egy jelátviteli kaszkád kezdődik ekkor, melynek része az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) megemelkedése, majd aktivációval összefüggő gének (pl.: IL-2 génje) íródnak át, s végül a T-sejtek proliferációjával végződik.

A limfociták Kv1.3 (feszültségfüggő K^+) csatornájának felfedezésével egy időben derült ki, hogy ezek a csatornák központi szerepet játszanak a T-sejtek aktivációjának és proliferációjának szabályozásában. Az IKCa1 ($\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ a szisztematikus nómenklatúrában, Ca^{2+} aktivált K^+) csatornákkal együtt a Kv1.3 csatornák döntően meghatározzák a T-sejtek membránpotenciálját, s ezen keresztül a sejtek aktivációjában kulcsszerepet játszó Ca^{2+} jelátvitelt. A Kv1.3 csatornák szerkezetének és funkciójának feltárásában nagy szerepe volt a Kv1.3 csatornákat gátló peptid toxinoknak és a kémiai úton előállított ún. kis-molekula Kv1.3 inhibitoroknak. A Kv1.3 csatornák specifikus, nagy affinitású gátlószerei különös jelentőséggel bírnak abból a szempontból is, hogy alapjául szolgálhatnak bizonyos autoimmun-betegségek (pl. szklerózis multiplex, 1-es típusú diabétesz) jövőbeli gyógyszeres kezelésének, szelektív immunszuppresszió megvalósításán keresztül.

A gátlószerek fentiekben vázolt terápiás alkalmazásának elengedhetetlen feltételei a nagy affinitású kötődés a csatornához, ugyanakkor nagy szelektivitás is szükséges a nemkívánt mellékhatások elkerülése végett. A nagy szelektivitás gyakorlati értéke legalább 1000-szeres affinitásbeli különbséget jelent, azaz egy szelektív gátlószer egy adott csatorna típust legalább 1000-szer kisebb koncentrációban blokkoljon, mint az összes többi, biológiailag fontos funkciót ellátó csatornát. Az ioncsatornák nagy affinitású gátlószerei azonban nem feltétlenül hordozzák magukban a nagy szelektivitást is. Emiatt elengedhetetlen azon molekuláris kölcsönhatások megismerése, melyek a gátlószer-csatorna kölcsönhatásokat meghatározzák. Kísérletes munkámban részletesen ez utóbbival foglalkoztam.

Irodalmi áttekintés

Jelátvitel a T-limfociták aktivációja során, az ioncsatornák (Kv1.3, IKCa1, CRAC) specifikus élettani szerepe a folyamatban

A T-limfociták az antigénnel az antigénprezentáló sejtek (APC) útján közvetve kerülnek kölcsönhatásba. A T-sejtek antigénreceptora (TCR) az antigén feldolgozása során feltáruuló T-sejt-epitópot csak akkor tudja felismerni, ha az az ún. fő hisztonkompatibilitási génkomplex (MHC) által kódolt membránfehérjéhez kapcsolódva jelenik meg az APC felszínén. Az APC-k a feldolgozott antigént a T-sejteknek prezentálják, és a két sejtípus a TCR/CD3-MHC-komplex útján szoros kapcsolatba kerül egymással, amit a mindkét sejtfeleségen egyaránt jelen lévő adhéziós molekulák kölcsönhatása tovább erősít. Ezt követően számos intracelluláris protein kináz transzlokációja és aktivitásának fokozódása történik (pl. az Src kinázok csoportjába tartozó Lck és Fyn; ZAP-70; Tec).

A jelátviteli útvonalak közül kiemelkedő fontosságú a K^+ -csatornákkal kapcsolatban a Ca^{2+} jel kialakulása. Ez a foszfolipáz $C\gamma$ enzim ($PLC\gamma$) aktiválásával kezdődik. A $PLC\gamma$ enzim a foszfatidilinozitol-biszfoszfát membránlipidet inozitol-trifoszfátra (IP_3) és diacilglicerolra (DAG) hasítja. Az IP_3 az endoplazmatikus reticulum (ER) IP_3 -receptorához kötődve Ca^{2+} felszabadulást idéz elő. Az ER kiürülése után a sejtmembránban lévő „store-operated Ca^{2+} ” (SOC) csatornák, azon belül is a „ Ca^{2+} Release-Activated Ca^{2+} ” (CRAC) csatornák aktiválódnak, melyen keresztül Ca^{2+} áramlik be a sejtbe az extracelluláris térből, megemelkedvén így az $[Ca^{2+}]_i$. A tartós, legtöbb esetben oszcilláló intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció emelkedés a kalmodulinon (CaM) keresztül aktiválja a calcineurint. Ez elősegíti az NF-AT transzkripció faktor magba történő transzlokációját, aminek következtében az IL2 gén aktiválódik, és a többi jelátviteli mechanizmussal (MAP kináz, Ras, Fos) szorosan együttműködve beindítja a sejtek proliferációját. Az IL2 expresszió szükséges a további, immár antigén független T-sejt aktivációhoz.

Ezen jelátviteli folyamat Ca^{2+} -jel részében a Ca^{2+} - és K^+ -csatornáknak fontos szerepük van. A kétfázisú Ca^{2+} -jel első szakaszában a T-sejt Ca^{2+} -raktárából (ER) az IP_3 -receptoron keresztül felszabaduló Ca^{2+} kis mértékben megnöveli az $[Ca^{2+}]_i$. Majd a raktárürülés miatt kinyit a CRAC-csatorna, amin keresztül beáramló Ca^{2+} tovább növeli az $[Ca^{2+}]_i$ -t, ami a második fázist jelenti. A raktárürülés és a CRAC-csatorna nyitása közötti kapcsolatban két fehérje, a STIM és az ORAI játszanak fő szerepet. A STIM az ER membránjában

elhelyezkedő transzmembrán fehérje, amely a raktár ürülését képes érzékelni a raktár belső részére eső (a Kalmodulinéhoz hasonló szerkezetű) Ca^{2+} -ot kötő „EF-hand”-jével. Amikor az ER-ben lecsökken a Ca^{2+} -koncentráció, a STIM fehérjék csoportosulni kezdenek, ún. „puktákat” alkotnak az ER membránjának azon részén, amelyik a sejtmembránnal mintegy összesimul. Ezzel egyidőben a sejtmembránban lévő ORAI (a CRAC-csatorna pórusát formáló) transzmembrán fehérjék arra a helyre csoportosulnak, amelyhez az ER membrán simul (10-25nm távolság).

A STIM feltehetően egyéb proteinek közbeiktatásával aktiválja az ORAI-t, létrehozva ezzel az aktív CRAC-csatornát. A nyitott CRAC-csatornákon keresztül folyó Ca^{2+} -áram hajtóerejének mértéke szempontjából fontos a sejtek membránpotenciálja. A T-sejtek membránpotenciálja -50 és -60 mV között van, melyet döntően a két K^{+} -csatorna, a feszültségfüggő depolarizáció-aktivált Kv1.3 és a Ca^{2+} -aktivált IKCa1 csatorna határozza meg. E két ioncsatorna által létrehozott kation kiáramlás a depolarizáló hatást jelentő Ca^{2+} beáramlás mellett is biztosítja a Ca^{2+} beáramláshoz szükséges hajtóerőt, és így a megfelelő Ca^{2+} -mediált jelátvitelt.

A Kv1.2 és Kv1.3 kálium csatornák felépítése és eloszlásuk a szervezetben

Az ioncsatornák legnagyobb és legszerteágazóbb csoportját a K^{+} -ra szelektív csatornák adják. Ezen belül a feszültség-kapuzott Kv csatornák számlálják a legtöbb tagot (12 alosztály: Kv1...Kv12, melyen belül genetikai homológia alapján további alcsoportok vannak, mint pl. Kv1.2 vagy Kv1.3 a Kv1 családon belül). A Kv csatornák négy alegységből épülnek fel (tetramer), melyek elrendeződése megközelítőleg szimmetrikus az együttesen létrehozott pórus körül. A sejtek egy részében a Kv csatornák azonos alegységeiből álló homotetramer csatornát találunk (pl. humán T sejteken Kv1.3-at), míg a legtöbb sejtben az azonos családba tartozó ioncsatorna alegységek funkcionális heterotetramereket képeznek (pl. makrofágok esetén Kv1.3/Kv1.5 vagy neuronok esetén Kv1.1/Kv1.2/Kv1.3 heterotetramerek. Mindegyik alegység kb. 500 aminosavból áll, melyeket 6 transzmembrán α -helikális szegmens és az őket összekötő intra- és extracelluláris hurkok építik fel. Az 5. és 6. transzmembrán szegmensek (S5 és S6) közötti extracelluláris hurkok valamint az S6 szegmensek egyes részei együttesen alkotják a K^{+} -csatorna pórusát, melyen keresztül a K^{+} átjut a plazmamembránon. A csatorna ugyanezen régiója felelős a Kv1.3 csatornák számos peptid és kis-molekula gátlószerének

kötéséért (ld. később). A pórusrégió tartalmazza a K^+ szelektivitást biztosító különösen konzervatív szelektivitási filter (GYGD) szekvenciát is. A membránpotenciál változásait a csatorna feszültség-szenzora érzékeli, melyet a többszörösen pozitívan töltött S4 hélixek ill. a nettó negatív töltést hordozó S3 hélixek közösen alkotnak. A feszültség-szenzor membránpotenciál-függő elmozdulása a csatorna aktivációs kapujának megnyílásához vezet. Az aktivációs kaput magát a csatorna citoszolikus bejáratánál az S6 hélixek kereszteződése hozza létre.

Feszültségfüggő jellegéből adódóan a Kv1.3 csatorna fiziológiás funkciója a membránpotenciál és a Ca^{2+} -jelátvitel szabályozása. Ez az ioncsatorna az immunrendszer és a központi idegrendszer jellemző feszültségfüggő ioncsatornája, de fellelhető az agyban, a tüdőben, hasnyálmirigy Langerhans szigetekben, a tímuszban, a lépben, a nyirokcsomóban, a fibroblasztokban, B- és T-limfocitákban, az elő(progenitor)-B-sejtekben, a mandulában, makrofágokban, mikrogliaokban, oligodendrocitákban, oszteoklasztokban, vérlemezkékben, és a herében is. A Kv1.3 csatorna alegységei a Kv1.x családba tartozó más csatorna alegységekkel is képesek csatornát formálni (heteromultimerek), de a többi Kv családba tartozókkal nem.

A Kv1.2 csatorna a membránpotenciál fenntartásában és az elektromos ingerelhetőség módosításában játszik fiziológiásan szerepet a neuronokban és az izomsejtekben. Megtalálható ezen kívül az agyban, a gerincvelőben, Schwann sejtekben, a szívizomban (kamra, pitvar), hasnyálmirigy Langerhans sziget sejtekben, a retinában, a simaizomban, és a PC12 sejtekben. A Kv1.2 alegységek is képesek heteromultimereket alkotni más Kv1.x családba tartozókkal, ám a többi Kv családtagokkal szintén nem.

Toxinok szelektivitási profilja

A skorpiók mérganyaga peptidek sokaságát tartalmazza, melyek közül sok nagy affinitással képes kötődni az ioncsatornákhöz. A jelenleg ismert skorpiók mérge főként kétfajta toxint tartalmaz:

- hosszú láncú, kb. 60-70 aminosavrést tartalmazó specifikusan Na^+ -csatornákat blokkoló peptidet.
- rövid láncú, kb. 37-39 aminosavrést tartalmazó specifikusan K^+ -csatornákat blokkoló polipeptidet.

Egy harmadik polipeptid toxin családról pedig az derült ki, hogy a szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -felszabadító csatornáját aktiválja.

A legalaposabban tanulmányozott skorpió toxinok a Na^+ -csatorna módosító vegyületek, amelyeket további α és β kategóriákba osztályoztak a Na^+ -csatornán található eltérő kötőhelyeik alapján. Az α -skorpió toxinok főként a Na^+ -csatornák inaktivációját módosítják, míg a β -skorpió toxinok a csatornák aktivációjának mechanizmusára hatnak. A peptidek közül több mint 120-ról tudjuk, hogy gátolják a K^+ -csatornákat, többé-kevésbé szelektíven a különböző K^+ -csatornák között. Ezek a toxinok hasonlóságot mutatnak: jellemzően 30-40 aminosavból állnak, mindegyikük rendelkezik egy α -hélixszel és két β -redővel, melyek három vagy négy diszulfid híddal vannak összekapcsolva. Általános szerkezeti tulajdonságuk még a nagy affinitással kötődő toxinoknak az ún. „eszenciális diád”, amely egy lizinből és egy tőle kilenc pozícióval C-terminális irányban elhelyezkedő aromás aminosavból áll. A toxinok hasonló 3 dimenziós szerkezete miatt a centrális lizin és az aromás aminosav α szénatomja egymástól néhány angstrom távolságra van a molekula azon felszínén, mely az ioncsatornák extracelluláris pórusa felé tekint. Az aromás aminosav azonban nem tűnik szükségesnek a hatékony gátláshoz, de annál inkább a különböző csatornatípusok közötti szelektivitáshoz, mint pl. a Kv1.2 és Kv1.3 között. Ezzel szemben a diád lizin aminosavjának pozitív töltésű oldallánca, amely a blokkolás során a K^+ -csatorna szelektivitási filterébe nyúlik bele, nagyon fontos a nagy affinitású gátláshoz. Mindemellett a toxin és a csatorna közötti hosszantartó összekapcsolódás több ponton történő, különböző mechanizmusokon keresztüli kölcsönhatást igényel. A toxinok és a csatorna fehérjék komplementer mutagenézise, valamint a termodinamikai mutáns ciklus analízis vizsgálatok azt mutatták, hogy három alapvető mechanizmus járulhat hozzá a toxin-csatorna kölcsönhatáshoz. Az egyik ezek közül az ún. hosszútávú elektrosztatikus kölcsönhatás, ami a többszörösen pozitív töltésű toxin és a csatorna extracelluláris bejáratának negatív töltései között ébrednek. A másik, a pozitív töltésű diád lizin szempontjából lényeges kölcsönhatás a rövid-távú, specifikus elektrosztatikus kölcsönhatás, és végül az oldalláncok közötti szterikus kölcsönhatás. Ez utóbbi szempontból kiemelendő a charybdotoxin (ChTx) Shaker típusú Kv csatornák iránti affinitásának vizsgálatokor izolált kölcsönhatás: egytlen aminosav oldallánc „térfogatának” jelentős csökkentése a csatorna fehérje turret részében (*Shaker* F425G) a ChTx affinitás kb. 1000-szeres emelkedését okozta. Nagyon valószínű az is, hogy egy toxinnak a különböző csatornák közötti szelektivitását az határozza meg, hogy mennyire különböznek a toxin-csatorna kontaktust létrehozó pontok és a következményes fizikokémiai kölcsönhatások. A

nagy szelektivitás igen fontos abban az esetben, ha a toxint, vagy annak származékát a jövőben terápiás célokra szeretnék használni, egy adott sejttípus speciális funkciójának módosításán keresztül. Ugyankor a majdani terápia mellékhatásának minimalizálása miatt is fontos a nagy szelektivitás, hogy más ioncsatorna típusra a toxin ne fejtsen ki hatást.

Laboratóriumunk molekuláris farmakológiai irányú kutatásának középpontjában a humán T-sejtek és azok Kv1.3 ioncsatornáit állnak. A T-sejtek egyes altípusai különböző mértékben fejezik ki a Kv1.3 és az IKCa1 csatornákat, így válik lehetővé a Kv1.3 csatornát gátló toxinok terápiás célú felhasználása. A nyugvó T-sejtek átlagosan ~200-400 Kv1.3 csatornát és 8-10 IKCa1 csatornát fejeznek ki. A sejtaktiváció után a sejtfelszíni antigénexpressziótól, és az ezzel párosuló élettani funkciótól függően különböző mértékben változik a sejtek által expresszált Kv1.3 és IKCa1 csatornák száma. 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 sejtté, kis része pedig különböző típusú memória T-sejtté 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} csatorna-fenotípus 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). Így az IKCa1 csatornák számának megnövekedését követően a naíve és T_{CM} sejtek proliferációja Kv1.3 inhibitoroktól függetlenné válik, szemben a T_{EM} sejtek proliferációjával, ami kizárólag Kv1.3-függő. 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 meggátoljuk.

Chandy és munkatársai azt találták, hogy sclerosis multiplexben, az 1-es típusú diabetes mellitusban ill. a rheumatoid arthritisben szenvedő betegekben a betegség kialakulásáért felelős autoreaktív T-sejtek főleg effektor memória (T_{EM}) sejtek, amelyek nagy számban expresszálnak Kv1.3 csatornákat. Ezzel szemben a betegekből származó, más

antigén specificitással bíró T- sejtek, ill. az egészséges kontroll személyekből származó autoreaktív T-sejtek főleg naïve ill. centrális memória (T_{CM}) sejtek, amelyek kisebb számban expresszálják a Kv1.3 csatornákat. A T_{EM} sejtekben az antigén prezentációt követően a Kv1.3 csatornák az immunológiai szinapszisba vándorolnak. 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 (naïve) és T_{CM} sejtek az IKCa1 csatornák fokozott expressziójával mentesülnek a Kv1.3 blokkolás proliferációt gátló hatása 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 csatornablokkolók ugyanakkor az eddigi vizsgálatok szerint nem rendelkeznek szisztémás toxicitással, nem mutagének. Mindezek alapján várható a Kv1.3 csatornablokkolók terápiás célú felhasználása autoimmun betegségek esetében.

A specifikus blokkolók fontos információt szolgáltatnak a Kv csatornák pórus régiójának szerkezetéről is. A toxint kötő régiók, receptorok és a toxinok komplementer mutagenézisével pl. következtetni lehet a pórus szerkezetére és a molekuláris kölcsönhatásokra. A pórus és a szelektivitási filter szerkezetére ezen adatok alapján levont indirekt következtetéseket Roderick MacKinnon röntgen-krisztallográfiás kísérletekkel igazolta, melyért 2003-ban kémiai Nobel díjat kapott. A feszültségfüggő K^{+} -csatornák kristályszerkezete alapján a csatornák extracelluláris pórusa négy szekvenciális K^{+} kötőhelyet tartalmaz, ezen kívül egy extracelluláris rehidrációs/dehidrációs kötőhelyet is feltételeznek. A toxinok receptorának jelentős részét az S5-S6 hélix közötti hurok S5-höz közeli ún. „turret” régiója, valamint a pórus szelektivitási filterében elhelyezkedő aminosavak oldalláncai adják. A kationok csatornaszájadékból történő kiszorításában kitüntetett szerepet játszik a csatornaszájadékba mélyen behatoló, pozitív töltésű lizin.

In vitro kísérletekben strukturálisan nagyon különböző peptid és nem peptid típusú Kv1.3 csatornablokkoló molekulák képesek gátolni a mitogén indukált [3H] timidin beépülést, a citokin termelést, a gén expressziót, a T-sejt proliferációt és az in vivo immunválaszt a csatorna blokkolásához szükséges koncentrációban. Ezek a csatornablokkolók (pl. 4-aminopiridin, tetraetil-ammónium, progeszteron, correolide) mikromoláris illetve millimoláris koncentrációban gátolták a feszültségfüggő K^{+} -csatornákat. Az első nanomoláris koncentrációban is hatékony peptid toxin: a Charybdotoxin (ChTx)

(Kv1.3 csatornára $K_d = 2.2$ nM), amit skorpió méregből izoláltak. Később több nano- és pikomoláris affinitású skorpióméreg eredetű csatornablokkoló peptidet is felfedeztek. Ezek a toxinok azonban nem csak a Kv1.3 csatornát, de más, hasonló szerkezetű ioncsatornákat is gátolnak hasonló nagyságrendű koncentrációban. Főleg az egyazon családba tartozó ioncsatornákat, így a Kv1.x többi tagjait elsősorban, mint a Kv1.2-t, mely szerkezetileg nagyon hasonló a Kv1.3-hoz.

Toxinok specificitásának növelése rekombináns technikákkal

Sok laboratórium foglalkozik világszerte a jelenleginél hatékonyabb, specifikusabb peptid és nem-peptid típusú K^+ -csatorna-blokkoló vegyületek előállításával. Az ilyen irányú kutatásokat erősen motiválja a gyógyszergyárak részéről fennálló érdeklődés olyan csatornablokkoló vegyületek iránt, melyek immunszuppresszív terápiában minimális mellékhatással alkalmazhatóak. Laborunk egyik fő kutatási vonala is új Kv1.3 ioncsatornát gátló skorpiótoxinok keresése, illetve az általunk felfedezett toxinok csatorna-specificitásának vizsgálata.

Néhány kis szelektivitású, többféle ioncsatornát is gátló peptidet molekuláris biológiai módszerekkel specifikusabbá lehetett tenni. A tengeri rózsa (sea anemone) ShK polipeptidje például a Kv1.3 mellett gátolja a Kv1.1, Kv1.4, Kv1.6 neuronális csatornákat is pikomoláris koncentrációban. A toxin-csatorna kölcsönhatásban kritikus szerepet játszó lizint (K22) egy szintén pozitív töltésű, de nem természetes eredetű aminosavra, diamino-propionsavra történő cserélésével (K22Dap) elérhető volt, hogy a peptid Kv1.3-ra vonatkozó nagy affinitása megmaradjon, míg a többi feszültség-kapuzott csatornára vonatkozóan az affinitás több nagyságrenddel csökkenjen (Kalman 1998). Az így kapott ShK-Dap22 szubnanomoláris koncentrációban gátolta az anti-CD3-indukált radioaktív timidin beépülését humán T-sejtekbe.

Az OSK1 38 aminosavból álló, az Orthochirus scrobiculosus skorpió venomjából származó peptid, ami gátolja a Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3 ill. az IKCa1 csatornákat rendre 0,6-, 5,4-, 0,014- és 225 nM-os félhatásos koncentrációkban. Az ismert Kv1 családhoz tartozó csatornák blokkolóinak aminosav szekvenciájával összevetve az OSK1 toxin szekvenciáját, felismerhetővé váltak azok a különbségek, melyek megváltoztatásával az OSK1 toxin szelektivitási és affinitási tulajdonságainak megváltozása is remélhető volt. Mindezek alapján a 16-os pozícióban lévő glutamátot lizinre cserélve (E16K), valamint 20-as pozícióban lévő lizint aszpartátra (K20D), a 12-es arginint prolinra (R12P) új tulajdonságú toxinokat kaptak:

[K₁₆]-OSK1, [D₂₀]-OSK1, [K₁₆,D₂₀]-OSK, [P₁₂,K₁₆,D₂₀]-OSK1 jelzésűeket, a különböző pontmutációknak – egy, vagy egyszerre több – megfelelően. A [K₁₆]-OSK1 affinitása Kv1.3-ra 0.067 nM-ra romlott, míg a többi, korábban gátolt csatornákra vonatkozóan ugyanaz maradt. A [K₁₆,D₂₀]-OSK esetében nőtt az affinitás a Kv1.3-ra: 0.003 nM, míg a többi csatornára alig változott. A [D₂₀]-OSK1 és a [P₁₂,K₁₆,D₂₀]-OSK1-nál bár csökkent az affinitás a Kv1.3-ra vonatkozóan, de nem nagyságrenddel (kb. 2- ill. 4-szer nagyobb K_d-k), azonban a többi csatornára vonatkozóan 1- vagy 2 nagyságrenddel csökkent.

A *Buthus Martensi* venomjából tisztított BmKTX toxin három aminosavját: Gly11, Ile28 és Asp33 kicserélve rendre Arg, Thr és His aminosavakra egy új peptidet eredményezett, amelyet ADWX-1-nek neveznek. Ez az új toxin a Kv1.3 ioncsatornát már pikomólos nagyságrendben blokkolja (K_d = 1.89 pM), ami kb. 100-szor kisebb koncentráció a natív BmKTX-hez képest. Mindemellett az ADWX-1 jó szelektivitással is rendelkezik a Kv1.3-ra nézve a Kv1.1 és a Kv1.2 ioncsatornák mellett.

Célkitűzések

- **Kísérleteink során célul tűztük ki új, a Kv1.3 csatornákat nagy affinitással gátló skorpió toxinok felfedezését és jellemzését.**
A *Centruroides suffusus suffusus* valamint a *Tityus stigmurus* skorpió venomjából izolált peptideket vizsgáltunk.
- **Vizsgálni kívántuk az új, Kv1.3-gátló toxinok (Css20 és Tst26) szelektivitását.**
A peptidek különböző feszültség-kapuzott (mKv1.1, hKv1.2, hKv1.4, hKv1.5, hBKCa, hERG, rKv2.1) és kalcium-aktivált (hIKCa1) kálium csatornára, továbbá egy szívizombeli nátrium csatornára (hNav1.5) kifejtet hatásukat hasonlítottuk a Kv1.3 gátló képességükhöz.
- **Jellemezni kívántuk e két toxin farmakológiai tulajdonságait a két, nagy affinitással gátolt csatornatípusra vonatkozóan (Kv1.2 és Kv1.3).**
Dózishatás-görbe elkészítése, a félhatásos koncentráció és a Hill koefficiens meghatározása mindkét toxin esetében mindkét csatornára vonatkozóan.
- **Terveztük annak vizsgálatát, hogy a toxin/csatora komplex kialakulása megváltoztatja-e a Kv1.2 és a Kv1.3 ioncsatornák biofizikai tulajdonságait.**
Az egyensúlyi aktiváció és -inaktiváció feszültségfüggésének vizsgálata; a $V_{1/2}$ értékek meghatározása mindkét toxinnál, mindkét csatornára.
- **Elemezni kívántuk a Kv1.2 és a Kv1.3 szelektivitást meghatározó tényezőket.**
Aminosav szekvenciák vizsgálata: összehasonlítva más, hatékony toxinok szekvenciájával, toxinok mutagenézis kísérleteinek eredményeivel, dokkolási szimulációk eredményeivel.

Anyagok és módszerek

Toxinok

A *Centruroides suffusus suffusus* és a *Tityus stigmurus* nevű skorpiókból elektromos stimulációval nyert teljes mérgek vízben oldható frakcióit először magas nyomású folyadék-kromatográfiás eljárással (HPLC) választották szét: a kihígított venomokat analitikai C18 reverz-fázisú oszlopon (250 x 10 mm) frakcionáltuk mindkét esetben. Az egyes aktív (Kv1.3 csatornát gátló) frakciókat további alfrakciókra bontottuk hasonló HPLC technikával. A Csx20 név arra utal, hogy a lineáris trifluorecetsav-gradiens elúció hányadik percében szedett frakcióban jelent meg a peptid az eluátumban - ez esetben a 20. percben - ami Tst26 esetén a 26. percet jelenti. Mindkét toxin szekvenciáját Beckam LF 3000 analízátor segítségével, molekulatömegüket pedig tömegspektrométerrel (Finnigan LCQ^{DUO}, San Jose, CA, USA) határoztuk meg. A toxinok izolálását és a szekvencia analízist kollaborációs partnerünk (Dr. Possani, Cuernavaca, Mexikó) laboratóriumában végezték.

Sejtek és ioncsatorna gének

Limfocita-szeperálás (Kv1.3 ioncsatorna)

A Kv1.3 áramokat humán perifériás T-limfocitákon mértük. A mononukleáris sejteket Ficoll gradiens centrifugálással nyertük egészséges donoroktól származó heparinizált humán vérből. 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 tenyésztettük 5% CO_2 mellett 37°C-on 24 lyukú tenyésztőedényekben, RPMI-1640 médiumot használva, 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$) phytohemagglutinin (PHA-P, Sigma-Aldrich Kft, Hungary) adtunk a K^+ -csatorna expresszió növelése érdekében.

Különböző ioncsatornák heterológ expressziója

A Cos-7 tenyésztése és bennük tranziensen kifejezett csatornák:

A Cos-7 sejteket standard sejtenyésztési feltételek mellett tartottuk fent. A **hIKCa1** ioncsatorna vizsgálatakor a sejtekbe tranziensen olyan dupla-gén plazmidot transzfektáltunk, mely kódolta a GFP fehérjét és az IKCa1 csatornát is (ajándék H. Wulff-tól, UC Davis, CA, USA). A többi, itt felsorolt ioncsatorna esetén két plazmid ko-transzfekecióját végeztük: a GFP-t kódoló plazmidot a vizsgálni kívánt ioncsatornát kódoló plazmiddal együtt juttatuk be a sejtekbe. Ezek a csatornák a következők voltak: **hKv1.2** (pcDNA3/Hygro vektor, amely a teljes Kv1.2-t kódoló szekvenciát tartalmazza, ajándék S. Grissmer-től, U. of Ulm); **hKv1.4** (hKv1.4ΔN: az N-terminális inaktivációs egységet nem tartalmazó Kv1.4 mutáns, ajándék D. Fedida-tól, University of British Columbia, Vancouver, Canada); **rKv2.1** (ajándék S. Korn-tól, U. of Connecticut); **hNav1.5** (ajándék R. Horn-tól, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA, USA).

A tsA-201 sejtek tenyésztése és a bennük tranziensen kifejezett csatornák:

Az *SV40 large T antigénnel transzformált* humán embrionális vese sejteket (tsA-201) magas glükóz tartalmú *Dulbecco's minimum essential medium* tápoldatban tenyésztettük, 37°C-on, 5% CO₂ és 95%-os páratartalom mellett. A tápoldat tartalmazta még a következőket: 10% FBS, 2 mM l-glutamin, 100 U/ml penicilin-G, és 100 µg/ml streptomycin (Invitrogen). A sejteket hetente kétszer oltottuk át, a kitapadva növő sejteket 7 perces 0.2 g/L EDTA-t tartalmazó PBS oldattal történő inkubációval választottuk le a tenyésztőedény aljáról. A tsA-201 sejtekben a **hBKCa-** (hSlo1 gén (U11058), pCI-neo plazmidban, ajándék T. Hoshi-tól, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA) és a **hKv1.5-** (ajándék D. Fedida-tól, University of British Columbia, Vancouver, Canada) ioncsatornákat és a GFP-t kódoló plazmidot tranziensen kotranszfekecióval fejeztük ki.

Ioncsatorna génekkel stabilan transzfektált sejtvonalak:

A **hERG (Kv11.1)** csatornák áramait a csatorna génnel stabilan transzfektált HEK-293 sejtekben, míg a **mKv1.1** csatornák áramait az egér Kv1.1 csatorna génjével stabilan transzfektált L929 sejtvonalba mértük. (részletesebben: Grissmer, 1994; ajándék H. Wulff-tól (UC Davis, CA, USA)).

Tranziens transzfekeció:

A sejteket (mind a COS-7-et, mind a tsA-201-et) Lipofectamine 2000 reagenst használva transzfektáltuk a gyártó (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) útmutatásai szerint, standard feltételek között tenyésztve. Röviden: A transzfektálást 35 mm átmérőjű petriedényben

végeztük a sejtek kb. 80%-os konfluenciája mellett. A transzfekciót a zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) és a csatornát kódoló plazmidok 1:5 arányú keverékével végeztük: 1 µg GFP és 5 µg csatornát kódoló plazmid 10 µl Lipofectamine-nal. A plazmidok keverési aránya azt biztosította, hogy a zöld fluoreszcenciát mutató sejtek több mint 70%-a a kotranszfektált ioncsatornákat is expresszálta. Az áramokat egy nappal a transzfektálás után mértük. A GFP pozitív, transzfektált sejteket Nikon TE2000U invert fluoreszcens mikroszkóppal azonosítottuk.

Elektrofiziológia

Méréseinket a patch-clamp technika teljes-sejt (whole-cell) konfigurációjában végeztük, minden esetben szobahőmérsékleten (22-25 °C), Axopatch 200A és Multiclamp 700B patch-clamp erősítőket használva, feszültség-zár üzemmódban. 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 Axon Digidata 1200 és 1322A illesztőegységen keresztül a pCLAMP8/10 programcsomag segítségével (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA). Méréseink során, szükség esetén soros ellenállás kompenzációt alkalmaztunk egészen 70%-ig, a soros ellenálláson eső feszültségből adódó hiba korrekciójának érdekében. Így a feszültséghibát minden esetben 5 mV alá csökkentettük.

A pipettákat GC 150 F-15 boroszilikát (Clark) üvegapillárisokból húztuk öt fázisban, majd hővel políroztuk a hegyüket. A pipetták ellenállása normál külső- (extracelluláris) és belső- (intracelluláris) oldat esetén 3-5 MΩ volt.

A külső oldatok minden esetben 0.1 mg/ml koncentrációban BSA-t (bovine serum albumin, Sigma-Aldrich) tartalmaztak, elkerülendő a peptid toxinok kikötődését a műanyag felületekhez. A külső oldatok ozmolaritása 302 és 308 mOsm/kg között volt, míg a belső oldaté kb. 295 mOsm/kg. Az oldatok cseréjét a mért sejtek környezetében gravitáció által hajtott perfúziós rendszer segítségével valósítottuk meg, folyamatos elszívás mellett.

A perfúziós fej 6-8 bemenettel rendelkezett, azaz 6-8 különböző oldat célbajuttatására volt alkalmas. A perfúziós fej kimeneti oldalát egy PE10-es (0,28 mm belső-, 0,61 mm külső átmérő) cső adta, melynek tölcészerűen kiképzett kifolyó nyílása kis turbulencia mellett juttatta az extracelluláris oldatot közvetlenül a sejtekre.

Adatkiértékelés

Az adatok gyűjtésére és kiértékelésére a pClamp8/10 szoftver-csomagot (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA) használtuk. A mért áramgörbét a kiértékelés elején korrigáltuk az ohmikus szivárgási áramra, és digitálisan megszűrtük azokat (három pontos boxcar módszerrel).

A dózishatás-görbén minden pont 3-7 független kísérlet mérési eredményének az átlaga, azok SEM hibájával ábrázolva. A kapott pontokra két-paraméteres Hill-egyenletet illesztettünk:

$$RCF = \frac{K_d^n}{K_d^n + [Tx]^n}$$
, ahol RCF (Remaining Current Fraction) a megmaradó áramhányad ($RCF = \frac{I}{I_0}$, ahol I és I_0 az áramamplitudók a toxin adott koncentrációja mellett, ill. a toxin hiányában (kontroll oldatban)), K_d a disszociációs állandó, n a Hill-koefficiens és $[Tx]$ a toxin-koncentráció.

Az egyensúlyi aktiváció és inaktiváció feszültségfüggését az adatpontokhoz illesztett Boltzmann-függvény paramétereivel jellemeztük:

$$G_{norm} = \frac{1}{1 + e^{-\frac{V - V_{1/2}}{k}}} \quad \text{ill.} \quad \frac{I}{I_{-120}} = \frac{1}{1 + e^{-\frac{V - V_{1/2,i}}{k_i}}}$$

ahol G_{norm} és I/I_{-120} a mérési adatokból számított mennyiség (ld. ott), V az aktuális tesztpotenciál, $V_{1/2}$ és $V_{1/2,i}$ rendre a félinaktivációs feszültség és félinaktivációs feszültség, k és k_i pedig az aktiváció és az inaktiváció feszültségfüggésének meredekségei. Az adott tesztpotenciálhoz tartozó, de különböző sejteken felvett G_{norm} és I/I_{-120} értékeket átlagoltuk, és az így kapott $G_{norm} - V$ és $I/I_{-120} - V$ összefüggésekhez illesztettük a Boltzmann függvényt.

A teljes sejt áram inaktivációs kinetikáját az inaktivációs időállandóval (τ) jellemeztük, mely az áramgörbe leszálló szárához illesztett, egy exponenciális tagot tartalmazó függvény jellemző paramétere: $I(t) = A \times e^{-t/\tau} + C$, ahol I az aktuális áramerősség, C az egyensúlyi (steady-state) áram nagysága, A az inaktiválódó komponens amplitúdója, t pedig az illesztés kezdetétől számított idő.

Eredmények

A Css20 és a Tst26 szelektivitása

A Css20 és a Tst26 toxinokat különböző kálium-csatornákon és egy feszültség-kapuzott nátrium-csatornán teszteltük teljes-sejt ionáramokat mérve patch-clamp technika segítségével. A kálium-csatornák közül öt a feszültség-kapuzott *Shaker*-család tagja: Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.4 és Kv1.5. A Ca^{2+} -aktivált K^+ csatornák közül a közepes konduktanciájú, feszültség-független IKCa1 ($\text{K}_{\text{Ca}}3.1$) és a nagy konduktanciájú, feszültség- és Ca^{2+} -aktivált kálium-csatornák áramait mértük a két toxin jelenlétében. A potenciális kardiológiai hatások megismeréséhez a Css20 és a Tst26 hatását mértük Nav1.5 és hERG (Kv11.1) csatornákon, melyek rendre a szívizom nátrium- és egyik fajta kálium-csatornái. A Css20 hatását a központi idegrendszerben kifejeződő Kv2.1 csatornán is tanulmányoztuk. Ezeket az ioncsatornákat különböző sejtvonalakban expresszáltattuk, a megfelelő feszültség-protokollok alkalmazásával kiváltottuk az ionáramokat (részletesebben alább, valamint az *Anyagok és módszerek*ben), és mértük, hogy a 10 nM koncentrációjú toxin (Css20 vagy Tst26) mekkora gátló hatást fejt ki a különböző csatornákra. A 10 nM-os toxin koncentrációt egyrészt az alapján választottuk meg, hogy az irodalmi adatok alapján a Kv csatornák jó gátlószerei az alacson nM-pM koncentráció tartományban már hatásosak, másrészt a vizsgálatra rendelkezésre álló peptid mennyiség igen komoly gátlót jelentett volna a magasabb peptid koncentrációk mellett végzett kísérleteknek.

Mivel érdeklődésünk középpontjában a Kv1.3 ioncsatorna áll, ezért szelektivitási vizsgálatainkhoz először a Kv csatornák közül választottunk. Ezen belül is a Kv1.x családba tartozó csatornák mutatják a legnagyobb genetikai hasonlóságot a Kv1.3 csatornához. Eredményeink azt mutatja, hogy a Kv1.4 és Kv1.5 csatornákra nincs hatása a Css20 peptidnek 10 nM koncentrációban. Teljesen hasonló a helyzet Tst26 esetében is, a toxin nem gátolta az ionáramokat (nincs bemutatva, ld. eredeti közlésemény). Ezen megállapításaink jó egyezésben vannak korábbi eredményekkel, ti. a Kv1.4 és a Kv1.5 toxin-rezisztens csatorna, azaz jelenleg nem ismert olyan peptid, amelyik gátolná ezeket a csatornákat. Ezzel szemben a Kv1.1 csatornákat más skorpió-toxinok hatékonyan gátolják (mint pl. a Kaliotoxin, Margatoxin, Hongotoxin), ugyanakkor sem a Css20, sem pedig a Tst26 nem gátolta Kv1.1 áramokat. Bár a rendelkezésünkre álló toxinmennyiség meglehetősen korlátozott volt, egyetlen csatorna vizsgálatát azonban el tudtuk végezni 100 nM toxin koncentráció mellett is. Ez a Kv1.1 csatorna volt, melynél a megmaradó áramhányadnak 0.957 ± 0.005 ($n=3$) adódott 100 nM

Tst26 esetében (eredmény nincs bemutatva), amely tisztán jelzi azt, hogy a peptidnek nincsen Kv1.1 gátló hatása még ebben a koncentrációban sem.

A fentiekkel szemben a Kv1.2 és Kv1.3 csatornákat mind a Css20, mind pedig a Tst26 jelentősen gátolta 10 nM koncentrációban.

A Shaker családba tartozó feszültség-kapuzott K^+ -csatornákon felül megvizsgáltuk a Css20 két további, szintén feszültség kapuzott kálium csatornára gyakorolt hatását: a hERG és a Kv2.1 csatornákat gátló képességét kívántuk meghatározni. A hERG csatorna vizsgálata ebből a szempontból igen kritikus, ugyanis amennyiben a peptid a hERG csatornákat gátolja, (erre van példa az irodalomban (REF ERG toxin)), úgy ez megakadályozhatja a peptid biológiai aktivitásának mérését állatkísérletes modellekben. A hERG csatornák ugyanis szívizomsejtekben fejeződnek ki, a csatornák árama jelentősen hozzájárul a szívizom akciós potenciál repolarizációs fázisához. Ennek megfelelően a hERG csatornák gátlása a repolarizáció zavarához, szerzett hosszú QT szindrómához és az arra jellemző ritmuszavarhoz vezethet. Eredményeink azt mutatja, hogy a Css20 sem a hERG sem pedig a Kv2.1 áramokat nem gátolja. A hERG áram gátlásának hiánya csökkenti annak lehetőségét, hogy állatkísérletekben ritmuszavar alakulhasson ki. A Css20-ra kapott eredményekhez teljesen hasonló eredményeket kaptunk Tst26 esetében is: 10 nM peptid nem gátolta a hERG áramot.

Meg kell itt említenünk a hERG áram kiváltásának módját: A feszültség protokoll első részében 0,5 s-ig -80 mV-on tartjuk a membránpotenciált, majd +20 mV-ra depolarizálunk, ami 2,5 s-ig tart, aztán -40 mV-ra állítjuk be a membránpotenciált 1 s-ig, s majd végül visszatérünk a tartófeszültségre (-80 mV). Ezzel a protokollal ki tudjuk küszöbölni a HEK-293 sejtek endogén kálium áramait. Ezek a gyorsan aktiválódó és lassan inaktiválódó K^+ -áramok megjelennek a +20 mV-ra történő depolarizációnál, és minimálisra csökkennek a -40 mV-ra történő depolarizációs lépésnél. Ez köszönhető egyrészt az így lecsökkent hajtóerőnek, valamint az inaktiváció magas fokának. A hERG áram a +20 mV-ra történő depolarizációs lépés alatt egy konstans értékre növekszik, amikor is egyensúlyba kerülnek a nyitott és az inaktivált állapotok. Így az áram alakja a +20 mV-ra történő depolarizációs lépés alatt minden egyes sejten az endogén és a hERG csatornákon átfolyó áramokból adódik össze. A -40 mV-ra történő depolarizációs lépés alatt a hERG csatornák gyorsan visszatérnek az inaktivált állapotból, aminek eredményeként egy nagy amplitudó növekedés adódik, míg az endogén csatornák hozzájárulása ehhez az áramhoz elhanyagolható. Ezért ennél a lépésnél mért teljes-sejt csúcsáramot használjuk arra, hogy a toxinok hatását megnézzük a hERG csatornákon.

A Ca^{2+} -aktivált kálium-csatornák közül az IKCa1 ($K_{Ca3.1}$) és a BKCa ($K_{Ca1.1}$) csatornákon vizsgáltuk a toxinok hatását: blokkolást ezeknél sem tapasztaltunk 10 nM toxin-

koncentrációnál. Az IKCa1 csatorna vizsgálata különösen fontos, mert a Kv1.3 mellett ez a T-limfociták másik kálium-csatornája. Gátlása esetén a T-sejtes immunválasznak nem az általunk kívánt módosulása következne be.

Mivel az IKCa1 nem feszültségfüggő ioncsatorna, ezért a rajta átfolyó áram meghatározására más protokollt használtunk: egy ún. feszültségrámpát. E protokoll során a membránpotenciál értékét folyamatosan emeljük a tartófeszültségről, -120 mV-ról +50 mV-ig, egy lineáris függvénynek megfelelően. Az IKCa1 áramgörbe és az x-tengely metszéspontjához tartozó feszültségérték az ún. megfordulási potenciál, vagyis e feszültségérték alatt befelé-, míg e felett kifelé folyik az áram. Az aspecifikus, szívárgási áramra vonatkozóan ez az érték 0 mV, míg tisztán kálium áram esetén kb. -85 mV-nak adódik az alkalmazott mérési feltételek mellett. Az IKCa1 csatornákon keresztül folyó K^+ -áram hajtóereje a protokoll lefolyása alatt egyenlő a protokoll által beállított membránpotenciál és a megfordulási potenciál különbségével. A hajtóerő megléte mellett az áram másik feltételét, a nyitott állapotú ioncsatornát, a belső oldat magas ($1 \mu M$) Ca^{2+} -koncentrációjával érhetjük el. A K^+ -áram specifikus gátlása esetén egyrészt a megfordulási potenciál 0 mV felé tolódna el, másrészt csökkenne az áram nagysága. Az áram nagyságának változását a rámpa végénél, +50 mV-nál határoztuk meg. Ez csak akkor tehető meg, ha más kálium-csatorna nincs, vagy elhanyagolható mértékben van jelen a mérés során. Ez a feltétel a mi esetünkben teljesült az IKCa1 magas expressziós szintje miatt, és mert a Cos-7 sejtekben endogén kálium-áram nem mérhető.

Végül ellenőriztük még a toxinok hatását a szívizombeli Nav1.5 csatornán is. E csatorna jelentősége a hERG csatornához hasonlóan abból adódik, hogy szerepet játszik a szív akciós potenciáljának kialakulásában. Mivel blokkolást nem tapasztaltunk, így a szívizomsejtek működését befolyásoló mellékhatás bekövetkezése még kisebbnek mondható.

A fentebb felsorolt kísérleti eredményeket összegezve: a Css20 és Tst26 toxinok csak a Kv1.2 és a Kv1.3 csatornákat gátolták jelentős mértékben 10 nM koncentrációban.

10 nM Tst26 84%-kal csökkentette a Kv1.2 áramot, a Kv1.3 áramot pedig 47%-kal, miközben a többi csatornán keresztüli áram kevesebb, mint 6%-kal csökkent csupán. 10 nM Css20 pedig 93%-kal csökkentette a Kv1.2 áramot, míg a Kv1.3 áramot 58%-kal; a többi csatornán átfolyó áramot azonban csak kevesebb, mint 7%-kal. Ez azt jelenti, hogy a becsült K_d érték nagyobb, mint 150 nM a többi csatornára vonatkozóan (már a 7% blokkolás esetében is, 1:1 toxin-csatorna sztöichiometriát feltételezve, a Hill egyenlet alapján, 10 nM toxin koncentrációval számolva). Így mind a Tst26, mind a Css20 szelektív blokkolója a Kv1.2 és a Kv1.3 csatornáknak, a többi, ebben a tanulmányban leírt csatornával szemben.

A Css20 és a Tst26 farmakológiai tulajdonságai Kv1.2 és Kv1.3 ioncsatornákon

Miután kiderült, hogy a Css20 és a Tst26 szelektív a Kv1.2 és a Kv1.3 csatornákra, megvizsgáltuk részletesebben mindkét toxin hatását ezekre az ioncsatornákra. A Kv1.2-csatornán keresztüli kálium-áramokat, 3 nM Css20 ill. 1 nM Tst26 az extracelluláris oldathoz történő hozzáadása előtt (kontroll), az egyensúlyi gátlás kialakulásakor, és a mérőkád toxinmentes oldattal történő perfúzióját követően (kimosás) mértük Cos-7 sejteken. Ezen körülmények között a Css20 és a Tst26 rendre a Kv1.2-csatornák kb. 75%-át ill. 40%-át gátolta. A gátlás nem volt teljesen reverzibilis a Css20-nál, ám a Tst26-nál igen, amikor toxinmentes külső oldattal perfundáltunk. Mindkét toxin asszociációs és disszociációs kinetikája lassú volt: több perc volt szükséges ahhoz, hogy beálljon a blokkolás egyensúlyi állapota, és ahhoz is, hogy a gátlásból visszatérjen az áram a mosás során.

Mindkét toxin kisebb affinitással kötődik a Kv1.3 ioncsatornához, mint a Kv1.2-höz. A Kv1.3 áramok humán perifériás vér T-sejtjein mért teljes-sejt áramok, amelyet az általunk alkalmazott kísérleti körülmények között kizárólag a T-sejtek által expresszált endogén Kv1.3 csatornákon átfolyó áram adja. A toxinokat extracellulárisan alkalmazva a teljes-sejt K^+ -áramok nagysága rendre kb. a kontroll 40%- ill. 50%-ára csökkent 10 nM Css20 ill. 10 nM Tst26 jelenlétében. A Kv1.3 csatorna gátlása mindkét toxin esetében teljesen reverzibilis volt, és a kinetika sokkal gyorsabb volt, mint a Kv1.2-nél. Mind a blokkolási egyensúly beállta, mint a gátlásból történő visszatérés 30 másodpercen belül, azaz két depolarizáló impulzus között megtörtént.

Mindkét toxin ioncsatorna gátló potenciáljának pontosabb karakterizálása érdekében megvizsgáltuk gátló hatásukat különböző koncentrációkban is a Kv1.2 ill. a Kv1.3 csatornákra vonatkozóan. Meghatároztuk a megmaradó áramhányadot (RCF), ami az I/I_0 hányadossal egyenlő, ahol I_0 és I a mért K^+ csúcsáram értéke kontroll oldat mellett és a toxin adott koncentrációjának jelenlétében, a gátlási egyensúly beállta után. Az RCF értékeket a toxin koncentrációjának függvényében (logaritmikusan) ábrázolva megkapjuk a dózis-hatás összefüggést, amit az ún. kétparaméteres Hill-egyenlettel illesztettünk meg. E két paraméter a disszociációs állandó (K_d) és a Hill-koefficiens (n), amelyek a következőknek adódtak: Css20 esetében $K_d = 1.3$ nM, $n = 1.17$ Kv1.2-re vonatkozóan és $K_d = 7.2$ nM, $n = 0.90$ Kv1.3-ra; Tst26 esetében pedig $K_d = 1.9$ nM, $n = 0.86$ Kv1.2-re és $K_d = 10.7$ nM, $n = 0.72$ Kv1.3-ra vonatkozóan. A Css20 estében az 1-hez közeli Hill-koefficiens értékek az általános toxin-

csatorna viszonyra utalnak a blokkolás során, azaz egy toxin egy csatornához kötődik. A Tst26 esetében azonban a Hill-koefficiens értéknek az 1-től való eltérése jelentősnek tűnik ($n = 0.72$).

A Tst26 hatása a Kv1.2 és a Kv1.3 ioncsatornák biofizikai tulajdonságaira

A legtöbb toxin a csatornával történő kölcsönhatás során egyszerűen csak eltömíti az ioncsatorna pórusát megakadályozva így a K^+ ionok átjutását. Vannak azonban olyan toxinok is, amelyek az ioncsatorna feszültség-érzékelő részéhez, vagy annak közelébe kötődnek, és így módosítják a csatorna kapuzási mechanizmusát. Ezek a toxinok képesek az egyensúlyi (steady-state) aktiváció feszültség függését eltolni a pozitívabb membránpotenciál érték felé és így csökkenteni a csatornák nyitási valószínűségét egy adott membránpotenciálon. Ez a teljes-sejt áram csökkenéséhez vezet a nélkül is, hogy a peptidek a K^+ áthaladását a csatornán fizikailag megakadályoznák.

Annak eldöntésére, hogy a Tst26 lehet-e kapuzást módosító peptid, meghatároztuk az egyensúlyi aktiváció és inaktiváció feszültségfüggését jellemző paramétereket Kv1.2 és Kv1.3 ioncsatornákra vonatkozóan a toxin jelenlétében és annak hiányában. Először a csatornák áram-feszültség karakterisztikáját készítettük el (I–V görbe): depolarizációs impulzusok sorát alkalmaztuk, -70 mV-tól $+40$ mV-ig 10 mV-os lépésközökkel, és közben mértük a teljes-sejt áramok csúcsértékeit minden depolarizáló impulzusnál. Ezután kiszámoltuk a teljes-sejtre vonatkozó vezetőképesség feszültségfüggését az I–V függvény értékeiből a $G=I/(E_m-E_{rev})$ összefüggés felhasználásával, ahol I a teljes-sejt áram amplitúdó, E_m a membránpotenciál a depolarizáló impulzus alatt, E_{rev} pedig a Nernst-egyenletből számított K^+ egyensúlyi potenciál (-88 mV). A kapott G értékeket normáltuk a legnagyobb vezetőképesség értékre, és ábrázoltuk a depolarizáló impulzus amplitúdójának függvényében. Az így kapott adatpontokra Boltzmann-függvényt illesztettünk (ld. még Anyagok és Módszerek). Az illesztett függvény paraméterei pedig nem utaltak arra, hogy a Tst26 toxin befolyásolná bármely (Kv1.2 vagy Kv1.3) csatorna egyensúlyi aktivációjának feszültségfüggését: Kv1.2-re: kontroll: $V_{1/2} = -26.9$ mV, és $k = 5.2$ mV; és 2 nM Tst26 jelenlétében: $V_{1/2} = -23.7$ mV, és $k = 5.1$ mV; Kv1.3-ra: kontroll: $V_{1/2} = -41.2$ mV, és $k = 7.9$ mV; és 10 nM Tst26 estében: $V_{1/2} = -40.1$ mV, és $k = 8.1$ mV). Hasonlóan nem befolyásolta a Tst26 jelenléte az egyensúlyi inaktiváció feszültség-függését sem: Kv1.2-re: kontroll: $V_{1/2,i} = -37.3$

mV, és $k_i = -5.0$ mV; és 2 nM Tst26 esetében: $V_{1/2,i} = -44.5$ mV, és $k_i = -6.7$ mV; Kv1.3-ra: kontroll: $V_{1/2,i} = -50.8$ mV, és $k_i = -6.7$ mV; és 10 nM Tst26 esetében: $V_{1/2,i} = -53.7$ mV, és $k_i = -5.6$ mV).

A csatornák kapuzásának biofizikai jellemzéséhez az egyensúlyi paramétereken felül az áram egy adott membránpotenciálon mért időbeli változását jellemző kinetikai paramétereket használjuk. Ismert, hogy a Kv1.3 csatorna szignifikánsan inaktiválódik egy hosszan tartó depolarizációs impulzus alatt, ami abban nyilvánul meg, hogy a teljes sejt áram a csúcsértékről egy exponenciális összefüggéssel illeszthető kinetikával egy egyensúlyi értékre csökken. Az áramgörbe leszálló szárának jellemzésére az inaktivációs időállandót használtuk (ld. még Anyagok és Módszerek), melynek értéke Kv1.3-ra ~200 ms.

Kísérleteinkben megvizsgáltuk azt, hogy a Kv1.3 csatornák lassú inaktivációjának kinetikáját befolyásolja-e a Tst26 toxin csatornához történő kötődése. Ehhez összehasonlítottuk az inaktivációs időállandókat Tst26 jelenlétében és annak hiányában. A kontroll körülményekre vonatkozó időállandót a toxin alkalmazása előtti és a toxin kimosása utáni időállandók átlagértékeként számítottuk, s így korrigáltunk a Kv1.3 csatornák természetéből adódó, a kísérlet időbeli előrehaladásával gyorsuló inaktivációjára. A toxin jelenlétében a Kv1.3 csatorna inaktivációja lassabb, mint kontroll körülmények között: 10 nM Tst26 megnövelte az időállandót 205 ± 33 ms-ról 342 ± 37 ms-ra ($n = 6$, $p < 0.001$). Az inaktivációs kinetika lassulása együtt járt az depolarizációs impulzus végénél mért egyensúlyi áram növekedésével, amit az egyensúlyi áram és a csúcsáram hányadosával jellemeztünk (kontroll: 0.021 ± 0.006 , 10 nM Tst26: 0.042 ± 0.016 , $n=4$, $p=0.04$).

Megbeszélés

A szelektivitás fontossága

Egy potenciális terápiás anyaggal szemben alapelvárás a mellékhatások minimális volta is, ami a mi esetünkben a toxinok egyéb ioncsatornákkal történő keresztreakcióinak hiányát jelenti. Mivel minden ismert ioncsatornára nem tesztelhettük toxinjainkat, ezért kiválasztottuk az általunk legjelentősebbnek tartott ioncsatornákat, amelyek mindemellett számunkra hozzáférhetőek is. A keresztreakció legvalószínűbb a Kv1.3-mal egy családba, a Shaker (Kv1.x) családba tartozó ioncsatornáknál, mert szerkezetileg ezek állnak a legközelebb hozzá. Ezért választottuk ki a Kv1.1, Kv1.2, Kv1.4 és a Kv1.5 csatornákat.

Az IKCa1 (KCa3.1) csatorna jelentősége abból adódik, hogy a Kv1.3 mellett a T-limfociták másik kálium-csatornája, és emellett a T-sejtek különböző alpopulációi különböző mértékben is expresszálják e két csatornát. Így az IKCa1 esetleges gátlásával a T-sejtes immunválasz olyan befolyásolása is megtörténne, amely nemkívánatos mellékhatást jelentene.

A BKCa feszültség- és Ca^{2+} -aktivált ioncsatorna az idegsejtek Ca^{2+} -háztartásában játszik szerepet. Esetleges gátlása felborítaná az idegsejtek kalcium-homeosztázisát. (megj.: a BKCa csatorna fontos farmakológiai célpont agyvérzés kezelésekor)

A hERG és az Nav1.5 a szívizom ioncsatornáit. Bármelyikük gátlása esetén a szívizom elektromos aktivitása módosulna. A hERG csatorna nem megfelelő működése esetében tipikusan előforduló betegség az ún. hosszú QT szindróma, ami a szívizombeli akciós potenciál QT intervallumának a meghosszabbodását jelenti.

A Kv2.1 a feszültség-kapuzott káliumcsatornák funkcionálisan egyik legösszetettebb osztályába tartozik. Részt vesz a szívritmus-, a neurotranszmitterek, az inzulin elválasztásának irányításában, a sejtterfogat, az idegsejtek gerjeszthetőségének, a simaizom összehúzódásának szabályozásában. Ezen felsorolás után látható, hogy ennek a csatornának esetleges gátlásból adódó keresztreakció következményei mennyire szerteágazóak lennének.

Meg kell itt említenünk a heterológ expresszió fontosságát: Ezeket a szelektivitási vizsgálatainkban részt vett ioncsatornákat olyan sejtvonalakban expresszáltattuk, amelyek egyébként nem fejezték ki az adott, vizsgálni kívánt csatornát. Sőt, semmilyen endogén ionáram nem volt mérhető rajtuk – az általunk alkalmazott feszültség-protokollokkal – kivéve a HEK-293 és a tsA-201 sejteket. Ez utóbbiban nátrium-áram volt mérhető (eredmény nincs bemutatva), ám mivel ebben a sejtvonalban csupán a BKCa és a Kv1.5 kálium-ioncsatornákat transzfektáltuk, így ez nem befolyásolta a méréseinket. Míg az előbbi sejttípusban a hERG

csatornát fejeztettük ki és a benne mérhető endogén áramtól a hERG csatornán átfolyó áramot a hERG protokoll segítségével különítettük el.

Analízis és konklúzió

Az utóbbi években a különböző fajok venomjaiból izolált, a Kv1.3 kálium ioncsatornát nagy affinitással és szelektivitással blokkoló toxinokra nagy figyelem irányult, mert ismerté lett, hogy a Kv1.3 ioncsatornákat blokkolva a limfociták bizonyos alpopulációinak proliferációja meggátolható és ezáltal szelektív immunszuppresszió érhető el.

A Kv1.2-csatornára vonatkozóan ugyanakkor mind a mai napig nincsen jó, nagy affinitású és nagy szelektivitású gátlószer; ráadásul ez a típusú ioncsatorna széles körben fordul elő a központi idegrendszerben és heterotetramereket alkot a Shaker-család többi tagjával, amelyek valószínűleg más farmakológiai tulajdonságokkal rendelkeznek, mint a homotetramer csatornák. Így egy olyan toxin, amely hasonló affinitással rendelkezik erre a két csatornára vonatkozóan – mint a Css20 és a Tst26 – nem ideális jelölt terápiás gyógyszernek.

Azonban lényeges különbség van a Css20- és a Tst26-nak a Kv1.2 és a Kv1.3 csatornákon kifejtett gátló hatásában a Kv1.1 és a Kv1.4 csatornákhöz viszonyítva: több, mint 100-szoros. Sőt, a blokkolási kinetikájuk is szignifikánsan különböző: a Kv1.2 esetében lassú, míg a Kv1.3 esetében gyors. Ezért az ilyen toxinokkal végzett struktúra tanulmányok megmutathatják, hogy a csatorna felületén és a toxinban melyek azok az aminosavak, amelyek meghatározzák a kötődés affinitását és a toxin szelektivitását a Kv1.2 és a Kv1.3 csatornákra vonatkozóan. Ezek az információk aztán később segíthetnek olyan toxinok tervezésében, amelyek szelektívebbek egy bizonyos csatornatípusra. Így a lentebb tárgyalt analízis eredménye lehetővé teszi kísérletileg olyan specifikus mutációk megvalósítását, amelyek szelektívebbé teszik a toxint.

Összehasonlítva az α -KTx2 toxincsalád tagjainak aminosav szekvenciáját, számos erősen konzervatív aminosavat találunk, mint pl. I3, K6, Q12, P16, K18, G22, N31, G32, K33, K28, K35, és Y37. Ezek közül kettő, a kritikus pozícióban lévő lizin (K28 Css20-nál; K27 Tst26-nál) és egy aromás aminosav 9 pozícióval lejjebb (az N-terminustól (α -hélixről) indulva a sorrend; Y37 a Css20-ban és Y36 a Tst26-ban) alkotják az ún. „eszenciális diád”-ot, mert ez a pár megtalálható a legtöbb olyan skorpió toxinban (nem csak az α -KTx2 tagjaiban), amelyek nagy affinitással blokkolják a K^+ -csatornákat.

A „eszenciális diád” kritikusnak látszik a Kv1.2 nagy affinitású gátlásához is. A diád aminosavakat alaninra cserélve a Pi1 (α -KTx6.1) toxin affinitása több nagyságrenddel csökkent a Kv1.2 esetében. Maurotoxinnál is (MTX (α -KTx6.2)) két, a diádnak megfelelő aminosav (K23 és Y32) bizonyítottan fontos Kv1.2-höz történő a nagy affinitású kötődésért a. Azonban a diád szükségessége nem egyértelmű a Kv1.3 gátlásánál. Annak ellenére, hogy a diád jelen van az MTX-ben, mégis gyengén blokkolja a hKv1.3-at, de a H399T mutáció a csatorna külső szájadékának alsó részénél olyan érzékennyé tette a csatornát az MTX blokkolására, mint a Kv1.2-nél.

A MTX toxin Y32 diád-aminosava kölcsönhat a mutáns hKv1.3 T399 aminosavával; tehát úgy tűnik, hogy a vad típusú Kv1.3 H399-es aminosava és a toxinban lévő diád-tirozin közötti kölcsönhatás megakadályozza a toxin kötődését. Ez lehet a helyzet a Csx20 esetében is; dokkolási szimulációink is azt jelzik, hogy kölcsönhatás van a toxin Y37 aminosava és a hKv1.3 két alegységén lévő H399 között. Habár számos olyan toxin van, amelyek tirozinnal rendelkeznek az aromás diád-pozícióban, és amelyek a Kv1.3-at nanomoláris koncentrációban blokkolják – mint pl. a noxiustoxin, hongotoxin-1 és a Csx20 – a Kv1.3-ra vonatkozó szelektivitás szempontjából előnyösnek látszik, ha a tirozint egy másik aminosavra cserélnénk. A Kv1.3 leghatékonyabb skorpió-toxin gátlószerei a tirozintól különböző aminosavat tartalmaznak az „aromás diád-pozícióban”, mint pl. fenil-alanint (Pi2, Pi3, anuroctoxin; α -KTx 7.1, 7.2 és 6.12), treonint (kaliotoxin, OSK1; α -KTx 3.1 és 3.7) vagy aszparagint (HsTx1 α -KTx 6.3). Azok a toxinok pedig, amelyek jobban gátolják a Kv1.2-t, mint a Kv1.3-at, mind tirozinnal rendelkeznek ezen a helyen [MTX, Pi1, CoTx1 (α -KTx 10.1), Pi4 (α -KTx 6.4)]. Így, amíg a csatorna pórusába belenyúló lizin nélkülözhetetlennek látszik mindkét csatorna blokkolásánál, addig a diád másik felét megtestesítő tirozin a Kv1.2-felé tolja el a szelektivitást. Ezzel összhangban, dokkolási eredményeink számos kölcsönhatási pontot jeleznek a toxin Y37- és P38-as aminosavai és mindkét csatorna különböző aminosavai között. Ebből arra következtethetünk, hogy az „aromás diád-aminosavak” pozíciójánál a térbeli megszorítás nagyon fontos meghatározója a nagy affinitású kötődésnek.

A toxinok különböző részeinek fontosságát a csatorna-felismerésben hűen tükrözi az a kísérlet, amikor előállítottak egy olyan hibrid (kiméra) toxint, amely a MTX Kv1.2-re specifikus α -helikális N-terminális részéből és a HsTx1 Kv1.3-ra specifikus C-terminális részéből áll. E kísérlet azt mutatta, hogy a MTX C-terminális felét kicserélve a HsTx1 ugyanezen részére, teljesen megszűnt a Kv1.2-re vonatkozó nagy affinitású blokkolás, ami ezen rész fontosságát jelzi a Kv1.2 és a Kv1.3 közötti szelektivitásban. Ezen régió

részletesebb vizsgálata rámutatott a Kv1.2 és a Kv1.3 specifikus toxinok pozitív és negatív töltésű oldalláncokkal rendelkező aminosavainak számbeli különbségeire. Azoknak a toxinoknak, amelyek a Kv1.3-ra vonatkozó nagyobb affinitással rendelkeznek, nagyobb nettó pozitív töltésük van általában. De ami még fontosabb, hogy a toxin C-terminális felének nagyobb nettó pozitív töltése korrelál a nagyobb Kv1.3 szelektivitással a Kv1.2-vel szemben. A Css20 beleillik ebbe a képbe: csak három pozitív töltésű aminosava van (a diád- és két másik lizin) a C-terminális részen és nagyobb is az affinitása a Kv1.2-re. Továbbá a Css20 dokkolási szimulációja a hKv1.2- és a hKv1.3 esetében azt jósolja, hogy ezek a nem-diád lizinek (K33 és K35) egy hidrogén-kötéssel és számos hidrofób kontaktussal kapcsolódnak a hKv1.2-höz, a hKv1.3-hoz viszont nem.

Sőt, a kritikus lizintől – amely lizin nagyon közel helyezkedhet el a csatorna felszínéhez, és úgy gondolják róla, hogy az oldallánca belenyúlik a szelektivitási filterbe – két pozícióval a C-terminális irányában elhelyezkedő aminosav egy izoleucin a nagy affinitású Kv1.2 blokkolóknak, míg egy metionin a Kv1.3 specifikus toxinokban. Ezt az izoleucint kulcsfontosságúnak találták a CoTx és a Pi4 toxinok valamint a Kv1.2 közötti kölcsönhatásnál. A Css20-ban ennél a pozíciónál egy izoleucin (I30) van, ami beleillik a Kv1.2 szelektív toxinok mintázatába, és a dokkolási eredményeink is megerősítették azt, hogy ez az aminosav valóban közelebb van a hKv1.2 szájadékának aljához (kb. $2\text{\AA}$), mint a hKv1.3-nál (kb. $5\text{\AA}$), ami jobb kontaktust eredményez.

A toxinok N-terminális szegmense – amely az α -hélix régiót tartalmazza – nem mutat olyan nyilvánvaló különbséget, mint amire az alapján számítanánk, hogy jelentős különbségek vannak e toxinok a Kv1.2 és Kv1.3 csatornák iránti affinitásában. Az MTX-HsTx1 hibrid (kiméra) kísérletek azonban egyértelműen azt igazolják, hogy ennek a régiónak kritikus szerepe van a csatornához való kötődésben is. A HsTx1 N-terminális felét kicserélve a MTX ugyanazon részére, a toxin Kv1.3-ra vonatkozó affinitása majdnem 400-ad részére csökkent. Az OSK1 ezen régiójának három aminosavát kicserélve a kalitoxinban található aminosavakra egy egyébként is Kv1.3-ra nagy szelektivitással bíró toxin szelektivitását majdnem 10-szer nagyobbra növelte. Az OSK1-ben egyetlen aminosav mutációja, a K20D majdnem 7-szer nagyobb Kv1.3-szelektivitást eredményezett. A CoTx-ben az R16-os, az előbbivel ekvivalens aminosavról azt mutatták ki, hogy kölcsönhat a Kv1.2-vel, amiből arra következtethetünk, hogy ebben a pozícióban egy pozitív töltésű aminosav jobb kötődést eredményez a Kv1.2-höz, mint a Kv1.3-hoz. A Pi4 R19-es aminosava szintén befolyásolja a kötődést a Kv1.2-höz és azok a toxinok, amelyek specifikusak erre a csatornára, egy argininnal vagy egy glutaminnal rendelkeznek ebben a pozícióban. Míg azoknak a

toxinoknak, amelyek alacsony affinitásúak a Kv1.2-re, egy töltetlen vagy egy negatív töltésű aminosavuk van, rövid oldallánccal. Ebben a tekintetben a Css20 különbözik a nagy affinitású Kv1.2-t blokkoló toxinoktól, mert két alaninja van ennél a pozíciónál (19-es és 20-as aminosavak). A Css20 más aminosavairól az N-terminális részen az gondoljuk, hogy specifikus kölcsönhatást létesítenek nem-konzervatív aminosavakkal a *turret*-nél, melyek a következők: S9, amely számos kontaktust létesít a csatornák aminosavaival a Q357A pozíciónál hKv1.2-nél és G375A-nál hKv1.3 esetében (a pozícióknál az utolsó A betű a csatornák alegységét jelöli); míg a toxin K18-as aminosava a hKv1.2 csatorna D-alegységének E335-ös pozíciójában lévő aminosavához kötődik és a hKv1.3 D-alegységének T373-as aminosavához. A fentebb említett kritériumok teljesülése esetén – vagyis a C-terminális rész alacsony nettó töltése, a diád tirozin (Y37) megléte és a 30-as pozícióban az izoleucin jelenléte – a Css20 nagyobb affinitása jósolható Kv1.2-re. Viszont a 19- és 20-as pozícióban lévő alaninok valószínűleg ez ellen dolgoznak, ami egy mérsékelt nagyobb szelektivitást eredményez a Kv1.2-re, a Kv1.3-mal szemben.

A Tst26 C-terminális része plusz egy lizint tartalmaz a Css20-hoz és a maurotoxinhoz képest, és egy methionint izoleucin helyett a 29-es pozícióban, amelyek inkább a Kv1.3-felé irányítják a Tst26 szelektivitását, míg a Q19 inkább a Kv1.2-höz való kötődésnek kedvez. Összességében mind a Css20, mind a Tst26 kb. 5-ször jobban kötődik a Kv1.2-höz. Ráadásul mindkettőnek (Css20 és Tst26) hasonló a dokkolási stratégiája mindkét csatornához (Kv1.2 és Kv1.3), mivel az asszociációjuk és a disszociációjuk hasonló.

A Css20 általi egyensúlyi blokkolás kialakulása, valamint a blokkolásból történő visszatérés 30 s alatt megtörtént Kv1.3 esetében; ezzel szemben a gátlás kialakulása kb. 10-szer lassúbb volt és a visszatérés legalább 30-szor lassabb Kv1.2 esetében. A különbség a toxin asszociációs és disszociációs sebességeiben a Kv1.2 és a Kv1.3 csatornákra vonatkozóan azt jelzi, hogy különböző módon hat kölcsön a Css20 a csatornákkal hasonló affinitása ellenére. A gyors asszociáció a Kv1.3-hoz magában foglalja azt, hogy a toxin gyorsan orientálódik a dokkolás korai fázisában, valószínűleg távolható elektrosztatikus kölcsönhatással, de számos nem kedvező, közeli érintkezésből adódó kölcsönhatás lehet az oka a gyors disszociációnak. A dokkolási eredmények teljes egyezésben vannak ezzel az elképzeléssel; a hKv1.3 csatorna legtöbb kölcsönható aminosava a szelektivitási filter azon részei, amelyek kontaktust alakítanak ki elsősorban a toxin eldugaszoló részével, a K28-as aminosavval. Más részről, a toxin orientációját a Kv1.2-höz történő dokkolás során úgy tűnik, hogy nem a távolható elektrosztatikus kölcsönhatás irányítja, hanem hogy a Css20 érintkező felülete jobban illeszkedik a Kv1.2-höz, egy erőteljes hidrogén-kötéses hálózaton keresztül –

amit a dokkolás is megjósolt – a csatorna *turret* aminosavai és a toxin tengelye mentén elhelyezkedő aminosavai között, ami egy lassabb disszociációhoz és egy nagyobb affinitáshoz vezet.

A Kv1.2 Tst26 általi blokkolásának kialakulása valamelyest gyorsabb volt, mint a Css20 esetében, az extra pozitív aminosav megléte miatt, ami erősebb távolba-ható elektrosztatikus kölcsönhatást okoz. A disszociáció szintén gyorsabb volt – kb. 6 perc szükséges a teljes visszatéréshez a kimosás alatt – ami néhány kevésbé kedvező, „közeli-kontaktus” kölcsönhatásból adódhat a Tst26 Q19 és M29 aminosavai és a nekik megfelelő partner aminosavak között a csatorna felületén; ezek megfelelnek a Css20 A19 és I30 aminosavainak.

A Tst26 egy szokatlan tulajdonsága, hogy lassítja a Kv1.3 csatorna inaktivációját. Ez a jelenség talán azzal magyarázható, amit a „foot-in-the-door” modellnek neveznek, amelyet korábban a tetraethylammonium kapcsán írtak le, amely azt mondja, hogy a blokkoló anyag jelenléte megakadályozza azt a konformáció változást, amely szükséges a csatorna lassú inaktivációjához. A szelektivitási filter konformációja és a K^+ jelenléte a szelektivitási filterben irányítja a lassú inaktivációt. Mindkettő befolyásolható a toxin bekötődésével. A bekötődött toxin csapdába ejti a szelektivitási filterben lévő K^+ -ot, ami így megakadályozza a csatorna lassú inaktiválódásához szükséges konformáció-változást. A legtöbb toxin esetében a toxin a csatornához hozzákötődve sokkal hosszabb időt tölt el, mint az inaktivációs folyamat időállandója. Így csupán elenyésző számú csatorna van nem blokkolt állapotban a depolarizációs impulzus alatt és járul hozzá a teljes-sejt áramhoz. A Kv1.3 csatorna Tst26 általi blokkolása és az abból történő teljes visszatérés 15 s alatt megtörténik, ami azt jelenti, hogy az asszociációs és disszociációs időállandó a néhány s-os tartományban van. Sajnos a Tst26 blokkolási kinetikája nem határozható meg jobb időfelbontásban a Kv1.3 csatorna egy belső (inherent) tulajdonsága miatt, amit kummulatív inaktivációnak hívnak, ami mint válasz alakul ki egy sorozat rövid depolarizáló impulzusra és így limitálja a csúcsáram meghatározásának gyakoriságát. Mindamellett a toxin asszociációs és disszociációs időállandója összemérhető az inaktivációs folyamat időtartamával (1-1.5 s), tehát több asszociációs és disszociációs esemény is megtörténhet a depolarizációs impulzus alatt. Ezért azok a csatornák, amelyek nem inaktiválódnak a Tst26-tal való kölcsönhatás miatt, hozzájárulhatnak a teljes-sejt áramhoz, s ezzel egy lassabb makroszkopikus inaktivációs kinetikát eredményeznek. Ennek a jelenségnek a következménye az egyensúlyi- és a csúcsáram hányadosának növekedésében is, mivel az egyensúlyi áram nagyságát az inaktív állapotba való kerülésnek és az abból való kikerülésnek a relatív arányából határozzuk meg.

Ennek az arálynak a lassulása a nem-inaktiválódott csatornák nagyobb arányát fogja eredményezni, és így nagyobb egyensúlyi áramot, ami egybevág azzal, amit találtunk.

Összefoglalás

Új peptid toxinokat azonosítottunk és karakterizáltunk: a Css20-at a *Centruroides suffusus suffusus* nevű skorpió mérgéből, valamint a Tst26-ot a *Tityus stigmurus* skorpió venomjából, amelyek nagy affinitással blokkolják a feszültség-kapuzott Kv1.2 és Kv1.3 csatornákat (Css20: $K_d = 1.3 \text{ nM}$ és 7.2 nM , Tst26: $K_d = 1.9 \text{ nM}$ és 10.7 nM). Míg hatástalannak bizonyultak számos más feszültség-kapuzott K^+ -csatornánál: mKv1.1, hKv1.4, hKv1.5, hBK, hERG valamint hKv2.1 Css20-nál; kalcium-aktivált kálium csatornára: hIKCa1; továbbá egy szívizombeli nátrium csatornára vonatkozóan: hNav1.5.

Érdekes módon annak ellenére, hogy mindkét csatornához hasonló affinitással kötődnek ezek a toxinok, az asszociációs és a disszociációs sebességük sokkal lassabb a Kv1.2-höz, ami magában foglalja azt, hogy különböző kölcsönhatással kapcsolódnak a két különböző csatorna típushoz.

A Tst26 esetében a vizsgált feszültségfüggő egyensúlyi paramétereket a toxin nem változtatta meg egyik csatornánál sem, de gyors asszociációs és disszociációs kinetikája miatt lassította a Kv1.3 csatorna inaktivációját.

A Css20 38 aminosavból, a Tst26 pedig 37 aminosavból áll, melyeket 3 diszulfid híd stabilizál; hasonlóak a többi, skorpió mérgekből kinyert K^+ -csatornát blokkoló peptidekhez. Mindkettő tartalmazza az ún. „esszenciális diád”-ot – amely a K^+ -csatorna felismerésénél fontos jelentőségű –, ami a Css20 esetében a 28-as pozíciójú lizin (K28) és egy aromás aminosav (itt tirozin) 9 pozícióval lejjebb (Y37), míg a Tst26-nál a K27 és a Y36. Az elsődleges struktúrájuk alapján, a szisztematikus nómenklatúrában a Css20-at az α -KTx2.13-nak, míg a Tst26-ot az α -KTx4.6-nak nevezhetjük.

A különböző toxinok szekvenciáinak vizsgálatára, mutánsaik analízisére és toxinok dokkolási modelljeire alapozva a toxinok szelektivitása növelhető mutációkkal valamely csatornára vonatkozóan. Például, megszüntetve a Css20-nak a Kv1.2-specifikus kölcsönhatásait (Q11 és K33 aminosavak és az E355 a különböző csatorna-alegységeken), az növelheti a Kv1.3 szelektivitást. Ezzel a megközelítéssel és módszerrel olyan ioncsatorna-blokkolókat kaphatunk, amelyekkel a megfelelő sejtek és fiziológiás/patofiziológiás funkciók befolyásolhatóak, módosíthatóak. Azonban további kutatás szükséges ennek igazolására, melynek irányvonalait a dolgozatban vázoltuk.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Corzo, G., **F. Papp**, Z. Varga, O. Barraza, P. G. Espino-Solis, R. C. Rodriguez de la Vega, R. Gaspar, G. Panyi, és L. D. Possani. 2008. A selective blocker of Kv1.2 and Kv1.3 potassium channels from the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*. *Biochem Pharmacol* 76: 1142-54 (*megosztott elsőszerző*)

IF: 4,711 (2008)

Papp, F., C. F Batista, Z. Varga, M. Herceg, S. A Román-González, R. Gaspar, L. D Possani, G. Panyi. 2009. Tst26, a novel peptide blocker of Kv1.2 and Kv1.3 channels from the venom of *Tityus stigmurus*. *Toxicon* 54: 379-89

IF: 2,460 (2008)

Egyéb közlemény

Varga, Z., T. Csepany, **F. Papp**, A. Fabian, P. Gogolak, A. Toth, G. Panyi. 2009. Potassium channel expression in human CD4(+) regulatory and naive T cells from healthy subjects and multiple sclerosis patients. *Immunol Lett* 124: 95-101

IF: 2,858 (2008)

Összesített impaktfaktor: **10,029 (2008)**

Posztterek

Papp F., Szilágyi O., Herceg M., Corzo G., Varga Z., Barraza O., Pavel G. E., Ricardo C. Rodríguez de la Vega, Gaspar R., Lourival D. Possani, Panyi G.: A *Centruroides suffusus* skorpió venomjából izolált kálium csatorna blokkoló toxin. A Magyar Biofizikai Társaság XXII. Kongresszusa, Pécs, 2009. augusztus 23-26.

Papp F., Tóth Á., Szilágyi O., Damjanovich S., Panyi G.: Oscillation of the Membrane Potential of T-cells Forming Immunological Synapse. Biophysical Society 53rd Annual Meeting, Boston, USA, 2009.

Szilágyi O., Herceg M., Gerardo C., **Papp F.**, Varga Z., O. Barraza, P. G. Espino, R. C. Rodríguez de la Vega, R. Gaspar, L. D. Possani, Panyi G.: A Potassium Channel Blocking

Toxin Isolated From The Venom Of The Scorpion *Centruroides suffusus suffusus*. Biophysical Society 53rd Annual Meeting, Boston, USA, 2009.

Szilágyi O., **Papp F.**, Herceg M., Gáspár R., Batista C. V. F., Zamudio F. Z., Varga Z., Possani L. D.: Pharmacological and biophysical studies of a toxin from the scorpion *Tytilus stigmurus*. IST Conference, Leuven, Belgium, 2008.

Bartók Á., **Papp F.**, Herceg M., Szilágyi O., Gáspár R.: Pharmacological and biophysical studies of a toxin from the scorpion *Tytilus stigmurus*. Membrántranszport Konferencia, Sümeg, 2008.

Herceg M., **Papp F.**, Fábián Á., Gogolák P., Varga Z.: CD4+CD25+ regulátor T-sejtek ioncsatorna-expressziós mintázatának vizsgálata. Membrántranszport Konferencia, Sümeg, 2008.

Papp F., Hajdu P., Varga Z., Zsiros E., Ludányi K., Gáspár R., Rajnavölgyi É., és Panyi G.: CRAC channels in developing human dendritic cells. Biophysical Society 52nd Annual Meeting, Long Beach, USA, 2008.02.2-6.

Papp F., Hajdu P., Varga Z., Zsiros E., Ludányi K., Gáspár R., Rajnavölgyi É., és Panyi G.: CRAC channels in developing human dendritic cells Regional Biophysics Conference, Balatonfüred, Hungary, 2007.

Tárgyszavak

Centruroides suffusus suffusus, *Tityus Stigmurus*, K⁺-csatorna, Limfociták, Molekuláris modellezés, Skorpió méreg

Keywords

Centruroides suffusus suffusus, *Tityus Stigmurus*, K⁺ ion-channel, Lymphocytes, Molecular modeling, Scorpion toxin