

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

A humán T limfociták Kv1.3 csatornájának farmakológiai és sejtfelszíni topológiai vizsgálata

Bagdány Miklós

Témavezetők: Prof. Dr. Gáspár Rezső és Dr. Panyi György

DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
BIOFIZIKAI ÉS SEJTBiolÓGIAI INTÉZET
Debrecen, 2005

Rövidítések jegyzéke:

α -kaliotoxin:	α -KTx
Ca^{2+} -aktivált K^{+} csatorna:	IKCa1
Charybdotoxin:	ChTx
Citotoxikus T limfocita:	CTL
Effektor memória T sejt:	T_{EM}
Fő hisztokompatibilitási komplex:	MHC
Konfokális lézer scanning mikroszkóp:	(CLSM)
Margatoxin:	MgTx
protein kináz-C:	PKC
T sejt receptor-CD3 komplex:	TCR/CD3
Tetraetilammónium:	TEA
Transzmissziós elektronmikroszkóp:	TEM

1. TUDOMÁNYOS HÁTTÉR	2
1.1 Bevezetés	2
1.2 A Az ioncsatornák és a limfocita aktiváció kapcsolata	3
1.3 A feszültség kapuzott Kv1.3 csatorna fontosabb biofizikai tulajdonságai	4
1.4 A Kv1.3 és IKCa1 szelektív blokkolói potenciális immunszupresszorok	7
1.5 A T sejt aktivációban résztvevő fehérjék térbeli elrendeződése és kapcsolatuk a Kv1.3 csatornákkal	9
2. CÉLKITŰZÉSEK	12
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	13
3.1 Sejtek	13
3.2 Skorpió toxinok	13
3.3 Molekuláris biológia	14
3.4 Jurkat sejtek transzfekciója	14
3.5 CTLL-2 sejtek transzfekciója	14
3.6 COS-7 sejtek transzfekciója	14
3.7 CTL transzfekció és a CTL-JY kontaktus kialakítása	15
3.8 Sejtek előkészítése elektrofiziológiai mérésekhez	15
3.9 Elektrofiziológia	15
3.10 Áramlási citometriás mérések	16
3.11 Immunogold jelölés	16
3.12 CLSM	16
3.13 Korreláció analízis és a fehérjék térbeli asszociációjának kimutatása néhány száz nm-es felbontásban	17
4. EREDMÉNYEK	19
4.1 Az anurotoxin a Kv1.3 csatorna hatékony blokkolója	19
4.2 A Kv1.3/FLAG csatorna és a FLAG epitóp funkcionális expressziója	28
4.3 A Kv1.3 csatornák sejt felszíni eloszlása nem véletlenszerű	30
4.4 A CD3 és a Kv1.3/FLAG csatorna térbeli asszociációja	32
4.5 Az aktivált CTL sejtek nagy mennyiségű feszültségfüggő Kv1.3 csatornát fejeznek ki	33
4.6 A Kv1.3/FLAG csatornák CTL sejtekben az IS-be rendeződnek	34
5. MEGBESZÉLÉS	36
6. ÖSSZEFOGLALÁS	43
7. AZ ÉRTEKEZÉSBEN FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK	44
8. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK	53
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	55

1. TUDOMÁNYOS HÁTTÉR

1.1 Bevezetés

A limfociták specifikus antigén hatására bekövetkező klonális proliferációja az immunrendszer működésének egyik meghatározó eseménye. A T-sejt receptor (TCR/CD3 komplex) stimulációt követően (2-3 óra) a limfociták akkor is a proliferáció útjára lépnek, ha a kezdeti stimulust megszüntetjük (McCardy 1988). Az aktiváció eredményeképpen számos gén átíródik, beleértve az interleukin-2 autokrin növekedési faktor génjét (Shaw 1988).

A limfociták Kv1.3 K⁺ csatornája központi szerepet játszik a T sejtek antigénekkal és mitogénekkal kiváltott aktivációjának és proliferációjának szabályzásában (Matteson 1984) azáltal, hogy az IKCa1 csatornákkal együtt döntően meghatározzák a T sejtek membránpotenciálját, s ezen keresztül a sejtek aktivációjában kulcsszerepet játszó Ca²⁺ jelátvitelt (Leonard 1992, Cahalan 2001). A Kv1.3 csatornák szerkezetének és funkciójának feltárásában nagy szerepe volt a Kv1.3 csatornákat gátló peptid toxinoknak és az igen szerteágazó kémiai szerkezetű ún. kis-molekula Kv1.3 inhibitoroknak (Panyi 2004c). A Kv1.3 csatornák specifikus, nagy affinitású gátlószereinek felfedezését célzó vizsgálatok fontosságát hűen tükrözi az is, hogy küszöbön áll az ilyen molekulák terápiás célú felhasználása egyes autoimmun betegségek kezelésére.

A Kv1.3 csatornák transzmembrán fehérjék, így a sejtmembrán lipid összetétele is érzékenyen szabályozhatja a csatornák aktivitását. A csatornák aktivitásának szabályzásában kiemelkedő jelentőségű lehet a koleszterinben és szfingolipidekben gazdag membrán mikrodoménekben, az ún. „lipid tutajokban” történő feldúsulása, valamint a Kv1.3 és a T sejt receptor jelátvitelében fontos szerepet játszó fehérjék kölcsönhatása (Martens 2000, Davis 2002). Ezekről a kölcsönhatásokról fontos információt nyújthat a Kv1.3 csatornák membránbeli eloszlásának ismerete.

A fentiekből következik, hogy a Kv1.3 csatornák farmakológiai és biofizikai vizsgálata lényeges, új információkkal szolgálhat a T sejtek működéséről és az immunválaszban betöltött szerepéről.

1.2 A Az ioncsatornák és a limfocita aktiváció kapcsolata

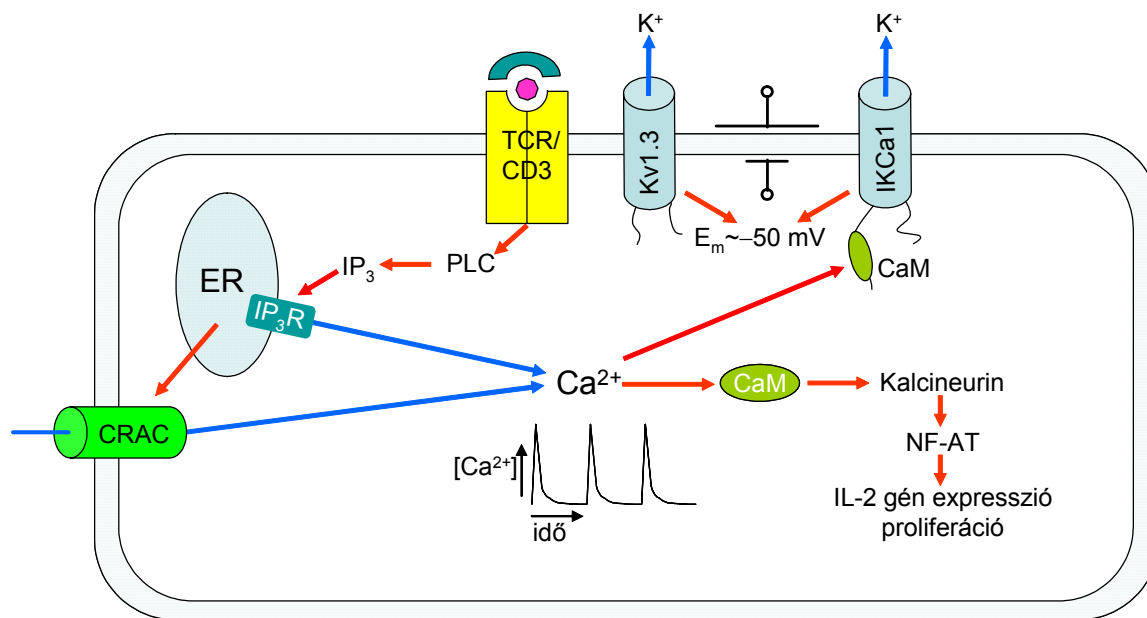
Az általános immunválasz során a limfociták klonális expansziójához szükséges az antigén prezentáló sejt (APC) MHC molekuláinak kötődése a T-sejt receptor–CD3 komplexhez (TCR/CD3), amely számos intracelluláris protein kináz transzlokációjában és aktivitásának fokozódásában nyilvánul meg (pl. az Src kinázok csoportjába tartozó Lck és Fyn; ZAP-70; Tec) (Janeway 2001).

A számos jelátviteli útvonal közül a K^+ csatornákkal kapcsolatosan kiemelendő a Ca^{2+} jel kialakulása. Ez a foszfolipáz $C\gamma$ enzim ($PLC\gamma$) foszforilált adapter fehérjékhez történő kapcsolódásával és Tec kinázok általi foszforilációjával kezdődik, ami a $PLC\gamma$ aktív alakját eredményezi. A $PLC\gamma$ a foszfatidil-inozitol difoszfátot hasítja inozitol- trifoszfátra (IP_3) és diacilglicerolra (DG). A keletkező molekulák két jól elkülöníthető, de szorosan összefüggő jelátviteli kaszkádot indítanak el a limfocitákban (Panyi 2004a).

Az IP_3 hatására Ca^{2+} felszabadulás történik az endoplazmatikus retikulumból, valamint a raktárak kiürülését követően Ca^{2+} áramlik be az extracelluláris térből. A tartós, legtöbb esetben oszcilláló Ca^{2+} koncentráció emelkedés a calmodulinon keresztül aktiválja a kalcineurint. Ez a vegyület elősegíti egy transzkripciós faktor magba történő transzlokációját, ezáltal képessé teszi azt az IL2 gén aktiválására, és a többi jelátviteli mechanizmussal (MAP kináz, Ras, Fos) szorosan együttműködve beindítja a sejtek proliferációját (Rao 1997 Crabtree 1999). Az IL2 expresszió szükséges a további, immár antigén független T sejt aktivációhoz. A DG is részt vesz a jelátviteli folyamatban a protein kináz-C (PKC) útvonalon keresztül, végső soron több gén átíródásához vezet (Northrop 1993)(1. ábra).

A Ca^{2+} -dependens jelátviteli útvonal meghatározóan függ a plazmamembránban elhelyezkedő K^+ és Ca^{2+} ioncsatornák aktivációjától (Panyi 2004b, Panyi 2004c; Cahalan 2001). A Ca^{2+} jel fenntartott fázisában a Ca^{2+} ionok plazmamembránon át történő beáramlása Ca^{2+} szelektív csatornákon keresztül történik, amelyek egy jelenleg még nem ismert mechanizmus szerint aktiválódnak az endoplazmatikus retikulum Ca^{2+} raktárának kiürülését követően. A jelenség háttérében álló csatornát “store-operated” Ca^{2+} csatornának, vagy kalcium felszabadulás aktiválta Ca^{2+} csatornának (angol rövidítés: CRAC) nevezik (Zweifach 1993, Prakriya 2003). A nyitott CRAC csatornákon folyó áram elektrokémiai hajtóerejéhez komoly hozzájárulást ad a sejtek membránpotenciálja (Lewis 1995, 2001).

A T sejtek membránpotenciálja -50 és -60 mV között van, melyet döntően két különböző K^+ csatorna, a feszültség-függő depolarizáció-aktivált Kv1.3 és a Ca^{2+} -aktivált K^+ csatorna (IKCa1) határozza meg (Matteson 1984, Fanger 2000). E két ioncsatorna által létrehozott kation kiáramlás a sejtmembránt hiperpolarizált állapotban tartja még a depolarizáló hatást jelentő Ca^{2+} influx mellett is, biztosítva ezzel a Ca^{2+} beáramláshoz szükséges hajtóerőt, és így a megfelelő Ca^{2+} -mediált jelátvitelt.

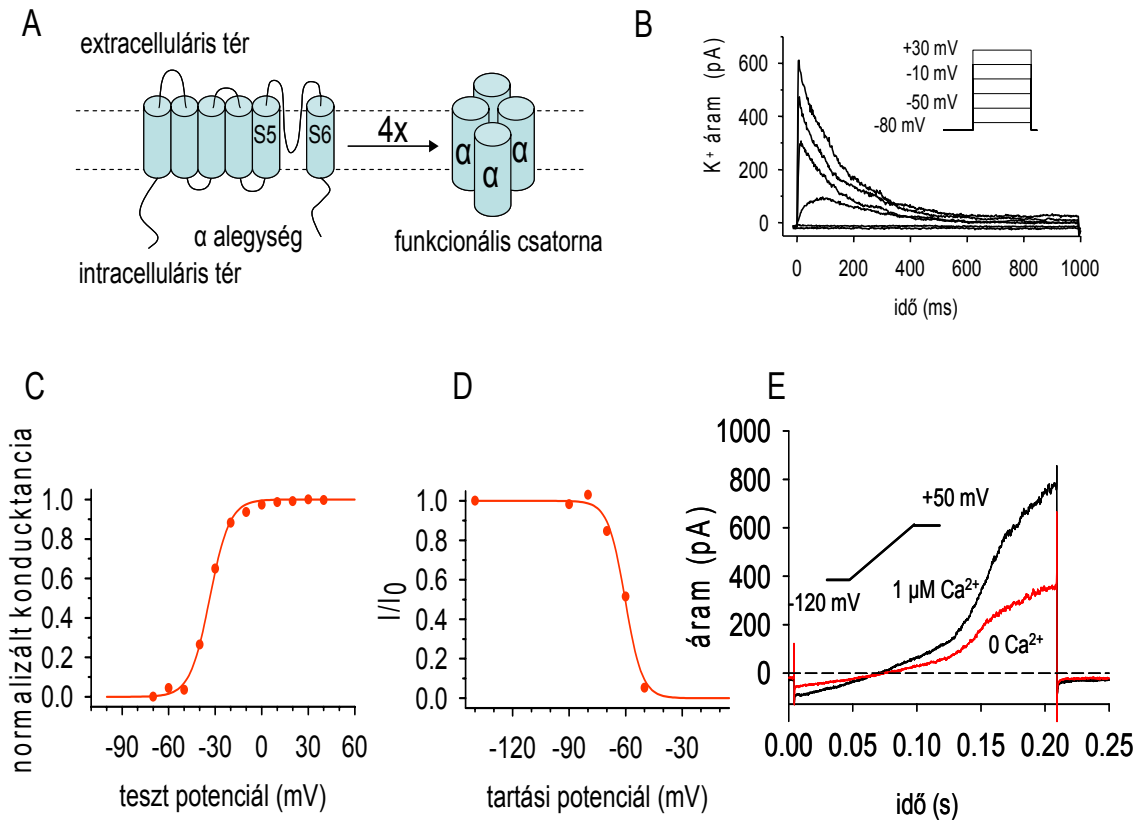


1. ábra: A Kv1.3 és IKCa1 csatornák szerepe a T sejt receptor jelátvitelében.

1.3 A feszültség kapuzott Kv1.3 csatorna fontosabb biofizikai tulajdonságai

A limfocita membrán domináns feszültség-kapuzott K^+ csatornája, a hKCNA3 gén által kódolt Kv1.3 csatorna. A Kv1.3 a feszültség-vezérelt ioncsatornák Shaker családjába tartozik, ez a csatorna az immunrendszer és a központi idegrendszer jellemző feszültségfüggő ioncsatornája. Az ingerelhető sejtek késleltetett egyenirányító ún. „delayed rectifier” áramaihoz viszonyítva a T limfociták Kv1,3 csatornái néhány teljesen eltérő tulajdonsággal rendelkeznek. A T limfociták feszültségfüggő Kv1.3 csatornáira jellemző pl. a kumulatív inaktiváció (nagy frekvenciájú, inaktivációt látszólagosan nem okozó rövid depolarizáló impulzusok sorozata a csúcsáramok

progrsszív csökkenését okozza), valamint a viszonylag sok csatornablokkoló szerre való érzékenység (DeCoursey 1984, Cahalan 1985).



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 limfocitákban. A belső ábra a feszültség protokolt 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 küszöbe alatt mérhető (a függőleges szaggatott vonaltól balra).

A Kv1.3 csatorna négy nem kovalensen kötött alegységből áll, az alegységek kb. 500 aminosavat tartalmaznak. A csatorna sematikus szerkezete az 2A ábrán látható. Minden egyes alegység hat, a membránt teljes egészében átérő helikális transzmembrán szegmensből áll, ezekhez és az őket összekötő extra- és intracelluláris hurkokhoz jól meghatározott funkciók tartoznak (Hille 1992). Az S5 és S6 domének közötti szakasz az S6 szegmensevel együtt képezi a pórus régiót, amelyen keresztül az ionok átjutnak a membránon. Itt található egy négy aminosavat

tartalmazó konzervatív szekvencia (GYGD), amelyet több különböző kálium csatornában is azonosítottak, és amelyről kísérleti eredmények alapján feltételezhető, hogy a K^+ szelektivitásért felelős (Aiyar 1996). Az S5 és S6 közötti régió egyben sok toxin kötőhelyeként is szolgál (Yellen 1991).

Mutagenézis vizsgálatok szerint az S4 szegmens hét Arg–X–X–Arg motívumot tartalmaz, és az S2 és S3 doménekkel együtt a feszültség szenzort alkotja. A membránpotenciálban történt változás megváltoztatja a csatorna konformációját, ez az S4 töltött részecskéinek az elmozdulásával jár, amely végül a csatorna nyitásához vezet (Papazian 1995, Seoh 1996, Glauner 1999). Újabb, a bakteriális feszültségfüggő K^+ csatornákon történt krisztallográfiás vizsgálatok szerint a nettó negatív töltést hordozó S3 és a többszörösen pozitívan töltött S4 domének evezőlapát-szerű feszültség szenzorokat formálnak minden alegységben, a feszültség szenzor membránpotenciál-függő elmozdulása pedig a csatorna aktivációs kapujának megnyílásához vezet (Jiang 2003). A fenti, elsősorban strukturális információt főként a Shaker csatornák mutagenézise, ill. peptid toxinok és a csatorna pórusa közötti kölcsönhatások analízise alapján határozták meg. A pórus és a szelektivitási filter szerkezetére ezen adatok alapján levont következtetéseket Roderick MacKinnon röntgen-krisztallográfiás kísérletei igazolták (2003 kémiai Nobel díj) (Doyle 1998; Zhou 2001; Jiang 2003).

A Kv1.3 típusú csatornák depolarizáció hatására kinyílnak, a csatornák aktivációs küszöbfeszültsége kb. -60 mV, és a nyitási valószínűség fokozatosan nő a feszültséggel kb. 0 mV-ig (2B ábra). A csatorna inaktiválódik, ha hosszú ideig tartó, vagy ismétlődő depolarizáló impulzust alkalmazunk. Az inaktiváció a teljes-sejt áram amplitúdójának csökkenésében nyilvánul meg, hiszen inaktivált állapotban a csatornák nem vezetnek. Ennek az ún. C-típusú lassú inaktivációnak a mechanizmusa különbözik a Shaker vagy más Kv típusú csatorna N terminális labda és lánc (ball and chain) típusú inaktivációjától. Szemben az N-típusú inaktivációval, a C-típusú inaktivációt az extracelluláris tér ionösszetétele és a pórus extracelluláris részében található aminosavak tulajdonsága befolyásolja (López-Barneo 1993). A C-típusú inaktiváció molekuláris mechanizmusa nem ismert, azonban a kísérletes adatok alapján a legvalószínűbb az, hogy a csatorna pórusának extracelluláris szájadéka az inaktiváció során összeszűkül (Panyi 1995, Liu, 1996).

Az egyensúlyi aktiváció és inaktiváció feszültségfüggése a 2. ábra C és D részében látható. Depolarizált membrán mellett a csatornák aktivációjukat követően egy nem-vezető ún.

inaktivált állapotba kerülnek (Marom 1994, Panyi 1995). Az inaktivált állapotból a Kv1.3 csatornák még -120 mV membránpotenciál mellett is hosszú idő alatt (~ 50 s) térnek vissza nyugalmi (zárt) állapotukba. Az inaktiváció alapján véve csökkenti a membránpotenciál kontrollhoz rendelkezésre álló, aktiválható K^+ csatornák számát. A Kv1.3 C-típusú inaktivációja azonban sokkal lassabb, mint a rokon Kv1.x csatornák inaktivációja, így az aktivált Kv1.3 csatornák jelentős K^+ fluxust képesek létrehozni mielőtt a nem-vezető inaktivált állapotba kerülnek. A Kv1.3 csatornák ezen tulajdonságai, valamint a limfociták kis mérete és membránjának rendkívül magas ellenállása ($10-20$ G Ω) biztosítják azt, hogy a T sejtek nyugalmi membránpotenciálját kevés számú aktív csatorna is képes fenntartani (Defarias 1995). A csatorna hatékony működését a nyugalmi membránpotenciál fenntartásában segíti, hogy az aktivációs küszöb közel van a sejt nyugalmi potenciáljához.

1.4 A Kv1.3 és IKCa1 szelektív blokkolói potenciális immunszupresszorok

A K^+ csatornák és a limfociták aktivációja közötti kapcsolat eddigi legmeggyőzőbb bizonyítékai farmakológiai kísérletekből származnak, a csatornákra ható toxinok alkalmazása segítette a Kv1.3 és IKCa1 csatornák nyugvó és aktivált T sejtekben betöltött szerepének megértésében. In vitro kísérletek bizonyították, hogy a Kv1.3 ill. IKCa1 csatornák peptid és nem-peptid természetű gátlószerei hatékonyan képesek gátolni a TCR aktivációt követő Ca^{2+} válasz fenntartott fázisát, és ennek következtében a sejtek proliferációját. A gátlószerek depolarizálják a T sejtek membránját, ami a csökkent elektrokémiai hajtóerő miatt gátolja a Ca^{2+} influxot a CRAC csatornákon keresztül. (Chandy 1984, Wulff 2000, Ghanshani 2000, Khanna 1999).

Struktúráisan nagyon különböző peptid és nem peptid típusú Kv1.3 csatornablokkoló molekulák képesek gátolni a mitogén indukált [3H] timidin beépülést, citokin produkciót, gén expressziót, T sejt proliferációt és az in vivo immunválaszt a csatorna blokkolásához szükséges koncentrációban. (Koo 1997). Ezek a csatornablokkolók (pl. 4-aminopiridin, tetraetil-ammónium, progeszteron, correolide) mikromoláris illetve millimoláris koncentrációban gátolták a feszültségfüggő K^+ csatornákat (DeCoursey 1984, Ehrling 1998, Hanner 1999). Mivel a korábban felfedezett nem peptid blokkolók csak nagy koncentrációban voltak hatékonyak, és más csatornákra is hatottak, a T sejtek ioncsatornáit specifikusan, nagy affinitással gátló molekulák izolálása vált szükségessé.

Az első nanomoláris koncentrációban is hatékony peptid toxin a charybdotoxin (ChTx) volt (Kv1.3 csatornára $K_d = 2.2$ nM), melyet skorpió méregből izoláltak (Price 1989, Sands 1989). A ChTx a Kv1.3 mellett hatékonyan blokkolja az T limfociták IKCa1 csatornáit is (Rauer 2000). Később több nanomoláris és pikomoláris affinitású skorpióméreg eredetű csatornablokkoló peptidet is felfedeztek, mint pl. a noxiustoxin, kalitoxin, margatoxin, agitoxin-2, hongotoxin, Pi 1-3, stb, melyek többé-kevésbé szelektíven gátoltak egy-egy ioncsatornát (Bednarek 1994, Drakopoulou 1995, Koschak 1998, Peter 1998, Mourre 1999). A skorpiómérgekből izolált K^+ csatorna toxinok 30-40 vagy 60-70 aminosavból állnak, amelyeket 3 vagy 4 diszulfid híd stabilizál. Az elsődleges szerkezet homológiája alapján 19 alcsoportot írtak le (Tytgat 1999).

Néhány kis szelektivitású, többféle ioncsatornát is gátló peptidet molekuláris biológia módszerekkel Kv1.3 specifikussá lehetett tenni. A Sea anemone ShK polipeptidje a Kv1.3 mellett gátolja a Kv1.1, Kv1.4, Kv1.6 neuronális csatornákat is pikomoláris koncentrációban. A toxin-csatorna kölcsönhatásban kritikus lizin (Lys22) diamino-propionsavra történő cserélésével elérhető volt, hogy a peptid Kv1.3-ra vonatkozó nagy affinitása megmaradt, míg a többi feszültség-kapuzott csatornára vonatkozóan az affinitás több nagyságrenddel lecsökkent (Kalman 1998). Az így kapott ShK-Dap22 szubnanomoláris koncentrációban gátolta az anti-CD3-indukált radiotív timidin beépülését humán T sejtekbe. A ChTx egyik származéka, a ChTx-Glu32 és az antimitotikus clotrimazol szerkezeti analógja, a TRAM-34 pedig az IKCa1 szelektív és hatékony blokkolója (Rauer 2000, Wulff 2001).

A specifikus blokkolók ezen felül fontos információt szolgáltatottak a Kv1.3 és más Kv csatornák pórus régiójának szerkezetéről is. A toxin receptorok és a toxinok komplementer mutagenézisével pl. következtetni lehet a pórus szerkezetére és a molekuláris kölcsönhatásokra (Gross 1996), a charybdotoxint igen széles körben használták fel erre a célra (Park 1992, Stocker 1994). 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 toxinok részéről a K^+ csatornák gátlásáért felelős struktúrális elem a referenciaként választott, a ChTx 27-es pozíciójának megfelelő helyen lévő lizin, ill. a ChTx 36-os pozíciónak megfelelően pedig egy aromás aminosav, amelynek aromás gyűrűje ~ 7 Å távolságra helyezkedik el a centrális lizin α szénatomjától. A kationok csatornaszájadékból történő kiszorításában

kitüntetett szerepet játszik a csatornaszájadékba mélyen behatoló, pozitív töltésű lizin (Tytgat 1999, Dauplais 1997).

A közelmúltban Chandy és munkatársai jelentős felfedezést tettek a Kv1.3 csatornák T sejt altípus-függő expressziója terén, ami komoly lendületet adhat további kísérleteknek (Wulff 2003). Felfedezték, hogy a sclerosis multiplex-ben szenvedő betegek véréből izolált, krónikusan aktivált effektor memória T sejtek (T_{EM} ; $CCR7^-CD45RA^{+/-}$), melyek a betegség patogenezisében döntő szerepet játszanak, igen nagy számban fejeznek ki Kv1.3 csatornát (kb. 1500/sejt), míg IKCa1 csatorna expressziójuk nem jelentős. Ezzel szemben nyugvó (naïve) ($CCR7^+CD45RA^+$) és centrális memória T sejtek (T_{CM} ; $CCR7^+CD45RA^-$) esetén a mitogén indukált proliferáció a Kv1.3 csatornák expressziójának enyhe ($\sim 250/sejt \rightarrow \sim 400/sejt$), ugyanakkor az IKCa1 csatornák expressziójának jelentős fokozódásával ($8-10/sejt \rightarrow 500/sejt$) jár együtt. A Kv1.3 nagy affinitású gátlószerei (pl. ShK toxin, $IC_{50} \sim 100$ pM) a T_{EM} sejtek osztódását specifikusan gátolták, ugyanis a Kv1.3 blokkolás mediált proliferáció gátlás alól a naïve és T_{CM} sejtek az IKCa1 csatornák fokozott expressziójával mentesülnek. Így a Kv1.3 szelektív inhibitorai specifikus immunszuppressziót okoznak (Chandy 2004). Ezek alapján érthető az igény a gyógyszergyárak részéről minimális mellékhatással rendelkező, terápiás célra is alkalmazható, a Kv1.3 csatornát specifikusan blokkoló vegyületek iránt.

A fentiekből következik, hogy a Kv1.3 és az IKCa1 csatornák különleges szöveti eloszlásuk és a T sejt aktivációban betöltött kritikus szerepük miatt alkalmas célpontjai lehetnek új immunoszuppresszív szerek fejlesztésének. A csatornablokkolók alkalmazásának feltétele a nagy specificitás és kevés mellékhatás. A csatornablokkolók terápiás használatához ismerni kell a csatorna biofizikai tulajdonágait, szöveti eloszlását, az expresszió szabályozását, a blokkolás hatékonyságát és szelektivitását, valamint a csatornafunkciók fiziológiai szabályozását.

1.5 A T sejt aktivációban résztvevő fehérjék térbeli elrendeződése és kapcsolatuk a Kv1.3 csatornákkal

Az aktivált limfociták kulcsszerepet játszanak a vírussal fertőzött és daganatos sejtek elpusztításában. A citotoxikus T sejtek (CTL) és a target sejtek közötti kapcsolódást TCR-MHC peptid komplex kialakulása jelenti számos kisegítő molekula közreműködésével. A kapcsolódást követően a citotoxikus sejt elpusztítja a target sejtet exocitotikus granulumokkal, vagy sejt felszíni

receptor-mediált sejthalálhoz vezető szignalizációs út beindításával (Lieberman 2003, Kagi 1994).

A target sejt és a T sejt érintkezési helyén, az úgynevezett immunológiai szinapszisban (IS) a molekulák mikrométeres doménekbe szegregálódnak (Davis 2002). Az IS kialakulása során a fehérjék eloszlása a lipid raftok újjászerveződése révén megy végbe, amelyben adaptor fehérjék és a citoszkeleton is részt vesz. Az így kialakuló szupramolekuláris aktivációs komplex (cSMAC) közepén a T sejtek oldalán többek között a TCR/CD3, CD28 és CD2 membrán fehérjék találhatók, míg a periférián az LFA-1/ICAM-1 adhéziós molekulák ölelik körül és stabilizálják a szinapszist. A membrán fehérjék átrendeződéséhez hasonló változások jönnek létre a citoszolban is, ahol a szinapszis perifériás részén talin, míg centrálisan Lck és PKC θ halmozódik fel (van der Merwe 2002, Grakoui 1999, Monks 1998, Bromley 2001, Holdorf 2002). Az IL2-R, mely a T sejt IL2 növekedési faktorának receptora és a T sejt membránban MHC és CD48 molekulákkal asszociálódott, szintén lipid raftokban helyezkedik el (Vereb 2000).

A fehérjék csoportosulása és térbeli orientációja biztosítja azt, hogy a TCR/CD3 komplex aktiválása hatékony legyen a protein kinázok molekuláris proximitásba kerülése eredményeként (Davis, 2002). A TCR keresztkötés a raft asszociált fehérjék aggregációját okozza, aminek következtében a szignalizációs fehérjék (elsősorban a raft-asszociáltak, mint pl. CD3, ZAP-70, p56^{lck}, LAT, PLC) tirozin-foszforilálódnak. A $[Ca^{2+}]_i$ szignalizáció beindulásához legalább 300 TCR molekulára van szükség az immunológiai szinapszisban (Wei 1999).

Hasonló IS-t írtak le CD4⁺ T limfocitákban és natural killer (NK) sejtekben is, de CD4⁺ sejtekben az IS központi régiója nem tartalmazza a lítikus granulumok exocitózisában szerepet játszó domént (Vyas 2001). Az NK és CTL sejtek által véghezvitt ölésben kimutatták a feszültség-függő kálium csatornák szerepét is (Felzen 1996, Schlichter 1986, Sharma 1988). Ezen csatornák szelektív blokkolói gátolták a citotoxicitást már az ionáramok gátlásához szükséges koncentrációban is, így a Kv1.3 csatornáknak is szerepük lehet a T sejt szignalizációban. Különböző biokémiai és biofizikai kísérletek szintén azt sugallták, hogy a már megismert molekulákon kívül a Kv1.3 csatornák is részesei lehetnek az immunológiai szinapszis kialakulásával létrejövő szignalizációs komplexnek. Ezt bizonyítja pl. a Kv1.3 csatornák p56^{lck} kináz általi szabályozása a T sejtek Fas receptor-mediált apoptózisa során (Szabo 1996; Bock 2003).

A Kv1.3 csatorna és a p56^{lck} kináz közötti kapcsolat közvetve valósul meg T sejtekben, a csatorna C-terminális PDZ kötő doménjével a p56^{lck}-t kötő hDlg fehérje PDZ doménjéhez kapcsolódik. Így a hDlg a Kv1.3 csatornákat a p56^{lck}-hoz kapcsoló adapter fehérjeként funkcionál, biztosítva ezzel a Kv1.3 tirozin foszforiláció révén történő szabályzásának térbeli feltételeit. Ez a kapcsolat azért különösen fontos, mert a T sejt jelátvitelében a p56^{lck} központi szerepet játszik (Hanada 1997). A Kv1.3 N terminális vége a Kvβ2 járulékos alegységen és egyéb adapter fehérjéken (ZIP-1, ZIP2) keresztül szintén kapcsolódhat p56^{lck} illetve PKC szignalizációs molekulákhoz (Gong 1999). Így a p56^{lck} tirozin kinázhoz a Kv1.3 N és C terminálisa is kötődhet.

A lipid raftok szerepe a T sejt receptor jelátvitelének térbeli és időbeli koordinációjában jól ismert (Matko 2003). Egyre több kísérletes eredmény mutat arra, hogy az ioncsatornák lipid raftokhoz történő asszociációja jelentősen módosítja a csatornák funkcióját (Martens 2000, 2001). Ezen információk alapján indokoltnak láttuk a Kv1.3 csatornák membrán síkjában való lokalizációjának vizsgálatát, valamint a csatornák és a T-sejt receptor komplex, illetve a lipid raftok egymáshoz képesti viszonyának tisztázását.

2. CÉLKITŰZÉSEK

1, Ismert, hogy a Kv1.3 csatornablokkolóknak immunszuppresszív hatása lehet. A gyógyszergyárak részéről fennálló érdeklődés minimális mellékhatással rendelkező, terápiás célra is alkalmazható csatornablokkoló vegyületek iránt indokolta új Kv1.3 gátlószer keresését. Kísérleteinkben arra kerestünk választ, hogy az *Anuroctonus phaiodactylus* skorpió mérgéből nyert anuroctoxin hatékonyan és specifikusan blokkolja-e a Kv1.3 csatornát.

2, Kíváncsiak voltunk arra, hogy milyen a Kv1.3 csatorna sejtfelszíni eloszlása a limfocita membránban, a csatornák eloszlásában található-e inhomogenitás. Emellett vizsgálni kívántuk, hogy van-e az immunológiai folyamatokban fontos szerepet játszó TCR/CD3 receptor komplex és a feszültségfüggő Kv1.3 csatorna között térbeli asszociáció.

3, Számos biokémiai és biofizikai kísérlet sugallta, hogy a már megismert molekulákon kívül a Kv1.3 K^+ csatornák is részesei lehetnek az immunológiai szinapszis kialakulásával létrejövő szignalizációs komplexnek. Ezért vizsgálni kívántuk, hogy milyen a csatorna eloszlása a target sejttel kontaktusba lépő citotoxikus T limfociták felszínén, jelen van-e a Kv1.3 az immunológiai szinapszisban, van-e szerepe a citotoxicitásban.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Sejtek

A Jurkat TagC15 sejteket $<1 \times 10^6/\text{ml}$ koncentrációban növesztettük RPMI 1640 médiumban, mely 10% (v/v) FCS-t, 50 mg/liter gentamicint és 2 mM L-glutamint is tartalmazott. A sejteket 2-3 naponta passzáltuk. A citotoxikus egér T sejteket (CTLL-2) szintén RPMI 1640 médiumban növesztettük, antibiotikum nélkül. A médium tartalmazott 10% (v/v) FCS-t, 2 mM Na-piruvátot, 10 mM HEPES-t, 4 mM L-glutamint, 50 μM 2-mercaptoetanolt és 100 CU/ml IL-2-t. A mKv1.1 és rKv1.2 csatornákat stabilan expresszáló L929 és B82 sejteket Dr. Heike Wulff-tól kaptuk (UC Davis, CA, USA)(Grissmer, 1994).

Az antigén specifikus CD8^+ humán CTL sejteket perifériás vér mononukleáris sejtek és JY limfoblasztok együtt-tenyésztésével nyertük (Bacso 1996) (RPMI-1640, 10 mM Hepes-sel (pH 7.3) és 50 μM 2-mercaptoetanollal kiegészítve). A perifériás vér mononukleáris sejtjeit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mitomycin C-vel kezelt JY sejtekkel stimuláltuk két héten keresztül. A negyedik naptól a médiumot kiegészítettük 20 U/ml humán rekombináns IL-2-vel, a továbbiakban ezt minden 3. nap megismételtük. A 14. napon a CTL sejteket újra stimuláltuk mitomycin C-vel kezelt JY sejtekkel, és a ciklust 14 naponta ismételtük. Leghamarabb 2 hónap múlva a limfocitákat lefagyasztottuk tárolás céljából. A kezelés hatására a sejtpopuláció 90 % CD8^+ sejtet tartalmazott. A lefagyasztott sejteket felolvasztva, stimuláló JY sejtekkel újra kezelve, 3-5 nappal az utolsó stimuláció után használtuk kísérleteinkhez.

A JY sejtvonal egy humán Epstein-Barr vírus transzformált B limfoblaszt sejtvonal, amely nagy mennyiségű HLA-A2, B7, DQw 1, DQw 3, és DR fehérjét expresszál (Terhorst 1976). A humán perifériás limfocitákat egészséges önkéntesekből szeparáltuk Ficoll-Histopaque sűrűség grádiens centrifugálással. A limfocita sejtkultúrához 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ phytohemagglutinin-t adtunk, hogy a K csatorna expressziót megnöveljük (Deutsch 1986, Péter 2001).

3.2 Skorpió toxinok

A felhasznált toxinok tisztítása kromatográfiás eljárással történt. A skorpiómérget az állatokból elektromos stimulációval nyertük. A skorpió méreg oldható frakcióit először magas nyomású folyadék kromatográfiás eljárással (HPLC) szeparáltuk. Az Apha-2 frakciót, amely az aktív peptid komponenst tartalmazta, HPLC kromatográfiával szubfrakciókra bontottuk. Az

anuroctoxin szekvenciáját Beckamm LF 3000 analízátor segítségével határoztuk meg, az aminosav szekvenciákat ClustalX, BLAST és FASTA kereső programokkal hasonlítottuk össze. A toxinok izolálását és a szekvencia analízist kollaborációs partnerünk (Dr. Possani, Cuernavaca, Mexikó) laboratóriumában végezték.

3.3 Molekuláris biológia

A FLAG epitópot (DYKDDDDK) pRC/CMV-Kv1.3 plazmidba klónoztuk QuikChange PCR mutagenesis kitet használva (Stratagene). 21 bázispárt inzertáltunk az S1 és S2 transzmembrán szegmens közötti extracelluláris szakaszba a 220. pozícióba úgy, hogy a FLAG epitóp 1. aminosava az eredeti D220. Az inzerciós mutagenézis eredményességét AatII restrikciós enzim hasítással és szekvencia analízissel ellenőriztük.

3.4 Jurkat sejtek transzfekciója

24 órával a transzfekció előtt a sejteken lecseréltük a médiumot, hogy a logaritmikus növekedési fázist biztosítsuk. A sejtekbe a vad típusú (Kv1.3/WT) vagy mutáns (Kv1.3/FLAG) csatornát Effectene reagenssel (Qiagen) tranziensen transzfektáltuk úgy, hogy a DNS/reagens arány 1 µg/25 µl volt a 60 mm-es petri edény 4×10^6 sejtet tartalmazott 5.2 ml végtérfogatban. A sejteket 24 óráig növesztettük az immunogold és fluoreszcens vizsgálatok előtt.

3.5 CTLL-2 sejtek transzfekciója

A CTLL-2 sejteket tranziensen kotranszfektáltuk a Kv1.3/WT vagy Kv1.3/FLAG Kv1.3 csatornát kódoló plazmiddal és CD4 gént kódoló Ccd4neo plazmiddal (5.0 kb; CD4-et kódoló pUC/CMV) 5:1 arányban, elektroporációval (Panyi 1995). A rKv2.1 vagy Shaker IR ioncsatornákat hasonló módszerrel transzfektáltuk CTLL-2 sejtekbe.

3.6 COS-7 sejtek transzfekciója

A Cos-7 sejteket tranziensen kotranszfektáltuk hKv1.2 csatornát kódoló plazmiddal és zöld fluoreszcens fehérjével (GFP) és 5:1 arányban, elektroporációval. Az áramokat a transzfekció után 3 nappal mértük, a GFP pozitív transzfektált sejteket fluoreszcens mikroszkóppal azonosítottuk.

3.7 CTL transzfekció és a CTL-JY kontaktus kialakítása

A CTL sejket Lipofecamine 2000 reagenssel (Invitrogen) transzfektáltuk a gyártó instrukciói szerint. A transzfekció után 24 órával a sejteket fenolvörös nélküli RPMI 1640 médiummal mostuk, és 2.5×10^5 CTL sejtet adtunk ugyanennyi JY sejthez 1 ml fenolvörös nélküli RPMI 1640 médiumban. A sejtkeveréket 1 percig centrifugáltuk 200 g-vel és 37 °C hőmérsékleten inkubáltuk 5 percig. A konjugált sejteket jégen tartottuk 1 % paraformaldehides PBS-ben 1 órán át.

3.8 Sejtek előkészítése elektrofiziológiai mérésekhez

A hCD4 molekulával és különböző ioncsatorna génekkel kotranszfektált CTLL-2 sejteket monoklonális egér anti-humán CD4 antitesttel ($0.5 \text{ mg}/10^6$ sejt) inkubáltuk és kecske anti-egér IgG-vel (BioSource International, Camarillo, CA) bevont petri-edényekhez (35 mm) rögzítettük (Deutsch 1993). A sejteket ötször mostuk 1 ml normál extracelluláris oldatban, hogy a le nem tapadtakat eltávolítsuk.

3.9 Elektrofiziológia

A sejtmembrán áramokat patch-clamp technika teljes sejt konfigurációjában mértük Axopatch 200A erősítőt használva, feszültség-zár üzemmódban. Az ingerlő feszültség impulzusokat és az adatgyűjtést személyi számítógép vezérelte Digidata 1200 illesztőegységen keresztül a pClamp8 programcsomag (Axon Instruments Inc., Foster City, CA) segítségével (Hamill 1981, Panyi 1996). A mérések során soros ellenállás kompenzációt alkalmaztunk (85%-ig), hogy minimalizáljuk a feszültséghibát. Az áramgörbék analíziséhez szintén a pClamp8 programcsomagot használtuk. Az analízis előtt a görbéket ohmikus leak-korrigáltuk és digitálisan simítottuk.

A pipettákat GC 150 F-15 boroszilikát üvegkapillárisokból húztuk két lépésben, és políroztuk. A pipetták ellenállása 2-3 M Ω volt. A külső oldat összetétele (mM): 145 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 2.5 CaCl₂, 5.5 glükóz, 10 HEPES (pH 7.35), 0.1 mg/ml BSA-val kiegészítve. Az oldat ozmolaritása 302 and 308 mOsm között változott. A belső oldat összetétele (mM): 140 KF, 2 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 HEPES, 11 EGTA (pH 7.22), kivéve a kalcium aktivált kálium áram méréseket, amikor 150 K-aspartate, 5 HEPES, 10 EGTA, 8.7 CaCl₂, 2 MgCl₂, (pH 7.2) tartalmú

oldatot használtunk. Az utóbbi esetben a pipetta oldatban a szabad Ca^{2+} koncentrációja $1\ \mu\text{M}$ volt. A belső oldat ozmolaritása $295\ \text{mOsm}$ volt.

A CD8^+ sejteket Alexa Fluor 546 festékkel konjugált anti-humán CD8 antitesttel jelöltük, a jelölt sejteket Nikon TE2000 fluoreszcens mikroszkóppal azonosítva mértük a rajtuk átfolyó áramot.

Az Kv1.3 blokkolókat tartalmazó oldatokat számítógép által szabályzott gravitációs perfúziós rendszerrel juttattuk el a sejtekhez, a folyadék felesleget folyamatosan eltávolítottuk. Minden esetben legalább 3 független mérést végeztünk, a K_d értékeket átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg.

3.10 Áramlási citometriás mérések

A Kv1.3/FLAG csatornával transzfektált Jurkat sejtek specifikus jelölődésének vizsgálatához a Kv1.3/WT illetve Kv1.3/FLAG csatornákkal transzfektált Jurkat sejteket anti-FLAG-M2 monoklonális primer és FITC-konjugált nyúl-anti-egér IgG poliklonális szekunder antitesttel (F-RAMIG, SIGMA), a kontroll mintákat csak F-RAMIG-gal jelöltük, és a fluoreszcenciát áramlási citométerrel detektáltuk. A Becton Dickinson FACSCalibur áramlási citométer $488\ \text{nm}$ -es vonalát használtuk gerjesztéshez.

3.11 Immunogold jelölés

A transzfektált sejteket kétszer mostuk Hanks' pufferrel és anti-FLAG M2 primer antitesttel (egér anti-human, Sigma) jelöltük jégen, 40 percig. A sejtszuspenziót kétszer mostuk és 10 illetve $30\ \text{nm}$ átmérőjű aranygömbbel konjugált poliklonális szekunder antitesttel (Aurogamig G10, Aurogamig G30, Amersham Pharmacia) jelöltük. A sejteket paraformaldehiddel és glutáraldehiddel fixáltuk és preparáltuk transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) vizsgálatához.

3.12 CLSM

A Jurkat sejtek CD3 molekulák és Kv1.3 ioncsatornák konfokális lézer scanning mikroszkópos (CLSM) vizsgálatához a következő jelöléseket végeztük el: A CD3 receptorokat Alexa Fluor 633-mal (Molecular Probes) konjugált anti-CD3-mal (UCHT-1), a csatornákat pedig anti-FLAG-M2 (egér anti humán, Sigma) primer, és Alexa Fluor 546-tal (Molecular Probes)

konjugált RAMIG (Sigma) szekunder antitestekkel jelöltük. A sejteket polilizines fedőlemezekre cseppentettük ki és Mowioolt (Calbiochem) adtunk a mintákhoz, hogy a kifakulást csökkentsük.

A felvételeket Zeiss LSM 510 mikroszkóppal készítettük, az Alexa Fluor 546 gerjesztéséhez HeNe lézer 543, az Alexa Fluor 633-hoz pedig 633 nm HeNe lézert használtuk. A fluoreszcencia detektálásához az 560-615 nm bandpass és 650 nm- longpass filtereket, és a mikroszkóp "Multi Track" funkcióját használtuk. A mikroszkóp Plan-Axomat 63 "immersion oil" objektívjét használtunk (numerikus apertúra 1.4, Zeiss), és 0.6 μm vastag optikai szeleteket gyűjtöttünk. A különböző csatornáknál történt detektálások miatt keletkezett eltolódások korrigálásához a felvételeket néhány pixellel eltoltuk a maximális átfedéshez (Vereb 2000).

A CTL-JY konjugátumokon a Kv1.3 csatornát anti-FLAG-M2 primer (egér anti-humán), és Alexa 546-RAMIG szekunder antitestekkel jelöltük. Más sejtfelszíni fehérjék jelölésére a következő festék-konjugált antitesteket használtuk: X-FITC-jelölt W6/32 az MHC I (Barnstable 1978), Alexa Fluor 647-jelölt MEM31 (V. Horejci, Molekuláris Genetikai Intézet, Prága szíves ajándéka) a CD8 molekulák ellen. A sejteket polilizines fedőlemezekre cseppentettük ki, és Mowioolt adtunk a mintákhoz.

A CTL sejtek plazmamembránján CLSM-mel (Zeiss LSM 510) tanulmányoztuk a Kv1.3/FLAG csatorna, CD8 és MHC I molekulákat. A fluorescein gerjesztéséhez az Argon lézer 488 nm-es, az Alexa Fluor 546-hoz a He-Ne lézer 543 nm-es, az Alexa Fluor 647 festékekhez pedig a He-Ne lézer 633 nm-es vonalát használtuk.

A fluoreszcenciát 505-550 nm bandpass, 560-615 nm bandpass, és 650 nm- longpass filterekkel detektáltuk. A mikroszkóp Plan-Axomat 63 „immersion oil” objektívjét használva (numerikus apertúra 1.4, Zeiss), a fluoreszcens képeket „Multi Track” funkcióban készítettük 0.8-1.5 μm vastag optikai szeleteket gyűjtve.

3.13 Korreláció analízis és a fehérjék térbeli asszociációjának kimutatása néhány száz nm-es felbontásban

A duplán jelölt sejtek CLSM-mel készült projekciós képeinek alsó vagy felső 2-3 optikai szeletét használtuk a kiértékeléshez. A fehérjék térbeli asszociációját a képpárok x és y pixel intenzitásainak keresztkorrelációjából számoltuk a következő képlet alapján:

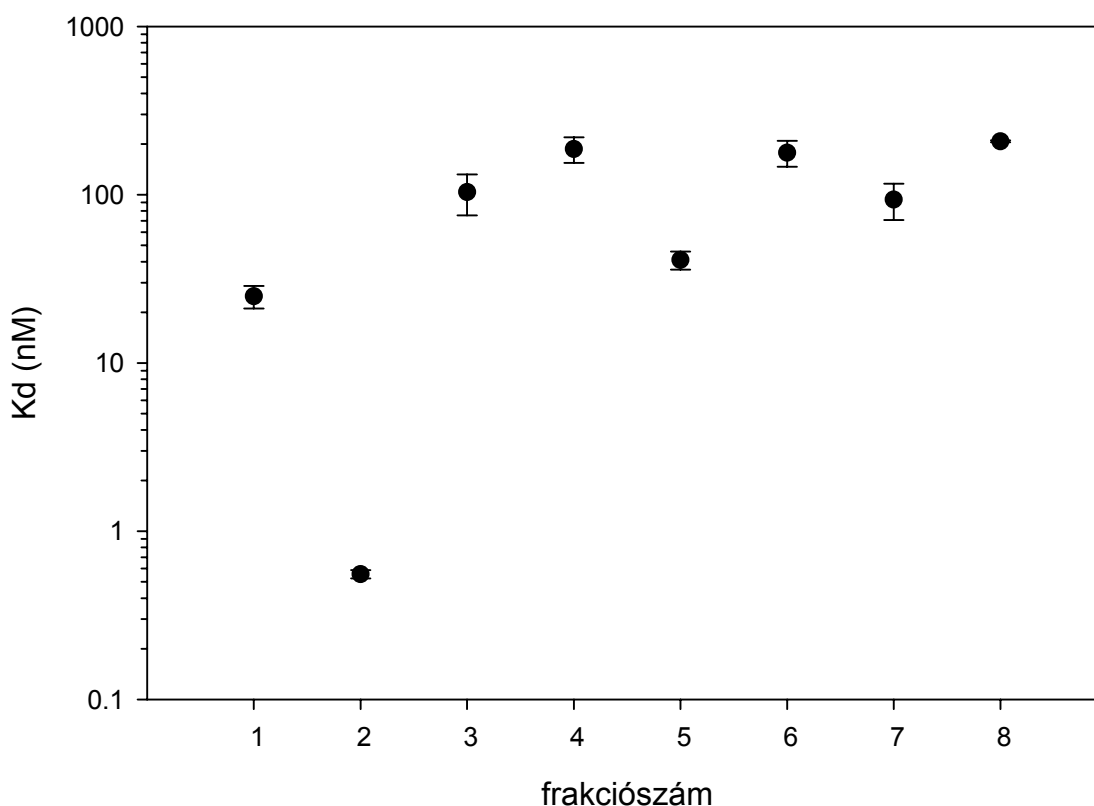
$$C = \frac{\sum_{i,j} (x_{ij} - \langle x \rangle)(y_{ij} - \langle y \rangle)}{\sqrt{\sum_{i,j} (x_{ij} - \langle x \rangle)^2 \sum_{i,j} (y_{ij} - \langle y \rangle)^2}} \quad [1]$$

ahol C a korrelációs koefficiens, x_{ij} és y_{ij} az x és y képek i és j koordinátájú pixeleinek egyedi fluoreszcencia szintje, $\langle x \rangle$ és $\langle y \rangle$ a megfelelő képek átlagos pixel intenzitásait jelölik. A képek keresztkorrelációs együtthatóját a Vereb Gy. által írt LABVIEW programmal számoltuk (National Instruments, Austin, TX), a kiértékelésnél a vizsgált sejt minden pixeljét figyelembe vettük. A tökéletesen egyező eloszlású molekulák esetén $C = 1$, míg az egymástól független eloszlás esetében $C = 0$ (Vereb 2000).

4. EREDMÉNYEK

4.1 Az anuroctoxin a Kv1.3 csatorna hatékony blokkolója

Az anuroctoxin izolációja és rendszertani besorolása. Az *Anuroctonus phaiodactylus* nevű skorpió szolubilis mérge HPLC-vel tisztítva legalább 70 frakcióit eredményezett. A 20.42 percnél eluálódó frakció a Kv1.3 csatornát nagy affinitással gátolta, ezt HPLC-vel tovább tisztították kollaboránsaink, majd a különböző retenciós idejű frakciók gátló hatását is megvizsgáltuk Kv1.3 csatornákra (3. ábra).

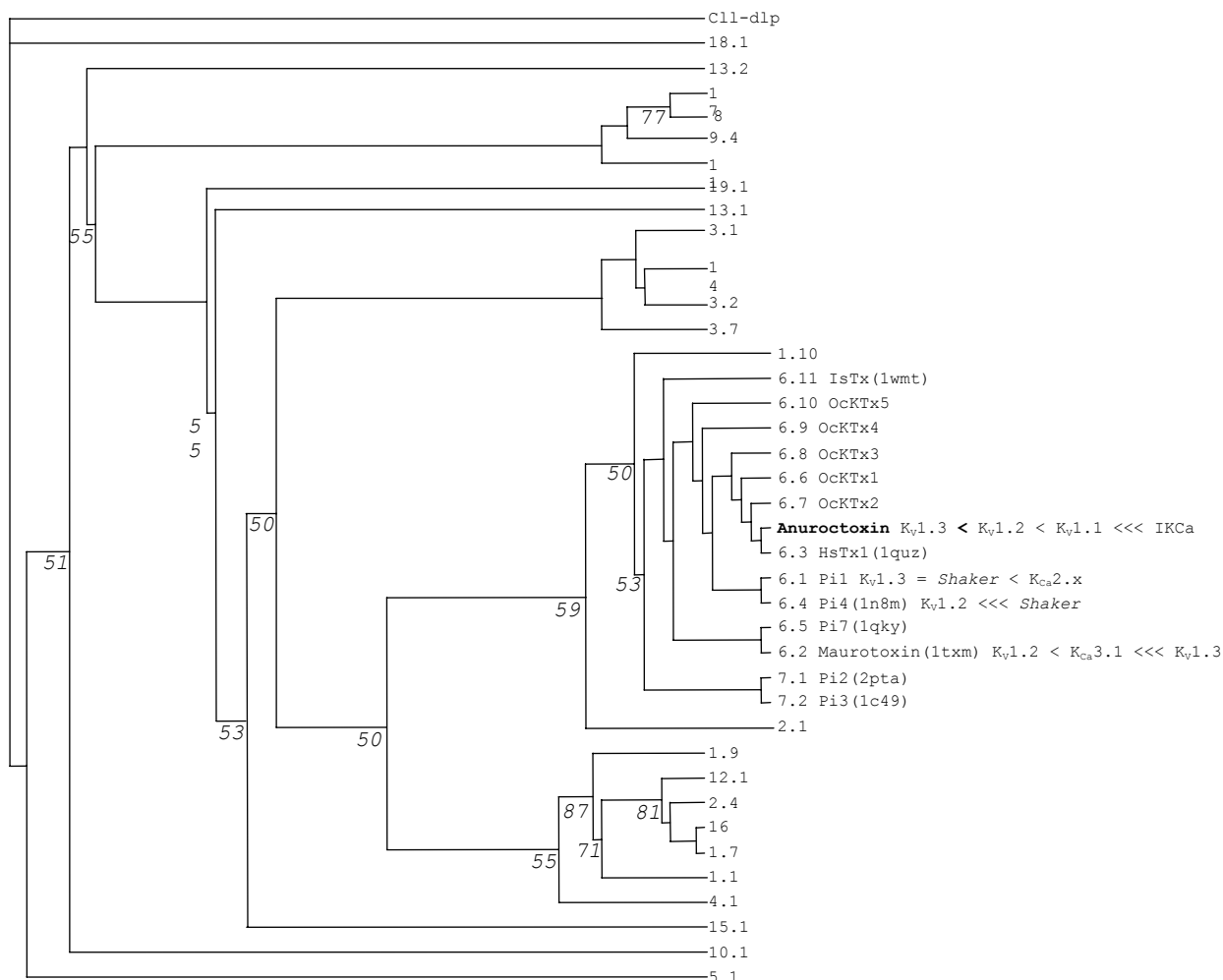


3. ábra: Az *Anuroctonus phaiodactylus* HPLC-vel tisztított frakcióinak gátló hatása a Kv1.3 áramra. A tisztítás eredményeként kapott frakciók közül nyolcat vizsgálunk. Az ábrán látható, hogy a 2. számú frakció (mely 20.42 percnél eluálódott) a Kv1.3 csatornát a többi frakcióhoz képest nagy affinitással gátolta. Ennek HPLC-vel történő további tisztítása eredményezte az anuroctoxint.

A tovább tisztított frakciók közül a 24.72 retenciós idejű bizonyult hatékony gátlószernek (anuroctoxin, $K_d = 0.73 \text{ nM}$). Mexicói partnereink meghatározták az anuroctoxin három dimenziós szerkezetét is (12. ábra). A szekvencia analízis szerint az anuroctoxin a jelenleg ismert 81 K^+ csatorna blokkoló skorpió toxin mindegyikével kevesebb mint 50 % homológiát mutatott (4. ábra). Filogenetikai analízis során az anuroctoxint az α -KTx toxincsalád 6. alcsaládjába soroltuk, α -KTx 6.12 számmal jelölve (5. ábra).

	10	20	30	40	%I
					
1.1 ChTx (2crd)	---ZFTNVSCTTSKECWSVCQRLHNTSRG- KCMN ---	KKCRCYS----	31		
2.1 Ntx (1sxm)	---TIINVKCTSPKQCSKPKELYGSSAG A KCMN ---	GKCKCYNN----	37		
3.1 Ktx (2ktx)	--GVEINVKCSGSPQCLKPKDA-GMRFG- KCMN ---	RKCHCTP----	32		
4.1 TsTXKa (1hp2)	---VFINAKCRGSPECLPKCKEAIGKAAG- KCMN ---	GKCKCYP----	33		
4.2 Tsk (1tsk)	---VVIGQRCYRSPDCYSACKKLVGKATG- KCTN ---	GRCDC-----	26		
5.1 Scytx (1scy)	-----AFCN-LRMQLSCRS-LGLL-G- KCIG ---	DKCECVKH----	28		
6.1 Pi1	-----LVKCRGTSDCGRPCQQQTGCPNS- KCIN ---	RMCKCYG-C--	36		
6.2 MauTx (1txm)	-----VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNA- KCIN ---	KSCKCYG-C--	42		
6.3 HsTx1 (1quz)	-----ASCRTPKDCADPCRKETGCPYG- KCMN ---	RKCKCNR-C--	50		
6.4 Pi4 (1n8m)	-----IEAIRCGSRDCYRPCQKRTGCPNA- KCIN ---	KTCKCYG-CS-	34		
6.5 Pi7 (1qky)	-----DEAIRCTGTDKCYIPCRYITGCFNS- KCIN ---	KSCKCYG-CT-	34		
6.6 OcKTx1	-----AEVIKCRTPKDCAGPCRKQTGCPHG- KCMN ---	RTCRCNR-C--	45		
6.7 OcKTx2	-----AEVIKCRTPKDCADPCRKQTGCPHG- KCMN ---	RTCRCNR-C--	45		
6.8 OcKTx3	-----AEVIKCRTPKDCAGPCRKQTGCPHA- KCMN ---	KTCRCHR-C--	39		
6.9 OcKTx4	-----AIIRCSGTRECYAPCQKLTGCLNA- KCMN ---	KACKCYG-CV-	39		
6.10 OcKTx5	-----AEVIRCSGSKQCYGPCKQQTGCTNS- KCMN ---	CKCYG-C--	37		
6.11 IsTx (1wmt)	---VHTNIPCRGTSDCYEPCEKKTNCARA- KCMN ---	RHCNCYNPCPW	34		
6.12 Anuroctoxin	-----ZKECTGPHCTNFCRKNK-CTHG- KCMN ---	RKCKCFNCK--	100		
7.1 Pi2 (2pta)	-----TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNA- KCMN ---	RKCKCFGR----	44		
8.1 P01 (1acw)	-----VSC---EDCPEHCSTQKAQA--- KCDN ---	DKCVCEPI----	25		
9.1 Bmp02 (1du9)	-----VGC---EECPMHCKGKNAKP---TCDD---GVCNCN-V---	17			
10.1 Cotx (1pjbv)	-----AVCV-YRTCDKDKR-RGYRSG- KCIN ---	NACKCYPY----	25		
11.1 PBTx1	--DEEPKESCS-DEMCIYCKG-EEYSTG-VCDG--PQCKCSD----	22			
12.1 Btx (1c55)	WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFGRAHG- KCMN ---	NKCRCYT----	31		
13.1 Tc1 (1j1z)	-----AC---GSCRKCK-----GSG- KCIN ---	GRCKCY-----	28		
14.1 BmKK1	---TPFAIKCATDADCSRKCP---GNP---SCRN---GFCACT-----	18			
15.1 Aa1	--QNETNKKCQ-GGSCASVCRRVIGVAAG- KCIN ---	GRCVCYP----	30		
16.1 Tamulotx	---DLIDVKCISSQECWIACKKVTGRFEG- KCQN ---	RQCRCY-----	26		
17.1 BmKK4 (1klh)	-----QTQCQSVRDCQQYCLT----PDR--CSY---GTCYCKTT---	20			
18.1 Tc32	---TGPQTTCQ-AAMCEAGCKG-LGKSME-SCQG---DTCKCKA----	21			
19.1 BmBKTx (1q2k)	-----AACY-SSDCRVKCA-MGFSSG- KCIN ---	SKCKCYK----	31		
C11-dlp	-----AC-QFWSCNSSCISR-GYRQG-YCWGIQYKYCQCQ-----	18			

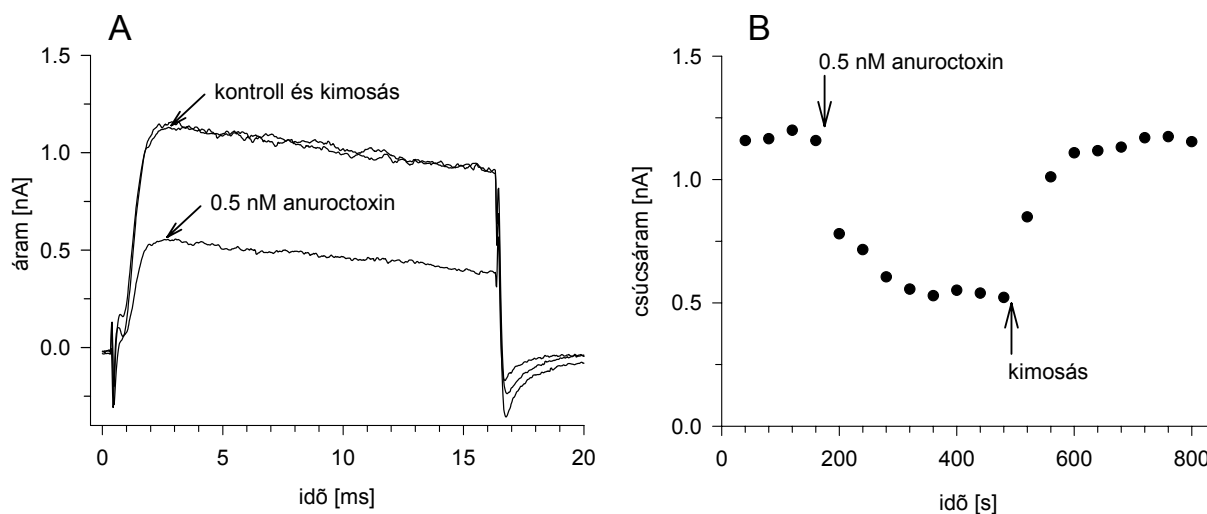
4. ábra: Az anuroctoxin és az α -KTx toxin családba tartozó toxin szekvenciák összehasonlítása. Az összehasonlítást elvégeztük az α -KTx toxincsalád mind a 19 alcsaládjának a reprezentánsaival, illetve a 6. alcsalád összes tagjával a ClustalX programot használva. I% mutatja a szekvencia azonosság mértékét az anuroctoxinnal összehasonlítva.



5. ábra: Az α -KTx toxinok filogenetikai törzsfája. Az ábrán az α -KTx család 81 szekvenciájának filogenetikai analizisének eredménye látható. Az anuroctoxin leginkább 6. alcsalád tagjaival mutatott rokonságot. A 6. alcsalád tagjainál jelöltük a toxinok relatív hatékonyságát a különböző csatornákra.

A Kv1.3 csatorna gátlása anuroctoxinnal. Humán perifériás T limfocitákon teljes sejtes üzemmódban, voltage-clamp technikával az Anyagok és módszerekben leírt kísérleti körülmények között Kv1.3 csatorna áramokat mértünk (Peter 2001). Az egyedi csatorna konduktancia értékekből meghatározott sejtentéti Kv1.3 csatornaszám 1000 és 2000 között volt. A 6A ábrán a Kv1.3 csatornán keresztül folyó makroszkópikus áramok regisztrátumai láthatók ugyanazon a sejten felvéve kontroll körülmények közt, az egyensúlyi blokk beállta után (0.5 nM anuroctoxin) valamint a toxin kimosását követően. Az anuroctoxin adása előtt és után felvett

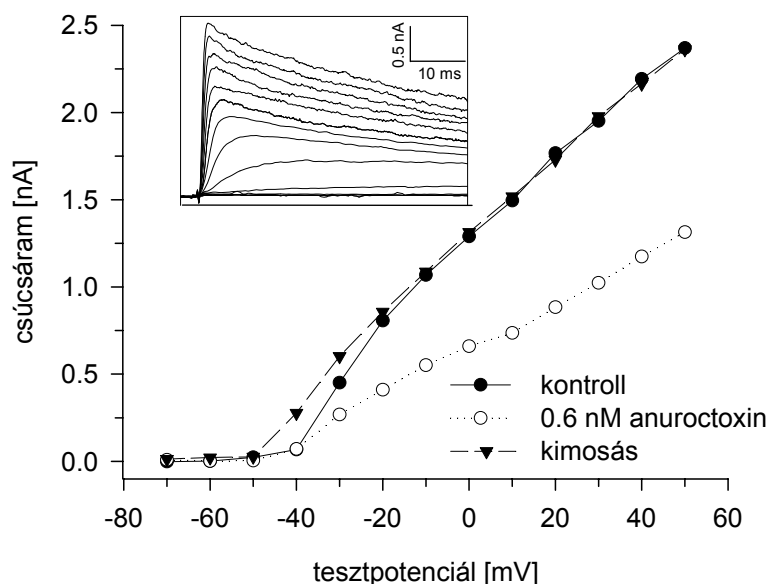
áramgörbék szinte egymáson futnak. 0.5 nM anuroctoxin a csatornáknak kb. a felét gátolta, a gátlás teljesen reverzibilis volt, amint az a 6B ábrán is jól látszik, toxin mentes külső oldattal perfundálva (kimosás) a csatornák teljesen visszatértek a gátolt állapotból. A csatorna gátlás és a kimosás kinetikája viszonylag gyors volt.



6. ábra: Az anuroctoxin a Kv1.3 csatorna hatásos gátlószere. **(A)** A reprezentatív áramgörbék a toxin adása előtti (kontroll), 0.5 nM anuroctoxinnal történő blokkolás utáni és a toxinmentes extracelluláris oldat újbóli perfúziója (kimosás) után mért K^+ áramokat mutatják az egyensúlyi állapot beállta után. Az áramokat perifériás T-limfocitán mértük -120 mV-os tartófeszültség mellett, +50 mV teszimpulzust alkalmazva. A teszimpulzusok között 40 s telt el. **(B)** ábra a K^+ blokkolásának és a blokk megszüntetésének időfüggését mutatja. A nyilak a 0.5 nM anuroctoxinnal történt perfúzió kezdetét és végét jelzik. A feszültség protokoll és az egyéb kísérleti körülmények megegyeznek az ábra **(A)** részében leírtakkal. Az ábrán jól látható, hogy az anuroctoxin teljesen kimosható.

Méréseink során meghatároztuk a megmaradó áramhányadot is (MÁH) különböző teszt-feszültségek mellett 0.6 nM anuroctoxin jelenlétében (7. ábra). $MÁH = I/I_0$, ahol I_0 jelenti a kontroll áram amplitúdóját, I pedig az áram amplitúdóját a toxin jelenlétében az egyensúlyi blokk elérése után. A tartófeszültség -120 mV volt. Azon esetekben, amikor a blokkoló nettó töltéssel bír és kötőhelye mélyen helyezkedik el a membrán elektromos erőterében a blokkolás mértéke feszültségfüggő lehet. Feszültségfüggő blokk esetén a pozitív töltésű toxin pozitívabb membránpotenciáloknál a csatornához kisebb affinitással kötődik. Az anuroctoxin nem

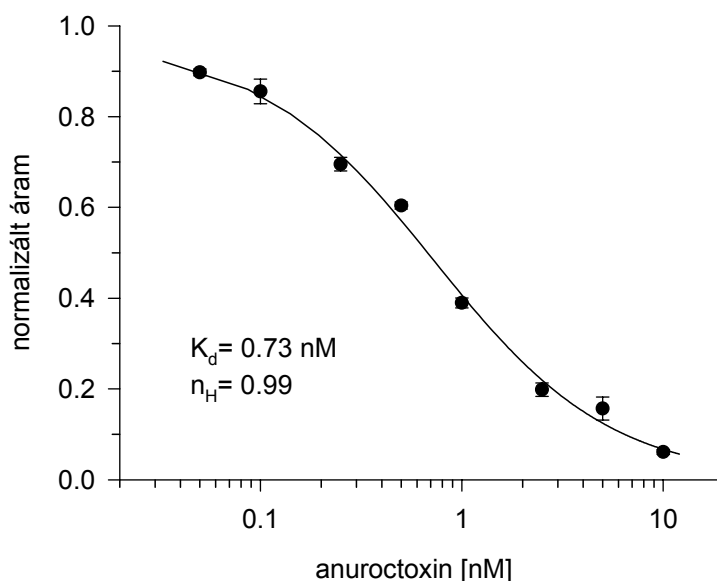
változtatta meg a Kv1.3 csatorna áram-feszültség karakterisztikáját, a csúcsáramokat minden feszültség értéknél hasonlóan csökkentette, tehát a gátlás nem feszültségfüggő. Az aktivációs küszöb -42.5 ± 4.8 mV ($n = 4$) volt kontroll körülmények között, illetve -42.5 mV $\pm$ 2.5 mV ($n = 4$).



7. ábra: Az extracellulárisan alkalmazott anuroctoxin hatása a limfociták teljes-sejt áramának feszültségfüggésére. Betétábra: a sejteket -120 mV-on tartva az ábrán jelzett feszültségekre depolarizáltuk (-70 mV - $+50$ mV tartomány) 200 ms-ig. Az egyes impulzusokat 40 s választotta el. A betétábra az áramgörbéknek 50 ms-os kezdeti szakaszát mutatja az anuroctoxin adása előtt. Az áramgörbéből kapott csúcsáramokat ábrázoltuk a tesztpotenciál függvényében. Az analízist elvégeztük kontroll körülmények között (fekete körök: kontroll oldat), 0.6 nM anuroctoxin jelenlétében (fehér körök) és a kimosás után is (háromszögek: kimosás után) ugyanazon protokoll szerint.

Sikeres Kv1.3 csatorna blokkolási kísérleteket végeztünk különböző koncentrációjú anuroctoxint tartalmazó külső oldatokkal is, 0.05-10 nM tartományban meghatároztuk a K^+ áram gátlásának az anuroctoxin koncentrációjától való függését (8. ábra). A megmaradó áramhányadokat (I/I_0) ábrázolva az anuroctoxin koncentráció függvényében megkaptuk a dózis-hatás görbét. Az $I/I_0 = K_d^n / (K_d^n + [Tx]^n)$ függvénnyel igen jó illeszkedést kaptunk. A képletben I_0 az a peptid hiányában mért csúcsáram, I a csúcsáram a megfelelő méregkoncentráció mellett, K_d

a félhatásos dózis és a [Tx] az anuroctoxin koncentrációját jelöli. A függvényből meghatározott disszociációs állandó értéke $K_d = 0.73$ nM lett. Ennek alapján megállapítottuk, hogy a toxin nagy affinitással kötődik a Kv1.3 típusú csatornához. A Hill koefficiens 1-hez közeli értékéből (0.99) arra következtettünk, hogy sok más K^+ csatorna blokkolókhöz hasonlóan egy toxin molekula kötődik a csatorna pórusába a gátlás során (Miller, 1995).

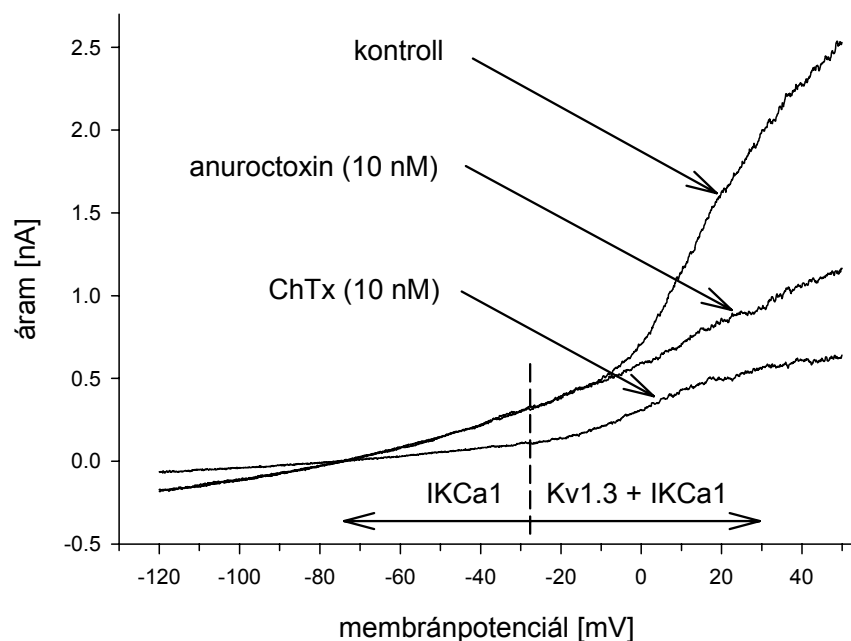


8. ábra: Az anuroctoxin által előidézett K^+ csatorna gátlás dózisfüggése. A Kv1.3 áramokat humán peifériás limfocitákon mértük, -120 mV-os tartófeszültség mellett, +50 mV tesztimpulzust alkalmazva. A megmaradó áramhányadot a toxin jelenlétében (I), valamint kontroll körülmények között mért csúcsáramok (I_o) hányadosaként számítottuk. A dózis-hatás görbéket 3 paraméteres Hill egyenlettel illesztettük, a disszociációs állandó értékére 0.73 nM-t kaptunk.

Az anuroctoxin K^+ csatorna gátlásának szelektivitása. Az anuroctoxin hatását más ioncsatornákra is megvizsgáltuk annak bizonyítására, hogy a gátlás specifikus-e a Kv1.3 csatornára. 10 nM anuroctoxin hatását teszteltük IKCa1, mKv1.1, rKv1.2, hKv1.2, rKv2.1 és Drosophila Shaker-IR csatornára.

Az anuroctoxin IKCa1 csatornára gyakorolt hatását humán perifériás T limfocitákon mértük, 1 μ M szabad Ca^{2+} -ot tartalmazó pipettatöltő oldatot használva (9. ábra). Ez a Ca^{2+} koncentráció elegendő volt a calcium függő IKCa1 kálium csatornák maximális aktivációjához.

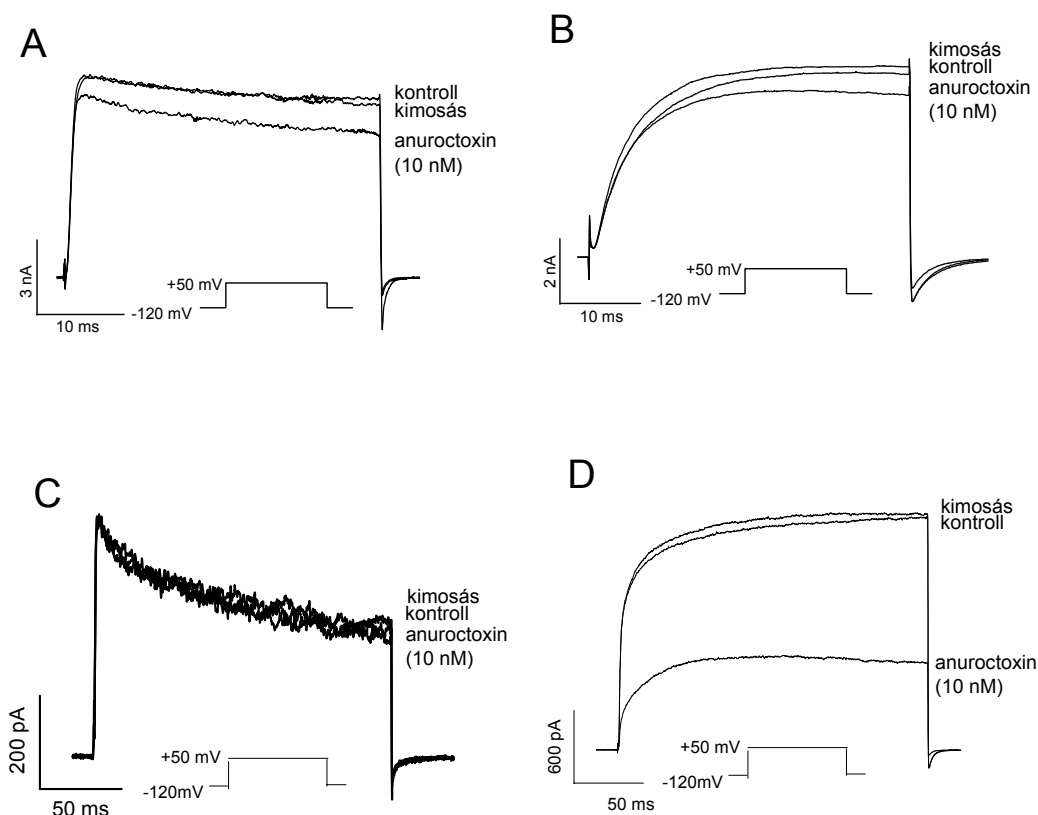
Az IKCa1 áram méréséhez feszültség-rámpa impulzusokat alkalmaztunk, a blokkolást a görbének a Kv1.3 csatorna aktivációs küszöbe alatti részének meredekségének változtatásával jellemeztük.



9. ábra: Az anuroctoxin nem gátolja a limfociták IKCa1 Ca^{2+} aktivált K^{+} csatornáját. Az IKCa1 áramokat humán perifériás limfocitákon mértük, a tartási potenciál -80 mV volt. A feszültség-rámpa impulzusok során a membránpotenciált folyamatosan változtattuk -120 mV-től $+50$ mV-ig 1.176 mV/ms sebességgel. A feltüntetett membránpotenciál tartományban mind az IKCa1, mind pedig a Kv1.3 csatornák aktiválódtak. Az IKCa1 áramot a függőleges szaggatott vonaltól balra, a Kv1.3 csatornák aktivációs küszöbe alatt mértük. A gátlás hatásosságát a görbék meredekségének változásából határoztuk meg. Pozitív kontrollként 10 nM charybdotoxint alkalmaztunk, mely gátolja mind a Kv1.3, mind pedig az IKCa1 csatornákat. Az ábrából kitűnik, hogy az anuroctoxin nem gátolja az IKCa1 csatornák áramát.

10 nM anuroctoxinnak nem volt hatása az IKCa1 csatornára, a kezelt és kontroll görbék meredekségének aránya $1.06 \pm 0.02\%$ ($n = 5$) volt. Pozitív kontrollként az IKCa1 és Kv1.3 csatornákat egyaránt blokkoló 10 nM ChTx-t használtunk, a Kv1.3 csatorna aktivációs küszöbénél negatívabb membránpotenciálokra a kezelt és kontroll görbék meredekségének aránya 0.38 ± 0.06 ($n = 5$) volt. A megfordulási potenciál (az a membránpotenciál érték, ahol nyitott csatornákon át sem nem folyik áram) a kontroll és a ChTx kezelés görbék esetében is -70 és -80 mV közötti értékeket mutatott, ami a kálium szelektív konduktanciára jellemző. A Kv1.3

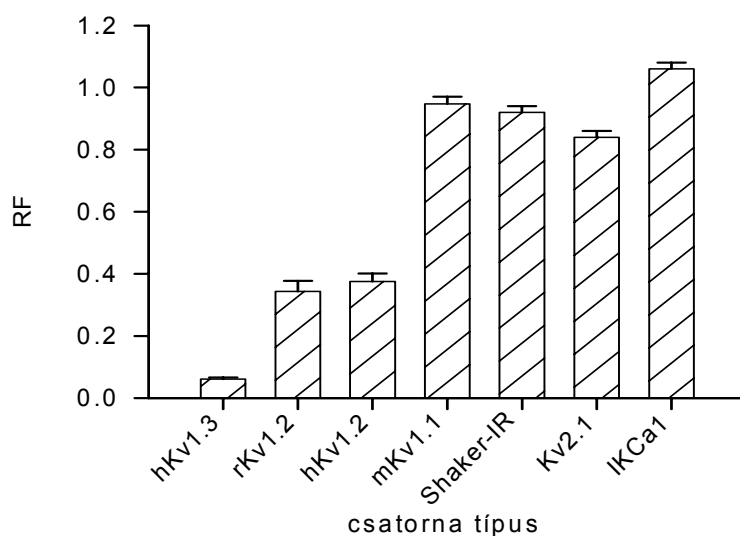
aktivációs küszöbénél magasabb membránpotenciálok esetében, amint az várható volt az anuroctoxin nagy affinitása miatt, a Kv1.3 áram majdnem teljesen gátlódott 10 nM anuroctoxin jelenlétében. 10 nM ChTx jelenlétében viszont a Kv1.3 csatornák mellett az IKCa1 csatornák is gátlódtak ($K_d \sim 3$ nM a Kv1.3, és $K_d \sim 5$ nM az IKCa1 gátlás esetében).



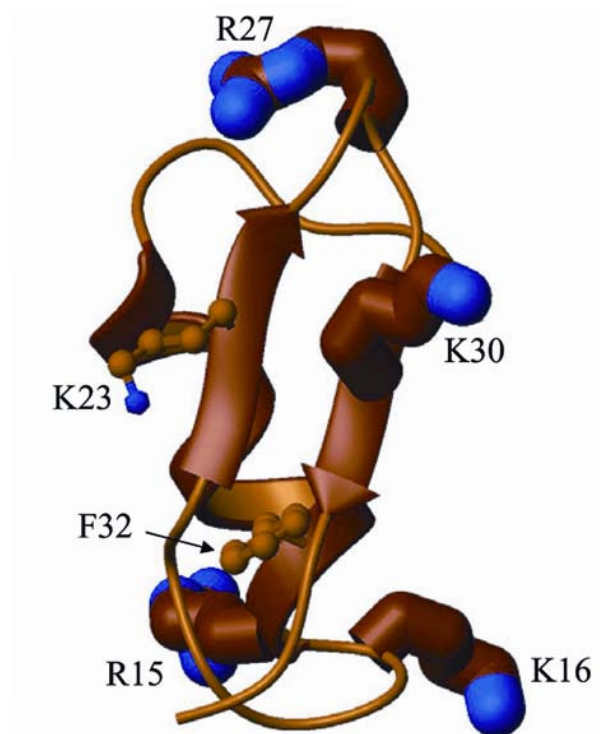
10. ábra: Az anuroctoxin hatása a Shaker IR (A), rKv2.1 (B) mKv1.1 (C) és rKv1.2 (D) csatornák áramaira. A reprezentatív áramgörbék a toxin adása előtti (kontroll), 10 nM anuroctoxinnal történő blokkolás utáni és a toxinmentes extracelluláris oldat újbóli perfúziója (kimosás) után mért K^+ áramokat mutatják az egyensúlyi állapot beállta után. A Shaker IR és rKv2.1 áramokat a csatornákat tranziensen expresszáló CTLL2 sejteken, az mKv1.1 és rKv1.2 áramokat pedig a csatornákat stabilan expresszáló L929 (mKv1.1), és B82 (rKv1.2) sejteken mértük -120 mV-os tartófeszültség mellett, +50 mV teszimpulzust alkalmazva.

10 nM anuroctoxin hatását *Drosophila* Shaker-IR, rKv2.1, mKv1.1, hKv1.2 és rKv1.2 csatornákra különböző expressziós rendszerekben vizsgáltuk (ld. Anyagok és módszerek). Az anuroctoxin blokkolása minden esetben reverzibilis volt, amint az a kontroll és a kimosási görbék

átfedéséből látható. A gátlás erősségének a sorrendje a következőképpen alakult: Kv1.3 > rKv1.2 = hKv1.2 >> Shaker-IR ~ mKv1.1 ~ rKv2.1 > IKCa1. Az anuroctoxin 10 nM koncentrációban csak a hKv1.2 és rKv1.2 csatornákat gátolta szignifikánsan (10, 11. ábra). Az anuroctoxin az rKv1.2 és a hKv1.2 csatornákat hasonló mértékben gátolta ($K_d = 6.14$ illetve 5 ± 0.28 nM), aminek a magyarázata az, hogy a humán és a patkány Kv1.2 csatorna a pórus régióban csak egy aminosavban különbözik (az E355 hKv1.2 -ben megfelel az rKv1.2 D355 aminosavjának). Az anuroctoxinnak nem volt jelentős hatása a Kv1.3 csatornával egy családba tartozó Drosophila Shaker csatornára, illetve a mKv1.1, hKv2.1, és IKCa1 csatornára sem (a megmaradó áramhányadok: 96.7 ± 2.68 , 91.6 ± 2.11 , 84 ± 1.98 , 106 ± 1.7 %).



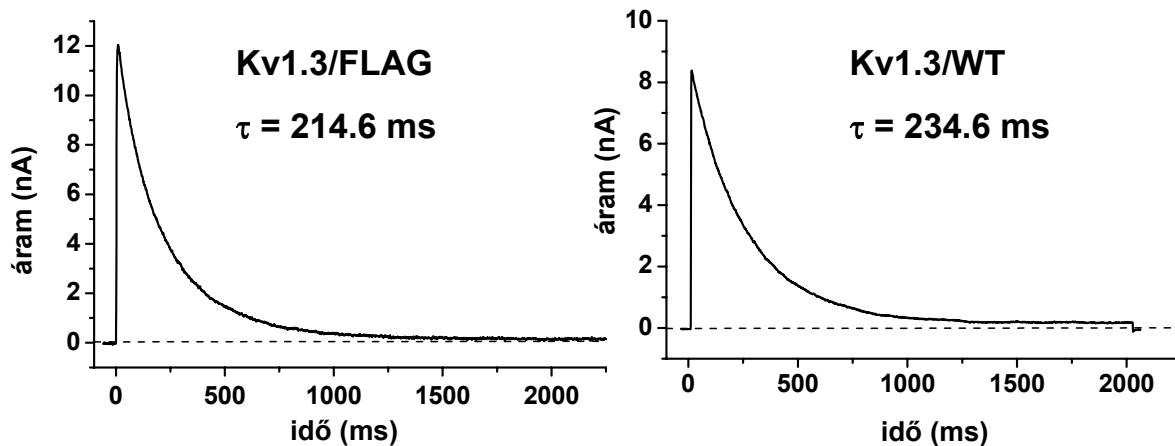
11. ábra: Az anuroctoxin szelektivitási vizsgálatának eredménye. Az ábrán 10 nM anuroctoxin jelenlétében számított megmaradó áramhányadok láthatóak a Kv1.3, IKCa1, Shaker IR, rKv2.1, mKv1.1, rKv1.2 és hKv1.2 csatornák esetében. A megmaradó áramhányadot a toxin jelenlétében (I), valamint kontroll körülmények között mért csúcsáramok (I_o) hányadosaként számítottuk. A feszültség protokoll megegyezett a 9. és 10. ábránál leírtakkal. Minden esetben legalább négy független mérést végeztünk, az eredményt átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg.



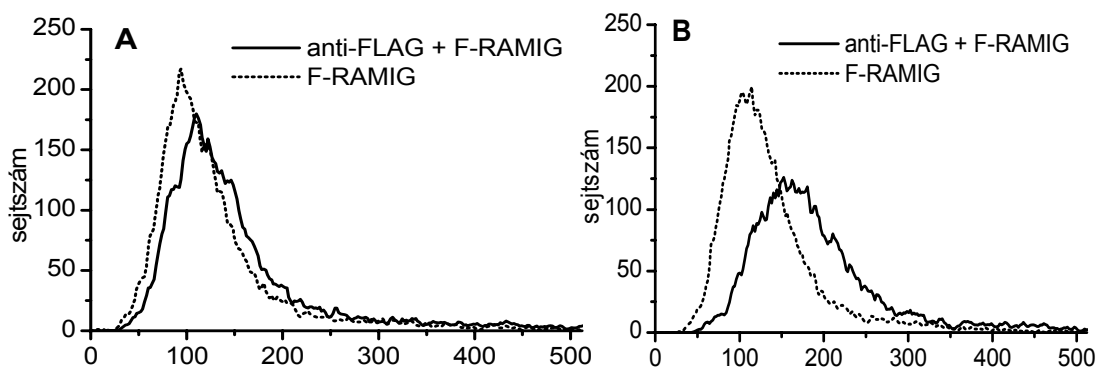
12. ábra Az anurotoxin molekula térbeli szerkezetét tükröző szalagdiagram. Az anurotoxin hasonlóan a ChTx-hez, rendelkezik a csatorna kötődésben fontos szerepet játszó két aromás aminosavval (K23, F32), mint esszenciális diáddal, ami az ábrán jól látható.

4.2 A Kv1.3/FLAG csatorna és a FLAG epitóp funkcionális expressziója

Az endogén feszültségfüggő csatornákat nem tartalmazó CTLL-2 sejtekbe transzfektált vad típusú (Kv1.3/WT) és FLAG epitópot is kódoló (Kv1.3/FLAG) csatornák áramait -120 mV tartási feszültség mellett, $+50$ mV-ra depolarizálva mértük. Azért választottuk a CTLL-2 sejteket a transzfekcióhoz, mert ezek a sejtek nem expresszálnak endogén feszültség-függő K^+ csatornákat. Az 13. ábrán látható, hogy a vad típusú és a mutáns csatorna időfüggő kapuzása nagyon hasonlít egymáshoz. Az aktiváció mindkét esetben nagyon gyors, ezt követi egy viszonylag lassú inaktiváció. Az inaktivációs időállandókat az áramgörbék lefutó részének egyszerű exponenciális illesztésével határoztuk meg. A Kv1.3/WT áram inaktivációs időállandója 234.6 ms, a Kv1.3/FLAG áramé pedig 214.6 ms volt. A mutáns és a vad csatorna inaktivációs kinetikájában nem volt jelentős különbség $p = 0.05$ szignifikancia szinten.



13. ábra: A Kv1.3/WT és Kv1.3/FLAG áramok nagyon hasonlóak. CTLL-2 sejteket transzfektáltunk Kv1.3/FLAG (bal oldali panel) illetve Kv1.3/WT (jobb oldali panel) csatornákkal, majd teljes-sejt konfigurációban regisztráltuk az ionáramokat. A tartási feszültség – 120 mV volt, a tesztpotenciál pedig +50 mV. Az inaktivációs időállandót az áramgörbe leszálló szárához illesztett exponenciális függvény alapján határoztuk meg. A bemutatott Kv1.3/WT áram inaktivációs időállandója 234.6 ms, a Kv1.3/FLAG áramé pedig 214.6 ms volt.

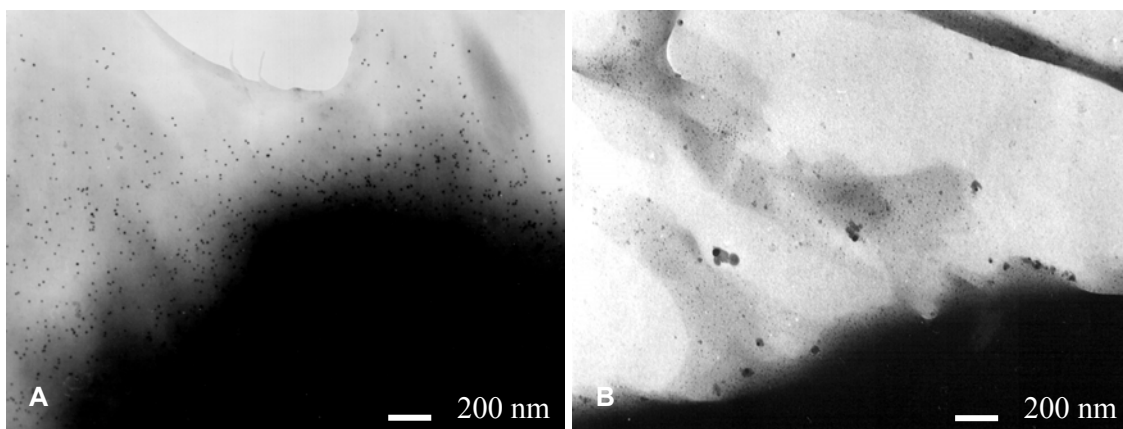


14. ábra: A Kv1.3/FLAG csatornával transzfektált Jurkat sejtek specifikusan jelölhetők. Jurkat sejteket Kv1.3/WT (A) illetve Kv1.3/FLAG (B) csatornákkal transzfektáltunk. A sejteket anti-FLAG primer és FITC-konjugált nyúl-anti-egér IgG szekunder antitesttel (F-RAMIG) (folytonos vonal) vagy csak F-RAMIG-gal (szaggatott vonal) jelöltük, és a fluoreszcenciát áramlási citométerrel detektáltuk. A hisztogramok a FLAG epitóp specifikus jelölődését mutatják.

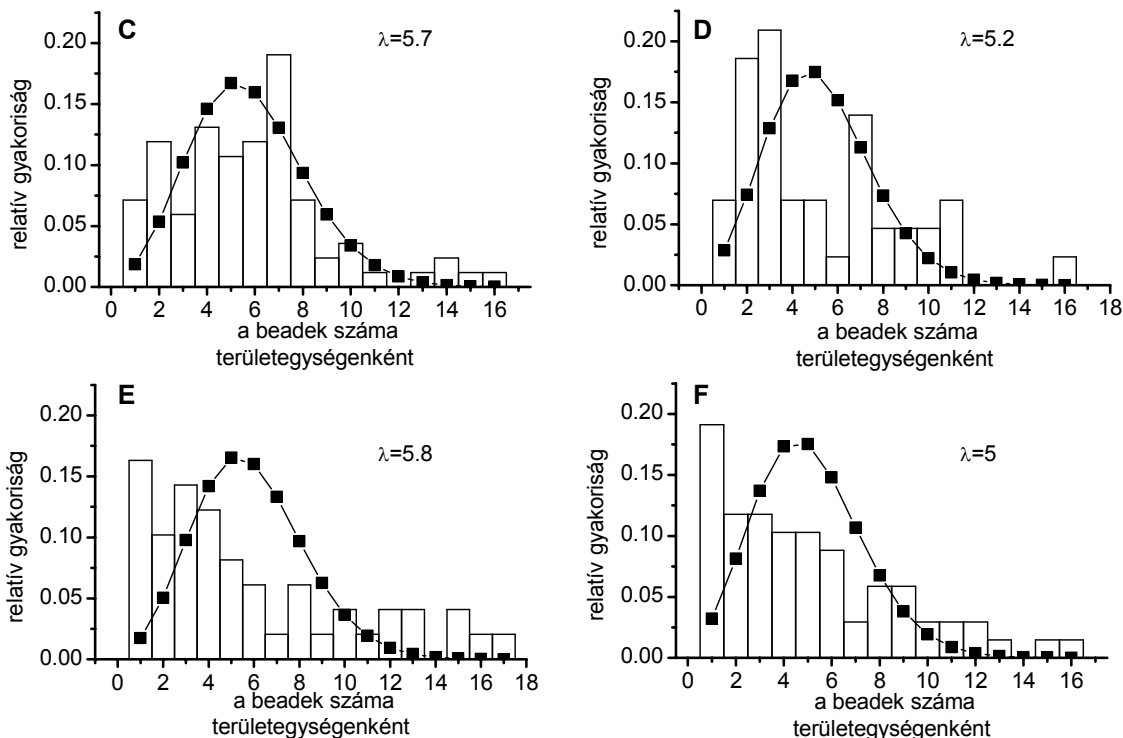
A 14. ábrán látható, hogy a Kv1.3/FLAG csatornával transzfektált, de endogén Kv1.3 csatornákat is kifejező Jurkat T sejtek specifikusan jelölhetők voltak FLAG epitóp ellenes antitestet használva. A 14A ábra átfedő fluoreszcencia hisztogramjai mutatják, hogy nem volt specifikus jelölődés, ha a Jurkat sejteket Kv1.3/WT csatornával transzfektáltuk és anti-FLAG-M2 elsődleges, valamint fluorescein-konjugált másodlagos antitesttel jelöltük. A Kv1.3/FLAG csatornával transzfektált Jurkat sejteket ugyanezekkel az antitestekkel specifikusan meg tudtuk jelölni, amint ez a duplán jelölt minta fluoreszcencia hisztogramjának a háttérhez (csak másodlagos antitesttel jelölt mintához) viszonyított jobbrtolódásából látható (14B ábra).

4.3 A Kv1.3 csatornák sejtfelszíni eloszlása nem véletlenszerű

A 15A és 15B ábra összehasonlításából kitűnik, hogy hasonlóan a fluoreszcens jelöléshez, a Kv1.3/FLAG csatornák immunogold jelölése szintén specifikus volt, ugyanis a Kv1.3/WT csatornával transzfektált Jurkat sejtek transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) felvételein (15B ábra) nem voltak láthatóak aranygömbök, míg a Kv1.3/FLAG csatornákat expresszáló sejtek felszínén nagy sűrűségben láthatók a kolloidális arany gömbök (15A ábra).



15. ábra: Kv1.3/FLAG (A) illetve Kv1.3/WT (B) csatornákkal transzfektált Jurkat sejtekről készített elektronmikroszkópos felvételek. A sejteket anti-FLAG-M2 primer és 10 nm-es aranygömbbel konjugált rat-anti egér IgG szekunder antitesttel jelöltük. Az elektronmikroszkópos képeken megfigyelhető a FLAG epitóp specifikus jelölődése.

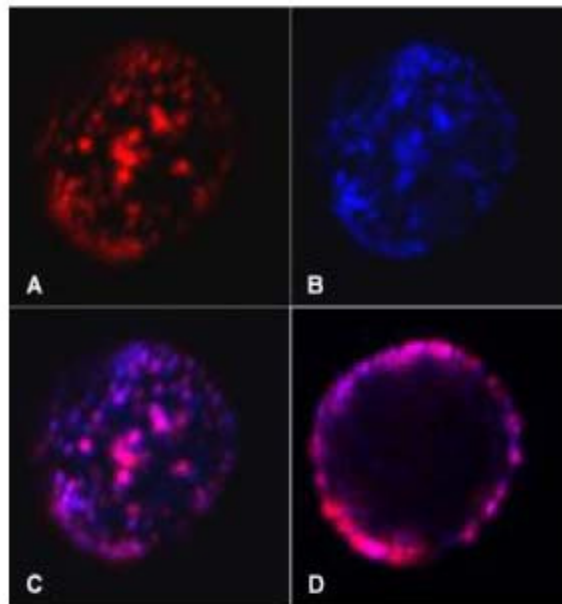


16. ábra: A Kv1.3 csatornák sejtfelszíni eloszlása nem véletlenszerű. Az elektronmikroszkópos képeket digitalizáltuk, és az intézetünk által készített szoftver segítségével meghatároztuk az aranygömbök pixel koordinátáit. A képeket területegységekre bontottuk (120x120 pixel) és meghatároztuk a területegységenkénti csatornaszámokat. Az ábrán 4 sejt relatív gyakorisági hisztogramja látható. A tapasztalati és a Poisson eloszlás között a különbség χ^2 teszttel ($p < 0.05$) statisztikailag szignifikánsnak adódott (λ az átlagos csatornaszám /területegység).

A Kv1.3 csatornák térbeli eloszlásának statisztikai analíziséhez a képeket digitalizáltuk, területegységekre bontottuk (120x120 pixel), meghatároztuk az aranygömbök számát az egységnyi membránfelületeken, majd elkészítettük a területegységenkénti csatornaszámok relatív gyakorisági hisztogramjait (16. ábra). Véletlenszerű eloszlás esetén a gyakorisági hisztogramok Poisson eloszlást követnének. A Kv1.3/FLAG csatornával tanszfektált sejtek hisztogramjai szerint a területenkénti csatornaszámok szignifikánsan eltértek a Poisson eloszlás alapján várt elméleti eloszlástól. Hasonló eredményt kaptunk, ha eltérő területegységeket választottunk (30 x 30-tól 150 x 150 pixel-ig).

4.4 A CD3 és a Kv1.3/FLAG csatorna térbeli asszociációja

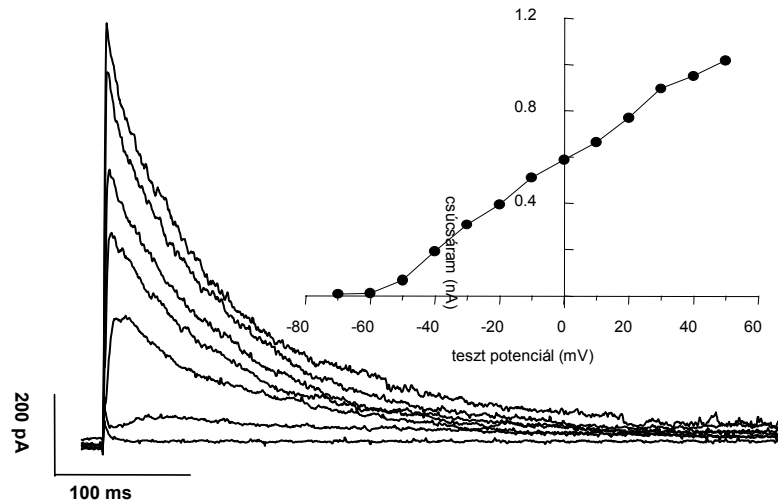
A Kv1.3/FLAG csatornával transzfektált Jurkat sejtekről készített CLSM felvételeket mutatja az 17. ábra. A csatornákat specifikusan jelöltük anti-FLAG-M2 elsődleges és Alexa Fluor 546-konjugált RAMIG másodlagos antitesttel (piros színnel jelölve). A CD3 molekulákat Alexa Fluor 633-konjugált anti-CD3 monoklonális antitesttel jelöltük és a CLSM felvételeken kék színben jelenítettük meg.



17. ábra: A CD3 és a Kv1.3FLAG csatorna asszociációja látható a konfokális mikroszkópos felvételeken. A Kv1.3FLAG-transzfektált Jurkat sejteket anti-FLAG M2 primer és Alexa Fluor 546-tal konjugált RAMIG-gal jelöltük (piros), valamint Alexa Fluor 633-mal konjugált anti-CD3-mal (kék). A HeNe lézerek 543- és 633-nm vonalaival gerjesztettük a festékeket, a fluoreszcencia jeleket pedig 560-615 nm bandpass és 650 nm- long-pass szűrőkkel detektáltuk. **(A és B)** A Kv1.3FLAG (piros) és CD3 (kék) jelek a sejt proximális optikai szeletéből származnak. **(C)** A két jel fúziós képe látható (ld. Anyagok és módszerek). Az 1. képletből számított keresztkorrelációs koefficiens $C = 0.64 \pm 0.10$ **(D)** A sejt egyenlítői síkjából származó fluoreszcens jelek.

A lila szín a CD3 és Kv1.3/FLAG csatorna asszociációját jelenti a plazmamembránban. A térbeli asszociációja kvantitatív mérésére a keresztkorrelációs koefficiens használtuk. A magas

korrelációs koefficiens érték ($C = 0.64 \pm 0.10$ (SD), $n = 6$) bizonyítja a két fehérje térbeli asszociációját néhány száz nm-es skálán belül.



18. ábra: Egy antigén aktivált CTL sejt teljes-sejt áramai. A kálium áramokat -70 -tól $+50$ mV-ig mértük, 10 mV lépésekben depolarizálva. A depolarizáló impulzusok időtartama 2 s volt, amelyből az első 500 ms látható minden görbe esetében. A sejteket -120 mV nyugalmi potenciálon tartottuk és 50 s-ot vártunk a rekordok között. Minden második rekordot jelenítettük meg a jobb áttekinthetőség érdekében. A betétábra a sejt csúcsáram-feszültség összefüggését mutatja. Mindegyik tesztpotenciál esetében meghatároztuk a csúcsáramokat és elvégeztük az ohmikus szivárgó áram korrekciókat, majd ábrázoltuk a teszt potenciál függvényében.

4.5 Az aktivált CTL sejtek nagy mennyiségű feszültségfüggő Kv1.3 csatornát fejeznek ki

Az immunológiai szinapszis funkcionális vizsgálatán kívül szükség volt annak bizonyítására is, hogy az általunk használt effektor CTL sejtekben a domináns feszültségkapuzott K^+ csatorna a Kv1.3. Ehhez elektrofiziológiai és farmakológiai kísérleteket végeztünk.

A 18 ábrán CTL sejteken teljes-sejt üzemmódban mért áramgörbék láthatóak, különböző tesztpotenciálok mellett. Az áram-feszültség görbék (18B ábra, belső ablak) mutatják, hogy a csatornák -60 mV-nál kezdenek el aktiválódni. A steady-state aktiváció feszültségfüggésének középpontja -33.8 ± 4.8 mV, meredeksége 10.7 ± 0.7 mV ($n = 5$). Ezeket az értékeket a normalizált konduktancia görbék Boltzmann függvénnyel történt illesztésével kaptuk. Az áramok

inaktivációs időállandója 180 ± 27 ms volt +50 mV tesztspotenciált alkalmazva. Ezt az értéket 10 mM tetraetil-ammonium 56 ± 4 %-kal megnövelte ($n = 4$). Ezek az adatok jó egyezést mutattak a Kv1.3 ioncsatorna korábban közölt hasonló paramétereivel (Cahalan 1985, Varga 2001).

A farmakológiai kísérletek során szintén a limfociták Kv1.3 csatornájának korábban közölt paramétereire is hasonló értékeket kaptunk. A CTL sejt kálium csatornáját az alábbi blokkolókkal karakterizáltuk: MgTX (disszociációs konstans, $K_d = 50 \pm 12$ pM, $n = 3$), ChTx (3.4 ± 0.6 nM, $n = 3$), és tetraetil-ammonium (14 ± 1 mM, $n = 4$) (Garcia-Calvo 1993, Rauer 2000).

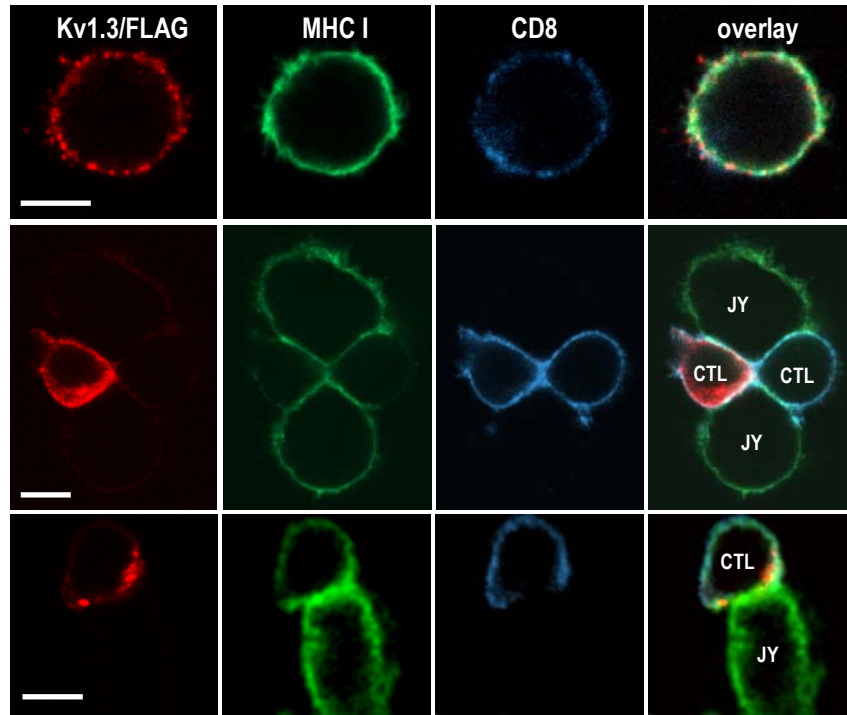
A biofizikai és farmakológiai adatok alapján megállapítottuk, hogy a CTL sejtek Kv1.3 csatornát expresszálnak. Az átlagos csúcsáram +50 mV tesztspotenciált alkalmazva antigén aktivált CTL sejtek esetében 1.9 ± 0.3 nA ($n = 13$), nem aktivált CTL sejteken pedig 0.6 ± 0.09 nA ($n = 14$), tehát a nyugvó T limfocitákhoz képest az aktivált CTL-ek jóval nagyobb számban expresszálnak Kv1.3 csatornákat.

4.6 A Kv1.3/FLAG csatornák CTL sejtekben az IS-be rendeződnek

A Kv1.3/FLAG csatornák térbeli elrendeződését CTL sejtekben és target sejttel konjugált CTL sejtekben CLSM-mel vizsgáltuk. A CTL sejtekről, valamint a CTL-JY konjugátumokról 1.1 μ m vastag optikai szeleteket készítettünk (19. ábra). A Kv1.3 csatornák foltszerű eloszlást mutattak a targettel nem konjugált CTL sejtek felszínén. A foltok eloszlása hasonló volt a Jurkat sejteken megfigyelt Kv1.3 eloszláshoz (Bock 2003, Panyi 2003), egyenletesen oszlottak el a membránban, hasonlóan az MHC-1-ben és CD8-ban gazdag doménekhez (19. ábra, felső sor). A Kv1.3/FLAG csatornát anti-FLAG-M2 elsődleges, és Alexa Fluor 546-RAMIG másodlagos antitesttel (piros), az MHC I-et fluorescein-konjugált W6/32 antitesttel (zöld), a CD8-at Alexa Fluor 647-konjugált MEM31 antitesttel jelöltük (kék).

A CTL-target sejt konjugátumok vizsgálatakor a sejtek azonosítása egyrészt méretük alapján történt (a JY jóval nagyobb, mint a CTL), másrészt a CD8 molekulák csak a CTL sejteken találhatók meg. A target sejttel konjugált CTL sejteken a Kv1.3/FLAG csatornák átrendezését figyeltük meg. Az esetek nagy részében a csatornák a CTL-target sejtek érintkező felszínére kerültek. A 19. ábra középső sorában két CTL sejt és két target sejt látható. Az egyik CTL Kv1.3/FLAG pozitív volt, a másik nem expresszálta a mutáns csatornát. Néhány esetben a

Kv1.3/FLAG övszerűen körülvette a CTL és target sejt között képződő IS-t (19. ábra, alsó sor). A target sejtek MHC I és a CTL sejtek CD8 molekulái szintén az IS-ben gyűltek össze (19. ábra, alsó sor).



19. ábra. A Kv1.3/FLAG felhalmozódása az IS körül. A Kv1.3/FLAG (vörös: anti-FLAG-ot követő ALEXA 546 RAMIG), MHC I (zöld: XF-W6/32) és CD8 (kék: ALEXA 647-anti-CD8) molekulák eloszlása CTL sejten (felső sor) és CTL-JY target sejt konjugátumon (középső és alsó sor). Az optikai szeletek vastagsága 1.1 μm volt. CTL sejteken a csatornák folszerűen oszlanak el a membránban (felső sor). CTL-target konjugátumokban a Kv1.3 csatornák az IS-ben (középső sor) vagy a szinapszis körül gyűrűszerűen halmozódnak fel a CTL sejtek többségében (alsó sor). A skála hossza 5 μm .

5. MEGBESZÉLÉS

Kísérleteink során célunk volt új, hatékony, specifikus Kv1.3 csatorna blokkoló keresése. Ennek érdekében az *Anuroctonus phaiodactylus* nevű skorpióból több lépcsőben, HPLC-vel izolált anuroctoxin ioncsatorna gátló hatását vizsgáltuk. Patch clamp kísérletekkel megállapítottuk, hogy az anuroctoxin a nyugvó és krónikusan aktivált T limfociták domináns feszültség-függő csatornáját, a Kv1.3 csatornát nagy szelektivitással gátló új toxin, amely már igen kis koncentrációban hatásosnak bizonyult (0.73 nM félhatásos koncentrációban).

A csatornablokkoló anyagok két csoportra oszthatók: pórusblokkolók és kapuzást befolyásoló anyagok. A csatornapórus blokkolók a csatorna szájadékába kötődnek be, és így akadályozzák meg a megfelelő ionok áramlását a csatornán át. A skorpió toxinok ezen utóbbi csoportba tartoznak, a gátlás sztöchiometriája 1:1. A skorpiók mérgéből származó kisméretű és meglehetősen merev struktúrájú peptid inhibitorok hatásukat úgy fejtik ki, hogy az ioncsatorna külső nyílásába kötődve elzárják az áthaladás útját a kálium ionok előtt. Az ismert struktúrájú inhibitor molekulák szerkezetéből így logikus következtetéseket lehet levonni az általuk lezárt pórus molekuláris szerkezetére. A kationok kiszorításában a csatornaszájadékból kitüntetett szerepet játszik a csatornaszájadékba mélyen behatoló, pozitív töltésű lizin. Ennek megfelelően a K^+ csatornák gátlásáért felelős struktúrális elem („esszenciális diád”) a referenciaként választott a ChTx 27-es pozíciójának megfelelő helyen lévő lizin, ill. a ChTx 36-os pozíciójának megfelelően egy aromás aminosav, amelynek aromás gyűrűje ~ 7 Å távolságra helyezkedik el a centrális lizin α szénatomjától (Tytgat 1999 Dauplais 1997).

Az anuroctoxin 3D szerkezete alapján megállapítottuk, hogy hasonlóan a ChTx-hez, rendelkezik a csatorna kötődésben fontos szerepet játszó két aromás aminosavval (K23, F32), mint esszenciális diáddal (12 ábra). Az anuroctoxin 23-as pozícióban lévő lizinje megfelel a ChTx 27-es, az anuroctoxin 32-es pozíciójában lévő fenilalanin pedig a ChTx 36-os pozíciójában található aminosavnak. Az anuroctoxin három dimenziós szerkezete hasonló a ChTx-hez, bár az F32 és a K23 α -szénatomja közötti távolság több, mint 7 Å. A szekvencia analízis szerint az anuroctoxin szerkezete nagymértékben eltér az összes α -KTx toxintól, a filogenetikai analízis során az anuroctoxin leginkább az α -KTx 6 alcsaláddal mutatott rokonságot. Az anuroctoxin 1:1 csatorna-toxin sztöchiometriával gátolja a Kv1.3 csatornák áramát, mivel három paraméteres Hill egyenlettel illesztve a Hill koefficiensre 1-hez közeli érték adódott ($n=0,99$). Az aktiváció, a

kapuzás, a feszültség-függetlenség, a Hill koefficiensből adódó sztöchiometria valamint az esszenciális diád jelenléte alapján az anuroctoxin által okozott gátlás mechanizmusa hasonló a többi skorpió toxin által okozott gátláshoz, így a toxin a Kv1.3 csatorna klasszikus pórusblokkolója.

A Kv1.3 csatorna T limfocitákban betöltött fontos szerepe miatt elvégeztük az anuroctoxin farmakológiai karakterizálását is, különös tekintettel a Kv1.3 szelektivitására a kalcium aktivált kálium csatornával (IKCa1) szemben. Ehhez 10 nM anuroctoxin hatását vizsgáltuk különböző ioncsatornákra T limfocitákon és heterológ expressziós rendszerekben, hogy megállapítsuk a gátlás specifikusságát.

A toxin limitált mennyisége miatt nem tudtunk dózis-hatás görbét meghatározni az IKCa1 csatornára, de abból, hogy az anuroctoxinnak 10 nM koncentrációban nem volt hatása az IKCa1 csatornára, a toxin hatását legalább 1000x szelektívebbnek becsüljük Kv1.3-ra, mint az IKCa1 csatornára. Az anuroctoxin 10 nM koncentrációban csak a hKv1.2 és rKv1.2 csatornákat gátolta szignifikánsan, nem volt jelentős hatása a Kv1.3 csatornával egy családba tartozó *Drosophila* Shaker csatornára, illetve a mKv1.1 és hKv2.1 csatornára sem.

Más toxinokról (pl. MgTX, NsTx, kalitoxin, ShK) is ismert, hogy szelektívebben gátolják a Kv1.3 csatornát, mint az IKCa csatornát, azonban az idegrendszerben és az izomsejtekben fontos ioncsatornákat (pl. Kv1.1, Kv1.2) ezek szintén gátolják pM illetve nM koncentrációkban (Kalman 1998, Grissmer 1994, Koch 1997). Ezzel szemben az anuroctoxin a Kv1.1 és Kv1.2 csatornákat kb. egy nagyságrenddel kisebb mértékben gátolja, mint a Kv1.3 csatornát. Bár filogenetikailag az anuroctoxin az α -KTx toxincsalád 6. alcsaládjába sorolható, farmakológiaiailag a MgTx-nal (α -KTx 2.2) és a NsTx-nal (α -KTx 2.1) mutat leginkább hasonlóságot.

Napjainkban komoly kutatás folyik terápiásan is alkalmazható hatékony, de a szervezetre káros hatással nem rendelkező csatornagátló szerek után, melyekkel immunszuppresszív hatást lehetne elérni. Az anuroctoxin azon képessége, hogy szelektíven képes lehet gátolni a nagy mennyiségű Kv1.3-at, de kevés IKCa1 csatornát expresszáló T_{EM} sejtek proliferációját anélkül, hogy a naïve and T_{CM} sejtek osztódását gátolná, alkalmassá teheti bizonyos T sejt mediált immunbetegségek (pl. sclerosis multiplex, diabetes mellitus) kezelésében és a szervátültetés utáni kilökődés megelőzésére. A toxin új alternatívát nyújthat a Kv1.3 csatorna struktúrájának, funkciójának kutatásában is.

A bevezetőben ismertetett biokémiai vizsgálatok arra utaltak, hogy a Kv1.3 csatorna is része lehet az antigén felismerésért felelős aktivációs komplexnek T sejtekben. Arra kerestük a választ, hogy modern biofizikai vizsgáló módszerek használatával ki lehet-e mutatni a Kv1.3 csatorna és a T sejtek jelátvitelében központi szerepet játszó molekulák asszociációját, ill. a Kv1.3 csatorna immunológiai szinapszisba történő lokalizációját. Kísérleteink további részében ezért a limfociták domináns feszültség-függő csatornájának, a Kv1.3 csatornának a sejtfelszíni eloszlását, a membránfehérjék és a csatornák közötti kapcsolatot vizsgáltuk.

Ahhoz, hogy a Kv1.3 csatorna sejtfelszíni eloszlását vizsgálni tudjuk, specifikusan meg kellett jelölnünk azt egy nagy affinitású monoklonális antitesttel. A Kv1.3 csatorna extracelluláris része ellen azonban ilyen antitest nem ismert, ezért PCR mutagenézissel egy FLAG epitópnak megfelelő bázisszekvenciát inzertáltunk a csatornát kódoló génbe (Kv1.3/FLAG).

A mutáns csatornát ezután tranziens transzfekcióval juttattuk a vizsgálni kívánt sejtekbe. A transzfekciót nemcsak az indokolta, hogy a mutáns csatornát be kellett juttatni a sejtbe, hanem az is, hogy fiziológias körülmények között a T sejtek endogén Kv1.3 expressziós szintje még aktivált állapotban is csak max. 1-2000/sejt, ami kevés ahhoz, hogy a fluoreszcencia jel detektálható legyen a CLSM vizsgálatokhoz. Az endogén és a transzfektált csatornák a sejtfelszíni expresszióhoz azonos útvonalat használnak, így a homo- és heterotetramer molekulák véletlenszerűen szerelődnek össze, a limfociták fúzióját követően pedig az azonos típusú fehérje klaszterek elemei dinamikusan kicserélődhetnek (Panyi 1996, Nagy 2001). Ezek alapján feltételeztük, hogy a transzfektált csatornákkal kapott topológiai információ megfelel az endogén Kv1.3 csatorna eloszlásának. A Jurkat sejtek transzfekciója FLAG epitópot tartalmazó Kv1.3 csatornával olyan mértékben megnövelte a csatornaszámot a membrán felszínén, hogy a jelöléssel elegendő nagyságú jelet tudtunk elérni a CLSM mérésekhez.

A transzfektált csatornák kinetikai és farmakológiai karakterizálásával kimutattuk, hogy a mutáns csatornák hasonlóképpen funkcionálnak, mint a vad típusúak. A Kv1.3/WT és Kv1.3/FLAG csatornák időfüggő kapuzása nagyon hasonlít egymáshoz, inaktivációs kinetikájukban nem volt szignifikáns különbség. Azt is bizonyítottuk áramlási citometriás mérésekkel, hogy a beépített FLAG epitóp antitestek számára hozzáférhető, a Kv1.3/FLAG csatornák specifikusan jelölhetők FLAG epitóp ellenes antitestet használva.

Különböző fehérjék (köztük ioncsatornák) nem véletlenszerű eloszlását írták le többféle sejt plazmamembránján (Vereb 2000, Artym 2002, Damjanovich 1995, Bock 2003). További

kísérleteinkben arra kerestünk választ, hogy a Kv1.3 csatorna esetében is kimutathó-e nem véletlenszerű eloszlás.

Kimutattuk kolloidális aranygömb jelöléssel, hogy a Kv1.3/FLAG csatorna eloszlása a Jurkat sejtek membránjában szignifikánsan eltér a véletlenszerű eloszlásnak megfelelő Poisson eloszlástól. A Singer Nicholson-féle folyadék mozaik membrán elmélet szerint az integráns membránfehérjék szabadon diffundálhatnak a membránban, eloszlásuk ennek megfelelően véletlenszerű. Ezzel szemben azt találtuk, hogy a Kv1.3 csatorna eloszlása a membránban (hasonlóan sok más, a T sejt szabályozásában résztvevő fehérjéhez) nem véletlenszerű. A nem véletlenszerű eloszlásnak két magyarázata lehetséges. Az egyik magyarázat szerint az ioncsatornák speciális mikrodoménekben, lipid raftokban helyezkednek el, a másik szerint a membránon belüli, illetve a citoszkeleton fehérjéivel közvetlen fehérje-fehérje kölcsönhatások befolyásolják a csatornák eloszlását. A TCR/CD3 komplex és a Kv1.3 csatorna T sejt aktivációban, valamint különböző fehérjék szabályozásában betöltött fontos szerepe miatt kísérleteink következő fázisában arra kerestük a választ, hogy kimutatható-e közelség a TCR/CD3 komplex és a Kv1.3 csatorna között.

A CLSM-mel kb. 200 nm-től μm -ekig terjedő skálán tudjuk a fehérje eloszlásokat megfigyelni. A CLSM képeken a két fehérje eloszlásából és a korrelációs koefficiens nagy értékéből ($C = 0.64 \pm 0.10$) nagymértékű domén szintű átfedésre lehetett következtetni. A Kv1.3 és CD3 molekulák közötti közelség növeli annak lehetőségét, hogy funkcionális kapcsolat lehet közöttük. Az aktivált TCR/CD3 komplex megváltoztathatja a közeli ioncsatorna aktivitását, vagy fordítva, az ionáramok, vagy a membránpotenciál változása hathat az immunológiai szinapszisban lejátszódó felismerési és az azt követő folyamatokra.

Kísérleteink további részében aktivált CTL sejteken vizsgáltuk a Kv1.3 csatorna jelenlétét az immunológiai szinapszisban. A csatorna lokalizációjának vizsgálata előtt biofizikai és farmakológiai kísérletekkel bizonyítottuk, hogy a CTL sejtek a Kv1.3 csatornát expresszálják. Ezek az eredmények egybevágnak a korábbi tanulmányokkal, melyek feszültségfüggő kálium konduktanciát mutattak ki humán citotoxikus CD8^+ és NK sejtekben (Chandy 1984, Schlichter 1986, Wulff 2003). Hasonlóan más munkákhoz, mi is azt találtuk, hogy a Kv1.3 expressziója a sejtek aktivációja során megnövekszik (Cahalan 2002, Wulff 2003).

A CTL-target sejt érintkezési felületen a Kv1.3 csatornák IS-ben történő felhalmozódását figyeltük meg a CLSM felvételeken. Figyelemre méltó, hogy a Kv1.3/FLAG-ot expresszáló és

nem expresszázó CTL sejtek által alkotott IS morfológiája hasonló, tehát a transzfekció nem befolyásolta a sejtek közötti kapcsolat kialakulását. A Kv1.3 csatorna kétféle lokalizációja (az immunológiai szinapszisban illetve körülötte övszerűen) a szinapszis típusával korrelálhat, vagyis a csatorna átrendeződése más fehérjékhez hasonlóan (Davis 2002, Grakoui 2002, Bromley 2002) dinamikus: az IS érésével párhuzamosan (korai vagy érett szinapszis) az IS különböző doménjeibe szegregálódik.

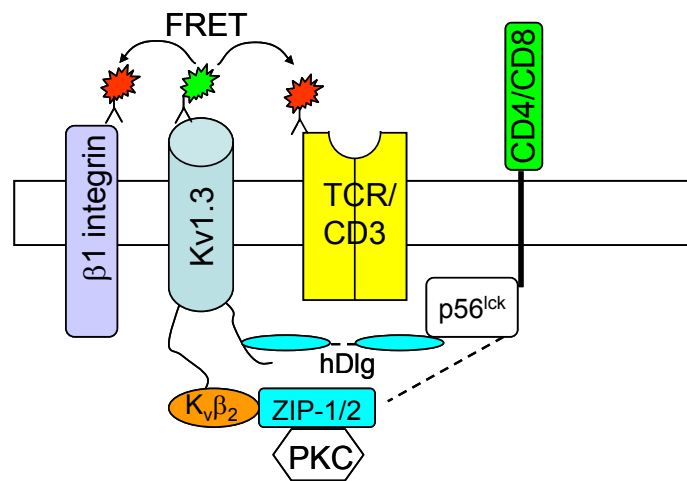
A T sejt aktiváció során a Kv1.3 csatornák IS-be jutásában a lipid raftok átrendeződése játszhat döntő szerepet. Ezek az eredmények hasonlóak a Bock és munkatársai (2003) által leírtakhoz, mely szerint a Kv1.3 csatornák Jurkat sejtekben raft asszociáltak, és a csatornák a kisméretű raftok és a nagyméretű, ceramidot tartalmazó membrándomének között átrendeződhetnek a T sejtek Fas receptor-mediált apoptózisa során. A Kv1.3 tehát a Kv1.5 és Kv2.1 csatornákhöz hasonlóan raft asszociált. Eredményeink jó összhangban vannak azzal is, hogy a membrán koleszterol kivonásával megváltoznak a Kv1.3 biofizikai tulajdonságai (Hajdú 2003).

Mi lehet a Kv1.3 csatornák IS-be történő felhalmozódásának a jelentősége? A korábban rendelkezésre álló és a saját megfigyeléseink alapján a Kv1.3 csatornák és a T sejtek jelátvitelében fontos molekulák egymáshoz viszonyított térbeli elrendeződésére a 20. ábrán bemutatott modellt hoztuk létre. A Kv1.3 és a TCR/CD3 komplex egymás molekuláris közelségében helyezkedik el, melyet FRET mérésekkel (melyet e disszertációban nem részleteztem) és CLSM vizsgálatokkal igazoltunk. A Kv1.3 csatornák és a kinázok, β_1 -integrin, hDlg, a különböző adapter fehérjék kapcsolatáról korábbi információk álltak rendelkezésünkre (ld. bevezető rész).

Modellünk alapján az intermolekuláris kölcsönhatások feltételezett élettani következményeit az alábbiakban foglalhatjuk össze. Nem valószínű, hogy a Kv1.3 csatorna IS-be jutása önmagában lokálisan jelentősen megváltoztatná a membránpotenciált a nyugvó sejthez képest, az IS-ben koncentrációban magas protein kinázok viszont hatékonyabban tudják foszforilálni a csatornákat. A fehérjék csoportosulása és térbeli orientációja biztosítja azt, hogy a TCR/CD3 komplex jelátvitelére és ezen keresztül az IS funkciója hatékony legyen a protein kinázok molekuláris közelségbe kerülése révén (Davis, 2002). Bizonyított, hogy a TCR/CD3 szignalizációban szerepet játszó protein kinázok (mint pl. LCK, PKC) a Kv1.3 csatornát is

szabályozzák, hatással vannak annak biofizikai és fiziológiai tulajdonságaira. (Szabo 1996, Chung 1997, Hanada 1997).

A membránbeli asszociáció által biztosított térbeli feltételeken felül a Kv1.3 és a p56^{lck} közötti adapter fehérjék is hozzájárulhatnak a Kv1.3 tirozin foszforiláció révén történő szabályzásához, és ezen keresztül a membránpotenciál és a Ca²⁺ jelátvitel modulálásához. A Kv1.3 és az integrinek között nem egyszerűen fizikai, de funkcionális kapcsolat is van, a K⁺ csatornák által biztosított K⁺ efflux az integrin funkció pozitív modulátora (Levite 2000), ezáltal az IS-ben lokalizált Kv1.3 csatornák hozzájárulhatnak az IS stabilitásához is. A Kv1.3 csatorna legfontosabb fiziológiai funkciója a T sejtek membránpotenciáljának szabályozása (Cahalan 2002), a membránpotenciál megváltozása pedig kihathat az antigénfelismerésben résztvevő fehérjék konformációjára is (Vereb 2003), ezáltal pedig a CTL mediált citotoxicitást is szabályozza (Gray 1987).



20. ábra: A Kv1.3 csatornák térbeli eloszlásának modellje. Az ábrán felktüntetett molekulák rövidítései: TCR/CD3: T sejt receptor/CD3 komplex; CD4/CD8: koreceptorok, hDlg: a *Drosophila* disc-large tumor suppresszor fehérje „humán homológja; PKC: protein kináz C; ZIP1/ZIP2: PKC-kölcsönhatást mediáló fehérje; K β_2 : Kv1.3 járulékos alegység. FRET: fluoreszcencia rezonancia energia transzfer. A FRET mérésekkel azonos eredményt adtak konfokális pásztázó lézer mikroszkópos vizsgálatok. Részleteket ld. a szövegben.

A modell összegzéseként tehát valószínű, hogy a TCR/CD3 aktivációja az IS-ben együtt jár egy közeli ioncsatorna módosításával, ezáltal az IS funkciója is megváltozik, ami az IS funkciójának és a csatornák aktivitásának kölcsönös szabályozási lehetőségét jelenti, a következmény pedig a target sejt specifikus ölése.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Vizsgáltuk egy új Kv1.3 csatornablokkolószert, az anuroctoxin hatékonyságát és specifikusságát. Megállapítottuk, hogy az anuroctoxin a Kv1.3 csatornát szelektíven gátló új toxin, amely már igen kis koncentrációban hatásosnak bizonyult ($K_d = 0.73$ nM), ezzel szemben nem hat az IKCa1 csatornákra. Az anuroctoxin gátlás mechanizmusa hasonló a többi skorpió toxin által okozott gátláshoz, más skorpió toxinhoz hasonlóan klasszikus pórusblokkolója a Kv1.3 csatornának. Az anuroctoxin ezen kívül az általunk vizsgált feszültségfüggő Kv1.x illetve Kv2.1 csatornákra sem hatott jelentősen, ezért a klinikumban is beválhat, mint a limfocita aktivációt és proliferációt gátló hatékony immunszuppresszív szer.

Általánosan elfogadott, hogy a membránpotenciál és a kálium ioncsatornák működése fontos a limfocita proliferáció mitogén indukciójához (Cahalan 1997), a sejt térfogat szabályozásához (Deutsch 1993), és a sejt mediált citotoxicitáshoz (Schlichter 1986, Felzen 1996). Kísérleteinkben a Kv1.3 csatorna és a T sejtek jelátvitelében fontos molekulák térbeli elrendeződését és asszociációját vizsgáltuk T limfocitákon abból a célból, hogy a molekuláris kölcsönhatásokból következtethessünk a csatorna T sejt aktivációban betöltött szerepére.

A Kv1.3 csatorna specifikus jelöléséhez PCR mutagenézissel egy FLAG epitópnak megfelelő bázisszekvenciát inzertáltunk a csatornát kódoló génbe (Kv1.3/FLAG). A mutáns csatorna hasonló biofizikai tulajdonságokat mutatott, mint a Kv1.3, és specifikusan jelölhető volt.

A FLAG epitópot hordozó csatornák felhasználásával kimutattuk Jurkat sejteken, hogy a Kv1.3 csatorna eloszlása nem véletlenszerű, valamint hogy a csatorna és a CD3 molekula között membrán domén szinten kolokalizáció van. Sikerült kimutatnunk a CTL sejteken, hogy a Kv1.3 csatorna felhalmozódik az immunológiai szinapszisban. Megállapítottuk, hogy az immunológiai szinapszis képződésekor a T sejt membránban a csatorna dinamikus átrendeződése figyelhető meg, és a csatorna bejut a szinapszisba, ami magába foglalja a csatornák és a jelátviteli molekulák közötti kölcsönös szabályozási lehetőséget.

7. AZ ÉRTEKEZÉSBEN FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK

Aiyar J, Rizzi JP, Gutman GA, Chandy KG: The signature sequence of voltage-gated potassium channels projects into the external vestibule. *J.Biol.Chem.* 271:31013-31016, 1996

Artym VV, Petty HR: Molecular proximity of Kv1.3 voltage-gated potassium channels and beta(1)-integrins on the plasma membrane of melanoma cells: effects of cell adherence and channel blockers. *J. Gen. Physiol.* 120:29–37, 2002

Bacsó Z, Bene L, Bodnár A, Matkó J, Damjanovich S: A photobleaching energy transfer analysis of CD8/MHC-I and LFA-1/ICAM-1 interactions in CTL-target cell conjugates. *Immunol. Lett.* 54:151–156, 1996

Barnstable CJ, Bodmer WF, Brown G, Galfre G, Milstein C, Williams AF, Ziegler A: Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens—new tools for genetic analysis. *Cell* 14, 9–20, 1978

Bednarek MA, Bugianesi RM, Leonard RJ, Felix JP: Chemical synthesis and structure-function studies of margatoxin, a potent inhibitor of voltage-dependent potassium channel in human T lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198:619-25, 1994

Bock J, Szabo I, Gamper N, Adams C, Gulbins E: Ceramide inhibits the potassium channel Kv1.3 by the formation of membrane platforms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305:890–7, 2003

Bromley SK, Burack WR, Johnson KG, Somersalo K, Sims TN, Sumen C, Davis, MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML: The immunological synapse. *Annu. Rev. Immunol.* 19:375–396, 2001

Cahalan MD, Chandy KG, DeCoursey TE, Gupta S: A voltage-gated potassium channel in human T lymphocytes. *J. Physiol (Lond)* 358:197–237, 1985

Cahalan MD, Chandy KG: Ion channels in the immune system as targets for immunosuppression. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:749–756, 1997

Cahalan MD, Wulff H, Chandy KG: Molecular properties and physiological roles of ion channels in the immune system. *J. Clin. Immunol.* 21:25–52, 2001

Cahalan MD, Wulff H, Chandy G: Molecular properties and physiological roles of ion channels in the immune system. *J. Clin. Immunol.* 21:235–252, 2002

Chandy KG, DeCoursey TE, Cahalan MD, McLaughlin C, Gupta S: Voltage-gated potassium channels are required for human T lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* 160:369 –385, 1984

Chandy KG, Gutman GA: in *Handbook of Receptors and Channels: Ligand and voltage-gated ion Channels*. CRC Press, Boca Ranton, FL, 1995

Chandy KG, Wulff H, Beeton C, Pennington M, Gutman GA, Cahalan MD: K⁺ channels as targets for specific immunomodulation. *Trends Pharmacol. Sci.* 25:280-289, 2004

Chung I, Schlichter LC: Native Kv1.3 channels are upregulated by protein kinase C. *J. Membr. Biol.* 156:73-85, 1997

Crabtree GR: Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca²⁺, calcineurin, and NF-AT. *Cell* 96:611-614, 1999

Damjanovich S, Vereb G, Schaper A, Jenei A, Matkó J, Starink JP, Fox GQ, Arndt-Jovin DJ, Jovin TM: Structural hierarchy in the clustering of HLA class I molecules in the plasma membrane of human lymphoblastoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1122-1126, 1995

Damjanovich S, Gáspár R Jr, Pieri C: Dynamic receptor superstructures at the plasma membrane. *Q. Rev. Biophys.* 30:67-106, 1997

Dauplais M, Gilquin B, Possani LD, Gurrola-Briones G, Roumestand C, Menez A: Determination of the three-dimensional solution structure of noxiustoxin: analysis of structural differences with related short-chain scorpion toxins. *Biochemistry*, 34: 16563-16573, 1995

Davis DM: Assembly of the immunological synapse for T cells and NK cells. *Trends Immunol.* 23:356-363, 2002

DeCoursey TE, Chandy KG, Gupta S, Cahalan MD: Voltage-gated K⁺ channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? *Nature* 307:465-468, 1984

Defarias FP, Stevens SP, Leonard RJ: Stable expression of human Kv1.3 potassium channels resets the resting membrane potential of cultured mammalian cells. *Receptors Channels* 3:273-81, 1995

Deutsch C, Krause D, Lee SC: Voltage-gated potassium conductance in human T lymphocytes stimulated with phorbol ester. *Journal of Physiology* 372:405-423, 1986

Deutsch and Chen: Heterologous expression of specific K⁺ channels in T lymphocytes: functional consequences for volume regulation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90:10036-10040, 1993

Doyle DA, Lee A, Lewis J, Kim E, Sheng M, and MacKinnon R: Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* 85:1067-1076, 1996

Doyle DA, Morais CJ, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R: The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280:69-77, 1998

Drakopoulou E, Cotton J, Virelizier H, Bernardi E, Schoofs AR, Partiseti M, Choquet D, Gurrola G, Possani LD, Vita C: Chemical synthesis, structural and functional characterisation of noxiustoxin, a powerful blocker of lymphocyte voltage-dependent K⁺ channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213:901-7, 1995

Ehring GR, Kerschbaum HH, Eder C, Neben AL, Fanger CM, Khoury RM, Negulescu PA, Cahalan MD: A nongenomic mechanism for progesterone-mediated immunosuppression: inhibition of K⁺ channels, Ca²⁺ signaling, and gene expression in T lymphocytes. *Exp. Med.* 188:1593-602, 1998

Fanger CM, Neben AL, Cahalan MD: Differential Ca²⁺ influx, K-Ca channel activity, and Ca²⁺ clearance distinguish Th1 and Th2 lymphocytes. *Journal of Immunology* 164:1153-1160, 2000

Felzen B, Lavy R, Garcia M, Berke G, Gardner P, Binah O: Interaction of cytotoxic T lymphocytes and guinea pig ventricular myocytes. Pharmacological modulation by blocking K⁺ currents in cytotoxic T lymphocytes. *Circ. Res.* 78:253–261, 1996

Fritschy JM, Weinmann O, Wenzel A, Benke DJ: Synapse-specific localization of NMDA and GABA(A) receptor subunits revealed by antigen-retrieval immunohistochemistry. *Comp. Neurol.* 390:194–210, 1998

Garcia-Calvo M, Leonard RJ, Novick J, Stevens SP, Schmalhofer W, Kaczorowski GJ, Garcia ML: Purification, characterization, and biosynthesis of margatoxin, a component of *Centruroides margaritatus* venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels. *J. Biol. Chem.* 268:18866–18874, 1993

Ghanshani S, Wulff H, Miller MJ, Rohm H, Neben A, Gutman GA, Cahalan MD: Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation: Molecular mechanism and functional consequences. *J. Biol. Chem.* 275:37137– 437139, 2000

Glauner KS, Mannuzzu LM, Gandhi CS, Isacoff EY: Spectroscopic mapping of voltage sensor movement in the Shaker potassium channel. *Nature* 402:813– 817, 1999

Gong J, Xu J, Bezanilla M, van Huizen R, Derin R, Li M: Differential stimulation of PKC phosphorylation of potassium channels by ZIP1 and ZIP2. *Science* 285:1565–1569, 1999

Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML: The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285:221–227, 1999

Gray LS, Gnarr JR, Russell JH, Engelhard VH: The role of K⁺ in the regulation of the increase in intracellular Ca²⁺ mediated by the T lymphocyte antigen receptor. *Cell* 50:119–127, 1987

Grissmer S, Nguyen AN, Cahalan MD: Calcium-activated potassium channels in resting and activated human T lymphocytes. expression levels, calcium dependence, ion selectivity, and pharmacology. *J Gen Physiol* 102:601-630, 1993

Grissmer S, Nguyen AN, Aiyar J, Hanson DC, Mather RJ, Gutman GA, Karmilowicz MJ, Auperin DD, Chandy KG: Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K⁺ channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol Pharmacol* 45:1227-1234, 1994

Gross A, Miller C: Agitoxin footprinting the Shaker potassium channel pore. *Neuron*, 16:399-406, 1996

Hajdú P, Varga Z, Pieri C, Panyi G, Gáspár R Jr: Cholesterol modifies the gating of Kv1.3 in human T lymphocytes. *Pflügers Arch.* 445: 674–682, 2003

Hanada T, Lin L, Chandy KG, Oh SS, Chishti AH: Human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor binds to p56lck tyrosine kinase and Shaker type Kv1.3 potassium channel in T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 272:26899-904, 1997

Hanner M, Schmalhofer WA, Green B, Bordallo C, Liu J, Slaughter RS, Kaczorowski GJ, Garcia ML: Binding of correolide to Kv1 family potassium channels. *J. Biol. Chem.* 274:25237–25244, 1999

Hille B: Ion channels of excitable membranes. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, 1992

Holdorf AD, Lee KH, Burack WR, Allen PM, Shaw AS: Regulation of Lck activity by CD4 and CD28 in the immunological synapse. *Nat. Immunol.* 3:259–264, 2002

Jenei A, Varga S, Bene L, Mátyus L, Bodnár A, Bacso Z, Pieri C, Gáspár RJ, Farkas T, Damjanovich S: HLA class I and II antigens are partially co-clustered in the plasma membrane of human lymphoblastoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:7269–7274, 1997

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ: Immunobiology, 5 edn, pp. 187-220. Garland Publishing, New York, 2001

Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R: X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 423:33–41, 2003

Kagi D, Vignaux F, Ledermann B, Burki K, Depraetere V, Nagata S, Hengartner H, Golstein P: Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 265:528–530, 1994

Kalman K, Pennington MW, Lanigan MD, Nguyen A, Rauer H, Mahnir V, Paschetto K, Kem WR, Grissmer S, Gutman GA, Christian EP, Cahalan MD, Norton RS, Chandy KG: ShK-Dap22, a potent Kv1.3-specific immunosuppressive polypeptide. *J. Biol. Chem.* 273:32697–32707, 1998

Kerschbaum HH, Cahalan MD: Monovalent permeability, rectification, and ionic block of store-operated calcium channels in Jurkat T lymphocytes. *J. Gen. Physiol.* 111:521–537, 1998

Khanna R, Chang MC, Joiner WJ, Kaczmarek LK, Schlichter LC: hSK4/hIK1, a calmodulin-binding Kca channel in human T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 274:14838 –14849, 1999

Koch RO, Wanner SG, Koschak A, Hanner M, Schwarzer C, Kaczorowski GJ, Slaughter RS, Garcia ML, Knaus HG: Complex subunit assembly of neuronal voltage-gated K⁺ channels. basis for high-affinity toxin interactions and pharmacology. *J Biol. Chem.* 272:27577-27581, 1997

Koo GC, Blake JT, Talento A, Nguyen M, Lin S, Sirotina A, Shah K, Mulvany K, Hora JD, Cunningham P, Wunderler D, Mcmanus OB, Slaughter R, Bugianesi R, Felix J, Garcia M, Williamson J, Kaczorowski G, Sigal NH, Springer MS, Feeney W: Blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 inhibits immune responses in vivo. *J. Immunol.* 158:5120–5128, 1997

Koschak A, Bugianesi RM, Mitterdorfer J, Kaczorowski GJ, Garcia ML, Knaus HG: Subunit composition of brain voltage-gated potassium channels determined by hongotoxin-1, a novel peptide derived from *Centruroides limbatus* venom. *J. Biol. Chem.* 273:2639-44, 1998

Ledesma MD, Simons K, Dotti CG: Neuronal polarity: essential role of protein-lipid complexes in axonal sorting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:3966–3971, 1998

Leonard RJ, Garcia ML, Slaughter RS, Reuben JP: Selective blockers of voltage-gated K⁺ channels depolarize human T lymphocytes: mechanism of the antiproliferative effect of charybdotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10094-10098, 1992

Levite M, Cahalon L, Peretz A, HersHKoviz R, Sobko A, Ariel A, Desai R, Attali B, Lider O: Extracellular K⁺ and opening of voltage-gated potassium channels activate T cell integrin function: physical and functional association between Kv1.3 channels and beta1 integrins. *Journal of Experimental Medicine* 191:1167-1176, 2000

Lewis RS, Cahalan MD: Potassium and calcium channels in lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 13:623–654, 1995

Lewis RS: Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu.Rev.Immunol.* 19:497-521. 2001

Lieberman J: The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat. Rev. Immunol.* 3:361–370, 2003

Liu Y, Jurman ME, Yellen G: Dynamic rearrangement of the outer mouth of a K⁺ channel during gating. *Neuron* 16:859-867, 1996

López-Barneo J, Hoshi T, Heinemann SH, Aldrich RW: Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of Shaker potassium channels. *Receptors and Channels*, 1, 61-71, 1993

Martens JR, Navarro-Polanco R, Coppock EA, Nishiyama A, Parshley L, Grobaski TD, Tamkun MM. Differential targeting of Shaker-like potassium channels to lipid rafts. *J. Biol. Chem.* 275:7443-6, 2000

Martens JR, Sakamoto N, Sullivan SA, Grobaski TD, Tamkun MM: Isoform-specific localization of voltage-gated K⁺ channels to distinct lipid raft populations 276:409–8414, 2001

Matkó J, Szöllösi J, Trón L, Damjanovich S: Luminescence spectroscopic approaches in studying cell surface dynamics. *Q. Rev. Biophys.* 21:479–544, 1988

Matkó J: K⁺ channels and T-cell synapses: the molecular background for efficient immunomodulation is shaping up. *Trends Pharmacol Science* 24:385–9, 2003

Marom S, Levitan IB: State-dependent inactivation of the Kv3 potassium channel. *Biophysical Journal* 67:579-589, 1994

Matteson DR, Deutsch C: K channels in T lymphocytes: a patch clamp study using monoclonal antibody adhesion. *Nature* 307:468-471, 1984

McCardy CW, Ely CM, Westin E, Carchman RA: 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, 1988

Miller C: The charybdotoxin family of K⁺-channel-blocking peptides. *Neuron* 15:5-10, 1995

Monks CR, Freiberg, BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A: Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395:82–86, 1998

Mourre C, Chernova MN, Martin-Eauclaire MF, Bessone R, Jacquet G, Gola M, Alper SL, Crest M: Distribution in rat brain of binding sites of kaliotoxin, a blocker of Kv1.1 and Kv1.3 alpha-subunits. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 291:943-52, 1999

Nagy P, Mátyus L, Jenei A, Panyi G, Varga S, Matkó J, Szöllösi J, Gáspár R Jr, Jovin TM, Damjanovich S: Cell fusion experiments reveal distinctly different association characteristics of cell-surface receptors. *J. Cell Sci.* 114:4063–4071, 2001

Northrop JP, Ullman KS, Crabtree GR: 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, 1993

Nusser Z, Lujan R, Laube G, Roberts JD, Molnar E, Somogyi P: Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. *Neuron* 21:545–559, 1998

Panyi G, Sheng ZF, Deutsch C: C-type inactivation of voltage-gated K⁺ channel occurs by a cooperative mechanism. *Biophys. J.* 69:896–904, 1995

Panyi G, Deutsch C: Assembly and suppression of endogenous Kv1.3 channels in human T cells: *J. Gen. Phys.* 107:409–20, 1996

Panyi G, Bagdány M, Bodnár A, Vámosi G, Szentesi G, Jenei A, Mátyus L, Varga S, Waldmann TA, Gáspár R, Damjanovich S: Colocalization and nonrandom distribution of Kv1.3 potassium channels and CD3 molecules in the plasma membrane of human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:2592–2597, 2003

Panyi G, Varga Z, Gaspar R: Ion channels and lymphocyte activation. *Immunology Letters* 92:55–66, 2004a

Panyi G, Vamosi G, Bodnar A, Gaspar RJ, Damjanovich S: Looking through ion channels: recharged concepts in T cell signaling. *Trends Immunol.* 11:565-9, 2004b

Panyi G, Varga Z, Gaspar R: Ion channels and lymphocyte activation. *Immunol. Lett.* 92:55-66, 2004c

Papazian DM, Shao XM, Seoh SA, Mock AF, Huang Y, Wainstock DH: Electrostatic interactions of S4 voltage sensor in Shaker K1 channel. *Neuron* 14:1293–1301, 1995

Park CS, Miller C: Mapping function to the structure in a channel-blocking peptide: electrostatic mutants of charybdotoxin. *Biochemistry* 31:7749-7755, 1992

Péter M Jr, Varga Z, Panyi G, Bene L, Damjanovich S, Pieri C, Possani LD, Gáspár R Jr: Pandinus imperator scorpion venom blocks voltage-gated K⁺ channels in human lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242:621-5, 1998

Péter M Jr, Varga Z, Hajdú P, Gáspár R Jr, Damjanovich S, Horjales E, Possani LD, Panyi G: Effects of toxins Pi2 and Pi3 on human T lymphocyte Kv1.3 channels: the role of Glu7 and Lys24. *J. Membrane Biol.* 179:13–25, 2001

Prakriya M, Lewis RS: CRAC channels: activation, permeation, and the search for a molecular identity. *Cell Calcium* 33: 311-321, 2003

Price M, Lee SC, Deutsch C: Charybdotoxin inhibits proliferation and interleukin 2 production in human peripheral blood lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:10171–10175, 1989

Rao A, Luo C, Hogan PG: Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu.Rev.Immunol* 15:707-47, 1997

Rauer H, Lanigan MD, Pennington MW, Aiyar J, Ghanshani S, Cahalan MD, Norton RS, Chandy KG: Structure-guided transformation of charybdotoxin yields an analog that selectively targets Ca(2⁺)-activated over voltage-gated K(+) channels. *J. Biol. Chem.* 275:1201-8, 2000

Sands SB, Lewis RS, Cahalan MD: Charybdotoxin blocks voltage-gated K⁺ channels in human and murine T lymphocytes. *J. Gen. Physiol.* 93:1061–1074, 1989

Schlichter L, Sidell N Hagiwara S: Potassium channels mediate killing by human natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 451–455, 1986

Seoh SA, Sigg D, Papazian DM, Bezanilla F: Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K1 channel. *Neuron* 16:1159–1167, 1996

Sharma B: Inhibition of the generation of cytotoxic lymphocytes by potassium ion channel blockers. *Immunology* 65:101–105, 1988

Shaw JP, Utz PJ, Durand DB, Toole JJ, Emmel EA, Crabtree GR: Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* 241:202-205, 1988

Stinchcombe JC, Bossi G, Booth S, Griffiths GM: The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* 15:751–761, 2001

Stocker M, Miller C: Electrostatic distance geometry in a K⁺ channel vestibule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9509-9513, 1994

Szabo I, Gulbins E, Apfel H, Zhang X, Barth P, Busch AE, et al: Tyrosine phosphorylation-dependent suppression of a voltage-gated K⁺ channel in T lymphocytes upon Fas stimulation. *J. Biol. Chem.* 271:20465–9, 1996

Terhorst C, Parham P, Mann DL Strominger JL: Structure of HLA antigens: amino-acid and carbohydrate compositions and NH₂-terminal sequences of four antigen preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:910–914, 1976

Tytgat J, Chandy KG, Garcia ML, Gutman GA, Martin-Eauclaire MF, van der Walt JJ, Possani LD: A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies. *Trends. Pharmacol. Sci.* 20, 444-447, 1999

van der Merwe PA: Formation and function of the immunological synapse. *Curr. Opin. Immunol.* 14:293–298, 2002

Varga Z, Panyi G, Péter M, Pieri C, Csécei G, Damjanovich S Gáspár R: Multiple binding sites for melatonin on Kv1.3. *Biophys. J.* 80:1280–1297, 2001

Vereb G, Matkó J, Vámosi G, Ibrahim SM, Magyar E, Varga S, Szöllösi J, Jenei A, Gáspár R Jr., Waldmann TA, Damjanovich S: Cholesterol-dependent clustering of IL-2R alpha and its colocalization with HLA and CD48 on T lymphoma cells suggest their functional association with lipid rafts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:6013–6018, 2000

Vereb G, Szollosi J, Matko J, Nagy P, Farkas T, Vigh L, Matyus L, Waldmann TA, Damjanovich S: Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 100:8053-8058, 2003

Vyas YM, Mehta KM, Morgan M, Maniar H, Butros L, Jung S, Burkhardt JK Dupont B: Spatial organization of signal transduction molecules in the NK cell immune synapses during MHC class I-regulated noncytolytic and cytolytic interactions. *J. Immunol.* 167:4358–4367, 2001

Wei X, Tromberg BJ, Cahalan MD: Mapping the sensitivity of T cells with an optical trap: polarity and minimal number of receptors for Ca^{2+} signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:8471– 8476, 1999

Wulff H, Miller MJ, Hansel W, Grissmer S, Cahalan MD, Chandy KG: Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel, IKCa1: A potential immunosuppressant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:8151– 8156, 2000

Wulff H, Gutman GA, Cahalan MD, Chandy KG: Delineation of the clotrimazole/TRAM-34 binding site on the intermediate conductance calcium-activated potassium channel, IKCa1. *J. Biol. Chem.* 276:32040-32045, 2001

Wulff H, Calabresi PA, Allie R, Yun S, Pennington M, Beeton C, Chandy KG: The voltage-gated $\text{Kv}1.3$ K^{+} channel in effector memory T cells as new target for MS. *J. Clin. Invest.* 111:1703– 1713, 2003

Yellen G, Jurman ME, Abramson T, MacKinnon R: Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable poreforming region of a K^{+} channel: *Science* 251:939 –942, 1991

Zhou Y, Morais-Cabral JH, Kaufman A, MacKinnon R: Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K^{+} channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* 414:43-48, 2001

Zweifach A, Lewis RS: Mitogen-regulated Ca^{2+} current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca^{2+} stores. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6295–9, 1993

8. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Eredeti közlemények:

Panyi G, **Bagdány M**, Bodnár A, Vámosi G, Szentesi G, Jenei A, Mátyus L, Varga S, Waldmann TA, Gáspár R, Damjanovich S: Colocalization and nonrandom distribution of Kv1.3 potassium channels and CD3 molecules in the plasma membrane of human T lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:2592–2597, 2003

IF: 10,272 (JCR 2003)

Panyi G, Vámosi G, Bacsó Z, **Bagdány M**, Bodnár A, Varga Z, Gáspár R, Mátyus L, Damjanovich S: Kv1.3 potassium channels are localized in the immunological synapse formed between cytotoxic and target cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 101:1285-90, 2004

IF: 10,272 (JCR 2003)

Bagdány M, Batista CV, Valdez-Cruz NA, Somodi S, Rodriguez de la Vega RC, Licea AF, Varga Z, Gáspár 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. (közlés alatt: Mol Pharmacol)

IF: 5,650 (JCR 2003)

Idézhető absztraktok:

Bagdány M, Varga S, Szentesi G, Bodnár A, Jenei A, Damjanovich S, Gáspár R, Panyi G: Non-random distribution of Kv1.3 channels in the lymphocyte plasma membrane. Biophys. J. 82:250a, 2002

Varga Z, Valdez-Cruz NA, **Bagdány M**, Somodi S, Gáspár R, Possani LD, Panyi G: Anuroctoxin: a Potent and Selective Blocker of Kv1.3 Channels Biophys. J. 86:538a, 2004

Vámosi G, Bacsó Z, Bodnár A, **Bagdány M**, Varga Z, Gáspár R, Matyus L, Damjanovich S, Panyi G: Kv1.3 potassium channels are localized in the immunological synapse formed between cytotoxic and target cells. Biophys. J. 86:540a, 2004

Poszterek és előadások:

Bagdány M: Kv1.3 ioncsatornafehérjék sejtfelszíni eloszlásának vizsgálata heterológ expressziós rendszerekben (előadás) Ph.D. konferencia, Debrecen, 2002

Bagdány M, Varga S, Szentesi G, Bodnár A, Jenei A, Vámosi G, Damjanovich S, Gáspár R. Jr., Panyi G: Kv1.3 ioncsatornafehérjék sejtfelszíni eloszlásának vizsgálata heterológ expressziós rendszerekben. (poszter) 32. Membrántranszport konferencia, Sümeg, 2002

Bagdány M, Somodi S, Gáspár R. Jr, Lourival DP, Panyi G: Az anuroctoxin a Kv1.3 kálium ioncsatorna új specifikus gátlószere. (poszter) A Magyar Biofizikai Társaság Vándorgyűlése, Szeged, 2003

Varga Z, Valdez-Cruz NA, **Bagdány M,** Somodi S, Gáspár R, Possani LD, Panyi: Anuroctoxin: A potent and selective blocker of Kv1.3 channels. (poszter) Gaiser school, Predeal, Románia, 2003

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetem fejezem ki témavezetőmnek, Dr. Gáspár Rezső egyetemi tanárnak, a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet igazgatójának a témaválasztásért, és amiért felkeltette érdeklődésemet a biofizika iránt, szakmailag irányított, valamint, hogy lehetővé tette számomra, hogy munkámat az intézetben és a kutatócsoportjában végezhessem. Különösen hálás vagyok másik témavezetőmnek, Dr. Panyi György egyetemi docensnek amiért bevezetett a tudományos kutatómunkába, szakmai munkámat napi szinten is irányította és felügyelte, nagy szakmai tudásával mindig a rendelkezésemre állt, és mindig maximálisan támogatott.

Köszönöm Dr. Damjanovich Sándor akadémikus egyetemi tanárnak, a Magyar Tudományos Akadémia Sejtbiofizikai Kutatócsoportja vezetőjének, hogy lehetővé tette számomra, hogy munkámat a kutatócsoportjában is végezhessem, munkámat folyamatosan figyelemmel kísérte és biztosította számomra a folyamatos szakmai fejlődés lehetőségét.

Köszönettel tartozom a patch-clamp laboratóriumban dolgozó kollégáimnak, barátaimnak, Dr Varga Zoltánnak, Dr Hajdú Péternek, Dr Somodi Sándornak, Papp Ferencnek, akikkel együtt mindig jó hangulatú légkört teremtettünk a közös munkához. Köszönettel tartozom az Akadémiai Kutatócsoport tagjainak, Dr Bodnár Andreának és Dr Vámosi Györgynek is, akikkel számos munkában együtt vettem részt, és mindig maximálisan segítettek.

Hálával tartozom Nagy Cecíliának és Pásztorné Tóth Enikőnek, a mérések előkészítésében nyújtott segítségükért. Szeretnék köszönetet mondani a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet valamennyi dolgozójának, akik e disszertáció megírásában segítettek.