

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A KV1.3 CSATORNÁK INAKTIVÁCIÓJÁNAK ÉS FARMAKOLÓGIAI
TULAJDONSÁGAINAK VIZSGÁLATA**

DR. SOMODI SÁNDOR



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

**A KV1.3 CSATORNÁK INAKTIVÁCIÓJÁNAK ÉS FARMAKOLÓGIAI
TULAJDONSÁGAINAK VIZSGÁLATA**

DR. SOMODI SÁNDOR

Témavezetők:

Dr. Panyi György egyetemi docens

Dr. Varga Zoltán egyetemi adjunktus

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS – ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
BIOFIZIKAI ÉS SEJTBIOLÓGIAI INTÉZET
DEBRECEN, 2007**

1 BEVEZETÉS

1.1 Ioncsatornák szerepe a lymphocyták aktivációjában

A lymphocyták aktivációja során az antigén prezentáló sejt MHC fehérjéjéhez kötődő idegen antigén aktiválja a lymphocyták membránjában lévő TCR/CD3 molekulakomplexet, amely számos intracelluláris protein kináz transzlokációját és aktivitásának fokozódását vonja maga után, amely végül a foszfolipáz C γ enzim aktivációját eredményezi. A PLC γ enzim a foszfatidilinozitol-biszfoszfát membránlipidet inozitol-triszfoszfátra (IP $_3$) és diacilglicerolra hasítja. A keletkező molekulák két jól elkülöníthető, de szorosan összefüggő jelátviteli kaszkádot indítanak el. A diacilglicerol a protein-kináz C (PKC) útvonalat aktiválja. Az aktivált PKC izoenzimek közül kiemelendő a PKC θ , amely számos intracelluláris szubsztrátot foszforilál. A másik jelátviteli út magába foglalja az IP $_3$ -függő Ca $^{2+}$ felszabadulást az endoplazmatikus retikulumból, valamint a raktárak kiürülését követő Ca $^{2+}$ beáramlást az extracelluláris térből. A tartós, legtöbb esetben oszcilláló Ca $^{2+}$ koncentrációemelkedés a kalmodulinon keresztül a calcineurin nevű foszfatázt aktiválja. A calcineurin defoszforilálja az NF-AT transzkripció faktorát, amely így a magba transzlokálódik, és az interleukin-2 gén promotor eleméhez kötődve IL-2 termelést indít el, és a többi jelátviteli mechanizmussal (MAP kináz, Ras, Fos) szorosan együttműködve a sejtek proliferációját beindítja.

A Ca $^{2+}$ jel kezdeti szakaszának kialakulásáért az endoplazmatikus retikulumból történő, IP $_3$ receptoron keresztül bekövetkező Ca $^{2+}$ felszabadulás felelős, míg a Ca $^{2+}$ jel fenntartott fázisában a Ca $^{2+}$ plazmamembránon át történő beáramlása a döntő. Ez Ca $^{2+}$ szelektív csatornákon keresztül történik, amelyek az endoplazmatikus retikulum Ca $^{2+}$ raktárának kiürülését követően aktiválódnak. A jelenség háttérében álló csatornát "store-operated" Ca $^{2+}$ csatornának, vagy kalcium felszabadulás aktiválta Ca $^{2+}$ csatornának (angol rövidítés: CRAC) nevezik. A CRAC csatorna egyik jellemző tulajdonsága, hogy nyitási valószínűsége nem függ a membránpotenciáltól. A nyitott CRAC csatornákon keresztül folyó áram elektrokémiai hajtóerejéhez komoly hozzájárulást ad a sejtek membránpotenciálja. A T sejtek membránpotenciálja -50 és -60 mV közötti érték, melyet a lymphocyták két domináns K $^{+}$ csatornája, a feszültség-függő depolarizáció-aktivált Kv1.3 és a Ca $^{2+}$ -aktivált K $^{+}$ csatorna (IKCa1) határozza meg. E két ioncsatorna által létrehozott kation kiáramlás még a depolarizáló hatást okozó Ca $^{2+}$ influx mellett is biztosítja a sejtmembrán hyperpolarizált állapotát,

létrehozva ezzel a Ca^{2+} beáramláshoz szükséges hajtóerőt, és így a megfelelő Ca^{2+} -mediált jelátvitelt.

1.2 A feszültség kapuzott Kv1.3 csatorna főbb biofizikai tulajdonságai

A lymphocyták domináns feszültségvezérelt K^+ csatornáját, a hKCNA3 gén által kódolt csatornát 1984-ben írták le. A csatorna génjének azonosítását követően a szekvencia homológia alapján a csatornát a feszültségvezérelt ioncsatornák *Shaker* családjába (Kv1) sorolták, és a Kv1.3 nevet kapta.

A csatornát négy azonos alegység alkotja, melyek elrendeződése megközelítőleg szimmetrikus az általuk létrehozott pórus körül. Az egyes alegységek kb. 500 aminosavból állnak, a tetramer csatornát az alegységek közötti nem-kovalens kötések tartják össze. Minden egyes alegység 6 transzmembrán α -helikális szegmensből és az őket összekötő intra- és extracelluláris hurkokból tevődik össze. A csatorna pórusát az 5. és 6. transzmembrán szegmensek (S5 és S6) közötti extracelluláris hurkok valamint az S6 szegmensek egyes részei együttesen hozzák létre. A csatorna ugyanezen régiójához kötődik a Kv1.3 csatornák számos peptid és kis-molekula gátlószere is. A pórusrégió tartalmazza a K^+ szelektivitást biztosító különösen konzervatív szelektivitási filter (GYGD) szekvenciát is. A csatornák extracelluláris pórusát határoló aminosav-oldalláncok fontos szerepet játszanak a skorpiótoxinok csatornához való kapcsolódásában és a nagy affinitású kötődés létrejöttében.

A csatornák aktivációs küszöbe kb. -50 - -60 mV, ami megegyezik a T sejtek nyugalmi membránpotenciáljával. Az aktivációs küszöbnél pozitívabb membránpotenciálok a csatornák nyitási valószínűsége meredeken emelkedik, így depolarizáció hatására gyorsan kinyitnak, majd egy nem vezető, ún. inaktívált állapotba mennek át. Ebből az állapotból a Kv1.3 csatornák még -120 mV membránpotenciál mellett is csak igen hosszú idő alatt (~ 50 s) térnek vissza nyugalmi (zárt) állapotukba. Az inaktíváció csökkenti a membránpotenciál kontrollhoz rendelkezésre álló, aktiválható K^+ csatornák számát. A csatornák egyensúlyi inaktívációjának feszültségfüggése olyan, hogy az aktivációs küszöb feszültségtartományában a csatornák nagy része inaktívált állapotban van, de egy kis hányaduk aktiválható. Így az egyensúlyi aktiváció és inaktíváció feszültségfüggése egy olyan membránpotenciál-ablakot határoz meg, ahol a membránban található Kv1.3 csatornák egy része aktív. Ezen ablak a lymphocyták nyugalmi membránpotenciál-értékének megfelelő feszültségeknél van, így az aktív Kv1.3 csatornákon keresztüli K^+ fluxus hozzájárul a diffúziós membránpotenciál

kialakításához. A Kv1.3 csatornák inaktivációja lassú, így aktivációjukat követően jelentős K⁺ fluxust képesek létrehozni mielőtt a nem-vezető inaktivált állapotba kerülnek. Ez a tény, valamint a lymphocyták membránjának rendkívül magas ellenállása (10-20 GΩ) biztosítják azt, hogy a T sejtek membránpotenciálját kevés számú aktív csatorna is képes fenntartani.

A *Shaker* családba tartozó K⁺ csatornák két alapvetően különböző mechanizmus révén inaktiválódhatnak. A Kv1.3 csatornában az N-típusú inaktivációért felelős, a csatornaalegység N-terminális részén lévő „inaktivációs labda” hiányzik, így az inaktiváció ezen csatornában kizárólag a lassú, ún. C-típusú mechanizmussal megy végbe. A C-típusú inaktiváció molekuláris mechanizmusa nem pontosan ismert. Abban mindenki egyetért, hogy a C-típusú inaktiváció az extracelluláris csatornaszájadék konformációváltozásának a következménye. Az, hogy ez a konformációváltozás milyen kiterjedésű, már nem egyértelmű. Az inaktiváció kialakulásának leírására kezdetben két modell alakult ki. Az egyik szerint a csatorna pórusának extracelluláris szájadékában bekövetkező konformációváltozás az ionok vezetésére szolgáló pórus összeeséséhez vezet, meggátolva ezzel a K⁺ és egyéb ionok áramlását. A másik modell szerint a lassú inaktiváció a csatorna ion-szelektivitásának megváltozását jelenti és molekuláris átrendeződés csak a szelektivitási filterben következik be.

A C-típusú inaktiváció sebességét az inaktivációs kaput kontrolláló, a szelektivitási szűrőben található K⁺ kötőhely telítettsége határozza meg. A kötőhely telítettségének növekedése lassítja az inaktivációt a „láb az ajtóban” (foot-in-the-door) mechanizmusnak megfelelően. Ennek lényege, hogy az inaktiváció csak akkor mehet végbe, ha ez a K⁺ kötőhely üres, az ezen a kötőhelyen K⁺-ot kötött csatorna pedig nem képes inaktiválódni. A fent említett K⁺ kötőhely valószínűleg a pórusban egymás után elhelyezkedő 3-4 kötőhely közül a legkülső, az ún. „external-lock-in site”.

A C-típusú inaktiváció sebességét döntően befolyásolja az extracelluláris pórusrégió aminosav sorrendje, különösképpen a *Shaker* B csatorna 449-es pozíciójának megfelelő helyen található aminosav minősége. Az ezen pozícióban elhelyezkedő threonin mutációja az inaktiváció sebességének jelentős megváltozását eredményezte. Ezen felül az inaktiváció sebessége módosítható gátlószerekkel (pl. tetraetil-ammónium), valamint az extracelluláris oldat kation összetételének és pH-jának megváltoztatásával.

Az irodalomból ismert, hogy több, a *Shaker* családba tartozó csatorna inaktivációs kinetikáját módosítja az extracelluláris pH. A legtöbb csatorna esetén az extracelluláris pH csökkenése a lassú inaktiváció gyorsulását eredményezte, ugyanakkor a csatornák pórusrégiójában elhelyezkedő hisztidin-oldalláncok megnövelték a lassú inaktiváció pH-

szenzitivitását. Különösen figyelemreméltó, hogy a többi csatornával ellentétben a Kv1.3 csatorna esetében az extracelluláris pH csökkentésével lassul a C-típusú inaktiváció. Ugyanakkor a Kv1.3 fontos és egyedülálló tulajdonsága a pH érzékenység szempontjából, hogy a kritikus (*Shaker* 449-cel ekvivalens) pozícióban egy titrálható hisztidin található (H399).

1.3 A nagy affinitású, nagy specificitású Kv1.3 és IKCa1 gátlószerek jelentősége az immunszuppresszióban

A Kv1.3 és IKCa1 csatornák gátlószerei kémiai szerkezetük alapján lehetnek anorganikus ionok, kis-molekulák és peptidtoxinok. A három csoport közül legnagyobb jelentősége a különböző állati eredetű, elsősorban skorpiómérgekből izolált peptidtoxinoknak van. A különböző skorpiók mérgeből előállított K^+ csatorna toxinok 30-40 vagy 60-70 aminosavból állnak. A toxinok csatornához való kötődésében az ioncsatornák részéről az S5 és az S6 hélix közötti hurok S5-höz közeli ún. „turret” régiója valamint a pórus szelektivitási filterében elhelyezkedő aminosavak oldalláncai a legfontosabbak. A toxinok K^+ csatornák gátlásáért felelős aminosav-oldalláncai a centrális, pozitívan töltött, a csatornapórusba mélyen benyúló lizin és egy aromás aminosav, amelynek aromás gyűrűje $\sim 7 \text{ \AA}$ távolságra helyezkedik el a centrális lizin α szénatomjától. E két aminosav-oldallancot „esszenciális diád”-nak is nevezzük. Az esszenciális diád jelenléte kritikusnak tűnik a K^+ csatorna felismerés szempontjából, ugyanakkor létezik olyan a Kv1.3 csatornát hatékonyan blokkoló skorpiótoxin (Tc32), amely sem a centrális lizinoldallancot, sem pedig az aromás aminosav-oldallancot nem tartalmazza.

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

Az utóbbi néhány évben fény derült arra, hogy az egyes T sejt altípusok, a naïve, a centrális memória (T_{CM}) és effektor memória (T_{EM}) T sejtek különböző mértékben expresszálják a Kv1.3 csatornákat, ami lehetővé teszi a Kv1.3 csatornát gátló toxinok terápiás célú felhasználását. Az effektor memória T sejtek (T_{EM}) aktivációja a Kv1.3 csatornák expressziójának drasztikus (~ 1500 /sejt) növekedését eredményezi az IKCa1 csatornák expressziójának lényeges változása nélkül, létrehozva ezzel a $Kv1.3^{high}IKCa1^{low}$ csatornafenotípust. Ezzel szemben a naïve és a centrális memória (T_{CM}) sejtek aktivációja a

Kv1.3 csatornák expressziójának enyhe (~250/sejt→~400/sejt), ugyanakkor az IKCa1 csatornák expressziójának jelentős fokozódásával (8-10/sejt→500/sejt) jár együtt (Kv1.3^{low}IKCa1^{high} csatorna fenotípus). Az is bebizonyosodott, hogy a különböző autoimmun betegségekben (I. típusú diabetes mellitus, rheumatoid arthritis, sclerosis multiplex) a pathogenezisben fontos szerepet játszó autoreaktív T sejtek a Kv1.3 csatornákat nagy számban kifejező effektor memória T sejtek (T_{EM}).

A Kv1.3 csatornákat specifikusan blokkoló toxinok potenciális therápiás jelentősége abban áll, hogy segítségükkel specifikusan gátolhatók a betegségek kialakulásában kulcsszerepet játszó T_{EM} sejtek, ugyanakkor a naïve és a T_{CM} sejtek az IKCa1 csatornák fokozott expressziója miatt nem kerülnek gátlás alá. A T_{EM} sejtek proliferációjának szelektív gátlását in vitro körülmények között számos specifikus Kv1.3 csatorna gátlószer esetén bizonyították. Patkányokban a Kv1.3 csatorna gátlószerei hatékonyan csökkentették a kísérletes autoimmun encephalomyelitis tüneteit, megakadályozták a pristin indukált arthritis kialakulását és csökkentették az experimentális autoimmun diabetes incidenciáját arra hajlamos törzsekben. A Kv1.3 csatornablokkolók ugyanakkor az eddigi vizsgálatok szerint nem rendelkeznek szisztémás toxicitással, nem mutagének. Mindezek alapján várható a Kv1.3 csatornablokkolók therápiás célú felhasználása autoimmun betegségek esetében.

A Kv1.3 csatornák fentebb vázolt központi szerepe a T sejtek fiziológias és pathofiziológias körülmények közötti aktivációjában indokolta a csatorna inaktivációjának és farmakológiai tulajdonságainak vizsgálatát.

2 CÉLKITŰZÉSEK

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

3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Humán perifériás vérből izolált lymphocyták

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

3.2 CTLL-2 sejtek tenyésztése és transzfekciója

Az endogén feszültségfüggő K^+ csatornákkal nem rendelkező egér citotoxikus sejteket (CTLL-2) folyamatos kultúrában, 10% fetális borjú savót, 2 mM Na-piruvátot, 10 mM HEPES-t, 4 mM L-glutamint, 50 μM 2-merkaptóetanolt, és 100 CU/ml IL-2-t tartalmazó RPMI-1640 tápfolyadékban, párásított széndioxid termosztátban (37°C , 5% CO_2) tenyésztettük. A CTLL-2 sejteket elektroporációval két különböző proteint kódoló DNS plazmiddal ko-transzfektáltuk, melyek közül az egyik egy sejtfelszíni marker molekulát kódolt (humán CD4, Ccd4neo plazmid), a másik pedig az ioncsatorna alegység kódolásáért felelős DNS szekvenciát tartalmazta (pRc/CMV/Kv1.3 WT, ill. a 399-es pozícióban különböző mutációkat tartalmazó pRc/CMV/Kv1.3_H399X). A jó ko-transzfektációs hatások a plazmidok moláris arányának helyes beállításával volt elérhető (1:5 = felszíni marker : csatorna alegység). A sejteket centrifugálást követően 2×10^7 sejt/ml koncentrációban vettük fel Hanks'-20 mM HEPES oldatban, és a megfelelő plazmid DNS sejtekhez adását követően a sejtszuszpenziót 4 mm réssel rendelkező elektroporációs küvettába helyeztük és a mintákat 10 percig jégen inkubáltuk. Az elektroporációt BTX ECM 600 típusú elektroporátorral végeztük 725 V/cm elektromos térerősség mellett, a kisülés időállandója ~24-25 ms volt. Ezt követően a mintát újabb 10 percre jégre helyeztük, majd a sejteket a küvettákból tápfolyadékba

helyezés után 8-72 órán keresztül tenyésztettük. A sejtek életképessége a transzfekciót követő 24 óra múlva ~50 % volt.

3.3 HEK 293 sejtek tenyésztése és transzfekciója

A HEK 293 sejteket 10% fetális borjú savót (FCS-t) tartalmazó DMEM-ben tenyésztettük párásított széndioxid termosztátban (37°C, 5% CO₂). A sejteket Ca-foszfát precipitációs módszerrel ko-transzfectáltuk hCD4 sejt felszíni markert ill. patkány Kv2.1 csatornát vagy Shaker IR csatornát kódoló plazmidokkal. A CD4 pozitív sejtek jó ko-transzfectációs hatásfokát úgy biztosítottuk, hogy a csatornakódoló plazmidot 5-10-szeres feleslegben alkalmaztuk a CD4-et kódoló plazmidhoz képest. A transzfectált sejteket 72 órán keresztül tenyésztettük.

3.4 Molekuláris biológia

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

3.5 Monoklonális antitest adhéziós módszer

Elektrofiziológiai mérésekhez (patch-clamp) a T sejteket szelektív antitest adhézióval szeparáltuk. A tenyésztés végén nyert sejtuszpenziót egér-anti-humán CD2 IgG-vel, egy specifikus T lymphocytá ellenes antitesttel jelöltük meg. Az így megjelölt sejteket 22 percig inkubáltuk jégen egy olyan Petri csészében, melynek az aljára kecskében termelt egér IgG ellenes antitesteket adszorbeáltunk. Az inkubálás után a Petri csészét ötször 1 ml normál extracelluláris oldattal körkörös mozdulatokkal mostuk, így az elsődleges antitesttel nem jelölt sejteket eltávolítottuk, míg a kitapadt anti-humán CD2-vel jelzett T lymphocyták a Petri csészében maradtak. Hasonló eljárással választottuk ki a sikeresen transzfectált, CD4

sejtfelszíni markert expresszálo CTLL-2 és HEK 293 sejteket is. Ezekben az esetekben elsődleges antitestként természetesen egér-anti-humán CD4 IgG-t használtunk.

3.6 Skorpió toxinok preparálása

A *Centruroides elegans* toxinok tisztítása kromatográfiás eljárással történt. A skorpióméreg oldható frakcióit először Sephadex G-50-nel töltött oszlopon szeparáltuk. A II. számú frakciót, amely az aktív peptid komponenseket tartalmazta, carboxy-methyl-cellulózt tartalmazó oszlopon ioncserélő kromatographiával tisztítottuk tovább. Az így nyert szubfrakciók közül a 9-11-es szubfrakciókat (II-9, II-10 és II-11, mivel a Sephadex G-50 oszlopon nyert II. frakció elválasztása során nyertük őket) nagy teljesítményű folyadék kromatográfiával több lépésben szubfrakciókra bontottuk. Az így nyert szubfrakciók közül 5 (Ce1-5) teljes karakterizálása történt meg. A tisztított peptid toxinok molekulatömegét tömegspektrométer (Finnigan LCQ^{DUO}, San Jose, CA, USA), szekvenciáját pedig automatikus ProSequencer készülék (Millipore, USA) segítségével határoztuk meg. A toxinok izolálását és a szekvencia analízist kollaborációs partnerünk (Dr. Possani, Cuernavaca, Mexikó) laboratóriumában végezték.

3.7 Patch-clamp

Az értekezés eredményeit szolgáltató kísérletes munka nagy része a Hamill, Marty, Neher, Sakmann és Sigworth által 1981-ben bevezetett patch-clamp technikán alapul. Méréseinket a patch-clamp technika teljes-sejt (whole-cell) konfigurációjában végeztük. A mérések a teljes-sejt konfiguráció elérése után 5-10 perc múlva kezdődtek. A méréseket minden esetben szobahőmérsékleten (22-25 °C) végeztük. A pipettákat GC 150 F-15 boroszilikát (Clark) üvegapillárisokból húztuk öt fázisban, majd hő alkalmazásával políroztuk a pipetták hegyét. A pipetták ellenállása normál extra- és intracelluláris oldat esetén 2-4 M Ω volt.

Méréseinkhez Axopatch 200 és 200A patch-clamp erősítőket használtunk feszültségzár üzemmódban. Ez azt jelenti, hogy a vizsgált sejt membránpotenciálját konstans értéken tartjuk, miközben a sejtmembránon átfolyó áram nagyságát meghatározzuk. Az ingerlő feszültség-impulzusokat és az adatgyűjtést IBM kompatibilis személyi számítógép vezérelte

Labmaster TL-1 illetve Digidata 1200 illesztőegységen keresztül a pCLAMP programcsomag segítségével (6.0 és 8.0 verziók). Méréseink során szükség esetén soros ellenállás kompenzációt alkalmaztunk egészen 85 %-ig a soros ellenálláson eső hiba korrekciójának érdekében, így a feszültséghibát minden esetben 5 mV alá csökkentettük.

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

A normál extracelluláris oldat (S-ECS) összetétele (mM-ban): 145 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 2,5 CaCl₂, 5,5 glükóz, 10 HEPES (pH 7,35, 305 mOsm) volt. A pipettaoldat összetétele a legtöbb esetben (mM-ban): 140 KF, 11 K₂EGTA, 1 CaCl₂, 2 MgCl₂, és 10 HEPES (pH 7,20, 295 mOsm) volt. Az oldatok cseréjét a sejtek környezetében PE10-es polietilén csövekből épített perfúziós rendszer segítségével biztosítottuk. Először mindig a kontroll oldattal perfundáltunk, majd pedig a megfelelő tesztvegyületet tartalmazó oldattal, végül kontroll oldattal történő visszamosás következett.

3.8 Adatok kiértékelése

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

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

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

4 EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

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

4.1.1 A Kv1.3 inaktivációja lassul alacsony pH_o mellett

A korábbi, humán perifériás lymphocytákon kapott eredményekkel egybehangzóan az extracelluláris pH csökkentése a CTLL-2 sejtekben expresszált Kv1.3 csatornák inaktivációjának lassulását eredményezte. Az inaktivációs kinetikát az inaktivációs időállandóval (τ) jellemeztük, mely az áramgörbe leszálló szárához illesztett, egy exponenciális tagot tartalmazó függvény jellemző paramétere ($I=A \times e^{-t/\tau} + C$, ahol I az aktuális áramerősség, C az egyensúlyi (steady-state) áram nagysága, A az inaktiválódó komponens amplitúdója, t pedig az illesztés kezdetétől számított aktuális idő). Mivel a kontroll oldattal történő perfúzió során az inaktivációs kinetika gyorsulását tapasztaltuk, kontrollként a kezelés előtt és a kontrolloldattal történő visszamosást követően mért τ értékek átlagát vettük és ehhez hasonlítottuk a kezelés során mért τ értékeket. Amennyiben a sejtet pH=6,5 ill. pH=5,5 extracelluláris oldattal perfundáltuk, az áramamplitúdó rendre a kontroll érték 91,2 ± 1,4 %-ára ill. 67,1 ± 1,8 %-ára csökkent, míg az inaktivációs időállandó a kontroll 117,2 ± 3,9 %-ára ill. 138,1 ± 1,9 %-ára növekedett. Az inaktivációs időállandó S-ECS pH=7,35 esetén 167 ± 20 ms, S-ECS pH=6,5 esetén 184 ± 25 ms, míg pH=5,5 esetén $\tau = 198 \pm 23$ ms volt.

4.1.2 Az extracelluláris pH befolyásolja az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggését

Ismert, hogy az extracelluláris pH csökkentése az egyensúlyi aktivációt (G-V görbe) a pozitívabb membránpotenciálok irányába tolja el a membránfelszíni töltésárnyékolásnak köszönhetően. Kísérleteinkben vizsgáltuk az extracelluláris pH CTLL-2 sejtekben expresszált Kv1.3 csatornák aktivációjára gyakorolt hatását. A mért adatpontokhoz Boltzmann-függvényt illesztettünk, az egyensúlyi aktivációt a féllaktivációs feszültséggel ($V_{1/2}$) és a meredekséggel (s) jellemeztük. Az extracelluláris pH csökkentése a $V_{1/2}$ értékek pozitív membránpotenciálok irányába való szignifikáns eltolódását eredményezte (pH=7,35: -33,6 ± 2,6 mV, pH=6,5: -

20,1 ± 2,8 mV, pH=5,5: -1,5 ± 1,6 mV), míg az τ értékek mindhárom vizsgált pH esetén azonosak voltak (pH=7,35: 6,2 ± 0,9 ms; pH=6,5: 7,0 ± 0,8 ms; pH=5,5: 6,4 ± 0,3 ms).

4.1.3 Magas extracelluláris [K⁺] mellett a pH csökkentése gyorsítja az inaktivációt

Az extracelluláris [K⁺] növelése a legtöbb káliumcsatorna esetén az inaktivációs kinetika lassulását eredményezi a csatorna pórusának extracelluláris bejáratában elhelyezkedő, az inaktiváció szempontjából kritikus káliumkötőhely telítettségének növelése révén. A Kv1.3 csatornák esetén 150 mM [K⁺]_e (K-ECS) mellett az inaktivációs kinetika kétfázisúvá válását észleljük, a mért áramgörbék leszálló szára két exponenciális tagot tartalmazó függvény segítségével illeszthető, az inaktivációs kinetikát két inaktivációs időállandóval (τ_s és τ_f) lehet jellemezni. Amennyiben a sejtet K-ECS pH=7,35 oldattal perfundáljuk, τ_f alacsonyabb, mint az S-ECS oldatban mért inaktivációs időállandó (60,5 ± 3,8 ms), míg τ_s annál magasabb értéket vesz fel: 610 ± 46 ms. A lassan inaktiválódó komponens relatív súlyfaktora magasabb, az $A_s/(A_s + A_f)$ értéke 0,830 ± 0,011 (n=11). Összességében K-ECS pH=7,35 oldatban az inaktiváció lassulását tapasztaljuk.

Szemben az S-ECS-ben tapasztaltakkal magas extracelluláris [K⁺] mellett a pH csökkentése az inaktiváció gyorsulását eredményezte. Amennyiben a sejtet K-ECS pH=6,5 oldattal perfundáltuk, az inaktivációs időállandó nem változott szignifikánsan, míg K-ECS pH=5,5 esetén τ_f a kontroll érték 127,7 ± 10,9 %-ára növekedett, τ_s pedig nem változott szignifikánsan. Az egyes áramkomponensek amplitúdói dózis-függő módon változtak, A_s szignifikánsan csökkent, míg A_f szignifikánsan növekedett. A lassan inaktiválódó komponens súlyfaktora szignifikánsan csökkent az extracelluláris pH csökkentésének hatására, a $A_s/(A_s + A_f)$ hányados értéke pH=6,5 esetén 0,738 ± 0,018, pH=5,5 esetén pedig 0,651 ± 0,030 volt. Az inaktivációs kinetika gyorsulása a lassan inaktiválódó komponens súlyfaktorának csökkenésével magyarázható.

4.1.4 40 mM [K⁺]_e esetén a pH csökkentése nem változtatja meg az inaktiváció sebességét

Mivel az extracelluláris pH csökkentése 5 mM és 150 mM [K⁺]_e esetén ellentétes módon befolyásolta az inaktiváció sebességét, köztes [K⁺]_e-k, nevezetesen 20 mM és 40 mM

esetén is elvégeztük a kísérletet. Ezen esetekben az áramgörbe leszálló szára sem egy, sem pedig két exponenciális tagot tartalmazó függvénnyel nem volt illeszthető megbízhatóan, ezért az inaktiváció jellemzésére egy alternatív módszert kellett választanunk. Ennek lényege a következő: Első lépésben kiszámoltuk a szivárgási (ún. leak) áramra korrigált áramgörbék görbe alatti területét, majd kivontuk belőle a nem inaktiválódó áramhányadnak megfelelő területet, így megkaptuk az inaktiválódó áramhányadnak megfelelő görbe alatti területet. Ennek és az inaktiválódó áramhányad amplitúdójának a hányadosa egy idő dimenziójú mennyiség, amely egyfázisú inaktiváció esetén az inaktivációs időállandót adja meg, kétfázisú inaktiváció esetén pedig az inaktiváció sebességével fordítottan arányos az értéke. A képzett hányadost annak angol nevéből (area/peak ratio) APPR-nek neveztük el.

Amennyiben a sejtet 20 mM $[K^+]_e$ pH=7,35 oldattal perfundáltuk, az APPR értéke $201,1 \pm 23,6$, míg 40 mM $[K^+]_e$ esetén $229,4 \pm 22,0$ volt. Az extracelluláris pH 7,35-ről 5,5-re való csökkentése 20 mM $[K^+]_e$ esetén az APPR értékét a pH=7,35-n mért érték $120,0 \pm 4,7$ %-ára növelte, míg 40 mM $[K^+]_e$ esetén nem változtatta meg szignifikánsan ($97,2 \pm 4,4$ %).

Annak érdekében, hogy az inaktivációs kinetika változása a különböző $[K^+]_e$ -k esetén közvetlenül összehasonlítható legyen, az S-ECS-ben és a HKR-ben mért áramgörbék esetében is elvégeztük az alternatív kiértékelést. A kapott eredmények nem tértek el az áramgörbék illesztésével kapott értékektől, amely az alternatív kiértékelési módszer megbízhatóságát jelzi.

4.1.5 Az inaktiváció pH-függése a His399 protonációjával függ össze

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

Korábban bizonyították, hogy a TEA rKv1.3 csatornák iránti affinitása jelentősen csökken, ha a 401-es helyzetű hisztidin (a hKv1.3 csatorna H399 aminosavával ekvivalens helyzetű aminosav) alacsony extracelluláris pH-n protonálódik. Ezt saját méréseink is igazolták. Az extracellulárisan alkalmazott TEA hKv1.3 csatornák esetén pH=7,35-n az áramamplitúdót a kontroll 47 ± 3 %-ára, míg pH=6,5 esetén a kontroll 94 ± 4 %-ára

csökkentette. A TEA affinitásának csökkenése bizonyítja, hogy pH=6,5-n a His399 protonálódik.

A 399-es helyzetű hisztidinek az inaktiváció pH-függő szabályozásában betöltött kulcsszerepét bizonyítják a különböző H399X mutáns Kv1.3 csatornákkal végzett kísérleteink is. A titrálható hisztidint a vizsgált pH tartományban permanens töltetlen ill. pozitív töltésű aminosavakkal helyettesítettük, így elkülöníthetővé vált a 399-es helyzetű aminosav protonációjának-deprotonációjának a hatása egyéb nem specifikus pH-függő hatásoktól.

Azt vizsgáltuk, hogy az extracelluláris pH csökkentése hogyan befolyásolja a H399L, H399V, H399Y, H399K és a H399R mutánsok inaktivációját. Mindegyik mutáns csatorna nagy számban fejeződött ki transzfektált CTLL-2 sejtekben, és funkcionáló ioncsatornaként viselkedett.

A 399-es helyzetben neutrális aminosavat tartalmazó mutánsok (L, Y és V) esetén az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggése (G-V görbe) pH=7,35-n a vad típusú csatornáéhoz volt hasonló. A töltött mutánsok (R és K) G-V görbéi a vad típusú csatornához képest kevésbé meredek voltak és a pozitívabb membránpotenciálok felé tolódtak. Ezek az eredmények a 399-es helyzetű aminosav és az aktivációs kapuzás közötti kölcsönhatás lehetőségét vetik fel. Alacsony pH-jú oldatban a vad típusú csatornához hasonlóan a G-V görbék pozitív membránpotenciálok irányába való eltolódása figyelhető meg valamennyi vizsgált mutáns esetén. Ezen kívül a H399K és H399R mutánsok esetén a G-V görbék meredekebbé váltak.

A mutációk a csatornák aktivációs kinetikáját nem befolyásolták, ugyanakkor az inaktivációs kinetika valamennyi mutáns esetén drámaian megváltozott. Minden mutáns kétfázisú inaktivációt mutatott, az áramgörbék lezálló szára két exponenciális tagot tartalmazó függvény segítségével volt illeszthető. Az extracelluláris pH 5,5-re való csökkentése különböző mértékben bár, de az összes mutáns csatorna inaktivációját gyorsította. Ezek az eredmények az inaktivációs kinetika tekintetében ellentétesek a vad típusú csatornák esetén tapasztaltakkal.

Az irodalomból jól ismert, hogy számos K^+ csatorna inaktivációját a csatorna extracelluláris bejárata közelében elhelyezkedő káliumkötőhely telítettsége szabályozza. A vad típusú és mutáns Kv1.3 csatornák inaktivációjában alacsony pH-n bekövetkező változások magyarázatára egy modellt alkottunk. Ennek lényege, hogy a protonált 399-es helyzetű hisztidin a csatorna extracelluláris bejáratában egy elektrosztatikus potenciálgátat képez, amely akadályozza a K^+ -ok extracelluláris tér felől a kötőhelyre való belépését és azoknak a kötőhelyről az extracelluláris tér felé történő távozását. Ennek megfelelően tehát a H399 protonációja csökkenti a kötőhely extracelluláris tér felől való töltődésének hatásfokát

és elősegíti annak az intracelluláris tér felől való töltődését. Modellünk helyességének bizonyítására több kísérletet végeztünk, amelyekben a deprotonált és protonált H399-et tartalmazó vad típusú csatorna viselkedését rendre a H399L és H399K mutáns csatornák segítségével modelleztük.

4.1.6 Magas ionerősségű oldat alkalmazása: az elektrosztatikus potenciálját megszüntetése

Az előzőekben leírt modell tesztelésére magas ionerősségű extracelluláris oldatot (HIS) alkalmaztunk, amellyel csökkenthetők a nagy hatótávolságú elektrosztatikus kölcsönhatások. Amennyiben a pozitívan töltött hisztidinek okozta elektromos potenciálját alacsony pH-n akadályozza a K^+ -ok pórusból történő kilépését, lassítva ezzel az inaktivációt, magas ionerősségű oldatban az elektrosztatikus kölcsönhatások csökkenése az elektromos potenciálját eltüntetésével az inaktiváció gyorsulásához vezet a kritikus pozícióban (399) töltött aminosavat tartalmazó csatornák esetén.

Amennyiben a sejtet S-ECS pH=7.35 oldattal perfundáltuk, a HIS pH=7.35 oldatra való váltás az inaktiváció sebességét nem változtatta meg, ezzel szemben pH=5.5-n az S-ECS oldatról HIS-re való áttérés az inaktiváció gyorsulását okozta.

Amennyiben a 399-es pozícióban töltött aminosavat tartalmazó H399K mutáns expresszálló CTLL-2 sejtet S-ECS pH=7,35 oldattal való perfúzió után HIS pH=7,35 oldattal perfundáltunk, az inaktivációs kinetika gyorsult. A 399-es helyzetben neutrális aminosavat tartalmazó H399L mutáns esetén a HIS oldatra való váltás ugyanakkor nem befolyásolta az inaktivációs időállandót. Eredményeink igazolják modellünk helyességét.

4.1.7 Az alacsony extracelluláris pH lassítja a bárium ionok csatornapórusba való belépését és onnan való kilépését

Hipotézisünk tesztelésére vizsgáltuk az ionok extracelluláris csatornaszájadékon át történő permeációját különböző extracelluláris pH-kon. Ehhez egy olyan ionra volt szükség, amelyre a Kv1.3 csatorna permeábilis, de az ion mozgása elég lassú ahhoz, hogy mérni tudjuk az ionmozgás sebességében bekövetkező változásokat. Erre a célra kiválóan alkalmasak a báriumionok, amelyek hasonló méretűek, mint a káliumionok, de kétszeres pozitív töltésüknél

fogva erőteljesebben kötődnek a csatornaszájadékban lévő kötőhelyekhez, megakadályozva ezzel a jóval gyorsabban mozgó káliumionok áramlását a csatorna látszólagos blokkolását okozva. Az irodalomban két szekvenciális báriumkötőhelyet írtak le *Shaker* csatornák esetén: egy külső kötőhelyet, amelyre a gyors asszociációs és disszociációs sebességek jellemzőek, és egy belső kötőhelyet, amely nagyobb affinitású és lassú asszociációs és disszociációs sebességekkel jellemezhető. A külső báriumkötőhely a Neyton és Miller által leírt „external-lock-in site”-nak felel meg és ezen kötőhely telítettsége határozza meg elsősorban az inaktiváció sebességét.

A kísérletekben alkalmazott 15 mM Ba^{2+} a Kv1.3 csatornák áramát S-ECS pH=7,35 oldatban a kontroll $18,47 \pm 1,28$ %-ára csökkentette. A steady-state blokk elérése után báriummentes S-ECS pH=7,35 ill. 5,5 oldattal perfundáltuk a sejtet és mértük a Ba^{2+} kimosódási kinetikáját. Alacsony extracelluláris pH-n a Ba^{2+} disszociációja lassabb, a kimosódás sebességét jellemző időállandók rendre $66,49 \pm 1,17$ s és $129,42 \pm 8,28$ s voltak pH=7,35 ill. 5,5 esetén.

A Ba^{2+} kimosódási kísérleteket egy-egy, a kritikus, 399-es pozícióban neutrális (L) és pozitív (K) töltésű aminosavat tartalmazó mutáns Kv1.3 csatorna esetén is elvégeztük. A H399L csatorna esetén a Ba^{2+} disszociációját nem befolyásolta az extracelluláris pH, és a kimosódási időállandó a vad típusú csatornák esetén pH=7,35-n kapott értékkel egyezett meg. A H399K mutáns csatornák esetén a Ba^{2+} kimosódása szintén pH-inszenzitívnek bizonyult és a kimosódási időállandók a vad típusú ioncsatornák esetén pH=5,5-n kapott értékekkel egyeztek meg.

A Ba^{2+} kimosódási kísérletekben használt protokoll esetén a bemosódás igen gyors, az egyensúlyi blokk 1-2 epizód alatt kialakul, amely nem teszi lehetővé a bemosódási kinetikák relatíve kis különbségeinek feloldását. A jobb feloldás, a Ba^{2+} asszociációjának lassítása érdekében tehát módosítanunk kellett az alkalmazott kísérleti protokollt. A módosított protokollt alkalmazva megállapítottuk, hogy a Ba^{2+} bemosódási kinetikáját vad-típusú csatornák esetén a pH csökkentése lassította, a bemosódási időállandó pH=7,35 esetén $32,8 \pm 1,4$ s, pH=5,5 esetén $46,5 \pm 2,6$ s volt.

A Ba^{2+} kimosási kísérletekhez hasonlóan a Ba^{2+} -ok bemosódási kinetikájának pH-függését is megvizsgáltuk egy, a 399-es pozícióban neutrális (L), ill. pozitív töltésű (K) aminosavat tartalmazó Kv1.3 mutáns esetén is. A vad típusú csatornák bemosódási kinetikájának vizsgálatokor alkalmazott protokollal 15 mM Ba^{2+} mindkét vizsgált mutáns csatorna esetén szignifikánsan nagyobb blokkot okozott és a bemosódási kinetika nagyon

gyors volt, emiatt kísérleti körülmények további módosítására volt szükség. Az extracelluláris pH csökkentése nem befolyásolta a bemosódási kinetikát egyik mutáns csatorna esetén sem, ugyanakkor a neutrális aminosavat tartalmazó mutáns (H399L) bemosódási kinetikája gyorsabb volt. A kapott eredmények megfelelnek a várakozásnak és a modell helyességét bizonyítják.

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

Hipotézisünk tesztelésére olyan kísérleteket is végeztünk, amelyekben alacsony intracelluláris káliumkoncentrációt alkalmaztunk, hogy a sejt belseje felé folyó (inward) áramot kapjunk. Ilyen körülmények között a csatorna extracelluláris szájadékában lévő, az inaktiváció sebességét meghatározó kötőhely intracelluláris oldal felől való töltődése lecsökken, amely megnöveli az extracelluláris tér felől való töltődés jelentőségét. Várakozásunk az volt, hogy az extracelluláris tér felől való töltődés jelentőségének növekedése miatt a pH csökkentésekor a 399-es helyzetű hisztidin protonációja következtében létrejövő elektrosztatikus potenciálgát jelentősen csökkenti a kötőhely telítettségét, és ezért a magas extracelluláris K^+ koncentrációhoz hasonlóan az inaktiváció gyorsulása lesz megfigyelhető.

A fiziológias oldatokkal kapott eredményekkel való összehasonlíthatóság érdekében az extracelluláris K^+ koncentrációt 5 mM-on kívántuk tartani, a befelé irányuló áramokhoz azonban ilyenkor olyan alacsony intracelluláris K^+ lett volna szükséges, ami működésképtelenné tette a csatornákat. Emiatt szükségessé vált mind az intra-, mind az extracelluláris K^+ koncentráció megnövelése. A legalacsonyabb intracelluláris $[K^+]_i$, amely mellett a kísérletek kivitelezhetők voltak 5 mM volt, extracellulárisan ennél magasabb $[K^+]_o$ -t kellett alkalmazni. Az inward áramgörbe leszálló szára 20 és 40 mM $[K^+]_o$ -k esetén jól illeszthető volt egy exponenciális tagot tartalmazó függvény segítségével, az inaktivációs időállandók rendre $160,3 \pm 9,6$ ms és $199,9 \pm 11,2$ ms voltak 20 mM és 40 mM K-ECS-ben. 20 mM K-ECS-ben az extracelluláris pH 7,35-ről 5,5-re való csökkentése nem befolyásolta az inaktivációs kinetikát, míg 40 mM K-ECS-ben a pH hasonló csökkentése az inaktiváció gyorsulását eredményezte. K-ECS oldat alkalmazásakor kétfázisú inaktivációs kinetikát kaptunk, az extracelluláris pH csökkentése pedig az inaktiváció nagyobb mértékű gyorsulását eredményezte. Mindkét intracelluláris $[K^+]_i$ mellett megfigyelhető tehát az a tendencia, hogy

az extracelluláris $[K^+]_o$ növelésével a pH_o csökkentése az inaktivációs kinetikát egyre inkább gyorsította. Alacsony $[K^+]_i$ esetén ez a tendencia az alacsonyabb $[K^+]_e$ értékek felé tolódott el annak megfelelően, hogy a kötőhely extracelluláris tér felől való töltődésének súlya nagyobb mértékű. A kapott eredmények a modell helyességét bizonyítják.

4.2 A Centruroides elegans skorpió mérgéből izolált peptidek Kv1.3 csatornákra gyakorolt hatásának vizsgálata

4.2.1 A Centruroides elegans peptidek szétválasztása, szekvenálása

A Centruroides elegans skorpió teljes mérgének Sephadex G-50 oszlopon történő szétválasztása során nyert 3 frakció közül az egerekre egyedül toxikus II. frakció komponenseit CMC oszlopon választottuk szét. Az így nyert szubfrakciók közül Noxiustoxin (NTx) ellenes antitestek a II-9, II-10 és II-11 szubfrakciókhoz kötődtek, tehát ezen szubfrakciók noxiustoxinhoz hasonló szerkezetű fehérjéket tartalmaznak. E három szubfrakciót HPLC-vel további alfrakciókra bontottuk. A II-9 frakcióból 3 noxiustoxinhoz hasonló szerkezetű peptidet izoláltunk, melyeket Ce1, Ce2, ill. Ce3 –nak neveztünk el. A II-10 frakcióból a Ce4, a II-11 frakcióból pedig a Ce5 jelű peptidet nyertük. A peptidek aminosav-szekvenciáját Edman degradációs módszerrel határoztuk meg.

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

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

Az egyensúlyi blokk közel félhatásos koncentrációban a toxintartalmú oldat perfúzióját követően 60-90 másodperccel alakult ki. A blokk utáni teljes kimosódás a toxinmentes oldattal történő perfúzió kezdete után 180 és 210 s között történt meg.

A három hatásos toxin esetén az áramblokkoló hatást különböző tesztpotenciálokon is megvizsgáltuk. Mindhárom toxin esetében kismértékű feszültségfüggés figyelhető meg a -25 - $+50$ mV-os membránpotenciál-tartományban, az áramblokkoló hatás pozitívabb tesztpotenciáloknál kisebb. A blokk kismértékű feszültségfüggése valószínűleg a toxinnak a toxin-csatorna kötődéskor mélyen a csatorna pórusába benyúló pozitív töltésű aminosav-oldallánca és a membrán elektromos erőtere között fellépő elektrosztatikus kölcsönhatás következménye.

A Ce1, Ce2 és Ce4 hatását 0.01-10 nM koncentrációtartományban vizsgáltuk, az adatpontokra 3 paraméteres Hill függvényt illesztettünk. A disszociációs konstans (K_d) és Hill koefficiens értéke a Ce1 esetén 0,71 nM és 0,98, a Ce2 esetén 0,25 nM és 0,96, a Ce4 esetén 0,98 nM és 0,95. A Hill koefficiens értéke mindhárom peptid esetén közel 1, tehát ezek a többi skorpiótoxinhoz hasonlóan pórusblokkolóként hatnak, 1:1 sztöchiometriával gátolják a Kv1.3 csatornákat.

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

A humán lymphocyták aktivációjában a Kv1.3 mellett fontos szerepet játszanak a Ca^{2+} aktivált K^+ csatornák családjába tartozó IKCa1 csatornák is. Mivel a Kv1.3 és IKCa1 csatornák blokkolása különbözőképpen gátolja az egyes T lymphocytá-altípusok proliferációját, fontosnak tartottuk a Ce toxinok hatásának tesztelését IKCa1 csatornákon is. Az alkalmazott -120 mV-tól $+50$ mV-ig terjedő feszültséggrampa protokollokkal a Kv1.3 csatornák aktivációs küszöbénél alacsonyabb feszültségeken mért áramok kizárólag az IKCa1 csatornáknak tulajdoníthatóak. Az IKCa1 csatornákra kifejtett gátló hatás a mért áramgörbék kezdeti, a Kv1.3 csatornák aktivációs küszöbénél alacsonyabb feszültségeknek megfelelő, egyenes szakaszára illesztett egyenesek meredekségének változása alapján számolható ki. Kísérleteinkben pozitív kontrollként charybdotoxint (ChTx) alkalmaztunk. A ChTx 10 nM koncentrációban az áramgörbék kérdéses szakaszának meredekségét a kontroll érték 54 ± 9 %-ára csökkentette, míg a Ce1, Ce2 és Ce4 toxinok 10 nM koncentrációban hatástalanok voltak.

A Ce toxinok szelektivitását HEK 293 sejtekbe transzfektált *Drosophila Shaker* IR ill. Kv2.1 csatornákon vizsgáltuk. A kísérletek során a vizsgált skorpiótoxinokat 10 nM

koncentrációban alkalmaztuk. Shaker IR csatornák esetén a +50 mV tesztpotenciálon mért megmaradó áramhányad mindhárom peptid esetén 1-hez közeli érték. Kv2.1 csatornák esetén hasonló körülmények között az áram kismértékű csökkenését tapasztaljuk. Ez alapján a peptidek Shaker és rKv2.1 csatornára vonatkozó K_d értéke jóval 100 nM felett van. Ez utóbbi két csatornát az alapján választottuk ki a szelektivitás vizsgálatához, hogy a Shaker-IR csatornák és toxinok közötti kölcsönhatás molekuláris mechanizmusa legjobban ismert, így e csatornák vizsgálata a kötődést meghatározó molekuláris kölcsönhatások tisztázásában segíthet. A Kv2.1 csatornák esetén több olyan toxin ismert, mely nem a csatorna pórusába, hanem annak feszültség érzékelőjéhez kötődve fejt ki hatását, így e csatornák vizsgálata a hatásmechanizmus tisztázásához nyújthat segítséget.

A kísérleteinkben vizsgált öt peptid közül a Ce1, Ce2 és Ce4 peptidek szelektíven gátolták a Kv1.3 csatornákat. A toxinok hatását legalább 1000x szelektívebbnek becsüljük Kv1.3-ra, mint az IKCa1 csatornára. A Ce1, Ce2 és Ce4 toxinok azon képessége, hogy szelektíven képesek gátolni a nagy mennyiségű Kv1.3-at, de kevés IKCa1 csatornát expresszáló T_{EM} sejtek proliferációját anélkül, hogy a naïve és a T_{CM} sejtek osztódását gátolnák, alkalmassá teheti őket bizonyos T sejt mediált immunbetegségek (pl. sclerosis multiplex, diabetes mellitus) kezelésére és a szervátültetés utáni kilökődés megelőzésére.

5 ÖSSZEFOGLALÁS

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

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

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

6 KÖZLEMÉNYEK

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

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

IF: 3.942 (JCR 2005)

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

IF: 2.255 (JCR 2005)

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

(kézirat)

Az értekezés témájához kapcsolódó idézhető absztraktok:

Somodi S, Hajdu P, Varga Z, Gáspár R, Panyi G.: C-type inactivation of Kv1.3 channels: combined effects of extracellular pH, K⁺ concentration and ionic strength. *Biophysical Journal* 84 (2): 76A-76A Part 2 Suppl. S, Feb 2003

Somodi S, Varga Z, Levy DI, Gaspar R, Panyi G.: The role of His399 in the pH-dependent modulation of Kv1.3 inactivation. *Biophysical Journal* 88 (1): 278A-278A Part 2 Suppl. S, Jan 2005

Varga Z, **Somodi S**, Gaspar R, Panyi G.: Effect of extra- and intracellular potassium on the pH-dependent modulation of Kv1.3 inactivation. Biophys Journal 90: Pos-1172 Suppl. S, Jan 2006

Az értekezés témájához kapcsolódó poszterek és előadások:

Somodi Sándor, Hajdú Péter, Gáspár Rezső, Damjanovich Sándor, Panyi György: Az extracelluláris pH és K^+ ionok hatása Kv1.3 K^+ csatornák C-típusú inaktivációjára Magyar Biofizikai Társaság XIX. Vándorgyűlése, Kecskemét, 1999. (előadás)

Sándor Somodi, Péter Hajdú, György Panyi: Interaction of extracellular pH and K^+ ions with C-type inactivation of Kv1.3 channels
11th European Students' Conference at the Charité Berlin, Germany, 2000. (poszter)

Sándor Somodi, Péter Hajdú, György Panyi: Interaction of extracellular pH and K^+ ions with C-type inactivation of Kv1.3 channels
Leiden International Medical Students Congress, Leiden, Netherlands, 2001. (előadás)

Sándor Somodi, Péter Hajdú, Rezső Gáspár, György Panyi: Modulation of C-type inactivation by extracellular pH and K^+ ions in Kv1.3 channel
International Summer School of Biophysics, Sovata, Romania, 2001. (poszter)

Sándor Somodi, Zoltán Varga, Péter Hajdú, György Panyi: C-type inactivation of Kv1.3 channels: combined effects of extracellular pH, K^+ concentration and ionic strength.
XXXIII. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2003. (előadás)

Somodi Sándor, Varga Zoltán, Hajdú Péter, Gáspár Rezső, Panyi György: A Kv1.3 K^+ csatornák inaktivációjának pH-függő változása: a His399 szerepe.
A Magyar Biofizikai Társaság XXI. Kongresszusa, Szeged, 2003. (poszter)

Somodi Sándor, Varga Zoltán, Bagdány Miklós, Gáspár Rezső, Panyi György: A Kv1.3 csatornák pH-függő inaktivációjának molekuláris mechanizmusa.
XXXIV. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2004. (előadás)

Somodi Sándor, Varga Zoltán, Bagdány Miklós, Panyi György, Gáspár Rezső: Új potenciális farmakonok limfociták káliumcsatornáinak szabályozásában.

Immunfarmakológiai Konferencia, Debrecen, 2005. (előadás)

Az értekezés témájához közvetlenül nem kapcsolódó közlemények:

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

[#]megosztott elsőszerzők

IF: 3.564 (JCR 2005)

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

IF: 2.301 (JCR 2005)

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

IF: 4.612 (JCR 2005)

Az értekezés témájához közvetlenül nem kapcsolódó könyvfejezet:

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

Az értekezés témájához közvetlenül nem kapcsolódó idézhető absztrakt:

Varga Z, Valdez-Cruz NA, Bagdany M, **Somodi S**, Gaspar R, Possani LD, Panyi G.:
Anurotoxin: a potent and selective blocker of Kv1.3 channels. Biophysical Journal 86 (1):
538A-538A Part 2 Suppl. S, Jan 2004

Tudományos mutatók:

Az „in extenso” közlemények összesített impact faktora: 16,674

Független citációk száma: 14