

**EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS**

---

**A Kv1.2 és Kv1.3 K<sup>+</sup>-csatornák toxin-szelektivitásának  
molekuláris meghatározói**

Papp Ferenc



**DEBRECENI EGYETEM**

**Molekuláris Orvostudomány DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2009**

# Tartalomjegyzék

TARTALOMJEGYZÉK	1
ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS	3
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
Jelátvitel a T-limfociták aktivációja során, az ioncsatornák (Kv1.3, IKCa1, CRAC) specifikus élettani szerepe a folyamatban	4
A Kv1.2 és Kv1.3 kálium csatornák felépítése és eloszlásuk a szervezetben	6
Toxinok szelektivitási profilja	7
Toxinok specificitásának növelése rekombináns technikákkal	13
CÉLKITŰZÉSEK	15
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	16
Toxinok	16
Sejtek és ioncsatorna gének	16
Limfocita-szeparálás (Kv1.3 ioncsatorna)	16
Különböző ioncsatornák heterológ expressziója	16
Elektrofiziológia	18
Adatkiértékelés	19
EREDMÉNYEK	21
A kísérletekben használt ioncsatornák ismertetője	21
A Css20 és a Tst26 szelektivitása	26
A Css20 és a Tst26 farmakológiai tulajdonságai Kv1.2 és Kv1.3 ioncsatornákon	33
A Tst26 hatása a Kv1.2 és a Kv1.3 ioncsatornák biofizikai tulajdonságaira	37
MEGBESZÉLÉS	40
A szelektivitás fontossága	40
Analízis és konklúzió	41
ÖSSZEFOGLALÁS	49

AZ ÉRTEKEZÉSBEN FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK_____	50
AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK__	57
TÁRGYSZAVAK _____	58
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS _____	59

## Általános bevezetés

Az adaptív immunrendszer sejtjeinek zömét a T- és B-limfociták alkotják. Ezen sejtek legfőbb jellemzője, hogy antigéneket fajlagosan felismerni képes receptorokat hordoznak a felszínükön. Az antigénnel közvetve (T-sejt) vagy közvetlenül (B-sejt) kölcsönhatásba kerülő sejtek aktiválódnak. Ez a folyamat az antigénre nézve fajlagos (specifikus) és klonális, azaz csak az adott antigén felismerésére alkalmas receptort hordozó sejtek vesznek részt benne. Az aktiválódás eredményeképpen a sejtek osztódnak, majd effektor sejtekké és hosszú életű emlékezősejtekké differenciálódnak. A T-sejt receptor (TCR/CD3 komplex) stimulációját követően (2-3 óra) a limfociták akkor is osztódnak, ha a kezdeti stimulust megszüntetjük (McCrady és mtsai, 1988). Egy jelátviteli kaszkád kezdődik ekkor, melynek része az intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció ( $[Ca^{2+}]_i$ ) megemelkedése, majd aktivációval összefüggő gének (pl.: IL-2 génje) íródnak át (Shaw és mtsai, 1988), s végül a T-sejtek proliferációjával végződik.

A limfociták Kv1.3 (feszültségfüggő  $K^+$ ) csatornájának felfedezésével egy időben derült ki, hogy ezek a csatornák központi szerepet játszanak a T-sejtek aktivációjának és proliferációjának szabályozásában (Matteson és Deutsch 1984). Az IKCa1 ( $K_{Ca}3.1$  a szisztematikus nomenklatúrában,  $Ca^{2+}$  aktivált  $K^+$ ) csatornákkal együtt a Kv1.3 csatornák döntően meghatározzák a T-sejtek membránpotenciálját, s ezen keresztül a sejtek aktivációjában kulcsszerepet játszó  $Ca^{2+}$  jelátvitelt (Cahalan és mtsai, 2001, Leonard és mtsai, 1992). A Kv1.3 csatornák szerkezetének és funkciójának feltárásában nagy szerepe volt a Kv1.3 csatornákat gátló peptid toxinoknak és a kémiai úton előállított ún. kis-molekula Kv1.3 inhibitoroknak (Panyi és mtsai, 2004b). A Kv1.3 csatornák specifikus, nagy affinitású gátlószerei különös jelentőséggel bírnak abból a szempontból is, hogy alapjául szolgálhatnak bizonyos autoimmun-betegségek (pl. szklerózis multiplex, 1-es típusú diabétesz) jövőbeli gyógyszeres kezelésének, szelektív immunszuppresszió megvalósításán keresztül (Wulff és mtsai, 2003b).

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

kölcsönhatások megismerése, melyek a gátlószer-csatorna kölcsönhatásokat meghatározzák. Kísérletes munkámban részletesen ez utóbbival foglalkoztam.

## Irodalmi áttekintés

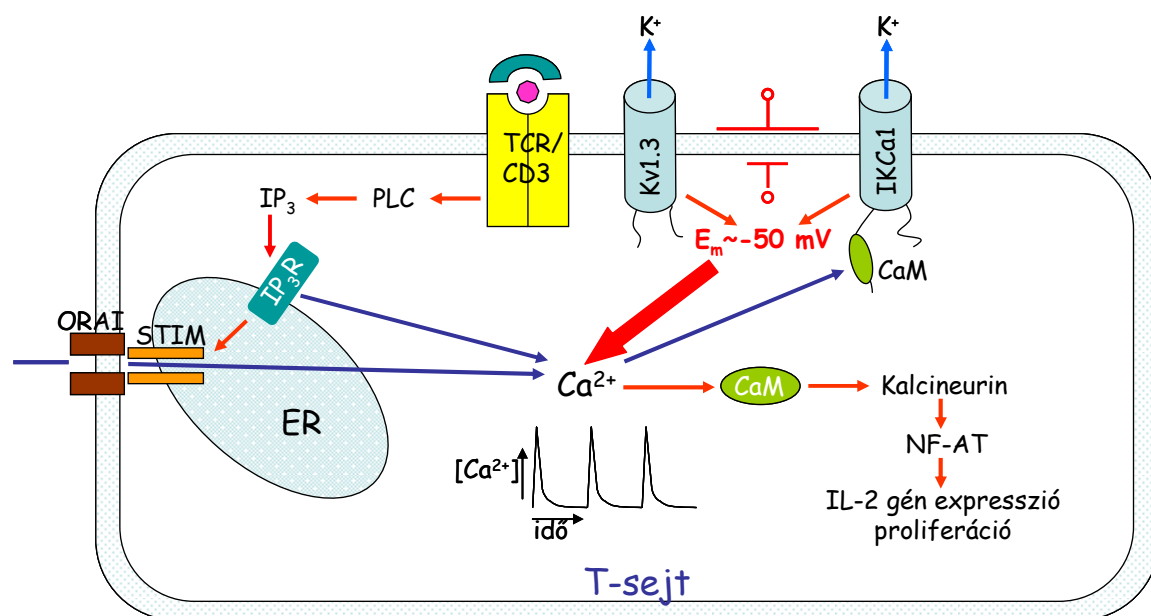
### ***Jelátvitel a T-limfociták aktivációja során, az ioncsatornák (Kv1.3, IKCa1, CRAC) specifikus élettani szerepe a folyamatban***

A T-limfociták az antigénnel az antigénprezentáló sejtek (APC) útján közvetve kerülnek kölcsönhatásba. A T-sejtek antigénreceptora (TCR) az antigén feldolgozása során feltáruuló T-sejt-epitópot csak akkor tudja felismerni, ha az az ún. fő hisztonkompatibilitási génkomplex (MHC) által kódolt membránfehérjéhez kapcsolódva jelenik meg az APC felszínén. Az APC-k a feldolgozott antigént a T-sejteknek prezentálják, és a két sejt típus a TCR/CD3-MHC-komplex útján szoros kapcsolatba kerül egymással, amit a mindkét sejtfeleségen egyaránt jelen lévő adhéziós molekulák kölcsönhatása tovább erősít. Ezt követően számos intracelluláris protein kináz transzlokációja és aktivitásának fokozódása történik (pl. az Src kinázok csoportjába tartozó Lck és Fyn; ZAP-70; Tec) (Janeway 2001).

A jelátviteli útvonalak közül kiemelkedő fontosságú a  $K^+$ -csatornákkal kapcsolatban a  $Ca^{2+}$  jel kialakulása (1. ábra). Ez a foszfolipáz  $C\gamma$  enzim ( $PLC\gamma$ ) aktiválásával kezdődik. A  $PLC\gamma$  enzim a foszfatidilinozitol-biszfoszfát membránlipidet inozitol-trifoszfátra ( $IP_3$ ) és diacilglicerolra (DAG) hasítja. Az  $IP_3$  az endoplazmatikus reticulum (ER)  $IP_3$ -receptorához kötődve  $Ca^{2+}$  felszabadulást idéz elő. Az ER kiürülése után a sejtmembránban lévő „store-operated  $Ca^{2+}$ ” (SOC) csatornák, azon belül is a „ $Ca^{2+}$  Release-Activated  $Ca^{2+}$ ” (CRAC) csatornák aktiválódnak (Prakriya és Lewis 2003, Zweifach és Lewis 1993), melyen keresztül  $Ca^{2+}$  áramlik be a sejtbe az extracelluláris térből, megemelkedvén így az  $[Ca^{2+}]_i$ . A tartós, legtöbb esetben oszcilláló intracelluláris  $Ca^{2+}$ -koncentráció emelkedés a kalmodulinon (CaM) keresztül aktiválja a kalcineurint. Ez elősegíti az NF-AT transzkripció faktor magba történő transzlokációját, aminek következtében az IL2 gén aktiválódik, és a többi jelátviteli mechanizmussal (MAP kináz, Ras, Fos) szorosan együttműködve beindítja a sejtek proliferációját (Crabtree 1999, Rao és mtsai, 1997). Az IL2 expresszió szükséges a további, immár antigén független T-sejt aktivációhoz.

Ezen jelátviteli folyamat  $Ca^{2+}$ -jel részében a  $Ca^{2+}$ - és  $K^+$ -csatornáknak fontos szerepük van (Cahalan és mtsai, 2001, Panyi és mtsai, 2004a, Panyi és mtsai, 2004b). A kétfázisú  $Ca^{2+}$ -jel első szakaszában a T-sejt  $Ca^{2+}$ -raktárából (ER) az  $IP_3$ -receptoron keresztül felszabaduló  $Ca^{2+}$  kis mértékben megnöveli az  $[Ca^{2+}]_i$ . Majd a raktárürülés miatt kinyit a

CRAC-csatorna, amin keresztül beáramló  $\text{Ca}^{2+}$  tovább növeli az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t, ami a második fázist jelenti. A raktárürülés és a CRAC-csatorna nyitása közötti kapcsolatban két fehérje, a STIM és az ORAI játszanak fő szerepet. A STIM az ER membránjában elhelyezkedő transzmembrán fehérje, amely a raktár ürülését képes érzékelni a raktár belső részére eső (a Kalmodulinéhoz hasonló szerkezetű)  $\text{Ca}^{2+}$ -ot kötő „EF-hand”-jével. Amikor az ER-ben lecsökken a  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció, a STIM fehérjék csoportosulni kezdenek, ún. „punktákat” alkotnak az ER membránjának azon részén, amelyik a sejtmembránnal mintegy összesimul. Ezzel egyidőben a sejtmembránban lévő ORAI (a CRAC-csatorna pórúsát formáló) transzmembrán fehérjék arra a helyre csoportosulnak, amelyhez az ER membrán simul (10-25nm távolság).



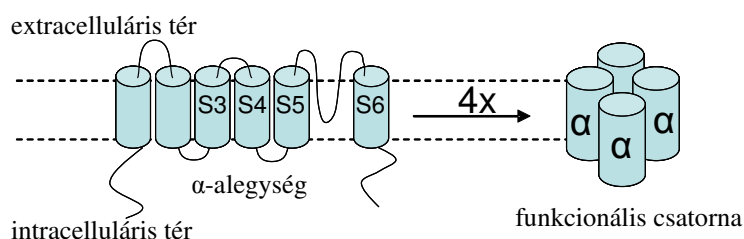
**1. ábra** Ioncsatornák a T-sejtek jelátviteli kaszkádjában.

Az ábrán található rövidítések: TCR: T-sejt receptor; PLC: Foszfolipáz C;  $\text{IP}_3$ : Inozitol-trifoszfát;  $\text{IP}_3\text{R}$ : Inozitol-trifoszfát Receptor; ER: Endoplazmatikus Retikulum; CaM: Kalmodulin; NF-AT: „Nuclear factor of activated T-cells” (aktivált T-sejtek transzkripció faktor); IL-2: Interleukin-2.

A STIM feltehetően egyéb proteinek közbeiktatásával aktiválja az ORAI-t, létrehozva ezzel az aktív CRAC-csatornát (Luik és Lewis 2007, Wu és mtsai, 2007). A nyitott CRAC-csatornákon keresztül folyó  $\text{Ca}^{2+}$ -áram hajtóerejének mértéke szempontjából fontos a sejtek membránpotenciálja (Lewis 2001, Lewis és Cahalan 1995). A T-sejtek membránpotenciálja  $-50$  és  $-60$  mV között van, melyet döntően a két  $\text{K}^+$ -csatorna, a feszültségfüggő depolarizáció-aktivált Kv1.3 és a  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált IKCa1 csatorna határozza meg (Fanger és mtsai, 2000, Matteson és Deutsch 1984). E két ioncsatorna által létrehozott kation kiáramlás a depolarizáló hatást jelentő  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlás mellett is biztosítja a  $\text{Ca}^{2+}$  beáramláshoz szükséges hajtóerőt, és így a megfelelő  $\text{Ca}^{2+}$ -mediált jelátvitelt.

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

Az ioncsatornák legnagyobb és legszerteágazóbb csoportját a  $K^+$ -ra szelektív csatornák adják. Ezen belül a feszültség-kapuzott Kv csatornák számlálják a legtöbb tagot (12 alosztály: Kv1...Kv12, melyen belül genetikai homológia alapján további alcsoportok vannak, mint pl. Kv1.2 vagy Kv1.3 a Kv1 családon belül). A Kv csatornák négy alegységből épülnek fel (tetramer), melyek elrendeződése megközelítőleg szimmetrikus az együttesen létrehozott pórus körül. A sejtek egy részében a Kv csatornák azonos alegységeiből álló homotetramer csatornát találunk (pl. humán T sejteken Kv1.3-at), míg a legtöbb sejtben az azonos családba tartozó ioncsatorna alegységek funkcionális heterotetramereket képeznek (pl. makrofágok (Villalonga és mtsai, 2007) esetén Kv1.3/Kv1.5 vagy neuronok esetén Kv1.1/Kv1.2/Kv1.3 heterotetramerek (Koch és mtsai, 1997). Mindegyik alegység kb. 500 aminosavból áll, melyeket 6 transzmembrán  $\alpha$ -helikális szegmens és az őket összekötő intra- és extracelluláris hurkok építik fel (2. ábra). Az 5. és 6. transzmembrán szegmensek (S5 és S6) közötti extracelluláris hurkok valamint az S6 szegmensek egyes részei együttesen alkotják a  $K^+$ -csatorna pórusát, melyen keresztül a  $K^+$  átjut a plazmamembránon. A csatorna ugyanezen régiója felelős a Kv1.3 csatornák számos peptid és kis-molekula gátlószerének kötéséért (ld. később). A pórusrégió tartalmazza a  $K^+$  szelektivitást biztosító különösen konzervatív szelektivitási filter (GYGD) szekvenciát is. A membránpotenciál változásait a csatorna feszültség-szenzora érzékeli, melyet a többszörösen pozitívan töltött S4 hélixek ill. a nettó negatív töltést hordozó S3 hélixek közösen alkotnak (Jiang és mtsai, 2003b). A feszültség-szenzor membránpotenciál-függő elmozdulása a csatorna aktivációs kapujának megnyílásához vezet. Az aktivációs kaput magát a csatorna citoszolikus bejáratánál az S6 hélixek kereszteződése hozza létre.



2. ábra A tetramer Kv csatornák összeszerelődése alegységekből.

Feszültségfüggő jellegéből adódóan a Kv1.3 csatorna fiziológiás funkciója a membránpotenciál és a  $\text{Ca}^{2+}$ -jelátvitel szabályozása. Ez az ioncsatorna az immunrendszer és a központi idegrendszer jellemző feszültségfüggő ioncsatornája, de fellelhető az agyban, a tüdőben, hasnyálmirigy Langerhans szigetekben, a tímuszban, a lépben, a nyirokcsomóban, a fibroblasztokban, B- és T-limfocitákban, az elő(progenitor)-B-sejtekben, a mandulában, makrofágokban, mikrogliaokban, oligodendrocitákban, oszteoklasztokban, vérlemezkékben, és a herében is. A Kv1.3 csatorna alegységei a Kv1.x családba tartozó más csatorna alegységekkel is képesek csatornát formálni (heteromultimerek), de a többi Kv családba tartozókkal nem (Gutman és mtsai, 2005).

A Kv1.2 csatorna a membránpotenciál fenntartásában és az elektromos ingerelhetőség módosításában játszik fiziológiásan szerepet a neuronokban és az izomsejtekben. Megtalálható ezen kívül az agyban, a gerincvelőben, Schwann sejtekben, a szívizomban (kamra, pitvar), hasnyálmirigy Langerhans sziget sejtekben, a retinában, a simaizomban, és a PC12 sejtekben. A Kv1.2 alegységek is képesek heteromultimereket alkotni más Kv1.x családba tartozókkal, ám a többi Kv családtagokkal szintén nem (Gutman és mtsai, 2005).

## ***Toxinok szelektivitási profilja***

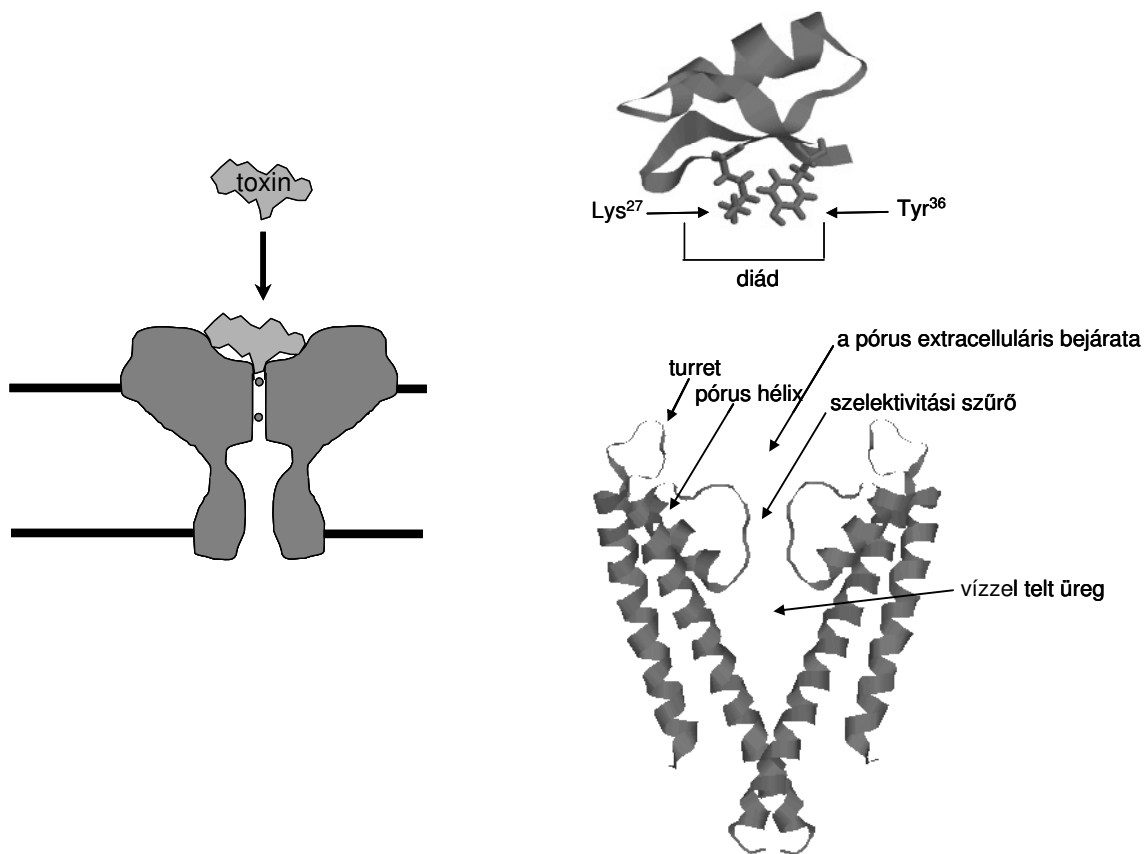
A skorpiók mérganyaga peptidek sokaságát tartalmazza, melyek közül sok nagy affinitással képes kötődni az ioncsatornához. A jelenleg ismert skorpiók mérge főként kétfajta toxint tartalmaz:

- hosszú láncú, kb. 60-70 aminosavrészt tartalmazó specifikusan  $\text{Na}^+$ -csatornákat blokkoló peptidet (Couraud és mtsai, 1982).
- rövid láncú, kb. 37-39 aminosavrészt tartalmazó specifikusan  $\text{K}^+$ -csatornákat blokkoló polipeptidet (Carbone és mtsai, 1982, Gimenez-Gallego és mtsai, 1988, Miller és mtsai, 1985, Possani és mtsai, 1985, Strong és mtsai, 1989).

Egy harmadik polipeptid toxin családról pedig az derült ki, hogy a szarkoplazmatikus retikulum  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadító csatornáját aktiválja (Valdivia és mtsai, 1991).

A legalaposabban tanulmányozott skorpió toxinok a  $\text{Na}^+$ -csatorna módosító vegyületek, amelyeket további  $\alpha$  és  $\beta$  kategóriákba osztályoztak a  $\text{Na}^+$ -csatornán található eltérő kötőhelyeik alapján (Couraud és mtsai, 1982, Jover és mtsai, 1980, Wheeler és mtsai, 1983). Az  $\alpha$ -skorpió toxinok főként a  $\text{Na}^+$ -csatornák inaktivációját módosítják (Nonner 1979), míg a

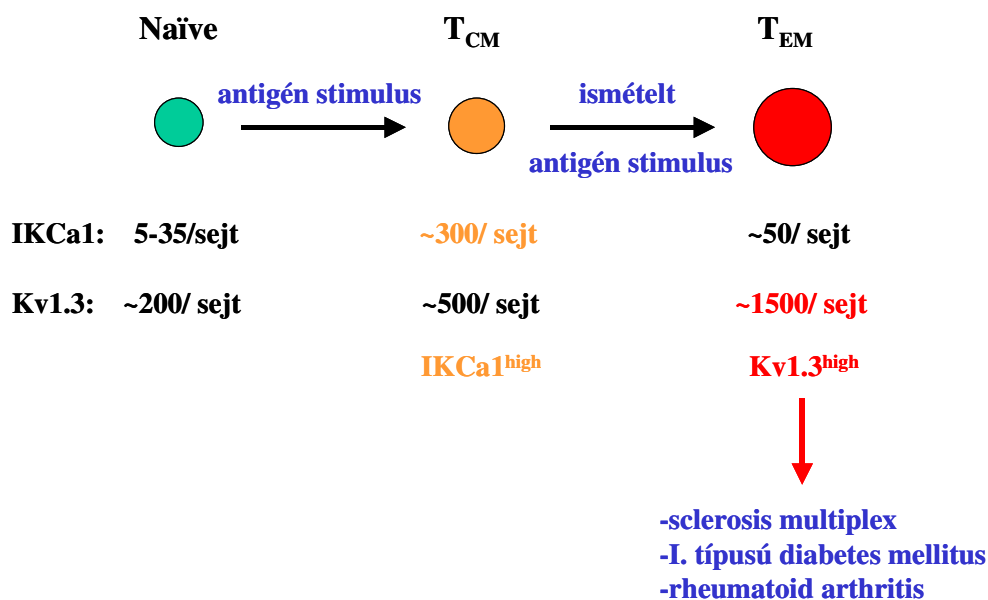
$\beta$ -skorpió toxinok a csatornák aktivációjának mechanizmusára hatnak (Meves és mtsai, 1986, Strichartz és mtsai, 1987, Thomsen és Catterall 1989). A peptidek közül több mint 120-ról tudjuk, hogy gátolják a  $K^+$ -csatornákat (de la Vega és mtsai, 2003), többé-kevésbé szelektíven a különböző  $K^+$ -csatornák között. Ezek a toxinok hasonlóságot mutatnak: jellemzően 30-40 aminosavból állnak, mindegyikük rendelkezik egy  $\alpha$ -hélixszel és két  $\beta$ -redővel, melyek három vagy négy diszulfid híddal vannak összekapcsolva (3. ábra). Általános szerkezeti tulajdonságuk még a nagy affinitással kötődő toxinoknak az ún. „eszenciális diád”, amely egy lizinből és egy tőle kilenc pozícióval C-terminális irányban elhelyezkedő aromás aminosavból áll (Dauplais és mtsai, 1997). A toxinok hasonló 3 dimenziós szerkezete miatt a centrális lizin és az aromás aminosav  $\alpha$  szénatomja egymástól néhány angstrom távolságra van a molekula azon felszínén, mely az ioncsatornák extracelluláris pórusa felé tekint (3. ábra). Az aromás aminosav azonban nem tűnik szükségesnek a hatékony gátláshoz, de annál inkább a különböző csatornatípusok közötti szelektivitáshoz, mint pl. a Kv1.2 és Kv1.3 között. Ezzel szemben a diád lizin aminosavjának pozitív töltésű oldallánca, amely a blokkolás során a  $K^+$ -csatorna szelektivitási filterébe nyúlik bele, nagyon fontos a nagy affinitású gátláshoz. Mindemellett a toxin és a csatorna közötti hosszantartó összekapcsolódás több ponton történő, különböző mechanizmusokon keresztüli kölcsönhatást igényel (Aiyar és mtsai, 1996). A toxinok és a csatorna fehérjék komplementer mutagenezise, valamint a termodinamikai mutáns ciklus analízis vizsgálatok azt mutatták, hogy három alapvető mechanizmus járulhat hozzá a toxin-csatorna kölcsönhatáshoz. Az egyik ezek közül az ún. hosszútávú elektrosztatikus kölcsönhatás, ami a többszörösen pozitív töltésű toxin és a csatorna extracelluláris bejáratának negatív töltései között ébrednek. A másik, a pozitív töltésű diád lizin szempontjából lényeges kölcsönhatás a rövid-távú, specifikus elektrosztatikus kölcsönhatás, és végül az oldalláncok közötti sztérikus kölcsönhatás. Ez utóbbi szempontból kiemelendő a charybdotoxin (ChTx) Shaker típusú Kv csatornák iránti affinitásának vizsgálatakor izolált kölcsönhatás: egyetlen aminosav oldallánc „térfogatának” jelentős csökkentése a csatorna fehérje turret részében (*Shaker* F425G) a ChTx affinitás kb. 1000-szeres emelkedését okozta. Nagyon valószínű az is, hogy egy toxinnak a különböző csatornák közötti szelektivitását az határozza meg, hogy mennyire különböznek a toxin-csatorna kontaktust létrehozó pontok és a következményes fizikokémiai kölcsönhatások. A nagy szelektivitás igen fontos abban az esetben, ha a toxint, vagy annak származékát a jövőben terápiás célokra szeretnék használni, egy adott sejttípus speciális funkciójának módosításán keresztül. Ugyankor a majdani terápia mellékhatásának minimalizálása miatt is fontos a nagy szelektivitás, hogy más ioncsatorna típusra a toxin ne fejtsen ki hatást.



**3. ábra:** Skorpió toxin és a kálium csatorna pórusa. (*bal panel*) A kálium csatorna keresztmetszetét bemutató rajz krisztallográfiai adatok és csatornagátló szerek strukturális adatai alapján készült. Az rajzon láthatjuk, hogy az ionok vezetését megvalósító csőszerű rész kiszélesedik az intracelluláris oldalnál. Kb. a membrán átmérőjének felétől kezdődően egy vízzel teli üreg található, amely összeszűkül a szelektivitási filternél, s végül kitérül az intracelluláris térrész felé egy egészen nagy felszínt formálva. A sejtől kifelé áramló kálium ionok a szelektivitási filternél megválnak hidrátburkuktól és a filteren keresztül egymás után, sorban haladnak keresztül. A legtöbb toxin a csatorna külső szájához kötődik, több ponton kontaktust kialakítva a csatorna aminosavaival. Sok toxin rendelkezik egy olyan lizin aminosavval, amely pozitív töltésű oldallánca belenyúlik a csatorna szelektivitási filterébe. Ezzel szemben sok kismolekula gátlószer a membránon keresztül hatolva a csatornát az intracelluláris oldal felől blokkolja. (*jobb panel*) Felső panel: A ChTx NMR-technikával meghatározott szerkezete (RasMol 2.7.2.1 és Protein Data Bank entry 2crd). Azok az aminosav oldalláncok, amelyek a funkcionális diád-ot alkotják, pálcikákkal vannak megjelenítve. Alsó panel: Az S1-S2 által létrehozott pórusrégió a KcsA csatornában, röntgenkrisztallográfiai adatok alapján (RasMol 2.7.2.1 és Protein Data Bank entry 1bl8). A bemutatott ábra megfeleltethető a K<sup>+</sup>-csatornák S5-S6 által alkotott pórusrégióknak.

Laboratóriumunk molekuláris farmakológiai irányú kutatásának középpontjában a humán T-sejtek és azok Kv1.3 ioncsatornái állnak. A T-sejtek egyes altípusai különböző mértékben fejezik ki a Kv1.3 és az IKCa1 csatornákat, így válik lehetővé a Kv1.3 csatornát gátló toxinok terápiás célú felhasználása (Wulff és mtsai, 2003a). A nyugvó T-sejtek átlagosan ~200-400 Kv1.3 csatornát és 8-10 IKCa1 csatornát fejeznek ki. A sejtaktiváció után a sejt felszíni antigénexpressziótól, és az ezzel párosuló élettani funkciótól függően (Sallusto és Lanzavecchia 2000) különböző mértékben változik a sejtek által expresszált Kv1.3 és IKCa1

csatornák száma (4. ábra). Az érett, de antigénnel még nem stimulált naíve T-sejtek antigén stimulációja a Kv1.3 csatornák expressziójának enyhe (~250/sejt ~400/sejt), ugyanakkor az IKCa1 csatornák expressziójának jelentős fokozódásával (8-10/sejt 500/sejt) jár együtt, amely Kv1.3<sup>low</sup>IKCa1<sup>high</sup> csatorna-fenotípust eredményez. Az antigén stimulációt követően a T-sejtek nagy része rövid élettartamú ún. armed effektor sejt, kis része pedig különböző típusú memória T-sejtté differenciálódik. A centrális memóriasejtek (T<sub>CM</sub>) a nyirokcsomókba vándorolnak, ahol a megfelelő antigént prezentáló sejtekkel történő stimulációjukat követően viszonylag hosszú idő alatt differenciálódnak effektor sejtekké és kerülnek ki a gyulladás helyére. Az aktivált T<sub>CM</sub> sejteket a naíve T-sejtekhez hasonlóan a Kv1.3<sup>low</sup>IKCa1<sup>high</sup> csatorna-fenotípus jellemzi. Ezzel szemben az effektor memória sejtek (T<sub>EM</sub>), melyek közvetlenül eljutnak a gyulladás helyszínére és azonnali effektorfunkcióval rendelkeznek, aktivációjukat követően igen nagy számban fejeznek ki Kv1.3 csatornákat (kb. 1500/sejt), míg IKCa1 csatorna expressziójuk nem jelentős (Kv1.3<sup>high</sup>IKCa1<sup>low</sup> csatorna-fenotípus) (4. ábra). Így az IKCa1 csatornák számának megnövekedését követően a naíve és T<sub>CM</sub> sejtek proliferációja Kv1.3 inhibitoroktól függetlenné válik, szemben a T<sub>EM</sub> sejtek proliferációjával, ami kizárólag Kv1.3-függő (Wulff és mtsai, 2003b). A csatornaexpresszió különbözősége tehát lehetővé teszi, hogy a különböző funkcióval rendelkező T-sejt altípusok proliferációját a Kv1.3 (T<sub>EM</sub> sejtek) vagy az IKCa1 (naíve és T<sub>CM</sub> sejtek) specifikus blokkolásával meggátoljuk (Chandy és mtsai, 2004).



**4. ábra:** A nyugvó és aktivált T-limfociták Kv1.3 és IKCa1 csatorna-expressziója. A kicsiméretű sejt a nyugvó, a nagyobb méretű sejtek az aktivált T-limfocitákat szimbolizálják. A nyilak a differenciálódást és a sejtaktivációt mutatják.

Chandy és munkatársai azt találták, hogy sclerosis multiplexben, az 1-es típusú diabetes mellitusban ill. a rheumatoid arthritisben szenvedő betegekben a betegség kialakulásáért felelős autoreaktív T-sejtek főleg effektor memória ( $T_{EM}$ ) sejtek, amelyek nagy számban expresszálnak Kv1.3 csatornákat. Ezzel szemben a betegekben származó, más antigén specificitással bíró T-sejtek, ill. az egészséges kontroll személyekből származó autoreaktív T-sejtek főleg naïve ill. centrális memória ( $T_{CM}$ ) sejtek, amelyek kisebb számban expresszálnak a Kv1.3 csatornákat. A  $T_{EM}$  sejtekben az antigén prezentációt követően a Kv1.3 csatornák az immunológiai szinapszisba vándorolnak. Specifikus Kv1.3 csatorna-blokkolók nem akadályozzák meg az immunológiai szinapszis létrejöttét, azonban gátolják a  $Ca^{2+}$  jelátvitelt, a citokin termelést és végső soron a  $T_{EM}$  sejtek proliferációját. Ez a hatás specifikus volt a  $T_{EM}$  sejtekre, mivel a nyugvó (naïve) és  $T_{CM}$  sejtek az IKCa1 csatornák fokozott expressziójával mentesülnek a Kv1.3 blokkolás proliferációt gátló hatása alól. Patkányokban a Kv1.3 csatorna gátlószerei hatékonyan csökkentették a kísérletes autoimmun encephalomyelitis tüneteit, megakadályozták a pristin indukált arthritis kialakulását és csökkentették az experimentális autoimmun diabetes incidenciáját arra hajlamos (DP-BB/W) törzsekben. A Kv1.3 csatornablokkolók ugyanakkor az eddigi vizsgálatok szerint nem rendelkeznek szisztémás toxicitással, nem mutagének. Mindezek alapján várható a Kv1.3 csatornablokkolók terápiás célú felhasználása autoimmun betegségek esetében (Beeton és mtsai, 2006, Chandy és mtsai, 2004, Panyi és mtsai, 2004a, Panyi és mtsai, 2004b, Wulff és mtsai, 2003a).

A specifikus blokkolók fontos információt szolgáltatnak a Kv csatornák pórus régiójának szerkezetéről is. A toxint kötő régiók, receptorok és a toxinok komplementer mutagenézisével pl. következtetni lehet a pórus szerkezetére és a molekuláris kölcsönhatásokra (Gross és MacKinnon 1996). A pórus és a szelektív filter szerkezetére ezen adatok alapján levont indirekt következtetéseket Roderick MacKinnon röntgenkristallográfiás kísérletekkel igazolta, melyért 2003-ban kémiai Nobel díjat kapott. A feszültségfüggő  $K^{+}$ -csatornák kristályszerkezete alapján a csatornák extracelluláris pórusa négy szekvenciális  $K^{+}$  kötőhelyet tartalmaz, ezen kívül egy extracelluláris rehidrációs/dehidrációs kötőhelyet is feltételeznek (Doyle és mtsai, 1998, Jiang és mtsai, 2003a, Zhou és mtsai, 2001). A toxinok receptorának jelentős részét az S5-S6 hélix közötti hurok S5-höz közeli ún. „turret” régiója, valamint a pórus szelektív filterében elhelyezkedő aminosavak oldalláncai adják. A kationok csatornaszájadékból történő kiszorításában kitüntetett szerepet játszik a csatornaszájadékba mélyen behatoló, pozitív töltésű lizin (Dauplais és mtsai, 1995, Tytgat és mtsai, 1999).

In vitro kísérletekben strukturálisan nagyon különböző peptid és nem peptid típusú Kv1.3 csatornablokkoló molekulák képesek gátolni a mitogén indukált [<sup>3</sup>H] timidin beépülést, a citokin termelést, a gén expressziót, a T-sejt proliferációt és az in vivo immunválaszt a csatorna blokkolásához szükséges koncentrációban (Koo és mtsai, 1997). Ezek a csatornablokkolók (pl. 4-aminopiridin, tetraetil-ammónium, progeszteron, correolide) mikromoláris illetve millimoláris koncentrációban gátolták a feszültségfüggő K<sup>+</sup>-csatornákat (DeCoursey és mtsai, 1984, Ehring és mtsai, 1998, Hanner és mtsai, 1999). Az első nanomoláris koncentrációban is hatékony peptid toxin: a Charybdotoxin (ChTx) (Kv1.3 csatornára K<sub>d</sub> = 2.2 nM), amit skorpió méregből izoláltak (Price és mtsai, 1989, Sands és mtsai, 1989). Később több nano- és pikomoláris affinitású skorpióméreg eredetű csatornablokkoló peptidet is felfedeztek. Ezek a toxinok azonban nem csak a Kv1.3 csatornát, de más, hasonló szerkezetű ioncsatornákat is gátolnak hasonló nagyságrendű koncentrációban. Főleg az egyazon családba tartozó ioncsatornákat, így a Kv1.x többi tagjait elsősorban, mint a Kv1.2-t, mely szerkezetileg nagyon hasonló a Kv1.3-hoz.

Toxin	K <sub>d</sub> (nM)		Referencia
	Kv1.3	Kv1.2	
Anuroctoxin (AnTx)	0.73	6	(Bagdany és mtsai, 2005)
Charybdotoxin (ChTx)	2.6	14	(Grissmer és mtsai, 1993)
<i>Centruroides suffusus suffusus</i> toxin (Css20)	7.2	1.3	(Corzo és mtsai, 2008)
Hongotoxin-1	0.09	0.17	(Koschak és mtsai, 1998)
HsTX1	0.011	>500	(Regaya és mtsai, 2004)
KTX	0.65	>1000	(Grissmer és mtsai, 1994)
Noxiustoxin (NxTx)	1	2	(Leonard és mtsai, 1992)
Margatoxin (MgTx)	0.05	2	(Leonard és mtsai, 1992)
Maurotoxin	3300	0.7	(Visan és mtsai, 2004)
OSK1	0.014	5.4	(Mouhat és mtsai, 2005)
OSK1-20	0.037	78	(Mouhat és mtsai, 2005)
OSK1-12,16,20	0.059	196	(Mouhat és mtsai, 2005)
<i>Pandinus Imperator</i> toxin 1 (Pi1)	11	1	(M'Barek és mtsai, 2003)
<i>Pandinus Imperator</i> toxin 2 (Pi4)	>10	0.008	(M'Barek és mtsai, 2003)
<i>Tityus stigmurus</i> toxin (Tst26)	1.9	10.7	(Papp és mtsai, 2009)

**1. Táblázat** Néhány peptid toxin Kv1.3 és Kv1.2 csatornákra vonatkozó egyensúlyi disszociációs állandója (K<sub>d</sub>).

## ***Toxinok specificitásának növelése rekombináns technikákkal***

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

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

Az OSK1 38 aminosavból álló, az Orthochirus scrobiculosus skorpió venomjából származó peptid, ami gátolja a Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3 ill. az IKCa1 csatornákat rendre 0,6-, 5,4-, 0,014- és 225 nM-os félhatásos koncentrációkban. Az ismert Kv1 családkhoz tartozó csatornák blokkolóinak aminosav szekvenciájával összevetve az OSK1 toxin szekvenciáját, felismerhetővé váltak azok a különbségek, melyek megváltoztatásával az OSK1 toxin szelektivitási és affinitási tulajdonságainak megváltozása is remélhető volt. Mindezek alapján a 16-os pozícióban lévő glutamátot lizinre cserélve (E16K), valamint 20-as pozícióban lévő lizint aszpartátra (K20D), a 12-es arginint prolinra (R12P) új tulajdonságú toxinokat kaptak: [K<sub>16</sub>]-OSK1, [D<sub>20</sub>]-OSK1, [K<sub>16</sub>,D<sub>20</sub>]-OSK, [P<sub>12</sub>,K<sub>16</sub>,D<sub>20</sub>]-OSK1 jelzésűeket, a különböző pontmutációknak – egy, vagy egyszerre több – megfelelően (Mouhat és mtsai, 2005). A [K<sub>16</sub>]-OSK1 affinitása Kv1.3-ra 0.067 nM-ra romlott, míg a többi, korábban gátolt csatornákra vonatkozóan ugyanaz maradt. A [K<sub>16</sub>,D<sub>20</sub>]-OSK esetében nőtt az affinitás a Kv1.3-ra: 0.003 nM, míg a többi csatornára alig változott. A [D<sub>20</sub>]-OSK1 és a [P<sub>12</sub>,K<sub>16</sub>,D<sub>20</sub>]-OSK1-nál bár csökkent az affinitás a Kv1.3-ra vonatkozóan, de nem nagyságrenddel (kb. 2- ill. 4-szer nagyobb  $K_d$ -k), azonban a többi csatornára vonatkozóan 1- vagy 2 nagyságrenddel csökkent.

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

## Célkitűzések

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

# Anyagok és módszerek

## **Toxinok**

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

## **Sejtek és ioncsatorna gének**

### Limfocita-szeperálás (Kv1.3 ioncsatorna)

A Kv1.3 áramokat humán perifériás T-limfocitákon mértük. A mononukleáris sejteket Ficoll gradiens centrifugálással nyertük egészséges donoroktól származó heparinizált humán vérből. A sejteket kétszer mostuk Ca<sup>2+</sup> és Mg<sup>2+</sup> mentes Hanks' oldattal, mely 25 mM HEPES-t is tartalmazott (pH: 7,4). A sejteket 0,5×10<sup>6</sup>/ml koncentrációban 3-4 napig tenyésztettük 5% CO<sub>2</sub> mellett 37°C-on 24 lyukú tenyésztőedényekben, RPMI-1640 médiumot használva, mely tartalmazott 10% fetális borjú savót (Hyclone, Logan, Utah), 100 IU/l penicillint, 100 µg/ml streptomycint és 2 mM L-glutamint. A tenyésztő médiumhoz különböző koncentrációjú (2,5, 5, 7,5 és 10 µg/ml) phytohemagglutinint (PHA-P, Sigma-Aldrich Kft, Hungary) adtunk a K<sup>+</sup>-csatorna expresszió növelése érdekében (Deutsch és mtsai, 1986).

### Különböző ioncsatornák heterológ expressziója

A Cos-7 tenyésztése és bennük tranziensen kifejezett csatornák:

A Cos-7 sejteket standard sejttenyésztési feltételek mellett tartottuk fent (Bagdany és mtsai, 2005). A **hIKCa1** ioncsatorna vizsgálatakor a sejtekbe tranziensen olyan dupla-gén plazmidot transzfektáltunk, mely kódolta a GFP fehérjét és az IKCa1 csatornát is (ajándék H. Wulff-tól, UC Davis, CA, USA). A többi, itt felsorolt ioncsatorna esetén két plazmid kotranszfekcióját végeztük: a GFP-t kódoló plazmidot a vizsgálni kívánt ioncsatornát kódoló plazmiddal együtt juttatuk be a sejtekbe. Ezek a csatornák a következők voltak: **hKv1.2** (pcDNA3/Hygro vektor, amely a teljes Kv1.2-t kódoló szekvenciát tartalmazza, ajándék S. Grissmer-től, U. of Ulm); **hKv1.4** (hKv1.4ΔN: az N-terminális inaktivációs egységet nem tartalmazó Kv1.4 mutáns, ajándék D. Fedida-tól, University of British Columbia, Vancouver, Canada); **rKv2.1** (ajándék S. Korn-tól, U. of Connecticut); **hNav1.5** (ajándék R. Horn-tól, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA, USA).

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

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

Ioncsatorna génekkel stabilan transzfektált sejtvonalak:

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

Tranziens transzfekció:

A sejteket (mind a COS-7-et, mind a tsA-201-et) Lipofectamine 2000 reagenst használva transzfektáltuk a gyártó (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) útmutatásai szerint, standard feltételek között tenyésztve. Röviden: A transzfektálást 35 mm átmérőjű petriedényben végeztük a sejtek kb. 80%-os konfluenciája mellett. A transzfekciót a zöld fluoreszcens

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

## ***Elektrofiziológia***

Méréseinket a patch-clamp technika (Hamill és mtsai, 1981) teljes-sejt (whole-cell) konfigurációjában végeztük, minden esetben szobahőmérsékleten (22-25 °C), Axopatch 200A és Multiclamp 700B patch-clamp erősítőket használva, feszültség-zár üzemmódban. Ez azt jelenti, hogy a vizsgált sejt membránpotenciálját konstans értéken tartjuk, miközben a sejtmembránon átfolyó áram nagyságát meghatározzuk. Az ingerlő feszültség-impulzusokat és az adatgyűjtést IBM kompatibilis személyi számítógép vezérelte Axon Digidata 1200 és 1322A illesztőegységen keresztül a pCLAMP8/10 programcsomag segítségével (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA). Méréseink során, szükség esetén soros ellenállás kompenzációt alkalmaztunk egészen 70%-ig, a soros ellenálláson eső feszültségből adódó hiba korrekciójának érdekében. Így a feszültséghibát minden esetben 5 mV alá csökkentettük.

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

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

Oldatok		
Fajtája	Ioncsatorna	Összetétele (mM)
Külső	Általában	145 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl <sub>2</sub> , 2.5 CaCl <sub>2</sub> , 5.5 glükóz, 10 HEPES (pH 7.35)
	hERG	140 Choline-Cl, 5 KCl, 2 MgCl <sub>2</sub> , 2 CaCl <sub>2</sub> , 0.1 CdCl <sub>2</sub> , 20 glükóz, 10 HEPES (pH 7.35)
Belső	Általában	140 KF, 2 MgCl <sub>2</sub> , 1 CaCl <sub>2</sub> , 10 HEPES és 11 EGTA (pH 7.22)
	hBKCa	140 KCl, 10 EGTA, 9.69 CaCl <sub>2</sub> , 5 HEPES (pH 7.2, [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>int</sub> = 5 μM)
	hIKCa1	150 K-aszpartát, 5 HEPES, 10 EGTA, 8.7 CaCl <sub>2</sub> , 2 MgCl <sub>2</sub> (pH 7.2, [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>int</sub> = 1 μM)
	hERG	140 KCl, 10 EGTA, 2 MgCl <sub>2</sub> , 10 HEPES (pH 7.3)

**2. Táblázat** A mérések során használt külső és belső oldatok összetétele a különböző ioncsatornák áramainak mérése esetében.

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

## Adatkiértékelés

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

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

$$RCF = \frac{K_d^n}{K_d^n + [Tx]^n}, \text{ ahol } RCF \text{ (Remaining Current Fraction) a megmaradó áramhányad}$$

$$\left( RCF = \frac{I}{I_0}, \text{ ahol } I \text{ és } I_0 \text{ az áramamplitudók a toxin adott koncentrációja mellett, ill. a toxin}$$

hiányában (kontroll oldatban)),  $K_d$  a disszociációs állandó,  $n$  a Hill-koefficiens és  $[Tx]$  a toxin-koncentráció.

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

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

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

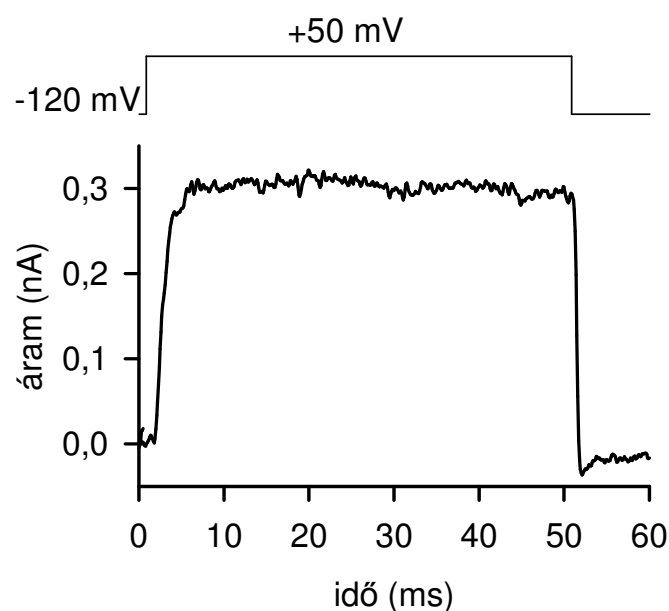
A teljes sejt áram inaktivációs kinetikáját az inaktivációs időállandóval ( $\tau$ ) jellemeztük, mely az áramgörbe leszálló szárához illesztett, egy exponenciális tagot tartalmazó függvény jellemző paramétere:  $I(t) = A \times e^{-t/\tau} + C$ , ahol  $I$  az aktuális áramerősség,  $C$  az egyensúlyi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

# Eredmények

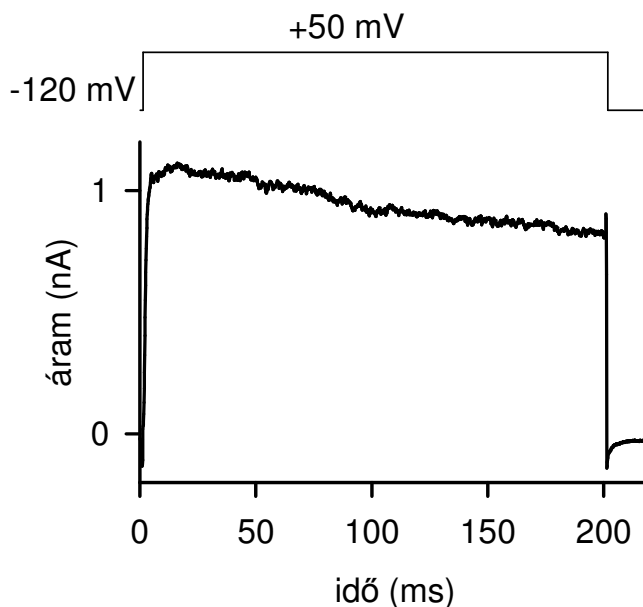
## ***A kísérletekben használt ioncsatornák ismertetője***

Kísérleteink során tíz különböző ioncsatornával dolgoztunk, melyek a következők: Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.4, Kv1.5, IKCa1 (K<sub>Ca</sub>3.1), BKCa (K<sub>Ca</sub>1.1), Nav1.5, hERG (Kv11.1), Kv2.1. Ezek mindegyike, az IKCa1-et kivéve, feszültség-kapuzott csatorna, azaz a sejtek membránpotenciáljának megváltozására aktiválódnak, válnak nyitott állapotúvá. Méréseink során a membránpotenciált a patch-clamp technika alkalmazásával két elektróda segítségével állítottuk be a kívánt értékekre és aktiváltuk ezzel a vizsgálni kívánt csatornát. Az IKCa1 esetében pedig ezzel a technikával hoztuk létre az áram folyásához szükséges hajtóerőt. Az alábbiakban bemutatott áramgörbék afelett mindig feltüntettük az alkalmazott feszültség-protokoll alakját is. Tekintsük át először, hogy kontroll körülmények között milyen ionáramokat mértünk a különböző csatornákon. Az ezt követő alfejezetben pedig majd azt tárgyaljuk, hogy a toxinok alkalmazása hogyan befolyásolta az ioncsatornákon átfolyó áramot. Emellett minden ioncsatornánál áttekintjük, hogy hol találhatóak meg és milyen funkcióval rendelkeznek.

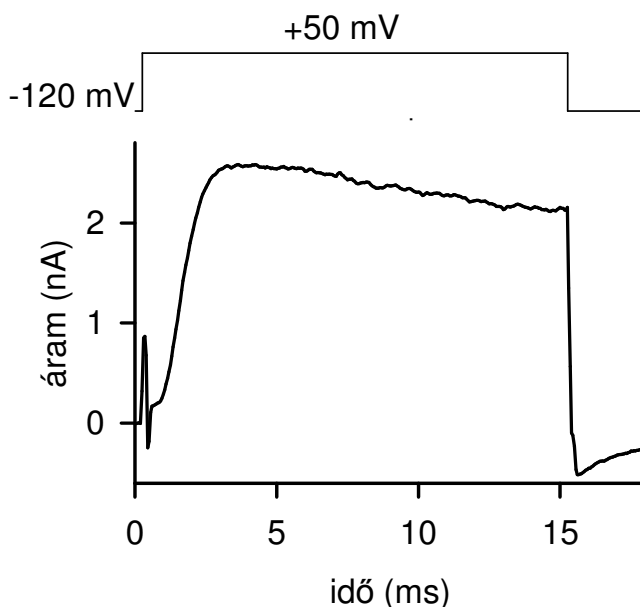
**Kv1.1:** az idegsejtek és a vázizom feszültségfüggő kálium csatornája. Ezen kívül megtalálható még a szívben, a retinában, a hasnyálmirigy Langerhans sziget sejtekben. Feladata a sejtek membránpotenciál értékének fenntartása, az idegsejtek és az izomsejtek elektromos ingerelhetőségének befolyásolása (Gutman és mtsai, 2005).



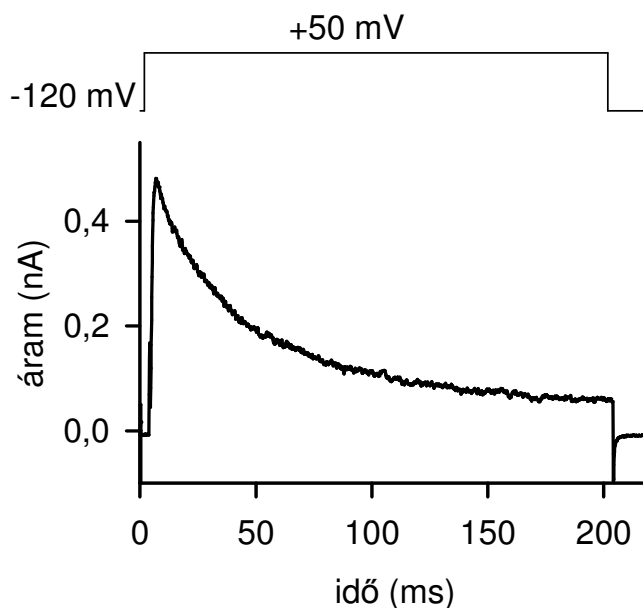
**Kv1.2:** a membránpotenciál fenntartásában és az elektromos ingerelhetőség módosításában játszik fiziológiásan szerepet a neuronokban és az izomsejtekben. Megtalálható ezen kívül az agyban, a gerincvelőben, Schwann sejtekben, a szívizomban (kamra, pitvar), a hasnyálmirigy Langerhans sziget sejtekben, a retinában, a simaizomban, és a PC12 sejtekben (Gutman és mtsai, 2005).



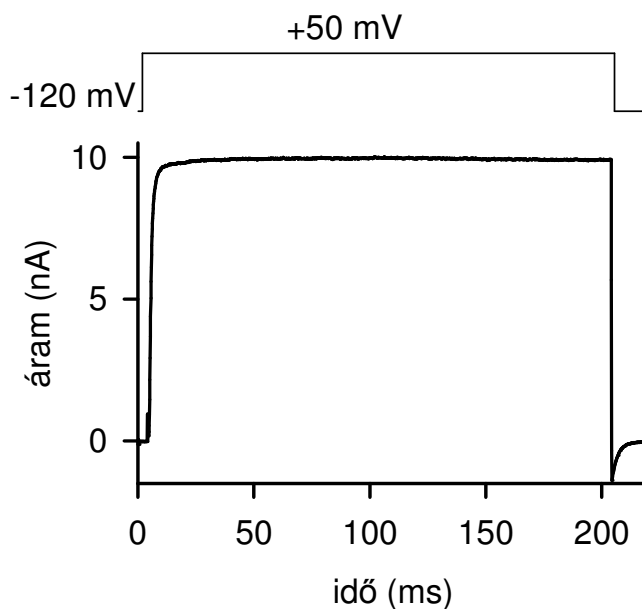
**Kv1.3:** fiziológiás funkciója a membránpotenciál és a  $Ca^{2+}$ -jelátvitel szabályozása. Ez az ioncsatorna az immunrendszer és a központi idegrendszer jellemző feszültségfüggő ioncsatornája, de fellelhető az agyban, a tüdőben, hasnyálmirigy Langerhans szigetekben, a tímuszban, a lépben, a nyirokcsomóban, a fibroblasztokban, B- és T-limfocitákban, az elő(progenitor)-B-sejtekben, a mandulában, makrofágokban, mikrogliaokban, oligodendrocitákban, oszteoklasztokban, vérlemezkékben, és a herében is (Gutman és mtsai, 2005).



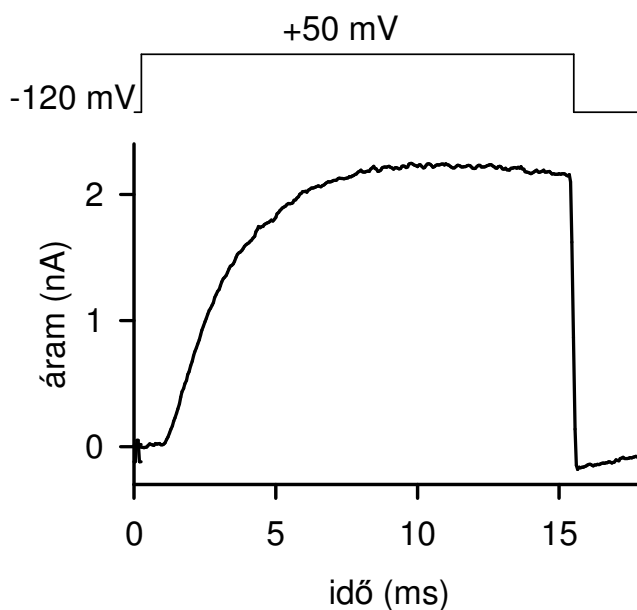
**Kv1.4:** gyorsan inaktíválódó feszültségfüggő kálium csatorna. Megtalálható az agyban, a tüdőkarcinómában, a vázizomban, a szívben, a hasnyálmirigy Langerhans sziget sejtekben (Gutman és mtsai, 2005).



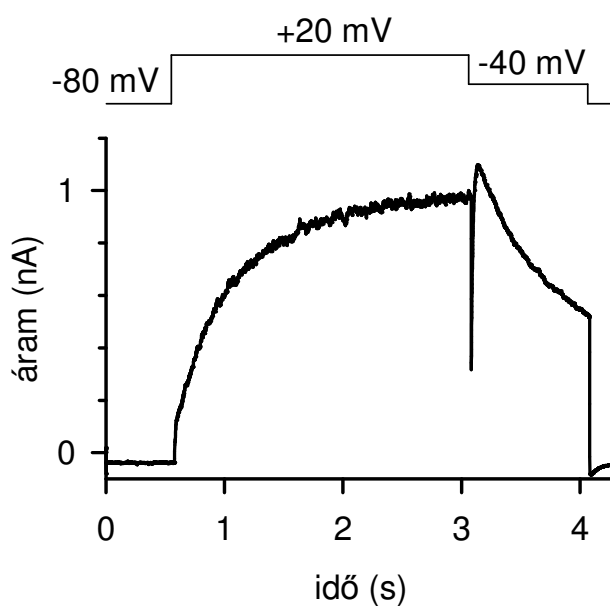
**Kv1.5:** ultragyorsan aktiválódó feszültségfüggő kálium csatorna. Fiziológias funkciója a membránpotenciál fenntartása, az elektromos gerjeszthetőség modulálása neuronokban. Megtalálható még az aortában, a vesében, a hasban, a simaizomban, az embrióban, a hippocampusban és a cortexben (Gutman és mtsai, 2005).



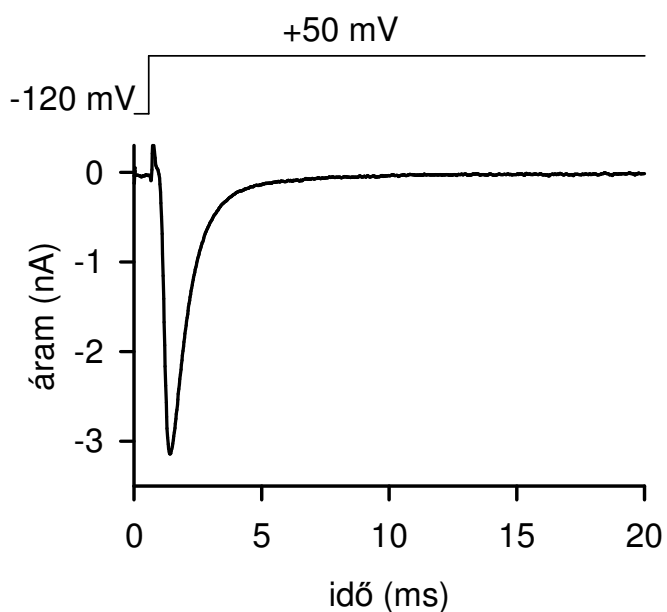
**Kv2.1:** Fiziológias funkciója a membránpotenciál fenntartása, az elektromos gerjeszthetőség modulálása neuronokban és az izomsejtekben. Megtalálható az agyban, a szívizomban (pitvarban, kamrában), a vázizomban, a retinában, a szemben, a tüdőben, a P12 sejtekben (Gutman és mtsai, 2005).



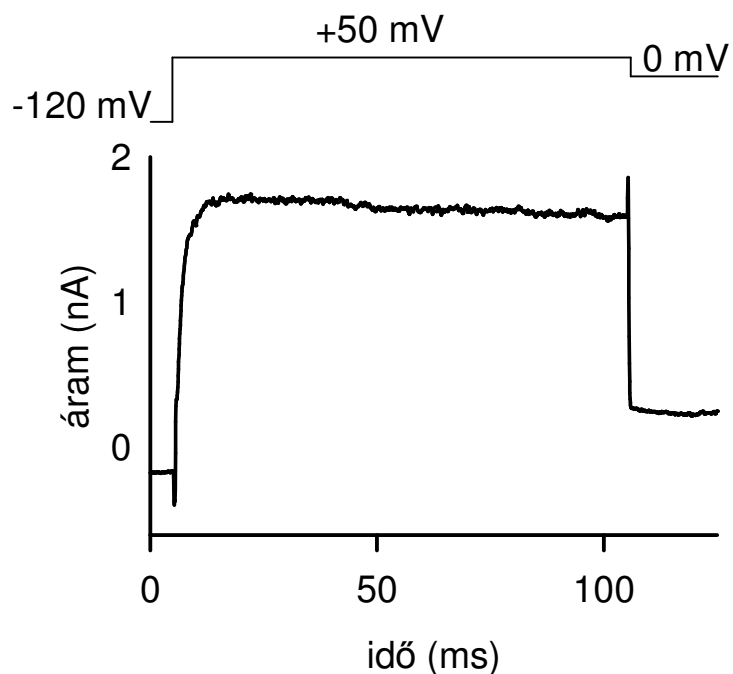
**hERG (Kv11.1):** befelé egyenirányító feszültségfüggő kálium csatorna. Fiziológias funkciót a szívizomsejtek repolarizációjánál játszik. Megtalálható ezen kívül még hippocampusban, az agyban, a vesében, a májban, a tüdőben, a herékben, a mandulában, a méhben, a microgliában (Gutman és mtsai, 2005).



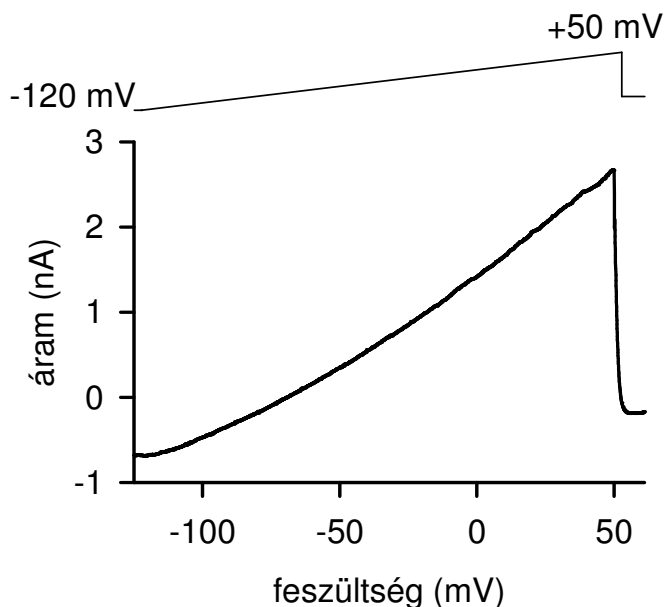
**Nav1.5:** Fiziológias funkciója a szív akciós potenciáljának a kialakításában van. Megtalálható ezen kívül még az agyban és a vázizomban is (<http://www.iuphar-db.org>).



**BKCa (K<sub>Ca</sub>1.1):** nagy vezetőképességű, kalcium és feszültség kapuzott kálium csatorna. Alapvető fontosságú a simaizom és a neuronok ingerelhetőségének szabályozásában.



**IKCa1 (K<sub>Ca</sub>3.1):** közepes konduktanciájú Ca<sup>2+</sup>-aktivált K<sup>+</sup> csatorna. A Kv1.3 mellett a T-limfociták másik kálium-csatornája. Fiziológiai funkciója a T-sejtek jelátviteli folyamatában a Ca<sup>2+</sup>-jel kialakulásánál van. Megtalálható még a B-limfocitákban, a simaizomsejtekben, a fibroblasztokban, a tüdőben, a hasban, a lépben, a nyirokcsomóban, csecsemőmirigyben (<http://www.iuphar-db.org>).



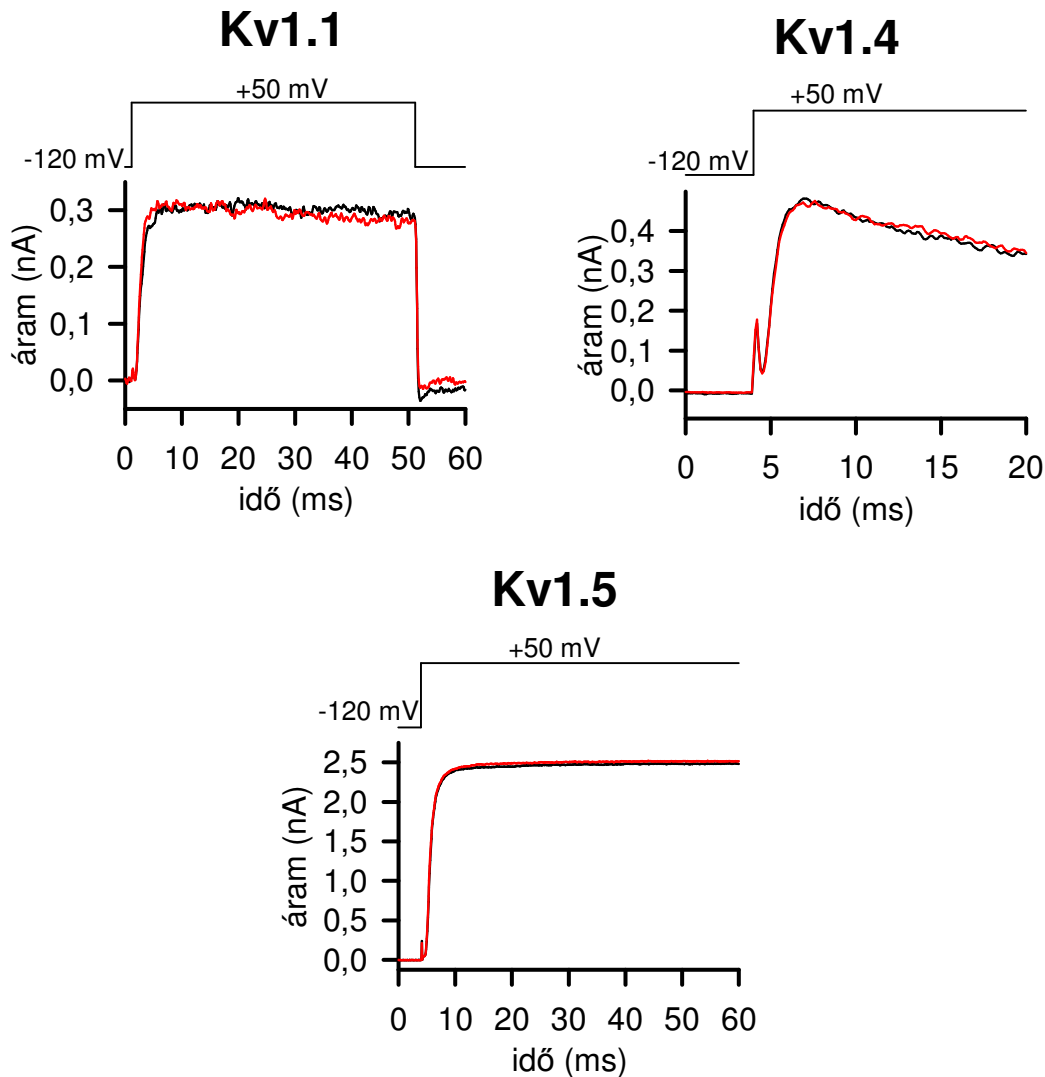
### **A C<sub>ss</sub>20 és a T<sub>st</sub>26 szelektivitása**

A C<sub>ss</sub>20 és a T<sub>st</sub>26 toxinokat különböző kálium-csatornákon és egy feszültség-kapuzott nátrium-csatornán teszteltük teljes-sejt ionáramokat mérve patch-clamp technika segítségével. A kálium-csatornák közül öt a feszültség-kapuzott *Shaker*-család tagja: Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.4 és Kv1.5. A Ca<sup>2+</sup>-aktivált K<sup>+</sup> csatornák közül a közepes konduktanciájú, feszültség-független IKCa1 (K<sub>Ca</sub>3.1) és a nagy konduktanciájú, feszültség- és Ca<sup>2+</sup>-aktivált kálium-csatornák áramait mértük a két toxin jelenlétében. A potenciális kardiológiai hatások megismeréséhez a C<sub>ss</sub>20 és a T<sub>st</sub>26 hatását mértük Nav1.5 és hERG (Kv11.1) csatornákon, melyek rendre a szívizom nátrium- és egyik fajta kálium-csatornái. A C<sub>ss</sub>20 hatását a központi idegrendszerben kifejeződő Kv2.1 csatornán is tanulmányoztuk. Ezeket az ioncsatornákat különböző sejtvonalakban expresszáztattuk, a megfelelő feszültség-protokollok alkalmazásával kiváltottuk az ionáramokat (részletesebben alább, valamint az *Anyagok és módszerekben* és az ábraszövegekben), és mértük, hogy a 10 nM koncentrációjú toxin (C<sub>ss</sub>20 vagy T<sub>st</sub>26) mekkora gátló hatást fejt ki a különböző csatornákra. A 10 nM-os

toxin koncentrációt egyrészt az alapján választottuk meg, hogy az irodalmi adatok alapján a Kv csatornák jó gátlószerei az alacson nM-pM koncentráció tartományban már hatásosak, másrészt a vizsgálatra rendelkezésre álló peptid mennyiség igen komoly gátlót jelentett volna a magasabb peptid koncentrációk mellett végzett kísérleteknek.

Mivel érdeklődésünk középpontjában a Kv1.3 ioncsatorna áll, ezért szelektivitási vizsgálatainkhoz először a Kv csatornák közül választottunk. Ezen belül is a Kv1.x családba tartozó csatornák mutatják a legnagyobb genetikai hasonlóságot a Kv1.3 csatornához. Az 5. ábra azt mutatja, hogy a Kv1.4 és Kv1.5 csatornákra nincs hatása a Css20 peptidnek 10 nM koncentrációban. Teljesen hasonló a helyzet Tst26 esetében is, a toxin nem gátolta az ionáramokat (nincs bemutatva, ld. eredeti közlésemény). Ezen megállapításaink jó egyezésben vannak korábbi eredményekkel, ti. a Kv1.4 és a Kv1.5 toxin-rezisztens csatorna (Gutman és mtsai, 2005), azaz jelenleg nem ismert olyan peptid, amelyik gátolná ezeket a csatornákat. Ezzel szemben a Kv1.1 csatornákat más skorpió-toxinok hatékonyan gátolják (mint pl. a Kaliotoxin, Margatoxin, Hongotoxin (Gutman és mtsai, 2005)), ugyanakkor sem a Css20 (5. ábra) sem pedig a Tst26 (nincs bemutatva, ld. eredeti közlésemény) nem gátolta Kv1.1 áramokat. Bár a rendelkezésünkre álló toxinmennyiség meglehetősen korlátozott volt, egyetlen csatorna vizsgálatát azonban el tudtuk végezni 100 nM toxin koncentráció mellett is. Ez a Kv1.1 csatorna volt, melynél a megmaradó áramhányadnak  $0.957 \pm 0.005$  ( $n=3$ ) adódott 100 nM Tst26 esetében (eredmény nincs bemutatva), amely tisztán jelzi azt, hogy a peptidnek nincsen Kv1.1 gátló hatása még ebben a koncentrációban sem.

A fentiekkel szemben a Kv1.2 és Kv1.3 csatornákat mind a Css20, mind pedig a Tst26 jelentősen gátolta 10 nM koncentrációban. E két csatornára vonatkozó eredményeinket később mutatom be (ld. 10-11. ábra).

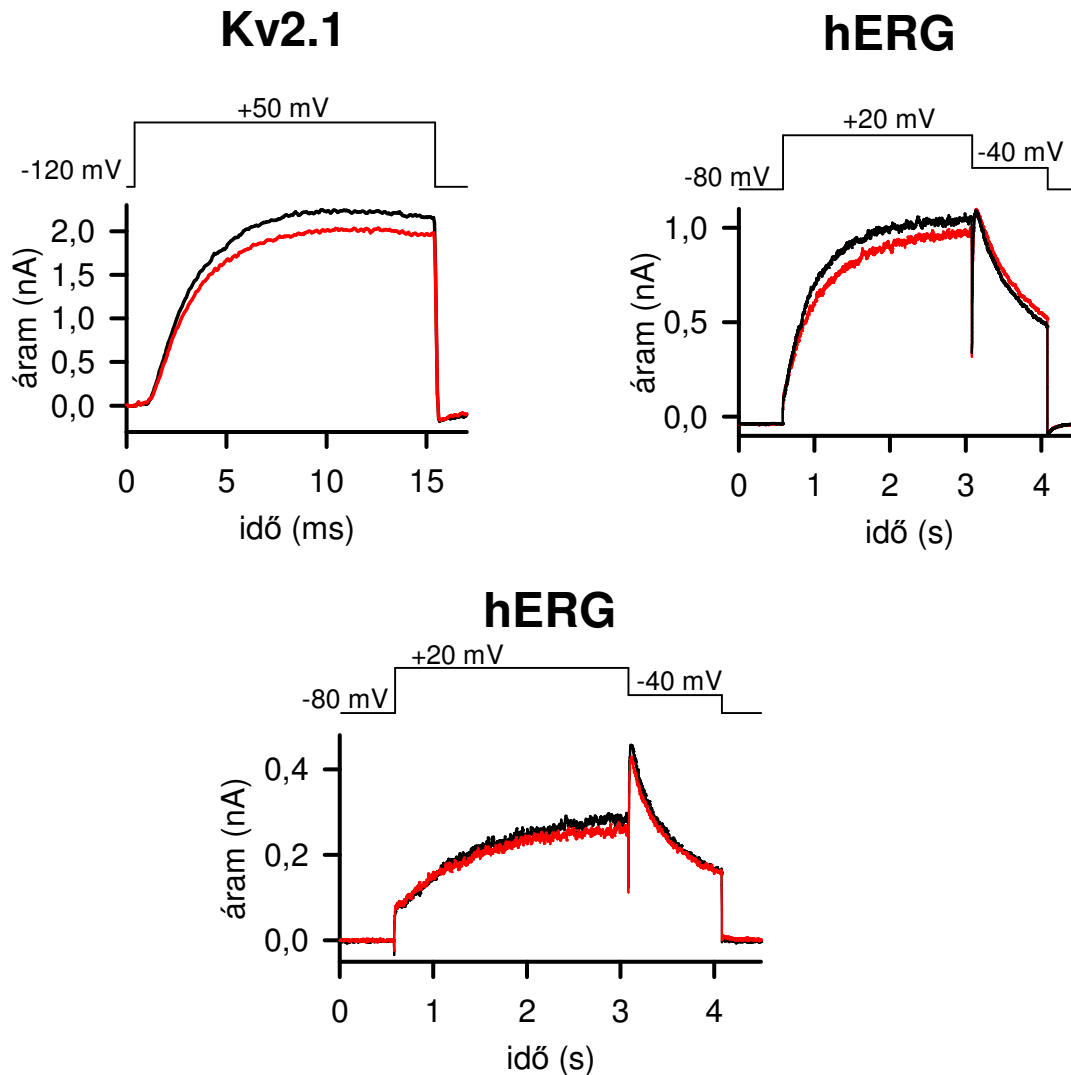


**5. ábra** A Css20 hatása Kv1.1, Kv1.4 és Kv1.5 csatornákra. Az (A-C) paneleken reprezentatív áramgörbék láthatók 10 nM Css20 jelenlétében (pirossal) és hiányában (feketével) a különböző vizsgált Kv1.x ioncsatornákra vonatkozóan, kivéve a Kv1.2-t és a Kv1.3-t, amelyek a 10. ábrán láthatóak. A feszültség-protokollokat a görbék felett tüntettem fel. Az ionáramokat minden esetben  $-120$  mV tartófeszültségről  $+50$  mV-ra történő lépéssel váltottuk ki, 15 másodperces időközönként. A mintavételezési frekvencia: 10 kHz; aluláteresztő szűrő: 5 kHz; digitális, 3 pontos un. boxcar szűrővel szűrőzve. A Kv1.4 és a Kv1.5 áramoknál 200 ms hosszúságú depolarizáló impulzusokat használtunk. Ezen utóbbi áramgörbék esetében a teljes görbének csak egy rövidebb részét mutatom be a csúcáramok könnyebb összehasonlíthatósága érdekében.

A Shaker családba tartozó feszültség-kapuzott  $K^+$ -csatornákon felül megvizsgáltuk a Css20 két további, szintén feszültség kapuzott kálium csatornára gyakorolt hatását: a hERG és a Kv2.1 csatornákat gátló képességét kívántuk meghatározni. A hERG csatorna vizsgálata ebből a szempontból igen kritikus, ugyanis amennyiben a peptid a hERG csatornákat gátolja, (erre van példa az irodalomban (REF ERG toxin)), úgy ez megakadályozhatja a peptid biológiai aktivitásának mérését állatkísérletes modellekben. A hERG csatornák ugyanis szívizomsejtekben fejeződenek ki, a csatornák árama jelentősen hozzájárul a szívizom akciós potenciál repolarizációs fázisához. Ennek megfelelően a hERG csatornák gátlása a repolarizáció zavarához, szerzett hosszú QT szindrómához és az arra jellemző

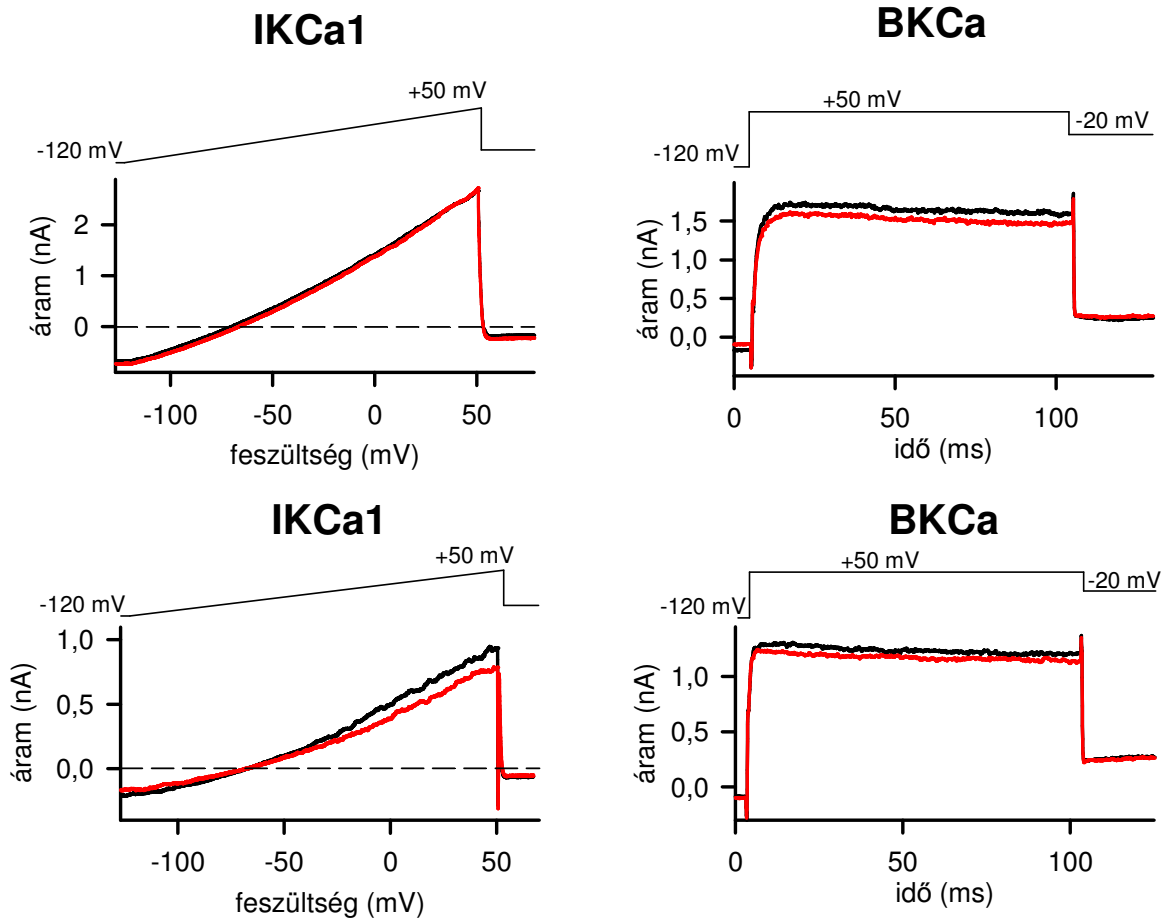
ritmuszavarhoz vezethet. Az 6. ábra azt mutatja, hogy a Css20 sem a hERG sem pedig a Kv2.1 áramokat nem gátolja. A hERG áram gátlásának hiánya csökkenti annak lehetőségét, hogy állatkísérletekben ritmuszavar alakulhasson ki. A Css20-ra kapott eredményekhez teljesen hasonló eredményeket kaptunk Tst26 esetében is: 10 nM peptid nem gátolta a hERG áramot.

Meg kell itt említenünk a hERG áram kiváltásának módját: A feszültség protokoll első részében 0,5 s-ig -80 mV-on tartjuk a membránpotenciált, majd +20 mV-ra depolarizálunk, ami 2,5 s-ig tart, aztán -40 mV-ra állítjuk be a membránpotenciált 1 s-ig, s majd végül visszatérünk a tartófeszültségre (-80 mV, lásd a 6. ábra hERG paneljein). Ezzel a protokollal ki tudjuk küszöbölni a HEK-293 sejtek endogén kálium áramait. Ezek a gyorsan aktiválódó és lassan inaktiválódó  $K^+$ -áramok megjelennek a +20 mV-ra történő depolarizációnál, és minimálisra csökkennek a -40 mV-ra történő depolarizációs lépésnél. Ez köszönhető egyrészt az így lecsökkent hajtóerőnek, valamint az inaktiváció magas fokának. A hERG áram a +20 mV-ra történő depolarizációs lépés alatt egy konstans értékre növekszik, amikor egyensúlyba kerülnek a nyitott és az inaktivált állapotok. Így az áram alakja a +20 mV-ra történő depolarizációs lépés alatt minden egyes sejten az endogén és a hERG csatornákon átfolyó áramokból adódik össze. A -40 mV-ra történő depolarizációs lépés alatt a hERG csatornák gyorsan visszatérnek az inaktivált állapotból, aminek eredményeként egy nagy amplitudó növekedés adódik, míg az endogén csatornák hozzájárulása ehhez az áramhoz elhanyagolható. Ezért ennél a lépésnél mért teljes-sejt csúcsáramot használjuk arra, hogy a toxinok hatását megnézzük a hERG csatornákon.



**6. ábra** A Css20 és a Tst26 hatása a hERG- és Kv2.1 csatornákra. Az A panel a Css20-ra míg a B panel a Tst26-ra vonatkozik. Mindkét panelen reprezentatív áramgörbéket mutatunk be 10 nM Css20 és Tst26 jelenlétében (pirossal) és hiányában (feketével). A feszültség-protokollokat a görbék felett tüntettük fel. A Kv2.1-csatornákon keresztüli áramokat a  $-120$  mV tartófeszültségről  $+50$  mV-ra történő lépéssel váltottuk ki, 15 másodperces időközönként. A mintavételezési frekvencia: 10 kHz; aluláteresztő szűrő: 5 kHz; digitális, 3 pontos boxcar szűrővel szűrve. A hERG áramok kiváltásakor először  $+20$  mV-ra lépünk (2.5 s), majd  $-40$  mV-ra (1 s), ami utóbbi alatt mért áramokat tekintettük a hERG áramnak. A tartó feszültség  $-80$  mV volt, az impulzusok pedig 30 s-ként követték egymást. Mintavételezési frekvencia: 2 kHz; analóg aluláteresztő szűrő: 1 kHz; digitális, 3 pontos boxcar szűrő.

A  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált kálium-csatornák közül az IKCa1 ( $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ ) és a BKCa ( $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$ ) csatornákon vizsgáltuk a toxinok hatását: blokkolást ezeknél sem tapasztaltunk 10 nM toxin-koncentrációnál (7. ábra). Az IKCa1 csatorna vizsgálata különösen fontos, mert a Kv1.3 mellett ez a T-limfociták másik kálium-csatornája. Gátlása esetén a T-sejtes immunválasznak nem az általunk kívánt módosulása következne be.

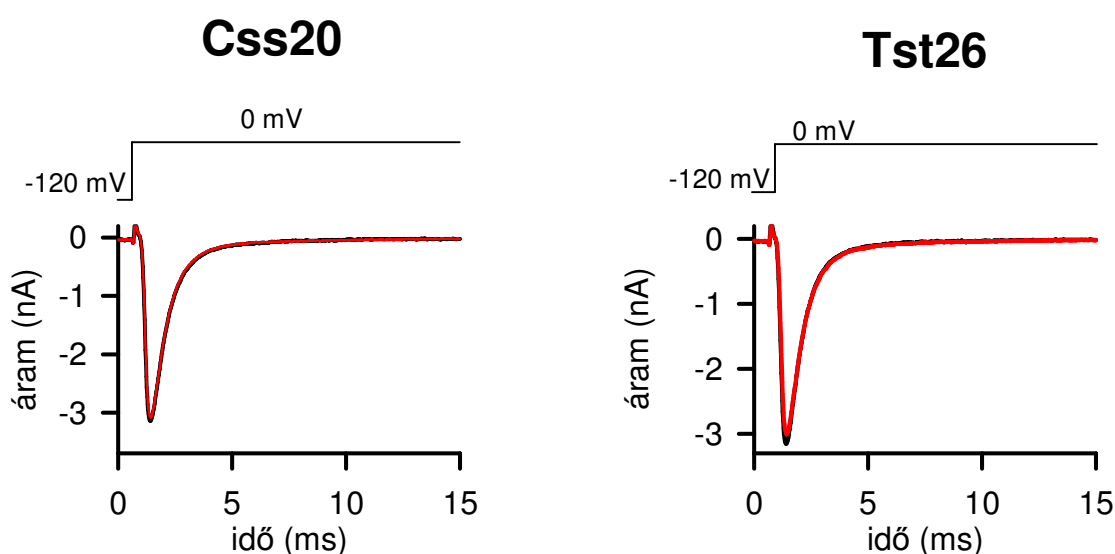


**7. ábra** A Css20 és a Tst26 hatása IKCa1 ( $K_{Ca3.1}$ ) és a BKCa ( $K_{Ca1.1}$ ) csatornákra. Az A panel a Css20-ra míg a B panel a Tst26-ra vonatkozik. Mindkét panelen reprezentatív áramgörbéket mutatunk be 10 nM Css20 és Tst26 jelenlétében (pirossal) és hiányában (feketével). A feszültség-protokollok a görbék felett vannak feltüntetve. Az IKCa1 áramokat  $-120$  mV és  $+50$  mV közötti feszültség-rámpával váltottuk ki 10 s-ként,  $-120$  mV-os tartófeszültség mellett. Mintavételezési frekvencia: 10 kHz; analóg aluláteresztő szűrő: 5 kHz; digitális, 3 pontos boxcar szűrő. A BKCa áramot egy  $+50$  mV-os feszültség-lépéssel váltottuk ki (100 ms), amelyet megelőzött egy 10 ms-os  $-120$  mV-ra történő hiperpolarizáció a  $0$  mV-os tartófeszültségről. Az impulzusokat 5 s-onként alkalmaztuk. Mintavételezési frekvencia: 20 kHz; analóg aluláteresztő szűrő: 4 kHz; digitális 3 pontos boxcar szűrő.

Mivel az IKCa1 nem feszültségfüggő ioncsatorna, ezért a rajta átfolyó áram meghatározására más protokollt használtunk: egy ún. feszültségrámpát. E protokoll során a membránpotenciál értékét folyamatosan emeljük a tartófeszültségről,  $-120$  mV-ról  $+50$  mV-ig, egy lineáris függvénynek megfelelően, amint az a 7. ábrán az IKCa1 áramok fölött látható is. Az IKCa1 paneleken az áramgörbe és a szaggatott vonal metszéspontjához tartozó feszültségérték az ún. megfordulási potenciál, vagyis  $e$  feszültségérték alatt befelé-, míg  $e$  felett kifelé folyik az áram. Az aspecifikus, szivárgási áramra vonatkozóan ez az érték  $0$  mV, míg tisztán kálium áram esetén kb.  $-85$  mV-nak adódik az alkalmazott mérési feltételek mellett. Az IKCa1 csatornákon keresztül folyó  $K^+$ -áram hajtóereje a protokoll lefolyása alatt egyenlő a protokoll által beállított membránpotenciál és a megfordulási potenciál különbségével. A hajtóerő

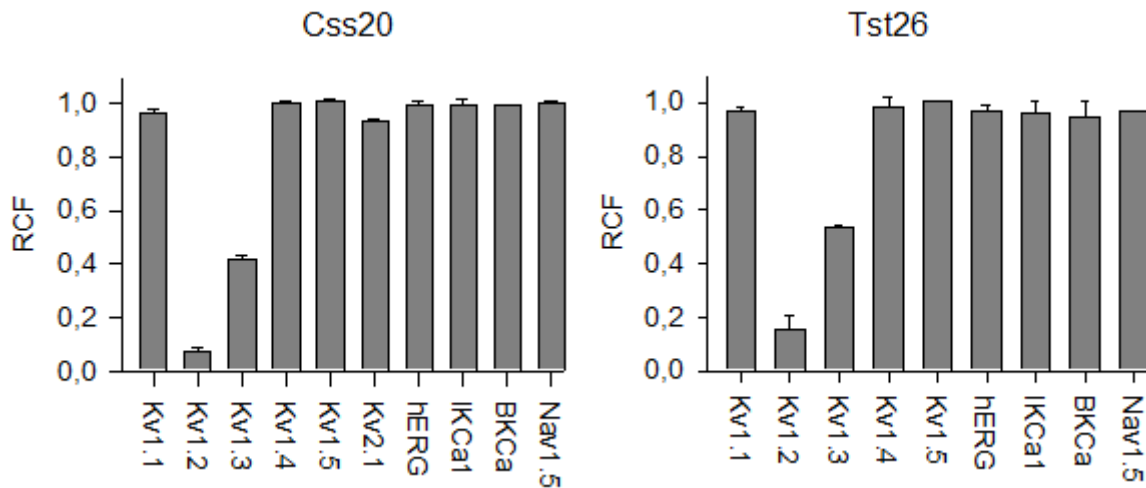
megele mellett az áram másik feltételét, a nyitott állapotú ioncsatornát, a belső oldat magas ( $1 \mu\text{M}$ )  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációjával érhetjük el. A  $\text{K}^+$ -áram specifikus gátlása esetén egyrészt a megfordulási potenciál  $0 \text{ mV}$  felé tolódna el, másrészt csökkenne az áram nagysága. Az áram nagyságának változását a rámpa végénél,  $+50 \text{ mV}$ -nál határoztuk meg. Ez csak akkor tehető meg, ha más kálium-csatorna nincs, vagy elhanyagolható mértékben van jelen a mérés során. Ez a feltétel a mi esetünkben teljesült az IKCa1 magas expressziós szintje miatt, és mert a Cos-7 sejtekben endogén kálium-áram nem mérhető.

Végül ellenőriztük még a toxinok hatását a szívizombeli Nav1.5 csatornán is. E csatorna jelentősége a hERG csatornához hasonlóan abból adódik, hogy szerepet játszik a szív akciós potenciáljának kialakulásában. Mivel blokkolást nem tapasztaltunk (8. ábra), így a szívizomsejtek működését befolyásoló mellékhatás bekövetkezése még kisebbnek mondható.



**8. ábra** Css20 és a Tst26 hatása az Nav1.5 csatornára. Mindkét panelen reprezentatív áramgörbéket mutatunk be  $10 \text{ nM}$  Css20 és Tst26 jelenlétében (pirossal) és hiányában (feketével).  $\text{Nav}_{1.5}$  áramot  $-120 \text{ mV}$  tartófeszültségről  $0 \text{ mV}$ -ra történő lépéssel váltottuk ki,  $15 \text{ s}$ -os időközönként. A depolarizáló impulzus  $40 \text{ ms}$  hosszúságú volt, amelyből csak  $15 \text{ ms}$ -ot mutatunk meg a csúcsáramok könnyebb összehasonlítása végett. Mintavételezési frekvencia:  $50 \text{ kHz}$ ; analóg aluláteresztő szűrő:  $5 \text{ kHz}$ ; digitális,  $3$  pontos boxcar szűrő.

A fentebb felsorolt kísérleti eredményeket az 9. ábra összegzi, amely azt mutatja, hogy a Css20 és Tst26 toxinok csak a Kv1.2 és a Kv1.3 csatornákat gátolták jelentős mértékben  $10 \text{ nM}$  koncentrációban.



**9. ábra** A Css20 és a Tst26 szelektivitási profilja. A Css20 ill. a Tst26 gátló hatását kilenc ill. nyolc kálium csatornán és egy szívizombeli nátrium csatornán vizsgáltuk. Minden vizsgált csatorna esetében a megmaradó teljes-sejt áramhányadot (RCF) 10 nM toxin jelenléte mellett határoztuk meg (a feltüntetett hibák az átlaghoz tartozó SEM, N=min.4). Nem volt szignifikáns áram gátlás egyik vizsgált csatornán sem, kivéve a Kv1.2 és a Kv1.3 csatornákat. Ennek részleteseb analízise a10. és 11. ábrákon látható.

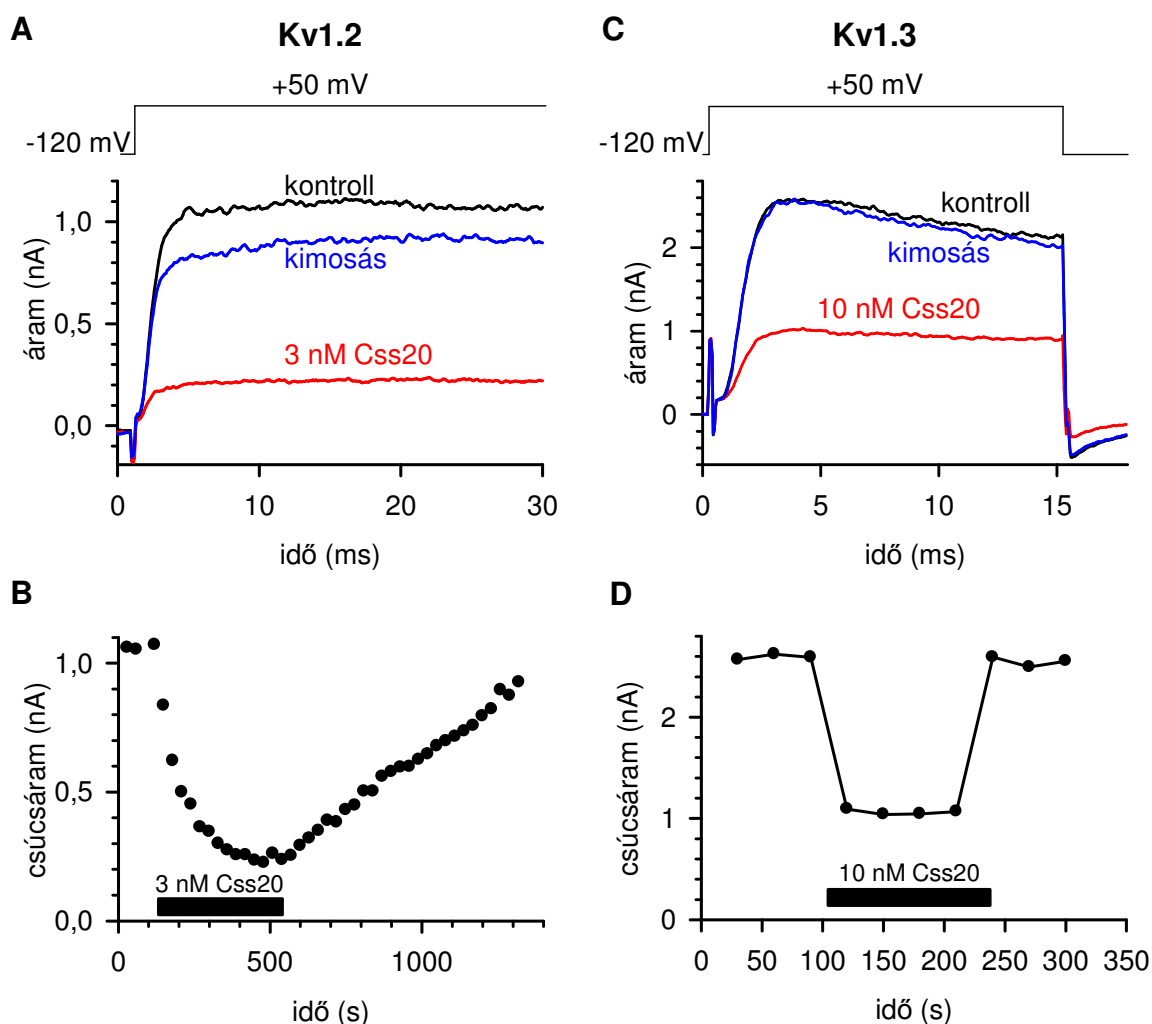
10 nM Tst26 84%-kal csökkentette a Kv1.2 áramot, a Kv1.3 áramot pedig 47%-kal, miközben a többi csatornán keresztüli áram kevesebb, mint 6%-kal csökkent csupán. 10 nM Css20 pedig 93%-kal csökkentette a Kv1.2 áramot, míg a Kv1.3 áramot 58%-kal; a többi csatornán átfolyó áramot azonban csak kevesebb, mint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

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

Miután kiderült, hogy a Css20 és a Tst26 szelektív a Kv1.2 és a Kv1.3 csatornákra, megvizsgáltuk részletesebben mindkét toxin hatását ezekre az ioncsatornákra. Az 10 (A) és az 11 (A) ábrán láthatjuk a Kv1.2-csatornán keresztüli kálium-áramokat, 3 nM Css20 ill. 1 nM Tst26 az extracelluláris oldathoz történő hozzáadása előtt (kontroll), az egyensúlyi gátlás kialakulásakor, és a mérőkád toxin-mentes oldattal történő perfúzióját követően (kimosás). A Kv1.2 teljes-sejt áramokat Cos-7 sejteken mértük. Ezen körülmények között a Css20 és a Tst26 rendre a Kv1.2-csatornák kb. 75%-át ill. 40%-át gátolta. A gátlás nem volt teljesen reverzibilis a Css20-nál, ám a Tst26-nál igen, amikor toxinmentes külső oldattal perfundáltunk. Mindkét toxin asszociációs és disszociációs kinetikája lassú volt: több perc

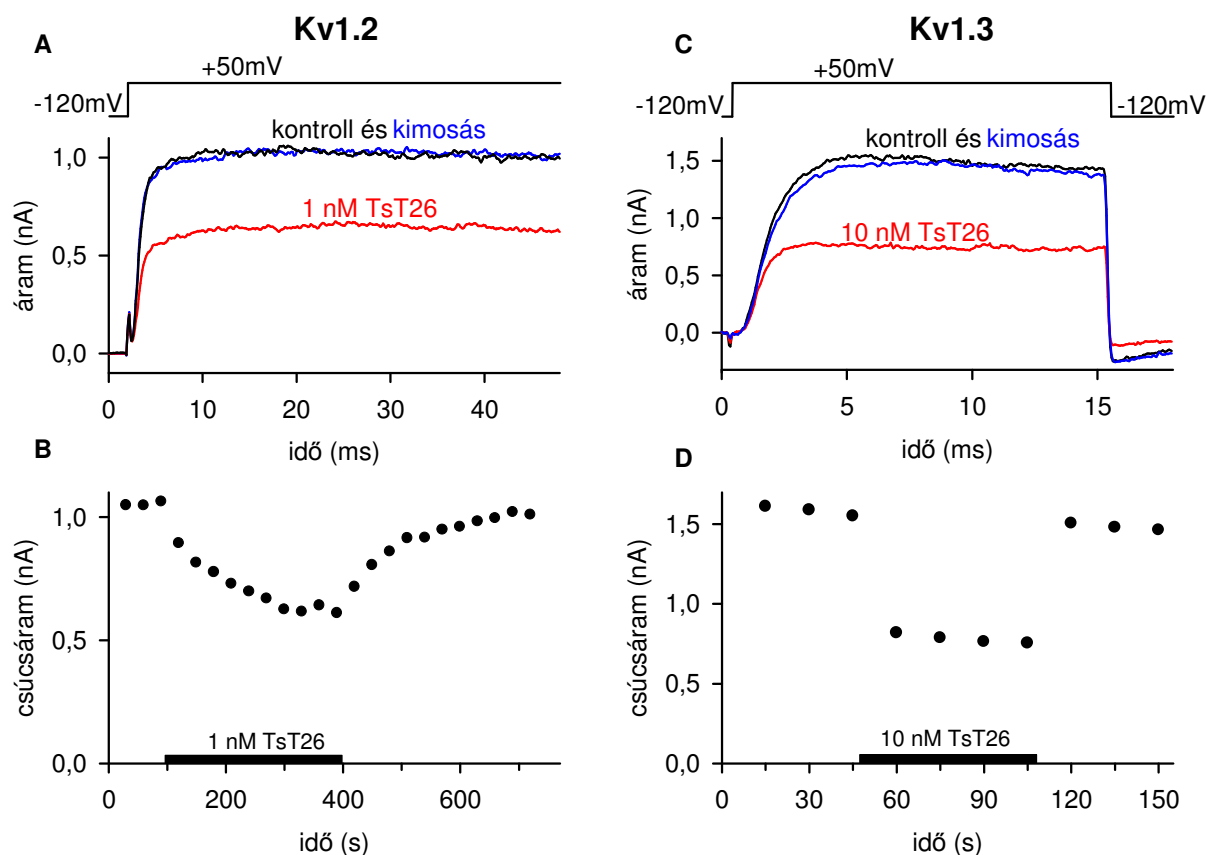
volt szükséges ahhoz, hogy beálljon a blokkolás egyensúlyi állapota, és ahhoz is, hogy a gátlásból visszatérjen az áram (10 (B) ill. 11 (B) ábra) a mosás során.

Az 10 (C) és a 11 (C) ábrán láthatjuk, hogy mindkét toxin kisebb affinitással kötődik a Kv1.3 ioncsatornához, mint a Kv1.2-höz. A Kv1.3 áramok humán perifériás vér T-sejtjein mért teljes-sejt áramok, amelyet az általunk alkalmazott kísérleti körülmények között kizárólag a T-sejtek által expresszált endogén Kv1.3 csatornákon átfolyó áram adja (Peter és mtsai, 2001). A toxinokat extracellulárisan alkalmazva a teljes-sejt  $K^+$ -áramok nagysága rendre kb. a kontroll 40%- ill. 50%-ára csökkent 10 nM Css20 ill. 10 nM Tst26 jelenlétében. A Kv1.3 csatorna gátlása mindkét toxin esetében teljesen reverzibilis volt, és a kinetika sokkal gyorsabb volt, mint a Kv1.2-nél. Mind a blokkolási egyensúly beállta, mint a gátlásból történő visszatérés 30 másodpercen belül, azaz két depolarizáló impulzus között megtörtént (10 (D) ill. 11 (D) ábra).



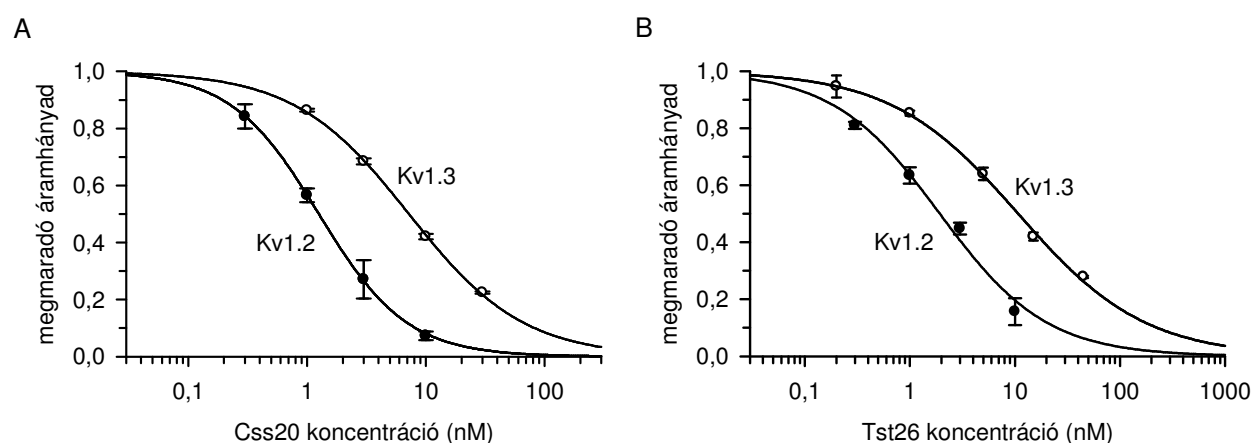
**10. ábra** A Css20 nagy affinitással, reverzibilisen gátolja a Kv1.2- és a Kv1.3-csatornákat. (A) A hKv1.2 áramokat 200 ms hosszúságú,  $-120$  mV tartófeszültségről  $+50$  mV-ra történő depolarizációs lépéssel váltottuk ki, 30 másodperces időközönként (az áramgörbe felett a feszültség-protokollnak, valamint a görbének csak egy része látható a csúcstartók könnyebb összehasonlítása érdekében). A mért sejtet körülvevő oldatot folyamatosan perfundáltuk. A reprezentatív áramgörbék toxin alkalmazása előtti (kontroll, feketével), 3 nM Css20 egyensúlyi blokkolásának kialakulása utáni

(pirossal) és toxinmentes oldatot perfundálva a blokkolásból történő részleges visszatérési (kimosás, kékkel) állapotot mutatják. Mintavételezési frekvencia: 10 kHz; analóg aluláteresztő szűrő: 5 kHz; digitális 3 pontos boxcar szűrő. (B) A  $K^+$ -csúcsáramok időbeli változása látható a blokkolás kialakulása és annak megszűnése alatt, az (A) panel sejtjére vonatkozóan. A  $K^+$ -csúcsáramokat meghatároztuk és ábrázoltuk az idő függvényében. Az időtengely feletti fekete téglalap 3 nM Css20 alkalmazásának időtartalmát jelzi. (C) Teljes-sejt konfigurációban mértük a  $K^+$ -áramokat human T-sejteken, melyek a Kv1.3 csatornákat edogénean expresszálják. 15 ms hosszúságú impulzusokat alkalmaztunk 30 s-os időközönként,  $-120$  mV tartófeszültségről  $+50$  mV-ra depolarizálva (a feszültség protokoll az áramgörbe felett látható). Mintavételezési frekvencia: 20 kHz; analóg aluláteresztő szűrő: 5 kHz; digitális 3 pontos boxcar szűrő. A többi kísérleti feltétel ugyanaz volt, mint az (A) és a (B) paneleknél. (D) A  $K^+$ -csúcsáramok időbeli változása látható a blokkolás kialakulása és annak megszűnése alatt, a (C) panel sejtjére vonatkozóan.



**11. ábra** A Tst26 nagy affinitással, reverzibilisen gátolja a Kv1.2- és a Kv1.3-csatornákat. (A) A hKv1.2 áramokat  $200$  ms hosszúságú,  $-120$  mV tartófeszültségről  $+50$  mV-ra történő depolarizációs lépéssel váltottuk ki,  $30$  másodperces időközönként (az áramgörbe fölött látható a feszültség-protokoll). A mért sejtet körülvevő oldatot folyamatosan perfundáltuk. A reprezentatív áramgörbék toxin alkalmazása előtti (kontroll, feketével),  $1$  nM Tst26 egyensúlyi blokkolásának kialakulása utáni (pirossal) és toxinmentes oldatot perfundálva a blokkolásból történő részleges visszatérési (kimosás, kékkel) állapotot mutatják. (B) A  $K^+$ -csúcsáramok időbeli változása látható a blokkolás kialakulása és annak megszűnése alatt, a (A) panel sejtjére vonatkozóan. A  $K^+$ -csúcsáramokat meghatároztuk és ábrázoltuk az idő függvényében. Az időtengely feletti fekete téglalap  $1$  nM Tst26 alkalmazásának időtartalmát jelzi. (C) Teljes-sejt konfigurációban mértük a  $K^+$ -áramokat human T-sejteken, melyek a Kv1.3 csatornákat edogénean expresszálják.  $15$  ms hosszúságú impulzusokat alkalmaztunk  $30$  s-os időközönként,  $-120$  mV tartófeszültségről  $+50$  mV-ra depolarizálva (a feszültség protokoll az áramgörbe felett látható). A többi kísérleti feltétel ugyanaz volt, mint az (A) és a (B) paneleknél. (D) A  $K^+$ -csúcsáramok időbeli változása látható a blokkolás kialakulása és annak megszűnése alatt, a (C) panel sejtjére vonatkozóan.

Mindkét toxin ioncsatorna gátló potenciáljának pontosabb karakterizálása érdekében megvizsgáltuk gátló hatásukat különböző koncentrációkban is a Kv1.2 ill. a Kv1.3 csatornákra vonatkozóan. Meghatároztuk a megmaradó áramhányadot (RCF), ami az  $I/I_0$  hányadossal egyenlő, ahol  $I_0$  és  $I$  a mért  $K^+$  csúcsáram értéke kontroll oldat mellett és a toxin adott koncentrációjának jelenlétében, a gátlási egyensúly beállta után. Az RCF értékeket a toxin koncentrációjának függvényében (logaritmikusan) ábrázolva megkapjuk a dózis-hatás összefüggést, amit az ún. kétparaméteres Hill-egyenlettel illesztettünk meg (12. ábra). E két paraméter a disszociációs állandó ( $K_d$ ) és a Hill-koefficiens ( $n$ ), amelyek a következőknek adódtak: C<sub>ss</sub>20 esetében  $K_d = 1.3$  nM,  $n = 1.17$  Kv1.2-re vonatkozóan és  $K_d = 7.2$  nM,  $n = 0.90$  Kv1.3-ra; T<sub>st</sub>26 esetében pedig  $K_d = 1.9$  nM,  $n = 0.86$  Kv1.2-re és  $K_d = 10.7$  nM,  $n = 0.72$  Kv1.3-ra vonatkozóan. A C<sub>ss</sub>20 estében az 1-hez közeli Hill-koefficiens értékek az általános toxin-csatorna viszonyra utalnak a blokkolás során, azaz egy toxin egy csatornához kötődik. A T<sub>st</sub>26 esetében azonban a Hill-koefficiens értéknek az 1-től való eltérése jelentősnek tűnik ( $n = 0.72$ ).



**12. ábra** A  $K^+$ -áramok blokkolásának függése a toxinok (C<sub>ss</sub>20 és T<sub>st</sub>26) koncentrációjától. A megmaradó áramhányadot (Kv1.2: tele kör és Kv1.3: üres kör) az  $I/I_0$  hányadossal számoltuk, ahol  $I_0$  és  $I$  a mért  $K^+$  csúcsáram értéke kontroll oldat mellett és a toxin adott koncentrációjának jelenlétében. A feszültség protokoll és a többi kísérleti feltételek ugyanazok voltak, mint az 10. és a 11. ábránál. A mért pontokra illesztett folytonos vonalú görbét a Hill-egyenlet segítségével

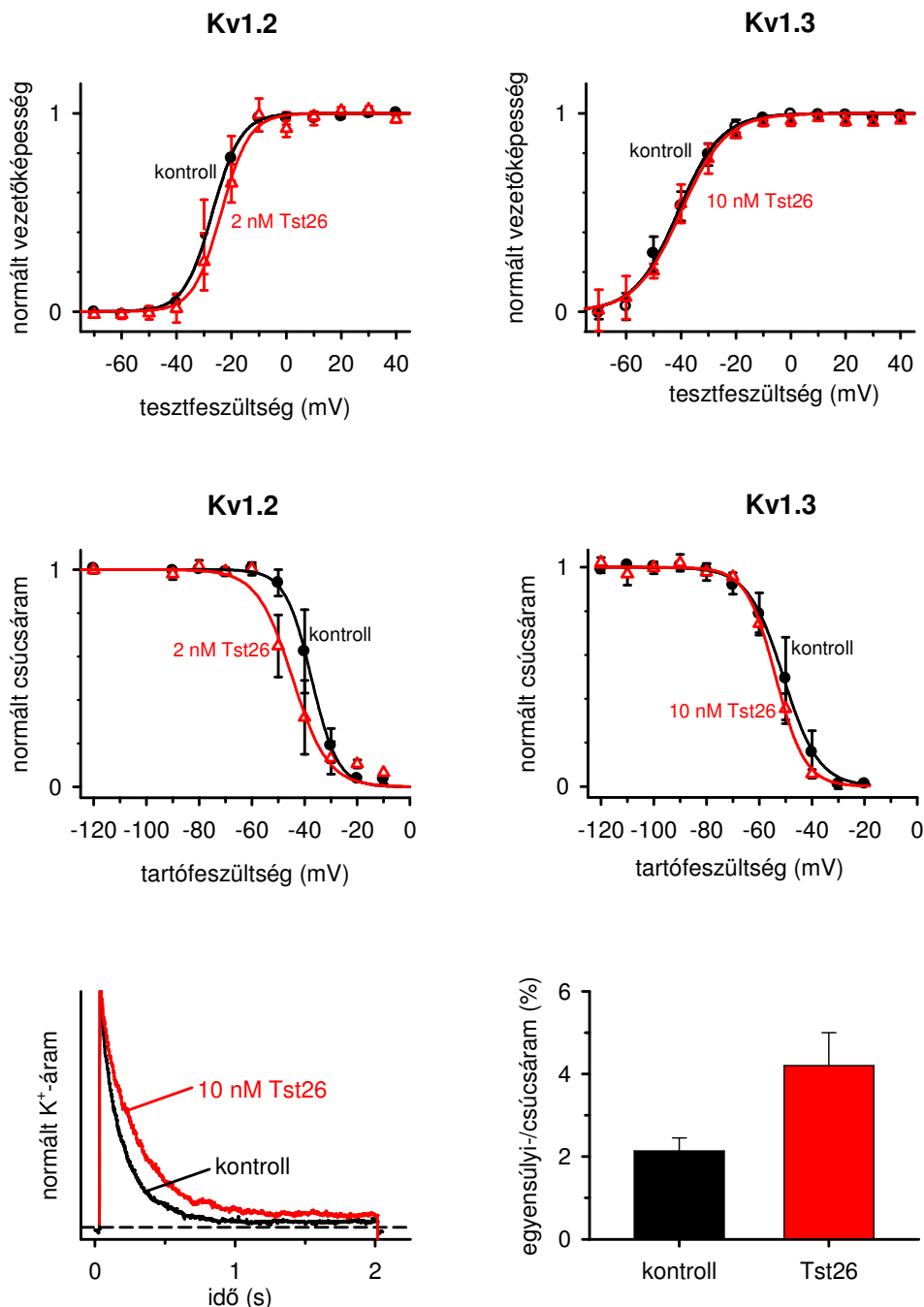
illesztettük, ami:  $RCF = \frac{K_d^n}{K_d^n + [Tx]^n}$ , ahol  $RCF$  (Remaining Current Fraction) a megmaradó

áramhányad,  $K_d$  a disszociációs állandó,  $n$  a Hill-koefficiens és  $[Tx]$  a toxin-koncentráció. A legjobb illesztésből kapott értékek a következők: **C<sub>ss</sub>20 esetében:**  $K_d = 1.26$  nM,  $n = 1.17$  Kv1.2-re vonatkozóan és  $K_d = 7.21$  nM,  $n = 0.90$  Kv1.3-ra; **T<sub>st</sub>26 esetében:**  $K_d = 1.9$  nM,  $n = 0.86$  Kv1.2-re és  $K_d = 10.7$  nM,  $n = 0.72$  Kv1.3-ra vonatkozóan. Az ábrázolt hibák a S.E.M.-et (Standard Error of the Mean) jelölik ( $n = 3-7$ ).

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

A legtöbb toxin a csatornával történő kölcsönhatás során egyszerűen csak eltömíti az ioncsatorna pórusát megakadályozva így a  $K^+$  ionok átjutását. Vannak azonban olyan toxinok is, amelyek az ioncsatorna feszültség-érzékelő részéhez, vagy annak közelébe kötődnek, és így módosítják a csatorna kapuzási mechanizmusát (Swartz és MacKinnon 1997). Ezek a toxinok képesek az egyensúlyi (steady-state) aktiváció feszültség függését eltolni a pozitívabb membránpotenciál érték felé és így csökkenteni a csatornák nyitási valószínűségét egy adott membránpotenciálon. Ez a teljes-sejt áram csökkenéséhez vezet a nélkül is, hogy a peptidok a  $K^+$  áthaladását a csatornán fizikailag megakadályoznák.

Annak eldöntésére, hogy a Tst26 lehet-e kapuzást módosító peptid, meghatároztuk az egyensúlyi aktiváció és inaktiváció feszültségfüggését jellemző paramétereket Kv1.2 és Kv1.3 ioncsatornákra vonatkozóan a toxin jelenlétében és annak hiányában (13. ábra). Először a csatornák áram-feszültség karakterisztikáját készítettük el (I–V görbe): depolarizációs impulzusok sorát alkalmaztuk,  $-70$  mV-tól  $+40$  mV-ig  $10$  mV-os lépésközökkel, és közben mértük a teljes-sejt áramok csúcserőit minden depolarizáló impulzusnál. Ezután kiszámoltuk a teljes-sejtre vonatkozó vezetőképesség feszültségfüggését az I–V függvény értékeiből a  $G=I/(E_m-E_{rev})$  összefüggés felhasználásával, ahol  $I$  a teljes-sejt áram amplitúdó,  $E_m$  a membránpotenciál a depolarizáló impulzus alatt,  $E_{rev}$  pedig a Nernst-egyenletből számított  $K^+$  egyensúlyi potenciál ( $-88$  mV). A kapott  $G$  értékeket normáltuk a legnagyobb vezetőképesség értékre, és ábrázoltuk a depolarizáló impulzus amplitúdójának függvényében. Az így kapott adatpontokra Boltzmann-függvényt illesztettünk (ld. még Anyagok és Módszerek). Az illesztett függvény paraméterei pedig nem utaltak arra, hogy a Tst26 toxin befolyásolná bármely (Kv1.2 vagy Kv1.3) csatorna egyensúlyi aktivációjának feszültség-függését (12 (A) ábra: Kv1.2-re: kontroll:  $V_{1/2} = -26.9$  mV, és  $k = 5.2$  mV; és  $2$  nM Tst26 jelenlétében:  $V_{1/2} = -23.7$  mV, és  $k = 5.1$  mV; Kv1.3-ra: kontroll:  $V_{1/2} = -41.2$  mV, és  $k = 7.9$  mV; és  $10$  nM Tst26 estében:  $V_{1/2} = -40.1$  mV, és  $k = 8.1$  mV). Hasonlóan nem befolyásolta a Tst26 jelenléte az egyensúlyi inaktiváció feszültség-függését sem (12 (B) ábra: Kv1.2-re: kontroll:  $V_{1/2,i} = -37.3$  mV, és  $k_i = -5.0$  mV; és  $2$  nM Tst26 esetében:  $V_{1/2,i} = -44.5$  mV, és  $k_i = -6.7$  mV; Kv1.3-ra: kontroll:  $V_{1/2,i} = -50.8$  mV, és  $k_i = -6.7$  mV; és  $10$  nM Tst26 esetében:  $V_{1/2,i} = -53.7$  mV, és  $k_i = -5.6$  mV).



**13. ábra** A Tst26 hatása Kv1.2 és a Kv1.3 csatornák egyensúlyi és kinetikai paramétereire. (A) A Kv1.2 és a Kv1.3 csatornák egyensúlyi aktivációjának feszültség-függését a Tst26 nem befolyásolta. A toxint 2 nM-ban alkalmaztuk Kv1.2 és 10 nM-ban Kv1.3 esetében, ami kb. 50%-os blokkolást okoz. A bal oldali panelek a Kv1.2-re, míg a jobb oldaliak a Kv1.3-ra vonatkoznak. A fekete teli körök a kontroll, míg az üres piros háromszögek a toxin jelenlétében mért adatokat ábrázolják. A normált vezetőképesség feszültség-függését (G-V) az áram-feszültség (I-V) függvényből készítettük el. Az I-V függvényen a mért K<sup>+</sup>-csúcsáramokat (mind Kv1.2-, mind Kv1.3-ra vonatkozóan) ábrázoljuk az azt kiváltó feszültség-impulzus függvényében, -70 mV-tól +40 mV-ig, 10 mV lépésekben, -120 mV tartófeszültségről. A vezetőképességeket kiszámoltuk minden feszültség-impulzus esetében – a K<sup>+</sup>-áram megfordulási potenciálját felhasználva – és normáltuk a maximális vezetőképességre azokat. Az ábrázolt pontokat Boltzmann-függvénnyel illesztettük, az illesztés paramétereit lásd a szövegben. Minden feltüntetett pont 3-6 független kísérlet átlaga, a hibajelek a SEM-et mutatják. (B) A Tst26 az egyensúlyi inaktiváció feszültség-függését szintén nem befolyásolta, egyik ioncsatorna esetében sem. A baloldali panel a Kv1.2-re a jobboldali a Kv1.3-ra vonatkozik; a tele fekete kör a kontroll, míg az üres piros háromszög a toxin jelenlétében mért pontokat jelenti. A sejteket a jelzett tartófeszültségeken tartottuk 2 percen át és a nem-inaktiválódott csatornák arányát

egy +40 mV-os tesztimpulzussal határoztuk meg. A különböző tartófeszültség mellett mért csúcsáramokat a -120 mV mellett mértre normáltuk ( $I/I_{-120}$ ). A kapott pontokat Boltzmann-függvénnyel illesztettük, melynek paramétereit lásd a szövegben. Minden feltüntetett pont 3-6 független kísérlet átlaga, a hibajelek a SEM-et mutatják. (C) A Kv1.3 inaktivációs kinetikáját jellemző paramétereket a Tst26 módosította. (*bal panel*) A Kv1.3 lassú inaktivációját a Tst26 lassította. A T-sejtben mért teljes-sejt áramot egy 2 s hosszúságú, +40 mV-ra történő depolarizációs impulzussal váltottuk ki -120 mV tartófeszültségről, 60 s-onként és a csúcsáramra normáltuk. A fekete színű a toxin hiányában (kontroll), míg a piros színű 10 nM Tst26 jelenlétében mért áramgörbe. A görbék inaktivációs időállandóját ( $\tau$ ) a görbe csökkenő részére illesztett exponenciális függvény (az ábrán nincs feltüntetve) segítségével határoztuk meg:  $I(t) = I \exp(-t/\tau) + C$ , ahol  $I$  az inaktiválódó áramkomponens és  $C$  a nem-inaktiválódó (egyensúlyi, steady-state) áram. A  $\tau$  értéke 161 ms és 250 ms volt 10 nM Tst26 hiányában és annak jelenlétében. (*jobb panel*) Az egyensúlyi Kv1.3 áram növekedett Tst26 jelenlétében. A megmaradó áramot 2 s hosszúságú depolarizáló feszültség impulzus végénél mértük (lásd bal panel) amit elosztottunk a csúcsárammal, s így megkaptuk az ábrázolt *egyensúlyi-/csúcsáram* hányados 10 nM Tst26 hiányában (kontroll) és annak jelenlétében (Tst26). Az ábrázolt hiba: SEM, n=4.

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

Kísérleteinkben megvizsgáltuk azt, hogy a Kv1.3 csatornák lassú inaktivációjának kinetikáját befolyásolja-e a Tst26 toxin csatornához történő kötődése. Ehhez összehasonlítottuk az inaktivációs időállandókat Tst26 jelenlétében és annak hiányában. A kontroll körülményekre vonatkozó időállandót a toxin alkalmazása előtti és a toxin kimosása utáni időállandók átlagértékeként számítottuk, s így korrigáltunk a Kv1.3 csatornák természetéből adódó, a kísérlet időbeli előrehaladásával gyorsuló inaktivációjára. Az 13. ábra C része azt mutatja, hogy a toxin jelenlétében a Kv1.3 csatorna inaktivációja lassabb, mint kontroll körülmények között: 10 nM Tst26 megnövelte az időállandót  $205 \pm 33$  ms-ról  $342 \pm 37$  ms-ra ( $n = 6$ ,  $p < 0.001$ ; 13 (C) ábra baloldali panele). Az inaktivációs kinetika lassulása együtt járt az depolarizációs impulzus végénél mért egyensúlyi áram növekedésével (12 (C) ábra baloldali panele), amit az egyensúlyi áram és a csúcsáram hányadosával jellemeztünk (12 (C) ábra jobb oldali panele; kontroll:  $0.021 \pm 0.006$ , 10 nM Tst26:  $0.042 \pm 0.016$ ,  $n=4$ ,  $p=0.04$ ).

# Megbeszélés

## **A szelektivitás fontossága**

Egy potenciális terápiás anyaggal szemben alapelvárás a mellékhatások minimális volta is, ami a mi esetünkben a toxinok egyéb ioncsatornákkal történő keresztreakcióinak hiányát jelenti. Mivel minden ismert ioncsatornára nem tesztelhettük toxinjainkat, ezért kiválasztottuk az általunk legjelentősebbnek tartott ioncsatornákat, amelyek mindemellett számunkra hozzáférhetőek is. A keresztreakció legvalószínűbb a Kv1.3-mal egy családba, a Shaker (Kv1.x) családba tartozó ioncsatornáknál, mert szerkezetileg ezek állnak a legközelebb hozzá. Ezért választottuk ki a Kv1.1, Kv1.2, Kv1.4 és a Kv1.5 csatornákat. Az IKCa1 (KCa3.1) csatorna jelentősége abból adódik, hogy a Kv1.3 mellett a T-limfociták másik kálium-csatornája, és emellett a T-sejtek különböző alpopulációi különböző mértékben is expresszálják e két csatornát (4. ábra). Így az IKCa1 esetleges gátlásával a T-sejtes immunválasz olyan befolyásolása is megtörténne, amely nemkívánatos mellékhatást jelentene.

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

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

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

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

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

## **Analízis és konklúzió**

Az utóbbi években a különböző fajok venomjaiból izolált, a Kv1.3 kálium ioncsatornát nagy affinitással és szelektivitással blokkoló toxinokra nagy figyelem irányult, mert ismerté lett, hogy a Kv1.3 ioncsatornákat blokkolva a limfociták bizonyos alpopulációinak proliferációja meggátolható és ezáltal szelektív immunszuppresszió érhető el (Wulff és mtsai, 2003a).

A Kv1.2-csatornára vonatkozóan ugyanakkor mind a mai napig nincsen jó, nagy affinitású és nagy szelektivitású gátlószer; ráadásul ez a típusú ioncsatorna széles körben fordul elő a központi idegrendszerben és heterotetramereket alkot a Shaker-család többi tagjával, amelyek valószínűleg más farmakológiai tulajdonságokkal rendelkeznek, mint a homotetramer csatornák (Coleman és mtsai, 1999, Isacoff és mtsai, 1990). Így egy olyan toxin, amely hasonló affinitással rendelkezik erre a két csatornára vonatkozóan – mint a Css20 és a Tst26 – nem ideális jelölt terápiás gyógyszernek.

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

Összehasonlítva az  $\alpha$ -KTx2 toxincsalád tagjainak aminosav szekvenciáját, számos erősen konzervatív aminosavat találunk, mint pl. I3, K6, Q12, P16, K18, G22, N31, G32, K33, K28, K35, és Y37 (3. táblázat). Ezek közül kettő, a kritikus pozícióban lévő lizin (K28 Css20-nál; K27 Tst26-nál) és egy aromás aminosav 9 pozícióval lejjebb (az N-terminustól ( $\alpha$ -hélixről) indulva a sorrend; Y37 a Css20-ban és Y36 a Tst26-ban) alkotják az ún. „esszenciális diád”-ot (a két diád aminosavat összekötöttük a 4. táblázatban), mert ez a pár megtalálható a legtöbb olyan skorpió toxinban (nem csak az  $\alpha$ -KTx2 tagjaiban), amelyek nagy affinitással

blokkolják a K<sup>+</sup>-csatornákat. (Bednarek és mtsai, 1994, Dauplais és mtsai, 1997, de la Vega és mtsai, 2003, Koschak és mtsai, 1998).

### 3. táblázat $\alpha$ -KTx2- és $\alpha$ -KTx4 alcsaládbeli toxinok aminosav-szekvenciája és disszociációs állandója Kv1.2 és Kv1.3 ioncsatornákra

Családnév	Név	Peptid 1234567890123456789012345678901234567890	Azonosság (%)	K <sub>d</sub> (nM)	
				Kv1.2	Kv1.3
$\alpha$ -KTx2.1	Noxiustoxin	TIINVKCTSPKQ <b>C</b> SKP <b>C</b> KELYGSSAGAK <b>C</b> MNGK <b>C</b> K <b>C</b> Y <b>N</b> N	68	2 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>
$\alpha$ -KTx2.2	Margatoxin	TIINVKCTSPKQ <b>C</b> LPP <b>C</b> KAQFGQSAGAK <b>C</b> MNGK <b>C</b> K <b>C</b> Y <b>P</b> H	76	0.6 <sup>b</sup>	0.23 <sup>b</sup>
$\alpha$ -KTx2.3	ClITx1 (II.10.9.1)	ITINVKCTSPQQ <b>C</b> LRP <b>C</b> KDRFGQHAGG <b>K</b> CINGK <b>C</b> K <b>C</b> Y <b>P</b>	81	nm	nm
$\alpha$ -KTx2.4	Cn Ntx2	TIINEK <b>C</b> FATSQ <b>C</b> WTP <b>C</b> KKAI <b>G</b> -SLQ <b>S</b> K <b>C</b> MNGK <b>C</b> K <b>C</b> Y <b>N</b> G	55	nm	nm
$\alpha$ -KTx2.5	Hongotoxin-1	TVIDVKCTSPKQ <b>C</b> LPP <b>C</b> KAQFGIRAGAK <b>C</b> MNGK <b>C</b> K <b>C</b> Y <b>P</b> H	73	0.17 <sup>b</sup>	0.09 <sup>b</sup>
$\alpha$ -KTx2.6	Hongotoxin-3	TFINVKCTSPKQ <b>C</b> L <b>P</b> AC <b>K</b> E <b>K</b> FGX <b>A</b> A <b>G</b> - <b>K</b> C <b>M</b> N <b>G</b> K <b>C</b> K <b>?</b>	70	nm	Nm
$\alpha$ -KTx2.7	ClITx2 (II.10.9.2)	TVIDVKCTSPKQ <b>C</b> LPP <b>C</b> KEIYGRHAGAK <b>C</b> MNGK <b>C</b> K <b>C</b>	63	nm	nm
$\alpha$ -KTx2.8	Ce1 toxin	TVINVKCTSPKQ <b>C</b> L <b>P</b> K <b>C</b> LDLYGPHAGAK <b>C</b> MNGK <b>C</b> K <b>C</b> Y <b>N</b> N	67	nm	0.71 <sup>c</sup>
$\alpha$ -KTx2.9	Ce2 toxin	TIINVKCTSPKQ <b>C</b> L <b>P</b> K <b>C</b> LDLYGPHAGAK <b>C</b> MNGK <b>C</b> K <b>C</b> Y <b>N</b> N	64	nm	0.25 <sup>c</sup>
$\alpha$ -KTx2.11	Ce4 toxin	TIINVKCTSPKQ <b>C</b> LL <b>P</b> CKE <b>I</b> YGIHAGAK <b>C</b> MNGK <b>C</b> K <b>C</b> Y <b>K</b> I	54	nm	0.98 <sup>c</sup>
$\alpha$ -KTx2.13	Css20	IFINVK <b>C</b> SS <b>P</b> QQ <b>C</b> L <b>P</b> K <b>C</b> AA <b>F</b> GISAGG <b>K</b> CINGK <b>C</b> K <b>C</b> Y <b>P</b>	<b>100</b>	1.3	7.2
$\alpha$ -KTx4.1	TstxK $\alpha$	VFINAKCRGSPECLPKCKE <b>A</b> IGKAAGK <b>C</b> MNGK <b>C</b> K <b>C</b> Y <b>P</b>	97	0.21 <sup>d</sup>	3-20 <sup>e</sup>
$\alpha$ -KTx4.2	TsK	VVIGQRCYRSPDCYSACKKLVGKATGKCTNGRCD	49	nm	nm
$\alpha$ -KTx4.3	TdK1	VFINVKCTGSKQCLPACKAAV <b>G</b> KAAGK <b>C</b> MNGK <b>C</b> K <b>C</b> Y <b>T</b>	78	nm	nm
$\alpha$ -KTx4.4	Tc30	VFINVKCRGSKECLPACKAAV <b>G</b> KAAGK <b>C</b> MNGK <b>C</b> K <b>C</b> Y <b>P</b>	86	nm	16 <sup>f</sup>
$\alpha$ -KTx4.5	-	VFINVKCRGSPECLPKCKE <b>A</b> IGKSAGK <b>C</b> MNGK <b>C</b> K <b>C</b> Y <b>P</b>	92	nm	nm
$\alpha$ -KTx4.6	Tst26	VFINAKCRGSPECLPKCKQ <b>A</b> IGKAAGK <b>C</b> MNGK <b>C</b> K <b>C</b> Y <b>P</b>	<b>100</b>	1.9	10.7

nm: nem meghatározott.

<sup>a</sup> rKv1.2- és mKv1.3-csatornák B82 egér fibroblasztban és L929 sejtekben expresszálva (Grissmer és mtsai, 1994)

<sup>b</sup> Kv1.2- és Kv1.3-csatornák HEK-293 sejtekben expresszálva (Koschak és mtsai, 1998)

<sup>c</sup> Kv1.3-csatornák humán limfocitákban (Garcia-Calvo és mtsai, 1993, Olamendi-Portugal és mtsai, 2005)

<sup>d</sup> rKv1.2 B82 fibroblasztokban (Werkman és mtsai, 1993)

<sup>e</sup> mKv1.3 Xenopus oocitákban és/vagy L292 sejtekben (de la Vega és mtsai, 2003)

<sup>f</sup> hKv1.3 humán T-limfocitákban (Batista és mtsai, 2002)

A „eszenciális diád” kritikusnak látszik a Kv1.2 nagy affinitású gátlásához is. A diád aminosavakat alaninra cserélve a Pi1 ( $\alpha$ -KTx6.1) toxin affinitása több nagyságrenddel csökkent a Kv1.2 esetében (Mouhat és mtsai, 2004). Maurotoxinnál is (MTX ( $\alpha$ -KTx6.2)) két, a diádnak megfelelő aminosav (K23 és Y32) bizonyítottan fontos Kv1.2-höz történő a nagy affinitású kötődésért a (Visan és mtsai, 2004). Azonban a diád szükségessége nem egyértelmű a Kv1.3 gátlásánál. Annak ellenére, hogy a diád jelen van az MTX-ben, mégis gyengén blokkolja a hKv1.3-at, de a H399T mutáció a csatorna külső szájadékának alsó részénél olyan érzékennyé tette a csatornát az MTX blokkolására, mint a Kv1.2-nél.

#### 4. táblázat Toxinok aminosav-szekvenciája és szelektivitásuk Kv1.2 és Kv1.3 csatornákra

név	Peptid										töltés/His		K <sub>d</sub> hányados		K <sub>d</sub> (nM)																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	összes	C-term.	Kv1.2/Kv1.3	Kv1.2	Kv1.2	Kv1.3																												
maurotoxin	V	S	C	T	G	S	K	D	C	Y	A	P	C	R	K	Q	T	G	C	P	N	A	-	K	C	I	N	K	S	C	K	C	Y	G	C	5/0	3/0	2e-4	0.7 <sup>a</sup>	3300 <sup>a</sup>				
CoTX1	A	V	C	V	Y	R	T	-	C	D	K	C	K	R	R	-	G	Y	R	S	G	-	K	C	I	N	N	A	C	K	C	Y	P	Y	6/0	3/0	0.005	27 <sup>b</sup>	5300 <sup>b</sup>					
Pi4	I	E	A	I	R	C	G	G	S	R	D	C	Y	R	P	C	Q	K	R	T	G	C	P	N	A	-	K	C	I	N	K	T	C	K	C	Y	G	C	S	6/0	3/0	<8e-7	0.008 <sup>c</sup>	>10000 <sup>c</sup>
Pi1	L	V	K	C	R	G	T	S	D	C	G	R	P	C	Q	Q	T	G	C	P	N	S	-	K	C	I	N	R	M	C	K	C	Y	G	C	5/0	3/0	0.09	1 <sup>d</sup>	11 <sup>e</sup>				
Css20	I	F	I	N	V	K	C	S	S	P	Q	Q	C	L	K	P	C	K	A	A	F	G	I	S	A	G	G	K	C	I	N	G	K	C	K	C	Y	P	6/0	3/0	0.2	1.5	7.2	
Tst26	V	F	I	N	A	K	C	R	G	S	P	E	C	L	P	K	C	K	Q	A	I	G	K	A	A	G	-	K	C	M	N	G	K	C	K	C	Y	P	8/0	4/0	0.2	2	10	
Noxiustoxin	T	I	I	N	V	K	C	T	S	P	K	Q	C	S	K	P	C	K	E	L	Y	G	S	S	A	G	A	K	C	M	N	G	K	C	K	C	Y	N	6/0	3/0	2	2 <sup>f</sup>	1 <sup>f</sup>	
Hongotoxin-1	T	V	I	D	V	K	C	T	S	P	K	Q	C	L	P	P	C	K	A	Q	F	G	I	R	A	G	A	K	C	M	N	G	K	C	K	C	Y	P	6/1	4/1	1.9	0.17 <sup>e</sup>	0.09 <sup>e</sup>	
ChTX	E	F	T	N	V	S	C	T	T	S	K	E	C	W	S	V	C	Q	R	L	H	N	T	S	R	G	-	K	C	M	N	K	K	C	R	C	Y	S	5/1	5/1	5.4	14 <sup>f</sup>	2.6 <sup>f</sup>	
anuroctoxin	Z	K	E	C	T	G	P	Q	H	C	T	N	F	C	R	K	N	-	K	C	T	H	G	-	K	C	M	N	R	K	C	K	C	F	N	C	K	7/2	6/1	9	6 <sup>h</sup>	0.7 <sup>h</sup>		
OSK1	G	V	I	I	N	V	K	C	K	I	S	R	Q	C	L	E	P	C	K	K	A	-	G	M	R	F	G	-	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	8/1	4/1	386	5.4 <sup>i</sup>	0.014 <sup>i</sup>
OSK1-20	G	V	I	I	N	V	K	C	K	I	S	R	Q	C	L	E	P	C	K	D	A	-	G	M	R	F	G	-	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	6/1	4/1	2108	78 <sup>i</sup>	0.037 <sup>i</sup>
OSK1-12,16,20	G	V	I	I	N	V	K	C	K	I	S	P	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	-	G	M	R	F	G	-	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	7/1	4/1	3322	196 <sup>i</sup>	0.059 <sup>i</sup>
HsTX1	A	S	C	R	T	P	K	D	C	A	D	P	C	R	K	E	T	G	C	P	Y	G	-	K	C	M	N	R	K	C	K	C	N	R	C	6/0	5/0	>45000	>500 <sup>j</sup>	0.011 <sup>j</sup>				
KTX	G	V	E	I	N	V	K	C	S	G	S	P	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	-	G	M	R	F	G	-	K	C	M	N	R	K	C	H	C	T	P	6/1	5/1	>1538	>1000 <sup>f</sup>	0.65 <sup>f</sup>

diád

A toxinokat úgy csoportosítottuk, mint Kv1.2-re szelektívek, köztesek és Kv1.3-ra szelektívek. Ezt a toxinok különböző csatornákra vonatkozó disszociációs állandók hányadosa alapján tettünk. A szekvenciák után az összelektromos töltés és a hisztidin aminosavak számát tüntettük fel a teljes toxinra, mellette ugyanezen adatok a C-terminálisra vonatkozóan csupán. A C- és N-terminális részeket szaggatott vonallal különítettük el. Az "esszenciális diád" aminosavakat alul jeleztük. Bekeretítettük azokat az aminosavakat, amelyek fontosnak látszanak a Kv1.2- és a Kv1.3-szelektivitás meghatározásában.

<sup>a</sup> hKv1.2 és hKv1.3 COS-7 sejtekben (Visan és mtsai, 2004)

<sup>b</sup> rKv1.2 és mKv1.3 emlős sejt vonalban (Jouirou és mtsai, 2004)

<sup>c</sup> rKv1.2 és rKv1.3 *Xenopus* oocytes-ban (M'Barek és mtsai, 2003)

<sup>d</sup> rKv1.2 *Xenopus* oocytes-ban (Mouhat és mtsai, 2004)

<sup>e</sup> hKv1.3 limfocitákban (Peter és mtsai, 2001)

<sup>f</sup> rKv1.2 és mKv1.3 emlős sejt vonalakban (Grissmer és mtsai, 1994)

<sup>g</sup> Kv1.2 és Kv1.3 csatorna HEK-293 sejtekben, Rb<sup>+</sup>-fluxus (Koschak és mtsai, 1998)

<sup>h</sup> hKv1.3 limfocitákban és hKv1.2 COS-7 sejteknél (Bagdany és mtsai, 2005, Mouhat és mtsai, 2005)

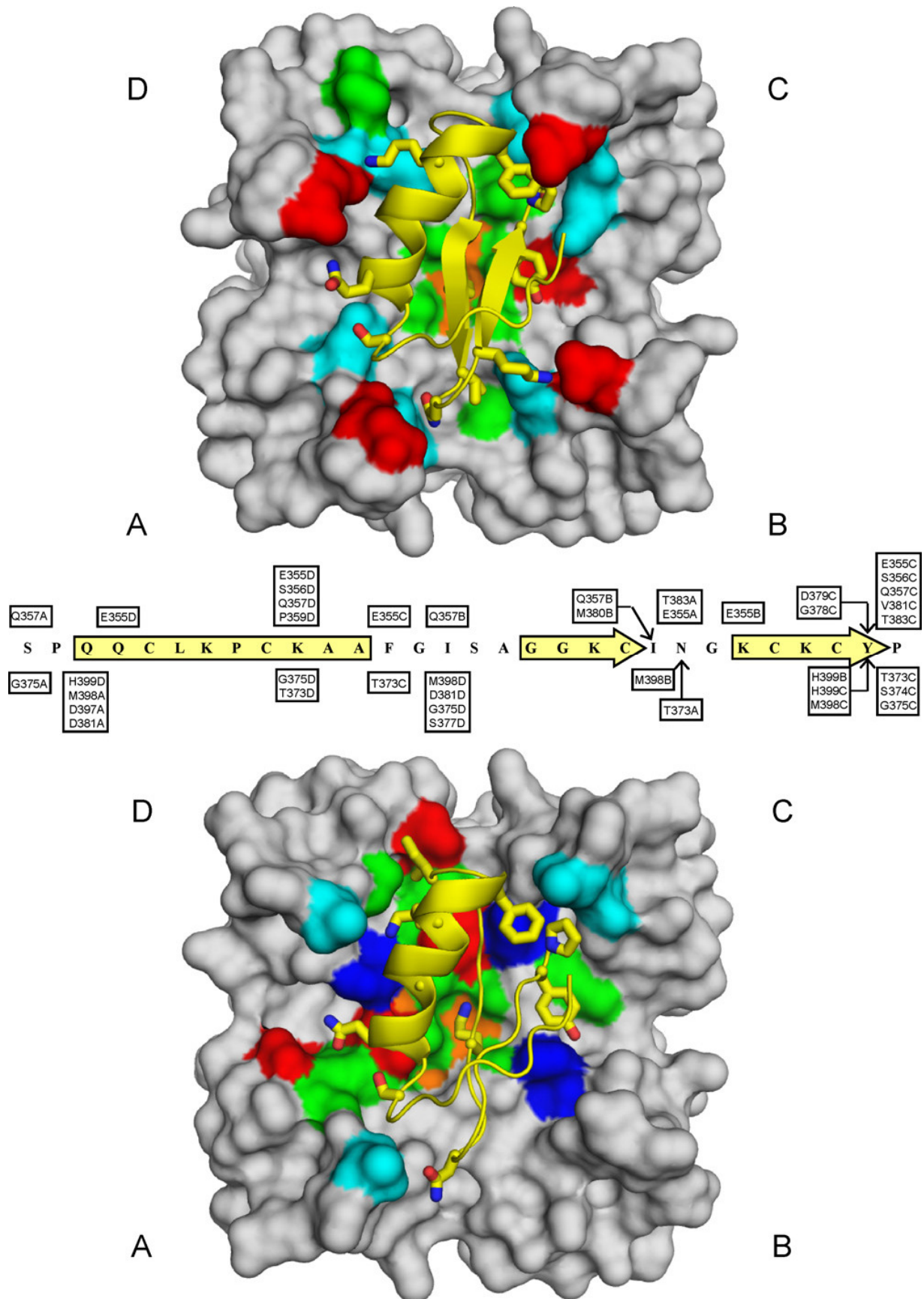
<sup>i</sup> hKv1.2 COS-7 sejtekben és mKv1.3 L929 vagy MEL sejtekben (Mouhat és mtsai, 2005)

<sup>j</sup> rKv1.2 B82-ben és mKv1.3 MEL sejtekben (Regaya és mtsai, 2004)

A MTX toxin Y32 diád-aminosava kölcsönhat a mutáns hKv1.3 T399 aminosavával; tehát úgy tűnik, hogy a vad típusú Kv1.3 H399-es aminosava és a toxinban lévő diád-tirozin közötti kölcsönhatás megakadályozza a toxin kötődését. Ez lehet a helyzet a Css20 esetében is; dokkolási szimulációink is azt jelzik, hogy kölcsönhatás van a toxin Y37 aminosava és a hKv1.3 két alegységén lévő H399 között. Habár számos olyan toxin van, amelyek tirozinnal rendelkeznek az aromás diád-pozícióban, és amelyek a Kv1.3-at nanomoláris koncentrációban blokkolják – mint pl. a noxiustoxin, hongotoxin-1 és a Css20 – a Kv1.3-ra vonatkozó szelektivitás szempontjából előnyösnek látszik, ha a tirozint egy másik aminosavra cserélnék. A Kv1.3 leghatékonyabb skorpió-toxin gátlószerei a tirozintól különböző

aminosavat tartalmaznak az „aromás diád-pozícióban”, mint pl. fenil-alanint (Pi2, Pi3, anuroctoxin;  $\alpha$ -KTx 7.1, 7.2 és 6.12), treonint (kaliotoxin, OSK1;  $\alpha$ -KTx 3.1 és 3.7) vagy aszparagint (HsTx1  $\alpha$ -KTx 6.3). Azok a toxinok pedig, amelyek jobban gátolják a Kv1.2-t, mint a Kv1.3-at, mind tirozinnal rendelkeznek ezen a helyen [MTX, Pi1, CoTX1 ( $\alpha$ -KTx 10.1), Pi4 ( $\alpha$ -KTx 6.4), lásd a 4. táblázatban]. Így, amíg a csatorna pórusába belenyúló lizin nélkülözhetetlennek látszik mindkét csatorna blokkolásánál, addig a diád másik felét megtestesítő tirozin a Kv1.2-felé tolja el a szelektivitást. Ezzel összhangban, dokkolási eredményeink számos kölcsönhatási pontot jeleznek a toxin Y37- és P38-as aminosavai és mindkét csatorna különböző aminosavai között (14. ábra). Ebből arra következtethetünk, hogy az „aromás diád-aminosavak” pozíciójánál a térbeli megszorítás nagyon fontos meghatározója a nagy affinitású kötődésnek.

A toxinok különböző részeinek fontosságát a csatorna-felismerésben hűen tükrözi az a kísérlet, amikor előállítottak egy olyan hibrid (kiméra) toxint, amely a MTX Kv1.2-re specifikus  $\alpha$ -helikális N-terminális részéből és a HsTx1 Kv1.3-ra specifikus C-terminális részéből áll (a két részt szaggatott vonallal különítettük el a 4. táblázatban). E kísérlet azt mutatta, hogy a MTX C-terminális felét kicserélve a HsTx1 ugyanezen részére, teljesen megszűnt a Kv1.2-re vonatkozó nagy affinitású blokkolás, ami ezen rész fontosságát jelzi a Kv1.2 és a Kv1.3 közötti szelektivitásban (Regaya és mtsai, 2004). Ezen régió részletesebb vizsgálata rámutatott a Kv1.2 és a Kv1.3 specifikus toxinok pozitív és negatív töltésű oldalláncokkal rendelkező aminosavainak számbeli különbségeire (4. táblázat). Azoknak a toxinoknak, amelyek a Kv1.3-ra vonatkozó nagyobb affinitással rendelkeznek, nagyobb nettó pozitív töltésük van általában. De ami még fontosabb, hogy a toxin C-terminális felének nagyobb nettó pozitív töltése korrelál a nagyobb Kv1.3 szelektivitással a Kv1.2-vel szemben. A Css20 beleillik ebbe a képbe: csak három pozitív töltésű aminosava van (a diád- és két másik lizin) a C-terminális részen és nagyobb is az affinitása a Kv1.2-re. Továbbá a Css20 dokkolási szimulációja a hKv1.2- és a hKv1.3 esetében azt jósolja, hogy ezek a nem-diád lizinek (K33 és K35) egy hidrogén-kötéssel és számos hidrofób kontaktussal kapcsolódnak a hKv1.2-höz, a hKv1.3-hoz viszont nem (14. ábra; adatok nincsenek bemutatva).



**14. ábra** Kölcsönhatások modellezése a Csx20 és a hKv1.2 (fölső) és a hKv1.3 (alsó) csatornák között.

A toxin citromsárga színnel van megjelenítve, a másodlagos szerkezet szintjén, az ioncsatorna pedig mint molekuláris felszín. A toxin aminosavainak azon oldalláncai, amelyek kontaktust alakítanak ki a

csatornával, pálcikákként tüntettük fel, amelyek N és O atomjait kékre és pirosra színeztük. A csatorna azon aminosavai, amelyek közvetlen kölcsönhatásba lépnek a toxinnal a következő színkodolásúak: piros: negatív töltésű (Asp és Glu), kék: pozitív töltésű (Arg, His és Lys), cián: poláros (Asn, Gln, Ser és Thr), zöld: hidrofób (Gly, Met, Pro és Val), narancs: aromás (Tyr).

A középső panel a toxin aminosav-szekvenciáját mutatja a 9-től indulva. Azok az aminosavak, amelyek kölcsönhatnak a C<sub>ss</sub>20-szal a hKv1.2-ben a toxin-szekvencia fölé írtuk, míg a hKv1.3-belié alá. Az utolsó betű (A-D) az aminosav sorszáma után a tetramer csatorna megfelelő alegységére utal.

A középső panelen a sárgás színű nyilak és a téglalap a  $\beta$ -redőket és az  $\alpha$ -hélixet jelzik.

Sőt, a kritikus lizintől – amely lizin nagyon közel helyezkedhet el a csatorna felszínéhez, és úgy gondolják róla, hogy az oldallánca belenyúlik a szelektivitási filterbe – két pozícióval a C-terminális irányában elhelyezkedő aminosav (bekeretezve a 4. táblázatban) egy izoleucin a nagy affinitású Kv1.2 blokkolóknak, míg egy metionin a Kv1.3 specifikus toxinokban. Ezt az izoleucint kulcsfontosságúnak találták a CoTx (Jouirou és mtsai, 2004) és a Pi4 (M'Barek és mtsai, 2003) toxinok valamint a Kv1.2 közötti kölcsönhatásnál. A C<sub>ss</sub>20-ban ennél a pozíciónál egy izoleucin (I30) van, ami beleillik a Kv1.2 szelektív toxinok mintázatába, és a dokkolási eredményeink is megerősítették azt, hogy ez az aminosav valóban közelebb van a hKv1.2 szájadékának aljához (kb. 2Å), mint a hKv1.3-nál (kb. 5Å), ami jobb kontaktust eredményez.

A toxinok N-terminális szegmense – amely az  $\alpha$ -hélix régiót tartalmazza – nem mutat olyan nyilvánvaló különbséget, mint amire az alapján számítanánk, hogy jelentős különbségek vannak e toxinok a Kv1.2 és Kv1.3 csatornák iránti affinitásában. Az MTX-HsTx1 hibrid (kiméra) kísérletek azonban egyértelműen azt igazolják, hogy ennek a régiónak kritikus szerepe van a csatornához való kötődésben is. A HsTx1 N-terminális felét kicserélve a MTX ugyanazon részére, a toxin Kv1.3-ra vonatkozó affinitása majdnem 400-ad részére csökkent (Regaya és mtsai, 2004). Az OSK1 ezen régiójának három aminosavát kicserélve a kaliotoxinban található aminosavakra (OSK1-12, 16, 20, a mutáns aminosavak aláhúzva a 4. táblázatban) egy egyébként is Kv1.3-ra nagy szelektivitással bíró toxin szelektivitását majdnem 10-szer nagyobbra növelte (Mouhat és mtsai, 2005). Az OSK1-ben egyetlen aminosav mutációja, a K20D majdnem 7-szer nagyobb Kv1.3-szelektivitást eredményezett. A CoTx-ben az R16-os, az előbbivel ekvivalens aminosavról azt mutatták ki, hogy kölcsönhat a Kv1.2-vel, amiből arra következtethetünk, hogy ebben a pozícióban egy pozitív töltésű aminosav jobb kötődést eredményez a Kv1.2-höz, mint a Kv1.3-hoz (Jouirou és mtsai, 2004). A Pi4 R19-es aminosava szintén befolyásolja a kötődést a Kv1.2-höz és azok a toxinok, amelyek specifikusak erre a csatornára, egy argininnal vagy egy glutaminnal rendelkeznek ebben a pozícióban. Míg azoknak a toxinoknak, amelyek alacsony affinitásúak a Kv1.2-re, egy töltetlen vagy egy negatív töltésű aminosavuk van, rövid oldallánccal (M'Barek és mtsai, 2003). Ebben a tekintetben a C<sub>ss</sub>20 különbözik a nagy affinitású Kv1.2-t

blokkoló toxinoktól, mert két alaninja van ennél a pozíciónál (19-es és 20-as aminosavak). A Css20 más aminosavairól az N-terminális részen az gondoljuk, hogy specifikus kölcsönhatást létesítenek nem-konzervatív aminosavakkal a *turret*-nél, melyek a következők: S9, amely számos kontaktust létesít a csatornák aminosavaival a Q357A pozíciónál hKv1.2-nél és G375A-nál hKv1.3 esetében (a pozícióknál az utolsó A betű a csatornák alegységét jelöli a 14. ábrának megfelelően); míg a toxin K18-as aminosava a hKv1.2 csatorna D-alegységének E335-ös pozíciójában lévő aminosavához kötődik és a hKv1.3 D-alegységének T373-as aminosavához. A fentebb említett kritériumok teljesülése esetén – vagyis a C-terminális rész alacsony nettó töltése, a diád tirozin (Y37) megléte és a 30-as pozícióban az izoleucin jelenléte – a Css20 nagyobb affinitása jósolható Kv1.2-re. Viszont a 19- és 20-as pozícióban lévő alaninok valószínűleg ez ellen dolgoznak, ami egy mérsékelttel nagyobb szelektivitást eredményez a Kv1.2-re, a Kv1.3-mal szemben.

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

A Css20 általi egyensúlyi blokkolás kialakulása, valamint a blokkolásból történő visszatérés 30 s alatt megtörtént Kv1.3 esetében; ezzel szemben a gátlás kialakulása kb. 10-szer lassabb volt és a visszatérés legalább 30-szor lassabb Kv1.2 esetében. A különbség a toxin asszociációs és disszociációs sebességeiben a Kv1.2 és a Kv1.3 csatornákra vonatkozóan azt jelzi, hogy különböző módon hat kölcsön a Css20 a csatornákkal hasonló affinitása ellenére. A gyors asszociáció a Kv1.3-hoz magában foglalja azt, hogy a toxin gyorsan orientálódik a dokkolás korai fázisában, valószínűleg távolható elektrosztatikus kölcsönhatással, de számos nem kedvező, közeli érintkezésből adódó kölcsönhatás lehet az oka a gyors disszociációnak (Goldstein és mtsai, 1994). A dokkolási eredmények teljes egyezésben vannak ezzel az elképzeléssel; a hKv1.3 csatorna legtöbb kölcsönható aminosava a szelektivitási filter azon részei, amelyek kontaktust alakítanak ki elsősorban a toxin eldugaszoló részével, a K28-as aminosavval. Más részről, a toxin orientációját a Kv1.2-höz történő dokkolás során úgy tűnik, hogy nem a távolható elektrosztatikus kölcsönhatás irányítja, hanem hogy a Css20 érintkező felülete jobban illeszkedik a Kv1.2-höz, egy erőteljes hidrogén-kötéses hálózaton keresztül – amit a dokkolás is megjósolt – a csatorna *turret* aminosavai és a toxin tengelye mentén elhelyezkedő aminosavai között, ami egy lassabb disszociációhoz és egy nagyobb affinitáshoz vezet.

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

A Tst26 egy szokatlan tulajdonsága, hogy lassítja a Kv1.3 csatorna inaktivációját. Ez a jelenség talán azzal magyarázható, amit a „foot-in-the-door” modellnek neveznek, amelyet korábban a tetraethylammonium (Choi és mtsai, 1991, Grissmer és Cahalan 1989) kapcsán írtak le, amely azt mondja, hogy a blokkoló anyag jelenléte megakadályozza azt a konformáció változást, amely szükséges a csatorna lassú inaktivációjához. A szelektivitási filter konformációja és a  $K^+$  jelenléte a szelektivitási filterben irányítja a lassú inaktivációt (Baukrowitz és Yellen 1996, Starkus és mtsai, 1997). Mindkettő befolyásolható a toxin bekötődésével. A bekötődött toxin csapdába ejti a szelektivitási filterben lévő  $K^+$ -ot, ami így megakadályozza a csatorna lassú inaktiválódásához szükséges konformáció-változást (Baukrowitz és Yellen 1996). A legtöbb toxin esetében a toxin a csatornához hozzákötődve sokkal hosszabb időt tölt el, mint az inaktivációs folyamat időállandója. Így csupán elenyésző számú csatorna van nem blokkolt állapotban a depolarizációs impulzus alatt és járul hozzá a teljes-sejt áramhoz. A Kv1.3 csatorna Tst26 általi blokkolása és az abból történő teljes visszatérés 15 s alatt megtörténik, ami azt jelenti, hogy az asszociációs és disszociációs időállandó a néhány s-os tartományban van. Sajnos a Tst26 blokkolási kinetikája nem határozható meg jobb időfelbontásban a Kv1.3 csatorna egy belső (inherent) tulajdonsága miatt, amit kummulatív inaktivációnak hívnak (Baukrowitz és Yellen 1996), ami mint válasz alakul ki egy sorozat rövid depolarizáló impulzusra és így limitálja a csúcsáram meghatározásának gyakoriságát. Mindamellet a toxin asszociációs és disszociációs időállandója összemérhető az inaktivációs folyamat időtartamával (1-1.5 s), tehát több asszociációs és disszociációs esemény is megtörténhet a depolarizációs impulzus alatt. Ezért azok a csatornák, amelyek nem inaktiválódnak a Tst26-tal való kölcsönhatás miatt, hozzájárulhatnak a teljes-sejt áramhoz, s ezzel egy lassabb makroszkopikus inaktivációs kinetikát eredményeznek. Ennek a jelenségnek a következménye az egyensúlyi- és a csúcsáram hányadosának növekedésében is, mivel az egyensúlyi áram nagyságát az inaktív állapotba való kerülésnek és az abból való kikerülésnek a relatív arányából határozzuk meg. Ennek az arálynak a lassulása a nem-inaktiválódott csatornák nagyobb arányát fogja eredményezni, és így nagyobb egyensúlyi áramot, ami egybevág azzal, amit találtunk.

## Összefoglalás

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

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

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

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

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

## Az értekezésben felhasznált közlemények

- Aiyar, J., J. P. Rizzi, G. A. Gutman, and K. G. Chandy. 1996. The signature sequence of voltage-gated potassium channels projects into the external vestibule. *Journal of Biological Chemistry* 271: 31013-31016.
- Bagdany, M., C. V. Batista, N. A. Valdez-Cruz, S. Somodi, R. C. Rodriguez de la Vega, A. F. Licea, Z. Varga, R. Gaspar, L. D. Possani, and G. Panyi. 2005. Anuroctoxin, a new scorpion toxin of the alpha-KTx 6 subfamily, is highly selective for Kv1.3 over IKCa1 ion channels of human T lymphocytes. *Mol Pharmacol* 67: 1034-44.
- Batista, C. V., F. Gomez-Lagunas, R. C. Rodriguez de la Vega, P. Hajdu, G. Panyi, R. Gaspar, and L. D. Possani. 2002. Two novel toxins from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* that block Kv1.3 and Shaker B K(+)-channels with distinctly different affinities. *Biochim Biophys Acta* 1601: 123-31.
- Baukrowitz, T., and G. Yellen. 1996. Use-dependent blockers and exit rate of the last ion from the multi-ion pore of a K<sup>+</sup> channel. *Science* 271: 653-6.
- Bednarek, M. A., R. M. Bugianesi, R. J. Leonard, and J. P. Felix. 1994. 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.
- Beeton, C., H. Wulff, N. E. Standifer, P. Azam, K. M. Mullen, M. W. Pennington, A. Kolski-Andreaco, E. Wei, A. Grino, D. R. Counts, P. H. Wang, C. J. LeeHealey, S. A. B, A. Sankaranarayanan, D. Homerick, W. W. Roeck, J. Tehranzadeh, K. L. Stanhope, P. Zimin, P. J. Havel, S. Griffey, H. G. Knaus, G. T. Nepom, G. A. Gutman, P. A. Calabresi, and K. G. Chandy. 2006. Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 17414-9.
- Cahalan, M. D., H. Wulff, and K. G. Chandy. 2001. Molecular properties and physiological roles of ion channels in the immune system. *Journal of Clinical Immunology* 21: 235-252.
- Carbone, E., E. Wanke, G. Prestipino, L. D. Possani, and A. Maelicke. 1982. Selective blockage of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels by a novel scorpion toxin. *Nature* 296: 90-1.
- Chandy, K. G., H. Wulff, C. Beeton, M. Pennington, G. A. Gutman, and M. D. Cahalan. 2004. K<sup>+</sup> channels as targets for specific immunomodulation. *Trends in Pharmacological Sciences* 25: 280-289.
- Choi, K. L., R. W. Aldrich, and G. Yellen. 1991. Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K<sup>+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 5092-5.

- Coleman, S. K., J. Newcombe, J. Pryke, and J. O. Dolly. 1999. Subunit composition of Kv1 channels in human CNS. *J Neurochem* 73: 849-58.
- Corzo, G., F. Papp, Z. Varga, O. Barraza, P. G. Espino-Solis, R. C. Rodriguez de la Vega, R. Gaspar, G. Panyi, and L. D. Possani. 2008. A selective blocker of Kv1.2 and Kv1.3 potassium channels from the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*. *Biochem Pharmacol* 76: 1142-54.
- Couraud, F., E. Jover, J. M. Dubois, and H. Rochat. 1982. Two types of scorpion receptor sites, one related to the activation, the other to the inactivation of the action potential sodium channel. *Toxicon* 20: 9-16.
- Crabtree, G. R. 1999. Generic signals and specific outcomes: Signaling through Ca<sup>2+</sup>, calcineurin, and NF-AT. *Cell* 96: 611-614.
- Dauplais, M., B. Gilquin, L. D. Possani, G. Gurrola-Briones, C. Roumestand, and A. Menez. 1995. Determination of the three-dimensional solution structure of noxiustoxin: analysis of structural differences with related short-chain scorpion toxins. *Biochemistry* 34: 16563-73.
- Dauplais, M., A. Lecoq, J. X. Song, J. Cotton, N. Jamin, B. Gilquin, C. Roumestand, C. Vita, C. L. C. deMedeiros, E. G. Rowan, A. L. Harvey, and A. Menez. 1997. On the convergent evolution of animal toxins - Conservation of a diad of functional residues in potassium channel-blocking toxins with unrelated structures. *Journal of Biological Chemistry* 272: 4302-4309.
- de la Vega, R. C. R., E. Merino, B. Becerril, and L. D. Possani. 2003. Novel interactions between K<sup>+</sup> channels and scorpion toxins. *Trends in Pharmacological Sciences* 24: 222-227.
- DeCoursey, T. E., K. G. Chandy, S. Gupta, and M. D. Cahalan. 1984. Voltage-gated K<sup>+</sup> channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? *Nature* 307: 465-8.
- Deutsch, C., D. Krause, and S. C. Lee. 1986. Voltage-gated potassium conductance in human T lymphocytes stimulated with phorbol ester. *J Physiol* 372: 405-23.
- Doyle, D. A., J. Morais Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait, and R. MacKinnon. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* 280: 69-77.
- Ehring, G. R., H. H. Kerschbaum, C. Eder, A. L. Neben, C. M. Fanger, R. M. Khoury, P. A. Negulescu, and M. D. Cahalan. 1998. A nongenomic mechanism for progesterone-mediated immunosuppression: inhibition of K<sup>+</sup> channels, Ca<sup>2+</sup> signaling, and gene expression in T lymphocytes. *J Exp Med* 188: 1593-602.
- Fanger, C. M., A. L. Neben, and M. D. Cahalan. 2000. Differential Ca<sup>2+</sup> influx, K-Ca channel activity, and Ca<sup>2+</sup> clearance distinguish Th1 and Th2 lymphocytes. *Journal of Immunology* 164: 1153-1160.

- Garcia-Calvo, M., R. J. Leonard, J. Novick, S. P. Stevens, W. Schmalhofer, G. J. Kaczorowski, and M. L. Garcia. 1993. Purification, characterization, and biosynthesis of margatoxin, a component of *Centruroides margaritatus* venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels. *J Biol Chem* 268: 18866-74.
- Gimenez-Gallego, G., M. A. Navia, J. P. Reuben, G. M. Katz, G. J. Kaczorowski, and M. L. Garcia. 1988. Purification, sequence, and model structure of charybdotoxin, a potent selective inhibitor of calcium-activated potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 3329-33.
- Goldstein, S. A., D. J. Pheasant, and C. Miller. 1994. The charybdotoxin receptor of a Shaker K<sup>+</sup> channel: peptide and channel residues mediating molecular recognition. *Neuron* 12: 1377-88.
- Grissmer, S., and M. Cahalan. 1989. TEA prevents inactivation while blocking open K<sup>+</sup> channels in human T lymphocytes. *Biophys J* 55: 203-6.
- Grissmer, S., A. N. Nguyen, J. Aiyar, D. C. Hanson, R. J. Mather, G. A. Gutman, M. J. Karmilowicz, D. D. Auperin, and K. G. Chandy. 1994. Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K<sup>+</sup> channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol Pharmacol* 45: 1227-34.
- Grissmer, S., A. N. Nguyen, and M. D. Cahalan. 1993. Calcium-activated potassium channels in resting and activated human T lymphocytes. Expression levels, calcium dependence, ion selectivity, and pharmacology. *J Gen Physiol* 102: 601-30.
- Gross, A., and R. MacKinnon. 1996. Agitoxin footprinting the shaker potassium channel pore. *Neuron* 16: 399-406.
- Gutman, G. A., K. G. Chandy, S. Grissmer, M. Lazdunski, D. Mckinnon, L. A. Pardo, G. A. Robertson, B. Rudy, M. C. Sanguinetti, W. Stuhmer, and X. L. Wang. 2005. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacological Reviews* 57: 473-508.
- Hamill, O. P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, and F. J. Sigworth. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391: 85-100.
- Hanner, M., W. A. Schmalhofer, B. Green, C. Bordallo, J. Liu, R. S. Slaughter, G. J. Kaczorowski, and M. L. Garcia. 1999. Binding of correolide to K(v)1 family potassium channels. Mapping the domains of high affinity interaction. *J Biol Chem* 274: 25237-44.
- Isacoff, E. Y., Y. N. Jan, and L. Y. Jan. 1990. Evidence for the formation of heteromultimeric potassium channels in *Xenopus* oocytes. *Nature* 345: 530-4.
- Janeway, C. A. 2001. How the immune system protects the host from infection. *Microbes and Infection* 3: 1167-1171.

- Jiang, Y., A. Lee, J. Chen, V. Ruta, M. Cadene, B. T. Chait, and R. MacKinnon. 2003a. X-ray structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature* 423: 33-41.
- Jiang, Y. X., A. Lee, J. Y. Chen, V. Ruta, M. Cadene, B. T. Chait, and R. MacKinnon. 2003b. X-ray structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature* 423: 33-41.
- Jouirou, B., A. Mosbah, V. Visan, S. Grissmer, S. M'Barek, Z. Fajloun, J. Van Rietschoten, C. Devaux, H. Rochat, G. Lippens, M. El Ayeb, M. De Waard, K. Mabrouk, and J. M. Sabatier. 2004. Cobatoxin 1 from *Centruroides noxius* scorpion venom: chemical synthesis, three-dimensional structure in solution, pharmacology and docking on K<sup>+</sup> channels. *Biochem J* 377: 37-49.
- Jover, E., F. Couraud, and H. Rochat. 1980. Two types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 95: 1607-14.
- Koch, R. O., S. G. Wanner, A. Koschak, M. Hanner, C. Schwarzer, G. J. Kaczorowski, R. S. Slaughter, M. L. Garcia, and H. G. Knaus. 1997. Complex subunit assembly of neuronal voltage-gated K<sup>+</sup> channels. Basis for high-affinity toxin interactions and pharmacology. *J Biol Chem* 272: 27577-81.
- Koo, G. C., J. T. Blake, A. Talento, M. Nguyen, S. Lin, A. Sirotina, K. Shah, K. Mulvany, D. Hora, Jr., P. Cunningham, D. L. Wunderler, O. B. McManus, R. Slaughter, R. Bugianesi, J. Felix, M. Garcia, J. Williamson, G. Kaczorowski, N. H. Sigal, M. S. Springer, and W. Feeney. 1997. Blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 inhibits immune responses in vivo. *J Immunol* 158: 5120-8.
- Koschak, A., R. M. Bugianesi, J. Mitterdorfer, G. J. Kaczorowski, M. L. Garcia, and H. G. Knaus. 1998. 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.
- Leonard, R. J., M. L. Garcia, R. S. Slaughter, and J. P. Reuben. 1992. Selective Blockers of Voltage-Gated K<sup>+</sup> Channels Depolarize Human Lymphocytes-T - Mechanism of the Antiproliferative Effect of Charybdotoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 10094-10098.
- Lewis, R. S. 2001. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annual Review of Immunology* 19: 497-521.
- Lewis, R. S., and M. D. Cahalan. 1995. Potassium and Calcium Channels in Lymphocytes. *Annual Review of Immunology* 13: 623-653.
- Luik, R. M., and R. S. Lewis. 2007. New insights into the molecular mechanisms of store-operated Ca<sup>2+</sup> signaling in T cells. *Trends in Molecular Medicine* 13: 103-107.
- Matteson, D. R., and C. Deutsch. 1984. K-Channels in Lymphocyte-T - a Patch Clamp Study Using Monoclonal-Antibody Adhesion. *Nature* 307: 468-471.

- M'Barek, S., A. Mosbah, G. Sandoz, Z. Fajloun, T. Olamendi-Portugal, H. Rochat, F. Sampieri, J. I. Guijarro, P. Mansuelle, M. Delepierre, M. De Waard, and J. M. Sabatier. 2003. Synthesis and characterization of Pi4, a scorpion toxin from *Pandinus imperator* that acts on K<sup>+</sup> channels. *Eur J Biochem* 270: 3583-92.
- Mccrady, C. W., C. M. Ely, E. Westin, and R. A. Carchman. 1988. Coordination and Reversibility of Signals for Proliferative Activation and Interleukin-2 Messenger-Rna Production in Resting Human Lymphocyte-T by Phorbol Ester and Calcium Ionophore. *Journal of Biological Chemistry* 263: 18537-18544.
- Meves, H., J. M. Simard, and D. D. Watt. 1986. Interactions of scorpion toxins with the sodium channel. *Ann N Y Acad Sci* 479: 113-32.
- Miller, C., E. Moczydlowski, R. Latorre, and M. Phillips. 1985. Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels from mammalian skeletal muscle. *Nature* 313: 316-8.
- Mouhat, S., A. Mosbah, V. Visan, H. Wulff, M. Delepierre, H. Darbon, S. Grissmer, M. De Waard, and J. M. Sabatier. 2004. The 'functional' dyad of scorpion toxin Pi1 is not itself a prerequisite for toxin binding to the voltage-gated Kv1.2 potassium channels. *Biochem J* 377: 25-36.
- Mouhat, S., V. Visan, S. Ananthakrishnan, H. Wulff, N. Andreotti, S. Grissmer, H. Darbon, M. De Waard, and J. M. Sabatier. 2005. K<sup>+</sup> channel types targeted by synthetic OSK1, a toxin from *Orthochirus scrobiculosus* scorpion venom. *Biochem J* 385: 95-104.
- Nonner, W. 1979. Effects of *Leiurus* scorpion venom on the "gating" current in myelinated nerve. *Adv Cytopharmacol* 3: 345-52.
- Olamendi-Portugal, T., S. Somodi, J. A. Fernandez, F. Z. Zamudio, B. Becerril, Z. Varga, G. Panyi, R. Gaspar, and L. D. Possani. 2005. Novel alpha-KTx peptides from the venom of the scorpion *Centruroides elegans* selectively blockade Kv1.3 over IKCa1 K<sup>+</sup> channels of T cells. *Toxicon* 46: 418-29.
- Panyi, G., G. Vamosi, A. Bodnar, R. Gaspar, and S. Damjanovich. 2004a. Looking through ion channels: recharged concepts in T-cell signaling. *Trends in Immunology* 25: 565-569.
- Panyi, G., Z. Varga, and R. Gaspar. 2004b. Ion channels and lymphocyte activation. *Immunology Letters* 92: 55-66.
- Papp, F., C. V. Batista, Z. Varga, M. Herceg, S. A. Roman-Gonzalez, R. Gaspar, L. D. Possani, and G. Panyi. 2009. Tst26, a novel peptide blocker of Kv1.2 and Kv1.3 channels from the venom of *Tityus stigmurus*. *Toxicon* 54: 379-89.
- Peter, M., Jr., Z. Varga, P. Hajdu, R. Gaspar, Jr., S. Damjanovich, E. Horjales, L. D. Possani, and G. Panyi. 2001. Effects of toxins Pi2 and Pi3 on human T lymphocyte Kv1.3 channels: the role of Glu7 and Lys24. *J Membr Biol* 179: 13-25.

- Possani, L. D., B. M. Martin, I. Svendsen, G. S. Rode, and B. W. Erickson. 1985. Scorpion toxins from *Centruroides noxius* and *Tityus serrulatus*. Primary structures and sequence comparison by metric analysis. *Biochem J* 229: 739-50.
- Prakriya, M., and R. S. Lewis. 2003. CRAC channels: activation, permeation, and the search for a molecular identity. *Cell Calcium* 33: 311-321.
- Price, M., S. C. Lee, and C. Deutsch. 1989. Charybdotoxin inhibits proliferation and interleukin 2 production in human peripheral blood lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 10171-5.
- Rao, A., C. Luo, and P. G. Hogan. 1997. Transcription factors of the NFAT family: Regulation and function. *Annual Review of Immunology* 15: 707-747.
- Regaya, I., C. Beeton, G. Ferrat, N. Andreotti, H. Darbon, M. De Waard, and J. M. Sabatier. 2004. Evidence for domain-specific recognition of SK and Kv channels by MTX and HsTx1 scorpion toxins. *J Biol Chem* 279: 55690-6.
- Sallusto, F., and A. Lanzavecchia. 2000. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunological Reviews* 177: 134-140.
- Sands, S. B., R. S. Lewis, and M. D. Cahalan. 1989. Charybdotoxin blocks voltage-gated K<sup>+</sup> channels in human and murine T lymphocytes. *J Gen Physiol* 93: 1061-74.
- Shaw, J. P., P. J. Utz, D. B. Durand, J. J. Toole, E. A. Emmel, and G. R. Crabtree. 1988. Identification of a Putative Regulator of Early T-Cell Activation Genes. *Science* 241: 202-205.
- Starkus, J. G., L. Kuschel, M. D. Rayner, and S. H. Heinemann. 1997. Ion conduction through C-type inactivated Shaker channels. *J Gen Physiol* 110: 539-50.
- Strichartz, G., T. Rando, and G. K. Wang. 1987. An integrated view of the molecular toxinology of sodium channel gating in excitable cells. *Annu Rev Neurosci* 10: 237-67.
- Strong, P. N., S. W. Weir, D. J. Beech, P. Hiestand, and H. P. Kocher. 1989. Effects of potassium channel toxins from *Leiurus quinquestriatus hebraeus* venom on responses to cromakalim in rabbit blood vessels. *Br J Pharmacol* 98: 817-26.
- Swartz, K. J., and R. MacKinnon. 1997. Hanatoxin modifies the gating of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel through multiple binding sites. *Neuron* 18: 665-73.
- Thomsen, W. J., and W. A. Catterall. 1989. Localization of the receptor site for alpha-scorpion toxins by antibody mapping: implications for sodium channel topology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 10161-5.

- Tytgat, J., K. G. Chandy, M. L. Garcia, G. A. Gutman, M. F. Martin-Eauclaire, J. J. van der Walt, and L. D. Possani. 1999. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies. *Trends Pharmacol Sci* 20: 444-7.
- Valdivia, H. H., O. Fuentes, R. el-Hayek, J. Morrissette, and R. Coronado. 1991. Activation of the ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup> release channel of sarcoplasmic reticulum by a novel scorpion venom. *J Biol Chem* 266: 19135-8.
- Villalonga, N., A. Escalada, R. Vicente, E. Sanchez-Tillo, A. Celada, C. Solsona, and A. Felipe. 2007. Kv1.3/Kv1.5 heteromeric channels compromise pharmacological responses in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 352: 913-8.
- Visan, V., Z. Fajloun, J. M. Sabatier, and S. Grissmer. 2004. Mapping of maurotoxin binding sites on hKv1.2, hKv1.3, and hIKCa1 channels. *Mol Pharmacol* 66: 1103-12.
- Werkman, T. R., T. A. Gustafson, R. S. Rogowski, M. P. Blaustein, and M. A. Rogawski. 1993. Tityustoxin-K alpha, a structurally novel and highly potent K<sup>+</sup> channel peptide toxin, interacts with the alpha-dendrotoxin binding site on the cloned Kv1.2 K<sup>+</sup> channel. *Mol Pharmacol* 44: 430-6.
- Wheeler, K. P., D. D. Watt, and M. Lazdunski. 1983. Classification of Na channel receptors specific for various scorpion toxins. *Pflugers Arch* 397: 164-5.
- Wu, M. M., R. M. Luik, and R. S. Lewis. 2007. Some assembly required: Constructing the elementary units of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Cell Calcium* 42: 163-172.
- Wulff, H., C. Beeton, and K. G. Chandy. 2003a. Potassium channels as therapeutic targets for autoimmune disorders. *Current Opinion in Drug Discovery & Development* 6: 640-647.
- Wulff, H., P. A. Calabresi, R. Allie, S. Yun, M. Pennington, C. Beeton, and K. G. Chandy. 2003b. The voltage-gated Kv1.3 K<sup>+</sup> channel in effector memory T cells as new target for MS (vol 111, pg 1703, 2003). *Journal of Clinical Investigation* 112: 298-298.
- Zhou, Y., J. H. Morais-Cabral, A. Kaufman, and R. MacKinnon. 2001. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K<sup>+</sup> channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* 414: 43-8.
- Zweifach, A., and R. S. Lewis. 1993. Mitogen-Regulated Ca<sup>2+</sup> Current of T-Lymphocytes Is Activated by Depletion of Intracellular Ca<sup>2+</sup> Stores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 6295-6299.

## Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

**IF: 4,711 (2008)**

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

**IF: 2,460 (2008)**

### Egyéb közlemény

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

**IF: 2,858 (2008)**

### Poszterek

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## Tárgyszavak

*Centruroides suffusus suffusus*, *Tityus Stigmurus*, K<sup>+</sup>-csatorna, Limfociták, Molekuláris modellezés, Skorpió méreg

## Keywords

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

## Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretném hálámat kifejezni témavezetőmnek, Dr. Panyi György egyetemi tanárnak, amiért bevezetett a tudományos kutatómunkába, szakmai munkámat napi szinten is irányította és felügyelte, nagy szakmai tudásával mindig a rendelkezésemre állt, és mindig maximálisan támogató, nem csupán a tudomány területén.

Köszönetem fejezem ki Dr. Szöllősi János egyetemi tanárnak, a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet mostani intézetigazgatójának, valamint Dr. Gáspár Rezső egyetemi tanárnak, korábbi igazgatónak, hogy lehetővé tették számomra, hogy munkámat az intézetben végezhessem.

Köszönöm Dr. Damjanovich Sándor akadémikus egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette számomra, hogy munkámat az MTA-DE Sejtbiológiai és Jelátviteli kutatócsoportban is végezhessem, munkámat folyamatosan figyelemmel kísérte és biztosította számomra a folyamatos szakmai fejlődés lehetőségét.

Köszönettel tartozom a patch-clamp laboratóriumban dolgozó kollégáimnak, barátaimnak, Dr. Krasznai Zoltánnak, Dr. Varga Zoltánnak, Dr. Hajdú Péternek, Dr. Szántó G. Tibornak, Tóth Ágnesnek, Bartók Ádámnak, Szilágyi Orsolyának, akik mindenben készségesen segítettek, és akikkel együtt mindig jó hangulatú légkört teremtettünk a közös munkához.

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