

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

Kv1.3 csatorna-gátló skorpiótoxinok farmakológiai vizsgálata

Bartók Ádám

Témavezető: Dr. Varga Zoltán



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2014

Kv1.3 csatorna-gátló skorpiótoxinok farmakológiai vizsgálata

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Bartók Ádám okleveles biológus/biotechnológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori
iskolája (Membránbiofizikai kérdések és vizsgálómódszerek
programja) keretében.

Témavezető: Dr. Varga Zoltán, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Dr. Várnai Péter, az MTA doktora
Dr. Penyige András, PhD

A doktori szigorlat időpontja: DE ÁOK Élettani Intézet könyvtára,
2014. szeptember 15. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Benkő Szilvia, PhD
Dr. Mike Árpád, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Dr. Várnai Péter, az MTA doktora
Dr. Benkő Szilvia, PhD
Dr. Mike Árpád, PhD
Dr. Penyige András, PhD

Az értekezés védésének időpontja: DE ÁOK Belgyógyászati Intézet
„A” épület tanterme, 2014. szeptember 15. 13 óra

1 Bevezetés

1.1 A T-limfociták aktivációs mechanizmusában résztvevő ioncsatornák szerepe

A T-limfocitákon kifejeződő ioncsatornák közül elsőként a feszültség-aktivált Kv1.3 csatornát írták le, melynek működése kulcsszerepet játszik a sejtek aktiválódásában. A Kv1.3 csatorna -60 mV-os membránpotenciál érték felett aktiválódhat, melynek következtében a csatornán át kiáramló kálium ionok a membránt hiperpolarizálják. Ennek következtében a csatorna nyitási valószínűsége lecsökken, így a depolarizáció negatív visszacsatolásként hat a Kv1.3 csatornákra. A T-limfocitákon a feszültség-aktivált Kv1.3 csatornák mellett kifejeződik a Ca^{2+} -aktivált KCa3.1 K^+ csatorna is, mely aktiválódása akkor következik be, amikor az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció 200 nM érték fölé emelkedik. A két említett csatorna típuson kívül több egyéb csatorna jelenlétét és kimutatták a T-limfociták plazmamembránjában. Ezek a csatornák az intracelluláris Ca^{2+} -raktárak kiürülése által aktivált Ca^{2+} csatornák, azaz CRAC csatornák (Calcium Release Activated Channels), a membránfeszülés-aktivált Cl^- csatornák, többféle TRP csatorna, kétpórusú K^+ csatornák, illetve feszültség-aktivált Na^+ és Ca^{2+} csatornák. Ezek közül a CRAC csatornák T-sejt aktivációban játszott szerepe jól ismert. A CRAC csatornán átfolyó áram aktiválásához elengedhetetlen az Orai1 és STIM1 fehérjék asszociációja. Az Orai1 fehérjék a plazmamembránban, míg a STIM1 fehérjék az endoplazmás retikulum membránjában találhatóak. Az endoplazmás retikulumból történő Ca^{2+} kiürülést a STIM1 fehérje a retikulum lumenje felé néző ún. EF-hand Ca^{2+} szenzor alegységével képes érzékelni, majd az Orai1 fehérjék tetramerizálásával a CRAC csatornák aktiválódását indítja be. A kétféle K^+ csatorna, illetve a CRAC csatorna együttes működésének a következménye egy hosszan tartó intracelluláris Ca^{2+} jel, mely szükséges feltétele a T sejtek aktivációjának. Ennek során a CRAC csatornákon keresztül Ca^{2+} áramlik be az intracelluláris térbe, melyhez a hajtó erőt a K^+ csatornák aktiválódása biztosítja a membrán hiperpolarizálása révén.

Az elmúlt években számos peptid-toxint is izoláltak különböző állatok mérgeiből, melyek a különböző ioncsatornák, köztük a feszültség-aktivált K^+ csatornák nagy affinitású gátlószereinek bizonyultak. A peptid-csatorna interakcióra jellemző, hogy a toxinok a csatornák extracelluláris régiójához kötődve eltömítik annak pórusát, ennek következtében megakadályozzák a csatornán keresztüli ionáramlást. Mivel a feszültség-kapuzott

káliumcsatornák nagyfokú szekvencia-homológiával rendelkeznek, az izolált természetes toxinok sokszor kis szelektivitással bírnak, azaz több, különböző ioncsatornát is blokkolhatnak, eltérő affinitással. Mivel a szervezet különböző szöveteiben, legfőképp az ingerelhető sejtekben a feszültség-aktivált K^+ csatornák szerepe kulcsfontosságú a sejtek működéséhez, a nem szelektív gátlószerek terápiás alkalmazása akár súlyos mellékhatásokkal is járhat.

1.2 A Kv1.3 csatorna, mint lehetséges célpont az autoimmun betegségek kezelésében

Mivel a membránpotenciál és a Ca^{2+} jel kialakulása nagyban függ a K^+ csatornák működésétől, a kálium csatorna gátlószerek felhasználhatóak a T sejtek aktiválódását gátló terápiás szerekként. Egy ideális immunzuppresszor csak azon T sejtek működését gátolja, melyek az autoimmun betegség kialakításában játszanak szerepet, míg az immunrendszer többi sejtjére nem fejt ki hatást. Ilyen terápiára ad lehetőséget a T sejtek különböző alpopulációira jellemző K^+ csatorna expressziós mintázata. A sejtfelszíni markerek mintázata, a citokin szekréció, illetve élettani funkciók alapján a sejteket három nagy csoportra különíthetjük el. Az első csoportot képezik a Naiv T sejtek, melyek még nem találkoztak antigénnel, specifikus markereik a $CCR7^+$ és $CD45RA^+$. A második csoportot a centrális memória T sejtek (T_{CM}) alkotják, melyek az effektor memória T sejt (T_{EM}) irányú terminális differenciáció során kerültek inaktív állapotba, majd a specifikus antigénnel újra találkozva effektor sejtjé alakulnak, markerei $CCR7^+$ és $CD45RA^-$. A harmadik csoportba tartoznak az effektor memória T sejtek (T_{EM}), melyek markerei a $CCR7^-$ és $CD45RA^{+/-}$. Ezek a sejtek jellemző kemokin receptorokat és adhézíós molekulákat fejeznek ki, melyek segítségével a gyulladt szövetekbe vándorolnak, ahol effektor funkciókat látnak el. A T_{EM} sejtek szerepét a szöveti károsodásban több autoimmun betegségben is kimutatták, pl.: szklerózis multiplex (MS), reumatoid artritisz és 1-es típusú diabetesz esetén.

Több tanulmányban is kimutatták, hogy stimulációt követően a fent említett T sejt csoportokban adott csoportra jellemző módon megváltozik a K^+ csatornák expressziója. Aktivációt megelőzően a nyugvó Naiv, T_{CM} és T_{EM} sejtek $CD4^+$ vagy $CD8^+$ fenotípustól függetlenül átlagosan sejtenként 200-300 darab Kv1.3 csatornát, míg emellett kb. 30 darab $KCa3.1$ csatornát fejeznek ki a plazmamembránjukban. Stimulációt követően a Naiv és T_{CM} sejtekben a Kv1.3 expressziós szintje kb. a másfélszeresére emelkedik, míg a $KCa3.1$

csatornák szintje több, mint tízszeresére emelkedik, így a sejtfelszínen található KCa3.1 csatornák átlagos száma eléri a kb. 500 darabot. Ezzel szemben a T_{EM} sejtekben az aktivációt követően a KCa3.1 csatornák száma változatlan marad, míg a Kv1.3 csatornák expressziós szintje megnő, és eléri a kb. 1500 darabos sejtenkénti mennyiséget. Ebből következően a T_{EM} sejtek aktivációs mechanizmusa a Kv1.3 csatorna működésétől függ, így annak gátlásával a T_{EM} sejtek aktiválódása megakadályozható. A Naiv és T_{CM} sejtek proliferációja az aktivációt követően szintén függ a Kv1.3 csatornák működésétől, mégis, a csatorna gátlásával a KCa3.1 csatornák expressziós szintjének megemelkedésének következtében a sejtek aktivációs mechanizmusa zavartalanul lezajlik. Ebből következik, hogy a T_{EM} sejtek proliferációja a Kv1.3 csatornák specifikus gátlószereivel szelektíven gátlható, ezért a nagy szelektivitású és affinitású Kv1.3 inhibitorok alkalmasak lehetnek az autoimmun megbetegedések kezelésére. Ezt a feltevést számos, autoimmun betegséget modellező *in vivo* állatkísérletben bizonyították.

A magas Kv1.3 és alacsony KCa3.1 expressziós szinttel rendelkező T_{EM} sejtek szöveti jelenlétét több, autoimmun betegségben szenvedő humán betegben is kimutatták, például Szklerózis multiplex (MS), 1-es típusú diabétesz (T1DM) és rheumatoid arthritisz (RA) esetében.

Ebből következik, hogy a Kv1.3 szelektív gátlószerek megfelelő gyógyszerhatóanyagok lehetnek a humán autoimmun megbetegedések terápiája során.

In vitro és *in vivo* kísérletek is kimutatták a Kv1.3 gátlószerek hatékonyságát és potenciális terápiás alkalmazhatóságát. Mivel valóban szelektív, nagy affinitású gátlószerek ritkán izolálhatók, többen irányított mutációk révén próbálják javítani a toxinok farmakológiai tulajdonságát. A megfelelő mutációk tervezéséhez elengedhetetlen a toxin-csatorna interakció minél jobb megismerése, melyhez az újonnan izolált skorpiótoxinok szerkezetének meghatározása és farmakológiai karakterizálása is nagyban hozzájárulhat.

A korábbi években munkacsoportunk számos újonnan izolált skorpiótoxin farmakológiai karakterizálásában vett részt, pl.: Pi1, Pi2, Pi3, anuroctoxin, Css20, TsT26 Vm24. Munkám során két újonnan izolált peptid, az OcyKTx2 és az urotoxin ioncsatorna gátló hatását vizsgáltam. Ezen felül részletesen vizsgáltuk a korábban izolált, sokak által a Kv1.3 csatorna szelektív gátlószerként ismert és alkalmazott margatoxin hatását különböző ioncsatornákon.

Annak ellenére, hogy a margatoxin a káliumcsatornák vizsgálatában széles körben használt, kereskedelmi forgalomban lévő molekula, olyan tanulmány, mely azonos feltételek mellett (expressziós rendszer, affinitás meghatározásának módja, stb.) keletkezett adatok alapján adna felvilágosítást a margatoxin receptorára még nem ismert.

A munkacsoportunk által korábban karakterizált anuroctoxin nagy affinitású gátlószere a Kv1.3 csatornának, viszont a Kv1.2 csatornát is blokkolja. Ebből következik, hogy a természetes anuroctoxin nem megfelelő az autoimmun megbetegedések terápiája során történő alkalmazásra. A kálium csatorna gátló toxinokról rendelkezésre álló eddigi ismereteink alapján létrehoztuk az anuroctoxin olyan mutáns változatait, melyek a Kv1.3 csatornát nagy affinitással és szelektíven gátolják.

Eredményeink hozzájárulhatnak a peptid toxinok jövőbeni terápiás célú felhasználásának elősegítéséhez, illetve az újabb nagy affinitású és szelektív Kv1.3 gátlószerek tervezésének sikerességéhez.

2 CÉLKITÚZÉSEK

1. Újonnan izolált skorpiótoxinok farmakológiai karakterizálása

Skorpiómérgekből izolált, új, eddig nem vizsgált peptidek különböző káliumcsatornákra kifejtett hatásának vizsgálata patch-clamp technikával.

2. A margatoxin szelektivitásának vizsgálata elektrofiziológiai módszerrel

Patch-clamp technikával feszültség-zár üzemmódban, teljes sejt, illetve outside-out patch konfigurációban kívánjuk tesztelni a margatoxin biológiai aktivitását a következő ioncsatornákon mért ionáramokon: Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.4, Kv1.5, Kv1.6, Kv1.7, Kv2.1, Shaker, KCa1.1, KCa3.1, Kv11.1 (hERG) és Nav1.5.

3. Az anuroctoxin előállítása rekombináns technikával

A toxin előállítását biológiai rendszerben rekombináns módszerrel *E. coli*-ban tervezzük. A rekombináns peptid analitikai vizsgálatát HPLC és tömegspektrometriás (MS) módszerekkel végezzük el, biológiai hatását a Kv1.2 és Kv1.3 csatornákon patch-clamp technikával mérjük.

4. Az anuroctoxin és annak mutáns változatainak előállítása szilárd fázisú kémiai szintézissel

Irodalmi adatok felhasználásával a toxin olyan régióinak azonosítása, melyek szerepet játszanak a szelektivitás és az affinitás meghatározásában. Ezt felhasználva mutációkat tervezünk a toxin szelektivitásának javítása érdekében. A mutáns toxinokat kémiai szintézissel kívánjuk előállítani kollaborációs partnerünk segítségével. Az anuroctoxin változatainak farmakológiai tulajdonságait patch-clamp technikával mérjük.

3 Anyagok és módszerek

3.1 Toxinok

Az OcyKTx2 toxint az *Opisthacanthus cayaporum* skorpió mérgéből izolálták. A faj több, Brazíliában élő egyedét befogták, majd megfelelő laboratóriumi körülmények közt tartva az állatok mérgét többszöri, elektromos stimulációval kinyerték. Az összegyűjtött méregből a vízdékony komponenseket kioldották, majd ebből a toxint HPLC technikával, C18 fordított fázisú oszloppal tisztították.

Az urotoxint az *Urodacus yaschenko*i Ausztráliában élő skorpió mérgéből izolálták az OcyKTx2 toxinnál leírtakkal megegyező módszerrel.

A rekombináns margatoxint (rMgTx) az Alomone Labs-tól (Izrael, Jeruzsálem) vásároltuk, katalógusszáma: RTM-325, Lot: MA103. A margatoxin *Centruroides margaritatus* skorpió mérgéből származik.

A szintetikus margatoxint (sMgTx) Peptide Institute Inc.-től (Japán, Osaka) vásároltuk, katalógusszáma: 4290-s, Lot: 560914.

A vad típusú anuroctoxin rekombináns változatát (rAnTx) laboratóriumunkban állítottuk elő *E. coli*-ban, affinitás kromatográfiás módszer segítségével (lásd később). Az anuroctoxin az *Anuroctonus phaiodactilus* skorpió mérgéből származik.

Az anuroctoxin szintetikus vad típusú (sAnTx), illetve mutáns változatait a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Vegytani Intézetben, Prof. Tóth Gábor és munkatársai szintetizálták, szilárd fázisú kémiai szintézissel.

3.2 Sejtek és ioncsatorna expressziós vektorok

3.2.1 Humán limfociták

A toxinok hatását hKv1.3 csatornán, a csatornát expresszáló, egészséges donorokból vett humán perifériás T-limfocitákon is mértük, melyeket Ficoll-Hypaque sűrűség grádiens centrifugálással izoláltuk majd phytohemagglutininnal aktiváltuk. A Kv1.3 áramokat az aktivációt követő 2-7. napban mértük.

3.2.2 tsA201 sejtvonala

A tsA201 sejtekben az alábbi ioncsatorna kódoló géneket expresszáltuk Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) reagenssel történő transzfekciót követően:

A hKv1.1, hKv1.2, hKv1.6 és hKv1.7 géneket pCMV6-GFP vektorban expresszáltuk, melyeket az Origene cégtől rendeltük.

A hKv1.3 csatornát a korábbiakban p-EGFP-C1 vektorba klónoztuk (Dr. Hajdú P.).

A hKv1.4 IR (inaktivációs domain-től megfosztott) gént kódoló vektor t D. Fedida, (University of British Columbia, Vancouver, Canada) ajándékozta.

A hKv1.5 gént kódoló plazmidot Dr. Heike Wulff (University of California, Davis CA) biztosította számunkra.

A rKv2.1 gént kódoló vektort Dr. S. Korn, (University of Connecticut, Storrs, CT) biztosította számunkra.

A hKCa3.1 (IKCa1) gént a pEGFP-C1 vektorban expresszáltuk, melyet szintén Dr. Heike Wulff ajándékozta.

A Shaker IR (inaktivációs domain –től megfosztott) csatorna expressziós vektorát G. Yellen (Harvard Medical School, Boston, MA) ajándékozta.

A hNaV1.5 csatorna expressziós vektorát R. Horn (Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA) ajándékozta.

A hERG csatorna génjét SH. Heinemann (Max-Planck-Gesellschaft, Jena, Germany) biztosította.

A hKCa1.1 (BK) gént pCleo plazmidban T. Hoshi (University of Pennsylvania, Philadelphia, PA) ajándékozta.

Mivel a HEK sejteken több ioncsatorna természetes, endogén expresszióját is leírták, a sejteken minden esetben outside-out patch konfigurációban végeztük az elektrofiziológiai méréseket.

3.2.3 L929 sejtvonala

Egér kötőszöveti eredetű sejtvonala. Az egér Kv1.1 (mKv1.1) csatorna génjével stabilan transzfektált L929 sejtvonala H. Wulff (UC Davis, CA, USA) ajándékozta munkacsoportunknak.

3.2.4 CHO sejtvonala

A CHO sejtekben a hKv1.1 és hKv1.2 csatornákat expresszáltuk.

3.2.5 Sf9 sejtvonala

Az Sf9, rovar eredetű sejtvonalon végzett méréseket kollaborációs partnereink (Prof. Lourival Domingos Possani munkacsoportja, Instituto de Biotecnologia, UNAM, Cuernavaca, Mexikó) végezték. A sejtekbe Shaker-IR ioncsatornát expresszáltak bakulovírusos transzfekció követően.

3.3 Tranzien transzfekció

A sejteket (mind a CHO-t és a tsA201-et) Lipofectamine 2000 reagenst használva transzfektáltuk a gyártó (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) útmutatásai szerint, standard feltételek között tenyésztve. A hKv1.1, hKv1.2, hKv1.3, hKv1.5, hKv1.6 és IKCa1 csatornákat kódoló vektorok C-terminális GFP vagy YFP (zöld/sárga fluoreszcens fehérje) tag-gel látják el a csatornákat, így a transzfektált, csatornát expresszáló sejtek fluoreszcens mikroszkóp segítségével közel 100%-os pontossággal azonosíthatók. A hKv1.4, rKv2.1, Shaker-IR, hERG, NaV1.5 és BK csatornák esetében a csatornát expresszáló gént 10:1 arányban kotranszfektáltuk a GFP génjét kódoló plazmiddal, így a zöld fluoreszcenciát

mutató sejtek nagy valószínűséggel a csatorna génjét kódoló vektort is felvették, és kifejezésre juttatják.

3.4 Elektrofiziológia

3.4.1 Az elektrofiziológiai mérésekhez használt műszerek és oldatok

Az elektrofiziológiai méréseket patch-clamp technikával végeztük, teljes-sejt, vagy outside-out patch konfigurációban, feszültség-zár üzemmódban, ahol a vizsgált sejt membránpotenciálját adott értéken tartva a sejtmembránon átfolyó áram nagyságát határoztuk meg. A mérésekhez a sejteket 3,5 mm átmérőjű Petri csészében tartottuk, majd Nikon TE2000U vagy TS100 invert fluoreszcens mikroszkóp alatt azonosítottuk. A méréseket személyi számítógép vezérelt Axon Axopatch 200A, Axopatch 200B vagy Multiclamp 700B erősítővel és Axon Digidata 1200 vagy 1440 digitalizálóval rögzítettük (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, USA). Az adatok grafikus megjelenítéséhez és kiértékeléséhez a pCLAMP8-10 programcsomagot használtuk (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, USA). Az elektrofiziológiai mérésekhez az alábbi oldatokat használtuk (az egyes komponensek mennyiségi egysége mM):

Külső: normál: 145 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 2,5 CaCl₂, 5,5 glükóz, 10 HEPES (pH 7,35); Kv11.1: 140 Choline-Cl, 5 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 0,1 CdCl₂, 20 glükóz, 10 HEPES (pH 7,35)

Belső: normál: 140 KF, 2 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 HEPES és 11 EGTA (pH 7,22); KCa1.1: 140 KCl, 10 EGTA, 9,69 CaCl₂, 5 HEPES (pH 7,2, szabad [Ca²⁺] = 5 μM); KCa3.1: 150 K-aszpartát, 5 HEPES, 10 EGTA, 8,7 CaCl₂, 2 MgCl₂ (pH 7,2, szabad [Ca²⁺] = 1 μM); Kv11.1: 140 KCl, 10 EGTA, 2 MgCl₂, 10 HEPES (pH 7,3)

3.4.2 A különböző ioncsatornákon átfolyó áramok mérésére használt protokollok

A mérések során különböző feszültség protokollokat alkalmaztunk. A tartófeszültséget -100 mV, vagy -120 mV értékre állítottuk, mely tapasztalati úton függött a méréshez használt sejt típusától, illetve a mérés módjától. A feszültség-aktivált Na⁺-csatornák esetében a csatornán átfolyó áramot 0 mV-ra történő depolarizációval aktiváltuk. A feszültség-aktivált K⁺-

csatornák esetében +50 mV-ra történő gyors depolarizációt, vagy feszültség-rámpát alkalmaztunk.

A hKv1.1, hKv1.2, hKv1.3, hKv1.4, hKv1.5, hKv1.6, hKv1.7, rKv2.1 és Shaker-IR áramokat az adott csatorna aktivációs kinetikájától függően 15, 40, 50 vagy 200 ms hosszúságú, +50 mV feszültségre történő depolarizáló impulzussal aktiváltuk. Két egymást követő impulzus között 15 s telt el, mely során a sejteket -100 mV feszültségen tartottuk. Ez az idő elegendő az említett csatornák inaktivációból való visszatéréséhez. A hKv1.3 csatornán átfolyó áramot feszültség-rámpa protokollal is mértük, mely során a membránpotenciált 15 másodpercenként -120 mV tartófeszültségről +50 mV-ra depolarizáltuk 150 ms alatt, így a csatorna aktivációs küszöbfeszültsége könnyen megfigyelhető.

A hKv11.1 (hERG) csatornák áramait egy +20 mV-ra történő 400 ms hosszú depolarizációt követő, 200 ms-ig alkalmazott -40 mV-os feszültségen mértük. Két impulzus közt a sejteket 30 s-ig -80 mV feszültségen tartottuk.

A hKCa3.1, kalcium-aktivált kálium csatorna esetében a mikropipettába töltött belső oldat 1 μM szabad Ca^{2+} -ot tartalmazott, lehetővé téve a csatornák aktiválódását. A csatornán átfolyó áramot feszültség-rámpa protokollal mértük, mely során a membránpotenciált -120 mV tartófeszültségről +40 mV-ra, vagy +50 mV-ra depolarizáltuk 150 ms alatt. Két depolarizáció között 10, vagy 15 s telt el.

A hKCa1.1 (BK) Ca^{2+} -és feszültség-aktivált kálium csatorna esetében 0 mV tartófeszültséget alkalmaztunk, majd az áramot 100 ms hosszú +50 mV-ra történő depolarizáló impulzussal mértük, melyet 10 ms hosszú, -120 mV-ra történő hiperpolarizáció előzött meg. Az impulzusokat 15 másodpercenként adtuk.

A hNav1.5 csatornákon átfolyó áramot 15 ms-os, -120 mV-ról 0 mV-ra történő depolarizációval mértük 15 másodpercenként.

3.4.3 Az elektrofiziológiai mérések kiértékelése

A toxinok adott koncentrációban mért hatását megmaradó áramhányad formában tüntettük fel ($M.\dot{A}.H. = I/I_0$, ahol I a toxin jelenlétében mért áram amplitúdó, I_0 pedig a toxinmentes kontroll oldatban mért áram amplitúdó).

A dózis-hatás görbéken, illetve az oszlopdigramokon feltüntetett értékek 3-5 független mérés eredményeinek átlagai, ahol mintaátlag átlagos hibáját S.E.M.-ben jelöltük.

A dózis-hatás görbén a különböző koncentrációkban mért adatpontokra kétparaméteres Hill-egyenletet illesztettünk ($M.\dot{A}.H. = IC_{50}^H / (IC_{50}^H + [Tx]^H)$), ahol IC_{50} a félhatásos dózis, H a Hill-koefficiens, $[Tx]$ pedig a toxin koncentráció).

Abban az esetben, amikor egy toxinból csak limitált mennyiség állt rendelkezésünkre, ennek következtében csak 2-3 koncentrációban tudtuk mérni a toxin hatását egy adott ioncsatornán, a disszociációs állandó meghatározását a Lineweaver-Burk módszerrel végeztük, mely során a megmaradó áramhányad reciprokát ($1/M.\dot{A}.H.$) ábrázoltuk a koncentráció függvényében. A pontokra illesztett ($y_0 = 1$) egyenes meredekségének a reciproka megadja a félhatásos dózist, feltételezve, hogy a Hill-koefficiens értéke $H = 1$. Ezt a feltételezést azzal támasztjuk alá, hogy a pórúsgátló toxinok leggyakrabban a toxin:csatorna 1:1 arányú kötődésével fejtik ki hatásukat.

Abban a ritka esetben, amikor csak egyetlen koncentrációban tudtuk mérni a toxin hatását, a disszociációs állandót a megmaradó áramhányadból becsültük a Hill-egyenlet alapján, szintén feltételezve, hogy a Hill-koefficiens értéke $H = 1$.

A disszociációs állandó meghatározásához a blokkolás és kimosás időfüggő kinetikai paraméterét is meghatároztuk. Ezek ismeretében a disszociációs állandó az következő módon számítható: $K_d = k_{off}/k_{on}$, ahol $k_{off} = (T_{OFF})^{-1}$, $k_{on} = ((T_{ON})^{-1} - (T_{OFF})^{-1})/[Tx]$, $[Tx]$ a toxinkoncentráció. A bemosódás gyorsaságát, azaz a toxin csatornához történő asszociációjának az időfüggését a T_{ON} érték jellemzi. Ennek a meghatározásához a toxin bemosódása közben, az egyensúlyi gátlás kialakulásáig mért csúcáramokat normáltuk, majd az idő függvényében ábrázoltuk. A pontokra a következő exponenciális függvényt illesztettük: $A(t) = B \times \exp(-t/T_{ON}) + C$, ahol $A(t)$ a t időpillanatban mért áram amplitúdó, C az egyensúlyi gátlás kialakulása után mért áram amplitúdó, és $B = A(t = 0) - C$. A kimosási kinetikát hasonló módon, az egyensúlyi gátlásból történő visszatérést, azaz a toxin kimosásakor mért áramok amplitúdóit normáltuk, majd ábrázoltuk az idő függvényében. A kimosás időfüggését jellemző T_{OFF} meghatározásához az ábrázolt pontokra a következő exponenciális egyenletet illesztettük: $A(t) = B \times (1 - \exp(-t/T_{OFF})) + C$, ahol $B = A(t = \infty) - C$, $A(t)$ a t időpillanatban mért áram amplitúdó, C az egyensúlyi gátlás kialakulása után mért áram amplitúdó.

3.5 Peptidszintézis

3.5.1 Anuroctoxin rekombináns előállítása *E.coli*-ban

3.5.1.1 Az anuroctoxin klónozása pPAL7 vektorba

A különböző peptidek rekombináns előállítása során széles körben alkalmazott az ún. fúziós fehérje expresszálása *E. coli* baktériumban. A fúziós fehérje egy olyan polipeptid, mely tartalmazza az előállítani kívánt fehérje szekvenciáját, illetve egy bizonyos jelölő szekvenciát (továbbiakban tag-et), pl: GST (glutation-s-transferáz), MBP (maltóz-kötő fehérje), poli His-tag (6 egymást követő hisztidin) mely alapján a teljes fúziós fehérje egy megfelelő affinitás kromatográfiás oszlopon a többi bakteriális fehérjétől elválasztható, tisztítható. A fúziós fehérje továbbá tartalmaz egy endopeptidáz hasító helyet a tag és a célfehérje szekvenciája között, mely lehetővé teszi a kísérő tag szekvencia leválasztását a fehérjéről.

3.5.1.2 Az anuroctoxin tisztítása HPLC technikával

A toxin analitikai vizsgálatát és szemi-preparatív elválasztását Vydac 218TP54 0,46 X 25 cm C18 fordított fázisú oszlopon (Grace, Deerfield, IL, USA) végeztük. Mozgó fázisként víz-TFA/acetonitril gradienst alkalmaztunk, ahol A oldat: 0,12% trifluor ecetsav vízben oldva, B oldat: 0,10% trifluor ecetsav acetonitrilben oldva. B oldat koncentrációját a mozgó fázisban 0-ról 30 %-ig lineárisan növeltük 45 percen keresztül.

3.5.2 Anuroctoxin előállítása kémiai szintézissel

A vad típusú anuroctoxint (sAnTx WT), illetve annak mutáns változatait (sAnTx N17A, sAnTx F32T, sAnTx n17A/F32T) a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Vegytani Intézetben, Prof. Tóth Gábor és munkatársai állították elő.

4 Eredmények:

4.1 Újonnan izolált skorpiótoxinok farmakológiai karakterizálása

Kollaborációs partnereink révén munkacsoportunk számára adott a lehetőség, hogy különböző skorpiók mérgéből izolált peptidok farmakológiai karakterizálásában vehetünk részt. A skorpiók begyűjtését, a méreg kinyerését és a peptidok tisztítását a kollaborációs partnereink végezték, míg az izolált toxinok ioncsatornákra kifejtett hatását nagy részben munkacsoportunkkal végeztük, elektrofiziológiai mérésekkel. Dolgozatomban két újonnan izolált skorpiótoxin, az OcyKTx2 és urotoxin karakterizálását kívánom bemutatni.

4.1.1 OcyKTx2

Az OcyKTx2 toxint az *Opisthacanthus cayaporum* skorpió mérgéből izolálták kollaborációs partnereink (Prof. Elisabeth F. Schwartz, Laboratório de Toxinologia, Universidade de Brasília, Brazíliaváros, Brazília), mely egy 34 aminosavból álló peptid, molekula tömege 3807 Da. A Toxin harmadlagos szerkezetét négy diszulfid híd stabilizálja. A toxin aminosav szekvenciája a következő:

IRCQGSNQCYGHCREKTGCMNGKCINRVCKCYGC

(hozzáférési szám: UniProtKB/Swiss-Prot: P86116.2)

Az OcyKTx2 toxin reverzibilisen gátolta a Shaker illetve Kv1.3 csatornákat A disszociációs állandót a Lineweaver-Burk módszerrel, illetve a kétparaméteres Hill egyenlettel is meghatároztuk. A Lineweaver-Burk módszerrel kapott disszociációs állandó a Shaker-IR csatorna esetében 93,5 nM, a hKv1.3 csatorna esetében 18,0 nM. A kétparaméteres Hill egyenlettel kapott disszociációs állandók pedig a Shaker-IR esetében 96,6 nM, míg a Kv1.3 estében 17,7 nM.

A toxin nem volt hatással a hKv1.3 aktivációs küszöbfezültségére.

Mivel a natív toxinból csak limitált mennyiség állt rendelkezésünkre, a peptid hatását további ioncsatorna típusokon nem tudtuk vizsgálni. A Shaker-IR csatormán a méréseket kollaborációs partnereink (Prof. Lourival Domingos Possani munkacsoportja, Instituto de Biotecnologia, UNAM, Cuernavaca, Mexikó) végezték.

4.1.2 Urotoxin

Az urotoxint az *Urodacus yaschenkoi*, Ausztráliában élő skorpió mérgeből izolálták kollaborációs partnereink (Prof. Lourival Domingos Possani, Instituto de Biotecnologia, UNAM, Cuernavaca, Mexikó). A peptid 37 aminosavból áll, szerkezetét 4 diszulfid híd stabilizálja, molekulatömege 4012,75 Da. Az urotoxin aminosav szekvenciája a következő:

GDIKCSGTRQCWGPCKKQTTCTNSKCMNGKCKCYGCV

A toxin farmakológiai karakterizálását hKv1.1, hKv1.2, hKv1.3, hKv1.5 és KCa3.1 csatornákon végeztük. A hKv1.1 csatornán a méréseket kollaborációs partnereink (Prof. Lourival Domingos Possani munkacsoportja, Instituto de Biotecnologia, UNAM, Cuernavaca, Mexikó) végezték. A toxin reverzibilisen blokkolta a CHO sejtekben expresszált hKv1.1 csatornát. A gátlás koncentráció függését a kétparaméteres Hill egyenlettel határoztuk meg, mely eredményeként $IC_{50} = 253,5$ nM értékeket kaptunk.

Mivel a hKv1.1 csatorna nagyfokú hasonlóságot mutat a hKv1.2 és hKv1.3 csatornákkal, teszteltük az urotoxin hatását ezeken a csatornákon is. A toxin 10 nM koncentrációban erősen gátolta a hKv1.2 csatornát. A gátlás reverzibilisnek bizonyult. A különböző koncentrációkban mért adatpontokból meghatároztuk az urotoxin félhatásos dózisát a hKv1.2 csatornára vonatkoztatva, mely 160,5 pM.

Az urotoxin kisebb affinitással a hKv1.3 csatornát is gátolta. A gátlás a hKv1.3 csatorna esetében is reverzibilisnek bizonyult. Mivel a toxin affinitása a hKv1.3 csatornához alacsonyabb, illetve a natív peptidből csak korlátozott mennyiség állt rendelkezésünkre, a gátlás félhatásos koncentrációját kevesebb mérési pontból, a Lineweaver-Burk módszerrel határoztuk meg, mely alapján $IC_{50} = 90,9$ nM.

Mivel a Kv1.2 csatorna legismertebb gátlószerei, mint a maurotoxin és charybdotoxin gátolják a KCa3.1 csatornát is, ezért teszteltük az urotoxin hatását a hKCa3.1 csatornán is. A toxin 10 nM koncentrációban gátolta a hKCa3.1 csatornát, mely gátlás toxin mentes külső oldattal kimosható volt. A hKCa3.1 csatornára vonatkozó félhatásos dózis meghatározásához további két koncentrációban (30 nM és 100 nM) mértük a peptid hatását, majd meghatároztuk a félhatásos dózist, mely eredményeként $IC_{50} = 69,9$ nM értéket kaptunk.

Az urotoxin hatását a hKv1.5 csatornán is vizsgáltuk, de ezen csatorna esetben 10 nM toxin nem fejtett ki gátló hatást.

4.2 A margatoxin szelektivitásának vizsgálata elektrofiziológiai módszerrel

A rekombináns margatoxint (rMgTx, Alomone Labs, Izrael, Jeruzsálem) mKv1.1, hKv1.1, hKv1.2, hKv1.3, hKv1.4, hKv1.5, hKv1.6, hKv1.7, rKv2.1, Shaker-IR, hKCa1.1, hKCa3.1, hERG és hNav1.5 csatornákon mért áramokon teszteltük.

Mivel a margatoxin (rMgTx) 1 nM koncentrációban gátolta az mKv1.1, hKv1.1, hKv1.2 és hKv1.3 csatornákat, további mérésekkel meghatároztuk a csatornákra kifejtett gátlás koncentráció függését. A Kv1.1 csatornák esetében a gátlás mértéke alacsonyabb volt, mely az mKv1.1 csatornák esetében $IC_{50} = 1,7$ nM, míg a hKv1.1 esetében $IC_{50} = 4,2$ nM volt. A hKv1.2 és hKv1.3 csatornák esetében 1 nM margatoxin által kifejtett gátlás nagyon nagymértékű volt, a félhatásos koncentráció a hKv1.2 csatornán 6,4 pM, a hKv1.3 csatornán 11,7 pM

4.3 Rekombináns anuroctoxin (rAnTx) hatása Kv1.2 és Kv1.3 csatornákon

A rekombináns anuroctoxin (újraoxidált, rAnTx) hatását a Kv1.3 és Kv1.2 csatornákon mértük. A félhatásos dózis a Kv1.3 esetében 0,2 nM, a Kv1.2 esetében 1,4 nM.

4.4 Anuroctoxin és annak mutáns változatainak előállítása szilárd fázisú kémiai szintézissel

4.4.1 Az anuroctoxin szelektivitását javító mutációk tervezése

A mutációk megtervezéséhez több, ismert szelektivitású Kv1.2 és Kv1.3 csatorna gátlószer lineáris aminosav szekvenciáit hasonlítottuk össze. szekvenciákban megfigyelt jellegzetes mintázatok alapján. a következő mutációkat terveztük meg: N17A, F32T, és a két mutációt együttesen tartalmazó N17A/F32T dupla mutánst. A anuroctoxin vad típusú és mutáns változatait szilárd fázisú kémiai szintézissel állította elő kollaborációs partnerünk Prof. Tóth Gábor és munkacsoportja a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Vegytani Intézetében.

4.4.2 A szilárd fázisú kémiai szintézissel előállított anuroctoxin (sAnTx) és annak mutáns változatainak hatása a Kv1.2 és Kv1.3 csatornákon

A szintetikus vad típusú anuroctoxin a Kv1.2 csatornát 5,2 nM, a Kv1.3 csatornát pedig 0,3 nM félhatásos koncentrációban gátolta. Ezek az értékek nagyságrendileg azonosak a natív anuroctoxin gátló hatásával, amely a Kv1.2 csatornát 6,1 nM, a Kv1.3 csatornát pedig 0,7 nM félhatásos koncentrációval gátolta.

A 32. pozícióban található fenilalanin treoninnal történő helyettesítése (F32T) a toxin Kv1.3 csatornához történő affinitását csökkentette, a mért félhatásos koncentráció 6,2 nM. Ezzel szemben a Kv1.2 csatornán 100nM koncentrációban sem fejtett ki gátló hatást.

A 17. pozícióban lévő aszparagin alaninra történő módosítása (N17A) mind a Kv1.2 ($IC_{50} = 20,0$ nM) és Kv1.3 ($IC_{50} = 1,2$ nM) csatorna esetén csökkent affinitást eredményezett, a szelektivitásra nem volt hatással.

A dupla mutáns anuroctoxin, mely mindkét mutációt együttesen tartalmazza (N17A/F32T) $IC_{50} = 0,6$ nM félhatásos koncentrációval gátolta a Kv1.3 csatornát, illetve nem fejtett ki gátló hatást a Kv1.2 csatornára.

4.4.3 A szilárd fázisú kémiai szintézissel előállított anuroctoxin (sAnTx) és annak mutáns változatainak hatása a Kv1.1 és KCa3.1 csatornákon

Miután a mutációk megváltoztatták az anuroctoxin Kv1.2 és Kv1.3 csatornákhöz történő affinitását, a mutáns toxinokat leteszteltük a Kv1.1 és KCa3.1 csatornákon is. A mutációk révén akár új, eddig nem gátolt ioncsatornákkal szemben is kialakulhat toxin-affinitás. A toxinokat 100 nM koncentrációban alkalmazva nem tapasztaltunk gátló hatást a Kv1.1 és KCa3.1 csatornákon.

5 Eredmények megbeszélése

5.1 Újonnan izolált skorpiótoxinok farmakológiai karakterizálása

Az OcyKTx2 izolálásával és karakterizálásával egy új, még eddig nem vizsgált skorpiótoxint írtunk le, mely α -KTx6.17 néven gyarapította a K^+ csatorna gátló skorpiótoxinok csoportját. Mivel csak limitált mennyiségű peptid állt rendelkezésünkre, a toxin farmakológiai karakterizálását csak részben tudtuk elvégezni. Az OcyKTx2 gátolta a tesztelt Shaker és

Kv1.3 csatornákat. A toxin aminosav szekvenciájának összehasonlítása más, ismert szelektivitású peptidekkel segítséget nyújthat azon ioncsatornák azonosításában, melyeket a vizsgált toxin gátolhat. Mivel az OcyKTx2 csak alacsony szekvencia azonosságot mutat az ismert szelektivitású peptidekkel, így ezzel a módszerrel nem tudjuk megbecsülni az OcyKTx2 által feltehetően gátolt kálium csatornákat.

Az urotoxin aminosav szekvencia homológia alapján α -KTx 6.21 névvel került besorolásra a K^+ csatorna gátló skorpiótoxinok osztályozása szerint. Az urotoxin karakterizálása során több ioncsatornán is el tudtuk végezni az elektrofiziológiai méréseket. A toxin a vizsgált csatorna típusok közül nem hatott a Kv1.4, Kv11.1 (hERG1), Kv12.2 (ELK2) (ezeket a méréseket kollaborációs partnereink végezték), illetve a Kv1.5 csatornákra. A peptid nagy affinitással gátolta a Kv1.2 csatornát ($IC_{50} = 160$ pM), továbbá jóval kisebb kisebb affinitással a Kv1.1, Kv1.3 és KCa3.1 csatornákat is. Elfogadott, hogy egy toxin akkor tekinthető szelektívnek, ha egy adott ioncsatornát legalább 100-szor nagyobb affinitással gátol, mint a többi vizsgált csatornát. Az urotoxin megfelel ennek a kritériumnak, azaz méréseink alapján Kv1.2 szelektív gátlószernek tekinthető, mivel a különböző csatornákon mért félhatásos koncentráció értékek a Kv1.2 csatornán mért félhatásos koncentrációhoz viszonyítva több mint 400-szoros különbséget mutatnak ($IC_{50}Kv1.3/IC_{50}Kv1.2 = 562$, $IC_{50}Kv1.1/IC_{50}Kv1.2 = 1579$ és $IC_{50}KCa3.1/IC_{50}Kv1.2 = 435$). A Kv1.2 csatorna legismertebb gátlószere a Maurotoxin, mely a Kv1.2 csatornát $IC_{50} = 0,8$ nM félhatásos koncentrációban gátolja. Ezzel összehasonlítva az urotoxin affinitása sokkal nagyobb ($IC_{50} = 160$ pM), azaz az urotoxin hatékonyabb gátlószer a Kv1.2 csatornának. A Maurotoxin továbbá a Kv1.1 csatornát $IC_{50} = 45$ nM, a Kv1.3 csatornát $IC_{50} = 180$ nM és a KCa3.1 csatornát $IC_{50} = 14$ nM félhatásos koncentrációban gátolja, így a maurotoxin esetében a Kv1.2 iránti szelektivitás kritériuma sem teljesül ($IC_{50}Kv1.3/IC_{50}Kv1.2 = 225$, $IC_{50}Kv1.1/IC_{50}Kv1.2 = 56$ és $IC_{50}KCa3.1/IC_{50}Kv1.2 = 18$).

Mindezek alapján az urotoxin megfelelő eszköz lehet a Kv1.2 csatorna farmakológiai vizsgálataiban. Mivel a Kv1.2 csatorna szerepét kimutatták a demielinizációs betegségek tüneteinek kialakításában, az urotoxin hasznos molekula lehet az ilyen betegségek kezelése céljából folytatott kísérletek során.

5.2 A margatoxin szelektivitásának vizsgálata

A margatoxin aminosav szekvenciája olyan toxinok szekvenciájával mutatja a legnagyobb hasonlóságot (>75%), melyek a Kv1.3 csatorna mellett hasonló affinitással a Kv1.2 csatornát is gátolják. A vizsgált ioncsatornák közül (mKv1.1, hKv1.1, hKv1.2, hKv1.3, hKv1.4-IR, hKv1.5, hKv1.6, hKv1.7, rKv2.1, Shaker-IR, hKv11.1, hKCa1.1, hKCa3.1 és hNav1.5) a rekombináns margatoxin a Kv1.1 csatornát nM koncentrációban gátolta, míg a Kv1.2 és Kv1.3 csatornákra pM koncentrációban fejtett ki gátló hatást.

Az eredményeink azt mutatják, hogy a margatoxin valóban nagy affinitású gátlószere a Kv1.3 csatornának, viszont azonos nagyságrendű affinitással gátolja a Kv1.2 csatornát is. Ezek mellett bár jóval kisebb félhatásos koncentrációval a Kv1.1 csatornát is gátolta. Ezek alapján a margatoxin nem felel meg a Kv1.3 csatorna iránti szelektivitás kritériumának, ugyanis a félhatásos koncentrációk egymáshoz viszonyított aránya $IC_{50}Kv1.2/IC_{50}Kv1.3 = 0,54$, mely jóval elmarad a 100-szoros affinitásbeli különbségtől.

5.3 Az anuroctoxin vad típusú és mutáns változatainak előállítás és farmakológiai karakterizálása

Az anuroctoxin rekombináns szintézise során az *E. coli* sejtekben előállított, majd affinitás kromatográfiával tisztított peptid analitikai vizsgálata kimutatta, hogy a prokarióta sejtekben a toxin oxidálása nem az általunk várt módon zajlik. A minta újraoxidálása (refolding) szükséges a megfelelő biológiai aktivitáshoz, mivel a redukálás és oxidálás előtti minta Kv1.3 csatornán mért hatása ($IC_{50} = 65,9$ nM) messze elmarad a természetes anuroctoxin Kv1.3 csatornán mért hatásától ($IC_{50} = 0,7$ nM). A minta újraoxidálását követően a Kv1.3 csatornán mért hatás nagyban megnőtt ($IC_{50} = 0,2$ nM), így a rekombináns anuroctoxin (rAnTx) hatásának koncentráció függését a Kv1.2 csatornán is meghatároztuk, ahol $IC_{50} = 1,4$ nM félhatásos koncentrációt kaptunk, mely a természetes anuroctoxin esetében $IC_{50} = 6,1$ nM. Összehasonlítva a rekombináns anuroctoxin hatását a természetes toxin hatásával elmondhatjuk, hogy a mindkét toxin nagyságrendileg azonos gátló hatást fejt ki a Kv1.3 és Kv1.2 csatornákon.

Az anuroctoxin szilárd fázisú kémiai szintézisének hatékonyságát patch clamp technikával ellenőriztük. A vad típusú, szintetikus anuroctoxin (sAnTx WT) farmakológiai

tulajdonságaiban megegyezik a természetes anuroctoxinnal, így a szintézis hatékonysága igazolható.

A 32. pozícióban lévő fenilalanin a tirozinhoz nagyon hasonló szerkezetű, aromás aminosav. A legtöbb alacsony szelektivitású Kv1.3 gátló toxin ekvivalens pozíciójában tirozin található, míg a Kv1.3 szelektív toxinokban treonin, vagy aszparagin. Az anuroctoxin esetében a 32. aminosav tirozinra cserélése a várakozásnak megfelelően drasztikusan megnövelte a Kv1.3 csatorna iránti szelektivitást, viszont a toxin Kv1.3 iránti affinitása lecsökkent a vad típusú toxin affinitásához képest (a félhatásos dózis kb. a 20-szorosára emelkedett).

Az anuroctoxin 17. aminosava aszparagin, mely poláros oldallánccal rendelkezik. A Kv1.2 gátló toxinokban a 17. pozícióval ekvivalens helyen legtöbbször vagy a szintén poláros glutamin, vagy a pozitív töltésű arginin található, míg a Kv1.3 szelektív peptidekre leginkább a hidrofób alanin jellemző. Bár a 17. pozícióban lévő aszparagin alaninra történő módosításától a Kv1.3 csatorna iránti szelektivitást vártuk, az N17A mutáció nem javította az anuroctoxin szelektivitását, hanem kis mértékben csökkentette mind a Kv1.2 és Kv1.3 csatornák iránti affinitást (a félhatásos dózis mindkét csatorna esetében kb. a 4-szeresére emelkedett). Ez az affinitásbeli különbség nem volt olyan nagymértékű, mint az F32T mutáció esetén tapasztalt csökkenés.

A két mutáció együttes alkalmazásától azt vártuk, hogy az F32T mutáció révén a Kv1.3 csatornára szelektív toxint kapunk, és az N17A mutáció miatt a Kv1.3 csatorna iránti affinitás a vad típusú toxin affinitásához hasonló marad. Az N17A/F32T dupla mutáns toxin a várakozásnak megfelelően nagy szelektivitással és a vad típusú toxinhoz képest nagyságrendileg megegyező affinitással és szelektíven gátolta a Kv1.3 csatornát.

Az N17A/F32T dupla mutáns anuroctoxin affinitása és szelektivitása alapján alkalmas lehet a Kv1.3 csatorna gátlószereként *in vivo* kísérletekben történő felhasználásra. További célunk a vad típusú és N17A/F32T mutáns toxinok pontos NMR szerkezetének összehasonlítása, mely az lineáris aminosav szekvenciánál sokkal pontosabb információt adhat a toxinok szelektivitását befolyásoló molekuláris elemekről.

A munkám során vizsgált toxinok farmakológiai tulajdonságainak és elsődleges szerkezetének vizsgálata alátámasztja azt a feltételezést, hogy a toxinokban található esszenciális diád kulcsszerepet játszik a toxin ioncsatornákhöz történő kötődésében. Az OcyKTx2, urotoxin, margatoxin és anuroctoxin peptidek mindegyike aromás aminosavat tartalmaz diádjában a

lizin mellett. A négy toxin közül az OcyKTx2 kivételével mindegyik igazoltan gátolja a Kv1.2 és Kv1.3 csatornákat. Ebből arra tudunk következtetni, hogy az OcyKTx2 peptid feltehetőleg a Kv1.2 csatornát is gátolja. Az esszenciális diád aromás aminosavának treoninra történő módosítása az anuroctoxin esetében azt eredményezte, hogy a peptid elvesztette a Kv1.2 csatornához történő kötődés képességét, viszont a Kv1.3 csatornát továbbra is képes volt gátolni. Ebből következőleg eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az esszenciális diád szerepe nem csupán az általános toxin-csatorna interakció kialakításában rejlik, hanem a toxin ioncsatorna felismerő képességét is befolyásolja.

6 Összefoglalás

A Kv1.3 csatorna kulcsszerepet játszik az autoimmun megbetegedéseket kiváltó effektor memória T-sejtek (T_{EM}) aktivációs mechanizmusában. A csatornán átfolyó K^+ áram gátlásával a T_{EM} sejtek aktivációja gátolható. Számos *in vitro* és *in vivo* tanulmányban kimutatták, hogy a specifikus Kv1.3 csatorna gátló szerek alkalmasak lehetnek az autoimmun betegségek kezelésére.

Munkánk során skorpió mérgekből izolált, 30-40 aminosavból álló, diszulfid hidakkal stabilizált toxinokat vizsgáltunk, melyek nagy affinitású gátlószerei a különböző K^+ csatornáknak.

Célul tűztük ki újonnan izolált peptidek farmakológiai karakterizálását, a korábban izolált margatoxin ioncsatorna gátló hatásának eddiginél részletesebb tanulmányozását, az anuroctoxin laboratóriumi előállítását illetve annak mutációi révén előnyösebb farmakológiai tulajdonságokkal rendelkező peptidek szintézisét. A toxinok ioncsatornákra kifejtett hatását elektrofiziológia mérésekkel, patch-clamp technikával mértük.

Kollaborációs partnereink segítségével két új skorpiótoxint írtunk le. Az OcyKTx2 (α -KTx 6.17) a Kv1.3 és Shaker ioncsatornák alacsony szelektivitású gátlószere, míg az urotoxin (α -KTx 6.21) a Kv1.2 csatorna nagy affinitású és szelektív gátlószere. A margatoxin a szakirodalomban a Kv1.3 csatorna nagy affinitású és szelektív gátlószereként van számon tartva. Ezzel szemben méréseink azt mutatják, hogy a margatoxin a Kv1.3 csatorna mellett hasonlóan nagy affinitással, pM koncentrációban gátolja a Kv1.2 csatornát, illetve kisebb affinitással, nM koncentrációban a Kv1.1 csatornát is. A munkacsoportunk által korábban karakterizált anuroctoxint rekombináns technikával és kémiai szintézissel is sikeresen előállítottuk. Az anuroctoxin Kv1.3 mellett a Kv1.2 csatornát is gátolja, mely farmakológiailag nem kedvező az autoimmun betegségek terápiás felhasználása során. Irányított mutációk révén sikerült az anuroctoxinnak olyan változatát létrehozni, mely kellően nagy affinitással és szelektíven gátolja a Kv1.3 csatornát.

Kv1.3 csatorna peptid toxin gátlószereinek vizsgálatával olyan aminosav pozíciókat tudtunk azonosítani, melyek befolyásolják a toxinok Kv1.3 csatorna iránti szelektivitását és affinitását. Eredményeink közelebb visznek a toxinok, és azok receptor molekulái között végbemenő bonyolult interakciók megértéséhez, mely elengedhetetlen feltétele az újabb, lehetőleg még

nagyobb affinitású, szelektív Kv1.3 gátlók tervezésének és előállításának, és a toxin molekulák autoimmun betegségek terápiájában történő alkalmazásának.

A doktori képzési programot a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 pályázat finanszírozta.

A kísérletes munkát a TÁMOP 4.2.2-A-11/1/KONV-2012-0025 és a Baross Gábor Program: REG-EA-09-1-2009-0010 pályázatok finanszírozták.

A kutatás a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.





Iktatószám: DEENKÉTK/126/2014.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. Publikációs Lista

Jelölt: Bartók Ádám

Neptun kód: NZXQ0S

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

MTMT azonosító: 10034486

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Bartók, Á.**, Tóth, Á., Somodi, S., G. Szántó, T., Hajdú, P., Panyi, G., Varga, Z.: Margatoxin is a non-selective inhibitor of human Kv1.3 K⁺ channels. *Toxicon*. "accepted by publisher", 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.05.002>
IF:2.924 (2012)
2. Luna-Ramírez, K., **Bartók, Á.**, Restano-Cassulini, R., Quintero-Hernandez, V., Coronas, F.I.V., Christensen, J., Wright, C.E., Panyi, G., Possani, L.D.: Structure, Molecular Modeling, and Function of the Novel Potassium Channel Blocker Urotoxin Isolated from the Venom of the Australian Scorpion *Urotaeus yaschenkoi*. *Mol. Pharmacol.* 86 (1), 28-41, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1124/mol.113.090183>
IF:4.411 (2012)
3. Schwartz, E.F., **Bartók, Á.**, Schwartz, C.A., Papp, F., Gomez-Lagunas, F., Panyi, G., Possani, L.D.: OcyKTx2, a new K⁺-channel toxin characterized from the venom of the scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. *Peptides*. 46, 40-46, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2013.04.021>
IF:2.522 (2012)





További Közlemények

4. Szentandrassy, N., Papp, F., Hegyi, B., **Bartók, Á.**, Krasznai, Z., Nánási, P.P.: Tetrodotoxin blocks native cardiac L-type calcium channels but not CaV1.2 channels expressed in HEK cells. *J.Physiol Pharmacol.* 64 (6), 807-810, 2013.
IF:2.476 (2012)
5. Varga, Z., Juhász, T., Matta, C., Fodor, J., Katona, É., **Bartók, Á.**, Oláh, T., Sebe, A., Csernoch, L., Panyi, G., Zákány, R.: Switch of voltage-gated k channel expression in the plasma membrane of chondrogenic cells affects cytosolic ca-oscillations and cartilage formation. *PLoS One.* 6 (11), e27957, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0027957>
IF:4.092

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 16.425

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 9.855

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudásmetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.05.30

