

# **EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Kv1.3 csatorna-gátló skorpiótoxinok farmakológiai vizsgálata**

**Bartók Ádám**

**Témavezető: Dr. Varga Zoltán**



**DEBRECENI EGYETEM**

**MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2014**

## Tartalomjegyzék

1	Bevezetés .....	3
2	IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	6
2.1	A kálium csatornák szerkezete és osztályozása .....	6
2.1.1	Kir csatornák .....	6
2.1.2	Két pórus-formáló hurkot tartalmazó káliumcsatornák ( $K_{2P}$ ) .....	7
2.1.3	Feszültség-aktivált káliumcsatornák (Kv) .....	8
2.1.4	Alacsony konduktanciájú $Ca^{2+}$ -aktivált káliumcsatornák (SK) .....	9
2.1.5	Magas konduktanciájú $Ca^{2+}$ -aktivált káliumcsatornák (BK) .....	9
2.2	A T-limfociták aktivációs mechanizmusában résztvevő ioncsatornák szerepe .....	10
2.3	A Kv1.3 csatorna, mint lehetséges célpont az autoimmun betegségek kezelésében.....	12
2.4	A kálium csatorna gátló skorpiótoxinok szerkezete.....	14
2.5	Az ioncsatorna gátló skorpiótoxinok karakterizálásának módjai.....	16
2.6	A skorpiótoxinok terápiás alkalmazásának lehetőségei.....	17
3	CÉLKITŰZÉSEK.....	19
4	Anyagok és módszerek.....	20
4.1	Toxinok .....	20
4.2	Sejtek és ioncsatorna expressziós vektorok .....	21
4.2.1	Humán limfociták .....	21
4.2.2	tsA201 sejtvonal .....	21
4.2.3	L929 sejtvonal .....	22
4.2.4	CHO sejtvonal.....	22
4.2.5	Sf9 sejtvonal.....	23
4.3	Tranziens transzfekció.....	23
4.4	Elektrofiziológia .....	23
4.4.1	Az elektrofiziológiai mérésekhez használt műszerek és oldatok .....	23
4.4.2	A különböző ioncsatornákon átfolyó áramok mérésére használt protokollok.....	25
4.4.3	Az elektrofiziológiai mérések kiértékelése .....	26
4.5	Peptidszintézis .....	29
4.5.1	Anuroctoxin rekombináns előállítása <i>E.coli</i> -ban .....	29
4.5.2	Anuroctoxin előállítása kémiai szintézissel.....	35

5	Eredmények: .....	36
5.1	Újonnan izolált skorpiótoxinok farmakológiai karakterizálása.....	36
5.1.1	OcyKTx2 .....	36
5.1.2	Urotoxin .....	38
5.2	A margatoxin szelektivitásának vizsgálata elektrofiziológiai módszerrel.....	47
5.2.1	A tsA sejtvonala endogén áramának tesztelése .....	47
5.2.2	A margatoxin szelektivitási profiljának meghatározása .....	49
5.3	Az anuroctoxin rekombináns szintézise .....	57
5.3.1	Rekombináns anuroctoxin (rAnTx) hatása Kv1.2 és Kv1.3 csatornákon.....	60
5.4	Anuroctoxin és annak mutáns változatainak előállítás szilárd fázisú kémiai szintézissel .....	62
5.4.1	Az anuroctoxin szelektivitását javító mutációk tervezése .....	62
5.4.2	A szilárd fázisú kémiai szintézissel előállított anuroctoxin (sAnTx) és annak mutáns változatainak hatása a Kv1.2 és Kv1.3 csatornákon .....	63
5.4.3	A szilárd fázisú kémiai szintézissel előállított anuroctoxin (sAnTx) és annak mutáns változatainak hatása a Kv1.1 és KCa3.1 csatornákon .....	67
6	Eredmények megbeszélése.....	69
6.1	Újonnan izolált skorpiótoxinok farmakológiai karakterizálása.....	69
6.2	A margatoxin szelektivitásának vizsgálata.....	70
6.3	Az anuroctoxin vad típusú és mutáns változatainak előállítás és farmakológiai karakterizálása	
	74	
	Összegzés.....	77
7	Összefoglalás .....	78
8	Summary .....	79
9	Hivatkozások .....	80
10	Az értekezésben gyakran használt rövidítések jegyzéke.....	90
11	Tárgyszavak .....	91
12	Köszönetnyilvánítás .....	92
13	Publikációs lista.....	93
14	Függelék .....	95

## 1 Bevezetés

A T-sejtek specifikus antigénekkal történő találkozását klonális proliferáció követi, mely során az osztódó sejtek effektor memória, vagy hosszú életű centrális memória sejtekké differenciálódnak, biztosítva az immunrendszer adaptivitását. Az antigén felismerését a TCR/CD3 receptor komplex biztosítja, mely a specifikus ligandját megkötve olyan intracelluláris jelátviteli kaszkádot indít el, melynek eredménye az intracelluláris szabad kalciumkoncentráció kétfázisú megemelkedése. A folyamat során először intracelluláris hírvivő, inozitol trifoszfát ( $IP_3$ ) szabadul fel, melynek hatására az intracelluláris kalciumraktárak ürülnek az endoplazmás retikulum membránjában található  $IP_3$  receptorokon keresztül. Ezt követően további  $Ca^{2+}$  ionok áramlanak a sejtbe az extracelluláris térből a plazmamembránban található,  $Ca^{2+}$  felszabadulás-aktivált, úgynevezett CRAC csatornákon (Calcium Release Activated Channels) keresztül. A CRAC csatorna működéséhez elengedhetetlen a plazmamembránban található, négy darab Orai1, pórusformáló alegység, illetve az endoplazmás retikulum membránjában található,  $Ca^{2+}$  raktár kiürülést érzékelő STIM1 fehérjék asszociációja. [1-3]

A megemelkedett intracelluláris kalciumkoncentráció hatására a sejtekben osztódáshoz, illetve differenciálódáshoz szükséges gének aktiválódnak. A kalcium beáramlása a sejtmembránt depolarizálja, mely nem kedvez a hosszan tartó  $Ca^{2+}$  jel kialakulásának. Ezt a depolarizáló hatást küszöbölik ki a plazmamembrán káliumcsatornái, melyeken keresztül kiáramló  $K^+$  ionok az osztódáshoz szükséges negatívabb membránpotenciált stabilizálják. A T-sejtekben kifejeződő káliumcsatornák a feszültség-aktivált Kv1.3, illetve a kalcium-aktivált KCa3.1 csatornák. A káliumcsatornák blokkolásával a sejtek depolarizálódnak, ennek következtében aktivációjuk nem megy végbe [4, 5].

A különböző funkciójú T-sejteken a feszültség- és kalcium-aktivált káliumcsatornák eltérő arányban expresszálódnak. Számos autoimmun megbetegedés tüneteinek kialakításában az effektor memória T-sejtek játszanak döntő szerepet. Az aktivált effektor memória T-sejtek a feszültség-aktivált Kv1.3 csatornákat nagy számban, míg az KCa3.1 csatornákat kis mértékben fejezik ki, így esetükben a Kv1.3 csatorna a meghatározó eleme a membránpotenciál stabilizálásának, ami szükséges feltétele az aktivációs program teljesülésének. A naiv és a centrális memória T-sejtek plazmamembránjának meghatározó káliumcsatornája a  $Ca^{2+}$  aktivált KCa3.1, mely mellett csak kis mennyiségben fordul elő a Kv1.3 csatorna. Ebből következik,

hogy a Kv1.3 csatornák gátlásával a T<sub>EM</sub> sejtek aktivációja szelektíven gátolható, ezért a specifikus Kv1.3 csatorna gátlószerek az autoimmun megbetegedések terápiájának új lehetőségét hordozzák magukban [6, 7].

A fent említett ioncsatornákon kívül a T-sejtek kifejeznek a sejt térfogatának szabályozásában szerepet játszó membránfeszülés-aktivált Cl<sup>-</sup> csatornákat [8], feszültség-aktivált Ca<sup>2+</sup> és Na<sup>+</sup> csatornákat [9-12], TRPM7 csatornát [13], illetve kétpórusú K<sup>+</sup> csatornákat (TASK1, TASK3) [14], utóbbiak szerepe jelenleg még nem teljesen tisztázott.

Az elmúlt években számos peptid-toxint izoláltak különböző állatok mérgeiből, melyek a különböző ioncsatornák, köztük a feszültség-aktivált K<sup>+</sup> csatornák nagy affinitású gátlószereinek bizonyultak [6, 15-19]. A peptid-csatorna interakcióra jellemző, hogy a toxinok a csatornák extracelluláris régiójához kötődve eltömítik annak pórusát, ennek következtében megakadályozzák a csatornán keresztüli ionáramlást [20]. 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<sup>+</sup> csatornák szerepe kulcsfontosságú a sejtek működéséhez, a nem szelektív gátlószerek terápiás alkalmazása akár súlyos mellékhatásokkal is járhat.[21-24]

*In vitro* és *in vivo* kísérletek is kimutatták a Kv1.3 gátlószerek hatékonyságát és potenciális terápiás alkalmazhatóságát [17, 25, 26]. Mivel valóban szelektív, nagy affinitású természetes 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 [27], Pi2, Pi3 [28], Css20 [29], TsT26 [22], anuroctoxin [30], Vm24 [17]. E hagyományt folytatva, 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 gátlószereként 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. Egy ilyen átfogó tanulmány hiányában több munkacsoport, mely e toxint alkalmazta eszközként, téves következtetéseket vonhatott le különböző sejtípusok által kifejezett ioncsatornák meghatározása során.

A munkacsoportunk által korábban karakterizált anuroctoxin nagy affinitású gátlószere a Kv1.3 csatornának, viszont a Kv1.2 csatornát is blokkolja [30]. 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 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1 A kálium csatornák szerkezete és osztályozása

A kálium csatornák a membránpotenciál szabályozása révén kulcsszerepet játszanak a sejtciklus, a hormon szekréció és a sejtek ingerelhetőségének a szabályozásában továbbá az akcióspotenciál sejtre jellemző tulajdonságainak meghatározásában. Jelenleg 70 különböző  $K^+$  csatorna gén ismert emlősökben. A káliumcsatornák szerkezet és funkció alapján a következő családokra oszthatók: Kir (inward rectifier), két pórus-formáló hurkot tartalmazó, feszültség-aktivált, alacsony konduktanciájú  $Ca^{2+}$ -aktivált és magas konduktanciájú  $Ca^{2+}$ -aktivált káliumcsatornák.

#### 2.1.1 Kir csatornák

A Kir (inward rectifier) csatornákat hét alcsaládba sorolják, jelenleg 15 Kir csatorna gén ismert. A csatornák működésüket tekintve négy csoportra oszthatók: klasszikus Kir, G-fehérje kapuzott, APT-szenzitív és  $K^+$  transzport csatornák [31].

A klasszikus Kir csatornák (Kir2.x) jellemzően a kamrai szívizom sejteken fejeződnek ki Kir2.1/Kir2.2 heteromer formában, funkciójuk a sejtek nyugalmi membránpotenciáljának fenntartása [32]. A klasszikus Kir csatornákat leírták simaizom- és endotélsejteken, ahol az izomtónust illetve a NO termelést szabályozzák [33, 34], továbbá központi idegrendszeri neuronokon, ahol a nyugalmi membránpotenciált szabályozzák [35]. Ezen felül leírták Schwann sejtekben [36], illetve vese kortikális sejtekben [37].

A G-fehérje kapuzott csatornák (GIRK, Kir3.x) a membránhoz kötött trimer G-fehérjék  $\beta\gamma$ -alegységei által szabályozottak. A G-fehérje aktiválását leggyakrabban acetilkolin, adenozin, GABA-B és dopamin receptorok válthatják ki [38, 39]. A csatornák szerepet játszanak a pulzus csökkentésével a szívizom szabályozásában [40], illetve a hasnyálmirigy  $\beta$ -sejtjeinek inzulin szekréciójának a szabályozásában [41]. A csatornákat leírták neuronokban is, ahol a sejtek ingerelhetőségét szabályozzák [42].

Az ATP-szenzitív csatornák (Kir6.x) spontán nyitását az intracelluláris ATP szint megemelkedése gátolja a szulfonilurea receptorokon (SUR) keresztül [43]. A SUR és a Kir6.2

csatornák kulcsszerepet játszanak a hasnyálmirigy  $\beta$ -sejtjeinek inzulin szekréciójának a szabályzásában [44]. A csatornák kifejeződnek a szívizomban is, ahol az ischemia hatásának kivédésében játszanak szerepet [45], illetve megtalálhatók glükóz érzékeny neuronokban [46].

A  $K^+$  transzport csatornák (Kir1.1, Kir4.x, Kir5.x és Kir7.1) számos sejten kifejeződnek, pl a vesében [37], glia sejtekben [47], a cochleában [48]. Szerepük az intra- és extracelluláris  $K^+$  koncentráció szabályozása.

### 2.1.2 Két pórus-formáló hurkot tartalmazó káliumcsatornák ( $K_2P$ )

A Két pórus-formáló hurkot tartalmazó káliumcsatornák közül jelenleg 15 humán gén ismert. A csatornákat a következő hat alcsaládra oszthatjuk: mechanikusan kapuzott (TREK), lúg-aktivált (TALK),  $Ca^{2+}$ -aktivált (TRESK), gyenge Kir (TWIK), sav-gátolt (TASK) és halotán-gátolt csatornák (THIK) [49, 50]. A csatornák jellemzően az úgynevezett háttérkonduktancia kialakításában játszanak szerepet, mely révén stabilizálják a sejtek nyugalmi membránpotenciálját [51]. A legismertebb két pórus-formáló hurkot tartalmazó csatornák a TREK, TRAAK és TASK csatornák, melyek főként idegsejteken fejeződnek ki [52].

A TREK csatornák főleg neuronokra jellemző, ahol a morfogenezisben, hő- és fájdalomérzékelésben játszanak szerepet. A csatornákat kimutatták szívizomsejtekben is, ahol az akcióspotenciál szabályzásában játszik szerepet [50]. A TALK csatornák a vesében, hasnyálmirigyben és a májban fejeződnek ki, ahol fontos szerepet játszanak a bikarbonát visszavételében (vese), a szekréció szabályzásában (hasnyálmirigy) [50]. A TRESK csatornák főként idegsejtekre jellemzők,  $Ca^{2+}$ -függő szabályzásáért a calcineurin fehérje felelős [53]. A TWIK csatornákat több szövetben is leírták, pl.: vese, tüdő, agy, légcső epitélium [50], illetve szerepét kimutatták tumorsejtek fejlődésében [54]. A TASK csatornák szerepet játszanak a kemoszenzitív sejtek működésében, az ízérzékelésben, továbbá apoptotikus és daganatos folyamatokban [50]. A THIK csatornákat Purkinje sejtekben írták le, feladatuk még nem teljesen tisztázott [50].



### 2.1.3 Feszültség-aktivált káliumcsatornák (Kv)

A feszültség-aktivált káliumcsatornák (Kv) két nagy csoportra oszthatók, a vezetőképes, illetve a nem vezető (silent) csatornákra. Vezetőképes homotetramer csatornákat alkotnak a Kv1.x, Kv2.x, Kv3.x, Kv4.x, Kv7.x, Kv10.x, Kv11.x és Kv12.x alegységek, míg a Kv5.x, Kv6.x, Kv8.x és Kv9.x fehérjék erre nem képesek [55]. A Kv csatornák vagy A-típusú (gyorsan inaktiválódó), vagy delayed rectifier (lassan, vagy nem inaktiválódó) áramokat hozhatnak létre. A feszültség-aktivált káliumcsatornáknak számos fajtája ismert, egy adott sejtben többféle Kv csatorna is kifejeződhet, ahol homo-, vagy heteromultimereket alkothatnak. Adott csatorna biofizikai paramétereit a multimer alegység összetétele és az esetleges járulékos alegységek pl.: Kv $\beta$ , vagy KCHIP (K<sup>+</sup> channel interacting protein) fehérjék jelenléte befolyásolhatják [56, 57].

A tipikusan A-típusú áramokat eredményező csatornák a Kv1.4, Kv3.3, Kv3.4, Kv4.1, Kv4.2 és Kv4.3.

A delayed rectifier csatornák depolarizáció esetén nem inaktiválódnak a ms-os időtartományban, ezért a feszültség-aktivált Na<sup>+</sup> csatornáknál lassabban, azokhoz képest késleltetve működnek. Ebből kifolyólag fő szerepük az akciós potenciál kialakítása, annak tulajdonságainak a meghatározása [51, 58]. A tipikus delayed rectifier csatornák a Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.5, Kv1.6, Kv1.7, Kv1.8, Kv2.x és a Kv7.x.

A Kv1.1 csatorna expresszióját leírták agy, szív, retina, porc, vese és vázizom szövetekben [59-62]. A Kv1.2 csatorna megtalálható az agyban, a gerincvelőben, a Schwann sejtekben, szívizomban, hasnyálmirigy  $\beta$ -sejtekben, retinában és sima izomban [55, 63, 64].

A Kv1.3 csatornák előfordulnak idegsejteken, tüdőben, nyirokszervekben, T és B limfocitákban, makrofágokon, dendritikus sejtekben [5, 55, 65-67], A Kv1.3 csatorna több sejtben más Kv csatornákkal heteromultimereket alkotva fordul elő [68, 69].

A Kv1.3 csatornák kulcsszerepet játszanak a limfociták aktivációs mechanizmusában, így terápiás célpontként szolgálnak az autoimmun megbetegedések kezelése során [6, 70]. A Kv1.3 csatornák megtalálhatóak a mitokondriumokban is, ahol apoptózis kiváltásában játszhatnak szerepet [71].

A Kv1.5 csatornák a szív pitvarban, makrofágokban aortában, vastagbélben, gyomorban, simaizom sejtekben, agyszövetben expresszálódnak [55, 68, 72-74]. A Kv1.6 csatornát leírták gliasejtekben, simaizomsejtekben és idegsejtekben [75-77]. A Kv1.7 csatornák fontos szerepet

játszanak a hasnyálmirigy  $\beta$ -sejtjeinek inzulin szekréciójában [78] illetve megtalálhatók szívizomsejtekben és artériákban [79, 80].

A Kv2.x csatornákat több esetben is kimutatták a központi idegrendszer neuronjaiban [81, 82], továbbá szívizomban, vázizomban és a tüdőben [55].

A feszültség-aktivált  $K^+$  csatornák csoportjába tartozik az EAG (ether-a-go-go) család, melybe a Kv10 (EAG), Kv11 (ERG) és Kv12 (ELK) alcsaládok tartoznak. A Kv11.1 csatorna a szívizom akcióspotenciáljának kialakításában játszik szerepet [83].

A Kv csatornák expresszióját több daganatos sejten is kimutatták, ahol a csatorna funkciója korrelál a tumorok osztódási vagy metasztatikus képességével [84-89].

A *Shaker* csatorna a *Drosophyla melanogaster* feszültség-kapuzott  $K^+$  csatornája, mely közeli rokonságban áll a Kv1.x csatornákkal. A *Shaker* csatorna, mint modell, gyakran használt ioncsatorna a feszültség-aktivált  $K^+$  csatornák működésének vizsgálatai során [90, 91].

#### **2.1.4 Alacsony konduktanciájú $Ca^{2+}$ -aktivált káliumcsatornák (SK)**

Az SK csatornákat az intracelluláris  $Ca^{2+}$  szint megemelkedése aktiválja. A család tagjai a KCa2.1, KCa2.2, KCa2.3 és a KCa3.1 csatornák [51].

A KCa3.1 csatornát többféle szövetben és sejten is kimutatták, pl.: fibroblasztokban, vörösvértestekben, osztódó simaizomsejtekben és limfocitákban [5, 92-94]. A csatorna jellemzően nem expresszálódik ingerelhető sejtekben (szívizom, vázizom, neuron) [95]. A KCa3.1 gátlószerek a terápiás alkalmazás lehetőségét hordozzák anémia, asztma, keringési betegségek esetén, illetve bizonyos T és B limfocita alcsoportok aktivációját gátolhatják [95].

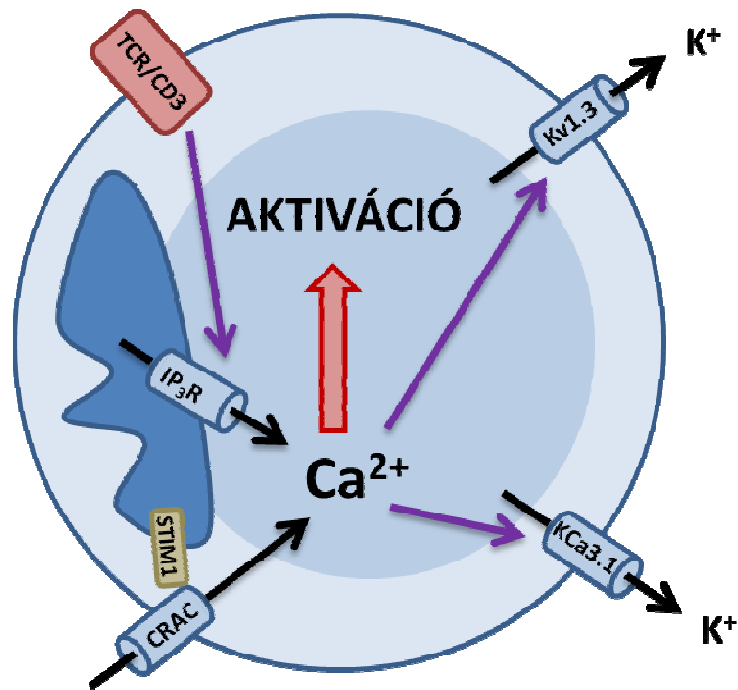
#### **2.1.5 Magas konduktanciájú $Ca^{2+}$ -aktivált káliumcsatornák (BK)**

A BK (MaxiK, Slo) csatornák családjába tartoznak a KCa1, KCa2, KCa4 és KCa5 alcsaládok [95].

A KCa1.1 csatorna feszültség- és  $Ca^{2+}$ -aktivált  $K^+$  csatorna, azaz az intracelluláris  $Ca^{2+}$  szint megemelkedése növeli a csatornák nyitási valószínűségét. A csatorna megtalálható az agyban [96], simaizomban [97], vesében [98], cochleában [99] és a mitokondriumokban [100].

## 2.2 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 [101]. 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  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált KCa3.1  $\text{K}^+$  csatorna is, mely aktiválódása akkor következik be, amikor az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció 200 nM érték fölé emelkedik [102]. A két említett csatorna típuson kívül több egyéb csatorna jelenlétét is kimutatták a T-limfociták plazmamembránjában. Ezek a csatornák az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -raktárak kiürülése által aktivált  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák, azaz CRAC csatornák (Calcium Release Activated Channels), a membránfeszülés-aktivált  $\text{Cl}^-$  csatornák, többféle TRP csatorna, két pórus-formáló hurkot tartalmazó  $\text{K}^+$  csatornák, illetve feszültség-aktivált  $\text{Na}^+$  és  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák [103]. Ezek közül a CRAC csatornák T-sejt aktivációban játszott szerepe jól ismert [104, 105]. 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  $\text{Ca}^{2+}$  kiürülést a STIM1 fehérje a retikulum lumenje felé néző ún. EF-hand  $\text{Ca}^{2+}$  szenzor alegységével képes érzékelni, majd az Orai1 fehérjék tetramerizálásával a CRAC csatornák aktiválódását indítja be [1, 2, 106]. A kétféle  $\text{K}^+$  csatorna, illetve a CRAC csatorna együttes működésének a következménye egy hosszan tartó intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  jel, mely szükséges feltétele a T sejtek aktivációjának. Ennek során a CRAC csatornákon keresztül  $\text{Ca}^{2+}$  áramlik be az intracelluláris térbe, melyhez a hajtó erőt a  $\text{K}^+$  csatornák aktiválódása biztosítja a membrán hiperpolarizálása révén (1. ábra).



**1. ábra** A T-sejtek aktivációs mechanizmusa intracelluláris kalciumszint függő. A TCR/CD3 receptor komplex aktiválódását intracelluláris IP<sub>3</sub> felszabadulása követi, mely aktiválja az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> raktárak (endoplazmás retikulum) IP<sub>3</sub> receptorait (IP<sub>3</sub>R). Ezeken keresztül Ca<sup>2+</sup> áramlik a citoszolba. A Ca<sup>2+</sup> raktár ürülése a STIM1 fehérjéken keresztül aktiválja a plazmamembránban található CRAC csatornákat, melyen keresztül további Ca<sup>2+</sup> ionok áramolnak be az intracelluláris térbe. A kalcium beáramlásához a hajtóerő fenntartására a membrán hiperpolarizálását az KCa3.1 kalcium-aktivált, illetve a Kv1.3 feszültség-aktivált káliumcsatornák végzik. A hosszan tartó intracelluláris Ca<sup>2+</sup> szint emelkedés a sejtek aktivációjához vezet.

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

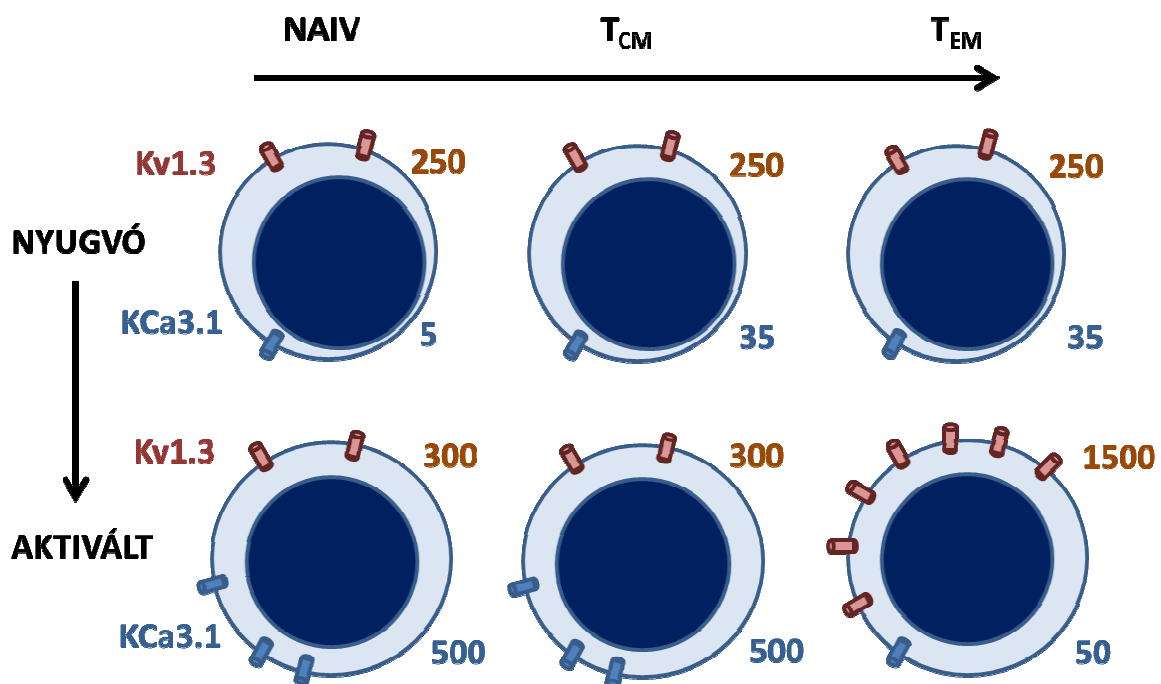
Mivel a membránpotenciál és a  $\text{Ca}^{2+}$  jel kialakulása nagyban függ a  $\text{K}^+$  csatornák működésétől, a kálium csatorna gátlószerek felhasználhatóak a T sejtek aktiválódását gátló terápiás szerekként. Egy ideális immunszuppresszor csak azon T sejtek működését gátolja, melyek az autoimmun betegség kialakításában játszanak szerepet, míg az immunrendszer többi sejtjére nem fejt ki hatást. Ilyen terápiára ad lehetőséget a T sejtek különböző alpopulációira jellemző, sajátos  $\text{K}^+$  csatorna expressziós mintázat [107]. A sejt felszíni markerek mintázata, a citokinszekréció, illetve élettani funkciók alapján a sejteket három nagy csoportra különíthetjük el [108]. Az első csoportot képezik a Naiv T sejtek, melyek még nem találkoztak antigénnel, specifikus markereik a  $\text{CCR7}^+$  és  $\text{CD45RA}^+$ . A második csoportot a centrális memória T sejtek ( $\text{T}_{\text{CM}}$ ) alkotják, melyek az effektor memória T sejt ( $\text{T}_{\text{EM}}$ ) irányú terminális differenciáció során kerültek inaktív állapotba, majd a specifikus antigénnel újra találkozva effektor sejté alakulnak, markerei  $\text{CCR7}^+$  és  $\text{CD45RA}^-$ . A harmadik csoportba tartoznak az effektor memória T sejtek ( $\text{T}_{\text{EM}}$ ), melyek markerei a  $\text{CCR7}^-$  és  $\text{CD45RA}^{+/-}$ . Ezek a sejtek jellemző kemokin receptorokat és adhézions molekulákat fejeznek ki, melyek segítségével a gyulladt szövetekbe vándorolnak, ahol effektor funkciókat látnak el. A  $\text{T}_{\text{EM}}$  sejtek szerepét a szöveti károsodásban több autoimmun betegségben is kimutatták, pl.: szklerózis multiplex (MS) [107], reumatoid artritisz és 1-es típusú diabétesz esetén [70].

Több tanulmányban is kimutatták, hogy stimulációt követően a fent említett T sejt csoportokban adott csoportra jellemző módon megváltozik a  $\text{K}^+$  csatornák expressziója [5, 107]. Aktivációt megelőzően a nyugvó Naiv,  $\text{T}_{\text{CM}}$  és  $\text{T}_{\text{EM}}$  sejtek  $\text{CD4}^+$  vagy  $\text{CD8}^+$  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  $\text{T}_{\text{CM}}$  sejtekben a Kv1.3 expressziós szintje kb. a másfélszeresére emelkedik, míg a KCa3.1 csatornák szintje több, mint tízszeresére emelkedik, így a sejt felszínen található KCa3.1 csatornák átlagos száma eléri a kb. 500 darabot. Ezzel szemben a  $\text{T}_{\text{EM}}$  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 (2. ábra). Ebből következően a  $\text{T}_{\text{EM}}$  sejtek aktivációs mechanizmusa a Kv1.3 csatorna működésétől függ, így annak gátlásával a  $\text{T}_{\text{EM}}$  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 [92]. Ebből következik, hogy a  $T_{EM}$  sejtek proliferációja a Kv1.3 csatornák specifikus gátlószereivel szelektíven gátolható, ezért a nagy szelektivitású és affinitású Kv1.3 inhibitorok alkalmasak lehetnek bizonyos autoimmun megbetegedések kezelésére. Ezt a feltevést számos, autoimmun betegséget modellező *in vivo* állatkísérletben bizonyították [17, 107, 109, 110].

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) [111], 1-es típusú diabétesz (T1DM) és rheumatoid artritisz (RA) [70] esetében.

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



**2. ábra** A különböző funkciójú T-sejteken a feszültség- és kalcium-aktivált káliumcsatornák eltérő arányban expresszálódnak. Az aktivált effektor memória T-sejtek, melyek az autoimmun megbetegedésekben is szerepet játszanak, nagy számban fejeznek ki Kv1.3 csatornákat, így esetükben ez a csatorna a meghatározó eleme a sejtmembrán hiperpolarizálásának, ami a sejtek aktivációjához vezet. A Kv1.3 csatornák gátlásával a  $T_{EM}$  sejtek aktiválódása szelektíven gátolható. (Chandy és mtsai. közleménye alapján[5]).

## 2.4 A kálium csatorna gátló skorpiótoxinok szerkezete

A skorpiók mérgeiben található számos komponens között több olyan peptid is található, melyek képesek befolyásolni a különböző ioncsatornák működését. Némelyikük  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , vagy  $\text{Ca}^{2+}$  csatornákkal lép interakcióba, de a legnagyobb és leginkább tanulmányozott csoport a  $\text{K}^+$  csatorna gátló toxinok (KTx) csoportja [19, 112-115].

A KTx csoport tagjai között megtalálhatóak rövid, 23-43 aminosavból álló, illetve hosszabb, 42-84 aegységű oligopeptidek, melyek szerkezetét 3, vagy 4 diszulfid híd stabilizálja. Jelenleg a KTx toxinokat szerkezet és funkció alapján 4 családba ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  és  $\kappa$ ) sorolják [19, 116]. A  $\kappa$ -KTx toxinokon kívül a többi három család összes tagjára jellemző az ún. cisztein-stabilizált  $\alpha/\beta$  motívum (CS- $\alpha\beta$ ), melyben az  $\alpha$ -hélix a  $\beta$ -redőkhöz diszulfid hidakkal kötődik.

A toxinokra jellemző egy ún. funkcionális, vagy esszenciális diád, mely a molekula  $\beta$ -redő részén található ún. kritikus lizin aegységből, és az attól a C-terminus felé kb. 7 Angström (9 aminosav) távolságra található, legtöbb esetben aromás oldalláncú aminosavból áll [117]. A diád lizin oldallánca pozitív töltése miatt képes a  $\text{K}^+$  csatornák szelektivitási szűrőjébe nyomulni, és azt dugóként elzárni. Bár a legtöbb toxin rendelkezik az esszenciális diáddal, nem ez az egyetlen módja az ioncsatorna gátlásnak, mivel bizonyos toxinok más régióikkal is képesek kapcsolatot kialakítani a csatornákkal (3. ábra).

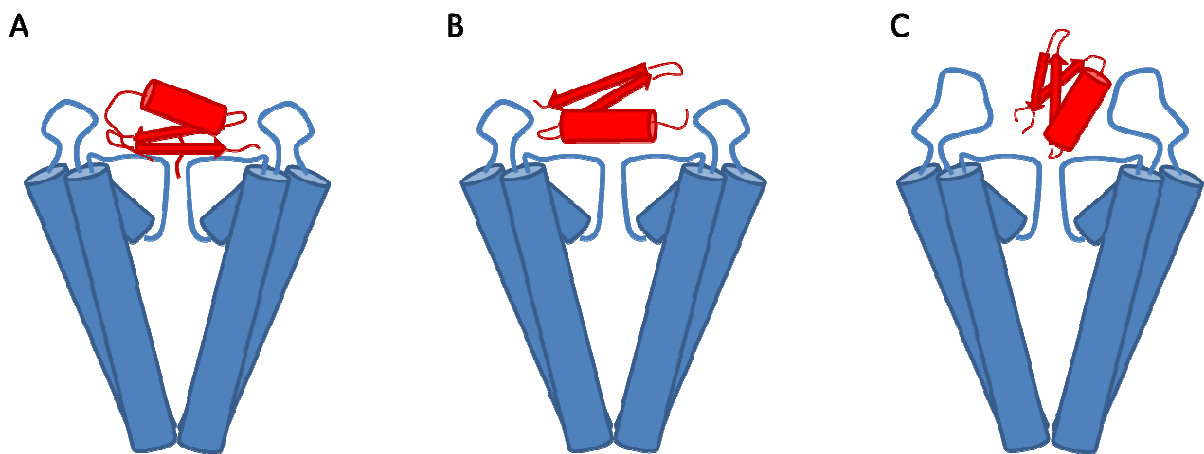
A KTx toxinok legnagyobb családja az  $\alpha$ -KTx, mely tagjai nagyfokú szekvencia homológiát mutatnak egymással. Ebbe a családba tartoznak a legkorábban izolált kálium csatorna gátló skorpiótoxinok. Jelenleg 133 ismert tagja van, mely szám gyorsan növekszik. A legrövidebb  $\alpha$ -KTx toxinok 23 aminosav, míg a leghosszabbak 43 aminosav aegységből állnak. Legtöbbjük 3 diszulfid híd kötést tartalmaz, kivéve az  $\alpha$ -KTx 6, 12, (kivételet a 12.5 és 12.7) és 24 alcsaládok, ahol 4 diszulfid híd stabilizálja a szerkezetet. Általában az  $\alpha$ -KTx toxinok a *Shaker* típusú feszültség-aktivált, és a  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált  $\text{K}^+$  csatornákat gátolják. Ebben a csoportban találhatóak a legnagyobb affinitású (pM koncentrációban hatásos) Kv csatorna gátló skorpió toxinok.

A  $\beta$ -KTx család tagjai hosszabbak az  $\alpha$ -KTx tagjainál. Jellemzően 47-84 aminosavból állnak, 3 diszulfidhíd kötéssel. A molekulák két funkcionális aegységgel rendelkeznek, az egyik egy N-terminális, szabadon mozgó, feltehetőleg  $\alpha$ -helikális aegység, mely citolitikus aktivitással bír, míg a másik aegység egy összetettebb, ciszteinben gazdag rész, melyre jellemző a CS- $\alpha\beta$

struktúra. Ez utóbbira jellemző a  $K^+$  csatorna gátló képesség. A  $\beta$ -KTx családot három további osztályra osztották fel, szekvencia homológia alapján.

A  $\gamma$ -KTx családba tartoznak az *ether-á-go-go* (ERG) típusú csatornákat gátló toxinok, jelenleg 29 peptid. A  $\gamma$ -KTx toxinokat a 2.1 és 2.2 kivételével 3 diszulfidhíd kötés stabilizálja. Méretük 36-47 aminosav alegység. Mivel az ERG családba tartozó ioncsatornák külső pórus illetve torony régiója eltér a többi Kv csatornától (3. ábra), ezért nem meglepő, hogy egy adott toxin általában nem képes mindkettő csatorna fajtát gátlani. Ennek ellenére az  $\alpha$ -KTx15.2 (BmTx3) gátolta mind a Kv illetve ERG típusú csatornákat [118].

A legkésőbb felfedezett toxin család a  $\kappa$ -KTx, melybe 22-28 alegységű peptidek tartoznak. Jelenleg 18 tagja van. Ezek a toxinok két párhuzamos  $\alpha$ -hélixből állnak, melyeket 2 diszulfid híd köt össze. A  $\kappa$ -KTx toxinokra jellemző, hogy gátolják a Kv csatornákat, bár alacsonyabb affinitással ( $\mu$ M koncentrációban).



**3. ábra** A skorpiótoxinok lehetséges interakciói különböző káliumcsatornákkal. **A** az  $\alpha$ -KTx toxinok általános blokkolási módja a *Shaker* típusú Kv csatornák pórusában. A csatornával történő interakció leginkább a toxin  $\beta$ -redő oldala felőli alegységek és a csatorna vesztibulumának alsó része között alakul ki, továbbá a toxin kritikus lizin oldallánca a csatorna szelektivitási szűrőjébe illeszkedik. **B** A KCa2.2 (SK) csatorna gátlása az  $\alpha$ -KTx5.3 által. A toxin a jellemző  $\alpha$ -KTx kötődéssel ellentétesen, az  $\alpha$ -helikális régiójával alakítja ki az interakciós felületet, melyben a csatorna vesztibulumának alsó része illetve a torony régiója vesz részt [119]. **C** A  $\gamma$ -KTx2.1 interakciója a Kv11.1 (hERG) csatornával főként a toxin  $\alpha$ -helikális régiója és a csatorna torony régiója között jön létre. Mivel a toxin nem férközik közvetlenül a pórushoz, így csak részben gátolja a csatornán keresztül folyó áramot [120].



## 2.5 Az ioncsatorna gátló skorpiótoxinok karakterizálásának módjai

Jelenleg a toxinok receptorainak azonosítására számos módszer lehetséges. Az első skorpiótoxin izolálásának idején (noxiustoxin, 1982 [121]) a klónozott ioncsatornák még limitált mennyiségben álltak rendelkezésre. Az első ioncsatorna gént, a nikotinerger acetilkolin receptor génjét 1982-ben klónozták, a *Torpedo californica* (elektromos rája) szervezetéből [122]. Ezt követte az *Electrophorus electricus* (elektromos angolna) feszültség-aktivált Na<sup>+</sup> csatornája 1984-ben [123]. Ebből kifolyólag a K<sup>+</sup> csatorna gátló hatás tesztelésére a legelterjedtebb módszer a patkány agyszövetből izolált ingerelhető sejteken természetesen kifejeződő ioncsatornákon történő mérés volt. Ezeken a sejteken gyorsan inaktiválódó A-típusú áramokon (melyet a Kv1.4, 3.4, 4.1, 4.2 és 4.3 csatornák áramai alkotják [124-126]), illetve az ún. delayed-rectifier áramokon (melyeket főként a Kv1.1, 1.2, 1.5, 1.6, 2.1, 3.1 és 3.2 csatornák hoznak létre [126]) lehet méréseket végezni, továbbá kifejeznek Ca<sup>2+</sup>-aktivált K<sup>+</sup> (SK) csatornákat is [127, 128]. Ezen kívül további, primer *ex vivo* sejt kultúrákon is végeztek méréseket, mint például szarvasmarha aorta eredetű endotél sejteken [129], illetve nyúl [130], vagy csiga [131] idegsejteken.

Miután több ioncsatorna génjét klónozták, különböző heterológ expressziós rendszerek révén lehetővé vált az egyedi ioncsatornák elkülönített vizsgálata. Ezek során főként *Xenopus laevis* oocitákban, rovar, vagy emlős (akár humán) sejtekben fejezik ki az ioncsatorna géneket [16, 17, 132]. A toxinok receptorhoz való kötődése több módszerrel mérhető. Ezek közül a legelterjedtebbek a radiográfiás és az elektrofiziológiai mérések.

A radiográfiás mérések történhetnek direkt, vagy indirekt módon. A direkt mérésekhez a toxin molekulát radioaktív izotóppal jelölik. Ez a legtöbb esetben <sup>125</sup>I izotóp. A mérések során a radioaktívan jelölt toxin membránokhoz történő asszociációját határozzák meg. A módszer hátránya, hogy a jelölés megváltoztathatja a toxin specificitását [133].

Az indirekt módszer során a vizsgált toxint egy ismert, radioaktívan jelölt toxin jelenlétében alkalmazzák a membránokon. Ha a két toxin kötőhelye megegyezik, azaz egymás kompetitorai, akkor a vizsgált anyag koncentráció-függően csökkenti az ismert, radioaktív izotóppal jelölt toxin (pl.: <sup>125</sup>I apamin vagy <sup>125</sup>I noxiustoxin) kötődésének hatékonyságát [127, 134]. A két radiográfiás módszerrel a vizsgált molekulák kötődésének koncentráció-függését jellemző

disszociációs állandó (Kd) határozható meg. A toxin membránhoz történő kötődése lehet aspecifikus, így nem jelenti szükségszerűen a membránban lévő ioncsatornák gátlását.

Másik elterjedt módszer a radioaktív  $^{86}\text{Rb}^+$  sejtekből történő kiáramlásának mérése. A mérésekhez a sejteket  $^{86}\text{Rb}^+$  ionokkal töltik, majd magas  $\text{K}^+$  tartalmú extracelluláris oldattal depolarizálják. A depolarizációval a sejtekben található feszültség-aktivált ioncsatornák nyitnak, így a  $^{86}\text{Rb}^+$  ionok a  $\text{K}^+$  csatornák pórusán keresztül az extracelluláris térbe áramlanak. A kiáramlott  $^{86}\text{Rb}^+$  mennyisége mérhető, így egy adott toxin  $\text{K}^+$  csatorna gátló hatásának koncentráció függése meghatározható [135, 136].

Az elektrofiziológiai mérések lehetővé teszik a toxinok direkt hatásának mérését specifikus ionáramokon. A mérésekhez többféle sejt, vagy membrán preparátum is használható. Az ionáramokat legtöbbször vagy primer sejteken (neuron, limfocita) természetesen kifejeződő ioncsatornákon [16, 17, 137], vagy pedig egy adott ioncsatorna génjével transzfektált sejten, vagy az ioncsatornát kódoló mRNS-sel injektált *Xenopus* oocitán mérik [16, 30, 138]. Az elektrofiziológiai mérések előnye, hogy meghatározható a toxinok valós, koncentráció függő ioncsatorna gátló hatása ( $\text{IC}_{50}$ ), illetve a gátlás kinetikai paramétereinek elemzésével a disszociációs állandó (Kd) is megadható [20, 28].

## 2.6 A skorpiótoxinok terápiás alkalmazásának lehetőségei

Sok mérgező állat mérgeiben található ioncsatorna gátló peptidek, melyekkel a préda ioncsatornáit gátolva megakadályozzák annak menekülő, illetve védekező képességét. Ismerve a különböző sejtekben kifejeződő ioncsatornák típusát és funkcióit, az egyes sejtípusok működése, akár differenciációja, az ioncsatornák specifikus gátlásával módosítható, ezért a specifikus ioncsatorna gátló szerek felhasználhatóak különböző betegségek terápiája során [6, 61]. A legismertebb ioncsatorna gátló szerek az ún. kis molekulák családjába tartoznak, pl.: tetraetilammónium (TEA), 4-amino piridin (4AP), lidokain, melyek farmakológiai tulajdonságai jól ismertek, a peptid toxinok azonban még mindig rendelkeznek néhány előnyös tulajdonsággal e molekulákkal szemben. Ezek közül az egyik az, hogy a peptid toxinok nagyobb felületük révén több interakciós lehetőséggel rendelkeznek, így több kapcsolódási pontot alakíthatnak ki az ioncsatornákkal. Ezért a kötődés affinitása sok esetben nagyobb, a kis molekulákéhoz képest, azaz a peptid toxinok alacsonyabb koncentrációban is hatékonyak lehetnek. A több kapcsolódási

pontból eredően a peptid toxinok szelektivitása is nagyobb lehet, mivel a különböző ioncsatornák hasonló szerkezetük ellenére mégis különböznek egymástól, ezért egy adott peptid toxin is képes a közeli rokon ioncsatornához is különbözőképpen kötődni, mely bizonyos toxinok esetén nagy fokú ioncsatorna szelektivitást eredményez [6, 17]. A nagy szelektivitású gátlás kulcsfontosságú a terápiás felhasználás során, mivel a célzott ioncsatornától eltérő ioncsatornák gátlása nem kívánt mellékhatásokhoz vezethet. A peptid toxinok szerkezetét általában 3 vagy 4 diszulfid híd stabilizálja, mely hozzájárulhat a molekula hosszú életidejéhez a szervezetben [139].

Számos *in vivo* állatkísérleti modellen kimutatták az  $K^+$  csatorna gátló molekulák terápiás hatékonyságát, mely azt mutatja, hogy a skorpiókból izolált peptid toxinok értékes molekulák lehetnek a gyógyszerhatóanyagok fejlesztése során [17, 109, 140].

A lehetséges terápiás alkalmazások közül a leginkább kutatott felhasználási mód az autoimmun megbetegedések kezelésére irányul a T-limfociták Kv1.3 csatornáinak gátlása révén. Az *in vivo* állatkísérletek során kimutatták, hogy a  $T_{EM}$  sejtek szelektív gátlása nincs hatással a virális és bakteriális fertőzések ellen történő protektív immunitásra, illetve a peptid toxinok terápiás koncentrációban nem váltanak ki toxicitást [70, 109]. Bizonyos mellékhatásokat, mint étvágycsökkenés, fokozott nyáltermelés és hiperaktivitás tapasztaltak a margatoxin *in vivo* alkalmazása során [141].

Az autoimmun betegségekben történő alkalmazáson túl, egerekben kiváltott *in vivo* metabolikus szindróma modellben egy specifikus Kv1.3 gátló peptid (SHK-186) pozitív hatását mutatták ki, ahol az állatokat magas zsír és fruktóz tartalmú diétának tették ki. A Kv1.3 csatorna gátlása képes volt csökkenteni a vér koleszterin, cukor és inzulin szintjét, növelte az inzulin érzékenységet, illetve gátolta a testsúly növekedését és a máj elzsírosodását [142].

Természetesen szelektív toxinokat csak ritkán izolálnak (pl: Vm24 [17]), viszont a természetes toxinok irányított mutációjával a peptidek ioncsatorna specificitása megváltoztatható pl.: Shk-170, Mokatoxin-1, OSK-20 [143-145]. Minél több ismerettel rendelkezünk a toxinok és ioncsatornák közötti interakciót befolyásoló molekuláris elemekről, annál könnyebben és hatékonyabban leszünk képesek nagy affinitású és specifikus ioncsatorna gátló szereket tervezni és létrehozni.

### 3 CÉLKITŰZÉSEK

#### 1. Újonnan izolált skorpiótoxinok farmakológiai karakterizálása

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

#### 2. A margatoxin szelektivitásának vizsgálata elektrofiziológiai módszerrel

A margatoxin a Kv1.3 csatorna szelektív gátlószereként forgalmazott skorpiótoxin, melyet széles körben alkalmaznak az ioncsatorna vizsgálatok során. Ennek ellenére olyan referencia, amely a margatoxin szelektivitását szisztematikusan vizsgálja nem állt rendelkezésre, ami téves következtetések levonásához vezethet alkalmazása során Ezt a bizonytalanságot kívánjuk megszüntetni a toxin szelektivitási profiljának feltérképezésével.

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.

## 4 Anyagok és módszerek

### 4.1 Toxinok

Az OcyKTx2 toxint az *Opisthacanthus cayaporum* skorpió mérgéből izolálták kollaborációs partnereink. 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 yaschenkoii* Ausztráliában élő skorpió mérgéből izolálták kollaborációs partnereink 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 kromatográfias 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.

## 4.2 Sejtek és ioncsatorna expressziós vektorok

### 4.2.1 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. A sejteket kétszer mostuk 25 mM HEPES-t is tartalmazó  $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{Mg}^{2+}$  mentes Hanks' oldattal (pH: 7,4), majd  $0,5 \times 10^6$  sejt/ml koncentrációban 2-7 napig tenyésztettük 5%  $\text{CO}_2$  mellett  $37^\circ\text{C}$ -on 24 lyukú tenyésztőedényekben, RPMI-1640 médiumot használva, mely tartalmazott 10% FBS-t, 100 IU/l penicillint, 100  $\mu\text{g/ml}$  streptomycint és 2 mM L-glutamint. A sejteket 2,5, 5 illetve 10 mg/ml phytohemagglutininnal (PHA-P, Sigma-Aldrich Kft, Hungary) aktiváltuk majd a Kv1.3 áramokat az aktivációt követő 2-7. napban mértük.

### 4.2.2 tsA201 sejtvonal

A tsA201, azaz az SV40 large T antigénnel transzformált humán embrionális vese sejtet (HEK) magas glükóz (4500 mg/ml), 10% FBS, 2 mM l-glutamin, 100 U/ml penicilin-G, és 100  $\mu\text{g/ml}$  streptomycin tartalmú Dulbecco's minimum essential medium (DMEM) tápoldatban tenyésztettük,  $37^\circ\text{C}$ -on, 5%  $\text{CO}_2$  és 95%-os páratartalom mellett. A sejteket hetente háromszor oltottuk át.

A tsA201 sejtekben az alábbi ioncsatorna kódoló géneket expresszáltuk Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) reagenssel történő transzfecciót 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-Plank-Gesellschaft, Jena, Germany) biztosította.

A hKCa1.1 (BK) gént pCIneo 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.

#### **4.2.3 L929 sejt vonal**

Egér kötőszöveti eredetű sejt vonal. Az egér Kv1.1 (mKv1.1) csatorna génjével stabilan transzfektált L929 sejt vonalat [146] H. Wulff (UC Davis, CA, USA) ajándékozta munkacsoportunknak. A sejteket a tsA201 sejteknél leírtak szerint tenyésztettük, ahol a tápoldatot 300 µg/ml geneticinnel (G418) egészítettük ki a stabil transzfektáns sejtek pozitív szelekciója miatt.

#### **4.2.4 CHO sejt vonal**

A kínai hörcsög petefészkéből izolált sejt vonal sejtjeit a tsA201 sejtekkel megegyező körülmények között tenyésztettük. A CHO sejtekben a hKv1.1 és hKv1.2 csatornákat expresszáltuk.

#### **4.2.5 Sf9 sejt vonal**

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

### **4.3 Tranziens 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 transzfektálást 35 mm átmérőjű szövettenyésztő Petri csészében végeztük a sejtek kb. 80%-os konfluenciája mellett. A hKv1.1, hKv1.2, hKv1.3, hKv1.5, hKv1.6 és IKCa1 csatornákat kódoló vektorok C-terminális GFP (zöld 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 plazmival, így a zöld fluoreszcenciát mutató sejtek nagy valószínűséggel a csatorna génjét kódoló vektort is felvették, és kifejezésre juttatják. A GFP pozitív, transzfektált sejteket Nikon TE2000U vagy TS100 invert fluoreszcens mikroszkóppal azonosítottuk.

### **4.4 Elektrofiziológia**

#### **4.4.1 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 [147]. A mérésekhez a sejteket 3,5 mm átmérőjű Petri csészében tartottuk, majd Nikon TE2000U vagy TS100 invert fluoreszcens mikroszkóp alatt azonosítottuk, a mérőelektrodát a mikropipettával Burleigh PCS-PS60 mikromanipulátor (Thorlabs, Newton, NJ, USA) segítségével juttattuk a



sejtekhez. 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).

A mikropipettákat GC 150 F-7.5 boroszilikát kapillárisokból készítettük (Harward Apparatus, Kent, Egyesült Királyság), melyek belsőoldattal feltöltve 3-5 MΩ ellenállást mutattak a külső mérőoldatba helyezve.

Az elektrofiziológiai mérésekhez használt oldatok összetételét az 1. táblázatban foglaltam össze.

<b>Elektrofiziológiai mérésekhez használt oldatok</b>		
<b>Fajtája</b>	<b>Ioncsatorna</b>	<b>Összetétele (mM)</b>
Külső	normál	145 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl <sub>2</sub> , 2,5 CaCl <sub>2</sub> , 5,5 glükóz, 10 HEPES (pH 7,35)
	hKv11.1	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	normál	140 KF, 2 MgCl <sub>2</sub> , 1 CaCl <sub>2</sub> , 10 HEPES és 11 EGTA (pH 7.22)
	hKCa1.1	140 KCl, 10 EGTA, 9,69 CaCl <sub>2</sub> , 5 HEPES (pH 7,2, szabad [Ca <sup>2+</sup> ] = 5 μM)
	hKCa3.1	150 K-aszpartát, 5 HEPES, 10 EGTA, 8,7 CaCl <sub>2</sub> , 2 MgCl <sub>2</sub> (pH 7,2, szabad [Ca <sup>2+</sup> ] = 1 μM)
	hKv11.1	140 KCl, 10 EGTA, 2 MgCl <sub>2</sub> , 10 HEPES (pH 7,3)

**1. Táblázat** Az elektrofiziológiai mérések során használt külső és belső oldatok összetétele a különböző ioncsatornák esetében

Az oldatok elkészítéséhez a vegyszereket a Sigma-Aldrich Kft.-től (Budapest, Magyarország) vásároltuk. A tesztelt toxinokat mindig a külső oldatban oldottuk fel a mérni kívánt koncentrációkban, ezért a külső oldatok minden esetben 0.1 mg/ml koncentrációban BSA-t (bovine serum albumin, Sigma-Aldrich) tartalmaztak, hogy elkerüljük peptid toxinok esetleges 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 sejtek környezetében gravitáció által hajtott perfúziós rendszer segítségével valósítottuk meg, folyamatos elszívás mellett. A perfúziós fej 6 bemenettel rendelkezett, azaz egy sejten akár 6 különböző oldat hatását tudtuk mérni. A perfúziós fej kimeneti oldalát egy PE10-es (0,28 mm belső-, 0,61 mm külső átmérő) cső adta, melynek tölcészerűen kiképzett kifolyó nyílása lamináris áramlással juttatta a tesztelt oldatot a sejtekre.

#### **4.4.2 A különböző ioncsatornákon átfolyó áramok mérésére használt protokollok**

A patch-clamp technikával végzett elektrofiziológiai méréseket feszültség-zár üzemmódban mértük teljes-sejt, vagy outside-out patch konfigurációban. Az utóbbi módszer a teljes-sejt konfigurációhoz hasonló, illetve technikailag abból kivitelezhető. Miután a sejtmembrán és a mikropipetta között létrejött a megfelelő kapcsolat (ún. giga-seal), melyet a mérőoldatba helyezett mikropipettán mérhető, kezdetben 3-5 M $\Omega$  ellenállás G $\Omega$ -os értékre történő megemelkedése jelez, a sejtmembránt a mikropipettában alkalmazott nyomásváltoztatással átszakítjuk. Így a teljes-sejt konfigurációban mérhetünk, vagyis a mikropipettában lévő belső oldat az intracelluláris térrel közlekedik, így a sejt membránpotenciálja a mikropipettában lévő elektródával tetszőleges értékre állítható. A teljes-sejt konfiguráció kialakítása után a pipetta lassú eltávolításával a sejtől egy membrándarab izolálható, mely felszínén az ioncsatornák orientációja megegyezik a sejtmembránban mutatott orientációjával, azaz a membrándarab vezikulaként helyezkedik el a mikropipetta végén, ahol a vezikula belső tere közlekedik a mikropipetta belső oldatával. A módszer hátránya, hogy jóval kisebb amplitúdójú áramokat mérhetünk, mint teljes-sejt konfigurációban, előnye viszont az, hogy a teljes-sejt konfigurációban mérhető membrán kapacitás, illetve a soros ellenállás outside-out patch konfigurációban elhanyagolható mértékű, így a membrán depolarizáció pontosabban, és gyorsabban kivitelezhető.

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<sup>+</sup>-csatornák esetében a csatornán átfolyó áramot 0 mV-ra történő depolarizációval aktiváltuk [148]. A feszültség-aktivált K<sup>+</sup>-csatornák esetében +50 mV-ra történő gyors depolarizációt, vagy feszültség-rámpát alkalmaztunk [17].

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  $\mu\text{M}$  szabad  $\text{Ca}^{2+}$ -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)  $\text{Ca}^{2+}$ -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.

#### **4.4.3 Az elektrofiziológiai mérések kiértékelése**

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

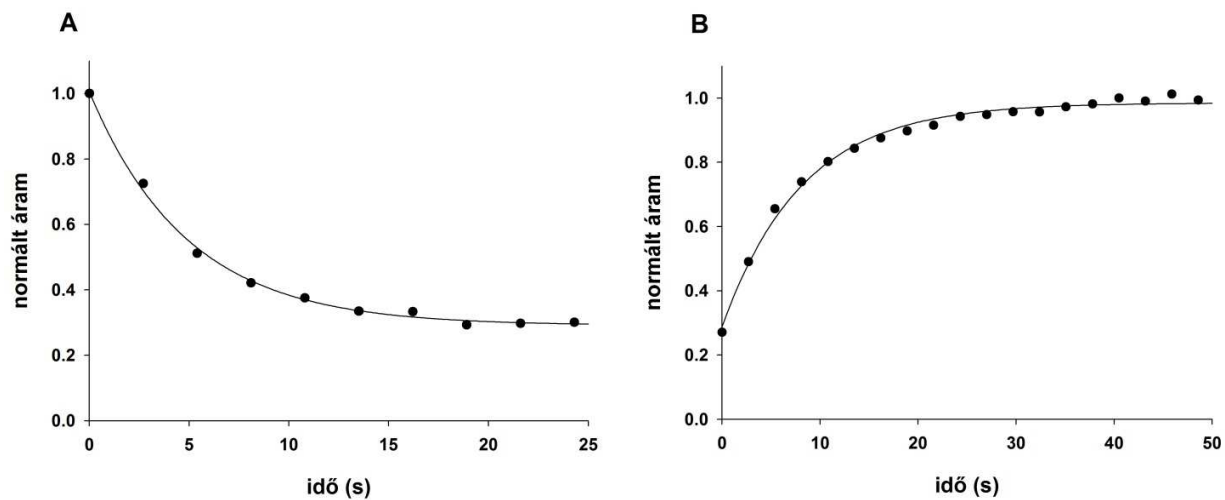
A dózis-hatás görbéken, illetve az oszlopdiagramokon feltüntetett értékek 3-5 független mérés eredményeinek átlagai, ahol mintaátlag átlagos hibáját S.E.M.-ben jelöltük.

A dózis-hatás görbén a különböző koncentrációkban mért adatpontokra kétparaméteres Hill-egyenletet illesztettünk ( $M.Á.H. = IC_{50}^H / (IC_{50}^H + [Tx]^H)$ ), 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 ( $1/M.Á.H.$ ) 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 pórus-gátló toxinok leggyakrabban a toxin:csatorna 1:1 arányú kötődésével fejtik ki hatásukat [6].

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 paramétereit 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 csúcsáramokat 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  $B = A(t = 0) - C$  (4. ábra A). 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 (4. ábra B).



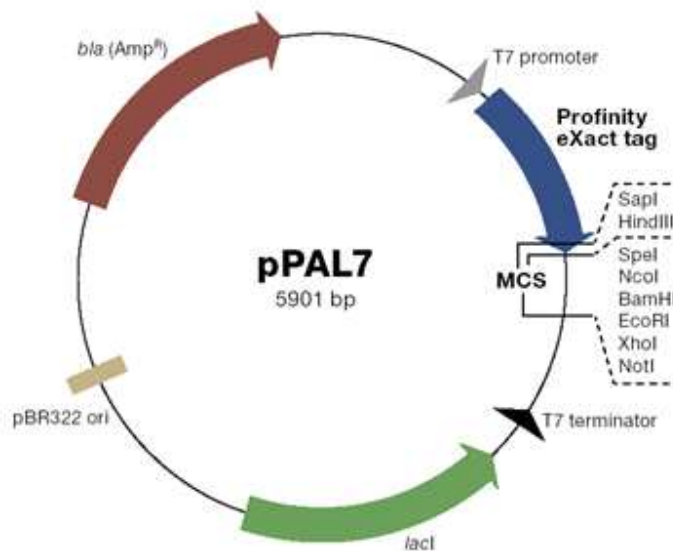
**4. ábra** hKv1.1 csatornán 1  $\mu\text{M}$  urotoxin által létrehozott egyensúlyi gátlás kialakulásának (**A**), illetve megszűnésének (**B**) kinetikai paramétereinek meghatározása. A mért áram amplitúdókat normáltuk, majd az idő függvényében ábrázoltuk. A pontokra exponenciális függvényeket illesztve meghatároztuk a gátlás kinetikai paramétereit, melyből megadtuk a disszociációs állandót ( $K_d$ ).

## 4.5 Peptidszintézis

### 4.5.1 Anuroctoxin rekombináns előállítása *E.coli*-ban

#### 4.5.1.1 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-transzferáz), 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.



5. ábra A pPAL7 plazmid szerkezete

A pPAL7 expressziós rendszer (5. ábra) (Bio-Rad Hungary Kft. Budapest, Magyarország) által egy olyan expressziós vektor, mely lehetővé teszi a fúziós fehérjék előállítását. A plazmidban

kódolt eXact fúziós partnert követően található az ún. MCS (multiple cloning site), mely lehetőséget biztosít a toxint kódoló DNS szakasz különböző módokon történő beillesztésére, mivel több restriktív endonukleáz hasítási helyét tartalmazza.

A beillesztést két különböző restriktív enzimmel végeztük, mellyel biztosítottuk a DNS szakasz megfelelő irányú beépülését. Az anuroctoxin esetében a HindIII enzimet alkalmaztuk 5' végénél (a tag felé), mivel az ezzel az enzimmel történő beillesztés biztosította a toxin plusz aminosavaktól mentes, szekvencia azonos előállítását, ezzel szemben a 3' végénél EcoRI enzimet használtunk.

**Az anuroctoxin aminosav szekvenciája a következő:**

ZKECTGPGHQCTNFCRKNKCTHKGKCMNRKCKCFNCK (35 aminosav)

**Az anuroctoxin DNS átírata *E. coli* kodon-optimalizációval**

CAGAAAGAATGTACCGGTCCGCAACATTGTACGAACTTTTGTTCGGAAAAATAAATGCACGCATG  
GTAAGTGCATGAACCGTAAATGCAAATGCTTTAATTGCAAG (105 bázis)

**A restriktív endonukleázok felismerési és hasítási szekvenciái**

**HindIII:**

5'-A<sup>^</sup>A G C T T-3'

3'-T T C G A<sup>^</sup>A-5'

**EcoRI:**

5'-G<sup>^</sup>A A T T C-3'

3'-C T T A A<sup>^</sup>G-5'

**Anuroctoxin inzert DNS szekvenciája a klónozáshoz szükséges restriktív enzim hasítóhelyekkel**

**pPAL7-AnTX-Sense:**

**CCG**AAGCTT**TG**CAGAAAGAATGTACCGGTCCGCAACATTGTACGAACTTTTGTTCGGAAAAATAA  
ATGCACGCATGGTAAGTGCATGAACCGTAAATGCAAATGCTTTAATTGCAAG**TAAGAATTCCGG**

(128 bázis)

**pPAL7-AnTX-Antisense (a pPAL7-AnTX-Sense szál komplementere):**

CCGGAATTCTTACTTGGCAATTAAAGCATTTGCATTTACGGTTCATGCACTTACCATGCGTGCAT  
TTATTTTTCCGACAAAAGTTTCGTACAATGTTGCGGACCGGTACATTCTTTCTGCAAAGCTTCGG  
(128 bázis)

TG nukleotidok beépítése az endopeptidáz megfelelő helyen történő hasításhoz, illetve az olvasási keret megtartásához, továbbá a TAA stop kodon a transzláció terminálásához szükséges.

A sense és antisense oligonukleotidokat Integrated DNA Technologies (Bio-Science Kft., Budapest, Magyarország) szintetizálta meg.

A sense és antisense komplementer oligonukleotidokat a következő protokollal állítottuk párba PCR készülékkel (Bio-Rad Hungary Kft. Budapest, Magyarország):

Az oligonukleotidokat 3 mg/ml koncentrációban vettük fel DN-áz mentes vízben.

A DNS szálak párba állításához a következő oldatot készítettük el:

48 µl pufferbe (100 mM NaCl, 50 mM Hepes, pH = 7,4) bemértünk 1 µl sense (3 mg/ml) illetve 1 µl antisense (3 mg/ml) oligonukleotidot, melyet PCR készülékben a következő hőmérséklet protokollal kezeltük:

90°C, 4 perc

70°C, 10 perc

60°C, 5 perc

50°C, 5 perc

37°C, 15 perc

10°C, tárolás

A protokoll elvégzése után a DNS szakaszt, illetve a pPAL7 plazmidot HindIII és EcoRI enzimekkel emésztettük. Emésztés után az inzertet 1,5%-os agaróz gélben, illetve a plazmidot 1%-os agaróz gélben gélelektroforézissel futtattuk TAE pufferben (40 mM Tris, 20 mM ecetsav,



1 mM EDTA) 120V feszültséggel. Az izolált géldarabból a DNS-t Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corp., Madison, Wi, USA) kit-tel izoláltuk.

A megemésztett plazmidot és az inzertet T4 ligáz enzimmal (Biocenter Ltd. Szeged, Magyarország) ligáltuk, majd *E. coli* sejtekbe (ET12567) transzformálva szaporítottuk fel. A felszaporított DNS-t a fehérjetermelésre optimalizált *E. coli* DE3 törzsbe transzformáltuk, melyben a fúziós fehérjét expresszáltuk.

Az *E. coli* sejteket az alábbi protokoll szerint transzformáltuk, ún. hősokk módszerrel:

A transzformáláshoz a plazmidot felvenni képes kompetens sejteket  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A transzformáláshoz 100  $\mu\text{l}$  kompetens sejthez jégen kb. 0,5-1  $\mu\text{g}$  DNS-t adtunk, majd 20 percig jégen tartottuk. Ez után a sejteket 50-60 s-ig  $42^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk, majd újra jégre helyeztük 2 percre. Ezt követően, steril 15 ml-es csövekben 60 percig inkubáltuk  $37^{\circ}\text{C}$ -on, 800  $\mu\text{l}$  SOC médiumban (4 g tripton, 1 g élesztő kivonat, 0,1 g NaCl, 0,2 ml 2,5 M KCl pH = 7,0, 200 ml végtérfogatban vízben feloldva), 220 RPM rázatás mellett. Az inkubáció után a sejteket lecentrifugáltuk 1600 RPM-en (kb. 400 g), majd 800  $\mu\text{l}$  sejtmentes felülúszót pipettával leszívtunk és a maradék szuszpenziót 0,1 mg/ml ampicillin tartalmú agarózos LB táptalajra (Sigma-Aldrich Kft, Hungary) szélesztettük. Az antibiotikumot a transzformált sejtek pozitív szelekciója miatt adtuk a táptalajhoz. A kinőtt telepek közül izolált telepeket 10 ml 0,1 mg/ml ampicillin tartalmú LB tápoldatban növesztettük  $37^{\circ}\text{C}$ -on, 220 RPM rázatás mellett 16 órán keresztül, majd a DNS-t Wizard Plus Miniprep (Promega Corp., Madison, Wi, USA) DNS izolációs rendszerrel a gyártó utasításai szerint végeztük. A protokoll végén a DNS-t nukleáz mentes vízben oldottuk fel, majd az oldat DNS tartalmát NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) mértük meg.

#### **4.5.1.2 Az anuroctoxin expressziója *E. coli*-ban**

Az előző fejezetben leírt módon előállított, az anuroctoxin génjét tartalmazó pPAL7 vektort *E. coli* BL21 DE3 sejtekbe transzformáltuk a fentebb ismertetett hősokk-módszerrel. A transzformáció után agarózos LB táptalajon kinőtt telepek közül egyet izoláltunk, majd 10 ml 0,1 mg/ml ampicillin tartalmú 2xYT tápoldatba oltottuk. A sejteket  $37^{\circ}\text{C}$ -on, 220 RPM rázatás

mellett 16 órán keresztül inkubáltuk, majd a kultúrát 1 liter 0,1 mg/ml ampicillin tartalmú 2xYT tápoldatba oltottuk, majd 37°C-on, 220 RPM fordulaton rázattuk. A tenyészet sejtsűrűségét 600 nm hullámhosszon mértük Hitachi U-2900 spektrofotométerrel (Hitachi, Tokyo, Japán).  $OD_{600} = 0,8$  értéket elérve a fúziós fehérje termelést 10 ml 0,1 M IPTG (Izopropil  $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid) hozzáadásával indukáltuk. Ez után további 5 órán keresztül, szobahőn, 180 RPM fordulaton rázattuk a kultúrát. Az inkubációs idő leteltével a sejteket lecentrifugáltuk (8000 RPM, 4°C, 20 perc) majd a felülúszót leöntöttük, a sejteket pedig az affinitás kromatográfiához használt mosó pufferben (2. táblázat) vettük fel. A sejtek feltárását Branson *SONIFIER 250* típusú ultrahangos szonikátorral végeztük. Ezt követően a szuszpenziót 4°C-on, 8000 RPM fordulaton, 20 percig centrifugáltuk, majd a felülúszót 0,45  $\mu$ m pórusméretű Whatman fecskendőszűrővel szűrtük. (Flexhorizon Bt. Budapest, Magyarország). A szűrt, sejtmentes oldatot 5 ml térfogatú Profinity eXact (Bio-Rad Hungary Kft. Budapest, Magyarország) affinitás kromatográfiás oszlopon tisztítottuk, a gyártó utasításai szerint. Az oszlop állófázisán egy bakteriális proteáz enzim, a szubtilizin található, mely megköti az eXact fúziós partnert. A kötődés után a szubtilizin enzim katalitikus aktivitása fluorid tartalmú pufferrel (eluáló puffer 2. táblázat) bekapcsolható. Ennek hatására az álló fázison kötve marad az eXact tag, míg a toxin lehasad. A toxin és fúziós partner elválasztása az oszlopon történt szobahőn, melynek inkubációs ideje 30 perc volt. Az oszlop mosását követően az oszlop álló fázisán kötött eXact fúziós partnert a regeneráló oldattal (2. táblázat) leválasztottuk, majd az oszlopot a tároló oldattal feltöltve (2. táblázat) a következő felhasználásig 4°C-on tároltuk. Az oldatok cseréjét az oszlopon Varioperpex II (LKB, Broma, Svédország) perisztaltikus pumpával végeztük. A terméket liofileztük, vízben oldottuk, majd az oldatba DTT (dithiothreitol) reagenst mérve 0,1 M koncentrációban 20 percig 55°C-on redukáltuk. Az így kapott lineáris peptidet HPLC módszerrel tovább tisztítottuk.

<b>Oldatok az anuroctoxin expressziójához és tisztításához</b>	
<b>oldat neve</b>	<b>összetétel</b>
2xYT	16 g tryptone, 10 g élesztőkivonat, 5 g NaCl, vízben feloldva 1 liter végtérfogatban. pH = 7,0
mosó puffer	100 mM Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , pH = 7,2
eluáló puffer	100 mM Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , 100 mM NaF, pH = 7,2
regeneráló oldat	100 mM foszforsav vízben oldva
tároló oldat	0,02% Na-azid, 100 mM Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , pH = 7,2

**2. Táblázat** Az az anuroctoxin expressziójához és affinitás kromatográfás tisztításához használt oldatok összetétele. Az oldatok elkészítéséhez a vegyszereket a Sigma-Aldrich Kft.-től (Budapest, Magyarország) vásároltuk.

#### **4.5.1.3 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.

A HPLC-vel tisztított toxin oxidációját redukált (GSH) és oxidált (GSSG) glutation 10:1 arányú jelenlétében guanidin hidroklorid pufferben végeztük 25°C-on, 72 órán át. Ehhez az alábbi törzsoldatokat készítettük el:

*10X GSH:GSSG 10:1 oldat:* 100 mM redukált glutation (GSH) 10 mM oxidált glutation (GSSG);

*3X Guanidin hidroklorid puffer:* 6 M guanidin hidroklorid, 0,3 M Tris

Az oldatok elkészítéséhez a vegyszereket a Sigma-Aldrich Kft.-től (Budapest, Magyarország) vásároltuk.

Az oxidált peptidet HPLC-vel tisztítottuk.

#### 4.5.2 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. A módszert csak röviden kívánom bemutatni:

Az anuroctoxin és a pontmutációkkal létrehozott analógok mindegyike Fmoc/*t*Bu stratégiával készült TentaGel R PHB, illetve Wang hordozón CEM mikrohullámú peptid szintetizátoron. A peptidlánc felépítéséhez használt aminosavak mindegyike TFA-ra érzékeny oldallánc védőcsoportot tartalmazott. Az N-terminális piroglutamint védőcsoport nélkül került beépítésre. Az aminosavak kapcsolása 4-4 ekv. Fmoc-aminosav származék, HOBt és HBTU alkalmazásával történt. A Fmoc-védett aminosavszármazékokról a Fmoc-védőcsoport hasítása 20% piperidin/DMF eleggyel történt. A szintézisekhez minden esetben egy optimalizált szintézisprotokollt használtak. A peptideket a hordozóról TFA/víz/DTT/TIS 83:10:5:2 arányú eleggyel hasították. Az oxidálásra az „oxidatív folding” módszerét használták: bázikus Gly-NaOH (pH = 8,7), illetve NH<sub>4</sub>OAc (pH = 8,0) pufferben oxidálták levegőn a nyers peptideket. A ciklizált termékeket szemipreparatív HPLC-n tisztították, analitikai jellemzésüket retenciósidejük és molekulatömegük mérésével végezték.

## 5 Eredmények:

### 5.1 Újonnan izolált skorpiótoxinok farmakológiai karakterizálása

Kollaborációs partnereink révén munkacsoportunk számára adott a lehetőség, hogy különböző skorpiók mérgéből izolált peptidek farmakológiai karakterizálásában vehetünk részt. A skorpiók begyűjtését, a méreg kinyerését és a peptidek 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.

#### 5.1.1 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:

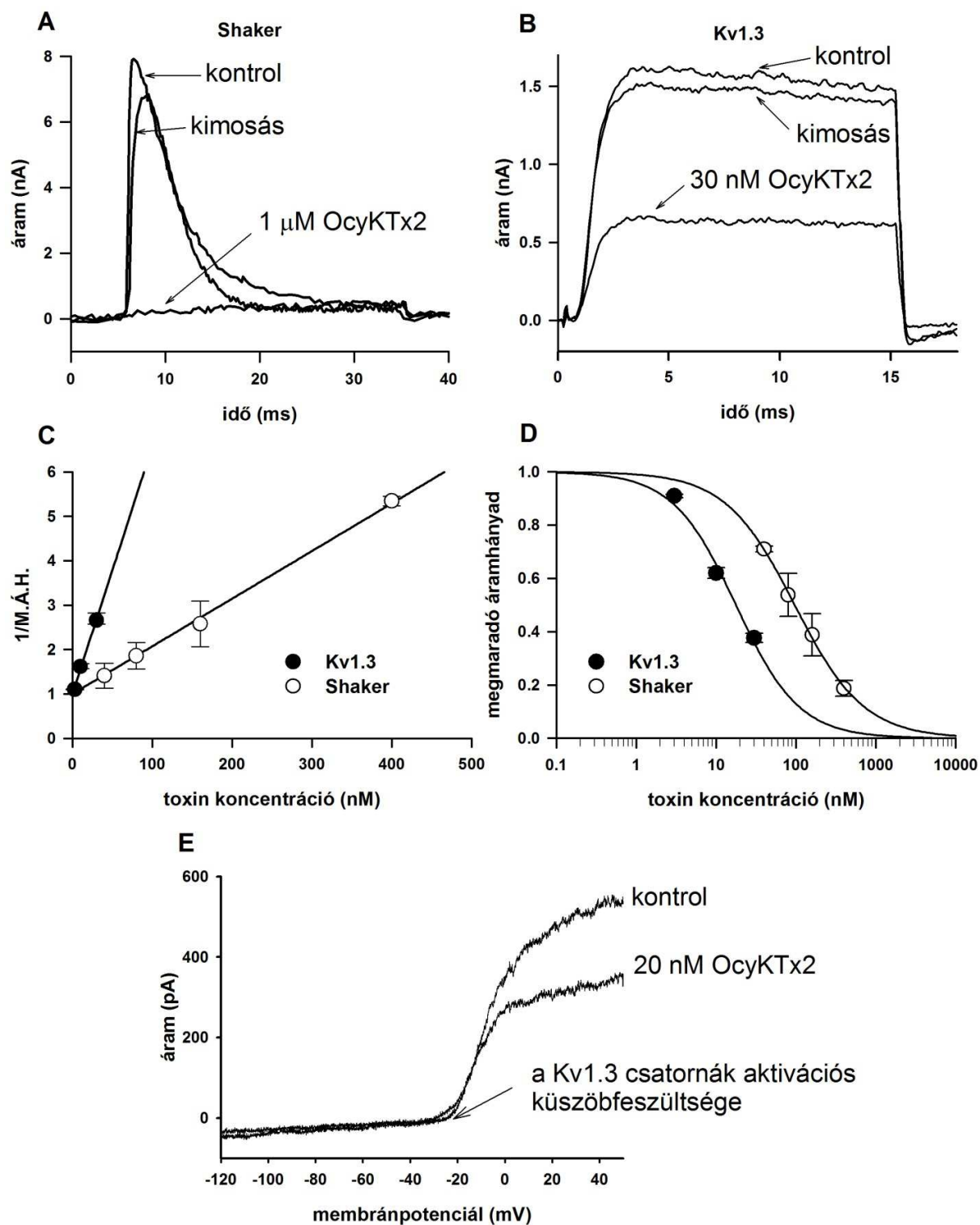
**IRCQGSNQCYGHCREKTGCMNGKCINRVCKCYGC**

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

Az OcyKTx2 toxin reverzibilisen gátolta a *Shaker* illetve Kv1.3 csatornákat (6. ábra A, B). A disszociációs állandót a Lineweaver-Burk módszerrel (6. ábra C), illetve a kétparaméteres Hill egyenlettel (6. ábra D) 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 küszöbfeszültségére (6. ábra E).

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



**6. ábra.** Az OcyKTx2 hatása a Shaker-IR és hKv1.3 csatornákon. **A** A toxin reverzibilisen blokkolja az Sf9 sejteken expresszált Shaker-IR csatornákat. A Shaker-IR áramokat teljes-sejt konfigurációban, -90 mV tartófeszültségről 30 ms hosszúságú, +50 mV-ra történő depolarizáló impulzusokkal mértük 30 s intervallumokkal. **B** A toxin reverzibilisen blokkolja az aktivált limfocitákon mért hKv1.3 csatornákat. A

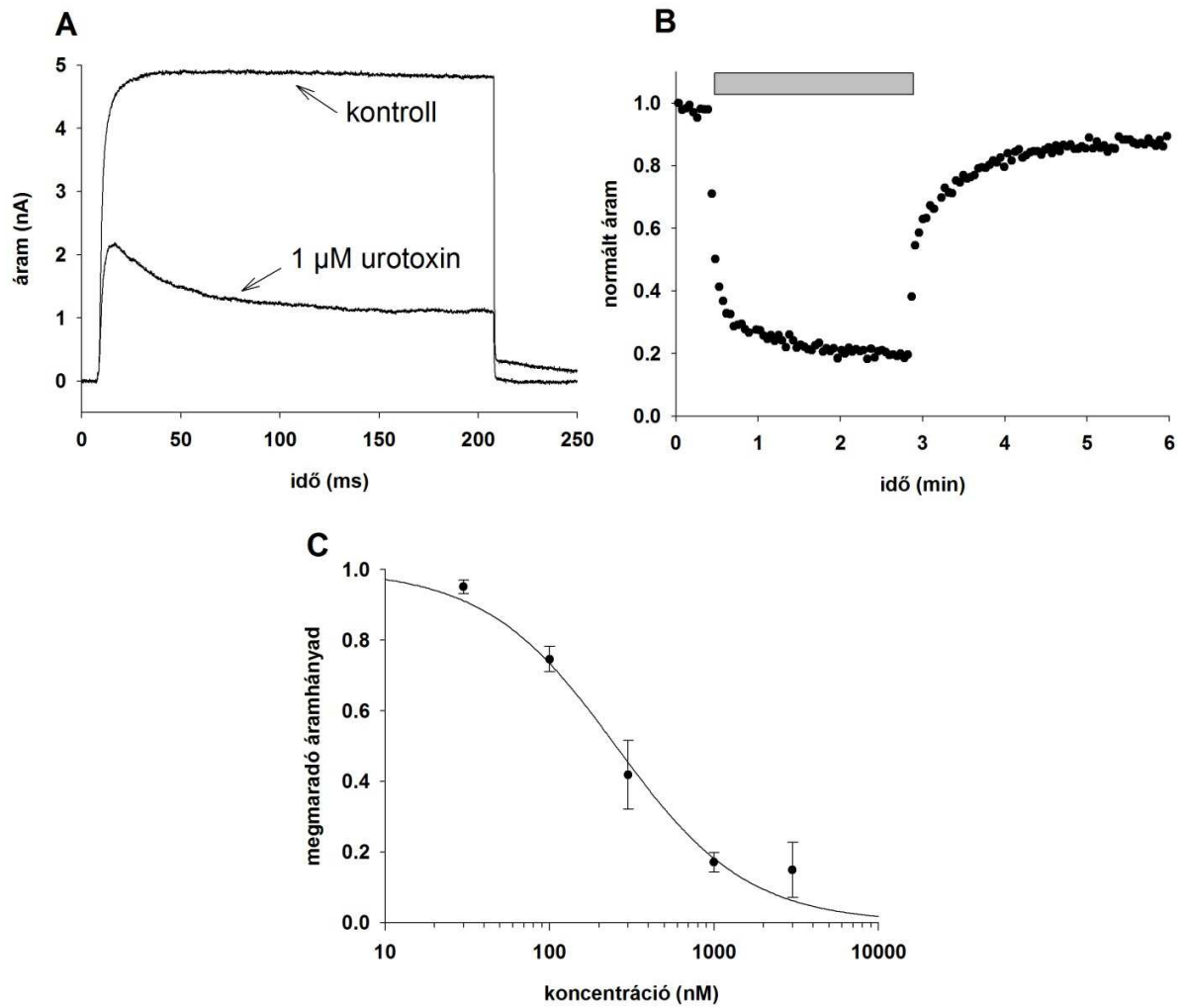
hKv1.3 áramot 15 ms hosszú +50 mV-ra történő depolarizációval aktiváltuk 15 s időközönként. A sejteket -100 mV feszültségen tartottuk. **C** A Lineweaver-Burk módszerrel kapott félhatásos dózisosok 93,5 nM (Shaker-IR) és 18,0 nM (hKv1.3). **D** A kétparaméteres Hill egyenlettel kapott félhatásos dózisosok 96,6 nM, H = 1,0 (Shaker-IR) és 17,7 nM, H = 1.1 (Kv1.3). **E** Feszültség rámpa protokollal (150 ms alatt, -120 mV-ról +50 mV-ra történő depolarizációval) mértük a toxin hatását a hKv1.3 csatorna aktivációs küszöbfeszültségére

### 5.1.2 Urotoxin

Az urotoxint az *Urodacus yaschenkoi*, Ausztráliában élő skorpió mérgéből 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 (7. ábra **A**, **C**). Ahogy az áramgörbéken látszik (7. ábra **A**), a toxin jelenlétében mért áram kinetikája eltér a kontroll körülmények között mért áram kinetikájától. Feltételezzük, hogy ennek az oka az, hogy a toxin nagyobb affinitással kötődik a nyitott állapotú csatornához, mint a zárt állapotúhoz. A toxin jelenlétében látható áramcsökkenés ennek, a nyitott állapotú csatornán kialakított, nagyobb affinitású gátlásnak a megjelenése. Ezért a megmaradó áramhányadot a nyitott állapotú blokk kialakulása után, számoltuk. A félhatásos koncentrációt a kétparaméteres Hill egyenlettel határoztuk meg (7. ábra **B**), mely eredményeként  $IC_{50} = 253,5$  nM értékeket kaptunk.

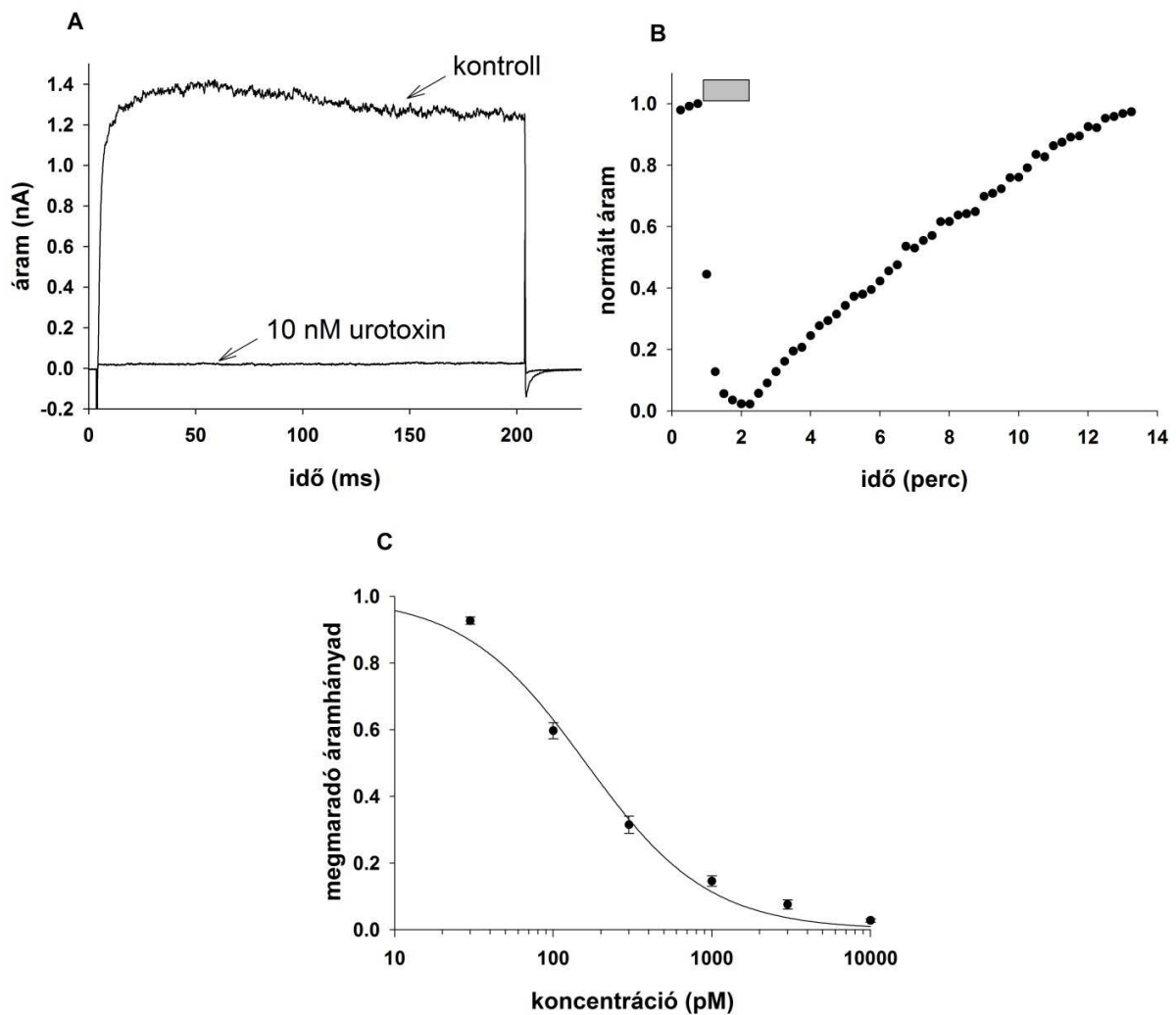


**7. ábra** Az urotoxin hatása a hKv1.1 csatornán.

**A** 1  $\mu$ M urotoxin gátolta a CHO sejteken expresszált hKv1.1 csatornát. **B** A kifejtett gátlás reverzibilis. 1  $\mu$ M urotoxin jelenlétét az extracelluláris mérőoldatban a szürke sáv jelzi. **C** A gátlás félhatásos dózist a kétparaméteres Hill egyenlettel határoztuk meg, mely szerint  $IC_{50} = 253,5$  nM,  $H = 1,1$ .



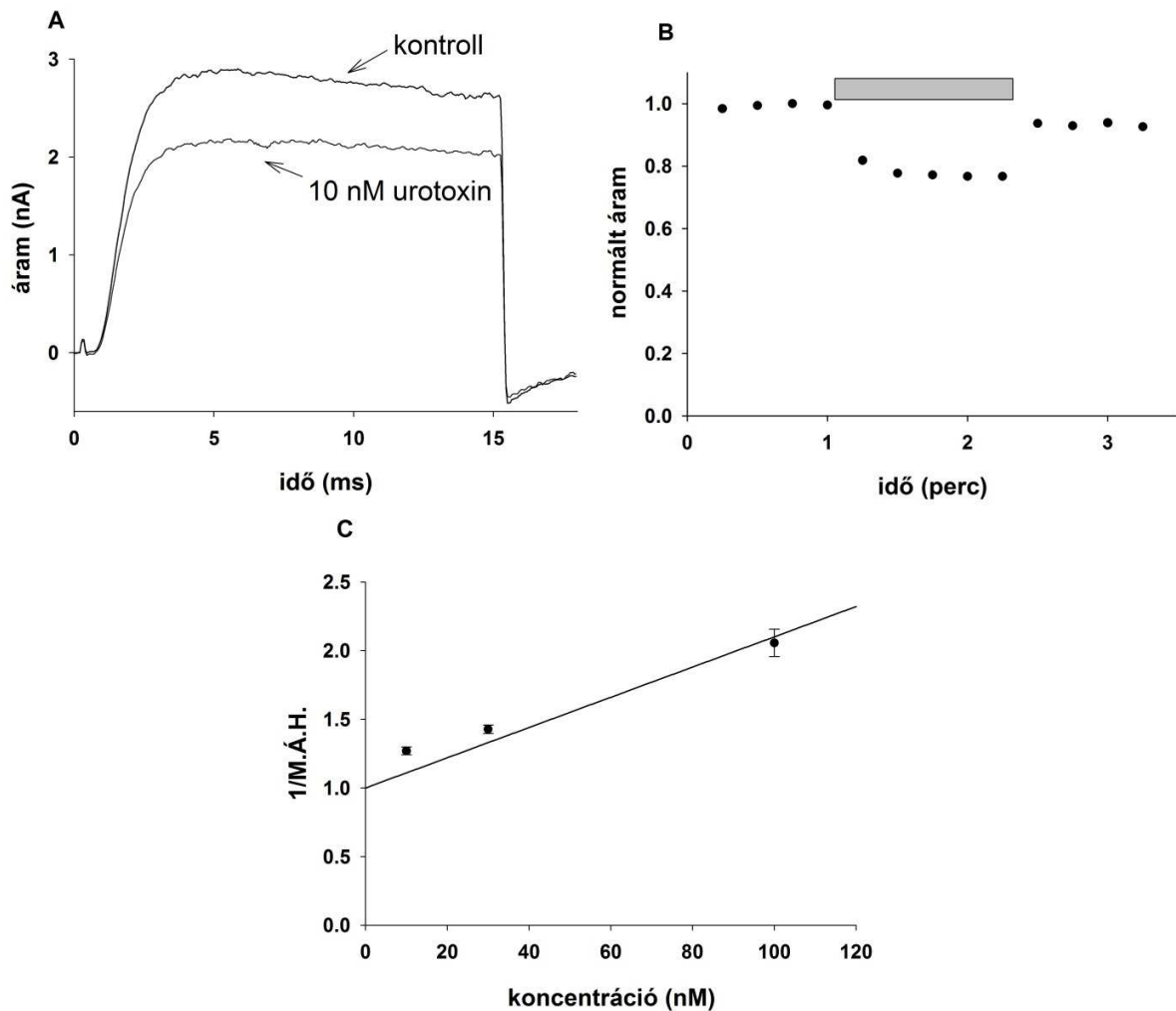
Mivel a hKv1.1 csatorna nagyfokú hasonlóságot mutat a hKv1.2 és hKv1.3 csatornákkal [149, 150], teszteltük az urotoxin hatását ezeken a csatornákon is. A toxin 10 nM koncentrációban erősen gátolta a hKv1.2 csatornát (8. ábra A). A gátlás reverzibilisnek bizonyult (8. ábra B). A különböző koncentrációkban mért adatpontokból meghatároztuk az urotoxin félhatásos dózist a hKv1.2 csatornára vonatkoztatva, mely 160,5 pM (8. ábra C).



**8. ábra** Az urotoxin nagy affinitású gátlószere a hKv1.2 csatornának.

**A** 10 nM urotoxin majdnem teljesen gátolta a tsA201 sejteken kifejezett hKv1.2 csatornát. **B** A kifejtett gátlás reverzibilis volt. 10 nM urotoxin jelenlétét az extracelluláris mérőoldatban a szürke sáv jelzi. **C** A gátlás félhatásos dózist a kétparaméteres Hill egyenlettel határoztuk meg, mely eredményeként  $IC_{50} = 160,5$  nM,  $H = 1,1$ .

Az urotoxin kisebb affinitással a hKv1.3 csatornát is gátolta (9. ábra A). A gátlás a hKv1.3 csatorna esetében is reverzibilisnek bizonyult (9. ábra B). 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 (9. ábra C), mely alapján  $IC_{50} = 90,9 \text{ nM}$ .

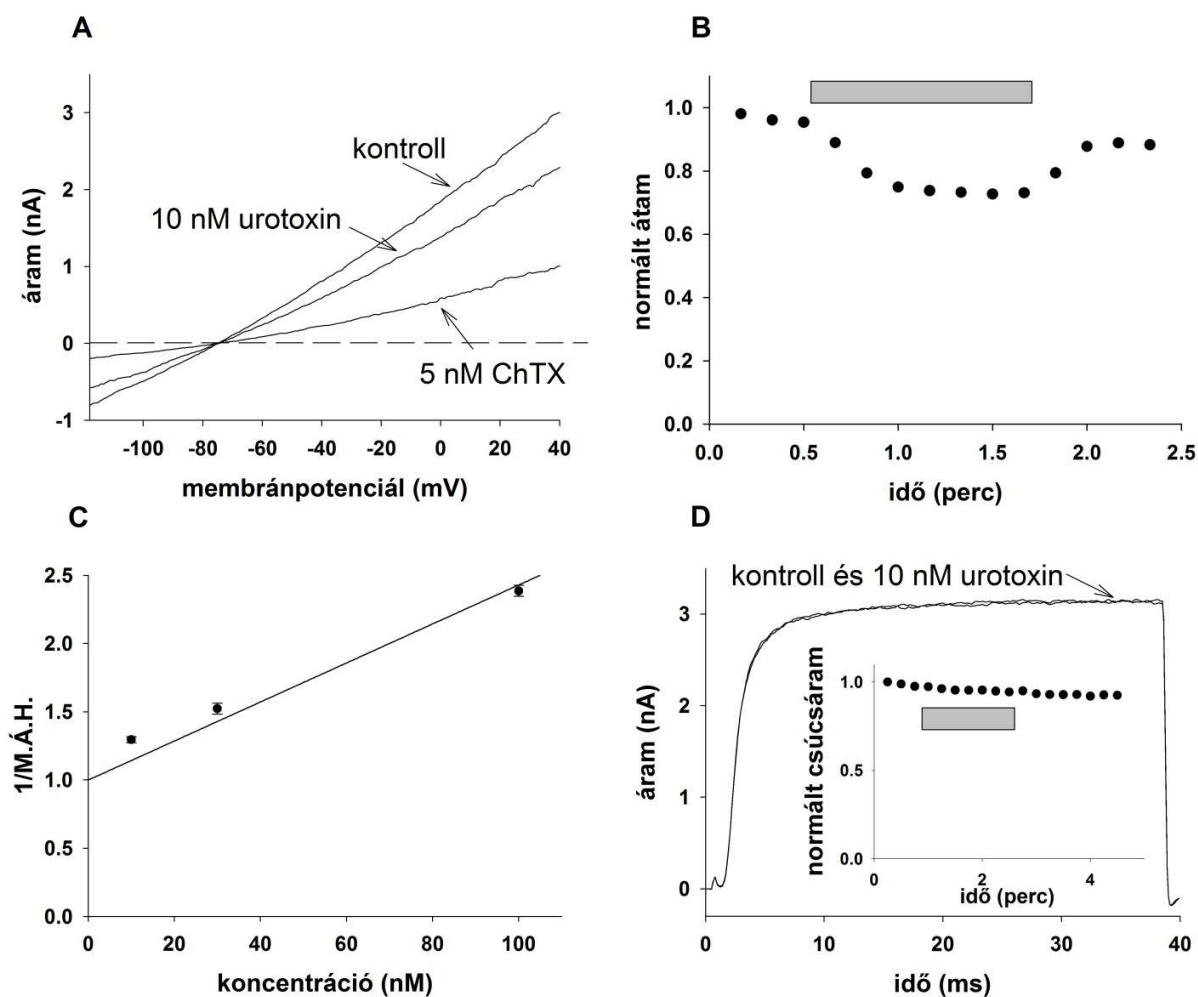


**9. ábra** Az urotoxin hatása a hKv1.3 csatornán.

**A** 10 nM urotoxin gátolta az aktivált humán perifériális limfocitákon kifejeződő hKv1.3 csatornát. **B** A kifejtett gátlás reverzibilis. 10 nM urotoxin jelenlétét az extracelluláris mérőoldatban a szürke sáv jelzi. **C** A gátlás félhatásos dózisát a Lineweaver-Burk módszerrel határoztuk meg, mely szerint  $IC_{50} = 90,9 \text{ nM}$ .

Mivel a Kv1.2 csatorna legismertebb gátlószerei, mint a maurotoxin és charybdotoxin gátolják a KCa3.1 csatornát is [95, 146, 151], ezért teszteltük az urotoxin hatását a hKCa3.1 csatornán is. A toxin 10 nM koncentrációban gátolta a HKCa3.1 csatornát (10. ábra A), mely gátlás toxin mentes külső oldattal kimosható volt (10. ábra B). 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 (10. ábra C), mely eredményeként  $IC_{50} = 69,9$  nM értéket kaptunk. A KCa3.1 csatornák mérése során pozitív kontrollként 5nM charybdotoxint (ChTx) használtunk [95].

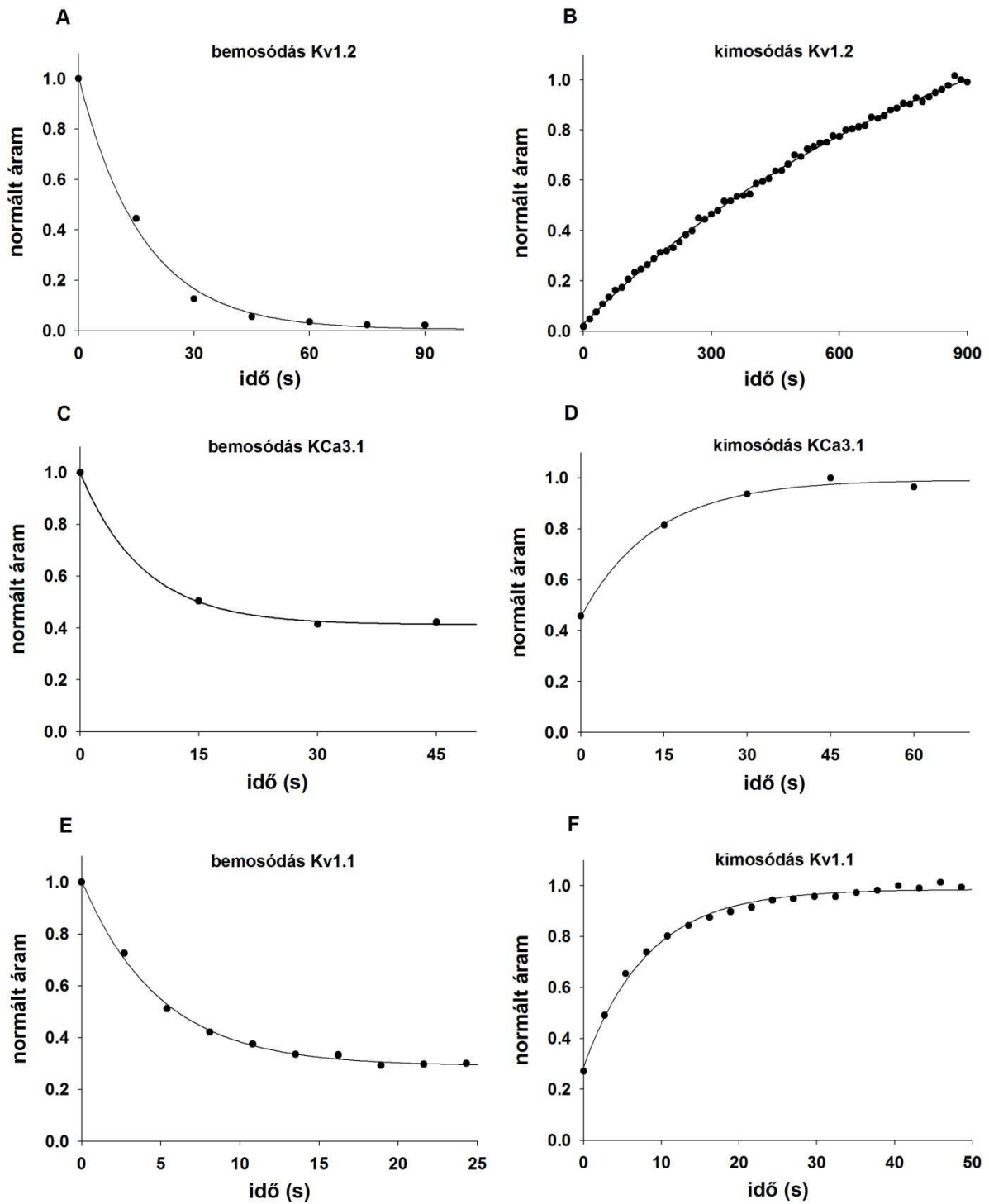
Az urotoxin hatását a hKv1.5 csatornán is vizsgáltuk, de ezen csatorna esetben 10 nM toxin nem fejtett ki gátló hatást (M.Á.H. = 1.0, S.E.M. = 0,003, N = 5) (10. ábra D).



**10. ábra** Az urotoxin hatása a hKCa3.1 és a hKv1.5 csatornákon

**A** a hKCa3.1 áramokat transzfektált tsA201 sejteken mértük, feszültség-rámpa protokollal, mely során a membránt -120 mV tartófeszültségről lineáris gradiens mentén +40 mV feszültségre depolarizáltuk 150 ms alatt. 10 nM urotoxin reverzibilisen gátolta a csatornát. A mérések során pozitív kontrollként 5nM charybdotoxint (ChTx) használtunk **B** A mért hKCa3.1 áramok amplitúdóját +40 mV membránpotenciál értéknél leolvastuk, majd normáltuk és az idő függvényében ábrázoltuk. 10 nM urotoxin jelenlétét az extracelluláris mérőoldatban a szürke sáv jelzi. **C** A gátlás koncentráció függését a Lineweaver-Burk modellel határoztuk meg, mely szerint az urotoxin félhatásos koncentrációja 69,9 nM. **D** 10 nM urotoxin nem fejtett ki gátló hatást a transzfektált tsA201 sejteken kifejeződő hKv1.5 csatornákra.

Az urotoxin csatorna gátló hatásának koncentráció függését a gátlás kinetikai paramétereinek analízisével is meghatároztuk. A toxin csatornához történő kötődésének és kimosódásának idő függése exponenciális függvények illesztésével meghatározható (11. ábra), melyből a disszociációs állandó ( $K_d$ ) számolható. A Kv1.2 csatornára kapott  $K_d = 190$  pM (11. ábra A, B), a KCa3.1 csatornán  $K_d = 109$  nM (11. ábra C, D) és a Kv1.1 csatornán  $468$  nM (11. ábra E, F). A Kv1.3 csatorna esetében a bemosódási és kimosódási kinetika olyan gyors volt, hogy a  $15$  másodpercenként alkalmazott depolarizáló impulzusokkal nem tudtuk feloldani, nagyobb mintavételezési frekvenciát pedig nem használhattunk a Kv1.3 csatorna kumulatív (use-dependent) inaktivációja miatt [146].



**11. ábra** Az urotoxin disszociációs állandójának ( $K_d$ ) meghatározása a Kv1.2 (A, B), KCa3.1 (C, D) és Kv1.1 (E, F) csatornákon.

A disszociációs állandó meghatározására az alábbi egyenletet használtuk:  $K_d = k_{off}/k_{on}$ , ahol  $k_{off} = (T_{OFF})^{-1}$ ,  $k_{on} = ((T_{ON})^{-1} - (T_{OFF})^{-1})/[Tx]$ ,  $[Tx]$  a toxinkoncentráció. A toxin csatornához történő asszociációjának az időfüggését a  $T_{ON}$  érték jellemzi. A, C, E A toxin bemosódása közben, az egyensúlyi gátlás kialakulásáig

mért csúcsáramokat normáltuk, majd az idő függvényében ábrázoltuk. A pontokra 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  $B = A(t = 0) - C$ . **B, D, F** A kimosási kinetikát hasonló módon, az egyensúlyi gátlásból történő visszatérést, azaz a toxin kimosásakor mért áram amplitúdókat 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.

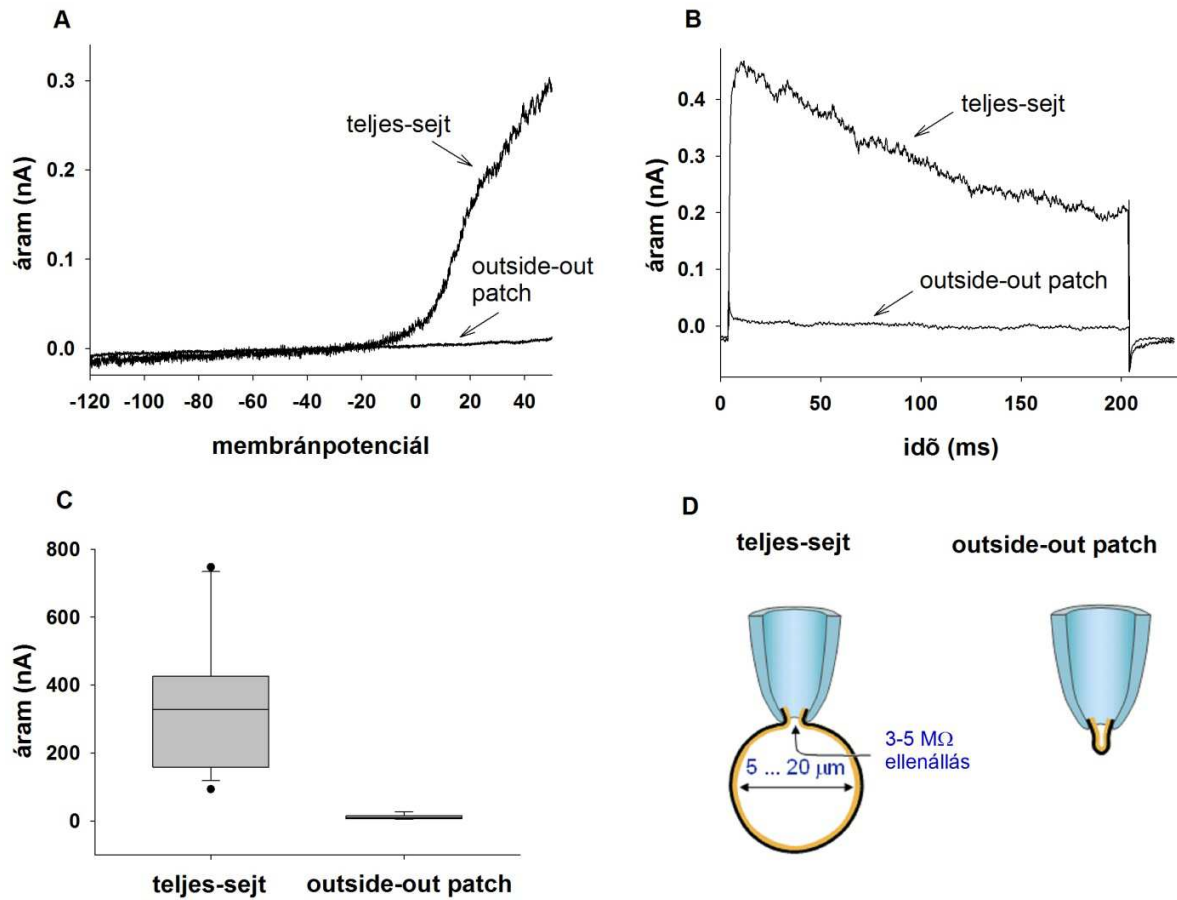
## **5.2 A margatoxin szelektivitásának vizsgálata elektrofiziológiai módszerrel**

Mivel a szakirodalomban nem található olyan közlemény, mely részletesen leírja a margatoxin  $K^+$ -csatornákra kifejtett hatását, elvégeztük a toxin karakterizálását a rendelkezésünkre álló ioncsatornákon. Ennek során a különböző ioncsatornák génjeit tsA201 sejtekben fejeztük ki. A transzfektált ioncsatornákon való mérést megelőzően teszteltük az általunk választott ioncsatorna-gén expressziós rendszer megbízhatóságát és kiválasztottuk a legoptimálisabb mérési módszert.

### **5.2.1 A tsA sejtvonal endogén áramának tesztelése**

A transzfektálatlan tsA201 sejteken teljes-sejt konfigurációban a sejtek membránját +50 mV-ra depolarizálva kifelé folyó áramot mértünk, (12. ábra) melynek sejtenkénti átlagos értéke  $337,1 \pm 48,5$  pA (N = 16) volt. Ha a teljes-sejt konfiguráció után sikeresen outside-out konfigurációra váltottunk (12. ábra D), a mért áram amplitúdó drasztikusan lecsökkent, melynek átlagos értéke  $11,6 \pm 0,8$  pA (N = 9) volt (12. ábra C). Mivel a tsA201 sejteken mért endogén áram outside-out konfigurációban nagyon alacsony mérési hibát eredményez, az ioncsatorna génekkel történő transzfekciót követően a méréseket outside-out konfigurációban végeztük.



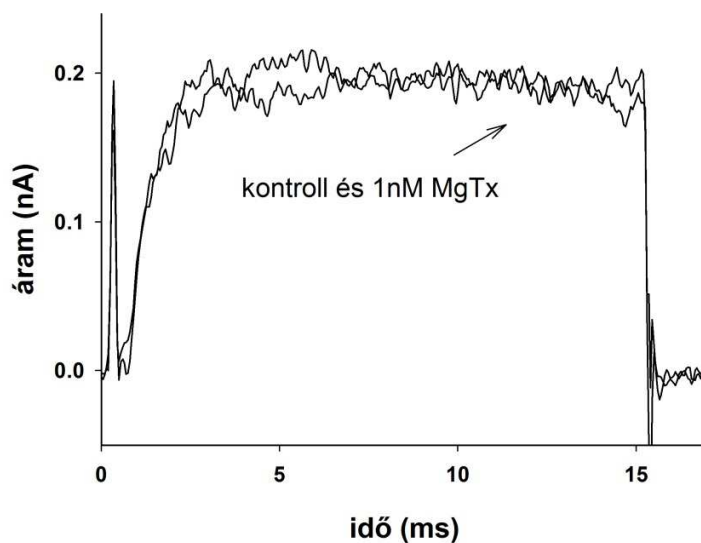


**12. ábra** Nem transzfektált tsA201 sejteken mért áramok.

A tsA201 sejteken kifelé folyó áramot mértünk +50 mV-ra történő depolarizációval feszültség-zár üzemmódban teljes-sejt, illetve outside-out patch konfigurációban. A depolarizációt vagy -120 mV-ról 150 ms alatt +50 mV-ra emelkedő feszültség rámpával (**A**), vagy 200 ms-ig tartó +50 mV-os feszültség impulzussal (**B**) váltottuk ki. **C** Box plot ábra a nem transzfektált tsA201 sejteken teljes-sejt ( $337,1 \pm 48,5$  pA,  $N = 16$ ), illetve outside-out patch ( $11,6 \pm 0,8$  pA,  $N = 9$ ) konfigurációban, +50 mV feszültségen mért csúcsáramok értékeiről. **D** Teljes-sejt és outside-out patch konfiguráció sematikus ábrája, mely a sejtmembrán és a mérőelektrodát tartalmazó pipetta kapcsolatát mutatja be (Jaakko Malmivuo & Robert Plonsey: *Bioelectromagnetism* Oxford University Press, 1995, 4.5.2 fejezet, 4.27. ábra alapján).

## 5.2.2 A margatoxin szelektivitási profiljának meghatározása

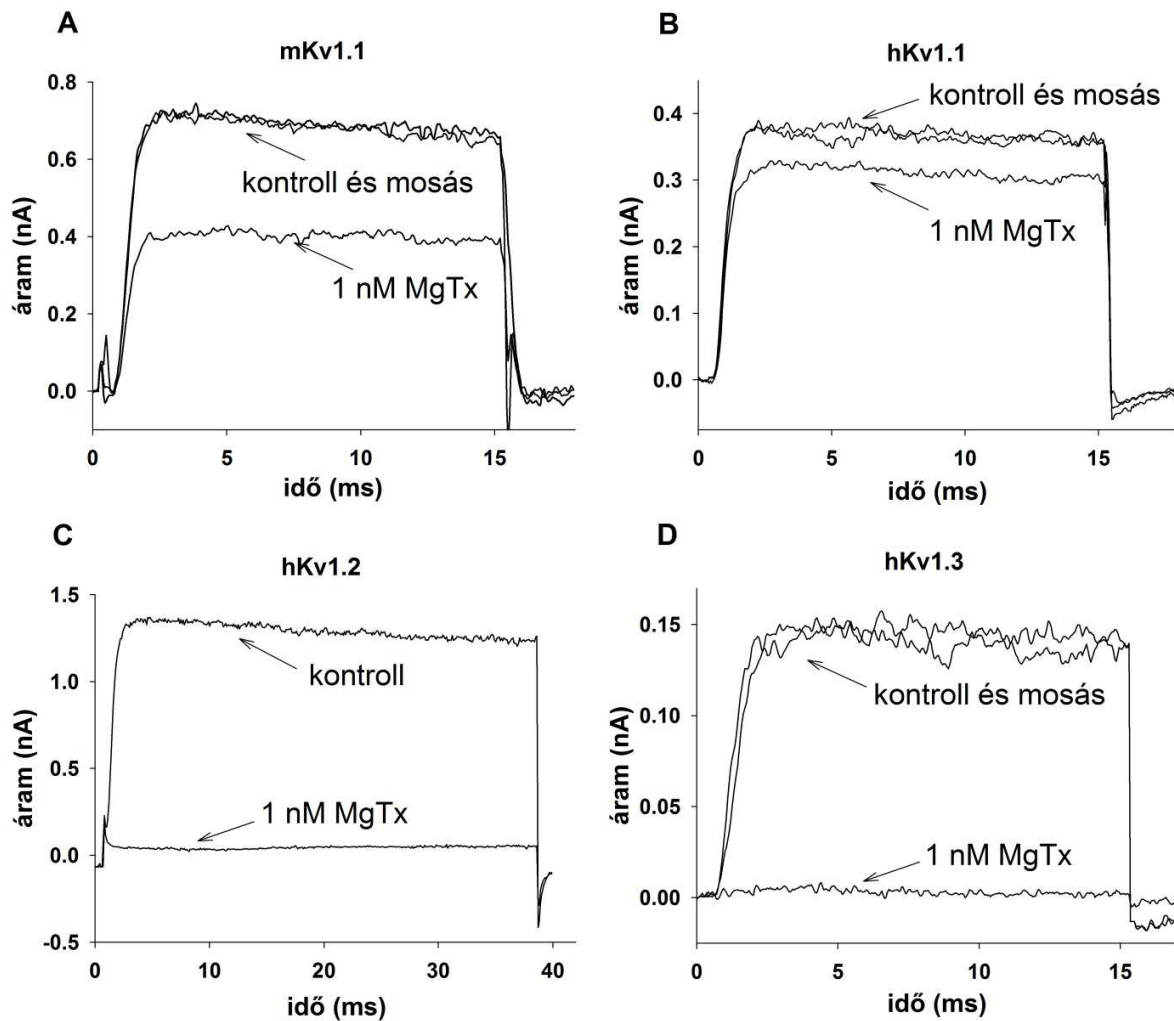
A rekombináns margatoxint (rMgTx, Alomone Labs, Izrael, Jeruzsálem) mKv1.1, hKv1.1, hKv1.2, hKv1.3, hKv1.4, hKv1.5, hKv1.6, hKv1.7, rKv2.1, Shaker-IR, hKCa1.1, hKCa3.1, hERG és hNav1.5 csatornákon mért áramokon teszteltük. Az ioncsatornákat az mKv1.1 csatorna kivételével tsA201 sejtekben fejeztük ki tranziens transzfekciót követően. Az mKv1.1 csatornákat stabilan transzfektált L929 sejteken mértük. A tsA201 sejtek esetében minden esetben outside-out konfigurációban mértünk, mivel a nem transzfektált sejteken teljes-sejt konfigurációban mérhető áram befolyásolhatja a transzfektált csatornákon történő mérések eredményeit. Bár a transzfektált tsA201 sejteken teljes-sejt konfigurációban nem mértünk, mégis teszteltük a margatoxin hatását a sejteken természetesen kifejeződő ioncsatornák áramán (13. ábra). A rMgTx nem gátolta a tsA201 sejtek teljes-sejt áramát (M.Á.H. =  $0,98 \pm 0,01$ ), így ha a további, transzfektált sejteken történő méréseink során ionáram gátlást találunk, az nem a tsA201 sejteken kifejeződő endogén ioncsatornák gátlásának tulajdonítható.



**13. ábra** A margatoxin hatása a tsA201 sejtek endogén áramára.

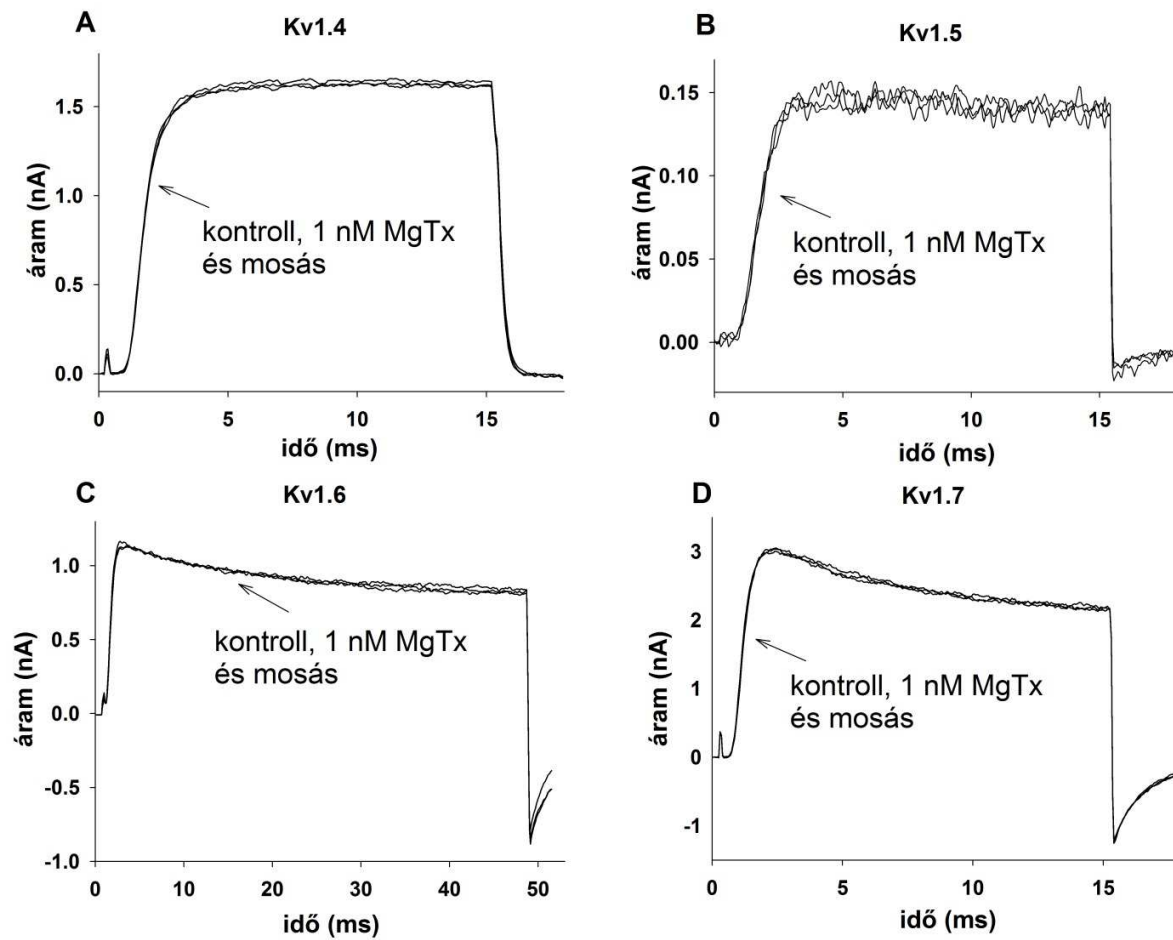
A nem transzfektált tsA201 sejteken az ionáramokat teljes-sejt konfigurációban, -100 mV tartófeszültségről +50 mV-ra történő 15 ms hosszúságú depolarizáló impulzusokkal váltottuk ki, 15 s időközönként. A margatoxint a normál extracelluláris oldatban oldottuk 1 nM koncentrációban. M.Á.H. =  $0,98$  ( $N = 10$ , S.E.M. =  $0,01$ ), mely szerint a margatoxin nem gátolta a tsA201 sejteken mért áramot.

A margatoxin hatása a tesztelt ioncsatornákon mért áramokon a 14-18. ábrákon láthatók. A toxint 1 nM koncentrációban alkalmaztuk. 1nM rMgTx gátló hatást fejtett ki az mKv1.1 (M.Á.H. = 0,63), hKv1.1 (M.Á.H. = 0,81), hKv1.2 (M.Á.H. = 0,06) és hKv1.3 (M.Á.H. = 0,05) csatornákon, míg a további vizsgált csatornákon nem láttunk gátlást (3. táblázat).



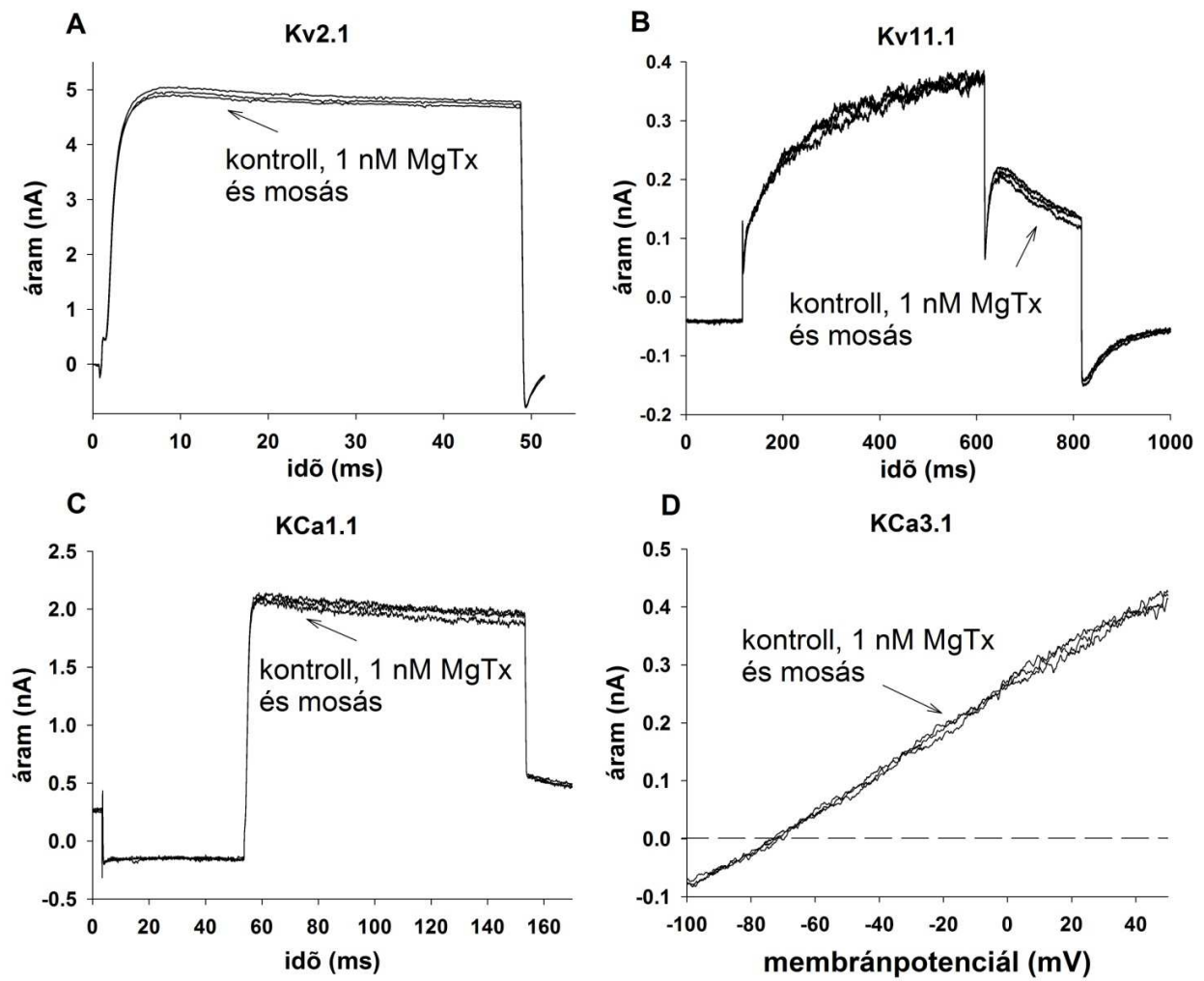
**14. ábra** 1 nM margatoxin hatása a mKv1.1, hKv1.1, hKv1.2 és hKv1.3 csatornákon.

Az mKv1.1 áramot (A) a csatorna génjével stabilan transzfektált L929 sejteken mértük, teljes-sejt konfigurációban, míg a hKv1.1 (B), hKv1.2 (C) és hKv1.3 (D) áramokat tranziensen transzfektált tsA201 sejteken mértük outside-out patch konfigurációban. A toxin 1nM koncentrációban mind a négy csatorna esetén csökkentette a mért ionáramot.

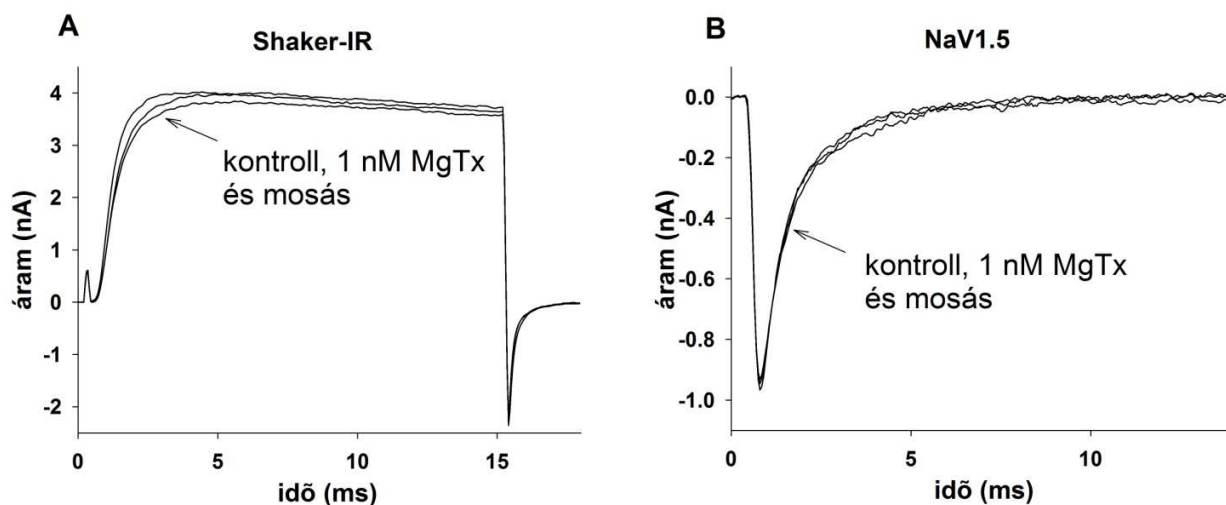


**15. ábra** 1 nM margatoxin hatása a hKv1.4, hKv1.5, hKv1.6 és hKv1.7 csatornákon.

Az áramokat tranziensen transzfektált tsA201 sejteken mértük outside-out patch konfigurációban. A toxin 1nM koncentrációban egyik csatorna esetén sem fejtett ki gátló hatást.



16. ábra 1 nM margatoxin hatása az rKv2.1, hKv11.1, hKCa1.1 és hKCa3.1 csatornákon. Az áramokat tranziensen transzfektált tsA201 sejteken mértük outside-out patch konfigurációban. A toxin 1nM koncentrációban egyik csatorna esetén sem fejtett ki gátló hatást.

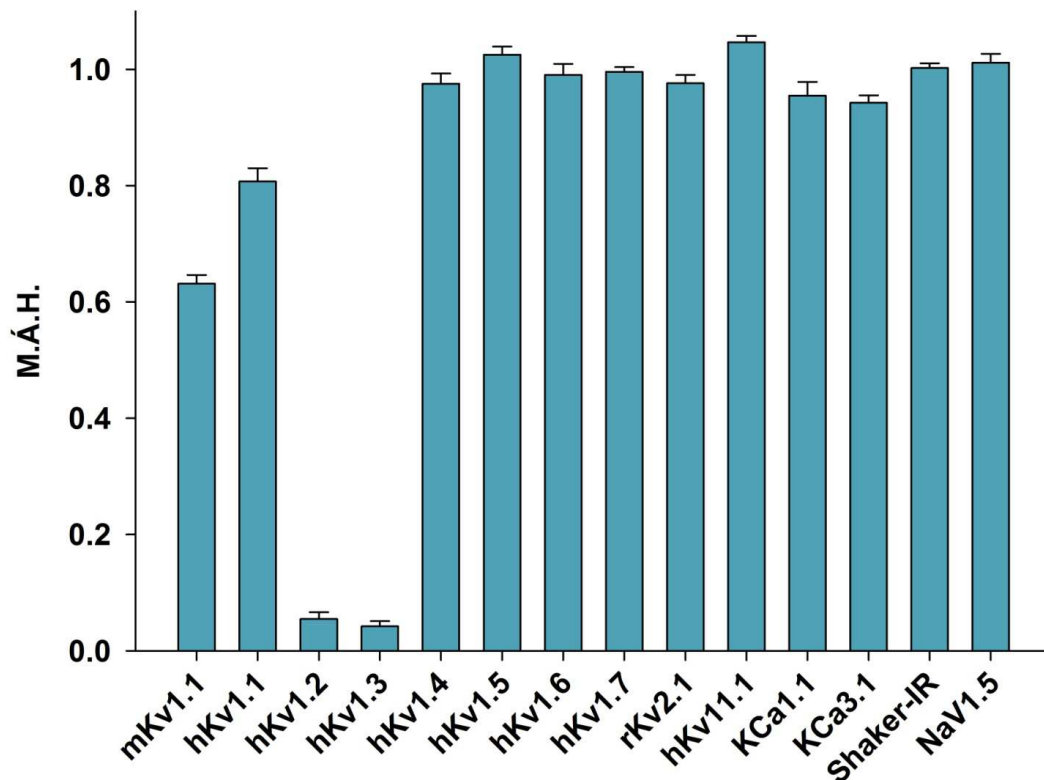


**17. ábra** 1 nM margatoxin hatása a Shaker-IR és hNaV1.5 csatornákon.

Az áramokat tranziensen transzfektált tsA201 sejteken mértük outside-out patch konfigurációban. A toxin 1nM koncentrációban egyik csatorna esetén sem fejtett ki gátló hatást.

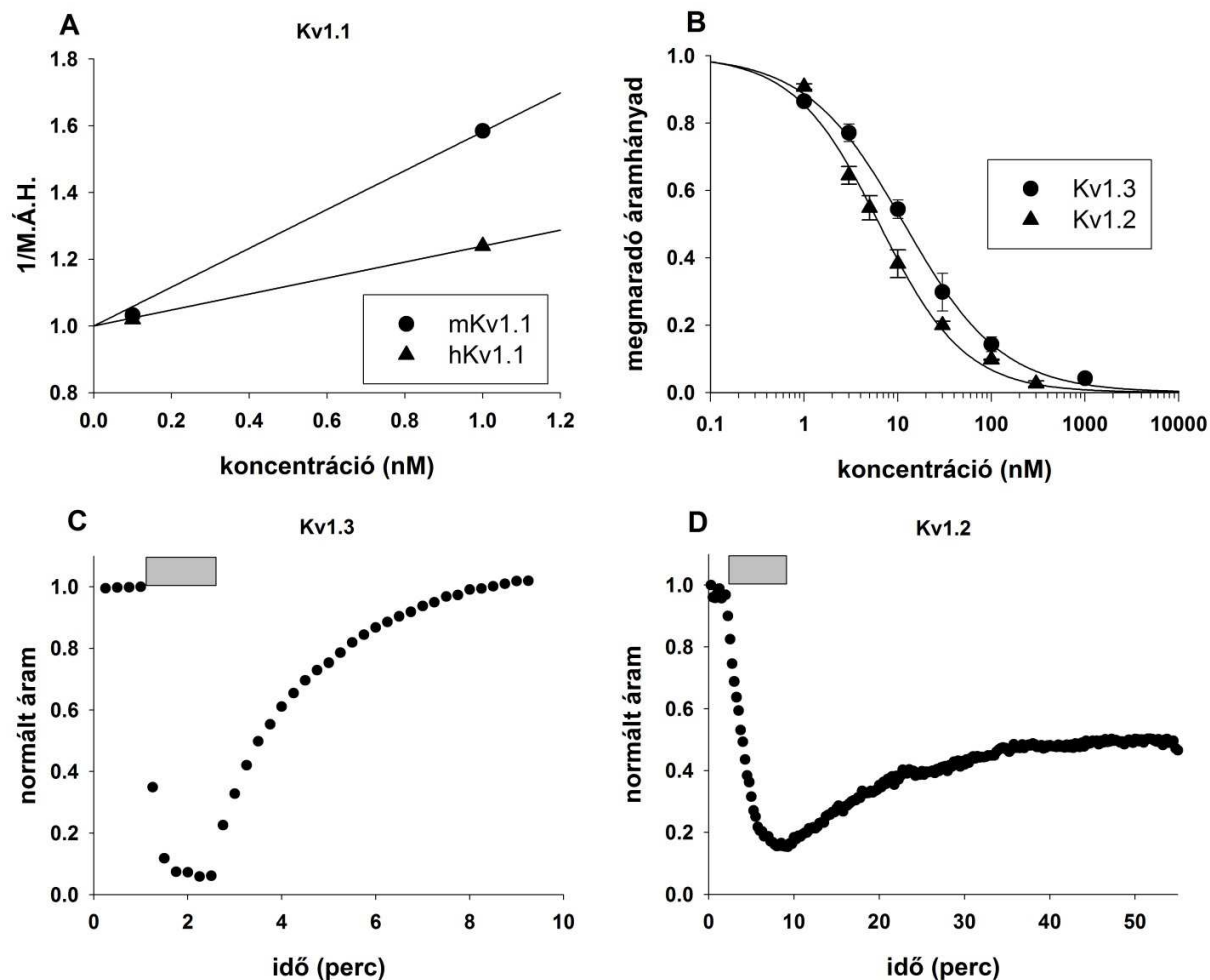
<b>1nM rMgTx</b>	<b>mKv1.1</b>	<b>hKv1.1</b>	<b>hKv1.2</b>	<b>hKv1.3</b>	<b>hKv1.4</b>	<b>hKv1.5</b>	<b>hKv1.6</b>	<b>M.Á.H.</b>
	0.63	0.81	0.06	0.05	0.98	1.03	0.99	<b>N</b>
	4	5	4	3	3	5	5	<b>S.E.M.</b>
<b>1nM rMgTx</b>	0.01	0.02	0.00	0.01	0.02	0.01	0.02	<b>S.E.M.</b>
	<b>hKv1.7</b>	<b>rKv2.1</b>	<b>hKCa1.1</b>	<b>hIKCa1</b>	<b>hKv11.1</b>	<b>Shaker-IR</b>	<b>hNaV1.5</b>	
	1.00	0.98	0.95	0.94	1.05	1.00	1.01	<b>M.Á.H.</b>
	8	5	8	4	3	4	3	<b>N</b>
	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	<b>S.E.M.</b>

**3. táblázat** 1 nM rekombináns margatoxin (rMgTx) hatása a tesztelt ioncsatornákon. A hatást a megmaradó áramhányaddal (M.Á.H.) jellemeztük, mely legalább 3 (N) független mérés eredményének átlaga. A hibát S.E.M.-ben tüntettük fel.



**18. ábra** 1 nM rekombináns margatoxin (rMgTx) hatása a tesztelt ioncsatornákon. A hatást a megmaradó áramhányaddal (M.Á.H.) jellemeztük.

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 vizsgált Kv1.1 csatornák esetében a gátlás mértéke alacsonyabb volt, mely az mKv1.1 csatornák esetében 1,7 nM, míg a hKv1.1 esetében 4,2 nM volt (19. ábra A). 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-nak, a hKv1.3 csatornán 11,7 pM-nak adódott (19. ábra B).



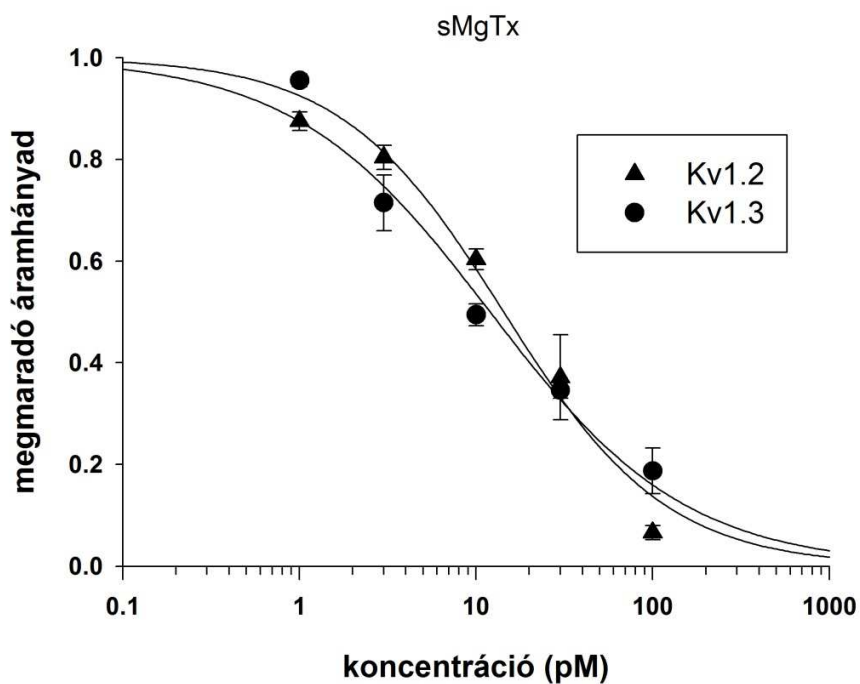
**19. ábra** A rekombináns margatoxin (rMgTx) hatása a Kv1.1, Kv1.2 és Kv1.3 csatornákon.

**A** A margatoxin alacsonyabb affinitással gátolta az mKv1.1 és hKv1.1 csatornákat. A gátlás koncentráció függését a Lineweaver-Burk módszerrel határoztuk meg. A toxin félhatásos dózisa az L929 sejteken kifejezett mKv1.1 csatornán 1,7 nM, míg a tsA201 sejteken expresszált hKv1.1 csatornán 4,2 nM. **B** A margatoxin (rMgTx) nagy affinitással gátolta a tsA201 sejteken kifejezett hKv1.2 és hKv1.3 csatornákat. A félhatásos koncentrációt a kétparaméteres Hill-egyenlettel számoltuk. A toxin félhatásos dózisa a hKv1.2 csatornán 6,4 pM ( $H = 1,0$ ), a hKv1.3 csatornán 11,7 pM ( $H = 0,8$ ). A margatoxin reverzibilisen gátolta a hKv1.3 csatornát (**C**), míg a hKv1.2 csatorna esetében a toxin kimosódása csak részleges volt (**D**). A szürke sáv 100 pM rMgTx extracelluláris alkalmazását jelöli (**C**, **D**)



Azt, hogy a margatoxin a Kv1.3 csatorna mellett nagy affinitású gátlószere a Kv1.2 csatornának is, teszteltük egy másik forrásból származó, szintetikus margatoxin alkalmazásával (sMgTx Peptide Institute Inc. Osaka, Japán) is.

A szintetikus margatoxin (sMgTx) szintén nagy affinitással gátolta a Kv1.2 és a Kv1.3 csatornákat. A gátlás félhatásos koncentrációja hKv1.2 esetében 14,3, a hKv1.3 esetében pedig 12,0 pM (20. ábra).

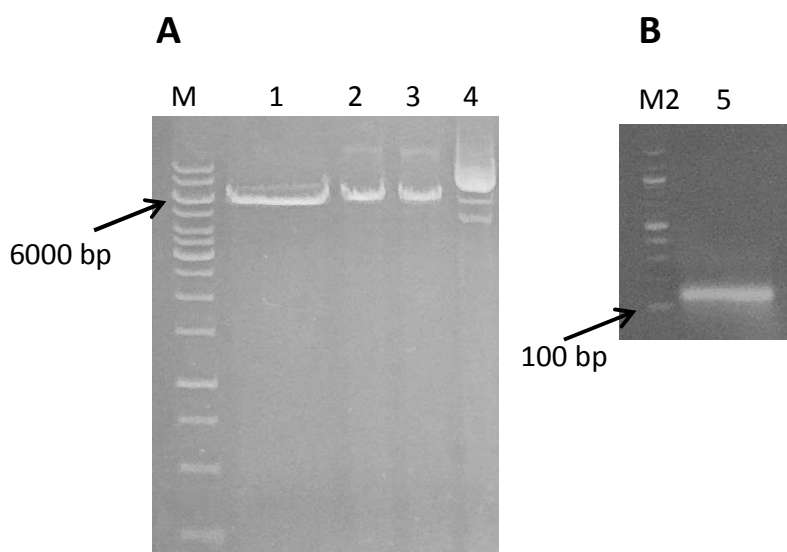


**20. ábra** A szintetikus margatoxin (sMgTx) hatása a Kv1.2 és Kv1.3 csatornákon.

A szintetikus margatoxin (sMgTx) nagy affinitással gátolta a tsA201 sejteken kifejezett hKv1.2 és hKv1.3 csatornákat. A félhatásos koncentrációt a kétparaméteres Hill-egyenlettel számoltuk. A toxin félhatásos dózisa a hKv1.2 csatornán 14,3 pM ( $H = 1,0$ ), a hKv1.3 csatornán 12,0 pM ( $H = 0,8$ ).

### 5.3 Az anuroctoxin rekombináns szintézise

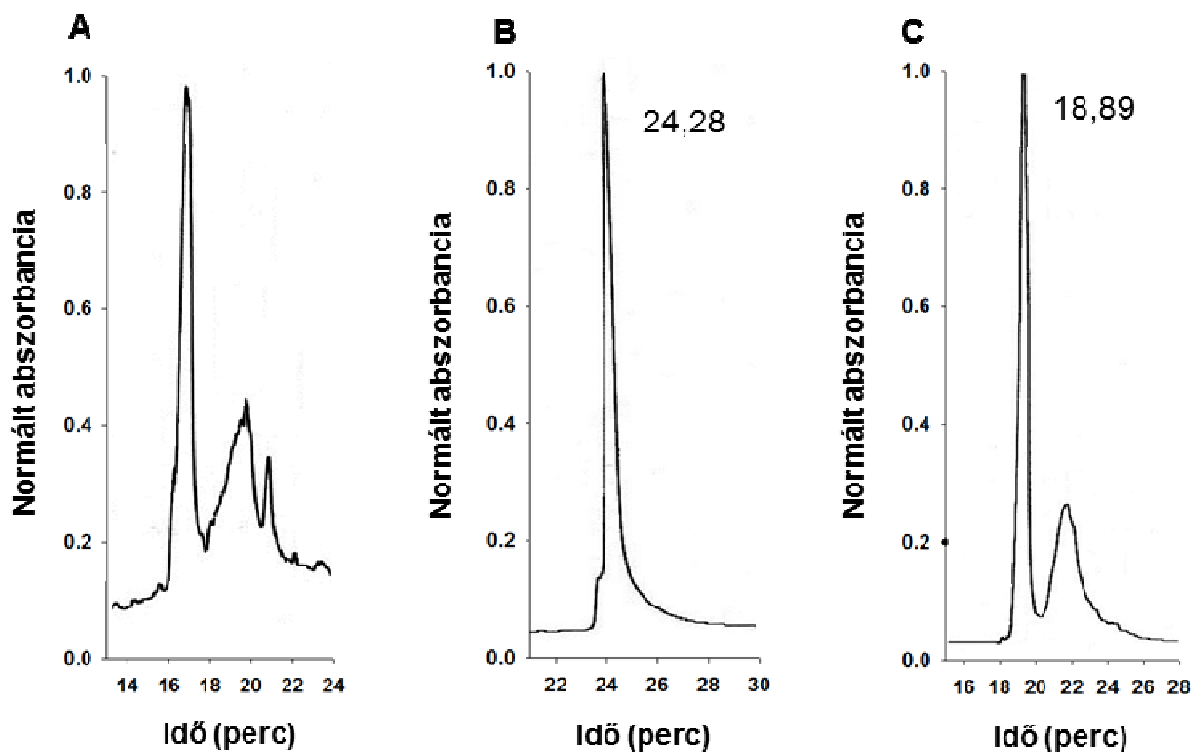
Az anuroctoxin gén klónozása az anyag és módszerek c. fejezetben került ismertetésre. A DNS szakaszok restrikciós enzimekkel történő hasítását gélelektroforézissel ellenőriztük (21. ábra). Az emésztett termékeket a gélből visszanyertük, majd T4 enzimmel történő ligálást követően *E. coli* sejtekbe transzformáltuk.



**21. ábra A pPAL7 vektor és az AnTx inzert emésztése *EcoRI* és *HindIII* restrikciós endonukleázzal.**  
**A,** M: molekula súly marker (Fermentas GeneRuler 1kb DNA Ladder), 1: pPAL7 vektor emésztése *EcoRI* és *HindIII* enzimekkel, 2: pPAL7 vektor emésztése *EcoRI* enzimmal, 3: pPAL7 vektor emésztése *HindIII* enzimmal, 4: cirkuláris pPAL7 vektor.  
**B,** M2: molekula súly marker (Fermentas GeneRuler 100bp DNA Ladder), 5: AnTx inzert emésztése *EcoRI* és *HindIII* enzimekkel.

A vad típusú anuroctoxint *E. coli* sejtekben expresszáva, fúziós fehérje formában állítottuk elő. A sejtek mechanikai feltárását követően a fúziós fehérjét affinitás kromatográfiával tisztítottuk, melynek során a fúziós partnert eltávolítottuk, így a toxin nagy koncentrációjú oldatához jutottunk. A toxin megfelelő térszerkezetét, azaz a diszulfid hidak megfelelő párokba állítását a minta redukálását követő oxidálásával végeztük (refolding). A megfelelő szerkezetet felvett molekulákat szemipreparatív HPLC technikával tisztítottuk. A 22. ábrán látható a rekombináns anuroctoxin HPLC spektruma a peptid affinitás kromatográfiás szintézisét (22. ábra A), majd

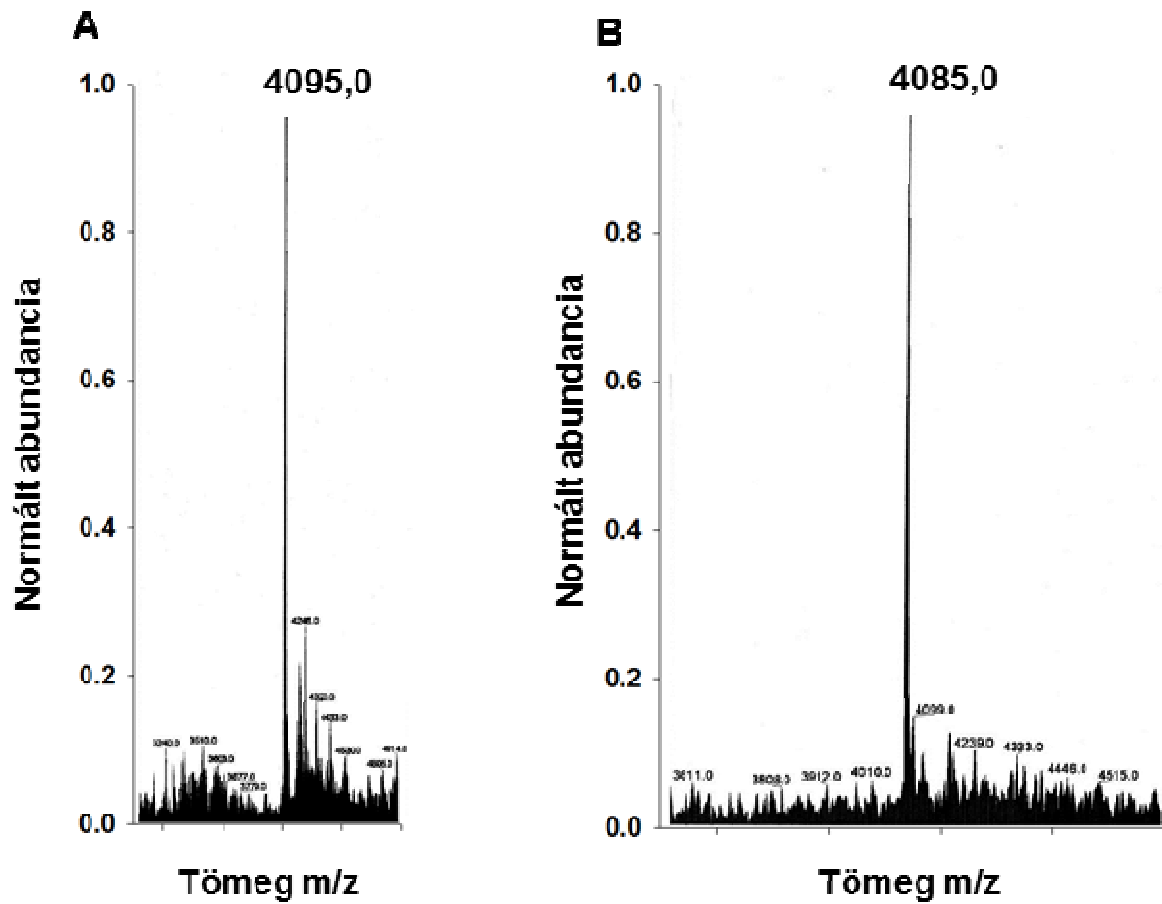
redukálását (22. ábra **B**), végül oxidálását (22. ábra **C**) követően. Az affinitás kromatográfiás módszerrel tisztított peptid HPLC spektrumán látható, hogy a minta több komponensből áll, melyek retenciós ideje 16 és 24 perc közötti (22. ábra **A**). A csúcsokhoz tartozó komponenseket egybe gyűjtöttük, majd redukáltuk (0,1 M DTT). A redukált mintát újra futtatva egy jellemző csúcsot kaptunk, melynek a retenciós ideje 24,28 perc volt (22. ábra **A**), molekulatömege 4095,0 (23. ábra **A**). A csúcshoz tartozó izolált terméket oxidáltuk (GSH:GSSG 10:1), majd újra futtattuk, mely eredményeként a fő komponens retenciós ideje 18,89 volt (22. ábra **C**), molekulatömege pedig 4085,0 (22. ábra **B**). Ezt a fő komponenszt izoláltuk és liofilizáltuk, majd a továbbiakban rekombináns anuroctoxinnak (rAnTx) neveztük.



**22. ábra** Az anuroctoxin különböző konformációinak analitikai vizsgálata, illetve elválasztása HPLC módszerrel.

Az elválasztást C18 fordított fázisú oszlopon végeztük, víz-TFA/acetonitril gradienssel, 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. A fő mintakomponenseket retenciós idejükkel jellemeztük.

**A**, Affinitás kromatográfiás tisztítás után kapott, különböző oxidáltsági állapotú AnTx formák. **B**, Az „A” képen látható minta redukált állapotban. **C**, A „B” képen látható minta oxidált állapotban.



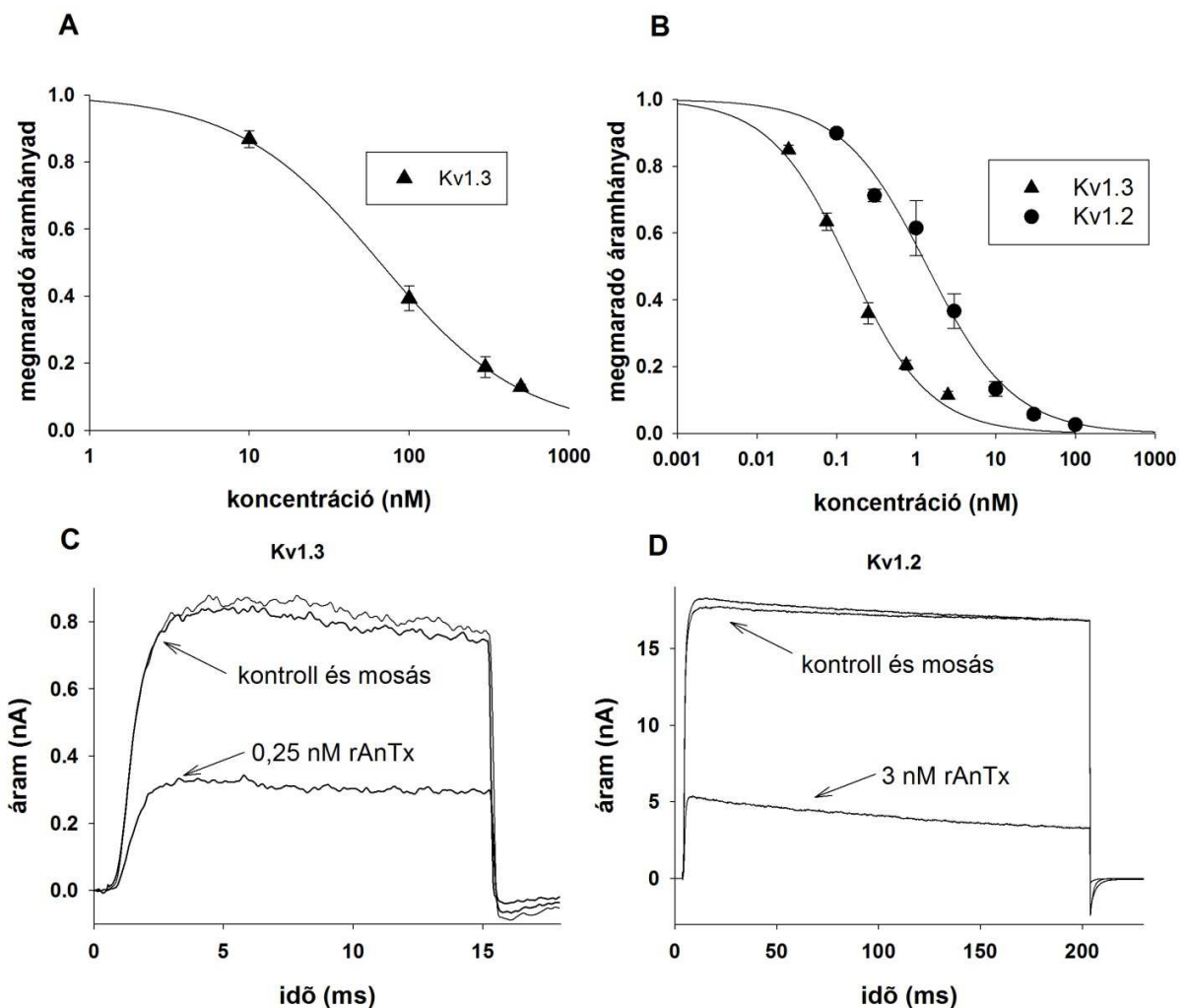
23. ábra A HPLC módszerrel elválasztott redukált (A) és oxidált (B) rekombináns anuroctoxin frakciók tömegspektrometriás vizsgálata. A redukált minta molekulatömege 4095,0, míg az oxidált mintáé 4085,0.

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

A rekombináns anuroctoxin (rAnTx) hatását a hKv1.3 csatornát természetesen expresszáló, egészséges donoroktól vett, humán, perifériális limfocitákon, illetve a hKv1.2 csatorna génjével transzfektált CHO sejteken mértük. A mérések során patch-clamp technikát alkalmaztunk, feszültség-zár üzemmódban, teljes-sejt konfigurációban.

Ahhoz, hogy a megfelelő térszerkezet biológiai aktivitásban betöltött szerepét vizsgáljuk, az affinitás kromatográfiát követően a toxin redukciója és oxidációja nélkül is meghatároztuk a minta aktivitását (24. ábra **A**). A nem megfelelően oxidált, több retenciós idejű komponensből álló minta  $IC_{50} = 65,9$  nM félhatásos koncentrációval gátolta a Kv1.3 csatornát.

A rekombináns anuroctoxin (újraoxidált, rAnTx) hatását a Kv1.3 és Kv1.2 csatornákon mértük (24. ábra **C**, **D**). A félhatásos dózis a Kv1.3 esetében 0,2 nM-nak, a Kv1.2 esetében 1,4 nM-nak ( $H = 0,8$ ) adódott.



**24. ábra** A rekombináns anurotoxin (rAnTx) hatása a Kv1.3 és Kv1.2 csatornákon.

**A**, A rekombináns anurotoxin toxin redukálása és oxidálása nélkül  $IC_{50} = 65,9$  nM ( $H = 1,0$ ) félhatásos koncentrációval gátolta a Kv1.3 csatornát. **B**, A rekombináns anurotoxin reduktációt és oxidációt követően (rAnTx) a hKv1.3 csatornát  $IC_{50} = 0,2$  nM ( $H = 0,9$ ), a hKv1.2 csatornát  $IC_{50} = 1,4$  nM ( $H = 0,8$ ) félhatásos koncentrációval gátolta. A gátlás koncentráció függését a hKv1.3 és hKv1.2 csatornákon a kétparaméteres Hill-egyenlettel határoztuk meg (**A**, **B**).

**C** A toxinok hatását hKv1.3 csatornán, a csatornát expresszáló, egészséges donorokból vett, aktivált humán perifériás T-limfocitákon mértük. A toxin reverzibilisen gátolta a hKv1.3 csatornát. **D** A hKv1.2 csatornát transzfektált CHO sejtekben expresszáltuk. A toxin reverzibilisen gátolta a hKv1.2 csatornát.

## **5.4 Anuroctoxin és annak mutáns változatainak előállításával szilárd fázisú kémiai szintézissel**

### **5.4.1 Az anuroctoxin szelektivitását javító mutációk tervezése**

A mutációk megtervezéséhez több, ismert szelektivitású Kv1.2 és Kv1.3 csatorna gátlószer lineáris aminosav szekvenciáit hasonlítottuk össze (4. táblázat). Az összehasonlítás alapjaként olyan toxinokat választottunk, melyek 3 csoportba sorolhatók: 1: Kv1.2 szelektív toxinok (Maurotoxin [152], Cobatoxin-1 [128], Pi4 [153]), 2: Kv1.2 és Kv1.3 csatornát hasonló affinitással gátló toxinok (Pi1 [154], Csx20 [29], Noxiustoxin [146], Hongotoxin-1 [136], Charybdotoxin [146], Anuroctoxin [30]), 3: Kv1.3 szelektív toxinok (OSK1 [145], OSK-12,16,20 [145], OSK-16,20,36 [145], Kaliotoxin-1 [155]). szekvenciákban megfigyelt jellegzetes mintázatok alapján. a következő mutációkat terveztük meg: N17A (a természetes anuroctoxinban 17. pozícióban lévő aszparagint alaninra cseréltük), F32T (a természetes anuroctoxinban 17. pozícióban lévő fenilalanint treoninra cseréltük), 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.

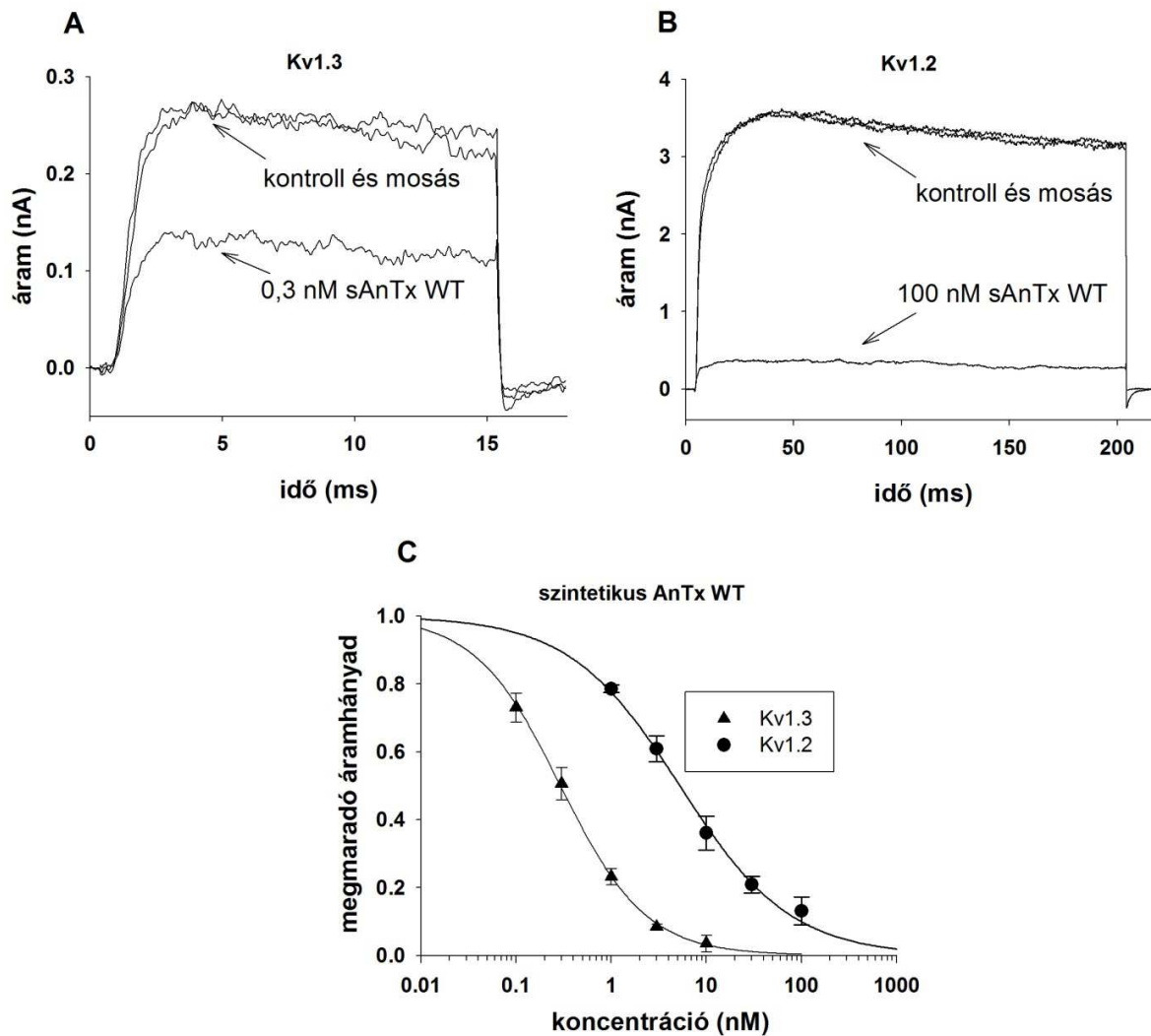
toxin	szekvencia	IC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>
		Kv1.2 / IC <sub>50</sub> Kv1.3	Kv1.2 (nM)	Kv1.3 (nM)
Maurotoxin	-----VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNA-KCINKSCKCYGC-	0,004	0,8	180
Cobatoxin-1	-----AVCVYRT-CDKDCKRR-GYRSG-KCINNACKCYPY-	0,005	27	5300
Pi4	--IEAIRCGGSRDCYRPCQKRTGCPNA-KCINKTCKCYGCS	<8e-7	0,008	>10000
Pi1	----LVKCRGTSDCGRPCQQQTGCPNS-KCINRMCKCYGC-	0,09	1	11
Css20	-IFINVKCSSPQQCLKPCKAAFGISAGGKCINGKCKCYP--	0,2	1,5	7,2
Noxiustoxin	-TIINVKCTSPKQCSKPKCKELYGSSAGAKCMNGKCKCYNN-	2	2	1
Hongotoxin-1	-TVIDVKCTSPKQCLPPCKAQFGIRAGAKCMNGKCKCYPH-	1,9	0,17	0,09
Charybdotoxin	-EFTNVSCTTSKECWSVCQRLHNTSRG-KCMNKKCRCY--	5,4	14	2,6
Anuroctoxin	----ZKECTGPQHCTNFCRKN-KCTHG-KCMNRKCKCFNCK	9	6	0,7
OSK1	GVIINVKCKISRQCLEPCKKA-GMRFG-KCMNGKCHCTPK-	386	5,4	0,014
OSK1-12,16,20	GVIINVKCKISPQCLKPCKDA-GMRFG-KCMNGKCHCTPK-	3322	196	0,059
OSK1-16,20,36	GVIINVKCKISRQCLKPCKDA-GMRFG-KCMNGKCHCYPK-	1901	232	0,122
HsTx1	-----ASCRTPKDCADPCKRETGCPYG-KCMNRKCKCNRC-	>45000	>500	0,011
Kaliotoxin-1	GVEINVKCSGSPQCLKPCKDA-GMRFG-KCMNRKCHCTPK-	>1538	>1000	0,65

**4. táblázat** Ismert szelektív toxinnal aminosav szekvenciájának összehasonlítása, illetve az egyes toxinnal koncentráció függő hatása a Kv1.2 és Kv1.3 csatornákon. A toxinnal szelektívását a Kv1.2 és Kv1.3 csatornákon mért disszociációs állandók hányadosa jellemzi. Adott csatorna iránti szelektívás kritériuma a legalább 100-szoros affinitásbeli különbség [156]. A mutációk helyzetét a piros keretek jelölik.

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

A szintetikus toxinnal farmakológiai tulajdonságait a Kv1.2 és Kv1.3 csatornákon az 5.3.1 fejezetben alkalmazott elektrofiziológiai mérésekkel megegyezően végeztük. A szintetikus vad típusú anuroctoxin a Kv1.2 csatornát 5,2 nM, a Kv1.3 csatornát pedig 0,3 nM félhatásos koncentrációban gátolta (25. ábra C). 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 [30].





**25. ábra** A szilárd fázisú kémiai szintézissel előállított vad típusú anuroctoxin (sAnTx WT) hatása a Kv1.2 és Kv1.3 csatornákon.

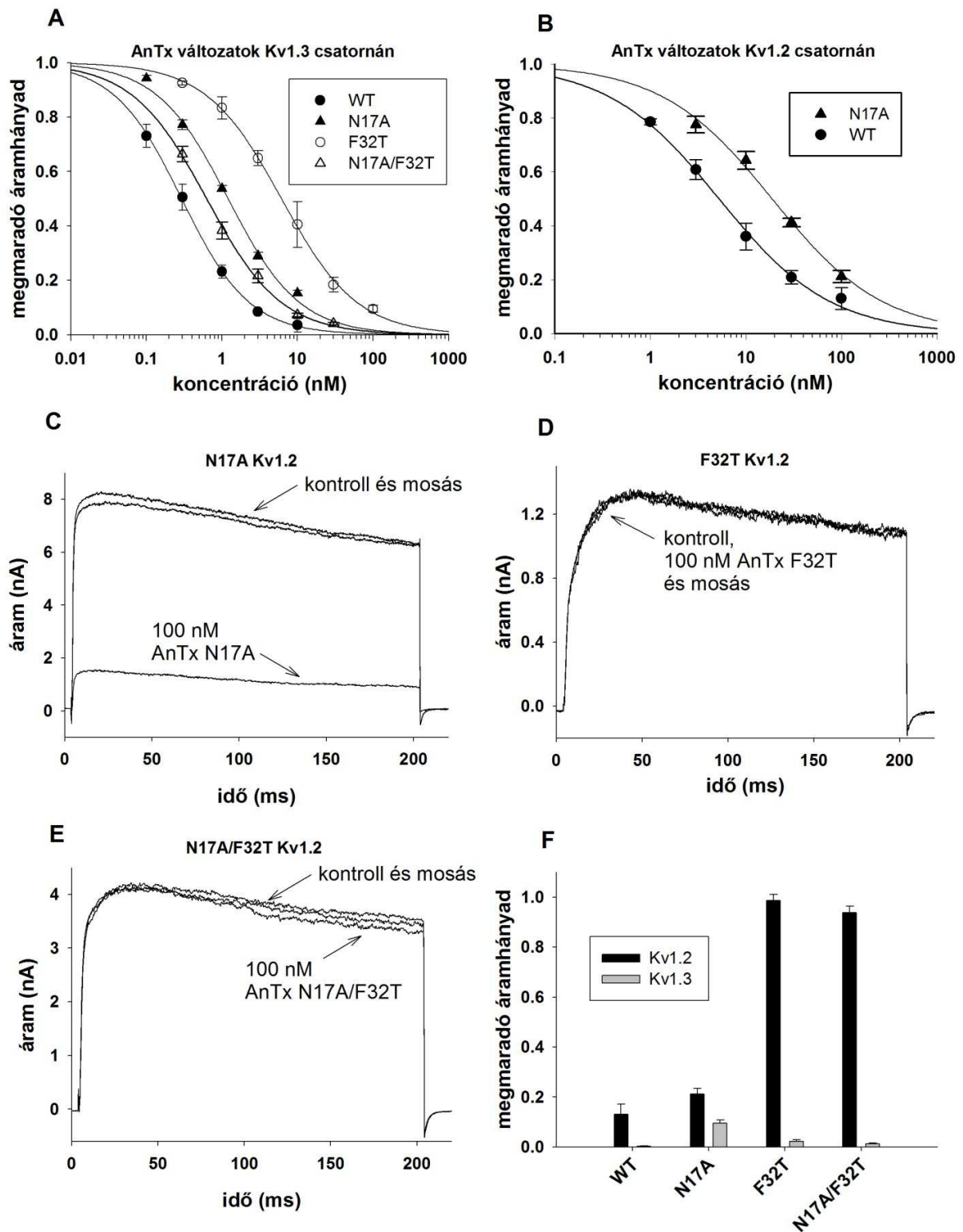
**A** A toxin hatását hKv1.3 csatornán, a csatornát expresszáló, egészséges donorokból vett, aktivált humán perifériás T-limfocitákon mértük. A toxin reverzibilisen gátolta a hKv1.3 csatornát. **B** A hKv1.2 csatornát transzfektált CHO sejtekben expresszáltuk. A toxin reverzibilisen gátolta a hKv1.2 csatornát. **C** A gátlás koncentráció függését a hKv1.3 és hKv1.2 csatornákon a kétparaméteres Hill-egyenlettel határoztuk meg. A szintetikus anuroctoxin (sAnTx WT) félhatásos koncentrációja a hKv1.3 csatorna esetében 0,3 nM ( $H = 1,0$ ), a hKv1.2 esetében 5,2 nM ( $H = 0,8$ ).

A 32. pozícióban található fenilalanin treoninnal történő helyettesítése (F32T) a toxin Kv1.3 csatornához történő affinitását csökkentette, a mért félhatásos koncentráció 6,2 nM (26. ábra A). Ezzel szemben a Kv1.2 csatornán 100nM koncentrációban sem fejtett ki gátló hatást (M.Á.H = 0,99) (26. ábra D).

A 17. pozícióban lévő aszparagin alaninra történő módosítása (N17A) mind a Kv1.2 ( $IC_{50} = 20,0$  nM,  $H = 0,8$ ) és Kv1.3 ( $IC_{50} = 1,2$  nM,  $H = 0,9$ ) csatorna esetén csökkent affinitást eredményezett, a szelektivitásra nem volt hatással (26. ábra A, B).

A dupla mutáns anuroctoxin, mely mindkét mutációt együttesen tartalmazza (N17A/F32T)  $IC_{50} = 0,6$  nM félhatásos koncentrációval gátolta a Kv1.3 csatornát (26. ábra A), mely mind a természetes és a szintetikus vad típusú toxin hatásával megegyezik. Az N17A/F32T mutáns toxin nem fejtett ki gátló hatást a Kv1.2 csatornára (M.Á.H. = 0,94) (26. ábra E).

Az eredményeket összesítve az **5. Táblázatban** tüntettem fel.



**26. ábra** A szintetikus anuroctoxin változatok hatása a Kv1.2 és Kv1.3 csatornákon. A Kv1.2 és Kv1.3 csatornán átfolyó áramokat az anyag és módszerek c. fejezetben ismertetett módon mértük. A toxinok adott koncentrációban mért hatását a megmaradó áramhányad értékkel jellemeztük. A

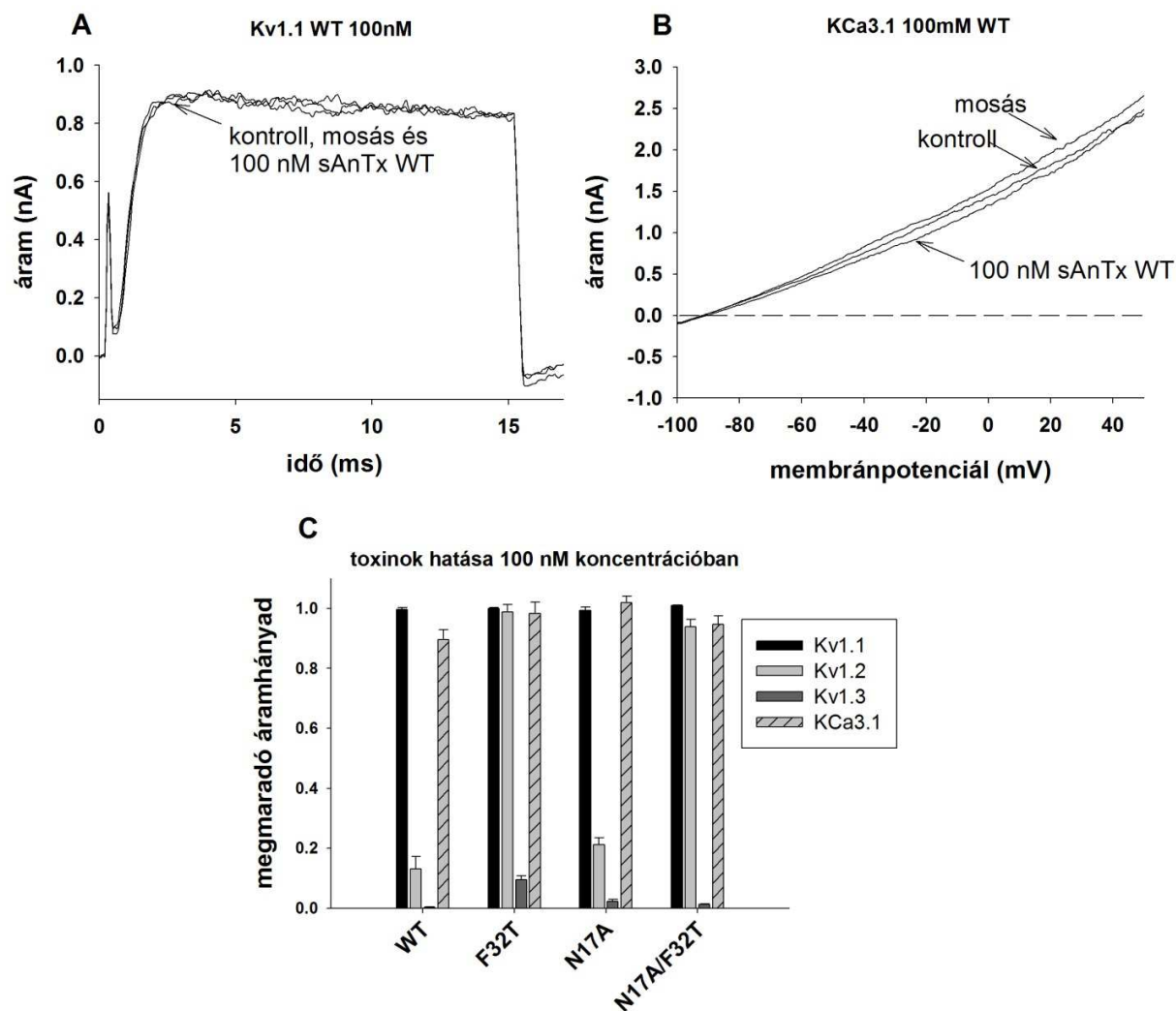
A Kv1.3 csatornát az N17A mutáns  $IC_{50} = 1,2$  nM ( $H = 0,9$ ), az F32T mutáns  $IC_{50} = 6,2$  nM ( $H = 1,0$ ), az N17A/F32T dupla mutáns pedig  $IC_{50} = 0,6$  nM ( $H = 0,9$ ) félhatásos koncentrációval gátolta. **B** Az N17A mutáns  $IC_{50} = 20,0$  nM ( $H = 0,8$ ) félhatásos koncentrációval gátolta a Kv1.2 csatornát. **C** Az N17A mutáns reverzibilisen gátolta a Kv1.2 csatornát. **D, E** Az F32T (**D**) és N17A/F32T (**E**) mutánsok nem fejtettek ki gátló hatást 100 nM koncentrációban a Kv1.2 csatornára. **F** A toxinok 100 nM koncentrációban kifejtett gátló hatását a megmaradó áramhánnyal jellemeztük. Az értékek 3-5 független mérés eredményének átlagai, ahol a hibát S.E.M.-ben tüntettük fel.

anuroctoxin	$IC_{50}$ Kv1.3 (nM)	$IC_{50}$ Kv1.2 (nM)	$IC_{50}Kv1.2/ IC_{50}Kv1.3$
természetes vad típus	0,7	6,1	8,7
szintetikus vad típus	0,3	5,2	17,3
F32T	6,2	hatástalan 100 nM koncentrációban	-
N17A	1,2	20,0	16,7
N17A/F32T	0,6	hatástalan 100 nM koncentrációban	-

**5. táblázat** A vad típusú és mutáns szintetikus anuroctoxin változatok félhatásos koncentrációi ( $IC_{50}$ ) a Kv1.3 és Kv1.2 csatornákon. A Kv1.3 csatorna iránti szelektivitás mértékét a Kv1.2 és Kv1.3 csatornákon mért félhatásos koncentrációk arányával jellemezzük

#### 5.4.3 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 csatornához történő affinitását, a mutáns toxinokat leteszteltük a Kv1.1 és KCa3.1 csatornákon is (27. ábra). 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 (27. ábra C).



27. ábra. Az anuroctoxin változatainak szelektivitási profilja

Az mKv1.1 csatornák áramait egér Kv1.1 csatornával stabilan transzfektált L929 sejteken mértük (A), míg az KCa3.1 csatornákat CHO sejtekben expresszáltuk Lipofectamine reagenssel végzett transzfekciót követően (B).

A mérések közben  $\text{Na}^+$  alapú külső oldatot, és  $\text{K}^+$  alapú belső oldatot használtunk. A  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált csatorna (KCa3.1) méréséhez használt belső oldat magas szabad kalciumkoncentrációval rendelkezett. C A toxinok 100 nM koncentrációban kifejtett gátló hatását a megmaradó áramhányaddal jellemeztük. Az értékek 3-5 független mérés eredményének átlagai, ahol a hibát S.E.M.-ben tüntettük fel.

## 6 Eredmények megbeszélése

### 6.1 Újonnan izolált skorpiótoxinok farmakológiai karakterizálása

Az OcyKTx2 izolálásával és karakterizálásával egy új, még eddig nem vizsgált skorpiótoxint írtunk le, mely  $\alpha$ -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 (6. táblázat), így ezzel a módszerrel nem tudjuk megbecsülni az OcyKTx2 által feltehetően gátolt kálium csatornákat.

toxin neve	toxin besorolása	szekvencia	Ismert ioncsatorna gátló hatás	átfedés (%)	azonosság (%)
OcyKTx2	$\alpha$ -KTx 6.17	---IRCQGSNQCYGHCREKTGCMNGKGINRVCKCYGC-	Kv1.3 (18 nM), Shaker (52 nM) [16]		
OcKTx5	$\alpha$ -KTx 6.10	AEVIRCSGSKQCYGPCKQQTGCTNSKCMNKVCKCYGC-	nem ismert	100	71
OcKTx1	$\alpha$ -KTx 6.6	AEVIKCRTPKDCAGPCRKQTGCPHGKCMNRTCRCNRC-	nem ismert	76	92
OcKTx4	$\alpha$ -KTx 6.9	AEIIRCSGTRECYAPCQKLTGCLNAKCMNKACKCYGCV	nem ismert	100	59
Maurotoxin	$\alpha$ -KTx 6.2	---VSGTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKINCSCKCYGC-	Kv1.1 (45 nM), Kv1.2 (0,8 nM), Kv1.3 (180 nM) [152] KCa3.1 (14 nM) [157]	100	62
Spinoxin	$\alpha$ -KTx 6.13	---IRCSGRDCYSPCMKQTGCPNAKINCSCKCYGC-	nem ismert	100	65
Pi4	$\alpha$ -KTx 6.4	IEAIRCGSRDCYRQPCQKRTGCPNAKINCKCYGCS	Shaker (8 nM) [158]	100	65
Pi7	$\alpha$ -KTx 6.5	DEAIRCTGTDKCYIPCRYITGCFNSRCINCSCKCYGCT	nem ismert	100	62
Pi1	$\alpha$ -KTx 6.1	--LVKCRGTSDCGRPCQQQTGCPNSKGINRMCKCYGC-	Kv1.3 (11,7 nM) [27] Shaker (32 nM) [159]	100	56
Hemitoxin	$\alpha$ -KTx 6.15	---IKCTLKDCYSPCKKETGCPRAKINRNCKCYGCS	Kv1.1 (13 nM), Kv1.2 (16 nM), Kv1.3 (2nM) [160]	100	59

**6. táblázat** Az OcyKTx2 toxin aminosav szekvenciájának összehasonlítása más peptidek aminosav szekvenciájával. Az összehasonlítást az NCBI honlapján ingyenesen hozzáférhető protein blast (blastp) alkalmazásával végeztük. A táblázatban azokat a találatokat tüntettük fel, melyek legalább 55% szekvencia azonosságot mutatnak. A táblázatban szerepel a toxin neve, szerkezeti besorolása, az aminosav szekvenciája, a toxin által gátolt ioncsatornák, illetve a zárójelben () a toxin csatornán mért félhatásos koncentrációja, és az aminosav szekvencia illesztése során az illesztés alapjául szolgáló, átfedő OcyKTx2 szekvencia részlete.

Az urotoxin aminosav szekvencia homológia alapján  $\alpha$ -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 [161]. A peptid nagy affinitással gátolta a Kv1.2 csatornát ( $IC_{50} = 160$  pM), továbbá jóval 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 [156]. 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 gátlószerre a maurotoxin, mely a Kv1.2 csatornát  $IC_{50} = 0,8$  nM félhatásos koncentrációban gátolja. Ezzel összehasonlítva az urotoxin affinitása sokkal nagyobb, azaz az urotoxin hatékonyabb gátlószerre 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 [152, 157], 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 vizsgálatai során, használatával a Kv1.2 csatorna sejtfelszíni expressziója elektrofiziológiai mérésekkel pontosabban igazolható. Mivel a Kv1.2 csatorna szerepét kimutatták a demielinizációs betegségek tüneteinek kialakításában [162, 163], az urotoxin hasznos molekula lehet az ilyen betegségek kezelése céljából folytatott kísérletek során.

## 6.2 A margatoxin szelektivitásának vizsgálata

A margatoxint a *Centruroides margaritatus* skorpió mérgéből izolálták [15]. A toxin 39 aminosavból áll és 3 diszulfid híd stabilizálja. A margatoxin kereskedelmi forgalomban kapható, a Kv1.3 csatorna szelektív gátlószerként alkalmazott molekula [164-167], mégis, olyan tanulmány, mely a toxin szelektivitását pontosan bemutatja még nem készült. Legtöbb esetben a

Kv1.3 csatorna iránti szelektivitásra történő hivatkozás a margatoxin izolálásáról szóló közlemény [15], melyben a szerzők a margatoxint a Kv1.5, Kv1.6, Kv1.3, Kv3.1, Kv7.1 (ISK) és *Shaker* csatornákon tesztelték. Ezen csatornák közül a margatoxin valóban csak a Kv1.3 csatornát gátolta, viszont a Kv1.3 csatornához szerkezetileg legközelebb álló Kv1.1, Kv1.2 és Kv1.4 csatornák gátlásáról nem nyújt információt. Ezzel szemben néhány közlemény megemlíti, hogy a margatoxin a Kv1.1 és Kv1.2 csatornákat is gátolja [168-170], mégis ezekben a közleményekben nem található olyan hivatkozás, amely az állítást egyértelműen kísérletesen igazolná. Több esetben a radioaktív margatoxin membránhoz történő kötődését, vagy ionáram gátló képességét, mint eszközt használták a vizsgált sejteken expresszált Kv1.3 csatornák azonosítására, viszont a margatoxin ioncsatorna szelektivitásának pontos ismeretének hiányában ezek az eredmények nem teljes mértékben alátámasztottak [171-173].

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 (7. táblázat, A) Ezek a Hongotoxin-1 [136], Noxiustoxin [146] és Csx20 [29] toxinok. Érdekes módon, ezek a toxinok csakúgy, mint a margatoxin, mind a *Centruroides* nemzetségbe tartozó skorpió fajokból lettek izolálva. Mindezek mellett a margatoxin az ismert, Kv1.3 csatorna iránt nagy szelektivitással rendelkező toxinokkal, mint az OSK1 [145], Kaliotoxin [146] és Vm24 [17] csak jóval alacsonyabb (<61%) szekvencia homológiát mutat (7. táblázat, B).



**A**

toxin neve	toxin besorolása	fajnév	szekvencia	átfedés (%)	azonosság (%)	IC <sub>50</sub> Kv1.2 (nM)	IC <sub>50</sub> Kv1.3 (nM)	IC <sub>50</sub> Kv1.2 / IC <sub>50</sub> Kv1.3
margatoxin	α-KTx 2.2	<i>Centruroides margaritatus</i>	TIINVKCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCYPH	100	100	0,0064	0,0117	0,55
Hongotoxin 1	α-KTx 2.5	<i>Centruroides limbatus</i>	TVIDVKCTSPKQCLPPCKAQFGIRAGAKCMNGKCKCYPH	100	90	0,07	0,09	0,78
Noxiustoxin	α-KTx 2.4	<i>Centruroides noxius</i>	TIINVKCTSPKQCSKPCKELYGSSAGAKCMNGKCKCYNN	100	79	2	1	2,00
Css20	α-KTx 2.13	<i>Centruroides suffusus suffusus</i>	IFINVKCSSPQCLPKCAAFGISAGGKCKINGKCKCYP-	97	76	1,26	7,21	0,17

**B**

toxin neve	toxin besorolása	fajnév	szekvencia	átfedés (%)	azonosság (%)	IC <sub>50</sub> Kv1.2 (nM)	IC <sub>50</sub> Kv1.3 (nM)	IC <sub>50</sub> Kv1.2 / IC <sub>50</sub> Kv1.3
margatoxin	α-KTx 2.2	<i>Centruroides margaritatus</i>	-TIINVKCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCYPH	100	100	0,0064	0,0117	0,55
OSK1	α-KTx 3.7	<i>Orthochirus scrobiculosus</i>	GVIINVKCKISRQCLEPCK-KAGMRFG-KCMNGKCHCTPK	79	61	5,4	0,014	385
Kaliotoxin	α-KTx 3.6	<i>Androctonus mauritanicus</i>	GVEINVKCSGSPQCLPKCK-DAGMRFG-KCMNRKCHCTP-	92	58	>1000	0,65	>1538
Vm24	α-KTx 23.1	<i>Vaejovis mexicanus smithi</i>	--AAAIscvgspeppkcr-AQGCKNG-KCMNRKCKCYC	84	45	5-10	0,0029	>1724

**7. táblázat** A margatoxin aminosav szekvenciájának összehasonlítása alacsony szelektivitású (**A**), illetve a Kv1.3 iránt szelektív (**B**) toxikok szekvenciáival. A táblázatban szerepel a toxinok neve, szerkezeti besorolása, aminosav szekvenciája, az aminosav szekvencia illesztése során az illesztés alapjául szolgáló, átfedő margatoxin szekvencia részlete (%), a szekvencia azonosság mértéke (%), a toxinok Kv1.2 és Kv1.3 ioncsatornákon mért félhatásos koncentrációi, illetve azok aránya, mely a szelektivitás mértékét fejezi ki.

A margatoxin szelektivitási profiljának meghatározásához ioncsatorna génekkel tranziensen transzfektált tsA201 (humán embrionális vese, HEK) sejteken végeztünk elektrofiziológiai méréseket. A tsA sejteket könnyű kezelhetőségük miatt választottuk, továbbá mert gyakran használják ioncsatorna expressziós tanulmányok során. Mivel a HEK sejteken leírtak természetesen expresszálódó, endogén ioncsatornákat [174-178], elsőként a transzfektálatlan tsA201 sejteken végeztünk áram méréseket patch-clamp technikával, feszültség-zár üzemmódban. Célunk nem az endogén ioncsatornák részletes azonosítása volt, hanem a

méréseink során esetlegesen jelen lévő háttér áram azonosítása. A méréseket teljes-sejt, illetve outside-out patch konfigurációkban végeztük, melyek során azt tapasztaltuk, hogy a teljes-sejt konfigurációban mérhető feszültség-aktivált áram outside-out patch konfigurációban elhanyagolható mértékű. Ebből kifolyólag úgy döntöttünk, hogy a méréseink hibájának csökkentése, és a toxin hatásának pontos mérése érdekében a transzfektált tsA201 sejteken minden mérést outside-out patch konfigurációban mérünk. Transzfektált sejtek esetében az ioncsatornák fokozott expressziója miatt teljes-sejt konfigurációban több nA amplitúdójú áramokat mértünk, illetve az izolált patch-eken is több száz pA, vagy akár néhány nA amplitúdójú áramokat regisztráltunk (14-17. Ábra). 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 (rMgTx, Alomone Labs, Jeruzsálem, Izrael) a Kv1.1 csatornát nM koncentrációban gátolta, míg a Kv1.2 és Kv1.3 csatornákra pM koncentrációban fejtett ki gátló hatást. A Kv1.2 és Kv1.3 csatornákon megismételtük a méréseket egy másik forrásból származó, szintetikus margatoxin felhasználásával (sMgTx, Peptides Inc. Osaka, Japán) (20. ábra), mely mérések eredménye megegyezik a rekombináns margatoxinnal végzett mérések eredményével.

Korábban leírták a margatoxin patkány eredetű Kv1.6 csatorna gátló hatását 5 nM félhatásos koncentrációval [15], ezzel szemben mi nem tapasztaltunk gátló hatást 1 nM koncentrációban a humán Kv1.6 csatornán.

A Kv1.1 csatorna esetében az egér (mKv1.1) és humán (hKv1.1) ioncsatornákon kissé eltérő félhatásos koncentráció értékeket mértünk (19. ábra), ennek oka lehet az eltérő expressziós rendszer (L979 és tsA201 sejtek), az esetleges különbségek a  $K^+$  csatorna interakciós partnerek jelenlétében, illetve az egér és humán Kv1.1 csatornák elsődleges szerkezetének minimális eltérése [24]. A Kv1.2 és Kv1.3 csatornákon közel azonos félhatásos koncentrációt mértünk, bár az ioncsatorna blokkolásának kinetikája eltérő (19. ábra). A Kv1.3 csatorna egyensúlyi gátlása hamar kialakul és reverzibilis. A Kv1.2 csatorna esetében az egyensúlyi blokk kialakulása jóval lassabban zajlik le, illetve a toxin kimosódása is lassabban, és nem teljesen reverzibilisen történik meg. A Css20 toxin, mely a margatoxinnal nagy fokú szekvencia azonosságot mutat (78%) hasonló módon gátolta a Kv1.2 és Kv1.3 csatornákat [29]. A Css20 *in silico* dokkolási modellezésével kimutatták, hogy a toxin Kv1.3 csatornához történő kötődésben kulcsszerepet játszik az esszenciális diád lizin oldallánca, mely a csatorna szelektivitási szűrőjével létesít

kapcsolatot, míg a Kv1.2 csatorna gátlása során a toxin inkább a csatorna torony régiójával létesít hidrogénhíd-kötéseket. Hasonló interakciókat feltételezünk a margatoxin és a Kv1.2 és Kv1.3 csatornák között is.

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 [156]. Mivel a Kv1.1 és Kv1.2 csatornák jellemzően idegsejteken fejeződnek ki, a margatoxin alacsony szelektivitása magyarázhatja az *in vivo* állatkísérletek során tapasztalt mellékhatások kialakulását (étvágycsökkenés, fokozott nyáltermelés és hiperaktivitás) [141].

### **6.3 Az anuroctoxin vad típusú és mutáns változatainak előállítása 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 (22. ábra). A HPLC spektrumon több komponens látható, melyek redukálását követően egy komponensű mintát kaptunk, melynek molekulatömege pedig 4095. A redukált minta oxidálását követően egy jól elkülöníthető csúcs izolálható, melynek molekulatömege 4085 (23. ábra). A természetes anuroctoxin molekulatömege 4082,8 [30]. A 4 diszulfid híd kötés redukciója a tömegszámot 8-cal növeli. A méréseket kollaborációs partnereink végezték. A mért értékek várttól való eltérését a tömegspektrométer nem megfelelő kalibrálása adhatja, így a mért értékek eltérhetnek a valós értékektől.

Az oxidált rekombináns toxin hatását a Kv1.3 és Kv1.2 csatornákon elektrofiziológiai mérésekkel végeztük (24. ábra). A minta újraoxidálása (refolding) szükséges a megfelelő biológiai aktivitáshoz, mivel a redukálás és oxidálás előtti minta Kv1.3 csatornán mért hatása messze elmarad a természetes anuroctoxin Kv1.3 csatornán mért hatásától. A minta újraoxidálását követően a Kv1.3 csatornán mért hatás nagyban megnőtt, 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 [30]. A toxinok szelektivitásának összehasonlítására a két csatornán mért félhatásos koncentrációk hányadosát vettük, mely a természetes anuroctoxin esetén  $IC_{50Kv1.2}/IC_{50Kv1.3} = 8,7$ , a rekombináns anuroctoxin esetén  $IC_{50Kv1.2}/IC_{50Kv1.3} = 7,0$ , melyek közel azonosnak tekinthetők.

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. A rekombináns minta valamelyest nagyobb affinitásának oka a rekombináns minta nagyobb tisztasága lehet, mivel a természetes toxin méregből történő izolálása során (HPLC) kisebb anyagmennyiség és több komponens közül történik az elválasztás, míg a rekombináns minta tisztasága eleve magasabb az affinitás kromatográfia miatt. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az alkalmazott rekombináns technika alkalmas az anuroctoxin, illetve feltehetőleg más, hasonló szerkezetű toxinok előállítására.

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 (4. táblázat). Az OSK toxinon végzett mutációk alapján ebben a pozícióban a treonin jelenléte kedvező a Kv1.3 iránti szelektivitás növelésére. Az anuroctoxin esetében a 32. aminosav treoninra 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 szelektivitás javulását 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 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.

## Összegzés

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 ioncsatornához történő kötődésében [117]. Az OcyKTx2, urotoxin, margatoxin és anuroctoxin peptidek mindegyike aromás aminosavat tartalmaz diádjában a lizin mellett (8. Táblázat, piros kerettel jelölve). A négy toxin közül az OcyKTx2 kivételével mindegyik igazoltan hasonló affinitással 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.

toxin	szekvencia	IC <sub>50</sub> Kv1.2 (nM)	IC <sub>50</sub> Kv1.3 (nM)	IC <sub>50</sub> Kv1.2 / IC <sub>50</sub> Kv1.3
OcyKTx2	----IRCQGSNQCYGHCREKTG-CMNGKCI <del>NRVCKCYGC</del> -	nem ismert	18,0	nem ismert
urotoxin	--GDIKCSGTRQ <del>CGWPCCKQTT</del> -CTNSKCMNGKCK <del>CYGC</del> V	0,16	90,9	0,002
margatoxin	TIINVKCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCK <del>CYPH</del> -	0,0064	0,0117	0,55
AnTx	---ZKECTG <del>PQHCTNFCRKNK</del> --CTHGKCMNRKCK <del>CFNCK</del>	5,2	0,3	17,3
AnTx N17A/F32T	---ZKECTG <del>PQHCTNFCRKA</del> K--CTHGKCMNRKCK <del>CTNCK</del>	>>100	0,6	>>170

8. táblázat Munkánk során vizsgált toxinok aminosav szekvenciáinak és farmakológiai tulajdonságainak összehasonlítása

## 7 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 ( $\alpha$ -KTx 6.17) a Kv1.3 és *Shaker* ioncsatornák alacsony szelektivitású gátlószere, míg az urotoxin ( $\alpha$ -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 gátlószerek tervezésének és előállításának, és a toxin molekulák autoimmun betegségek terápiájában történő alkalmazásának.

## 8 Summary

The Kv1.3 channel plays a key role in the activation process of effector memory T-cells ( $T_{EM}$ ), which are the main causatives of various autoimmune diseases. Inhibition of the  $K^+$  current through the channel can block the activation of  $T_{EM}$  cells. The potential of Kv1.3 inhibitors in the treatment of autoimmune diseases has been shown in several *in vitro* and *in vivo* experiments.

We investigated toxins of 30-40 amino acids stabilized by disulfide bonds isolated from scorpion venoms, which are high affinity inhibitors of different  $K^+$  channels.

The aims of our research were to isolate and characterize new scorpion toxins, to perform a detailed screening of the selectivity of the previously isolated and characterized margatoxin, to synthesize the scorpion toxin, anuroctoxin and to improve its pharmacological properties with directed mutations. The effect of toxins on the ion channels was measured with electrophysiological measurements using the patch-clamp technique.

With the help of our collaboration partners we could isolate two novel scorpion toxins, OcyKTx2 ( $\alpha$ -KTx 6.17), which is a non-selective inhibitor of *Shaker* and Kv1.3 channels and urotoxin ( $\alpha$ -KTx 6.21), which is a high affinity and selective inhibitor of Kv1.2. Margatoxin is considered a high affinity and selective inhibitor of Kv1.3. Our results show that margatoxin blocks the Kv1.3 and Kv1.2 channel with similarly high affinity (pM concentration) and the Kv1.1 channel with lower affinity (nM concentration). With recombinant technique and solid phase chemical synthesis we could successfully synthesize the previously characterized anuroctoxin. This peptide naturally inhibits both Kv1.2 and Kv1.3 channels which is not advantageous for the therapeutic application in autoimmune diseases. With site directed mutations we could design and synthesize a variant of anuroctoxin, which is a high affinity and selective inhibitor of the Kv1.3 channel.

As the result of our work with scorpion toxins, which inhibit Kv1.3 we could identify amino acid residues that influence the affinity and selectivity of toxins for Kv1.3. Our results provide us valuable data to understand the interactions between toxins and ion channels, which is crucial for the design and synthesis of future peptides highly selective for Kv1.3 in the therapy of autoimmune diseases.



## 9 Hivatkozások

- [1] Zhang SL, Yu Y, Roos J, Kozak JA, Deerinck TJ, Ellisman MH, et al. STIM1 is a Ca<sup>2+</sup> sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca<sup>2+</sup> store to the plasma membrane. *Nature* 2005;437:902-5.
- [2] Liou J, Kim ML, Heo WD, Jones JT, Myers JW, Ferrell JE, Jr., et al. STIM is a Ca<sup>2+</sup> sensor essential for Ca<sup>2+</sup>-store-depletion-triggered Ca<sup>2+</sup> influx. *Curr Biol* 2005;15:1235-41.
- [3] Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV, Ohlsen K, Lioudyno M, Zhang S, et al. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca<sup>2+</sup> channel function. *J Cell Biol* 2005;169:435-45.
- [4] Panyi G. Biophysical and pharmacological aspects of K<sup>+</sup> channels in T lymphocytes. *Eur Biophys J* 2005;34:515-29.
- [5] Chandy KG, Wulff H, Beeton C, Pennington M, Gutman GA, Cahalan MD. K<sup>+</sup> channels as targets for specific immunomodulation. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25:280-9.
- [6] Panyi G, Possani LD, Rodriguez de la Vega RC, Gaspar R, Varga Z. K<sup>+</sup> channel blockers: novel tools to inhibit T cell activation leading to specific immunosuppression. *Curr Pharm Des* 2006;12:2199-220.
- [7] Varga Z, Hajdu P, Panyi G. Ion channels in T lymphocytes: an update on facts, mechanisms and therapeutic targeting in autoimmune diseases. *Immunol Lett* 130:19-25.
- [8] Lewis RS, Ross PE, Cahalan MD. Chloride channels activated by osmotic stress in T lymphocytes. *J Gen Physiol* 1993;101:801-26.
- [9] Kotturi MF, Carlow DA, Lee JC, Ziltener HJ, Jefferies WA. Identification and functional characterization of voltage-dependent calcium channels in T lymphocytes. *J Biol Chem* 2003;278:46949-60.
- [10] Kotturi MF, Hunt SV, Jefferies WA. Roles of CRAC and Cav-like channels in T cells: more than one gatekeeper? *Trends Pharmacol Sci* 2006;27:360-7.
- [11] Cahalan MD, Chandy KG, DeCoursey TE, Gupta S. A voltage-gated potassium channel in human T lymphocytes. *J Physiol* 1985;358:197-237.
- [12] Lo WL, Donermeyer DL, Allen PM. A voltage-gated sodium channel is essential for the positive selection of CD4(+) T cells. *Nat Immunol* 2012;13:880-7.
- [13] Jin J, Desai BN, Navarro B, Donovan A, Andrews NC, Clapham DE. Deletion of Trpm7 disrupts embryonic development and thymopoiesis without altering Mg<sup>2+</sup> homeostasis. *Science* 2008;322:756-60.
- [14] Meuth SG, Bittner S, Meuth P, Simon OJ, Budde T, Wiendl H. TWIK-related acid-sensitive K<sup>+</sup> channel 1 (TASK1) and TASK3 critically influence T lymphocyte effector functions. *J Biol Chem* 2008;283:14559-70.
- [15] Garcia-Calvo M, Leonard RJ, Novick J, Stevens SP, Schmalhofer W, Kaczorowski GJ, et al. Purification, characterization, and biosynthesis of margatoxin, a component of *Centruroides margaritatus* venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels. *J Biol Chem* 1993;268:18866-74.
- [16] Schwartz EF, Bartok A, Schwartz CA, Papp F, Gomez-Lagunas F, Panyi G, et al. OcyKTx2, a new K<sup>(+)</sup>-channel toxin characterized from the venom of the scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. *Peptides* 2013;46:40-6.
- [17] Varga Z, Gurrola-Briones G, Papp F, Rodriguez de la Vega RC, Pedraza-Alva G, Tajhya RB, et al. Vm24, a natural immunosuppressive peptide, potently and selectively blocks Kv1.3 potassium channels of human T cells. *Mol Pharmacol* 2012;82:372-82.

- [18] Olamendi-Portugal T, Somodi S, Fernandez JA, Zamudio FZ, Becerril B, Varga Z, et al. 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* 2005;46:418-29.
- [19] Rodriguez de la Vega RC, Possani LD. Current views on scorpion toxins specific for K<sup>+</sup>-channels. *Toxicon* 2004;43:865-75.
- [20] Goldstein SA, Miller C. Mechanism of charybdotoxin block of a voltage-gated K<sup>+</sup> channel. *Biophys J* 1993;65:1613-9.
- [21] Varga Z, Gurrola-Briones G, Papp F, Rodriguez de la Vega RC, Pedraza-Alva G, Tajhya RB, et al. Vm24, a Natural Immunosuppressant Peptide Potently and Selectively Blocks Kv1.3 Potassium Channels of Human T Cells. *Mol Pharmacol*.
- [22] Papp F, Batista CV, Varga Z, Herceg M, Roman-Gonzalez SA, Gaspar R, et al. Tst26, a novel peptide blocker of Kv1.2 and Kv1.3 channels from the venom of *Tityus stigmurus*. *Toxicon* 2009;54:379-89.
- [23] Gutman GA, Chandy KG, Adelman JP, Aiyar J, Bayliss DA, Clapham DE, et al. International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol Rev* 2003;55:583-6.
- [24] Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, et al. Molecular diversity of K<sup>+</sup> channels. *Ann N Y Acad Sci* 1999;868:233-85.
- [25] Beeton C, Pennington MW, Norton RS. Analogs of the sea anemone potassium channel blocker ShK for the treatment of autoimmune diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2011;10:313-21.
- [26] Beeton C, Pennington MW, Wulff H, Singh S, Nugent D, Crossley G, et al. Targeting effector memory T cells with a selective peptide inhibitor of Kv1.3 channels for therapy of autoimmune diseases. *Mol Pharmacol* 2005;67:1369-81.
- [27] Peter M, Jr., Hajdu P, Varga Z, Damjanovich S, Possani LD, Panyi G, et al. Blockage of human T lymphocyte Kv1.3 channels by Pi1, a novel class of scorpion toxin. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;278:34-7.
- [28] Peter M, Jr., Varga Z, Hajdu P, Gaspar R, Jr., Damjanovich S, Horjales E, et al. Effects of toxins Pi2 and Pi3 on human T lymphocyte Kv1.3 channels: the role of Glu7 and Lys24. *J Membr Biol* 2001;179:13-25.
- [29] Corzo G, Papp F, Varga Z, Barraza O, Espino-Solis PG, Rodriguez de la Vega RC, et al. A selective blocker of Kv1.2 and Kv1.3 potassium channels from the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*. *Biochem Pharmacol* 2008;76:1142-54.
- [30] Bagdany M, Batista CV, Valdez-Cruz NA, Somodi S, Rodriguez de la Vega RC, Licea AF, et al. 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* 2005;67:1034-44.
- [31] Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev* 2010;90:291-366.
- [32] Zobel C, Cho HC, Nguyen TT, Pekhletski R, Diaz RJ, Wilson GJ, et al. Molecular dissection of the inward rectifier potassium current (IK1) in rabbit cardiomyocytes: evidence for heteromeric co-assembly of Kir2.1 and Kir2.2. *J Physiol* 2003;550:365-72.
- [33] Kwan HY, Leung PC, Huang Y, Yao X. Depletion of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores sensitizes the flow-induced Ca<sup>2+</sup> influx in rat endothelial cells. *Circ Res* 2003;92:286-92.
- [34] Wellman GC, Bevan JA. Barium inhibits the endothelium-dependent component of flow but not acetylcholine-induced relaxation in isolated rabbit cerebral arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;274:47-53.
- [35] Day M, Carr DB, Ulrich S, Ilijic E, Tkatch T, Surmeier DJ. Dendritic excitability of mouse frontal cortex pyramidal neurons is shaped by the interaction among HCN, Kir2, and K<sub>leak</sub> channels. *J Neurosci* 2005;25:8776-87.

- [36] Mi H, Deerinck TJ, Jones M, Ellisman MH, Schwarz TL. Inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels that may participate in K<sup>+</sup> buffering are localized in microvilli of Schwann cells. *J Neurosci* 1996;16:2421-9.
- [37] Hebert SC, Desir G, Giebisch G, Wang W. Molecular diversity and regulation of renal potassium channels. *Physiol Rev* 2005;85:319-71.
- [38] He C, Zhang H, Mirshahi T, Logothetis DE. Identification of a potassium channel site that interacts with G protein betagamma subunits to mediate agonist-induced signaling. *J Biol Chem* 1999;274:12517-24.
- [39] Slesinger PA, Reuveny E, Jan YN, Jan LY. Identification of structural elements involved in G protein gating of the GIRK1 potassium channel. *Neuron* 1995;15:1145-56.
- [40] Anumonwo JM, Lopatin AN. Cardiac strong inward rectifier potassium channels. *J Mol Cell Cardiol* 2010;48:45-54.
- [41] Ferrer J, Nichols CG, Makhina EN, Salkoff L, Bernstein J, Gerhard D, et al. Pancreatic islet cells express a family of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel subunits which interact to form G-protein-activated channels. *J Biol Chem* 1995;270:26086-91.
- [42] Fernandez-Alacid L, Aguado C, Ciruela F, Martin R, Colon J, Cabanero MJ, et al. Subcellular compartment-specific molecular diversity of pre- and post-synaptic GABA-activated GIRK channels in Purkinje cells. *J Neurochem* 2009;110:1363-76.
- [43] Clement JPt, Kunjilwar K, Gonzalez G, Schwanstecher M, Panten U, Aguilar-Bryan L, et al. Association and stoichiometry of K(ATP) channel subunits. *Neuron* 1997;18:827-38.
- [44] Ashcroft FM, Rorsman P. Electrophysiology of the pancreatic beta-cell. *Prog Biophys Mol Biol* 1989;54:87-143.
- [45] Gross GJ, Auchampach JA. Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res* 1992;70:223-33.
- [46] Miki T, Liss B, Minami K, Shiuchi T, Saraya A, Kashima Y, et al. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the hypothalamus are essential for the maintenance of glucose homeostasis. *Nat Neurosci* 2001;4:507-12.
- [47] Newman EA. Regional specialization of retinal glial cell membrane. *Nature* 1984;309:155-7.
- [48] Ando M, Takeuchi S. Immunological identification of an inward rectifier K<sup>+</sup> channel (Kir4.1) in the intermediate cell (melanocyte) of the cochlear stria vascularis of gerbils and rats. *Cell Tissue Res* 1999;298:179-83.
- [49] Patel AJ, Lazdunski M. The 2P-domain K<sup>+</sup> channels: role in apoptosis and tumorigenesis. *Pflugers Arch* 2004;448:261-73.
- [50] Enyedi P, Czirjak G. Molecular background of leak K<sup>+</sup> currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol Rev* 2010;90:559-605.
- [51] Gonzalez C, Baez-Nieto D, Valencia I, Oyarzun I, Rojas P, Naranjo D, et al. K(+) channels: function-structural overview. *Compr Physiol* 2012;2:2087-149.
- [52] Talley EM, Solorzano G, Lei Q, Kim D, Bayliss DA. Cns distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *J Neurosci* 2001;21:7491-505.
- [53] Czirjak G, Toth ZE, Enyedi P. The two-pore domain K<sup>+</sup> channel, TRESK, is activated by the cytoplasmic calcium signal through calcineurin. *J Biol Chem* 2004;279:18550-8.
- [54] Beitzinger M, Hofmann L, Oswald C, Beinoraviciute-Kellner R, Sauer M, Griesmann H, et al. p73 poses a barrier to malignant transformation by limiting anchorage-independent growth. *EMBO J* 2008;27:792-803.
- [55] Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, et al. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005;57:473-508.
- [56] Pourrier M, Schram G, Nattel S. Properties, expression and potential roles of cardiac K<sup>+</sup> channel accessory subunits: MinK, MiRPs, KChIP, and KChAP. *J Membr Biol* 2003;194:141-52.

- [57] Heinemann SH, Rettig J, Graack HR, Pongs O. Functional characterization of Kv channel beta-subunits from rat brain. *J Physiol* 1996;493 ( Pt 3):625-33.
- [58] Hodgkin AL, Huxley AF. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. *J Physiol* 1952;116:449-72.
- [59] Beckh S, Pongs O. Members of the RCK potassium channel family are differentially expressed in the rat nervous system. *EMBO J* 1990;9:777-82.
- [60] Tsauro ML, Sheng M, Lowenstein DH, Jan YN, Jan LY. Differential expression of K<sup>+</sup> channel mRNAs in the rat brain and down-regulation in the hippocampus following seizures. *Neuron* 1992;8:1055-67.
- [61] Varga Z, Juhasz T, Matta C, Fodor J, Katona E, Bartok A, et al. Switch of voltage-gated K<sup>+</sup> channel expression in the plasma membrane of chondrogenic cells affects cytosolic Ca<sup>2+</sup>-oscillations and cartilage formation. *PLoS One* 2011;6:e27957.
- [62] San-Cristobal P, Lainez S, Dimke H, de Graaf MJ, Hoenderop JG, Bindels RJ. Ankyrin-3 is a novel binding partner of the voltage-gated potassium channel Kv1.1 implicated in renal magnesium handling. *Kidney Int* 2013.
- [63] Bakondi G, Por A, Kovacs I, Szucs G, Rusznak Z. Voltage-gated K<sup>+</sup> channel (Kv) subunit expression of the guinea pig spiral ganglion cells studied in a newly developed cochlear free-floating preparation. *Brain Res* 2008;1210:148-62.
- [64] Rusznak Z, Bakondi G, Pocsai K, Por A, Kosztka L, Pal B, et al. Voltage-gated potassium channel (Kv) subunits expressed in the rat cochlear nucleus. *J Histochem Cytochem* 2008;56:443-65.
- [65] Zsiros E, Kis-Toth K, Hajdu P, Gaspar R, Bielanska J, Felipe A, et al. Developmental switch of the expression of ion channels in human dendritic cells. *J Immunol* 2009;183:4483-92.
- [66] Fadool DA, Tucker K, Perkins R, Fasciani G, Thompson RN, Parsons AD, et al. Kv1.3 channel gene-targeted deletion produces "Super-Smeller Mice" with altered glomeruli, interacting scaffolding proteins, and biophysics. *Neuron* 2004;41:389-404.
- [67] Spencer RH, Chandy KG, Gutman GA. Immunological identification of the Shaker-related Kv1.3 potassium channel protein in T and B lymphocytes, and detection of related proteins in flies and yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;191:201-6.
- [68] Vicente R, Escalada A, Villalonga N, Texido L, Roura-Ferrer M, Martin-Satue M, et al. Association of Kv1.5 and Kv1.3 contributes to the major voltage-dependent K<sup>+</sup> channel in macrophages. *J Biol Chem* 2006;281:37675-85.
- [69] Xu J, Wang P, Li Y, Li G, Kaczmarek LK, Wu Y, et al. The voltage-gated potassium channel Kv1.3 regulates peripheral insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:3112-7.
- [70] Beeton C, Wulff H, Standifer NE, Azam P, Mullen KM, Pennington MW, et al. Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:17414-9.
- [71] Szabo I, Bock J, Grassme H, Soddemann M, Wilker B, Lang F, et al. Mitochondrial potassium channel Kv1.3 mediates Bax-induced apoptosis in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:14861-6.
- [72] David M, Macias A, Moreno C, Prieto A, Martinez-Marmol R, Vicente R, et al. Protein kinase C (PKC) activity regulates functional effects of Kvbeta1.3 subunit on KV1.5 channels: identification of a cardiac Kv1.5 channelosome. *J Biol Chem* 2012;287:21416-28.
- [73] Felipe A, Soler C, Comes N. Kv1.5 in the immune system: the good, the bad, or the ugly? *Front Physiol* 2010;1:152.
- [74] Villalonga N, Martinez-Marmol R, Roura-Ferrer M, David M, Valenzuela C, Soler C, et al. Cell cycle-dependent expression of Kv1.5 is involved in myoblast proliferation. *Biochim Biophys Acta* 2008;1783:728-36.

- [75] Smart SL, Bosma MM, Tempel BL. Identification of the delayed rectifier potassium channel, Kv1.6, in cultured astrocytes. *Glia* 1997;20:127-34.
- [76] Yuan XJ, Wang J, Juhaszova M, Golovina VA, Rubin LJ. Molecular basis and function of voltage-gated K<sup>+</sup> channels in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1998;274:L621-35.
- [77] Rasband MN, Trimmer JS, Peles E, Levinson SR, Shrager P. K<sup>+</sup> channel distribution and clustering in developing and hypomyelinated axons of the optic nerve. *J Neurocytol* 1999;28:319-31.
- [78] Finol-Urdaneta RK, Remedi MS, Raasch W, Becker S, Clark RB, Struver N, et al. Block of Kv1.7 potassium currents increases glucose-stimulated insulin secretion. *EMBO Mol Med* 2012;4:424-34.
- [79] Kashuba VI, Kvasha SM, Protopopov AI, Gizatullin RZ, Rynditch AV, Wahlestedt C, et al. Initial isolation and analysis of the human Kv1.7 (KCNA7) gene, a member of the voltage-gated potassium channel gene family. *Gene* 2001;268:115-22.
- [80] Bardien-Kruger S, Wulff H, Arieff Z, Brink P, Chandy KG, Corfield V. Characterisation of the human voltage-gated potassium channel gene, KCNA7, a candidate gene for inherited cardiac disorders, and its exclusion as cause of progressive familial heart block I (PFHBI). *Eur J Hum Genet* 2002;10:36-43.
- [81] Misonou H, Mohapatra DP, Trimmer JS. Kv2.1: a voltage-gated k<sup>+</sup> channel critical to dynamic control of neuronal excitability. *Neurotoxicology* 2005;26:743-52.
- [82] Hermansteyne TO, Subedi K, Le WW, Hoffman GE, Meredith AL, Mong JA, et al. Kv2.2: a novel molecular target to study the role of basal forebrain GABAergic neurons in the sleep-wake cycle. *Sleep* 2013;36:1839-48.
- [83] Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME, Keating MT. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell* 1995;81:299-307.
- [84] Bielanska J, Hernandez-Losa J, Moline T, Somoza R, Cajal SR, Condom E, et al. Increased voltage-dependent K(+) channel Kv1.3 and Kv1.5 expression correlates with leiomyosarcoma aggressiveness. *Oncol Lett* 2012;4:227-30.
- [85] Bielanska J, Hernandez-Losa J, Moline T, Somoza R, Ramon y Cajal S, Condom E, et al. Differential expression of Kv1.3 and Kv1.5 voltage-dependent K<sup>+</sup> channels in human skeletal muscle sarcomas. *Cancer Invest* 2012;30:203-8.
- [86] Comes N, Bielanska J, Vallejo-Gracia A, Serrano-Albarras A, Marruecos L, Gomez D, et al. The voltage-dependent K channels Kv1.3 and Kv1.5 in human cancer. *Front Physiol* 2013;4:283.
- [87] Felipe A, Bielanska J, Comes N, Vallejo A, Roig S, Ramon YCS, et al. Targeting the voltage-dependent K(+) channels Kv1.3 and Kv1.5 as tumor biomarkers for cancer detection and prevention. *Curr Med Chem* 2012;19:661-74.
- [88] Vallejo-Gracia A, Bielanska J, Hernandez-Losa J, Castellvi J, Ruiz-Marcellan MC, Ramon y Cajal S, et al. Emerging role for the voltage-dependent K<sup>+</sup> channel Kv1.5 in B-lymphocyte physiology: expression associated with human lymphoma malignancy. *J Leukoc Biol* 2013;94:779-89.
- [89] Fraser SP, Grimes JA, Djamgoz MB. Effects of voltage-gated ion channel modulators on rat prostatic cancer cell proliferation: comparison of strongly and weakly metastatic cell lines. *Prostate* 2000;44:61-76.
- [90] Panyi G, Deutsch C. Cross talk between activation and slow inactivation gates of Shaker potassium channels. *J Gen Physiol* 2006;128:547-59.
- [91] Gonzalez C, Rosenman E, Bezanilla F, Alvarez O, Latorre R. Modulation of the Shaker K(+) channel gating kinetics by the S3-S4 linker. *J Gen Physiol* 2000;115:193-208.
- [92] Ghanshani S, Wulff H, Miller MJ, Rohm H, Neben A, Gutman GA, et al. Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences. *J Biol Chem* 2000;275:37137-49.

- [93] Vandorpe DH, Shmukler BE, Jiang L, Lim B, Maylie J, Adelman JP, et al. cDNA cloning and functional characterization of the mouse Ca<sup>2+</sup>-gated K<sup>+</sup> channel, mIK1. Roles in regulatory volume decrease and erythroid differentiation. *J Biol Chem* 1998;273:21542-53.
- [94] Kohler R, Wulff H, Eichler I, Kneifel M, Neumann D, Knorr A, et al. Blockade of the intermediate-conductance calcium-activated potassium channel as a new therapeutic strategy for restenosis. *Circulation* 2003;108:1119-25.
- [95] Wulff H, Castle NA. Therapeutic potential of KCa<sub>3.1</sub> blockers: recent advances and promising trends. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2010;3:385-96.
- [96] Fakler B, Adelman JP. Control of K(Ca) channels by calcium nano/microdomains. *Neuron* 2008;59:873-81.
- [97] Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, Nelson MT. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology (Bethesda)* 2006;21:69-78.
- [98] Grimm PR, Foutz RM, Brenner R, Sansom SC. Identification and localization of BK-beta subunits in the distal nephron of the mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;293:F350-9.
- [99] Fettiplace R, Fuchs PA. Mechanisms of hair cell tuning. *Annu Rev Physiol* 1999;61:809-34.
- [100] Douglas RM, Lai JC, Bian S, Cummins L, Moczydlowski E, Haddad GG. The calcium-sensitive large-conductance potassium channel (BK/MAXI K) is present in the inner mitochondrial membrane of rat brain. *Neuroscience* 2006;139:1249-61.
- [101] DeCoursey TE, Chandy KG, Gupta S, Cahalan MD. Voltage-gated K<sup>+</sup> channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? *Nature* 1984;307:465-8.
- [102] Grissmer S, Nguyen AN, Cahalan MD. Calcium-activated potassium channels in resting and activated human T lymphocytes. Expression levels, calcium dependence, ion selectivity, and pharmacology. *J Gen Physiol* 1993;102:601-30.
- [103] Cahalan MD, Chandy KG. The functional network of ion channels in T lymphocytes. *Immunol Rev* 2009;231:59-87.
- [104] Zweifach A, Lewis RS. Mitogen-regulated Ca<sup>2+</sup> current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:6295-9.
- [105] Partiseti M, Le Deist F, Hivroz C, Fischer A, Korn H, Choquet D. The calcium current activated by T cell receptor and store depletion in human lymphocytes is absent in a primary immunodeficiency. *J Biol Chem* 1994;269:32327-35.
- [106] Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel SH, Tanasa B, et al. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 2006;441:179-85.
- [107] Wulff H, Calabresi PA, Allie R, Yun S, Pennington M, Beeton C, et al. The voltage-gated Kv1.3 K(+) channel in effector memory T cells as new target for MS. *J Clin Invest* 2003;111:1703-13.
- [108] Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 2004;22:745-63.
- [109] Beeton C, Wulff H, Barbaria J, Clot-Faybesse O, Pennington M, Bernard D, et al. Selective blockade of T lymphocyte K(+) channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:13942-7.
- [110] Azam P, Sankaranarayanan A, Homerick D, Griffey S, Wulff H. Targeting effector memory T cells with the small molecule Kv1.3 blocker PAP-1 suppresses allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol* 2007;127:1419-29.
- [111] Rus H, Pardo CA, Hu L, Darrah E, Cudrici C, Niculescu T, et al. The voltage-gated potassium channel Kv1.3 is highly expressed on inflammatory infiltrates in multiple sclerosis brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:11094-9.
- [112] Garcia ML, Hanner M, Knaus HG, Koch R, Schmalhofer W, Slaughter RS, et al. Pharmacology of potassium channels. *Adv Pharmacol* 1997;39:425-71.

- [113] Legros C, Ceard B, Bougis PE, Martin-Eauclaire MF. Evidence for a new class of scorpion toxins active against K<sup>+</sup> channels. *FEBS Lett* 1998;431:375-80.
- [114] DeBin JA, Maggio JE, Strichartz GR. Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *Am J Physiol* 1993;264:C361-9.
- [115] Valdivia HH, Kirby MS, Lederer WJ, Coronado R. Scorpion toxins targeted against the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-release channel of skeletal and cardiac muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:12185-9.
- [116] Tytgat J, Chandy KG, Garcia ML, Gutman GA, Martin-Eauclaire MF, van der Walt JJ, et al. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies. *Trends Pharmacol Sci* 1999;20:444-7.
- [117] Dauplais M, Lecoq A, Song J, Cotton J, Jamin N, Gilquin B, et al. On the convergent evolution of animal toxins. Conservation of a diad of functional residues in potassium channel-blocking toxins with unrelated structures. *J Biol Chem* 1997;272:4302-9.
- [118] Ozcan M, Matinlinna JP, Vallittu PK, Huysmans MC. Effect of drying time of 3-methacryloxypropyltrimethoxysilane on the shear bond strength of a composite resin to silica-coated base/noble alloys. *Dent Mater* 2004;20:586-90.
- [119] Cui M, Shen J, Briggs JM, Fu W, Wu J, Zhang Y, et al. Brownian dynamics simulations of the recognition of the scorpion toxin P05 with the small-conductance calcium-activated potassium channels. *J Mol Biol* 2002;318:417-28.
- [120] Tseng GN, Sonawane KD, Korolkova YV, Zhang M, Liu J, Grishin EV, et al. Probing the outer mouth structure of the HERG channel with peptide toxin footprinting and molecular modeling. *Biophys J* 2007;92:3524-40.
- [121] Carbone E, Wanke E, Prestipino G, Possani LD, Maelicke A. Selective blockage of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels by a novel scorpion toxin. *Nature* 1982;296:90-1.
- [122] Noda M, Takahashi H, Tanabe T, Toyosato M, Furutani Y, Hirose T, et al. Primary structure of alpha-subunit precursor of *Torpedo californica* acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence. *Nature* 1982;299:793-7.
- [123] Noda M, Shimizu S, Tanabe T, Takai T, Kayano T, Ikeda T, et al. Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 1984;312:121-7.
- [124] Vacher H, Prestipino G, Crest M, Martin-Eauclaire MF. Definition of the alpha-KTx15 subfamily. *Toxicon* 2004;43:887-94.
- [125] Song WJ, Tkatch T, Baranauskas G, Ichinohe N, Kitai ST, Surmeier DJ. Somatodendritic depolarization-activated potassium currents in rat neostriatal cholinergic interneurons are predominantly of the A type and attributable to coexpression of Kv4.2 and Kv4.1 subunits. *J Neurosci* 1998;18:3124-37.
- [126] Song WJ. Genes responsible for native depolarization-activated K<sup>+</sup> currents in neurons. *Neurosci Res* 2002;42:7-14.
- [127] Legros C, Oughuideni R, Darbon H, Rochat H, Bougis PE, Martin-Eauclaire MF. Characterization of a new peptide from *Tityus serrulatus* scorpion venom which is a ligand of the apamin-binding site. *FEBS letters* 1996;390:81-4.
- [128] Jouirou B, Mosbah A, Visan V, Grissmer S, M'Barek S, Fajloun Z, et al. Cobatoxin 1 from *Centruroides noxius* scorpion venom: chemical synthesis, three-dimensional structure in solution, pharmacology and docking on K<sup>+</sup> channels. *Biochem J* 2004;377:37-49.
- [129] Nieto AR, Gurrola GB, Vaca L, Possani LD. Noxiustoxin 2, a novel K<sup>+</sup> channel blocking peptide from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon* 1996;34:913-22.
- [130] Laraba-Djebari F, Legros C, Crest M, Ceard B, Romi R, Mansuelle P, et al. The kaliotoxin family enlarged. Purification, characterization, and precursor nucleotide sequence of KTX2 from *Androctonus australis* venom. *J Biol Chem* 1994;269:32835-43.

- [131] Crest M, Jacquet G, Gola M, Zerrouk H, Benslimane A, Rochat H, et al. Kaliotoxin, a novel peptidyl inhibitor of neuronal BK-type Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels characterized from *Androctonus mauretanicus mauretanicus* venom. *J Biol Chem* 1992;267:1640-7.
- [132] Lebrun B, Romi-Lebrun R, Martin-Eauclaire MF, Yasuda A, Ishiguro M, Oyama Y, et al. A four-disulphide-bridged toxin, with high affinity towards voltage-gated K<sup>+</sup> channels, isolated from *Heterometrus spinnifer* (Scorpionidae) venom. *Biochem J* 1997;328 ( Pt 1):321-7.
- [133] Koch RO, Wanner SG, Koschak A, Hanner M, Schwarzer C, Kaczorowski GJ, et al. Complex subunit assembly of neuronal voltage-gated K<sup>+</sup> channels. Basis for high-affinity toxin interactions and pharmacology. *J Biol Chem* 1997;272:27577-81.
- [134] Pedarzani P, D'Hoedt D, Doorty KB, Wadsworth JD, Joseph JS, Jeyaseelan K, et al. Tamapin, a venom peptide from the Indian red scorpion (*Mesobuthus tamulus*) that targets small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels and afterhyperpolarization currents in central neurons. *J Biol Chem* 2002;277:46101-9.
- [135] Bartschat DK, Blaustein MP. Potassium channels in isolated presynaptic nerve terminals from rat brain. *J Physiol* 1985;361:419-40.
- [136] Koschak A, Bugianesi RM, Mitterdorfer J, Kaczorowski GJ, Garcia ML, Knaus HG. Subunit composition of brain voltage-gated potassium channels determined by hongotoxin-1, a novel peptide derived from *Centruroides limbatus* venom. *J Biol Chem* 1998;273:2639-44.
- [137] Vacher H, Romi-Lebrun R, Mourre C, Lebrun B, Kourrich S, Masméjean F, et al. A new class of scorpion toxin binding sites related to an A-type K<sup>+</sup> channel: pharmacological characterization and localization in rat brain. *FEBS Lett* 2001;501:31-6.
- [138] Romi-Lebrun R, Lebrun B, Martin-Eauclaire MF, Ishiguro M, Escoubas P, Wu FQ, et al. Purification, characterization, and synthesis of three novel toxins from the Chinese scorpion *Buthus martensi*, which act on K<sup>+</sup> channels. *Biochemistry* 1997;36:13473-82.
- [139] Tarcha EJ, Chi V, Munoz-Elias EJ, Bailey D, Londono LM, Upadhyay SK, et al. Durable pharmacological responses from the peptide ShK-186, a specific Kv1.3 channel inhibitor that suppresses T cell mediators of autoimmune disease. *J Pharmacol Exp Ther* 2012;342:642-53.
- [140] Koshy S, Huq R, Tanner MR, Atik MA, Porter PC, Khan FS, et al. Blocking Kv1.3 channels inhibits Th2 lymphocyte function and treats a rat model of asthma. *J Biol Chem* 2014.
- [141] Koo GC, Blake JT, Talento A, Nguyen M, Lin S, Sirotna A, et al. Blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 inhibits immune responses in vivo. *J Immunol* 1997;158:5120-8.
- [142] Upadhyay SK, Eckel-Mahan KL, Mirbolooki MR, Tjong I, Griffey SM, Schmunk G, et al. Selective Kv1.3 channel blocker as therapeutic for obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:E2239-48.
- [143] Pennington MW, Beeton C, Galea CA, Smith BJ, Chi V, Monaghan KP, et al. Engineering a stable and selective peptide blocker of the Kv1.3 channel in T lymphocytes. *Mol Pharmacol* 2009;75:762-73.
- [144] Takacs Z, Toups M, Kollwe A, Johnson E, Cuello LG, Driessens G, et al. A designer ligand specific for Kv1.3 channels from a scorpion neurotoxin-based library. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:22211-6.
- [145] Mouhat S, Visan V, Ananthakrishnan S, Wulff H, Andreotti N, Grissmer S, et al. K<sup>+</sup> channel types targeted by synthetic OSK1, a toxin from *Orthochirus scrobiculosus* scorpion venom. *Biochem J* 2005;385:95-104.
- [146] Grissmer S, Nguyen AN, Aiyar J, Hanson DC, Mather RJ, Gutman GA, et al. 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* 1994;45:1227-34.



- [147] Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 1981;391:85-100.
- [148] Kis-Toth K, Hajdu P, Bacskai I, Szilagyi O, Papp F, Szanto A, et al. Voltage-gated sodium channel Nav1.7 maintains the membrane potential and regulates the activation and chemokine-induced migration of a monocyte-derived dendritic cell subset. *J Immunol* 2011;187:1273-80.
- [149] Robbins CA, Tempel BL. Kv1.1 and Kv1.2: similar channels, different seizure models. *Epilepsia* 2012;53 Suppl 1:134-41.
- [150] Wang H, Kunkel DD, Schwartzkroin PA, Tempel BL. Localization of Kv1.1 and Kv1.2, two K channel proteins, to synaptic terminals, somata, and dendrites in the mouse brain. *J Neurosci* 1994;14:4588-99.
- [151] Regaya I, Beeton C, Ferrat G, Andreotti N, Darbon H, De Waard M, et al. Evidence for domain-specific recognition of SK and Kv channels by MTX and HsTx1 scorpion toxins. *J Biol Chem* 2004;279:55690-6.
- [152] Kharrat R, Mansuelle P, Sampieri F, Crest M, Oughideni R, Van Rietschoten J, et al. Maurotoxin, a four disulfide bridge toxin from *Scorpio maurus* venom: purification, structure and action on potassium channels. *FEBS letters* 1997;406:284-90.
- [153] M'Barek S, Mosbah A, Sandoz G, Fajloun Z, Olamendi-Portugal T, Rochat H, et al. Synthesis and characterization of Pi4, a scorpion toxin from *Pandinus imperator* that acts on K<sup>+</sup> channels. *Eur J Biochem* 2003;270:3583-92.
- [154] Mouhat S, Mosbah A, Visan V, Wulff H, Delepierre M, Darbon H, et al. 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* 2004;377:25-36.
- [155] Mourre C, Chernova MN, Martin-Eauclaire MF, Bessone R, Jacquet G, Gola M, et al. Distribution in rat brain of binding sites of kaliotoxin, a blocker of Kv1.1 and Kv1.3 alpha-subunits. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;291:943-52.
- [156] Giangiacomo KM, Ceralde Y, Mullmann TJ. Molecular basis of alpha-KTx specificity. *Toxicon* 2004;43:877-86.
- [157] Castle NA, London DO, Creech C, Fajloun Z, Stocker JW, Sabatier JM. Maurotoxin: a potent inhibitor of intermediate conductance Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channels. *Mol Pharmacol* 2003;63:409-18.
- [158] Olamendi-Portugal T, Gomez-Lagunas F, Gurrola GB, Possani LD. Two similar peptides from the venom of the scorpion *Pandinus imperator*, one highly effective blocker and the other inactive on K<sup>+</sup> channels. *Toxicon* 1998;36:759-70.
- [159] Romi-Lebrun R, Martin-Eauclaire MF, Escoubas P, Wu FQ, Lebrun B, Hisada M, et al. Characterization of four toxins from *Buthus martensi* scorpion venom, which act on apamin-sensitive Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *Eur J Biochem* 1997;245:457-64.
- [160] Srairi-Abid N, Shahbazzadeh D, Chatti I, Mlayah-Bellalouna S, Mejdoub H, Borchani L, et al. Hemitoxin, the first potassium channel toxin from the venom of the Iranian scorpion *Hemiscorpius lepturus*. *FEBS J* 2008;275:4641-50.
- [161] Luna-Ramirez K, Bartok A, Restano-Cassulini R, Quintero-Hernandez V, Coronas F, Christensen J, et al. Structure, Molecular Modeling and Function of the First Potassium Channel Blocker, Urotoxin, Isolated from the Venom of the Australian Scorpion *Urodoacus yaschenkoi*. *Mol Pharmacol* 2014.
- [162] Judge SI, Bever CT, Jr. Potassium channel blockers in multiple sclerosis: neuronal Kv channels and effects of symptomatic treatment. *Pharmacol Ther* 2006;111:224-59.
- [163] Shi R, Sun W. Potassium channel blockers as an effective treatment to restore impulse conduction in injured axons. *Neurosci Bull* 2011;27:36-44.

- [164] Jang SH, Choi SY, Ryu PD, Lee SY. Anti-proliferative effect of Kv1.3 blockers in A549 human lung adenocarcinoma in vitro and in vivo. *Eur J Pharmacol* 2011;651:26-32.
- [165] Kazama I, Maruyama Y, Murata Y, Sano M. Voltage-dependent biphasic effects of chloroquine on delayed rectifier K(+)-channel currents in murine thymocytes. *J Physiol Sci* 2012;62:267-74.
- [166] Toldi G, Bajnok A, Dobi D, Kaposi A, Kovacs L, Vasarhelyi B, et al. The effects of Kv1.3 and IKCa1 potassium channel inhibition on calcium influx of human peripheral T lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Immunobiology* 2013;218:311-6.
- [167] Zhao N, Dong Q, Du LL, Fu XX, Du YM, Liao YH. Potent suppression of Kv1.3 potassium channel and IL-2 secretion by diphenyl phosphine oxide-1 in human T cells. *PLoS One* 2013;8:e64629.
- [168] Anangi R, Koshy S, Huq R, Beeton C, Chuang WJ, King GF. Recombinant expression of margatoxin and agitoxin-2 in *Pichia pastoris*: an efficient method for production of KV1.3 channel blockers. *PLoS One* 2012;7:e52965.
- [169] Suarez-Kurtz G, Vianna-Jorge R, Pereira BF, Garcia ML, Kaczorowski GJ. Peptidyl inhibitors of shaker-type Kv1 channels elicit twitches in guinea pig ileum by blocking kv1.1 at enteric nervous system and enhancing acetylcholine release. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;289:1517-22.
- [170] Vianna-Jorge R, Oliveira CF, Garcia ML, Kaczorowski GJ, Suarez-Kurtz G. Shaker-type Kv1 channel blockers increase the peristaltic activity of guinea-pig ileum by stimulating acetylcholine and tachykinins release by the enteric nervous system. *Br J Pharmacol* 2003;138:57-62.
- [171] Arkett SA, Dixon J, Yang JN, Sakai DD, Minkin C, Sims SM. Mammalian osteoclasts express a transient potassium channel with properties of Kv1.3. *Receptors Channels* 1994;2:281-93.
- [172] Li YF, Zhuo YH, Bi WN, Bai YJ, Li YN, Wang ZJ. Voltage-gated potassium channel Kv1.3 in rabbit ciliary epithelium regulates the membrane potential via coupling intracellular calcium. *Chin Med J (Engl)* 2008;121:2272-7.
- [173] Saria A, Seidl CV, Fischer HS, Koch RO, Telser S, Wanner SG, et al. Margatoxin increases dopamine release in rat striatum via voltage-gated K+ channels. *Eur J Pharmacol* 1998;343:193-200.
- [174] He B, Soderlund DM. Human embryonic kidney (HEK293) cells express endogenous voltage-gated sodium currents and Na v 1.7 sodium channels. *Neurosci Lett* 2010;469:268-72.
- [175] Yu SP, Kerchner GA. Endogenous voltage-gated potassium channels in human embryonic kidney (HEK293) cells. *J Neurosci Res* 1998;52:612-7.
- [176] Jiang B, Sun X, Cao K, Wang R. Endogenous Kv channels in human embryonic kidney (HEK-293) cells. *Mol Cell Biochem* 2002;238:69-79.
- [177] Varghese A, Tenbroek EM, Coles J, Jr., Sigg DC. Endogenous channels in HEK cells and potential roles in HCN ionic current measurements. *Prog Biophys Mol Biol* 2006;90:26-37.
- [178] Zhu G, Zhang Y, Xu H, Jiang C. Identification of endogenous outward currents in the human embryonic kidney (HEK 293) cell line. *J Neurosci Methods* 1998;81:73-83.

## 10 Az értekezésben gyakran használt rövidítések jegyzéke

CRAC	Calcium Release Activated Channels
IP <sub>3</sub>	inozitol trifoszfát
K <sub>v</sub>	feszültség-aktivált káliumcsatorna
KCa	kalcium-aktivált káliumcsatorna
T <sub>CM</sub>	centrális memória T sejt
T <sub>EM</sub>	effektor memória T sejt
KTx	K <sup>+</sup> csatorna gátló toxin
MgTx	margatoxin
AnTx	anuroctoxin
M.Á.H.	megmaradó áramhányad
IC <sub>50</sub>	félhatásos koncentráció

## 11 Tárgyszavak/Keywords

Kv1.3, Kv1.1, Kv1.2, feszültség-aktivált káliumcsatorna, Ca<sup>2+</sup>-aktivált káliumcsatorna, skorpiótoxin, ioncsatorna gátlószer, margatoxin, anuroctoxin, autoimmun megbetegedés, effektor memória T sejt, patch-clamp technika

Kv1.3, Kv1.1, Kv1.2, voltage-gated potassium channel, Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channel, scorpion toxin, ion channel blocker, margatoxin, anuroctoxin, autoimmune disease, effector memory T cell, patch-clamp technique

## 12 Köszönetnyilvánítás

Hálával tartozom Prof. Szöllősi Jánosnak, a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet Igazgatójának, hogy biztosította munkavégzésem feltételeit.

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Varga Zoltánnak a kutatásom során nyújtott segítséget, illetve Prof. Panyi Györgynek, hogy csatlakozhattam a munkacsoportjához, továbbá hogy aktívan részt vett a munkám irányításában.

Külön köszönet illeti Dr. Hajdú Pétert és Dr. Papp Ferencet, hogy megtanítottak az elektrofiziológiai mérések kivitelezésére.

Köszönet illeti Nagy Cecíliát, munkacsoportunk asszisztensét, illetve a munkacsoportunk összes lelkes tagját, akik mindig készségesen segítettek a munkámat.

Mindezen felül leginkább a családomnak és Kedvesemnek tartozok a legtöbb hálával.

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.



## 13 Publikációs lista



DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR  
PUBLIKÁCIÓK



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<sup>+</sup> channels. *Toxicon*. "accepted by publisher", 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.05.002>  
IF:2.924 (2012)
2. Luna-Ramirez, 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 *Urodacus yaschenko*. *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<sup>+</sup>-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 tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.05.30



## **14 Függlék**