

**K<sup>+</sup> CSATORNÁK VIZSGÁLATA NATÍV ÉS EXPRESSZIÓS RENDSZEREK BEN**



**HAJDÚ PÉTER BÉLA**

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

**DEBRECEN, 2002**

Témavezető:  
Dr. Gáspár Rezső  
Dr. Panyi György

A szigorlati bizottság elnöke:

A szigorlati bizottság tagjai

A védési bizottság elnöke:

Opponensek:

A védési bizottság tagjai:

## I. BEVEZETÉS

A specifikus antigén hatására *in vivo* kialakuló immunválasz feltétele a sejtek osztódását és differenciálódását magában foglaló limfocita aktiváció. Ennek kiinduló lépése a T-sejt receptor/CD3 (TCR/CD3) receptor komplex aktiválása, amelyet protein kinázok (PK) valamint a foszfatidil inozitol ( $IP_3$ ) másodlagos hírvivő rendszer iniciálása követ. A folyamat eredményeképp az intracelluláris szabad  $Ca^{2+}$  szint megnövekszik, és a protein kináz C (PKC) aktiválódik. Az előbbi biokémiai folyamatok mellett számos fizikai tényező is szerepet játszik a plazmamembránon keresztül történő proliferatív jel a citoplazma és a gének irányába történő közvetítésében.

A limfocitákban eddig sokféle ioncsatornát ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cl^-$ ) azonosítottak, de csak néhányat sikerült közülük megfelelően jellemezni, azok plazmamembránbeli koncentrációját és kromoszóma lokalizációját beleértve. A humán T limfociták domináns ioncsatornája az *n*-típusú, depolarizációra aktiválódó  $K^+$  csatorna, mely aminosav szekvencia homológia alapján a Kv1.3 kódot kapta. Az *n*-típusú csatornától eltérő kinetikai paraméterekkel és gyógyszer érzékenységgel rendelkező *n'* és *l*-típusú  $K^+$  csatornák jelenlétét eddig csak egér eredetű limfocitákon írták le.  $Ca^{2+}$  aktivált  $K^+$  csatornák találhatóak humán leukémiás T sejtekben és humán perifériás vérből preparált T sejtekben. A limfocita  $K^+$  csatorna variabilitást molekuláris biológiai kutatási eredmények is alátámasztják.

Számos, egymástól független bizonyíték utal arra, hogy a  $K^+$  csatornák szerepet játszanak a T sejt proliferációban:

- A nyugvó T sejtek membránjának  $K^+$  konduktanciája megnő a mitogén indukált hiperpolarizációt követően.
- A feszültség vezérelt  $K^+$  csatornák száma többszörösére emelkedhet a mitogén aktiváció során.
- A hagyományos  $K^+$  csatorna gátlószerek, mint tetraetil-ammonium (TEA), charybdotoxin (ChTx), noxiustoxin (NxTx), margatoxin (MgTx) gátolják mind a limfociták  $K^+$  áramait,

mind pedig a sejtek mitogén stimuláció eredményeként előálló proliferációját nem csak *in vitro*, hanem *in vivo* is.

Jelenleg még nem tisztázott, hogy a  $K^+$  csatornák pontosan milyen mechanizmusokon keresztül hatnak a T sejt aktivációra. Mivel a limfociták membránpotenciálját elsősorban a  $K^+$  diffúziós potenciál határozza meg, így valószínűleg a  $K^+$  csatorna gátlószerek a membrán depolarizációja révén akadályozzák meg az intracelluláris  $Ca^{2+}$  szint megemelkedését. Ez alapján valószínűsíthető, hogy a  $K^+$  csatornák nyugalmi membránpotenciált kellően negatív értéken tartva segítik elő a  $Ca^{2+}$  szignál kialakulását.

A Kv1.3 csatorna, mely felelős a limfociták *n*-típusú áramának kialakulásáért, a  $K^+$  csatornák *Shaker* családjába tartozik. A *Shaker* csatornák négy azonos alegységből felépülő tetramer makromolekulák, mely alegységek hat,  $\alpha$ -helikális transzmembrán szegmensből állnak, melyeket meghatározott funkcióval rendelkező extra- és intracelluláris hurkok kapcsolnak össze.

A *Shaker* csatornák depolarizáció hatására gyorsan kinyitnak, majd egy nem vezető ún. inaktivált állapotba kerülnek. A csatornák aktiválódása során az S4 transzmembrán szegmens - az itt elhelyezkedő pozitív töltésű aminosavak miatt - az extracelluláris tér irányába mozdul, s ezáltal konformációváltozást idéz elő a csatornafehérjében, mely során a pórus régió keresztül kiáramlanak a  $K^+$  ionok.

A *Shaker* csatornák inaktivációja az N-típusú és a C-típusú inaktiváció révén valósulhat meg. Az N-típusú mechanizmust a szakirodalom a „ball-and-chain” modell jellemzi. A modell szerint az intracelluláris (N-terminális) oldalon egy több pozitív töltést tartalmazó peptid szakasz („labda”) kapcsolódik minden csatornaalegységhez egy fehérje szálon („lánc”) keresztül, melyek az inaktiváció során bekötődnek a csatorna pórusába és eltömítik. A Kv1.3 csatornában hiányzik ez az inaktivációs egység, így inaktivációjáért kizárólag a C-típusú a felelős. A C-inaktiváció egy összetett, eddig nem tisztázott molekuláris folyamat eredménye, amely kialakulására két elfogadott magyarázat is létezik:

- Az inaktiváció során az egyes alegységek kooperatív kölcsönhatása révén a csatorna külső pórusának teljes beszűkülése megakadályozza az ionok áramlását.
- A csatorna szelektivitási filterének konformációs változása miatt az inaktivált csatornák nem permeábilisak  $K^+$ -ra, viszont más ionokra (pl.:  $Na^+$ ) ekkor válhatnak permeábilissá.

Mind a négy alegységben található, S5 és S6 -hélixeket összekötő oligopeptid szakaszok együttesen alkotják a csatorna pórusát. Ebben a szakaszban található az a négy aminosavból álló szekvencia, amely feltételezhetően felelős a  $K^+$  szelektivitásért. Továbbá a csatorna pórusát eltömítő gátlószerek is e régió aminosav oldalláncaival lépnek kölcsönhatásba.

A csatornaműködés megértésében az ioncsatorna gátlószerek specifikus kötődésük miatt struktúra-funkció vizsgálatra alkalmasak. A gátlószerek kémiai összetételük alapján két csoportra oszthatók: a peptid és a nem peptid típusúakra. Az előbbi csoportba sorolhatók a különböző állatfajok (pl. skorpiók, kígyók) által termelt méreganyagok (venom), melyek nagy affinitással képesek kötődni a  $K^+$  csatorna fehérjéhez.

A peptid blokkolók többsége úgy fejt ki hatását, hogy a csatorna extracelluláris pórusába kötődve elzárják a  $K^+$  ionok áthaladásának útját (pórus-blokkolók). Ismert szekvenciájú toxinok (ChTx) és a csatornafehérje együttes mutációja révén sikerült csatornapórus topológiájának és az egyes aminosavak szerepének meghatározása.

A peptid inhibitorok többségétől eltérő blokkolási mechanizmusa miatt nagy jelentőséggel bír egy pók venomból izolált toxin, a hanatoxin (HnTx). A HnTx nem a csatorna pórusába kötődik, hanem a *Shaker* csatorna S3 szegmensein található kötőhelyen keresztül módosítja a csatorna kapuzását, gátolva a  $K^+$  áramot: a hanatoxin molekula kötődése a pozitív irányba tolja el a csatorna-aktiváció feszültség függését (gating-modifier: „kapuzás-módosító” hatású).

A peptid inhibitorok mellett a nem peptid típusú gátlószerek alkalmazása is jelentős előrelépést hozott a csatornafunkció, a kapuzási mechanizmusok felderítésében. Ezek a molekulák egyszerűbb szerkezetűek, eltérő a blokkolási mechanizmusuk és kötőhelyeik eltérő lokalizációja

miatt bizonyultak a viszonylag magas félhatásos koncentráció ellenére alkalmasnak a struktúra-funkció feltérképezésében.

A  $K^+$  csatornák egyik leggyakrabban használt nem peptid gátlószere a tetraetil-ammónium (TEA), melynek segítségével az N- és C-inaktiváció elkülöníthető, azáltal, hogy a *Shaker* csatornák extra- és intracelluláris pórusában is található TEA kötőhely. A TEA molekula a *Shaker* csatorna nyitott pórusába kötődve blokkolja a kálium ionok áramát, és lelassítja az áram inaktivációját.

A nem peptid blokkolók között is található olyan vegyület, amely nem közvetlenül a pórus „eltömítése” révén, hanem bizonyos csatornafunkciók módosításán keresztül fejt ki hatását. Ulens és munkatársai HERG (**h**uman **e**ther-à-go-go (**eag**) **r**elated **g**ene) csatornákon kimutatták, hogy propoxyphene és annak metabolitja, a D-norpropoxyphene megváltoztatja a csatorna kapuzását és szelektivitását (Ulens et al. *Cardiov. Res.* 1999.). Ha a csatorna ionszelektivitását egy pontmutációval megszüntették, akkor a két gátlószernak semmiféle hatását nem tapasztalták.

A sejtek plazmamembránja egy foszfolipid kettős réteg, amelyben különféle receptorfehérjék, glikoproteinek, koleszterin, sphingolipid stb. található. Ez a lipid kettősréteg nem tekinthető merev rendszernek, hanem a benne lévő alkotórészek diffúzióra képesek, sőt akár egymással kölcsönhatnak; ez a felismerés vezetett 1972-ben a Singer és Nicholson által felállított modellhez. A sejt élete során a sejtmembrán összetétele különböző okok miatt (betegség, öregedés, étrendváltozás stb.) megváltozhat, ezáltal befolyásolja a membrán biofizikai sajátságait (viszkozitás, görbület, feszülés stb.) és módosítja az integrális fehérjék funkcióját.

Koleszterin, amely az egyik meghatározó eleme az emlős sejtek membránjának, a membrán kettősréteg külső felében található, és elsősorban annak dinamikai paramétereit módosítja. *In vitro* kimutatták, hogy a sejtmembrán nem csak magas koleszterin szintje, hanem az élettani értéknél alacsonyabb koncentráció is gátolja a receptorfehérjék (nAChR,  $Na^+K^+$ -ATP-áz) megfelelő működését. Emellett számos tény támasztja alá, hogy a membrán koleszterintartalmának változtatása módosítja az ioncsatornák működését. Általánosan elmondható, hogy a koleszterin

szint növelése csökkenti a csatornák aktivitását, míg kivonása stimulálja azokat. Jelenleg elfogadott elmélet szerint, a membrán viszkozitása egyrészt mechanikai, másrészt a lipid-fehérje kölcsönhatás által hat a csatornafehérje membránbeli mozgására. Ez utóbbi feltevést alátámasztják a *Shaker* csatornák S1-S3 transzmembrán szegmensében végzett triptofán/alanin pontmutációs kísérletek.

Martens és munkatársai kísérleteikkel igazolták a közelmúltban, hogy bizonyos  $K^+$  csatornák (Kv2.1 és Kv1.5) expressziós rendszertől függetlenül speciális mikrodoménekben, ún. raftokban (tutajokban) helyezkednek el, ellenben mások nem (Kv4.2). A membrán koleszterintartalmának kivonása, mely a lipid tutajrendszer szétesését segíti elő, a csatorna-raftok felbomlását jelentette, megváltoztatva a csatornák kapuzására jellemző egyensúlyi.

### **A kétpórusú $K^+$ csatornák**

A  $K^+$  csatornák egyre bővülő családját alkotják a két alegységből felépülő, alegységenként két pórus régiót tartalmazó (P1 ill. P2), ún. 2-pórusú  $K^+$  csatornák. Az egyes alegységek a membránt teljesen átívelő négy,  $\alpha$ -helikális szegmensből (M1-M4) állnak, melyeket intra- és extracelluláris hurkok kötnek össze. A csatornák aktiválása teljesen különböző szignálok hatására jöhet létre. Közös jellemzőjük, hogy intrinsic feszültség-kapuzással nem rendelkeznek, a hagyományos peptid (ChTx, MgTx stb.) és nem peptid jellegű (TEA, 4-AP)  $K^+$  csatorna gátlószerekre kis mértékben vagy egyáltalán nem szenzitívek. Feltételezhető élettani szerepük a nyugalmi membrán potenciál kialakításában és fenntartásában van, ezek a csatornák tehetők felelőssé a „szivárgási” áramért.

A humán genom projektnek köszönhetően sikerült az első humán eredetű kétpórusú csatornát, a TWIK-1-et (Two-pore Weak Inward Rectifier  $K^+$  channel) k, majd expresszálni emlős sejtekben. Ezenfelül kimutatták a TWIK-1 esetében, hogy az M1 és P1 régió között található extracelluláris hurok ciszteinjé (C69) felelős az alegységek homodimerizációjáért. Továbbá

különböző csatornák alegységei (TASK-1 és TASK-5) expresszáldva funkcionális heterodimereket képeznek.

Az általunk vizsgált, egér myocytákból izolált cTBAK-1 (Cardiac Two-pore Background  $K^+$  channel)  $K^+$  csatorna az aminosav homológia (99%) és elektrofiziológiai tulajdonságok alapján az egér TASK-1 (TWIK Related Acidic Sensitive  $K^+$  channel) csatornával azonos, és az ún. Goldman-Hodgkin-Katz-egyenirányító,  $K^+$ -szelektív csatornához tartoznak. Mindkét csatorna rendkívül érzékeny az extracelluláris pH fiziológias tartományon belül történő változásaira, mely a szelektivitási szűrő közelében található hisztidin oldalláncnak tulajdonítható. Másrészt, TASK-1 csatornának jelenleg egyetlen nagy affinitású, specifikus és direkt gátlószere ismert: szervezet által termelt endocannabinoid típusú vegyület, az anandamid.

Az elmúlt években több tanulmány is beszámolt arról, hogy a TASK-1 csatorna a központi idegrendszer sejtjeiben expresszálddik, így feltehetőleg fontos szerepet játszik azok nyugalmi potenciáljának kialakításában, ezáltal befolyásolva elektromos aktivitásukat. Továbbá arra is fény derült, hogy a klinikai gyakorlatban alkalmazott különböző altató és érzéstelenítő vegyületek (éter, halotán, kloroform) gátló vagy éppen ellenkezőleg, serkentő módon hatnak a TASK-1 csatorna működésére; mely azt igazolhatja, hogy valószínűleg ezen ioncsatornán keresztül történik meg az idegrendszer „átmeneti blokkolása” az anasztetia során.

## II. CÉLKITŰZÉSEK

1. A sejtmembrán összetétele, az egyes alkotóelemek aránya a különböző fiziológias és patofiziológias tényezők hatására megváltozik, mely maga után vonja a membrán fizikokémiai és strukturális módosulását. A membránban elhelyezkedő fehérjék normális működésének elengedhetetlen feltétele a membrán megfelelő fizikai és kémiai állapota. Ezért kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy a Kv1.3 csatorna működését miképpen befolyásolja a lipid milió módosulása, különös tekintettel a koleszterin tartalom megváltozására.



2. A *Pandinus imperator* venomjából izolált P1 toxin a többi frakciótól eltérően négy diszulfid híddal rendelkezik, eltérően a szokásos hat cisztein alkotta három kovalens hídtól. Ennek ismeretében azt kutattuk, hogy a feltételezhetően kompaktabb struktúra miképpen befolyásolja a Kv1.3 csatorna gátlását.
3. Az általunk alkalmazott cTBAK csatorna gátlószerekről, a fluoxetine-ről (*FL*) és a D-norpropoxyphene-ről (*NORP*) vizsgálataink során kiderült, hogy teljesen eltérő a hatásmechanizmusuk. A *FL* klasszikus pórusblokkolónak bizonyult, míg a *NORP* megváltoztatta a csatorna szelektivitását. A csatorna fehérje mutációjának segítségével kívántuk kideríteni, hogy a *NORP* a csatorna mely régiójával lép kölcsönhatásba.

### III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtek: A T sejteket Ficoll gradiens centrifugálással nyertük heparinózott humán vérből. A tenyésztő médiumhoz phytohemagglutinint adtunk a  $K^+$  csatorna expresszió növelése érdekében.

A *Xenopus laevis* oocitákat nőstény karmos békákból nyertük. A mikroinjektálást megelőzően a sejteket méret és kondíciójuk szerint szelektáltuk, antibiotikumot tartalmazó ND-96 oldatban tartottuk a mérés kezdetéig.

Elektrofiziológia: A tenyésztett limfocitákból a T-sejteket a mérések előtt a monoklonális antitest adhéziós módszerrel szelektáltuk. A méréseinket a patch-clamp technika teljes-sejt konfigurációjában végeztük. Méréseinkhez Axopatch 200 és 200A patch-clamp erősítőket használtunk feszültség-zár üzemmódban, méréseinket a pCLAMP 6.0 és 8.0 programcsomag segítségével végeztük. A méréseink során használt extracelluláris oldat NaCl alapú  $Ca^{2+}$ -ot és  $Mg^{2+}$ -ot tartalmazó oldat volt. A pipetta töltőfolyadék KF alapú, EGTA-t tartalmazó oldat volt.

Az oocitákat 50 nl cRNS-sel (0,1 ng/nl) injektáltuk, majd 2-4 nap múlva kételektrodás feszültség-zár technikával mértük az ionáramokat, GeneClamp 500 erősítő használatával. Az alábbi extracelluláris oldatokat használtuk kísérleteink során: NaCl alapú oldat, magas kálium tartalmú oldat, 300  $\mu$ M  $BaCl_2$  tartalmazó oldat,  $Na^+$  mentes oldat (a  $Na^+$ -ot TRIS-sel helyettesítettük). Az

elektródákat 3 M-os KCl oldattal töltöttük meg. Az oldatok cseréjét mindkét rendszer esetében gravitáció hajtott perfúziós rendszerrel végeztük. A folyadéktöbbletet folyamatos szívással távolítottuk el.

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

Koleszterin manipuláció: Az aktivált T limfociták koleszterin kezelése során a sejteket metilált- $\beta$ -cyclodextrin/koleszterin-t (M $\beta$ CD/C) vagy metilált- $\beta$ -cyclodextrin-t (M $\beta$ CD) tartalmazó Hanks' oldatban inkubáltuk. Kontroll sejtek esetében M $\beta$ CD/C vagy M $\beta$ CD nélkül inkubáltuk.

Mutagenézis kísérletek: A pGEMHE/cTBAK-1 vektort templátként használva PCR segítségével Y105F és F211Y mutációkat hoztunk létre a megfelelő primerek felhasználásával. A PCR mutagenézis eredményességét enzim restrikciós módszerrel ellenőriztük. *In vitro* transzkripcióhoz a pGEMHE/cTBAK-1 vektort linearizáltuk, majd capped cRNS-t szintetizáltunk.

#### **IV. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSEK**

##### **1. A koleszterin hatása a Kv1.3 csatornák inaktivációs és aktivációs kapuzására**

Kísérleteink során a M $\beta$ CD-t, és annak koleszterinnel telített komplexét, a M $\beta$ CD/C-t használtuk, hogy a T limfociták membránjának koleszterintartalmát módosítsuk. A kezelések eredményességét két független módszer segítségével ellenőriztük (anizotrópia mérés ill. kapacitásra normált áramsűrűség összehasonlítása), és azt találtuk, hogy a membrán koleszterintartalmának változtatása mindkét irányban hatásos volt.

A Kv1.3 csatornák a +50 mV-os depolarizáció hatására gyorsan kinyitnak, majd egy nem vezető inaktivált állapotba jutnak, melyet az áram viszonylagos lassú exponenciálisan lecsengő szakasza jellemez a csatorna C-típusú inaktivációjának megfelelően. Az áramgörbe leszálló ágát egy exponenciális függvényvel illesztettük ( $I(t) = I_0 \times \exp(-t/\tau_{in}) + C$ ,  $I_0$ : áram amplitúdója,  $\tau_{in}$ : az

inaktivációs időállandó,  $C$ : áram egyensúlyi értéke), és az inaktiváció kinetikai jellemzésére az inaktivációs időállandót ( $\tau_{in}$ ) használtuk. A T sejtek membránjának M $\beta$ CD-nel (0,95 és 1,425 mg/ml) történő koleszterintartalom csökkentése az inaktiváció gyorsulását eredményezte. Ellenben a koleszterinszint emelésével (1 és 1,5 mg/ml), amikor az inaktivációs állandó szignifikánsan növekedett. A csúcsáramra normált egyensúlyi áram értéke jelentősen megemelkedett a koleszterin bevitel hatására, amely szintén alátámasztja az áram inaktivációjának lassulását.

A Kv1.3 csatornák aktivációja vizsgálatokor +50 mV-os rövid impulzusokat alkalmaztunk. Az aktivációs áramgörbéket a Hodgkin-Huxley (HH)  $n^4$ -es modellnek megfelelően illesztettük. A koleszterinszint 1 és 1,5 mg/ml M $\beta$ CD/C-nel való növelése az áram aktivációjának jelentős lassulását okozta. A M $\beta$ CD-nel előkezelt limfociták kálium áramai a kontroll sejtekkel azonos aktivációs kinetikát mutattak.

Ha a sejteket 1 ill. 1,5 mg/ml M $\beta$ CD/C-nel inkubáltuk, akkor az aktiváció egyes T sejtek esetében kétfázisúvá vált. Ez esetben az aktivációs áramgörbét két exponenciális taggal rendelkező függvénnyel illesztettük; az aktivációt a gyors ( $I_{a,f}$ ) ill. lassú ( $I_{a,s}$ ) komponens amplitúdójából származtatott  $R$  paraméterrel ( $R = I_{a,f}/(I_{a,f} + I_{a,s})$ ), valamint a gyors ( $\tau_{a,f}$ ) és a lassú ( $\tau_{a,s}$ ) komponenshez tartozó időállandóval jellemeztük. A kétfázisú aktiváció „gyors időállandója” a kontrollhoz képest szignifikánsan nőtt, míg mind lassú áramkomponens időállandója, mind az  $R$  paraméter nem különböztek a két kezelés összehasonlítása során, ezenfelül az utóbbi feszültség függést sem mutatott.

A koleszterin által módosított aktivációs és inaktivációs kinetika befolyásolhatja a két folyamatot jellemző egyensúlyi paramétereket, amelyek a különböző konformációs állapotban (pl. nyitott-zárt, zárt-inaktivált) lévő csatornák egyensúlyi megoszlásáról nyújtanak információt egy adott membránpotenciál értéknél. A normált teljes-sejt konduktancia ( $G_N$ ) tesztfeszültség függésével az aktivációt, a visszatért áramhányad membránpotenciál függésének meghatározásával pedig az inaktivációt jellemeztük, majd az adatpontokhoz illesztett Boltzman függvények

paramétereit használtuk a változások mértékének kifejezésére. Az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggésének középpontja kontrol sejtekhez képest ( $-27,5 \pm 1,2$  mV) a membrán koleszterinszint növekedés hatására pozitív irányba tolódott el ( $-20,2 \pm 2,0$  mV (1mg/ml) és  $-20,9 \pm 1,3$  mV (1.5 mg/ml)). Továbbá a meredekség a kontrolnál kapott  $8,32 \pm 0,2$  mV-ról  $10,1 \pm 0,56$  mV (1,0 mg/ml) ill.  $9,61 \pm 0,26$  mV-ra (1,5 mg/ml) változott, mely szignifikáns változásnak bizonyult ( $p = 0.002$ ). Mint azt előzőleg már tapasztalhattuk, a koleszterin kivonása nem okozott változást az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggésében sem. A visszatért áramhányad membránpotenciál függését, amely az inaktivált és zárt csatornák arányát jellemzi egy adott tartófeszültség értéken, a koleszterinszint változtatása nem módosította.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a T sejt membránjának koleszterin koncentrációjának növelése egyaránt módosítja a Kv1.3 csatornák aktivációs és inaktivációs kapuzását, a koleszterinszint csökkentése nem eredményezett biológiai relevanciát. Az aktiváció lassulása a csatornafehérje S1-S4 szegmensei aminosav-oldalláncai és a lipid molekulák között fellépő erősebb kölcsönhatás következménye.

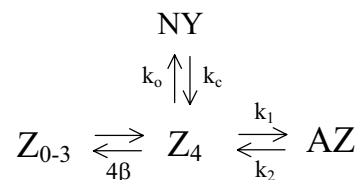
Az aktiváció kétfázisú viselkedésének magyarázatára két modellt is alkottunk. Az első szerint a membránban két, eltérő lipid miliőben lévő csatornapopuláció van jelen, melyek aktivációjának feszültség-függése is különböző. Mivel a két populáció aránya ( $R$  paraméter) feszültség független, viszont az egyensúlyi aktiváció feszültség függése a két „csatornatípus” arányának változását mutatja. Másrészt, e modell szerint a két csatornapopulációnak az áram inaktivációs kinetikájában is kétfázisú viselkedést kellene mutatnia, melyet viszont nem sikerült igazolnunk.

A másik modellünk a Zagotta és mtsai korábbi cikkén alapul, melyet kibővítettünk a csatorna ún. aktivált zárt (AZ) állapotával (1. diagram) (Zagotta és mtsai *J.Gen.Physiol.* 1990.). Az „AZ” állapot megjelenése annak tulajdonítható, hogy  $k_1$  és  $k_2$  sebességi állandók (lásd az 1. diagramot) a membrán viszkozitásának növekedése következtében módosulnak. A megváltozott

$k_1/k_2$  arány miatt válik ez az állapot „láthatóvá”, holott normál élettani körülmények között is jelen van.

A Kv1.3 csatorna S5-S6 szegmense, valamint a P régiója a C típusú inaktiváció során konformáció változást szenved, viszont közvetlenül nincs kontaktusban a csatornafehérjét körülvevő lipid molekulákkal. Ezért a membrán összetételében történő változásokat csak közvetett módon, az egyes  $\alpha$ -hélixek között fellépő kölcsönhatáson keresztül érzékeli. Tulajdonképpen, az S5-S6 és az első négy szegmenst alkotó aminosavak oldalláncai között fellépő erősebb kölcsönhatás az, amely késlelteti az inaktivációt eredményező struktúra-átalakulást.

### 1. diagram



### 2. A Pi1 toxin hatása a Kv1.3 csatornák áramára

Az általunk vizsgált Pi1 toxin a *Pandinus imperator* skorpió venomjából (PiV) származik. A Pi1 toxin egy jellegzetes motívumban eltér a többi frakciótól (Pi1-Pi8): az oligopeptid stabilitását a megszokott három diszulfid helyett egy extra negyedik biztosítja. A kiegészítő ciszteinek megléte a molekula stabilabb struktúráját, valamint a méret csökkenését eredményezi, mely maga után vonhatja a toxin-csatorna kölcsönhatás, a gátlás erősségének a megváltozását. Az extracellulárisan alkalmazott Pi1 teljes-sejt  $K^+$  áramra kifejtett hatását vizsgálva azt találtuk, hogy (1) toxin nem változtatta meg a csatorna az aktivációt és inaktivációt jellemző kinetikai és egyensúlyi paramétereit; (2) a gátlás feszültség függetlennek bizonyult; (3) 1 toxin molekula : 1 csatorna sztöchiometriát feltételezve a  $K_d$ -re 11.4 nM adódott.

A Pi1 alacsonyabb blokkolási hatásfoka valószínűleg magyarázható az egyes aminosavak eltéréseivel, valamint a felületi töltés (surface charge) megváltozásával. A 11-es helyzetű tirozin (Y)

glicinre (G), valamint a 35-ös arginin (R) ciszteinre (C) történő „cseréje” lehet felelős a csökkent affinitásért: a toxin-csatornapórusba történő kötődésének modellezése azt mutatta, hogy ezen aminosavak fontos szerepet játszanak a csatornapórus aminosav oldalláncaival kialakuló kölcsönhatásban. Ezenfelül a R35C változás a Pi1-ben a Pi2 és Pi3 frakcióhoz képest egy nagy felületi töltésváltozást eredményez: a pozitív töltésű arginin helyett egy negatív töltésű cisztein oldallánc építi fel a toxint.

Összefoglalva a Pi1-ben meglévő negyedik, kiegészítő diszulfid híd nem befolyásolja a Kv1.3 csatornához történő kötődésének affinitását. A magasabb félhatásos koncentráció feltételezhető oka a 11. és a 35. helyzetben lévő, a toxin-csatorna komplex létrehozásában bizonyítottan alapvető szerepet játszó aminosavak eltérésének tudható be.

### **3. Gátlószer és mutagenézis indukált szelektivitásváltozás a cTBAK ioncsatornában**

*A Xenopus laevis* oocitában kifejezett cTBAK-1 csatorna  $K^+$  szelektív, Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) egyenirányító tulajdonságokkal rendelkezik. Két nem peptid típusú, a humán medicinában alkalmazott vegyületről (fluoxetine és D-norpropoxyphene) kimutattuk, hogy gátolja a cTBAK-1 csatornák teljes-sejt áramát, azonban hatásmechanizmusuk teljesen eltérő. Ezenfelül a mutagenézis kísérletek során olyan cTBAK-1 fenotípusokat állítottunk elő, amelyek hozzásegítenek a csatorna-gátlószer kölcsönhatás, valamint a szelektivitási mechanizmus megértéséhez.

A *NORP* cTBAK-1 csatornák áramára kifejtett összetett hatását az alábbiak jellemezték: (1) részlegesen és irreverzibilisen gátolta a kifelé irányuló áramot ( $IC_{50}=168 \mu M$ ); (2) megnövelte a befelé irányuló ionáramot; (3) eltolta az I-V görbét a pozitív feszültségek felé, mely az áram megfordulási potenciáljának ( $E_{rev}$ ) a megváltozását jelenti ( $EC_{50} = 122 \mu M$ ). A kifelé folyó áram gátlásának részleges volta, valamint az  $E_{rev}$  megváltozása az ionszelektivitás módosulásának a

következménye: a  $\text{Na}^+$  mentes oldatban az  $E_{\text{rev}}$  eltolódása azonos koncentrációjú *NORP* alkalmazásakor szignifikánsan kisebb volt.

Hasonlóan a *NORP*-hoz, a *FL* is irreverzibilis gátlószernek bizonyult, mely feszültség- és dózis-függő ( $\text{IC}_{50} = 226 \mu\text{M}$ ) módon eltömíti a csatornapórust, nem változtatva meg a csatorna szelektivitását. Kísérleteinkben a *FL* nagyon hasznos „segédeszköznek” bizonyult, minthogy segítségével a *NORP* specifikus hatását tudtuk szemléltetni.

A  $\text{K}^+$  csatornák egyik nagyon konzervatív szekvencia szakasza a pórus régió vagy P-régió (ún. signature-sequence), amely egyértelműen determinálja a csatorna permeabilitási tulajdonságait. Ulens és munkatársai a közelmúltban mutatták ki, hogy *NORP* a HERG csatornák szelektivitásának és kapuzási kinetikájának megváltozását eredményezte, míg a  $\text{Kv}1.1$  csatornák esetében nem tapasztaltak hasonló jelenséget (Ulens et al. *Cardiov. Res.* 1999.). A  $\text{cTBAK-1}$  csatorna szelektivitási szűrője két GYGH és két GFGD aminosav szekvenciát foglal magában, amely tekinthető a HERG (GFGN) és a  $\text{Kv}1.1$  (GYGD) csatornák közti átmenetnek. E két tényre alapozva azt feltételeztük, hogy a *NORP*-csatorna kölcsönhatás a P-régió, szűkebben a szelektivitási szűrő aminosav oldalláncainak módosításán keresztül jön létre. A PCR technika felhasználásával mindkettő szelektivitási szűrőben pontmutációt hoztunk létre: Az első pórusban a 105. pozícióban lévő Y-t cseréltük le egy F-ra (Y105F), a másodikban a megfelelő helyzetben lévő (211-es pozíció) F-t mutáltattuk egy Y-ra (F211Y).

Az első és a második pórus szelektivitási szűrőjébe bejuttatott pontmutációk két teljesen eltérő csatornatípust hoztak létre. A Y105F mutáns, feltételezhetően  $\text{K}^+$  szelektivitása csökkenése miatt, *NORP* rezisztenciát mutatott, míg a F211Y konstrukció megtartotta  $\text{K}^+$  szelektív képességét, és a *NORP* sem okozott olyan mértékű változást sem az áramamplitúdóban, sem a  $E_{\text{rev}}$ , mint azt a vad-típusnál tapasztaltuk.

Az első pórusban történt mutáció nagymértékben megváltoztatta a  $\text{cTBAK-1}$  csatorna alapvető biofizikai sajátosságait. Az izoozmotikus ionhelyettesítési módszer segítségével

karakterizáltuk az összes fenotípus elemi elektrofiziológiai tulajdonságait. Az első pórus GYGH szekvenciájában történt aminosav módosítás az ionszelektivitásért felelős filter szétroncsolását eredményezte; a  $K^+$  és  $Na^+$  ionok árama az együttesen alakítja ki a csatornán átfolyó ionáramok sajátosságait.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a mutagenézis eszközeivel élve két olyan cTBAK-1 fenotípust sikerült megalkotnunk, melyek hozzájárulnak a pórus szelektivitási mechanizmusának, valamint a csatorna-gátlószer kölcsönhatásnak a megértéséhez. Eddigi ismereteink szerint nem sikerült olyan vegyületet találni, amely valamely kétpórusú csatorna szelektivitását változtatná meg.

## V. Összefoglalás

1. Kimutattuk, hogy a T limfociták domináns, feszültség vezérelt  $K^+$  csatornájának (Kv1.3) egyensúlyi és kinetikai paramétereit módosítja a plazmamembrán koleszterintartalmának változtatása. Az aktiváció és az inaktiváció is lelassul a koleszterin bevitel hatására, míg annak kivonása biológiai relevanciával nem bír. Ezenfelül a koleszterinszint emelése az aktiváció kétfázisú viselkedését eredményezte. A javasolt modellünk szerint a sebességi állandók arányának változása miatt, egy ún. aktivált-zárt állapot megjelenése tehető felelőssé az aktiváció efféle megváltozásáért.
2. A *Pandinus imperator* venomjából izolált Pi1 frakció eltér a klasszikusnak mondható toxinok struktúrájától: négy diszulfid híd biztosítja stabilitását. Kimutattuk, hogy e család korábban vizsgált tagjaihoz viszonyítva (Pi2 és Pi3) a Pi1 toxin a legkevésbé hatékony gátlószer a Kv1.3 csatornának, de a negyedik diszulfid híd nem befolyásolja a kötődés affinitását. A kisebb gátlási hatékonyság oka 11. és a 35. pozícióban levő, a toxin-csatorna komplex kialakításában fontos szerepet játszó aminosavakban való eltérésnek tulajdonítható.
3. A mutagenézis eszközeivel élve két olyan cTBAK-1 fenotípust sikerült megalkotnunk, melyek hozzájárulnak a pórus szelektivitási mechanizmusának, valamint a csatorna-gátlószer



kölcsönhatásnak a megértéséhez. Eddigi ismereteink szerint nem sikerült olyan vegyületet találni, amely valamely kétpórusú csatorna szelektivitását változtatná meg.

## **VI. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények**

**Hajdú P.**, Varga Z., Pieri C., Panyi Gy., Gáspár R. Cholesterol modifies the gating of Kv1.3 in human T lymphocytes. *Pflügers Archives, European Journal of Physiology* (közlésre elfogadva) **I.F.: 1,632**

**Hajdú P.**, Ulens C., Panyi Gy., Tytgat J. Drug- and mutagenesis-induced changes in the selectivity filter of a cardiac 2-pore background K<sup>+</sup> channel. *Cardiovascular Research* (közlésre beadva) **I.F.: 4,552**

Péter M., **Hajdú P.**, Varga Z., Damjanovich S., Possani L., Panyi Gy. Gáspár R. Block of human T lymphocyte Kv1.3 channels by Pi1, a novel class of scorpion toxin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2000); 278(1):34-37 **I.F.: 2,946**

## **VII. Egyéb közlemények**

Peter M., Varga Z., **Hajdú P.**, Gaspar R., Damjanovich S., Horjales E., Possani L.D., Panyi G. Effects of toxins Pi2 and Pi3 on human T lymphocyte Kv1.3 channels: the role of Glu7 and Lys24. *Journal of Membrane Biology* (2001); 179(1): 13-25 **I.F.: 2,787**

C.V.F. Batista, F. Gómez-Lagunas, R.C. Rodríguez de la Vega, **P. Hajdu**, Gy. Panyi, R. Gáspár, L. D. Possani Two novel toxins from the Amzonean scorpion *Tytius cambridgei* that block Kv1.3 and *Shaker* B K<sup>+</sup>-channels with distinctly different affinities *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* **I.F.: 2,112**

Panyi Gy., Somodi S., Varga Z., **Hajdú P.**, Pieri C., Pandi-Perumal S.R., Damjanovich S., Gáspár R. Pharmacological effects of melatonin on ion channels. Chapter 27 in *Pineal Gland and Melatonin*, ed.: Chandana Haltar, Oxford & IBH Publishing Co. (könyvfejezet)