

**A humán T limfociták Kv1.3 csatornájának farmakológiai és
sejtfelszíni topológiai vizsgálata**

Bagdány Miklós

Témavezetők: Prof. Dr. Gáspár Rezső és Dr. Panyi György

DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
BIOFIZIKAI ÉS SEJTBOLÓGIAI INTÉZET
DEBRECEN, 2005

1. BEVEZETÉS

1.1 A Kv1.3 csatorna általános jellemzői

Az immunrendszer és a központi idegrendszer jellemző feszültségfüggő K^+ csatornája, a hKCNA3 gén által kódolt Kv1.3 ioncsatorna a feszültség-vezérelt ioncsatornák Shaker családjába tartozik. A Kv1.3 csatorna négy egymáshoz nem kovalensen kapcsolódó alegységből áll, az alegységek kb. 500 aminosavat tartalmaznak. Minden egyes alegység hat, a membránt teljes egészében átérő helikális transzmembrán szegmensből áll (S1-S6), ezekhez és az őket összekötő extra- és intracelluláris hurkokhoz jól meghatározott funkciók tartoznak. Az S5 és S6 domének közötti szakasz az S6 szegmensevel együtt a pórus régiót képezi, amelyen keresztül az ionok átjutnak a membránon. Itt található egy négy aminosavat tartalmazó szekvencia, amelyet több különböző kálium csatornában is azonosítottak, és amelyről kísérleti eredmények alapján feltételezhető, hogy a K^+ szelektivitásért felelős. Az S5 és S6 közötti régió toxin, kötőhelye is. Mutagenézis vizsgálatok szerint az S4 szegmens hét Arg-X-X-Arg motívumot tartalmaz, és az S2 és S3 doménekkal együtt a feszültség-szenzort alkotja.

A csatorna aktivációs küszöbe kb. -60 mV, és a nyitási valószínűség fokozatosan nő a feszültséggel kb. 0 mV-ig. A Kv1.3 csatorna inaktiválódik, ha hosszú ideig tartó, vagy ismétlődő depolarizáló impulzust alkalmazunk. Ennek az ún. C-típusú lassú inaktivációnak a mechanizmusa különbözik a Shaker vagy más Kv típusú csatorna N terminális „ball and chain” típusú inaktivációjától. Szemben az N-típusú inaktivációval, a C-típusú inaktivációt az extracelluláris tér ionösszetétele és a pórus extracelluláris részében található aminosavak tulajdonsága befolyásolja.

A Kv1.3 C-típusú inaktivációja sokkal lassabb, mint a rokon Kv1.x csatornák inaktivációja, így az aktivált Kv1.3 csatornák jelentős K^+ fluxust képesek létrehozni, mielőtt a nem-vezető inaktivált állapotba kerülnek. A Kv1.3 csatornák ezen tulajdonságai, valamint a limfociták kis mérete és membránjának rendkívül magas ellenállása ($10-20$ G Ω) biztosítják azt, hogy a T sejtek nyugalmi membránpotenciálját kis számú aktív csatorna is képes fenntartani.

1.2 Az ioncsatornák és a limfocita aktiváció kapcsolata

A limfociták specifikus antigén hatására bekövetkező klonális proliferációja az immunrendszer működésének egyik meghatározó eseménye. A folyamatban az ioncsatornák

és a sejt aktiváció kapcsolata szempontjából döntő szerepe van a Ca^{2+} -dependens jelátviteli útvonalnak.

A T sejt receptor/CD3 komplexet (TCR/CD3) az antigén prezentáló sejt fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) fehérjéihez kötődő antigén aktiválja, amely számos intracelluláris protein kináz transzlokációját és a foszfolipáz $\text{C}\gamma$ enzim (PLC γ) aktív alakjának kialakulását eredményezi. Az enzim a foszfatidilinozitol-diszfoszfát membránlipidet inozitol-triszfoszfátra (IP_3) és diacilglicerolra hasítja. A diacilglicerol a protein-kináz C (PKC) útvonalat aktiválja, amely számos intracelluláris szubsztrát foszforilációjához vezet. A másik jelátviteli út magába foglalja az IP_3 -függő Ca^{2+} felszabadulást az endoplazmatikus retikulumból, valamint a raktárak kiürülését követő Ca^{2+} beáramlást az extracelluláris térből. Szemben az idegsejtek és izomsejtek gyors Ca^{2+} tranzienseivel, a limfocitákban a Ca^{2+} koncentráció növekedése lassú, több óráig tartó folyamat lehet, melynek eredményeképp a sejtek proliferációját elindító gének (pl. IL-2 gén) átírása következik be. Ez a Ca^{2+} szint növekedés nagyon fontos a limfociták antigén felismerési és válaszadó működésében.

A Ca^{2+} ionok a Ca^{2+} jel fenntartott fázisában Ca^{2+} szelektív csatornákon keresztül jutnak át a plazmamembránon az endoplazmatikus retikulum Ca^{2+} raktárának kiürülését követően. A jelenség háttérében álló csatornát kalcium felszabadulás aktivált Ca^{2+} csatornának (angol rövidítés: CRAC) nevezik. A nyitott CRAC csatornákon keresztül folyó áram elektrokémiai hajtóerejéhez komoly hozzájárulást ad a sejtek membránpotenciálja. A T sejtek nyugalmi membránpotenciálja -50 és -60 mV között van, melyet döntően két különböző K^+ csatorna, a feszültség-függő depolarizáció-aktivált Kv1.3 és a Ca^{2+} -aktivált K^+ csatorna (IKCa1) határoz meg. E két ioncsatorna által létrehozott kation kiáramlás a sejtmembránt hiperpolarizált állapotban tartja még a depolarizáló hatást jelentő Ca^{2+} influx mellett is, biztosítva ezzel a Ca^{2+} beáramláshoz szükséges hajtóerőt, és így a megfelelő Ca^{2+} -mediált jelátvitelt.

1.3 A Kv1.3 csatornák gátlószerei specifikus immunszuppressziót okoznak

Struktúráisan nagyon különböző nem peptid típusú vegyületről bizonyosodott be, hogy gátolni képesek a limfociták Kv1.3 csatornáit. Ezen vegyületek (pl. 4-aminopiridin, TEA, correolide, progeszteron, ShK-Dap22, melatonin, stb.) kötődési mechanizmusukat, sztöchiometriájukat és kötőhelyeiket illetően is igen sokszínűek. A gátlószer csoport közös neve ennek megfelelően „kis-molekula” inhibitor. A klasszikus nem peptid típusú csatornablokkolók (pl. 4-aminopiridin, tetraetil-ammónium) mikromoláris illetve millimoláris koncentrációban gátolták a Kv1.3 csatornákat. Ezen molekulák közül a csatornák szerkezet-

funkció vizsgálata szempontjából kiemelkedő jelentőségű a tetraetil-ammónium (TEA), melynek segítségével a K^+ csatornák N- és C-típusú inaktivációja elkülöníthető.

A Kv1.3 csatornablokkolók másik csoportjába a peptid típusú toxinok tartoznak. Az első nanomoláris koncentrációban is hatékony ilyen toxin a skorpió venomból izolált charybdotoxin (ChTx) volt ($K_d = 2.2$ nM), később több nanomoláris és pikomoláris affinitású skorpió venom eredetű csatornablokkoló peptidet is felfedeztek, mint pl. a noxiustoxin, kaliotoxin, margatoxin, agitoxin-2, hongotoxin, Pi 1-3, stb. A skorpiómérgekből izolált K^+ csatorna toxinok 30-40 vagy 60-70 aminosavból állnak, amelyeket 3 vagy 4 diszulfid híd stabilizál. Az elsődleges szerkezet homológiája alapján 19 alcsoportot írtak le.

A specifikus blokkolók fontos információt szolgáltattak a Kv1.3 csatornák pórus régiójának szerkezetéről és a toxin-csatorna közötti molekuláris kölcsönhatásokról. A ChTx-et igen széles körben használták fel erre a célra, a kísérleti stratégia magába foglalta a toxin receptorok és a toxinok komplementáris mutagenézisét. A kísérletekből többek között az alábbi általános következtetések vonhatók le:

1, A toxinok receptorának jelentős részét az S5-S6 hélix közötti hurok S5-höz közeli régiója, valamint a pórus szelektivitási filterében elhelyezkedő aminosavak oldalláncai adják.

2, A toxinok oldaláról a K^+ csatornák gátlásáért felelős struktúrális elem a referenciaként választott, a ChTx 27-es pozíciójának megfelelő helyen lévő lizin, ill. a ChTx 36-os pozíciónak megfelelően pedig egy aromás aminosav, amelynek aromás gyűrűje ~ 7 Å távolságra helyezkedik el a centrális lizin α szénatomjától. A csatornaszájadékba mélyen behatoló pozitív töltésű lizin kitüntetett szerepet játszik a kationok csatornaszájadékból történő kiszorításában.

A K^+ csatornák és a limfociták aktivációja közötti kapcsolat eddigi legmeggyőzőbb bizonyítékai farmakológiai kísérletekből származnak. In vitro kísérletek bizonyították, hogy a Kv1.3 ill. IKCa1 csatornák peptid és nem-peptid természetű gátlószerei hatékonyan képesek gátolni a TCR aktivációt követő Ca^{2+} válasz fenntartott fázisát, és ennek következtében a sejtek proliferációját. A gátlószerek depolarizálták a T sejtek membránját, ami a csökkent elektrokémiai hajtóerő miatt gátolta a Ca^{2+} influxot a CRAC csatornákon keresztül.

Az elmúlt évben Chandy és munkatársai jelentős felfedezést tettek a Kv1.3 csatornák T sejt altípus-függő expressziója terén, ami komoly lendületet ad további kísérleteknek. Felfedezték, hogy a sclerosis multiplex-ben szenvedő betegek véréből izolált, a betegség patogenezisében döntő szerepet játszó krónikusan aktivált effektor memória T sejtek (T_{EM} ; $CCR7^-CD45RA^{+/-}$) igen nagy számban fejeznek ki Kv1.3 csatornákat (kb. 1500/sejt), míg IKCa1 csatorna expressziójuk nem jelentős. Ezzel szemben naïve ($CCR7^+CD45RA^+$) és

centrális memória T sejtek (T_{CM} ; $CCR7^+CD45RA^-$) esetén a mitogén indukált proliferáció a Kv1.3 csatornák expressziójának enyhe (~ 250 /sejt \rightarrow ~ 400 /sejt), ugyanakkor az IKCa1 csatornák expressziójának jelentős fokozódásával ($8-10$ /sejt \rightarrow 500 /sejt) jár együtt. A Kv1.3 nagy affinitású gátlószerei (pl. ShK toxin, $IC_{50} \sim 100$ pM) csak a T_{EM} sejtek osztódását gátolták specifikusan, a proliferáció gátlás alól a nyugvó (naïve) és T_{CM} sejtek az IKCa1 csatornák fokozott expressziójával mentesülnek. Így a Kv1.3 szelektív inhibitorai specifikus immunszuppressziót okoznak. Ezek alapján érthető az igény a gyógyszergyárak részéről minimális mellékhatással rendelkező, terápiás célra is alkalmazható, a Kv1.3 csatornát specifikusan blokkoló vegyületek iránt.

1.4 A T sejt aktivációban résztvevő proteinek térbeli elrendeződése és kapcsolatuk a Kv1.3 csatornákkal

A limfociták aktivációjának TCR/CD3 és MHC kölcsönhatáson alapuló sematikus képe jelentősen megváltozott az elmúlt néhány évben az immunológiai szinapszis (továbbiakban IS) felfedezésével. Az IS az antigént prezentáló és az azt felismerő sejt közötti interakciós felszín jelenti, ahol a specifikus kölcsönhatások a plazmamembrán fehérjéinek csoportosulását és mikrométer skálájú membrán doménekbe történő szegregációját eredményezik. Az így kialakuló szupramolekuláris aktivációs komplex közepén (cSMAC) a T sejtek oldalán többek között a TCR/CD3, CD28 és CD2 membrán proteinek találhatók, míg a periférián (pSMAC) az LFA-1 adhéziós molekulák ölelik körül és stabilizálják a szinapszist. A membrán proteinek átrendeződéséhez hasonló változások jönnek létre a citoszolban is, ahol a szinapszis perifériás részén talin, míg centrálisan Lck és PKC θ halmozódik fel. A fehérjék csoportosulása és térbeli orientációja biztosítja azt, hogy a TCR/CD3 komplex aktiválása hatékony legyen a protein kinázok molekuláris proximitásba kerülése eredményeként. Az immunológiai szinapszis kialakításában, a molekulák szegregációban fontos szerepe van a citoszkeletonnak és lipid raftoknak is.

Számos biokémiai és biofizikai kísérlet sugallta azt, hogy a már megismert molekulákon kívül a Kv1.3 K^+ csatornák is részesei lehetnek az immunológiai szinapszis kialakulásával létrejövő szignalizációs komplexnek. Ezek közül is kiemelendő a Kv1.3 csatornák p56^{lck} kináz általi szabályozása a T sejtek Fas receptor-mediált apoptózisa során. A Kv1.3 csatornák hDlg adaptor fehérjén keresztül kölcsönhatásban állnak a T sejt jelátvitelben központi szerepet játszó p56^{lck}-val, biztosítva ezzel a Kv1.3 tirozin foszforiláció révén történő szabályzásának térbeli feltételeit.

Ezen információk alapján indokoltnak láttuk a Kv1.3 csatornák membrán síkjában való lokalizációjának vizsgálatát, valamint a csatornák és a T-sejt receptor komplex, illetve a lipid raftok egymáshoz képesti viszonyának tisztázását.

2. CÉLKITŰZÉSEK

1, Ismert, hogy a Kv1.3 csatornablokkolóknak immunszuppresszív hatása lehet. A gyógyszergyárak részéről fennálló érdeklődés minimális mellékhatással rendelkező, terápiás célra is alkalmazható csatornablokkoló vegyületek iránt indokolta új Kv1.3 gátlószer keresését. Kísérleteinkben arra kerestünk választ, hogy az *Anuroctonus phaiodactylus* skorpió mérgéből nyert anuroctoxin hatékonyan és specifikusan blokkolja-e a Kv1.3 csatornát.

2, Kíváncsiak voltunk arra, hogy milyen a Kv1.3 csatorna sejtfelszíni eloszlása a limfocita membránban, a csatornák eloszlásában található-e inhomogenitás. Emellett vizsgálni kívántuk, hogy van-e az immunológiai folyamatokban fontos szerepet játszó TCR/CD3 receptor komplex és a feszültségfüggő Kv1.3 csatorna között térbeli asszociáció.

3, Számos biokémiai és biofizikai kísérlet sugallta, hogy a már megismert molekulákon kívül a Kv1.3 K^+ csatornák is részesei lehetnek az immunológiai szinapszis kialakulásával létrejövő szignalizációs komplexnek. Ezért vizsgálni kívántuk, hogy milyen a csatorna eloszlása a target sejttel kontaktusba lépő citotoxikus T limfociták felszínén, jelen van-e a Kv1.3 az immunológiai szinapszisban, van-e szerepe a citotoxicitásban.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Sejtek

Kísérleteinkhez Jurkat TagC15 limfocitákat, COS-7 sejteket, citotoxikus egér T sejteket (CTLL-2), humán perifériás limfocitákat, JY limfoblasztokkal együtt növesztett perifériás vér mononukleáris sejteiből nyert $CD8^+$ humán CTL sejteket, valamint a mKv1.1 és rKv1.2 csatornákat stabilan expresszáló L929 és B82 sejteket használtunk.

3.2 Skorpió toxinok

A felhasznált toxinok tisztítása magas nyomású folyadék kromatográfiás eljárással (HPLC) történt. A skorpió venomot az állatokból elektromos stimulációval nyertük. Az anuroctoxin szekvenciáját Beckam LF 3000 analizátor segítségével határoztuk meg, az aminosav szekvenciákat ClustalX, BLAST és FASTA kereső programokkal hasonlítottuk össze. A toxinok izolálását és a szekvencia analízist kollaborációs partnerünk (Dr. Possani) laboratóriumában végezték.

3.3 Molekuláris biológia

A FLAG epitópot (DYKDDDDK) pRC/CMV-Kv1.3 plazmidba klónoztuk, az S1 és S2 transzmembrán szegmens közötti extracelluláris szakaszba. A mutáns csatornákat lipofil reagenssel (Effectene vagy Lipofectamine), vagy elektroporációval juttattuk a sejtekbe.

3.4 Jurkat sejtek transzfekciója

24 órával a transzfekció előtt a sejteket friss médiumba raktuk, biztosítva ezzel, hogy a transzfekció idejére a sejtek logaritmus növekedési fázisba kerüljenek. A Jurkat sejteket Effectene reagenssel transzfektáltuk a vad típusú (Kv1.3/WT) vagy mutáns (Kv1.3/FLAG) csatornát úgy, hogy a DNS/reagens arány 1 µg/25 µl volt, a 60 mm-es petri edény 4×10^6 sejtet tartalmazott 5.2 ml végtérfogatban. A sejteket 24 óráig növesztettük az immunogold és fluoreszcens vizsgálatok előtt.

3.5 CTLL-2 sejtek transzfekciója

A CTLL-2 sejteket tranziensen kotranszfektáltuk vad típusú (Kv1.3/WT) vagy mutáns (Kv1.3/FLAG) Kv1.3 csatornát kódoló plazmiddal és CD4 gént kódoló Ccd4neo plazmiddal (5.0 kb; CD4-et kódoló pUC/CMV) 5:1 arányban, elektroporációval. A rKv2.1 vagy Shaker IR ioncsatornákat hasonló módszerrel transzfektáltuk CTLL-2 sejtekbe.

3.6 Cos-7 sejtek transzfekciója

A Cos-7 sejteket tranziensen kotranszfektáltuk hKv1.2 csatornát kódoló plazmiddal és zöld fluoreszcens proteinnel (GFP) 5:1 arányban, elektroporációval. Az áramokat a transzfekció után 3 nappal mértük, a GFP pozitív transzfektált sejteket fluoreszcens mikroszkóppal azonosítottuk.

3.7 CTL transzfekció és a CTL-JY kontaktus kialakítása

A CTL sejteket Lipofecamine 2000 reagenssel transzfektáltuk Kv1.3/FLAG csatorna génnel a gyártó instrukciói szerint. A transzfekció után 24 órával a sejteket fenolvörös nélküli RPMI 1640 médiummal mostuk, és 2.5×10^5 CTL sejtet adtunk ugyanennyi JY sejthez 1 ml fenolvörös nélküli RPMI 1640 médiumban. A sejtkeveréket 1 percig centrifugáltuk 200 g-vel és 37 °C hőmérsékleten inkubáltuk 5 percig. A konjugált sejteket jégen tartottuk 1 % paraformaldehides PBS-ben 1 órán át.

3.8 Elektrofiziológia

A sejtmembrán áramokat patch-clamp technika teljes sejt konfigurációjában mértük Axopatch 200A erősítőt használva, feszültség-zár üzemmódban. A T sejteket monoklonális antitest adhézióval szelektáluk.

Az adatgyűjtéshez és az áramgörbék analíziséhez a pClamp8 programcsomagot használtuk. A külső oldat összetétele (mM): 145 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 2.5 CaCl₂, 5.5 glükóz, 10 HEPES (pH 7.35). A belső oldat összetétele (mM): 140 KF, 2 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 HEPES, 11 EGTA (pH 7.22), kivéve a kalcium aktivált kálium áram méréseket, amikor 150 K-aspartate, 5 HEPES, 10 EGTA, 8.7 CaCl₂, 2 MgCl₂, (pH 7.2) tartalmú oldatot használtunk. Az utóbbi esetben a pipetta oldatban a szabad Ca²⁺ koncentrációja 1 μM volt.

Az Kv1.3 blokkolókat tartalmazó oldatokat gravitációs perfúziós rendszerrel juttattuk el a sejtekhez. Minden esetben legalább 3 független mérést végeztünk, a K_d értékeket átlag ± SEM formában adtuk meg.

3.9 Áramlási citometriás mérések

A Kv1.3/FLAG csatornával transzfektált Jurkat sejtek specifikus jelölődésének vizsgálatához a Kv1.3/WT illetve Kv1.3/FLAG csatornákkal transzfektált Jurkat sejteket anti-FLAG-M2 monoklonális primer és FITC-konjugált nyúl-anti-egér IgG poliklonális szekunder antitesttel (F-RAMIG, SIGMA), a kontroll mintákat csak F-RAMIG-gal jelöltük, és a fluoreszcencia jelet áramlási citométerrel detektáltuk. A Becton Dickinson FACSCalibur áramlási citométer 488 nm-es vonalát használtuk gerjesztéshez.

3.10 Immunogold jelölés

A Kv1.3 csatornával transzfektált Jurkat sejteket anti-FLAG-M2 primer antitesttel és 10 illetve 30 nm átmérőjű aranygömbbel konjugált poliklonális szekunder jelöltük transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) vizsgálathoz.

3.11 CLSM

Jurkat sejteken a CD3 receptorokat Alexa Fluor 633-mal konjugált anti-CD3-mal, a csatornákat pedig anti-FLAG-M2 (egér anti-humán) primer, és Alexa Fluor 546-tal konjugált RAMIG szekunder antitestekkel jelöltük. A CTL illetve JY sejtek felszínén a Kv1.3/FLAG ioncsatornákat hasonlóképpen, az MHC I-et fluorescein-konjugált W6/32 antitesttel, a CD8⁺ - at Alexa Fluor 647-konjugált MEM31 antitesttel jelöltük.

A Jurkat és CTL sejtek molekuláinak sejt felszíni eloszlásának tanulmányozására Zeiss LSM 510 mikroszkópot használtunk. A kiértékeléshez a duplán jelölt sejtek CLSM-mel készült projekciós képeinek alsó vagy felső 2-3 optikai szeletét használtuk. A proteinek kolokalizációját a képpárok x és y pixel intenzitásainak keresztkorrelációjából számoltuk a következő képlet alapján:

$$C = \frac{\sum_{i,j} (x_{ij} - \langle x \rangle)(y_{ij} - \langle y \rangle)}{\sqrt{\sum_{i,j} (x_{ij} - \langle x \rangle)^2 \sum_{i,j} (y_{ij} - \langle y \rangle)^2}} \quad [1]$$

ahol C a korrelációs koefficiens, x_{ij} és y_{ij} az x és y képek i és j koordinátájú pixeleinek egyedi fluoreszcencia szintje, $\langle x \rangle$ és $\langle y \rangle$ a megfelelő képek átlagos pixel intenzitásait jelölik.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

4.1 Az anuroctoxin a Kv1.3 csatorna hatékony blokkolója

Célunk volt egy új, hatékony, specifikus Kv1.3 csatorna blokkoló keresése. Ennek érdekében az *Anuroctonus phaiodactylus* nevű skorpióból több lépcsőben izolált anuroctoxin hatását vizsgáltuk különböző ioncsatornákra. A skorpió venomjának HPLC-vel tisztított frakciói közül a hatékonyan gátló frakció tovább tisztított alfrakciói közül a 24.72 retenció idejű bizonyult hatékony Kv1.3 gátlószernek (anuroctoxin, $K_d = 0.73$ nM), ennek a hatását más ioncsatornákra is megvizsgáltuk heterológ expressziós rendszerekben vagy perifériás limfocitákon annak bizonyítására, hogy a gátlás specifikus a Kv1.3 csatornára.

Humán perifériás T limfocitákon teljes sejtes üzemmódban, voltage-clamp technikával az Anyagok és módszerekben leírt kísérleti körülmények között Kv1.3 csatorna áramokat mértünk. 0.5 nM anuroctoxin hatására a csatornák kb. fele gátlódott, a gátlás teljesen reverzibilis volt, toxin mentes külső oldattal perfundálva (kimosás) a csatornák teljesen visszatértek a gátolt állapotból. A blokkolás kinetikája és a toxin kimosása viszonylag gyors volt. Az anuroctoxin nem változtatta meg a Kv1.3 csatorna áram-feszültség karakterisztikáját, a csúcsáramokat minden feszültség értéknél hasonlóan csökkentette. Az aktivációs küszöb -42.5 ± 4.8 mV ($n = 4$) volt kontroll körülmények között, illetve -42.5 mV ± 2.5 mV ($n = 4$) 0.6 nM anuroctoxin jelenlétében. A Kv1.3 csatorna gátlás 0.05-10 nM közötti anuroctoxin koncentrációban felvett dózis-hatás görbéjéből 0.73 nM félhatásos dózis (K_d) és 0,99 Hill koefficiens adódott. A Hill koefficiens 1-hez közeli értékéből arra következtettünk, hogy sok más K^+ csatorna blokkolókhöz hasonlóan egy toxin molekula kötődik a csatorna pórusába a gátlás során. Az aktiváció, a kapuzás, a feszültség-függetlenség, a Hill koefficiensből számolt 1:1 csatorna-toxin sztöchiometria alapján az anuroctoxin által okozott gátlás mechanizmusa hasonló a többi skorpió toxin által okozott gátláshoz, más skorpió toxinhoz hasonlóan klasszikus pórusblokkolója a Kv1.3 csatornának.

Mexikói kollaborátoraink meghatározták az anuroctoxin szerkezetét. A szekvencia analízis szerint az anuroctoxin elsődleges szerkezete eléggé eltér az összes KTx toxintól, a jelenleg ismert 81 K^+ csatorna blokkoló skorpió toxin mindegyikével kevesebb mint 50 % homológiát mutat. Filogenetikai analízis során az anuroctoxin az α -KTx toxincsalád 6. alcsaládjába került, α -KTx 6.12 számmal jelölve. Az anuroctoxin 3D szerkezetéből megállapítható volt, hogy hasonlóan a ChTx-hez, a csatornához kötődésben fontos szerepet játszó két aminosav (K23, F32) megfelelő térbeli orientációban van, azaz az anuroctoxin esetén is kialakul az „esszenciális diád”.

Annak bizonyítására, hogy az anuroctoxin gátlása specifikus a Kv1.3 csatornára, teszteltük 10 nM anuroctoxin hatását különböző csatornákra megfelelő expressziós rendszereket használva (ld. Anyagok és módszerek). Az IKCa1 áram méréséhez feszültség-rámpa impulzusokat alkalmaztunk, a blokkolást a görbék a Kv1.3 csatorna aktivációs küszöbe alatti részének meredekségének változtatásával jellemeztük. 10 nM anuroctoxinnak nem volt hatása az IKCa1 csatornára, a kezelt és kontroll görbék meredekségének aránya $1.06 \pm 0.02\%$ ($n = 5$) volt. A toxin hatását legalább 1000x szelektívebbnek becsüljük Kv1.3-ra, mint az IKCa1 csatornára.

Az anuroctoxin 10 nM koncentrációban csak a hKv1.2 és rKv1.2 csatornákat gátolta szignifikánsan ($K_d = 6.14$ illetve 5 ± 0.28 nM), nem volt jelentős hatása a Kv1.3 csatornával egy családba tartozó *Drosophila Shaker* csatornára, illetve az mKv1.1, hKv2.1, és IKCa1 csatornákra sem (a megmaradó áramhányadok: 96.7 ± 2.68 , 91.6 ± 2.11 , 84 ± 1.98 , 106 ± 1.7 %). Más toxinokról (pl. MgTX, NtX, kaliotoxin, ShK) is ismert, hogy szelektívebben gátolják a Kv1.3 csatornát, mint az IKCa csatornát, azonban az idegrendszerben és az izmokban fontos ioncsatornákat (pl. Kv1.1, Kv1.2) ezek szintén gátolják pM illetve nM koncentrációkban. Ezzel szemben az anuroctoxin a Kv1.1 és Kv1.2 csatornákat kb. egy nagyságrenddel kisebb mértékben gátolja, mint a Kv1.3 csatornát.

Napjainkban komoly kutatás folyik terápiásan is alkalmazható hatékony, de a szervezetre káros hatással nem rendelkező csatornagátló szerek után, melyekkel immunsuppresszív hatást lehetne elérni. Az anuroctoxin azon képessége, hogy szelektíven képes lehet gátolni a nagy mennyiségű Kv1.3-at, de kevés IKCa1 csatornát expresszáló T_{EM} sejtek proliferációját anélkül, hogy a naïve és TCM sejtek osztozását gátolná, alkalmassá teheti bizonyos T sejt mediált immunbetegségek (pl. sclerosis multiplex, diabetes mellitus) kezelésében és a szervátültetés utáni kilökődés megelőzésére. A toxin új alternatívát nyújthat a Kv1.3 csatorna struktúrájának, funkciójának kutatásában is.

4.2 A Kv1.3/FLAG csatorna térbeli szerveződése Jurkat sejteken

A T limfociták domináns feszültség-függő csatornájának, a Kv1.3 csatornának a sejt felszíni eloszlását transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) és CLSM technikákat használva tanulmányoztuk. Ahhoz, hogy a Kv1.3 csatornát specifikusan meg tudjuk jelölni, PCR mutagenézissel egy FLAG epitópnak megfelelő bázisszekvenciát inzertáltunk a csatornát kódoló génbe (Kv1.3/FLAG), a mutáns csatornát ezután tranziens transzfekcióval juttattuk a vizsgálni kívánt sejtekbe. Áramlási citometriás mérésekkel bizonyítottuk, hogy a Kv1.3/FLAG csatornák FLAG epitóp ellenes antitestet használva specifikusan jelölhetők, a jelöléssel elegendő nagyságú jelet tudunk elérni a TEM és CLSM mérésekhez is.

Az endogén feszültségfüggő csatornákat nem tartalmazó CTLL-2 sejtekbe transzfektált Kv1.3/WT és Kv1.3/FLAG csatornák áramait -120 mV tartási feszültség mellett, $+50$ mV-ra depolarizálva mértük. A Kv1.3/WT áram inaktivációs időállandója 234.6 ms, a Kv1.3/FLAG áramé pedig 214.6 ms volt. A mutáns és a vad csatorna inaktivációs kinetikájában nem volt jelentős különbség, a mutáns csatornák hasonlóképpen funkcionálnak, mint a vad típusúak.

Transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) felvételek alapján elkészítettük a területegységenkénti csatornaszámok relatív gyakorisági hisztogramjait, random eloszlás esetén a hisztogramok Poisson eloszlást követnének. A Kv1.3/FLAG csatornával tanszfektált sejtek hisztogramjai szerint a területenkénti csatornaszámok szignifikánsan eltértek a Poisson eloszlás alapján várt elméleti λ értékektől, ami azt jelenti, hogy a csatornák eloszlása a membránban (hasonlóan sok más, a T sejt szabályozásában résztvevő fehérjéhez) nem véletlenszerű. A nem random eloszlást magyarázhatja az ioncsatornák lipid raftokba szerveződése, illetve közvetlen protein-protein kölcsönhatások a citoszkeleton fehérjéivel.

4.3 A CD3 és a Kv1.3/FLAG csatorna közötti kolokalizáció

A TCR/CD3 komplex és a Kv1.3 csatorna T sejt aktivációban, valamint különböző fehérjék szabályozásában betöltött fontos szerepe miatt arra kerestük a választ, hogy kimutatható-e közelség a TCR/CD3 komplex és a Kv1.3 csatorna között. A CLSM felvételeken a jelölt csatornák és a CD3 molekulák átfedése jól mutatta a CD3 és Kv1.3/FLAG csatorna kolokalizációját a Jurkat sejtmembránban. A kolokalizáció kvantitatív mérésére a keresztkorrelációs koefficiens használtuk. Az 1. egyenletből számolt magas korrelációs koefficiens érték ($C = 0.64 \pm 0.10$ (SD), $n = 6$) bizonyítja a két protein kolokalizációját néhány száz nm-es skálán belül. A Kv1.3 és CD3 molekulák közötti közelség növeli annak lehetőségét, hogy funkcionális kapcsolat lehet közöttük.

4.4 Az aktivált CTL sejtek nagy mennyiségű feszültségfüggő Kv1.3 csatornát expresszálnak

Elektrofiziológiai és farmakológiai kísérletekkel bizonyítottuk, hogy az aktivált CTL sejtek domináns feszültségfüggő kálium ioncsatornája a Kv1.3. Az áram-feszültség görbék szerint a csatornák -60 mV-nál kezdtek el aktiválódni. A steady-state aktiváció feszültségfüggésének középpontja -33.8 ± 4.8 mV, meredeksége 10.7 ± 0.7 mV ($n = 5$). Az áramok inaktivációs időállandója 180 ± 27 ms volt $+50$ mV tesztpotenciált alkalmazva ($n = 9$). Ezt az értéket 10 mM tetraetil-ammonium 56 ± 4 %-kal megnövelte ($n = 4$). Ezek az adatok jó egyezést mutattak a Kv1.3 ioncsatorna korábban közölt hasonló paramétereivel.

A farmakológiai kísérletek során szintén a limfociták Kv1.3 csatornájának korábban közölt paramétereire hasonló értékeket kaptunk. A CTL sejt kálium csatornáját az alábbi blokkolókkal karakterizáltuk: MgTX ($K_d = 50 \pm 12$ pM, $n = 3$), ChTx (3.4 ± 0.6 nM, $n = 3$), és tetraetil-ammonium (14 ± 1 mM, $n = 4$). A biofizikai és farmakológiai adatok alapján megállapítottuk, hogy a CTL sejtek Kv1.3 csatornát expresszálnak.

4.5 A Kv1.3/FLAG csatornák CTL sejtekben az IS-be rendeződnek

Kísérleteink további részében aktivált CTL sejteken vizsgáltuk a Kv1.3 csatorna jelenlétét az immunológiai szinapszisban. A Kv1.3/FLAG csatornák térbeli elrendeződését CTL sejtekben és target sejttel konjugált CTL sejtekben CLSM-mel vizsgáltuk. A Kv1.3 csatornák foltszerű eloszlást mutattak a targettel nem konjugált CTL sejtek felszínén, hasonlóan az MHC-1-ben és CD8⁺-ban gazdag doménekhez. A target sejttel konjugált CTL sejteken a Kv1.3/FLAG csatornák átrendezését figyeltük meg, az esetek nagy részében a csatornák a CTL-target sejtek érintkező felszínére kerültek. A target sejtek MHC I és a CTL sejtek CD8⁺ molekulái szintén az IS-ben gyűltek össze. Néhány esetben a Kv1.3/FLAG övszerűen körülvette a CTL és target sejt között képződő IS-t. A Kv1.3 kétféle lehetséges elrendeződése (övszerű ill. kontakt régió) arra utalhat, hogy a csatorna átrendeződése más fehérjékhez hasonlóan dinamikus: az IS érésével párhuzamosan az IS különböző doménjeibe szegregálódik.

Mi lehet a Kv1.3 csatornák IS-be történő felhalmozódásának a jelentősége? A Kv1.3 csatorna legfontosabb fiziológiai funkciója a T sejtek membránpotenciáljának szabályozása, a membránpotenciál pedig a CTL mediált citotoxicitást is szabályozza. Nem valószínű viszont, hogy a Kv1.3 csatorna IS-be jutása után lokálisan jelentősen megváltoztatná a membránpotenciált a nyugvó sejthez képest, az IS-ben koncentrációban magas protein kinázok viszont hatékonyabban tudják foszforilálni a csatornákat az IS-ben. Bizonyított, hogy a TCR/CD3 szignalizációban szerepet játszó protein kinázok (mint pl. LCK, PKC) a Kv1.3 csatornát is szabályozzák, hatással vannak annak biofizikai és fiziológiai tulajdonságaira.

Megfigyeléseink alapján valószínű, hogy a TCR/CD3 aktivációja az IS-ben együtt jár egy közeli ioncsatorna módosításával, ezáltal az IS funkciója is megváltozik, ami az IS funkciójának és a csatornák aktivitásának kölcsönös szabályozási lehetőségét jelenti, a következmény pedig a target sejt specifikus ölése.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Vizsgáltuk egy új Kv1.3 csatornablokkoló szer, az anuroctoxin hatékonyságát és specifikusságát. Megállapítottuk, hogy az anuroctoxin a Kv1.3 csatornát szelektíven gátló új toxin, amely már igen kis koncentrációban hatásosnak bizonyult ($K_d = 0.73 \text{ nM}$), ezzel szemben nem hat az IKCa1 csatornákra. Az anuroctoxin gátlás mechanizmusa hasonló a többi skorpió toxin által okozott gátláshoz, más skorpió toxinhoz hasonlóan klasszikus pórusblokkolója a Kv1.3 csatornának. Az anuroctoxin ezen kívül az általunk vizsgált feszültségfüggő Kv1.x illetve Kv2.1 csatornákra sem hatott jelentősen, ezért a klinikumban is beválhat, mint a limfocita aktivációt és proliferációt gátló hatékony immunszuppresszív szer.

Általánosan elfogadott, hogy a membránpotenciál és a kálium ioncsatornák működése fontos a limfocita proliferáció mitogén indukciójához (Cahalan 1997), a sejt térfogat szabályozásához (Deutsch 1993), és a sejt mediált citotoxicitáshoz (Schlichter 1986, Felzen 1996). Kísérleteinkben a Kv1.3 csatorna és a T sejtek jelátvitelében fontos molekulák térbeli elrendeződését és asszociációját vizsgáltuk T limfocitákon abból a célból, hogy a molekuláris kölcsönhatásokból következtethessünk a csatorna T sejt aktivációban betöltött szerepére.

A Kv1.3 csatorna specifikus jelöléséhez PCR mutagenézissel egy FLAG epitópnak megfelelő bázisszekvenciát inzertáltunk a csatornát kódoló génbe (Kv1.3/FLAG). A mutáns csatorna hasonló biofizikai tulajdonságokat mutatott, mint a Kv1.3, és specifikusan jelölhető volt.

A FLAG epitópot hordozó csatornák felhasználásával kimutattuk Jurkat sejteken, hogy a Kv1.3 csatorna eloszlása nem véletlenszerű, valamint hogy a csatorna és a CD3 molekula között membrán domén szinten kolokalizáció van. Sikerült kimutatnunk a CTL sejteken, hogy a Kv1.3 csatorna felhalmozódik az immunológiai szinapszisban. Megállapítottuk, hogy az immunológiai szinapszis képződésekor a T sejt membránban a csatorna dinamikus átrendeződése figyelhető meg, és a csatorna bejut a szinapszisba, ami magába foglalja a csatornák és a jelátviteli molekulák közötti kölcsönös szabályozási lehetőséget.

8. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Eredeti közlemények:

Panyi G, **Bagdány M**, Bodnár A, Vámosi G, Szentesi G, Jenei A, Mátyus L, Varga S, Waldmann TA, Gáspár R, Damjanovich S: Colocalization and nonrandom distribution of Kv1.3 potassium channels and CD3 molecules in the plasma membrane of human T lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:2592–2597, 2003

IF: 10,272 (JCR 2003)

Panyi G, Vámosi G, Bacsó Z, **Bagdány M**, Bodnár A, Varga Z, Gáspár R, Mátyus L, Damjanovich S: Kv1.3 potassium channels are localized in the immunological synapse formed between cytotoxic and target cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 101:1285-90, 2004

IF: 10,272 (JCR 2003)

Bagdány M, Batista CV, Valdez-Cruz NA, Somodi S, Rodriguez de la Vega RC, Licea AF, Varga Z, Gáspár R, Possani LD, Panyi G: 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. (közlés alatt: Mol Pharmacol)

IF: 5,650 (JCR 2003)

Idézhető absztraktok:

Bagdány M, Varga S, Szentesi G, Bodnár A, Jenei A, Damjanovich S, Gáspár R, Panyi G: Non-random distribution of Kv1.3 channels in the lymphocyte plasma membrane. Biophys. J. 82:250a, 2002

Varga Z, Valdez-Cruz NA, **Bagdány M**, Somodi S, Gáspár R, Possani LD, Panyi G: Anuroctoxin: a Potent and Selective Blocker of Kv1.3 Channels Biophys. J. 86: 538a, 2004

Vámosi G, Bacsó Z, Bodnár A, **Bagdány M**, Varga Z, Gáspár R, Matyus L, Damjanovich S, Panyi G: Kv1.3 potassium channels are localized in the immunological synapse formed between cytotoxic and target cells. Biophys. J. 86: 540a, 2004

Poszterek és előadások:

Bagdány M: Kv1.3 ioncsatornafehérjék sejtfelszíni eloszlásának vizsgálata heterológ expressziós rendszerekben (előadás) Ph.D. konferencia, Debrecen, 2002

Bagdány M, Varga S, Szentesi G, Bodnár A, Jenei A, Vámosi G, Damjanovich , Gáspár R. Jr., Panyi G: Kv1.3 ioncsatornafehérjék sejtfelszíni eloszlásának vizsgálata heterológ expressziós rendszerekben. (poszter) 32. Membrántranszport konferencia, Sümeg, 2002

Bagdány M, Somodi S, Gáspár R. Jr, Lourival DP, Panyi G: Az anuroctoxin a Kv1.3 kálium ioncsatorna új specifikus gátlószere. (poszter) A Magyar Biofizikai Társaság Vándorgyűlése, Szeged, 2003

Varga Z, Valdez-Cruz NA, **Bagdány M,** Somodi S, Gáspár R, Possani LD, Panyi: Anuroctoxin: A potent and selective blocker of Kv1.3 channels. (poszter) Gaiser school, Predeal, Románia, 2003