

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**HUMÁN LIMFOCITÁK KV1.3 TÍPUSÚ
IONCSATORNÁJÁNAK IMMUNFARMAKOLÓGIAI
VIZSGÁLATA PEPTID TOXINOKKAL**

PÉTER MÓZES



**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS– ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
BIOFIZIKAI ÉS SEJTBOLÓGIAI INTÉZETE
DEBRECEN, 2001.**

A szigorlati bizottság elnöke:

Prof. Dr. Kovács László, akadémikus

A szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Erdődi Ferenc, biológiai tudomány kandidátusa

Dr. Garab Győző, biológiai tudomány doktora

A védési bizottság elnöke:

Prof. Dr. Kovács László, akadémikus

Opponensek:

Prof. Dr. Szűcs Géza, orvostudomány doktora

Dr. Kiss Tibor, biológiai tudomány doktora

A védési bizottság tagjai:

Dr. Erdődi Ferenc, biológiai tudomány kandidátusa

Dr. Garab Győző, biológiai tudomány doktora

**HUMÁN LIMFOCITÁK KV1.3 TÍPUSÚ
IONCSATORNÁJÁNAK IMMUNFARMAKOLÓGIAI
VIZSGÁLATA PEPTID TOXINOKKAL**

PÉTER MÓZES

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
BIOFIZIKAI ÉS SEJTBiolÓGIAI INTÉZETE
DEBRECEN, 2001.**

Bevezetés

I. BEVEZETÉS

A meleg égövi országokban skorpió támadások következtében fellépő halálesetek nagy száma arra készítette a kutatókat, hogy a skorpió mérgek összetételét analizálják és az egyes komponensek hatásmechanizmusát feltárják. A kapott eredmények elősegítették a modern ioncsatorna kutatások fejlődését, ugyanis a skorpió méregből tisztított peptidekről kiderült, hogy azok egyes ioncsatornák azonosításához, működésének megismeréséhez és annak specifikus befolyásolásához az egyedüli kulcsot szolgáltatották. Az így kialakult kutatómunka iránya nagymértékben egybeesett a nemzetközi szinten kiemelt fontosságú ioncsatorna kutatások fő irányvonalával. Az ioncsatornákra ható toxinok kutatása napjainkban is kitüntetett fontossággal rendelkezik. A limfociták ioncsatornáira kifejtett specifikus gátló hatásuk miatt egyes skorpió toxinok az immunológiai kutatások számára is fontossá váltak, mivel segítségükkel az immunfolyamatokat a jelátvitel kapujánál, a limfociták plazmamembránjának szintjén befolyásolhatjuk.

A skorpió toxinok kitüntetett szerepet játszanak az ioncsatornák működésének kutatásában. Számos skorpió mérgé szignifikánsan csökkenti a Na^+ és K^+ csatorna aktivitást ingerlékeny sejtekben. A jelenleg ismert skorpiók mérgé főként kétfajta toxint tartalmaz:

- hosszú láncú kb. 60–70 aminosavrészt tartalmazó specifikusan Na^+ csatornákat blokkoló,
- rövid láncú kb. 37–39 aminosavrészt tartalmazó specifikusan K^+ csatornákat blokkoló polipeptidet.

A közelmúltban egy harmadik polipeptid toxin családot is kimutattak a skorpiók mérgében, amely a szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} felszabadító csatornáját aktiválja.

A legalaposabban tanulmányozott skorpió toxinok a Na^+ csatornamódosító vegyületek, amelyeket további α és β kategóriákba osztályoztak a Na^+ csatornán található eltérő kötőhelyeik alapján. Az α -skorpió toxinok főként a Na^+ csatornák inaktivációját módosítják, míg a β -skorpió toxinok a csatornák aktivációjának mechanizmusára hatnak. A K^+ csatorna blokkoló skorpió toxinok fontos szerepet játszottak az egymástól igen eltérő tulajdonságú K^+ csatornák leírásában. A legtöbbet használt charybdotoxin (ChTx) nagy affinitással blokkolja a humán limfociták Ca^{2+} aktivált K^+ csatornáit, valamint számos eltérő fajból származó feszültségfüggő K^+ csatornát. A peptid gátlószerek közé tartozó noxiustoxin (NxTx) és margatoxin (MgTx) specifikusan a feszültségvezérelt K^+ csatornákra hat, ide értve a humán T limfociták hasonló csatornáit is.

A közelmúltban számos skorpió mérgéből származó toxin struktúra-aktivitás összefüggését tanulmányozták. A toxicitáshoz és az antigenitáshoz fontos molekula szerkezeti régiókat szintetikus peptidek és monoklonális antitestek használatával feltérképezték. A skorpió mérgek toxikológiai vizsgálata területén a molekuláris

Bevezetés

biológia és modern elektrofiziológia módszereinek kombinációja új távlatokat nyit meg, amely egyben az ioncsatornák működésének mélyebb megértését is szolgálja.

A specifikus antigén hatására *in vivo* kialakuló hatékony általános immunválasz feltétele a sejtek osztódását és differenciálódását magában foglaló limfocita aktiváció. A kezdeti T-sejt receptor (TCR/CD3) stimulációt (kb. 2–3 óra) követően a limfociták a kezdeti stimulus megszűnése után továbbra is proliferációra képesek maradnak. A TCR/CD3 receptor komplex funkcionálisan kapcsolódik a foszfatidil inozitol másodlagos hírvívő rendszerhez, amely az intracelluláris szabad Ca^{2+} mobilizálásáért és a protein kináz C (PKC) aktiválásáért felelős. A plazmamembrán szintjén lezajló viszonylag jól ismert biokémiai történéseken túlmenően számos fizikai hatás is szerepet játszik a proliferatív jel közvetítésében a citoplazma és a gének irányában. Ezen folyamatokban számos esetben felmerült az ioncsatornák és a membránpotenciál szerepe, azonban a pontos hatásmechanizmus leírása a mai napig várat magára.

Leukocitákban több különféle K^+ , Na^+ , Ca^{2+} és Cl^- csatornát mutattak ki, azonban közülük csak néhányat sikerült kellő alaposággal jellemezni, azok expressziót követő plazmamembránbeli sűrűségét és kromoszóma lokalizációját is beleértve. Az n-típusú feszültségvezérelt K^+ csatorna bizonyult a domináns csatorna típusnak a limfociták többségében, amely csatorna a genetikai homológia alapján a Kv1.3 nevet kapta. Az n-típusú csatornától eltérő kinetikai paraméterekkel és gyógyszerérzékenységgel rendelkező, egér limfocitákban leírt n' és l-típusú K^+ csatornák jelenlétét eddig még nem sikerült igazolni humán T vagy B sejteken, bár l-típusú K^+ csatornák jelen vannak egy humán B limfóma sejtvonalon. Közelmúltbeli patch-clamp kísérletek közvetlen bizonyítékkal szolgáltak a Ca^{2+} aktivált K^+ csatornák jelenlétéről humán B sejtekben, patkány timocitákban, humán leukémiás T sejtekben és humán perifériás vérből preparált T sejtekben.

A K^+ csatornáknak a T sejt proliferációban játszott szerepét az alábbi, egymástól független eredmények támasztják alá:

- A mitogén indukált hiperpolarizációt a sejt plazmamembrán K^+ permeabilitás növekedése kíséri.
- A mitogén aktivált T sejtek teljes sejtfelületének K^+ vezetőképessége megnő a membránban megnövekedett számú feszültségvezérelt K^+ csatorna jelenléte miatt.
- A jól ismert K^+ csatorna gátló szerek, mint pl. a kinin, tetraetilammonium ion (TEA), ChTx, NxTx, MgTx, mind a limfociták K^+ áramait, mind pedig az azok mitogén stimuláció eredményeként előálló proliferációját gátolják.
- Autoimmun betegségeket mutató egér törzsekben funkcionálisan és fenotípusosan abnormális T sejt szubpopuláció jelenik meg, amelyhez tartozó sejtek kóros mennyiségben l-típusú K^+ csatornát tartalmaznak.

Bevezetés

Jelenleg is széles körben tanulmányozott kérdés, hogy a K^+ csatornák hogyan befolyásolják a limfocita aktivációt. A limfociták membránpotenciálját elsődlegesen a K^+ diffúziós potenciál határozza meg, ezért a legvalószínűbb elmélet szerint normális körülmények között a limfociták K^+ csatornái olyan membránpotenciál értéket tartanak fenn, amely kedvez a mitogén általi stimulus kiváltásának, valamint azt követő fenntartásának. A K^+ csatorna gátlók a T sejteket depolarizálják és a depolarizáció meggátolja a Ca^{2+} jel kialakulását, alátámasztva azt a feltételezést, hogy a K^+ csatornák indirekt úton elősegítik a Ca^{2+} beáramlást mitogén stimulálta Ca^{2+} csatornákon keresztül a fentebb részletezett, kedvező membránpotenciál érték fenntartása útján. A közelmúltban több olyan vegyületről számolt be munkacsoportunk, amelyek perifériás limfociták n-típusú K^+ csatorna aktivitását gátolva hatnak a sejtek membránpotenciáljára és így befolyást gyakorolnak a mitogén és az antitest stimulációval kiváltott limfocita aktiváció folyamatára.

Valószínűleg működőképes K^+ csatornák szükségesek az alapvető metabolitok transzportjához is, mivel pl. a TEA és a 4-aminopiridin (4-AP) a timidin és a fenilalanin felvételt gátolják egyes T sejt klónokban. A metabolikus gátló hatás inkább a K^+ csatorna gátló hatás következményének tudható be, mint a csatorna gátlószerek nem specifikus hatásának, mivel ezek a szerek nem gátolják a sejtnövekedést egy K^+ csatornát nem tartalmazó limfóma sejtvonalon.

Patch-clamp vizsgálatok a T sejtek plazmamembránjában számos további K^+ csatorna típust mutattak ki, amelyek egyedi csatorna vezetőképessége, aktivációjának feszültségfüggése, valamint Ca^{2+} érzékenysége eltérő, többek között feszültségfüggetlen, ChTx inszenzitív és nem inaktiválódó változatokat. A limfocita K^+ csatorna variabilitást molekuláris biológiai kutatási eredmények is alátámasztják.

A limfocita ioncsatornák immunmodulációs szerepére vonatkozó kutatások jelentőségét alátámasztják a Koo és munkatársai által 1997-ben közölt eredmények (1997., J.Immunol. 158:5120–5128.), amelyek szerint a limfociták feszültségvezérelt Kv1.3 ioncsatornáinak gátlása képes egyes immunreakció típusok *in vivo* gátlására, illetőleg a hosszabb idejű Kv1.3 csatorna aktivitás hiánya gátolja egyes T sejt altípusok fejlődését a thymusban.

Napjainkban az ioncsatornák struktúrájának és működésének sok részlete ismert, azonban az ide vonatkozó ismeretek köre közel sem teljes. A csatorna fehérje szerkezetének feltérképezésére és molekuláris működési mechanizmusának feltárására olyan ismert szerkezetű molekulákat lehet felhasználni, amelyek kölcsönhatnak a csatorna fehérjével és annak működését ezúton befolyásolják. A skorpiók mérgéből származó kisméretű és meglehetősen merev struktúrájú peptid inhibitorok hatásukat úgy fejtik ki, hogy az ioncsatorna külső nyílásába kötődve elzárják az áthaladás útját a kálium ionok előtt. Az ismert struktúrájú inhibitor molekulák szerkezetéből így logikusan következtetéseket lehet levonni az általuk lezárt pórus molekuláris szerkezetére. A közelmúltban egy skorpió méregből izolált

Bevezetés

kis peptid toxint, a ChTx-t használták fel erre a célra igen kiterjedten. A csatorna fehérje és a ChTx molekula kitüntetett részeinek molekuláris biológiai technikákkal történő szerkezeti módosításával vizsgálták az előidézett változások hatását a csatorna működésére. A vizsgálatok során meghatározták a csatorna fehérje és a toxin molekula egyes részei közötti elektrosztatikus kölcsönhatási energia hozzájárulásokat és tisztázták a funkció szempontjából fontos molekuláris részleteket a csatorna fehérjén, valamint a hozzá kapcsolódó toxin molekulán. A vizsgálatokból kiderült, hogy a ChTx-nak a *Shaker* K⁺ csatornához való kötődési affinitását a csatorna fehérje S5–S6 transzmembrán szegmenseit összekötő hurokban levő aminosavak határozzák meg. A *Shaker* K⁺ csatorna extracelluláris pórus szájadékának molekuláris feltérképezésére az ugyancsak skorpió méregből származó agitoxint is sikerrel használták. A fentiekből látszik, hogy új molekuláris szerkezetű peptid inhibitorok felfedezése – mint pl. a közelmúltban izolált *Pandinus imperator* venomból származó Pi1 toxin – nagyban elősegítheti az ioncsatorna működés további részleteinek megértését. Ebből a szempontból igen lényeges, hogy adott toxin csatorna típusonként eltérő mértékű kötődési affinitással és funkciómódosító képességgel rendelkezik. Ezen utóbbi tény különösen aláhúzza jelen vizsgálatok jelentőségét, amelyek során a humán limfociták Kv1.3 típusú kálium csatornáinak vizsgálatára kívántunk koncentrálni.

MacKinnon munkacsoportja részletesen tanulmányozta toxinok *Shaker* K⁺ csatornához való kötődési mechanizmusát Lq2 toxin felhasználásával (1993., *Biochemistry* 32:6982–6987.). A *Shaker* típusú K⁺ csatornákat oocytákban fejezték ki, majd csatorna fehérje mutációk és az oldat ionerősségének változtatása mellett meghatározták az Lq2 toxin asszociációs és disszociációs sebességi állandóját. Az így kapott adatokból vontak le következtetéseket a toxinok csatornához való kötődésének lépéseiről és az azokat befolyásoló hatásokról. Az asszociációs és disszociációs sebességi állandókat a blokk kialakulásának és megszűnésének kinetikájából határozták meg hasonlóképpen, ahogyan mi tettük ezt a skorpió toxinokkal (lásd alább).

A csatorna fehérje 422-es pozíciójában levő, negatív töltésű glutaminsavat neutrális glutaminra, majd pozitívan töltött lizinre cserélték és meghatározták, hogy hogyan változnak az asszociációs és disszociációs sebességi állandók. Azt találták, hogy az asszociációs sebességi állandó ötöd részére csökkent, míg a disszociációs sebességi állandó csak kismértékben változott. A csatorna mindhárom változata esetében az oldat ionerősségének növelése nagymértékben csökkentette az asszociációs sebességi állandót. Ezen eredmények jól magyarázhatók egy a pozitív töltésű toxin és a negatív töltésű csatornaszájadék között kialakuló elektrosztatikus kölcsönhatással. Itt fontos még megemlítenem, hogy mivel a csatorna négy azonos alegységből épül fel, egyetlen aminosav oldallánc töltésének a változtatása négyszeres töltésváltozást okoz a csatornaszájadékban.

Bevezetés

Eredményeiket összegezve modellt állítottak fel, melyben a toxin (Tx) csatornához (Cs) való kötődését két lépésre bontják:

1. aktivációs komplex kialakulása (AK),
2. kötött toxin–csatorna állapot kialakulása (TxCs).

Ezen lépéseket az alábbi egyenlet szemlélteti:



Az aktivációs komplex még nem jelent csatorna blokkot: a csatornán ionáram folyhat. Ebből alakulhat ki a kötött állapot, mely már nem vezet, vagy a toxin el is hagyhatja a komplexet. Ez az állapot számtalan térbeli orientációt foglal magába figyelembe véve a toxint és a csatornaszájadékot. A toxin és a csatorna között még ilyenkor jelen levő víz és kationok kiszorításával kifokú konformáció változás során megy végbe a kötött állapot kialakulása, ami már ionáramot nem vezet. Ezen utóbbi folyamatban a rövidtávolságú elektrosztatikus kölcsönhatások játszanak szerepet, melyek a csatornaszájadék bizonyos oldalláncai és a toxin meghatározott oldalláncai között alakulnak ki specifikusan. A kationok kiszorításában a csatornaszájadékból kitüntetett szerepet játszik a csatornaszájadékba mélyen behatoló, pozitív töltésű lizin.

Az aktivációs komplex kialakulásának folyamatában a nagytávolságú elektrosztatikus kölcsönhatások játszanak fontos szerepet, melyek aspecifikusak. A pozitív töltésű toxin és a negatív töltésű csatornaszájadék között kialakuló elektrosztatikus kölcsönhatás miatt a toxin koncentrációja a csatornaszájadék közelében magasabb lesz, mint az oldatban (Debye–Huckel elmélet), ami nagy asszociációs sebességi állandót eredményez, növelve így a toxinok ioncsatornák iránti affinitását.

Goldstein és munkatársai 67 féle módosított ChTx mutánst állítottak elő mind a 30. oldat felé tekintő aminosav oldallánc módosításával (1994., Neuron 12:1377–1388.). Ezután vizsgálták a mutáns toxinok kötődési tulajdonságait *Shaker B* feszültségfüggő K^+ csatornák egy módosított változatához, melyben a 425. helyen levő fenilalanint glicinre cserélték. Azért használták ezt a csatornát méréseikhez, mert ezen csatornához a ChTx 2000–szer nagyobb affinitással kötődik. Vizsgálták, hogy mi okozza ezt a nagymértékű affinitásváltozást. Ennek érdekében különböző méretű, töltéssel nem rendelkező oldallánccal bíró aminosavakra cserélték a 425. pozícióban levő fenilalanint: glicinre, alaninra, valinra és leucinra.

Azt tapasztalták, hogy az aminosav oldallánc méretének a növelése nagymértékben növeli a disszociációs sebességi állandót az asszociációs sebességi állandó lényeges változása nélkül. Ezen eredményeket egy a csatornafehérjében a 425. helyen levő aminosav oldallánca és a ChTx molekula 8–as és 9–es aminosava (mindkettő treonin) között kialakuló szterikus kölcsönhatás okozza.

Bevezetés

Megvizsgálták azt is, hogy a Thr-8-Ser+Thr-9-Gly dupla mutáns ChTx milyen affinitással kötődik a vad típusú és a 425. pozícióban glicint tartalmazó csatornához. Ezen utóbbi csatorna esetében azt találták, hogy a kötődést a dupla mutáció számottevően nem befolyásolja. Azonban abban az esetben, amikor a csatorna 425. aminosava fenilalanin volt a dupla mutáció lényegesen befolyásolta az affinitást. A mutáns toxin hétszer nagyobb affinitással kötődött a csatornához, aminek az oka a disszociációs sebességi állandó változásában van. Ennek magyarázata a szerzők szerint az oldalláncok között kialakuló szterikus gátlásban van, ami akkor jöhet létre, ha a csatorna 425. aminosava a nagyobb méretű fenilalanin.

A T limfocitákban az n-típusú áram kialakításáért felelős Kv1.3 csatornák a membrán depolarizációjára nyílnak ki. E folyamat igen részletesen ismert az irodalomból szemben a csatornák inaktivációjával. A csatornák inaktivációja limitálja a csatornák aktiválódását követő nyitott állapot időtartamát. A Kv1.3 csatornák az ioncsatornák *Shaker* családjába tartoznak. Az elmúlt néhány évben, a molekuláris biológiai módszerek széleskörű alkalmazásának köszönhetően, hatalmas mennyiségű adat gyűlt össze az ioncsatornák működésének molekuláris mechanizmusáról. MacKinnon elegáns kísérleteiben kimutatta, hogy a *Shaker* K⁺ csatorna négy azonos alegységből felépülő homotetramer molekula (1991., Nature 350:232–235.). Minden egyes alegység hat, a membránt teljes egészében átérő helikális szegmensből áll. Ezekhez a transzmembrán szegmensekhez és az őket összekötő extra és intracelluláris hurkokhoz jól meghatározott funkciók tartoznak. Egyik ilyen kitüntetett hurok az alegység N terminusában levő több pozitív töltést tartalmazó szakasz, mely a K⁺ csatornák un. N-típusú inaktivációjáért felelős. Az N-típusú inaktiváció során az inaktivációs egység a csatorna pórusának intracelluláris oldalán levő receptorhoz kapcsolódik, és így meggátolja az ionok áramlását. Számos *Shaker* K⁺ csatornában, többek között a Kv1.3-ban is hiányzik ez az inaktivációs egység, a csatorna azonban mégis inaktiválódik. Ez a felismerés vezetett a másik un. C-típusú inaktiváció felfedezéséhez, mely folyamatot az alegység C-terminális részében (hatodik transzmembrán szegmens) elhelyezkedő aminosavak összetétele és az extracelluláris térben levő oldat ionösszetétele határoz meg. Ellentétben az N-típusú inaktivációval, a C-típusú inaktiváció molekuláris mechanizmusa nem ismert, azonban a kísérletes adatok alapján a legvalószínűbb az, hogy a csatorna pórusának extracelluláris szájadéka az inaktiváció során összeszűkül. Munkacsoportunk korábbi eredményei szerint a C-típusú inaktiváció során a csatornákat alkotó négy alegység kooperatív kölcsönhatásban áll (1995., Biophys.J. 69:896–904.).

A Kv1.3 inaktivációjáért teljes egészében a C-típusú inaktiváció a felelős. A csatorna inaktivációja illetve annak modulációja fontos szerepet játszhat a limfociták membránpotenciál függő aktivációjában, illetve a sejt térfogatának szabályozásában.

Célkitűzések, anyagok és módszerek

Éppen ezért az inaktiváció folyamatának ill. szabályozhatóságának mélyebb megismerése kritikus lehet a fenti folyamatok megértése szempontjából.

II. CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteink során a következő kérdéseket vizsgáltuk:

1. Hogyan befolyásolja a *Pandinus imperator* skorpió teljes mérge (PiV) a humán limfociták ioncsatornáinak működését?
2. A skorpió mérgeinek peptidil komponensei közül melyek rendelkeznek ioncsatorna effektor hatással és milyen irányban, milyen mértékben és milyen koncentráció tartományban befolyásolják a humán limfociták ioncsatornáinak működését? Hogyan befolyásolják a toxinok a sejtek nyugalmi potenciálját?
3. Létezik-e olyan peptidil komponens, amely irreverzibilisen kötődik a limfociták feszültségfüggő K^+ csatornájához?
4. Befolyásolják-e és ha igen, akkor hogyan módosítják az egyes peptid toxin komponensek a Kv1.3 típusú csatorna kapuzási mechanizmusait.
5. A hatékony skorpió toxinok és a csatorna fehérje kölcsönhatásának melyek azok a részletei, amelyek felelősek a toxin kötődésért és a csatorna funkció módosításáért.
6. Milyen kölcsönhatások befolyásolják a toxin molekula kötődését a csatorna fehérjéhez?

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleteinkhez a humán perifériás limfocitákat heparinnal alvadásgátolt vérből szeparáltuk. A szeparálás eredményeként nyert sejteket frissen használtuk fel a kísérletekhez, vagy tenyésztettük őket a sejtek aktiválása és a feszültségfüggő K^+ csatornák számának növelése céljából phytohemagglutininnal. A T sejteket szelektív antitest adhézióval szeparáltuk.

Méréseinket Axopatch-200 és Axopatch-200A típusú patch-clamp erősítők segítségével végeztük. Az adatgyűjtéshez és az adatok kiértékeléséhez a pClamp6 programcsomagot használtuk fel. Az áramgörbéket a kiértékelés során 3 pontos boxcar módszerrel szűrtük, majd ohmikus szivárgási áramra korrigáltuk.

A mérésekhez használt extracelluláris oldat (normál Ringer) az alábbi összetevőket tartalmazta: 145 NaCl mM, 5 KCl mM, 1 MgCl₂ mM, 2,5 CaCl mM, 5,5 mM glükóz, 10 mM HEPES. Az oldat pH-ja 7,35 volt. A magas ionerősségű oldat ennek egy módosított változata volt, amiben az egyértékű ionok egy részét

Eredmények

kétértékűekkel helyettesítettük: 77,5 mM NaCl, 5 mM KCl, 48,6 mM MgCl₂, 2,5 mM CaCl₂, 5,5 mM glükóz, 10 mM HEPES. A pipetták töltésére a következő KF alapú belső oldatot használtuk: 140 mM KF, 11 mM K₂EGTA, 1 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES. A belső oldat osmolaritása 295 mOsm körül volt, pH-ját 7,2-re állítottuk be. A külső oldatokat 0,1 mg/ml borjú szérum albuminnal egészítettük ki, hogy megakadályozzuk a toxinok nem specifikus kötődését a Petri edényhez és a műanyag csövekhez. Az oldatok cseréjét a sejtek környezetében perfúziós rendszer segítségével biztosítottuk.

A blokkolási kinetika vizsgálatánál számítógép által vezérelt mágnesszelepes rendszerrel biztosítottuk a mérőszoftver és az oldatcsere szinkronizálását. A referencia elektródát agar híd segítségével kapcsoltuk a mérőedényhez, hogy az oldatcserekből adódó elektróda potenciálhibákat kiküszöböljük.

IV. EREDMÉNYEK

A Pandinus imperator teljes mérgének vizsgálata

Humán perifériás limfociták K⁺ csatornáin át megfelelő depolarizációs impulzus hatására kifelé irányuló K⁺ áram folyik. Az impulzus hatására a csatornák néhány ms-on belül kinyitnak, az áram eléri maximális amplitúdóját, majd a csatornák inaktivációja miatt a teljes sejt áram amplitúdója csökken egy alacsony egyensúlyi szintig. Korábbi mérések szerint a PiV irreverzibilisen gátolja a béka idegrostok és GH₃ sejtek feszültségfüggő K⁺ csatornáit. Ezek a csatornák a PiV erősen feszültségfüggő blokkot okoz. Ez arra utal, hogy a toxinok kötőhelye mélyen a membrán elektromos erőterében van. Humán perifériás limfocitákon végzett méréseink szerint a külső oldathoz 20 ng/ml PiV-t adva a feszültségfüggő K⁺ áram amplitúdója jelentősen csökkent. Ezek a csatornák a PiV által létrehozott blokk feszültségfüggetlennek bizonyult. A Kv1.3 csatornák a PiV által létrehozott blokk reverzibilis: kontroll oldattal történő perfúzió során az áram amplitúdója visszatér az eredeti szintre.

Számos sikeres blokkolási kísérletet végeztünk különböző koncentrációjú PiV-t tartalmazó külső oldatokkal a 0,0001–100 µg/ml-es tartományban. A kapott koncentráció-hatás összefüggés jól illeszthető az egy csatorna egy toxin molekula modellel. Ebben a modellben a megmaradó áram hányad a következő képlettel számolható: $I/I_0 = K_{df}/(K_{df} + [PiV])$, ahol I₀ az eredeti csúcsáram, I a csúcsáram a megfelelő méregkoncentráció mellett, K_{df} az effektív, látszólagos K_d és a [PiV] a *Pandinus imperator* mérgének koncentrációját jelöli. Itt effektív K_d-ről van szó, hiszen nem egyetlen fajta toxinmolekulát tartalmazó oldatról van szó, hanem egy

Eredmények

méregről, ami többféle toxint tartalmaz (lásd alább). A jó illeszkedés arra utal, hogy egy csatornához egy toxin molekula kötődik és így váltja ki a blokkot. Az illesztés eredményeül 14 ng/ml félhatásos dózist kaptunk.

A teljes méregből mexikói kollaborációs partnereink 8 toxin komponenszt izoláltak, melyeket Pi1...Pi8-nak neveztük el. Ezek 27–38 aminosavból állnak, molekulásúlyuk 3795 és 4370 között van és 3 vagy 4 diszulfid hidat tartalmaznak. Megvizsgáltuk az egyes komponensek Kv1.3 csatornára kifejtett hatását és meghatároztuk ezen toxinok félhatásos dózisát. Ezen peptidek csatornagátló hatékonysága nagyon különbözőnek bizonyult.

Külön figyelmet érdemel a Pi2 nevű komponens rendkívüli affinitása miatt ($K_{dPi2}=44$ pM), ezért ezt a peptidet részletes vizsgálatnak vetettük alá. Ugyanakkor a Pi2 és a Pi3 elsődleges szerkezete csak egyetlen aminosavban különbözik egymástól: a Pi3-ban a hetedik pozícióban prolin helyett glutaminsav van. Ennek fényében különösen érdekes, hogy disszociációs állandójuk ilyen nagymértékben különbözik egymástól ($K_{dPi3}=0.5$ nM). Ez szintén felkeltette érdeklődésünket, tisztázására további kísérleteket végeztünk (lásd alább).

A K^+ áram gátlásának karakterizálása után azt vizsgáltuk meg, hogy a PiV hogyan befolyásolja a K^+ csatorna kapuzási mechanizmusait. Ezek közül a K^+ vezetőképesség feszültségfüggésére, a K^+ áram aktivációs és inaktivációs kinetikájára a PiV nem volt hatással. Lényeges változást tapasztaltunk azonban az inaktivációból való visszatérés kinetikájában. A mérés technikáját illetően fontos, hogy a Kv1.3 típusú csatornák depolarizáció hatására kinyílnak, majd amennyiben a depolarizációs impulzust továbbra is fenntartjuk, akkor a csatornák inaktiválódnak. Az inaktiváció az egész-sejt áram amplitúdójának csökkenésében nyilvánul meg, hiszen inaktivált állapotban a csatornák nem vezetnek. Amennyiben egy teszimpulzus után egy másikat alkalmazunk olyan rövid idővel, ami alatt a csatornák egy része nem tér vissza az inaktivált állapotból, akkor a második impulzus hatására kialakuló áram amplitúdója kisebb lesz az előzőnél. Ilyenkor az inaktivált állapotból visszatért csatornák hányada (VH) meghatározható a következő képlet alapján:

$$VH = (csúcs_2 - SS_1) / (csúcs_1 - SS_1)$$

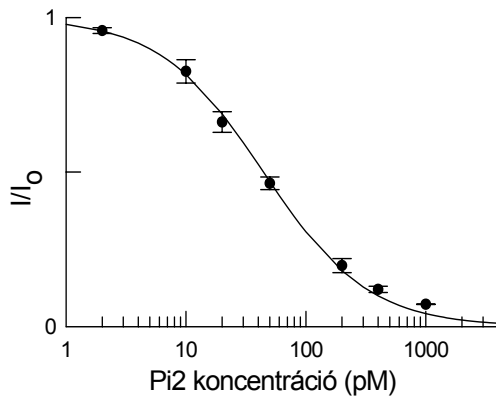
, ahol $csúcs_1$ és $csúcs_2$ az első és a második impulzus által kiváltott egész sejt áram maximumát, SS_1 pedig az első impulzus végén folyó egyensúlyi áram amplitúdóját jelenti. Az inaktivált állapotból való visszatérés kinetikáját jellemző időállandó meghatározásához a visszatért áramhányadot az impulzusok között eltelt idő függvényében ábrázoltuk, és a pontokhoz egy egy exponenciális tagot tartalmazó függvényt illesztettünk: $VH(t) = 1 - \exp(-t/T)$. Az illesztés eredményeként kapott időállandók mutatják, hogy PiV jelenlétében az inaktivált állapotból történő

Eredmények

visszatérés kinetikája felgyorsult. Ez arra utal, hogy a PiV egyes komponensei az inaktivált csatornához is kötve maradnak és destabilizálják a csatornák inaktivált állapotát.

A Pi2 rendkívül nagy affinitással kötődik a Kv1.3 csatornához

A gátlás pontos jellemzéséhez és a gátlás sztöchiometriájának meghatározásához megvizsgáltuk a Pi2 és a Pi3 által létrehozott blokk koncentrációfüggését. Különböző extracelluláris Pi2, illetve Pi3 koncentrációk mellett meghatároztuk a toxin jelenlétében mért áramamplitúdók (I) és a kontroll oldatban mért áramamplitúdók hányadosát (I/I_0). +50 mV-os depolarizáló impulzusokat alkalmaztunk 50 ms-ig -120 mV-os tartófeszültségről. A megmaradó áramhányadokat (I/I_0) ábrázolva a Pi2 koncentráció függvényében megkaptuk a dózis-hatás görbét (1. ábra).



1. ábra A Pi2 dózis-hatás görbéje. A nem blokkolt csatornák hányadát ábrázoltam a Pi2 koncentrációjának a függvényében. A nem blokkolt hányadot az I/I_0 hányados adja meg, ahol I_0 a gátlás előtti áramamplitúdó és I az áram amplitúdója a Pi2 alkalmazott koncentrációja mellett. A kapott pontokat az $I/I_0 = K_d / (K_d + [Pi2])$ képlettel illesztettem, ahol $[Pi2]$ a Pi2 toxin koncentrációját, K_d pedig a disszociációs állandóját jelöli. Az illesztés eredményeként 44 pM-t kaptunk a disszociációs állandóra.

Mivel a peptid toxinok többsége 1:1 sztöchiometriával kötődik az ioncsatornához, először az ennek megfelelő függvénnyel illesztettük a mérési pontjainkat. A $I/I_0 = K_d / (K_d + [Tx])$ függvénnyel igen jó illeszkedést kaptunk, vagyis az 1:1 sztöchiometriájú modell helytállóan bizonyult. Ez azt jelenti, hogy egy K^+ csatornához egy toxin molekula kötődik és így hozza létre a blokkot a ChTx-hoz hasonlóan. Az egyenletben a $[Tx]$ a megfelelő toxin (Pi2, ill. Pi3) koncentrációját jelöli. A függvényből meghatározott disszociációs állandó értéke $K_{dPi2} = 44$ pM lett Pi2, míg $K_{dPi3} = 795$ pM Pi3 esetében. Ennek alapján megállapíthatjuk, hogy mindkét toxin nagy affinitással kötődik a Kv1.3 típusú csatornához, különösen a Pi2, melynek disszociációs állandója rendkívül alacsony.

Eredmények

A Pi2 és a Pi3 által létrehozott blokk feszültségfüggetlen

A PiV által létrehozott blokk feszültségfüggésének vizsgálata után hasonló vizsgálatnak vetettük alá a Pi2 és a Pi3 nevű toxinokat is. A Pi2 nettó 7 pozitív töltéssel bír, a 24. pozícióban lizint tartalmaz, mely lizin ekvivalens a ChTx 27-es lizinjével, ami elengedhetetlen *Shaker* típusú K^+ csatornához való kötődéshez. Emellett számos más aminosav is befolyásolja a Kv1.3 típusú csatornához való kötődést. Különböző feszültségekre depolarizálva határoztuk meg az áramamplitúdókat, kontroll körülmények között és Pi2 jelenlétében, melyeket a feszültség függvényében ábrázoltunk. Méréseink során meghatároztuk a megmaradó áramhányadot is (MÁH) különböző tesztfeszültségek mellett. $MÁH=I/I_0$, ahol I_0 jelenti a kontroll áram amplitúdóját, I pedig az áram amplitúdóját a toxin jelenlétében az egyensúlyi blokk elérése után. A tartófeszültség -120 mV volt. A kapott pontokhoz egyenest illesztettünk, melynek elhanyagolható meredeksége jól jelzi a blokk feszültségfüggetlenségét. A Pi3 vizsgálata során ugyanezt az eredményt kaptuk. A blokk feszültségfüggetlen volta azt jelezheti, hogy a toxin receptora nem mélyen a csatorna szájadékában, hanem felszínesen, a membrán elektromos erőterétől távol van. Másik lehetőség az, hogy a membránpotenciáltól függő gátlási egyensúly kialakulásához jóval több idő szükséges, mint ami a membránpotenciál változás kezdetétől a csúcsáram kialakulásáig rendelkezésre áll (lásd a megbeszélésben).

A Pi2 és a Pi3 asszociációja és disszociációja nagyon gyors

A *Pandinus imperator* skorpió toxinok hatása a Kv1.3 típusú csatornákra kimoshatónak bizonyult. Toxint nem tartalmazó extracelluláris oldattal történő perfúzióval az eredeti áram amplitúdó tér vissza. Az alacsony K_d és a viszonylag gyors kimosási kinetika rendkívül gyors asszociációs és disszociációs sebességi állandókat feltételez a Pi2 esetében. Ennek pontos tisztázására meghatároztuk a Pi2 bemosási és a kimosási kinetikáját teljes sejt konfigurációban. A jó időbeli felbontás érdekében 15 másodpercenként depolarizáltuk a sejtet mindössze 8 ms-ig. Az alkalmazott protokoll nem vezetett kumulatív inaktivációhoz, amit jól mutat, hogy kontroll körülmények között az áram amplitúdók állandó értéket mutatnak a sorozatos ingerlés ellenére. A perfúziós rendszerünket ezen kinetikai kísérletek során minden esetben az adatgyűjtő szoftver által vezérelt mágnesszelepekkel vezéreltük.

Eredmények

A mérést a teljes sejt konfigurációba lépés után csak akkor indítottuk, amikor az áram amplitúdó stabilizálódott. A teljes sejt áram amplitúdókat a toxinnal történő perfúzió indítása után az idő függvényében ábrázoltuk és egyszerű exponenciális függvénnyel illesztettük: $A(t)=B \times \exp(-t/T_{BE})+C$, ahol $A(t)$ az áram amplitúdója t időpontban, C a csúcáram az egyensúlyi blokk kialakulása után és $B=A(t=0)-C$. A Pi2 blokk kialakulását jellemző időállandóra (T_{BE}) 58 ± 7 s–ot kaptunk ($n=7$). Az egyensúlyi blokk kialakulása után ismét kontroll oldatot áramoltattunk a sejtre, miközben az adatgyűjtést folytattuk. Az így kapott áram amplitúdókat hasonlóképpen ábrázoltuk és szintén egyszerű exponenciálissal illesztettük: $A(t)=B \times (1-\exp(-t/T_{KI}))+C$, ahol $B=A(t=\infty)-C$. Az így kapott időállandó (T_{KI}) 158 ± 21 s ($n=7$).

A Pi3 által létrehozott blokk szintén reverzibilisnek bizonyult. A Pi3 blokk kialakulásának és megszűnésének kinetikáját szintén meghatároztuk az előbbi módszerrel, 0,5 nM Pi3 alkalmazásával. A blokk kialakulását jellemző időállandónak (T_{BE}) 53 ± 3 s–ot ($n=8$) kaptunk. A blokk megszűnését jellemző időállandó (T_{KI}) pedig 80 ± 6 s–nak bizonyult Pi3 esetében ($n=7$). Mindkét esetben a kapott időállandókból a következő képletek felhasználásával számítottuk ki az asszociációs (k_{ON}) és disszociációs (k_{OFF}) sebességi állandókat, valamint az ezekből számított K_d -ket:

$$K_d = \frac{k_{OFF}}{k_{ON}} \quad k_{ON} = \frac{1 - T_{BE} \times k_{OFF}}{T_{BE} \times [Tx]} \quad k_{OFF} = \frac{1}{T_{KI}}$$

Elektrosztatikus kölcsönhatások befolyásolják a Pi2 és a Pi3 csatornához kötődését

Tanulmányoztuk, hogy a pozitív töltésű toxinok és a negatív töltésű csatornaszájadék között kialakuló elektrosztatikus kölcsönhatások hogyan befolyásolják a Pi2 és a Pi3 kötődését. Ezekhez a kísérletekhez magas ionerősségű külső oldatot használtunk fel (lásd: anyagok és módszerek). Ebben a magas ionerősségű oldatban a Na^+ ionok egy részét Mg^{++} ionokkal helyettesítettük, így az oldat ionerősségét növeltük, természetesen az oldat ozmolaritását állandó értéken tartottuk. Ez a módosítás az ionerősséget 1,4-szeresére emelte meg. A magas ionerősségű oldatban gyengébb kölcsönhatás alakul ki azonos töltéseket és azonos távolságot figyelembe véve, mert a töltések közötti dipólusok orientálódnak a külső elektromos erőternek megfelelően és így saját elektromos erőterük összegezve a külső térrel egy kisebb eredő elektromos térerősséget eredményez. Ebben a magas

Eredmények

ionerősségű oldatban is meghatároztuk az asszociációs és a disszociációs sebességi állandókat és összehasonlítottuk a kapott eredményeket a normál Ringer oldatban mért értékekkel. A magas ionerősségű oldatban mindkét toxin asszociációs sebességi állandója 32-ed részére csökkent. A Pi2 disszociációs sebességi állandója 2,8-szeresére, míg a Pi3-é 1,4-szeresére nőtt.

A Pi3 háromdimenziós szerkezete

A Pi2 NMR spektroszkópiával meghatározott háromdimenziós szerkezetét alapul véve mexikói kollaborációs partnereink elkészítették a Pi3 háromdimenziós modelljét. Ez a modell gyakorlatilag teljesen megegyezik a Pi3 nemrég megjelent NMR spektroszkópiával elkészített modelljével.

A Pi2 és a Pi3 elsődleges szerkezete csak egy aminosavban különbözik (7. prolin helyett glutaminsav a Pi3-ban), de a disszociációs állandók közötti különbség mégis 18-szoros. Ezt a tényt két lehetséges ok magyarázhatja:

1. Ez az oldallánc kitüntetett szerepet játszik a csatornához való kötődésben és a Pi3-ban jelenlevő negatív töltésű glutaminsav a csatorna egy negatív töltésű oldalláncával kerül szembe.
2. Ugyanezen negatív töltésű oldallánc a toxin molekulán belül kölcsönhat egy másik töltött oldallánccal.

Ennek tisztázására a Pi3 háromdimenziós struktúrájának megismerése adott magyarázatot. Számításaik alapján ez a különbség a másodlagos szerkezetet nem befolyásolja, de az atomok közötti távolságokat és szögeket igen. Ezek a változások megfelelnek egy a csak a Pi3-ban található glutaminsav és a 24. pozícióban levő, a csatornához való kötődésben kulcsfontosságú lizin között kialakuló sóhíd kialakulásának. Ezen sóhíd kialakulása okozhatja a disszociációs állandókban jelentkező jelentős különbséget. Ez nem meglepő, ha figyelembe vesszük, hogy ez az aminosav a csatorna szájadékába legmélyebben merül be. Ez az aminosav ekvivalens pozícióban van a ChTx 27-es lizinjével és a NxTx-ban a 28. pozícióban található.

A ChTx Ser10Asp mutációja hasonló változást okoz a toxin szerkezetében, mint ami a Pi3-ban, a Pi2 természetes mutánsában megfigyelhető

Goldstein és munkatársai korábban készítettek egy olyan ChTx mutánst, melyben a 10. pozícióban aszparaginsav van szerin helyett (1994., Neuron 12:1377–

Eredmények

1388.). Kv1.1 típusú csatornához való kötődést vizsgálva azt találták, hogy a Ser10Asp mutáns affinitása a vad típusú toxin affinitásának 1500–ad részére csökken. Amennyiben a Pi2 és a ChTx elsődleges szerkezetét megvizsgáljuk, megfigyelhetjük, hogy a Pi2 7. pozíciója megfelel a ChTx 10. pozíciójának.

Figyelembe véve azt, hogy a Pi3–ban ebben a pozícióban levő negatív töltéssel bíró aminosav a korábban leírtaknak megfelelően sóhidat képez a csatorna szájadékába mélyen bemerülő pozitív töltésű lizinnel, felmerült bennünk, hogy a ChTx fenti mutációja is hasonló konformáció változást hoz létre, ami részben, vagy teljesen magyarázhatja az eltérő affinitást. Ennek tisztázására kollaborációs partnereink elkészítették ezen mutáns háromdimenziós modelljét a ChTx–ből kiindulva. Várakozásunknak megfelelően a mutáns 10. pozíciójában levő aszparaginsav elektrosztatikus kölcsönhatásnak megfelelő közelségbe kerül a pozitív töltésű lizinhez, sóhid alakul ki közöttük.

A Pi2 befolyásolja a Kv1.3 típusú csatornák inaktívált állapotból való visszatérését

A PiV–nek a Kv1.3 típusú csatornák inaktívált állapotból való visszatérésére kifejtett hatásának az ismeretében megvizsgáltuk a Pi2 és a Pi3 esetleges hasonló hatását. A mérés során 1 másodperc hosszú depolarizációs impulzusokat alkalmaztunk különböző időintervallumokkal 1 és 60 másodperc között. Az 1 másodperces depolarizáció elegendő a Kv1.3 csatornák esetében ahhoz, hogy elérjük az egyensúlyi áramot és így a K^+ csatornák nagy részét inaktíváljuk. Az impulzuspárok között 80 másodpercet vártunk -120 mV–os tartófeszültségen, hogy a csatornák az inaktívált állapotból maradéktalanul visszatérjenek zárt állapotba. Az inaktívált állapotból visszatért csatornák hányadát a korábban ismertetett módon határoztuk meg. Egyszerű exponenciálissal való illesztés alkalmazásával határoztuk meg a visszatérés időállandóját: $VH(t)=1-\exp(-t/T)$. Az inaktívált állapotból való visszatérést a Pi2 gyorsítja, amit jól mutat, hogy az időállandó $15,42\pm 1,87$ s–ről $10,42\pm 1,04$ s–ra csökkent 50 pM Pi2 jelenlétében ($p<0,0028$, $n=6$).

A Pi2 és a Pi3 Kv1.3 típusú csatornához való affinitásában (K_d) 18–szoros különbség van, míg csak egy aminosavban különböznek. Ennek ismeretében vizsgáltuk meg azt, hogy az inaktívált állapotból való visszatérést hasonló mértékben befolyásolják–e. Bármely különbségért valószínűleg a 7. pozícióban levő különböző aminosavak tehetők felelőssé.

Az előzőekben már bemutattam, hogy az inaktívált állapotból való visszatérés kinetikája egyszerű exponenciális folyamattal írható le függetlenül attól, hogy Pi2, illetve Pi3 van–e az oldatban. Mivel a kinetika változatlan, ezért elegendő egy meghatározott időintervallum mellett összehasonlítani a Pi2 és a Pi3 hatását az

Eredmények

inaktivációból történő visszatérésre. A 7 másodperces intervallumot azért választottuk, mert a visszatért hányad itt 0,5 közelében van. A toxinokat félhatásos dózisban alkalmaztuk. A tartófeszültség -120 mV volt. Az inaktivációból visszatért hányadot a korábban ismertetett módon határoztuk meg. A 7 s alatt visszatért hányad $0,53 \pm 0,03$ volt kontroll körülmények között, és $0,56 \pm 0,03$ $0,5$ nM Pi3 jelenlétében ($p < 0,099$, $n=6$). Ugyanezt a protokollt alkalmazva a Pi2 jelenlétében a visszatért hányad $0,53 \pm 0,5$ -re nőtt $0,45 \pm 0,02$ -ről ($p < 0,009$, $n=5$). Ezen utóbbi változás szignifikánsnak bizonyult önkontrollos t-próbával. Az inaktivált állapotból való visszatérés kinetikájának különböző mértékben való befolyásolása az egyetlen különböző aminosavnak tulajdonítható a Pi2-ben és a Pi3-ban a 7. pozícióban.

A Pi2 depolarizálja a sejtmembránt

A humán limfociták membránpotenciáljának fenntartásában a feszültségfüggő K^+ csatornák fontos szerepet játszanak. Ezen csatornák nyitása a K^+ permeabilitás növekedését okozza, ami hiperpolarizációt eredményez, illetve a csatorna blokkolásával depolarizáció hozható létre, ami meggátolja a limfociták aktivációját. A K^+ csatornák tanulmányozásának fontosságát hangsúlyozza, hogy a K^+ csatornák gátlásának terápiás alkalmazási lehetőségei vannak, ugyanakkor a blokkolók hatásmechanizmusának tanulmányozása során lehetőség nyílik a csatornák szerkezetének és működésének pontosabb megismerésére. Megvizsgáltuk, hogy a Pi2 befolyásolja-e a humán limfociták membránpotenciálját. Ugyanis depolarizált membránpotenciál esetén a limfociták aktivációjának kezdeti lépései nem mennek végbe, így a membránpotenciál befolyásolásával lehetőség nyílik a limfocita aktiváció specifikus gátlására. Oxonollal jelölt humán limfociták membránpotenciálját áramlási citométerrel mértük meg 50 pM Pi2 jelenlétében és kontroll körülmények között. A Pi2 hozzáadása után már $1,5$ perccel membránpotenciál depolarizáció figyelhető meg. Ez az eredmény összhangban van patch-clamp méréseinkkel.

V. MEGBESZÉLÉS

A csatornablokkoló anyagok két csoportra oszthatók: pórusblokkolók és kapuzást befolyásoló anyagok. A csatornapórus blokkolók a csatorna szájadékába kötődnek be, és így akadályozzák meg a megfelelő ionok áramlását a csatornán át. A skorpió toxinok ezen utóbbi csoportba tartoznak, a gátlás sztöchiometriája 1:1. Adataink szerint az általunk részletesen tanulmányozott Pi2 és Pi3 is 1:1 sztöchiometriával gátolja a K^+ áramot a következők alapján:

Megbeszélés

1. Mindkét toxin dózis–hatás görbéje jól illeszthető az egy csatorna egy toxin molekulát feltételező modellel.
2. Ezen toxinok be– és kimosási kinetikája egyszerű exponenciális függvénnyel jellemezhető. Ez azt mutatja meg, hogy az asszociáció folyamata látszólagosan elsőrendű, a disszociáció pedig elsőrendű reakció.
3. Mind a Pi2, mind a Pi3 disszociációs állandóját meghatároztuk egyensúlyi blokk módszerrel és kinetikai módszerrel is az asszociációs– és disszociációs sebességi állandókból való számolással. Az első módszerrel $K_{dPi2}=44$ pM, míg a második módszerrel $K_{dPi2}=29$ pM. Ugyanezek az értékek 795 és 970 pM–nak bizonyultak a Pi3 esetében egyensúlyi, illetve kinetikai módszerrel. Az, hogy a két módszerrel meghatározott disszociációs állandók hasonlóak szintén az egy csatorna egy toxin modellt támasztják alá.

Azon esetekben, amikor a blokkoló nettó töltéssel bír és kötőhelye mélyen helyezkedik el a membrán elektromos erőterében, a blokkolás mértéke feszültségfüggő lehet. Feszültségfüggő blokk esetén, a pozitív töltésű toxin pozitívabb membránpotenciáloknál a csatornához kisebb affinitással kötődik. Ebben az esetben a disszociációs állandót (K_d) az alábbi képlet segítségével lehet kiszámolni a nulla mV membránpotenciálon mért disszociációs állandóból (K_{d0}):

$$K_d = K_{d0} \times e^{-\frac{\delta \times \Delta V \times Z \times F}{R \times T}}$$

, ahol ΔV a membránpotenciál, Z a toxin töltése, F a Faraday állandó, R a gázállandó és T a hőmérséklet. Az egyenletben szereplő δ pedig megmutatja, hogy milyen mélyen van a toxin kötőhelye a membrán elektromos erőterében.

A PiV erősen feszültségfüggő blokkot okoz idegrostokon. Méréseink szerint azonban sem a PiV, sem a Pi2, sem a Pi3 esetében nem mutatható ki feszültségfüggő blokk annak ellenére, hogy mindkét toxin és a venom egyéb komponensei is jelentős nettó pozitív töltéssel bírnak. Ennek két magyarázata lehet:

1. A toxinok kötőhelye felületesen helyezkedik el a Kv1.3 csatornákon.
2. A gátlás látszólagosan feszültségfüggetlen, a feszültségfüggés kimutatása a csatornák kapuzási sebessége és a gátlás sebessége közötti időaránytalansága miatt nem lehetséges.

Ezen második magyarázat akkor érthető meg, ha összehasonlítjuk a Kv1.3 típusú csatorna nyitási kinetikáját és a Pi2, illetve a Pi3 asszociációját és disszociációját leíró időállandókat. Az az idő, ami a teljes sejt áram maximumának eléréséhez szükséges ms–os tartományban van. A fenti toxinok asszociációját és disszociációját jellemző időállandók viszont s–os tartományban vannak. Ennek megfelelően valószínű, hogy az idő, ami a depolarizáció kezdetétől a teljes sejt áram

Megbeszélés

maximumáig eltelik nem elegendő az adott membránpotenciálra jellemző equilibrium kialakulásához. Mi pedig a blokk mértékét a teljes sejt áram maximumaiból tudjuk csak meghatározni különböző feszültségekre történő depolarizálás esetében. Egy korábbi közleményben Goldstein és Miller olyan ChTx mutánsokat alkalmaztak a gátlás feszültségfüggésének kimutatására, illetve tanulmányozására, melyek disszociációs sebességi állandója nagyon magas (1993., *Biophys.J.* 65:1613–1619.). Ezen mutánsok alkalmazásával a blokkolás feszültségfüggése kimutatható a különböző feszültségeken egy impulzus alatt mért gátlási kinetikából. Ezek alapján a 2. magyarázatot tartjuk helyesnek, azaz a gátlás csak látszólagosan feszültségfüggetlen.

A Pi2 és a Pi3 elsődleges szerkezete rendkívüli hasonlóságot mutat: mindössze egy aminosavban különböznek egymástól. A Pi3-ban a 7. aminosav glutaminsav szemben a Pi2-ben található prolinnal. Nagyon érdekes tény, hogy ezen minimális különbség ellenére a Pi3 disszociációs állandója 18-szorosa a Pi2-ének. Ennek a különbségnek az oka az asszociációs sebességi állandók különbségéből adódik leginkább, hiszen a Pi3 ezen paramétere 17-ed része a Pi2-ének, ugyanakkor a disszociációs sebességi állandója csak a kétszerese.

A disszociációs sebességi állandó kisfokú változása azt mutatja, hogy ezen aminosav csere nem befolyásolja a csatorna és a toxin között kialakuló sztérikus kölcsönhatásokat, tehát nem jön létre ennek következtében sztérikus gátlás.

Ugyanakkor ez a mutáció csökkenti a toxin töltését, hiszen a Pi2 7, míg a Pi3 6 nettó pozitív töltéssel bír. Ez természetesen befolyásolja a negatív csatornaszájadék és a pozitív toxin között kialakuló nagytávolságú elektrosztatikus kölcsönhatást. Ezen kölcsönhatást több szerző korábban már részletesen tanulmányozta toxin és csatorna mutánsok segítségével. Az elektrosztatika törvényszerűségei miatt a töltés változtatása az asszociációs sebességi állandót befolyásolja. Ennek megfelelően a ChTx és az Iberiotoxin esetében a töltés csökkentése az asszociációs sebességi állandót csökkentette. Hasonlóképpen negatív töltésű oldalláncok cseréje neutrálisra vagy pozitív töltésűre a toxin kötőhelyének közelében (422-es pozíció a *Shaker* csatornán), az asszociációs állandót csökkentették a ChTx és a Lq2 toxin esetében. Saját kísérleteink alapján a nettó hat pozitív töltéssel rendelkező Pi3 asszociációs sebességi állandója 17-ed része a Pi2-ének, amely nettó hét pozitív töltéssel bír. Ugyanakkor a disszociációs sebességi állandók hasonló nagyságrendben vannak. Mindezidáig eredményeink megfelelnek az elektrosztatikai kölcsönhatások ismeretében várható eredményeknek. Ezen modell alapján a következőket várhatjuk még:

1. az oldat ionerősségének növelése csökkenti az asszociációs sebességi állandókat, hiszen ilyen közegben azonos töltések között azonos távolságban kisebb erő ébred,

Megbeszélés

2. ezen hatás a Pi2 esetében kifejezettebb kellene, hogy legyen, hiszen a Pi2 nagyobb töltéssel rendelkezik.

Mérési eredményeink alapján az asszociációs sebességi állandók valóban csökkentek a magas ionerősségű oldatban. Ezzel egy időben viszont azt tapasztaltuk, hogy az asszociációs sebességi állandók hasonló mértékben érzékenyek a környezet ionerősségének a növelésére: az ionerősség 1,4-szeres növelése 32-ed részére csökkentette mind a Pi2, mind a Pi3 asszociációs sebességi állandóját. Ez azt mutatta meg számunkra, hogy a nagytávolságú elektrosztatikus kölcsönhatások fontos szerepet játszanak a toxin kötődésében, de ehhez a Pi3-ban levő glutaminsav nem járul hozzá számottevő mértékben, hasonlóan a Park és Miller által ChTx mutánsokkal tapasztaltakhoz (1992., Biochemistry 31:7749-7755). Ezek alapján a nagytávolságú, toxin és a csatorna között kialakuló elektrosztatikus kölcsönhatások nem tehetők felelőssé a Pi3 alacsony asszociációs sebességi állandójáért.

Akkor mi a magyarázata a Pi3 Pi2-höz viszonyított alacsony affinitásának? Ennek a kérdésnek a megválaszolására került sor a mexikói kollaborációs partnereink által végzett modellezésre, mely során a Pi3 háromdimenziós szerkezetét állították elő a Pi2 ismert háromdimenziós szerkezetéből kiindulva. Ez azt mutatta meg nekünk, hogy a vártaknak megfelelően a Pi3-ban levő glutaminsav elektrosztatikus kölcsönhatásba kerül a hozzá térben közeleső 24-es lizinnel és sóhidat képez vele. Ezen sóhid szerepének a megértése érdekében az Escobar és munkatársai, valamint Mullmann és munkatársai által ismertetett, nem diffúzió limitált bimolekuláris toxin-csatorna modellt alkalmaztuk. Ez a megközelítés kétlépcsős toxinkötődést feltételez:



Az első lépés a toxin (Tx) diffúziója az aktivációs komplexbe (AK), illetve az aktivációs komplextől. Ebben a lépésben fontos szerepet játszik a helyi elektromos potenciál és így értelemszerűen az ionerősség. Az aktivációs komplex végtelen sok konkrét térbeli orientációt foglal magába, melyek a toxin és a csatorna között alakulhatnak ki. Ebből a komplexből alakulhat ki a kötött toxin-csatorna állapot (TxCs), ami egyben az ionáram blokkolását is jelenti. Nem diffúzió limitált folyamatokban ez a lépés határozza meg a reakció sebességét és számos folyamatot foglalhat magába:

1. aminosav oldalláncok átrendeződése: a kötött állapot (TxCs) kialakulásához megfelelő konformáció kialakítása,
2. hidrogénkötések kialakulása,
3. kationok és víz kiszorítása a komplexből.

Megbeszélés

Ezen folyamatok végbemenetele után alakul ki a szoros (nem vezető) toxin-csatorna komplex. Ezen második, sebességmeghatározó lépést rövidtávolságú, a pozitív töltésű toxin és a negatív töltésű csatorna között kialakuló számos elektrosztatikus kölcsönhatás befolyásolja. Mullmann és munkatársai azzal érvelnek, hogy a lizin 27 és az arginin 34 neutralizálása csökkenti az Iberiotoxin azon képességét, mellyel kiszorítja a kationokat a csatornaszájadékból, és ezt teszik felelőssé a Lys-27-Gln, a Lys-27-Asn és az Arg-34-Asn mutánsok csökkent asszociációs sebességi állandóiért (1999., *Biochemistry* 38:2395-2402). A mi eredményeink ezen eredményeknek kvalitatíve és kvantitatíve is megfelelnek. Véleményünk szerint a Pi3 alacsonyabb asszociációs sebességi állandójának az oka a Lys24 és a Glu7 között kialakuló sóhíd, ami csökkenti a Lys24 körül kialakuló elektrosztatikus potenciált, befolyásolva ezzel azokat a rövidtávolságú elektrosztatikus kölcsönhatásokat, amelyek a kötődés második lépésében játszanak szerepet.

A ChTx Lys27-e a mélyen a K^+ csatornába hatol, ahol kölcsönhat a K^+ ionokkal. Egy további érdekes kérdés az, hogy felbomlik-e a sóhíd, amikor a toxin a csatornához kötődik. A disszociációs állandóból, az asszociációs sebességi állandóból és a disszociációs sebességi állandóból számolt szabadenergia változás a Pi2 esetében 58,5 kJ/mol, Pi3 esetében 51,4 kJ/mol. A különbség mindössze 7 kJ/mol, ami nem elegendő a sóhíd felbontásához, mert ehhez kb. 15 kJ/mol kellene. Ez azt jelenti, hogy a sóhídon kívül egyéb tényezők is szerepet játszanak a szabadenergia változásban. Ez lehet a glutaminsav és a csatorna fehérje között kialakuló kölcsönhatás, illetve hidrogénkötések és van der Waals kölcsönhatások kialakulása a toxin és a csatorna között. A teljes szabadenergia változásban ezen tényezők is szerepet játszhatnak lehetőséget adva arra, hogy a sóhíd a toxinkötődés során felbomoljon. Az, hogy a Pi2 csatornához kötődése esetében a szabadenergia változása nagyobb, mint a Pi3 esetében szintén a sóhíd jelenlétét, illetve a kötődés során végbemenő felbomlását támasztja alá.

A Pi3 sóhídjának fent említett szerepét támasztja továbbá alá egy ChTx mutáns kötődésének vizsgálata egy *Shaker* típusú K^+ csatornához. A szerzők a vad típusú ChTx és a Ser10Asp mutáns kötődését tanulmányozták *Shaker* típusú K^+ csatornához. A ChTx-ban a 10-es és a 27-es pozíció megfelel a Pi2 7-es és 24-es helyének. A ChTx-ban a szerin cseréje a negatív töltésű aszpartátra a disszociációs állandó 1500-szorosra történő növekedését okozta. Ezen adatok ismeretében felmerült bennünk, hogy a Pi2 és a Pi3 toxinokhoz hasonlóan nem alakul-e ki itt is hasonló konformációváltozás, ami az eltérő affinitást magyarázná. Ötletünk alapján mexikói kollaborációs partnereink elvégezték ezen mutáns háromdimenziós modellezését is, és egy a Pi3-ban levő sóhídhöz rendkívül hasonló konformációt találtak. Ez az eredmény magyarázatot ad a Ser10Asp ChTx mutáns eltérő affinitására.

Megbeszélés

Az általunk felismert sóhíd jelenlétét bizonyítja egy nemrég megjelent közlemény, melyben a Pi3 NMR spektroszkópiával meghatározott háromdimenziós szerkezetét ismertetik a szerzők a Pi2–vel összehasonlítva (2000., Proteins 38:441–449.). Megállapították, hogy a Pi2 és a Pi3 másodlagos szerkezete azonos, és leírták a harmadlagos szerkezet különbözőségét okozó kölcsönhatást, ami gyakorlatilag azonos a kísérleteink alapján felvetett, és 3D modellezéssel verifikált kölcsönhatással a glutamát és a lizin között. Pusztán NMR spektroszkópiás adatokra alapozva a szerzők a Pi3 csökkent affinitását a sóhíd kialakulásának tulajdonították.

Annak ismeretében, hogy a Pi3–ban sóhíd alakul ki a glutamát és a lizin között további hasonló K^+ csatorna toxinokat kerestünk az irodalomban. Tytgat és munkatársai nemrég megjelent közleményükben egységes nevezéktant javasolnak a K^+ csatorna blokkolók vonatkozásában, és 49 aminosav sorrendet mutatnak be, ami azóta 50–re egészült ki (1999., Trends Pharmacol. Sci. 20:444–447.). Ezen toxinok elsődleges szerkezetének tanulmányozása során megállapítottuk, hogy a Pi3 sóhídjához hasonló sóhíd egyikben sem alakulhat ki. Egyedül a dél–afrikai *Parabuthus* skorpió PBTX1 és a PBTX2 nevű toxinjai tartalmazznak savas oldalláncot a 10–es pozíció közelében. Ezen toxinok a 11–es alcsoportba tartoznak és a K^+ csatornához való affinitásuk alacsony. Ugyanakkor ezen toxinok a 26–os pozícióban, mely ekvivalens a ChTx 27–tel, valint tartalmazznak, ami lehetetlenné teszi az előzőekhez hasonló sóhíd kialakulását.

Méréseink alapján a PiV gyorsítja a Kv1.3 típusú feszültségfüggő K^+ csatornák inaktivált állapotból való visszatérését. Ez arra utal, hogy a venom valamelyik toxinja vagy toxinjai kötve maradnak az inaktivált állapotban levő csatornához. Megvizsgáltuk a Pi2, a venom Kv1.3 típusú csatornával szembeni legnagyobb affinitással rendelkező toxinjának hasonló hatását is. Azt találtuk, hogy a Pi2 szintén gyorsítja ezen csatornák inaktivált állapotból való visszatérését. Ennek alapján elmondhatjuk, hogy a Pi2 kötődik az inaktivált csatornához is, destabilizálja annak inaktivált állapotát, így segíti a csatorna visszatérését a zárt állapotba.

A Pi2 és a Pi3 disszociációja a Kv1.3 típusú csatornáról viszonylag gyors, a folyamatot jellemző időállandó ~180 s a Pi2, és ~58 s a Pi3 esetében. A viszonylag gyors disszociáció teszi lehetővé, hogy az inaktivált állapotból való visszatérés folyamata alatt tekintélyes számú disszociáció és asszociáció jön létre, ami lehetővé teszi az inaktivált állapotból való visszatérést befolyásoló hatás kimutatását. Összehasonlítottuk a Pi2 és a Pi3 inaktivált állapotból való visszatérést gyorsító képességét a Kv1.3 típusú csatornákon. Az inaktivált állapotból való visszatérést a Pi2 szignifikánsan gyorsítja, míg a Pi3 nem. Ez azt jelenti, hogy az egyetlen aminosav, ami a Pi2–ben és a Pi3–ban különbözik, befolyásolja az inaktivált állapotból való visszatérés gyorsításának a képességét. Jelenleg nem ismerjük ezen különbség molekuláris hátterében rejlő okot. Figyelembe véve a C–típusú inaktiváció bonyolult, jelenleg még nem teljesen tisztázott folyamatát számos

Összefoglalás, közlemények

mechanizmus jöhet szóba. Elképzelhető például, hogy a csatornához kötött toxin befolyásolhatja az inaktívált állapotból való visszatérésre ható K^+ kötőhely telítettségét.

VI. ÖSSZEFOGLALÁS

Összefoglalva tanulmányoztuk a *Pandinus imperator* nevű skorpió teljes venomjának és egyes toxin komponenseinek a hatását a limfociták plazmamembránjában található Kv1.3 típusú csatornákra. Ezen csatornák fontos szerepet játszanak az immunválaszban, a működésükre ható szerekkel új útvonalon nyílik mód immunmechanizmusok befolyásolására egyes immunrendszert érintő betegségekben. Méréseink során felismertük, hogy a Pi2 nevű komponens rendkívül nagy affinitással kötődik ezen csatornához. Ezen toxin szerkezetéből kiindulva a későbbiek során esetleg a Kv1.3 csatornákra nagyon alacsony koncentrációban ható immunszupresszor hatású gyógyszer kifejlesztésére nyílnak lehetőségek. Elvégeztük a Pi2 és természetes mutánsának, a Pi3-nak az összehasonlító elektrofiziológiai vizsgálatát és megtaláltuk az eltérő affinitás háromdimenziós szerkezetben rejlő magyarázatát. Kimutattuk a Pi2 hatását a Kv1.3 típusú csatornák inaktívált állapotból való visszatérésére, mely segítséget nyújthat az eddig teljesen még nem tisztázott C-típusú inaktiváció molekuláris mechanizmusának a megértéséhez.

VIII. KÖZLEMÉNYEK:

Az értekezésben felhasznált közlemények:

1. Péter, M., jr., Varga, Z., Panyi, G., Bene, L., Damjanovich, S., Pieri, C., Possani, L.D. and Gáspár, R., jr. *Pandinus imperator* scorpion venom blocks voltage-gated K^+ channels in human lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242. 621–625, (1998)

IF: 3,161

2. Péter, M., jr., Varga, Z., Hajdu, P., Gáspár, R., jr., Damjanovich, S., Horjales, E., Possani, L.D. and Panyi, G. Effects of toxins Pi2 and Pi3 on human T lymphocyte Kv1.3 channels: the role of Glu7 and Lys24 J. *Membrane Biol.* 179. 13–25, (2001)

IF: 3,187

Egyéb közlemények:

1. Péter, M., jr., Hajdu, P., Varga, Z., Damjanovich, S., Possani, L.D., Panyi, G. and Gáspár, R., jr. Blockage of Human T Lymphocyte Kv1.3 Channels by Pi1, a

Közlemények

Novel Class of Scorpion Toxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278. 34–37, (2000)

IF: 3,161

2. Varga, Z., **Péter, M. jr.**, Panyi, G., Pieri, C., Csécsey Gy., Damjanovich, S., Gáspár, R. jr. Multiple Binding Sites for Melatonin on Kv1.3. *Biophys. J.* 80. 1280–97, (2001)

IF: 4,58

Könyvfejezetek:

1. **Péter, M., jr.**, Varga, Z., Krasznai Z., Panyi, Gy., Gáspár, R. Recording and analysis of membrane potential and ion currents in cultured peripheral human lymphocytes, *In: Practical guide to physical analysis of cell surface receptors*, University Medical School of Debrecen, Hungary, 1998. ISBN: 9639070319

A témakörben megjelent absztraktok:

1. Gáspár, R., jr., **Péter, M., jr.**, Varga, Z., Panyi, Gy., Damjanovich, S. The effect of *Pandinus imperator* scorpion venom on the K⁺ channels of human peripheral blood lymphocytes, *Toxicon*, 36: 1280, (1998)

2. Varga Z., **Péter M. Jr.**, Panyi Gy., Pieri C., Damjanovich S., Gáspár R.: Molecular pharmacological effects of melatonin on K⁺ channels of human T-lymphocytes, *Biophys J.*, 76: A76 (1999)

3. **Péter M. Jr.**, Varga Z., Panyi Gy., Damjanovich S., Possani L. D., Gáspár R.: *Pandinus imperator* Pi2 toxin blocks voltage-gated potassium channels with high affinity, *Biophys J.*, 76: A75 (1999)

4. Varga Z., **Péter M., Jr.**, Panyi Gy., Damjanovich S., Possani L. D., Gáspár R., jr.: A putative salt bridge between Glu7 and Lys24 may explain the different binding kinetics of Pi2 and Pi3 scorpion toxins to Kv1.3, *Biophys. J.*, 78. 97A (2000)