

**Humán limfociták Kv1.3 típusú ioncsatornájának
immunfarmakológiai vizsgálata peptid toxinokkal.**

Péter Mózes

Témavezető: Dr. Gáspár Rezső egyetemi tanár

DEBRECENI EGYETEM
ORVOS– ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSI KAR
BIOFIZIKAI ÉS SEJTBiolÓGIAI INTÉZET

Debrecen, 2001.

Rövidítések jegyzéke:

Charybdotoxin	ChTx
Margatoxin	MgTx
Noxiustoxin	NxTx
<i>Pandinus impearator</i> venom	PiV
<i>Pandinus imperator</i> toxinok (1-8)	Pi1-Pi8
Tetraetilammonium	TEA

<i>I. BEVEZETÉS</i>	1
Skorpió toxinok hatása az ioncsatornák működésére	1
Limfociták ioncsatornáinak szerepe a sejtaktivációs folyamatokban	2
Az ioncsatornák funkció–molekuláris szerkezet összefüggés vizsgálata	4
Toxinok csatornákhöz való kötődési mechanizmusának vizsgálata	5
A Kv1.3 típusú csatorna inaktivációja	8
<i>II. CÉLKITŰZÉSEK</i>	10
<i>III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</i>	11
Sejtek	11
Elektrofiziológia	12
Skorpió toxinok	13
Áramlási citometriás mérések	13
A Pi3 és a Ser–10–Asp mutáns ChTx 3D modellezése	14
<i>IV. EREDMÉNYEK</i>	15
A <i>Pandinus imperator</i> teljes mérgének vizsgálata	15
A Pi2 rendkívül nagy affinitással kötődik a Kv1.3 csatornákhöz	20
A Pi2 és a Pi3 által létrehozott blokk feszültségfüggetlen	21
A Pi2 és a Pi3 asszociációja és disszociációja nagyon gyors	23
Elektrosztatikus kölcsönhatások befolyásolják a Pi2 és a Pi3 csatornához kötődését	25
A Pi3 háromdimenziós szerkezete	26
A ChTx Ser10Asp mutációja hasonló változást okoz a toxin szerkezetében, mint ami a Pi3–ban a Pi2 természetes mutánsában megfigyelhető	27
A ChTx Ser10Asp mutációja hasonló változást okoz a toxin szerkezetében, mint ami a Pi3–ban a Pi2 természetes mutánsában megfigyelhető	28

A Pi2 befolyásolja a Kv1.3 típusú csatornák inaktivált állapotból való visszatérését	29
A Pi2 depolarizálja a sejtmembránt	30
<i>V. MEGBESZÉLÉS</i>	32
<i>VI. ÖSSZEFOGLALÁS</i>	39
<i>VII. REFERENCIÁK</i>	40
<i>VIII. KÖZLEMÉNYEK:</i>	49
Az értekezésben felhasznált közlemények:	49
Egyéb közlemények:	49
Könyvfejezetek:	50
A témakörben megjelent absztraktok:	50
<i>IX. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</i>	51
<i>X. MELLÉKLET</i>	52

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 egybe esett a nemzetközi szinten kiemelt fontosságú ioncsatorna kutatások fő irányvonalával. Az ioncsatornákra ható toxinok kutatása napjainkban is kitüntetett fontossággal rendelkezik. A limfociták ioncsatornáira kifejlesztett 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.

Skorpió toxinok hatása az ioncsatornák működésére

A skorpió toxinok kitüntetett szerepet játszanak az ioncsatornák működésének kutatásában (1; 2). Számos skorpió mérge szignifikánsan csökkenti a Na^+ és K^+ csatorna aktivitást az ingerlékeny sejtekben (3). A jelenleg ismert skorpiók mérge főként kétfajta toxint tartalmaz:

- hosszú láncú kb. 60-70 aminosavrésszt tartalmazó specifikusan Na^+ csatornákat blokkoló (4; 5)
- rövid láncú kb. 37-39 aminosavrésszt tartalmazó specifikusan K^+ csatornákat blokkoló polipeptidet (6-10).

A közelmúltban egy harmadik polipeptid toxin családot is kimutattak a skorpiók mérgeiben, amely a szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} felszabadító csatornáját aktiválja (11).

A legalaposabban tanulmányozott skorpió toxinok a Na^+ csatornamódosító vegyületek, amelyeket további α és β kategóriákba osztályoztak a Na^+ csatornán

található eltérő kötőhelyeik alapján (5; 12; 13). Az α -skorpió toxinok főként a Na^+ csatornák inaktivációját módosítják (14), míg a β -skorpió toxinok a csatornák aktivációjának mechanizmusára hatnak (15-17). A K^+ csatorna blokkoló skorpió toxinok fontos szerepet játszottak az egymástól igen eltérő tulajdonságú K^+ csatornák leírásában (2; 18). A legtöbbet használt charybdotoxin (ChTx) nagy affinitással blokkolja a humán limfociták Ca^{2+} aktivált K^+ csatornáit, valamint számos eltérő fajból származó feszültségfüggő K^+ csatornát (19; 20). 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 (19; 21).

A közelmúltban számos skorpió mérgéből származó toxin struktúra-aktivitás összefüggését tanulmányozták (22). A toxicitáshoz és az antigenitáshoz fontos molekula szerkezeti régiókat szintetikus peptidok és monoklonális antitestek használatával feltérképezték (23; 24). A skorpió mérgek toxikológiai vizsgálata területén a molekuláris biológia és modern elektrofiziológia módszereinek kombinációja új távlatokat nyit meg, amely egyben az ioncsatornák működésének mélyebb megértését is szolgálja (25-30).

Limfociták ioncsatornáinak szerepe a sejtaktivációs folyamatokban

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 (31). A TCR/CD3 receptor komplex funkcionálisan kapcsolódik a foszfatidil inozitol másodlagos hírvivő rendszerhez (32), 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 (33). Ezen folyamatokban számos esetben felmerült az ioncsatornák és a membránpotenciál szerepe, azonban a pontos hatásmechanizmus leírása a mai napig várat magára (34).

Leukocitákban több különféle K^+ , Na^+ , Ca^{2+} és Cl^- csatornát mutattak ki, azonban közülük csak néhányat sikerült kellő alaposítással jellemezni, azok expressziót követő

plazmamembránbeli sűrűségét és kromoszóma lokalizációját is beleértve (35; 36). 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 (37-42). 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 (41; 43), bár l-típusú K^+ csatornák jelen vannak egy humán B limfóma sejtvonalon (44). Közelmúltbeli patch-clamp kísérletek közvetlen bizonyítékkal szolgáltak a Ca^{2+} aktivált K^+ csatornák jelenlétéről humán B sejtekben, patkány timocitákban, humán leukémiás T sejtekben (45; 46) és humán perifériás vérből preparált T sejtekben (47).

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 (órák/napok) alatt 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 eltérő határfokkal, de gátlószerekként azonos mértékben gátolják (19; 48-51).
- Autoimmun betegségeket mutató egér törzsekben funkcionálisan és fenotípusosan abnormális T sejt szubpopuláció jelenik meg, amelyhez tartozó sejtek kóros mennyiségben l-típusú K^+ csatornát tartalmaznak (43).

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 (34), 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 (19; 51; 52) és a depolarizáció meggátolja a Ca^{2+} jel kialakulását (53-55), 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 (42). 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 (56-59).

Valószínűleg működőképes K^+ csatornák szükségesek az alapvető metabolitok transzportjához is, mivel pl. a TEA és a 4-AP a timidin és a fenilalanin felvételt gátolják egyes T sejt klónokban (60). 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 sejt növekedést egy K^+ csatornát nem tartalmazó limfóma sejtvonalon (49).

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 (18; 61). A limfocita K^+ csatorna variabilitást molekuláris biológiai kutatási eredmények is alátámasztják (36; 62-65).

A limfocita ioncsatornák immunmodulációs szerepére vonatkozó kutatások jelentőségét alátámasztják a Koo és munkatársai által 1997-ben közölt eredmények, 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 (66).

Az ioncsatornák funkció–molekuláris szerkezet összefüggés vizsgálata

Napjainkban az ioncsatornák struktúrájának és működésének sok részlete ismert, azonban a 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 (67). A közelmúltban egy skorpió méregből izolált kis peptid toxint, a ChTx-t használták fel erre a célra igen kiterjedten (68-70). 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 lévő aminosavak határozzák meg. A *Shaker* K⁺ csatorna extracelluláris pórus szájadékának molekuláris feltérképezésére az ugyancsak skorpió méregből származó agitoxint is sikerrel használták (67). 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 (29). 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.

Toxinok csatornához való kötődési mechanizmusának vizsgálata

MacKinnon munkacsoportja részletesen tanulmányozta toxinok *Shaker* K⁺ csatornához való kötődési mechanizmusát Lq2 toxin felhasználásával (71). 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 lévő, 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 5-öd 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.

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 még magába figyelembe véve a toxint és a csatornaszájadékot. A toxin és a csatorna között még ilyenkor jelen lévő 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 (72), 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 (70). Ezután vizsgálták a mutáns toxinok kötődési tulajdonságait *Shaker B* feszültségfüggő K^+ csatornák egy módosított változatához, melyben a 425. helyen lévő 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 lévő 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 lévő aminosav oldallánca és a ChTx molekula 8-as és 9-es aminosava (mindkettő treonin) között kialakuló sztérikus kölcsönhatás okozza.

A csatorna 425. pozíciójában lévő aminosav a ChTx 8. és 9. pozícióiban lévő aminosavak oldalláncaival kerül kölcsönhatásba a kötődés során. 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 csatornákhöz. 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 oldallánccok között kialakuló sztérikus gátlásban van, ami akkor jöhet létre, ha a csatorna 425. aminosava a nagyobb méretű fenilalanin.

A Kv1.3 típusú csatorna inaktivációja

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 (73). Az elmúlt néhány évben, a molekuláris biológiai módszerek széleskörű alkalmazásának köszönhetően, hatalmas mennyiségű adat gyűlt össze az ioncsatornák működésének molekuláris mechanizmusáról. MacKinnon (1991) elegáns kísérleteiben kimutatta, hogy a *Shaker* K^+ csatorna négy azonos alegységből felépülő homotetramer molekula (74). 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 (2). Egyik ilyen kitüntetett hurok az alegység N terminusában lévő több pozitív töltést tartalmazó szakasz, mely a K^+ csatornák u.n. N-típusú inaktivációjáért felelős. Az N-típusú inaktiváció során az inaktivációs egység a csatorna pórusának intracelluláris oldalán lévő receptorhoz kapcsolódik, és így meggátolja az ionok áramlását (75; 76). 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 u.n. C-típusú inaktiváció felfedezéséhez, mely folyamatot az alegység C-terminális részében (hatodik transzmembrán szegmens) elhelyezkedő aminosavak összetétele és az extracelluláris térben lévő oldat ionösszetétele határoz meg (77). 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 (78). Munkacsoportunk korábbi eredményei szerint a C-típusú inaktiváció során a csatornát alkotó négy alegység kooperatív kölcsönhatásban áll (79).

A Kv1.3 inaktivációjáért teljes egészében a C-típusú inaktiváció a felelős (79-81). A csatorna inaktivációja illetve annak modulációja fontos szerepet játszhat a limfociták membránpotenciál függő aktivációjában, illetve a sejt térfogatának szabályozásában (82). 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

Sejtek

Kísérleteinkhez humán perifériás limfocitákat egészséges önkéntesek heparinnal alvadásgátolt véréből szeparáltuk Ficoll–Hypaque sűrűség gradiens centrifugálással. A szeparálás eredményeként nyert sejteket frissen használtuk fel a kísérletekhez, vagy tenyésztettük őket. A tenyésztett sejteket steril körülmények között szeparáltuk és kezeltük. Ezeket a sejteket kétszer mostuk Ca^{++} és Mg^{++} mentes HBSS-ben 25 mM Hepes jelenlétében 7,4-es pH-n. A sejteket 0,5 millió/ml-es koncentrációban RPMI–1640 tenyésztőoldatban vettük fel. Ez az oldat 25 mM Hepest, 10% fetális borjú savót, 100 u./l penicillint, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomicint és 2 mM L–glutamint is tartalmazott. 24 lyukú tenyésztőedénybe 1 milliliterenként osztottuk szét a sejteket tartalmazó tenyésztőoldatot. A sejtek aktiválása és egyben a feszültségfüggő K^+ csatornák számának növelése céljából a sejteket phytohemagglutinin jelenlétében inkubáltuk párasított inkubátorban 37 °C-on 5% CO_2 jelenlétében (83; 84). A phytohemagglutinin 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, illetve 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ koncentrációban alkalmaztuk. Az aktivált sejteket az inkubációtól kezdettől számított harmadik (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ phytohemagglutinin), illetve negyedik (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ phytohemagglutinin) napon használtuk fel a mérésekhez.

Méréseinkhez a T sejteket szelektív antitest adhézióval szeparáltuk Matteson és Deutsch módszerével (39). A tenyésztés végén nyert sejtszuspenziót egér–anti–humán CD2 IgG–vel (Beckton–Dickinson, San Jose, CA), egy specifikus T limfocita ellenes antitesttel jelöltük meg. Az így megjelölt sejteket egy olyan Petri csészében inkubáltuk 22 percig jégen, melynek az aljára kecskében termelt egér IgG ellenes antitesteket adszorbeáltunk. Az inkubálás után a Petri csészét ötször 1 ml normál Ringer oldattal körkörös mozdulatokkal mostuk, így az elsődleges antitesttel nem jelölt sejteket eltávolítottuk, míg a kitapadt anti–humán CD2–vel jelzett T limfociták a Petri csészében maradtak.

Elektrofiziológia

Méréseinket Axopatch-200 és Axopatch-200A típusú patch-clamp erősítők segítségével végeztük. A patch-clamp erősítők Axon Instruments TL-1-125, illetve Digidata 2000-es típusú illesztő kártyákkal csatlakoznak egy-egy IBM kompatibilis személyi számítógéphez. Ez a rendszer végzi az ingerlő impulzusok előállítását, az adatgyűjtést és az adatok tárolását is. Az adatgyűjtéshez és az adatok kiértékeléséhez a pClamp6 programcsomagot (Axon Instruments Inc., Foster City, CA) használtuk fel. A felhasznált pipettákat GC 150 F-15-ös boroszilikát üvegkapillárisból (Clark Biomedical Instruments, UK) húztuk, melyeknek az ellenállása polírozás után 2-3 M Ω között volt. A pipetta és a sejtmembrán közötti nagyellenállású kontaktus létrehozásának érdekében 10-15 vízcm-es negatív nyomást alkalmaztunk. A kontaktus kialakulása és a pipetta kapacitás kompenzálása után a pipetta alatti membránt rövid ideig tartó vákuum impulzus alkalmazásával átlyukasztottuk és így teljes sejt konfigurációba jutottunk. A méréseket a teljes sejt konfiguráció kialakítása után 8-10 perccel kezdtük el és szobahőmérsékleten végeztük feszültség-zár üzemmódban. Méréseink során szükség esetén soros ellenállás kompenzációt alkalmaztunk egészen 85 %-ig a soros ellenálláson eső hiba korrekciójának érdekében, így a feszültséghibát minden esetben 5 mV alá csökkentettük.

Az áramgörbéket a kiértékelés során 3 pontos boxcar módszerrel szűrtük, majd ohmikus szivárgási áramra korrigáltuk. Ezen korrekció azon alapszik, hogy a negatív tartófeszültségnél a csatornák zárt állapota mellett a szivárgási áram ellenállása meghatározható, és mivel a szivárgási áram amplitúdója lineárisan függ az alkalmazott membránpotenciáltól bármely membránpotenciál esetén a mért áramból ezen zavaró komponens levonható.

A kísérletek során kapott adatok statisztikai módszerekkel történő feldolgozása során egy- és kétmintás t-próbát alkalmaztunk $p=0,05$ szignifikancia szint mellett. Mérési adatok során átlagokat és azok közepes hibáját (SEM) adtunk meg.

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

77,5 mM NaCl, 5 mM KCl, 48,6 mM MgCl₂, 2,5 mM CaCl₂, 5,5 mM glükóz, 10 mM HEPES. Így normál külső oldat 190,5 mOsm-os ionerőssége 265,9 mOsm-ra nőtt. A külső oldatok ozmolaritása mindkét esetben 302 és 308 mOsm között volt. 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 ozmolaritása 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 PE10-es polietilén csövekből épített perfúziós rendszer segítségével biztosítottuk. A perfúziós fejet a vizsgált sejt közvetlen közelébe helyeztük el a sejttől kevesebb, mint 0,5 mm-re. Először mindig a kontroll oldattal perfundáltunk, majd pedig a megfelelő toxint tartalmazó oldattal. 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.

Skorpió toxinok

A felhasznált toxinok tisztítása kromatográfiás eljárással történt. A PiV-ot a skorpióktól elektromos stimulációval nyertük. A skorpió méreg oldható frakcióit először Sephadex G-50-el töltött oszlopon szeparáltuk. A III. számú frakciót, amely az aktív peptid komponenseket tartalmazza nagynyomású folyadék kromatográfiával szubfrakciókra bontottuk (Pi1-Pi8). A tisztított peptid toxinok aminosav összetételét Beckmann 6300E aminosav analizátor, szekvenciáját pedig automatikus ProSequencer (Millipore model 6400/6600) segítségével határoztuk meg (30; 85). A toxinok izolálását kollaborációs partnerünk (Dr. Possani) laboratóriumában végezték.

Áramlási citometriás mérések

Az áramlási citometriás méréseket módosított Beckton–Dickinson FACS Star áramlási citométerrel végeztük el. 10⁶ sejtet 15,5 nM oxonollal (DiBAC4(3)) 1 ml

térfogatban 37 °C-on 3 percig inkubáltuk. Minden mérés 8000 sejtről készült. Az adatgyűjtést az élő sejtekre korlátoztuk az előre irányuló fényszórást felhasználva.

A Pi3 és a Ser-10-Asp mutáns ChTx 3D modellezése

A Pi2 háromdimenziós szerkezete a brookhaveni fehérje adat bankból származik, bejegyzés száma 2PTA (86). A bejegyzés alatt található első konformációt használtuk fel a Pi3 háromdimenziós modellezésére. A direkt mutáció utasítást használtuk az "O" programban (87) annak érdekében, hogy a hetedik helyen lévő aminosavat prolinról glutamára változtassuk és a modellezés alapjául szolgáló kiinduló szerkezethez jussunk. Ez a lépés természetesen adódott, mivel a 7-es prolin Pi2-beli Ramachandran szögei kompatibilisek egy ugyanebben a pozícióban lévő glutamátéval ($\phi=-77$, $\psi=-29$). Következő lépésként a Rotamer keresés utasítást alkalmaztuk annak érdekében, hogy a legkedvezőbb kölcsönhatási paraméterekkel rendelkező rotamert kiválasszuk. A folyamat eredményeként kiválasztottuk a Glu második legvalószínűbb rotamerjét. A lizin 24 rotamert is megváltoztattuk annak érdekében, hogy a Glu 7-el létrejöhessen a sóhíd. Mivel ebben a konformációban nem ébredtek taszító kölcsönhatások ill. nem generálódott feszültség a fehérje-vázon belül az alkalmazott pont mutáció hatására, úgy döntöttünk, hogy ezt a modellt használjuk további optimalizálás nélkül. Az eredményként kapott sóhíd geometria megfelel a természetes körülmények között adódónak és kompatibilis a jelen munka kísérleti eredményeivel.

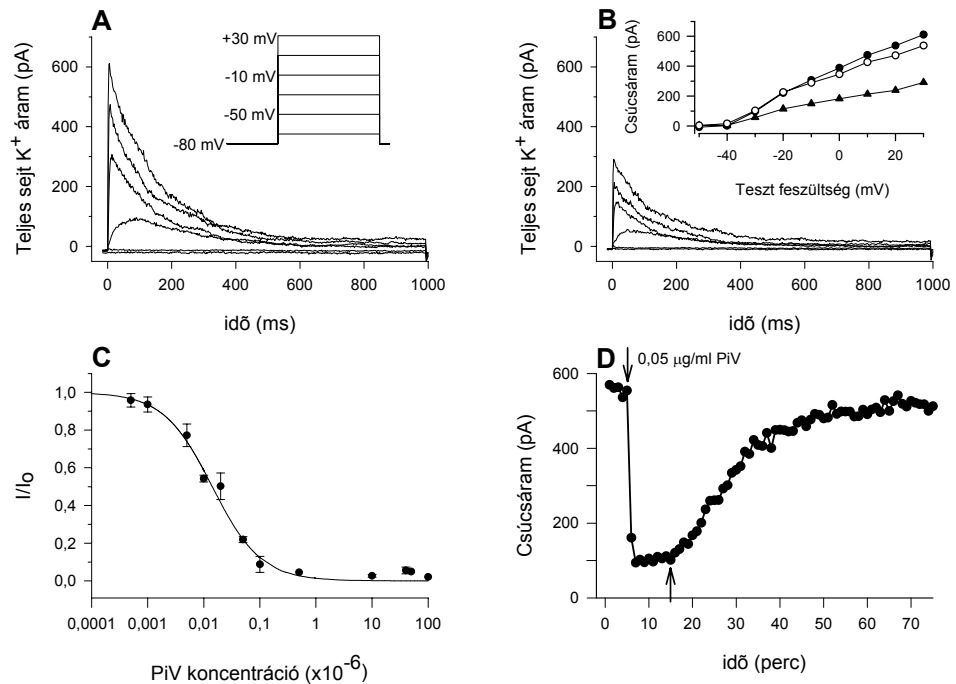
A vad típusú ChTx háromdimenziós szerkezete a brookhaveni fehérje adat bankból származik, bejegyzés száma 2CRD (88). A Ser-10-Asp ChTx mutánst a Pi3-hoz hasonlóan építettük fel és az eredményként kapott rotamerek is hasonlóak voltak. A modellezést Dr. Possani laboratóriumával közösen végeztük.

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 (1. ábra A része). Korábbi mérések szerint a PiV irreverzibilisen gátolja a béka idegrostok és GH_3 sejtek feszültségfüggő K^+ csatornáit (89; 90). 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 (1. ábra A és B része). Ezek a csatornák a PiV által létrehozott blokk feszültségfüggetlennek bizonyult (1. ábra B része, betét). A Kv1.3 csatornák a PiV által létrehozott blokk reverzibilis: kontroll oldattal történő perfúzió során az áram amplitúdója visszatér az eredeti szintre (1. ábra D része).

Számos sikeres blokkolási kísérletet végeztünk különböző koncentrációjú PiV-t tartalmazó külső oldatokkal a 0,0001-100 $\mu\text{g/ml}$ -es tartományban. A kapott koncentráció-hatás összefüggés jól illeszthető az egy csatorna egy toxin molekula modellel (1. ábra C része). Ebben a modellben a megmaradó áram hányad a következő képlettel számolható: $I/I_0 = K_{df}/(K_{df} + [PIV])$, ahol I_0 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 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.



1. ábra Az extracellulárisan adott PiV blokkolja a humán limfociták feszültségfüggő K^+ áramait. **A rész:** Kontroll áramok Ringer odattal történő perfúzió alatt. -80 mV-os tartófeszültségről depolarizáltuk a sejteket először -70 mV-ra, majd 10 mV-onként egyre nagyobb feszültségekre $+30$ mV-ig. A jobb áttekinthetőség kedvéért csak bizonyos impulzusok által kiváltott áramokat tüntettünk fel ezen az ábrán (lásd: betét). **B rész:** Ugyanazon limfocita teljes sejt áramai azonos protokollt alkalmazva 20 ng/ml PiV-vel történő perfúzió alatt. A mérést csak azután indítottuk, miután a blokkolás miatt csökkenő áramamplitúdó stabilizálódott. Betét: Az A (●) és B (▲) részekben bemutatott mérési adatait felhasználva ezen az ábrán az áramamplitúdókat ábrázoltam a depolarizáló feszültség függvényében. Az ábrát kiegészítettem a kontroll oldattal történő újbóli perfúzió során mért értékekkel, miután az áramamplitúdó ismét stabilizálódott (○). **C rész:** A PiV által létrehozott blokk koncentrációfüggő. Különböző koncentrációjú PiV-t tartalmazó oldatokkal végeztünk csatorna blokkolási kísérleteket és meghatároztuk a nem blokkolt csatornák hányadát az I/I_0 képlettel, ahol I_0 a kontroll áram amplitúdója, I pedig az áram amplitúdója a megfelelő koncentrációjú PiV alkalmazása mellett ($n=4 \pm \text{SEM}$). Az egy csatorna egy toxin molekula modell jól illeszkedik a mért pontokhoz. **D rész:** A PiV hatása a $Kv1.3$ típusú csatornákra reverzibilis. A mérési pontok a teljes sejt K^+ amplitúdókat jelentik, melyeket -80 mV tartási feszültségről $+40$ mV tesztpotenciálon mértünk. Az ábra egy blokkolási kísérletet mutat be, ahol az ötödik depolarizációs impulzus után (\downarrow) $0,05$ $\mu\text{g/ml}$ PiV-t tartalmazó oldattal perfundáltunk, majd az áramamplitúdó stabilizálódott és ismét kontroll oldattal perfundáltunk (\uparrow). Az ábra jól demonstrálja, hogy a PiV hatása reverzibilis.

A teljes méregből mexikói kollaborációs partnereink 8 toxin komponenset 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. A Kv1.3 csatornákra meghatározott disszociációs állandókat (K_d) a 1. táblázat mutatja.

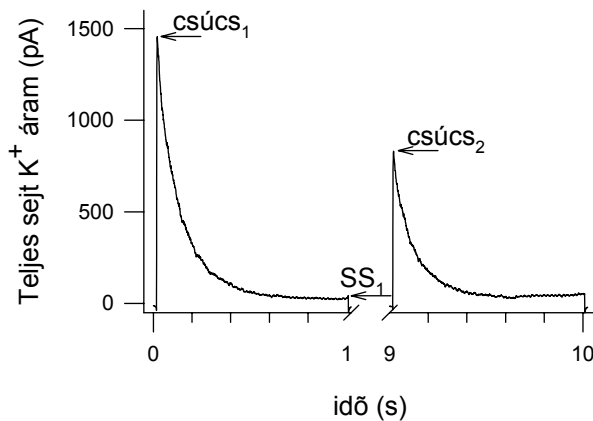
Toxin	K_d
Pi1	9,7 nM
Pi2	44 pM
Pi3	0,5 nM
Pi4	24,3 nM
Pi5	640 nM
Pi6	780 nM
Pi7	nem hatásos
Pi8	nem hatásos

1. táblázat A *Pandinus imperator* skorpió mérgéből izolált toxin frakciók (Pi1-8) félhatásos koncentrációja, illetve disszociációs állandója a humán T-limfociták Kv1.3 csatornáinak gátlása szempontjából. Az adatokat különböző toxin koncentrációk mellett meghatározott nem blokkolt áramhányadokhoz történő illesztéssel nyertük hasonlóan az 5. ábrán bemutatottakhoz ($n \geq 3$).

Külön figyelmet érdemel a Pi2 nevű komponens rendkívüli affinitása miatt. Éppen ezért ezt a peptidet részletes vizsgálatnak vetettük alá. A peptidek elsődleges szerkezetét a 2. táblázat mutatja. Kiemelném, hogy 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. Ez szintén felkeltette érdeklődésünket, ennek érdekében további kísérleteket végeztünk (lásd alább).

A Pandinus imperator toxinjainak elsődleges szerkezete:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	
Pi1			L	V	K	C	R	G	T	S	D	C	G	R	P	C	Q	Q	Q	T	G	C	P	N	S	K	C	I	N	R	M	C	K	C	Y	G	C		
Pi2			T	I	S	C	T	N	P	K	Q	C	Y	P	H	C	K	K	E	T	G	Y	P	N	A	K	C	M	N	R	K	C	K	C	F	G	R		
Pi3			T	I	S	C	T	N	E	K	Q	C	Y	P	H	C	K	K	E	T	G	Y	P	N	A	K	C	M	N	R	K	C	K	C	F	G	R		
Pi4	I	E	A	I	R	C	G	G	S	R	D	C	Y	R	P	C	Q	K	R	T	G	C	P	N	A	K	C	I	N	K	T	C	K	C	Y	G	C	S	
Pi5			V	A	K	C	S	T	S	E	C	G	H	A	C	Q	Q	A	G	C	R	N	S	G	C	R	Y	G	S	C	I	C	V	G	C				
Pi6			V	D	A	C	Y	E	A	C	M	H	H	H	M	N	S	D	D	C	I	E	A	C	K	N	P	V	P										
Pi7	D	E	A	I	R	C	T	G	T	K	D	C	Y	I	P	C	R	Y	I	T	G	C	F	N	S	R	C	I	N	K	S	C	K	C	Y	G	C	T	
Pi8			D	P	I	C	L	E	V	C	I	Q	H	T	G	N	P	R	E	C	E	E	A	C	.	.	.	?											



2. *ábra* Az inaktivált állapotból visszatért csatornák hányadának meghatározása. Az első impulzust ebben az esetben 8 másodperccel követi egy második impulzus, mely által kiváltott áram amplitúdója (csúcs₂) jelentősen alacsonyabb az elsőnél (csúcs₁), hiszen a csatornák jelentős hányada ekkor még inaktivált állapotban van. Az inaktivált állapotból visszatért hányad (VH) az alábbi képlettel határozható meg:

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

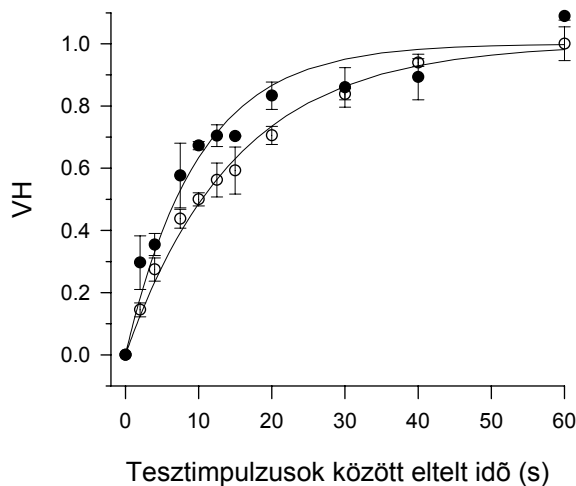
ahol SS₁ az egyensúlyi áramot jelenti az első impulzus végén.

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 (2. ábra). 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:

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

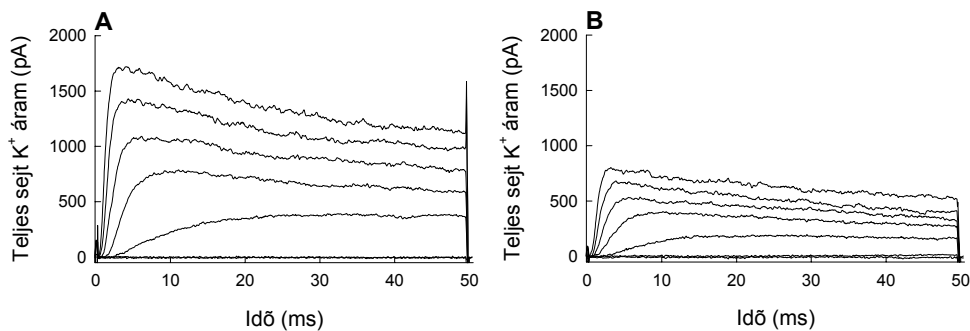
,ahol $csúcs_1$ és $csúcs_2$ az első és a második impulzus által kiváltott áram maximumát, SS_1 pedig az első impulzus végén folyó egyensúlyi áram amplitúdóját jelentik. Az inaktivált állapotból való visszatérés kinetikáját jellemző időállandó meghatározásához a visszatért áramhányadot az impulzusok között eltelt idő függvényében ábrázoltuk, és a pontokhoz egy egy exponenciális tagot tartalmazó függvényt illesztettünk: $VH(t) = 1 - e^{-t/\tau}$. Az inaktivációból történő visszatérés kinetikáját meghatároztuk kontroll körülmények között és PiV jelenlétében is (3. ábra). Az illesztés eredményeként kapott időállandók mutatják, hogy PiV jelenlétében az inaktivált állapotból történő visszatérés kinetikája felgyorsult. Ez arra utal, hogy a PiV egyes komponensei az inaktivált csatornához is kötve maradnak és destabilizálják a csatornák inaktivált állapotát.



3. ábra A PiV hatása a Kv1.3 típusú csatornák inaktivált állapotból való visszatérésének kinetikájára. Az inaktivált állapotból visszatért csatornák hányadát (VH) a 2. ábrán szemléltetett módszer alapján határoztuk meg kontroll körülmények között (○) és 20 ng/ml PiV jelenlétében (●) ($n=3 \pm \text{SEM}$). A tartófeszültség -100 mV volt, amin minden impulzuspár között 120 s-ig tartottuk a sejtet és ezután +40 mV-ra depolarizáltunk fél másodpercig. A kapott pontokhoz egyszerű exponenciális függvényeket illesztettünk.

A Pi2 rendkívül nagy affinitással kötődik a Kv1.3 csatornákhöz

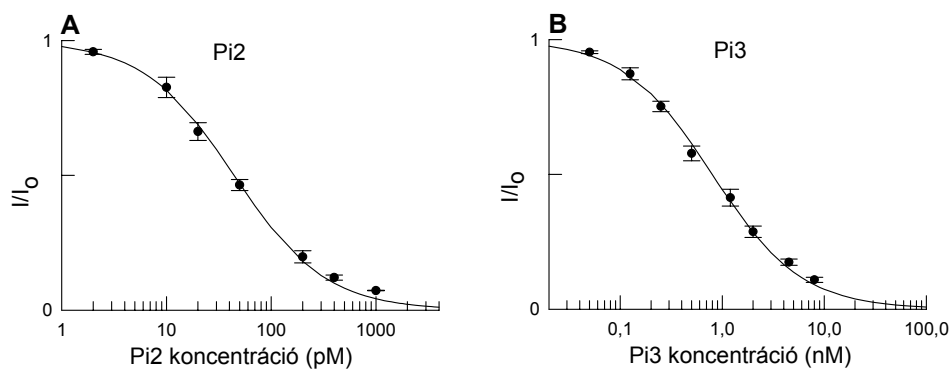
A 4. ábra A része egy humán limfocita teljes sejt áramát mutatja be kontroll körülmények között. A tartófeszültség -80 mV volt és különböző teszt-feszültségekre depolarizáltunk. Az ábra B része ugyanezen sejt teljes sejt áramát mutatja 50 pM Pi2-vel történő perfúzió alatt. Az ábrán látható, hogy 50 pM Pi2 körülbelül felére csökkentette a teljes sejt K^+ áramot.



4. ábra A Pi2 kis koncentrációban is hatékonyan blokkolja a humán limfociták feszültségfüggő K^+ csatornáit. **A rész:** Egy perifériás humán limfocita teljes sejt árama kontroll oldattal történő perfúzió alatt. 50 másodpercenként depolarizáltunk 50 ms időtartamig -80 mV-ről először -70 mV-ra, majd a depolarizációs feszültséget 10 mV-onként emeltük $+50$ mV-ig. A jobb áttekinthetőség kedvéért csak bizonyos impulzusok által kiváltott áramokat mutatok be ezen az ábrán (-70 , -50 , -30 , -10 , 10 , 30 , 50 mV). **B rész:** Ugyanezen sejt áramai 50 pM Pi2 jelenlétében.

A gátlás pontos jellemzéséhez és a gátlás sztöchiometriájának meghatározásához megvizsgáltuk a Pi2 és a Pi3 által létrehozott blokk koncentrációfüggését (5. ábra A és B része). Különböző extracelluláris Pi2, illetve Pi3 koncentrációk mellett meghatároztuk a toxin jelenlétében mért áramamplitúdók (I) és a kontroll oldatban mért áramamplitúdók hányadosát (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. Mivel a peptid toxinok többsége $1:1$ sztöchiometriával kötődik az ionszatornákhöz 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 (91). 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 lett Pi3 estében. Ennek alapján megállapíthatjuk, hogy mindkét toxin nagy affinitással kötődik a Kv1.3 típusú csatornához, különösen a Pi2, melynek disszociációs állandója rendkívül alacsony.

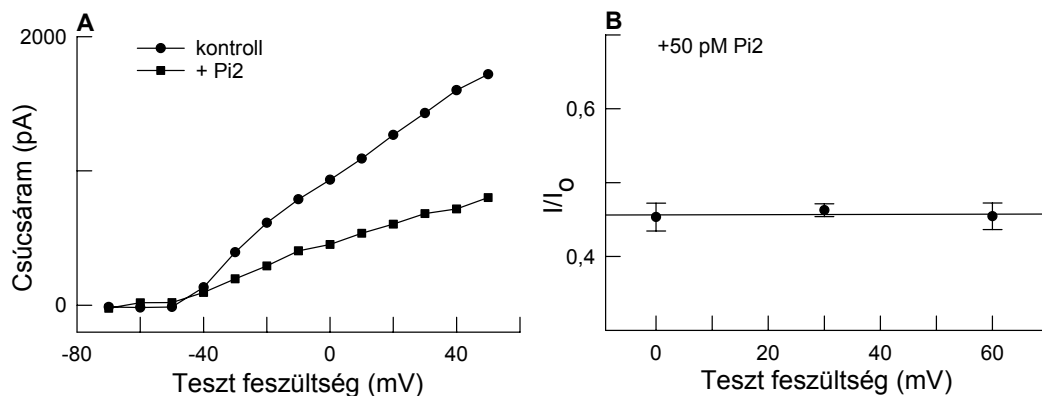


5. ábra A Pi2 és a Pi3 dózis-hatás görbéje. A nem blokkolt csatornák hányadát ábrázoltam a Pi2 (A rész) és a Pi3 (B rész) koncentrációjának a függvényében. A nem blokkolt hányadot az I/I_0 hányados adja meg, ahol I_0 a gátlás előtti áramamplitúdó és I az áram amplitúdója a megfelelő toxin alkalmazott koncentrációja mellett. A kapott pontokat az $I/I_0 = K_d/(K_d+[Tx])$ képlettel illeszttem, ahol [Tx] a toxin koncentrációját, K_d pedig a disszociációs állandóját jelöli. Az illesztés eredményeként 44 pM kaptunk a Pi2, míg 795 pM a Pi3 esetében a disszociációs állandóra. A tartófeszültség -120 mV volt, ahonnan +50 mV-ra depolarizáltunk.

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 (6. ábra A része). Méréseink során meghatároztuk a megmaradó áramhányadot is (MÁH) különböző tesztfeszültségek mellett (6. ábra B része). $M\acute{A}H=I/I_0$, 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).



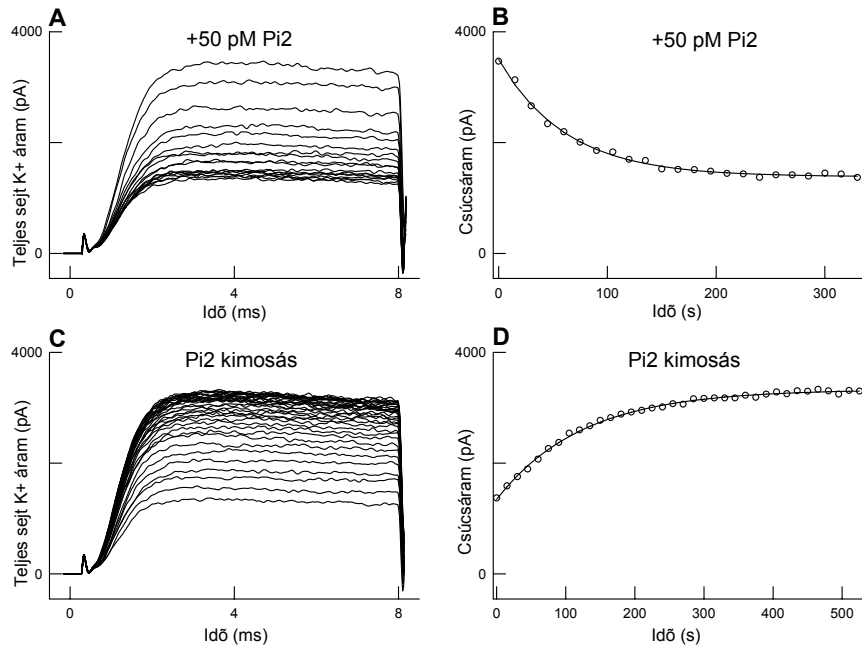
6. ábra A Pi2 által létrehozott blokk feszültségfüggetlen. **A rész:** Áramamplitúdók a tesztfeszültség függvényében kontroll körülmények között és 50 pM Pi2 jelenlétében. **B rész:** Megmaradó áramhányadok különböző tesztfeszültségeknél 50 pM Pi2 hozzáadása után. A megmaradó áramhányadokat az I/I_0 képlettel számoltam, ahol I_0 a kontroll áram amplitúdóját jelenti I pedig az áram amplitúdóját Pi2 jelenlétében. -120 mV-os tartófeszültségről 0 mV-ra $+30$ mV-ra és $+60$ mV-ra depolarizáltunk 50 ms-ig. A kapott pontokhoz egyenest illesztettünk, melynek a meredeksége $1,7 \times 10^{-5}$ 1/mV-nak adódott.

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 (7. ábra). 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.

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 (7. ábra B rész) és egyszerű exponenciális függvénnyel illesztettük: $A(t)=B \times \exp(-t/T_{BE})+C$, ahol $A(t)$ az áram amplitúdója t időpontban, C a csúcsáram 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 (7. ábra C rész). Az így kapott áram amplitúdókat hasonlóképpen ábrázoltuk és szintén egyszerű exponenciálissal illesztettük: $A(t)=B \times (1-\exp(-t/T_{KI}))+C$, ahol $B=A(t=\infty)-C$ (7. ábra D rész). 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 estében ($n=7$).



7. ábra A Pi2 bemosási és kimosási kinetikája. -120 mV-os tartófeszültségről depolarizáltuk a sejtet $+50$ mV-ra 8 ms-ig 15 másodpercenként. A perfúziós rendszert ezen kísérleteknél mágnesszelepekkel vezéreltük az adatgyűjtő programból. **A rész:** Teljes sejt áramok 50 pM Pi2-vel történő perfúzió kezdetétől. **B rész:** Az A részben bemutatott teljes sejt áramok amplitúdói a Pi2-vel történő perfúzió kezdetétől eltelt idő függvényében. **C rész:** Teljes sejt áramok a kontroll oldattal történő perfúzió kezdetétől. **D rész:** A C részben ábrázolt áramok amplitúdó a kontroll oldatra történő váltástól eltelt idő függvényében.

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:

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

$$k_{OFF} = \frac{1}{T_{KI}},$$

$$K_d = \frac{k_{OFF}}{k_{ON}}.$$

A kapott sebességi és disszociációs állandókat a 3. táblázat tartalmazza.

	oldat	k_{ON} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{OFF} (s^{-1})	K_d
Pi2	NR	2.18×10^8	6.33×10^{-3}	29 pM
	MI	6.90×10^6	17.7×10^{-3}	2558 pM
Pi3	NR	1.28×10^7	12.5×10^{-3}	0.97 nM
	MI	3.98×10^5	18.0×10^{-3}	45.2 nM

3. táblázat A Pi2 és a Pi3 kötődését jellemző állandók normál Ringer (NR) oldatban és magas ionerősségű (MI) oldatban.

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 ionerősségű oldatban is meghatároztuk az asszociációs és a disszociációs sebességi állandókat és összehasonlítottuk a kapott eredményeket a normál Ringer oldatban mért értékekkel (3. táblázat). A magas ionerősségű oldatban mindkét toxin

asszociációs sebességi állandója 32-ed részére csökkent. A Pi2 disszociációs sebességi állandója 2,8 szorosára, míg a Pi3-é 1,4 szorosára nőtt.

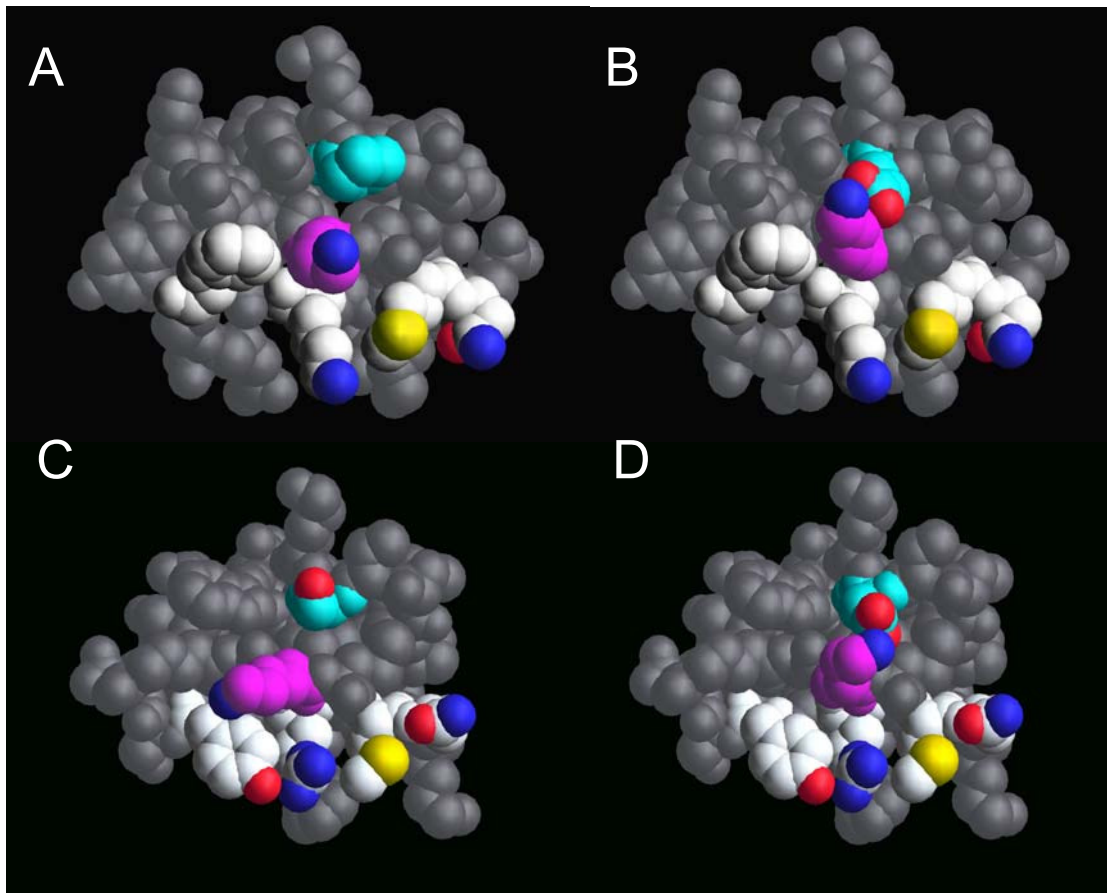
A Pi3 háromdimenziós szerkezete

A Pi2 NMR spektroszkópiával meghatározott háromdimenziós szerkezetét (86) alapul véve mexikói kollaborációs partnereink elkészítették a Pi3 háromdimenziós modelljét (lásd: anyagok és módszerek). Ez a modell gyakorlatilag teljesen megegyezik a Pi3 nemrég megjelent NMR spektroszkópiával elkészített modelljével (92).

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 jelenlévő negatív töltésű glutaminsav a csatorna egy negatív töltésű oldalláncával kerül szembe.
2. Ugyanezen negatív töltésű oldallánc a toxin molekulán belül hat kölcsön egy másik töltött oldallánccal.

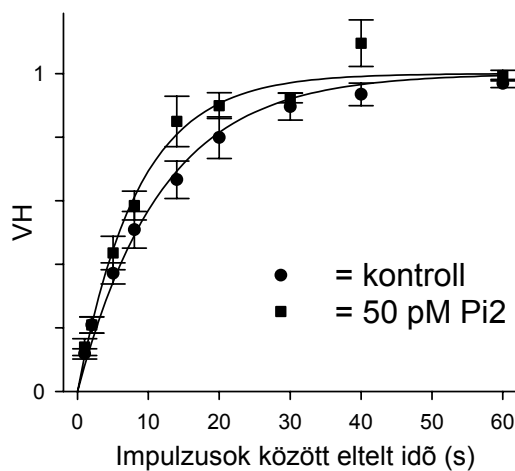
Ennek tisztázására a Pi3 háromdimenziós struktúrájának megismerése adott magyarázatot. Számításaik alapján ez a különbség a másodlagos szerkezetet nem befolyásolja, de az atomok közötti távolságokat és szögeket igen. Ezek a változások megfelelnek egy a csak a Pi3-ban található glutaminsav és a 24. pozícióban lévő, a csatornához való kötődésben kulcsfontosságú lizin között kialakuló sóhíd kialakulásának (9. ábra). Ezen sóhíd kialakulása okozhatja a disszociációs állandókban jelentkező jelentős különbséget. Ez nem meglepő, ha figyelembe vesszük, hogy ez az az aminosav csatorna szájadékába legmélyebben merül be (93). Ez az aminosav ekvivalens pozícióban van a ChTx 27-es lizinjével (70) és a N_xTx-ban a 28. pozícióban található (94).



9. ábra A Pi2, a Pi3, a vad típusú ChTx és a Ser-10-Asp mutáns ChTx háromdimenziós szerkezete. **A rész:** A Pi2 szerkezete a 24-es lizin (ciklámen színű szénatommal) irányából nézve. Fehér színnel vannak jelölve a kötődésben fontos szerepet játszó egyéb aminosavak szénatomjai. Balról jobbra: Phe33, Lys31, Met26 és Asn27. A Pro7, mely megkülönbözteti a Pi3-at a Pi2-től türkizkék színű. Az oxigén pirossal, a nitrogén kézzel és a kén sárgával van jelölve. **B rész:** A Pi3 szerkezete ugyanabból a nézetből, ahonnan a Pi2-t mutatja be az A rész. A színek szintén azonosak. A Glu7 és a Lys24 között kialakuló sóhíd jól megfigyelhető. **C rész:** A vad típusú ChTx szerkezete hasonló nézetből. A színek hasonló az előzőekhez figyelembe véve, hogy az előző toxinok 7-es pozíciója itt 10-esnek felel meg. Ezen a helyen a ChTx-ban szerin van (türkizkék színnel). A Lys 27 ciklámen színű szénatommal van jelölve. Az A és a C rész összehasonlításával megfigyelhető a Pro7 (Pi2) és a Ser10 (ChTx) hasonló helyzete. **D rész:** A Ser-10-Asp mutáns ChTx szerkezete ugyanabból a nézetből. A színek azonosak a C részben használtakkal, azzal a különbséggel, hogy itt szerin helyett asparaginsav van türkizkékkel jelölve. A Lys27 és az Asp10 között kialakuló sóhíd nagyon hasonlít a Pi3 sóhídjához, és valószínűleg ez okozhatja az affinitáscsökkenését.

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

A PiV-nek a Kv1.3 típusú csatornák inaktivált állapotból való visszatérésére kifejtett hatásának az ismeretében (95) 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 inaktiváljuk. Az impulzuspárok között 80 másodpercet vártunk -120 mV-os tartófeszültségen, hogy a csatornák az inaktivált állapotból maradéktalanul visszatérjenek zárt állapotba. Az inaktivált állapotból visszatért csatornák hányadát (VH) a korábban ismertetett módon határoztuk meg (lásd a 2. ábrát). Egyszerű exponenciálissal való illesztés alkalmazásával határoztuk meg a visszatérés időállandóját: $VH(t)=1-\exp(-t/T)$. Az inaktivált állapotból való visszatérést a Pi2 gyorsítja, amit jól mutat, hogy az időállandó $15,42\pm 1,87$ s-ról $10,42\pm 1,04$ s-ra csökkent 50 pM Pi2 jelenlétében ($p<0,0028$, $n=6$) (8. ábra).



8. ábra 50 pM Pi2 hatása a Kv1.3 típusú csatornák inaktivált állapotból való visszatérésére. Egy másodpercig tartó $+50$ mV-os depolarizáló impulzuspárokat alkalmaztunk különböző impulzusok közötti idővel (1-60 s). Az impulzuspárok között 80 másodpercig -120 mV-on tartottuk a sejtet, hogy a csatornák az inaktivált állapotból visszatérjenek. Az inaktivált állapotból visszatért hányadot (VH) a 2. ábrán ismertetett módszerrel határoztuk meg. A VH-t kontroll körülmények között (●) és 50 pM Pi2 hozzáadása után (■) határoztuk meg és ábráztuk ($n=3$, átlag \pm SEM). Egyszerű exponenciálissal jó illeszkedést kaptunk.

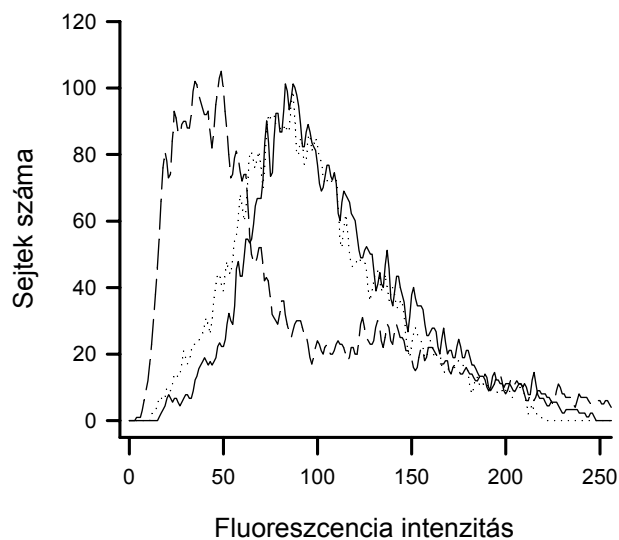
A Pi2 és a Pi3 Kv1.3 típusú csatornához való affinitásában (K_d) 18 szoros különbség van, míg csak egy aminosavban különböznek. Ennek ismeretében vizsgáltuk meg azt, hogy az inaktivált állapotból való visszatérést hasonló mértékben befolyásolják-e. Bármely különbségért valószínűleg a 7. pozícióban lévő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

Az előzőekben már bemutattam, hogy az inaktivált állapotból való visszatérés kinetikája egyszerű exponenciális folyamattal írható le függetlenül attól, hogy Pi2, illetve Pi3 jelen van-e az oldatban. Mivel a kinetika változatlan, ezért elegendő egy meghatározott időintervallum mellett összehasonlítani a Pi2 és a Pi3 hatását az 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 (11. ábra). A Pi2 hozzáadása után már 1,5 perccel membránpotenciál depolarizációja figyelhető meg. Ez az eredmény összhangban van patch-clamp méréseinkkel.



11. ábra A Pi2 depolarizálja a humán perifériás limfocitákat. Kontroll sejtek (szaggatott vonal) és Pi2-vel kezelt sejtek fluoreszcencia jelintenzitása másfél (pontosított vonal) és 3 perccel (folytonos vonal) a Pi2 hozzáadása után. A kísérletet szobahőmérsékleten végeztük. A sejteket membránpotenciál érzékeny oxonollal jelöltük. A növekvő fluoreszcencia jól mutatja a membrán sejtmembrán depolarizációját.

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:

1. Mindkét toxin dózis–hatás görbéje jól illeszthető az egy csatorna egy toxin molekulát feltételező modellel (5. ábra).
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 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, ha a pozitív töltésű toxin pozitívabb membránpotenciálknál 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 (89). Méréseink szerint azonban sem a PiV, sem a Pi2, sem a Pi3 nem 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 idő aránytalansága 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 (4. ábra). 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 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 (91). 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, ugyanekkor a disszociációs sebességi állandója csak a kétszerese.

A disszociációs sebességi állandó kismértékű 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 (70).

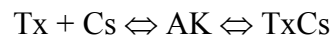
Ugyanakkor ez a mutáció csökkenti a toxin töltését, hiszen a Pi2 7, míg a Pi3 6 nettó pozitív töltéssel bír. Ez természetesen befolyásolja a negatív csatornaszájadék és a pozitív toxin között kialakuló nagytávolságú elektrosztatikus kölcsönhatást. Ezen kölcsönhatást több szerző korábban már részletesen tanulmányozta toxin és csatorna mutánsok segítségével (68; 70-72; 96). Az elektrosztatika törvényszerűségei miatt a töltés változtatása az asszociációs sebességi állandót befolyásolja. Ennek megfelelően a ChTx (68; 70) és a az Iberiotoxin (72) 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 (70) és a Lq2 toxin esetében (71). 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. Ugyanekkor a disszociációs sebességi állandók hasonló nagyságrendben vannak (3. táblázat). Mindeztáig 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,
2. ezen hatás a Pi2 estében kifejezettebb kellene, hogy legyen, hiszen a Pi2 nagyobb töltéssel rendelkezik.

Mérési eredményeink alapján az asszociációs sebességi állandók valóban csökkentek a magas ionerősségű oldatban (3. táblázat). Ezzel egy időben viszont azt tapasztaltuk, hogy az asszociációs sebességi állandók hasonló mértékben érzékenyek a környezet ionerősségének a növelésére: az ionerősség 1,4 szerez 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 lévő glutaminsav nem járul hozzá számottevő mértékben hasonlóan a Park és Miller által ChTx mutánsokkal tapasztaltakhoz (68). 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 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 lévő glutaminsav elektrosztatikus kölcsönhatásba kerül a hozzá térben közeleső 24-es lizinnel és sóhidat képez vele. Ezen sóhíd szerepének a megértése érdekében az Escobar és munkatársai, valamint Mullmann és munkatársai által ismertetett (71; 72), 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 (71. idézet Escobar 6. és 7. egyenlet). 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.

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 avval 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 (72). A mi eredményeink ezen eredményeknek kvalitatíve és quantitáíve 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 (91). 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 estében 58,5 kJ/mol, Pi3 estében 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 (70). A szerzők a vad típusú ChTx és a Ser-10-Asp 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 (10. ábra). A ChTx-ban a szerin cseréje a negatív töltésű aszpartátra a disszociációs állandó 1500 szorosra történő növekedését okozta (70). 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 lévő sóhídhoz rendkívül hasonló konformációt találtak (9. ábra). Ez az eredmény magyarázatot ad a Ser-10-Asp ChTx mutáns eltérő affinitására.

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 (92). 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 (92).

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 (97), ami azóta 50-re egészült ki (98). Ezen toxinok elsődleges szerkezetének tanulmányozása során megállapítottuk, hogy egy a Pi3 sóhídjához hasonló sóhíd egyikben sem alakulhat ki. Egyedül a dél-afrikai *Parabuthus* skorpió PBTX1 és a PBTX2 nevű toxinjai tartalmazzak savas oldalláncot a 10-es pozíció közelében (99). 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 tartalmazzak, ami lehetlenné 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 lévő 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 estében. 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 okát. Figyelembe véve a C-típusú inaktiváció bonyolult, jelenleg még nem teljesen tisztázott folyamatát számos mechanizmus jöhet szóba. Elképzelhető például, hogy a csatornához kötött toxin befolyásolhatja az inaktivált állapotból való visszatérésre ható K^+ kötőhely telítettségét (100; 101).

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, 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 csatornákhöz. 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 inaktivált állapotból való visszatérésre gyakorolt hatását, mely segítséget nyújthat az eddig teljesen még nem tisztázott C-típusú inaktiváció molekuláris mechanizmusának a megértéséhez.

VII. REFERENCIÁK

1. Rochat, H., P. Bernard, and F. Couraud. 1979. Advances in Cytopharmacology. B. Cerrarelli and F. Clementi, editors. Raven Press, New York. 325-334.
2. Hille, B. 1992. Ion channels of excitable membranes. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA.
3. Carbone, E., G. Prestipino, L. Spadavecchia, F. Franciolini, and L.D. Possani. 1987. Blocking of the squid axon K^+ channel by noxiustoxin: a toxin from the venom of the scorpion *Centruroides noxius*. *Pflugers Arch.* 408:423-431.
4. Caterral, W.A. 1977. Activation of the action potential Na^+ ionophore by neurotoxins. An allosteric model. *J.Biol.Chem.* 252:8669-8676.
5. Couraud, F., E. Jover, J.M. Dubois, and H. Rochat. 1982. Two types of scorpion toxin receptor sites, one related to the activation, the other to the inactivation of the action potential sodium channel. *Toxicon* 20:9-16.
6. Carbone, E., E. Wanke, G. Prestipino, L.D. Possani, and A. Maelicke. 1982. Selective blockage of voltage-dependent K^+ channels by a novel scorpion toxin. *Nature* 296:90-91.
7. Possani, L.D., B.M. Martin, and I. Svendsen. 1982. The primary structure of Noxiustoxin: a K^+ channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Carlsberg Res.Comm.* 47:285-289.
8. Miller, C., E. Moczydlowski, R. Latorre, and M. Phillips. 1985. Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca^{2+} -activated K^+ channels from mammalian skeletal muscle. *Nature* 313:316-318.
9. Gimenez Gallego, G., M.A. Navia, J.P. Reuben, G.M. Katz, G.J. Kaczorowski, and M.L. Garcia. 1988. Purification, sequence, and model structure of charybdotoxin, a potent selective inhibitor of calcium-activated potassium channels. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 85:3329-3333.
10. Strong, P.N., S.W. Weir, D.J. Beech, P. Hiestand, and H.P. Kocher. 1989. Effects of potassium channel toxins from *Leiurus quinquestriatus hebraeus* venom on responses to cromakalim in rabbit blood vessels. *Br.J.Pharmacol.* 98:817-826.
11. Valdivia, H.H., O. Fuentes, R. el Hayek, J. Morrisette, and R. Coronado. 1991. Activation of the ryanodine receptor Ca^{2+} release channel of sarcoplasmic reticulum by a novel scorpion venom. *J.Biol.Chem.* 266:19135-19138.

-
12. Wheeler, K.P., D.D. Watt, and M. Lazdunski. 1983. Classification of Na⁺ channel receptors specific for various scorpion toxins. *Pflugers Arch.* 397:164-165.
 13. Jover, E., F. Couraud, and H. Rochat. 1980. Two types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 95:1607-1614.
 14. Nonner, W. 1979. Effects of Leiurus scorpion venom on the 'gating' current in myelinated nerve. In *Advances in Cytopharmacology*. B. Ceccarelli and F. Clementi, editors. Raven Press, New York. 345-351.
 15. Meves, H., M.J. Simard, and D.D. Watt. 1986. Interactions of scorpion toxins with the sodium channel. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 479:113-132.
 16. Strichartz, G., T. Rando, and G.K. Wang. 1987. An integrated view of the molecular toxinology of sodium channel gating in excitable cells. *Annu.Rev.Neurosci.* 10:237-267.
 17. Thomsen, W.J. and W.A. Catterall. 1989. Localization of the receptor site for alpha-scorpion toxins by antibody mapping: implications for sodium channel topology. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 86:10161-10165.
 18. Lee, S.C., D.I. Levy, and C. Deutsch. 1992. Diverse K⁺ channels in primary human T lymphocytes. *J.Gen.Physiol.* 99:771-793.
 19. Leonard, R., M.L. Garcia, R.S. Slaughter, and J.P. Reuben. 1992. Selective blockers of voltage-gated K⁺ channels depolarize human T lymphocytes: Mechanism of the antiproliferative effect of charybdotoxin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89:10094-10098.
 20. Sands, S.B., R.S. Lewis, and M.D. Cahalan. 1989. Charybdotoxin blocks voltage-gated K⁺ channels in human and murine T lymphocytes. *J.Gen.Physiol.* 93:1061-1074.
 21. Novick, J., R.J. Leonard, V.F. King, W. Schmalhofer, G.J. Kaczorowski, and M.L. Garcia. 1991. Purification and characterization of two novel peptidyl toxins directed against K⁺ channels from venom of new world scorpions. *Biophys.J.* 59:78a Abstract.
 22. Zamudio, F., R. Saavedra, B.M. Martin, G. Gurrola Briones, P. Herion, and L.D. Possani. 1992. Amino acid sequence and immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Eur.J.Biochem.* 204:281-292.
-

-
23. Gurrola, G.B., R. Molinar Rode, M. Sitges, A. Bayon, and L.D. Possani. 1989. Synthetic peptides corresponding to the sequence of noxiustoxin indicate that the active site of this K⁺ channel blocker is located on its amino-terminal portion. *J.Neural Transm.* 77:11-20.
 24. Possani, L. D., Gurrola, G. B., Portugal, T. O., Zamudio, F. Z., Vaca, L. D., Calderon, E. S. A., and Kirsch, G. E. Scorpion toxins: a model for peptide synthesis of new drugs. 352-367. 1991. Campinas, Brazil, UNICAMP. (GENERIC)
Ref Type: Conference Proceeding
 25. Vazquez, A., B. Becerril, B.M. Martin, F. Zamudio, F. Bolivar, and L.D. Possani. 1993. Primary structure determination and cloning of the cDNA encoding toxin 4 of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *FEBS Lett.* 320:43-46.
 26. Becerril, B., A. Vazquez, C. Garcia, M. Corona, F. Bolivar, and L.D. Possani. 1993. Cloning and characterization of cDNAs that code for Na⁺- channel-blocking toxins of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Gene* 128:165-171.
 27. Vaca, L., G.B. Gurrola, L.D. Possani, and D.L. Kunze. 1993. Blockade of a KCa channel with synthetic peptides from noxiustoxin: a K⁺ channel blocker. *J.Membr.Biol.* 134:123-129.
 28. Drakopoulou, E., J. Cotton, H. Virelizier, E. Bernardi, A.R. Schoofs, M. Partiseti, D. Choquet, G. Gurrola, L.D. Possani, and C. Vita. 1995. Chemical synthesis, structural and functional characterization of noxiustoxin, a powerful blocker of lymphocyte voltage-dependent K⁺ channels. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 213:901-907.
 29. Olamendi-Portugal, T., F. Gomez-Lagunas, G.B. Gurrola, and L.D. Possani. 1996. A novel structural class of K⁺-channel blocking toxin from the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochem.J.* 315:977-981.
 30. Gomez-Lagunas, F., T. Olamendi-Portugal, F.Z. Zamudio, and L.D. Possani. 1996. Two novel toxins from the venom of the scorpion *Pandinus imperator* show that the N-terminal amino acid sequence is important for their affinities towards *Shaker* B K⁺ channels. *J.Membr.Biol.* 152:49-56.
 31. McCurdy, C.W., C.M. Ely, E. Westin, and R.A. Carchman. 1988. Coordination and reversibility of signs for proliferative activation and IL2 mRNA production in human T lymphocytes by phorbol ester and calcium ionophore. *J.Biol.Chem.* 263:18537-18544.
 32. Imboden, J.B. and J.D. Stobo. 1985. Transmembrane signalling by the T cell antigen receptor. *J.Exp.Med.* 161:446-456.
-

-
33. Matkó, J., J. Szöllösi, L. Trón, and S. Damjanovich. 1988. Luminescence spectroscopic approaches of cell surface dynamics. *Quart.Rev.Biophys.* 21:479-544.
 34. Grinstein, S. and S.J. Dixon. 1989. Ion transport, membrane potential, and cytoplasmic pH in lymphocytes: changes during activation. *Physiol.Rev.* 69:417-481.
 35. Cahalan, M.D. and R.S. Lewis. 1990. Functional roles of ion channels in lymphocytes. *Semin.Immunol.* 2:107-117.
 36. Grissmer, S., B. Dethlefs, J.J. Wasmuth, A.L. Goldin, G.A. Gutman, M.D. Cahalan, and K.G. Chandy. 1990. Expression and chromosomal localization of a lymphocyte K⁺ channel gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 87:9411-9415.
 37. Lewis, R.S. and M.D. Cahalan. 1990. Ion channels and signal transduction in lymphocytes. *Annu.Rev.Physiol.* 52:415-430.
 38. Gallin, E.K. 1991. Ion channels in leukocytes. *Physiol.Rev.* 71:775-811.
 39. Matteson, D.R. and C. Deutsch. 1984. K⁺ channels in T lymphocytes: a patch clamp study using monoclonal antibody adhesion. *Nature* 307:468-471.
 40. Decoursey, T.E., K.G. Chandy, S. Gupta, and M.D. Cahalan. 1984. Voltage-gated K⁺ channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? *Nature* 307:465-468.
 41. Lewis, R.S. and M.D. Cahalan. 1988. Subset-specific expression of potassium channels in developing murine T lymphocytes. *Science* 239:771-775.
 42. Cahalan, M.D., K.G. Chandy, T.E. Decoursey, and S. Gupta. 1985. A voltage-gated potassium channel in human T lymphocytes. *J.Physiol.(Lond)* 358:197-237.
 43. Grissmer, S., M.D. Cahalan, and K.G. Chandy. 1988. Abundant expression of type I K⁺ channels. A marker for lymphoproliferative diseases? *J.Immunol.* 141:1137-1142.
 44. Shapiro, M.S. and T.E. Decoursey. 1988. Two types of potassium channels in a lymphoma cell line. *Biophys.J.* 53:550a Abstract.
 45. Mahaut Smith, M.P. and L.C. Schlichter. 1989. Ca²⁺-activated K⁺ channels in human B lymphocytes and rat thymocytes. *J.Physiol.Lond.* 415:69-83.
 46. Grissmer, S., R.S. Lewis, and M.D. Cahalan. 1992. Ca²⁺-activated K⁺ channels in human leukemic T cells. *J.Gen.Physiol.* 99:63-84.
 47. Grissmer, S. and M.D. Cahalan. 1992. Characterization of Ca²⁺ activated K⁺ channels in resting and activated human peripheral T lymphocytes. *Biophys.J.* 61:A14 Abstract.
-

-
48. Price, M., S.C. Lee, and C. Deutsch. 1989. Charybdotoxin inhibits proliferation and interleukin 2 production in human peripheral blood lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 86:10171-10175.
 49. Chandy, K.G., T.E. Decoursey, M.D. Cahalan, C. McLaughlin, and S. Gupta. 1984. Voltage-gated potassium channels are required for human T lymphocyte activation. *J.Exp.Med.* 160:369-385.
 50. Freedman, B.D., M. Price, and C. Deutsch. 1992. Evidence for voltage modulation of IL2 production by human blood lymphocytes. *J.Immunol.* 149:3784-3794.
 51. Wilson, H.A. and T.M. Chused. 1985. Lymphocyte membrane potential and Ca²⁺-sensitive potassium channels described by oxonol dye fluorescence measurements. *J.Cell Physiol.* 125:72-81.
 52. Grinstein, S. and J.D. Smith. 1990. Calcium-independent cell volume regulation in human T lymphocytes. Inhibition by charybdotoxin. *J.Gen.Physiol.* 95:97-120.
 53. Lin, C.S., R.C. Boltz, J.T. Blake, M. Nguyen, A. Talento, P.A. Fischer, M.S. Springer, N.H. Sigal, R.S. Slaughter, M.L. Garcia, G.J. Kaczorowski, and G.C. Koo. 1993. Voltage-gated potassium channels regulate calcium-dependent pathways involved in human T lymphocyte activation. *J.Exp.Med.* 177:637-645.
 54. Sarkadi, B., A. Tordai, and G. Gárdos. 1990. Membrane depolarization selectively inhibits receptor-operated calcium channels in human (Jurkat) T lymphocytes. *Biochim.Biophys.Acta* 1027:130-140.
 55. Oettgen, H.C., C. Terhorst, L.C. Cantley, and P.M. Rosoff. 1985. Stimulation of the T3-T cell receptor complex induces a membrane potential sensitive calcium influx. *Cell* 40:583-590.
 56. Gáspár, R., G. Panyi, Z. Krasznai, D.L. Ypey, Gy. Vereb, C. Pieri, and S. Damjanovich. 1994. Effects of Bretylium Tosilate on Voltage-Gated Potassium Channels in Human T Lymphocytes. *Mol.Pharmacol.* 46:762-766.
 57. Varga, Z., L. Bene, C. Pieri, S. Damjanovich, and R.J. Gaspar. 1996. The effect of juglone on the membrane potential and whole-cell K⁺ currents of human lymphocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 218:828-832.
 58. Gaspar, R., Jr., L. Bene, S. Damjanovich, C. Munoz Garay, E.S. Calderon Aranda, and L.D. Possani. 1995. Beta-scorpion toxin 2 from *Centruroides noxius* blocks voltage-gated K⁺ channels in human lymphocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 213:419-423.
-

-
59. Gaspar, R.Jr., Z. Varga, L. Bene, F. Marcheselli, C. Pieri, and S. Damjanovich. 1996. Effect of acetylcholine on the electrophysiology and proliferative response of human lymphocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 226:303-308.
60. Schell, S.R., D.J. Nelson, H.A. Fozzard, and F.W. Fitch. 1987. The inhibitory effects of K⁺ channel-blocking agents on T lymphocyte proliferation and lymphokine production are "nonspecific" [published erratum appears in *J Immunol* 1988 Mar 1; 140(5):1713]. *J.Immunol.* 139:3224-3230.
61. Pahapill, P.A. and L.C. Schlichter. 1992. Modulation of potassium channels in intact human T lymphocytes. *J.Physiol.(Lond)* 445:407-430.
62. Chandy, K.G., C.B. Williams, R.H. Spencer, B.A. Aguilar, S. Ghanshani, B.L. Tempel, and G.A. Gutman. 1990. A family of three mouse potassium channel genes with intronless coding regions. *Science* 247:973-975.
63. Douglass, J., P.B. Osborne, Y.C. Cai, M. Wilkinson, M.J. Christie, and J.P. Adelman. 1990. Characterization and functional expression of a rat genomic DNA clone encoding a lymphocyte potassium channel. *J.Immunol.* 144:4841-4850.
64. Cai, Y.C., P.B. Osborne, R.A. North, D.C. Dooley, and J. Douglass. 1992. Characterization and functional expression of genomic DNA encoding the human lymphocyte type *n* potassium channel. *DNA Cell Biol.* 11:163-172.
65. Attali, B., G. Romey, E. Honore, A. Schmid-Alliana, M.G. Mattei, F. Lesage, P. Ricard, J. Barhanin, and M. Landzuski. 1992. Cloning, functional expression, and regulation of two K⁺ channels in human T lymphocytes. *J.Biol.Chem.* 267:8650-8657.
66. Koo, G.C., J.T. Blake, A. Talento, M. Nguyen, S. Lin, A. Sirotna, K. Shah, K. Mulvany, D. Hora, Jr., P. Cunningham, D.L. Wunderler, O.B. McManus, R. Slaughter, R. Bugianesi, J. Felix, M. Garcia, J. Williamson, G. Kaczorowski, N.H. Sigal, M.S. Springer, and W. Feeney. 1997. Blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 inhibits immune responses in vivo. *J.Immunol.* 158:5120-5128.
67. Gross, A. and R. MacKinnon. 1996. Agitoxin footprinting the shaker potassium channel pore. *Neuron* 16:399-406.
68. Park, C.S. and C. Miller. 1992. Mapping function to structure in a channel-blocking peptide: electrostatic mutants of charybdotoxin. *Biochemistry* 31:7749-7755.
69. Stocker, M. and C. Miller. 1994. Electrostatic distance geometry in a K⁺ channel vestibule. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91:9509-9513.
-

-
70. Goldstein, S.A., D.J. Pheasant, and C. Miller. 1994. The Charybdotoxin receptor of a Shaker K⁺ channel: peptide and channel residues mediating molecular recognition. *Neuron* 12:1377-1388.
71. Escobar, L., M.J. Root, and R. MacKinnon. 1993. Influence of protein surface charge on the bimolecular kinetics of a potassium channel peptide inhibitor. *Biochemistry* 32:6982-6987.
72. Mullmann, T.J., P. Munujos, M.L. Garcia, and K.M. Giangiacomo. 1999. Electrostatic mutations in Iberitoxin as a unique tool for probing the electrostatic structure of the Maxi-K channel outer vestibule. *Biochemistry* 38:2395-2402.
73. Chandy, K.G. 1991. Simplified gene nomenclature [letter]. *Nature* 352:26-26.
74. MacKinnon, R. 1991. Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* 350:232-235.
75. Demo, S.D. and G. Yellen. 1991. The inactivation gate of the Shaker K⁺ channel behaves like an open-channel blocker. *Neuron* 7:743-753.
76. Zagotta, W.N., T. Hoshi, and R.W. Aldrich. 1990. Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB [see comments]. *Science* 250:568-571.
77. López-Barneo, J., T. Hoshi, S.H. Heinemann, and R.W. Aldrich. 1993. Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of *Shaker* potassium channels. *Receptors and Channels* 1:61-71.
78. Yellen, G., D. Sodickson, T.-Y. Chen, and M.E. Jurman. 1994. An engineered cysteine in the external mouth of a K⁺ channel allows inactivation to be modulated by metal binding. *Biophys.J.* 66:1068-1075.
79. Panyi, G., Z.-F. Sheng, L.-W. Tu, and C. Deutsch. 1995. C-type inactivation of a voltage-gated K⁺ channel occurs by a cooperative mechanism. *Biophys.J.* 69:896-904.
80. Marom, S. and I.B. Levitan. 1994. State-dependent inactivation of the Kv3 potassium channel. *Biophys.J.* 67:579-589.
81. Marom, S., S.A. Goldstein, J. Kupper, and I.B. Levitan. 1993. Mechanism and modulation of inactivation of the Kv3 potassium channel. *Receptors and Channels* 1:81-88.
-

-
82. Deutsch, C. and L.-Q. Chen. 1993. Heterologous expression of specific K⁺ channels in T lymphocytes: Functional consequences for volume regulation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90:10036-10040.
 83. Deutsch, C., M. Price, S. Lee, V.F. King, and M.L. Garcia. 1991. Characterization of high affinity binding sites for charybdotoxin in human T lymphocytes. Evidence for association with the voltage-gated K⁺ channel. *J.Biol.Chem.* 266:3668-3674.
 84. Deutsch, C., D. Krause, and S.C. Lee. 1986. Voltage-gated potassium conductance in human T lymphocytes stimulated with phorbol ester. *J.Physiol.(Lond)* 372:405-423.
 85. Delepierre, M., A. Prochnicka Chalufour, and L.D. Possani. 1997. A novel potassium channel blocking toxin from the scorpion *Pandinus imperator*: A 1H NMR analysis using a nano-NMR probe. *Biochemistry* 36:2649-2658.
 86. Tenenholz, T.C., R.S. Rogowski, J.H. Collins, M.P. Blaustein, and D.J. Weber. 1997. Solution structure for *Pandinus* toxin K-alpha (PiTX-K alpha), a selective blocker of A-type potassium channels. *Biochemistry* 36:2763-2771.
 87. Jones, T.A., J.Y. Zou, S.W. Cowan, and Kjeldgaard. 1991. Improved methods for binding protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr.A.* 47:110-119.
 88. Bontems, F., B. Gilquin, C. Roumestand, A. Menez, and F. Toma. 1992. Analysis of side-chain organization on a refined model of charybdotoxin: structural and functional implications. *Biochemistry* 31:7756-7764.
 89. Pappone, P.A. and M.D. Cahalan. 1987. *Pandinus imperator* scorpion venom blocks voltage-gated potassium channels in nerve fibers. *J.Neurosci.* 7:3300-3305.
 90. Pappone, P.A. and M.T. Lucero. 1988. *Pandinus imperator* scorpion venom blocks voltage-gated potassium channels in GH3 cells. *J.Gen.Physiol.* 91:817-833.
 91. Goldstein, S.A. and C. Miller. 1993. Mechanism of Charybdotoxin block of a voltage-gated K⁺ channel. *Biophys.J.* 65:1613-1619.
 92. Klenk, K.C., T.C. Tenenholz, D.R. Matteson, R.S. Rogowski, M.P. Blaustein, and D.J. Weber. 2000. Structural and Functional Differences of Two Toxins From the Scorpion *Pandinus imperator*. *Proteins* 38:441-449.
 93. Possani, L.D., B. Selisko, and G. Gurrola Briones. 1999. Structure and function of scorpion toxins affecting K⁺ channels. *Perspectives in drug discovery and design* 15/16:15-40.
-

-
94. Martinez, F., C. Munoz Garay, G. Gurrola, A. Darszon, L.D. Possani, and B. Becerril. 1998. Site directed mutants of Noxiustoxin reveal specific interactions with potassium channels. *FEBS Lett.* 429:381-384.
 95. Péter, M., Z. Varga, G. Panyi, L. Bene, S. Damjanovich, C. Pieri, L.D. Possani, and R. Gáspár. 1998. *Pandinus imperator* scorpion venom blocks voltage-gated K⁺ channels in human lymphocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 242:621-625.
 96. MacKinnon, R. and C. Miller. 1989. Mutant potassium channels with altered binding of charybdotoxin, a pore-blocking peptide. *Science* 245:1382-1385.
 97. Tytgat, J., K.G. Chandy, M.L. Garcia, G.A. Gutman, M.F. Martin-Eauclaire, J.J. van der Walt, and L.D. Possani. 1999. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms; alpha-KTx molecular subfamilies. *Trends in Pharmacological Science* 20:444-447.
 98. D'Suze, G., F. Zamudio, F. Gomez Lagunas, and L.D. Possani. 1999. A novel K⁺ channel blocking toxin from *Tityus descrepans* scorpion venom. *FEBS Lett.* 456:146-148.
 99. Tytgat, J., T. Debont, K. Rostoll, I. Vandenberghe, F. Desmet, F. Verdonck, P. Daenens, J. Van Beeumen, and J.J. van der Walt. 1998. Novel scorpion K⁺ channel toxins isolated from venoms of species belonging to the *Parabuthus* genus. *Biophys.J.* 74:A229 Abstract.
 100. Levy, D.I. and C. Deutsch. 1996. A voltage dependent role for K⁺ in recovery from C-type inactivation. *Biophys.J.* 71:3157-3166.
 101. Levy, D.I. and C. Deutsch. 1996. Recovery from C-type inactivation is modulated by extracellular potassium. *Biophys.J.* 70:798-805.
-

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 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., Csécsy 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)

IX. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki Dr. Damjanovich Sándor akadémikus egyetemi tanárnak, a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet igazgatójának, hogy lehetővé tette számomra, hogy intézetében a patch-clamp laboratóriumban dolgozhassak, ahol minden feltétel rendelkezésre állt nemzetközi szinten elismert színvonalú tudományos munka végzéséhez.

Köszönöm témavezetőmnek Dr. Gáspár Rezső egyetemi tanárnak, hogy felkeltette érdeklődésemet a biofizika és azon belül az elektrofiziológia iránt és bevezetett a tudományos kutatómunkába.

Köszönettel tartozom Dr. Panyi Györgynek, aki a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetben végzett munkámban gyakran segítséget nyújtott. Hozzá bármikor fordulhattam kérdéseimmel. Külön köszönöm segítségét Dr. Varga Zoltánnak, akitől a patch-clamp technika gyakorlati módszereit elsajátítottam.

Köszönettel tartozom L.D. Possaninak és munkatársainak, akik a *Pandinus imperator* skorpió mérgét és az abból izolált komponenseket a kísérletekhez rendelkezésre bocsátották, illetve a 3D modellezést végezték.

Köszönettel tartozom a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetben dolgozó minden kollégának a baráti légkörért, amiben három évig dolgozhattam olyan környezetben, ahova öröm volt minden nap bemenni.

X. MELLÉKLET

BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 242, 621–625 (1998)
ARTICLE NO. RC978018

Pandinus imperator Scorpion Venom Blocks Voltage-Gated K⁺ Channels in Human Lymphocytes

Mózes Péter, Jr., Zoltán Varga, György Panyi, László Bene, Sándor Damjanovich, Carlo Pieri,* Lourival D. Possani,† and Rezs Gáspár, Jr.¹

Department of Biophysics and Cell Biology, University Medical School, Debrecen, 4012 Hungary;

*Cytology Center, Research Department of Gerontology, Ancona, 60121 Italy;

and †Department of Molecular Recognition and Structural Biology, Institute of Biotechnology, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca 62271, Mexico

Received December 8, 1997

Using the patch-clamp technique, we determined that *Pandinus imperator* scorpion venom blocked whole-cell n-type K⁺ currents in human peripheral blood lymphocytes in a dose-dependent manner with K_d = 0.02 μg/ml. K⁺ channel block was instantaneous and removable by washing with venom-free extracellular solution. The venom-induced block was independent of membrane potential. The venom did not influence activation and inactivation kinetics of the K⁺ channels, however, accelerated recovery from inactivation. Purified peptides Pi1, Pi2, and Pi3 from the *P. imperator* venom powerfully blocked Kv1.3 channels in human lymphocytes with K_d values of 9.7 nM, 50 pM, and 0.5 nM, respectively. Flow cytometric membrane potential measurements with the oxonol dye showed that Pi2, the most effective peptide toxin of the *P. imperator* venom, depolarizes human lymphocytes in accordance with its K⁺ channel blocking effect. © 1998

Academic Press

Scorpion toxins (STox) are exquisite tools for studying ion channels (1, 4). STox K⁺ channel inhibitors played an important role in the characterization of diverse K⁺ channels including those of human lymphocytes (1–5). Charybdotoxin (ChTX), the most frequently utilized one, blocks both Ca²⁺ activated K⁺ channels in human lymphocytes and voltage-gated K⁺ channels from several species with high affinity (6–8). Peptide inhibitors noxiustoxin (NxTX) and margatoxin (MgTX) are specific for voltage-gated K⁺ channels, including n-type K⁺ channels of human T lymphocytes (6, 7, 10).

¹ To whom correspondence should be addressed. Fax: +36-52-412623. E-mail: gaspar@jaguar.dote.hu.

During the search for new K⁺ channel inhibitors the effect of the whole venom of scorpion *Pandinus imperator* (PiV) on the voltage-gated potassium channels of nerve fibers and GH₃ cells has been investigated. The *Pandinus* venom was found to differ from other known K⁺ channel scorpion toxins in that the effects of the venom were highly voltage dependent and were not readily reversible (11, 12).

From the venom of *Pandinus imperator* three new K⁺ channel blocking peptides named Pi1, Pi2 and Pi3 were purified to homogeneity and their primary structures were determined (13, 14). Recently, the three dimensional structure of Pi1 was also described (15). The K⁺ channel blocking properties of peptide toxins Pi1, Pi2 and Pi3 were investigated in patch-clamp experiments on *Shaker* B K⁺ channels expressed in an insect cell line, Sf9 from the army-worm caterpillar *Spodoptera frugiperda*. Dissociation constants characterizing the affinities of Pi1, Pi2 and Pi3 to *Shaker* B K⁺ channels were found to be 23.3 nM, 8.2 nM and 140 nM, respectively (13, 14, 16).

In the present study we examine the effect of the venom of *Pandinus imperator* and some of its peptide components on the whole-cell K⁺ currents and membrane potential of human peripheral blood lymphocytes by the patch-clamp method and flow cytometry. The predominant voltage-gated potassium channel underlying whole-cell K⁺ currents of human lymphocytes is the *Shaker* Kv1.3.

MATERIALS AND METHODS

Cell isolation. Peripheral blood was obtained from healthy volunteers, HPBL were isolated from heparinized blood using the standard Ficoll-Hypaque sedimentation technique (17). The cells were used on the day of isolation and stored until the measurement at

room temperature in PBS solution containing (in mM) 150 NaCl, 3.3 KCl, 8.6 Na₂HPO₄, 1.69 KH₂PO₄, supplemented with 5.5 mM glucose, at pH 7.4.

Electrophysiology. Whole-cell membrane currents were recorded with Axopatch-200 and 200A patch-clamp amplifiers in conjunction with AXON Instruments TL-1-125 and Digidata 2000 computer interfaces with varying sampling rates, applying low-pass filtering at half of the sampling frequency.

Patch electrodes of 3-4 M Ω resistance were fabricated from GC 150 F-15 borosilicate glass capillaries (CLARK Electromedical Instruments, Reading, England).

The pipettes were filled with a KF intracellular solution (ICS: 140 mM KF, 2 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 11 mM EGTA and 10 mM HEPES, pH 7.22). The cells were bathed in a Ringer like extracellular solution (ECS: 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2.5 mM CaCl₂ and 10 mM HEPES and 5.5 mM glucose, pH 7.35) containing 0.1 mg/ml bovine serum albumin (BSA). The measured osmolarity of the solutions was 300-340 mOSM.

Gigaseals in the order of 20-100 G Ω were formed by applying 50-70 H₂Ocm negative pressure to the interior of the patch pipette. Subsequently whole-cell measuring configurations were established by the application of negative pressure pulses. Control experiments were started at least 12 min after entering whole-cell configuration and K⁺ channel properties of T lymphocytes remained stable for up to several hours.

During the experiments no series resistance (R_s) compensation was used. After the initial setting, usually there was no need to alter the capacitive transient compensation, which means that after the initial equilibration period no tendentious changes in R_s happened during the long term experiments or following solution changes. As far as time control comparisons are concerned, peak K⁺ current amplitudes at a given depolarizing potential usually remained within \pm 5% of the control value up to several hours, when the abrupt loss of the measuring configuration occurred. In most of the experiments leak current was negligible compared to the K⁺ currents, therefore during the analysis of the results usually no leak subtraction was done. All patch-clamp experiments were carried out at room temperature (25°C).

For data acquisition and analysis the pClamp6 program package (AXON Instruments Inc., Foster City, CA, USA) was used.

Flow-cytometric membrane potential measurements. Measurements were carried out in a modified Becton-Dickinson FACS Star flow cytometer. 10⁶ cells were incubated in 1 ml with 15.5 nM final concentration of oxonol (DiBAC4(3)) at 37°C for 3 min. Each measurement was based on data from 8000 cells. The fluorescence signal collection was restricted only to live cells by gating on forward angle light scatter.

Toxin separation. *Pandinus imperator* venom was obtained from anesthetized animals by electrical stimulation. To separate the Pi1-Pi3 peptide toxins the soluble venom was initially fractionated in a Sephadex G-50 column and the subfractions were further separated by HPLC, using a C18 reverse-phase column (Vydac, Hesperia, CA), of a Waters 600E HPLC. The homogeneity of the purified samples were confirmed by step-gradient HPLC and by direct Edman degradation using an automatic sequencer (13, 14).

Chemicals. Membrane potential sensitive oxonol dye (DiBAC4(3)) was purchased from Molecular Probes Inc. Leiden, The Netherlands, all other chemicals from SIGMA (St. Louis, MO). Test and drug free extracellular solutions (control) were administered via a perfusion head positioned less than 1 mm from the cell. The fluid flow was driven by gravity. Excess fluid was removed by continuous suction.

Results are given as means \pm standard error for a given number of cells or measurements, n. Whenever error bars are not displayed they fall within the limits of the symbols used.

RESULTS AND DISCUSSION

Fig. 1a illustrates that human peripheral blood lymphocytes display strong outward whole-cell currents upon step depolarization from a -80 mV holding potential. After reaching a peak, the current declines, due to inactivation toward a low steady state level. Ion-channels basically contributing to this transient outward current have been identified as voltage-gated potassium channels on the basis of their being selective for K⁺, having a linear single-channel current-voltage relationship with a slope conductance of approximately 10 pS at pipette potentials between -30 and +40 mV, and properly responding to quinine (100 μ M) and 4-aminopyridine (5 mM) (17).

Peak values of the lymphocyte whole-cell K⁺ currents were significantly reduced in the presence of 0.02 μ g/ml PiV in the external bath, although no significant alteration in the initial rise and the inactivation rate of the K⁺ current was observed by the venom (Fig. 1b). Inset of Fig. 1b demonstrates that the decrease in the whole-cell current amplitudes induced by PiV was voltage independent at test potentials more positive than -20 mV. The peak whole-cell K⁺ current was decreased to 0.48 ± 0.03 (n = 6) times of its original value by 0.02 μ g/ml extracellular PiV in the indicated membrane potential range. This observation is in contrast to the voltage dependent block of potassium channels by PiV in nerve fibers and GH₃ cells (11, 12).

Several successful blocking experiments were performed with various other PiV concentrations in the 0.0001-100 μ g/ml range. In this concentration range the block by PiV was dose dependent and our data could be fitted to a channel-toxin interaction model in which one channel protein binds one toxin molecule. Based on this assumption, the $I_K/I_{K_0} = k_d/(k_d + [PiV])$ equation was fitted to the measured data points yielding 0.014 μ g/ml for the half blocking concentration of PiV (Fig. 2). In the above equation I_{K₀} and I_K are the initial and PiV blocked K⁺ current amplitudes, respectively, k_d is the dissociation constant and [PiV] is the venom concentration.

The full development of the blocking effect by PiV was rather quick. After the application of 0.02 μ g/ml extracellular PiV to the cells, the peak whole-cell K⁺ current value at a given depolarizing membrane potential stabilized at a reduced level within approximately the time of the minimum interpulse interval (60 s), a value corresponding to the time needed for the complete recovery from inactivation of the K⁺ channels (Fig. 1c inset). Perfusion of the bath with drug free extracellular solution for approx. 40 minutes resulted in a recovery of the whole-cell currents (see Fig. 1b and 1c insets). The channel block by PiV was almost completely removed by the end of the washing period, as opposed to the irreversible blocking effect of PiV on K⁺ currents in nerve fibers and GH₃ cells (11, 12).

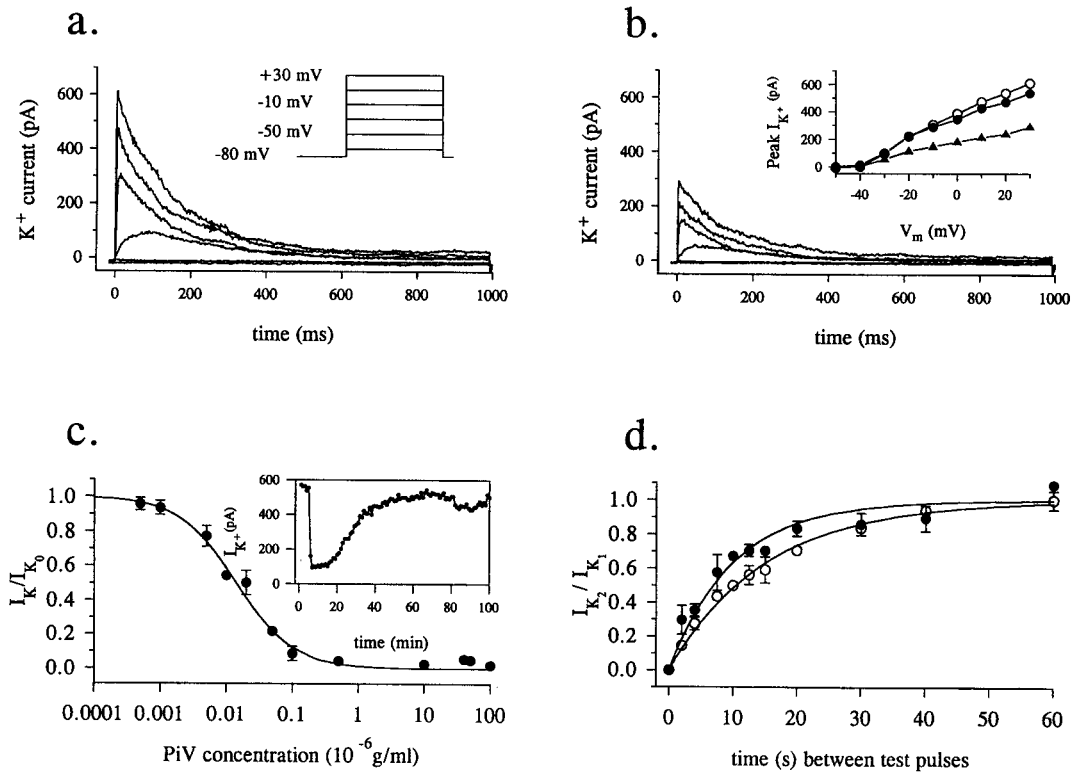


FIG. 1. Partial block of whole-cell K^+ current by externally applied *Pandinus imperator* venom in human peripheral blood lymphocytes. (a) Control. (Inset) Voltage steps lasting for 1000 ms were applied every 60 s from a holding potential -80 mV in 10 mV increments from -50 to $+30$ mV. Selected traces are displayed only for picture clarity. (b) Measurement of whole-cell K^+ currents starting 2 min after the administration of 0.02 $\mu\text{g/ml}$ extracellular PiV to the cell. (Inset) Effect of extracellular PiV on peak current-voltage relations of whole-cell K^+ currents (\circ = control, \blacktriangle = 0.02 $\mu\text{g/ml}$ PiV, \bullet ; = after wash-out). No leak current subtraction has been applied. (c) Dose dependence of partial K^+ channel block by PiV (0.02 $\mu\text{g/ml}$) in human lymphocytes ($n = 4$). The I_{K2}/I_{K0} values are based on peak current values measured at $+40$ mV test potential before and after the administration of PiV. Fitted curve is based on a 1:1 stoichiometry channel-toxin interaction model. (Inset) Time course of the development and removal of K^+ channel block by the application of external 0.02 $\mu\text{g/ml}$ PiV and successive washing of the cell with venom-free ECS. PiV has been administered to the lymphocyte immediately after the last data point at control current level, wash-out started after the second data point at the blocked current level. (d) Effect of extracellular PiV on the time course of recovery from K^+ channel inactivation in a human lymphocyte. The recovered current fraction (I_{K2}/I_{K1}) was determined by measuring peak current amplitudes evoked by depolarizing pulse pairs ($+40$ mV, 500 ms) separated by various time intervals ($n=3$). The cells were clamped to -100 mV for 120 s between successive pulse pairs to allow complete recovery of the channels. Steady state levels at the end of the 500 ms pulses were subtracted from peak current values. Fitted curves were calculated assuming simple exponential recovery.

In view of the results described above with the whole venom of *Pandinus imperator* and given the fact that the pure peptides were available we decided to test the blocking effect of peptide toxins Pi1, Pi2 and Pi3 on the whole-cell K^+ currents of human lymphocytes at selected values in the 0.01 - 50 nM concentration range. On the basis of the good fit, gained for the whole venom K^+ channel block by the 1:1 channel-toxin interaction model, the binding of the individual peptide toxin components of the venom could be characterized with a

similar model. Based on this assumption, dissociation constants for toxins Pi1, Pi2 and Pi3 in human lymphocytes were estimated and they were compared to K_d values characterizing the binding of these toxin components to *Shaker* B channels, as displayed in Table 1 (13, 14). K_d values characterizing the binding of peptide toxins Pi1-3 to Kv1.3 channels in lymphocytes are at least one, sometimes two orders of magnitude smaller than the corresponding values for *Shaker* B channels. This observation is in line with the observed difference

between the PiV K_d values for the different channels (see also Table 1).

The voltage independence of the K^+ channel block by PiV in human lymphocytes, as opposed to the voltage dependent block of potassium channels in nerve fibers and GH₃ cells, implies that the binding site of the highly charged toxin components of the venom is on the outer surface of the membrane and not deeply 'immersed' into the electric field in Kv1.3. Recovery from inactivation was accelerated to a large extent (from a single exponential fit: $\tau_{\text{control}} = 15.04 \pm 0.4$ s to $\tau_{\text{PiV}} = 9.95 \pm 0.3$ s) in the presence of PiV (Fig. 1d). This implies that the toxin remains bound to the Kv1.3 channel even in its inactivated conformation, and the presence of the bound toxin destabilizes the inactivated state. This suggests, that the bound toxin interferes with the C-type inactivation machinery of the channels, which involves a cooperative interaction of the four subunits of the tetrameric channel and a molecular rearrangement of the outer vestibule of the conducting pore (18,19). Besides a physical toxin-channel protein interaction, the trapping of K^+ ions in the outer vestibule can also be responsible for the enhancement of recovery from inactivation through the K^+ modulatory site of recovery (20).

Flow cytometric membrane potential measurements with the oxonol dye revealed a considerable depolarizing effect of 50 pM Pi2, the most effective Kv1.3 blocking peptide toxin component of the *Pandinus imperator* venom discovered so far, on the membrane potential of human lymphocyte populations at room tem-

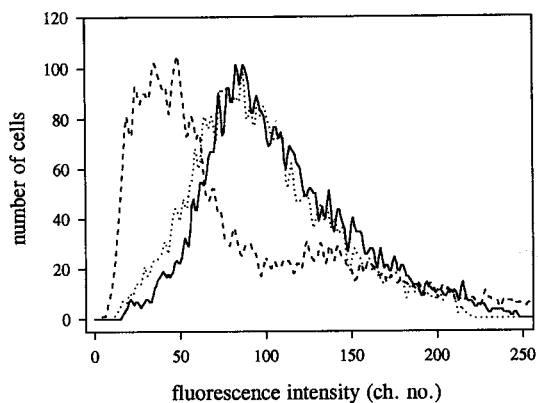


FIG. 2. Human peripheral blood lymphocytes are depolarized by toxin Pi2. Fluorescence intensity distributions of the control (dashed line) and 50 pM Pi2 treated samples. Measurements were taken 1.5 min (dotted line) and 3 min (full line) after the administration of Pi2. Sample temperature was 25°C. The cell population was labeled with membrane potential sensitive oxonol dye. In the present measurement increasing fluorescence corresponds to depolarization of the lymphocytes.

TABLE 1

Dissociation Constants Characterizing the Binding of PiV and Pi1-Pi3 to Different K^+ Channels Assuming a 1:1 Stoichiometry of Drug-Channel Interaction

Toxin	Channel	Human lymphocyte Kv1.3 ^a	Shaker B (Refs. 13, 14)	Nerve type (Ref. 11) ^b
PiV		0.014 $\mu\text{g/ml}$		260 $\mu\text{g/ml}$
Pi1		9.7 nM	23.3 nM ^c	
Pi2		50 pM	8.2 nM	
Pi3		0.5 nM	140 nM	

^a Measurements were taken at +30 mV test potential from a holding potential of -100 mV.

^b For the calculated value, measurements were taken into account from experiments when cells were depolarized to +30 mV from a holding potential of -100 mV.

^c For the calculated value, measurements were taken into account from experiments when cells were depolarized to +50 mV from a holding potential of -80 mV.

perature (25°C) and otherwise similar conditions to the patch-clamp experiments (Fig. 2). This observation is in concert with the high degree K^+ channel block caused by a similar dose of the toxin, because K^+ conductances play a basic role in setting the resting potential of human lymphocytes (17, 21-23).

In conclusion, PiV and peptide toxins Pi1-3 are powerful blockers of Kv1.3 channels, and as such can be very useful in the investigation of ion channels in lymphocytes and clarify the relationship between the activation of human lymphocytes and Kv1.3 potassium channels.

ACKNOWLEDGMENTS

The technical assistance of M.Sc. Timoteo Olamendi Portugal during purification of pure peptides is acknowledged. This work was supported by Grants OTKA T14655, T23873, and T17592 to R.G. and S.D.; MAKÁ JF No. 542 and FIRCA 1R03TW0722 to Gy.P.; in part by grants of Howard Hughes Medical Institute (75197-527107) and European Commission (C11*-CT94-0045) to L.D.P.; and by CNR "Progetto Finalizzato Invecchiamento" to C.P.

REFERENCES

- Hille, B. (1992) *Ionic Channels of Excitable Membranes* (2nd ed.), Sinauer, Sunderland, MA.
- Rochat, H., Bernard, P., and Couraud, F. (1979) in *Advances in Cytopharmacology* (Cerrarelli, B., and Clementi, F., Eds.), Vol. 3, pp. 325-334, Raven Press, NY.
- Becerril, B., Vázquez, A., Garcia, C., Corona, M., Bolivar, F., and Possani, L. D. (1993) *Gene*, **128**, 165-171.
- Valdivia, H. H., Fuentes, O., El-Hayek, R., Morrissette, J., and Coronado, R. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 19135-19138.
- Lee, S. C., Levy, D. I., and Deutsch, C. (1992) *J. Gen. Physiol.* **99**, 771-793.
- Carbone, E., Wanke, E., Prestipino, G., Possani, L. D., and Maelicke, A. (1982) *Nature* **296**, 90-91.

7. Leonard, R., Garcia, M. L., Slaughter, R. S., and Reuben, J. P. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10094–10098.
8. Sands, S. B., Lewis, R. S., and Cahalan, M. D. (1989) *J. Gen. Physiol.* **93**, 1061–1074.
9. Miller, C., Moczydlowski, E., Latorre, R., and Phillips, M. (1985) *Nature* **313**, 316–318.
10. Novick, J., Leonard, R. J., King, V. F., Schmalhofer, W., Kaczorowski, G. J., and Garcia, M. L. (1991) *Biophys. J.* **59**, 78a.
11. Pappone, P. A., and Cahalan, M. D. (1997) *J. Neuro. Sci.* **7**, 3300–3305.
12. Pappone, P. A., and Lucero, M. T. (1988) *J. Gen. Physiol.* **91**, 817–833.
13. Olamendi-Portugal, T., Gómez-Lagunas, F., Gurrola, G. B., and Possani, L. D. (1996) *Biochem. J.* **315**, 977–981.
14. Gómez-Lagunas, F., Olamendi-Portugal, T., Zamudio, F. Z., and Possani, L. D. (1996) *J. Membr. Biol.* **152**, 49–56.
15. Delepierre, M., Prochinicka-Chalufour, A., and Possani, L. D. (1997) *Biochemistry* **36**, 2649–2658.
16. Gómez-Lagunas, F., Olamendi-Portugal, T., and Possani, L. D. (1997) *FEBS Lett.* **400**, 197–200.
17. Gáspár, R., Jr., Panyi, Gy., Ypey, D. L., Krasznai, Z., Vereb, Gy., Pieri, C., and Damjanovich, S. (1994) *Mol. Pharmacol.* **46**, 762–766.
18. Panyi, G., Sheng, Z., Tu, L. W., and Deutsch, C. (1995) *Biophys. J.* **69**, 896–904.
19. Liu, Y., Jurman, M. E., and Yellen, G. (1996) *Neuron* **16**, 859–867.
20. Levy, D. I., and Deutsch, C. (1996) *Biophys. J.* **70**, 798–805.
21. Gáspár, R., Jr., Bene, L., Damjanovich, S., Muñoz-Garay, C., Calderon-Aranda, M. E., and Possani, L. D. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **213**, 419–423.
22. Varga, Z., Bene, L., Pieri, C., Damjanovich, S., and Gáspár, R., Jr. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **218**, 828–832.
23. Gáspár, R., Jr., Varga, Z., Bene, L., Marcheselli, F., Pieri, C., and Damjanovich, S. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **226**, 303–308.

Effects of Toxins Pi2 and Pi3 on Human T Lymphocyte Kv1.3 Channels: The Role of Glu7 and Lys24

M. Péter Jr.¹, Z. Varga¹, P. Hajdu¹, R. Gáspár Jr.¹, S. Damjanovich¹, E. Horjales², L.D. Possani², G. Panyi¹

¹Department of Biophysics and Cell Biology, University Medical School of Debrecen, 4012 Hungary, POB 39

²Department of Molecular Recognition and Structural Biology, Institute of Biotechnology, National Autonomous University of Mexico, Avenida Universidad, 2001 Cuernavaca 62210 MEXICO

Received: 17 December 1999/Revised: 3 October 2000

Abstract. *Pandinus imperator* scorpion toxins Pi2 and Pi3 differ only by a single amino acid residue (neutral Pro7 in Pi2 vs. acidic Glu7 in Pi3). The binding kinetics of these toxins to human Kv1.3 showed that the decreased *on* rate ($k_{ON} = 2.18 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ for Pi2 and $1.28 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ for Pi3) was almost entirely responsible for the increased dissociation constant (K_d) of Pi3 ($K_d = 795 \text{ pM}$) as compared to Pi2 ($K_d = 44 \text{ pM}$). The ionic strength dependence of the association rates was exactly the same for the two toxins indicating that through-space electrostatic interactions can not account for the different *on* rates. Results were further analyzed on the basis of the three-dimensional structural models of the toxins. A 3D structure of Pi3 was generated from the NMR spectroscopy coordinates of Pi2 by computer modeling. The Pi3 model resulted in a salt bridge between Glu7 and Lys24 in Pi3. Based on this finding our interpretation of the reduced *on* rate of Pi3 is that the intramolecular salt bridge reduces the local positive electrostatic potential around Lys24 resulting in decreased short-range electrostatic interactions during the binding step. To support our finding, we constructed a 3D model of the Ser-10-Asp Charybdotoxin mutant displaying distinctly reduced affinity for *Shaker* channels. The mutant Charybdotoxin structure also displayed a salt bridge between residues Asp10 and Lys27 equivalent to the one between Glu7 and Lys24 in Pi3.

Key Words: Human lymphocyte — Kv1.3 — Scorpion toxin binding — *Pandinus imperator* — Charybdotoxin — Three-dimensional structure — Salt bridge

Correspondence to: R. Gáspár

Introduction

The voltage-gated potassium channel, Kv1.3, plays an important role in T-cell physiology because of its involvement in the regulation of the membrane potential of these cells thereby influencing T-cell activation in vitro [4, 18, 21, 34]. K⁺ channel blocker scorpion toxins (Stox) together with complementary mutagenesis of Kv1.3 proved to be excellent tools in studying structure-function relations and defining binding sites for the blockers on the ion channel [1]. Recently, Stox Kv1.3 channel blocker Margatoxin has been shown to be effective even in suppressing T-cell function in vivo [17]. The above results suggest that Kv1.3 may be an excellent target for modulating immune system functions by specific and potent blockers [3].

During the search for more potent K⁺ channel inhibitors the whole venom of scorpion *Pandinus imperator* (PiV) has been applied to the voltage-gated potassium channels of nerve fibers and GH₃ cells. The effects of the *Pandinus* venom was shown to be different from other known K⁺ channel Stox in their marked voltage dependence and poor reversibility of the block on these channels [29, 30].

Recently, several new K⁺ channel blocking peptides named Pi1-Pi7 were purified to homogeneity from the venom of *Pandinus imperator* and their primary structures were determined [14, 26, 27]. Toxins Pi2 and Pi3 are very closely related in their structure, both contain three disulfide bridges and the sequences differ only in one amino acid at position 7 (proline in Pi2 vs. glutamic acid in Pi3) in the N-terminal region [14]. Pi2 and Pi3 bear 7 and 6 net positive charges, respectively. The three-dimensional structure of Pi2, under the name of

PTX K-alpha, was determined by NMR spectroscopy [36].

The whole *Pandinus imperator* venom efficiently reduces whole-cell K^+ currents in human peripheral blood lymphocytes [32]. Preliminary experiments also showed that purified peptide components Pi2 and Pi3 of the venom powerfully blocked Kv1.3 channels in human peripheral blood lymphocytes with approximate K_d values of 50 pM and 500 pM, respectively [32].

The single amino acid difference between Pi2 and Pi3 and the large difference in their blocking potency for Kv1.3 provide excellent background for studying the structure-function relationship of current block by these toxins. Our experiments were motivated by in-depth analysis of factors influencing toxin binding to *Shaker* and Ca^{2+} activated K^+ channels [10, 12, 13, 22, 25, 31, 35]. These include long-range nonspecific electrostatic interactions, short-range electrostatic interactions and close contact steric interactions. The contribution of these interactions to toxin binding requires the analysis of blocking kinetics, the determination of association and dissociation rates and the ionic strength dependence of the rate constants. We applied this approach to determine the difference between the binding of Pi2 and Pi3 to Kv1.3 channels. In addition to patch-clamp experiments we analyzed the results in the view of differences found between the three-dimensional structures of these toxins, as well as between those of relevant charybdotoxin (ChTx) mutants [12].

Throughout this article observations concerning Pi2, one of the most potent toxin inhibitor of Kv1.3, are presented in detail, in comparison with Pi3. Kv1.3 was studied in human peripheral blood lymphocytes where voltage-gated whole-cell currents are dominated by these channels.

Materials and Methods

CELLS

Heparinized human peripheral venous blood was obtained from healthy volunteers (authors of the paper). Mononuclear cells were separated by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation. Collected cells were washed twice with Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free Hanks' solution containing 25 mM HEPES (pH:7.4). Cells were cultured in a 5% CO_2 incubator at 37°C in 24-well culture plates in RPMI-1640 supplemented with 10% FCS (Hyclone, Logan, Utah), 100 u./l penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 2 mM L-glutamine at 0.5×10^6 /ml density for 3–4 days. The culture medium also contained 2.5 or 5 µg/ml of phytohemagglutinin A (PHA-P, Sigma-Aldrich Kft, Hungary) to increase K^+ channel expression [8, 9].

ELECTROPHYSIOLOGY

Whole-cell measurements were carried out using Axopatch-200 and Axopatch-200A amplifiers connected to personal computers using

Axon Instruments TL-1-125 and Digidata 1200 computer interfaces, respectively. For data acquisition and analysis the pClamp6 software package (Axon Instruments, Foster City, CA) was used. T lymphocytes were selected for current recording by incubation with mouse anti-human CD2 (Becton-Dickinson, San Jose, CA) followed by selective adhesion to Petri dishes coated with goat anti-mouse IgG antibody (Biosource, Camarillo, CA), as described by Matteson and Deutsch [24]. Dishes were washed gently five times with 1 ml of normal extracellular bath medium (*see below*) for the patch-clamp experiments. Standard whole-cell patch-clamp techniques were used [11, 24, 32, 39]. Series resistance compensation up to 85% was used to minimize voltage errors and achieve good voltage-clamp conditions ($V_{err} < 5$ mV). Pipettes were pulled from GC 150 F-15 borosilicate glass capillaries (Clark Biomedical Instruments, UK) in two stages and fire polished, resulting in electrodes having 2–3 MΩ resistance in the bath. The bath solution was (in mM): 145 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 2.5 CaCl₂, 5.5 glucose, 10 HEPES (pH 7.35, ionic strength = 190.5 mM). The high ionic strength external solution was (in mM): 77.5 NaCl, 5 KCl, 48.6 MgCl₂, 2.5 CaCl₂, 5.5 glucose, 10 HEPES (pH 7.35, ionic strength = 265.9 mM). The measured osmolarity of the external solutions was between 302 and 308 mOsm. The pipette solution was (in mM): 140 KF, 11 K₂EGTA, 1 CaCl₂, 2 MgCl₂, and 10 HEPES (pH 7.20, ~295 mOsm).

TEST SUBSTANCES

Pandinus imperator venom was obtained from anesthetized animals by electrical stimulation. To separate the peptide toxin components the soluble venom was initially fractionated in a Sephadex G-50 column and the subfractions were further fractionated by high performance liquid chromatography (HPLC), using a C18 reverse-phase column (Vydac, Hysperia, CA), of a Waters 600E HPLC apparatus. The homogeneity of the purified samples was confirmed by step-gradient HPLC and direct Edman degradation using an automatic sequencer [7, 14].

Solutions were supplemented with 0.1 mg/ml bovine serum albumin to suppress nonspecific binding of the toxins to the walls of the tubes and to the Petri dish. Bath perfusion around the measured cell with different test solutions was achieved using a gravity-flow perfusion setup with 8 input lines and PE10 polyethylene tube output tip with flanged aperture to reduce the turbulence of the flow. The solutions were applied in an alternating sequence of control and test solutions, unless stated otherwise. Excess fluid was removed continuously. For the measurement of blocking kinetics of toxins data acquisition was synchronized to fluid exchange using solenoid valves controlled by pClamp6 via digital outputs of Digidata 1200. The reference electrode was connected to the recording chamber with an agar bridge to eliminate junction potential changes during perfusion.

DATA ANALYSIS

Prior to analysis whole-cell current traces were corrected for ohmic leak and digitally filtered (3 point boxcar smoothing). Nonlinear least squares fits were done using the Marquardt-Levenberg algorithm. Fits were evaluated visually, as well as by the residuals and the sum of squared differences between the measured and calculated data points.

Statistical comparisons were made using Student's *t*-test, and when appropriate, paired *t* test at $P = 0.05$. For all experiments, the standard error of the mean (SEM) is reported.

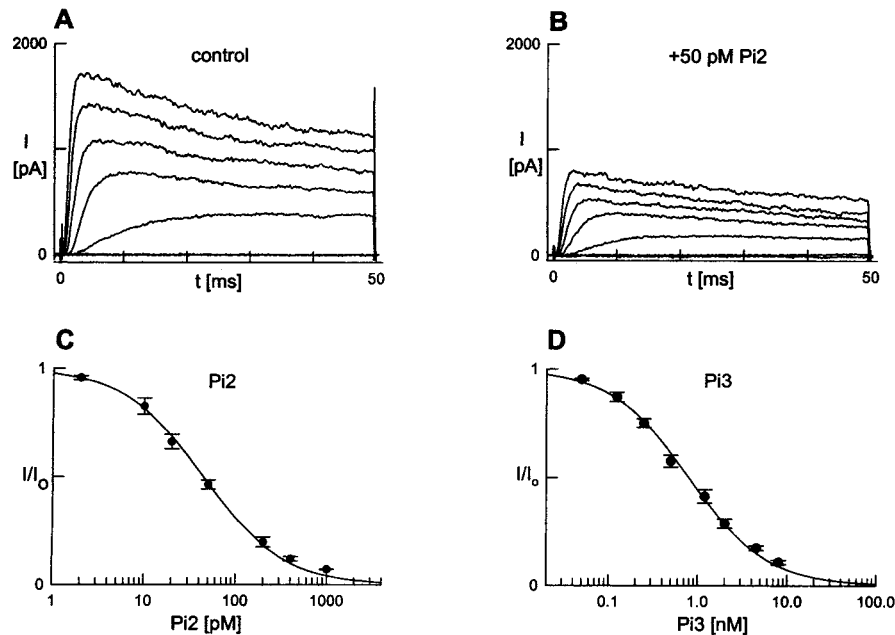


Fig. 1. Effects of Pi2 and Pi3 on whole-cell K^+ currents in human T lymphocytes. (*Panel A*) Lymphocyte perfused with control extracellular solution. Voltage steps lasting for 50 msec were applied every 50 sec from a holding potential of -80 mV in 10 mV increments from -70 to $+50$ mV. Selected traces are displayed only for image clarity (-70 , -50 , -30 , -10 , 10 , 30 , 50 mV). (*Panel B*) Whole-cell K^+ currents of the same cell in the presence of 50 pM Pi2 using the same pulse protocol as for *panel A*. Sampling rate was 20 kHz, lowpass filtering was applied at 5 kHz. Current traces were smoothed using the 3-point boxcar method. (*Panels C and D*) Dose response of K^+ current block by Pi2 and Pi3, respectively. The fraction of unblocked current was calculated as I/I_0 where I_0 is the peak K^+ current measured in the control solution and I is the peak current during bath perfusion with the test solution containing the toxin. The solid line is the binding curve fitted to the data points based on a 1:1 drug:channel stoichiometry: $I/I_0 = K_d/(K_d + [Tx])$, where $[Tx]$ indicates the toxin concentration and K_d is the dissociation constant. The best fit resulted in a dissociation constant of 44 and 795 pM for Pi2 and Pi3, respectively. The test potential was $+50$ mV, the holding potential was -120 mV. Error bars indicate SEM ($n = 3$).

MODELING OF 3D-STRUCTURES OF PI3 AND THE SER-10-ASP CHTX MUTANT

The 3D-structure of Pi2 toxin from the scorpion *Pandinus imperator* was obtained as a multiple NMR structure from the Brookhaven Protein Data Bank, entry 2PTA [36]. The conformation with best geometry (first reported in the entry) was used to model Pi3. A direct mutation command was used in the program "O" [15] and applied to position 7 to change the side chain from Pro to Glu, to obtain a first-step structure in the modeling procedure. This step was natural since the Ramachandran angles of the Pro7 residue in Pi2 structure are compatible with a Glu in that position ($\phi = -77$, $\psi = -29$). Next, ROTAMER search command was applied, to find the rotamer with the best interactions. Thus the second most frequent rotamer for the Glu was selected. We also changed the Lys24 rotamer so this residue could build the salt bridge with Glu7. As no repulsive interactions were found in this conformation and no main-chain tensions were generated with this point-mutation we decided to use this model without further optimization. Moreover, the salt bridge geometry generated (*see Results*) is both natural and compatible with experimental observations in this work. The 3D-structure of wild-type ChTx was obtained from the Brookhaven Protein Data Bank, entry 2CRD [2]. The Ser-10-Asp mutant of ChTx was built in the same way as for Pi3 and the resulting rotamers were also the same.

Results

PI2 AND PI3 BLOCK Kv1.3 CHANNELS WITH HIGH AFFINITY

Figure 1A shows whole-cell current traces recorded from a human T lymphocyte. Currents were evoked from -80 mV holding potential at test potentials ranging from -70 to $+50$ mV. Under the experimental conditions used in this study, i.e., low internal Ca^{++} (*see Materials and Methods*) the current traces correspond to voltage-gated potassium current flowing through Kv1.3 channels of human T lymphocytes. Figure 1B shows that 50 pM Pi2 reduced the above demonstrated whole-cell K^+ currents effectively at all membrane potentials tested (*see below*).

Dose dependence of equilibrium K^+ channel block by Pi2 and Pi3 was determined by measuring the peak whole-cell K^+ current at $+50$ mV in the bath solution (I_0) then changing the perfusion to bath solutions containing the toxins at different concentrations. To verify that equilibrium block was reached, short (50 msec duration)

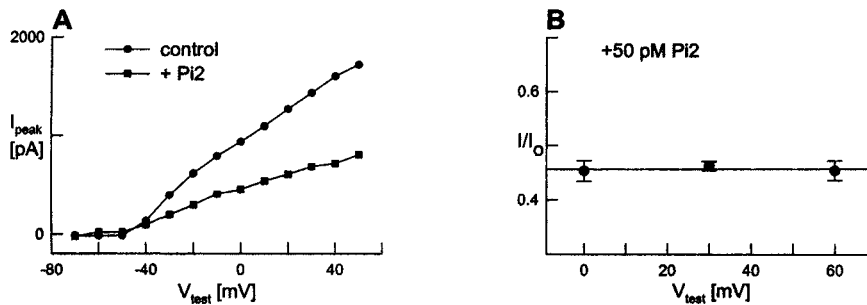


Fig. 2. Block of Kv1.3 by Pi2 is voltage independent. (Panel A) Peak currents derived from the measurement represented in Fig. 1A and B and plotted as a function of applied test potential. Control: (●); 50 pM Pi2: (■). (Panel B) Remaining fractions of the whole-cell K^+ current in a human T lymphocyte at different test potentials during perfusion with 50 pM Pi2. Remaining fractions were calculated as I/I_0 where I_0 is the peak of the control current and I is the peak in the presence of 50 pM Pi2. Cells were depolarized from -120 to 0 , $+30$ and $+60$ mV for 50 msec. Data were fitted with a straight line with the equation: $I/I_0 = SL \times TP + INT$, where SL is the slope of the line, TP is the applied test potential and INT is the y intercept. The fit yielded 1.7×10^{-5} 1/mV for slope.

depolarizing pulses to $+50$ mV were applied every 50 sec. The peak current in the presence of the toxin (I) was calculated by averaging 3–4 peaks at equilibrium block. From I_0 and I the remaining fraction ($R = I/I_0$) of the current was calculated and plotted as a function of toxin concentration in Fig. 1C and D for Pi2 and Pi3, respectively. The resulting dose response curve could be fitted by equation $R = K_d/(K_d + [Tx])$ describing a model where one toxin molecule binds to one channel protein. In the above formula R indicates the remaining fraction of the whole-cell current, $[Tx]$ is the extracellular toxin concentration and K_d is the dissociation constant characterizing the drug-channel interaction. The excellent fit obtained supports a mechanism in which one toxin molecule binds to one channel protein and plugs the pore of the channel similarly to ChTx [13]. As a result of the fitting procedure $K_d = 44$ pM and $K_d = 795$ pM were obtained for Pi2 and Pi3, respectively. Both toxins bind to the voltage-gated Kv1.3 channels of human T lymphocytes with high affinity.

BLOCK BY Pi2 AND Pi3 SHOWS NO VOLTAGE DEPENDENCE

Pappone et al. reported previously a voltage-dependent action of the whole soluble venom on delayed rectifier K^+ channels of myelinated frog nerve fiber [29]. In our previous paper we showed that no voltage dependence of block exists for the full *Pandinus imperator* venom on human T lymphocyte K^+ channels [32]. Pi2 bears a net 7 positive charge and has a lysine in position 24 equivalent to the lysine in position 27 of ChTx, which is critical for interaction with *Shaker* potassium channels. However, other charged and uncharged amino acids in several

positions influence their binding affinity. To further examine the reasons for the above-mentioned difference in the voltage dependence of the K^+ channel block by the *Pandinus imperator* venom we tested the effect of toxins Pi2 and Pi3 purified from the whole venom on the voltage dependence of the block. We determined the remaining fraction of whole-cell current in the presence of 50 pM Pi2 at various membrane potentials. Current-voltage relations on Kv1.3 show that the percentage of block by Pi2 is independent of the applied test potential (Fig. 2A and 2B). Similar results proved the voltage independence of the Pi3 block (*data not shown*). The voltage independence of the block in both cases implies that the binding site of the highly charged toxin component on Kv1.3 is not deeply immersed into the transmembrane electric field. Alternatively, the rate of obtaining a new equilibrium at different depolarized membrane potentials is not fast enough to show the voltage dependence of the block measured from the peak current (*see Discussion*).

ASSOCIATION AND DISSOCIATION OF Pi2 AND Pi3 ARE VERY FAST

K^+ channel block by Pi2 and Pi3 is reversible, because after washing toxin-treated human T lymphocytes with drug free extracellular solution the whole-cell K^+ current returns to its original amplitude (Fig. 3). The very low dissociation constant of Pi2 and the fact that its blocking effect was fully reversible by washing in less than 15 min, suggested that the *on* and *off* rates of the toxin are very high. Therefore, we examined the association and dissociation rates of Pi2 to the channel protein by determining the wash-in and wash-out kinetics of the drug on

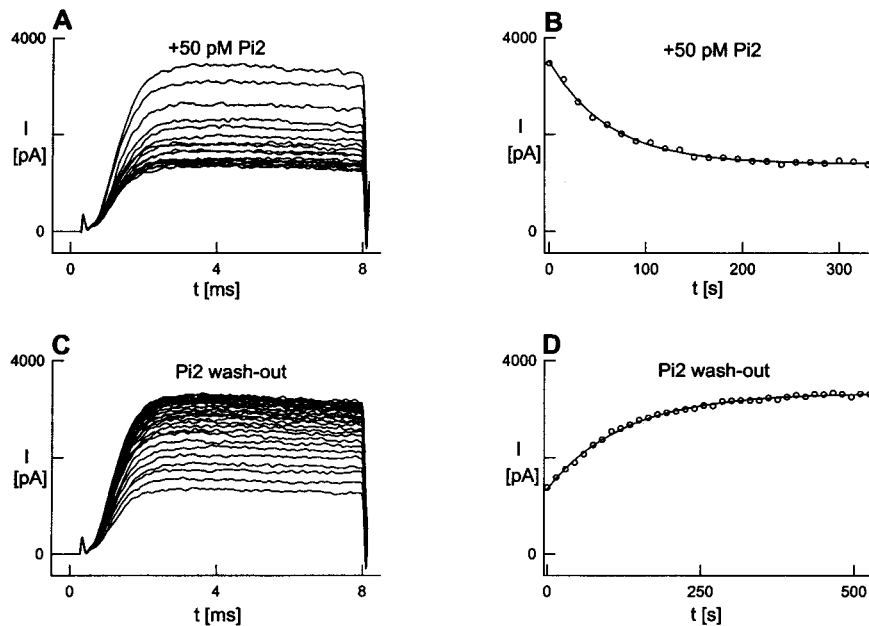


Fig. 3. Wash-in and wash-out kinetics of Pi2 characterizing the interaction of the toxin with Kv1.3 channels of human T lymphocytes. Cells were held at a holding potential of -120 mV and depolarized for 8 msec to $+50$ mV at every 15 sec. The bath was perfused with control extracellular solution until the current amplitude stabilized. (*Panel A*) The perfusion was switched to solution containing 50 pM Pi2 by the use of electromagnetic valves driven by the computer at the end of the first episode shown. The perfusion with toxin containing solution was continuous until equilibrium block was reached. (*Panel B*) Peak currents were plotted as the function of time and fitted to a single exponential decay (*see* the text for details). (*Panel C*) After the equilibrium block had already been reached the perfusion was switched back to control solution by the software driven valves. (*Panel D*) The peak whole-cell K^+ currents were plotted against the time elapsed from switching back to the control solution and were fitted to a single exponential rise.

the Kv1.3 channels of human T lymphocytes in the whole-cell configuration (Fig. 3). To achieve a good time resolution we used depolarizing pulses lasting for 8 msec only, and applied every 15 sec (Fig. 3A and C). This pulsing rate did not induce cumulative inactivation since identical peak amplitudes were obtained after wash-out compared to those measured at the beginning of the wash-in process. The gravity-driven flow of extracellular solution was switched on and off by electromagnetic valves controlled by the data acquisition apparatus.

The measurement of the time course of current block by the toxin was started after the peak amplitude stabilized when entering whole-cell. Whole-cell K^+ currents recorded after switching to an extracellular solution containing 50 pM Pi2 (Fig. 3A) and peak values were plotted in Fig. 3B as a function of time and fitted to a single exponential function: $A(t) = B \times \exp(-t/T_{ON}) + C$, where $A(t)$ indicates the amplitude of the measured current at time t , C is the peak current at equilibrium block and $B = A(t = 0) - C$. The time constant (T_{ON}) describing the

wash-in kinetics of Pi2 yields 58 ± 7 sec ($n = 7$). After reaching equilibrium block of the whole-cell current the perfusion was switched back to the drug-free control solution, while the voltage-clamp protocol recording the whole-cell current was running continuously. The results are displayed in Fig. 3C. Peak currents recorded during the wash-out procedure were plotted the same way as above (Fig. 3D) and were also fitted to a single exponential function: $A(t) = B \times (1 - \exp(-t/T_{OFF})) + C$, where $B = A(t = \infty) - C$, $A(t)$ and C were defined above. The resulting time constant (T_{OFF}) was 158 ± 21 sec ($n = 7$) in this case.

K^+ channel block by Pi3 was also found to be reversible (*data not shown*). We determined the time constants of block and unblock by 500 pM Pi3 using the same method as above. For Pi3 the values of T_{ON} and T_{OFF} were 53 ± 3 sec ($n = 8$) and 80 ± 6 sec ($n = 7$), respectively. From the measured time constants and assuming a simple bimolecular reaction between the toxin and the channel, k_{ON} , k_{OFF} and K_d can be expressed as follows:

Table 1. Blocking parameters of Pi2 and Pi3 in normal and high ionic strength solutions*

	Solution	k_{ON} ($M^{-1}sec^{-1}$)	k_{OFF} (sec^{-1})	K_d
Pi2	NR**	2.18×10^8	6.33×10^{-3}	29 μ M
	HIS***	6.90×10^6	17.7×10^{-3}	2558 μ M
Pi3	NR**	1.28×10^7	12.5×10^{-3}	0.97 nM
	HIS***	3.98×10^5	18.0×10^{-3}	45.2 nM

* Second-order association and first-order dissociation rates were determined from averaged T_{ON} and T_{OFF} values obtained from 4–7 independent wash-in-wash-out experiments. K_d was calculated as the ratio of kinetic constants k_{OFF}/k_{ON} . **Normal Ringer solution. ***High ionic strength solution.

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

The calculated values of k_{ON} , k_{OFF} and K_d are displayed in Table 1.

ASSOCIATION RATE OF PI2 AND PI3 IS SENSITIVE TO THE IONIC STRENGTH OF THE SOLUTION

To study the influence of through-solution electrostatic interaction between the cationic toxin and the anionic mouth of the ion channel on the kinetics of ion channel blockade the effect of increasing ionic strength of the extracellular solution was assayed. In high ionic strength solution (HIS), the concentration of divalent magnesium ions was raised in the recording solution to 48.6 mM while the osmolarity of the solution was kept constant for undisturbed patch-clamping of human lymphocytes (*see* Materials and Methods). The isosmotic substitution resulted in a 1.4-fold increase in the ionic strength. We determined the dissociation constants, the *on* and the *off* rates of Pi2 and Pi3 in HIS and compared them to the ones measured in normal Ringer (NR) solution (*see* Table 1). In the high ionic strength solution *on* rates decreased 32-fold for both toxins, when *off* rates increased 2.8- and 1.4-fold altogether causing 88- and 46-fold increased dissociation constants for Pi2 and Pi3, respectively.

PI2 ALTERS THE KINETICS OF RECOVERY FROM INACTIVATION OF KV1.3 CHANNELS

In our previous paper [32] we reported that current block by the whole soluble Pi venom is associated with a significant enhancement of the rate of recovery from inactivation of Kv1.3. In this paper we extended this study to the purified Pi2 and Pi3 peptides of the venom. In the presence of Pi2 the recovery from inactivation of human

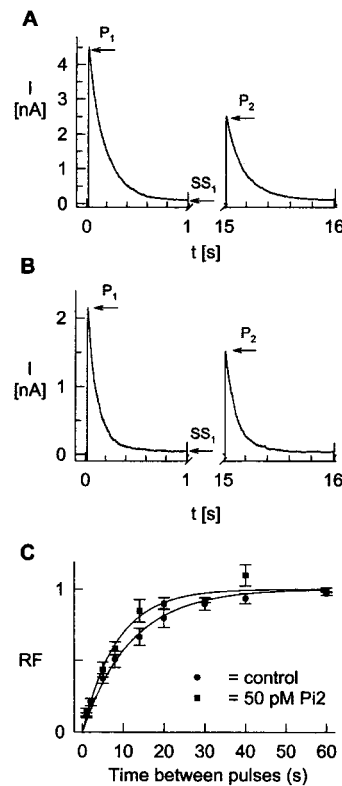


Fig. 4. The effect of 50 pM Pi2 on recovery from inactivation of Kv1.3 channels in human T lymphocytes. (*Panel A*) Representative whole cell currents evoked by a pulse pair (1 sec to +50 mV) separated by 14 sec interpulse interval at -120 mV holding potential in control solution. P_1 and P_2 are peak currents observed during the first and second pulses, respectively, and SS_1 is the steady-state current at the end of the first pulse. The recovered fraction (RF) of the channels was calculated using the following formula: $RF = (P_2 - SS_1)/(P_1 - SS_1)$. The calculated RF was 0.55 in this experiment. (*Panel B*) Recovery from inactivation in the presence of Pi2 is faster. The same cell as in *Panel A* was perfused with 50 pM Pi2. All other experimental conditions were the same. 50 pM Pi2 reduced the peak current to 48% of control. The calculated RF was 0.70 indicating that 70% of the inactivated channels recovered from inactivation within 14 sec. The value of RF is higher in the presence of Pi2 than in the absence. (*Panel C*) Comparison of the kinetics of recovery from inactivation in the presence and absence of Pi2. Depolarizing pulse pairs (1 sec to +50 mV) separated by various inter-pulse intervals ranging from 1 to 60 sec were applied. The time between pulse pair sequences was 80 sec at -120 mV holding potential to allow full recovery of the channels. The recovered fraction (RF) of the channels was calculated as above. Mean \pm SEM ($n = 3$) of RF is plotted on the figure for control solutions (\bullet) and obtained during bath perfusion with 50 pM Pi2 (\blacksquare) as a function of interpulse interval. The continuous lines show the best fit to a single exponential function (*see* text).

lymphocyte Kv1.3 channels became faster (Fig. 4). During the experiments we applied 1 sec long depolarizing pulse pairs with various interepisode intervals ranging from 1 to 60 sec (Fig. 4A). The 1 sec long test pulse was

enough for reaching steady-state amplitude for the whole-cell current. Time between pulse pairs was 80 sec at a holding potential of -120 mV to allow full recovery of the channels. We calculated the fraction of channels (RF) recovered from the inactivated state during the varying interpulse intervals using the formula $RF = (P_2 - SS_1)/(P_1 - SS_1)$, where P_1 and P_2 are peak currents detected during the first and the second pulses in the pair, respectively and SS_1 is the steady-state amplitude of the current during the first pulse. Figure 4B shows the two-pulse protocol applied to the same cell in the presence of 50 μ M Pi2. The RF increased from 0.55 in control solution (Fig. 4A) to 0.70 (Fig. 4B) indicating that channels recover faster from inactivation in the presence of Pi2. We determined the recovery time constant by plotting the recovered fractions as the function of interpulse interval and fitting a single exponential function: $RF(t) = 1 - \exp(-t/T)$ to the data points. Recovery from inactivation was significantly accelerated in the presence of 50 μ M Pi2, because the time constant characterizing it decreased from 15.42 ± 1.87 sec (control) to 10.42 ± 1.04 sec ($P < 0.0028$, $n = 6$).

One amino acid difference between Pi2 and Pi3 caused an 18-fold difference in their affinity for Kv1.3 as determined from the equilibrium block of the channels. We were interested to know if the ability of Pi2 and Pi3 to speed up recovery from inactivation of Kv1.3 was different. Any such existing difference could be immediately attributed to the mutated amino acid in position 7 (Glu for Pro), between the two toxins.

In the previous section we have shown that recovery from inactivation was a single exponential process. Therefore, in order to characterize the effect of toxins on the recovery kinetics, it was sufficient to compare RF values obtained at fixed time intervals under control conditions and after the application of Pi2 or Pi3. We have chosen 7 sec interpulse intervals and applied close to half blocking concentrations of Pi2 (44 μ M) and Pi3 (500 μ M). We used the 7 sec long inter-episode time because by this time the recovered fraction of the current was close to 0.5. We calculated the recovered fractions of the channels in the control extracellular solution and in solutions containing Pi2 and Pi3. The recovered fraction of the K^+ current during the 7 sec long inter-episode time was 0.53 ± 0.03 in the absence and 0.56 ± 0.03 in the presence of 500 μ M Pi3 ($P < 0.099$, $n = 6$). Using the same protocol the recovery from inactivation was accelerated by Pi2 resulting in a recovered current fraction 0.53 ± 0.05 compared to the control value of 0.45 ± 0.02 . The latter difference proved to be significant (paired t -test, $P < 0.009$, $n = 5$). The observed difference in the ability of Pi2 and Pi3 to speed up the recovery from inactivation of Kv1.3 can only be associated to the seventh amino acid in the toxins, which is the only different amino acid in these peptides.

THREE-DIMENSIONAL MODEL OF Pi3

Based on the parameters obtained from NMR spectroscopy data of Pi2 [36], a model of the three-dimensional structure of Pi3 was generated, as described in Materials and Methods. This independently generated model was fully compatible with the recently published 3D NMR structure of Pi3 [16].

Pi3 is a natural mutant (Pro-7-Glu) of Pi2, in which the substituted proline for glutamic acid in position 7 does not modify the folding pattern of the molecule, on the contrary, the distances and angle torsion constraints are quite compatible with the formation of a salt bridge with Lys24, as shown in Fig. 5. Lys24 of Pi2 and Pi3 is at the equivalent structural position of Lys27 in ChTx [12], (Table 2) and Lys28 in noxiustoxin [23]. Both lysines were shown to be essential for binding to the K-channels studied [33]. Figure 5A represents Pi2, whereas Fig. 5B is the model of Pi3. The colored amino acids are some of those found to be essential for toxin-channel interaction, plus residue 7, which is the mutated amino acid. In magenta is Lys24, in white, from left to right are Phe33, Lys31, Met26 and Asn27. In blue is Pro7 for Pi2 and Glu7 for Pi3, making the salt bridge with Lys24.

THREE-DIMENSIONAL MODEL OF THE SER-10-ASP CHTX MUTANT

Earlier work performed by the group of Miller [12] showed that a mutant of ChTx containing an aspartic acid in position 10, substituting for serine, was capable of recognizing the channel with 1,500-fold less affinity, compared to native ChTx. When we aligned the amino acid sequences of these peptides in search for the best similarity, we observed that Ser10 of ChTx corresponds to position 7 in Pi2, where the glutamic acid substitutes for proline in Pi3 (Table 2). Thus, the three-dimensional models of wild-type ChTx (Fig. 5C) and its mutant containing aspartic acid (Fig. 5D) were constructed on the basis of literature data and compared to our results. The Asp10 has a spatial geometry compatible with a salt-bridge formation with Lys27 in the mutant ChTx. These results are consistent with the highly conserved structural folding of the segments where these mutations occur in Pi2 and ChTx. Position 10 in ChTx and position 7 in Pi2, are the first residues of the alpha-helical domains of the toxins, whereas residue 27 in ChTx (24 in Pi2) is a central residue in one of the conserved beta-strands of these peptides. Consequently, the relative positions of the mutated residues are compatible with the formation of salt bridges in both Pi3 and Ser-10-Asp ChTx, which could explain an important decrement of affinity (increase of K_d) for the respective channel.

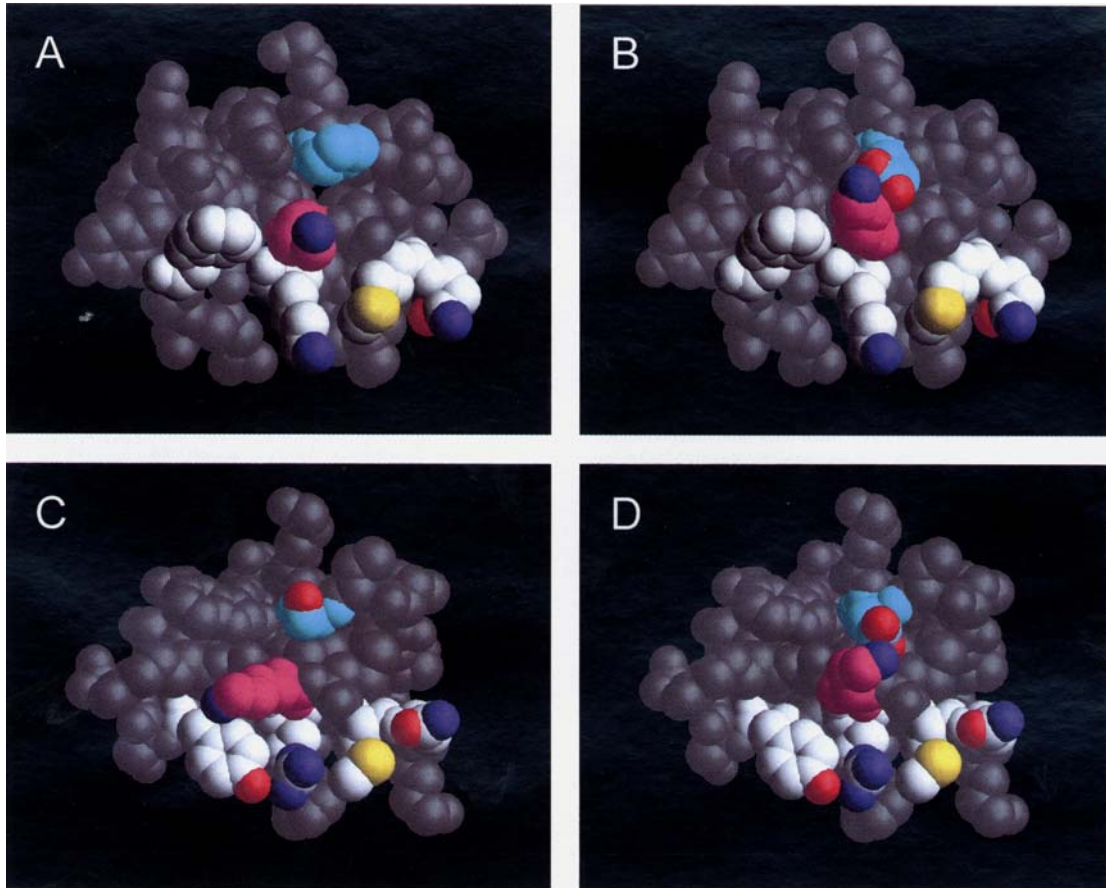


Fig. 5. Three-dimensional models of Pi2, Pi3, wild-type ChTx and Ser-10-Asp mutant of ChTx. (*Panel A*) A view of the Pi2 structure observed from the Lys24 residue (with carbon atom in magenta). Some amino acids essential for channel binding (from left to right: Phe33, Lys31, Met26 and Asn27) are represented with carbon atoms in white. Pro7, the only point mutation differentiating Pi2 and Pi3 is represented in cyan. Other atom types in these residues are colored, as follows: oxygen in red, nitrogen in blue and sulfur in yellow. The remaining structure is shown in gray. (*Panel B*) Pi3 toxin model viewed in the same orientation as *panel A*; color codes are also the same as above. A movement of the Lys24 (in magenta) is observed, thus, this amino acid is in adequate geometry to build a salt bridge with Glu7 (in cyan), still being in its second most frequent rotamer. (*Panel C*) A view of the wild-type ChTx structure, observed from the Lys27 residue. Color codes are as in *Panel A* for the corresponding residues in the sequence alignment. (Ser10 in cyan, Lys27 in magenta). The spatial similarity of the conformations of Ser10 and Pro7 of Pi2 can be observed. (*Panel D*) Structure of the Ser-10-Asp mutant of ChTx viewed in the same orientation as in *Panel C*; color codes are also the same. The salt bridge Lys27-Asp10 presents a geometry very similar to that of the Pi3 model, thus explaining the observed decrease in affinity for the channel.

Discussion

In the present work we describe the effect of peptide toxin components Pi2 and Pi3 of the *Pandinus imperator* scorpion venom on the Kv1.3 type voltage-gated K⁺ channel of human T lymphocytes. Earlier, we published results on the effect of the whole venom on Kv1.3 channels and preliminary data on the dissociation constants characterizing three peptide components of the venom [32]. We further investigated Pi2 as it had the highest affinity among the toxins indicated by a very low disso-

ciation constant and Pi3 because of its very similar structure to Pi2.

In general, channel blockers can be pore blockers or gating modifiers. Pore blockers bind to the channel in 1:1 stoichiometry and plug the pore of the channel impeding the flow of the ionic current. Our data suggest that both Pi2 and Pi3 belong to the pore blocker family. This fact is supported by the following properties of the equilibrium block and the blocking kinetics of the compounds. The dose-response curve can be fitted well to a function describing a one channel-one blocker model

Table 2. Primary structure of Pi2, Pi3, ChTx and Ser-10-Asp mutant ChTx*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35		
Pi2	T	I	S	C	T	N	P	K	Q	C	Y	P	H	C	K	K	E	T	G	Y	P	N	A	K	C	M	N	R	K	C	K	C	F	G	R		
Pi3	T	I	S	C	T	N	E	K	Q	C	Y	P	H	C	K	K	E	T	G	Y	P	N	A	K	C	M	N	R	K	C	K	C	F	G	R		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
ChTx p	E	F	T	N	V	S	C	T	T	S	K	E	C	W	S	V	C	Q	R	L	H	N	T	S	R	G	K	C	M	N	K	K	C	R	C	Y	S
Ser-10-Asp ChTx p	E	F	T	N	V	S	C	T	T	D	K	E	C	W	S	V	C	Q	R	L	H	N	T	S	R	G	K	C	M	N	K	K	C	R	C	Y	S

* Structures were aligned in search for best similarity in the amino acid sequences of these peptides. Position of the salt bridge (indicated by connecting lines under the text) formed between the residues Asp10 and Lys27 in the Ser-10-Asp mutant of ChTx corresponds exactly to the one formed between Glu7 and Lys24 in Pi3. Disulfide bridges are indicated by the connecting lines above the sequence.

(Fig. 2A). We also investigated the wash-in and wash-out kinetics of the toxins and found that both of them follow a single exponential time course. This behavior is characteristic of first order (dissociation) and pseudo first order (association) bimolecular reactions.

We determined the dissociation constant of Pi2 from both the equilibrium block and the *on* and *off* rates of the toxin molecules binding to the channel protein. The first approach resulted in a $K_d = 44$ pM for Pi2, whereas the calculated K_d from the *on* and *off* rates was 29 pM. These data are comparable and support the 1:1 stoichiometry of Pi2 binding to Kv1.3 channels. We also determined the dissociation constant of Pi3 using both methods. The K_d of Pi3 was 795 pM according to the equilibrium method and 970 pM calculated from the *on* and *off* rates, again leading to a reasonable agreement of the results.

If the binding site of a channel blocker is deeply immersed into the electric field of the cell membrane, and the blocker is a charged particle like Pi2, the block may show voltage dependence. The whole soluble venom of scorpion *Pandinus imperator* showed highly voltage-dependent block on voltage-gated K^+ channels of nerve fibers [29]. Our experiments, however, did not show voltage dependence of the block by Pi2 and Pi3 on voltage-gated K^+ channels of human T lymphocytes, although both toxins were positively charged pore blockers of the channels. This is not surprising if we consider the time course of channel activation and the *on* and *off* rates of the block. The time needed to reach the peak of the current depends on the amplitude of the test pulse but it is always in the msec range. *On* and *off* rates determined experimentally were in the order of seconds. The block of Kv1.3 channels by Pi2 and Pi3 may be voltage dependent although this fact is not seen in our results, where we determined the remaining fractions of the K^+ current from the peak amplitudes measured at different test potentials. It can be assumed that the peak of the current is reached much faster during a test pulse than the

time necessary for the development of a new equilibrium of block at the currently applied test potential. Indeed, Goldstein and Miller studied the voltage dependence of current block by several low affinity mutants of ChTx (*e.g.*, Y36A) having high *off* rate. The voltage dependence of block in those cases could be determined from equilibration of block during a single depolarizing pulse [13].

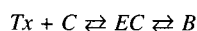
The only difference between Pi2 and Pi3 is the presence of a negatively charged amino acid in Pi3 (Glu7), resulting in an 18-fold increase of the K_d as determined from the equilibrium block of the channels. The analysis of blocking kinetics of Kv1.3 channels isolated that the 17-fold decrease of Pi3 *on* rate was primarily responsible for the increase of K_d , since the change of the *off* rate was negligible (only 2-fold increase over Pi2). The minimal increase of Pi3 *off* rate indicates that the Pro to Glu change did not alter the steric interactions between the channel and the toxin [12]. This means that steric hindrance for binding to Kv1.3 was not generated by the amino acid substitution.

At the same time, the Pro-7-Glu mutation in Pi3 results in a decrease in the net positive charge of the toxin, which might influence the long-range electrostatic interaction between the channel and the toxin. Several authors discussed previously the importance of through-space electrostatics in toxin binding by introducing charge neutralization or charge reversal mutations either in the channel vestibule or in the toxin [10, 12, 22, 25, 31]. Simple electrostatics predicts that charge alterations should be manifested in the association rate of the toxin. Indeed, mutations decreasing the net charge of ChTx [12, 31] and Iberitoxin [25] decreased the toxin *on* rates. Similarly, substituting acidic residues for neutral or basic ones near the toxin binding site (position 422 in *Shaker*) also decreased the association rate of ChTx [12] and toxin Lq2 [10]. Our experiments showed that the association (*on*) rate of Pi3 (bearing net 6 positive charges)

was 17-times smaller than that of Pi2 (bearing net 7 positive charges), while the *off* rates were comparable (Table 1). So far our results are compatible with the predictions from through-space electrostatics. This model, however, also predicts that (i) increasing the ionic strength of the recording solution should decrease the association rate of the toxins, and (ii) the ionic strength dependence of the association rate should be more pronounced for Pi2 (+7 charges) as compared to Pi3 (+6 charges). Our results showed that the *on* rate of both Pi2 and Pi3 was reduced when the ionic strength was raised (Table 1). At the same time, the association rate of Pi2 and Pi3 was equally sensitive to the ionic strength of the medium, the 1.4-fold increase in the ionic strength resulted in a 32-fold decrease in the association rate of both toxins. These results pointed out that through-space electrostatics is an important factor for toxin binding but glutamic acid residue at position 7 in Pi3 does not contribute significantly to the overall long-range electrostatic interaction, similarly to ChTx mutations studied by Park and Miller [31]. Thus, through-space electrostatics can not account for the decreased association rate of Pi3.

So what can be the explanation for the reduced *on* rate of Pi3? To answer this question the model of the three-dimensional structure of Pi3 was generated based on the parameters obtained from NMR spectroscopy data of Pi2. This model showed that glutamic acid in position 7 (Pi3) is likely to form a salt bridge with Lys24. Lys24 of Pi2 and Pi3 is at the equivalent structural position of Lys27 in ChTx that is essential for toxin binding to K⁺ channels. To examine the effect of the salt bridge between Glu7 and Lys24 we applied the analysis of non-diffusion-limited bimolecular toxin-channel interactions used by Escobar et al. [10] and Mullmann et al. [25]. This approach considers a two-step reaction for toxin binding (Scheme 1). The first step includes diffusion of the toxin (*Tx*) up to and away from the encounter complex (*EC*). This step accounts for the local electrical potential and ionic strength dependence of the association rate (*see above*, Table 1, Eqs. 6 and 7 in Escobar et al. [10]). The *EC* represents an infinite number of possible contact orientations formed between the toxin (*Tx*) and the channel (*C*) from which the bound state of the toxin (*B*) is formed in the second step. In nondiffusion controlled reactions this second step is the rate-limiting and might include the rearrangement of amino acid side chains, formation of hydrogen bonds and squeezing water molecules and cations out of the vestibule to form the tightly bound (nonconducting) toxin:channel complex.

Scheme 1:



The second (binding) step would allow specific short-range electrostatic interactions between specific basic residues on the toxin and cations in the vestibule. Accordingly, Mullmann et al. [25] argued that neutralization of Lys27 and Arg34 reduces the ability of IbTx mutants to repel cations from the vestibule, which would account for the 10- to 20-fold slower association rate of Lys-27-Gln, Lys-27-Asn and Arg-34-Asn mutants. Our results are similar to these data both qualitatively and quantitatively (Table 1). Thus, our interpretation of the reduced *on* rate of Pi3 is that the intramolecular salt bridge formed between Glu7 and Lys24 reduces local positive electrostatic potential around Lys24 resulting in decreased short-range electrostatic interactions during the binding step. This might lead to a decreased association rate by a similar mechanism to the one described above for IbTx mutants.

The ϵ -amino group of Lys-27 in ChTx protrudes slightly into the K⁺ conduction pore, where it interacts with conducting ions [13]. Does the salt bridge between Lys24 and Glu7 break up during the binding step to allow Lys24 to interact freely with the ion channel? The overall free energy change calculated for the binding of Pi2 and Pi3, based on the K_d , k_{ON} and k_{OFF} values obtained is 58.5 kJ/mol for Pi2 and 51.4 kJ/mol for Pi3. The difference is in the order of 7 kJ/mol, a value that is not enough to break a salt bridge (approx. 15 kJ/mol). This means that besides the salt bridge, other interactions are implicated in the overall free energy change observed, either through the interaction of the carboxylate of the glutamic acid with some other residues in the channel, or even with the formation of hydrogen bonds or van der Waals interactions between residues of the toxin and the channel. The overall free energy change due to these interactions may easily compensate for the free energy change during the breaking of the salt bridge. It is certainly true that the overall free energy change for Pi2 is higher than Pi3 and thus it goes into the right direction of the expected results, assuming our proposition of salt bridge formation in Pi3 and its breaking during the interaction of the toxin with the channel.

The influence of salt bridge formation on binding of Pi3 to Kv1.3 is further substantiated by a comparison of the present problem to the binding of a ChTx mutant to a similar ion channel, the *Shaker* K⁺ channel [12]. A considerable difference between the affinity of the wild-type ChTx and its Ser-10-Asp mutant has been observed to the *Shaker* K⁺ channel. According to the sequence alignment in Table 2 positions 7 and 24 in Pi2 correspond to positions 10 and 27 in ChTx, respectively. Mutation of Ser to an acidic residue (Asp) in position 10 of ChTx resulted in a 1,500-fold increase in the equilibrium dissociation constant for the *Shaker* channel [12]. At the same time the 3D molecular modeling performed by us

pointed out the existence of a salt bridge between the Asp10 and Lys27 positions in the Ser-10-Asp mutant ChTx that is similar to the salt bridge between corresponding positions in Pi3. Thus, a similar mechanism, as discussed above for Pi3, can account for the observed high K_d of the Ser-10-Asp mutant ChTx [12].

Our salt bridge hypothesis is strongly supported by a recent paper in which the three-dimensional structure of Pi3 was determined by NMR spectroscopy and compared to that of Pi2 [16]. They determined that the overall folding pattern of Pi3 was very similar to Pi2. In addition, a salt bridge between Glu7 and Lys24 of Pi3 was described. Based exclusively on NMR spectroscopy data the authors attributed the reduced affinity of Pi3 to the intramolecular salt bridge between Glu7 and Lys24 [16]. Although both our results and the results of Klenk et al. support the idea that the salt bridge between Glu7 and Lys24 explains the lowered affinity of Pi3 for the Kv1.3 channel, in the absence of toxin docking models, we can not exclude the possibility that the two toxins bind with slightly different geometry to the Kv1.3 turret and pore.

Since our three-dimensional models of Pi2, Pi3 and ChTx showed the possibility of salt bridge formation between acidic residues of position 7–10 with the lysine in position 24–27, we looked into the literature for other homologues. Recently, a paper by Tytgat et al. [37] proposed a generalized nomenclature for K-scorpion toxin subfamilies, and listed 49 complete amino acid sequences (now 50, see ref. [5]). Examination of all these peptides suggests that none of them (except Pi3) would qualify for such salt bridge formation. The only other two toxins with acidic residues around residue 10 are two novel toxins, PBTX1 and PBTX2 purified from scorpions of the genus *Parabuthus* of South Africa [38]. These toxins belong to subfamily 11 and were reported to have a low affinity for K⁺-channels, however they contain a valine in the position 26 (equivalent to Lys27 of ChTx), which would make impossible a salt bridge formation in this spatial location.

Dauplais et al. [6] reported recently that structurally unrelated highly specific potassium channel inhibitor toxins possess an essential dyad consisting of a critical Lys and a neighboring aromatic residue separated by ~7 Å. According to the sequence alignment in Table 2, Lys24 and Phe33 qualify for that dyad in Pi2 and Pi3. Our molecular models in Fig. 5 show the close position of the corresponding residues on the contact surface of both Pi2 and Pi3. The calculated distance between the C_α carbon atoms of Lys24 and Phe33 is 7.9 Å which is in a good agreement with the distance (6.6 ± 1 Å) between C_α of the critical Lys and the center of the benzene rings of the neighboring tyrosines in toxins BgK and ChTx [6]. Thus, Pi2 and Pi3 contain the conserved critical residues for potassium channel blocking.

Recently, we found that the whole soluble venom of the scorpion *Pandinus imperator* accelerates the recovery from inactivation of Kv1.3 channels [32]. We investigated the same effect for purified Pi2, which is the most effective peptide component of the *Pandinus imperator* venom on Kv1.3 channels. We found that Pi2 accelerates the recovery from inactivation of Kv1.3 channels. This means that the toxin remains bound to the inactivated channel and destabilizes this conformation. The ability of Pi2 to speed up the recovery from inactivation of Kv1.3 channels is remarkable.

The kinetics of dissociation of Pi2 and Pi3 from Kv1.3 is relatively fast, the characteristic time constants are ~180 and 58 sec, respectively. The fast dissociation provides that during the recovery process substantial number of on-off reactions take place to account for the enhanced recovery from inactivation measured in the presence of Pi2. We compared the ability of Pi2 and Pi3 to speed up the recovery from inactivation of human lymphocyte voltage-gated K⁺ channel, Kv1.3. Recovery from inactivation is enhanced by Pi2, but not by Pi3. This means that the single amino acid difference between the two toxins affects the ability of enhancing the recovery rate of Kv1.3. We do not know yet the nature of molecular interactions responsible for this difference. Due to the complexity of C-type inactivation and recovery several mechanisms might be involved [28]. For example toxins bound to the channel pore might alter diversely the extracellular K⁺ modulatory site of recovery from inactivation [19, 20].

In conclusion, we described the effects of two potent and closely related peptide toxins on the Kv1.3 channels in human T lymphocytes and gave an explanation for the observed differences in their channel blocking ability and binding kinetics on the basis of the differences in their 3D structures and by comparing them to structurally related ChTx mutants. Due to its remarkably low dissociation constant of 44 pM, Pi2 may provide a good model for developing a nonpeptide drug that could be used to achieve an immunosuppressive effect by specifically blocking human lymphocyte voltage-gated K⁺ channels.

The authors thank Dr. Vilmos Gáspár for the valuable discussions on the energetics of binding. This work was supported by grants ETT T05/102/2000, OTKA T029947 and FKFP 327/2000 to R.G., OTKA T23873 and T30411 to S.D., FKFP 622/2000, OTKA F035251 and US-Hungarian Joint Fund JFNo.542 to G.P. and grant (75197-527107) from the Howard Hughes Medical Institute to L.D.P. The technical assistance of M.Sc. Timoteo Olamendi-Portugal is greatly acknowledged.

References

1. Aiyar, J., Withka, J.M., Rizzi, J.P., Singleton, D.H., Andrews, G.C., Lin, W., Boyd, J., Hanson, D.C., Simon, M., Dethlefs, B., Lee, C., Hall, J.E., Gutman, G.A., Chandy, K.G. 1995. Topology

- of the pore-region of a K⁺ channel revealed by the NMR-derived structures of scorpion toxins. *Neuron* **15**:1169–1181
2. Bontems, F., Gilquin, B., Roumestand, C., Menez, A., Toma, F. 1992. Analysis of side-chain organization on a refined model of charybdotoxin: structural and functional implications. *Biochemistry* **31**:7756–7764
 3. Cahalan, M.D., Chandy, K.G. 1997. Ion channels in the immune system as targets for immunosuppression. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**:749–756
 4. Chandy, K.G., Decoursey, T.E., Cahalan, M.D., McLaughlin, C., Gupta, S. 1984. Voltage-gated potassium channels are required for human T lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* **160**:369–385
 5. D'Suze, G., Zamudio, F., Gomez Lagunas, F., Possani, L.D. 1999. A novel K⁺ channel blocking toxin from Tityus discrepans scorpion venom. *FEBS Lett.* **456**:146–148
 6. Dauplais, M., Lecoq, A., Song, J., Cotton, J., Jamin, N., Gilquin, B., Roumestand, C., Vita, C., de Medeiros, C.L.C., Rowan, E.G., Harvey, A.L., Menez, A. 1997. On the Convergent Evolution of Animal Toxins. *J. Biol. Chem.* **272**:4302–4309
 7. Delepierre, M., Prochnicka Chalufour, A., Possani, L.D. 1997. A novel potassium channel blocking toxin from the scorpion *Pandinus imperator*: A 1H NMR analysis using a nano-NMR probe. *Biochemistry* **36**:2649–2658
 8. Deutsch, C., Krause, D., Lee, S.C. 1986. Voltage-gated potassium conductance in human T lymphocytes stimulated with phorbol ester. *J. Physiol.* **372**:405–423
 9. Deutsch, C., Price, M., Lee, S., King, V.F., Garcia, M.L. 1991. Characterization of high affinity binding sites for charybdotoxin in human T lymphocytes. Evidence for association with the voltage-gated K⁺ channel. *J. Biol. Chem.* **266**:3668–3674
 10. Escobar, L., Root, M.J., MacKinnon, R. 1993. Influence of protein surface charge on the bimolecular kinetics of a potassium channel peptide inhibitor. *Biochemistry* **32**:6982–6987
 11. Gáspár, R., Panyi, G., Krasznai, Z., Ypey, D.L., Vereb, Gy., Pieri, C., Damjanovich, S. 1994. Effects of bretylium tosylate on voltage-gated potassium channels in human T lymphocytes. *Mol. Pharmacol.* **46**:762–766
 12. Goldstein, S.A., Pheasant, D.J., Miller, C. 1994. The charybdotoxin receptor of a *Shaker* K⁺ channel: peptide and channel residues mediating molecular recognition. *Neuron* **12**:1377–1388
 13. Goldstein, S.A., Miller, C. 1993. Mechanism of charybdotoxin block of a voltage-gated K⁺ channel. *Biophys. J.* **65**:1613–1619
 14. Gomez-Lagunas, F., Olamendi-Portugal, T., Zamudio, F.Z., Possani, L.D. 1996. Two novel toxins from the venom of the scorpion *Pandinus imperator* show that the N-terminal amino acid sequence is important for their affinities towards *Shaker* B K⁺ channels. *J. Membrane Biol.* **152**:49–56
 15. Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W., Kjeldgaard. 1991. Improved methods for binding protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr. A.* **47**:110–119
 16. Klenk, K.C., Tenenholz, T.C., Matteson, D.R., Rogowski, R.S., Blaustein, M.P., Weber, D.J. 2000. Structural and functional differences of two toxins from the scorpion *Pandinus imperator*. *Proteins* **38**:441–449
 17. Koo, G.C., Blake, J.T., Talento, A., Nguyen, M., Lin, S., Sirotna, A., Shah, K., Mulvany, K., Hora, D., Jr., Cunningham, P., Wunderler, D.L., McManus, O.B., Slaughter, R., Bugianesi, R., Felix, J., Garcia, M., Williamson, J., Kaczorowski, G., Sigal, N.H., Springer, M.S., Feeney, W. 1997. Blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 inhibits immune responses in vivo. *J. Immunol.* **158**:5120–5128
 18. Leonard, R., Garcia, M.L., Slaughter, R.S., and Reuben, J.P. 1992. Selective blockers of voltage-gated K⁺ channels depolarize human T lymphocytes: Mechanism of the antiproliferative effect of charybdotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**:10094–10098
 19. Levy, D.I., Deutsch, C. 1996a. A voltage dependent role for K⁺ in recovery from C-type inactivation. *Biophys. J.* **71**:3157–3166
 20. Levy, D.I., Deutsch, C. 1996b. Recovery from C-type inactivation is modulated by extracellular potassium. *Biophys. J.* **70**:798–805
 21. Lin, C.S., Boltz, R.C., Blake, J.T., Nguyen, M., Talento, A., Fischer, P.A., Springer, M.S., Sigal, N.H., Slaughter, R.S., Garcia, M.L., Kaczorowski, G.J., Koo, G.C. 1993. Voltage-gated potassium channels regulate calcium-dependent pathways involved in human T lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* **177**:637–645
 22. MacKinnon, R., Miller, C. 1989. Mutant potassium channels with altered binding of charybdotoxin, a pore-blocking peptide. *Science* **245**:1382–1385
 23. Martinez, F., Munoz Garay, C., Gurrola, G., Darszon, A., Possani, L.D., and Becerril, B. 1998. Site-directed mutants of noxiustoxin reveal specific interactions with potassium channels. *FEBS Lett.* **429**:381–384
 24. Matteson, D.R., Deutsch, C. 1984. K⁺ channels in T lymphocytes: a patch clamp study using monoclonal antibody adhesion. *Nature* **307**:468–471
 25. Mullmann, T.J., Munujos, P., Garcia, M.L., Giangiacomo, K.M. 1999. Electrostatic mutations in Iberitoxin as a unique tool for probing the electrostatic structure of the Maxi-K channel outer vestibule. *Biochemistry* **38**:2395–2402
 26. Olamendi-Portugal, T., Gomez-Lagunas, F., Gurrola, G.B., Possani, L.D. 1996. A novel structural class of K⁺-channel blocking toxin from the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochem. J.* **315**:977–981
 27. Olamendi Portugal, T., Gomez Lagunas, F., Gurrola, G.B., Possani, L.D. 1998. Two similar peptides from the venom of the scorpion *Pandinus imperator*, one highly effective blocker and the other inactive on K⁺ channels. *Toxicol.* **36**:759–770
 28. Panyi, G., Sheng, Z.-F., Tu, L.-W., Deutsch, C. 1995. C-type inactivation of a voltage-gated K⁺ channel occurs by a cooperative mechanism. *Biophys. J.* **69**:896–904
 29. Pappone, P.A., Cahalan, M.D. 1987. *Pandinus imperator* scorpion venom blocks voltage-gated potassium channels in nerve fibers. *J. Neurosci.* **7**:3300–3305
 30. Pappone, P.A., Lucero, M.T. 1988. *Pandinus imperator* scorpion venom blocks voltage-gated potassium channels in GH3 cells. *J. Gen. Physiol.* **91**:817–833
 31. Park, C.S., Miller, C. 1992. Mapping function to structure in a channel-blocking peptide: electrostatic mutants of charybdotoxin. *Biochemistry* **31**:7749–7755
 32. Péter, M., Varga, Z., Panyi, G., Bene, L., Damjanovich, S., Pieri, C., Possani, L.D., and Gáspár, R. 1998. *Pandinus imperator* scorpion venom blocks voltage-gated K⁺ channels in human lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **242**:621–625
 33. Possani, L.D., Selisko, B., Gurrola Briones, G. 1999. Structure and function of scorpion toxins affecting K⁺ channels. *Perspectives in drug discovery and design* **15/16**:15–40
 34. Price, M., Lee, S.C., Deutsch, C. 1989. Charybdotoxin inhibits proliferation and interleukin 2 production in human peripheral blood lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:10171–10175
 35. Stocker, M., Miller, C. 1994. Electrostatic distance geometry in a K⁺ channel vestibule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:9509–9513

36. Tenenholz, T.C., Rogowski, R.S., Collins, J.H., Blaustein, M.P., Weber, D.J. 1997. Solution structure for Pandinus toxin K-alpha (PiTX-K alpha), a selective blocker of A-type potassium channels. *Biochemistry* **36**:2763–2771
37. Tytgat, J., Chandy, K.G., Garcia, M.L., Gutman, G.A., Martin-Eauclaire, M.F., van der Walt, J.J., Possani, L.D. 1999. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms; alpha-KTx molecular subfamilies. *Trends in Pharmacological Science* **20**:444–447
38. Tytgat, J., Debont, T., Rostoll, K., Vandenberghe, I., Desmet, F., Verdonck, F., Daenens, P., Van Beeumen, J., van der Walt, J.J. 1998. Novel scorpion K⁺ channel toxins isolated from venoms of species belonging to the *Parabuthus* genus. *Biophys. J.* **74**:A229 (Abst.)
39. Varga, Z., Bene, L., Pieri, C., Damjanovich, S., Gáspár, R.J. 1996. The effect of juglone on the membrane potential and whole-cell K⁺ currents of human lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **218**:828–832