MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

FESZÜLTSÉG-FÜGGŐ IONCSATORNÁK KAPUZÁSA ÉS KÖLCSÖNHATÁSA SKORPIÓ TOXINOKKAL

Dr. Varga Zoltán



Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

Debrecen

2017

BEVEZETÉS

A feszültség-függő kálium csatornák szerkezete és kapuzása

A feszültség-függő ioncsatornák transzmembrán fehérjék, melyek ionok szelektív és szabályozott átjuttatását valósítják meg a sejtmembránon keresztül. A membrán két oldala között mérhető feszültség, azaz a membránpotenciál, értéke határozza meg e csatornák nyitásához vezető konformáció-változás bekövetkezésének valószínűségét. A csatorna nyitását követően ionok áramlanak a membrán másik oldalára, ami viszont módosítja a membránpotenciált, így lehetőséget teremt visszacsatolásos szabályozás megvalósítására. Amennyiben a membránpotenciál új értéke elősegíti az adott csatorna nyitását, akkor pozitív visszacsatolás révén az összes csatorna gyors nyitása következik be, az adott ionra vonatkozó permeabilitás drámaian megnő és a membránpotenciál rövid időn belül az adott ion egyensúlyi potenciálját közelíti meg. Ez történik például ingerelhető sejtekben az akciós potenciál kezdeti, depolarizációs szakaszában a feszültség-függő Na⁺ (Na_V) csatornák nyitása során. Amikor viszont a membránpotenciál új értéke csökkenti a csatorna nyitási valószínűségét, negatív visszacsatolás valósul meg, ugyanis a nyitás hatására átáramló ionok a csatorna zárásához vezetnek, ami a membránpotenciál stabilizálását eredményezi, mint például a feszültség-függő K⁺ (K_V) csatornák esetén.

A feszültség-függő ioncsatornák tehát igen hatékonyan és pontosan képesek szabályozni a membránpotenciált, és ennek révén számos sejtfunkcióban vesznek részt, mint például a proliferáció, differenciáció, apopotózis, ozmo-reguláció, a sejtciklus, a hormon szekréció és a sejtek ingerelhetőségének szabályozása, továbbá az akciós potenciál sejtre jellemző tulajdonságainak meghatározása. Bár e csatornák legismertebb funkciója az idegi vezetés és az izom összehúzódás megvalósítása, nyilvánvaló, hogy a nem-ingerelhető sejtek homeosztázisához is nélkülözhetetlenek.

A membránpotenciál által kapuzott, közeli rokonságot mutató K⁺, Na⁺ és Ca²⁺ csatornák mellett ismertek feszültség-függő Cl⁻ és H⁺ csatornák is, ezek azonban szerkezetileg jelentősen eltérnek az előbbi háromtól. E számos csatorna típus közül munkám során K_V és Na_V csatornákat tanulmányoztam, így az alábbiakban ezeket taglalom részletesebben.

A K_V, Na_V és Ca_V csatornák nagyfokú szerkezeti és funkcionális hasonlóságot mutatnak. A K_V csatornák négy, egyenként hat transzmembránból álló hélixet tartalmazó alegység (~ 600 aminosav) nem-kovalens összekapcsolódásából állnak össze, míg az Na_V és Ca_V csatornák egyetlen folytonos polipeptid láncból állnak (~2000 aminosav), melyek négy, a K_V csatornák egy-egy alegységének megfelelő, szintén hat transzmembrán hélixből álló, domént tartalmaznak.

A feszültség-függő káliumcsatornákat kódoló gének terméke egy csatorna-alegység ($K_v 1.x-K_v 12.x$), melyből négy szerelődik össze a funkcionális csatorna létrehozásához. Egy adott sejtben több féle Kv csatorna is kifejeződhet, ahol az egy családba tartozó alegységek homo-, vagy heteromultimereket alkothatnak. Adott csatorna biofizikai paramétereit a multimer alegység összetétele és az esetleges járulékos alegységek pl.: $K_v\beta$ fehérjék jelenléte befolyásolhatják. A K_v csatornákat tehát négy, azonos családba tartozó alegység alkotja, melyek elrendeződése szimmetrikus az általuk létrehozott pórus körül. Minden alegység 6 transzmembrán α -helikális szegmensből és az azokat összekötő intra- és extracelluláris hurkokból tevődik össze. A csatorna ionvezetésért felelős pórus doménjét (PD) az 5. és 6. transzmembrán szegmensek (S5 és S6) közötti extracelluláris hurkok valamint az S6 szegmensek egyes részei együttesen hozzák létre. A csatorna ugyanezen régiójához kötődik a Kv csatornák számos peptid és kis-molekula gátlószere is. A pórusrégió tartalmazza a K⁺ szelektivitást biztosító különösen konzervatív szelektivitási szűrő (GYGD) szekvenciát is, melyen a dehidrált K⁺ ionok egyesével haladhatnak át. A szelektivitási szűrő az intracelluláris oldalon az aktivációs kapu zárja le. A csatornák pórusa négy szekvenciális K⁺ kötőhelyet tartalmaz, valamint egy extracelluláris rehidrációs/dehidrációs kötőhelyet is.

A Kv csatornákban a membránpotenciál változásait a csatorna feszültség-szenzor doménje (VSD) érzékeli, mely az S1-S4 hélixeket foglalja magában. Ezen belül is különös jelentősége van a több pozitív töltést hordozó S4 hélixnek, melynek elmozdulását indukálja a membrán depolarizációja, és miután a VSD konformáció-változása csatolás (coupling) révén áttevődik a PD-re, a csatorna aktivációs kapuja megnyílik. A két domén mozgásának független és egyidejű megfigyelését lehetővé tevő technika a feszültség-zár fluorometria (Voltage-Clamp Fluorometry): az ionáramokat két-elektródás feszültség-zárral mérhetjük, míg a VSD mozgását egy, az abba mutációval behelyezett ciszteinhez reagenssel kapcsolt fluorofór jelével követhetjük nyomon. A membránpotenciál-változás hatására az S4-ben elmozduló töltések hozzák létre a mérhető "kapuzási áramot", melynek kinetikája jellemzi a kapuzási konformáció-változásának sebességét, integrálja, a "kapuzási töltés" pedig az elmozduló töltés mennyiségével és a csatornák számával arányos.

Hosszan tartó depolarizáció esetén a Kv csatornák egy nem-vezető inaktivált állapotba léphetnek, mely az ún. A-típusú áramot létrehozó csatornáknál az intracelluláris oldalon történik gyors N-típusú inaktiváció révén. Sok Kv csatornánál létezik egy másik mechanizmusú, ún. C-típusú, lassabb inaktivációs mechanizmus, mely a szelektivitási szűrőben, a pórus extracelluláris végén gátolja meg az ionáramlást. Ennek sebességét a pórus kijáratánál található aminosavak, az oldatok ionösszetétele és pH-ja, valamint gátlószerek is erősen befolyásolhatják.

A Kv1.3 szerepe T sejtekben

A Kv csatornák legismertebb funkciója az ingerelhető sejtekben az akciós potenciál repolarizációs fázisának létrehozása, de számos nem-ingerelhető sejtben vesznek részt kritikus sejtfunkciókban, mint például a sejt proliferációban.

A T-sejtek specifikus antigénekkel történő találkozását klonális proliferáció követi, mely során az osztódó sejtek effektor memória, vagy hosszú életű centrális memória sejtekké differenciálónak, biztosítva az immunrendszer adaptivitását. Az antigén felismerését a TCR/CD3 receptor komplex biztosítja, mely olyan intracelluláris jelátviteli kaszkádot indít el, melynek eredménye az

³

intracelluláris szabad kalciumkoncentráció kétfázisú megemelkedése. Először az intracelluláris hírvivő, inozitol trifoszfát (IP₃) szabadul fel, melynek hatására az intracelluláris kalciumraktárak ürülnek az endoplazmás retikulum membránjában található IP₃ receptorokon keresztül. Ezt követően további Ca²⁺ ionok áramlanak a sejtbe az extracelluláris térből a plazmamembránban található, Ca²⁺ felszabadulás-függő CRAC csatornákon (Calcium Release Activated Channels) keresztül.

A megemelkedett intracelluláris Ca^{2+} koncentráció hatására a sejtekben osztódáshoz, illetve differenciálódáshoz szükséges gének aktiválódnak. A kalcium beáramlása a sejtmembránt depolarizálja, mely nem kedvez a hosszan tartó Ca^{2+} jel kialakulásának. Ezt a depolarizáló hatást küszöbölik ki a plazmamembrán káliumcsatornái, melyeken keresztül kiáramló K⁺ ionok az osztódáshoz szükséges negatívabb membránpotenciált stabilizálják. A T-sejtekben kifejeződő K⁺ csatornák a feszültség-függő Kv1.3, illetve a kalcium-függő K_{Ca}3.1. A káliumcsatornák blokkolásával a sejtek depolarizálódnak, ennek következtében aktivációjuk nem megy végbe.

A különböző funkciójú T-sejteken a feszültség- és kalcium-függő káliumcsatornák eltérő arányban expresszálódnak. Számos autoimmun megbetegedés tüneteinek kialakításában az effektor memória T-sejtek játszanak döntő szerepet. Az aktivált effektor memória T-sejtek a feszültség-függő Kv1.3 csatornákat nagy számban, míg az KCa3.1 csatornákat kis mértékben fejezik ki, így esetükben a Kv1.3 a meghatározó eleme a membránpotenciál stabilizálásának, ami szükséges feltétele az aktivációs program teljesülésének. A naiv és a centrális memória T-sejtek plazmamembránjának meghatározó káliumcsatornája a K_{Ca}3.1, mely mellett csak kis mennyiségben fordul elő a Kv1.3. Ebből következik, hogy a Kv1.3 gátlásával a T_{EM} sejtek aktivációja szelektíven gátolható, ezért a specifikus Kv1.3 gátlószerek az autoimmun megbetegedések terápiájának új lehetőségét hordozzák magukban. E lehetőség bizonyítékául szolgálnak azon autoimmun betegségek állatmodelljei, melyekben sikerrel alkalmaztak Kv1.3 gátlószereket a betegség tüneteinek enyhítésére.

A Kv csatornákat gátló peptid skorpió toxinok

Számos, állatok mérgeiből izolált peptid-toxin ismert, melyek különböző ioncsatornák, köztük a feszültség-függő K⁺ csatornák nagy affinitású gátlószereinek bizonyultak. A peptid-csatorna interakció során a toxinok a csatornák extracelluláris régiójához kötődve eltömítik annak pórusát, ennek következtében megakadályozzák a csatornán keresztüli ionáramlást. A kálium csatornákat gátló peptid skorpió toxinokra jellemző, hogy 35-39 aminosav hosszúságúak, egy α -hélixet és egy β -lemezt tartalmaznak, a szerkezetet pedig 3-4 diszulfid híd rögzíti. Többségük tartalmaz egy két, általában egymástól 9 pozíciónyira elhelyezkedő "esszenciális diádnak" nevezett aminosav párt, mely meghatározó jelentőségű az affinitás és szelektivitás szempontjából. Ezek egyike egy ("centrális") lizin, melynek oldallánca benyúlik a csatorna szelektivitási szűrőjébe a gátlás során, a másik pedig jellemzően egy aromás aminosav, többnyire tirozin.

A feszültség-kapuzott káliumcsatornák nagyfokú szekvencia-homológiával rendelkeznek, ezért az izolált természetes toxinok sokszor kis szelektivitással bírnak, azaz több, különböző ioncsatornát is

blokkolhatnak, eltérő affinitással. Mivel a szervezet különböző szöveteiben, legfőképp az ingerelhető sejtekben a Kv csatornák szerepe kulcsfontosságú a sejtek működéséhez, a nem szelektív gátlószerek terápiás alkalmazása akár súlyos mellékhatásokkal is járhat.

In vitro és *in vivo* kísérletek is kimutatták a Kv1.3 gátlószerek hatékonyságát és potenciális terápiás alkalmazhatóságát. Mivel valóban szelektív, nagy affinitású természetes gátlószerek ritkán izolálhatók, irányított mutációk révén lehetséges javítani a toxinok farmakológiai tulajdonságait. A megfelelő mutációk tervezéséhez elengedhetetlen a toxin-csatorna interakció minél részletesebb ismerete, melyhez az újonnan izolált skorpiótoxinok szerkezetének meghatározása és farmakológiai karakterizálása is segítséget nyújthat.

Motiváció a Kv csatornák kapuzási mechanizmusának és a csatorna-toxin kölcsönhatás részleteinek megismerésére

A fentiek alapján látható, hogy a szervezet legkülönbözőbb sejtjeiben előforduló Kv csatornák a sejtek alapvető funkcióit, és így szövetek vagy akár szervek tulajdonságait képesek befolyásolni. Kritikus tehát megérteni a kapuzás történéseit molekuláris szinten, és azt, hogy ezen a szinten hogyan hat kölcsön a csatornafehérje az olyan környezeti tényezőkkel, melyek e történéseket módosíthatják. Ilyen tényezők például a tumorok környezetében, vagy gyulladásos területeken a fiziológiás értékektől jelentősen eltérő lokális ionkoncentrációk és pH.

A terápiás alkalmazással kecsegtető peptid toxinok csatornákkal kialakított kölcsönhatásának részleteit ismerve lehetőség nyílik a kölcsönhatást a kívánt irányba módosítani például az affinitás vagy a szelektivitás javításának érdekében. Ilyen irányú kutatási eredményeink hozzájárulhatnak a peptid toxinok jövőbeni terápiás célú felhasználásának elősegítéséhez, illetve az újabb nagy affinitású és szelektív Kv1.3 gátlószerek tervezésének sikerességéhez.

A feszültség-függő Na⁺ ioncsatornák kapuzása

Bár Na⁺ ionokat sok különböző családba tartozó ioncsatorna képes átengedni, igen kevés olyan csatorna ismert, mely nagy Na⁺-szelektivitással bír. Ingerelhető sejtekben az akciós potenciálok kiváltásában szerepet játszó ligand-kapuzott neurotranszmitter receptor csatornák, mint például a nikotinos acetilkolin-receptor vagy az N-metil-D-aszpartát receptor, nem-szelektív kationcsatornák, melyek alegység-összetételük függvényében a Na⁺ mellett jellemzően K⁺ és / vagy Ca²⁺ ionokra is permeábilisak, így nem tekinthetők Na⁺ csatornáknak. Hasonlóképpen Na⁺-permeábilisak, de nem szelektívek az érzékszervek jelátvitelében is szerepet játszó ciklikus nukleotidok által kapuzott csatornák, és az endo-lizoszómális rendszerben expresszálódó két-pórusú csatornák sem. Az alábbiakban a nagy szelektivitású feszültség-függő Na⁺ csatornákat mutatom be.

Feszültség-függő Na⁺ csatornák (Na_V)

Ez a legkorábban azonosított, és legjobban tanulmányozott Na⁺-szelektív ioncsatorna család, mely kilenc tagjának közismert funkciója az akciós potenciál felszálló szárának kialakítása. Szinte minden ingerelhető sejt membránjában megtalálhatók e csatornák, melyeket az egyesített nomenklatúra alapján Nav1.1-1.9-nek nevezünk. Az Nav1.1-1.3 és 1.6 csatornák elsősorban a központi idegrendszer neuronjaiban fejeződnek ki, de megtalálhatók perifériás neuronokban is, míg a Nav1.7-1.9 csatornák szinte kizárólag a perifériás idegrendszer neuronjaiban expresszálódnak. Az Nav1.4 a vázizom, az Nav1.5 pedig a szívizom feszültség-függő Na⁺ csatornája. Az Nav csatornák jól ismert gátlószere a gömbhalban is megtalálható tetrodotoxin (TTX), mely erős neurotoxin, ami már 8 µg/ testsúly kg koncentrációban is halált okozhat. Az Nav csatornákat a TTX által okozott gátlás félhatásos koncentrációja alapján (IC50) TTX-érzékeny és TTX-rezisztens csatornákra oszthatjuk. A TTX mellett számos, Nav csatornák működését módosító peptid toxin is ismert, melyek a csatorna különböző strukturális elemeihez kötődhetnek, és a Kv csatorna-gátló skorpiótoxinokkal ellentétben az egyszerű pórusblokkon túl a kapuzást is erősen módosíthatják. Igen fontos, a klinikai gyakorlatban is alkalmazott gátlószer csoportot jelentek a helyi érzéstelenítők, melyek legismertebb képviselője a lidokain. E vegyületek a Nav csatornák gátlásán keresztül gátolják az akciós potenciál kialakulását, és így az idegi vezetést.

A feszültség-függő Na⁺ csatornák szerkezeti sajátságai és kapuzása

A funkcionális Nav csatornák egyetlen pórusformáló α -alegységből állnak, melyhez egy vagy több β -alegység csatlakozhat. Az α -alegység négy homológ, hat transzmembrán hélixet tartalmazó doménből áll (DI-DIV), melyek a Kv csatornák egy-egy alegységeinek felelnek meg. Ezen domének működése azonban messze nem olyan szimmetrikus, mint egy homotetramer Kv csatorna alegységei esetén, egyedi funkcióik vannak a kapuzási lépések során. A csatornák szelektivitási szűrőjét a Kv csatornákhoz hasonlóan a négy domén S5 és S6 szegmensei közötti pórushurkok együttesen alakítják ki, mindegyik domén egy-egy aminosav oldallánccal hozzájárulva a DEKA szekvenciájú szűrőhöz. A pórus további részét az S6 szegmensek határolják, és ezek alakítják ki a pórus intracelluláris oldalán az aktivációs kaput.

Az Nav csatornákra jellemző az aktivációt rövid időn belül követő gyors inaktiváció, mely szorosan kontrollálja a sejtbe áramló Na⁺ ionok mennyiségét. A gyors inaktivációt egy, a III-as és IV-es domént összekötő intracelluláris hurkon elhelyezkedő, három aminosavból álló IFM-motívum hozza létre a pórus intracelluláris oldalához bekötődve és elzárva az ionáramlás útját.

Depolarizáció során a DI-DIII feszültségszenzorok elmozdulása kinyitja a csatorna pórusát, majd a lassabb kinetikájú DIV elmozdulása olyan konformáció-változást eredményez a pórus belső vége körül, hogy kialakul egy "második nyitott állapot", s ezzel a nagy affinitású kötőhely az IFM-motívum számára. Ingerelhető sejtekben a gyors inaktiváció következtében alakul ki az abszolút refrakter periódus, mely alatt nem képződhet újabb akciós potenciál a Na⁺ beáramlás hiánya miatt.

Az inaktiváció során kialakul a Kv csatornáknál is megfigyelhető kapuzási töltés immobilizáció, amit az inaktivációs IFM-motívum és a VSD-k között fellépő kölcsönhatás okoz. Patkány izom Nav csatornán azt találták, hogy a repolarizáció során lassan visszatérő töltés a DIII- és DIV-VSD-k IFM által akadályoztatott visszatéréséből származik, míg a gyorsan visszatérő hányad a DI- és DII-VSD-k töltését jelenti. Ezzel szemben humán Nav1.5 csatornákon csak a DIII-VSD szerepét mutatták ki az inaktiváció által okozott lassú töltés visszatérésben, míg a DIV-VSD visszatérését attól függetlennek találták. Az irodalmi adatok alapján tehát az inaktivációs mechanizmusok kölcsönhatása a feszültség-függő ioncsatornák általános tulajdonságának tekinthető, de a kölcsönhatás részletei csatornánként változhatnak, így egyedi kapuzási modellek lehetnek szükségesek még azonos családba tartozó csatornák esetén is.

Nav1.5, a szív feszültség-függő Na⁺ csatornája

A szív kamrai és pitvari akciós potenciáljait jelentős, depolarizációt okozó Na⁺ beáramlás indítja el a feszültség-függő Nav1.5 csatornákon keresztül. A csatorna a TTX-rezisztens csoportba tartozik, amiért a pórusban található C373 aminosav felelős, ugyanis a C373Y mutáció TTX-érzékennyé változtatja a csatornát. Az akciós potenciál kialakításában betöltött központi szerepe miatt az olyan molekuláris szintű kölcsönhatások, melyek interferálnak az Nav1.5 működésével, könnyen vezethetnek aritmiák kialakulásához. Az Nav1.5 mutációi 3-as típusú hosszú QT szindrómát (LQT3), Brugada-szindrómát, Sick Sinus szindrómát és pitvari fibrillációt okozhatnak. Sok esetben a mutációk az inaktiváció folyamatát befolyásolják: LQT3 betegekben a csökkent inaktiváció funkciónyeréses változást okoz, azaz fokozódik a Na⁺ beáramlás és ezzel megnyúlik az akciós potenciál, míg Brugada-szindróma esetén gyakran a felgyorsult inaktiváció okoz funkció-vesztés miatt csökkent Na⁺

Motiváció a hNav1.5 csatorna kapuzásának molekuláris szintű megértéséhez

Az I-es típusú antiaritmiás szerek (pl. lidokain vagy flekainid) az Nav1.5 csatornán keresztül hatnak, és hatásmechanizmusuktól függően különböző típusú aritmiák kezelésére alkalmasak. E csatorna kapuzásának molekuláris szintű ismerte kritikus a potenciálisan életet is veszélyeztető betegségek kialakulásának megértéséhez, valamint a célzott terápiában alkalmazható gátlószerek hatásmechanizmusának finomhangolásához.

A Voltage-Clamp Fluorometry (VCF) technika meghonosítása

A feszültség-függő ioncsatornák egyszerű molekuláris kapcsolóként működnek a membránpotenciál változásának függvényében, de ezt a funkciót számos faktor módosíthatja. Ennek a "finom szabályozásnak" a megismeréséhez a klasszikus biofizikai módszereket (pl. patch-clamp, két elektródás voltage-clamp) ki kell egészíteni olyan funkcionális szerkezetvizsgáló módszerekkel,

melyek segítségével valós időben követhetők a szerkezeti átalakulások, felderíthető a funkcionális domének közötti kommunikáció. Így lehetőség nyílik olyan fundamentális események megértésére, mint a feszültség-szenzor átrendeződése és a csatornák aktivációs/inaktivációs kapui közötti kommunikáció vagy a lassú inaktivációból történő visszatérés molekuláris történései. Ez utóbbiak pedig a celluláris neurobiológiai rendszerek és neuronhálózatok finomhangolása szempontjából olyan fontos jelenségeket befolyásolnak, mint az akciós potenciálok alakjának és a Ca²⁺ jeleknek a változása repetitív akciós potenciál tüzelés során.

Amerikai tanulmányutam során elsajátítottam a feszültség-zár fluorometria (Voltage-Clamp Fluorometry = VCF) technikát, mely éppen ilyen jellegű többlet információt szolgáltat. A VCF egy hatékony elektrofiziológiai módszer, melyet a világon csak néhány tucat, itthon pedig – tudomásunk szerint – rajtunk kívül egyetlen laboratórium sem alkalmaz. E módszer előnye, hogy egyidejűleg vizsgálható az ioncsatornákon átfolyó áram hagyományos két-elektródás feszültségzárral mérve, valamint a feszültség-kapuzott csatornák feszültség-szenzorához vagy a pórusformáló részhez kapcsolt fluoreszcens festék jelével e domének mozgása. Ezáltal információt nyerünk ugyanazon csatorna-populáció pórusának és feszültség-szenzorának kapuzási állapotáról, követhető e domének kapuzási kinetikája, és következtetéseket lehet levonni a két domén közötti csatolásról.

Mivel munkacsoportunk egy másik tagja is a VCF technika segítségével vizsgált egy új feszültség-érzékeny fehérjét egy amerikai laboratóriumban, és e munkáját ő is folytatni kívánta hazatérése után, célunk volt létrehozni egy VCF mérőállomást a hozzá tartozó infrastruktúrával együtt, hogy eszköztárunkat bővítsük, és kutatásainkat új irányokba fordíthassuk.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során az alábbi kérdésekre kerestem a választ, illetve célokat tűztem ki a feszültség-függő K⁺ és Na⁺ csatornákkal kapcsolatban:

- Milyen összefüggés van a feszültség-szenzor domén mozgása és a pórus záródása között a Kv csatornák hiperpolarizáció alatt létrejövő záródása során, és hogyan módosítják ezt különböző permeabilitású kationok?
- Hogyan módosítja a Kv csatornák kapuzását az intra- és extracelluláris pH csökkentése, és mi ezen változások molekuláris alapja?
- Milyen molekuláris mechanizmus állhat annak a megfigyelésnek a hátterében, hogy a pH csökkentésére a Kv1.3 csatorna inaktivációja a többi Kv csatornával ellentétes választ mutat?
- Új, skorpió méregből izolált, Kv1.3 csatornát gátló peptid toxinok felkutatása, valamint azok biofizikai és farmakológiai karakterizálása.
- Egy azonosított Kv1.3-gátló toxin szelektivitásának javítása célzott pontmutációkkal.
- Hogyan aktiválódnak és deaktiválódnak a humán szívizom Nav1.5 ioncsatornájának kapuzását vezérlő VSD-k az idő és feszültség függvényében, és milyen változások történnek ezekben a kapuzási lépésekben két, Brugada-szindrómát okozó mutáció esetén?
- Célunk volt a humán Nav1.5 csatorna inaktivációja, főként a szív akciós potenciál hosszával összemérhető időtartam, során kialakuló kapuzási lépések feltárása, különös tekintettel a DIIIés DIV-VSD szerepére, és ez alapján egy koherens inaktivációs modell felállítása.
- A feszültség-függő ioncsatornák kapuzásának mélyebb megértéséhez segítő VCF technika meghonosítása.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Natív és rekombináns toxinok

A toxinokat skorpió mérgekből izolálták kollaborációs partnereink. A faj több élő egyedét befogták, majd megfelelő laboratóriumi körülmények közt tartva az állatok mérgét többszöri, elektromos stimulációval kinyerték. Az összegyűjtött méregből a vízoldékony komponenseket kioldották, majd ebből a toxint HPLC technikával, C18 fordított fázisú oszloppal tisztították.

Anuroctoxin előállítása kémiai szintézissel

A vad típusú anuroctoxint, illetve annak mutáns változatait a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Vegytani Intézetben, Prof. Tóth Gábor és munkatársai állították elő Fmoc/tBu stratégiával TentaGel R PHB, illetve Wang hordozón CEM mikrohullámú peptid szintetizátoron. A ciklizált termékeket szemipreparatív HPLC-n tisztították, analitikai jellemzésüket retenciós idejük és molekulatömegük mérésével végezték.

Sejtek és ioncsatorna expressziós vektorok

Humán limfociták

A toxinok hatását hKv1.3 csatornán, a csatornát expresszáló, egészséges donorokból vett humán perifériás T-limfocitákon is mértük, melyeket Ficoll-Hypaque sűrűség grádiens centrifugálással izoláltuk. A sejteket 2,5, 5 illetve 10 mg/ml phytohemagglutininnal aktiváltuk majd a Kv1.3 áramokat az aktivációt követő 2-7. napban mértük.

Sejtvonalak

A tsA201, L929, CHO és Sf9 sejtvonalakat a vendor utasitásai szerint a megfelelő médiumokban növesztettük.

Xenopus laevis oociták előkészítése és injektálása

A nőstény békákból eltávolított oocitákat Ca²⁺-mentes oldatban kezeltük kollagenázzal, hogy a follikuláris réteget eltávolítsuk. Egészséges V. stádiumú sejteket válogattunk ki, majd Drummond nanoinjektálóval (Drummond Scientific Co.) 50 nl kívánt koncentrációjú, a vizsgáni kívánt csatornát kódoló RNS-t injektáltunk a sejtekbe. Ezt követően a sejteket a mérések előtt 1-2 napig inkubáltuk 18°C-on. Patch-clamp mérések előtt a sejteket 5-10 percre hiperozmotikus oldatba helyezve a zsugorodást követően csipeszekkel eltávolítottuk a vitellin membránt.

Tranziens transzfekció

A sejteket (mind a CHO-t és a tsA201-et) Lipofectamine 2000 reagenst használva transzfektáltuk a gyártó (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) útmutatásai szerint, standard feltételek között tenyésztve. A csatornákat kódoló vektorok egy része GFP (zöld fluoreszcens fehérje) tag-gel látja el a csatornákat, így a transzfektált, csatornát expresszáló sejtek fluoreszcens mikroszkóp segítségével azonosíthatók. A többi esetben a csatornát expresszáló gént 10:1 arányban kotranszfektáltuk a GFP génjét kódoló plazmiddal. A GFP pozitív, transzfektált sejteket Nikon TE2000U vagy TS100 invert fluoreszcens mikroszkóppal azonosítottuk.

Elektrofiziológia

Az elektrofiziológiai méréseket patch-clamp technikával végeztük, teljes-sejt, inside-out vagy outside-out patch konfigurációban, feszültség-zár üzemmódban. A mérések során a tartófeszültséget és a feszültség-protokollok impulzus amplitúdóit és időtartamát a vizsgált ioncsatorna jellemzőihez igazítottuk.

A mérésekhez a sejteket 3,5 mm átmérőjű Petri csészében tartottuk, a mérőelektródát a mikropipettával Burleigh PCS-PS60 mikromanipulátor segítségével juttattuk a sejtekhez. A méréseket személyi számítógép vezérelt Axon Axopatch 200A, Axopatch 200B, Multiclamp 700B vagy HEKA EPC-9 erősítővel és Axon Digidata 1200 vagy 1440 digitalizálóval rögzítettük. Az adatok grafikus megjelenítéséhez és kiértékeléséhez a pCLAMP8-10 és a Pulse programcsomagot használtuk. A mikropipettákat boroszilikát kapillárisokból készítettük, melyek belső oldattal feltöltve 3-5 MΩ ellenállást mutattak a külső mérőoldatba helyezve. A pH-méréseknél használt gyors oldatcserét egy két-csövű, 20 μM átmérőjű téta-üveggel oldottuk meg, melynek gyors mozgatásáról egy piezo meghajtó gondoskodott.

Az elektrofiziológiai mérésekhez használt oldatok összetételét mindig a mérés céljaihoz igazítottuk, de jellemzően a következő oldatokat használtuk:

Sejtvonalak: külső oldat:145 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 2,5 CaCl₂, 5,5 glükóz,10 HEPES (pH 7,35); és belső oldat: 140 KF, 2 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 HEPES és 11 EGTA (pH 7.22).

Xenopus oociták: külső oldat: 1.8 CaCl₂, 10 HEPES + 115 KCl, NaCl, RbCl, CsCl vagy Tris-Cl; és belső oldat: 1.8 EGTA, 10 HEPES + 115 KCl, NaCl, RbCl, CsCl vagy Tris-Cl

A mérő-oldatok pH-ját HCl illetve N-metil-D-glukamin oldatokkal állítottuk be. A tesztelt toxinokat mindig a külső oldatban oldottuk fel a mérni kívánt koncentrációkban, ezért a külső oldatok minden esetben 0.1 mg/ml koncentrációban BSA-t (bovine serum albumin) tartalmaztak, hogy elkerüljük peptid toxinok esetleges kikötődését a műanyag felületekhez. Az oldatok cseréjét a sejtek környezetében gravitáció által hajtott perfúziós rendszer segítségével valósítottuk meg, folyamatos elszívás mellett.

Az elektrofiziológiai mérések kiértékelése

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

A dózis-hatás görbén a különböző koncentrációkban mért adatpontokra kétparaméteres Hillegyenletet illesztettünk (M.Á.H. = $IC_{50}^{H}/(IC_{50}^{H}+[Tx]^{H})$, ahol IC_{50} a félhatásos dózis, H a Hillkoefficiens, [Tx] pedig a toxin koncentráció).

Feszülség-zár fluorometria (Voltage-clamp Fluorometry = VCF)

Az oocitákon az áramméréseket egy Warner TEV-700 két-elektródás feszültség-zár munkaállomáson végezzük (OC-725 erősítővel). A fluoreszcencia méréséhez az oocitákat 10 μM metánszulfonát-karboxitetrametilrodaminnal (MTS-TAMRA) vagy Alexa488-maleimiddel jelöljük depolarizáló oldatban jégen 20 percig. A megvilágítást 470 nm és 530 nm-es LED fényforrások biztosítják. A méréseket egy Nikon Eclipse Fn1 mikroszkópon végezzük 40× vízimmerziós objektívvel. A fluoreszcencia intenzitását fotodiódával mérjük (PIN-040A; United Detector Technology), melyre egy gyűjtőlencsével fókuszáljuk a beérkező fényt. A dióda áramát egy patch-clamp erősítővel mérjük.

A Cut-open Oocyte Vaseline Gap feszültség-zár technika (COVG)

A TEVC technika egy bonyolultabb, de több szempontból előnyösebb változata a Cut-open Oocyte Vaseline Gap feszültség-zár technika (COVG). Ennek során az oocita membránját térben három elszigetelt részre osztjuk (itt alkalmazható a vazelin a szigetelés javítása érdekében), és az ioncsatornák aktivitását csak a felső "sapkából" mérjük, mely a teljes membránfelület 1/10-1/6-od része. A sejt alsó részét jellemzően szaponinnal permeabilizáljuk, és az alsó, intracelluláris oldat potenciálját állítjuk földpotenciálra. A felső, extracelluláris oldat potenciálját változtatjuk az intracelluláris nullához képest, melynek értékét egy, a felső sapkába szúrt pipettával ellenőrizzük. A középső rész a két szélső tartomány még hatékonyabb elszigetelését hivatott megvalósítani. Mivel egy kisebb membrándarab feszültségét kontrolláljuk, és az intra- és extracelluláris oldatok potenciálját kis ellenállású agarhidakkal állítjuk be, mind a soros ellenállással, mind a membránkapacitással kapcsolatos problémák minimalizálódnak, csakúgy, mint a "space clamp" problémák. Ezáltal a beállított membránpotenciál jóval gyorsabban elérhető, mint TEVC esetén, és a passzív kapacitív áramtüskék is kisebbek, könnyebben kompenzálhatók lesznek. Ezek az előnyök lehetővé teszik olyan gyors kinetikájú áramok mérését, mint például a feszültség-függő Na⁺ csatornák árama, vagy kapuzási áramok.

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

A Kv csatornák kapuzásának vizsgálata

A feszültség-szenzor domén és az aktivációs kapu kölcsönhatásának vizsgálata különböző kationok segítségével.

A K_v csatornákban a membrán depolarizációját követően a VSD konformáció-változása áttevődik a pórus doménre, és a csatorna nyitását eredményezi. A hiperpolarizáció során végbemenő mozgások sorrendje azonban kevésbé egyértelmű: először mozdul a VSD és okozza a pórus záródását, vagy a pórusnak kell először záródnia mielőtt a kapuzási töltés nagy része visszatérhet a nyugalmi állapotba? Az is kérdéses volt, hogy a permeáló ionok befolyásolják-e ezeket a konformáció-változásokat.

Kísérleteinkben *inside-out* konfigurációban vizsgáltunk *Shaker* Kv csatornákat, és a csatornák nyitását követően növekvő időtartamú hiperpolarizációs pulzusokkal mértük a farokáramból a csatornák záródási kinetikáját és a kapuzási áram integráljából a kapuzási töltés visszatérési kinetikáját, mely a VSD mozgását jellemezte. Eredményeink azt mutatták, hogy a vad-típusú csatornákban a pórus záródási kinetikája lényegesen gyorsabb, mint a kapuzási töltés visszatérése. Cs⁺, Rb⁺ és K⁺ ionok felhasználásával vizsgálva e folyamatokat azt találtuk, hogy a csatorna záródási kinetikája érzékeny volt az ion fajtájára, de a töltés visszatérés sebességét nem befolyásolta. Ebből megállapítottuk, hogy a kapuzási töltés visszatérését nem hátráltatja a pórus záródása, mivel az minden kation esetén gyorsabb volt. A hiperpolarizációt követő, a csatorna nyugalmi állapotába visszavezető folyamat során tehát a sebesség-meghatározó lépés a VSD mozgása.

Amikor azonban megismételtük e kísérleteket a W434F mutáns csatornával, melyben a szelektivitási szűrőhöz közeli mutáció egy permanensen inaktivált állapotú, minimális vezetőképességű csatornát hoz létre, drámaian különböző eredményeket kaptunk. Ebben a csatornában a különböző kationok esetén a kapuzási töltés különböző sebességgel tért vissza, arra utalva, hogy ebben az esetben a pórus a kation fajtájától függő záródása válik a sebesség-meghatározó lépéssé. További vizsgálataink során kiderült, hogy az eddig nem-vezetőnek hitt csatorna minimális mértékben képes a K⁺ ionok áteresztésére, viszont a vad-típusú csatornával ellentétben a Cs⁺ és Rb⁺ ionokat egyáltalán nem vezeti. A K⁺ ionok áramlása a póruson keresztül akadályozta a kapu záródását, és így lassította a deaktivációs kinetikát, ezen keresztül pedig a VSD nyugalmi állapotba történő visszatérését. A két nem permeáló kation esetén ez nem volt megfigyelhető, így a kapuzási töltés lényegesen gyorsabban tért vissza.

Hipotézisünk szerint az inaktiváció folyamata megváltoztatja az aktivációs kapu és a VSD kapcsolatát, oly módon, hogy a pórus záródása lényegesen lelassul, és az válik sebesség-meghatározó lépéssé. E hipotézis ellenőrzésére vad-típusú csatornákat is vizsgáltunk K⁺-mentes, Na⁺ ionokat tartalmazó oldatokban, mivel ismert, hogy ezen K_V csatornák az inaktivációt követően K⁺ ionokat nem, de Na⁺ ionokat képesek vezetni az átalakult szelektivitási szűrő miatt. Azt tapasztaltuk, hogy rövid, inaktivációt nem indukáló impulzusokat követően a csatorna záródása gyorsabb volt, mint a

VSD visszatérése, hasonlóan a K⁺ ionok jelenlétében megfigyeltekhez. Amikor azonban a depolarizáció kellően hosszú volt az inaktiváció kiváltásához, a W434F mutánshoz hasonlóan a csatorna záródása lelassult, és hátráltatta a VSD visszatérését.

Ezen eredményeink tehát rámutattak arra, hogy hiperpolarizációt követően az aktivációs kapu záródása minden esetben megelőzi a VSD visszatérését. Fiziológiás körülmények között az aktivációs kapu minimális töltést hordozva, de igen gyorsan, és a permeáló ion fajtájától függő sebességgel záródik be, és a VSD visszatérése jóval lassabban ezt követően történik meg. Hosszú depolarizációt követően azonban az inaktiváció hatására a csatorna záródása lassúvá, s ezzel sebességmeghatározóvá válik, ezáltal hátráltatva a VSD visszatérését a nyugalmi állapotba.

Az intra- és extracelluláris pH csökkentésének hatása a Kv csatornák kapuzására

Az intra- és extracelluláris közeg savasításának a Kv csatornák kapuzására gyakorolt hatását már több tanulmány jelezte, azonban mi végeztük el az első szisztematikus vizsgálatot, melynek során a háttérben álló mechanizmusokat is feltártuk. Kísérleteinket *Xenopus* oocitákból tépett *inside-out* és *outside-out* membrán darabokon mértük gyors-perfúziós rendszerrel.

Kimutattuk, hogy az intracelluláris pH csökkenése már a fiziológiás tartományon belül is jelentős mértékben csökkenti a K⁺ csatornákon átfolyó áramot a csatornák blokkolása révén. A gátlás pK értéke 6,5 volt, ami azt mutatja, hogy már a fiziológiás pH 7,2-7,4 tartományban is az áram jelentős hányadát gátolják a protonok. Emiatt a kísérletek további részében pH 8,0 oldatot használtunk kontrollnak.

A gátlás feszültség-független volt, ami arra utal, hogy a protonok nem hatolnak mélyen a szelektivitási szűrőbe, ahol a transz-membrán potenciál nagy része esik. A gátlás kinetikáját gyors perfúzióval vizsgáltuk, mely lehetővé tette az oldat cseréjét < 2ms idő alatt. Eredményeink azt mutatták, hogy a gátlás a rendszerünk időbeli feloldási határán belül kialakult, azaz igen gyors. A kimosás kinetikája szintén gyors volt, viszont konzisztensen lassabb, mint a gátlás kialakulásának kinetikája. Bár nem bizonyítottuk további kísérletekkel, ennek lehetséges magyarázata, hogy több proton kötőhely van a szelektivitási szűrő intracelluláris bejáratánál, melyek közül egy betöltöttsége elegendő a gátlás kialakulásához.

Zaj-analízist alkalmazva megállapítottuk, hogy az áram csökkenésének oka elsősorban az egyedi csatorna vezetőképesség csökkenése, és kisebb mértékben a nyitási valószínűség csökkenése. Ezek alapján a gátlás mechanizmusát az extracellulárisan alkalmazott tetraetil-ammónium (TEA) gátlásához hasonlónak gondoljuk, mely olyan nagy sebességű asszociációs és disszociációs lépéseket jelent, ami a mérőrendszer feloldóképességét meghaladja, s így egy látszólag csökkent egyedi csatorna vezetőképesség figyelhető meg.

Érdekes módon az intracelluláris alacsony pH gyorsította a farokáramok kinetikáját, ami nem lehetett felszíni töltés-árnyékolási effektus (surface charge screening) eredménye, mivel annak éppen ellenkező irányba kellett volna változtatnia a kinetikát. Feltételezésünk szerint a protonok kompetálnak a csatornába belépő K⁺ ionokkal, melyek akadályozzák az aktivációs kapu záródását. A proton jelenléte a csatorna bejáratánál megfigyeléseink alapján viszont lehetővé teszi a kapu záródását, ezért koncentrációjának növekedésével gyorsul a kapu záródása. Ezzel ellentétben viszont az inaktiváció sebességét nem módosította az intracelluláris pH. Ez a megfigyelés nem meglepő annak fényében, hogy az inaktiváció a szelektivitási szűrő extracelluláris végéhez közel megy végbe.

Az extracelluláris oldali savasítás teljesen más hatással volt a csatornák kapuzására. Megfigyeltük a már ismert töltés-árnyékolási effektust, aminek hatására pH 8,0-ról pH 5,0-ra váltva a VSD mintegy 45 mV-tal negatívabb feszültséget érzékel, s így ennyivel eltolódik a nyitáshoz szükséges membránpotenciál a pozitív irányba, valamint felgyorsul a farokáram a látszólag negatívabb feszültség miatt. Az extracelluláris pH fiziológiás tartományon belüli csökkenése nem blokkolta a csatornákat, csak jóval alacsonyabb értékek esetén okozta a csatornák lassú inaktivációjának gyorsulását. A gyorsulás mértéke igen nagymértékű volt: pH 4,0-nál 200-szor gyorsabb volt az inaktiváció, mint ph 8,0-nál. A dózis-hatás görbe alapján pKa = 4,7/alegység értéket kaptunk, ami egy savas oldalláncú aminosav protonálására utal. A legvalószínűbb jelölt a 447-es pozíciójú aszpartát, mely a szelektivitási szűrő extracelluláris végéhez közel helyezkedik el, éppen ahol az inaktivációval kapcsolatos konformáció-változások mennek végbe. Csatorna-gátlást még befelé folyó áramok esetén sem figyeltünk meg, ami azt bizonyítja, hogy a protonok nem tudnak belépni a szelektivitási szűrőbe, és nincsen proton permeabilitás a Kv csatorna pórusán keresztül. Ezt pH 2 értékig ellenőriztük.

Összességében tehát megállapítottuk, hogy intracellulárisan a protonok gátolják a Kv csatornákat már fiziológiás pH tartományban is, aminek élettani relevanciája is lehet. Az extracelluláris oldalról viszont csak jóval alacsonyabb pH tartományban befolyásolják az inaktiváció mechanizmusát, felgyorsítva azt. Ez a hatás mégis releváns lehet alacsony extracelluláris pH-jú, pl. gyulladásos területeken, mivel a töltés-árnyékolási effektussal együtt a csatornák aktivációját hátráltatva, inaktivációját pedig felgyorsítva lényegesen csökkentheti a K⁺ konduktanciát.

A Kv1.3 csatorna inaktivációjának extracelluláris pH-függése

A *Shaker* családba tartozó K_V csatornák fent leírt inaktivációja a "láb az ajtóban" (foot-in-thedoor) mechanizmusnak megfelelően csak akkor mehet végbe, ha egy K⁺ ion kötőhely a pórusban kiürül, vagyis az ott lévő ion távozik. A lassú inaktiváció sebességét erősen befolyásolja az extracelluláris pórusrégió aminosav sorrendje, különösképpen a *Shaker* csatorna 449-es pozíciójának megfelelő helyen található aminosav. Ezen felül az inaktiváció sebessége módosítható gátlószerekkel (pl. tetraetil-ammónium), valamint az extracelluláris oldat kation összetételének és pH-jának változtatásával.

Az irodalomból ismert, hogy több, a *Shaker* családba tartozó csatorna inaktivációs kinetikáját módosítja az extracelluláris pH. Különösen figyelemreméltó, hogy míg minden más csatornánál a kinetika előző részben leírt gyorsulása figyelhető meg a pH csökkenésével, addig a humán T-sejtek

domináns, és a proliferációban kulcsszerepet játszó Kv1.3 csatornájának esetében lassul a lassú inaktiváció. Fontos és egyedülálló tulajdonsága a pH érzékenység szempontjából, hogy a kritikus (*Shaker* 449-cel ekvivalens) pozícióban egy titrálható hisztidin található (H399).

A lassú inaktiváció pH-függése fontos szabályozó mechanizmus lehet például gyulladásos területeken, ahol a környezet pH-ja jelentősen eltérhet a fiziológiás értéktől. Mivel a humán limfociták membránpotenciálját elsősorban a Kv1.3 csatornák határozzák meg, ezek működésének a pH változása által okozott módosulása befolyásolja a sejtek membránpotenciálját és ezen keresztül számos sejtfunkciót. Nevezetesen, gyulladásos, alacsony pH-jú területen a Kv1.3 csatornák lassabb inaktivációja miatt átlagosan hosszabb ideig tartanak nyitva e csatornák. Ez negatívabb membránpotenciált eredményez, ami kedvez a limfociták aktivációja során kialakuló jelátviteli folyamatoknak, és így a sejtek proliferációjának.

Feltételeztük, hogy alacsony pH mellett a protonált hisztidin elektrosztatikus tere befolyásolja az inaktivációt moduláló K⁺ kötőhely betöltöttségét. Ezt alátámasztotta, hogy a hisztidint más aminosavra mutálva a többi csatornánál is megfigyelt gyorsulás következett be az inaktivációban, valamint hogy a protonált hisztidin elektromos terét leárnyékoló magas ionerősségű oldatot alkalmazva, a vad-típusú (WT) csatornában is az inaktiváció gyorsulása volt megfigyelhető alacsony pH-n. Az inaktivációt kontrolláló K⁺ kötőhelyre kötődő gátló Ba²⁺ ion be- és kimosódási kinetikája is lelassult alacsony pH esetén, arra utalva, hogy a kialakult potenciálgát akadályozza a kötőhely betöltődését és elhagyását is. A Ba²⁺ bekötődésének és disszociációjának sebessége azonban nem függött a pH-tól a H399K és H399L csatornák esetén, ahol nem volt protonálható a kritikus pozíciójú aminosav. Amennyiben a kötőhely elsősorban az extracelluláris tér felől telítődik K⁺ ionnal, mint például magas extracelluláris K⁺ koncentráció és/vagy befelé irányuló áramok esetén, a pórus extracelluláris bejáratánál elhelyezkedő protonált hiszitidin által létrehozott potenciálgát feltételezhetően a kívülről a pórusba belépő kationokat is akadályozza. Ezzel összhangban, alacsony pH mellett az inaktiváció gyorsulása volt megfigyelhető a 40-150 mM extracelluláris K⁺ koncentráció-tartományban, ami már alacsonyabb, 20 mM-os extracelluláris K⁺ koncentrációnál megfigyelhető volt befelé folyó áramok esetén.

Mérési eredményeink alapján felállítottunk egy modellt, mely szerint a Kv1.3 csatorna inaktiváció szempontjából fontos 399-es pozíciójában levő hisztidin protonálódik alacsony pH-n, s az így kialakuló elektrosztatikus tér gátolja a K⁺ ionok mozgását mindkét irányba a pórus bejáratánál. Emiatt az alacsony pH hatása az inaktivációs kinetikára attól függ, hogy a kötőhely betöltődése elsősorban melyik oldalról történik az áramirány és K⁺ koncentráció függvényében, fiziológiás körülmények között lassulást okoz.

Összefoglalásképpen egy egyszerű modellel sikerült megmagyaráznunk a Kv1.3 csatorna szokatlan inaktivációs kinetika változását alacsony extracelluláris pH esetén.

Kv csatornákat gátló skorpió toxinok vizsgálata

Új Kv1.3 csatornát gátló peptid toxinok felkutatása és karakterizálása

A korábbi években munkacsoportunk számos újonnan izolált skorpiótoxin farmakológiai karakterizálását végezte el, pl.: Pi2, Pi3, Ce toxinok, Css20, TsT26, anuroctoxin és Vm24. A bevezetésben említett potenciális terápiás felhasználhatóság reményében keresünk a Kv1.3 csatornát minél hatékonyabban és minél szelektívebben gátló toxinokat. A toxinokat mexikói kollaborátorunk, Lourival D Possani laboratóriumában izolálják és határozzák meg szerkezetüket. Ezt követően elvégezzük biofizikai vizsgálatukat: a Kv1.3 iránti affinitás meghatározása után vizsgáljuk az asszociációs és disszociációs kinetikát, esetenként kompetíciós kísérletekkel a kötőhely pozícióját, illetve egyes esetekben végeztünk dokkolási szimulációkat a csatornával kölcsönható aminosavak meghatározására. Végül pedig a szelektivitás meghatározása történik a toxint kipróbálva a rendelkezésünkre álló, mintegy 15 ioncsatornából álló bankunkon.

Ezen toxinokon felül részletesen vizsgáltuk a korábban izolált, sokak által a Kv1.3 csatorna szelektív gátlószereként ismert és alkalmazott margatoxin hatását 13 különböző ioncsatornán. Annak ellenére, hogy a margatoxin a káliumcsatornák vizsgálatában széles körben használt, kereskedelmi forgalomban lévő molekula, olyan tanulmány, mely azonos feltételek mellett (expressziós rendszer, affinitás meghatározásának módja, stb.) keletkezett adatok alapján adna felvilágosítást a margatoxin receptorára még nem ismert. Egy ilyen átfogó tanulmány hiányában több munkacsoport, mely e toxint alkalmazta eszközként, téves következtetéseket vonhatott le különböző sejttípusok által kifejezett ioncsatornák meghatározása során.

E tanulmányban megállapítottuk, hogy a margatoxin hatékonyabban gátolja a Kv1.2 csatornát, mint a Kv1.3-at, és bár lényegesen kisebb affinitással, de a Kv1.1 csatornát is. Így a konklúziónk szerint a margatoxin nem tekinthető Kv1.3-szelektív gátlószernek.

A fent felsorolt toxinok közül több hatékony (K_d a nM vagy alacsonyabb koncentráció tartományban), és többé-kevésbé szelektív gátlószere a Kv1.3 csatornának. Itt a legjobb tulajdonságú Vm24 toxint mutatom be.

A Vm24 egy 36 aminosavból álló toxin, mely a *Vaejovis mexicanus smithi* skorpió mérgéből származik. Méréseink szerint a jelenleg ismert egyik legpotensebb Kv1.3 csatorna gátlószer, disszociációs állandója 2,9 pM. A nagyon alacsony alkalmazott koncentrációk és a rendkívül lassú kimosódási kinetika miatt több kísérletet végeztünk annak megerősítésére, hogy a csatornával fellépő valódi specifikus kölcsönhatás révén alakul ki a gátlás. A blokk kialakulása során, a vártnak megfelelően, a bemosási időállandó reciproka egyenesen arányos volt a koncentrációval. Végeztünk kompetíciós kísérletet charybdotoxinnal (ChTx), mely egy jól karakterizált pórus-blokkolója e csatornának, és azt tapasztaltuk, hogy növekvő ChTx koncentrációk mellett lassult a Vm24 bemosódási kinetikája, mely arra utalt, hogy azonos kötőhelyért kompetálnak, azaz a Vm24 is a hagyományos toxin gátlási mechanizmust követi.

Egy ilyen affinitású toxinnál különösen érdekes a csatorna-szelektivitás, ezért 10 egyéb ioncsatornán is teszteltük gátló képességét. 1 nM koncentrációban csak a Kv1.2 csatornán mutatott kis mértékű gátlást. Ez legalább 1500-szoros szelektivitást jelent a Kv1.3 irányába, ami bőven meghaladja a terápiás alkalmazáshoz javasolt minimum 100-szoros különbséget.

További kísérletekben kimutattuk, hogy a Vm24 pM-os koncentrációban gátolja a T-sejtek Ca²⁺ jelét, proliferációját, CD25 expresszióját, valamint patkányokban gátolja a késői hiperszenzitivitási reakciót *in vivo*. A demonstrált tulajdonságok alapján a Vm24 az eddigi ismert egyik legjobb tulajdonságú Kv1.3 csatorna gátlószer, mely kiindulási molekulaként szolgálhat a terápiás célú felhasználás irányába.

Az anuroctoxin szelektivitásának javítása célzott pontmutációkkal

Ebben a projektben célunk egy ismert K_V1.3-gátló toxin, a korábban munkacsoportunk által az *Anuroctonus Phaiodactylus* mexikói skorpió mérgéből izolált, 35 aminosavból álló anuroctoxin szelektivitásának javítása volt. Előzőleg kimutattuk, hogy bár e toxin több ioncsatornán hatástalan volt, a K_V1.3 mellett a K_V1.2 csatornát is nagy affinitással gátolta. Mivel a K_V1.2 csatorna számos idegsejtben megtalálható, ez erősen korlátozza a potenciális terápiás alkalmazás lehetőségét. Ezért célunk az volt, hogy a toxin affinitásának megtartása mellett annak szelektivitásán javítsunk.

A szelektivitás javítása érdekében létrehozott pontmutációk helyét két technikával határoztuk meg. Egyrészt ismert szelektivitású toxinok szekvenciáját hasonlítottuk össze, és a toxinokat a Kv1.2 és 1.3 iránti disszociációs állandójuk hányadosa alapján 1.2, 1.3, vagy átmeneti szelektivitásúként csoportosítottuk. A szekvenciák alapján sok hasonlóság mellett (pl. a gátláshoz szükséges centrális lizin) több különbség is észrevehető az 1.2 és 1.3-szelektív toxinok között. A legfontosabb, hogy a diád aromás pozíciójában elhelyezkedő tirozin a Kv1.2 szelektív toxinokra jellemző, míg a Kv1.3 iránt magasabb szelektivitást mutató toxinokban polárosabb aminosav van itt jelen.

A második módszer egy másik skorpiótoxinnal, a Css20-szal, mely szintén gátolta e két csatornát, végzett számítógépes modellezés eredményének analízise volt. A toxin dokkolását szimuláltuk a Kv1.2 és 1.3 csatornákhoz, és így meghatározhattuk a legvalószínűbb kölcsönható partnereket, melyből következtethettünk a szelektivitást befolyásoló aminosavakra.

Ezen analízisek alapján a következő mutációkat terveztük meg: N17A, F32T, és a két mutációt együttesen tartalmazó N17A/F32T dupla mutánst. A anuroctoxin vad típusú (kontroll) és mutáns változatait szilárd fázisú kémiai szintézissel állította elő kollaborációs partnerünk Prof. Tóth Gábor és munkacsoportja a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Vegytani Intézetében. Ezen toxinok hatását vizsgáltuk Kv1.3 és Kv1.2 csatornákon.

Először a natív és a szintetikus vad-típusú toxint hasonlítottuk össze, és azt találtuk, hogy mind a Kv1.3, mind a Kv1.2 csatornákat hasonló affinitással gátolták, így a szintézis sikeresnek bizonyult. Az egyszeres mutáns toxinok nem mutattak jelentős javulást a WT toxinhoz képest. A dupla mutáns anuroctoxin viszont, mely mindkét mutációt együttesen tartalmazza (N17A/F32T), IC50 = 0,6 nM

félhatásos koncentrációval gátolta a K_v1.3 csatornát, mely mind a természetes és a szintetikus vad típusú toxin hatásával megegyezik, ugyanakkor a K_v1.2 csatornát csak 9,6 μ M félhatásos koncentrációval gátolta, azaz 16000-szeres szelektivitással bír a K_v1.3 iránt. Megvizsgáltuk a toxinok hatását még két másik csatornára is: a legközelebbi rokon K_v1.1 és a T sejtekben megtalálható másik K csatornára, az K_{Ca}3.1-re is, és a mutánsok ezeken is hatástalanok voltak.

Összességében tehát sikerült a toxin Kv1.3 iránti szelektivitását nagy mértékben javítani, az affinitás megtartása mellett, s ezzel egy lényegesen jobb tulajdonságú toxint előállítani . E toxin tehát kiváló alapja lehet a T sejt-mediált autoimmun betegségek kezelésére kifejlesztendő gyógyszereknek.

A szív feszültség-függő Nav1.5 csatorna kapuzásának vizsgálata

A feszültség-szenzor domének mozgásának vizsgálata

Az Nav1.5 csatorna kapuzásának molekuláris szintű vizsgálatához feszültség-zár fluorometriát alkalmaztuk, melyet a csatorna igen gyors kapuzási kinetikája miatt a módszerek leírásában részletesen ismertetett cut-open (COVG) technikával kombináltunk. Az Nav csatorna egyes doménjeit megjelölve, a VCF technikával jól vizsgálhatók e domének egyedi konformáció-változásai, melyekről az ionáram vagy a kapuzási áram mérése nem szolgáltat információt. Ilyen mérések korábban születtek az izom Nav1.4 csatornával kapcsolatban, az aritmiák kialakulásának és a szívre szelektív gátlószerek hatásmechanizmusának megértéséhez azonban szükségesek a csatornaspecifikus vizsgálatok, mivel jelentős eltérések lehetnek a két csatorna kapuzásában. A mérések elvégzésének első feltétele a VCF mérésekhez szükséges cisztein-mutánsok előállítása volt, ami a Na⁺ csatorna esetében négy különböző mutáns előállítását jelenti a négy domén jelölhetőségéhez. A cisztein mutációt (melyek az adott domén S3-S4 extracelluláris összekötő szakaszán találhatók) hordozó mutánsokat DI-LFS, DIII-LFS, és DIV-LFS jelöléssel illettük (LFS = Large Fluorescence Signal).

Az új mutánsok funkcionális tesztelését két mérési protokoll futtatásával végeztük el. Elsőként a vezetőképesség feszültség-függését (G-V) határoztunk meg egy depolarizáló impulzus-sorozat alatt mért áramamplitúdókat osztva a hajtóerővel. A másodikkal az egyensúlyi inaktiváció (steady-state inactivation = SSI) feszültség-függését határoztuk meg rövid, -20 mV-os impulzusokkal, melyek előtt különböző feszültségeken tartottuk a membránt 200 ms időtartamig.

A festékkel jelölt csatornákon futtatva a fentebb leírt feszültség-protokollokat lehetővé vált az áram mérésével egyidejűleg a VSD-k konformáció-változásait is nyomon követni. A G-V protokollal mért fluoreszcencia jelekből megkonstruálható az F-V görbe, mely a jelölt domén VSD aktivációjának feszültség-függését jellemzi. Az SSI protokoll alatt regisztrált fluoreszcenciás jelekből pedig az SSI F-V görbéket határoztuk meg. Amennyiben mindkét görbe egy egyszerű kétállapotú rendszer nyugvó és aktivált állapotai között végbemenő átmenet feszültség-függését írja le, úgy azok egymás tükörképei lesznek, és az 50%-os y-tengely értéknél metszik egymást. Mivel azonban az SSI protokoll során egy adott teszt-feszültségen lényegesen hosszabb időt tölt a csatorna, lehetőség nyílik lassabban betölthető "mélyebb", jellemzően, inaktivált állapotok elérésére, így a két görbe egymáshoz képest eltolódhat.

A homotetramer K_V csatornákkal ellentétben méréseink alapján az Na_V1.5 egyes doménjeinek a VSD-i nagyon különböző feszültség-függéssel és kinetikával aktiválódnak: aktivációjuk több, mint 50 mV-os feszültségtartományt fed le. A DIII VSD aktiválódik a legnegatívabb membránpotenciálnál (V_{1/2}=-106,0 ± 3,2 mV), melyet DI követ (-83,9 ± 2,8), majd DIV (-66.8 ± 3,4), és végül DII (-51.4 ± 2,4). Mind a négy VSD negatívabb feszültségnél aktiválódik, mint az áram aktivációját jellemző G-V görbe (V_{1/2}=-39.9 ± 2,9 mV).

A DI, DII és DIII VSD-k hasonló kinetikával aktiválódtak de az ionáram aktivációs kinetikájánál lassabban. Azonban az áram szigmoid aktivációja által okozott késlekedés miatt az áram és fluoreszcencia jelek felfutása időben átfedett. Ez a megfigyelés egybevág a Hodgkin-Huxley féle modellel, mely az Nav csatornák aktivációját 3 aktivációs "kapuval" jellemzi, ami alapján az áram szigmoid felfutása várható, mivel az csak mindhárom VSD aktivációja után következhet be. Szintén egybevág a HH modellel a DIV-VSD lényegesen lassabb aktivációja, mivel ez a domén felelős a gyors inaktiváció kialakulásáért, és csak a másik három VSD aktivációját követően aktiválódhat.

Egyéb érdekes megfigyeléseket is tettünk az egyes domének esetében. A DII F-V görbéjének középpontja negatívabb a G-V görbéjénél, mutatva, hogy a DII-VSD az áram aktivációját megelőzően kezd mozogni, viszont enyhébb meredeksége miatt később telítődik a görbe, mint a konduktancia görbéje, ami arra utal, hogy a két folyamat között nincs szoros csatolás – a pórus nyitása megelőzheti a DII-VSD teljes aktivációját. Hasonlóképpen, a DII SSI és SSI-FV görbéinek összehasonlításából kiderül, hogy az áram inaktivációja negatívabb membránpotenciáloknál megtörténik, mint a DII-VSD aktivációja, és az inaktivációs görbe lényegesen meredekebb is, mint a DII-VSD aktivációé. Ez azt jelenti, hogy olyan tartófeszültségeknél, melyeknél teljesen megszűnik a vezetőképesség az inaktiváció révén (V>-50 mV), a DII-VSD még távol van a teljesen aktivált állapotától, ami alapján valószínű, hogy nem vesz részt a zárt állapotú inaktiváció kialakulásában.

A DII-vel ellentétesen, a DIII-VSD aktivációja nagy feszültség-különbséggel megelőzi a pórus nyitását, és inaktiváció során is a VSD mozgás döntő része megtörténik, még mielőtt a konduktanciában észrevehető csökkenés lépne fel az inaktiváció miatt.

Különböző hosszúságú depolarizáló impulzusokat követően visszatérve a negatív tartófeszültségre, megmértük az egyes VSD-k visszatérési, azaz deaktivációs kinetikáját. Ismert, hogy Nav csatornákban hosszabb depolarizációt követően a kapuzási töltés egy része "immobilizálódik", azaz lassabban tér vissza, mint rövid depolarizáció után, az inaktiváció kialakulása miatt. Későbbi VCF mérések a patkány izom rNav1.4 csatornán a DIII és DIV VSD-k lassabb visszatérésének tulajdonították az immobilizáció jelenségét. Méréseink alapján a DI és DII VSD-k gyorsan, és a depolarizáció hosszától független sebességgel térnek vissza az aktivált állapotból. Ezzel szemben a DIII-VSD deaktivációja már rövid depolarizációt követően is lényegesen (legalább 10-szer) lassabb a másik két doménhez viszonyítva, de még ehhez képest is szignifikánsan

lassul hosszú depolarizációt követően. A DIII-VSD deaktivációjának hosszú depolarizációt követő jelentős lassulását az okozhatja, hogy a csatorna "mélyebb" inaktivált állapotokat ér el, melyek stabilizálják a DIII-VSD aktivált konformációját. A DIV-VSD deaktivációja jelentősen lassabb volt a DI és DII-es doméneknél, de 2-3-szor gyorsabb, mint a DIII-é. A DIV inaktivációban játszott kulcsszerepének ismeretében meglepő módon a DIV-VSD deaktiváció nem lassult szignifikánsan a növekvő impulzushosszal, ami immobilizációjának hiányára utal az Nav1.4 csatornával ellentétben.

Brugada-szindróma mutáns csatornák kapuzása

A továbbiakban molekuláris szinten vizsgáltuk két Brugada-szindrómát (BrS) okozó, a DII-VSDben pontmutációt hordozó Nav1.5 csatornát, az A735V és G752R mutánsokat. A Brugada-szindróma egy örökletes szívbetegség, melyet három típusú, jellegzetesen megváltozott EKG egyike és a hirtelen szívhalál emelkedett kockázata jellemez. A halál oka BrS esetén kamrai fibrilláció. Több gén mutációja is felelős lehet a BrS kialakulásáért, de az esetek mintegy 20 %-ában az Nav1.5 pórusformáló α -alegységét kódoló gén funkcióvesztéses mutációja okozza, azaz csökkent Na⁺ beáramlással jár.

Az A735V mutánsban a DII-VSD feszültség-függése gyengült, depolarizáltabb irányba tolódott, és aktivációs kinetikája lassult. Ezen felül az áram aktivációja, azaz a pórus nyitása is szignifikánsan lassult. Kiderült továbbá, hogy a DII-VSD aktivációja csak facilitálja a csatorna nyitását egy allosztérikus mechanizmuson keresztül, és nem előfeltétele a pórus nyitásának. Ez a jelenség a DII-LFS-nél is megfigyelhető, bár jóval kisebb mértékben, ami arra utal, hogy ez az Nav1.5 inherens tulajdonsága, amit az A735V mutáció jelentősen felerősít.

A G752R mutánsban a mutációt hordozó DII-VSD aktivációjának drámai lassulását figyeltük meg. Depolarizáló impulzus hatására a DII-VSD aktivációja a mutánsban mintegy 7-szer lassabb, mint a DII-LFS csatornában. Az ionáram aktivációs kinetikája is szignifikánsan lassult a G752R mutánsban: a -40 - +30 mV feszültségtartományban a nyitási kinetika 1,7 – 2,9-szer bizonyult lassabbnak, mint a DII-LFS csatornánál.

A DIII- és DIV-VSD szerepe az inaktivációban, az inaktivációs mechanizmus modellje

A szív Nav csatorna DIII- és DIV-VSD-jének az inaktiváció, illetve az abból való visszatérés folyamatában betöltött szerepét olyan mutáns csatornákon vizsgáltuk, melyekről ismert volt, hogy sérült az inaktiváció folyamata. E mutációk a DIII-DIV összekötő régión, és a DIII és DIV S4-S5 összekötő régióiban helyezkedtek el. Az S4-S5 összekötő jelenti a közvetlen kapcsolatot a VSD és a pórus között az egyes doménekben, s így a VSD konformáció-változásainak továbbítójaként tekinthető a PD felé.

Az inaktivációs motívumot (részecskét), jelentő, a DIII-DIV összekötőn elhelyezkedő IFM szekvenciában az F1486Q (IQM) mutációt hoztuk létre, mely jelentősen gátolja az inaktivációt az Nav1.5 csatornában: hosszú depolarizáló impulzusok alatt is csak kis mértékű inaktivációt

tapasztalatunk. E mutánson korábbi eredményekkel összhangban azt találtuk, hogy az inaktiváció során nem immobilizálódó DI- és DII-VSD-k nem játszanak szerepet az inaktivációban. A DIII-VSD vad-típusú csatornánál megfigyelhető immobilizációja viszont gyakorlatilag megszűnt a mutáció hatására, jelezve a mély inaktivált állapotok betöltöttségének csökkenését illetve megszűnését. Megfigyeléseinkből arra következtethetünk, hogy a mutáció hatására az inaktivációs motívum erősen csökkent affinitással képes modulálni a DIII-VSD mozgását és immobilizációját indukálni.

Az IQM mutáció hatására sem jelentek meg immobilizációt okozó mélyebb állapotok a DIV-VSD esetén. A DIV-VSD deaktivációs kinetikája az IQM hatására lényegesen felgyorsult, ami arra utal, hogy az IFM motívum a vad-típusban a DIV-VSD-vel kölcsönhatva stabilizálja annak aktivált állapotát, míg e kölcsönhatás a mutánsban sérül.

A továbbiakban a DIII S4-S5 összekötőjében található N1325S LQT3-mutáns csatornát vizsgáltuk, melyről kimutatták, hogy megnöveli a késői Na⁺ áramot. A fluoreszcenciás görbék alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy e mutánsban csökkent a mélyebb inaktivált állapotok DIII-VSD általi betöltöttsége a DIII-LFS-hez képest. Mivel az N1325S csak az FV, az IQM pedig csak az SSI-FV görbét módosította, valószínűsíthető, hogy mindkét mutáció az DIII-VSD –IFM kölcsönhatást gyengíti, de más-más átmenetekre hatva.

További különbséget találtunk a WT és az N1325S között: a mutáns csatornánál eltűnt az ionáram inaktivációból való visszatérésének lassú komponense. A WT csatornánál a visszatérés lényegesen lassabb 200 ms-os depolarizáció után, mint 10 ms után, ami valószínűleg a hosszú impulzus alatt benépesített mélyebb inaktivált állapotoknak tudható be. Ezzel szemben, az N1325S csatornánál a visszatérés sebessége azonos volt 10 és 200 ms után, mutatva, hogy a mutáció megszüntette a mély inaktivált állapot betöltöttségét.

A DIV-VSD szerepének vizsgálatához a DIV S4-S5 összekötőjében található N1659A mutáns csatornával végeztünk kísérleteket, mely pozícióról feltételezhető, hogy kölcsönhat az inaktivációs IFM motívummal. Az IQM mutánshoz hasonlóan a DIII-N1659A csatorna árama is erősen csökkent inaktivációt mutatott és SSI-FV görbéje is jelentősen pozitív irányba tolódott. A DIII-VSD deaktivációja szignifikánsan felgyorsult, ami arra utalhat, hogy a DIII-VSD deaktivációja függ a DIV-VSD konformációjától. A DIII-hoz hasonlóan, de a DIII-IQM mutánssal ellentétben, a DIII-N1659A deaktivációja lassul hosszú depolarizáló pulzusokat követően, ami azt jelzi, hogy a DIII-VSD továbbra is kölcsönhat a DIII-DIV összekötővel. Az IQM és a DIV-N1659A mutánsokban hasonlóképpen jobbra tolódott a DIV FV görbe és felgyorsult a DIV-VSD deaktiváció, ami alátámasztja a DIV-VSD és a DIII-DIV összekötő közvetlen kölcsönhatását.

A fenti kísérletek eredményei alapján megfigyeltük, hogy szoros korreláció áll fent az áram inaktivációból való visszatérésének (az amplitúdó túlnyomó részét kitevő) gyors komponense és a DIII-VSD deaktivációs sebessége között 200 ms-os impulzusok után, de nem 10 ms-os impulzusok után. Ez a szoros összefüggés arra utal, hogy a DIII-VSD meghatározó szerepet játszik az inaktivációból való visszatérésben hosszabb, a szív akciós potenciáljának megfelelő időtartamú, depolarizációkat követően.

Kísérleti eredményeink alapján felállítottunk egy modellt, mely a jelenleg széles körben elfogadott inaktivációs modell továbbfejlesztése, elsősorban az eddig figyelmen kívül hagyott DIII-VSD szerepének hangsúlyozásával. A depolarizáció elején a DI-DIII VSD-k gyorsan aktiválódnak, nyitják a csatornát, melyet késleltetve követ a DIV-VSD aktivációja. A DIV-VSD aktivált konformációja lehetővé teszi a DIII-DIV összekötőn található IFM motívum kötődését a DIV-VSD-hez, mellyel egyúttal elzárja a pórust, és megakadályozza a Na⁺ ionok áramlását. A szív akciós potenciáljának hosszához mérhető, >100 ms hosszúságú depolarizációk esetén az IFM kölcsönhatásba lép a DIII-VSD-vel is, így stabilizálva mindkét VSD aktivált állapotát. Repolarizáció során az IFM először a DIV-VSD-től válik el, lehetővé téve annak visszatérését a nyugalmi állapotba, majd jóval később a DIII-VSD-től, melynek visszatérését jellemző deaktivációs kinetika lassabb, mint a DIV-é, és a depolarizáció hosszától függ.

A modell alapján megfigyeléseink a következők szerint magyarázhatók. Az IQM mutáció akadályozza az inaktivációs motívum kölcsönhatását mind a DIII-, mind a DIV-VSD-vel, így sérül az inaktiváció, és mindkét VSD deaktivációs kinetikája gyorsul, de a DIII-VSD esetében csak hosszú depolarizációk után, mivel csak ilyenkor alakul ki a kölcsönhatás. Az DIV összekötőben levő N1659A mutáció gátolja az IFM kötődését a DIV-VSD-hez, így annak deaktivációja gyorsabb lesz. A DIII-VSD visszatérése is lényegesen gyorsabb lesz, viszont az időfüggő kölcsönhatás továbbra is kialakulhat, amit a depolarizáció hosszától függő deaktivációs kinetika megmaradása jelez. A DIII-VSD ben levő N1325S mutáció akadályozza az IFM - DIII-VSD kötődést, így megszűnik a DIII-VSD deaktivációjának impulzushossz-függése, valamint az áram inaktivációból való visszatérése is gyorsabb és egy komponensű lesz.

Összességében modellünk szerint a szív akciós potenciál alatt a DIV-VSD határozza meg az inaktiváció kialakulását, míg a DIII-VSD szabályozza az abból történő visszatérést. Ezek alapján a DIII-VSD fogja meghatározni a rendelkezésre álló Na⁺ csatornák számát az akciós potenciált követően, s ezáltal kontrollálni a refrakter periódus hosszát, ami egy kritikus meghatározója az aritmiák kialakulásának.

A Voltage-Clamp Fluorometry (VCF) technika meghonosítása

A hNav1.5 csatornáról született eredmények jól illusztrálják a VCF technikával megszerezhető adatokat és az azokból levonható következtetéseket. Mivel kutatási irányainkat bővíteni kívántuk "elektromosan néma", azaz áramot nem vezető, de mégis feszültség-érzékeny fehérjék vizsgálatának irányába, valamint kihasználni ezt az ioncsatornákról is több információt nyújtó módszert, vezetésemmel létrehoztunk egy VCF laboratóriumot. A Nemzeti Agykutatási Program keretén belül elnyert támogatással megalakítottuk az MTA-DE NAP B "Ioncsatorna funkcionális szerkezetvizsgáló laboratóriumot" a DE ÁOK Biofizikai és Sejtbiológiai intézetében.

A laboratórium 2015. évi létrehozását követően beüzemeltük a VCF mérőállomást a szükséges kiegészítő berendezésekkel és eszközökkel együtt, mint például a mikroinjektor, sejtinkubátor, gél-

futtató és megvilágító. Optimalizáltuk a technikához szükséges protokollokat, úgy, mint cisztein mutáns csatornák előállítása, RNS készítés és sejtinjektálás. A létrejött kutatási infrastruktúra felhasználásával a következő, a feszültség-érzékeny fehérjék kapuzásával / konformáció-változásaival kapcsolatos struktúra-funkció vizsgálatokat végezzük:

1. Vizsgáljuk, hogy hogyan hat a membránban a koleszterin és analógjai szintjének változása a Kv csatornák kapuzására, és hogy a csatorna melyik doménje a hatások elsődleges célpontja. Korábban azt találtuk, hogy a koleszterin és a 7-dehidrokoleszterin szintjének változása a humán limfociták és sejtvonalak membránjában erősen befolyásolja a Kv1.3 ioncsatorna kapuzásának mind feszültségfüggő egyensúlyi, mind kinetikai paramétereit. A VCF technikával azt kívánjuk meghatározni, hogy a hatás a VSD-n vagy a pórus doménen keresztül nyilvánul-e meg, és ezáltal a hatásmechanizmust próbáljuk megérteni. Vizsgálni kívánjuk a szterolok különböző VSD-PD csatolású Kv csatornák kapuzására gyakorolt hatását, és ezáltal a szterol-hatás csatorna-specificitását.

2. Szekvencia homológia alapján azonosítottak egy fehérjét, mely a feszültség-függő ioncsatornák VSD-jéhez hasonló szerkezetű, de ionok átjutását biztosító PD-nel nem rendelkezik. Munkacsoportunk egyik tagja, Papp Ferenc, az NIH laboratóriumában kezdte meg ennek az NVS-nek (Novel Voltage Sensor) nevezett molekulának a vizsgálatát VCF-fel, és ez a projekt folytatódik új laboratóriumunkban is. Célunk bizonyítani az NVS valódi feszültség-érzékelő funkcióját, és felderíteni szerepét a sejt működésében. Előzetes eredmények alapján a membránpotenciál változásait közvetítheti intracelluláris jelátviteli útvonalak felé.

3. Vizsgáljuk az agyban és a humán tumorok többségében előforduló Kv10.1 ioncsatorna szerkezetét és kapuzását. A csatorna közelmúltban publikált krio-EM szerkezete számos, a konvencionálistól eltérő elemet tárt fel, és német kollaborátoraink munkája alapján kapuzásának vizsgálata is váratlan felfedezéseket eredményezett. Kísérleteinkben a szerkezet alapján alkotott predikciókat kívánjuk kísérletesen ellenőrizni, illetve a nem-konvencionális kapuzási elemek részleteit feltárni. Ehhez a VCF-en felül bevezettük a laborban Substituted Cysteine Accessibility Method módszert, ahol a fehérje célzott aminosavát ciszteinre cserélve, metántioszulfonát MTS) reagensekkel vizsgáljuk annak a vizes oldatok felőli hozzáférhetőségét a fehérje különböző konformációs állapotaiban.

ÖSSZEFOGLALÁS

A feszültség-függő K⁺ és Na⁺ csatornákkal kapcsolatosan az alábbi új megállapításokat tettük:

- A Kv csatornákban a hiperpolarizációt követően az aktivációs kapu záródása minden esetben megelőzi a VSD visszatérését. Fiziológiás körülmények között az aktivációs kapu minimális töltést hordozva, de igen gyorsan, és a permeáló ion fajtájától függő sebességgel záródik be, és a VSD visszatérése jóval lassabban ezt követően történik meg. Hosszú depolarizációt követően azonban az inaktiváció hatására a csatorna záródása lassúvá, s ezzel sebességmeghatározóvá válik, ezáltal hátráltatva a VSD visszatérését a nyugalmi állapotba.
- Intracellulárisan a protonok gátolják a K_V csatornákat már fiziológiás pH tartományban is, aminek élettani relevanciája is lehet. Az extracelluláris oldalról viszont csak jóval alacsonyabb pH tartományban befolyásolják az inaktiváció mechanizmusát, felgyorsítva azt. Ez a hatás mégis releváns lehet alacsony extracelluláris pH-jú, pl. gyulladásos területeken, mivel a töltés-árnyékolási effektussal együtt a csatornák aktivációját hátráltatva, inaktivációját pedig felgyorsítva lényegesen csökkentheti a K⁺ konduktanciát.
- Egy egyszerű modellel sikerült megmagyaráznunk a Kv1.3 csatorna szokatlan inaktivációs kinetika változását alacsony extracelluláris pH esetén: az alacsony pH-n protonált H399-es aminosav gátolja a K⁺ ionok mozgását mindkét irányba a pórus bejáratánál. Emiatt az alacsony pH hatása az inaktivációs kinetikára attól függ, hogy a kötőhely betöltődése elsősorban melyik oldalról történik az áramirány és K⁺ koncentráció függvényében.
- Több K_v1.3 csatornát gátló skorpió toxint azonosítottunk, melyek közül a legjobb tulajdonságú Vm24 K_d = 2,9 pM hatékonysággal gátol. Továbbá gátolja a T-sejtek Ca²⁺ jelét, proliferációját, CD25 expresszióját, valamint patkányokban gátolja a késői hiperszenzitivitási reakciót *in vivo*. A demonstrált tulajdonságok alapján a Vm24 az eddig ismert egyik legjobb tulajdonságú K_v1.3 csatorna gátlószer.
- Célzott mutációkkal sikerült az anuroctoxin Kv1.3 iránti szelektivitását nagy mértékben javítani az affinitás megtartása mellett, s ezzel egy lényegesen jobb tulajdonságú toxint előállítani.
- Elsőként írtuk le a humán szívizom akciós potenciáljának alakításában kulcsszerepet játszó Nav1.5 csatorna feszültség-érzékelő doménjeinek feszültség-függését, aktivációs és deaktivációs kinetikáját és ezek függését az inaktiváció mértékétől a VCF technika segítségével. Megállapítottuk, hogy a VSD-k nagyon széles feszültség-tartományban aktiválódnak, és nem szükséges az összes VSD teljesen aktivált állapota a csatorna nyitásához.
- Karakterizáltuk két, Brugada-szindrómát okozó hNav1.5 mutáns defektív kapuzási mechanizmusát domén szinten.

- Tisztáztuk a DIII- és DIV-VSD-k eddig ellentmondásos szerepét az Nav1.5 inaktivációjában. Megállapítottuk, hogy a szív akciós potenciáljának időtartományában elsősorban a DIII-VSD határozza meg az inaktivációból való visszatérés kinetikáját, és felállítottunk egy modellt az inaktiváció kialakulásának és az abból való visszatérésnek a mechanizmusáról.
- Létrehoztuk vezetésemmel az MTA-DE NAP B "Ioncsatorna funkcionális szerkezetvizsgáló laboratóriumot" a DE ÁOK Biofizikai és Sejtbiológiai intézetében. A létrejött kutatási infrastruktúra felhasználásával a feszültség-kapuzott K⁺ csatornák doménjeinek izolált mozgását, ill. a domének közötti kommunikációt vizsgáljuk a feszültség-zár fluorometria módszerrel elsőként az országban.

GYAKORLATI JELENTŐSÉG

Figyelembe véve, hogy a feszültség-függő K⁺ és Na⁺ csatornák az emberi szervezet szinte minden sejtjében jelen vannak, és a membránpotenciálon keresztül kihatnak a sejtfunkciók széles skálájára, nem kérdéses, hogy e csatornák kapuzását befolyásoló tényezők megértése túlmutat a molekula működésének egyszerű biofizikai leírásán. A kóros folyamatokban előforduló lokális ionkoncentráció vagy pH változások, illetve a csatornagénben előforduló mutációk nagy mértékben módosíthatják a csatornák kapuzását, melyek részben magyarázhatják például az ilyen területen működő idegsejtek tüzelési válaszában, vagy az immunsejtek proliferációs képességében beállt változásokat. A mechanizmusok részletes ismerete megteremtheti a lehetőségét a későbbi farmakológiai beavatkozásoknak, illetve betegség-specifikus csatornamodulátor molekulák tervezésének.

A T-sejtek $K_V 1.3$ ioncsatornájának nagy affinitású és szelektivitású peptid toxin gátlószerei kiinduló molekulaként szolgálhatnak bizonyos autoimmun betegségek kezelésére fejlesztendő gyógyszerek számára. *In vivo* állatkísérletek már bizonyították az ilyen toxinokból fejlesztett, de kémiailag stabilabbá tett és csökkentett immunogenecitású molekulák hatékonyságát a T-sejt mediált autoimmun kórképek tüneteinek enyhítésében.

KÖZLEMÉNYEK

A PHD FOKOZAT MEGSZERZÉSE ELŐTTI KÖZLEMÉNYEK:

Első vagy utolsó szerzős:

Varga Z, Bene L, Pieri C, Damjanovich S, Gaspar R J r
 The effect of juglone on the membrane potential and whole-cell K+ currents of human lymphocytes.
 BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 218: pp. 828-832.
 (1996); IF: 2,872

társszerzős:

Gaspar R J r, Varga Z, Bene L, Marcheselli F, Pieri C, Damjanovich S
 Effect of acetylcholine on the electrophysiology and proliferative response of human lymphocytes.
 BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 226: pp. 303-308.
 (1996); IF: 2,872

 Peter M, Varga Z, Panyi G, Bene L, Damjanovich S, Pieri C, Possani LD, Gaspar R Pandinus imperator scorpion venom blocks voltage-gated K+ channels in human lymphocytes.
 BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 242: pp. 621-625. (1998); IF: 2,780

4. Berecki G, Varga Z, van Iren F, van Duijn BAnion channels in chara corallina tonoplast membrane: calcium dependence and rectification.JOURNAL OF MEMBRANE BIOLOGY 172: pp. 159-168. (1999); IF: 3,187

5. Peter M, Hajdu P, Varga Z, Damjanovich S, Possani LD, Panyi G, Gaspar R
Blockage of human T lymphocyte Kv1.3 channels by Pi1, a novel class of scorpion toxin.
BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 278: pp. 34-37.
(2000); IF: 3,055

A PhD értekezés előtti közlemények összesített impakt faktora: 14,766

A TÉZISEK ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK:

Első vagy utolsó szerzős:

Panyi G, Possani LD, Rodriguez de la Vega RC, Gaspar R, Varga Z
 K+ channel blockers: novel tools to inhibit T cell activation leading to specific immunosuppression.
 CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN 12:(18) pp. 2199-2220. (2006); IF: 5,270

Varga Z, Hajdu P, Panyi G, Gaspar R, Krasznai Z
 Involvement of membrane channels in autoimmune disorders.
 CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN 13:(24) pp. 2456-2468. (2007); IF: 4,868

3. Somodi S, Hajdu P, Gaspar R, Panyi G, Varga Z
Effects of changes in extracellular pH and potassium concentration on Kv1.3 inactivation.
EUROPEAN BIOPHYSICS JOURNAL 37:(7) pp. 1145-1156. (2008); IF: 2,409

4. Varga Z, Hajdu P, Panyi G
Ion channels in T lymphocytes: an update on facts, mechanisms and therapeutic targeting in autoimmune diseases.
IMMUNOLOGY LETTERS 130:(1-2) pp. 19-25. (2010); IF: 2,511

5. Varga Z, Gurrola-Briones G, Papp F, de la Vega RCR, Pedraza-Alva G, Tajhya RB, Gaspar R, Cardenas L, Rosenstein Y, Beeton C, Possani LD, Panyi G
Vm24, a Natural Immunosuppressive Peptide, Potently and Selectively Blocks Kv1.3 Potassium Channels of Human T Cells.
MOLECULAR PHARMACOLOGY 82:(3) pp. 372-382. (2012) ; IF: 4,411

6. Bartok A, Toth A, Somodi S, Szanto TG, Hajdu P, Panyi G, Varga Z Margatoxin is a non-selective inhibitor of human Kv1.3 K+ channels. TOXICON 87:6-16. (2014); IF: 2,492

7. Varga Z, Zhu W, Schubert AR, Pardieck JL, Krumholz A, Hsu EJ, Zaydman MA, Cui J, Silva JR Direct Measurement of Cardiac Na+ Channel Conformations Reveals Molecular Pathologies of Inherited Mutations.

CIRCULATION: ARRHYTHMIA AND ELECTROPHYSIOLOGY 8:(5) pp. 1228-1239. (2015); IF: 4,428

 Bartok A, Feher K, Bodor A, Rakosi K, Toth GK, Kover KE, Panyi G, Varga Z An engineered scorpion toxin analogue with improved Kv1.3 selectivity displays reduced conformational flexibility.
 SCIENTIFIC REPORTS 5: p. 18397. (2015); IF: 5,228

9. Varga Z, Rayner M D, Starkus J G

Cations affect the rate of gating charge recovery in wild-type and W434F Shaker channels through a variety of mechanisms.

JOURNAL OF GENERAL PHYSIOLOGY 119: pp. 467-485. (2002); IF: 5,193

társszerzős:

10. Starkus J G, Varga Z, Schonherr R, Heinemann S H
Mechanisms of the inhibition of Shaker potassium channels by protons.
PFLÜGERS ARCHIV FÜR DIE GESAMTE PHYSIOLOGIE DES MENSCHEN UND DER TIERE
447: pp. 44-54. (2003); IF: 2,063

11. Panyi G, Varga Z, Gaspar RIon channels and lymphocyte activation.IMMUNOLOGY LETTERS 92: pp. 55-66. (2004); IF: 2,136

12. Bagdany M, Batista C V, Valdez Cruz N A, Somodi S, Rodriguez de la Vega R C, Licea A F, Varga Z, Gaspar R, Possani L D, Panyi G
Anuroctoxin, a new scorpion toxin of the alpha-KTx 6 subfamily, is highly selective for Kv1.3 over IKCa1 ion channels of human T lymphocytes.
MOLECULAR PHARMACOLOGY 67: pp. 1034-1044. (2005); IF: 4,612

13. Olamendi Portugal T, Somodi S, Fernandez J A, Zamudio F Z, Becerril B, Varga Z, Panyi G, Gaspar R, Possani L D
Novel alpha-KTx peptides from the venom of the scorpion Centruroides elegans selectively blockade
Kv1.3 over IKCa1 K+ channels of T cells.
TOXICON 46: pp. 418-429. (2005); IF: 2,255

14. Corzo G, Papp F, Varga Z, Barraza O, Espino-Solis PG, Rodriguez de la Vega RC, Gáspár R, Panyi G, Possani LD
A selective blocker of Kv1.2 and Kv1.3 potassium channels from the venom of the scorpion Centruroides suffusus suffusus.
BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY 76:(9) pp. 1142-1154. (2008); IF: 4,838

15. Papp F, Batista C F, Varga Z, Herceg M, Román-González S A, Gaspar R, Possani L D, Panyi G Tst26, a novel peptide blocker of Kv1.2 and Kv1.3 channels from the venom of Tityus stigmurus. TOXICON 54: pp. 379-389. (2009); IF: 2,128

16. Gurrola GB, Hernandez-Lopez RA, de la Vega RCR, Varga Z, Batista CVF, Salas-Castillo SP, Panyi G, del Rio-Portilla F, Possani LD

Structure, Function, and Chemical Synthesis of Vaejovis mexicanus Peptide 24: A Novel Potent Blocker of Kv1.3 Potassium Channels of Human T Lymphocytes. BIOCHEMISTRY 51:(19) pp. 4049-4061. p. 13 (2012); IF: 3,377

17. Rudokas MW, Varga Z, Schubert AR, Asaro AB, Silva JR
The Xenopus Oocyte Cut-open Vaseline Gap Voltage-clamp Technique With Fluorometry.
JOURNAL OF VISUALIZED EXPERIMENTS N/A:(85) doi: 10.3791/51040. (2014); IF: 1,325

18. Zhu W, Varga Z, Silva J RMolecular motions that shape the cardiac action potential: Insights from voltage clamp fluorometryPROGRESS IN BIOPHYSICS AND MOLECULAR BIOLOGY 120:(1-3) p. 3-17. (2016); IF: 2,581

19. Hsu EJ, Zhu W, Schubert AR, Voelker T, Varga Z, Silva JR Regulation of Na+ Channel Inactivation by the DIII and DIV Voltage-Sensing Domains JOURNAL OF GENERAL PHYSIOLOGY 149(3):389-403, (2017); IF: 4,511

A tézisek alapját képező közlemények összesített impakt faktora: 66,325

A PHD ÉRTEKEZÉST KÖVETŐ EGYÉB KÖZLEMÉNYEK:

Első vagy utolsó szerzős:

 Varga Z, Panyi G, Peter M J r, Pieri C, Csecsei G, Damjanovich S, Gaspar R J r Multiple binding sites for melatonin on Kv1.3.
 BIOPHYSICAL JOURNAL 80: pp. 1280-1297. (2001); IF: 4,636

2. Varga Z, Csepany T, Papp F, Fabian A, Gogolak P, Toth A, Panyi G
Potassium channel expression in human CD4+ regulatory and naive T cells from healthy subjects and multiple sclerosis patients.
IMMUNOLOGY LETTERS 124: pp. 95-101. (2009); IF: 2,906

3. Varga Z, Juhasz T, Matta C, Fodor J, Katona E, Bartok A, Olah T, Sebe A, Csernoch L, Panyi G, Zakany R
Switch of Voltage-Gated K+ Channel Expression in the Plasma Membrane of Chondrogenic Cells Affects Cytosolic Ca2+-Oscillations and Cartilage Formation.
PLOS ONE 6:(11) pp. 1-14. Paper e27957. (2011); IF: 4,092

4. Petho Z, Balajthy A, Bartok A, Bene K, Somodi S, Szilagyi O, Rajnavolgyi E, Panyi G, <u>Varga Z</u> The anti-proliferative effect of cation channel blockers in T lymphocytes depends on the strength of mitogenic stimulation.

IMMUNOLOGY LETTERS 171: pp. 60-69. (2016); IF: 2,483

5. Balajthy A, Hajdu P, Panyi G, Varga Z.
Sterol Regulation of Voltage-Gated K⁺ Channels.
CURRENT TOPICS IN MEMBRANES 80:255-292. (2017); IF: 2,976

Társszerzős:

6. Peter M, Varga Z, Hajdu P, Gaspar R, Damjanovich S, Horjales E, Possani LD, Panyi G Effects of toxins Pi2 and Pi3 on human T lymphocyte Kv1.3 channels: The role of Glu7 and Lys24. JOURNAL OF MEMBRANE BIOLOGY 179: pp. 13-25. (2001); IF: 2,787

7. Hajdu P, Varga Z, Pieri C, Panyi G, Gaspar R
Cholesterol modifies the gating of Kv1.3 in human T lymphocytes.
PFLÜGERS ARCHIV - EUROPEAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY 445: pp. 674-682. (2003);
IF: 2,063

8. Somodi S, Varga Z, Hajdu P, Starkus JG, Levy DI, Gaspar R, Panyi G
pH-dependent modulation of kv1.3 inactivation: role of His399.
AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-CELL PHYSIOLOGY 287: pp. C1067-C1076.
(2004); IF: 3,939

9. Panyi G, Vamosi G, Bacso Z, Bagdany M, Bodnar A, Varga Z, Gaspar R, Matyus L, Damjanovich S

Kv1.3 potassium channels are localized in the immunological synapse formed between cytotoxic and target cells.

PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 101: pp. 1285-1290. (2004); IF: 10,452

10. Vamosi G, Bodnar A, Damjanovich S, Nagy P, Varga Z, Damjanovich L

The role of supramolecular protein complexes and membrane potential in transmembrane signaling processes of lymphocytes.

IMMUNOLOGY LETTERS 104: pp. 53-58. (2006), IF: 2,352

11. Detre C, Kiss E, Varga Z, Ludanyi K, Paszty K, Enyedi A, Kovesdi D, Panyi G, Rajnavolgyi E, Matko J

Death or survival: Membrane ceramide controls the fate and activation of antigen-specific T-cells depending on signal strength and duration.

CELLULAR SIGNALLING 18:(3) pp. 294-306. (2006); IF: 4,887

12. Zhu W, Voelker TL, Varga Z, Schubert AR, Nerbonne JM, Silva JR.
Mechanisms of noncovalent β subunit regulation of Nav channel gating.
JOURNAL OF GENERAL PHYSIOLOGY, 2017 Jul 18. pii: jgp.201711802. doi: 10.1085/jgp.201711802. [Epub ahead of print]; IF: 4,200

13. Feher K, Timari I, Rakosi K, Szolomajer J, Illyes T, Bartok A, Varga Z, Panyi G, Toth G, Kover K

Probing pattern and dynamics of disulfide bridges using synthesis and NMR of an ion channel blocker peptide toxin with multiple diselenide bonds.

CHEMICAL SCIENCE 7:(4) pp. 2666-2673. (2016); IF: 9,144

14. Balajthy A, Somodi S, Pethő Z, Péter M, Varga Z, Szabó GP, Paragh G, Vígh L, Panyi G, Hajdu P

7DHC-induced changes of Kv1.3 operation contributes to modified T cell function in Smith-Lemli-Opitz syndrome.

PFLUGERS ARCHIV 468(8):1403-18, (2016); IF: 3,654

15. Pajtás D, Kónya K, Kiss-Szikszai A, Džubák P, Pethő Z, Varga Z, Panyi G, Patonay T. Optimization of the Synthesis of Flavone-Amino Acid and Flavone-Dipeptide Hybrids via Buchwald-Hartwig Reaction.

JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY 82(9):4578-4587, (2017); IF: 4,849

A PhD fokozat megszerzését követő egyéb közlemények összesített impakt faktora: 65,420

Az összes közlemény impakt faktora: 146,511 Független hivatkozás: 618

KÖNYVFEJEZETEK

1. Bartok A., Panyi G., Varga Z. Potassium Channel-Blocking Peptide Toxins from Scorpion Venom. In: Toxinology, DOI 10.1007/978-94-007-6647-1_30-1, Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

2. Varga Z. és Gaspar R.Jr. Signal transduction by ion channels in lymphocytes. In: Biophysical aspects of transmembrane signaling. Damjanovich, S. (ed.), Springer Verlag, Berlin, (2005) pp. 293-315.

3. Panyi Gy., Somodi S., Varga Z., Hajdú P., Pieri C., Pandi-Perumal S.R., Damjanovich S., Gáspár R. Pharmacological effects of melatonin on ion channels. In: Treatsie on Pineal Gland and Melatonin, Ed.: Chandana Haldar et al., Oxford & IBH Publishing Co. (2002) pp. 489-506

4. Péter M., Varga Z., Krasznai Z., Panyi G., Gáspár R. Jr. Recording and analysis of membrane potential and ion currents in cultured peripheral human lymphocytes. In: Practical guide to physical analysis of cell surface receptors, Eds Krasznai Z., Mátyus L.,. Department of Biophysics and Cell Biology, University Medical School of Debrecen, Debrecen (1998) pp.1-16.

5. Gaspar R. Jr., Varga Z., Panyi Gy., Krasznai Z., Pieri C., Damjanovich S. Measurement and analysis of different aspects of potassium currents in human lymphocytes. In: Signal Transduction. Single cell techniques Eds. Bert van Duijn and Anneke Wiltink, Springer Verlag, (1997) pp. 214-235.