UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Anja BALANT

IZOLACIJA BLOKATORJEV K⁺ KANALČKOV IZ MORSKE VETRNICE Urticina crassicornis

DIPLOMSKO DELO Univerzitetni študij

ISOLATION OF K⁺ CHANNEL BLOCKATOR FROM SEA ANEMONE Urticina crassicornis

GRADUATION THESIS University studies Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije, na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za biokemijo Oddelka za biologijo.

Študijska komisija je za mentorja imenovala prof. dr. Toma Turka.

Komisija za oceno in zagovor diplomske naloge:

Predsednica:	prof. dr. Kristina SEPČIĆ Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Član:	prof. dr. Tom TURK Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Član:	prof. dr. Gregor ANDERLUH Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 23. 12. 2009

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje diplomske naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je elektronska oblika naloge identična tiskani verziji.

Anja Balant

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn

- DK 577.1:593.65(043.2) = 163.6
- KG toksin, morska vetrnica, kalijev kanalček, površinska plazmonska resonanca, sinaptosomi

KK

- AV BALANT, Anja
- SA TURK, Tom (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2009
- IN IZOLACIJA BLOKATORJEV K⁺ KANALČKOV IZ MORSKE VETRNICE Urticina crassicornis
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XII, 109 str., 3 pregl., 38 sl., 3 pril., 183 vir.
- IJ Sl
- JI sl/an
- AI Z ustaljenimi metodami za izolacijo blokatorjev kalijevih kanalčkov smo iz morske vetrnice Urticina crassicornis uspeli izolirati aktivne peptidne vzorce. Aktivnost peptidov v izoliranih vzorcih smo preverili s tehnologijo SPR (površinska plazmonska resonanca) – izolirane vzorce smo vodili prek površine čipa z imobiliziranimi sinaptosomi. Od peptidnih vzorcev prve izolacije toksinskih blokatorjev kalijevih kanalčkov smo aktivnost dokazali vzorcu B, ki nam je dalje služil kot orientacijsko območje vsebnosti toksina v kromatogramih. Glede na bližino v retencijskemu času vzorca B prve izolacije smo izbrali posamezne RP-HPLC vrhove druge izolacije aktivnih peptidov ter jim z uporabo masne spektrometrije določili molekulske mase peptidov v vzorcih. Izkazalo se je, da so vsi vzorci vsebovali nekaj primesi drugih peptidov. Peptide z molekulsko maso okrog 4000 Da, kar je značilnost K_v1 blokatorjev morskih vetrnic, so vsebovali vzorci F, G in H. Med njimi je bil najbolj čist vzorec F. Izmerjena molekulska masa potencialnih aktivnih peptidov v vzorcih F in G je bila 3840 Da, v vzorcu H pa 3894 Da. Vsem trem testiranim vzorcem smo potrdili aktivnost na sinaptosome. Vzorcema F in H smo z uporabo N-terminalne Edmanove degradacije določili zaporedje aminokislin. Analiza zaporedij aktivnih vzorcev nakazuje na homologijo izoliranih peptidov z drugimi toksini morskih vetrnic tipa 1, ki blokirajo K_v1 tip napetostno-odvisnih kalijevih kanalčkov, a se od njih tudi pomembno razlikujeta.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC 577.1:593.65(043.2) = 163.6
- CX toxin, sea anemone, potassium channel, surface plasmon resonance
- CC
- AU BALANT, Anja
- AA TURK, Tom (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY 2009
- TI ISOLATION OF K⁺ CHANNEL BLOCKATORS FROM Urticina crassicornis
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO XII, 109 p., 3 tab., 38 fig., 3 ann., 183 ref.
- LA Sl
- AL sl/en
- AB With the use of custom methods for isolation potassium channel blockers we managed to isolate active peptide samples from sea anemone Urticina crassicornis. Activity of peptides in isolated samples were examined with the SPR technology (surface plasmon resonance) - isolated samples were guided over the surface of sensor chip with immobilized synaptosomes. From peptide samples of the first isolation potassium channel modulator was detected in sample B that latter served as orientation region of located toxin in chromatograms. With respect of the retention time of sample B from the first isolation, individual RP-HPLC peaks from the second isolation of active peptides were selected for molecular mass measurements with mass spectrometry. It was determined that all samples were slightly contaminated with other peptides. Samples F, G and H contained peptides with molecular mass round 4000 Da which is typical for sea anemone's K_v1 blockers. Among them the purest sample was sample F. Determined molecular mass of active peptides were 3840 Da in sample F and G and 3894 Da in sample H, respectively. We have shown that all tested samples bond to synaptosomes. By means of Nterminal Edman degradation we determined amino acid sequences of peptides in samples F and H. Sequence analysis of peptides found in active samples showed a partial homology to known sea anemones' type 1 toxins that block K_v1 voltagegated potassium channels, but also revealed some significant differences.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	str. III	
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV	
KATALO VSEDINE		
KAZALO PREGLEDNIC	VIII	
KAZALO SLIK		
KAZALO PRILOG	XI	
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI		
1 UVOD		
2 PREGLED OBJAV		
2.1 KALIJEVI (K+) KANALČKI IN NJIHOVI BLOKATORJI		
2.1.1 Toksinski blokatorji K ⁺ kanalčkov		
2.1.1.1 Aktivna diada		
2.1.1.2 Obroč bazičnih aminokislinskih ostankov		
2.1.1.3 Disulfidne povezave		
2.1.1.4 Blokiranje pore kanalčkov	15	
2.1.1.5 Vrste toksinskih blokatorjev napetostno-odvisnih K ⁺ kanalčkov		
2.1.1.5.1 Dendrotoksini		
2.1.1.5.2 Škorpijonski toksini in toksini morskih vetrnic		
2.2 SINAPTOSOMI		
2.3 TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC).		
2.4 POVRŠINSKA PLAZMONSKA RESONANCA (SPR)		
2.5 NAMEN DIPLOMSKEGA DELA		
3 MATERIAL IN METODE		
3.1 MATERIALI		
3.1.1 Živalski material		
3.1.2 Kemikalije		
3.1.3 Raztopine za HPLC		
3.1.4 Toksini		
3.1.5 Raztopine za izolacijo sinaptosomov		
3.2 METODE		
3.2.1 Izolacija toksinov iz morske vetrnice		

	3.2	2.1.1	Homogenizacija, obarjanje, odparitev acetona	32
	3.2	2.1.2	Ekstrakcija na trdnem nosilcu	32
	3.2	2.1.3	Frakcioniranje s kationsko izmenjevalno TSK-GEL kolono za tekočins	sko
	kro	omatog	rafijo visoke ločljivosti (HPLC)	33
	3.2	2.1.4	Filtriranje in koncentriranje	33
	3.2	2.1.5	BCA Protein Assay Kit	34
	3.2	2.1.6	Elektroforeza na poliakrilamidnem peptidnem gelu z natrijevim dodec	il
	sul	fatom	(NaDS-PAGE)	34
	3.2	2.1.7	Test hemolize	35
	3.2	2.1.8	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z obrnjeno fazo (RP-HPL	LC)35
	3.2.2	Ma	isna spektrometrija	35
	3.2.3	Pri	prava sinaptosomov	36
	3.2	2.3.1	Izolacija sinaptosomov (6 h)	36
	3.2	2.3.2	Izolacija sinaptosomov po hitrem postopku (2 h)	38
	3.2.4	Pro	everjanje uspešnosti izolacije	38
	3.2.5	Ve	zava vzorcev na sinaptosome	39
	3.2	2.5.1	Vezava vzorcev prve izolacije	39
	3.2	2.5.2	Vezava vzorcev druge izolacije	39
	3.2	2.5.3	Specifična vezava toksina ShK	41
	3.2	2.5.4	Obdelava rezultatov eksperimentalnega dela na aparatu Biacore X	41
	3.2.6	Do	ločanje aminokislinskega zaporedja	42
4	REZU	LTAT	Ι	43
	4.1 IZ	ZOLA	CIJA PEPTIDNIH BLOKATORJEV K ⁺ KANALČKOV	43
	4.2 M	IASNI	SPEKTRI	46
	4.3 IZ	ZOLA	CIJA SINAPTOSOMOV	50
	4.4 V	EZAV	A KONTROLNIH TOKSINOV NA SINAPTOSOME	. 51
	4.4.1	Ne	specifična, totalna in specifična vezava ShK	. 51
	4.4.2	Ko	ncentracijska odvisnost ShK	53
	4.5 V	EZAV	A IZOLIRANIH PEPTIDOV NA SINAPTOSOME	54
	4.5.1	Ve	zava peptidnih vzorcev prve izolacije	. 54
	4.5.2	Ve	zava peptidnih vzorcev druge izolacije	56
	4.6 D	OLOČ	TITEV AMINOKISLINSKEGA ZAPOREDJA IZBRANIH PEPTIDOV	. 61
5	RAZP	RAVA	IN SKLEPI	61
	5.1 R	AZPR	AVA	61

	5.1	1.1 Sinaptosomi	
	5.2	SKLEPI	
6	VIF	RI	
	6.1	DRUGI VIRI	

ZAHVALA PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

		str.
Preglednica 1.	Masne koncentracije proteinov, fosfolipidov in holesterola v sinaptosomih	
-	krajše in daljše izolacije. Slednji imajo precej nižje masne koncentracije	50
Preglednica 2.	Toksini mamb in morskih vetrnic ter njihove tarčne podenote tetramernih	
	kalijevih kanalčkov. Križec označuje interakcije med toksinom in tarčno	
	podenoto. Poševna črtica označuje, da toksin nima učinka na kanalno	
	podenoto	2
Preglednica 3.	Škorpijonski inhibitorji kalijevih kanalčkov ter njihove tarčne podenote.	
	Križec označuje interakcije med toksinom in tarčno podenoto tetramernih	
	kalijevih kanalčkov.	3
	kalijevih kanalčkov.	3

KAZALO SLIK

		str.
Slika 1.	Shema posamezne podenote napetostno-odvisnega KvAP kanalčka.	4
Slika 2.	Struktura bakterijskega kalijevega kanalčka.	6
Slika 3.	Modela odprte in zaprte konformacije kalijevih kanalčkov.	9
Slika 4.	Kristalna struktura napetostnega senzorja KvAP kanalčka	. 10
Slika 5.	Aktivna diada in obroč bazičnih aminokislinskih ostankov	. 13
Slika 6.	Predstavitev gradbenih struktur toksinov morskih vetrnic in škorpijonov, ki	
	blokirajo tok skozi napetostno-odvisne Kv1 kalijeve kanalčke	. 19
Slika 7.	Struktura toksina BgK iz morske vetrnice Bunodosoma granulifera	. 23
Slika 8.	Primerjava zaporedij aminokislin izoliranih polipeptidnih nevrotoksinskih	
	blokatorjev Kv1 tipa napetostno-odvisnih kalijevih kanalčkov	. 24
Slika 9.	Struktura toksinov ShK, α-dendrotoksina in KTX1	. 25
Slika 10.	Shema postavitve gradientno ločenih sinaptosomov z ultracentrifugiranjem	1
Slika 11.	Osnovni eksperimentalni potek (pretočna celica 2)	. 40
Slika 12.	Frakcioniranje s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) na	
	kationskem izmenjevalcu.	. 43
Slika 13.	NaDS poliakrilamidni peptidni gel po tekočinski kromatografiji visoke ločljivost	i
	na kationskem izmenjevalcu TSK GEL.	. 44
Slika 14.	Čiščenje s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti z reverzno fazo (RP-HPL	.C).
		. 45
Slika 15.	Masni spekter vzorca F	. 47
Slika 16.	Masni spekter vzorca G.	. 48
Slika 17.	Masni spekter vzorca H.	. 49
Slika 18.	Preverjanje nespecifične vezave toksina ShK (uporabili smo sinaptosome daljšeg	ga
	postopka izolacije).	. 51
Slika 19.	Totalna vezava ShK na sinaptosome daljšega postopka izolacije	. 52
Slika 20.	Koncentracijsko-odvisna vezava ShK na imobilizirane sinaptosome, izolirane po)
	krajšem postopku izolacije.	. 53
Slika 21.	Enominutni nanos RP-HPLC vzorca B prve izolacije aktivnih peptidov na	
	sinaptosome, izolirane po daljšem postopku izolacije	. 55
Slika 23.	Vezava 13 nM vzorca G (4-krat redčen).	. 57
Slika 24.	Vezava 40 nM ShK po vezavi 13 nM vzorca G (4-krat redčen).	. 58
Slika 27.	Primerjava zaporedja aminokislin izoliranih peptidnih vzorcev F in H iz Urticina	l
	crassicornis z zaporedji nevrotoksinskih blokatorjev Kv1 tipa napetostno-odvisni	ih
	kalijevih kanalčkov	. 65
Slika 28.	Podrobnejša primerjava aminokislinskih ostankov zaporedij izoliranih vzorcev F	in
	H z zaporedjem toksina ShK.	. 67
Slika 29.	Frakcioniranje s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) na	
	kationskem izmenjevalcu (prva izolacija aktivnih peptidov)	5
Slika 30.	RP-HPLC ločevanje vzorca 3 s kationsko izmenjevalne HPLC prve izolacije	
	aktivnih peptidov	6
Slika 31.	RP-HPLC ločevanje vzorca 4 s kationsko izmenjevalne HPLC prve izolacije	
	aktivnih peptidov	7
Slika 32.	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z reverzno fazo. Določitev	
	retencijskega časa kontrolnega toksina ShK.	8
Slika 33.	Masni spekter vzorca D.	. 10
Slika 34.	Masni spekter vzorca J.	. 11
Slika 35.	Masni spekter vzorca L	. 12
Slika 36.	Masni spekter vzorca N.	. 13

Slika 37.	Masni spekter vzorca O; prvi del	14
Slika 38.	Masni spekter vzorca O; drugi del	15

KAZALO PRILOG

Priloga A	Toksini različnih izvorov in njihove tarčne podenote kalijevih kanalčkov
Priloga B	Ločevanje peptidnih vzorcev prve izolacije blokatorjev K ⁺ kanalčkov
Priloga C	Masni spektri peptidov po ločbi z RP-HPLC druge izolacije blokatorjev K ⁺ kanalčkov

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BSA	goveji serumski albumin (ang. bovine serum albumin)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. high pressure liquid
	chromatography)
NaCl	natrijev klorid
NaOH	natrijev hidroksid
PMSF	fenilmetilsulfonil fluorid (ang. phenylmethylsulfonyl fluoride)
RU	odzivne enote (ang. response units)
RP-HPLC	HPLC z obrnjeno fazo
NaDS	natrijev dodecilsulfat
SPR	površinska plazmonska resonanca (ang. surface plasmon resonance)
TFA	trifluorocetna kislina
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan (= 2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol)

1 UVOD

Organizmi so skozi evolucijo razvili številne obrambne mehanizme in vedenjske vzorce, ki jim zagotavljajo preživetje in dotok hrane. Eden od mehanizmov je sposobnost sinteze aktivnih kemičnih snovi, t.i. toksinov. Strup organizmov je sestavljen iz več različnih komponent, ki na podlagi aditivnega, potenciacijskega, sinergističnega ali antagonističnega delovanja delujejo obrambno ali plenilsko.

Vsebino strupov so začeli raziskovati predvsem zaradi nekaterih hudih zastrupitev. Odkrivanje protistrupov je bilo glavno vodilo, ki je znanost pripeljalo do množičnejših raziskav strukture in funkcije toksinskih komponent. Toksini služijo kot modelne molekule, s katerimi preučujemo telesu lastne morfološke značilnosti in fiziološke mehanizme. V zadnjem času vse več toksinov testirajo na imunološko in protitumorsko aktivnost.

Vzporedno z raziskavami že znanih toksinov, poteka tudi odkrivanje novih, nam še nepoznanih toksinskih komponent. Precej raziskovalnih skupin po svetu se ukvarja z odkrivanjem potencialnih blokatorjev K⁺ kanalčkov, saj so kalijevi kanalčki pomembne sestavine celice in prispevajo k celični homeostazi. S pomočjo njihovih blokatorjev pa lahko preučujemo lastnosti in mehanizme delovanja kanalčkov.

V okviru diplomskega dela smo poskušali izolirati enega ali več polipeptidnih blokatorjev K^+ kanalčkov iz morske vetrnice *Urticina crassicornis* in razviti metodo za merjenje njihove aktivnosti s pomočjo površinske plazmonske resonance (SPR).

2 PREGLED OBJAV

2.1 KALIJEVI (K⁺) KANALČKI IN NJIHOVI BLOKATORJI

Kalijevi kanalčki so proteinske molekule, ki prevajajo K⁺ ione skozi celično membrano v smeri elektrokemičnega gradienta za kalij (K⁺). Prevodnost kalija vpliva na mnoge različne celične procese, vključno z regulacijo celične prostornine (osmoregulacijo), sekrecijo hormonov, oblikovanjem električnega impulza v električno-vzdražnih celicah. Tako kalijeve kanalčke najdemo v vseh celicah, kjer prispevajo k regulaciji membranskega potenciala. Posamezna celica lahko izraža različne tipe in podtipe K⁺ kanalčkov, ki se lahko odpirajo kot odgovor na spremembo v napetosti na membrani ali kot odgovor na vezavo specifičnega liganda, ki je lahko ion (znotrajcelična raven Ca^{2+}), majhna organska molekula, v nekaterih primerih pa protein (določene G-proteinske podenote v celici). Poleg razlike v načinu aktivacije, imajo kalijevi kanalčki na ohranjeno enoto pore priključene različne strukturne domene. Od ligandov odvisni kalijevi kanalčki imajo za vezavo ligandov posebne citoplazemske ali zunajcelične domene, napetostno-odvisni K⁺ kanalčki pa napetostne razlike zaznavajo z integralnimi membranskimi domenami. Kljub njihovi raznolikosti so si kalijevi kanalčki še vedno izjemno podobni in jih uvrščamo v isto družino proteinov. Najdemo jih v bakterijskih, arhejskih in evkariontskih celicah - tako rastlinskih kot živalskih (Miller, 1991; Catterall, 1995; MacKinnon, 2003; Catterall in sod., 2007).

Najpogosteje so v celicah zastopani napetostno-odvisni K⁺ kanalčki (K_v tip K⁺ kanalčkov) (Miller, 1991; Catterall, 1995; MacKinnon, 2003). Za enkrat poznamo okrog 40 različnih napetostno-odvisnih kalijevih kanalčkov, ki jih glede na homologijo aminokislinskega zaporedja uvrščamo v 12 različnih poddružin K_v1-12 (Gutman in sod., 2003]). K_v kanalčki imajo podobno sekundarno strukturo; so tetramerne molekule, osnovane iz štirih, med seboj povezanih, identičnih ali sorodnih podenot, ki s 4-kratno simetrijo obkrožajo centralno prevodno pot za ione (Doyle in sod., 1998; Zhou in sod., 2001). α -podenote (K_v1-12) se tako sestavljajo v homo- ali heterotetramere, kar vodi do velikega števila različnih kompleksov (Catterall in sod., 2007). Tetramerizacija podenot je sicer omejena na predstavnike določenih razredov (tj. K_v1 podenote se ne povezujejo s K_v2, K_v3 ali K_v4 podenotami), kar pa bistveno ne zmanjšuje števila domnevnih funkcionalnih kombinacij z različnimi biofizikalnimi in farmakološkimi lastnostmi. Poleg omenjenih, so določili tudi dodatne podenote kalijevih kanalčkov, ki, kadar so izražene skupaj s poro-formirajočimi podenotami, vodijo do znatnih sprememb biofizikalnih in/ali farmakoloških lastnosti posameznega kanalčka. Ta fenomen še dodatno prispeva k stopnji kompleksnosti in raznolikosti kalijevih kanalčkov (Garcia in sod., 1998). Nekateri razredi kanalčkov, K_v8 in K_v9, sami po sebi ne izražajo aktivnosti, značilne za ionske kanalčke; izražajo pa jo, kadar so podenote omenjenih kanalčkov izražene skupaj s K_v2 podenotami (Garcia in sod., 1998).

Znotraj poddružine K_v1 podenot ločujemo sedem podtipov α -podenot ($K_v1.1$ do $K_v1.7$) (Pongs, 1999). Vsaka različna podenota je pri sesalcih kodirana s svojim genom. Le-ti se heterogeno izražajo v različnih tkivih (Cotton in sod., 1997). $K_v1.5 \alpha$ -podenote prevladujejo v srčnem tkivu (Roberds in sod., 1991), medtem ko nevroni osrednjega živčnega sistema izražajo preostale podenote, še posebno $K_v1.1$ in $K_v1.2$ (Veh in sod., 1995).

Vsaka od štirih podenot, ki obkrožajo osrednjo ionsko prevodno pot, je sestavljena iz šestih transmembranskih α -heliksov (S1-S6) ter ima oba, amino- in karboksilni konec, na znotrajcelični strani membrane, pri čemer je karboksilni konec bližje pori, amino konec pa bližje membrani (Slika 1). Prvi štirje transmembranski α -heliksi (S1-S4) oblikujejo napetost-zaznavajočo domeno, medtem ko zadnja dva transmembranska α -heliksa (S5-S6) skupaj z vmesno porno zanko (P) oblikujeta strukturno ohranjeno porno domeno (S6 je notranja vijačnica, ki obroblja večino pore). Podenote K_v kanalčkov so tako sestavljene iz dveh različnih, a funkcijsko sklopljenih transmembranskih domen. Porna domena (ang. »pore domain«) je odgovorna za ionsko selektivnost in prevodnost kalijevih ionov. Napetostno-občutljiva domena (ang. »voltage-sensing domain« ali »voltage sensor domain«) pa sproži konformacijsko spremembo porne domene kot odgovor na spremembo v transmembranski napetosti (Sands in sod., 2005).

Napetostno-odvisni (K_v) kanalčki so v zaprti konformaciji, kadar je celična membrana polarizirana (tj. napetost celične notranjosti je negativna v primerjavi z zunanjostjo). Ko se celična membrana depolarizira (tj. notranjost celice postane pozitivno nabita v primerjavi z zunanjostjo), se K_v kanalčki hipoma odpro (<1 ms) in s tem dovolijo pasivni pretok

kalijevih ionov K^+ v smeri njihovega elektrokemijskega gradienta pri skoraj difuzijskih hitrostih (~10⁻⁸ ionov/sekundo) (Sands in sod., 2005).



Slika 1. Shema posamezne podenote napetostno-odvisnega K_vAP kanalčka. (A) Transmembranska topologija podenote K_v kanalčka prikazuje senzor napetosti in porno domeno. Intaktni kanalček je sestavljen iz štirih takšnih podenot. Na sliki sta označeni zunajcelična (EC) in znotrajcelična (IC) stran membrane. (B) Struktura napetostno-občutljive domene bakterijskega napetostno-občutljivega K_vAP kanalčka. (C) Struktura porne domene K_vAP kanalčka (Sands in sod., 2005).

S5-S6 predel kalijevih kanalčkov je strukturno ohranjen (Gasparini in sod., 2004). Zasledimo ga v bakterijskem napetostno-neobčutljivem KcsA kanalčku, napetostnoodvisnem arhebakterijskem K_vAP kanalčku in K_v1 kanalčkih (Doyle in sod., 1998; Heginbotham in sod., 1999; Zhou in sod., 2001; Jiang in sod., 2003). Prva dva imata strukturo S5-S6 območja skoraj identično, med prvim in tretjim pa je identičnost zaporedja za to območje 30-odstotkov. Zaradi njihove velikosti so K_v1 kanalčki precej težavni za preučevanje. Zato, kot strukturni model za območje S5-S6 K_v1 kanalčkov, v raziskavah uporabljajo predvsem KcsA kanalček (Gasparini in sod., 2004). Le-tega uvrščamo med strukturno preprostejše tetramerne kanalčke z le dvema transmembranskima α -heliksoma – notranji je bližje ionski poti, zunanji pa hidrofobni membrani (Doyle in sod., 1998; Zhou in sod., 2001; MacKinnon, 2003). Med seboj ju povezuje območje P, porna zanka, ki oblikuje zunajcelični vhod v poro in selektivni filter. Slednji je najožji del pore. Oblikuje nekakšno cev s premerom 3 Å in dolžino 10-15 Å (Gasparini in sod., 2004). Kanalček je napetostno-neobčutljiv, pri čemer kaže enako selektivnost za K⁺ kot ostali kalijevi kanalčki (Århem, 2004).

Leta 1998 je MacKinnonu in njegovi skupini uspelo kristalizirati napetostno-neobčutljiv kanalček (KcsA) iz bakterije *Streptomyces lividans* in razkriti strukturo osrednje pore, ki je skupna vsem kalijevim kanalčkom. Delo skupine so leta 2003 nagradili z Nobelovo nagrado v kemiji. Osrednja pora vključuje selektivni filter in do 10 Å široko, z vodo napolnjen osrednji lumen, tega pa omejuje struktura, ki si jo predstavljamo kakor vrata iz svežnja štirih S6 segmentov na znotrajcelični strani pore (MacKinnon, 2003; Lee in sod., 2003; Århem, 2004).

Selektivni filter za K⁺ ione leži v zunajcelični tretjini ionske poti med osrednjo votlino in zunajcelično raztopino. Zagotavlja visoko selektivnost K⁺ kanalčka, pri čemer onemogoča vstop Na⁺ ionov (premer 0,95 Å) v kanalček, čeprav so le-ti po velikosti manjši od K⁺ ionov (premer 1,22 Å). S kristalno strukturo so dokazali, da imajo Na⁺ ioni onemogočen vstop v selektivni filter, četudi so le-ti v prebitku (Zhou in sod., 2001; Zhou in MacKinnon, 2003). Vzrok za več kot 1000-kratno preferenco selektivnega filtra za privzem K⁺ ionov pred Na⁺ ioni je izključno razlika v premeru iona (MacKinnon, 2003).

Mehanizem delovanja K⁺ kanalčkov je precej zapleten, namreč, visoka selektivnost in visoke prevodne lastnosti predstavljajo svojevrsten paradoks. Natančna koordinacija ionov, ki je potrebna za visoko selektivnost, ne sme imeti učinka močne vezave ionov, kar bi lahko preprečilo njihovo hitro difuzijo skozi poro.

Z vodo napolnjen lumen pore in orientirani α -heliksi prispevajo k pomembni lastnosti K^+ kanalčka: da bi bil K^+ kanalček lahko visoko prevoden, mora premagati elektrostatski odboj, ki bi ga K^+ ion normalno zaznal med gibanjem iz stanja visoke hidratiziranosti vodnega okolja v dielektrično nizko membransko okolje. Hidratacija kalijevega iona v osrednjem delu membrane in usmerjenost negativno nabitih C-koncev pornih α -heliksov proti središču vestibula omogočata stabilizacijo kalijevega iona v središču membrane (Roux in MacKinnon, 1999) (Slika 2).



Slika 2. Struktura bakterijskega kalijevega kanalčka. Shema prikazuje dva transmembranska α -heliksa od le dveh izmed štirih identičnih podenot. Iz citosolne strani se pora odpre v vestibul v sredini membrane. Vestibul pospeši transport, s tem ko omogoči kalijevim ionom, da ostanejo hidratirani, čeprav so le-ti že na pol poti skozi membrano. Ozek selektivni filter poveže vestibul kanalčka z zunajcelično stranjo celice. Karbonilni kisiki selektivnega filtra oblikujejo prehodna vezavna mesta za dehidrirane kalijeve ione. Dva kalijeva iona zasedeta mesta v selektivnem filtru, medtem ko tretji kalijev ion leži v središču vestibula kanalčka, kjer je stabiliziran z električnimi interakcijami z bolj negativno nabitimi konci pornih heliksov. C-konci štirih pornih heliksov (prikazana sta le dva) so usmerjeni točno proti središču vestibula, s čimer vodijo kalijeve ione v selektivni filter. Negativno nabite aminokisline (označuje jih rdeč minus) so zbrane blizu kanalčkovega vhoda in izhoda (Alberts in sod., 2008).

 K^+ kanalčki torej izkoriščajo elektrostatski odboj med tesno razporejenimi ioni znotraj selektivnega filtra (MacKinnon, 2003). P zanka, ki med S5 in S6 vstopi v zunajcelični del membrane, je zgrajena iz kratkega pornega heliksa in razširjajoče regije polipeptidne verige, ki vsebuje značilno zaporedje TVGYG in oblikuje selektivni filter v zunajceličnem delu pore (Sands in sod., 2005). Glicinska ostanka motiva omogočata selektivnemu filtru konformacijsko obliko, v kateri so štiri enakomerno razporejene plasti karbonilnih kisikovih atomov in ena plast hidroksilnih kisikovih atomov treonina usmerjene proti osrednji porni osi, s čimer tvorijo štiri vezavna mesta za K⁺ ione, nanizana vzdolž odprtine K⁺ kanalčka in oštevilčena z 1 do 4, iz zunajcelične proti znotrajcelični strani. Na vezavna mesta se K⁺ ioni vežejo v nujno dehidriranem stanju; takrat jih obdaja osem kisikovih atomov kanalnega proteina – štirje od njih so zgoraj in štirje spodaj vsakega vezanega iona. Organizacija proteinskih kisikovih atomov, ki obdajajo vsako vezavno mesto v selektivnem filtru je zelo podobna organizaciji vodnih molekul okrog hidratiranih K⁺ ionov. Tako kristalna zgradba kanalčka jasno prikazuje vlogo selektivnega filtra:

ustvarja vrsto čakajočih vezavnih mest za K^+ ione; vezavna mesta pa oponašajo hidratacijsko vodo, ki obdaja vsak K^+ ion. Tako K^+ ioni prehajajo iz vode v selektivni filter, kjer pride do vezave na aminokislinske ostanke selektivnega filtra; ta vezava pa je energetsko ugodnejša od samega hidratacijskega ovoja kalijevega iona (MacKinnon, 2003).

Odboj med tesno razporejenimi ioni v selektivnem filtru pomaga preseči notranjo afiniteto vsakega iona do njegovega vezavnega mesta (Zhou in sod., 2001; Morais-Cabral in sod., 2001; Zhou in MacKinnon, 2003). Na štirih možnih položajih vzdolž selektivnega filtra sta v danem času v povprečju prisotna dva K⁺ iona, ki sta pretežno v dveh konfiguracijah – 1,3 in 2,4; v vsaki konfiguraciji pa sta iona ločena z eno vodno molekulo. Kristalna struktura K⁺ kanalčka je tako povprečje obeh konfiguracij, ki oblikujeta končni točki preprostega prevodnega cikla. Ko en kalijev ion vstopi v niz vezavnih mest selektivnega filtra na zunanji strani kanalčka, drugi kalijev ion, izstopi na nasprotni strani. Smer toka je določena z elektrokemijskim gradientom K⁺ ionov (MacKinnon, 2003).

Drugi razlog za visoke prevodne hitrosti ob visoki selektivnosti K⁺ kanalčka je odvisnost strukture selektivnega filtra od prisotnosti K⁺ ionov (Morais-Cabral in sod., 2001). Zlasti takrat, ko je v kristalografskih poskusih koncentracija K⁺ ionov veliko nižja od normalne znotrajcelične ravni, pade zasedenost selektivnega filtra z dveh na en K⁺ ion, pri čemer se zgodi posebna konformacijska sprememba (Zhou in MacKinnon, 2003). Vstop drugega K⁺ iona v selektivni filter je torej odločilen za termodinamsko sprožitev konformacijske spremembe kanalčka. Ker se del vezavne energije iona porabi za spremembo strukture selektivnega filtra, se ion veže šibkeje, kakor v primeru, da se konformacijska sprememba ne bi zgodila. Šibka vezava iona v selektivnem filtru je prvi pogoj za visoke prevodne hitrosti (MacKinnon, 2003).

Kakšna konformacijska sprememba je potrebna za odprtje pore K⁺ kanalčka, izvemo iz strukturne primerjave kanalčkov KcsA, MthK in K_vAP (MacKinnon, 2003; Jiang in sod., 2003). KcsA so kristalizirali v razmerah, v katerih je kanalček v membrani v zaprtem stanju (Doyle in sod., 1998; Heginbotham in sod., 1999; Zhou in sod., 2001). MthK, od Ca²⁺ odvisen K⁺ kanalček, so kristalizirali v prisotnosti take koncentracije Ca²⁺ ionov, ki odpira poro kanalčka v membranah (Jiang in sod., 2002a). K_vAP, napetostno-odvisen

kanalček iz termofilne arhebakterije *Aeropyrum pernix*, so kristalizirali v odprti konformaciji (Jiang in sod., 2003). Pora zaprtega KcsA se od por odprtih MthK in K_vAP razlikuje v dolžini zunajceličnega dela P zank ter v legi notranjih, pornih α -heliksov na znotrajcelični strani selektivnega filtra (MacKinnon, 2003).

Zaprta konformacija KcsA ima ravne notranje helikse, ki oblikujejo hidrofobno zožitev blizu citoplazemskega vhoda v poro. V območju zvitja je pora KcsA zožena na okrog 3,5 Å premera ter poravnana s hidrofobnimi aminokislinami ustvarja bariero za tok K⁺ ionov. Nasprotno, odprti konformaciji MthK in napetostno občutljivega K_vAP kanalčka imata notranje helikse na mestu ohranjenih glicinskih ostankov. Ukrivljeni heliksi se nagibajo navzven (tj. stran od osi pore kanalčka) ter odpirajo znotrajcelično ustje kanalčka (Slika 3) (MacKinnon, 2003; Sands in sod., 2005).

Strukture omenjenih kanalčkov veljajo za predstavne oblike zaprte in odprte porne konformacije mnogih različnih K⁺ kanalčkov, ne glede na dražljaj, ki odpira poro (Jiang in sod., 2002b). Sklep temelji na ohranjenem glicinskem ostanku na zgibu notranjega heliksa (tj. M2 v KcsA in MthK oz. S6 v K_v kanalčkih) v večini K⁺ kanalčkov (Sands in sod., 2005). Glicinski zgib (ang. »glycine gating hinge«) naj bi notranjim pornim heliksom omogočal ukrivljanje, s tem pa kanalčkom preklapljanje med zaprto KcsA-ju podobno konformacijo in odprto MthK-ju podobno konformacijo (MacKinnon. 2003).

K_v kanalčki višjih organizmov imajo poleg glicinskih ostankov ohranjen tudi PVP motiv, ki naj bil deloval kot nadaljnji molekulski zgib znotraj S6 heliksa (Labro in sod., 2003; Sands in sod., 2005).



Slika 3. Modela odprte in zaprte konformacije kalijevih kanalčkov. (A) Model porne domene Shaker K_v kanalčka. Model zaprte konformacije temelji na strukturi KcsA kanalčka, model odprte konformacije temelji na strukturi K_vAP. V obeh primerih sta prikazani le dve podenoti porne domene (S5-P-S6) ter površina pore. Model zaprte konformacije ima označena hidrofobna citoplazemska vrata. (B) Primerjava heliksov, ki tvorijo poro KcsA (modra, M2 heliks, zaprta pora), MthK (rdeča, M2 heliks, odprta pora), K_vAP (vijolična, S6 heliks, odprta pora). (C) Primerjava struktur S6 heliksa na začetku (modra) in koncu (rdeča) simulacije molekularne dinamike Shaker K_v kanalčka (Grottesi in sod., 2005). V obeh, B in C, so amino-terminalne polovice – pred molekulskim zgibom – heliksov položene ena vrh druge. Približne lokacije molekulskih zgibov so nakazane s puščicama (Sands in sod., 2005).

Konformacijske spremembe, ki so osnova za napetostno občutljivost arhebakterijskega kanalčka K_vAP (tetramerni K_v kanalček, s šestimi transmembranskimi α -heliksi na podenoto), so velike in vključujejo gibanje bazičnih aminokislinskih ostankov skozi membrano (MacKinnon, 2003). Segmenti od S1 do S4 tvorijo na napetost občutljivo domeno kalijevih kanalčkov. Osnovni strukturni elementi, odgovorni za napetostno-občutljivost, so S4 heliksi s simetrično urejenimi pozitivno nabitimi aminokislinskimi ostanki, od katerih je vsak tretji ostanek arginin ali lizin (Stühmer in sod., 1989; Yang in Horn, 1995; Larsson in sod., 1996) (Slika 4). Bazični aminokislinski ostanki S4 α -heliksa

omogočajo napetostno-občutljivi domeni premik kot odgovor na depolarizacijo membrane, s čimer sproži odprtje aktivacijskih vrat pore kanalčka (Armstrong in Bezanilla, 1974; Perozo in sod, 1993, 1994; Aggarwal in MacKinnon, 1996; Larsson in sod, 1996; Mannuzzu in sod., 1996; Seoh in sod., 1996; Yang in sod., 1996; Starace in sod., 1997; Cha in sod., 1999; Horn, 2000; Lee in sod., 2003). Ko se napetostno-odvisni kanalček odpre, se nabiti aminokislinski ostanki (ang. »gating charges«), premaknejo skozi membransko električno polje in sklopijo električno delo s procesom odpiranja pore kanalčka (Armstrong in Bezanilla, 1974; Sigworth, 1994; Bezanilla, 2000). Tok, ki regulira porno aktivnost, ustreza translokaciji skoraj 14 elektronov skozi celotno transmembransko električno napetostno razliko (Schoppa in sod., 1992; Aggarwal in MacKinnon, 1996; Seoh in sod., 1996). Večino naboja pripisujejo štirim argininskim ostankom na podenoto, skupaj torej 16-im na kanalček; vsak arginin naj bi nosil približno en naboj elektrona (Aggarwal in MacKinnon, 1996; Seoh in sod., 1996).



Slika 4. Kristalna struktura napetostnega senzorja K_vAP kanalčka. Heliksi S1 do S3 so obarvani svetlo modro. Domnevna pregibna regija temno modrega heliksa S4 je obarvana rdeče (Cuello in sod., 2004). Stranske verige pozitivno nabitih argininskih ostankov S4 heliksa, ki zaznavajo napetost, so prikazane v temno modri paličasti obliki (Sands in sod., 2005).

Aktivacija Kv kanalčkov je tako rezultat transmembranskega gibanja nosilcev nabojev, ki so nameščeni v napetost-zaznavajoči domeni (Armstrong in Bezanilla, 1974; Perozo in sod, 1993, 1994; Aggarwal in MacKinnon, 1996; Larsson in sod, 1996; Mannuzzu in sod., 1996; Seoh in sod., 1996; Yang in sod., 1996; Starace in sod., 1997; Cha in sod., 1999; Horn, 2000). Način gibanja S4 še ni povsem znan. Predlagali so nekaj modelov, ki jim

predvidoma pripisujejo vpliv na prepustnost kanalčka (Århem, 2004; Sands in sod., 2005). Še vedno je zaznati primanjkljaj eksperimentalnih dokazov o natančni strukturi napetostnega senzorja K_v kanalčkov ter o konformacijski spremembi strukture K_v kanalčkov kot odgovoru na spremembo v transmembranski napetosti (Sands in sod., 2005).

2.1.1 Toksinski blokatorji K⁺ kanalčkov

Strupene živali iz različnih razvojnih debel so med evolucijo razvile številne toksine raznolikih strukturnih zgradb, ki delujejo na homologne molekulske tarče različnega plena. Toksini, ki delujejo na ionske kanalčke, so večinoma majhni peptidi in so v strupih navadno prisotni v majhnih količinah (Jouirou in sod., 2004b). Na delovanje kalijevih kanalčkov učinkujejo številne polipeptidne komponente v strupih čebel, škorpijonov (Miller, 1995), kač (Harvey in Anderson, 1985), polžev stožcev (Terlau in sod., 1996) in morskih vetrnic (Castañeda in sod., 1995). Rezultat konvergentne evolucije toksinov in njihovih tarčnih mest delovanja je izoblikovanje ključnih vezavnih toksinskih determinant in funkcijskih homologij (Jouirou in sod., 2004b).

Ključne skupne lastnosti polipeptidov, katerih tarčna mesta so napetostno-odvisni K⁺ kanalčki, vključujejo primarno strukturo, dolžino peptidne verige, tvorbo disulfidnih mostičkov in strukturne motive (Ménez, 1998; Mouhat in sod., 2004a). Opisani toksini praviloma vsebujejo od 22 do 60 aminokislinskih ostankov in so križno povezani z 2 do 4 disulfidnimi vezmi. Glede na njihov tip zvitja, peptide uvrščamo v osem razredov (Lancelin in sod., 1994; Tudor in sod., 1996; Blanc in sod., 1997; Scanlon in sod., 1997; Ménez, 1998; Savarin in sod., 1998; Takahashi in sod., 2000; Srinivasan in sod., 2002). Peptidna zvitja so sestavljena iz dveh do štirih dobro določenih sekundarnih struktur (α-heliksov in β-trakov). Tipi peptidnih zvitij so naslednji: kombinacije α-heliksov (αα, 3_{10} αα), kombinacije β-trakov (βββ), mešanice obeh sekundarnih struktur (αββ, βαββ, 3_{10} ββ, 3_{10} ββα); pri čemer obstajata dva tipa αα zvitja – lasnici podobni motiv (antiparalelno urejena α-heliksa) in križu podobni motiv (pravokotno urejena α-heliksa). Direktna korelacija med določenim tipom peptidnega zvitja in živalsko vrsto ne obstaja (Ménez, 1998; Mouhat in sod., 2004a). Peptidni blokatorji tipov αα, αββ, βαββ koeksistirajo v strupih škorpijonov. Toksini vseh osmih tipov zvitij so aktivni na kalijeve

kanalčke; hkrati pa je mnogo peptidov istega tipa zvitja aktivnih na različne tipe ionskih kanalčkov (Escoubas in sod., 2000; Mouhat in sod., 2004a).

Kljub obstoju toksinov različnih zvitij, ki prepoznajo različne podtipe napetostno-odvisnih K^+ kanalčkov, so dokazali obstoj skupnih ključnih molekulskih determinant, kot sta aktivna diada in obroč bazičnih aminokislinskih ostankov.

2.1.1.1 Aktivna diada

Aktivna diada, bistvena za blokado kalijevih kanalčkov, je ohranjena v vrsti strukturno nesorodnih peptidnih toksinov morskih vetrnic, škorpijonov, kač in polžev stožcev (Dauplais in sod., 1997; Norton in sod., 2004). Aminokislinska diada poveča afiniteto toksina za njegov tarčni ionski kanalček in prispeva k blokadi ionskega toka prek celične membrane (Srinivasan in sod., 2002; Mouhat in sod., 2004b). Aktivno diado tvorita lizinski (Lys) ostanek, ki s svojo stransko verigo vstopi v poro ionskega kanalčka, in sosednji hidrofobni aminokislinski ostanek - aromatski (Tyr ali Phe) ali alifatski (Leu) aminokislinski ostanek (Slika 5A) (Dauplais in sod., 1997; Gasparini in sod., 1998; Possani in sod., 1999; Shakkottai in sod., 2001). Aminokislinska ostanka sta v diadi med seboj oddaljena 6-7 Å. Odločilen lizinski ostanek med delovanjem na kanalček leži v pori kanalčka, in sicer v centru obroča, sestavljenega iz karbonilnih skupin štirih enakovrednih kislih aminokislinskih ostankov (Asp ali Glu) (M'Barek in sod., 2003b; Jouirou in sod., 2004a; Mouhat in sod., 2004b), od katerih vsak pripada po eni od štirih α -podenot, ki tvorijo K+kanalček. Odločilen aromatski oz. alifatski ostanek aktivne diade prek hidrofobnih sil interagira s skupino aromatskih ostankov (Tyr in Trp), ki navadno pripadajo eni od α -podenot K+ kanalčka.

Aktivne diade so značilne za peptide različnih tipov zvitij, ki so jih izolirali iz strupov morskih vetrnic in škorpijonov (Dauplais in sod., 1997; Alessandri-Haber in sod., 1999; Mouhat in sod., 2004a); v škorpijonskih toksinih jo navadno najdemo v β -traku. Strukture teh peptidov se med seboj razlikujejo, zato ni nujno, da aminokislinska ostanka aktivne diade ležita v primarni strukturi skupaj. Terciarna struktura lahko peptidu omogoča postavitev aminokislinskih ostankov aktivne diade enega vrh drugega. (Dauplais in sod., 1997; Ménez, 1998). Prostorsko urejena diada aminokislinskih ostankov ima ključno vlogo pri visoko afinitetni interakciji molekule s tarčnim napetostno-odvisnim K_v1-tipom K⁺ kanalčkov. Seveda obstajajo tudi izjeme. Eno izmed njih predstavlja škorpijonski toksin Tc32 (Batista in sod., 2002), ki očitno nima aktivne diade, a kljub temu učinkovito blokira $K_v 1.3$ kanalčke. Nekateri toksini imajo namesto diad aktivne triade (Katoh in sod., 2000). Triado sestavljata dva enakovredna hidrofobna ostanka, ki lahko drug drugega funkcionalno nadomeščata in tako z osrednjim lizinskim ostankom tvorita aktivno diado.



Slika 5. Aktivna diada in obroč bazičnih aminokislinskih ostankov. (A) Lega aktivne diade v strukturah dveh poravnanih škorpijonskih toksinih: Lys27 in Tyr36 v karibdotoksinu (vijoličen), Lys27 in Phe25 v agitoksinu 2 (zelen). (B) Obroč bazičnih aminokislinskih ostankov škorpijonskega toksina Pi4 (vijoličen) (Guijarro in sod., 2003; M'Barek in sod., 2003a). Ostanki Arg10, Arg19, Lys30 in Lys33 so prikazani s prostorskimi modeli, medtem ko sta diadna Lys26 in Tyr35 (aktivna diada) prikazana s kroglično-verižno strukturo (Rodríguez de la Vega in Possani, 2004).

2.1.1.2 Obroč bazičnih aminokislinskih ostankov

K razlikam v afiniteti toksinov za interakcijo s K+ kanalčki prispevajo mnogo-točkovne povezave peptidov z njihovimi tarčnimi ionskimi kanalčki. V nekaterih na Kv aktivnih toksinih (Pi1, Pi2, Pi4 iz strupa škorpijona *Pandinus imperator*) so odkrili obroč iz bazičnih aminokislinskih ostankov (Slika 5B) (M'Barek in sod., 2003b; Mouhat in sod., 2004b), ki bi lahko imel osrednjo vlogo v prepoznavanju in interakciji molekul s Kv kanalčki. Bazični aminokislinski ostanki naj bi oblikovali solne mostičke s specifičnimi kislimi aminokislinskimi ostanki štirih α -podenot. V toksinih Pi1, Pi2 in Pi4, ki delujejo na Kv1.2 kanalčke, je peptidni bazični obroč sestavljen iz štirih bazičnih ostankov (Arg ali Lys). Število bazičnih ostankov, ki sestavljajo bazični obroč, je lahko v drugih toksinih drugačno (Jouirou in sod., 2004b).

Poleg obroča bazičnih aminokislinskih ostankov in aktivne diade obstajajo še drugi aminokislinski ostanki, ki prispevajo k visoki afiniteti vezave toksina na napetostnoodvisne K⁺ kanalčke. Na primer, glavna aminokislina za stabilizacijo kompleksa škorpijonskega agitoksina2 (AgTx2) s kanalčkom je Asn30 (Gao in Garcia, 2003). Seveda pa v procesu mnogo-točkovnih interakcij, posamezne interakcije ne prispevajo enako k vezavi toksina na ionski kanalček. Selektivnost ionskega kanalčka in afiniteta peptida odražajo odklone v vzorcih tesnih kontaktov med aminokislinskimi ostanki toksinov in ionskih kanalčkov (Jouirou in sod., 2004b).

2.1.1.3 Disulfidne povezave

Živalski peptidni toksini imajo glede na njihovo velikost dokaj raznoliko sekundarno strukturo. Imajo dva do štiri disulfidne mostičke (Van Rietschoten in sod., 1975; Kharrat in sod., 1996; Olamendi-Portugal in sod., 1996; Lebrun in sod., 1997; Srinivasan in sod., 2002), ki med seboj povezujejo po dva Cys ostanka (»polcisteina«) in igrajo posredno vlogo v biološki aktivnosti peptidov. Disulfidni mostički prispevajo k stabilizaciji in rigidnosti strukture peptidov (Drakopoulou in sod., 1998: Pennington in sod., 1999). Zmanjšana fleksibilnost peptida poveča učinkovitost blokade kanalčka. Že ena sama sprememba v vzorcu disulfidnih povezav spremeni tridimenzionalno strukturo peptida in s tem zmanjša njegovo učinkovitost (M'Barek in sod., 2003a).

Med vzorcem disulfidnih mostičkom in končnim tipom zvitja molekule ni nobene korelacije. Toksina ShK in BgK (iz morskih vetrnic *Stichodactyla helianthus* in *Bunodosoma granulifera*) ter dendrotoksin I (iz strupa mambe *Dendroaspis polylepis*) imajo podobne disulfidne povezave (tipa C1-C6, C2-C4 in C3-C5), čeprav imajo različno strukturo ($3_{10}\alpha\alpha, \alpha\alpha, 3_{10}\beta\beta\alpha$) (Tudor in sod., 1996; Dauplais in sod., 1997; Katoh in sod., 2000]). Obratno, pa je za enak tip peptidnega zvitja mogočih več različnih tipov disulfidnih povezav. Dva sorodna škorpijonska toksina (iz α -KTx6 družine), Pi1 in maurotoksin, katerih gradbeni tip je α/β -struktura, imata različno ureditev disulfidnih mostičkov (Pi1: C1-C5, C2-C6, C3-C7, C4-C8; maurotoksin: C1-C5, C2-C6, C3-C4, C7-C8) (Kharrat in sod., 1996; Olamendi-Portugal in sod., 1996).

Izjema je heliksni, lasnici podobni $\alpha\alpha$ tip zvitja toksina, ki je nujno povezan s specifično organizacijo disulfidnih mostičkov – C1-C4 in C2-C3 v primeru κ –hefutoksina, toksina z dvema disulfidnima vezema, ki so ga izolirali iz škorpijona *Heterometrus fulvipes* (Srinivasan in sod., 2002).

2.1.1.4 Blokiranje pore kanalčkov

Raziskave interakcije toksina Pi1 z napetostno-odvisnimi Kv1.2 kanalčki (Mouhat in sod., 2004b) so pokazale dvostopenjsko vezavo peptida na kanalček. Bazični obroč toksina (Arg5, Arg12, Arg28 in Lys31) prek elektrostatskih sil prepozna, se veže in pravilno namesti Pi1 na Kv1.2 kanalček. Sledi tesnejši stik prek hidrofobnih sil in vodikovih vezi med diadnim Tyr33 peptida in skupino aromatskih ostankov kanalčka (Phe358, Trp366, Trp367 in Tyr377) ene izmed štirih Kv1.2 α -podenot. Stranska veriga diadnega Lys24 vstopi v poro ionskega kanalčka, kjer jo stabilizirajo štirje asparaginski (Asp379) karbonilni kisikovi atomi Kv1.2 α -podenot. Stranska veriga Lys blokira iztok kalijevih ionov (Jouirou in sod., 2004b).

Posledica mutacij aminokislinskih ostankov, ki pripadajo aktivni diadi (Lys24 in Tyr33) toksina Pi1, je novo tarčno mesto peptida na pori ionskega kanalčka, saj Lys31 iz bazičnega obroča funkcijsko nadomesti mutiran diadni Lys24. Takšna spremenljivost nakazuje na dejstvo, da se toksin usmerja glede na najugodnejše, nizkoenergijske stike med aminokislinskimi ostanki. Ob tem obstaja nekakšna hierarhija, ki daje prednost stranski verigi lizina Lys, da vstopi v poro kanalčka (Jouirou in sod., 2004b).

Podoben vzorec bližnjih stikov so opazili, ko so Pi4 vezali na podganji $K_v 1.2$ kanalček (M'Barek in sod., 2003b). Bazični obroč peptida sestavljajo Arg10, Arg19, Lys30 in Lys33, aktivno diado pa Lys26 in Tyr35. Zamenjava Lys26 v Pi4 za Arg26 v strukturno homolognem Pi7 je verjetno ključna naravna točkovna mutacija, odgovorna za različno učinkovitost peptidov pri blokiranju K_v kanalčkov (Olamendi-Portugal in sod., 1998; Delepierre in sod. 1999).

2.1.1.5 Vrste toksinskih blokatorjev napetostno-odvisnih K⁺ kanalčkov

Strukturno nesorodni analogni toksini, ki so produkt kač, morskih vetrnic, škorpijonov in polžev stožcev učinkujejo na delovanje Kv1 tipa napetostno-odvisnih K+ kanalčkov (Terlau in sod., 1996; Kaczorowski and Garcia, 1999).

2.1.1.5.1 Dendrotoksini

Dendrotoksini so farmakološko aktivni peptidi, ki so jih pred skoraj tridesetimi leti prvič izolirali iz strupov afriških elapidnih kač mamb (Dendroaspis) (Harvey in Karlsson, 1980). Sestavljeni so iz 57-60 aminokislinskih ostankov, polcisteine pa križno povezujejo trije disulfidni mostički (Harvey, 2001; Harvey in sod., 1998).

Iz vzhodnoafriške zelene mambe *Dendroaspis angusticeps* so izolirali štiri homologne toksične polipeptide α-, β-, γ- in δ-dendrotoksin (DTX) (Benishin in sod., 1988) učinkovite blokatorje napetostno-odvisnih kalijevih kanalčkov družine K_v1 (Tricaud in sod., 2000). α-dendrotoksin je glavni peptidni blokator kalijevih kanalčkov v strupu *Dendroaspis angusticeps*. Sestavlja ga 59 aminokislin in disulfidne vezi C7-C57, C16-C40, C32-C53 (Joubert in Taljaard, 1980; Belva in sod., 2000). Poleg omenjenih dendrotoksinov so iz zahodnoafriške zelene mambe *Dendroaspis viridis* izolirali še Dv14 (Mehraban in sod., 1986), iz črne mambe *Dendroaspis polyleptis* pa toksina I in K (Strydom, 1973; Harvey in Karlsson, 1982). Leta 1995 pa so odkrili še tri dendrotoksinske homologe, katerih izvor niso mambe, temveč morska vetrnica *Anemonia sulcata*; imenujemo jih kalikludini (Schweitz in sod., 1995).

Čeprav imajo posamezni dendrotoksini med seboj zelo podobna zaporedja, kažejo pomembne razlike v specifičnosti za različne podtipe kalijevih kanalčkov. α -DTX in toksin I v nanomolarnih koncentracijah blokirata le nekatere napetostno-odvisne kalijeve kanalčke (K_v1.1, 1.2 in 1.6; $K_d < 20$ nM); drugi K⁺ kanalčki so neobčutljivi na mnogo višje koncentracije omenjenih dendrotoksinov (Harvey in sod., 1998; Robertson in sod., 1996; Owen in sod., 1994).Toksin K preferenčno blokira K_v1.1 kanalčke in je učinkovitejši blokator le-teh od drugih dendrotoksinov (Harvey in sod., 1998; Robertson in sod., 1996; Owen in sod., 1997).

Dendrotoksini predstavljajo družino sorodnih proteinov, ki so homologni Kunitz-tipu inhibitorjev serinskih proteinaz. Čeprav so dendrotoksini zelo šibki inhibitorji tripsina in serinskih proteaz, pa inhibitorji Kunitz ne blokirajo K⁺ kanalčkov (Harvey in Karlsson, 1982; Marshall in Harvey, 1992; Dufton in Harvey, 1998). Kljub podobnosti v tridimenzionalni obliki in zaporedju aminokislin, obstajajo med homologi lokalne strukturne razlike, ki so razlog različnega farmakološkega delovanja (Harvey in sod., 1984; Swaminathan in sod., 1996; Dufton in Harvey, 1998; Nishio in sod., 1999]). S pomočjo kemijskih modifikacij in genskega inženirstva so ustvarili mutirane toksine, s katerimi so odkrili za vezavo na K⁺ kanalčke pomembne aminokisline. Lizinski ostanek, blizu Nkonca polipeptidne verige, pomembno prispeva k aktivnosti α -DTX, δ -DTX in toksina K. Različni pridruženi ostanki N-terminalne regije toksinov pomagajo pri vezavi posameznega toksina na njegovo tarčno mesto (Harvey, 2001). Za vezavo α -DTX na K⁺ kanalček sta pomembna Lys5 ter Leu9 (Harvey in sod., 1997; Gasparini in sod., 1988). Čeprav obstaja splošno prepričanje, da stranska veriga odločilnega lizinskega ostanka dendrotoksinov zamaši poro ionskega kanalčka, so mutacije aminokislinskih ostankov ob pori K_v1.1 kanalčkov pokazale, da se δ -dendrotoksin veže blizu vhoda v poro, le-te pa fizično ne zamaši (Imredy in MacKinnon, 2000).

Dendrotoksini se močno in specifično vežejo na kalijeve kanalčke v možganskih membranah (Black in sod., 1988; Rehm in Lazdunski, 1988; Parcej in Dolly, 1989; Sorensen in Blaustein, 1989; Harvey in Anderson, 1991; Dolly in Parcei, 1996). Vezavna mesta za dendrotoksine so prisotna v možganih različnih živalskih skupin, npr. podganah, opicah, človeku (Bidard in sod., 1989; Barrezueta in sod., 1994; Cochran, 1998). Najgostejša so v območjih, kjer je veliko sinaps, tj. v talamusu, srednjih možganih in neokorteksu (Bidard in sod., 1989; Pelchen-Matthew in Dolly, 1989; Awan in Dolly, 1991). Tarčna mesta za dendrotoksine so prisotna tudi v drugih delih živčevja: malih možganih, perifernem živčevju, senzoričnem in motoričnem sistemu (Harvey, 2001). Glavne tarče α - in δ -DTX so K_v1.1 in K_v1.2 kanalčki, izraženi v *Xenopus* oocitah ali sesalčjih celicah; toksina nimata vpliva na K_v1.3 ali K_v1.4 kanalčke (Grissmer in sod., 1994; Hopkins in sod. 1996; Harvey, 1997; Owen in sod., 1997; Imredy in sod. 1998). Vezava α -DTX na različne K_v1.2 in/ali K_v1.1 podenote v možganih poteče, četudi so le-te združene v heterooligomerne komplekse z α -podenotami, ki ne vežejo toksinske molekule (Dolly in Parcej, 1996). γ -DTX kaže visoko afiniteto do mišjih K_v1.1 (mK_v1.1), pri čemer velja učinkovitostna lestvica γ -DTX < δ -DTX < α -DTX (Hopkins in sod.,1996; Owen in sod., 1997; Hopkins in sod., 1999).

Kalijevi kanalčki, ki vežejo α -DTX, izolirani iz skorje velikih možganov goveda, so sestavljeni iz štirih velikih združenih transmembranskih proteinskih α -podenot in štirih dodatnih manjših β -podenot (Parcej in sod., 1992). Membrane vsebujejo heterooligomerno kombinacijo različnih α -podenot znotraj K_v1 družine (Scott in sod., 1994; Wang in sod., 1999). Z dendrotoksinom hkrati reagirajo vse štiri podenote K⁺ kanalčka in le ena toksinska molekula je potrebna za blokado kanalčka. Vezavno mesto za dendrotoksin na K⁺ kanalnem polipeptidu predstavljajo Ala352, Glu353 in Tyr379 (Hurst in sod., 1991; Tytgat in sod., 1995). Zaporedje N-konca izoliranih proteinov, ki vežejo DTX, je homologno zaporedju podganjih K⁺ kanalčkov iz skorje velikih možgan (rKv1.2) (Scott in sod., 1990; Newitt in sod., 1991).

Dendrotoksine uporabljajo kot orodja v mnogih raziskavah, npr. α -DTX pri procesu čiščenja α - in β -podenot K⁺ kanalčkov iz Shaker poddružine (Dolly in Parcej, 1996), razlagi oligomerne kompozicije številnih kanalnih podtipov v sinaptičnih membranah iz govejih možganov (Shamotienko in sod., 1997).

S strukturnimi analogi dendrotoksinov so definirali prepoznavne lastnosti molekul za različne tipe K⁺ kanalčkov. Radioaktivno označene dendrotoksine uporabljajo v izolacijskih postopkih toksinov iz drugih virov, katerih vezavna mesta so K⁺ kanalčki. So uporabni markerji podtipov K⁺ kanalčkov, zato jih uporabljajo kot sonde pri preučevanju funkcije K⁺ kanalčkov v fiziologiji in patofiziologiji (Harvey, 2001).

2.1.1.5.2 Škorpijonski toksini in toksini morskih vetrnic

Če se osredotočimo na škorpijonske toksine in toksine morskih vetrnic, lahko iz primerjave rezultatov strukture in funkcije sklepamo, da se kljub podobni velikosti, ki znaša okrog 35 aminokislinskih ostankov, in bazičnosti, njihove strukture precej razlikujejo, funkcijsko pa so si zelo podobni; oboji se vežejo na isto območje P, s čimer blokirajo tok skozi Kv1 napetostno-vodene kalijeve kanalčke. Strukture toksinov morskih vetrnic vsebujejo 2 α -heliksa in nobenega β -traku, medtem ko je za toksine škorpijonov tipična α/β -struktura, ki jo sestavljajo en kratek α -heliks in trije antiparalelni β -trakovi (Slika 6) (Gasparini in sod., 2004; Bontems in sod., 1991; Dauplais in sod., 1997; Fernandez in sod., 1994; Krezel in sod., 1995; Tudor in sod., 1996).



Slika 6. Predstavitev gradbenih struktur toksinov morskih vetrnic in škorpijonov, ki blokirajo tok skozi napetostno-odvisne K_v1 kalijeve kanalčke. Zgoraj: toksina morskih vetrnic BgK (levo) (Dauplais in sod., 1997) in ShK (desno) (Tudor in sod., 1996). Spodaj: škorpijonska toksina CTx (levo) (Bontems in sod., 1991) in AgTx (desno) (Krezel in sod., 1995). Modra barva prikazuje disulfidne mostičke (Gasparini in sod., 2004).

Na podlagi primerjave rezultatov funkcijskih raziskav blokiranja toka skozi napetostnoodvisne kalijeve kanalčke s toksini morskih vetrnic in škorpijonov, lahko rečeno, da so ti toksini primer mehanistične konvergentne evolucije. Namreč, kljub različni 3D-strukturi, njihovo vezavno jedro vsebuje nekatere podobnosti, ki kažejo na skupen oz. zelo podoben način vezave, kar jim omogoči aktivno blokado kanalčka (Gasparini in sod., 2004). Za vezavo toksinov morskih vetrnic na površino K⁺ kanalčkov je ključna aktivna diada, ki jo sestavljata v primarni strukturi skupaj ležeča bazični lizin in aromatski tirozinski ostanek (Lys-Tyr diada). Pojavlja se v heliks-zanka-heliks motivu toksinskih inhibitorjev K⁺ kanalčkov iz morskih vetrnic (Pennington in sod., 1996a; Pennington in sod., 1996b; Pennington 1997; Cotton in sod., 1997; Dauplais in sod., 1997; Tudor in sod., 1996). Škorpijonski blokatorji K⁺ kanalčkov imajo podoben vezavni motiv, sestavljen iz ključnega Lys in aromatskega (Tyr ali Phe) ostanka na vezavni površini (Stampe in sod., 1994; Hidalgo in MacKinnon, 1995; Aiyar in sod., 1995b), ki pa v primarni strukturi ležita narazen (Rodríguez de la Vega in Possani, 2004) in se šele po zvitju v terciarni zgradbi približata drug drugemu.

Škorpijonski blokatorji kalijevih kanalčkov tvorijo cisteinsko stabiliziran α/β -motiv, v katerem dva disulfidna mostička kovalentno vežeta segment α -heliksa na enega od β -trakov (Rodríguez de la Vega in Possani, 2004). Zaporedje 30-40 aminokislinskih

ostankov križno povezujejo 3 do 4 disulfidni mostički (Garcia in sod., 2001). 3D-struktura, ki je sicer pomembna za visoko stabilnost peptida in dovoljuje variabilnost zaporedja, ni direktno v korelaciji s specifično tarčno molekulo. Za omenjeno strukturo toksinov je značilno, da je ~80-90 % aminokislinskih ostankov na peptidni površini. Tako sta tip in lega teh različnih površinskih aminokislin odločilna v določanju biološke funkcije proteina (Rodríguez de la Vega in sod., 2003; Rodríguez de la Vega in Possani, 2004).

Najbolje so preučili škorpijonske peptide, ki se povezujejo s predstavniki $K_v 1$ družine napetostno-odvisnih kanalčkov in/ali od kalcija odvisnih kalijevih kanalčkov (Garcia in sod., 1997). Preučevani peptidi se vežejo v zunanji vestibul kanalčka in blokirajo ionsko prevodnost s fizično zamašitvijo pore, ne da bi vplivali na kinetiko delovanja kanalčka (MacKinnon in Miller, 1988, 1989; Miller, 1988; Giangiacomo in sod., 1992). Do vezave peptidov pride z reverzibilno dvomolekularno reakcijo, ki jo usmerjajo elektrostatske interakcije med negativno nabitimi aminokislinskimi ostanki v kanalčku in pozitivno nabitimi aminokislinskimi ostanki v peptidu. Tako asociacijska hitrostna konstanta za vezavo peptida na kanalček narašča s padanjem ionske jakosti zunanjega medija. Hitrost disociacije toksina se poveča, kadar se poveča koncentracija trajno monovalentnih kationov na notranji strani membrane (MacKinnon in Miller, 1988; Giangiacomo in sod., 1992; Goldstein in Miller, 1993).

Na podlagi poznavanja 3D-strukture peptida so določili aktivno stran inhibitorja, ki se poveže s kanalčkom. Gre za sploščeno strukturo, ki jo oblikujejo aminokislinski ostanki iz anti-paralelnega β -traku (Garcia in sod., 2001). Eden odločilnih ostankov v škorpijonskih toksinih - karibdotoksinu (ChTx), agitoksinu 2 (AgTx₂) in kaliotoksinu (KTx) je Lys27 (Park in Miller, 1992; Ranganathan in sod., 1996; Aiyar in sod., 1995b, 1996). Kaliotoksinov Lys27 se pri vezavi toksina na K_v1.3 kanalček vrine v poro kanalčka in tako leži sterično blizu ionskemu filtru oz. vezavnemu mestu za kalijeve ione (Aiyar in sod., 1995b, 1996). V kompleksu toksin-kanalček je torej mesto lizina blizu centra simetrije v tetramerni strukturi kalijevega kanalčka (Chandy in sod., 2001). Kaliotoksinov Arg24 se poravna z Asp386 v K_v1.3 in z njim vstopi v močno elektrostatsko interakcijo (Aiyar in sod., 1995b, 1996). Peptidni toksin interagira z ostanki vseh 4 podenot kalijevega kanalčka. Škorpijonski toksini se vežejo v poro Kv1.3 kanalčka na 30 Å široko površino s 6-8 Å globokim vestibulom na zunanjem vhodu (Aiyar in sod., 1995b, 1996).

V vseh na K_v1 kanalčke delujočih škorpijonskih toksinih so našli ohranjene Lys27, Met29 in Asn30 (Tytgat in sod., 1999), ki so se pokazali za funkcionalno pomembne za vezavo karibdotoksina in agitoksina 2 na napetostno-odvisne kalijeve kanalčke tipa *Shaker* (K_v1) (Goldstein in sod., 1994; Ranganathan in sod., 1996) ter margatoksina (MgTx), ki se veže na K_v1.3 tip kanalčkov (Bednarek in sod., 1994). Že omenjeni Lys27 omogoča vezavo kaliotoksina in karibdotoksina na K_v1.3 kanalček (Aiyar in sod., 1996; Rauer in sod., 2000). Poleg tega, aktivna mesta škorpijonskih toksinov vsebujejo še pomembne neohranjene hidrofobne ostanke: Tyr36 v ChTx in MgTx, Phe25 v AgTx₂ in KTx (Gasparini in sod., 2004). Ser10 je ohranjen v dveh od treh poddružin škorpijonskih toksinov – α -KTX₁ in α -KTX₃ (ChTx in AgTx₂) – in prispeva k vezavi na *Shaker* (K_v1) kanalčke (Goldstein in sod., 1994; Ranganathan in sod., 1996). Ser10 je ključen tudi za vezavo CTx na od Ca²⁺ odvisne kalijeve kanalčke (Stampe in sod., 1994).

Iz morskih vetrnic izolirane peptidne blokatorje kalijevih kanalčkov glede na dolžino verige in homologijo zaporedja uvrščamo v štiri strukturne razrede (Castañeda in Harvey, 2009). Toksini tipa 1 imajo 35-37 aminokislinskih ostankov in tri disulfidne vezi (BgK iz *Bunodosoma granulifera* (Aneiros in sod., 1993; Cotton in sod., 1997), ShK iz *Stichodactyla helianthus* (Castañeda in sod., 1995; Pennington in sod., 1996a; Kalman in sod., 1998), kaliseptin (AsKS) iz *Anemonia viridis* (Schweitz in sod., 1995) in toksin AeK iz *Actinia equina* (Minagawa in sod., 1998)). Toksini tekmujejo z dendrotoksinom za vezavna mesta v membranah sinaptosomov (BgK in ShK sta enako učinkovita blokatorja kot dendrotoksini (Aneiros in sod., 1993; Cotton in sod., 1997; Castañeda in sod., 1995); AeK in AsKS (kaliseptin) kažeta znatno nižjo toksičnost kot α -dendrotoksin (Schweitz in sod., 1995)). Toksini tipa 1 blokirajo tokove skozi kanalčke s številnimi K_v1 podenotami in skozi srednje-prevodne od kalcija odvisne kalijeve kanalčke. Toksine tipa 2 gradi od 58 do 59 aminokislinskih ostankov, ki so povezani s tremi disulfidnimi vezmi (kalikludini (AsKC 1-3) iz *Anemonia viridis (sulcata)* (Schweitz in sod., 1995; Ishida in sod., 1997) in SHTxIII iz *Stichodactyla haddoni*). Ta tip toksinov je homologen Kunitz-tipu inhibitorjev

serinskih proteaz. Predstavniki blokirajo K_v1.2 kanalčke. Tretji tip toksinov prestavljajo 41 do 42 aminokislinskih ostankov dolgi toksini, ki imajo 3 disulfidne mostičke (BDS-I in BDS-II iz morske vetrnice *Anemonia viridis (sulcata)* (Diochot in sod., 1998) ter APETx1 iz morske vetrnice *Anthopleura elegantissima* (Diochot in sod., 1998)). BDS-I in BDS-II blokirata tokove, ki vključujejo K_v3 podenote, APETx1 pa blokira ERG kanalčke. Med toksine tipa 4 uvrščamo 28 aminokislinskih ostankov dolge toksine, katerih zaporedje je povezano z dvema disulfidnima vezema (SHTx I in II iz *Stichodactyla haddoni*). Specifičnost blokiranja kanalčkov za omenjena toksina še ni znana. Toksina tekmujeta z dendrotoksinom za vezavna mesta na membranah sinaptosomov (Castañeda in sod., 2009). Celo toksini znotraj istega strukturnega razreda se lahko razlikujejo v učinkovitosti ali selektivnosti za različne podtipe kalijevih kanalčkov (Castañeda in sod., 2009).

Nekateri toksini morskih vetrnic tekmujejo za vezavna mesta z α -dendrotoksinom, ki se veže z visoko afiniteto na kalijeve kanalčke, ki vsebujejo K_v1.1, K_v1.2 in K_v1.6 podenote (Harvey, 2001). Toksin BgK blokira v *Xenopus* oocitah izražene K_v1.1, K_v1.2, K_v1.3 in K_v1.6 kanalčke s približno enako učinkovitostjo v nizkih nanomolarnih količinah (Cotton in sod., 1997; Gilquin in sod., 2002). Na K_v3.1 kanalčke BgK nima inhibitornega vpliva (Castañeda in Harvey, 2009). Nativni ShK toksin inhibira v *Xenopus* oocitah izražene K_v1.1, K_v1.2, K_v1.7 in IKCa1 kanalčke pa v nanomolarnih koncentracijah (Kalman in sod., 1998). Kljub visoki učinkovitosti blokade obojih, blokira ShK K_v1.3 kanalčke učinkoviteje kot K_v1.1 kanalčke (Pennington in sod., 1995a,b, 1996b). ShK učinkovito blokira (IC₅₀ < 1 nM) tudi Kv3.2 kanalčke (Yan in sod., 2005). Oba, BgK in ShK, blokirata tudi srednje prevodne od kalcija odvisne kalijeve kanalčke (Rauer in sod., 1999)

ShK toksin ima več elementov, ki stabilizirajo strukturo. Največjo vlogo imajo pri tem tri intramolekularne disulfidne vezi; strukturo pa jim pomaga vzdrževati solni mostiček med Asp5 in Lys30 (Tudor in sod., 1996; Pennington, 1996a,b; Tudor in sod., 1998). Disulfidne vezi močno prispevajo k aktivnosti ShK toksina. Še posebej pomembna sta notranji dve (Cys17-Cys32 in Cys12-Cys28) (Pennington in sod., 1999). Struktura ShK vsebuje dva α -heliksa, ki vključujeta ostanke 14-19 in 21-24, ter vse do osmega aminokislinskega ostanka

iztegnjeni N-konec; le-temu sledi par spojitvenih zavojev, ki oblikujejo 3_{10} -heliks (Norton, 2009; Chandy in sod., 2001). Toksin je strukturno podoben BgK (Dauplais in sod., 1997), prav nič pa škorpijonskim toksinom (npr. karibdotoksinu) (Bontems in sod., 1992). BgK vsebuje dva raztegnjena α -heliksa, ki se rahlo razlikujeta v dolžini in legi od tistih v ShK toksinu; prvi heliks je daljši (poteka od devetega do šestnajstega ostanka). Vsesplošna topologija teh dveh toksinov je precej podobna (Tudor in sod., 1996; Dauplais in sod., 1997).

ShK toksin blokira kalijeve kanalčke z vezavo na plitev vestibul na zunanjem vhodu ionske prevodne poti in zamašenjem vhoda v poro (Kalman in sod., 1998; Lanigan in sod., 2002). Površina ShK, ki je vpletena v vezavo toksina na K_v kanalčke vključuje dva ključna aminokislinska ostanka – Lys22 in Tyr23 (Pennington in sod., 1996a; Rauer in sod., 1999); enako velja za toksin BgK (Dauplais in sod., 1997). Diadni lizin vstopi v poro kanalčka. K vezavi toksina na površino K_v kanalčkov prispevajo tudi nekateri drugi aminokislinski ostanki. Tako Arg11 leži v bližini His404 ene Kv1.3 podenote, ShK-jeva Met21 in Arg29 pa v tetrameru ležita blizu dveh His404 ostankov od preostalih treh α -podenot kanalčka (Kalman in sod., 1998; Chandy in sod., 2001). ShK-jevi Ile7, Ser20 in Phe27 pomagajo pri vezavi toksina na kanalčke podganjih možgan (Pennington in sod., 1996a).

Funkcionalna mesta, ki jih uporablja BgK za vezavo na različne tarče so zelo podobna. Sestavlja jih 7-11 aminokislinskih ostankov; vsi vsebujejo skupno jedro treh glavnih ostankov (Ser23, Lys25 in Tyr26) (Slika 7) (Alessandri-Haber in sod., 1999; Gilquin in sod., 2002).



Slika 7. Struktura toksina BgK iz morske vetrnice *Bunodosoma granulifera* (Cotton in sod., 1997; Alessandri-Haber in sod., 1999; Gilquin in sod., 2002) proti podganjim $K_v1.1$ (a), $K_v1.2$ (b) in $K_v1.3$ (c). Na slikah je prikazana prostorska orientacija strukture BgK. Označeni aminokislinski ostanki so del funkcijskih načrtov BgK-ja za blokado različnih podganjih K_v1 kanalčkov. Ostanki so oštevilčeni glede na njihov položaj v zaporedju BgK-ja. Aminokislinska ostanka aktivne diade sta obarvana vijolično. Ostali bazični in

aromatični aminokislinski ostanki BgK-jevega funkcijskega načrta so prikazani v modri in rumeni barvi. Polarni (alkoholni in karbonil-amidirani) aminokislinski ostanki so obarvani zeleno. Na sliki so prikazani le ostanki, ki so bili eksperimentalno raziskani. V funkcijski načrt so verjetno vpleteni tudi nekateri preostali ostanki, npr. ostanki, ki prispevajo k bazičnemu obroču, ki na shemah niso označeni. Ista aktivna diada je prisotna v vseh treh funkcijskih načrtih (Jouirou in sod., 2004).

Poravnava vseh znanih aminokislinskih zaporedij analognih toksinov morskih vetrnic, ki blokirajo K_v1 kanalčke (Castañeda in sod., 1995; Cotton in sod., 1997; Gendeh in sod., 1997; Minagawa in sod., 1998; Schweitz in sod., 1995) razkrije, da so Ser23, Lys25 in Tyr26 strogo ohranjeni (Slika 8) (Gasparini in sod., 2004). Rezultati raziskav ShK so pokazali, da so ti trije ostanki pomembni tudi za vezavo na podganje možganske kalijeve kanalčke (Pennington in sod., 1996a), K_v1.3 in od Ca²⁺odvisne kalijeve kanalčke IK_{Ca}1 (Rauer in sod., 1999). Navedeni ostanki naj bi vsem toksinom morskih vetrnic torej služili kot primarno vezavno jedro za blokiranje kalijevih kanalčkov.



Slika 8. Primerjava zaporedij aminokislin izoliranih polipeptidnih nevrotoksinskih blokatorjev $K_v 1$ tipa napetostno-odvisnih kalijevih kanalčkov. Ohranjeni aminokislinski ostanki so označeni z zeleno barvo oz. cisteinski ostanki z rumeno ter aktivna diada z vijolično barvo.

Diadni hidrofobni ostanek škorpijonskih toksinov in toksinov morskih vetrnic v vseh kompleksih toksin-kanalček interagira z enim ali dvema ostankoma z istega območja kanalčka, ki povezuje selektivni filter s transmembranskim segmentom S6. Interakcije, ki vključujejo v vseh K_v1 kanalčkih ohranjen aminokislinski ostanek (Met448 v *Shaker*) in toksinski diadni hidrofobni ostanek, so prisotne v vseh kompleksih toksin-K_v1 kanalček. Nasprotno se drugi ostanek te regije kanalčka razlikuje od kanalčka do kanalčka: Thr449 v *Shaker*, Tyr379 v K_v1.1, His399 v K_v1.3. Hidrofobna narava interakcij med tem mestom in diadnim hidrofobnim ostankom je prisotna v vseh kompleksih. Te interakcije naj bi ojačale elektrostatske interakcije med lizinom in kisikovimi atomi aminokislinskih ostankov selektivnega filtra, in sicer z izključitvijo teh aminokislin iz raztopine (Gilquin in sod., 2002). Med toksini in K_v1 kanalčki obstajajo še nekatere druge hidrofobne interakcije, ki
vključujejo npr. toksinov serinski ter kanalčkov glutaminski ostanek (primer: BgK-jev S23 je hidrofobno povezan z Gln376 K_v1.1 kanalčka) (Gasparini in sod., 2004).

Površina polipeptidov škorpijonov in morskih vetrnic, ki veže K_v kanalčke, je kljub strukturni različnosti toksinov približno podobnih dimenzij (25 Å široka in 8 Å globoka) in je sestavljena iz podobnih ostankov, ki interagirajo s K_v kanalčki (Slika 9) (Chandy in sod., 2001). Toksini škorpijonov in morskih vetrnic torej vsebujejo ključen ohranjen lizinski ostanek ter pomemben hidrofobni ostanek, ki sta v končni strukturi ločena z ohranjeno razdaljo 7 ± 1 Å. Za vezavo na isto regijo strukturno sorodnih tarč so se strukturno nesorodni toksini konvergentno razvijali, kar je vodilo do ohranitve aktivne diade, ki naj bi igrala podobno vlogo v različnih kompleksih toksin-kanalček (Gasparini in sod., 2004). Tako, kakor škorpijonski toksini, tudi ShK vsebuje osrednji lizinski ostanek (Lys22), in kot analog Arg24 v kaliotoksinu, ShK vsebuje drug pozitivno nabit ostanek (Arg11), ki je potreben za toksinovo interakcijo s kanalčkom (Kalman in sod., 1998; Rauer in sod., 1999). Arg24 v ShK morda pomaga pri vezavi toksina na kanalček (Rauer in sod., 1999).



Slika 9. Struktura toksinov ShK, α -dendrotoksina in KTX1. (ShK iz morske vetrnice Stichodactyla helianthus (Tudor in sod., 1996; Pennington in sod., 1996a), α -DTX iz strupa mambe Dendroaspis angusticeps (Gasparini in sod., 1998) in KTX1 iz strupa škorpijona Androctonus mauretanicus mauretanicus (Lipkind in Fozzard, 1997)) proti podganjim K_v1.3 kanalčkom. Strukture toksinov so prostorsko prikazane. Aminokislinski ostanki so oštevilčeni glede na njihov položaj v zaporedju toksina. Ostanka aktivne diade sta obarvana vijolično. Ostali bazični aminokislinski ostanki so označeni z modro barvo. Hidrofobni ostanki aktivnih načrtov so obarvani rumeno. Polarni (alkoholni in karbonil-amidirani) aminokislinski ostanki so obarvani zeleno. Shema vsakega toksina prikazuje eksperimentalno dokazano aktivno diado. Aktivni načrt poudarja mnogo-točkovne interakcije toksinov različnega živalskega izvora s K_v1.3 kanalčki (Jouirou in sod., 2004).

2.2 SINAPTOSOMI

Sinaptosomi so izolirani končni deli živčnega vlakna, ki izločajo nevrotransmitorje kot odgovor na fiziološko stimulacijo. Predstavljajo osnovni živčno-kemični preparat za preučevanje sproščanja nevrotransmitorjev (Bradford, 1975; Dunckley in sod., 1987).

Nevronske kalijeve kanalčke oblikujejo homomerne in heteromerne kombinacije $K_v 1 \alpha$ podenot (Cotton, 1997). K⁺ kanalčki v membranah podganjih možganov so primarno sestavljeni iz heteromultimernih K_v1.1 in K_v1.2 podenot (Pennington in sod., 1999).

K_v1.1 in K_v1.3 podenoti kanalčkov niso zasledili skupaj kot partnerja v heterotetramernih K_v kanalčkih v sinaptičnih membranah govejih možganov (Scott in sod., 1994; Shamotienko in sod., 1997). K_v1.1 in K_v1.3 kanalčka se ne pojavljata kot homooligomera. Z imunoprecipitacijami so zaznali le del možnih oligomerov K_v1 družine (Shamotienko in sod., 1997). K_v1.3 α-podenote so prisotne le v majhnem delu oligomerov, ki jih istočasno sestavljajo še K_v1.4 in K_v1.2 podenote. Popolnoma so definirali tetramer K_v1.3/1.4/1.2/1.6. V drugih podtipih napetostno-odvisnih kalijevih kanalčkov je lahko K_v1.6 podenota zamenjana s še eno K_v1.3, K_v1.4, K_v1.2 ali drugo K_v1 podenoto (razen K_v1.1). Kanalčke z obema, K_v1.3 in K_v1.2 podenotama z visoko afiniteto prepoznavata α-dendrotoksin iz zelene mambe ter kaliotoksin iz strupa škorpijona *Androctonus mauretanicus mauretanicus*. K_v1.2 podenota je prisotna v vseh na α-DTX občutljivih kanalčkih; v približno polovici le-teh je bila prisotna tudi podenota K_v1.1. δ-DTX in γ-DTX sta učinkovita blokatorja K_v1.1 (Tricaud in sod., 2000) (Podenote kalijevih kanalčkov in njihovi inhibitorji so navedeni v tabelah priloge A.).

2.3 TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC)

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. high pressure liquid chromatography, HPLC) se uporablja za analizo in ločevanje različnih snovi. Omogoča ločevanje snovi na osnovi adsorbcije, porazdelitve, ionske izmenjave in velikosti molekul na nosilcih in v kolonah, ki zdržijo velike delovne pritiske. HPLC se odlikuje z izredno veliko ločljivostjo in občutljivostjo. Ker je ničelni volumen vzorca med delci nosilca izredno majhen, prepreči velike razredčitve komponent vzorca, ki ga ločujemo. Kolone, ki se uporabljajo v HPLC tehniki, v premeru navadno merijo le od 0,4 do 0,6 cm in so dolge do 20 cm. Prenesejo

delovni pritisk od 5 do 20 kg/cm². Ena glavnih komponent HPLC sistema je črpalka, ki ustvarja delovni pritisk med 250 in 400 bari. Visoki tlaki omogočajo uporabo krajših kolon in stacionarnih faz, katerih delci imajo bistveno manjše dimenzije. Črpalka poganja mobilno fazo skozi kolono, eluirane frakcije pa analiziramo z ustreznim detektorjem (UV/VIS, fluorescenčni ali refrakcijski detektor, kar je odvisno od samih lastnosti molekul v vzorcu). Frakcije lahko lovimo s frakcijskim kolektorjem. Prednost analitskih in separacijskih tehnik HPLC pred klasično kromatografijo je v kratkih časih ločitve, veliki ponovljivosti in visoki občutljivosti detekcije (Sepčić in sod., 2002).

2.4 POVRŠINSKA PLAZMONSKA RESONANCA (SPR)

Površinska plazmonska resonanca (ang. surface plasmon resonance, SPR) je eksperimentalna tehnika, s katero preučujemo interakcije bioloških molekul. Tehnologija temelji na merjenju intenzitete odbite svetlobe na meji med dvema medijema z različnima lomnima količnikoma. Prvi medij predstavlja prizma, skozi katero laser usmeri snop svetlobe na medij z nižjim lomnim količnikom, tj. senzorski čip z merilno (pretočno) celico. Laserski žarek polarizirane svetlobe je usmerjen pod takšnim kotom, da pride do popolnega odboja vpadne svetlobe.

Polarizirana svetloba se preko prizme usmeri na površino čipa, od koder se odbija pod določenim kotom. Na čipu je na meji med obema medijema nanešen tanek sloj zlata, ki lahko pod določenimi pogoji privzame del energije vpadne svetlobe. Tako pri točno določenem vpadnem kotu svetlobe zaznamo močan upad intenzitete odbite svetlobe, ki je značilen za pojav površinske plazmonske resonance in je v največji meri odvisen od lomnega količnika drugega medija. Vezava poljubne molekule na čip povzroči spremembo kota odbite svetlobe, kar zazna detektorski sistem. Le-ta uporablja optični senzor, ki izmeri intenziteto odbite svetlobe na meji med dvema medijema z različnima lomnima količnikoma pri fiksnem kotu vpadne svetlobe. Vezava na čip povzroči takojšnjo spremembo v SPR signalu. Podatki o odbiti svetlobi se na ekranu računalniškega monitorja izrisujejo v obliki senzograma, tj. krivulje, ki prikazuje spremembo intenzitete svetlobe v času. Z analizo oblike senzograma spremljamo vezavo snovi na površino senzorskega čipa. Z vnosom rezultatov v matematične modele lahko izračunamo kinetično hitrostno konstanto za asociacijo in disociacijo.

Za raziskavo smo uporabili švedski aparat Biacore X, katerega sestavni deli so mikrotekočinski sistem, senzorski čip in detektor. Mikrotekočinski sistem pripelje vzorec raztopine z analitom do površine čipa, ki leži v pretočni celici. Uporabljen Biacore senzorski čip L1 je sestavljen iz steklenega nosilca, prekritega s tankim slojem zlata, na katerega je vezan polisaharid dekstran z lipofilnimi alkilnimi molekulami.

Molekule, ki jih želimo analizirati se vežejo na obdelano površino čipa. Ligand na površini čipa je tarčno mesto, ki narekuje specifičnost vezave analitov (molekul, katerih vezavo opazujemo). V našem primeru smo za analit uporabili toksin, ligand pa predstavljajo na površino čipa imobilizirani sinaptosomi.

Biosenzorji, ki temeljijo na površinski plazmonski resonanci, v bistvu merijo spremembe masne koncentracije biomolekul na površini čipa. Ligand imobiliziramo na površino senzorskega čipa. Nato prek mikropretočnega sistema do površine senzorskega čipa z vezanim ligandom pripeljemo vzorec. Molekule iz vzorca se vežejo na ligand, s čimer povzročijo SPR odziv. Izmerjeni odziv je proporcionalen koncentraciji molekul, vezanih na površino in ga izražamo v resonančnih enotah (ang. »resonance unit«, RU). Enota predstavlja spremembo kota, pri katerem pride do intenzitetnega minimuma, za 0,0001°. Za večino proteinov 1 RU predstavlja spremembo koncentracije na površini čipa za približno 1 pg/mm². Točen pretvorbeni faktor je odvisen od lastnosti senzorske površine in narave analita.

Tehnika SPR ima mnogo prednosti. Zagotavlja visoko občutljivost, kar pomeni, da lahko z njo določamo zelo majhne količine snovi v vzorcu. Proteine v vzorcu zaznamo v nanomolarnih koncentracijah. Na voljo je več različnih površin senzorskih čipov, ki omogočajo vezavo različnih ligandov in s tem njihovih analitov; tako predhodna kemijska modifikacija molekul ni potrebna. Možno je preučevanje interakcij med različnimi biološkimi makromolekulami: med proteinoma, proteinom in membrano, proteinom in DNA, encimom in substratom... Sistem omogoča spremljanje napredovanja biomolekularnih interakcij v realnem času. Omogoča sledenje interakcij v kompleksnih zmeseh. SPR je neinvazivna tehnologija, saj detekcija SPR odziva temelji na meritvi odbite svetlobe s strani senzorja, ki ni v stiku z vzorcem. Ker pri tej tehniki svetloba ne preseva skozi vzorec, lahko meritve izvajamo tudi na motnih, neprozornih vzorcih brez stranskih vplivov absorpcije ali sipanja svetlobe (SPR strani. Infrastrukturni center za površinsko plazmonsko resonanco, 2009).

2.5 NAMEN DIPLOMSKEGA DELA

Iz tkiva celih morskih vetrnic severno-pacifiške vrste *Urticina crassicornis* smo želeli izolirati domnevne peptidne inhibitorje napetostno-odvisnih K⁺ kanalčkov. Za izolacijo peptidov bomo uporabili klasične biokemijske metode, peptidom pa določili molekulsko maso in aminokislinsko zaporedje. S pomočjo teh parametrov in znanih podatkov iz literature bomo primerjali izolirane peptide in sklepali na njihovo aktivnost. Aktivnost bomo skušali ugotoviti tako, da bomo membrane (podganje sinaptosome) nanesli na biočipe in s površinsko plazmonsko resonanco preverili kinetiko vezave na membrane. Za kontrolo bomo uporabili znane blokatorje napetostno-odvisnih K⁺ kanalčkov, kot sta dendrotoksin in ShK 1 toksin. Predvidevamo, da je slednji podoben verjetnim peptidom iz *Urticina crassicornis*.

3 **MATERIAL IN METODE**

3.1 MATERIALI

3.1.1 Živalski material

Morske vetrnice Urticina crassicornis, nabrane v severnem Pacifiku ob obali Britanske Kolumbije, Kanada (Westwind SeaLab Supplies, Victoria, B.C.). Celotna telesa vetrnic so v laboratoriju dobavitelja liofilizirali in jih poslali v Biokemijski laboratorij Oddelka za biologijo.

Možgane podgan smo na podlagi koncesije o uporabi živali v izobraževalne namene dobili z Veterinarske fakultete. Možgani so bili sveže preparirani in še nezmrznjeni na ledu prepeljani v Biokemijski laboratorij Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete.

3.1.2 Kemikalije	
Aceton (CH ₃ COCH ₃)	Merck, Nemčija
Acetonitril (CH ₃ CN)	J.T. Baker, Nizozemska
Amonacetat (CH ₃ COONH ₄)	Merck, Nemčija
96 % Etanol (CH ₃ CH ₂ OH)	Merck, Nemčija
100 % Etanol (CH ₃ CH ₂ OH)	Merck, Nemčija
Fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF)	P7626 Sigma, Nemčija
Ficoll 400	Amersham Pharmacia Biotech AB, Švedska
Hepes $(C_8H_{18}N_2O_4S)$	Merck, Nemčija
Izopropanol	Kemika, Hrvaška
Kalijev hidroksid (KOH)	Merck, Nemčija
Metanol (CH ₃ OH)	Merck, Nemčija
Natrijev hidroksid (NaOH)	Merck, Nemčija
Natrijev klorid (NaCl)	Merck, Nemčija
Ocetna kislina (CH ₃ COOH)	Merck, Nemčija
Saharoza ($C_{12}H_{22}O_{11}$)	Merck, Nemčija
SDS (C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S)	Merck, Nemčija
Trifluorocetna kislina (TFA) (C ₂ HF ₃ O ₂)	Fluka, Sigma-Aldrich, Nemčija

3.1.3 Raztopine za HPLC

10 mM amonacetatni pufer, pH 5,3 10 mM amonacetatni pufer, pH 5,3, 1 M NaCl 1 M ocetna kislina (za uravnavanje pH) destilirana voda + 0,1 % TFA acetonitril + 0,1 % TFA

3.1.4 Toksini

ShK (1 mg/mL)

 α -dendrotoksin

0,8 M saharoza, pH 7,0

prof. dr. W.R. Kem (Florida University, Gainesville, ZDA) Sigma, ZDA

3.1.5 Raztopine za izolacijo sinaptosomov

Homogenizacijski pufer	5 mM Hepes-KOH, pH 7,4
	320 mM saharoza
6-odstotni (m/V) Ficoll 400	Ficoll 400
	Homogenizacijski pufer
9-odstotni (m/V) Ficoll 400	Ficoll 400
	Homogenizacijski pufer
13-odstotni (m/V) Ficoll 400	Ficoll 400
	Homogenizacijski pufer
0,2 M PMSF	fenilmetilsulfonil fluorid (Sigma, Nemčija)
	100-odstoten etanol
0,32 M saharoza, pH 7,0	
1,2 M saharoza, pH 7,0	

3.2 METODE

3.2.1 Izolacija toksinov iz morske vetrnice

3.2.1.1 Homogenizacija, obarjanje, odparitev acetona

K 40 g liofiliziranih, na kose narezanih živali, smo dodali 200 mL hladne deionizirane vode ter jih homogenizirali v hladni sobi pri 4 °C z Elvejham-Potterjevim homogenizerjem. Homogenat smo razredčili z deionizirano vodo do 150 mL in centrifugirali 20 min pri 26000 x g ter temperaturi 4 °C. Supernatant smo frakcionirno obarjali z ledeno hladnim acetonom do končne 33-, 40-, 60- in 80-odstotne (v/v) nasičenosti acetona, in sicer smo v hladni sobi čašo z vzorcem postavili v ledeno kopel ter vse skupaj postavili na magnetno mešalo. Postopoma smo v majhnih količinah dodajali ustrezen volumen acetona do ustrezne končne nasičenosti. Po vsaki posamezni stopnji, smo po končanem dodajanju acetona počakali, da so se proteini dokončno oborili, in nato centrifugirali 20 min pri 26000 x g in temperaturi 4 °C. Oborine smo raztopili v deionizirani vodi, ponovno centrifugirali 20 min pri 26000 x g in temperaturi 4 °C ter po potrebi shranili supernatant pri -20 °C.

Delo smo nadaljevali z zadnjim zgoraj navedenim supernatantom. Sledeče postopke izolacije smo ponovili dvakrat in sproti odtajali potrebno količino zamrznjenega vzorca. Za prvo ponovitev postopka izolacije smo od začetnega vzorca odpipetirali 4 mL frakcije, preostalih 16 mL pa smo uporabili za ponovno izolacijo aktivnih polipeptidov.

Z rotacijskim vakuumskim izparilnikom R-134 (Büchi, Švica) smo odparili aceton iz supernatanta 80-odstotne frakcije acetona. Izmerili smo masno koncentracijo peptidov v brezacetonskem vzorcu z uporabo kolorimetričnega testa BCA Protein Assay Kit po standardnem protokolu (inkubacija 30 min pri 37 °C) (Pierce, ZDA) in VIS spektrofotometrije (pri $\lambda = 562$ nm).

3.2.1.2 Ekstrakcija na trdnem nosilcu

Peptidni vzorec, iz katerega smo odparili aceton, smo grobo očistili z nanosom na kartušo Sep-Pak Plus C18 (kartuša za ekstrakcijo s trdno reverzno fazo, V=0,80 mL) (Waters, ZDA). Vzorec smo na kartušo nanesli s pomočjo brizge. Nadaljevali smo s spiranjem kartuše. Kot mobilno fazo za spiranje kartuše smo najprej uporabili 10 mL destilirane vode, nato 6 mL 50-odstotnega acetonitrila ter nazadnje še 6 mL 100-odstotnega acetonitrila. Posamezne frakcije smo zbirali v mikrocentrifugirke.

Izmerili smo koncentracijo peptidov v nevezanem vzorcu in vodni frakciji s kolorimetričnim testom BCA Protein Assay Kit (Pierce, ZDA) po standardnem protokolu (inkubacija 30 min pri 37 °C) in VIS spektrofotometrijo pri $\lambda = 562$ nm.

Iz frakcij 50-odstotnega in 100-odstotnega acetonitrila smo odparili acetonitril na rotacijskem vakuumskem izparilniku R-134 (Büchi, Švica). Posušeno 100-odstotno frakcijo acetonitrila smo raztopili v 100 μ L deionizirane vode. Nato smo z uporabo proteinskega kolorimetričnega testa BCA Protein Assay Kit po standardnem protokolu (inkubacija 30 min pri 37 °C) in VIS spektrofotometrije (pri $\lambda = 562$ nm) izmerili koncentracijo proteinov v frakcijah 50- in 100-odstotnega acetonitrila.

3.2.1.3 Frakcioniranje s kationsko izmenjevalno TSK-GEL kolono za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC)

Frakcijo 50-odstotnega acetonitrila, z odparjenim acetonitrilom, smo ločili na kationsko izmenjevalni koloni za HPLC - TSK-GEL SP-5PW, $0,75 \times 7,5$ cm (Supelco, Švica). Za mobilno fazo smo uporabili 10 mM amonacetatni pufer, pH 5,3 z gradientno naraščajočo ionsko jakostjo od 0 do 1 M NaCl, s katero smo eluirali peptide. Hitrost pretoka skozi kolono je bila 1 mL/min. Zaradi nizkega odgovora in optimalne ločbe smo prostornino vbrizganega vzorca z 0,2 mL povečali na 0,5 mL.

Vzorec smo nanašali na kolono v večih ponovitvah. Združevali smo posamezne, z gradientom ločene frakcije, ki so se eluirale v območju enakih retencijskih časov.

3.2.1.4 Filtriranje in koncentriranje

S filtracijo oz. centrifugiranjem posameznih združenih frakcij v filtrirnih centrifugirkah Centricon Ultracel YM-10 membranes (Millipore, ZDA) pri 5000 x g in temperaturi 4 °C smo iz frakcij odfiltrirali peptide, z molekulsko maso 10 kDa in več. Filtrate s peptidi, manjšimi od 10 kDa, smo skoncentrirali v filtrirnih centrifugirkah Microsep 1K omega (Pall, ZDA), s čimer smo frakcije očistili molekul manjših od 1 kDa. Centrifugiranje je potekalo pri 5000 g in temperaturi 4 °C.

Ker je filtriranje (pridobivanje retentata) v centrifugirkah PALL precej dolgotrajno in zamudno smo pri ponovni izolaciji aktivnih proteinov za koncentriranje vzorca uporabili vakuumski koncentrator miVac (GeneVac, ZDA), s čimer nismo odstranili peptidov, manjših od 1 kDa.

3.2.1.5 BCA Protein Assay Kit

Nefiltrirane dele vzorcev, tj. »koktajl« molekul vseh velikosti, smo uporabili za izdelavo umeritvene krivulje BCA testa po občutljivejši metodi (30-minutna inkubacija pri 60 °C) (Pierce, ZDA).

Izmerili smo koncentracije peptidov v posameznih filtriranih združenih frakcijah s kolorimetričnim testom BCA Protein Assay Kit po protokolu za občutljivejšo metodo (30minutna inkubacija pri 60 °C) (Pierce, ZDA) in VIS spektrofotometrijo pri $\lambda = 562$ nm.

3.2.1.6 Elektroforeza na poliakrilamidnem peptidnem gelu z natrijevim dodecil sulfatom (NaDS-PAGE)

Izolirane peptidne frakcije smo analizirali z elektroforeznim sistemom Mini Protean IV (BioRad, ZDA) po protokolu za ločevanje peptidov.

Pripravili smo vzorce in proteinske velikostne standarde. Peptidnim vzorcem smo dodali enako količino tricinskega pufra za vzorce »Tricine Sample Buffer« (BioRad, ZDA) (razmerje 1:1) ter 2-odstotni β -merkaptoetanol (koncentriran β -merkaptoetanol smo redčili s tricinskim pufrom za vzorce »Tricine Sample Buffer«) (BioRad, ZDA); vzorce smo nato pet minut inkubirali v vreli vodi. Za standarde smo izbrali Polypeptide SDS-PAGE Molecular Weight Standards (BioRad, ZDA), standard Page Ruler Prestained Protein Ladder (Fermentas, Litva) in standard MARK 12 (Invitrogen, ZDA).

Za ločitev peptidov smo uporabili že pripravljen 16,5-odstoten poliakrilamiden gel Ready Gel[®] Comb and Tape Removal (assorted ready gel[®] precast gels) (BioRad, ZDA). Za

mobilno fazo poliakrilamidne NaDS elektroforeze smo uporabili pufer 1x Tris/Tricin/SDS Buffer (BioRad, ZDA). Elektroforeza je tekla pri napetosti 100 V približno 40 min.

Po končani elektroforezi smo peptide na gelu čez noč barvali v raztopini Page Blue Protein Staining Solution (Fermentas, Litva). Obarvan gel smo spirali v destilirani vodi ter nazadnje v pripravku 1x raztopine Destain solution, Coomassie R-250 (BioRad, ZDA). Razbarvan gel smo skenirali in posušili oz. plastificirali.

3.2.1.7 Test hemolize

Retentat kolon Centricon Ultracel YM-10 membranes (Millipore, ZDA) smo testirali na morebitno prisotnost citolizina z ustaljenim hemoliznim testom (Maček in Lebez, 1981).

3.2.1.8 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z obrnjeno fazo (RP-HPLC)

Posamezne združene, koncentrirane frakcije smo nadalje frakcionirali z gradientnim povečevanjem stopnje nepolarnosti mobilne faze. Peptide smo ločili s kolono za RP-HPLC Vydac C4 $4,6 \times 150$ mm (Vydac, ZDA) Za mobilno fazo smo uporabili 0,1-odstotno trifluorocetno kislino (TFA) v bidestilirani vodi. Stopnjo nepolarnosti mobilne faze smo zviševali z acetonitrilom, in sicer od 5- do 45-odstotkov acetonitrila v mobilni fazi, pri čemer smo čas gradientnega prehoda raztegnili na 60 min. Hitrost pretoka skozi kolono je bila 1 mL/min. Volumen nanešenega vzorca na kolono je bil 0,5 mL.

Vzorec smo nanašali na kolono v večih ponovitvah. Združili smo posamezne, z gradientom enakovredno ločene frakcije in jih izparili na vakuumskem koncentratorju miVac (GeneVac, ZDA). Posušene frakcije smo raztopili v bidestilirani vodi oz. v Hepes pufru (25 mM Hepes, pH 7,4, 150 mM NaCl) za delo v SPR centru na aparatu Biacore X (Biacore, Švedska).

3.2.2 Masna spektrometrija

Masne spektre izbranih frakcij, ločenih s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti z obrnjeno fazo (RP-HPLC) smo pomerili v laboratorijih podjetja Atheris (Švica) na

masnem spektrometru z ionizacijo z elektrorazprševanjem (EMI-MS) Quattro micro (Waters, ZDA) po standardnem protokolu.

3.2.3 Priprava sinaptosomov

Sinaptosome smo pripravili po dveh različnih postopkih v večkratnih ponovitvah. Celotna postopka priprave sinaptosomov potekata pri temperaturi 0-4 °C.

V sodelovanju s prof. dr. Robertom Frangežem iz Inštituta za fiziologijo, farmakologijo in toksikologijo Veterinarske fakultete smo v eksperimentalne namene žrtvovali odrasle podgane. Podgane so bile žrtvovane in preparirane v laboratoriju Veterinarske fakultete. Uspavali so jih z ogljikovim dioksidom in jih dekapitirali. Sledila je preparacija možganskih hemisfer in odstranitev sivine možganske skorje. Preparirano možgansko skorjo smo zavili v aluminijasto folijo in jo nezmrznjeno na ledu prenesli v laboratorije Katedre za biokemijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete, kjer smo preparirali oziroma izolirali sinaptosome.

3.2.3.1 Izolacija sinaptosomov (6 h)

Postopek za izolacijo sinaptosomov smo priredili po metodi, ki sta jo razvila Booth in Clark (Booth in Clark, 1978).

Možgansko skorjo ene podgane smo homogenizirali v 5-kratnem volumnu homogenizacijskega pufra (5 mM Hepes-KOH, pH 7,4, 320 mM saharoza) z Elvejham-Potterjevim homogenizerjem z rotacijo 10. stopnje (1000 vrt./min) z osmimi potezami gor in dol. Homogenat smo centrifugirali dve minuti v polikarbonatni centrifugirki na 3000 x g in temperaturi 4 °C. Kremno bel supernatant smo odtočili v ohlajen merilni valj, usedlino pa resuspendirali v homogenizacijskem pufru. Resuspendirani usedlini smo dodali 7,5 mL raztopine 0,2 M PMSF (fenilmetilsulfonil fluorid; Sigma, Nemčija) ter ponovno homogenizirali s tremi potezami gor in dol. Dobljeni homogenat smo centrifugirali dve minuti v polikarbonatni centrifugirki na 3000 x g in temperaturi 4 °C. Supernatant smo prilili k že prej odlitemu supernatantu, usedlino pa zavrgli. Združeni supernatant smo temperaturi 4 °C. Odlili smo bledo rožnato obarvani supernatant ter resuspendirali dvoslojno usedlino v preostanku supernatanta v centrifugirki. Nato smo centrifugirko zapolnili z ledenomrzlim homogenizacijskim pufrom in centrifugirali 12 min na 13000 x g, 4 °C. Supernatant smo zavrgli. Zgornjo belozeleno plast dvoslojne usedline smo resuspendirali s previdnim vrtinčenjem v preostanku supernatanta v centrifugirki, pri čemer smo se izognili spodnji zelenorjavi mitohondrijski plasti usedline, ki se je tesneje oprijemala dna centrifugirke. Resuspendirano usedlino smo s Pasteurjevo pipeto prenesli v ohlajeno čašo na ledu ter jo dopolnili do 4 mL s homogenizacijskim pufrom.



suspenzije v naslednjem vrstnem



Slika 10. Shema postavitve gradientno ločenih sinaptosomov z ultracentrifugiranjem

redu: 1,667 mL 13-odstotnega Ficoll/saharoza, 0,417 mL 9-odstotnega Ficoll/saharoza, 1,667 mL 6-odstotnega Ficoll/saharoza, ~1,26 mL resuspendirane sprane usedline. Centrifugirali smo 35 min na 86670 x g in temperaturi 4 °C. Vzorec se je gradientno ločil. Sinaptosomi so se zbrali med 6- in 13-odstotnim Ficollom (Slika 10). Gradientno ločene sinaptosome smo odpipetirali v ledenomrzlo polikarbonatno centrifugirko, jo nato do vrha napolnili s homogenizacijskim pufrom ter centrifugirali 12 minut na 27200 x g (17660 vrt./min, rotor št. 12158 za centrifugo Sigma 3K30) in temperaturi 4 °C. Supernatant smo izsesali in zavrgli, s sinaptosomi bogato usedlino pa s pipeto ponovno suspendirali v 500 μ L homogenizacijskega pufra. Suspenzijo s sinaptosomi smo razdelili na enake dele (po 100 μ L) v mikrocentrifugirke ter zamrznili v tekočem dušiku in shranili pri -80 °C.

3.2.3.2 Izolacija sinaptosomov po hitrem postopku (2 h)

Protokol za hitro metodo izolacije sinaptosomov (Dodd in sod., 1981) smo priredili aparaturam Katedre za biokemijo (Elvejham-Potterjev homogenizer, centrifugi). Možgansko skorjo smo homogenizirali v 10-kratnem volumnu ledeno mrzle 0,32 M saharoze (pH 7,0). Uporabili smo motorno voden Elvejham-Potterjev homogenizer pri hitrosti motorja 800 rpm, 12 potegov bata gor in dol. Med batom in steklenim delom je bilo 0,5 mm prostora. Homogenizirali smo na ledu. Homogenat smo pretočili v 25mililitrsko polikarbonatno centrifugirko in centrifugirali 10 minut v Beckman centrifugi na 1800 x g, 4 °C. Kot rezultat centrifugiranja smo dobili usedlino z jedri in supernatant. Slednjega smo odpipetirali. V treh 5-mililitrskih ultracentrifugirkah za rotor SW65 Beckman ultracentrifuge smo ustvarili gradient: na 2-mililitrsko plast 1,2 M saharoze smo ob steni previdno nanesli 3 mL supernatanta. Gradientno pripravljene ultracentrifugirke smo centrifugirali 20 minut na 171500 x g, 4 °C. Nastala je mitohondrijska usedlina, medtem ko so sinaptosomi, mielin in nekaj mikrosomov ostali v saharoznem gradientnem medprostoru. Ločeni material smo previdno zbrali v prostornino 3,85 mL ter mu dodali preostali del do 9 mL, tj. 5,15 mL ledeno mrzle 0,32 M saharoze. Ponovno smo pripravili saharozni gradient v treh ultracentrifugirkah SW65: na 2 mL 0,8 M saharoze smo previdno ob steni odpipetirali po 3 mL razredčenega vzorca s sinaptosomi. Centrifugirali smo 20 minut na 171500 x g, 4 °C. Dobili smo sinaptosomsko usedlino, mielin v saharoznem gradientnem medprostoru in mikrosome v supernatantu. Sinaptosomsko usedlino smo suspendirali v mediju. Suspenzijo smo razdelili na enake dele (po 100 µL) v mikrocentrifugirke, jo zamrznili v tekočem dušiku in shranili v zamrzovalniku pri -80 °C.

3.2.4 Preverjanje uspešnosti izolacije

Pripravljenim sinaptosomom smo določili koncentracijo proteinov in koncentracijo lipidov s komercialnimi kolorimetričnimi testi. Koncentracijo proteinov v vzorcu smo določili s pomočjo testa za določanje koncentracije proteinov BCA (Pierce, ZDA), koncentracijo fosfolipidov s testom Phospholipids B Kit (Wako Chemicals, Nemčija) in koncentracijo sterolov s testom Free Cholesterol C (Wako Chemicals, Nemčija).

3.2.5 Vezava vzorcev na sinaptosome

Vezavo izoliranih peptidov na pripravljene sinaptosome smo preverjali z metodo površinske plazmonske resonance (SPR) na refraktometru Biacore X (Biacore, Švedska) v Infrastrukturnem centru za površinsko plazmonsko resonanco. Za nosilec smo uporabljali senzorski čip L1 (Biacore, Švedska), ki je namenjen delu z lipidi. Spiranje površine čipa, vezava toksina in regeneracija membran sinaptosomov je potekala skozi obe pretočni celici. Za referenčno celico smo izbrali pretočno celico 1, sinaptosome pa smo vezali le na pretočno celico 2. Poskuse na aparaturi za površinsko plazmonsko resonanco smo izvajali pri sobni temperaturi.

Z bidestilirano vodo smo pripravili pufer: 25 mM Hepes, pH 7,4, 150 mM NaCl ter ga nato filtrirali skozi 0,22-mikrometrske pore na filtru (Millipore, Irska). Pripravljen pufer smo pred vsakim nanosom odzračili po predpisanem protokolu za delo z aparatom Biacore X.

3.2.5.1 Vezava vzorcev prve izolacije

Priprava površine senzorskega čipa za nanos toksina se razlikuje od bolj optimiziranega načina vezave vzorcev kasneje izoliranih aktivnih proteinov (glej sledeče poglavje: Vezava vzorcev druge izolacije).

Senzorski čip smo 3-krat sprali z enominutnim pulzom mešanice izopropanola in 50 mM NaOH v razmerju 2:3 pri pretoku 20 μ L/min. Nato smo pri pretoku 1 μ L/min na površino pretočne celice 2 senzorskega čipa L1 z enkratnim desetminutnim nanosom vezali 5-krat redčene sinaptosome. Nestabilno vezane sinaptosome smo sprali z enkratnim enominutnim spiranjem s 100 mM NaOH pri pretoku 20 μ L/min skozi obe pretočni celici. Na tako pripravljen čip smo vezali vzorce prve izolacije, in sicer z enkratnim enominutnim nanosom pri pretoku 20 μ L/min skozi obe pretočni celici. Regeneracija čipa je potekala po istem postopku, kot je opisano v poglavju Vezava vzorcev druge izolacije.

3.2.5.2 Vezava vzorcev druge izolacije

Senzorski čip smo 3-krat sprali z enominutnim pulzom mešanice izopropanola in 50 mM NaOH v razmerju 2:3 pri pretoku 20 µL/min (Slika 11).



Slika 11. Osnovni eksperimentalni potek (pretočna celica 2)

V drugi pretočno celico senzorskega čipa smo pri pretoku 1 µL/min dvakrat po 10 minut nanašali 5-krat redčene sinaptosome. Po vsakem nanosu sinaptosomov smo mikrotekočinski sistem vsaj enkrat sprali s pufrom z metodo WASH v menijski vrstici programa. Vse naslednje korake eksperimenta smo opravili skozi obe pretočni celici pri pretoku 20 µL/min. Šibko vezane sinaptosome smo odstranili z enominutnim pulzom 100 mM NaOH, s čimer smo si zagotovili stabilno začetno linijo. Sledil je enominutni nanos 0,1 mg/mL govejega serumskega albumina (BSA). Z BSA smo prekrili vsa morebitna prosta mesta na dekstranu, s čimer smo zmanjšali možnost nespecifične vezave. Po vzpostavitvi razmeroma stabilne bazne linije smo v sistem pri enakih pogojih vbrizgali pufer, za tem pa še vzorec. Po vezavi smo čip sprali in regenerirali. Vezan toksin smo s sinaptosomov sprali z dvema enominutnima pulzoma 100 mM NaOH. Sinaptosome smo iz čipa odstranili z vsaj 5-kratnimi zaporednimi enominutni pulzi mešanice izopropanola in 50 mM NaOH v razmerju 2:3.

3.2.5.3 Specifična vezava toksina ShK

Do informacije o specifični vezavi toksina ShK smo prišli z različnima postopkoma vezave.

Površino pretočne celice 2 smo popolnoma prekrili z nanosi 5-krat redčenih sinaptosomov. Nanje smo vezali visoko koncentracijo (5 μ M) α -dendrotoksina, ki je zasedel vsa zanj možna vezavna mesta na čipu; tako na sinaptosomih, kot tudi na prazni površini pretočne celice 1. Nato smo na obe pretočni celici nanesli 100 nM ShK in opazovali nespecifično vezavo le-tega.

V drugem postopku smo na površino pretočne celice 2 nanesli 5-krat redčene sinaptosome. Nato smo na obe celici nanesli 100 nM ShK in opazovali njegovo vezavo.

Na podlagi odštetih RU nespecifične vezave ShK od totalne vezave ShK, smo dobili podatek o specifični vezavi ShK na vezane sinaptosome.

3.2.5.4 Obdelava rezultatov eksperimentalnega dela na aparatu Biacore X Dobljene podatke smo obdelali v programu BIAevaluation (Biacore, Švedska).

Izrisane krivulje pretočne celice 1 smo odšteli od krivulj pretočne celice 2. S tem smo dobili podatek o vezavi vzorca na sinaptosome. Odštete krivulje smo izvozili iz programa ter obdelavo podatkov nadaljevali v programu za risanje grafov OriginPro 8 SR0 (OriginLab Corporation, ZDA).

Ker se je pogosto dogajalo, da je bazna linija med celotnim eksperimentom konstantno naraščala, smo z obdelavo rezultatov umetno zravnali bazno linijo, s čimer samega odziva vzorca praktično nismo spremenili. Bazno linijo smo zravnali tako, da smo krivuljo odziva pufra, nanešenega pred vzorcem, odšteli od krivulje za pufrom nanešenega vzorca.

3.2.6 Določanje aminokislinskega zaporedja

V laboratoriju Odseka za molekularne in biomedicinske znanosti Inštituta Jožef Štefan smo pod vodstvom prof. dr. Igorja Križaja določili N-terminalno aminokislinsko zaporedje izbranega peptidnega vzorca, ločenega po RP-HPLC metodi. Za določitev N-terminalnega aminokislinskega zaporedja smo uporabili sistem za avtomatsko Edmanovo degradacijo Procise 492A (Applied Biosystems, ZDA) po navodilih proizvajalca.

4 REZULTATI

4.1 IZOLACIJA PEPTIDNIH BLOKATORJEV K⁺ KANALČKOV

S pomočjo klasičnih preparativnih biokemijskih tehnik za izolacijo peptidnih inhibitorjev K⁺ kanalčkov iz morskih vetrnic smo iz *Urticina crassicornis* izolirali nov aktiven peptid. Med izolacijo smo uporabljali klasične analitske tehnike za analizo peptidov.

Liofiliziran preparat morskih vetrnic smo homogenizirali in frakcionirno obarjali z acetonom do 80% nasičenja. Iz vzorca smo odparili aceton. Z ekstrakcijo na nepolarnem nosilcu smo vzorec očistili. Koncentracija peptidov v frakciji 50 % acetonitrila je bila 14,0 mg/mL v prvi izolaciji oz. 8,1 mg/mL v drugi izolaciji. Frakcija 100 % acetonitrila skoraj ni vsebovala peptidov.

Odparili smo acetonitril in frakcijo 50-odstotnega acetonitrila ločili s HPLC metodo na šibkem kationskem izmenjevalcu, karboksimetil celulozi (Slika 12).



Slika 12. Frakcioniranje s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) na kationskem izmenjevalcu. Rumeni okvir označuje vzorec, s katerim smo nadaljevali izolacijo aktivnih peptidov. Zeleni okvirčki ponazarjajo vzorce od 1 do 6, ki smo jih nanesli na NaDS peptidni gel (Slika 13). (Zeleni okvirčki se sicer ne nanašajo na ta graf, ampak se dejansko nanašajo na graf, prikazan v prilogi B (Slika 29)).

Združili smo z rumenim okvirjem označene frakcije večih ponovitev frakcioniranja na kationskem izmenjevalcu (Slika 12). Združene frakcije smo s filtracijo očistili molekul večjih od 10 kDa. Očiščene frakcije smo skoncentrirali v vakuumskem koncentratorju.

Naredili smo NaDS poliakrilamidni peptidni gel (Slika 13) in test hemolize, za kar smo frakcije predhodno očistili molekul manjših od 1 kDa ter jih s tem razsolili. Rezultat testa hemolize za vzorec z molekulami večjimi od 10 kDa je bil negativen.



Slika 13. NaDS poliakrilamidni peptidni gel po tekočinski kromatografiji visoke ločljivosti na kationskem izmenjevalcu TSK GEL. Rumeni okvir prikazuje označeno frakcijo z grafa kationsko izmenjevalne tekočinske kromatografije visoke ločljivosti, ki smo jo nato ločili z reverzno fazo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti. Z zeleno obrobo označeni vzorci so enakovredni zelenim pravokotnikom na grafu kationsko izmenjevalne kromatografije (Slika 12). Frakcija 2 na gelu je tako ekvivalentna levemu in nizkemu sredinskemu vrhu v rumenem pravokotniku prejšnjega grafa. Frakcija 3 na gelu predstavlja skupek vrhov na desni strani rumenega pravokotnika na prejšnjem grafu. (Gel smo naredili le v prvem postopku izolacije aktivnih peptidov, zato se vzorci na gelu pravzaprav ne nanašajo na prejšnji graf, temveč se dejansko nanašajo na graf kationsko izmenjevalne HPLC, prikazan v prilogi B (Slika 29)).

Z rumenim okvirjem označeno frakcijo na grafu kationsko izmenjevalne tekočinske kromatografije visoke ločljivosti oz. na NaDS peptidnem gelu smo skoncentrirali v vakuumskem koncentratorju. Koncentrat smo ločili s tehniko tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z obrnjeno fazo (RP-HPLC) (Slika 14). Frakcije, ki so se eluirale v

ponovljenih ločbah smo združevali glede na retencijske čase posameznih vrhov. Frakcije smo združili v petnajst vzorcev (poimenovanih od A do O) ter iz njih odparili acetonitril. Vzorce smo nato raztopili v bidestilirani vodi oz. v Hepes pufru (25 mM Hepes, pH 7,4, 150 mM NaCl) za delo v SPR centru na aparatu Biacore X (Biacore, Švedska).



Slika 14. Čiščenje s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti z reverzno fazo (RP-HPLC). Označene vzorce smo uporabili v nadaljnjih eksperimentih. Rumeni okvir označuje vrhove oz. vzorce, ki smo jih dalje testirali za vezavo na sinaptosome. Testirani vrhovi se iz kolone sperejo s podobnim retencijskim časom kot toksin ShK.

Vzorcem, raztopljenim v bidestilirani vodi, smo s komercialnim BCA testom izmerili koncentracijo proteinov. Masna koncentracija proteinov je bila za vzorec F (Slika 14) 134 µg/mL, za vzorec G 100 µg/mL ter za vzorec H 148 µg/mL.

Vzorce F, G in H (Slika 14) smo uporabili v nadaljnjih eksperimentih.

4.2 MASNI SPEKTRI

Peptidom v ločenih vzorcih (med njimi vzorcem F, G in H) smo z uporabo masne spektrometrije določili molekulske mase. S pomočjo le-teh smo izbrali vzorce, v katerih so bili peptidi po molekulski masi podobni peptidu ShK oziroma drugim znanim peptidnim blokatorjem kalijevih kanalčkov iz morskih vetrnic.

Peptide s približno molekulsko maso 4000 Da smo zasledili v vzorcih F, G in H. Najbolj čist masni spekter ima vzorec F (Slika 15). Molekulska masa prevladujočega peptida v vzorcu F znaša 3840,25 Da (Slika 15). Vzorec G vsebuje manjšo količino peptidov kot vzorca F in H. Molekulska masa nam zanimivega peptida v vzorcu G je 3840,625 Da (Slika 16). Molekulska masa prevladujočega peptida v vzorcu H se malce razlikuje od predhodnih in je 3894,00 Da (Slika 17). (Masni spektri vzorcev D, J, L, N, O so prikazani v prilogi C).



Slika 15. Masni spekter vzorca F. Številke nad vrhovi prikazujejo molekulsko maso peptidov v vzorcu.



Slika 16. Masni spekter vzorca G. Številke nad vrhovi prikazujejo molekulsko maso peptidov v vzorcu.



Slika 17. Masni spekter vzorca H. Številke nad vrhovi prikazujejo molekulsko maso peptidov v vzorcu.

4.3 IZOLACIJA SINAPTOSOMOV

Iz sivine podganjih velikih možganov smo izolirali sinaptosome. S komercialnimi testi smo izmerili masno koncentracijo proteinov, fosfolipidov in holesterola v suspenziji izoliranih sinaptosomov. Izmerjene vrednosti so bile precej višje pri sinaptosomih, izoliranih po krajšem, drugem postopku (Preglednica 1).

Preglednica 1. Masne koncentracije proteinov, fosfolipidov in holesterola v sinaptosomih krajše in daljše izolacije. Slednji imajo precej nižje masne koncentracije.

	Masna koncentracija	Masna koncentracija	Masna koncentracija
	proteinov	fosfolipidov	holesterola
Sinaptosomi daljše			
izolacije	0,9 mg/mL	0,37 mg/mL	0,25 mg/mL
Sinaptosomi krajše			
izolacije	2,1 mg/mL	6,41 mg/mL	2,32 mg/mL

4.4 VEZAVA KONTROLNIH TOKSINOV NA SINAPTOSOME

4.4.1 Nespecifična, totalna in specifična vezava ShK

Specifičnost in nespecifičnost vezave peptidnih nevrotoksinov morskih vetrnic na podganje sinaptosome smo želeli preveriti z vezavo referenčnih blokatorjev K⁺ kanalčkov: ShK in α -dendrotoksina. V prvem poskusu smo površino pretočne celice 2 senzorskega čipa L1 popolnoma prekrili s 5-krat redčenimi sinaptosomi. Nato smo na senzorski čip nanesli 5 μ M α -dendrotoksin, zatem pa poskušali ugotoviti morebitno nespecifično vezavo 100 nM ShK (Slika 18). Slednji se je na površino čipa sicer vezal, vendar je takoj po končani asociaciji z nje tudi disociiral.



Slika 18. Preverjanje nespecifične vezave toksina ShK (uporabili smo sinaptosome daljšega postopka izolacije). Potek poskusa: 5-krat redčene sinaptosome smo nanesli 5-krat zaporedno in jih površini čipa izpostavljali vsakič po deset minut pri pretoku 1 μ L/min. Nadalnji del poskusa je potekal pri pretoku 20 μ L/min, nanosi vzorcev pa so trajali 1 minuto. Na površino čipa smo vezali 5 μ M α -DTX, ki se je vezal za 5550 RU. Za tem smo z nanosom 100 nM ShK preverili še nespecifičnost vezave 100 nM ShK. ShK je s površine čipa popolnoma disociiral.

V drugem poskusu smo na 350 RU stabilno vezanih sinaptosomov brez dendrotoksina nanesli 100 nM ShK (Slika 19), katerega odziv vezave, odštet od odziva vezave ShK na referenčno celico, znaša 175 RU.



Slika 19. Totalna vezava ShK na sinaptosome daljšega postopka izolacije. Odziv vezave 100 nM ShK na sinaptosome, imobilizirane na pretočni celici 2, odštet od odziva referenčne celice, doseže 215 RU, tj. 215 pg toksina na mm² površine senzorskega čipa.

4.4.2 Koncentracijska odvisnost ShK

Preverili smo koncentracijsko odvisnost vezave toksina ShK na imobilizirane sinaptosome. Različne koncentracije ShK (10 nM, 20 nM, 40 nM ShK) smo vezali na imobilizirane sinaptosome krajše izolacije na površini senzorskega čipa L1 (Slika 20). Odziv je v času asociacije narasel do 57 RU za 10 nM ShK, 78 RU za 20 nM ShK ter 289 RU za 40 nM ShK. Višina odziva je 75 sekund po končani asociaciji znašala 57 RU za 10 nM ShK, 70 RU za 20 nM ShK in 165 RU za 40 nM ShK ter se vsaj nadaljnjih deset minut ni zmanjševala.



Slika 20. Koncentracijsko-odvisna vezava ShK na imobilizirane sinaptosome, izolirane po krajšem postopku izolacije. Odziv vezave posamezne koncentracije sinaptosomov smo preverili v ločenih eksperimentih z vedno svežim nanosom sinaptosomov, kot je opisano v metodah dela (Slika 11). Spodnja črna krivulja prikazuje odziv na površino čipa nanešenega delovnega pufra in služi za primerjavo z ostalimi signali. Eksperimenta vezave 10 nM ShK in 20 nM ShK sta bila opravljena na večkrat uporabljenem čipu. Vezava 40 nM ShK je bila izvedena na popolnoma novem, še neuporabljenem čipu.

4.5 VEZAVA IZOLIRANIH PEPTIDOV NA SINAPTOSOME

S švedskim aparatom Biacore X, katerega delovanje temelji na metodi SPR, smo preverjali vezavnost oz. aktivnost izoliranih peptidov v izbranih vzorcih z ustreznimi peptidi.

4.5.1 Vezava peptidnih vzorcev prve izolacije

Vzorce iz postopka prve izolacije smo vezali na sinaptosome na čipu. 5-krat redčene sinaptosome smo nanesli z enkratnim desetminutnim nanosom pri pretoku 20 µL/min na pretočno celico 2 senzorskega čipa L1. Nestabilno vezane sinaptosome smo sprali s 100 mM NaOH. Na tako pripravljeno površino senzorskega čipa smo zaporedno vezali izbrane RP-HPLC vzorce, tj. RP-HPLC ločbe združenih vrhov 3 oz. 4 kationsko izmenjevalne kromatografije (glej prilogo B (Slika 29)). Za ločitev vzorcev 3 in 4 kationsko izmenjevalne HPLC z RP-HPLC smo se odločili na podlagi rezultatov NaDS peptidnega gela. Oba vzorca vsebujeta peptide velikostnega razreda 4000 Da, kar je značilno za peptidne blokatorje kalijevih kanalčkov iz morskih vetrnic. Glede na značilno velikost slednjih je vzorec 4 sicer bolj čist, a se ni vezal na čip. Zato smo za nadaljnjo izolacijo uporabili vzorec 3. Ločene RP-HPLC vrhove, ki so se eluirali iz RP-HPLC kolone, smo testirali na aktivnost z vezavo na sinaptosome. V primeru vezave smo vezan vzorec posameznega RP-HPLC vrha sprali s 100 mM NaOH in nadaljevali poskus z nanosom vzorca naslednjega vrha RP-HPLC. Izmed nanešenih vzorcev (RP-HPLC vrhov) prve izolacije aktivnih peptidov se je na površino čipa vezal le vzorec B (glej prilogo B (Slika 30)), ki smo ga dobili po ločitvi na RP HPLC koloni iz vzorca vrhov 3, dobljenega z ločbo na kationsko izmenjevalni HPLC koloni (glej prilogo B (Slika 29)). Retencijski čas vzorca B na RP-HPLC je bil zelo podoben retencijskemu času toksina ShK ± 2 minuti. SPR senzogram prikazuje kinetiko vezave vzorca B, ki je v začetku nanosa hitra, nato pa se vezava upočasni ter po končanem nanosu pade na nižjo vrednost (Slika 21).



Slika 21. Enominutni nanos RP-HPLC vzorca B prve izolacije aktivnih peptidov na sinaptosome, izolirane po daljšem postopku izolacije. Priprava površine senzorskega čipa za nanos toksina se razlikuje od kasnejših izvedb vezave, in sicer smo na površino pretočne celice 2 senzorskega čipa L1 z le enkratnim desetminutnim nanosom vezali 5-krat redčene sinaptosome. Nestabilno vezane sinaptosome smo sprali s 100 mM NaOH. Na tako pripravljen čip smo vezali vzorec B, tj. RP-HPLC vrh prve izolacije aktivnih peptidov (glej prilogo B (Slika 30)), katere izvor je vzorec 3 kationsko izmenjevalne HPLC (glej prilogo B (Slika 29); glej tudi rezultate (Slika 13 – vzorec 3 na NaDS gelu). Koncentracija proteinov v vzorcu je bila 400 µg/mL.

Izmerjena masna koncentracija proteinov v vzorcu B prve izolacije aktivnih peptidov je bila 400 μ g/mL, kar je za 2,67-4,00-krat višja koncentracija proteinov kot v ekvivalentnih peptidnih frakcijah druge izolacije (tj. frakcijah F, G in H druge izolacije).

4.5.2 Vezava peptidnih vzorcev druge izolacije

5-krat redčene sinaptosome smo v dveh ločenih, zaporednih nanosih izpostavili površini pretočne celice 2 senzorskega čipa L1. Nestabilno vezane sinaptosome smo sprali s 100 mM NaOH. Nespecifično vezavo peptidnih vzorcev na referenčno pretočno celico 1 smo poskušali preprečiti z nanosom 0,1 mg/mL BSA. V primeru nestabilne linije smo le-to poskušali zravnati z uporabo 100 mM NaOH. Velikost odštetega odziva se pri tem ni spremenila (Slika 22).



Slika 22. Potek eksperimenta vezave vzorcev druge izolacije aktivnih peptidov na sinaptosome krajše izolacije. Imobilizacija 5-krat redčenih sinaptosomov, odstranjevanje nestabilno vezanih sinaptosomov s 100 mM NaOH, vezava 0,1 mg/mL BSA, stabilizacija linije odziva z nanosom 100 mM NaOH in nanos 14 nM vzorca F.

Na osnovi izmerjene masne koncentracije proteinov v vzorcih in čistosti vzorcev (masna spektrometrija) smo izbrali ustrezno redčitev izbranih vzorcev za vezavo na sinaptosome. Na pripravljen čip smo v ločenih poskusih vezali vzorce F, G in H. Vezavo posamezne koncentracije vzorca smo zaradi izolirane majhne količine le-tega opravili le po enkrat. Na senzorski čip z imobiliziranimi sinaptosomi in 0,1 mg/mL BSA smo nanesli 14 nM vzorec F (5-krat redčen) (Slika 22). Odziv vezave vzorca na sinaptosome se je po končani asociaciji ustalil pri dobrih 125 RU, tj. približno 125 pg/mm3 površine senzorskega čipa.

V naslednjem poskusu smo ponovili postopek priprave površine L1 čipa in nato naj vezali 13 nM vzorec G (4-krat redčen) (Slika 23). Odziv vezave vzorca na pretočno celico 2 z odšteto vrednostjo odziva na referenčni celici je v času asociacije dosegel 65 RU. Po približno osmih minutah disociacije je odziv padel na 15 RU oz. na 20 % odziva asociacije. Hitrost disociacije vzorca G je primerljiva s hitrostjo disociacije 100 nM ShK (Slika 18). Za nanosom vzorca G smo testirali še vezavnost 40 nM ShK. Le-ta se je za vzorcem G vezal še za 390 RU (Slika 24).



Slika 23. Vezava 13 nM vzorca G (4-krat redčen). SPR signal prikazane vezave je zaradi konstantnega naraščanja linije odziva (Slika 24) odštet od odziva predhodno nanešenega pufra. Linijo odziva smo s tem umetno stabilizirali. Odziv vezave vzorca na sinaptosome je dosegel 65 RU. Vzorec je hitro disociiral s površine sinaptosomov.



Slika 24. Vezava 40 nM ShK po vezavi 13 nM vzorca G (4-krat redčen). Odziv vezave kontrolnega toksina na sinaptosome znaša 390 RU, kar pomeni 390 pg vezanega kontrolnega proteina na kubični milimeter pretočne celice.

Na površino pripravljenega čipa smo vezali vzorec H (Slika 25). Najprej smo vezali manj koncentriran 19 nM vzorec H (4-krat redčen), nato pa še neredčen vzorec H (76 nM). Manj koncentriran vzorec se ni uspel vezati na površino čipa. Bolj koncentriran vzorec je hipoma dosegel zelo visok odziv. Disociacija vzorca H s čipa je bila sprva izjemno hitra, nato se je postopno zmanjševala.



Slika 25. Zaporedna vezava dveh različnih koncentracij vzorca H na eksperimentalno pripravljeno površino senzorskega čipa L1. Asociacija 76 nM vzorca H je potekla izredno hitro in že na samem začetku nanašanja vzorca na čip.

Za naslednji poskus smo pripravili čip na enak način kot v prejšnjih primerih (Slike 26). Nato smo s tro-kratnim zaporednim enominutnim nanosom 80 nM ShK zasičili površino čipa ter nanjo nanesli še 14 nM vzorec F (5-krat redčen). Višina odziva zasičenja čipa s tro-kratnim nanosom 80 nM ShK je znašala 130 RU. Do vezave vzorca F na s ShK zasičeno površino sinaptosomov ni prišlo, ker so bila vsa specifična mesta vezave že zasedena s predhodno vezanim ShK, vzorec F pa se ni vezal nespecifično.



Slika 26. Vezava 14 nM vzorca F (5-krat redčen) na zasičen čip z 80 nM ShK. Velikost odziva zasičenja čipa s tro-kratnim zaporednim enominutnim nanosom 80 nM ShK je znašala 130 RU. Do vezave vzorca F na s ShK zasičeno površino sinaptosomov ni prišlo, kar pomeni, da se vzorec ni vezal nespecifično na druga vezavna mesta, ki niso značilna za vezavo ShK.
4.6 DOLOČITEV AMINOKISLINSKEGA ZAPOREDJA IZBRANIH PEPTIDOV Z Edmanovo degradacijo smo določili N-terminalno aminokislinsko zaporedje izbranih peptidnih vzorcev F in H, frakcij RP-HPLC kromatografije (Slika 14). Uspeli smo določiti prvih 30 (F) oz. 31 (H) aminokislinskih ostankov. Po analizi rezultatov sta najverjetnejši spodnji zaporedji.

Vzorec H: KQCDDAESDCAQLQKQCRTSRNVRIVLCPKT

Vzorec F: KGCVDHMPTAYCENIEKQGQCNRNQDDDPK

Položaji cisteinskih ostankov so določene glede na izostanek signala. Rumeno označen cistein v zaporedju vzorca H ni zanesljiv. Prav tako niso povsem zanesljivi ostanki proti C-koncu zaporedja aminokislin (predvsem trije zaporedni Asp vzorca F).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Rezultati prve in druge ponovitve izolacije aktivnih polipeptidov sta se v koncentraciji proteinov v posameznih vzorcih razlikovali že od samega začetka. Frakcija 80-odstotnega acetona je v odvzetem vzorcu za prvo izolacijo vsebovala 25 mg/mL proteinov, preostali del frakcije, namenjen ponovitvi postopka izolacije, je vseboval 21 mg/mL proteinov. Glede na to, da sta bila vzorca odvzeta iz istega začetnega vzorca, lahko sklepamo, da je do te razlike prišlo med pipetiranjem – začetnega vzorca verjetno nismo dovolj dobro premešali preden smo odvzeli 4 mL vzorca, namenjenega prvemu poskusu izolacije aktivnih polipeptidov.

Pri ločevanju frakcije 80-odstotnega acetona na nepolarnem nosilcu ekstrakcijske kartuše je precejšen del peptidov že med nanašanjem vzorca pripotoval skozi kartušo, ne da bi se vezal na hidrofobni nosilec. V postopku prve izolacije aktivnih peptidov je bilo v nevezani frakciji dobrih 5 mg/ml, pri drugi izolaciji pa kar 11,5 mg/mL.

Na kolono nanešen vzorec smo spirali z destilirano vodo, s katero se je v prvi izolaciji spralo 6,5 mg/mL proteinov (od začetnih 25 mg/mL frakcije 80-odstotnega acetona) oz. 1 mg/mL v postopku druge izolacije aktivnih peptidov. Nižja koncentracija izpranih

proteinov v drugem primeru je verjetno posledica večjega izpiranja proteinov med nanašanjem vzorca.

Pri kationsko-izmenjevalni tekočinski kromatografiji visoke ločljivosti smo se orientirali in o retencijskih časih peptidnih toksinov sklepali predvsem na podlagi izsledkov prejšnjih raziskav mentorja (T. Turk).

Elektroforezno analizo in preverjanje hemolitične aktivnosti smo opravili le v prvem poskusu izolacije z razsoljenimi vzorci. Vzorci niso bili hemolitično aktivni, kar je potrdilo naše domneve, da acetonska frakcija z 80 % nasičenostjo več ne vsebuje hemolitičnih proteinov značilnih za predhodno obarjene frakcije z manjšo nasičenostjo acetona. Na podlagi elektroforetske analize smo za izhodni material nadaljnjih izolacijskih postopkov prve izolacije aktivnih peptidov izbrali vzorca 3 in 4, tj. skupka vrhov s kationsko izmenjevalne kromatografije (Slika 13, glej prilogo B (Slika 29)). Vzorca smo posamično ločili s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti z obrnjeno fazo. Posamezne RP-HPLC ločbe s kationsko izmenjevalno HPLC pridobljenih vzorcev 3 in 4 smo testirali na aktivnost oz. vezavo na izolirane sinaptosome. Od testiranih RP-HPLC vrhov se je vezal vzorce B (izoliran iz vzorca 3 ionsko izmenjevalne HPLC), katerega retencijski čas ločbe je podoben retencijskemu času toksina ShK (glej prilogo B (Slika 30)). Krivulja odziva vzorca B ob vezavi na sinaptosome je podobna krivuljam ShK. Odziv narašča skozi celoten nanos, sledeča disociacija pa očitno traja precej časa. Na podlagi podobnosti v retencijski časih smo prilagodili iskanje aktivnih peptidov druge izolacije.

Posamezne RP-HPLC vrhove druge izolacije aktivnih peptidov smo glede na podobnost retencijskemu času peptida ShK ter glede na vsebnost peptidov velikostnega razreda 4000 Da (masna spektrometrija) testirali na sposobnost vezave na sinaptosome. Potrdili smo aktivnost treh vzorcev (F, G, H). Ker masna spektrometrija velja za zelo natančno metodo določanja molekulske mase, bi lahko sklepali, da gre za isti ali vsaj zelo podoben peptid v vzorcih F in G, v vzorcu H pa je nekoliko drugačen peptid. Primerjava SPR odzivov vzorcev F, G in H na sinaptosome ne potrjuje prejšnje trditve. Krivulja odziva vzorca F je zelo podobna odzivom kontrolnega toksina ShK. Zanjo je značilna dokaj počasna asociacija, ki traja skozi celoten nanos, ter izredno dolga faza disociacije, ki raven

odziva glede na čas trajanja po vsej verjetnosti ne povrne na začetno raven. Vzorec G ima drugačno obliko krivulje odziva. Asociacija vzorca G je postopna, a hitra ter doseže najvišji odziv ob koncu nanosa vzorca na čip. Tudi disociacija vzorca G je hitra, njena hitrost pa je podobna disociaciji 100 nM ShK, nanešenega po visoki koncentraciji αdendrotoksina (Slika 18). Vzorec H ima spet drugačno obliko krivulje vezave. Asociacija je izredno hitra. Svoj vrh doseže že po prvih petih sekundah 60-sekundnega nanosa. V nadaljnjih petih sekundah pade odziv na polovično vrednost najvišjega odziva. Po končanem nanosu, vzorec H daljši čas postopno disociira s površine sinaptosomov. Disociacija lahko ostane nepopolna (vzorec s površine sinaptosomov ne disociira povsem). Masni spekter vzorca F prikazuje, da je vzorec precej čist. Glavna sestavina vzorca F je peptid z molekulsko maso 3840,25 Da. Odziv vezave vzorca F na sinaptosome, ki je podoben krivuljam toksina ShK, zato verjetno lahko pripišemo peptidnemu blokatorju v vzorcu. Vzorec G vsebuje manjšo količino prevladujočega peptida v vzorcu F. Vzorec H pa omenjenega peptida ne vsebuje. Vzorca G in H sta tudi manj čista od vzorca F ter vsebujeta nekatere peptide enakih molekulskih mas, vendar v različnih razmerjih. Tako, glede na drugačno obliko senzograma obstaja možnost, da prihaja do drugačnih interakcij vzorcev G in H s površino sinaptosomov, kot so značilne za peptidne blokatorje kalijevih kanalčkov. Vezava vzorcev G in H poteče precej hitreje kot je to značilno za toksin ShK, pri čemer je vezava vzorca G postopnejša in poteka skozi celoten čas nanašanja vzorca. Po končanem nanosu vzorec G hitro disociira s površine čipa. Nenavaden odziv vzorca G je verjetno posledica seštevka odzivov različnih interakcij med peptidi v vzorcu ter površino čipa. Hitra asociacija in hitra začetna disociacija sta verjetno posledici prehodne interakcije neaktivnih peptidov v vzorcu s površino sinaptosomov, medtem ko je podaljšana disociacija verjetno le posledica učinkovite vezave aktivnega peptida, ki ga zasledimo tudi v vzorcu F. Le-tega je v vzorcu G precej manj kot v F, tako je tudi njegova učinkovitost ustrezno manjša. Za razliko od vzorca G, odziv vzorca H doseže najvišjo vrednost že v prvih petih sekundah 60-sekundnega nanašanja vzorca na čip. V naslednjih petih sekundah odziv strmo upade na polovično vrednost najvišjega odziva, nato se disociacija upočasni. Po končanem 60-sekundnem nanosu je disociacija vzorca s površine sinaptosomov še naprej počasna. Vzorec H ne vsebuje aktivnega peptida iz vzorca F oz. G. Trajajoča nepopolna disociacija bi bila lahko posledica vsebnosti drugega aktivnega peptida. V vzorcu H je precej peptida z molekulsko maso 3894,00 Da, ki bi lahko igral vlogo potencialnega blokatorja kalijevih kanalčkov.

Primerjava odzivov različnih koncentracij toksina ShK ob nanosu na površino sinaptosomov prikazuje koncentracijsko odvisno vezavo toksina ShK na vezavna mesta (Slika 20). Glede na izmerjeno višino odzivov le-ta ne narašča popolnoma premosorazmerno. Višina odziva je poleg koncentracije toksina odvisna še od starosti uporabljenega čipa (nov oz. star, že večkrat uporabljen senzorski čip), količine imobiliziranih sinaptosomov, števila vezavnih mest na sinaptosomih. Višina odziva se nekaj sekund po končani asociaciji ustali in ohranja svojo vrednost še vsaj nadaljnjih 13 minut.

Želeli smo preveriti specifičnost vezave toksina ShK. Višino odziva totalne vezave ShK na sinaptosome brez dendrotoksina (Slika 19) bi odšteli od odziva nespecifične vezave ShK na sinaptosome s predhodno vezanim α -dendrotoksinom (Slika 18), s čimer bi dobili informacijo o specifični vezavi ShK na vezavna mesta. Zaradi razlik v pripravi površine čipa (nanašanje sinaptosomov, 100 mM NaOH) dobljenih rezultatov ne moremo neposredno primerjati na zgoraj opisan način. Vsekakor pa lahko razberemo, da do neke vezave ShK, nanešenega po α -dendrotoksinu, vendarle pride, a z vezavnih mest tudi hitro disociira. Glede na to, da je koncentracija toksina ShK razmeroma nizka in da se ShK veže z isto učinkovitostjo na enake kalijeve kanalčke kot α -dendrotoksin, verjetno lahko govorimo o nespecifični vezavi, kar nakazuje tudi dokaj hitra disociacija toksina ShK z membran.

Podoben poskus smo opravili z vzorcem F in ShK (Slika 26). Vezavna mesta na imobiliziranih sinaptosomih smo zasičili z 80 nM toksinom ShK. Prek površine čipa smo nato nanesli 14 nM vzorec F in opazovali morebitno vezavo. Nanešen vzorec se ni uspel vezati na površino sinaptosomov, kar pomeni da so vsa specifična, verjetno pa tudi nespecifična mesta vezave zasedena z ShK, čeprav le-ta ni v tako velikem prebitku. Izoliran aktivni peptid se torej veže na ista vezavna mesta kakor ShK. Koncentracija

aktivnega peptida v vzorcu F je bila prenizka, da bi uspel tekmovati in eventuelno izriniti visokoafinitetni ShK z zasedenih vezavnih mest.

Z Edmanovo degradacijo smo določili N-terminalno zaporedje peptidov v vzorcih F in H. Določili smo prvih 30 aminokislinskih ostankov vzorca F in prvih 31 ostankov vzorca H. Na podlagi primerjave določenih zaporedij z zaporedji drugih, iz morskih vetrnic izoliranih K_v 1 blokatorjev (Slika 27), in določenih mol. mas z masno spektroskopijo lahko sklepamo, da gre v obeh primerih za 35-aminokislinskih ostankov dolg aktiven peptid. Končne štiri oz. pet aminokislinskih ostankov nismo uspeli določiti zaradi nezanesljivosti avtomatskega sekveniranja zaporedij, ki so daljša od 30 aminokislin. Kljub temu, zaporedji obeh peptidov precej jasno nakazujeta na homologijo z blokatorji kalijevih kanalčkov, a hkrati kažeta tudi pomembne razlike.

Položaje cisteinskih ostankov smo predvideli glede na izostanek signala, ki manjka, kadar (tako kot v našem primeru) cisteini niso predhodno alkilirani. Zato so položaji cisteinskih ostankov v zaporedju verjetne, a ne popolnoma zanesljive. Tako, izostanek signala Cys3 peptida H ni bil najbolje viden in je zgolj predviden. Enako nezanesljiv podatek je prisotnost treh zaporednih aspartatnih ostankov na C-terminalnem delu peptida F. Glede na to, da so cisteinski ostanki določeni le na podlagi izostanka signala, obstaja verjetnost, da sta aspartatna ostanka Asp26 in Asp27 dejansko prisotna v zaporedju aminokislin, medtem ko bi na mestu 28 lahko bil cistein. Zaznan šibek signal določenega Asp28 bi potemtakem lahko bil zgolj posledica signala predhodnega aspartata v zaporedju, saj na mestu nealkiliranega cisteina signala ni.



Slika 27. Primerjava zaporedja aminokislin izoliranih peptidnih vzorcev F in H iz Urticina crassicornis z zaporedji nevrotoksinskih blokatorjev $K_v 1$ tipa napetostno-odvisnih kalijevih kanalčkov. Enaki aminokislinski ostanki so označeni z zeleno barvo. Aktivna diada je predstavljena na modrem ozadju. Na rdečem ozadju so prikazani nezanesljivo določeni aminokislinski ostanki. Rumeno ozadje označuje pomembno drugačnost peptida.

Da lahko primerjamo položaje cisteinskih ostankov obeh peptidov z ShK in drugimi toksini iz morskih vetrnic je potrebno uvesti precejšnje vrzeli, kar seveda ni najbolj zaželjeno (Slika 27, Slika 28). Poravnava aminokislinskih zaporedij peptidov H in F z zaporedji ostalih blokatorjev kalijevih kanalčkov, izoliranih iz morskih vetrnic, predvideva šest cisteinov, kar je značilnost toksinov morskih vetrnic tipa 1 (Castañeda in Harvey, 2009). Trije intramolekularni disulfidni mostički pomembno stabilizirajo strukturo toksina ter s tem močno prispevajo k njegovi aktivnosti (Pennington in sod., 1999). K stabilizaciji strukture toksina ShK prispeva tudi solni mostiček med Asp5 in Lys30 (Tudor in sod., 1996; Pennington, 1996a,b; Tudor in sod., 1998). Oba aminokislinska ostanka sta prisotna tudi v peptidih F in H, in sicer na enakih položajih kot v toksinu ShK oz. ostalih toksinih tipa 1 (Slika 27).

V obeh določenih aminokislinskih zaporedjih manjka aktivna diada – lizinski in sosednji tirozinski ostanek, ki sta odločilna za aktivnost omenjenih toksinov morskih vetrnic (Castañeda in sod., 1995; Schweitz in sod., 1995; Cotton in sod., 1997; Gendeh in sod., 1997; Minagawa in sod., 1998; Gasparini in sod., 2004). Aktivna diada je prisotna v vseh kompleksih toksin-K_v1 kanalček. Diadni hidrofobni ostanek (Tyr oz. Phe) tvori hidrofobne interakcije s tarčnim kanalčkom, ki ojačajo elektrostatske interakcije med diadnim lizinskim ostankom in kisikovimi atomi ostankov selektivnega filtra (Gilquin in sod., 2002). Aktivno diado bi pričakovali vsaj v vzorcu F, ki kaže primerljivo kinetiko vezave na receptorje kot toksin ShK. Zaporedje peptida F sicer vsebuje tirozinski ostanek, ki pa je v zaporedju na popolnoma drugem mestu kakor v znanih blokatorjih K^+ kanalčkov. Le-ta bi se lahko v terciarni zgradbi peptida približal enemu izmed treh lizinskih ostankov danega zaporedja ter z njim tvoril aktivno diado, kot je to značilno za škorpijonske toksine (Rodríguez de la Vega in Possani, 2004). Najverjetnejša možna kombinacija bi tako glede na bližino ter središčno lego v zaporedju lahko bila zveza med Lys17 in Tyr11. Vprašanje pa je ali je to zaradi položaja cisteinskih ostankov mogoče. V nasprotju s peptidom F, v zaporedju peptida H tirozinskega ostanka ne zasledimo. Prav tako v peptidu H (enako velja za peptid F) ni aromatskega fenilalanina, ki drugače značilno nadomešča tirozin v aktivnih diadah nekaterih škorpijonskih toksinov (Stampe in sod., 1994; Hidalgo in MacKinnon, 1995; Aiyar in sod., 1995b). Glede na to, da vzorec H nima odločilne aktivne diade ter da izraža izredno počasno disociacijo s sinaptosomov, ki je dolgotrajno nepopolna, kot je to značilno za kontrolni toksin ShK, se poraja vprašanje receptorskega vezavnega mesta ter možnih interakcij z njim.

K aktivnosti toksinov na kalijeve kanalčke dodatno prispeva serinski ostanek, ki leži v zaporedju dve mesti pred aktivno diado. Serinski ostanek tvori hidrofobne interakcije z določenim aminokislinskim ostankom kanalnega proteina oz. njegove podenote (Gilquin in sod., 2002). Tak serinski ostanek je v peptidu H, ne pa tudi v peptidu F (Slika 27). Serinski ostanek in ostanka aktivne diade veljajo za primarno vezavno jedro za blokiranje kalijevih kanalčkov (v podganjih možganih, K_v1.3, IK_{Ca}1) (Stampe in sod, 1994; Castañeda in sod., 1995; Schweitz in sod., 1995; Pennington in sod., 1996a; Cotton in sod., 1997; Dauplais in sod., 1997; Gendeh in sod., 1997; Minagawa in sod., 1998; Rauer in sod., 1999; Gasparini in sod., 2004).



Slika 28. Podrobnejša primerjava aminokislinskih ostankov zaporedij izoliranih vzorcev F in H z zaporedjem toksina ShK. V obarvanem ozadju prikazani aminokislinski ostanki toksina ShK so prisotni v vseh toksinih tipa 1, izoliranih iz morskih vetrnic (Slika 27).

Podrobnejša primerjava določenih zaporedij s toksinom ShK nam poda nekatere zanimive informacije (Slika 28). K interakciji toksina ShK s podenotami kanalčkov pomembno prispevajo Ile7, Arg11, His19, Ser20, Met21, Arg24, Phe27 in Arg29 (Tudor in sod., 1996; Pennington in sod., 1996a; Kalman in sod., 1998; Rauer in sod., 1999; Chandy in sod., 2001). Kot že omenjeno, peptid H vsebuje Ser20 ter poleg njega še en serinski ostanek – Ser8. Zaporedje peptida F ne vsebuje serinskih ostankov. Obe določeni zaporedji vsebujeta po en izolevcinski ostanek – Ile25 v peptidu H oz. Ile15 v peptidu F. V zaporedjui peptida H so trije argininski ostanki – Arg18, Arg21 in Arg24 – ter nobenega metionina. Peptid F pa za razliko vsebuje Met7 ter Arg23. Histidinski ostanek vsebuje le peptid F – His6. Kot že omenjeno, v nobenem od peptidov ni fenilalanina.

V aktivni načrt toksina BgK proti različnim tarčnim kanalčkom uvrščamo poleg aktivne diade in Ser23 še bazične ostanke Arg3, Lys7, Arg12, His13, aromatska Trp5, Phe6, ter

karbonil-amidirana Asn19, Gln24 (Cotton in sod., 1997; Alessandri-Haber in sod., 1999; Gilquin in sod., 2002). Določeni zaporedjil ne vsebujeta triptofana.

Posebnost izoliranih peptidov v primerjavi z drugimi blokatorji K⁺ kanalčkov je veliko število asparaginskih in glutaminskih ostankov – Gln2, Gln12, Gln14, Gln16, Asn22 najdemo v peptidu H, v peptidu F pa Asn14, Gln18, Gln20, Asn22, Asn24 in Gln25. V nasprotju z blokatorji K⁺ kanalčkov vsebuje predvsem peptid F nenavadno veliko kislih aminokislin, vsega skupaj kar šest, čeprav so vsaj tiste na C-terminalnem koncu peptida vprašljive. Peptid H vsebuje štiri kisle aminokislinske ostanke, kar je še vedno veliko v primerjavi z ostalimi inhibitorji K_v1 kanalčkov, ki imajo enega do največ tri kisle aminokislinske ostanke. Blokatorji K_v1 kanalčkov vsebujejo bistveno več bazičnih aminokislinskih ostankov – sedem do devet. Peptida F in H jih imata manj – peptid H vsebuje šest bazičnih aminokislin, peptid F pa le 5.

Zaporedji peptidov F in H torej predvidevata bolj kislo naravo izoliranih peptidov oz. manjšo hidrofobnost, kot je to značilno za podobne peptidne toksine iz morskih vetrnic. Še posebno peptid F vsebuje nenavadno razmerje kislih in bazičnih aminokislinskih ostankov. Za blokatorje kanalčkov velja, bolj bazičen je peptid, bolj aktiven je. Vprašanje pa je ali testirani vzorci res inhibirajo kalijeve kanalčke, in v primeru da jih, na kateri tip oz. podenoto kanalčka se vežejo.

5.1.1 Sinaptosomi

Sinaptosome smo izolirali po dveh različnih metodah. Za uporabo druge metode izolacije smo se odločili iz več razlogov. Za izbiro metode po Dodu smo se odločili zaradi časovno krajše izolacije, ki prihrani nekaj ur dela, ter dobre kvalitete sinaptosomov, določene na podlagi primerjav več načinov izolacij (Dodd in sod., 1981). K poseganju po krajši metodi izolacije nas je napeljalo dejstvo, da smo s prvo opisano metodo izolacije sinaptosomov izmed treh poskusov izolacije uspeli le prvič izolirati delujoče sinaptosome, v nadaljnjih poskusih pa le-ti niso bili sposobni vezati uporabljenih toksinov. Razlogov za neuspeh izolacij je več. V drugem poskusu izolacije so skorjo možganov predhodno zamrznili na - 80 °C. Možno je, da so celice tkiva popokale oz. se spremenile, kar je vplivalo na nadaljnji potek izolacije in neuspeh vezave preizkušenih toksinov. Slednje ne drži za neuspeh tretjega poskusa ponovitve protokola izolacije. Razlog bi lahko bila predolga

homogenizacija tkiva možganske skorje, s katero smo morda popolnoma uničili strukturo sinaptičnega dela nevronov. K neuspehu izolacije bi lahko prispevala tudi nehotena nenatančnost pri ločevanju plasti usedline centrifugiranja zaradi izredno majhne količine izhodnega tkiva glede na opisano metodo, ki sta jo razvila Booth in Clark (Booth in Clark, 1978).

Količina vezanih toksinov je odvisna od količine imobiliziranih sinaptosomov. Lipofilne skupine na karboksimetiliranem dekstranu na površini čipa omogočajo dobro vezavo sinaptosomov. A ta je vsakič drugačna in kot kaže, kljub istemu postopku priprave sinaptosomov in enakem načinu nanosa na senzorski čip, ni popolnoma ponovljiva. Razlog za to bi lahko bila površina senzorskega čipa. Večino poskusov smo namreč opravili na že uporabljenih senzorskih čipih, ki so imeli že spremenjeno površino. Tako je bil že osnovni odgovor čipa celo do enkrat višji, kot bi moral biti. Del poskusov (vezava 40 nM ShK in vzorca H), pri katerih smo uporabili nov senzorski čip, je potekal precej bolje, a smo tudi pri teh poskusih opazili precejšnjo razliko v višini odgovora imobiliziranih sinaptosomov.

Na količino vezanih toksinov vpliva tudi kakovost imobiliziranih sinaptosomov. Sinaptosomi, izolirani po postopku daljše, prve izolacije, so vsebovali manj proteinov, fosfolipidov in holesterola kot sinaptosomi, izolirani po krajšem postopku izolacije. Nižja vsebnost teh komponent se odraža v slabši kakovosti in manj stabilni bazni liniji. Nižja kot je koncentracija proteinov, manj povezav lahko nastane med transmembranskimi kanalnimi proteini in njihovimi peptidnimi blokatorji. S tem dejstvom lahko razložimo slabšo vezavo bolj koncentriranega vzorca B prve ponovitve izolacije peptidnih blokatorjev na manj kakovostne sinaptosome daljšega postopka izolacije (Slika 21). Koncentracija proteinov v vzorcu B je znašala 400 µg/mL, kar je 2,67-4,00-krat višja koncentracija od izmerjene v vzorcih F, G in H. Do razmeroma velikih razlik prihaja tudi v primeru koncentracijske odvisnosti vezave kontrolnega toksina ShK na vezavna mesta na sinaptosomih krajše izolacije, kjer pa odstopanj od pričakovanih rezultatov višine odzivov ne moremo razložiti le z razliko v količini imobiliziranih sinaptosomov na čipu. Eksperiment vezave 10 nM in 20 nM ShK smo izvedli na že mnogokrat uporabljenih čipih, katerih kakovost ni bila najboljša. Vezavo 40 nM ShK pa so izvedli na popolnoma svežem, še neuporabljenem čipu. Razlog za razliko bi tako po vsej verjetnosti lahko bila kvaliteta senzorskega čipa.

K neenakomerni količini imobiliziranih sinaptosomov še dodatno prispeva spiranje šibkeje vezanih sinaptosomov s 100 mM NaOH. Ugotovili smo, da se odgovor pri tem lahko spremeni od za le malo (140 RU) do precej (1400 RU). Tudi tu se pojavi vprašanje kakovosti površine senzorskega čipa in vezanih sinaptosomov.

Specifičnost vezave kontrolnega toksina ShK ter izoliranih potencialnih aktivnih peptidov na sinaptosome smo poskušali zagotoviti z vezavo 0,1 mg/mL BSA (goveji serumski albumin) (enkratni enominutni nanos pri pretoku 20 µL/min skozi obe pretočni celici). Na osnovi izkušenj osebja katedre in rezultatov raziskav v člankih smo predvideli, da bo BSA zasedel vsa možna nespecifična vezavna mesta na površini referenčne pretočne celice senzorskega čipa ter s tem preprečil možno nespecifično vezavo izoliranih peptidnih vzorcev na površino čipa v referenčni pretočni celici.

Linija odziva pogosto ni bila stabilna in se je spreminjala s časom. Pojav je bil pogost pri že večkrat uporabljenih senzorskih čipih. Dokaj stabilno odzivno linijo smo uspeli dobiti z enkratnim enominutnim spiranjem čipa s 100 mM NaOH pri pretoku 20 µL/min skozi obe pretočni celici (po nanosu BSA in pred vezavo vzorca). Ker se je linija pogosto (odvisno od starosti čipa) še vedno konstantno spreminjala s časom, smo pred nanosom vzorca na čip nanesli delovni pufer, odziv le-tega pa smo pri analizi rezultatov odšteli od odziva za pufrom nanešenega vzorca. Tako smo normalizirali bazno linijo, samega odziva analita na imobiliziran ligand pa s tem praktično nismo spremenili.

Spiranje površine čipa je bilo vedno dolgotrajno. Vezani toksini so se dobro sprali z dvema do tremi zaporednimi enominutnimi nanosi 100 mM NaOH. Večji problem so predstavljali imobilizirani sinaptosomi. Najuspešneje smo se jih lotili z mnogokratnim zaporednim enominutnim nanosom mešanice izopropanola in 50 mM NaOH v razmerju 2:3. Dvominutna izpostavitev istemu regeneratorju je bila manj učinkovita. Za odstranjevanje sinaptosomov smo uporabili tudi druga regeneracijska sredstva v različnih zaporednih kombinacijah: 0,5 % NaDS, 40 mM oktil-β-glukopiranozid, 10 mM glicin (pH 1,5, pH 2,0, pH 2,5, pH 9,5), 1 M NaCl v 50 mM NaOH, 1 M NaCl, 5 M NaCl, 4,0 M MgCl₂, etilenglikol, 100 mM HCl, vendar našteta sredstva niso bila ravno uspešna pri

odstranjevanju preostanka vezanih sinaptosomov, ki jih mešanica izopropanola in 50 mM NaOH v razmerju 2:3 ni uspela popolnoma odstraniti s površine senzorskega čipa. Od naštetih sredstev je bila še najuspešnejša regeneracija z večkratnim zaporednim enominutnim nanosom 0,5 % NaDS.

Regeneracija površine čipa po vsakem poskusu je trajala najmanj dobro uro; pogosto pa mnogo dlje. Tako se je kar nekajkrat zgodilo, da kljub vsem opisanim postopkom nismo uspeli dovolj dobro regenerirati čipa in smo ga morali spirati še več ur naslednji dan. Višina odziva se je po dolgotrajni regeneraciji (tudi 8-urni) sicer precej zmanjšala, vendar ne na začetno raven. Kadar vidnejšega uspeha v regeneraciji površine čipa tudi po celodnevnem poskušanju nismo dosegli, odziv na čipu pa je bil še vedno zelo visok (tudi do dvakrat višji kot pri novem čipu), smo »delovni čip« kar direktno obdelali z regeneracijsko metodo »Desorb«, ki smo jo izbrali v meniju delovnega programa. Ta metoda je sicer v prvi vrsti namenjena čiščenju aparata po vsakem zaključenem eksperimentu (za izvajanje metode »Desorb« se navadno uporablja vzdrževalni čip). Odziv na čipu je bil po omenjeni metodi malenkost nižji, vendar še vedno daleč od pričakovane začetne vrednosti ali odziva novega čipa. V takšnih primerih smo čip zavrgli in uporabili drug čip, ki pa večinoma tudi ni bil nov. Popolnoma nov čip smo uporabili le za vezavo nekaterih peptidnih vzorcev, in sicer v sledečem zaporedju: 40 nM ShK, vzorec F, vzorec H. Regeneracija čipa je bila najuspešnejša pri novem čipu. Z vsakim naslednjim eksperimentom je bila regeneracija težja, dolgotrajnejša in tudi nepopolna.

Zaradi težavnega spiranja imobiliziranih sinaptosomov smo za vsakim od zaporednih nanosov sinaptosomov spirali mikrotekočinski sistem z metodo »Wash« v meniju delovnega programa (spiranje s pufrom pri zelo visokem pretoku). Isto metodo smo uporabljali na različnih mestih pred nanosom vzorcev na površino čipa, s čimer smo poskušali izboljšati stabilnost linije odziva ter preprečiti morebitno zastajanje vbrizganih snovi na stenah mikrotekočinskega sistema.

Predvsem zaradi izjemno težkega spiranja sinaptosomov s površine senzorskega čipa smo začeli iskati nove možnosti za preučevanje vezave peptidnih molekul. Predlogov za preučevanje vezave je več. Glede na to, da obstaja možnost dela na aparatih Biacore v Infrastrukturnem centru za površinsko plazmonsko resonanco, bi bilo smiselno uporabiti obraten način vezave (Chai in sod., 2006) – na čip vezan toksin bi izzvali s po krajši metodi izoliranimi sinaptosomi. Za takšen način imobilizacije toksina bi potrebovali večje koncentracije toksina, kot smo jih imeli na voljo. Chai in sodelavci so preučevani toksin (40 μ L s koncentracijo 40 μ g/mL v 10 mM acetatnem pufru, pH 5,0) imobilizirali na površino senzorskega čipa CM5 (karboksi-metiliran dekstran); na referenčno pretočno celico toksina niso vezali. Vezani toksin so izvali s podganjimi cerebrokortikalnimi sinaptosomi, izoliranimi po Doddu ter raztopljenimi v nanašalnem pufru (150 mM NaCl, 3,5 mM EDTA, 0.05 % BIAcore surfaktant P-20 in 10 mM Hepes, pH 7,4). Poskus so izvajali pri pretoku 5 μ L/min. Površino čipa so regenerirali z 10 mM NaOH.

Ji in sodelavci so na podoben način imobilizirali toksin na površino senzorskega čipa CM5. Prek imobiliziranega toksina so uvajali različne koncentracije podganjih možganskih sinaptosomov ter opazovali vezavo toksina na sinaptosome. Hitrost vezave je odvisna od koncentracijskega gradienta sinaptosomov (višja je koncentracija sinaptosomov, hitrejša je vezava toksina nanje). Za popolno disociacijo vezanih proteinov so površino čipa regenerirali s 100 mM NaOH (Ji in sod., 2003).

Z enakim zaporedjem nanosov bi lahko opazovali kompetitivno vezavo različnih toksinov na sinaptosome (Jia in sod., 1999; Ji in sod., 2003). Jia in sodelavci so preučevani toksin imobilizirali na površino senzorskega čipa CM5. Podganje možganske sinaptosome (izolirane po opisani metodi po Dodd-u; Dodd in sod., 1981) so predhodno 30 minut inkubirali z drugimi toksini pri 37°C ter jih nato vbrizgali prek senzorskega čipa. Ugotavljali so najnižjo koncentracijo preučevanega toksina, ki je še kompetentna izbranim kontrolnim toksinom (tj. ali se še veže na sinaptosome v prisotnosti izbranih kontrolnih toksinov) (Jia in sod., 1999). Ji in sodelavci so izvedli podoben poskus. Na enak način so imobilizirali preučevani toksin ter nato na čip nanesli sinaptosome, ki so jih predhodno inkubirali s preučevanim in drugimi toksini. S sinaptosomi predhodno inkubiran preučevani toksin je predstavljal pozitivno kontrolo. Enako količino podganjih možganskih sinaptosomov so uporabili za negativno kontrolo (Ji in sod., 2003).

Ker vseh parametrov dela s sinaptosomi v poskusu ne moremo popolnoma kontrolirati in se o njihovi vsebnosti lahko zanašamo le na Doddov članek, bi bilo namesto sinaptosomov za preučevanje vezave smiselno uporabljati umetno narejene vezikle z izraženimi

različnimi podtipi kalijevih kanalčkov. Tako bi dejansko ugotovili oz. lahko potrdili vezavo izoliranih toksinov na kalijeve kanalčke ter natančno določili podenote kanalčkov, ki vežejo toksinsko molekulo.

Obstajajo tudi drugačni načini preučevanja aktivnosti toksinskih molekul. Molekule ter tarčna mesta se ustrezno označi in nato z uporabo mikroskopskih tehnik spremlja vezava na posamezne razrede visoko afinitetnih vezavnih mest (Koch in sod., 1997). Na podlagi označevanja lahko spremljamo tudi medsebojno kompeticijo dveh toksinov za vezavna mesta, s čimer dobimo informacijo o afiniteti preučevanega toksina za njegova tarčna mesta oz. njegovo učinkovitost delovanja (Castañeda in sod., 1995).

5.2 SKLEPI

Z ustaljenimi metodami za izolacijo blokatorjev kalijevih kanalčkov smo iz morske vetrnice Urticina crassicornis uspeli izolirati aktivne peptidne vzorce. Aktivnost peptidov v izoliranih vzorcih smo preverili s tehnologijo SPR (površinska plazmonska resonanca) izolirane vzorce smo vodili prek površine čipa z imobiliziranimi sinaptosomi. Od peptidnih vzorcev prve izolacije toksinskih blokatorjev kalijevih kanalčkov smo aktivnost dokazali vzorcu B, ki nam je dalje služil kot orientacijsko območje vsebnosti toksina v kromatogramih. Glede na bližino v retencijskemu času vzorca B prve izolacije smo izbrali posamezne RP-HPLC vrhove druge izolacije aktivnih peptidov ter jim z uporabo masne spektrometrije določili molekulske mase peptidov v vzorcih. Izkazalo se je, da so vsi vzorci vsebovali nekaj primesi drugih peptidov. Peptide z molekulsko maso okrog 4000 Da, kar je značilnost K_v1 blokatorjev morskih vetrnic, so vsebovali vzorci F, G in H. Med njimi je bil najbolj čist vzorec F. Izmerjena molekulska masa potencialnih aktivnih peptidov v vzorcih F in G je bila 3840 Da, v vzorcu H pa 3894 Da. Vsem trem testiranim vzorcem smo potrdili aktivnost na sinaptosome. Senzogrami odzivov vzorcev F, G in H se med seboj precej razlikujejo. Senzogram vzorca F je podoben odzivom vezave toksina ShK. Aktivni peptid iz vzorca F vsebuje tudi vzorec G, vendar v manjši količini. Odziv vzorca G se kljub temu precej razlikuje od odzivov ShK, kar po svoje potrjuje manjšo vsebnost aktivnega peptida iz vzorca F ter prevlado drugih neaktivnih peptidnih komponent v vzorcu G. Vzorec H ne vsebuje aktivnega peptida iz vzorca F oz. G. Odziv vzorca H se ustrezno razlikuje od odzivov toksina ShK. Presenetljiva je le izredno počasna in dolgotrajna disociacija s površine sinaptosomov. Ker je v vzorcu največ peptida, ki vsaj po velikosti ustreza inhibitorjem K_v 1 kanalčkov iz morskih vetrnic, bi lahko šlo za drugačen aktiven peptid.

Vzorec F se veže na ista vezavna mesta kot ShK, kar potrjuje vsebnost peptidnih inhibitorjev kalijevih kanalčkov v vzorcu. Smiselno bi bilo preveriti ali se ShK veže še na katera druga vezavna mesta na sinaptosomih, na katera vzorec F nima vpliva.

Vzorcema F in H smo z uporabo N-terminalne Edmanove degradacije določili zaporedje aminokislin. Analiza izoliranih aktivnih peptidov nakazuje na homologijo z drugimi toksini morskih vetrnic tipa 1, ki blokirajo K_v 1 tip napetostno-odvisnih kalijevih kanalčkov, a se od njih tudi pomembno razlikujeta.

Peptidoma manjka aktivna diada, ki je ključna za aktivnost sorodnih inhibitorjev ter drugih blokatorjev K_v 1 kalijevih kanalčkov. Tirozinski ostanek peptida F bi se načeloma v prostorski zgradbi peptida lahko približal enemu izmed treh lizinskih ostankov v verigi in skupaj z njim tvoril prostorsko urejeno aktivno diado, kar je drugače značilno za škorpijonske blokatorje kalijevih kanalčkov. Peptid H ne vsebuje tirozinskega ostanka ali fenilalaninskega ostanka, ki navadno sodelujeta v aktivni diadi (slednji predvsem v škorpijonskih toksinih). K aktivnosti toksina pomembno prispeva hidrofoben serinski ostanek, ki v zaporedju inhibitorjev iz morskih vetrnic leži dve mesti pred aktivno diado. Serinski ostanek zasledimo v zaporedju peptida H, peptid F pa ga ne vsebuje.

Cisteinski ostanki, ki z disulfidnimi mostički pomembno stabilizirajo strukturo peptida ter omogočajo njegovo aktivnost, so v obeh določenih zaporedjih po vsej verjetnosti zastopani v polnem številu (6 cisteinov na peptid), čeprav bi jih bilo potrebno za natančno določitev predhodno alkilirati. Prav tako sta v obeh zaporedjih zastopana aminokislinska ostanka, ki tvorita solni mostiček (Asp5 ter Lys30), ki še dodatno stabilizira strukturo K_v1 toksinov morskih vetrnic.

K vezavi na kalijeve kanalčke prispevajo še nekateri drugi aminokislinski ostanki, ki pa ne ležijo na enakih mestih v zaporedjih toksinov. Obe določeni zaporedji vsebujeta po en izolevcinski ostanek ter različno število argininskih, asparaginskih in glutaminskih ostankov. Peptid F vsebuje še en histidinski ostanek ter en metioninski ostanek. Omenjeni ostanki so vpleteni v aktivni načrt toksinov ShK in BgK.

Za testiranje aktivnosti izoliranih peptidnih frakcij smo uporabili sinaptosome, izolirane po dveh različnih postopkih. Za kvalitetnejše so se izkazali sinaptosomi druge izolacije – omogočali so višje odzive vezave aktivnih vzorcev pri nižjih koncentracijah le-teh. Pri testiranju vezave ligandov na sinaptosome predstavlja precejšen problem regeneracija površine senzorskih čipov. Boljše rezultate smo dobili z uporabo novih čipov.

Odziv imobiliziranih sinaptosomov na čipu je bil zelo različen. Zato je potrebno vzorce sinaptosomov na vsakem koraku ustrezno dobro premešati.

Bazna linija odziva je pogosto konstantno naraščala. Vezava 0,1 mg/mL BSA, ki je zasedel vsa nespecifična vezavna mesta na referenčni celici, je linijo precej zravnala. Za dodatno izravnavo smo ponekod za BSA nanesli še 100 mM NaOH, ki se je izkazal za primerno metodo, oz. smo pred vzorcem obvezno nanesli pufer. Linijo odziva pufra smo pri obdelavi podatkov odšteli od linije odziva vzorca ter s tem umetno zravnali konstantno naraščajočo linijo odziva.

V poskusu vezave smo z metodo Wash, ki jo ponuja proizvajalec, spirali mikrotekočinski sistem s pufrom pri zelo visokem pretoku, s čimer smo želeli preprečiti morebitno zastajanje vbrizganih snovi na stenah mikrotekočinskega sistema in s tem izboljšati stabilnost linije odziva ter omiliti težave regeneracije čipa.

Zaradi težavne regeneracije bi bilo v prihodnje smiselno testirati aktivnost izoliranih vzorcev na način, ki ga opisujejo Chai in sodelavci (Chai in sod., 2006). Na senzorski čip CM5 bi imobilizirali izoliran peptidni vzorec ter šele nato nanesli sinaptosome. Za omenjeni eksperiment bi potrebovali večje količine izoliranih vzorcev oz. aktivnih peptidov, kot smo jih imeli na voljo v naših eksperimentih.

Izolirane aktivne vzorce bi bilo smiselno še bolje očistiti, tako da ne bi vsebovali primesi, temveč le peptide velikostnega razreda 4000 kDa. Tako bi lahko dobili SPR odzive posameznih, nam zanimivih peptidov.

Peptidom bi bilo smiselno določiti celotno aminokislinsko zaporedje ter položaj cisteinskih ostankov v njem.

6 VIRI

- Aggarwal S.K., MacKinnon R. 1996. Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K+ channel. Neuron 16, 1169-1177
- Aiyar J., Rizzi J.P., Gutman G.A., Chandy K.G. 1995a. The signature sequence of the voltage-gated potassium channels projects into the external vestibule. J. Biol. Chem. 271, 31013-31016
- Aiyar J., Withka J.M., Rizzi J.P., Singleton D.H., Andrews G.C., Lin W., Boyd J., Hanson D.S., Simon M., Dethlefs B., Lee C.-L., Hall J.E., Gutman G.A., Chandy K.G. 1995b.
 Topology of the pore-region of a K⁺ channel revealed by the NMR-derived structures of scorpion toxins. Neuron 15, 1169-1181
- Alessandri-Haber N., Lecoq A., Gasparini S., Grangier-Macmath G., Jacquet G., Harvey A.L., de Medeiros C., Rowan E.G., Gola M., Ménez A. Crest M. 1999. Mapping the functional anatomy of BgK on Kv1.1, Kv1.2, and Kv1.3 cleus to design analogs with enhanced selectivity. J. Biol. Chem. 274, 50, 35653-35661
- Aneiros A., Garcia I., Martinez J.R., Harvey A.L., Anderson A.J., Marshall D.L., Engström Å., Hellmann U., Karlsson E. 1993. Biochem. Biophys. Acta 1157, 86-92
- Århem P. 2004. Voltage sensing in ion channels: a 50-year-old mystery resolved?. Lancet 363, 1221-1223
- Armstrong C.M., Bezanilla F. 1974. Charge movement associated with the opening and closing of the activation gates of the Na channels. J. Gen. Physiol.63, 533-552
- *Awan K.A., Dolly J.O. 1991.* K^+ *channel sub-types in rat brain: characteristic locations revealed using β-bungarotoxin, α- and β-dendrotoxins. Neuroscience 40, 29-39*
- Barrezueta N.X., Pearsall D.M., Schechter L.E., Rhodes K.J. 1994. Distribution of (¹²⁵I)αdendrotoxin binding sites in the amygdala, hippocampus, and entorhinal cortex of the monkey. Soc. Neurosci. Abst. 20
- Batista C.V., Gomez-Lagunas F., Rodriguez de la Vega R.C., Hajdu P., Panyi G., Gaspar R., Possani L.D. 2002. Two novel toxins from the Amazonian scorpion Tityus cambridgei that block Kv1.3 and Shaker B K⁺ channels with distinctly different affinities. Biochem. Biophys. Acta 1601, 2, 123-131
- Bednarek M.A., Bugianesi R.M., Leonard R.J., Felix J.P. 1994. Chemical synthesis and structure-function studies of margatoxin, a potent inhibitor of voltage-dependent

potassium shannel in human T lymphocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 198, 619-625

- Belva H., Valois C., Lange C. 2000. Determination of disulphide bonds in highly bridged alpha-dendrotoxin by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry 14, 224-229
- Benishin C.G., Sorensen R.G., Brown W.E., Krueger B.K., Blaustein M.P. 1988. Four polipeptide components of green mamba venom selectively block certain potassium channels in rat synaptosomes. Mol. Pharmacol. 34, 152-159
- Bezanilla F. 2000. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. Physiol. Rev. 80, 555-592
- Bidard J-N., Moure C., Gandolfo G., Schweitz H., Widmann C., Gottesmann C., Lazdunski M. 1989. Analogies and differences in the mode of action and properties of binding sites (localization and mutual interactions) of two K⁺ channel toxins, MCD peptide and dendrotoxin I. Brain Res. 495, 45-57
- Black A.R., Donegan C.M. Denny B.J., Dolly J.O. 1988. Solubilization and physical characterization of acceptors for dendrotoxin and β-bengarotoxin from synmaptic membranes o frat brain. Biochemistry 27, 6814-6820
- Blanc E., Sabatier J.M., Kharrat R., Meunier S., El Ayeb M., Van Rietschoten J., Darbon
 H. 1997. Solution structure of maurotoxin, a scorpion toxin from Scorpio maurus, with
 high affinity for voltage-gated potassium channels. Proteins 29, 3, 321-333
- Bontems F., Gilquin B., Roumestand C., Ménez A., Toma F. 1992. Analysis of the sidechain organization on a refind model of charybdotoxin: structural and functional implications. Biochemistry 31, 7756-7764
- Bontems F., Roumestand C., Gilquin B., Ménez A., Toma F. 1991. Refined structure of charibditoxin: common motifs in scorpion toxins and insect defensins. Science 254, 1521-1523
- Booth R.F., Clark J.B. 1978. A rapid method for the preparation of relatively pure metabolically competent synaptosomes from rat brain. Biochemical Journal, 176, 2: 365-70
- Bradford H.F. 1975. Isolated nerve terminals as an in vitro preparation for the study of dynamic aspects of transmitter metabolism and release. In: Iversen L.L., Iversen S.D.,

Snyder S.M., editors, Handbook of Psychopharmacology 1. London: Plemium press, 96-117

- Castañeda O., Harvey A.L. 2009. Discovery and characterization of cnidarians peptide toxins that affect neuronal potassium channels. Toxicon, 54, 8, 1119-1124
- Castañeda O., Sotolongo V., Amor A.M., Stöcklin R., Anderson A.J., Harvey A.L., Engström Åke, Wernstedt C., Karlsson E. 1995. Characterisation of potassium channel toxin from the caribbean sea anemone Stichodactyla helianthus. Toxicon 33, 5, 603-613
- Catterall W.A. 1995. Structure and function of voltage-gated ion channels. Ann. Rev. Biochem, 64, 493-531
- Catterall W.A., Cestèle S., Yarov-Yarovoy V., Yu F.H., Konoki K., Scheuer T. 2007. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. Toxicon 49, 124-141
- Cha A., Snyder G.E., Selvin P.R., Bezanilla F. 1999. Atomic scale movement of the voltage-sensing region in a potassium channel measured via spectroscopy. Nature 402, 809-813
- Chai Z.-F., Zhu M.-M., Bai Z.-T., Liu T., Tan M., Pang X.-Y., Ji Y.-H. 2006. Chinesescorpion (Buthus martensi Karsch) toxin BmK αIV, a novel modulator of sodium channels: from genomic organization to functional analysis. Biochem. J. 399, 445-453
- Chandy K.G., Cahalan M., Pennington M., Norton R.S., Wulff H., Gutman G.A. 2001. Potassium channels in T lymphocytes: toxins to therapeutic immunosuppressants. Toxicon 39, 1269-1276
- Cochran S.M. 1998. Ph.D. Thesis, University of Strathclede, Glasgow
- Cotton J., Crest M., Bouet F., Alessandri N., Gola M., Forest E., Karlsson E., Castañeda O., Harvey A.L., Vita C., Ménez A. 1997. A potassium-channel toxin from the sea anemone Bunodosoma granulifera, an inhibitor for Kv1 channels. Revision of the amino acid sequence, disulfide-bridge assignment, chemical synthesis, and biological activity. Eur. J.Biochem. 244, 192-202
- *Cuello L.G., Cortes D.M. Perozo E. 2004. Molecular architecture of the KvAP voltagedependent K*⁺ *channel in a lipid bilayer. Science 306, 491-495*
- Dauplais M., Lecoq A., Song J., Cotton J., Jamin N., Gilquin B., Roumestand C, Vita C., de Medeiros C.L., Rowan E.G. in sod. 1997. On the convergent evolution of animal

toxins. Conservation of a diad of functional residues in potessium channel-blocking toxins with unrelated structures. J. Biol. Chem. 272, 4302-4309

- Delepierre M., Prochnicka-Chalufour A., Boisbouvier J., Possani L.D. 1999. Pi7, an orphan peptide from the scorpion Pandinus imperator: a ¹H-NMR analysis using a nano-NMR Probe. Biochemistry 38, 51, 16756-16765
- Diochot S., Schweitz H., Béress L., Lazdunski M. 1998. Sea anemone peptides with a specific blocking activity against the fast inactivating potassium channel Kv3.4. The Journal of biological chemistry 273, 12, 6744-6749
- Dodd P.R., Hardy J.A., Oakley A.E., Edwardson J.A., Perry E.K., Delaunoy J.-P. 1981. A rapid method for preparing synaptosomes: comparison, with alternative procedures. Brain Research 226, 107-118
- Dolly J.O., Parcej D.N. 1996. Molecular properties of voltage-gated K⁺ channels. J. Bioenerg. Biomembr. 28, 231-253
- Doyle D.A,. Cabral J.M., Pfuetzner R.A., Kuo A., Gulbis J.M., Cohen S.L., Chait B.T., MacKinnon R. 1998. The structure of the potessium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. Science 280, 69-77
- Drakopoulou E., Vizzavona J., Neyton J., Aniort V., Bouet F., Virelizier H., Ménez A., Vita C. 1998. Consequence of the removal of evolutionary conserved disulfide bridges on the structure and function of charybdotoxin and evidence that particular cystein spacings govern specific disulfide bond formation. Biochmistry 37, 5, 1292-1301
- Dufton M.J., Harvey A.L. 1998. Dendrotoxins: how does structure determine function? J. Toxicol. Toxin Rev. 17, 161-182
- Dunkley P.R., Rostas J.A.P., Heath J.W., Powis D.A. 1987. The preparation and use of synaptosomes for studying secretion of catecholamines. In: Poisner A.M., Trifaro J.-M., editors, In Vitro Methods for Studying Secretion. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 315-334
- Escoubas P., Diochot S., Corzo G. 2000. Structure and pharmacology of spider venum neurotoxins. Biochimie 82, 9-10, 893-907
- Fernandez I., Romi R., Szendeffy S., Martin-Eauclaire M.F., Rochat H., Van Rietschoten J., Pons M., Giralt E. 1994. Kaliotoxin (1-37) shows structural differences with related potassium channel blockers. Biochemistry 33, 14256-14263

- Gao Y.D., Garcia M. 2003. Interaction of agitoxin2, charybdotoxin, and iberiotoxin with potassium channels: selectivity between voltage-gated and maxi-K channels. Proteins 52, 2, 146-154
- Garcia M., Gao Y.-D., McManus O.B., Kaczorowski G.J. 2001. Potassium channels: from scorpion venoms to high-resolution structure. Toxicon 39, 739-748
- *Garcia M.L., Hanner M., Kaczorowski G.J. 1998. Scorpion toxins: tools for studying K*⁺ *channels. Toxicon 36, 11, 1641-1650*
- Garcia M.L., Hanner M., Knaus H.-G., Koch R., Schmalhofer W., Slaughter R.S., Kaczorowski G.J. 1997. Pharmacology of potassium channels. Adv. Pharmacol. 39, 425
- Gasparini S., Danse J.M., Lecog A., Pinkasfeld S., Zinn-Justin S., Young L.C., de Medeiros C.L.C., Rowan E.G., Harvey A.L., M énez A. 1998. Delineation of the functional site of α-dendrotoxin. The functional topographies of dendrotoxins are different but share a conserved core with those of other Kv1 potassium channel-blovking toxins. J. Biol. Chem. 273, 25393-25403
- Gasparini S., Gilquin B., Ménez A. 2004. Comparison of sea anemone and scorpion toxins binding to Kv1 channels: an example of convergent evolution. Toxicon 43, 901-908
- Gendeh G.S. Young L.C., de Medeiros C.L., Jeyaseelan K., Harvey A.L., Chung M.C. 1997. A new potassium channel toxin from the sea anemone Heteractis magnifica: isolation, cDNA cloning, a functional expression. Biochemistry 36, 11461-11471
- Giangiacomo K.M., Garcia M.L., McManus O.B. 1992. Mechanism of iberiotoxin block of the large-conductance calcium-activated potassium channel from bovine aortic smooth muscle. Biochemistry 31, 6719
- Gilquin B., Racapé J., Wrisch A., Visan V., Lecoq A., Grissmer S., Ménez A., Gasparini S.
 2002. Structure of the BgK-Kv1.1 complex based on the distance restraints identified by double mutant cycles. Molecular basis for convergent evolution of Kv1 channel blockers. J. Biol. Chem. 227, 37406-37413
- 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
- *Goldstein S.A.N., Miller C. 1993. Mechanism of charybdotoxin block of a voltage-gated K*⁺ *channel. Biophys. J. 65, 1613*

- Grissmer S., Nguyen A.N., Aiyar J., Hanson D.C., Mather R.J., Gutman G.A. 1994.
 Pharmacological characterization of 5 cloned voltage-gated K⁺ channels, types Kv1.1,
 Kv1.2, Kv1.3, Kv1.5 and Kv3.1, stably expressed in mammalian cell lines. Mol.
 Pharmacol. 45, 1227-1234
- Grottesi A., Domene C., Haider S., Sansom M.S.P. 2005. Molecular dynamics simulation approaches to K channels: conformational flexibility and physiological function. IEEE Transact. Bionanosci., in press
- Guijarro J.I., M'Barek M., Gómez-Lagunas F., Garnier D., Rochat H., Sabatier J-M., Possani L.D., Delepierre M. 2003. Solution structure of Pi4, a short four-disulfidebridged scorpion toxin specific of potassium channels. Prot. Sci. 12, 1844-1854
- Gutman G.A., Chandy K.G., Adelman J.P., Aiyar J., Bayliss D.A., Clapham D.E., Covarriubias M., Desir G.V., Furuichi K., Ganetzky B., Garcia M.L., Grissmer S., Jan L.Y., Karschin A., Kim D., Kuperschmidt S., Kurachi Y., Lazdunski M., Lesage F., Lester H.A., McKinnon D., Nichols C.G., O'Kelly I., Robbins J., Robertson G.A., Rudy B., Sanguinetti M., Seino S., Stuehmer W., Tamkun M.M., Vandenberg C.A., Wei A., Wulff H., Wymore R.S. 2003. International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. Pharmacol. Rev. 55, 583-586
- Harvey A.L. 1997. Recent studies on dendrotoxins and potassium ion channels. Gen. Pharmac. 28, 7-12
- Harvey A.L. 2001. Twenty years of dendrotoxins. Toxicon 39, 15-26
- Harvey A.L., Anderson A.J. 1985. Dendrotoxins: Snake toxins that block potassium channels and facilitate neurotransmitter release. Pharmacol. Ther. 31, 33-55
- Harvey A.L., Anderson A.J. 1991. Dendrotoxins: snake toxins that block potassium channels and facilitate neurotransmitter release. In: Harvey A.K. (Ed.), Snake Toxins. Pergamon Press, New York, pp. 131-164
- Harvey A.L., Anderson A.J., Karlsson E. 1984. Facilitation of transmitter release by neurotoxins from snake venoms. J. Physiol. (Paris) 79, 222-227
- Harvey A.L., Bradley K.N., Cochran S.A., Rowan E.G., Pratt J.A., Quillfeldt J.A., Jerusalinsky D.A. 1998. What can toxins tell us for drug discovery?. Toxicon 36, 11, 1635-1640

- Harvey A.L., Karlsson E. 1980. Dendrotoksin from the venom of the green mamba, Dendroaspis angusticeps: a neurotoxin that enhances acetylcholine release at neuromuscular junctions. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 312, 1-6
- Harvey A.L., Karlsson E. 1982. Protease inhibitor homologues from mamba venoms: facilitation of acetylcholine release and interaction with prejunctional blocking toxins.
 Br. J. Pharmacol. 77, 133-161
- Harvey A.L., Rowan E.G., Vatanpour H., Engstrom A., Westerlund B., -Karlsson E. 1997. Changes to biological activity following acetylation of dendrotoxin I from Dendroaspis polylepis (black mamba). Toxicon 35, 1263-1273
- Heginbotham L,. LeMasurier M., Kolmakova-Partensky L., Miller C. 1999. J. Gen. Physiol. 114, 551-560
- Hidalgo P., MacKinnon R. 1995. Science 268, 307-310
- Hopkins W.F., Allen M., Tempel B.L. 1999. Interactions of snake dendrotoxins with K⁺ channels. Meth. Enzym. 294, 649-661
- Hopkins W.F., Miller J.L., Miljanich G.P. 1996. Voltage-gated potassium channel inhibitors. Curr. Pharmac. Des. 2, 389-396
- Horn R. 2000. Conversation between voltage sensors and gates of ion channels. Biochemistry 39, 15653-15658
- Hurst R.S., Busch A.E., Kavanaugh M.P., Osborne P.B., North R.A., Adelman J.P. 1991. Identification of amino acid residues involved in dendrotoxin block of rat voltagedependent potassium channels. Mol. Pharmacol. 140, 572-576
- Imredy J.P., Chen C., MacKinnon R. 1998. A snake toxin inhibitor of Inward rectifier potassium channel ROMK1. Biochemistry 37, 14867-14874
- Imredy J.P., MacKinnon R. 2000. Energetic and structural interactions between deltadendrotoxin and a voltage-gated potassium channel. J. Mol. Biol. 296, 1283-1294
- Ishida M., Minagawa S., Miyauchi K., Shimakura K., Nagashima Y., Shiomi K. 1997. Fisheries Sci. 63, 794-798
- Ji Y.H., Wang W.X., Ye J.G., He L.L., Li Y.J., Yan Y.P., Zhou Z. 2003. Martentoxin, a novel K⁺ channel-blocking peptide: purification, cDNA and genomic cloning, and electrophysiological and pharmacological characterization. Journal of Neurochemistry 84, 325-335

- Jia L.Y., Zhang J.W., Ji Y.H. 1999. Biosensor binding assay of BmK AS-1, a novel Na⁺ channel-blocking scorpion ligand on rat brain synaptosomes. NeuroReport 10, 3359-3362
- Jiang Y., Lee A., Chen J., Cadene M., Chait B.T., MacKinnon R. 2002a. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channels. Nature 417, 515-522
- Jiang Y., Lee A., Chen J., Cadene M., Chait B.T., MacKinnon R. 2002b. The open pore conformation of potassium channels. Nature 417, 523-526
- Jiang Y., Lee A., Chen J., Ruta V., Cadene M., Chait B.T., MacKinnon R. 2003. X-ray structure of a voltage-dependent K+ channel. Nature 423, 33-41
- Joubert F.J., Taljaard N. 1980. The amino acid sequence of two proteinase inhibitor homologues from Dendroaspis angusticeps venom. Hoppe Scylers Z. Physiol. Chem. 361, 661-674
- Jouirou B., Mosbah A., Visan V., Grissmer S., M'Barek S., Fajloun Z., Van Rietschoten J., Devaux C., Rochat H., Lippens G., El Ayeb M., De Waard M., Mabrouk K., Sabatier J.M. 2004a. Cobatoxin 1 from Centruroides noxius scorpion venom: chemical synthesis, 3-D structure in solution, pharmacology and docking on K⁺ channels. Biochem. J. 377, 1, 37-49
- Jouirou B., Mouhat S., Andreotti N., De Waard M., Sabatier J.M. 2004b. Toxin determinants required for interaction with voltage-gated K⁺ channels. Toxicon 43, 909-914
- Kaczorowski G.J., Garcia M.L. 1999. Pharmacology of voltage-gated and calciumactivated potassium channels. Curr. Opin. Chem. Biol. 3, 448-458
- Kalman K., Pennington M.W., Lanigan M.D., Nguyen A., Rauer H., Mahnir V., Paschetto K., Kem W.R., Grissmer S., Gutman G.A., Chrastian E.P., Cahalan M.D., Norton R.S., Chandy K.G. 1998. ShK-Dap²², a potent Kv1.3-specific immunosuppressive polypeptide. J. Biol. Chem. 273, 32697-32707
- Katoh E., Nishio H., Inui T., Nishiuchi Y., Kimura T., Sakakibara S., Yamazaki T. 2000. Structural basis for the biological activity of dendrotoxin-I, a potent potassium channel blocker. Biopolymers 54, 1, 44-57
- Kharrat R., Mabrouk K., Crest M., Darbon H., Oughideni R., Martin-Eauclaire M.F., Jacquet G., El Ayeb M., Van Rietschoten J., Rochat H., Sabatier J.M. 1996. Chemical

synthesis and characterisation of maurotoxin, a short scorpion toxin with four disulfide bridges that acts on K^+ channels. Eur. J. Biochem. 242, 3, 491-498

- Koch R.O., Wanner S.G., Koschak A., Hanner M., Schwarzer C., Kaczorowski G.J., Slaughter R.S., Garcia M.L., Knaus H.-G. 1997. Complex subunit assembly of neuronal voltage-gated K⁺ channels. J. Biol. Chem. 272, 27577
- Krezel A.M., Kasibhatla C., Hidalgo P., MacKinnon R., Wagner G. 1995. Solution structure of the potassium channel inhibitor agitoxin 2: caliper for probing channel geometry. Protein Sci. 4, 1478-1489
- Labro A.J., Raea A.L., Bellens I., Ottschytsch N., Snyders D.J. 2003. Gating of Shaker-type channels requires the flexibility of S6 caused by prolines J. Biol. Chem. 278, 50724-50731
- Lancelin J.M., Foray M.F., Poncin M., Hollecker M., Marion D. 1994. Proteinase inhibitor homologues as potassium channel blockers. Nat. Struct. Biol. 1, 4, 246-250
- Lanigan M.D., Kalman K., Lefievre Y., Pennington M.W., Chandy K.G., Norton R.S. 2002. Mutating a critical lysine in ShK toxin alters its binding configuration in the porevestibule region of the voltage-gated potassium channel, Kv1.3. Biochemistry 41, 11963-11971
- Larsson H.P., Baker O.S., Dhillon D.S. Isacoff E.Y. 1996. Transmembrane movement of the Shaker K⁺ channel S4. Neuron 16, 387-397
- Lebrun B., Romi-Lebrum R., Martin-Eauclaire M.F., Yasuda A., Ishiguro M., Oyama Y., Pongs O., Nakajima T. 1997. A four-disulfid-bridged toxin, with high affinity towards voltage-gated K⁺ channels, isolated from Heterometrus spinnifer (Scorpionidae) venom. Biochem. J. 328, 1, 321-327
- Lee H.C., Wang J.M., Swartz K.J. 2003. Interaction between extracellular Hanatoxin and the Resting Conformation of the Voltage-Sensor Paddle in Kv channels. Neuron 40, 527-536
- Lipkind G.M., Fozzard H.A. 1997. A model of scorpion toxin binding to voltage-gated K⁺ channels. J. Membr. Biol. 158, 3, 187-196
- MacKinnon R. 2003. Potassium channels. FEBS Letters, 555, 62-65
- *MacKinnon R., Miller C. 1988. Mechanism of charybdotoxin block of the highconductance, Ca*²⁺*-activated K*⁺ *channel. J. Gen. Physiol. 91, 335*

- MacKinnon R., Miller C. 1989. Functional modification of a Ca2+-activated K+ channel by trimethyloxonium. Biochemistry 28, 8087
- Maček P. in Lebez D. (1981) Kinetics of hemolysis induced by equinatoxin, a cytolytic toxin from the sea anemone Actinia equina. Effect of some ions and pH. Toxicon 19(2), 233-240.
- Mannuzzu L.M., Moronne M.M., Isacoff E.Y. 1996. Direct physical measureof conformational rearrangement underlying potassium channel gating. Science 271, 213-216
- Marshall D.L., Harvey A.L. 1992. Protease inhibitor homologs of dendrotoxin do not bind dendrotoxin acceptors on synaptosomal membranes or facilitate neuromuscular transmission. Biol. Chem. Hoppe-Seyler 373, 707-714
- M'Barek S., Lopez-Gonzalez I., Andreotti N., di Luccio E., Visan V., Grissmer S., Judge S., El Ayeb M., Darbon H., Rochat H., Sampieri F., Béraud E., Fajloun Z., De Waard M., Sabatier J.M. 2003a. A maurotoxin with constrained standard disulfide bridging – innovative strategy of chemical synthesis, pharmacology, and docking on K⁺ channels. J. Biol. Chem. 278, 33, 31095-31104
- M'Barek S., Mosbah A., Sandoz G., Fajloun Z., Olamendi-Portugal T., Rochat H., Sampieri F., Guijarro J.I., Mansuelle P., Delepierre M., De Waard M., Sabatier J.M. 2003b. Synthesis and characterisation of Pi4, a scorpion toxin from Pandinus imperator that acts on K⁺ channels. Eur. J. Biochem. 270, 17, 3583-3592
- Mehraban F., Haines A., Dolly J.O. 1986. Monoclonal and polyclonal antibodies against dendrotoxin: their effects on its convulsive activity and interaction with neuronal acceptors. Neurochem. Int. 9, 11-22
- Ménez A. 1998. Functional architectures of animal toxins: a clue to drug design?. Toxicon 36, 11, 1557-1572
- *Miller C. 1988. Competition for block of a* Ca^{2+} *-activated* K^+ *channel by charybdotoxin and tetraethylamonium. Neuron 1, 1003*
- Miller C. 1991. 1990: annus mirabilis of potassium channels. Science 252, 1092-1096
- *Miller C. 1995. The charybdotoxin family of K*⁺ *channel-blocking peptides. Neuron 15, 5-*10
- Minagawa S., Ishida M., Nagashima Y., Shiomi K. 1998. Primary structure of a potassium channel toxin from the sea anemone Actinia equine. FEBS Letters 427, 149-151

Morais-Cabral J.H., Zhou Y., MacKinnon R. 2001. Nature 414, 37-42

- Mouhat S., Jouirou B., Mosbah A., De Waard M., Sabatier J.M., 2004a. Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. Bioichem. J. 378, 3, 717-726
- Mouhat S., Mosbah A., Visan V., Wulff H., Delepierre M., Darbon H., Grissmer S., De Waard M., Sabatier R.M. 2004b. The 'functional' dyad of scorpion toxin Pi1 is not by itself a prerequisite for toxin binding to the voltage-gated Kv1.2 potassium channels. Biochem. J. 377, 1, 25-36
- Newitt R.A., Houamed K.M., Rehm H., Tempel B.L. 1991. Potassium channel and epilepsy: evidence that the epileptogenic toxin, dendrotoxin, binds to porassium channel proteins. In: Anderson V.E., Hauser W.A., Leppik I.E., Noebels J.L., Rich S.S. (Eds.), Genetic Strategies in Epilepsy Research. Elsevier, Amsterdam 263-273
- Nishio H., Katoh E., Yamazaki T., Inui T., Nishiuchi Y., Kimura T. 1999. Structure-activity relationships of calcicludine and dendrotoxin-I, homologous peptides acting on different targets, calcium and potassium channels. Biochem. Biophys. Res. Commun. 262, 319-321
- Norton R.S. 2009. Structures of sea anemone toxins. Toxicon 54, 8, 1075-1088
- Norton R.S., Pennington M.W., Wulff H. 2004. Potassium channel blockade by the sea anemone toxin ShK for the treatment of multiple sclerosis and other autoimmune diseases. Cur. Med. Chem. 11, 3041-3052
- 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, 3, 977-981
- Owen D.G., Hall A., Stephens G., Stow J., Robertson B. 1997. The relative potencies of dendrotoxins as blockers of the cloned voltage-gated K⁺ channel, mKv1.1 (MK-1), when stably expressed in Chinese hamster ovary cells. British Journal of Pharmacology 120, 1029-1034
- Parcej D.N., Dolly J.O. 1989. Dendrotoxin acceptor from bovine synaptic plasma membranes. Biochem. J. 257, 899-903
- Parcej D.N., Scott V.E.S., Dolly J.O. 1992. Oligomeric properties of α-dendrotoxinsensitive potassium ion channels purified from bovine brain. Biochemistry 31, 11084-11088

- Park C.-S., Miller C. 1992a. Interaction of charybdotoxin with permeant ions inside the pore of a K^+ channel. Neuron 9, 307.
- *Pelchen-Matthew A., Dolly J.O. 1989. Distribution in the rat central nervous system of acceptor sub-types for dendrotoxin, a K⁺ channel probe. Neuroscience 29, 347-361*
- Pennington M.W., Byrnes M.E., Zaydenberg I., Khaytin I., De Chastonay J., Krafte D.S., Hill R., Mahnir V.M., Volberg W.A., Gorczyca W., Kem W.R. 1995a. Chemical synthesis and characterization of ShK toxin: a potent K⁺ channel inhibitor from the sea anemone. Int. J. Peptide Protein Res. 46, 354-358
- Pennington M.W., Karlsson E., Kem W.R. 1997. Guidebook to Protein Toxins and Their Use in Cell Biology (Montecucco C., Rappuoli R., Eds.) 159-161, Oxford University Press
- Pennington M.W., Kem W.R., Mahnir V.M., Byrnes M.E., Zaydenberg I., Khaytin I., Krafte D.S., Hill R. 1995b. Identification of essential residues in the potassium channel inhibitor ShK toxin: analysis of monosubstituted analogs. In: Kaumaya P.T.P., Hodges R.S. (Eds.), Peptides: Chemistry, Structure and Biology. Escom, Leiden, Netherlands, 14-16
- Pennington M.W., Lanigan M.D., Kalman K., Mahnir V.M., Rauer H., McVaugh C.T., Behm D., Donaldson D., Chandy K.G., Kem W.R., Norton R.S. 1999. Role of disulfide bonds in the structure and potassium channel blocking activity of ShK toxin. Biochemistry 38, 44, 14549-14558
- Pennington M.W., Mahnir V.M., Khaytin I., Zaydenberg I., Byrnes M.E., Kem W.R. 1996a. An essential binding surface for ShK toxin interaction with rat brain potassium channels. Biochemistry 35, 16407-16411
- Pennington M.W., Mahnir V.M., Krafte D.S., Zaydenberg I., Byrnes M.E., Khaytin I., Crowley K., Kem W.R. 1996b. Identification of three separate binding sites on ShK toxin, a potent inhibitor of voltage-dependent potassium channels in human Tlymphocytes and rat brain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 219, 696-701
- Perozo E., MacKinnon R., Bezanilla F., Stefani E. 1993. Gating currents from a nonconduting mutant reveal open-closed conformations in Shaker K⁺ channels. Neuron 11, 353-358
- Perozo E., Santacruz-Toloza L., Stefani E., Bezanilla F., Papazian D.M. 1994. S4 mutations alter gating currents of Shaker K channels. Biophys. J. 66, 345-354

- Pongs O. 1999. Voltage-gated potassium channels: from hyper-excitability to excitement. FEBS Letters 452, 31-35
- Possani L.D., Selisko B., Gurrola G.B. 1999. Structure and function of scorpion toxins affecting K⁺ channels. In: DArbon H., Sabatier J.M. (Eds.), Perspectives in Drug Discovery and Design: Animal Toxins and Potassium Channels, 15/16. Kluwer/Escom, Dordrecht, 15-40
- *Ranganathan R., Lewis J.-H., MacKinnon R. 1996. Spatial localization of the K⁺ channel selectivity filter by mutant cycle-based structure analysis. Neuron 16, 131*
- Rauer H., Lanigan M.D., Pennington M.W., Aiyar J., Ghanshani S., Cahalan M.D., Norton R.S., Chandy K.G. 2000. Structure-guided transformation of charybdotoxin yields an analog that selectively targets Ca²⁺-activated over voltage-gated K⁺ channels. J. Biol. Chem. 275, 1201-1208
- Rauer H., Pennington M., Cahalan M., Candi K.G. 1999. Structural conservation of the pores of calcium-activated and voltage-gated potassium channels determined by a sea anemone toxin. J. Biol. Chem. 274, 21885-21892
- Rehm H., Lazdunski M. 1988. Purification and subunit structure of a putative K⁺-channel protein identified by its binding properties for dendrotoxin I. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85, 4919-4923
- Roberds S.L., Tamkun M. 1991. Cloning and tissue-specific expression of five voltagegated potassium channel cDNAs expressed in rat heart. Proc. Natl Acad. Sci. USA 88, 5, 1798-1802
- Robertson B., Owen D., Stow J., Butler C., Newland C. 1996. Novel effects of dendrotoxin homologues on subtypes of mammalian Kv1 potassium channels expressed in Xenopus oocytes. FEBS Letters 383, 26-30
- Rodríguez de la Vega R., Merino E., Becerril B., Possani L.D. 2003. Novel interactions between K⁺ channels and scorpion toxins. Trends in Pharmacological Science 24, 5, May
- Rodríguez de la Vega R., Possani L.D. 2004. Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels. Toxicon 43, 865-875
- *Roux B., MacKinnon R. 1999. The cavity and pore helices in the KcsA* K^+ *channel: electrostatic stabilization of monovalent cations. Science 285, 100-102*

- Sands Z., Grottesi A., Sansom M.S.P. 2005. Voltage-gated ion channels. Current Biology 15, 2, 44-47
- Savarin P., Guenneugues M., Gilquin B., Lamthanh H., Gasparini S., Zinn-Justin S., Ménez A. 1998. Three dimensional structure of κ-conotoxin PVIIA, a novel potassium channel-blocking toxin from cone snails. Biochemistry 37, 16, 5407-5416
- Scanlon M.J., Naranjo D., Thomas L., Alewood P.F., Lewis R.J., Craik D.J. 1997. Solution structure and proposed binding mechanism of a novel potassium channel toxin κconotoxin PVIIA. Structure 5, 12, 1585-1597
- Schoppa N.E., McCormack K., Tanouye M.A., Sigworth F.J. 1992. Science 255, 1712-1715
- Schweitz H., Bruhn T., Guuillemare E., Moinier D., Lancelin J.-M., Beress L., Lazdunski
 M. 1995. Kalicludines and kaliseptine: two different classes of sea anemone toxins for voltage-sensitive K⁺ channels. J. Biol. Chem. 270, 25121-25126
- Scott V., Muniz Z.M., Sewing S., Lichtinghagen R., Parcej D.N., Pongs O., Dolly J.O. 1994.Antibodies specific for distinct Kv subunits unveil a heterooligomeric basis for subtypes of α-dendrotoxin-sensitive K⁺ channels in bovine brain. Biochemistry 33, 1617-1623
- Scott V.E.S., Parcej D.N., Keen J.N. Findlay J.B.C., Dolly J.O. 1990. α -dendrotoxin acceptor from bovine brain is a K⁺ channel protein evidence from the N-terminal sequence of its larger subunit. J. Biol. Chem. 265, 20094-20097
- Seoh S.A., Sigg D., Papazian D.M., Bezanilla F. 1996. Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel. Neuron 16, 1159-1167
- Shakkottai V.G., Regaya I., Wulff H., Fajloun Z., Tomita H., Fathallah M., Cahalan M.D., Gargus J.J., Sabatier J.M., Chandy K.G. 2001. Design and characterisation of a highly selective peptide inhibitor of the small conductance calcium-activated K⁺ channel, SKCa2. J. Biol.Chem. 276, 46, 43145-43151
- Shamotienko O.G., Parcej D.N., Dolly J.O. 1997. Subunit combinations defined for potassium channel Kv1 subtypes in synaptic membranes from bovine brain. Biochemistry 36, 8195-8201
- Sigworth F.J. 1994. Q. Rev. Biophys. 27, 1-40

- Sorensen R.G., Blaustein M.P. 1989. Rat brain dendrotoxin receptors associated with voltage-gated potassium channels: dendrotoxin binding and receptor solubilization. Mol. Pharmacol. 36, 689-698
- Srinivasan K.N., Sivaraja V., Huys I., Sasaki T., Cheng B., Kumar T.K., Sato K., Tytgat J., Yu C., San B.C., Ranganathan S., Bowie H.J., Kini R.M., Gopalakrishnakone P., 2002. κ-Hefutoxin 1, a novel toxin from the scorpion Heterometrus fulvipes with unique structure and function. J. Biol. Chem. 277, 33, 30040-30047
- Stampe P., Kolmakova-Partemsky L., Miller C. 1994. Intimations of K⁺ channel structure from a complete functional map of the molecular surface of charybdotoxin. Biochemistry 33, 443-450
- Starace D.M., Stefani E., Bezanilla F. 1997. Voltage dependent proton transport by the voltage sensor of the Shaker K⁺ channel. Neuron 19, 1319-1327
- Strydom D.J. 1973. Protease inhibitors as snake venom toxins. Nature New Biol. 243, 88-89
- StühmerW., Conti F., Suzuki H. in sod. 1989. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. Nature 22, 597-603
- Swaminathan P., Hariharan M., Murali R., Singh C.U. 1996. Molecular structure, conformational analysis, and structure-activity studies of dendrotoxin and its homologues using molecular mechanics and molecular dynamics techniques. J. Med. Chem. 39, 2141-2155
- Takahashi H., Kim J.I., Min H.J., Sato K., Swartz K.J., Shimada I. 2000 Solution structure of hanatoxin1, a gating modifier of voltage-dependent potassium channels: common structure features of gating modifier toxins. J. Mol. Biol. 297, 3, 771-780
- *Terlau H., Shon K.J., Grilley M., Stocker M., Stuhmer W., Olivera B.M. 1996. Strategy for rapid immobilization of prey by fish-hunting marine snail. Nature 381, 148-151*
- Tricaud N., Marchot P., Martin-Eauclaire M.F. 2000. On the kaliotoxin and dendrotoxin binding sites on rat brain synaptosomes. Toxicon 38, 1749-1758
- Tudor J.E., Pallaghy P.K., Pennington M.W., Norton R.S. 1996. Solution structure of ShK toxin, a novel potassium channel inhibitor from sea anemone. Nat. Struct. Biol. 3, 317-320
- Tudor J.E., Pennington M.W., Norton R.S. 1998. Ionisation behavior and solution properties of the potassium-channel blocker ShK toxin. Eur. J. Biochem. 251, 133-141

- 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 –pharmacol. Sci. 20, 444-447
- Tytgat J., Debont T., Carmeliet, Daenens P. 1995 The α-dendrotoxin footprint on a mammalian potassium channel. J. Biol. Chem. 270, 24776-24781
- Van Rietschoten J., Garnier C., Rochat H., Lissitzky S., Miranda F.1975. Synthesis of apamin, a neurotoxic peptide from bee venom. Eur. J. Biochem. 56, 1, 35-40
- Veh R.W., Lichtinghagen R., Sewing S., Wunder F., Grumbach I.M., Pongs O. 1995. Europ. J. Neurosci. 7, 2189-2205
- Wang F.C., Parcej D.N., Dolly J.O. 1999. α Subunit compositions of Kv1.1-containing K⁺ channel subtypes fractionated from rat brain using dendrotoxins. Eur. J. Biochem. 263, 230-237
- Yan L., Herrington J., Goldberg E., Dulsky P.M., Bugianesi R.M., Slaughter R.S., Banarjee P., Brochu R.M., Priest B.T., Kaczorowski G.R., García M.L. 2005. Stichodactyla helianthus peptide, a pharmacological tool for styding Kv3.2 channels. Mol. Pharmacol. 67, 1513-1521
- Yang N., George A.L., Jr., Horn R. 1996. Molecular basis of charge movement in voltagegated sodium channels. Neuron 16, 113-122
- Yang N., Horn R. 1995. Evidence fot voltage-dependent S4 movement in sodium channels. Neuron 15, 213-218
- Zhou Y., MacKinnon R. 2003. The occupancy of ions in the K⁺ selectivity filter: charge balance and coupling of ion binding to a protein conformational change underlie high conduction rates. J. Mol. Biol. 333, 5, 965-975
- Zhou Y., Morais-Cabral J.H., Kaufman A., MacKinnon R. 2001. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel Fab complex at 2.0 Å resolution. Nature 414, 43-48

6.1 DRUGI VIRI

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. Walter P. 2008. Molecular biology of the cell. 5. izdaja. ZDA, New York.

- Bavdek A. 2005. Vezava listeriolizina na podprte lipidne membrane. Dipl.delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo.
- Copper G.M., Hausman R.E. 2007. The cell. A molecular approach. 4. izdaja. ZDA, Washington, Boston University.
- Perko U. 2006. Mehanizem delovanja litičnega proteina iz morske vetrnice Urticina crassicornis. Dipl.delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.
- Sepčić K., Anderluh G., Turk T., Maček P. 2002. Biokemijski praktikum. 4. natis. Ljubljana, Študentska založba: 182 str.
- Biacore Life Sciences
 - http://www.biacore.com/lifesciences/index.html (3.11.2009)
- Nixon T. Specific volume calculator.
 - http://www.bmb.psu.edu/nixon/webtools/mwtvbar.htm (3.11.2009)
- SPR strani. Infrastrukturni center za površinsko plazmonsko resonanco http://web.bf.uni-lj.si/bi/sprcenter/index.html (3.11.2009)

ZAHVALA

Svojemu mentorju prof. dr. Tomu Turku in delovnemu mentorju Andreju Razpotniku se iskreno zahvaljujem za vso podporo, prejeto znanje, nasvete, praktično pomoč in dobro voljo na vsakem koraku.

Zahvaljujem se recenzentu prof. dr. Gregorju Anderluhu za pomoč pri nastajanju diplomskega dela.

Lepa hvala prof. dr. Kristini Sepčić, Vesni Hodnik, Ireni Pavešič, Andreju Bavdeku, Biserki Brakič za vzpodbudne besede, podporo in praktično pomoč.

Lepo mi je bilo z vami vsemi!

Za vso podporo, obiske in pomoč med časom okrevanja se zahvaljujem dobrim prijateljem.

Nazadnje iskrena hvala domačim, ki so me spodbujali in finančno podpirali tekom študija.

PRILOGE

Priloga A TOKSINI RAZLIČNIH IZVOROV IN NJIHOVE TARČNE PODENOTE KALIJEVIH KANALČKOV

V preglednicah so navedeni nekateri toksini mamb, morskih vetrnic in škorpijonov ter njihove tarčne podenote kalijevih kanalčkov.

Preglednica 2 vsebuje dva dendrotoksina ter različne tipe toksinov morskih vetrnic. Preglednica 3 navaja izbrane škorpijonske toksine. Preglednica 2. Toksini mamb in morskih vetrnic ter njihove tarčne podenote tetramernih kalijevih kanalčkov. Križec označuje interakcije med toksinom in tarčno podenoto. Poševna črtica označuje, da toksin nima učinka na kanalno podenoto.

			$\mathbf{K}_{v}\mathbf{I}$		\mathbf{K}^{2}		K_{v3}		Kv4	IK_{C_a}	innibira vezavo 1a-dendrotoksina											
	$K_v l.l$	$K_v 1.2$	Kv1.3	$K_v l.6$		$K_v 3.1$	$K_{\nu}3.2$	$K_{\nu}3.4$			na sinaptosome											
MAMBE																						
a-dendrotoksin	х	х	х																			
toksin I	x	x	x																			
MORSKE VETRNICE																						
Tip 1																						
BgK	x	x	х	x		/				x												
ShK	x		x (>K _v 1.1)				х			х												
HmK		×																				
AsKS (kaliseptine)		x																				
AeK											x											
AETxK											x											
Tip 2																						
AsKC1 (kalicludine 1)		х																				
AsKC2 (kalicludine 2)		х																				
AsKC3 (kalicludine 3)		х																				
SHTX III											х											
Tip 3																						
BDS-I	/	/	/	/	/	х	x	x	/													
BDS-II	/	/	/	/	/	х	х	х	/													
APETx1																						
Tip 4																						
SHTX II											х											
_	_	-	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_
-----------	--------------	------------	---------------	--------------	--------------	-------------	-------------	-------------	------	-----	--------------	-----	---------	-----	-------------	-----	-----	------------	-----	------	--------------	------
$K_{Ca}3$	$K_{Ca}3.1$	x													х							
	$K_{Ca}2.3$									х	х	х	х	х	х		х					
$K_{Ca}2$	$K_{Ca}2.2$									Х	х	x	х	х	х		х					
	$K_{Ca}2.1$												х									
$K_{Ca}l$	K_{Ca} 1.1	x	Х		Х																х	
	$K_v 1.3$		х		х	х	х	х						х	x	х						x
$K_v l$	$K_v 1.2$						х		х						х							
	$K_v 1.1$				Х			х								х		х		х		
Shaker			Х		х	х		х						х	х			х	х	х		x
		ŠKORPIJONI	karibdotoksin	iberiotoksin	noxiustoksin	margatoksin	kaliotoksin	agitoksin 2	TsKa	Tsk	scyllatoksin	P05	tamapin	Pil	maurotoksin	Pi2	P01	cobatoksin	Tc1	OsK2	martentoksin	Tc32

Preglednica 3. Škorpijonski inhibitorji kalijevih kanalčkov ter njihove tarčne podenote. Križec označuje interakcije med toksinom in tarčno podenoto tetramernih kalijevih kanalčkov.

Priloga B LOČEVANJE PEPTIDNIH VZORCEV PRVE IZOLACIJE BLOKATORJEV K⁺ KANALČKOV

V rezultatih smo navedli le kromatograme ločevanja peptidnih vzorcev druge izolacije s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti na kationskem izmenjevalcu ter s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti z obrnjeno fazo. Kromatograme prve izolacije aktivnih peptidov navajamo v prilogi zaradi nezmožnosti pridobitve elektronske oblike krivulj kot posledice okvare računalnika, povezanega z napravo HPLC.

Prvi kromatogram v prilogi (Slika 29) prikazuje HPLC ločevanje peptidnega vzorca na kationskem izmenjevalcu. Zeleni okvirčki označujejo vzorce, ki smo jih nanesli na NaDS peptidni gel (prikazan v rezultatih (Slika 13)). Na podlagi peptidnih lis na gelu smo se odločili za nadaljnjo ločitev vzorca 4 in vzorca 3.

Z zelenim okvirčkom označena vzorca 3 in 4 smo ločeno nanesli na RP-HPLC kolono. V prilogi sta prikazani RP-HPLC ločitev vzorca 3 (Slika 30) in RP-HPLC ločitev vzorca 4 (Slika 31).

Priložen je tudi kromatogram retencije toksina ShK na koloni za RP-HPLC (Slika 32).



Slika 29. Frakcioniranje s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) na kationskem izmenjevalcu (prva izolacija aktivnih peptidov). Zeleni okvirčki označujejo vzorce nanešene na NaDS gel (glej rezultati (Slika 13)). Vzorca 4 in 3 smo dalje posamično ločili z RP-HPLC.



Slika 30. RP-HPLC ločevanje vzorca 3 s kationsko izmenjevalne HPLC prve izolacije aktivnih peptidov (Slika 29). Rožnat okvirček označuje vzorec B, ki je pokazal aktivnost na sinaptosomih (Slika 21).



Slika 31. RP-HPLC ločevanje vzorca 4 s kationsko izmenjevalne HPLC prve izolacije aktivnih peptidov (Slika 29). Nobeden od ločenih vzorcev ni pokazal aktivnosti na sinaptosome.



Slika 32. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z reverzno fazo. Določitev retencijskega časa kontrolnega toksina ShK.

40.00

Minutes

50.00

60.00

-0.02

10.00

20.00

30.00

-0.00

-5.00

70.00

Priloga C

MASNI SPEKTRI PEPTIDNIH RP-HPLC VZORCEV DRUGE IZOLACIJE BLOKATORJEV K⁺ KANALČKOV

Izbranim vzorcem oz. posameznim RP-HPLC vrhovom (Slika 14) druge izolacije peptidnih blokatorjev kalijevih kanalčkov smo z masno spektrometrijo določili spekter molekulskih mas peptidov v vzorcu.

V rezultatih diplomskega dela so navedeni:

- masni spekter vzorca F (Slika 15),
- vzorca G (Slika 16) in
- vzorca H (Slika 17).

V prilogi B navajamo masne spektre ostalih testiranih RP-HPLC vrhov:

- masni spekter vzorca D (Slika 33),
- vzorca J (Slika 34),
- vzorca L (Slika 35),
- vzorca N (Slika 36) ter
- masna spektra vzorca O (Slika 37 in Slika 38).



Slika 33. Masni spekter vzorca D. Številke nad vrhovi prikazujejo molekulsko maso peptidov v vzorcu.



Slika 34. Masni spekter vzorca J. Številke nad vrhovi prikazujejo molekulsko maso peptidov v vzorcu.



Slika 35. Masni spekter vzorca L. Številke nad vrhovi prikazujejo molekulsko maso peptidov v vzorcu.

*

100-

322.5000

326.5000

400 5



Slika 36. Masni spekter vzorca N. Številke nad vrhovi prikazujejo molekulsko maso peptidov v vzorcu.



Slika 37. Masni spekter vzorca O; prvi del. Številke nad vrhovi prikazujejo molekulsko maso peptidov v vzorcu.



Slika 38. Masni spekter vzorca O; drugi del. Številke nad vrhovi prikazujejo molekulsko maso peptidov v vzorcu.

UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Anja BALANT

IZOLACIJA BLOKATORJEV K⁺ KANALČKOV IZ MORSKE VETRNICE Urticina crassicornis

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009