

**Membránpotenciál függő ioncsatorna
gének genetikai és molekuláris analízise
*Drosophila melanogaster*ben**

DEÁK PÉTER

Cambridge
1999

TARTALOMJEGYZÉK

Fejezet	Oldal
Összefoglaló	3
Bevezetés	4
Az ioncsatornák szerkezete	5
Membránpotenciál-függő aktiváció	6
Szelektív ionáramlás	7
Inaktiváció	8
A kiegészítő alegységek szerepe	8
Egyéb fehérje-ioncsatorna kölcsönhatások	9
Célkitűzéseink és eredményeink összefoglalása	9
Irodalmi hivatkozások	11
Közlemények különlenyomatai	12

ÖSSZEFOGLALÓ

Dolgozatomban az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) membránpotenciál-függő ioncsatornáinak felépítését és funkcióját meghatározó gének genetikai és molekuláris analízisét ismertetem. Munkánk célja az volt, hogy jobban megismerjük azokat a strukturális elemeket, melyeknek szerepe van olyan alapvető biológiai folyamatokban, mint az ideg és az izomrendszer működése.

Az első rész a *tipE* (*temperature induced paralysis locus E*) gén genetikai és fizikai térképezését, majd pedig klónozását tartalmazza. E gén mutációja hőérzékeny reverzibilis paralizist eredményez, és szinergisztikus kölcsönhatást mutat más, ismert Na^+ csatorna génekkel. A mutánsok elektrofiziológiai és farmakológiai tanulmányozásából kiderült, hogy sejtjeik kevesebb Na^+ csatornát tartalmaznak. Sikerült új kromoszóma-átrendeződésekkel együtt járó allélokat izolálni, és ezek citológiai analízise alapján, a nyálmirigy óriáskromoszóma 64B2 sávjához lokalizáltuk *tipE*-t. Kromoszóma „walk”-olással izoláltunk kb. 140 kb méretű genomikus DNS szekvenciát, és kimutattuk, hogy ez átfedi a 64B2 régiót. Szubklónozással, és homozigóta *tipE* mutánsok transzformálásával azonosítottunk egy 7.4 kb-os szekvenciát, ami menekítette a homozigótákra jellemző hőérzékeny paralitikus fenotípust. Három, egymással átfedő mRNS-t sikerült kimutatni ezen a 7.4 kb-os genomikus DNS darabon, melyek egyetlen gén különböző transzkripciós termékeinek bizonyultak. Megállapítottuk, hogy *tipE* egy egyedi membránfehérjét kódol, amely jelentősen módosítja a Na^+ csatorna α alegységének működőképességét *in vitro*, továbbá szerepe van a hősokk elleni védekezési mechanizmusban is.

A második részben a *seizure* (*sei*) gén klónozását ismertetem. A *sei* mutánsok biokémiai és elektrofiziológiai fenotípusa nincs tökéletes összhangban genetikai fenotípusukkal. Míg a *sei^{ts1}* mutánsokra csökkent saxitoxin kötés és csökkent Na -áramlás jellemző, addig a *sei^{ts2}* allél nem eredményez eltéréseket ezekben. A Na^+ csatornák számának, vagy aktivitásának csökkenése alacsonyabb ingerelhetőséghez kellene hogy vezessen. Evvel szemben mind *sei^{ts1}*, mind pedig *sei^{ts2}* homozigóták hiperaktívak még permisszív hőmérsékleten is. A *seizure* gén klónozásával és analízisével próbáltunk választ kapni erre az ellentmondásra, valamint fényt deríteni funkciójára. A *sei* lókus az 60A8-B10 citológiai régióba térképeződik. A klónozás előfeltételeként meghatároztuk pozícióját a régiót

reprezentáló fizikai térképen is, *sei^{ts1}* és *or^{49h}* rekombinációs vonalak RFLP térképezésével. Azonosítottuk azt a mRNS-t ami a *sei* allélokban változást szenvedett. Szekvencia analízise alapján megállapítható, hogy a *seizure* fehérje egy *eag* típusú membránpotenciál függő K⁺ csatorna alegység, valamint *Drosophila* homológja a humán *h-erg* K⁺ csatorna génnek.

BEVEZETÉS

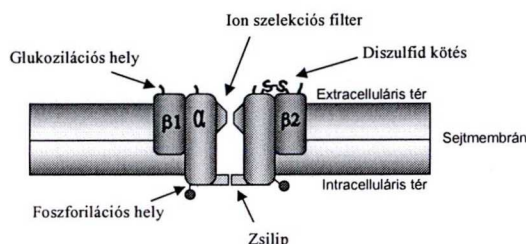
Az ideg és az izomrendszer közös jellemzője, hogy sejtjeik elektromosan ingerelhetőek. Ennek köszönhető, hogy képesek információ továbbítására, és feldolgozására elektromos impulzus, vagy akciós potenciál formájában. A sejtmembránba ágyazott speciális fehérje komplexek, a membránpotenciál-függő ioncsatornák felelősek az említett elektromos impulzus létrehozásáért és továbbításáért, ezért kulcsszerepük van az ideg és izomszövetek működésében. Az ioncsatornáknak az akciós potenciál létrehozásában és terjedésében játszott szerepét Alan Hodgkin és Andrew Huxley fedezték fel 1952-ben (1). A tintahal óriás axonját használták kísérleti objektumként, amelynek átmérője lehetővé tette elektródok hozzákapcsolását, és membránpotenciál változások mérését. Kimutatták, hogy a membránpotenciál változását a plazmamembránban elhelyezkedő Na⁺ és K⁺ csatornák szabályozott nyitódása, és az ezekkel együtt járó iontranszport eredményezi.

Az ioncsatornák vizsgálata elektrofiziológiai módszerek alkalmazásával kezdődött. Ezek közül leglényegesebbek a Hodgkin és Huxley által is használt „voltage clamp” technikák, és ezek továbbfejlesztett változatai, a „patch clamp” és a „whole clamp” technikák. Jelentős előrelépés volt biokémiai módszerek alkalmazása az ioncsatorna vizsgálatokban. Ezek közül kiemelkedik az ioncsatornák specifikusan és nagy affinitással kötő neurotoxinok felfedezése. Ezeket molekuláris próbaként használva lehetővé vált az ioncsatornák izolálása, és alegység összetételük megállapítása (2). Ezen túlmenően, lehetővé tették az ioncsatornák mennyiségének, eloszlásának és típusainak meghatározását is. Az ioncsatorna kutatások új szakaszát jelentette az elektromos rája Na⁺ (3), és az *ecetmuslica Shaker* K⁺ csatorna génjének klónozása (4), és szekvenálása. Ez lehetővé tette az ioncsatornák elsődleges szerkezetének a megállapítását. Lényeges, hogy e két gén cDNS klónját próbaként felhasználva, további ioncsatorna géneket lehetett azonosítani számos

állatfajban, és az emberben is (5, 6). Ez az evolúció során megtartott nagyfokú strukturális és funkcionális konzerváltságot bizonyít.

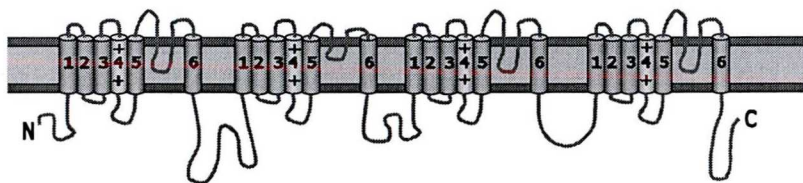
Az ioncsatornák szerkezete

Az említett vizsgálatokból kiderült, hogy a membránpotenciál-függő csatornák 3-5 alegységből álló fehérje komplexek (7, 8), melyek fő alegysége a kb. 260-280 kD-os alfa



1. ábra Membránpotenciál-függő ioncsatornák funkcionális modellje

alegység (1. ábra). A többi un. kiegészítő alegységek (β , γ és δ) száma és mérete változó, ezek különböző kémiai kölcsönhatásokkal kapcsolódnak a fő alegységhez és/vagy egymáshoz. Az alfa alegységek közös szerkezeti motívuma, hogy négy homológ transzmembrán doménből állnak, melyek mindegyike hat transzmembrán alfa hélixet tartalmaz (2. ábra) és ezek egy ion pórust fognak közre (9).

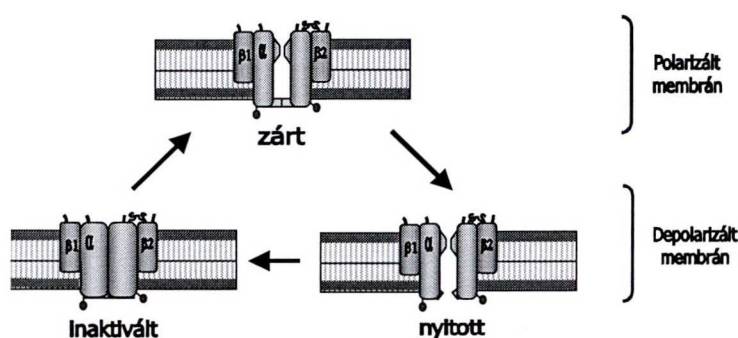


2. ábra A Na⁺ csatorna transzmembrán elrendeződése

A K⁺ csatorna esetében az egyes domének különböző géntermékek, így a funkcionális K⁺ csatorna egy homo- vagy hetero-tetramer. A fő, vagy alfa alegység önmaga is képes ellátni

alapvető ioncsatorna funkciókat, ezért tartalmaznia kell mindazokat a szerkezeti elemeket, amik egy ioncsatorna működéséhez szükségesek (10).

Az ioncsatornák hidrofób pórusokat képeznek a sejtmembránon keresztül (1. ábra), és lehetővé teszik az ionok passzív áramlását az elektrokémiai gradiensüknek megfelelően. Működésük három szakaszra osztható: a membránpotenciál-függő aktivációra, ami a csatorna nyitódását eredményezi, az ionáramlási szakaszra, valamint az inaktivációs szakaszra, ami a csatorna záródásához vezet. Ezeknek megfelelően, az ioncsatornák legalább három konformációs állapotot vehetnek fel: nyitott, zárt és inaktivált állapotokat (3. ábra).



3. ábra Ioncsatornák konformációs állapot-változásai

Membránpotenciál-függő aktiváció

A jelenlegi elképzelések szerint az ioncsatornák aktivációja az alfa alegység konformációs változásának következménye. Ezt a membránpotenciál-változás váltja ki, és eredményeként egy pórus nyílik meg a fehérjén keresztül. Valamennyi ioncsatorna esetében, a negyedik transzmembrán alfa hélix (S4) tartalmaz egy erősen konzerválódott szekvenciát, amelyben ismétlődően pozitív töltésű aminosavak (arginin és lizin) találhatók, melyeket hidrofób aminosavak követnek (11). Az elképzelések szerint, ez az S4 szekvencia képes potenciál-változás érzékelésére. Kezdetben a fehérjében található negatív töltésű csoportokkal való kölcsönhatás neutralizálja és stabilizálja az S4 szekvenciát. A membránpotenciál változása azonban destabilizálja ezt a kölcsönhatást, és elmozdítja az S4 szekvenciát az

extracelluláris tér felé. Ez indukálja a konformáció változást, majd pedig a csatorna nyitódását. Ezt az elképzelést utóbb sikerült alátámasztani helyspecifikus mutagenézissel is (12). Ezekben a kísérletekben, a pozitív töltésű aminosavak mutációja az S4 szekvencián belül csökkentette a csatorna érzékenységét a membránpotenciál változásokra. Noha az S4 szekvencia szerepe valószínű az ioncsatornák aktivációjában, ennek pontos mechanizmusa továbbra is ismeretlen.

Szelektív ionáramlás

Működésük szempontjából az ioncsatornák leglényegesebb tulajdonságai nagyfokú ionszelektivitásuk, valamint hatékonyságuk, amit az ionáramlás sebessége jelez. Az ioncsatornán való áthaladás igen gyors, több, mint 10^6 ion jut át másodpercenként. Ez az áramlási sebesség kb. ezerszer nagyobb, mint a szállító fehérjék által biztosított anyagáramlás. Ennek következtében a membránpotenciál jelentősen kitérhet mind pozitív, mind pedig negatív irányban. Az ionáramlás nagyfokú szelektivitás fenntartásával valósul meg: a pórusuk kis átmérője és felépítése csak a megfelelő méretű és töltésű ionok áramlását teszi lehetővé. Tévedési gyakoriságuk általában 0.1 % alatt marad fiziológias körülmények között.

A szelektivitást biztosító struktúra a bakteriális K^+ csatorna esetében egy szűk, 12 Å átmérőjű pórus a csatorna extracelluláris felszíne közelében, amit konzerválódott aminosavak határolnak. Az aminosavak úgy helyezkednek el, hogy karbonil oxigénjeikkel „bélelik” ki a pórust (13). Az elképzelések szerint, a karbonil-oxigén gyűrű ál-hidrátburokként hat, és így helyettesíteni képes a K^+ ionokat burkoló hidrát burkot. A csatornában várakozó K^+ ionok hidrát burkukat hátrahagyva a szelektivitási pórusban található karbonil-oxigénekre kerülnek. A póruson belül aztán az egymás között fellépő taszító erő hajtja őket előre, az extracelluláris tér felé. Feltételezhető, hogy a szelektivitás úgy valósul meg, hogy a pórus éppen megfelelő méretű ahhoz, hogy az 1.3 Å átmérőjű K^+ ionok képesek hidrát burkuk lecserélésére, viszont más ionok (pl. a 0.9 Å átmérőjű Na^+ ionok) számára ez nem optimális (13). Nagyon valószínű, hogy ehhez hasonló elvek érvényesülnek a többi ioncsatorna szelektív ionáramlásának biztosításában is.

Inaktiváció

A jelenleg elfogadott ioncsatorna modell szerint a membránpotenciál-függő ioncsatornák öngátlásos módon, az ún. „ball and chain” mechanizmussal inaktiválódnak. Ennek lényege, hogy egy inaktivációs részecske (a ball), ami a csatorna intracelluláris felszínéhez kapcsolódik (a chain-en keresztül), a pórus fölé mozog, majd pedig hozzákötődik és elzárja a pórust. Ezt az elképzelést támasztja alá az a megfigyelés, hogy az inaktiváció gátolható a csatornák intracelluláris felszínének proteolitikus enzimekkel való kezelésével (14). A modell feltételezi, hogy a pórus intracelluláris nyílása (vagy annak közvetlen környezete) receptorként funkcionál és köti az inaktivációs részecskét. Helyspecifikus mutagenézissel később valóban azonosítani lehetett mind az inaktivációs részecskének, mind pedig a receptorának megfelelő aminosav szekvenciákat (15, 16). Az inaktivációs részecske elhelyezkedése szempontjából jelentős különbség van a Na^+ és a K^+ csatornák között: az előbbieken az alfa alegység C-terminális, míg az utóbbiakban az N-terminális vég közelében található (17).

A kiegészítő alegységek szerepe

Heterológ expressziós kísérletek bizonyították, hogy a membránpotenciál-függő ioncsatornák alfa alegységei önmagukban is képesek működőképes csatornák létrehozására, azonban ezek funkcionális paraméterei eltértek a natív csatornák tulajdonságaitól. Ebből következik, hogy a csatorna-komplexek kiegészítő alegységei módosítják az alfa alegységek funkcióját, amivel szinte egyedi elektromos tulajdonságokat biztosítanak a sejteknek. Az eddig azonosított és tanulmányozott kiegészítő alegységek kizárólag a csatornák aktivációjának, vagy inaktivációjának kinetikáját módosítják, esetenként befolyásolják a csatornák funkcionális expresszióját. Azonban nem ismert olyan kiegészítő alegység, ami az ionszelektivitást, vagy az ionáramlást érintené (18).

Nem bizonyított, de elképzelhető, hogy a csatorna-komplexek alegység összetétele dinamikusan változik a sejtek fiziológiai állapotának megfelelően. Ezek a változások jelentősen megnövelnék az ioncsatornák sokféleségét, és fontos szerepük lehet pl. az idegrendszer fejlődésének és plaszticitásának kialakulásában (18).

Fontos megemlíteni, hogy a kiegészítő alegységek egyben receptorai is olyan működést befolyásoló szignáloknak, melyek más fehérjékkel történő időleges kölcsönhatásokból származnak.

Egyéb fehérje-ioncsatorna kölcsönhatások

A csatorna-komplexekkel időlegesen más fehérjék is kölcsönhatásba lépnek, és ezek tovább módosítják a csatornák működését. Ilyen kölcsönhatások száma igen nagy lehet, eddig azonban csak néhányat sikerült kísérletesen is bizonyítani (18). Egyértelmű, hogy valamennyi csatorna működését befolyásolja protein foszforiláció. Protein foszfatáz A (PKA) és protein foszfatáz C (PKC) foszforilálja a Ca^{2+} csatorna fő- és kiegészítő alegységeit is (19), defoszforilálásukban pedig a protein foszfatáz PP1 és PP2A szerepét sikerült kimutatni (20).

Immunprecipitációs kísérletek azt mutatják, hogy az ioncsatornák közvetlen protein-protein kapcsolatban vannak G proteinekkel, ezért feltételezhető, hogy működésüket G protein-függő szignál transzdukció is befolyásolja (21).

A sejtek működése megköveteli elektromos aktivitásuk szabályos tér- és időbeli lokalizálását. Ez a különböző ioncsatorna típusok sejten belüli megoszlásának szabályozásával valósítható meg. Ennek pontos mechanizmusa még nem ismert, de közvetett kísérleti adatokból arra következtethetünk, hogy a citoskeleton bizonyos komponenseinek szerepe lehet a csatornák sejten belüli eloszlásában. Bizonyos idegsejt preparátumokban a Na^+ csatornák immunprecipitálhatók voltak egy citoskeleton komponensre, az ankyrinre specifikus ellenanyaggal (22). Ebben az esetben sikerült meghatározni azt a domént a Na^+ csatornán belül, amely az ankyrinnel való kölcsönhatásért felelős.

CÉLKITŰZÉSEINK ÉS EREDMÉNYEINK ÖSSZEFOGLALÁSA

Munkánk célja az volt, hogy tanulmányozzuk az ioncsatornák szerkezetét, funkcióját és szabályozását az ecetmuslica, *Drosophila melanogaster*, kísérleti rendszerben, és ezen keresztül jobban megértsük az ideg- és izomrendszer ingerelhetőségének molekuláris mechanizmusát. Munkánk során klasszikus és molekuláris genetikai módszereket

alkalmaztunk. Ezeknek a módszereknek az az előnye, hogy nem korlátozódnak bizonyos szerkezeti elemek vizsgálatára, továbbá, hogy nem feltételezik az egyes géntermékek előzetes ismeretét, és/vagy manipulációját. Genetikai interakciós kísérletekkel olyan új géntermékek azonosíthatók, melyek fiziológiai kölcsönhatásban vannak ismert csatorna komponensekkel, és módosítják azok működését, vagy pedig az ioncsatornák expressziójának szabályozásában vesznek részt. Genetikai megközelítéssel eldönthető az is, hogy a farmakológiailag és elektrofiziológiailag különböző ioncsatorna altípusok különböző géntermékeket reprezentálnak-e, vagy pedig egyetlen géntermék poszttranszlációs módosulásával jönnek létre.

Az *ecetmuslica* ideális organizmus az említett genetikai vizsgálatokra a genomjával kapcsolatosan felhalmozódott ismeretek, valamint laboratóriumi kezelhetősége miatt. Életciklusa rövid, csak 10-14 napot vesz igénybe, olcsón és nagy számban tartható fenn, és szaporítható laboratóriumi körülmények között. Az eddig azonosított *Drosophila* ioncsatornák biokémiai és farmakológiai tulajdonságai nagyon hasonlóak más állatfajok, valamint a humán ioncsatornához, tehát analízisükből általános következtetések vonhatók le.

Munkánk kiindulópontját két korábban izolált hőérzékeny paralitikus mutáció, a *tipE* and the *seizure* jellemzése jelentette. Ezek elektrofiziológiai és ligant kötési vizsgálatából kiderült, hogy a mutációk a Na^+ csatorna működését érintik. Pozicionális klónozással sikerült mindkét génterméket azonosítani, és természetüket meghatározni.

A *tipE* gén egy eddig még nem azonosított transzmembrán fehérjét kódol, amely befolyásolja a Na^+ csatorna expresszióját. A *tipE* gén elsősorban a központi és a perifériás idegrendszerben expresszálódik, és expressziója egyedfejlődésileg szabályozott. A *TipE* fehérje jelenléte a bábstádium folyamán nélkülözhetetlen az adult hőérzékeny parálízis kivédésére. Elképzeléseink szerint *TipE* egy új Na^+ csatorna kiegészítő alegység, amely kölcsönhatásban lehet az alfa alegységgel, és elősegíti annak funkcióképes beépülését a sejtmembránba.

A *seizure* gén szekvencia analíziséből kiderült, hogy a humán *HERG* K^+ csatorna alfa alegységének *Drosophila* homológját kódolja, ami az *eag* K^+ csatorna családba tartozik. Homozigóta *seizure* null allélokban alacsonyabb a Na^+ csatorna mennyisége, ami arra utal, hogy specifikus K^+ csatornáknak szerepe lehet a Na^+ csatornák szabályozásában. A *seizure*

gén vizsgálatát indokolja, hogy humán homológjának mutációja okozza egy dominánsan öröklődő szív aritmia, a LQT kór kifejlődését.

Irodalmi hivatkozások

1. Hodgkin A.L. and Huxley A.F., 1952. *J. Physiology* 117: 500-544
2. Catterall W.A., 1988. *Science* 242: 50-61
3. Noda M., et al., 1984. *Nature* 312: 121-127
4. Tempel B.L., et al., 1987. *Science* 237: 770
5. Gautron S., et al., 1992. *PNAS* 89: 7272-7276
6. George A.L., et al., 1992. *PNAS* 89: 4893-4897
7. Hartshorne R.P. and Catterall W.A., 1981. *PNAS* 78: 4620-4624
8. Messner D.J. and Catterall W.A., 1985. *J. Biol. Chem.* 260: 10597-10604
9. Catterall W.A., 1992. *Physiol. Review* 72: 515-541
10. White M.M., et al., 1991. *Mol. Pharmacol.* 39:604-608
11. Guy H.R. and Conti F., 1990. *Trends in Neurosci.* 13: 201-206
12. Stühmer W., et al., 1989. *Nature* 339: 597-603
13. Doyle D.A., et al., 1998. *Science* 280: 69-77
14. Armstrong C.M., 1981. *Physiol. Review* 61: 644-682
15. Patton D.E., et al., 1992. *PNAS* 89: 10905-10909
16. Eaholts G., et al., 1994. *Neuron* 12: 1041-1048
17. Hoshi T., et al., 1990. *Science* 250: 533-538
18. Adelman J.P. 1995. *Current Opinion in Neurobiol.* 5: 286-295
19. Jahn H., et al., 1988. *Eur. J. Biochem.* 178: 535-542
20. Lai Y., et al., 1993. *J. Neurochemistry* 61: 1333-1339
21. Hamilton S.L., et al., 1991. *J. Biol. Chem.* 266: 19528-19635
22. Srinivasan Y., et al., 1988. *Nature* 333: 177-180

SUMMARY

In this paper, I describe the genetic and molecular analysis of genes determining structure and function of voltage gated ion channels in *Drosophila melanogaster*. The aim of this study was to dissect the structural elements important for the activity of voltage gated ion channels, and through this, to assist in elucidating the molecular basis of the electrical excitability of cells.

We have used positional cloning of a temperature sensitive paralytic mutation to identify the *tipE* gene. It encodes a new class of transmembrane protein that stimulates sodium channel expression. The *tipE* gene product has dramatic effects on the number of functional channels in the membrane. Preliminary work suggest that *TipE* may interact with the sodium channel α -subunit, helping it to reach functional state in the membrane and changing channel kinetics as a result of this interaction. It is required developmentally to prevent adult paralysis. It is unrelated to any other sodium channel auxiliary subunit described to date.

Genetic and pharmacological analysis of *seizure* mutations revealed that their electrophysiological phenotypes of reduced sodium channel numbers and function do not match their hyperactive behavioral phenotype. Cloning and sequence analyses have shown that *seizure* encodes the *Drosophila* homologue of *HERG*, a member of the *eag* family of K^+ channel. This gene is implicated in one form of hereditary long QT syndrome in humans. A missense mutation in the *seizure* gene which changes the charge of a conserved glutamate residue near the outer mouth of the pore has a semidominant phenotype suggesting that the mutant subunit can act as a "poison" in a multi-subunit complex. A recessive nonsense mutation at the amino terminus is associated with a reduction in sodium channel levels suggesting that null mutations in this K^+ channel cause Na^+ channel down regulation. Expression of *seizure* in adults only is sufficient to rescue the adult paralytic phenotype. In contrast, expression of the *tipE* gene product is required during mid to late pupal development in order to rescue adult paralysis. Expression of *tipE* only in adults does not rescue paralysis. Thus, the causative events leading to *tipE* and *seizure* paralysis are distinct mechanisms.