

# Rola kanałów jonowych w procesach sygnalizacyjnych limfocyta T

## The role of ionic channels of the T cell in cellular signalling

ANTONINA GAWLIK, MARYLA KRASNOWSKA

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Alergologii we Wrocławiu, ul. Traugutta 57/59, 50-417 Wrocław

Kanały jonowe są strukturami białkowymi umożliwiającymi transport jonów poprzez błony biologiczne, odgrywającymi ważną rolę w funkcjonowaniu systemów sygnalizacyjnych komórki. Kanały te są przedmiotem licznych badań, których celem jest ustalenie fizjologii i patogenezy chorób, a także nowych sposobów ich terapii. Artykuł zawiera charakterystykę kanałów jonowych, ze szczególnym uwzględnieniem kanałów limfocyta T, komórki odgrywającej kluczową rolę w procesie zapalnym toczącym się w drogach oddechowych. *Alergia Astma Immunologia, 2001, 6(1), 17-23*

**Słowa kluczowe:** kanały potasowe, limfocyty T, procesy sygnalizacyjne

Ionic channels are protein structures responsible for ionic transport through biological membranes. They play an important role in signal transduction systems. These channels have been extensively studied to establish their role in physiology and pathogenesis of several diseases as well as their treatment. This review presents current issues on ionic channels with special focus on T - cells, which play a key role in the inflammatory processes in the airways.

*Alergia Astma Immunologia, 2001, 6(1), 17-23*

**Key words:** ionic channels (K-channels), lymphocytes T, cellular signaling

Specyficzna biologiczna odpowiedź komórki na bodźce płynące z zewnątrz, jak też z jej wnętrza, jest możliwa dzięki działaniu systemów sygnalizacyjnych. Mechanizmy te decydują o wszystkich funkcjach życiowych komórki. Receptory, będące strukturami białkowymi, umożliwiają selekcję, analizę i prawidłową interpretację docierających informacji. Znajdują się one na powierzchni komórki lub w jej wnętrzu. Rozpoznają sygnał, przetwarzają go i przekazują informację na odpowiedni szlak sygnalizacyjny. Jest on kaskadą (ciągiem) wysoce wyspecjalizowanych białek o charakterze regulatorowym i efektorowym oraz uwalnianych w wyniku ich aktywacji cząstek lub jonów pełniących rolę wtórnych przekaźników informacji (ang. *second messengers*). Odpowiedź na zadany bodziec może być natychmiastowa lub odległa w czasie. W pierwszym przypadku dochodzi do wykorzystania mechanizmów modulujących aktywność obecnych już w komórce białek efektorowych np. enzymów lub kanałów jonowych. Natomiast jeśli do otrzymania biologicznego efektu wymagana jest synteza odpowiednich białek, wtedy odpowiedź na bodziec jest odleglejsza.

Wiadomym jest, że zaburzenia przepływu informacji na drodze od zewnątrzkomórkowego sygnału do odpowiedzi biologicznej komórki stanowią pierwotną przyczy-

nę wielu stanów chorobowych. Mogą one być spowodowane wrodzonymi lub indukowanymi mutacjami genów receptorów lub innych białek szlaków sygnalizacyjnych np. kanałów jonowych, a także błędami w procesach posttranslacyjnych modyfikacji białek powodowanych np. przez niektóre toksyny bakteryjne (cholery, krztuśca) [1,2].

Ostatnia dekada przyniosła ogromny postęp w badaniach struktury, funkcji i mechanizmów działania poszczególnych składowych różnych systemów sygnalizacji przezbłonowej i wewnątrzkomórkowej. Stało się to dzięki nowoczesnym technikom badawczym, takim jak: mikroskopia konfokalna, elektrofizjologiczne techniki nieinwazyjnego wglądu w budowę i działanie pojedynczych składników komórkowych systemów sygnalizacyjnych, a także technikom biologii molekularnej, w szczególności klonowaniu DNA i sterowanej mutagenie.

Dzięki błonom biologicznym w komórce może odbywać się jednocześnie kilka tysięcy reakcji chemicznych. Ich wybiórcza przepuszczalność umożliwia prawidłowe funkcjonowanie szlaków sygnalizacyjnych komórki. Dzięki różnym systemom transportowym w poprzek błony komórkowej odbywa się ciągły ruch cząsteczek, jonów. Podstawę zrębu błony komórkowej stanowią fosfolipidy, przez które dyfundować mogą jedynie substancje

rozpuszczalne w tłuszczach. O jej czynnościowych właściwościach decydują białka tworzące takie struktury, jak: enzymy transportujące, nośniki i kanały jonowe.

Badania nad kanałami jonowymi datują się już od ponad 40 lat, kiedy to zaczęto łączyć zmiany przepuszczalności błony dla jonów z procesem pobudzenia nerwowego. Elektrofizjologiczna charakterystyka tego zjawiska stała się możliwa dzięki badaniom biofizycznym. Zasadniczym zwrotem w badaniach biochemicznych nad kanałami było znalezienie selektywnych inhibitorów: tetrodotoksyny dla kanału sodowego i  $\alpha$ -bungarotoksyny dla nikotynowego receptora cholinergicznego. Zastosowanie powyższych substancji umożliwiło ustalenie budowy białek obu kanałów [3].

Od roku 1982 do badań nad kanałem sodowym zastosowano techniki biologii molekularnej. Dzięki znajomości sekwencji aminokwasowej fragmentów łańcucha polipeptydowego jednej z podjednostek kanału, stało się możliwe zsyntetyzowanie polinukleotydowych znaczników segregujących, a za ich pomocą wydzielenie mRNA, uzyskanie cDNA i sklonowanie go. Białka, będące produktami transkrypcji klonowanych genów, reagowały z przeciwciałami przeciw oczyszczonym podjednostkom kanału sodowego. W badaniach z zastosowaniem biologii molekularnej zajęto się również innymi typami kanałów, które zbadano i oznaczono ich budowę. Na podstawie sekwencji aminokwasowej sporządzono profile hydropatyczne i przewidywane struktury II-rzędowe białek kanałów. To umożliwiło ustalenie topografii kanałów w błonie (kolejność regionów hydrofilnych i hydrofobowych, położenie fragmentów transmembranowych). Odpowiedni materiał genetyczny (cDNA lub mRNA) wprowadzano do komórki, w której dany kanał nie występował i uzyskiwano dowody na to, że istotnie koduje on funkcjonujące kanały jonowe. Tą metodą określono m.in., które z podjednostek kanału są niezbędne dla jego funkcji [4].

W drugiej połowie lat 80., dzięki zastosowaniu metody kłamy łątkowej (ang. *patch-clamp*)\*, stał się możliwy pomiar aktywności elektrycznej pojedynczych kanałów jonowych w błonie komórkowej. Pozwoliło to na ich dokładną charakterystykę. Stosowane różne warianty powyższej metody umożliwiają wprowadzanie całego wachlarza substancji (również leków) zarówno do wnętrza badanej komórki, jak również do roztworu zewnątrzkomórkowego i obserwacje dotyczące ich modulacyjnego wpływu na aktywność kanałów jonowych. Dysfunkcja kanałów jonowych, będących ogniwem w systemach sygnalizacyjnych komórki, może być czynnikiem patogenezycznym wielu chorób (np. mukowiscydozy). Powyższe kierunki badań nad rolą kanałów jonowych w procesach życiowych komórki i nad ich patologią są obecnie prowadzone bardzo intensywnie.

## Ogólna charakterystyka kanałów jonowych

Kanały jonowe są wielkocząsteczkowymi białkami tunelowymi błon komórkowych i błon wewnątrzkomórkowych, poprzez które odbywa się przepływ jonów zgodnie z gradientem stężeń i potencjałów. W transporcie przez błony zasadniczym mechanizmem napędowym generującym gradienty chemiczne i elektrochemiczne są pompy jonowe. Zadaniem kanałów jonowych jest natomiast kontrola optymalnej dla komórki wartości potencjału elektrycznego lub różnicy stężeń przez błonę, w której są zlokalizowane.

Są one wydajniejsze od enzymów. Małe zmiany w konformacji powodują otwarcie dotychczas zamkniętego kanału pozwalając na przepływ do lub z komórki aż do 10 milionów jonów na sekundę. Ponieważ kanały jonowe są wydajne, liczba ich przypadająca na komórkę jest względnie niska, zazwyczaj wystarcza kilka tysięcy kanałów danego typu.

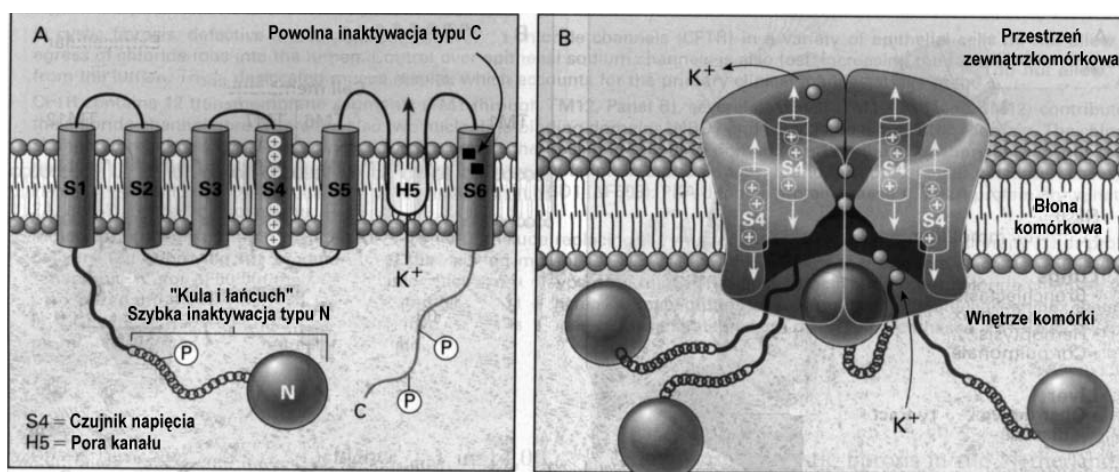
Kanały jonowe mogą być wybiórcze (selektywne) lub niewybiórcze. Dzięki wybiórczości możliwy jest przepływ przez nie tylko określonych prądów jonowych np. sodowego, potasowego lub wapniowego. Nazywamy takie kanały odpowiednio: sodowymi, potasowymi lub wapniowymi. Inną charakterystyczną cechą kanałów jonowych jest zmienność ich przewodności co oznacza, że kanał może być otwarty lub zamknięty. Wyróżniamy następujące bodźce prowadzące do aktywacji (otwarcia) kanału:

1. zmianę potencjału błonowego (najczęściej jest to depolaryzacja), mówimy wówczas o kanałach napięciowo-zależnych,
2. wewnątrz i zewnątrzkomórkowe czynniki chemiczne (np. jony wapnia, przekaźniki nerwowe, ATP, GTP, cykliczne nukleotydy jak cAMP), kanały takie nazywamy aktywowanymi chemicznie bądź aktywowanymi przez ligandy,
3. naprężenie mechaniczne błony, mówimy wówczas o kanałach aktywowanych naprężeniem błony

Aktywacja kanałów może zachodzić pod wpływem jednego z wymienionych bodźców lub też pod wpływem dowolnej ich kombinacji. Funkcjonowanie kanałów może zostać zablokowane przez działanie substancji zwanych blokerami. Każdy typ kanału posiada charakterystyczne, specyficzne dla siebie blokery np. kanały sodowe – tetrodotoksynę (TTX), kanały potasowe – tetraetyloaminy (TEA). Dzięki tej specyficzności blokery używane są do badania obecności, lokalizacji, a także właściwości określonych kanałów. Wiążą się one ze strukturami kanału i hamują przepływ jonów. Znajdują również zastosowanie kliniczne jak np. blokery kanału wapniowego – werapamil czy nifedypina [1,3,5].

Większość białek kanałów jonowych składa się z indywidualnych podjednostek lub grup podjednostek (ryc. 1), przy czym każda podjednostka zawiera 6 hydrofobowych regionów przezbłonowych od S1 do S6. Kanały potasowe

\* Przyczyną używania nazw techniki i jej konfiguracji w języku angielskim jest brak odpowiedników w języku polskim.



Ryc. 1. Struktura kanałów jonowych.

**A** – Podjednostka kanału zawierająca sześć motywów przezbłonowych, od  $S_1$  –  $S_6$ , które tworzą rdzeń struktury kanałów sodowych, wapniowych i potasowych. Struktura „kula i łańcuch” w N – końcu białka stanowi region, który uczestniczy w „szybkiej inaktywacji” typu N, zamykając drogę przepuszczania jonów. Kółka ze znakiem + w  $S_4$ , czujnika napięcia elektrycznego oznaczają dodatnio naładowane reszty lizyny i argininy. P – oznacza fosforylację. **B** – kanał potasowy składający się z czterech podjednostek (wg Michael J. Ackerman [1]).

napięciowo-zależne (ang. *K channel voltage dependent*) składają się z czterech osobnych podjednostek, z których każda zawiera pojedynczy sześcioregionowy motyw przezbłonowy. Podjednostki są ułożone z uformowaniem centralnego poru, co determinuje zarazem podstawowe właściwości bramkujące (możliwość odpowiedzi na obecność liganda, napięcie lub rozciąganie) i charakterystykę przepuszczalności danego kanału. Łańcuch peptydowy (H5 lub pętla P) pomiędzy przezbłonowymi segmentami  $S_5$  i  $S_6$  wystaje do wypełnionego wodą centralnego poru i zarazem go odgranicza. Mutacje w tym regionie zmieniają właściwości przepuszczające kanału. Region przezbłonowy  $S_4$  zawiera pęczek aminokwasów naładowanych dodatnio (lizyny i argininy) i stanowi główny czujnik napięcia elektrycznego kanału jonowego. W zależności od napięcia „szybkiej inaktywacji” kanału pośredniczy przyłączenia N-końcowa cząstka blokująca (kula i łańcuch), która kołyszac się swobodnie może zamykać drogę przepuszczania jonów (mechanizm zamykający) [1].

### Kanały jonowe limfocyta T

Limfocyty T odgrywają doniosłą rolę w funkcjonowaniu systemu immunologicznego. W odróżnieniu od komórek nerwowych i mięśniowych są one komórkami elektrycznie niebudliwymi. Przy zastosowaniu techniki „patch-clamp” w błonie komórkowej limfocyta T wykryto dotychczas następujące typy kanałów:

1. Wrażliwe na charydotoksynę napięciowo aktywowane kanały potasowe typu Shaker określone jako  $Kv1.3$  [6,7,8]
2. Niewrażliwe na charydotoksynę napięciowo aktywowane kanały potasowe wciąż nieznanego typu [9]
3. Kanały potasowe aktywowane przez wewnątrzkomórkowy wapń ( $K_{Ca}$ ) [10,11]

4. Napięciowo-niezależne i niewrażliwe na charydotoksynę kanały potasowe aktywowane przez wewnątrzkomórkowy cAMP ( $K_{cAMP}$ ) [12]
5. Kanały wapniowe aktywowane na skutek wydzielania wapnia z wewnątrzkomórkowych zbiorników - typu CRAC. [13]
6. Kanały chlorkowe aktywowane napięciowo typu „maxi” [14].
7. Kanały chlorkowe aktywowane przez wewnątrzkomórkowy cAMP [15]
8. Kanały chlorkowe „mini” aktywowane naprężeniem błony komórkowej [16]
9. Napięciowo-niezależne kanały kationo-selektywne aktywowane przez naprężenie błony [13].

Obecność klasycznych kanałów sodowych i wapniowych napięciowo-zależnych w ludzkich limfocytach T nie została udowodniona.

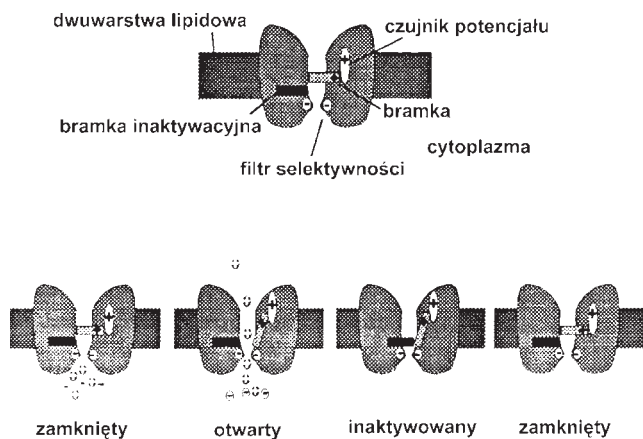
### Kanały jonowe napięciowo-zależne

Jest to typ kanałów, których prawdopodobieństwo otwarcia zależy od napięcia na błonie. Aktywacja (proces otwierania się kanału) następuje najczęściej w odpowiedzi na bodziec depolaryzacyjny, kiedy potencjał błony zmierza w kierunku wartości dodatnich. Jest to możliwe dzięki obecności w strukturze kanału tzw. czujnika potencjału. Jego ruch, pod wpływem zmiany natężenia pola elektrycznego na błonie, prowadzi do przemieszczenia fragmentu kanału zwanego bramką, co z kolei umożliwia otwarcie pory kanału. Po pewnym czasie po otwarciu następuje inaktywacja kanału. Jest to stan, w którym, pomimo działania bodźca depolaryzującego, kanał nie przewodzi jonów i jednocześnie jest niezdolny do dalszej aktywacji. Ta ostatnia cecha odróżnia go od stanu zamknięcia kanału. Za proces inaktywacji kanału odpowiedzialna jest



struktura kanału zwana bramką inaktywacyjną. Powrót ze stanu inaktywacji do stanu zamknięcia – a tym samym możliwość powtórnej aktywacji – jest możliwy wówczas, gdy potencjał na błonie osiągnie wartości zbliżone do potencjału spoczynkowego [1,5].

Ryc. 2 przedstawia elementy funkcjonalne kanału jonowego zależnego od napięcia i sekwencję jego działania.



Ryc. 2. Wybrane zagadnienia z biofizyki. Część I. Pod redakcją Stanisława Miękisz, Andrzeja Hendricha. Wrocław 1996, Akademia Medyczna we Wrocławiu

### Kanały potasowe napięciowo-zależne typu Kv1.3

Metoda „*patch-clamp*” umożliwiła w latach 80. kilku grupom badawczym przeprowadzenie doświadczeń nad kanałami potasowymi napięciowo-zależnymi w niedojrzałych i dojrzałych komórkach T, B oraz liniach komórkowych komórek białaczkowych. Na ich podstawie wyróżniono trzy rodzaje kanałów, nazywając je odpowiednio:

- „n” – dla typu przeważającego w ludzkich, normalnych limfocytach T i w komórkach białaczkowych linii Jurkat [17]
- „n' ” – dla kanałów podobnych w swej kinetyce do typu „n”, ale występujących tylko w komórkach T myszy [17]
- „l” – (*large*) – kanały o dużym przewodnictwie, występujące w zwiększonej ilości w limfocytach CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> u myszy ze schorzeniami autoimmunologicznymi [15,17,18] oraz w ludzkich komórkach linii chłoniaka Burkitt-Louckes’a [13].

Poniższa charakterystyka dotyczyć będzie kanałów potasowych napięciowo-zależnych typu Kv1.3, które licznie dominują wśród kanałów jonowych limfocytów T [6,11]. Zbudowane są z podjednostek alfa, tworzących ściany poru i podjednostki beta położonej wewnątrzplazmatycznie [19,20]. Uważa się, że ta ostatnia moduluje funkcję kanału i może uczestniczyć w regulacji proliferacji limfocytów T, w której uczestniczą kanały Kv1.3 [19,20]. Ze względu na budowę podjednostki alfa, zasadniczej struktury kanału, należy on do podrodziny Kv1 (Sha-

ker) [16]. Kanał Kv1 (a tym samym należący doń Kv1.3) składa się z czterech identycznych podjednostek alfa tworząc tetrameryczny kompleks z centralnie położoną porą, warunkujący podstawowe właściwości bramkujące i charakterystykę przepuszczalności kanału. Struktura podjednostki alfa jest wspólna dla wszystkich kanałów napięciowo-zależnych (również sodowych i wapniowych) [3].

Kanały potasowe typu Kv1.3, dominujące w limfocytach T, umożliwiają przepływ jonów potasu w kierunku na zewnątrz komórki. Mówi się, że mają one właściwości prostownicze; istnienie wewnętrznej bariery elektrycznej uniemożliwia ruch jonów w kierunku odwrotnym [6]. Występowanie kanałów Kv1.3 jest bardzo zróżnicowane i zależne od fazy cyklu rozwojowego komórki. Wykazano, że liczba kanałów Kv1.3 w poszczególnych subpopulacjach limfocytów T jest zbliżona [11]. W przypadku ludzkich komórek T średnia ich liczba wynosi około 400 w komórce spoczynkowej. Tylko znikoma ilość (2–7) w komórce w temp. 22°C lub (5–20) w temp. 37°C jest w danym momencie otwarta i aktywna przy spoczynkowej różnicy potencjałów. Natomiast w przypadku limfocytów T zaktywowanych ilość stwierdzanych w nich kanałów Kv1.3 wzrasta do około 1000 na komórkę [6,7,21].

Kanały Kv1.3 limfocytów T są blokowane przez substancje będące klasycznymi blokerami kanałów potasowych takie, jak: tetraetyloamina (TEA), 4-aminopirydyna, chinina [6]. Poza tym są one blokowane przez substancje znane jako blokery kanałów wapniowych (wera-pamil, diltiazem, nifedypina) [13]. Z kolei charybdotoksyna (ChTX) – oligopeptyd wyizolowany z jadu afrykańskiego skorpiona *Leiurus quinquestratus*, znana jako klasyczny bloker kanałów potasowych aktywowanych przez wewnątrzkomórkowy wapń występujących w komórkach mięśni gładkich, również blokuje kanały typu Kv1.3 [13]. Silnymi i specyficznymi blokerami Kv1.3 są oligopeptydy wyizolowane z jadów skorpionów takie jak: noxiutoksyna [NTX], margotoksyna [MgTX] i kaliotoksyna (KTX) [13].

Specyficzne blokery okazały się niezbędne w badaniach nad strukturą białkową kanałów jonowych, a także w różnicowaniu poszczególnych ich typów [3]. W badaniach niedawno przeprowadzonych stwierdzono, że acetylocholina redukując prądy kanałów Kv1.3 hamuje proliferację limfocytów T [23]. Podobne właściwości blokujące Kv1.3 ma propofol, środek szeroko stosowany jako ogólnie znieczulający dożylny lek [24]. Również cyklosporyna i inne leki immunosupresyjne hamują prądy potasowe w ludzkich limfocytach T [25]. W związku z udowodnionym udziałem kanałów Kv1.3 w procesie mitogenezy limfocytów T, a jednocześnie wnioskiem, że obniżenie przewodnictwa potasowego może ten proces blokować [7,17], prowadzi się intensywne poszukiwania blokerów Kv1.3, które mogłyby być stosowane w terapii jako środki immunosupresyjne [26,27,28]. Kandydatem rokuującym nadzieje jest związek chemiczny o nazwie WIN-173173, który blokuje kanały Kv1.3 20 razy silniej

i 150 razy bardziej selektywnie niż inne blokery tych kanałów [29]. W przypadku większości blokerów ich działanie jest odwracalne i zależy od zastosowanej dawki.

Własności kanałów Kv1.3 ulegają modulacji pod wpływem czynników fizjologicznych takich, jak: wewnątrzkomórkowe i zewnątrzkomórkowe pH, temperatura, zewnątrzkomórkowe stężenie  $K^+$ , wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe stężenie  $Ca^{++}$  [21,30,31].

Wartość gK w limfocytach T wzrasta około trzykrotnie wraz ze wzrostem wewnątrzkomórkowego pH od wartości 5,2 do 8,2, przy czym największe zmiany w przewodnictwie potasowym zachodzą przy zmianie pH w zakresie od 6,5 do 7,0 [30]. Również wraz ze wzrostem temperatury od 22°C do 37°C gK rośnie około dwukrotnie. Przyczyną jest zarówno zwiększone przewodnictwo pojedynczych kanałów Kv1.3, jak również obserwowany wzrost prawdopodobieństwa ich otwarcia w temperaturze 37°C [21,31].

Udowodniono, że wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia wywołuje hamowanie aktywności kanałów typu Kv1.3 zarówno w limfocytach T, jak i w B [4,32]. Prawdopodobnie dochodzi w tych warunkach do przyspieszenia szybkości inaktywacji kanałów [13]. Obserwacje te są zgodne ze zmianami zachodzącymi podczas procesu proliferacji limfocytów T [4]. Kanały reagują również na zewnątrzkomórkowe zmiany w stężeniu jonów wapnia. Jego obniżenie, wskutek wprowadzenia do roztworu kąpieli związku chelatującego wapń (EDTA), powoduje znaczący wzrost prądu potasowego. Natomiast podwyższenie stężenia  $Ca^{++}$  w roztworze kąpieli wywołuje skutek odwrotny [4,17].

Dodanie mitogenów (PHA – fitohemaglutynina) oraz cytokin do roztworu, w którym zawieszono są badane komórki powoduje w czasie kilku minut stopniową aktywację kanałów [33].

Funkcja kanałów Kv1.3 może ulegać krótkotrwałej, jak i długotrwałej modulacji. Liczne bodźce, np. antygenowe, przekaźniki nerwowe, hormony, działając poprzez receptory limfocyta generują wzrost stężenia wtórnych przekaźników takich, jak jony  $Ca^{++}$  czy cAMP i aktywują kinazy proteinowe [13]. Różnorodność uzyskanych wyników licznych badań wskazuje na dużą złożoność procesów sygnalizacyjnych w komórce, w których kanały Kv1.3 współuczestniczą.

### **Rola kanałów jonowych w procesach fizjologicznych zachodzących w ludzkich limfocytach T**

Kanały jonowe limfocytów T uczestniczą w następujących procesach fizjologicznych: w utrzymaniu potencjału spoczynkowego na błonie komórki, w mitogenezie komórki i w procesie regulacji objętościowej limfocytów T [13,34,35].

Badania *patch-clamp* potwierdzają, że potencjał spoczynkowy w nieaktywowanych mitogenami ludzkich LT

(limfocyty T) fluktuuje w zakresie 20 mV wokół średniej wartości  $-60mV$  i jest głównie utrzymywany przez periodyczną aktywność kanałów typu Kv1.3 oraz kanałów potasowych napięciowo-zależnych niewrażliwych na charybdotoksynę.

Potencjał spoczynkowy w nieaktywowanych mitogenami LT nie zależy od stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia. Wyklucza to istotny udział kanałów typu  $K_{Ca}$  w jego utrzymywaniu [32].

Potencjał spoczynkowy w aktywowanych mitogenami limfocytach T wynosi około 75 mV i jest bardziej stabilny (mniejsze oscylacje) niż w przypadku komórek nieaktywowanych. Są dwie główne przyczyny tego zjawiska. Pierwszą jest zwiększone występowanie kanałów Kv1.3 w aktywowanych mitogenami LT. Drugą przyczyną wspomnianego faktu jest liczne występowanie kanałów typu  $K(ca)$  w aktywowanych mitogenami LT, co w połączeniu ze zwiększonym stężeniem wewnątrzkomórkowego wapnia w trakcie aktywacji mitogenami powoduje, że aktywność kanałów typu  $K_{Ca}$  odgrywa istotną rolę w utrzymywaniu potencjału spoczynkowego w LT aktywowanych mitogenami. W efekcie większa liczba kanałów potasowych jest otwarta i spoczynkowe przewodnictwo błony komórkowej dla jonów potasowych jest większe niż w przypadku komórek nieaktywowanych, zaś potencjał spoczynkowy błony jest bliższy potencjałowi równowagi dla jonów potasu niż w przypadku komórek nieaktywowanych mitogenami [5,6].

### **Udział kanałów jonowych w mitogenezie limfocytów T**

Rola poszczególnych typów kanałów jonowych w odpowiedzi proliferacyjnej limfocyta T jest, mimo wielu badań, do końca niejasna. W procesie tym biorą prawdopodobnie udział różne typy kanałów. Istnieją dowody świadczące o udziale kanałów Kv1.3 w procesie mitogenezy ludzkich limfocytów T [4,6,36]. Przede wszystkim w odpowiedzi na działanie mitogenu ulegają zmianie własności biofizyczne kanałów Kv1.3. Wpływ mitogenu może być widoczny już po upływie kilkudziesięciu sekund od momentu jego dodania (tzw. *short-term effect* = efekt krótkoczasowy), bądź też dopiero po upływie około 24 godzin (tzw. *long-term effect* = efekt długoczasowy) [36].

Dodatkowym dowodem na udział kanałów Kv1.3 w procesie mitogenezy LT jest obserwowana zależność pomiędzy ilością kanałów typu Kv1.3 w błonie komórek, a szybkością ich proliferacji w danym okresie życia, zaobserwowaną w mysich LT [15,37]. Wykazano bowiem, że ilość kanałów typu Kv1.3 w błonie niedojrzałych limfocytów (o dużej szybkości proliferacji) jest dwa rzędy większa niż w dojrzałych, nieaktywowanych mitogenami LT. Ponadto stwierdzono, że w LT typu  $CD4^+ CD8^-$  (podwójnie negatywnych) myszy chorujących na schorzenia autoimmunologiczne dominującą rolę odgrywają kanały potasowe typu „l” i że komórki te nie wykazują zdolności do proliferacji. Tymczasem w LT typu  $CD4^+ CD8^-$  od osobników

zdrowych dominują kanały typu Kv1.3, zaś komórki te wykazują normalną zdolność do proliferacji. Powyższe obserwacje dowodzą, że zdolność LT do proliferacji zależy od ilości kanałów typu Kv1.3 w błonie komórki [15].

Kolejnym dowodem na udział kanałów Kv1.3 w mitogenezie komórki jest fakt, że proces ten jest blokowany przez te same substancje, które blokują kanały Kv1.3 w ludzkich LT. Stwierdzono bowiem, że chinina, 4-AP, TEA, diltiazem, ChTX, NTX oraz MgTX – substancje znane jako blokery kanałów Kv1.3 w ludzkich LT, blokują również proces mitogenezy, zaś względna skuteczność działania toksyn jest w obu wypadkach jednakowa: MgTX > ChTX > NTX > werapamil > chinina > diltiazem > 4-AP > TEA [17,36]. Należy zwrócić uwagę na fakt, że blokada procesu mitogenezy LT zachodzi przy użyciu blokerów specyficznych dla kanałów Kv1.3. Oznaczałoby to, że uczestniczą one w tym procesie. Jednakże stężenia toksyn niezbędne do połowicznego zablokowania mitogenezy LT są zawsze większe niż te, które są potrzebne do połowicznego zablokowania kanałów typu Kv1.3 [4,13]. Badania dowiodły, że np. przy obecności surowicy w roztworze, stężenia toksyn takich jak chinina, 4-AP, potrzebne do połowicznego zablokowania kanałów typu Kv1.3, są znacząco wyższe niż w przypadku roztworów nie zawierających surowicy [4,33].

Należy pamiętać, że proces mitogenezy zachodzi przy potencjale błonowym równym spoczynkowemu, podczas gdy pomiary własności kanałów typu Kv1.3 z zastosowaniem techniki „*patch-clamp*” dokonywane są przy potencjałach depolaryzujących błony LT wyższych od spoczynkowego.

O przebiegu procesu mitogenezy współdecyduje zatem spoczynkowe przewodnictwo LT, nie zaś obliczona w oparciu o pomiary elektrofizjologiczne wartość gK. Badania dowiodły, że skuteczność działania toksyn może zależeć od wartości potencjału błonowego, jak to ma miejsce w przypadku 4-AP. Prawdopodobnie jednak najważniejsze jest występowanie w LT oprócz kanałów typu Kv1.3, kanałów potasowych napięciowo-zależnych o innych właściwościach biofizycznych i farmakologicznych. Istnienie tych kanałów zostało potwierdzone niedawno [9]. Kanały te różnią się od kanałów typu Kv1.3 między innymi: wyższym potencjałem aktywacji, jak również brakiem wrażliwości na ChTX. Do tej pory nie wyizolowano genu kodującego wspomniane kanały, toteż ich precyzyjne nazwanie nie jest jeszcze w dniu dzisiejszym możliwe. Stąd robocza nazwa „kanały potasowe napięciowo-zależne, niewrażliwe na charybdotoksynę”. Ze względu na obecność tych kanałów nawet całkowite zablokowanie kanałów typu Kv1.3 przez ChTX może zahamować proces mitogenezy LT jedynie częściowo [9].

Mechanizm współdziałania kanałów typu Kv1.3 w procesie mitogenezy LT do dziś nie został jeszcze w pełni wyjaśniony. Fakt, że wpływ substancji blokujących kanały typu Kv1.3 na proces mitogenezy jest widoczny jedynie we wczesnym jej stadium może oznaczać, że ak-

tywność kanałów typu Kv1.3 w LT ma wpływ nie na cały proces mitogenezy komórki, ale na pewien konkretny etap tego procesu. Tym etapem, podobnie jak w przypadku limfocytów B, może być późna faza G1, której przebieg jest kontrolowany przez czynnik wzrostu (*growth factor*), którym w przypadku LT jest interleukina 2 (IL-2). W limfocytach T pobudzonych do mitogenezy nasila się produkcja IL-2, jak również zwiększa się liczba receptorów IL-2 na powierzchni błony komórkowej. Wykazano również, że zablokowanie mitogenezy LT przy użyciu blokerów kanałów potasowych, takich jak MgTX, NTX, ChTX, TEA, 4-AP czy chinina towarzyszy zahamowaniu wytwarzania IL-2 [13,33]. Najbardziej prawdopodobny mechanizm oddziaływania kanałów typu Kv1.3 na proces wytwarzania IL-2 polega na kontrolowaniu napływu jonów Ca do wnętrza LT w trakcie aktywacji komórki przez mitogeny. Badania wykazały, że użycie ChTX, NTX oraz MgTX blokuje napływ jonów Ca do wnętrza LT podczas aktywacji przez antygeny. Z drugiej strony wiadomo, że zahamowanie napływu jonów Ca do wnętrza LT zahamuje proces wytwarzania IL-2 [17].

W jaki sposób kanały Kv1.3 mogą kontrolować napływ jonów Ca do wnętrza komórki? Wiadomo, że podstawową rolą kanałów potasowych typu Kv1.3 w LT jest utrzymanie potencjału spoczynkowego komórki na określonym poziomie. Wiadomo też, że zablokowanie kanałów typu Kv1.3 powoduje znaczącą spoczynkową depolaryzację błony LT, podobny efekt zachodzi również wówczas, gdy badane komórki zostaną umieszczone w roztworze o podwyższonym stężeniu potasu. Z drugiej strony badania wykazały, że zablokowanie napływu jonów wapnia w trakcie aktywacji przez antygeny, jak również procesu wytwarzania IL-2 oraz proliferacji LT, zachodzi także wówczas, gdy badane komórki zostaną umieszczone w roztworze o podwyższonym stężeniu potasu. Oznaczałoby to, że kanały potasowe typu Kv1.3 kontrolują napływ jonów wapnia do wnętrza LT przez utrzymywanie odpowiedniej wartości potencjału spoczynkowego na błonie komórki [7,17]. Napływ jonów Ca<sup>++</sup> do wnętrza komórki odbywa się poprzez napięciowo-niezależne kanały wapniowe typu CRAC. Potencjał błonowy jest siłą napędową tego procesu.

Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca<sup>++</sup> w trakcie aktywacji LT przez antygeny zachodzi również na skutek uwalniania jonów Ca<sup>++</sup> z wewnątrzkomórkowych zbiorników. Mechanizm wpływu zmian potencjału błonowego na proces uwalniania jonów wapnia z wewnątrzkomórkowych zbiorników w trakcie aktywacji LT przez antygeny pozostaje do wyjaśnienia [17,36].

Warto zauważyć, że zdolność blokerów kanałów typu Kv1.3 do hamowania produkcji IL-2 i procesu mitogenezy może mieć implikacje terapeutyczne. Chodzi o zastosowanie antagonistów kanałów jako środków immunosupresyjnych. Jednak wszystkie dotychczas poznane blokery jak: werapamil, nifedypina, diltiazem nie wykazują ani wystarczającej skuteczności, ani specyficzności, aby były traktowane jako immunosupresory [13,35]. Dlatego



poszukuje się nowych blokerów z wysoką swoistością i powinowactwem. Kandydatem rokującym największe nadzieje jest związek o nazwie WIN-17317-3, który blokuje kanały typu Kv1.3 20 razy silniej i 150 razy bardziej selektywnie niż inne niepeptydowe blokery kanałów [29].

Z drugiej strony istnienie w LT kanałów potasowych napięciowo-zależnych niewrażliwych na ChTX powoduje, że dla całkowitego zablokowania procesu mitogenezy LT konieczne będzie wynalezienie specyficznych blokerów również dla tego typu kanału.

#### Piśmiennictwo

- Ackerman MJ, Clapham DE. Ion channels - basic science and clinical disease. *N Engl J Med* 1997; 336: 1575-1586.
- Skangiel-Kramska J. Receptory błonowe: Klasyfikacja, struktura, funkcje. w: Konarska L. Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce. PWN Warszawa 1995; 45-62.
- Kwiatkowska-Korczak J. Budowa kanałów jonowych: rodziny strukturalne. *Postępy Biochemii* 1991; 37: 122-12.
- DeCoursey TE, Chandy UG, Gupta S, Cahalan MD. Voltage-gated K<sup>+</sup> channels in human T-lymphocytes: a role in mitogenesis? *Nature* 1984; 307: 465-468.
- Moran O. Patch-clamp technique a practical introduction. Preprint of the International School of Advanced Studies. Trieste, Italy 1988.
- Cahalan MD, Chandy KG, DeCoursey TE, Gupta S. A voltage-gated potassium channel in human T lymphocytes. *J Physiol* 1985; 358: 197-237.
- Gallin EK. Ion channels in leukocytes. *Physiol Rev* 1991; 71: 775-811.
- Lee SC, Levy DI, Deutsch C. Diverse K<sup>+</sup> channels in primary human T lymphocytes. *J Gen Physiol* 1992; 99: 771-793.
- Verheugen JAH, Korn H. A charybdotoxin-insensitive conductance in human T lymphocytes: T cell membrane potential is set by distinct K<sup>+</sup> channels. *J Physiol* 1997; 503: 317-331.
- Grissmer S, Nguyen AN, Cahalan MD. Calcium-activated potassium channels in resting and activated human T lymphocytes. *J Gen Physiol* 1993; 102: 601-630.
- Verheugen JAH, Vijverberg HPM, Oortgiesen M, Cahalan MD. Voltage-gated and Ca<sup>2+</sup> activated K<sup>+</sup> channels in intact human T lymphocytes. *J Gen Physiol* 1995; 105: 765-794.
- Oleson DR, DeFelice LJ, Quinn MF, Donahoe RM. Cyclic adenosine 3'5'-monophosphate increases the open probability of potassium channels in activated human T cells. *J Immunol* 1996; 157: 1080-1086.
- Lewis RS, Cahalan MD. Potassium and calcium channels in lymphocytes. *Ann Rev Immunol* 1995; 13: 623-653.
- Pahapill PA, Schlichter LC. Modulation of potassium channels in intact human T lymphocytes. *J Physiol* 1992; 445: 407-430.
- Grissmer S, Hanson DC, Natoli EJ, Cahalan MD. CD4-CD8- T cells from mice with collagen arthritis display aberrant expression of type „I” K<sup>+</sup> channels. *J Immunol* 1990; 145: 2105-2109.
- Cahalan MD, Levis R. Role of potassium and chloride channels in volume regulation by T lymphocytes. *Cell. Physiol of Blood Chapter 24, The Rockefeller University Press* 1988; 282-301.
- Gardner P. Patch-clamp studies of lymphocyte activation. *Ann Rev Immunol* 1990; 8: 231-251.
- Chandy KG, Cahalan MD, Grissmer S. Autoimmune disease linked to abnormal K<sup>+</sup> channel expression in double-negative CD4-CD8- T cells. *Eur J Immunol* 1990; 20: 747-751.
- Autieri MV, Belkovski SM, Constantinescu CS. Lymphocyte-specific inducible expression of potassium channel beta subunits. *J Neuroimmunology* 1997; 77: 8-16.
- Desir GV. The structure, regulation and pathophysiology of potassium channels. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 1995; 4: 402-405.
- Lee SC, Deutsch C. Temperature dependence of K<sup>+</sup> channel properties in human T lymphocytes. *Biophys J* 1990; 57: 49-62.
- Laxminarayana D, Berrada A, Krammer GM. Early events of human T-lymphocyte activation are associated with type I protein kinase A activity. *J Clin Invest* 1993; 92: 2207-2214.
- Gaspar R, Varga Z, Benc L, Marcheselli F. Effect of acetylcholine on the electrophysiology and proliferative response of human lymphocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1996; 226: 303-308.
- Mozrzymas JW, Teisseyre A, Vittur F. Propofol blocks voltage-gated potassium channels in human T-lymphocytes. *Biochem Pharmacol* 1996; 52: 843-849.
- Panyi G, Gaspar R, Krasznai Z, Ter Horst JJ. Immunosuppressors inhibit voltage-gated potassium channels in human peripheral blood lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 221: 254-258.
- Michne WF, Guiles IW, Treasurywaler AM. Novel inhibitors of potassium ion channels on human T lymphocytes. *J Med Chem* 1995; 38: 1877-1883.
- Nguyen A, Kath JC, Hanson DC, Biggers MS. Novel nonpeptide agents potentially block the C-type inactivated conformation of Kv1.3 and suppress T-cell activation. *Mol Pharmacol* 1996; 50: 1672-1679.
- Stauss V, Wittstock V, Schubert R, Teuscher E, Jung S, Mix E. Cicutoxin from *Cicuta virosa* - a new and potent potassium channel blocker in T lymphocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1996; 219: 332-336.
- Hill RJ, Grant AA, Volberg W. WIN-17317-3 novel nonpeptide antagonist of voltage-activated K<sup>+</sup> channels in human T lymphocytes. *Mol Pharmacol* 1995; 48: 98-104.
- Deutsch C, Lee SC. Modulation of K<sup>+</sup> currents in human lymphocytes by pH. *J Physiol Lond* 1989; 413: 399-413.
- Pahapill PA, Schlichter LC. Modulation of potassium channels in intact human T lymphocytes. *J Physiol* 1992; 445: 407-430.
- Verheugen JAH, Vijverberg HPH. Intracellular Ca<sup>++</sup> oscillations in intact human T lymphocytes: role of K<sup>+</sup> channels in Ca<sup>++</sup> signaling. *Cell Calcium* 1995; 17: 287-300.
- Freddman BD, Price MA, Deutsch CI. Evidence for voltage modulation of IL-2 production in mitogen-stimulated human peripheral blood lymphocytes. *J Immunol* 1992; 149: 3784-3794.
- Gleich G. Conference reporter: Congress of European Academy of Allergy and Clinical Immunology. Rhodes-Hellas 1-5 June 1997.
- Rader RK, Dupuis G. Dual regulation of the n-type K<sup>+</sup> channel in Jurkat T lymphocytes by protein kinases A and C. *J Biol Chem* 1992; 267: 18270-18273.
- Lin CS, Boltz RC, Blake JT. Voltage-gated potassium channels regulate calcium-dependent pathways involved in human T lymphocyte activation. *J Exp Med*. 1993; 177: 637-645.
- Chandy KG, Cahalan MD, Grissmer S. Autoimmune disease linked to abnormal K<sup>+</sup> channel expression in double-negative CD4-CD8- T cells. *Eur J Immunol* 1990; 20: 747-751.