

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Gaál Szabolcs Máté

**Feszültségkapuzott ioncsatornák funkcionális vizsgálata,
implikációk aritmia mechanizmus karakterizálására**

Debreceni Egyetem

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2026.

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Feszültségkapuzott ioncsatornák funkcionális vizsgálata,
implikációk humán aritmia mechanizmus karakterizálására**

Dr. Gaál Szabolcs Máté

Témavezetők: Dr. Szántó G. Tibor, Prof. Dr. Csanádi Zoltán



Debreceni Egyetem

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2026.

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés és irodalmi áttekintés	7
1.1. Ioncsatornák	7
1.2. Feszültségkapuzott káliumcsatornák (K_v)	7
1.2.1. K_v csatornák C-típusú inaktivációját stabilizáló molekuláris tényezők	11
1.3. Feszültségkapuzott nátriumcsatornák (Na_v)	13
1.4. Brugada-szindróma – bevezető, epidemiológia	15
1.4.1. Brugada-szindróma – genetikai háttér, patofiziológia	16
1.4.2. Brugada-szindróma – klinikai manifesztáció	17
1.4.3. Brugada-szindróma – diagnózis	18
1.4.4. Brugada-szindróma – terápia	20
1.5. Brugada-szindróma – esetismertetés	22
1.6. Nyitott kérdések, dilemmák a C-típusú inaktivációval és a Brugada-szindróma klinikumával kapcsolatban	25
2. Céltűzés	26
3. Anyagok és módszerek	27
3.1. Etikai engedély	27
3.2. Genetikai analízis	27
3.3. Célzott mutagenézis	27
3.4. A T449A és I470A mutáns Shaker-IR feszültségfüggő káliumcsatornák	27
3.5. Sejtkultúrák és transzfekció	28
3.6. Fluoreszcens és konfokális mikroszkópia	29
3.7. Celluláris elektrofiziológia	30
3.7.1. Felhasznált oldatok és perfúziós rendszer	31
3.7.2. A Shaker-IR mérések során használt feszültség protokollok	32
3.7.3. A $Na_v1.5$ mérések során használt feszültség protokollok	34
3.8. A fehérjeszerkezet modellezése	35
3.9. Adatértékelés és statisztikai elemzés	36
4. Eredmények	37
4.1 A 10 % (m/m) szacharóz hatása Shaker-IR káliumcsatornák lassú inaktivációjára	37
4.1.1. Az 5% (m/m) glicerín hatása Shaker-IR káliumcsatornák lassú inaktivációjára	38
4.1.2 A 10% (m/m) glicerín hatása Shaker-IR káliumcsatornák lassú inaktivációjára	39
4.2. Egy potenciálisan patogén $Na_v1.5$ mutáció detektálása	41
4.3. A vad típusú $Na_v1.5_{GFP}$ biofizikai karakterizálása	43
4.4. A $Na_v1.5$ R893C mutáció biofizikai karakterizálása	45

4.4.1. Membránexpressziós vizsgálatok.....	49
4.4.2. R893C mutáns csatornák hatása a vad típusú csatornák működésére.....	51
4.4.3. Ditiotreitol (DTT) hatása az R893C mutáns csatornák működésére.....	53
4.4.5. A prokainamid mutációfüggetlen hatása a Na _v 1.5 működésére.....	54
4.4.6. Arg893 jelentősége a Na _v 1.5 működésében.....	55
4.4.7. R893C Na _v 1.5 strukturális modellezése.....	56
5. Megbeszélés.....	58
5.1. A Shaker-IR K ⁺ -csatornák lassú inaktivációjának vizsgálata során nyert eredmények értékelése.....	58
5.2. Na _v 1.5-R893C biofizikai karakterizálása során nyert eredmények értékelése.....	60
6. Összegzés.....	68
7. Új tudományos megállapítások.....	70
8. Irodalomjegyzék.....	72
9. Kulcsszavak.....	81
10. Köszönetnyilvánítás.....	82
11. Függelék.....	83

Rövidítések jegyzéke

Akciós potenciál – AP

Beültethető kardioverter defibrillátor (Implantable Cardioverter Defibrillator) - ICD

Brugada-szindróma - BrS

Domain I-IV – DI-IV

Elektrofiziológiai vizsgálat (Electrophysiological Study) - EPS

Elektrokardiogram – EKG

Extracelluláris – EC

Feszültségkapuzott kapuzott káliumcsatorna – K_v

Feszültségkapuzott nátriumcsatorna – Na_v

Feszültség szenzor domén (Voltage Sensor Domain) - VSD

Funkcióvesztő (Loss of Function) – LOF

Hirtelen szívhalál – HszH

Intracelluláris – IC

Jobb kamra kiáramlási traktus (Right Ventricular Outflow Tract) – RVOT

Jobb Tawara-szár blokk – JTSZB

Kalcium/Kalmodulin-függő protein kináz II - CaMKII

Kamrai extrasystolia (Ventricular Extrasystole) – VES

Kamrafibrilláció (Ventricular Fibrillation) - VF

Kamrai tachycardia (Ventricular Tachycardia) - VT

Korai utódepolarizáció (Early Afterdepolarisation) - EAD

Késői utódepolarizáció (Delayed Afterdepolarisation) – DAD

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger - NCX

Pórusdomén - PD

Radiofrekvencia – RF

Sodium channel protein type 5 subunit alpha – $\text{Na}_v1.5$

Sodium voltage-gated channel alpha subunit 5 – SCN5A

Szarkoplazmatikus retikulum - SR

Szelektivitási filter – SF

Tetrodotoxin - TTX

Transzmembrán helikális szegmentumok – S1-S6

1,4-Dithiotreitol - DTT

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

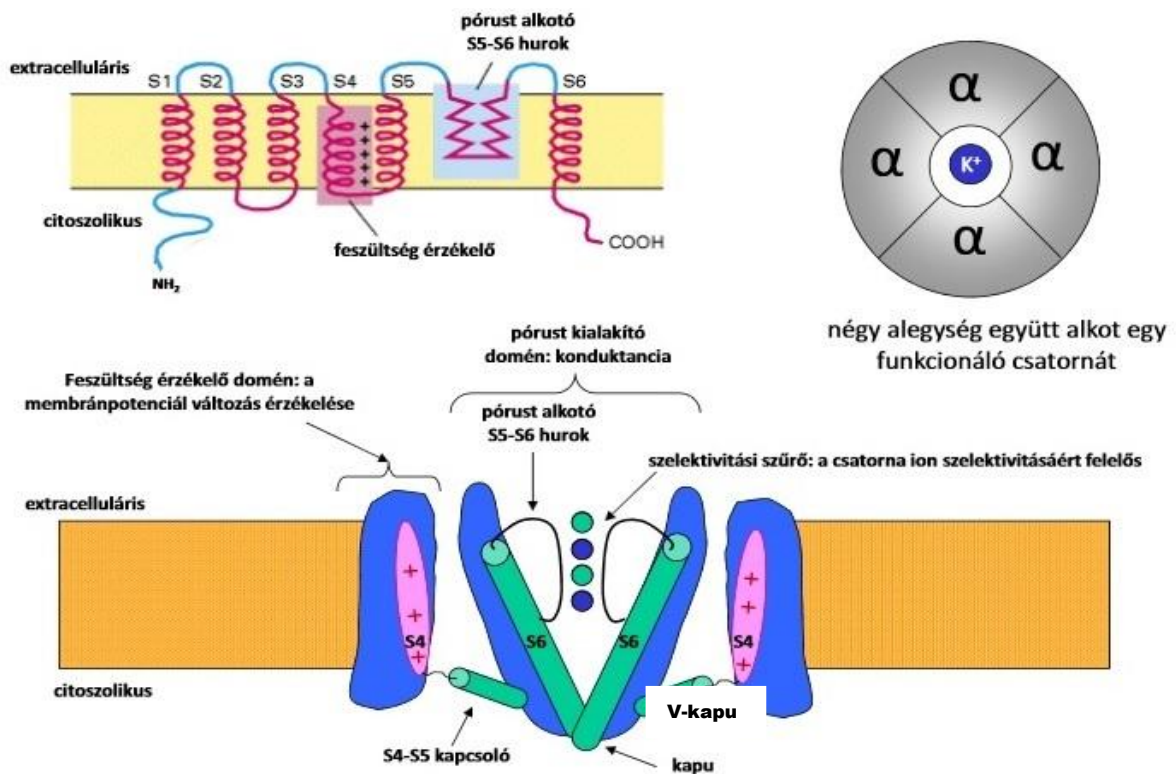
1.1. Ioncsatornák

Az ioncsatornák a plazmamembránban és a sejtorganellumok membránjában megtalálható speciális transzmembrán fehérjék, melyek a membránon keresztül egy hidrofil pórust képezve biztosítják az ionok extracelluláris és intracelluláris terek közötti, elektrokémiai gradiens által hajtott, passzív áramlását. A különböző ioncsatornák az emberi szövetek minden sejtípusában kifejeződnek, ezáltal számos élettani folyamat szabályozásában részt vesznek. Egyik fontos tulajdonságuk a szelektivitás, vagyis a póruson keresztül csak meghatározott méretű/töltésű ionok hatolhatnak keresztül. A szelektivitás mellett fontos tulajdonságuk a kapuzás is, mely során a csatorna zárt állapotból valamilyen specifikus inger, például feszültség, mechanikai inger, ligand bekötődése stb., olyan konformációváltozásokon megy keresztül, melynek hatására nyitott, vezetőképes állapotba kerül. Az ioncsatornák inaktivációja során a csatorna különböző molekuláris változások következtében olyan konformációváltozásokon megy keresztül, amelynek eredményeképpen az aktivációs kapu nyitott állapotától függetlenül a csatorna nem vezet ionáramot. Az inaktivációnak nagy szerepe van az akciós potenciálok egyenirányításában, illetve koordinálásában, ezáltal kiemelt fontosságú ingerelhető sejtek funkcióinak szabályozásában. Érdeklődésünk középpontjában a feszültség-kapuzott nátrium és kálium csatornák állnak, ezért ezek felépítését és működését disszertációmban részletesen bemutatom.

1.2. Feszültségkapuzott káliumcsatornák (K_v)

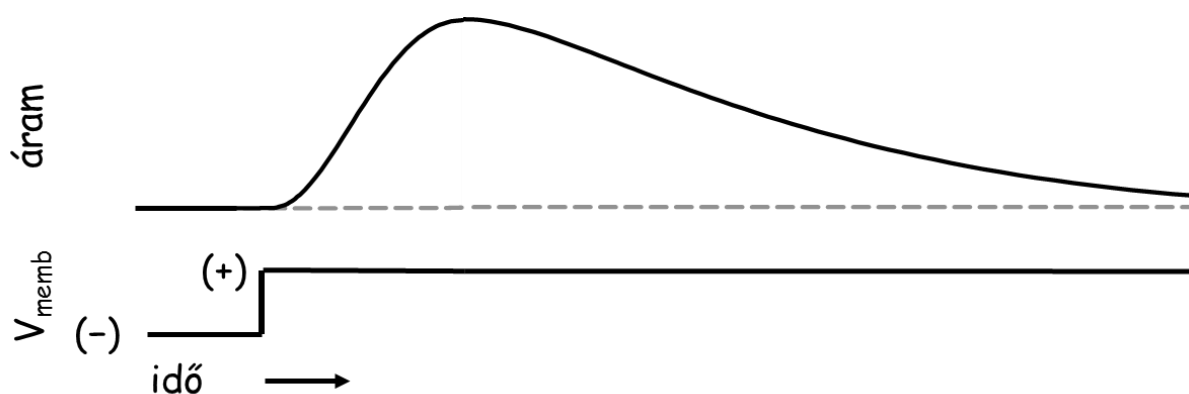
A feszültségkapuzott káliumcsatornák (K_v) az esetek nagy részében négy alfa-alegységből felépülő homotetramerek, melyek együttesen alakítják ki a csatorna két fő funkcionális egységét, a feszültség-szenzor domént – voltage sensor domain (VSD) és a pórosdomént (PD). Az egyes alegységek hat transzmembrán helikális szegmentumból épülnek

fel (S1-S6), melyeket intra-és extracelluláris aminosav hurkok tartanak össze. Az S1-S4 hélixek alkotják a csatorna feszültség szenzor doménjét (VSD), míg a csatorna pórusdoménjét az S5-S6 szegmentumok és az ezeket összekötő hurok hozza létre. Ezen hurokszekvenciában található többek között a K^+ szelektivitást biztosító Gly-Tyr-Gly-Asp (GYGD) szekvencia, ami a csatorna szelektivitási szűrőjének (SF) felépítéséért felelős [Doyle és mtsai., 1998]. A szelektivitási szűrő alapján ezek a csatornák elkülöníthetők más ionokra szelektív ioncsatornáktól. A membránpotenciál érzékeléséért a VSD-, míg az ionáram koordinálásáért a PD-ben található, ún. aktivációs kapu, valamint a szelektivitási szűrő (SF) felelősek. Az S6 szegmentumok egymás felé konvergáló részei adják az aktivációs kaput (V-kapu) (1. ábra).



1. ábra: A feszültségkapuzott káliumcsatornák (K_v) felépítése. Bal felül egyetlen alegység sematikus képe látható oldalról, jobb felül a homotetramer szerkezet felülnézetből, alul a feszültség szenzort és a pórus domént szemléltető rajz oldalnézetből (két szemközti alegység esetén). Az S4 szegmensben található pluszjelek a pozitív töltésű feszültségérzékelő aminosav-oldalláncokat jelölik.

A membrán depolarizációját a VSD érzékeli a benne található pozitív töltésű aminosav oldalláncok (döntően arginin) révén, ami az S4 szegmensek extracelluláris irányba történő elmozdulását és következményesen az aktivációs kapu nyílását eredményezi, így az ioncsatorna képessé válik a K^+ ionok szelektív kondukciójára. A fenntartott depolarizáció következtében a csatorna egy funkcionálisan nem vezető, inaktivált állapotba kerülhet (2. ábra). Depolarizáció hatására a zárt állapotban lévő csatorna aktivációs kapuja kinyit, így funkcionálisan vezető állapot jön létre, majd ha a depolarizáció továbbra is fennáll, az inaktivációs kapu bezáródása nem vezető, inaktivált állapotot hoz létre. Amennyiben a csatornát kellő ideig negatív membránpotenciálon tartjuk, létrejön az inaktivációból való visszatérés állapota (recovery from inactivation), azaz a csatorna ismét zárt, ingerelhető állapotba kerül.

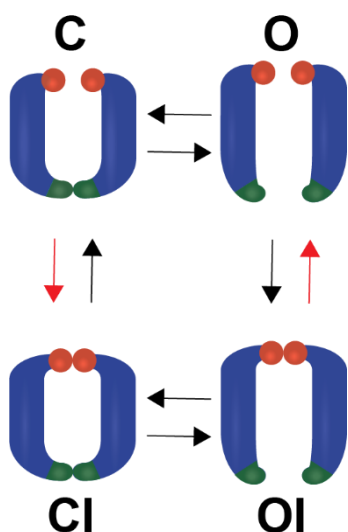


2. ábra: Az inaktivációt szemléltető rajz. Amennyiben a depolarizáló impulzust fenntartjuk, az inaktiváció következtében az ioncsatornán átfolyó áram fokozatosan megszűnik.

Az inaktiváció pontos mechanizmusainak bemutatása nélkülözhetetlen eredményeink megfelelő értelmezéséhez. Ez alapvetően két mechanizmus révén mehet végbe K_v csatornák esetén. A csatornák alegységeinek N-terminális részén egyenként található egy közel 40 aminosavból álló szekvencia, melyet az irodalomban inaktivációs labdaként említene. Az N-típusú inaktiváció során ezen inaktivációs labdák közül az egyik a Brown-mozgás következtében a pórusba bekötődve egyszerűen lezárja a permeációs útvonalat [Kurata és mtsai., 2006]. Ettől eltérő mechanizmus révén jön létre a C-típusú inaktiváció, ami szerkezetileg

a szelektivitási szűrő konformációváltozásaihoz kötődik és az alegység C-terminusához közelebb eső, C-típusú inaktivációs kapu záródásának révén jön létre [Kurata és mtsai., 2006]. Ezen kapu alkotásában részt vesz a szelektivitási szűrő, melynek kölcsönhatásai a pórust alkotó hélixekkel és a SF mögötti térben elhelyezkedő ún. „inaktivációs” vízmolekuláknak is nagy szerepet tulajdonítanak mind a C-típusú inaktiváció-, mind az inaktivációból való visszatérés folyamataihoz kapcsolódó molekuláris átrendeződések szabályozásában [Cordero-Morales és mtsai., 2011]. Az N-típusú inaktiváció létrejöttéhez elégséges egyetlen inaktivációs labda bekötődése, ezért ez milliszekundumos időskálán alakul ki. Ezzel szemben a C-típusú inaktivációt a csatorna négy alegysége kooperatív módon hozza létre, ezért kinetikáját tekintve lényegesen lassabb folyamatról beszélünk, melynek pontos molekuláris mechanizmusa a mai napig nem tisztázott. A *Drosophila melanogaster* Shaker káliumcsatornája hasonló felépítésű és kapuzású, mint bizonyos humán K_v csatornák (pl. $K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v1.6$). A kísérleteim során használt mutáns Shaker káliumcsatornák nem tartalmazták az N-típusú inaktivációért felelős „labda szekvenciát” (Shaker-IR), mely széles körben elfogadott modellcsatorna a K_v ioncsatornák C-típusú inaktivációjának szelektív tanulmányozásához [Kurata és mtsai., 2006]. A C-típusú inaktiváció szempontjából kiemelt jelentőségű a 449-es pozícióban lévő treonin oldallánc. Ha ezt az aminosavat alaninra cseréljük, akkor az inaktiváció felgyorsul, míg ha aromás aminosavakkal, például hisztidinnel végezzük ugyanezt, az lassítja a folyamatot [López-Barneo és mtsai., 1993]. A kísérleteim során T449A, illetve T449A/I470A mutációkat tartalmazó, ezáltal eltérő sebességgel, de a vad típusú Shaker-IR csatornához képest gyorsabban inaktiválódó Shaker mutánsokat használtam a folyamat vizsgálhatósága érdekében. A csatornák lehetséges funkcionális és strukturális állapota alapján négy fő kapuzási állapotot különböztetünk meg: zárt (C), nyitott (I), nyitott-inaktiválódott (OI) és zárt-inaktiválódott (CI) állapotot (3.ábra, Szanto és mtsai., 2020). A depolarizáció hatására kinyíló aktivációs kapu lehetővé teszi az ionok áramlását a csatornán keresztül (I), majd az elnyújtott depolarizáció az

inaktivációs kapu záródása révén a C-típusú inaktiváció kialakulásához vezet (OI), ennek következtében az átfolyó ionáram csökkenését és egy nem vezető állapot kialakulását eredményezi. Ezt követően a negatív membránpotenciál először az aktivációs kapu záródását (CI), majd az inaktivációs kapu nyílását és a kezdeti zárt állapot (C) kialakulását eredményezi. Az inaktivációból való visszatérés több szekundumos folyamatának sebességmeghatározó lépése Shaker-IR csatornáknban a CI->C átmenet, azaz az inaktivációs kapu nyílása.

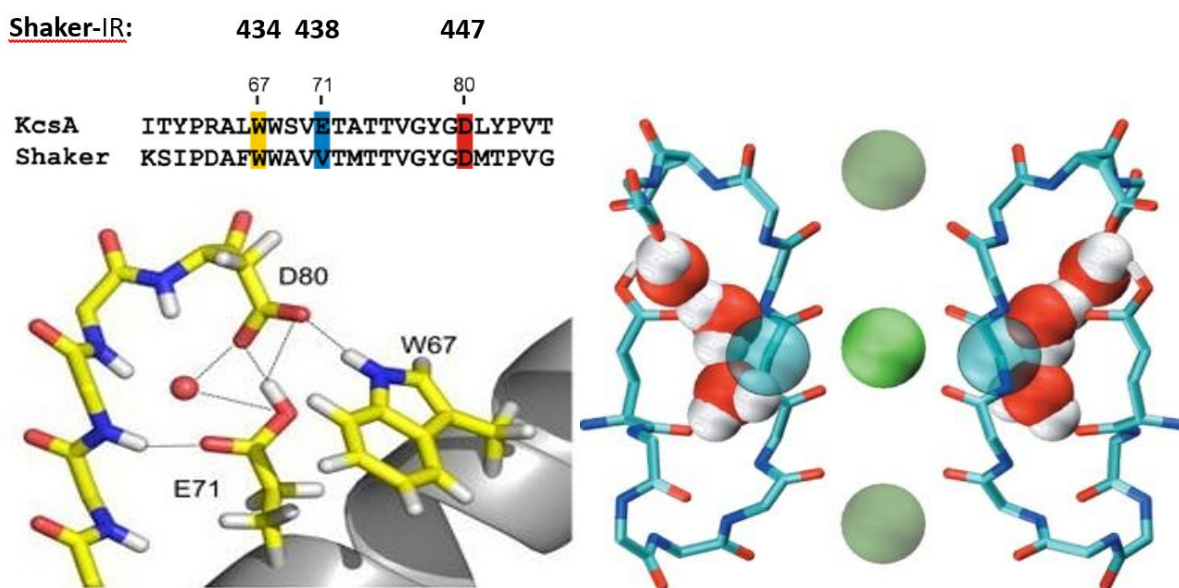


3. ábra: A Shaker-IR csatornák néglépéses kapuzási modellje. A pórusdoméneket szemléltető rajzon négy fő kapuzási állapot látható az aktivációs (sötétzöld) és az inaktivációs (piros gömbök) kapuk állapotától függően. A zárt (C), nyitott (O), nyitott-inaktivált (OI) és zárt-inaktivált (CI) állapotok közül csak a nyitott állapot vezetőképes. Az egyes kapuzási állapotok között lehetséges átmeneteket nyilak jelölik (a jobbra és lefelé mutató nyilak a depolarizációt-, míg a balra és felfelé mutató nyilak a repolarizációt jelölik).

1.2.1. K_v csatornák C-típusú inaktivációját stabilizáló molekuláris tényezők

Ismert, hogy a C-típusú inaktivált állapotot a szelektivitási filter mögötti régióban kialakuló hidrogénkötés-hálózat stabilizálja (4. ábra). Ezt a hálózatot először a *Streptomyces lividans*-ból származó, bakteriális, pH-kapuzott KcsA káliumcsatornában írták le, amely nagyfokú szekvenciahomológiát mutat a Shaker-típusú káliumcsatornákkal [Cordero-Morales és mtsai., 2011]. Bizonyítást nyert, hogy KcsA-ban ezen kötések közül a legnagyobb

inaktivációs stabilitást a W67-D80 közt kialakuló, illetve az D80-E71 között létrejövő hidrogénkötés biztosítja. Amikor a 67-es pozícióban lévő triptofánt helyettesítették fenilalaninnal (W67F), egy C-típusú inaktivációra képtelen mutánst kaptak, mivel a fenilalanin nem képes hidrogénkötést kialakítani az aszpartát oldallánccal. Ha nem fenilalaninnal, hanem tirozinnal helyettesítették a triptofánt (W67Y), akkor egy gyors és robosztus módon inaktíváló mutánst kaptak, ugyanis ebben az esetben az oldallancok között erős hidrogénkötések alakulnak ki [Cordero-Morales és mtsai., 2011]. Ezen hidrogénkötés-hálózat jelen van a Shaker feszültségfüggő káliumcsatornák szelektivitási filtere mögötti régióban is, hasonló módon, mint KcsA-ban [Cordero-Morales és mtsai., 2011]. A W67-D80 kötésnek itt a W434-D447 kötés felel meg. Ez a legfontosabb kötés Shakerben az inaktívált állapot stabilitásának szempontjából (4.ábra).



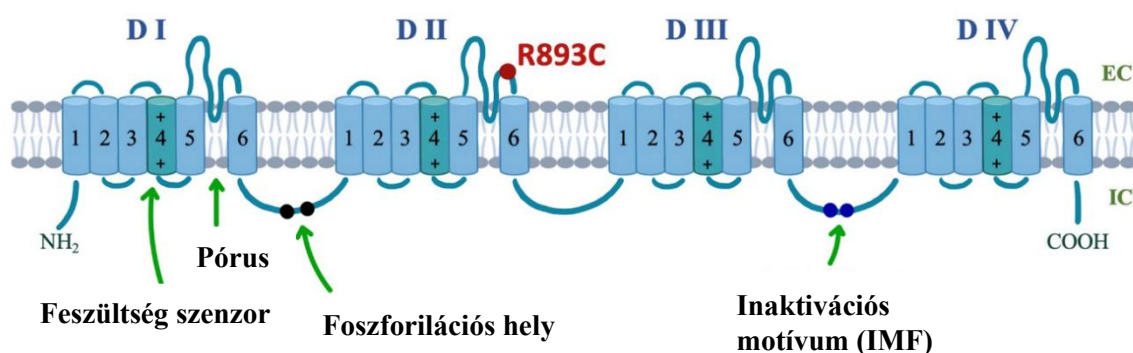
4. ábra: A KcsA káliumcsatorna szelektivitási filtere mögötti régiójában kialakuló hidrogénkötés-hálózat és az inaktívált állapotot stabilizáló vízmolekulák. Az ábra bal oldalán a víz molekula piros gömbként van jelölve, jobb oldalán a zöld körök a kálium kötőhelyeket, a világoskékek pedig a glicin oldallánccokat jelölik, ami a szelektivitási szűrő legszűkebb része. Az ábra tetején látható szekvencia a hidrogénkötések szempontjából legfontosabb aminosav oldallánccok elhelyezkedését mutatja KcsA és Shaker csatornában. [Cordero-Morales és mtsai., 2011; Ostmeyer és mtsai., 2013].

Molekuláris dinamikai modellszámítások szerint a szelektivitási filter mögötti régióban vízmolekulák is találhatóak, amelyek az inaktivált állapot létrejöttében és stabilizálásában játszanak kulcsszerepet (Ostmeyer és mtsai. 2013). Ezen vízmolekulák az inaktivált csatorna struktúrájának integrális részét képezik (4. ábra). Ha ezek a vízmolekulák eltávolításra kerülnek, akkor a csatorna visszatér az inaktív állapotból a nyugalmi állapotba. Az inaktivált állapotból való visszatéréshez tehát szükség van az inaktivációs vízmolekulák eltávozására a szűrő mögötti régióból, így az inaktivációs vízmolekulák egyfajta „kapuőr” szerepet játszanak. Az irodalomban korábban már beszámoltak az inaktivációs vízmolekulák kísérleti úton történő eltávolításának az inaktivált állapotból való visszatérést gyorsító hatásáról, nagy viszkozitású (2 M) szacharóz oldat segítségével, KcsA csatornában (Ostmeyer és mtsai. 2013).

1.3. Feszültségkapuzott nátriumcsatornák (Na_v)

Az emlősökben megfigyelhető feszültségkapuzott nátriumcsatornák (Na_v) egy pórusformáló, pszeudotetramer felépítésű alfa-alegységből és egy vagy két regulátor funkcióval bíró béta-alegységből épülnek fel. A csatornák alfa-alegysége egyetlen hatalmas polipeptid lánc, amely négy domént tartalmaz (DI-DIV). Ezen domének egyenként 6 transzmembrán helikális szegmentumból tevődnek össze (S1-S6), melyeket intracelluláris- és extracelluláris hurkok kapcsolnak össze (5. ábra). Ezen szegmentumok közül S1-4 alkotja a csatorna feszültség-szenzor egységét (VSD), melynek fő eleme az S4 hélix a benne található pozitív töltéssel rendelkező oldalláncai következtében, melyek a depolarizáció hatására létrejövő konformáció változást szabályozzák, ami a csatorna nyitásához és ennek következtében a sejtbe történő rapid Na^+ beáramláshoz vezet. A négy domén S5-S6 szegmentumai, és az ezeket összekötő extracelluláris hurok régiók alkotják a csatorna pórusát (PD) és a szelektivitási filtert (SF) [de Lera Ruiz és mtsai., 2015]. Az emberi genomban összesen 9 féle Na_v alfa-alegységet kódoló gén található, ennek megfelelően $\text{Na}_v1.1$ - $\text{Na}_v1.9$ altípusokat lehet megkülönböztetni. Ezen csatornák szövetspecifikusan fejeződnek ki: $\text{Na}_v1.1$ -1.3 az agyszövetben, $\text{Na}_v1.7$ -1.9 a

perifériás idegrendszerben, $\text{Na}_v1.6$ az agyban és a perifériás idegrendszerben, $\text{Na}_v1.4$ a harántcsíkolt izmokban, illetve az érdeklődésünk középpontjában álló $\text{Na}_v1.5$ pedig döntően a szívizomban fejeződik ki [Caterall és mtsai., 2005]. Az egyik legszélesebb körben használt Na_v gátlószer a tetrodotoxin (TTX). A Na_v családon belül a $\text{Na}_v1.1$ - 1.4 , $\text{Na}_v1.6$ és $\text{Na}_v1.7$ csatornák esetében 1-25 nM koncentrációban alkalmazott TTX gátló hatást fejt ki a csatorna működésére, ezért ezeket az altípusokat TTX szenzitívnek nevezzük. Ezzel szemben a $\text{Na}_v1.8$, $\text{Na}_v1.9$ és az általunk vizsgált $\text{Na}_v1.5$ csatornák esetében csak sokkal magasabb, μM nagyságrendű koncentrációban alkalmazott TTX képes gátló hatást kifejteni, ezért ezeket a csatornákat TTX rezisztensnek nevezzük [de Lera Ruiz és mtsai., 2015; Cestéle és mtsai., 2000]. Az SCN5A gén által kódolt kardialis, gyors feszültségfüggő nátriumcsatorna ($\text{Na}_v1.5$) az elmúlt évtizedekben számos kísérleti kutatás célpontjává vált, ugyanis ezen gén mutációit egyre több primer elektromos szívbetegséggel hozták összefüggésbe. Disszertációmban egy Brugada-szindrómában szenvedő betegben felfedezett SCN5A mutációt fogok bemutatni (R893C, 5.ábra), annak teljes klinikai és biofizikai jellemzésével, bizonyítva ezen mutáció patogén voltát és feltárni a funkcióvesztés molekuláris részleteit.



5.ábra: Az SCN5A gén által kódolt $\text{Na}_v1.5$ felépítését bemutató sematikus ábra. A csatorna négy doménből (DI, DII, DIII és DIV) áll, amelyeket intracelluláris linker régiók kapcsolnak össze. Mindegyik domén hat transzmembrán α -hélix szegmenst (S1–S6) tartalmaz. Az S4 szegmensben található pluszjelek a pozitív töltésű feszültségérzékelőt jelölik. A DIII és DIV doméneket összekötő intracelluláris hurok tartalmazza az inaktivációs kaput, amelyet egy hidrofób triplet (IFM motívum) alkot, és korlátozza az ionáramlást a csatorna pórusán keresztül. A piros pont az általunk vizsgált mutációt (R893C) jelöli.

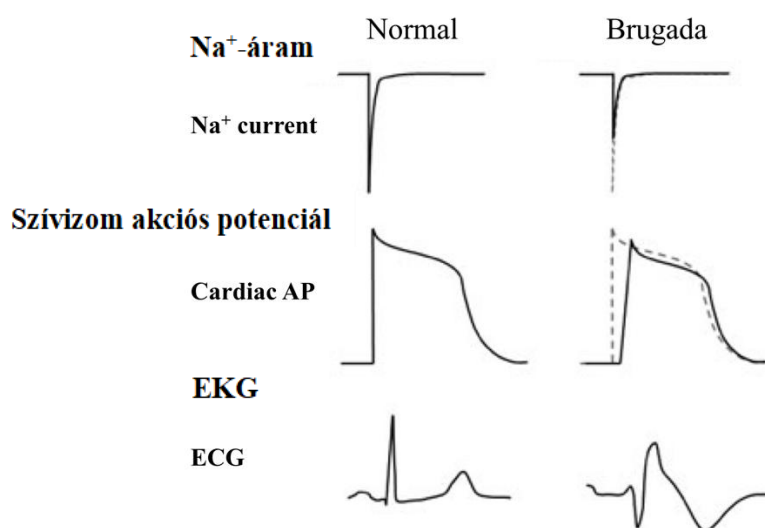
1.4. Brugada-szindróma – bevezető, epidemiológia

A Brugada-szindróma (BrS) egy genetikailag meghatározott, potenciálisan halálos szívritmuszavarok kialakulására hajlamosító, meglehetősen ritka ioncsatorna betegség. Az entitás először 1992-ben került leírásra a Brugada fivérek által, egy, az elektrokardiogramon (EKG) inkomplett vagy komplett jobb Tawara-szár blokkal (JTSZB), jobb precordiális (V1-2) ST-elevációval és hirtelen szívhalállal (HszH) járó szindróma formájában [Brugada and Brugada; 1992]. Az elmúlt 30 évben a tudomány fejlődésével egyre nagyobb betekintést nyertünk ezen entitás molekuláris és genetikai hátterébe, súlyos következményeinek köszönhetően pedig egyre több klinikai és alapkutatás témájává vált. A Brugada-szindróma prevalenciája meglehetősen alacsony, minden 10.000 egyénből nagyjából 1-5 érintett, az összes hirtelen szívhalálon átesett beteg körülbelül 4%-a szenved ebben a betegségben. A strukturálisan ép szívű, hirtelen szívhalált halt populációban a prevalencia sokkal magasabb, megközelíti a 20%-ot, ezáltal ebben az alcsoportban a BrS a halálos szívritmuszavarok leggyakoribb oka [Antzelevitch és mtsai., 2005]. A betegség prevalenciája regionális különbségeket is mutat, leggyakoribb Ázsiában, majd ezt követi Európa és az Egyesült Államok. A diagnosztizált esetek 80-90%-a férfiakat érint, a fenotípusos megjelenés pedig összefügg az életkorral, bizonyos ritka eseteket kivéve a betegség mindig felnőtt korban jelentkezik [Antzelevitch és mtsai., 2005; Chen and Priori, 2008; Juang and Horie, 2016]. A BrS miatt hirtelen szívhalált halt betegek átlag életkora 41 év, a halálos kimenetelű szívritmuszavarok gyakrabban jelentkeznek az éjszakai órákban, alvás közben, illetve provokáló tényező lehet a lázas állapot, különböző nátrium-csatorna blokkoló gyógyszerek és a fokozott vagotóniával járó állapotok. Figyelembe véve az alacsony prevalenciát és a súlyos klinikai kimenetelt, a BrS továbbra is egy meglehetősen aluldiagnosztizált kórkép.

1.4.1. Brugada-szindróma – genetikai háttér, patofiziológia

Több, mint 10 különböző génben talált eltéréseket hoztak már összefüggésbe Brugada-szindrómával, ezek közül a leggyakoribb az SCN5A, mely a s található gyors, feszültségfüggő nátrium csatona ($\text{Na}_v1.5$) primer alfa alegységét kódolja. A genetikailag feltérképezett Brugada-szindrómás betegek nagyjából 10-30%-ában megtalálható az SCN5A gén valamely funkció vesztő mutációja, melyet autoszomális domináns öröklésmenet jellemez [Wang és mtsai., 1996; Juang and Horie, 2016]. A változó expresszivitás és inkomplett penetrancia miatt egy patogén mutáció különböző egyéneken eltérő klinikai lefolyású és súlyosságú kórképet okozhat. A tudomány jelen állása alapján több, mint 300 különböző SCN5A mutációt azonosítottak Brugada-szindrómás betegekben, melyek a $\text{Na}_v1.5$ fehérje bármely strukturális egységét érinthetik. Ezek döntő többsége funkcióvesztéses mutáció (LOF – loss-of-function) melyek eredményezhetik a plazmamembránban elérhető $\text{Na}_v1.5$ fehérjék számának-, illetve a csatornán átfolyó ionáram mennyiségének a csökkenését, illetve módosíthatják a fehérje kapuzási paramétereit, aktivációs és inaktivációs kinetikáját és ezek feszültségfüggését is [Antzelevitch and Nof, 2008; Zimmer and Surber, 2008; Kapplinger és mtsai., 2010]. A $\text{Na}_v1.5$ csatornák funkcióvesztésének következményeképpen csökkent az akciós potenciál (AP) során a sejtbe beáramló Na^+ áram mennyisége, ami az AP felszálló szárának lassulásához vezet (6. ábra). Kísérleti modellezés alapján a $\text{Na}_v1.5$ funkció összefüggést mutat a környezet hőmérsékletével, ami még kifejezettebbé válik a különböző LoF SCN5A mutáns csatornák esetében [Keller és mtsai., 2005], ami magyarázatul szolgálhat a lázas állapot indukálta hirtelen szívhalál bekövetkezésére a BrS betegpopulációban. Az aritmogenezis pontos mechanizmusa ezen kórképben a mai napig vita tárgyát képezi a szakértők körében. A legszélesebb körben elfogadott mechanizmus szerint a $\text{Na}_v1.5$ diszfunkció következtében a Na^+ konduktancia csökkenésének következtében az AP felszálló szárának meredeksége csökken, ez pedig a pitvari és kamrai ingerületvezetés lassulásához, illetve endo-epicardiális potenciálkülönbség

kialakulásához és a jobb kamrai aktiváció késéséhez vezet (6. ábra). A fenti mechanizmusok eredményeképpen specifikus EKG eltérések jönnek létre: 1.) az ingerületvezetés lassulása a PQ-szakasz nyúlásához és QRS szélesedéséhez vezethet. 2.) az endo-epicardiális potenciál különbség és a jobb kamrai aktiváció késésének következményeképp V1-2 elvezetésekben jobb Tawara-szár blokk (JTSZB) morfológia és háztetőszerű ST-eleváció látható. 3.) A depolarizáció lassulása a jobb kamra kiáramlási traktusban – right ventricular outflow tract (RVOT) a legkifejezettebb, itt a repolariáció és depolarizáció iránya megegyezővé válik, az EKG-n negatív T-hullámokat okozva a V1-2 elvezetésekben [Coronel és mtsai., 2005; Postema és mtsai., 2008] (6. ábra).



6. ábra: A beáramló Na⁺-áram csökkenése és a következményes változások az egyedi Na⁺ ionáramban, a kardiális akciós potenciálban és a felszíni EKG-n BrS betegek esetében [Mizusawa és mtsai.,2012].

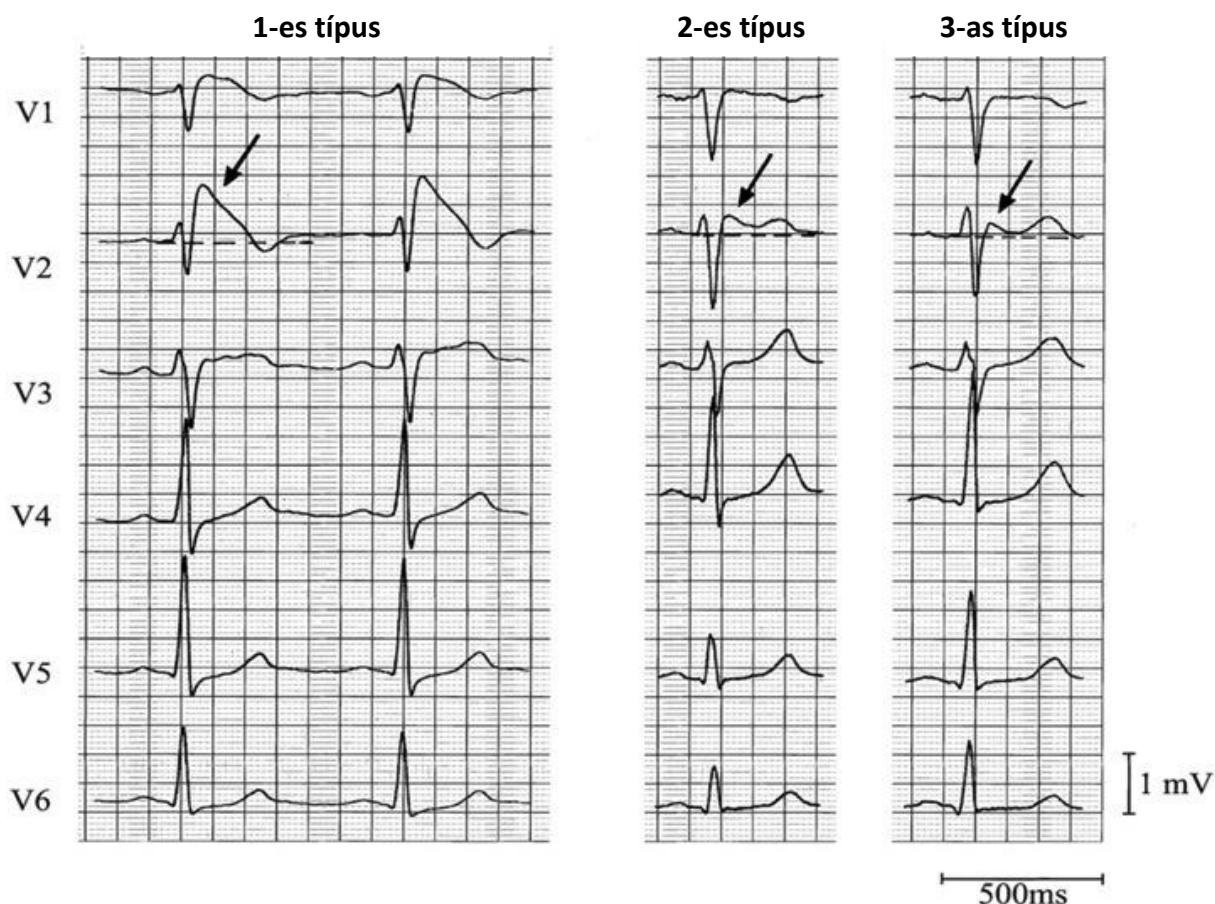
1.4.2. Brugada-szindróma – klinikai manifestáció

A Brugada-szindróma klinikailag leggyakrabban prodróma nélküli eszméletvesztés és hirtelen szívhalál formájában manifesztálódik, mely leginkább gyors, polimorf kamrai tachycardia (VT) és kamrafibrilláció (VF) következménye. A tartós kamrai ritmuszavarokat

legtöbb esetben rövid kapcsolási idejű kamrai extraszisztolé (VES) indítja, az első ilyen epizódot a betegek általában 30 és 50 éves kor között szenvedik el, ritka kivételektől eltekintve [Krahn és mtsai., 2022]. A diagnózis felállításának idején a betegek 1/3-a legalább egy alkalommal szenvedett el eszméletvesztést, 2/3-a pedig panaszmentes volt. A BrS a betegek 4%-ában a hirtelen szívhalál elszenvedését követően kerül felfedezésre, ezen súlyos klinikai kimenetel létrejöttére hajlamosít a lázas állapot, a nagy mennyiségű étel- és alkohol fogyasztás, illetve bizonyos nátriumcsatorna blokkoló gyógyszerek. A kamrai ritmuszavarok mellett a BrS betegpopulációban a pitvari tachyaritmiák előfordulása is magasabb, ezen betegek körülbelül 10%-ában alakul ki élete folyamán valamilyen szupraventrikuláris tachycardia [Krahn és mtsai., 2022]. Mivel a nátrium-csatornák kulcsfontosságú szerepet játszanak az exctiációban és kontrakcióban, nem meglepő, hogy az SCN5A pozitív egyéneknél és családokban BrS mellett egyéb entitások is jelen lehetnek, melyeket ún. „overlap szindrómának” nevezünk: hosszú-QT szindróma, sick-sinus szindróma, pitvarfibrilláció és különböző atrio-ventrikuláris- és intraventrikuláris ingerületvezetési zavarok [Makiyama és mtsai., 2005; Meregalli és mtsai., 2009].

1.4.3. Brugada-szindróma – diagnózis

Brugada-szindrómás betegeknél 3 típusos EKG eltéréssel találkozhatunk, melyek közül az 1-es típusú Brugada-jel diagnosztikus a betegségre nézve: 2 mm-t elérő vagy meghaladó, háztető-szerű ST eleváció és negatív T-hullám jelenléte az EKG jobb precordiális elvezetéseiben (V1-2), melyek a jobb kamra kiáramlási traktust (RVOT) reprezentálják (7. ábra) [Chen and Priori, 2008].



7. ábra: *Brugada-szindrómában szenvedő betegeknél megfigyelt EKG-eltérések [Antzelevitch és mtsai., 2005]. A nyilak az 1-es, 2-es, illetve 3-as típusú Brugada-jelre mutatnak.*

A betegség diagnózisa sokat fejlődött az elmúlt évtizedekben. Korábban a spontán, vagy provokáció hatására kialakuló I. típusú Brugada-jel jelenléte egyet jelentett a BrS diagnózisával. Napjainkban az újonnan publikált Shanghai-pontszám alapján állítható fel a diagnózis, amely az EKG eltéréseken kívül figyelembe veszi a klinikai tüneteket, családi anamnesist és a genetikai eredményt is [Krahn és mtsai., 2022]. A spontán I. típusú BrS EKG továbbra is diagnosztikus a betegségre nézve, azonban a provokáció hatására kialakuló Brugada-jel esetében további diagnosztikus lépésekre van szükség [Krahn és mtsai., 2022]. A jobb kamra kiáramlási pálya (RVOT) anatómiai lokalizációjának egyéni variációi miatt a 12 elvezetéses EKG vizsgálat szenzitivitása akár 1.5-szörösére is növelhető a V1-2 elvezetések magasabbra, második vagy harmadik bordaközbe való áthelyezésével. Tekintettel a fenti EKG eltérések dinamikus fluktuáló megjelenésére, a nátriumcsatorna-blokkoló gyógyszerekkel

végzett provokációs teszt egyre nagyobb szerepet kap a betegség diagnózisában. Korábban már leírták, hogy az egészséges kontrollhoz képest BrS betegeknel bizonyos nátrium-csatorna blokkoló gyógyszerek képesek provokálni a típusos ST-T eltéréseket [Miyazaki és mtsai., 1996], ennek megfelelően ezt a diagnosztikus lépést ajánlott elvégezni azon betegek esetében, akiknél spontán II. vagy III. típusú Brugada-jel látható az EKG-n, illetve azon egyéneknél is, ahol a klinikai tünetek és családi anamnézis alapján megalapozott a gyanú a BrS jelenlétére. A világon legjobban elterjedt gyógyszerek ilyen célra a Vaughan Williams klasszifikáció alapján Ia típusú ajmalin és prokainamid, illetve az Ic típusú flekainid és pilsicanidine. Amennyiben spontán vagy provokáció hatására I. típusú BrS-jel látható az EKG-n, javasolt genetikai vizsgálatot is elvégezni a betegségre jellemző, potenciálisan örökletes genetikai variánsok detektálásának céljából, bár az inkomplett penetrancia miatt egyazon genetikai eltérést hordozó családtagok esetében csak körülbelül 50%-ban alakulnak ki klinikai tünetek [Juang és mtsai., 2016]. Mindezeket figyelembe véve a genetika pozitivitás nem jelent egyet a BrS diagnózisával, és az elsőfokú rokonok szűrésében a genetikai vizsgálaton kívül nagy szerepet kap a klinikai utánpótlás is. Végül, de nem utolsó sorban, szívultrahang vizsgálattal a strukturális szívbetegségek kizárása is nélkülözhetetlen a diagnózis felállítása során, bizonyos komplex esetekben szív MR szükségessége is felmerül az RVOT régió strukturális és funcionális megítélésére [Krahn és mtsai., 2022].

1.4.4. Brugada-szindróma – terápia

A Brugada-szindrómában szenvedő betegek kezelésében jelenleg 4 fő modalitást különböztetünk meg: életmódbeli tanácsok, gyógyszeres kezelés, eszközös kezelés, katéterablatio és ezek kombinációja. Ezen terápiás alternatívákat mindig egyénre szabottan, megfelelő rizikóbecslést követően határozzuk meg. Minden betegnél fontos a gyors és hatásos lázcsillapítás, nagy mennyiségű alkohol és kábítószer fogyasztás kerülése. A betegek és kezelőorvosaik figyelmét érdemes felhívni a BrS-ra jellemző EKG eltéréseket és

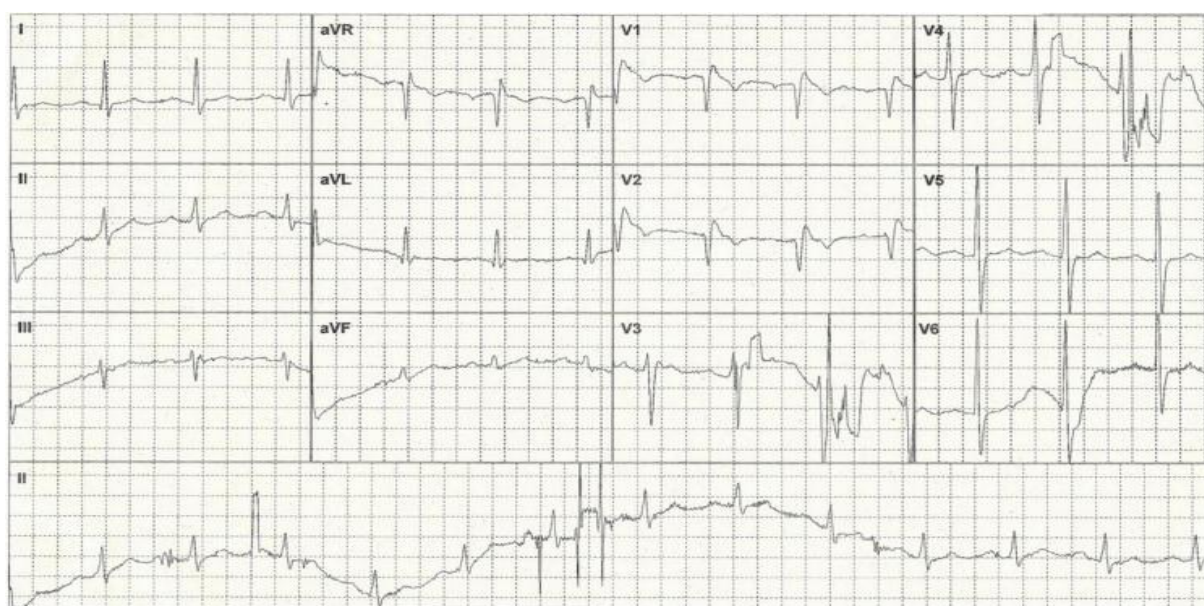
ritmuszavarokat provokáló gyógyszerek kerülésére (<https://brugadadrugs.org>), illetve a metabolikus eltérések mielőbbi korrekciójára (acidózis, hypo és hyperkalaemia). Az eszközös kezelés ebben a betegcsoportban a beültethető kardioverter defibrillátor – implantable cardioverter defibrillator (ICD) implantációját jelenti. Az ICD egy speciális pacemaker, amely képes felismerni a potenciálisan életveszélyes kamrai ritmuszavarokat és azokat fájdalommentesen felülvezérelni, ennek sikertelensége esetén pedig elektromos shock leadásával megszüntetni. ICD beültetése történhet ún „szekunder prevenció” indikációval azon BrS betegeknél, akik tartós kamrai ritmuszavaron vagy hirtelen szívhalálon estek át, illetve ún. „primer prevenció” indikációval azon betegeknél, akiknek még nem volt dokumentált aritmia eseményük, de ennek a kockázata magas. Az ajánlás primer prevenció ICD beültetését jelenleg azon betegek esetén javasolja, akik spontán vagy provokált I. típusú Brugada-jellel rendelkeznek és típusos kardiális eszméletvesztésen estek át [Krahn és Mtsai., 2022]. A primer prevenció ICD beültetése mindig alapos rizikófelbecslést követően, egyedi mérlegelés alapján kell történnie. A gyógyszeres kezelés szempontjából korlátozottak a lehetőségek, az egyetlen bizonyítottan hatásos szer az aritmia megelőzésre a Kinidin (VW Ia szer), amely nátriumcsatorna gátlás mellett feszültségkapuzott kálium csatorna blokkoló hatással is rendelkezik, ezáltal az akciós potenciál leszálló szárának meredeksége csökken, így a refrakter fázis nyújtásával éri el antiaritmiás hatását. Évtizedekkel ezelőtt széles körben alkalmazták elsősorban pitvarfibrilláció kezelésére, azonban szedése mellett nem ritkán kialakuló proaritmia (Torsades de Pointes) miatt klinikai használata visszaszorult. Elsősorban ICD beültetés kontraindikációja, illetve visszatérő ICD shock leadását igénylő kamrai ritmuszavarok előfordulása esetén alkalmazzuk. Terápia refrakter elektromos vihar esetén BrS betegeknek a katekolamin Izoproterenol alkalmazása is megfontolandó [Krahn és Mtsai., 2022]. Azon betegeknek, akiknél megfelelő gyógyszeres és eszközös kezelés ellenére is gyakran visszatérő, ICD shock leadását igénylő aritmia epizódok fordulnak elő, katéterablatio elvégzése is szóba

jön. Ezen invazív beavatkozás célja a jobb kamra kiáramlási pályában (RVOT) található epikardiális aritmia szubsztrát radiofrekvenciás energia leadásával történő roncsolása. Amennyiben katéterablatiot követően nátriumcsatorna blokkoló gyógyszer adásával a korábban jelen lévő Brugada-jel már nem provokálható, a beavatkozást sikeresnek tekintjük. A kamrai ritmuszavarok triggerként szolgáló, korai kapcsolási idejű kamrai extra ütések (VES-ek) endokardiális radiofrekvenciás ablatiójával a hosszú távú sikeresség tovább növelhető [Krahn és mtsai., 2022]. A Brugada-szindrómás betegek esetében a megfelelő terápiás modalitás megválasztása mindig egyéni elbírálás alapján, megfelelő rizikóbecslést követően kell történni.

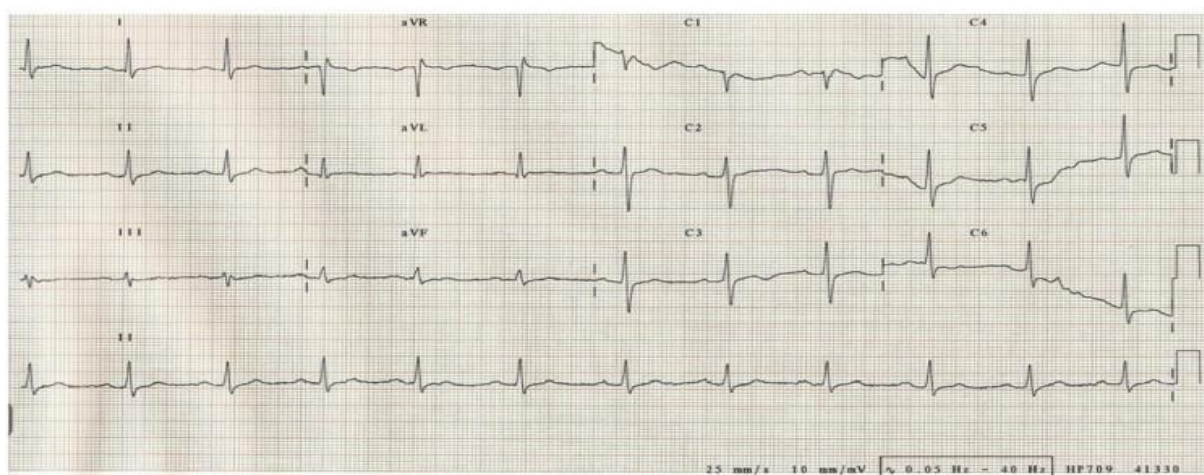
1.5. Brugada-szindróma – esetismertetés

Vizsgálatunk középpontjában egy 41 éves férfibeteg áll, akit mellkasi fájdalom miatt esetkocsi referált klinikánk felé, sürgős koronária intervenció céljából. Az eset klinikai részletei már publikálása kerültek [G. Sándorfi és mtsai., 2013], így itt csak a legfontosabbakra térek ki. Az esetkocsi által küldött transztelefonikus EKG-n (TTEKG) a korábban részletezett I. típusú Brugada-jel volt látható (9. ábra A), mely a beteg érkezésekor készített 12 elvezetéses EKG-n már nem volt megfigyelhető (9. ábra B). Laborokban korrekciót igénylő ioneltérés nem volt látható, a szívizomkárosodásra utaló biomarkerek szintje több mérés során is normál tartományban volt. Szívultrahang vizsgálat megtartott bal kamra pumpafunkciót mutatott szegmentális falmozgászavar nélkül, CT angiográfiás vizsgálattal aorta disszekció és tüdőembolia is kizárásra került, így a dinamikus EKG eltérések hátterében BrS gyanúja merült fel. A beteg kórtörténetéből gyermekkor óta visszatérő eszméletvesztéses epizódok emelhetők ki, mely miatt több alkalommal történt elektroencefalográfia (EEG), negatív eredménnyel. A beteg számára több különböző antiepileptikum került felírásra az elmúlt 25 évben, azonban a kezelés ellenére évente 5-10 alkalommal, főleg az éjszakai órákban, a beteg görcsrohammal járó eszméletvesztéses epizódokat szenvedett el. Invazív szívelektrofiziológiai

vizsgálat során 400 mg intravénás prokainamid adásával, illetve jobb kamrából végzett programozott extrastimulációval egyaránt gyors, spontán szűnő, polimorf kamrai tachycardia (VT) volt indukálható, a gyógyszer adását követően pedig I. típusú Brugada-jel jelent meg a 12 elvezetéses EKG-n (10. ábra), alátámasztva ezzel a BrS diagnózist. Figyelembe véve a beteg kórtörténetét, felmerült, hogy a gyermekkor óta visszatérő eszméletvesztéses epizódok valójában a megfigyelt spontán szűnő kamrai ritmuszavarok következményei, így beültethető kardioverter defibrillátor (ICD) kezelés mellett döntöttünk. A beültetést követően eszméletvesztései továbbra is előfordultak, ezek alatt az ICD azonban ritmuszavart nem rögzített. Ennek fényében a Brugada-szindróma klinikai jellemzőinek jelenléte ellenére a több évtizede ismétlődő rosszullétek hátterében agyi elektromos betegség, az epilepszia állhat.

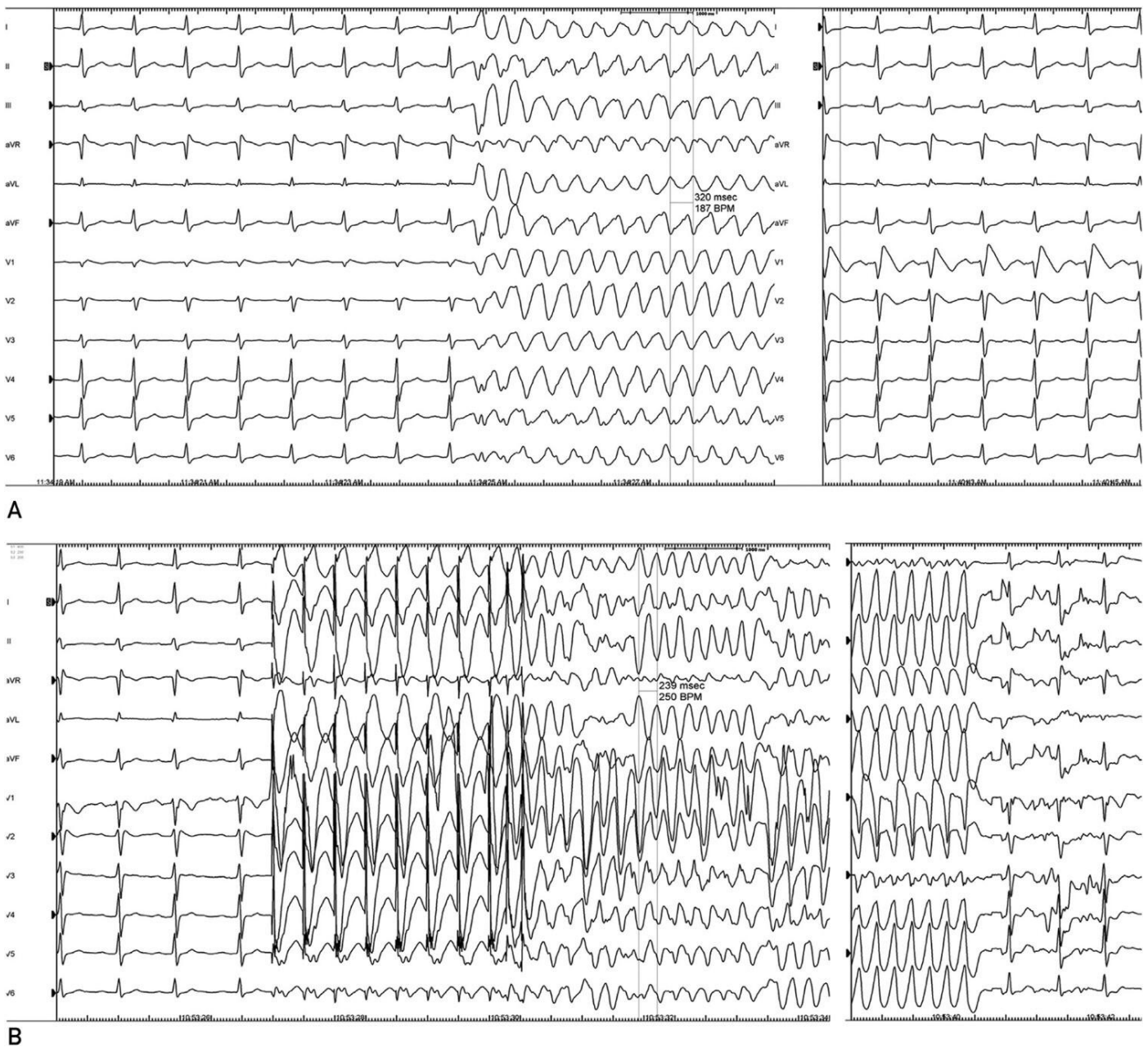


A



B

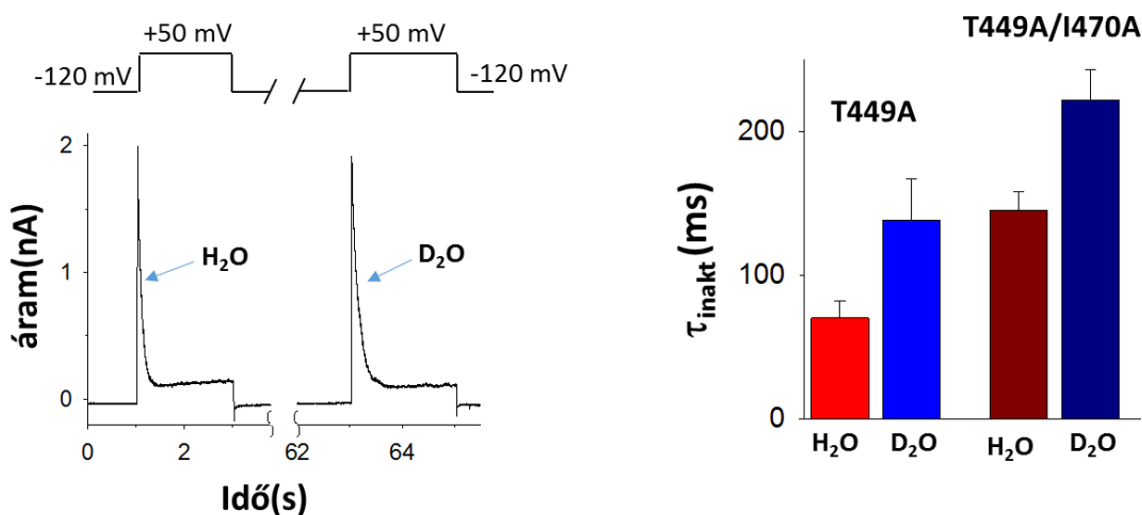
9. ábra: (A) Az esetkocsi által küldött transztelefonikus EKG (TTEKG), melyen I. típusú Brugada-jel látható. (B) A beteg érkezésekor készült 12 elvezetéses EKG, melyen a Brugada-jel már nem látható



10. ábra: 12 elvezetéses EKG regisztrátum a beteg invazív szívelektrofiziológiai vizsgálata során. (A) Az intravénásan adott 400 mg prokainamid (11:34:25 AM) hatására gyors kamrai tachycardia lép fel, majd termináció után I. típusú Brugada-jel jelenik meg a V1-2 elvezetésekben. (B) A jobb kamrából végzett programozott extrastimuláció (10:53:30 AM) hatására gyors (250/min), polymorph VT lép fel.

1.6. Nyitott kérdések, dilemmák a C-típusú inaktivációval és a Brugada-szindróma klinikumával kapcsolatban

A bevezetőben említett, szelektivitási filter mögötti régióban lévő „inaktivációs vízmolekulák” jelenlétének bizonyítására korábban munkacsoportunk a nehézvíz inaktivációra kifejtett hatását vizsgálta (8. ábra, Tibor G. Szántó; Szabolcs Gaál és mtsai., 2021). Bizonyítást nyert, hogy a nehézvíz lassítja ezen csatornák inaktivációját, illetve különböző klónokat használva a hatás nem marad el, tehát mutációfüggetlen, azonban a pontos mechanizmus még nem bizonyított.



8. ábra: A nehézvíz hatása Shaker-IR csatornák inaktivációs kinetikájára (I/O konfiguráció)

A Brugada-szindróma klinikai lefolyása és prognózisa betegenként rendkívül nagy változatosságot mutat, így a patogén SCN5A mutációk azonosítása és biofizikai karakterizálása kulcsfontosságú a ritmuszavarok kialakulásának megértéséhez ezen betegpopulációban. Az újonnan felfedezett patogén mutációk és klinikai lefolyás közötti kapcsolat feltárása hasznos gyakorlati információkat szolgáltat a betegek rizikóbecslése során, illetve a mutáns Nav1.5 fehérje szerkezeti és funkcionális eltéréseinek ismerete elősegítheti új és hatékonyabb terápiás alternatívák kifejlesztését SCN5A channelopátiákban szenvedő betegek számára.

2. Célkitűzés

A nehézvíz inaktivációt lassító specifikus hatásainak kimutatása közvetlen árammérésekkel gyakorlatilag lehetetlen, ezért indirekt bizonyítási stratégiát választottunk. Azáltal, hogy kizárjuk a nem specifikus hatásokat, indirekt módon próbáltuk bizonyítani a specifikus hatások érvényesülését. Shaker-IR csatornákon végzett kísérleteim célja igazolni, hogy a nehézvíz nem a normál vízhez képest nagyobb viszkozitása miatt fejt ki az inaktivációt lassító hatását. A viszkozitás hatásának tanulmányozására glicerín, illetve szacharóz jelenlétében végeztem celluláris elektrofiziológiai méréseket.

Ezt követően transzlációs jellegű vizsgálatokat végeztem, melynek célja egy sajátos klinikai jellemzőket mutató, Brugada-szindrómával diagnosztizált beteg genetikai vizsgálata során egy SCN5A mutáció (R893C) detektálása, majd ezen mutáns Na_v1.5 csatornák teljes strukturális és funkcionális karakterizálása, ezáltal a patogénnek vélt mutáció és ioncsatorna működés közötti összefüggés bizonyítása volt. Az R893C mutáció karakterizálása során széles körben vizsgáltam az érintett beteg és családtagjainak klinikai jellemzőit, a mutáns csatorna szerkezeti változásait, illetve funkcionális eltéréseit patch-clamp technikával végzett elektrofiziológiai és farmakológiai vizsgálatok által.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Etikai engedély

Kutatásunk összhangban áll a Helsinki Nyilatkozatban rögzített etikai irányelvekkel és jóváhagyásra került az Országos Tisztifőorvosi Hivatal és a Debreceni Egyetem helyi Etikai Bizottsága által. A vérminták levétele minden esetben szóbeli és írásbeli tájékoztatást követően, írásos beleegyező nyilatkozat aláírása után történt.

3.2. Genetikai analízis

A genetikai elemzést teljes genom szekvenálással végeztük, amelyet a Novogene (Cambridge, UK) hajtott végre. Az adatelemzés Genom Analysis Toolkit (GATK pipeline) segítségével történt. Az észlelt lehetséges patogén variáns (SCN5A R893C) megerősítésre került Sanger szekvenálással a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing készlet (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segítségével, a gyártó protokollja szerint.

3.3. Célzott mutagenézis

A vad típusú (WT) humán SCN5A (Uniprot referencia: Q14524-1) gén először alklónozásra került és N-terminális GFP-jelölést kapott [vektor: pcDNA3.1/Zeo (+)]. Ezt a konstruktot H. Abriel biztosította számunkra (University of Bern, Svájc). A vizsgálataim középpontjában álló R893C és R893H Na_v1.5 mutációk célzott mutagenézissel, ún. „overlap extension” PCR segítségével készültek. Az R893C mutációt az UD-GenoMed Kft. (Debrecen, Magyarország) végezte el és a mutáns klónt direkt szekvenálással erősítették meg.

A mutáns DNS-fragmentumot az EcoRI és KpnI restrikciós enzimek segítségével illesztettük be a humán WT-Na_v1.5 csatornát kódoló plazmidba. A mutáns klón direkt szekvenálásával ellenőriztük a kívánt mutáció jelenlétét és más variációk hiányát.

3.4. A T449A és I470A mutáns Shaker-IR feszültségfüggő káliumcsatornák

Az IR rövidítése az „Inactivation Ball Removed” kifejezésnek. Ez azt jelenti, hogy a vad típusú Shaker csatornáról eltávolításra kerültek az N-típusú inaktivációért felelős 6-46-os pozícióban lévő aminosavak, így nem található meg a fehérjében az „inaktivációs labda”. Így azonban az inaktiváció annyira lassúvá válna, hogy nehézkes lenne dolgozni vele. Ezért ezen a módosításon kívül az általam felhasznált csatornában található egy vagy két C-típusú inaktiváció kinetikáját befolyásoló mutáció. A 449-es pozícióban lévő treonin cseréje alaninra, amely gyorsítja a C-típusú inaktivációt, ezáltal az egy néhány másodperces időablakban kényelmesen vizsgálhatóvá válik. Az általam használt másik mutáns ezen a változtatáson kívül tartalmaz még egy 470-es pozícióban lévő izoleucin-alanin cserét is. A továbbiakban ezekre a csatornákra úgy fogok hivatkozni, mint T449A, illetve T449A/I470A mutánsok.

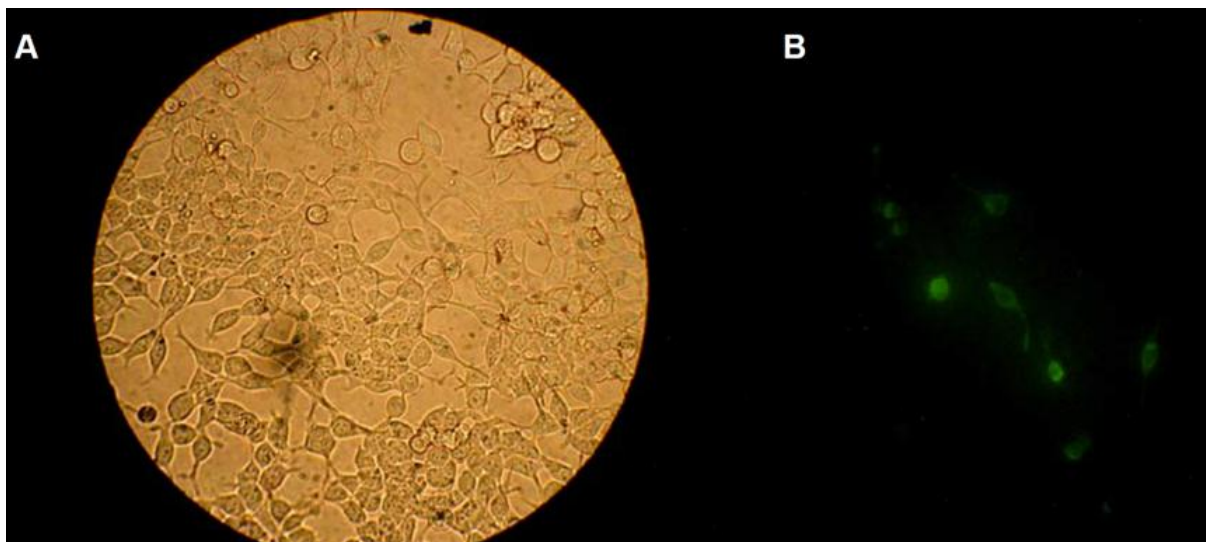
3.5. Sejtkultúrák és transzfekció

A vizsgálataim során használt kínai hörcsög ovárium (CHO) és humán embrionális vesesejteket (HEK) magas glükóz tartalmú tápoldatban tenyésztettem (10% FBS, 2 mM L-glutamin, 100 U/ml, penicilin-G, és 100 µg/ml streptomycin). A sejtek tenyésztése 37°C-os, 5% CO₂ -ot és 95%-os páratartalmat biztosító termosztátban, 25 cm²-es tenyésztőflaskában történt. A sejteket hetente kétszer passzáltam. A letapadó sejteket a passzálás során 5 percig tartó 0,2 g/L EDTA-t tartalmazó PBS oldattal történő inkubációval választottam le a tenyésztőflaska aljáról. A transzfekciót megelőző napon a sejteket 60x15 mm-es Petri-csészékbe helyeztem, hígítási sort készítve. Másnap a transzfekcióhoz mindig egy 50-75 %-os konfluenciájú Petri-csészét választottam. A Shaker-IR csatornákon végzett mérésekhez a sejteket Ca-foszfát precipitációs módszerrel ko-transzfektáltam a T449A, illetve T449A/I470A mutáns ioncsatornát kódoló plazmiddal (10 µg), illetve EGFP plazmiddal (1 µg). A Na_v1.5 mérésekhez a sejteket az N-terminális GFP tagget tartalmazó vad típusú humán Na_v1.5 (WT-Na_v1.5_{GFP}), az N-terminális GFP tag nélküli vad típusú humán Na_v1.5 (WT-Na_v1.5), illetve R893C vagy R893H mutációt tartalmazó, N-terminális GFP taggelt humán Na_v1.5 (R893C-

Na_v1.5_{GFP} / R893H-Na_v1.5_{GFP}) csatornát kódoló plazmiddal tranziensen transzfektáltam, melyhez Lipofectamine 2000 kit-et használtam a gyártó protokollja szerint (Invitrogen, Carlsbad, CA). Az elektrofiziológiai méréseket mindig a transzfekciót követő 24-36 órás időablakban végeztem el. A transzfekciót követően a sejteket 35 mm átmérőjű, a folyamat előtt egy órával előzetesen poly-L-ornitinnel kezelt, majd desztillált vízzel átmosott Petri-csészékbe helyeztem, 2 ml tápoldat kíséretében. Közvetlenül a mérés megkezdése előtt az adott Petri-csészében levő sejteket kétszer 1 ml külső oldattal (150 mM NaCl, 2 mM KCl, 1,5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES; pH= 7,38) mostam, majd végül a sejteket 2 ml külső oldatban inkubáltam. A sejtek tenyésztése során, illetve a transzfekcióhoz Sigma Aldrich gyári készítményeket használtam (Sigma Aldrich, Budapest, Magyarország).

3.6. Fluoreszcens és konfokális mikroszkópia

Fluoreszcens mikroszkópos méréseknél az EGFP pozitív transzfektált sejtek azonosításához Nikon Eclipse TS-100 fluoreszcens mikroszkópot (Nikon, Tokyo, Japan) használtam. Az excitációs szűrő a 455-495 nm-es, az emissziós szűrő az 515-555 nm-es hullámhossz tartomány számára volt átjárható. A transzfekciós protokoll biztosította, hogy az EGFP pozitív sejtek több, mint 60%-a kifejezte a transzfektált mutáns ioncsatornát a mérési időszámban. Az elektrofiziológiai méréshez mindig olyan sejtet igyekeztem választani, amely fluoreszcens jelet ad, a többi sejttől valamelyest elkülönül, illetve letapadt sejtekre jellemző nyúlványos morfológiát mutat (11. ábra).



11. ábra: *Fluoreszcens mikroszkópos kép a sejtekről áteső fényben (A), illetve epifluoreszcens megvilágítással (B)*

A konfokális mikroszkópos vizsgálatokhoz a CHO sejteket 24 órával a transzfekció előtt egy 8-kamrás fedőlemezre (7 000 sejt/kamra, ibidi GmbH, Gräfelfing, Németország) helyeztük. 0,4 µl FuGene HD (Promega, Madison, WI) és kamráként 120 vagy 140 ng DNS szérum- és fenolvörös-mentes Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) oldatban került hozzáadásra a sejtekhez. A sejtekés mtsaiea Fluor™ 647 NHS (szukcinimidil) észterrel jelöltük meg, amelyet 1× TBS-ben (Tris-pufferolt sóoldat; 25 mM Tris–HCl, 150 mM NaCl, pH = 7,5) oldottunk fel a mérések előtt 20 perccel jégen. A konfokális mikroszkópos mérések 48 órával a jelölést követően történtek szobahőmérsékleten. A konfokális képeket A1 típusú konfokális mikroszkóppal készítettük (Nikon, Tokió, Japán). A GFP és az Alexa Fluor™ 647 NHS-észter fluoreszcens intenzitása alapján a jelek átfedő területeit az ImageJ szoftver Intensity Plot Profile eszközének segítségével értékeltük. Az intenzitásértékeket a maximális intenzitáshoz viszonyítva normalizáltuk.

3.7. Celluláris elektrofiziológia

Az elektrofiziológiai méréseket patch-clamp technika segítségével végeztem, Nav1.5 esetében teljes sejt-, Shaker-IR esetében pedig döntően outside-out konfigurációban.

mérésekhez Axopatch 200B patch-clamp erősítőt (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) használtam, feszültség-zár üzemmódban, amely biztosította a vizsgált sejt membránpotenciáljának állandó értéken tartását, miközben a sejtmembránon átfolyó áram nagysága meghatározható. A mérések során Burleigh PCS5000 (Thorlabs Inc., Newton, New Jersey, USA) mikromanipulátort használtam. Az ingerlő feszültség-impulzusokat és az adatgyűjtést személyi számítógép vezérelte Axon Digidata 1550A (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, USA) illesztőegységen keresztül a GraphPad Prism 8 (GraphPad, CA) és pCLAMP10 programcsomag (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, USA) segítségével. Az áramgörbéket 3 pólusú Boxcar szűrővel szűrőztem. A tartófeszültség általában -120 mV volt, a soros ellenállásból fakadó hibák 70-80%-át elektromos kompenzációval küszöbölem ki, az elfogadható soros ellenállás felső határértéke 15 M Ω volt. Amennyiben az adott tartófeszültségen az ún. szivárgási áram nagysága meghaladta a maximális áramerősség 10%-át, a mérést elvettem. A nátriumáram mérések során online szivárgási korrekciót végeztem P/4 szubsztrakcióval. A mintavételezési frekvenciát az aktuálisan alkalmazott feszültségprotokollnak megfelelően állítottam be. A mikropipettákat GC150F-7.5 boroszilikát üvegapillárisokból (Harvard Apparatus Co., Holliston, MA) 4 fázisban készítettem a Flaming Brown automata pipettahúzó segítségével (Sutter Instruments, San Rafael, CA). A pipettahegy átmérője 0.5-1 μ m, ellenállása az alkalmazott oldatok esetén 2-8 M Ω volt. A méréseket minden esetben szobahőmérsékleten (20 - 24°C) végeztem.

3.7.1. Felhasznált oldatok és perfúziós rendszer

A Shaker-IR mérésekhez a pipettában lévő intracelluláris oldat (ICS) egy 150 mM K⁺ -ot tartalmazó belső oldat volt (105 mM KF, 35 mM KCl és 10 mM HEPES, pH = 7.36 – 7.38). A perfúziós rendszer által a sejtekre vezetett nátrium alapú külső oldat (ECS) pedig 5 mM K⁺ -ot tartalmazott (150 mM NaCl, 2 mM KCl, 1,5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ és 10 mM HEPES, pH = 7.36 – 7.38). A kísérleteimhez felhasználtam ezen kontroll külső ECS oldatot, illetve

ennek az 5- vagy 10 tömegszázalék (%(m/m)) glicerint, vagy 10 tömegszázalék szacharózt tartalmazó változatát. A méréseimhez felhasznált külső oldat normál víz, illetve nehézvíz alapú volt, ezek pontos viszkozitás értékeit az 1. táblázatban foglaltam össze. Az eredményeim ismertetésekor külön fel vannak tüntetve azok a mérések, amelyek nehézvízes környezetben készültek. A teljes-sejt konfigurációban végzett $\text{Na}_v1.5$ mérések esetén az ECS összetétele a következő volt: 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES és 5.5 mM glükóz. Az endogén K^+ áramok kiküszöbölésének céljából a ICS ezen méréseknél Cs^+ -alapú: 10 mM NaCl, 105 mM CsF, 10 mM HEPES és 10 mM EGTA ($\text{pH} = 7.2$, CsOH-al titrálva), ozmolaritása pedig 295 mOsm/L volt. Az extracelluláris oldatokat egy a gravitáció által hajtott, mikroperfúziós rendszer segítségével vezetem az adott sejtre/kitépelt patchre, 0.2-0.5 ml/perces ütemben, folyamatos elszívás biztosítása mellett. A tetrodotoxin (TTX), 1.4-dithiotreitol (DTT) és prokainamid tartalmú külső oldatok a mérést megelőzően frissen készültek. Az oldatok elkészítése során Sigma Aldrich gyári készítményeket használtam (Sigma Aldrich, Budapest, Magyarország). A vizsgált vegyületek adott koncentrációban kifejtett hatását a normalizált áram (I/I_0) értékkel jellemeztem, ahol I_0 és I rendre a csúcsáramot jelöli a vegyület távollétében, illetve jelenlétében az adott koncentráció mellett. Perfúziós kontrollként használt ECS összetétele a következő volt: 145 mM Kolin-Cl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 5.5 mM glükóz, 2.5 mM CaCl_2 , és 1mM MgCl_2 . Ezen kolin alapú ECS hatására a Na-áram amplitúdójában létrejövő prominens változás jelezte a sikeres transzfekciót és fehérje expressziót, illetve a perfúziós rendszer megfelelő működését.

3.7.2. A Shaker-IR mérések során használt feszültség protokollok

A kísérleteim során úgynevezett „kétlépcsős” protokollt használtam. A kitépelt patchet előbb -120 mV tartófeszültségen tartottam, majd ezt követően egy 2 másodperces, +50 mV membránpotenciál értékre történő depolarizáló impulzus következett. Ezen a membránpotenciál értéken az általam használt mutáns csatornák előzetes biofizikai

karacterizálása alapján az összes csatorna nyitott állapotban van. A depolarizáció után a patchet 45 s-ig -120 mV-os membránpotenciálon tartottam. A következő depolarizáló impulzus előtt 2 másodperccel megtörtént az oldatsere, és az alkalmazni kívánt oldat folyt a kitépett patch-re. Ez a másik oldat a fentebb már említett, kontrollnál nagyobb viszkozitású oldat volt, mivel ez tartalmazta vagy a szacharózt, vagy pedig a glicerint. Az ismételt depolarizációt egy újabb mérés követte a nagyobb viszkozitású ECS oldat környezetében és ezen áramgörbék kerültek később összehasonlításra. Az inaktiváció kinetikai vizsgálatához ezeket a fentebb részletezett, 2 s hosszú depolarizáló impulzusokat alkalmaztam +50 mV-ra, -120 mV-os tartófeszültségről kiindulva. A kifelé irányuló áram gyors aktivációját az áram lecsengése követte, amely a csatornák C-típusú inaktivációjának felelt meg. Az inaktivációs időállandó (τ_i) meghatározásához egy exponenciális függvényt illesztettem az áramgörbék leszálló részére $[I(t) = I_0 \times \exp(-t/\tau_i) + C]$, ahol I_0 az áram inaktiválódó komponensének amplitúdója, τ_i a Shaker csatornák inaktivációs időállandója, és C a depolarizáló impulzus végén megfigyelhető egyensúlyi áram. Egy adott Shaker-IR mutáns esetében legalább $n \geq 4$ sejtet vizsgáltam, és az inaktivációs időállandók átlagértékét használtam az inaktivációs kinetika jellemzésére. Az alábbi táblázatról leolvasható a nehézvíz, illetve a szacharóz/glicerín vízben oldott, 5 és 10

%(m/m)-os elegyének viszkozitása 20°C-on.

D2O	1.245
H2O	1.005
5% glicerín H2O-ban	1.171
10% glicerín H2O-ban	1.31
10% szacharóz H2O-ban	1.336

1. Táblázat: A Shaker-IR kísérletek során alkalmazott oldatok viszkozitás értékei 20°C-on, mPas egységekben

3.7.3. A $\text{Na}_v1.5$ mérések során használt feszültség protokollok

A különböző $\text{Na}_v1.5$ variánsok alapvető biofizikai karakterizálásához teljes-sejt konfigurációban végeztem méréseket. Vizsgáltam a csatornák aktivációs és inaktivációs kinetikáját, az inaktivált állapotból való visszatérés kinetikáját, illetve az egyensúlyi aktiváció és inaktiváció feszültségfüggését. Az aktiváció és inaktiváció vizsgálatához a sejteket 5 másodpercenként -120 mV tartófeszültségről, 15 ms-ig 0 mV-ra depolarizáltam (20 kHz mintavételezési frekvenciával). Az aktiváció kinetikáját a „time-to-peak” változóval értékeltem, amely független az alkalmazott kapuzási modelltől és szintén használatos az aktivációs kinetika jellemzésére (Keller és mtsai., 2005). Az átlagos time-to-peak értékét egy adott sejt esetében 4-5 0 mV-ra depolarizáló impulzus time-to-peak értékeinek átlagaként határoztam meg. Az adott sejtre vonatkozó, pA/pF-ben kifejezett áramsűrűséget úgy határoztam meg, hogy a legalább három, 5 másodpercenként ismételt alkalmazott depolarizáló pulzus során, a megfelelő tesztpotenciálokra mért csúcsáramok átlagát elosztottam a sejt kapacitásával. Amennyiben a depolarizáló impulzust fenntartjuk, $\text{Na}_v1.5$ esetében a gyors aktivációt gyors inaktiváció követi. Az inaktivációs időállandó (τ_i) meghatározásához egy exponenciális függvényt illesztettem az áramgörbék leszálló részére [$I(t) = I_0 \times \exp(-t/\tau_i) + C$], ahol I_0 az áram inaktiválódó komponensének amplitúdója, τ_i az inaktivációs időállandó, és C a depolarizáló impulzus végén megfigyelhető egyensúlyi áram. $\text{Na}_v1.5$ esetén az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggésének meghatározásához a sejteket -120 mV tartófeszültségről -70 és +70 mV közötti tesztpotenciálokra depolarizáltam, 5 másodperces időközönként, 10 mV emelkedéssel (50 kHz mintavételezési frekvenciával). A különböző tesztpotenciálok esetén az aktuális konduktanciát a következő képlettel határoztam meg: $G(V) = I_{\text{peak}} / (V_m - V_{\text{Na}})$, ahol I_{peak} a csúcsáram egy adott tesztpotenciálnál, V_m a tesztpotenciál, és V_{Na} a Na^+ egyensúlyi potenciálja (+68.7 mV, a Nernst-egyenlet, illetve a belső és külső oldat ionösszetétele alapján). A $G(V)$ értékeket ezután normalizáltam a maximális konduktanciára

(G/G_0), és a tesztpotenciál függvényében ábrázoltam a legjobban illeszkedő Boltzmann-függvénnyel ($G/G_0 = 1 / (1 + \exp [-(V_m - V_{1/2}) / s])$), ahol V_m az aktuális tesztpotenciál, $V_{1/2}$ a félaktivációs feszültség és s a függvény meredeksége. Az egyensúlyi inaktiváció feszültségfüggésének (h_∞) meghatározásához a nem-inaktiválódott csatornák frakcióját számoltam ki minden tesztpotenciálnál az I/I_{-120} segítségével, ahol I_{-120} a -120 mV-os tartófeszültségről történő depolarizáció során kapott maximális áramerősség, I pedig az aktuális tartófeszültségről történő azonos depolarizáló impulzus által kiváltott maximális áramerősség. A $V_{1/2}$ és s értékeket az adatpontokra egy Boltzmann-függvény illesztésével határoztam meg. A késői I_{Na} értékeléséhez a 15 ms időtartamú, 0 mV-ra történő depolarizáló impulzusok utolsó 5 ms-a során mért egyensúlyi Na^+ -áramot elemeztem. A TTX-érzékeny késői Na^+ -áram a 0,5 μM TTX jelenlétében és hiányában, azonos időablakban mért egyensúlyi áram értékek különbségeként lett definiálva. Az inaktivált állapotból való visszatérés kinetikájának vizsgálatához -120 mV tartófeszültségről, 0 mV-ra történő, 100 ms hosszúságú depolarizáló impulzuspárokat használtam (20 kHz mintavételezési frekvenciával). Az első impulzus során megmértem az adott csúcsáramot (I_1). Az inaktivációt követően egy ún. „recovery” periódus következett -120 mV tartófeszültségen, melyet interpulzus intervallumként (ipi) definiáltam. Ezt követte az elsővel megegyező, második depolarizáló impulzus, majd ismét megmértem az aktuális csúcsáramot (I_2). Az interpulzus intervallum (ipi) hossza -120 mV tartófeszültségen 0.25 és 60 ms között változott. Az ún. „fractional recovery” (FR) az adott ipi érték mellett a következő képlet segítségével került meghatározásra: $FR = (I_2) / (I_1)$. Az FR vs ipi értékeket egy exponenciális függvénnyel illesztettem, az inaktivált állapotból való visszatérés időállandóját (τ_r) pedig a következő összefüggés alapján számoltam ki: $FR(t) = 1 - \exp(-t/\tau_r)$. A nemlineáris, legkisebb négyzetek illesztését a Levenberg-Marquardt algoritmus segítségével végeztem.

3.8. A fehérjeszerkezet modellezése

A szerkezeti modellezést az emberi Na_v1.5 csatorna krio-elektronmikroszkópos szerkezete alapján végeztük (PDB: 7DTC; Li és mtsai., 2021b). A fentebb említett konzervált régiók, köztük az R893C mutáció és környezete 3,30 Å felbontással sikeresen rekonstruálható volt. A kristályszerkezés mtsaiapján az R893 aminosavat ciszteinre cseréltük az UCSF Chimera X szoftver segítségével (Meng és mtsai., 2023), majd protonálási és energiaminimalizálási lépéseket hajtottunk végre (GAFF erőter alkalmazásával). A feltételezett ligandum–fehérje kölcsönhatásokat a LigPlot programmal ábráztuk (Laskowski és Swindells, 2011).

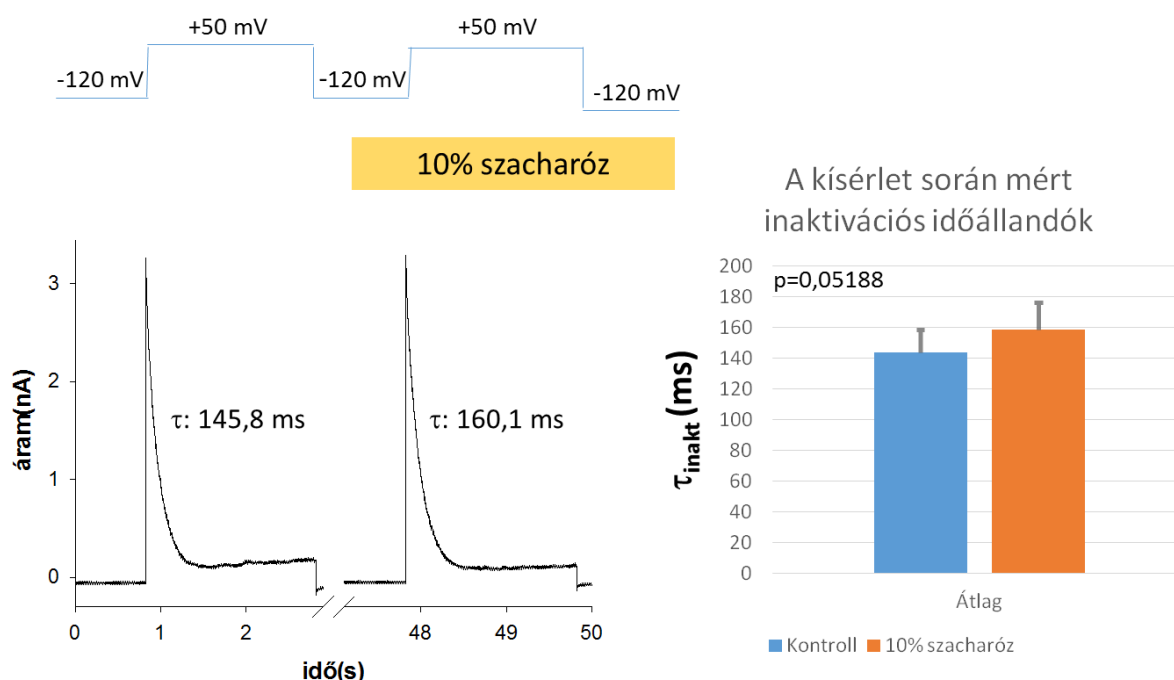
3.9. Adatértékelés és statisztikai elemzés

Az eredmények értékeléséhez a pClamp10 program csomagot használtam (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, USA). A mérés során kapott áramgörbék kiértékelés során először korrigáltam az adott impulzus előtti -120 mV-os tartófeszültség mellett meghatározott ohmikus szivárgási áram értékével. A szövegben feltüntettem a különböző sejtekre vonatkozó mérések számát (n), a mérési adatok közlésénél az adatokat átlag ± SEM formában adtam meg, az egyedi adatpontokat az oszlopdiagramokon jelöltem. A független transzfekciók/biológiai ismétlések száma (n) a kísérletek többségében legalább 4 volt. A mérési eredményeket reprezentáló ábrák szerkesztéséhez, valamint a statisztikai analízishez a GraphPad Prism 8 szoftvert (8.0.1 verzió, La Jolla, CA) használtam. Az adatok normalitásának vizsgálatára Shapiro–Wilk-próbát alkalmaztam. Két csoport összehasonlítására Student-féle önkontrollos t-próbát, illetve nem normális eloszlás esetén Mann–Whitney-féle rangösszeg-próbát használtam. Több csoport összehasonlítása esetén one-way ANOVA varianciaanalízist alkalmaztam Tukey-féle post hoc teszttel. A statisztikai szignifikanciát P-értékekkel jelöltem. Amennyiben P<0,0001 értéket adtam meg, a statisztikai program a pontos P-értéket nem tudta meghatározni, ezért ezekben az esetekben P<0,0001 szerepel. A szignifikáns eltéréseket értekezésemben csillaggal (*) jelöltem.

4. Eredmények

4.1 A 10 % (m/m) szacharóz hatása Shaker-IR káliumcsatornák lassú inaktivációjára

Korábban már említettem, hogy az irodalom beszámol az inaktivációs vízmolekulák kísérletes eltávolításáról nagy viszkozitású (2 M) szacharóz oldat segítségével, illetve ennek az inaktivált állapotból való visszatérést gyorsító hatásáról (Ostmeyer és mtsai. 2013), ezért az általam végzett kísérletek közül ezt mutatom be elsőnek. A korábban részletezett protokoll szerinti, oldatcsere előtti első depolarizáció hatására a létrejövő makroszkópikus kálium áram inaktivációs időállandójának átlaga 144 ± 6.6 ms-nak adódott ($n = 6$), míg az oldatcsere utáni második depolarizáló impulzus esetében ez az átlag 159 ± 17.4 ms volt ($n = 6$). Abban az esetben tehát, amikor 10%(m/m) szacharózt alkalmaztam a 2. számú oldatban az eredmények azt mutatták, hogy nincs szignifikáns hatás az inaktivációs időállandókra annak ellenére, hogy a szacharóz viszkozitása még a nehézvíznél is nagyobb ($P > 0.05$). A kísérleteket T449A mutáns Shaker-IR káliumcsatornán végeztem.

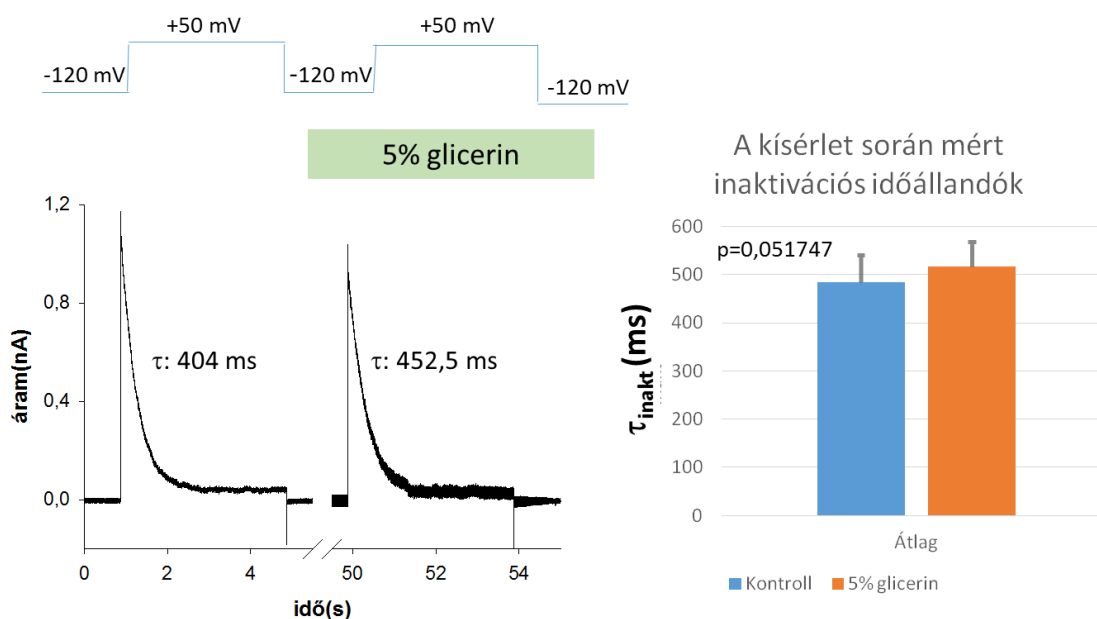


12. ábra: 10% szacharóz hatása T449A Shaker-IR csatornák inaktivációs kinetikájára. Az inaktivációs időállandó meghatározásához használt feszültség-protokoll a 3.7.2 fejezetben részletesen leírásra került.

A 12. ábráról leolvasható a kísérleti protokoll, amely időrendileg megfelelően van ábrázolva az alatta lévő áramgörbék és a szacharóz hozzáadásához képest. A bal alsó ábrán két általam kiválasztott, reprezentatív áramgörbe látható kontroll körülmények között (bal) illetve szacharóz jelenlétében (jobb). A jobb alsó ábra pedig az inaktivációs időállandók átlagát és annak közepes hibáját (SEM-et) szemlélteti kontroll körülmények között, illetve szacharóz jelenlétében. A kísérletek alapján meghatározott inaktivációs időállandókban szignifikáns eltérés nem tapasztalható.

4.1.1. Az 5% (m/m) glicerín hatása Shaker-IR káliumcsatornák lassú inaktivációjára

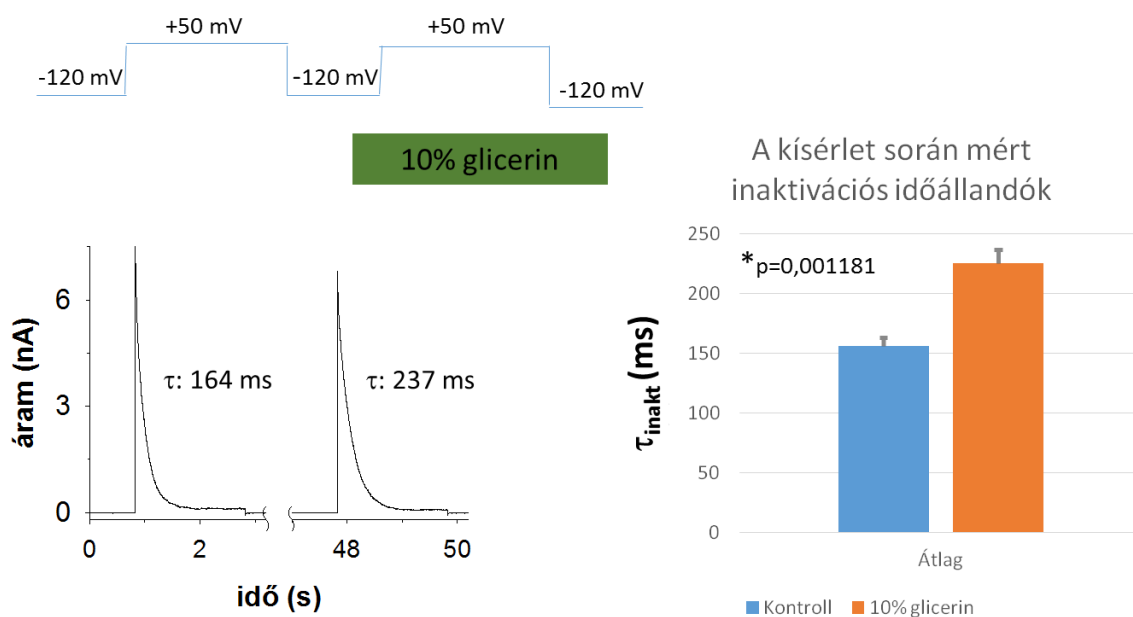
A következő kísérlet során az 5 tömegszázalékos glicerín hatását vizsgáltam (13. ábra) a fentivel (4.1 pont) teljesen megegyező feszültség-protokoll alkalmazásával. A kontroll körülmények között meghatározott inaktivációs időállandók átlaga 485 ± 16.6 ms volt ($n = 6$), míg glicerín expozíció hatására ez az átlag 517 ± 17.4 ms-nak adódott ($n = 6$). Ezen eredmények alapján, mikor 5% (m/m) glicerint alkalmaztam a viszkozitás növelésének céljából, szintén nem adódott szignifikáns különbség az inaktivációs időállandók átlagában ($P > 0.05$). Ezeket a kísérleteket a valamivel lassabban inaktiválódó T449A/I470A mutánsra végeztem, ez volt az oka az inaktivációs időállandók az előző mérésekkel szembeni nagyobb voltának.



13. ábra: 5% glicerín hatása T449A/I470A Shaker-IR csatornák inaktivációs kinetikájára. Az inaktivációs időállandó meghatározásához használt feszültség-protokoll az előző kísérlettel megegyező volt.

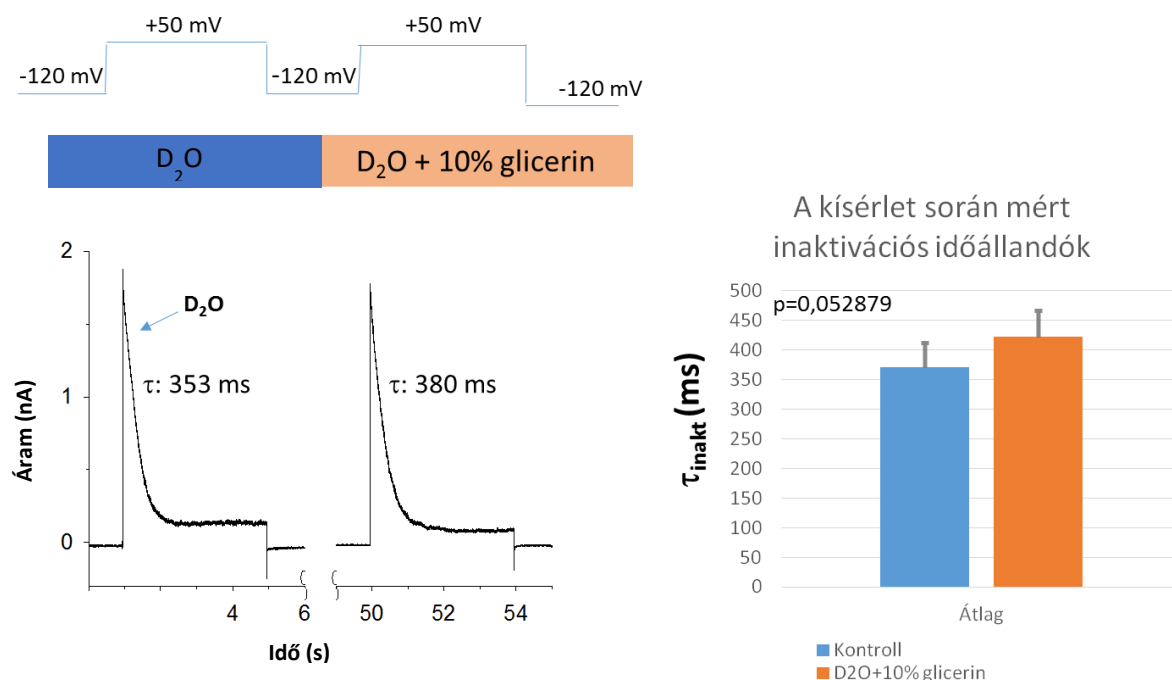
4.1.2 A 10% (m/m) glicerín hatása Shaker-IR káliumcsatornák lassú inaktivációjára

Vizsgáltam a glicerín hatásának koncentráció függését is, így kísérleteket végeztem 10%(m/m) glicerint tartalmazó ECS alkalmazásával is. Ezeket a méréseket a T449A mutáns csatornákon végeztem. Ebben az esetben a protokoll szerinti első +50 mV-os depolarizáció hatására kialakuló áramgörbékről leolvasható inaktivációs időállandók átlaga kontroll körülmények között 157 ± 6.6 ms volt ($n = 6$), míg ez az átlag 10%(m/m) glicerín hatására 225 ± 12.5 ms-ra emelkedett ($n = 6$). Ezen szignifikáns különbség ($P = 0.0011$) azért volt nagyon meglepő, mert 5%(m/m) glicerint alkalmazva nem láttuk ezt a hatást, másrészt pedig a 10%(m/m) glicerín viszkozitása vizes közegben 1.31 mPas, míg a 10%(m/m) szacharózé 1.336 mPas. A nagyobb viszkozitású szacharózós oldat esetén pedig nem tapasztaltam az inaktiváció szignifikáns lassulását. Ugyan ez még nem bizonyított, de vélhetően a 10%(m/m) glicerín nem a viszkozitásának köszönhetően, hanem specifikus molekuláris kölcsönhatások révén okozza ezt a változást a csatornák inaktivációs kinetikájában.



14. ábra: 10% glicerín hatása T449A Shaker-IR csatornák inaktivációs kinetikájára, az alkalmazott feszültség-protokoll a korábbiaknak megfelelő volt.

A fenti jelenség fényében szükségessé vált egy újabb kísérlet megvalósítása, amely képes bizonyítani, hogy nem a megnövekedett viszkozitás, hanem valamilyen specifikus molekuláris kölcsönhatás okozta az inaktivációs időállandók növekedését 10%(m/m) glicerinnel alkalmazásakor. Így megvizsgáltam, hogy a nehézvíz és a 10%(m/m) glicerinnel való inaktivációt lassító hatása additív-e. Ha a viszkozitás jelentős növekménye mellett az inaktivációs időállandók átlagának különbsége nem szignifikáns, az arra enged következtetni, hogy nem a megnövekedett viszkozitás okozta a 10%(m/m) glicerinnel fentebb bemutatott hatását. Ebben az esetben a kontroll ECS oldat nehézvíz-alapú volt, a glicerint tartalmazó ECS pedig nehézvizet és 10 tömegszázalék glicerint. A kísérleteket T449A mutáns csatornákon végeztem. Az 15. ábrán feltüntetett protokoll szerinti, oldatcsere előtti első depolarizáció hatására az áramgörbéről leolvasható inaktivációs időállandók átlaga 370 ± 23.6 ms-nak adódott ($n = 5$), míg az oldatcsere utáni második depolarizáló impulzus esetében ez az átlag 422 ± 22 ms volt ($n = 5$).



14. ábra: 10% glicerinnel való hatás T449A Shaker-IR csatornáknál az inaktivációs kinetikájára. Az ábráról leolvasható a kísérleti protokoll, amely időrendileg megfelelően van ábrázolva az alatta lévő áramgörbék és a nehézvíz alapú, 10%(m/m) glicerint tartalmazó oldat hozzáadásához képest. A bal alsó ábrán egy általam kiválasztott reprezentatív áramgörbe látható nehézvízes kontroll

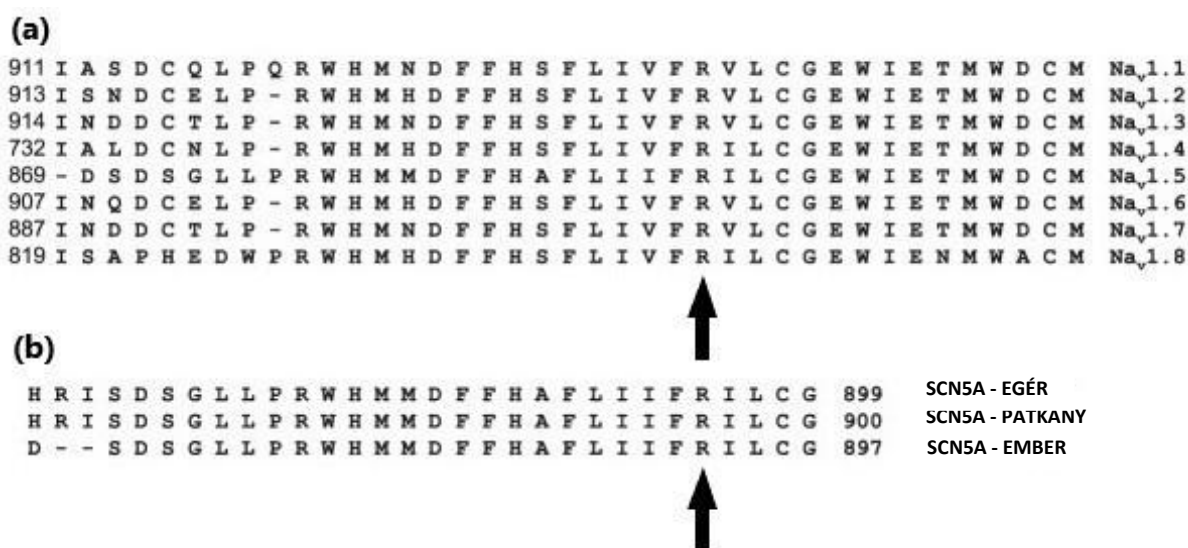
(bal) és nehézvízes 10%(m/m) glicerint tartalmazó (jobb) közegben. A jobb alsó grafikonnál leolvasható az inaktivációs időállandók átlaga és annak közepes hibája (SEM).

A különbség az inaktivációs időállandók átlaga között nem volt szignifikáns ($P > 0.05$). Ez arra enged következtetni, hogy a nehézvíz és a glicerín hatása nem additív, ez pedig alátámasztja a hipotézisünket mely szerint a 10%(m/m) glicerín inaktivációs kinetikára gyakorolt hatása nem a nagyobb viszkozitásának köszönhető. Ebben a fejezetben bemutatott átlagok több mérés adatainak összegzéséből származnak (lásd Anyagok és módszerek fejezet). Az egymással összehasonlított áramgörbék és ezekből származó inaktivációs időállandók mindig ugyanazon a patch-en végzett kísérlet eredményei, a statisztikai elemzéseket önkontrollos t-próbával végeztem.

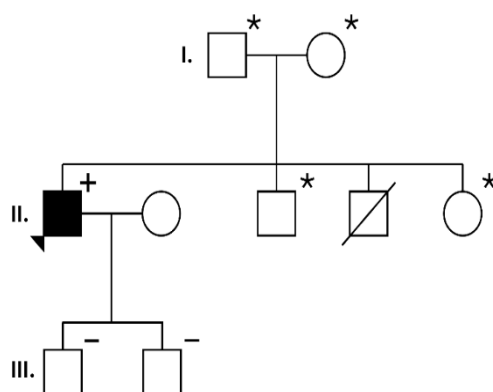
4.2. Egy potenciálisan patogén $Na_v1.5$ mutáció detektálása

A korábban részletezett kórtörténetű, Brugada-szindrómában szenvedő betegünkénél teljes genom szekvenálás során egy heterozigóta pontmutációt sikerült detektálni az SCN5A gén 2677-es pozíciójában (c.2677C>T). Ezen „missense” mutáció a fehérje szerkezetében, a 893-as pozícióban lévő arginin cseréjét eredményezte ciszteinre (R893C). A különböző pontmutációk fehérje szerkezetre és funkcióra gyakorolt hatását előrejelző algoritmusok (SIFT, PolyPhen-2, Align-GVGD) alapján ezen mutáció potenciálisan patogén, diszruptív hatású a $Na_v1.5$ fehérje működésére nézve. Az irodalmi adatok alapján, egy nagy számú (6500) egészséges kontroll populáción végzett genetikai analízis során az SCN5A R893C mutáció nem volt megtalálható [Kapplinger és mtsai., 2010], illetve nem található meg a humán génmutációs adatbázisban [HGMD, Stenson és mtsai., 2020], az Ensembl, HapMap és az 1000 genom projekt adatbázisában sem. Ezek alapján az R893C, mint potenciálisan patogén $Na_v1.5$ mutáció szerepe feltételezhető a betegség kialakulásában. Bár az R893 pontos szerepe a $Na_v1.5$ működésében még nem teljesen tisztázott, az Arginin jelenléte ebben a pozícióban evolúciós szempontból előnyös. Az aminosav szekvenciák összehasonlítása alapján az R893 magas fokú

konzerváltságot mutat különböző humán Na_v izoformákban, illetve a $Na_v1.5$ fehérje szerkezetében is különböző fajokban (15. ábra) [Zimmer és mtsai., 2002]. A 893-as pozíció a $Na_v1.5$ fehérje második doménjében (DII) lévő transzmembrán S5-S6 szegmentumokat összekötő extracelluláris hurok régióban található, amely része a csatorna pórusának és közel található a szelektivitási szűrőhöz (5. ábra), mely egy mutációs forrópontnak tekinthető BrS szempontjából [Kapplinger és mtsai., 2010]. A beteg epilepsziás rohamait magyarázó patogén nátriumcsatorna mutációt nem sikerült detektálnunk, illetve nem volt kimutatható mutáció a szívizomban kifejeződő kálium- és kalciumcsatornák esetében sem.



15. ábra: A DII S5-S6 régió szekvencia összehasonlítása, a 893-as pozíciót nyilak jelölik. Ebben a pozícióban az Arginin nagy fokú konzerváltságot mutat a humán Na_v izoformákban (a) és különböző fajokban (egér, patkány, ember) is (b).



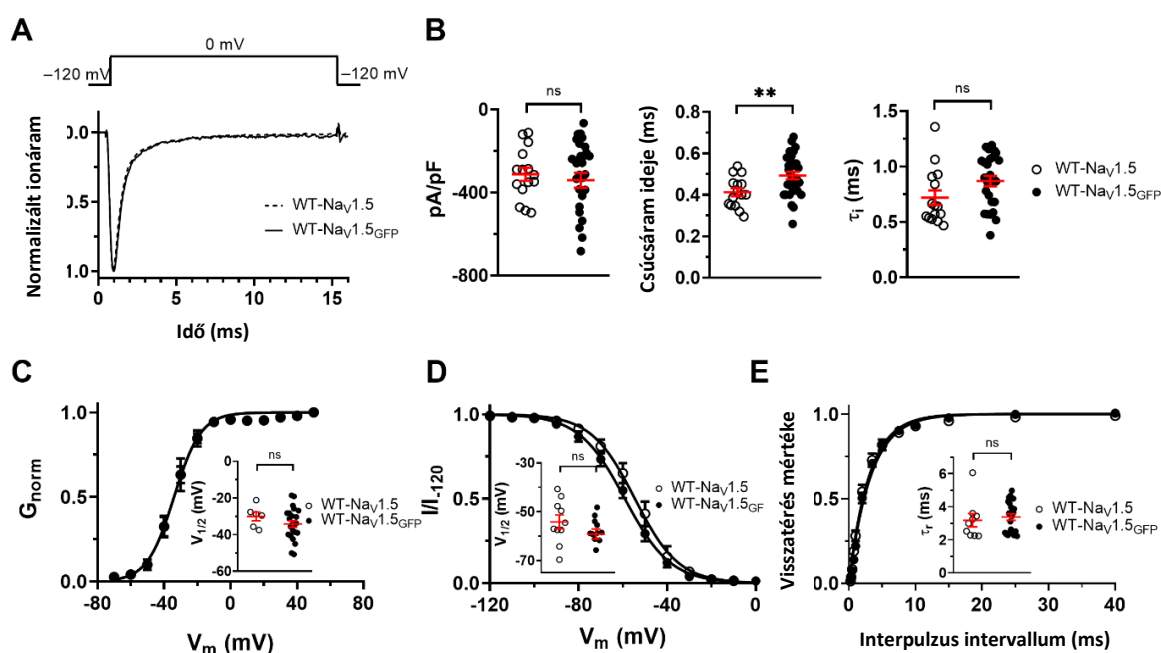
16. ábra: *Fenotípusos és genotípusos információkat tartalmazó családfa. A férfiakat négyzetek, a nőket körök jelölik. Betegünket nyílhegy jelöli, a „+” szimbólum jelzi az SCN5A c.2677C>T variáns hordozóit. A „-” szimbólum a mutációt nem hordozó, az keresztbe húzott szimbólum az elhunyt családtagokat jelöli. Azon családtagokat, akik nem estek át genetikai vizsgálaton, a „*” szimbólum jelzi.*

Betegünknek két fia van (16. ábra III-1 és III-2), mindketten teljesen panaszmentesek, szívultrahang vizsgálat strukturális eltérést nem mutatott. Nyugalmi 12 elvezetési EKG-n az egyiküknél (III-1) teljesen normál mintázat, a másik esetében (III-2) pedig egy inkomplett JTSZB morfológia volt látható Brugada-jel nélkül. Genetikai vizsgálat során a patogénnek vélt mutáció egyik utódban sem volt megtalálható, illetve mindketten elzárkóztak gyógyszerprovokációs tesztől és invazív szívelektrofiziológiai vizsgálatról. A beteg egyik testvére fiatalon elhunyt, halálát azonban hepatocelluláris karcinóma szövődményei okozták, nem szívritmuszavar.

4.3. A vad típusú $\text{Na}_v1.5_{\text{GFP}}$ biofizikai karakterizálása

Elsőként a vad típusú $\text{Na}_v1.5$ N-terminális végén található GFP-jelölés biofizikai hatását vizsgáltam ($\text{WT-Na}_v1.5_{\text{GFP}}$), amely során összehasonlítottam a csatorna működését annak GFP jelöletlen változatával ($\text{WT-Na}_v1.5$). Ezen méréseket CHO sejteken végeztem, teljes-sejt konfigurációban. Egy 15 ms hosszú, 0 mV-ra depolarizáló impulzus leadását követően a $\text{WT-Na}_v1.5$ plazmiddal transzfektált sejtek esetében a maximális áramsűrűség átlaga 311.8 ± 31.8 pA/pF-nak adódott ($n = 15$), míg $\text{WT-Na}_v1.5_{\text{GFP}}$ esetében ez 340.6 ± 36.2 pA/pF ($n = 31$) volt (17. ábra A és B; 3. táblázat), így az áramsűrűség értékekben nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget ($P = 0.6150$). Az áram csúcsának eléréséig eltelt idő (time-to-peak) értékek szintén nem mutattak szignifikáns különbséget: $\text{WT-Na}_v1.5$ esetén 0.413 ± 0.019 ms ($n = 15$), míg $\text{WT-Na}_v1.5_{\text{GFP}}$ esetén 0.493 ± 0.018 ms ($n = 31$) adódott (17. ábra B, $P = 0.008$). Az inaktivációs időállandók (t_i) $\text{WT-Na}_v1.5$ esetén 0.719 ± 0.065 ms-nak ($n = 15$), $\text{WT-Na}_v1.5_{\text{GFP}}$ esetén pedig 0.869 ± 0.047 ms-nak adódott ($n = 26$) (17. ábra B, $P = 0.0658$). Az N-terminális GFP jelölés szintén nem okozott szignifikáns különbséget az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggésében és a függvény meredekségében (s) sem: a félaktivációs feszültség ($V_{1/2}$) és meredekség a

jelöletlen csatornákat kifejező sejteknél -30.1 ± 2.4 mV-nak, $s = 5.8 \pm 0.4$ mV-nak ($n = 6$), míg WT-Nav1.5_{GFP} esetén a $V_{1/2} = -34.2 \pm 1.8$ mV-nak, $s = 6.1 \pm 0.3$ mV-nak adódott ($n = 23$) (17. ábra C, $P = 0.2846$; $P = 0.6591$; $V_{1/2}$ és s esetén). Az egyensúlyi inaktiváció feszültségfüggésében szintén nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget. A $V_{1/2}$ érték WT-Nav1.5 esetén -54.2 ± 2.9 mV, az s faktor -8.4 ± 0.5 mV, ($n = 10$), WT-Nav1.5_{GFP} esetén pedig a $V_{1/2} = -34.2 \pm 1.8$ mV, az s pedig -6.1 ± 0.3 mV ($n = 23$) volt (17. ábra D, $P = 0.1676$; $P = 0.1461$, $V_{1/2}$ és s esetén). Végül az inaktivált állapotból való visszatérés kinetikáját vizsgáltam: WT-Nav1.5 esetén az inaktivált állapotból való visszatérés időállandója (t_r) 3.2 ± 0.40 ms ($n = 9$), míg WT-Nav1.5_{GFP} esetén 3.40 ± 0.20 ms ($n = 22$) volt (17. ábra E, $P = 0.6283$). A GFP jelölés hatásainak ebben a bekezdésben részletezett vizsgálatát a 17. ábra és 2. táblázat foglalja össze.



17. ábra: (A) Reprezentatív teljes-sejt áramgörbék vad típusú Nav1.5 (szaggatott vonal) és WT-Nav1.5_{GFP} (folytonos vonal) csatornák esetében. A mérés során alkalmazott feszültségprotokoll az áramgörbék felett látható. (B) Bal: a 0 mV-on mért áramsűrűségek. Középen: az aktiváció kinetikáját az (A) panelen bemutatott INa csúcsáramának eléréséig eltelt idő (time-to-peak) meghatározásával jellemeztem. Jobb: az inaktiváció időállandóját (τ_i) az (A) panelen látható áramgörbék leszálló szakaszára illesztett exponenciális függvényvel

határoztam meg. (C) Az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggése: a pontok az egyensúlyi aktiváció félaktivációs feszültségének ($V_{1/2}$) egyedi adatpontjait jelölik. (D) Az egyensúlyi inaktiváció feszültségfüggése: az adatpontok az állandósult inaktiváció félinaktivációs feszültségének ($V_{1/2}$) egyedi értékeit jelölik. (E) Az inaktivációból való visszatérés kinetikáját kétimpulzusos protokollal vizsgáltam, amelyben az impulzusok közötti időt (interpulse interval, i_{pi} ; 0,25–40 ms) fokozatosan növeltem. Az adatpontok az inaktivációból való visszatérés mértékét mutatják az impulzusok közötti idő (i_{pi}) függvényében, az időállandót (τ) az adatpontokra illesztett exponenciális függvénnyel határoztam meg. A teli körök a WT- $Na_v1.5$, míg az üres körök a WT- $Na_v1.5GFP$ esetében kapott egyedi adatpontokat jelölik. Az ábrán az adott paraméterek átlag $\pm$ SEM értékeit tüntettem fel. A különbségeket szignifikánsnak tekintettem $P < 0,01$ esetén, míg az ns jelölés nem szignifikáns különbséget jelez ($P > 0,05$) a WT- $Na_v1.5GFP$ -hez viszonyítva.

A vad típusú $Na_v1.5$ esetében, az N-terminális GFP jelölés nem okozott szignifikáns változást az áramsűrűségben, az aktivációs és inaktivációs időállandókban, a steady-state aktiváció és inaktiváció feszültségfüggésében, illetve az inaktivált állapotból való visszatérésben sem.

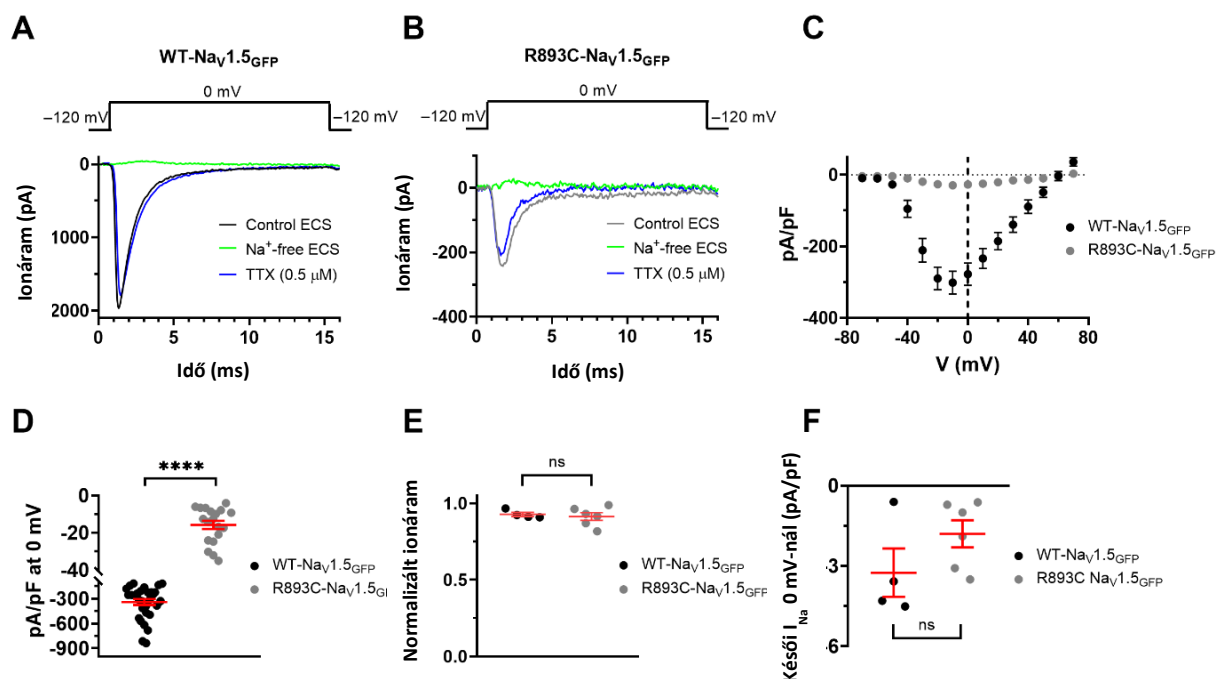
4.4. A $Na_v1.5$ R893C mutáció biofizikai karakterizálása

Betegünkben felfedezett patogénnek vélt heterozigóta SCN5A mutáció (R893C) kóroki szerepének feltárását, biofizikai karakterizálását szintén patch-clamp technikával, teljes-sejt konfigurációban végeztem, amelynek célja a vad-típusú (WT- $Na_v1.5GFP$) és a mutáns ioncsatornák (R893C- $Na_v1.5GFP$) kapuzási paramétereinek összehasonlítása volt. Elsőként a mutáns csatornákat kifejező CHO sejteket -120 mV tartófeszültségről, 0 mV-ra depolarizáltam 15 ms-ig, mely során a WT- $Na_v1.5GFP$ csatornákhöz képest drámai áramsűrűség csökkenést tapasztaltam, a reprezentatív áramgörbéket a 18. ábrán tüntettem fel (WT- $Na_v1.5GFP$ – A, R893C- $Na_v1.5GFP$ – B). A 0 mV membránpotenciálon meghatározott áramsűrűség WT-

Nav1.5_{GFP} esetén 340.6 ± 36.2 pA/pF-nak ($n = 31$) -, míg R893C-Nav1.5_{GFP} esetén 15.8 ± 2.2 pA/pF-nak adódott ($n = 19$) (18. ábra C és D, 3. táblázat, $P < 0.0001$). Ezen eredmények alapján megállapítható, hogy az R893C mutáció funkcióvesztéses mutáció, és okozati összefüggésben állhat betegünk BrS fenotípusával.

Ismert, hogy a CHO sejteken gyakran fejeződnek ki endogén nátriumcsatornák is [Lalik PH és mtsai., 1993]. Kísérleteink során ugyan a nem transzfektált sejteken minimális nátrium áramot mértünk (0 mV-ra depolarizálva 4.6 ± 1.2 pA/pF, $n = 15$), mégis szükségessé vált annak a kizárása, hogy a mutáns csatornákkal transzfektált sejteken mért, vad típusúhoz képest jóval kisebb áramsűrűség nem a CHO sejtek által kifejezett endogen nátrium áram következménye. Ennek céljából az extracellulárisan hozzáadott 0,5 mM tetrodotoxin (TTX) hatását vizsgáltam, ugyanis a CHO sejtek endogén nátriumcsatornái TTX-szenzitívek ($IC_{50} \approx 3-5$ nM) (Lalik és mtsai., 1993), a Nav1.5 azonban TTX rezisztens (Gellens és mtsai., 1992; Lee and Ruben, 2008). A TTX jelenlétében és hiányában 0 mV-ra történő depolarizáció során rögzített áramgörbék gyakorlatilag fedték egymást mind a WT-Nav1.5_{GFP}-, mind az R893C-Nav1.5_{GFP}-transzfektált sejtek esetében: a sejtek ~3 perces folyamatos TTX-perfúzióját követően (18 ábra A és B). A normalizált áram (I/I_0), ahol I_0 a TTX hiányában mért csúcsáram, míg I a 0,5 μ M TTX által létrehozott egyensúlyi blokk mellett mért csúcsáram, WT-Nav1.5_{GFP} esetén $0,927 \pm 0,013$ ($n = 4$), míg R893C-Nav1.5_{GFP} esetén $0,913 \pm 0,025$ ($n = 6$) volt ($P = 0,7029$) (18. ábra E). A TTX érzékeny áramként definiált késői I_{Na} értékeket pA/pF-ban határoztam meg: WT-Nav1.5_{GFP} esetén $3,3 \pm 0,9$ ($n = 4$), míg R893C-Nav1.5_{GFP} esetén $1,8 \pm 0,5$ ($n = 6$) volt ($P = 0,1680$) (18. ábra F). A vad típusú és mutáns csatornákat HEK sejtekbe transzfektálva is végeztem méréseket, ebben az esetben R893C-Nav1.5_{GFP}-t expresszáló sejteket 0 mV-ra depolarizálva még kisebb áramsűrűséget tapasztaltunk (5.4 ± 0.7 pA/pF, $n = 9$), vagyis eredményeink nem korlátozódnak CHO expressziós rendszerre. A fent részletezett, CHO

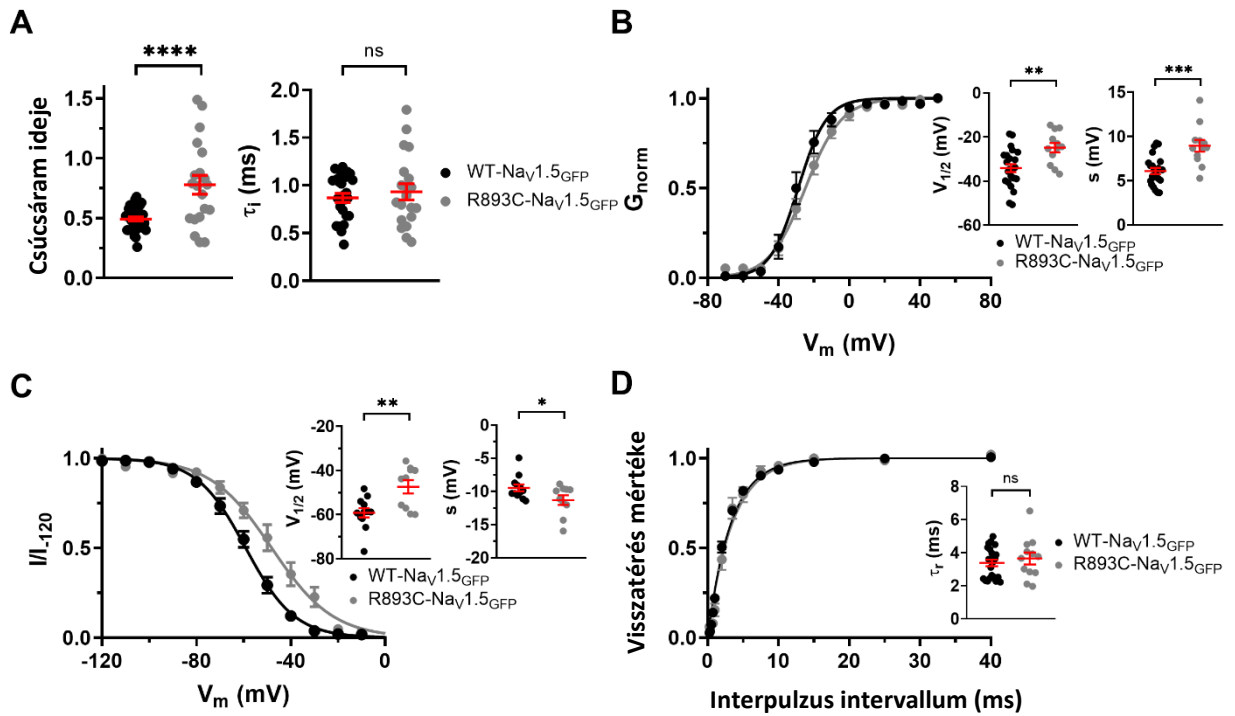
sejteken végzett kísérletek eredményeit, egy-egy reprezentatív áramgörbével a 18. ábra foglalja össze.



18. ábra: A vad típusú és R893C mutáns ioncsatornákon mért áramsűrűség összehasonlítása. Különböző külső oldatokkal kezelt sejtek 0 mV-ra történő depolarizációját követően mért áramsűrűség, reprezentatív áramgörbék és késői I_{Na} értékek WT- $Na_v1.5_{GFP}$ és R893C- $Na_v1.5_{GFP}$ esetén, illetve különböző tesztpotenciálokon mért áramsűrűség WT és mutáns csatornák esetén. Az alkalmazott feszültség-protokollok a 3.7.3. fejezetben részletesen leírásra kerültek. Az ábrán minden egyes egyedi adatpontot ábrázoltam, illetve az adott paraméterek átlag $\pm$ SEM értékeit tüntettem fel.

A fent részletezett drámai áramsűrűség csökkenés mellett, a mutáns ioncsatornát kifejező sejtek esetében a kapuzási paraméterek jelentős változását is tapasztaltam. A mutáns csatornák esetében az aktiváció lassulása volt látható: a csúcsáram elérésének ideje (time-to-peak) WT- $Na_v1.5_{GFP}$ esetén 0.493 ± 0.018 ms-nak ($n = 31$), R893C- $Na_v1.5_{GFP}$ esetén pedig 0.779 ± 0.079 ms-nak ($n = 20$) adódott ($P < 0.0001$, 19. ábra A). Ezzel ellentétben, az inaktivációs időállandókban (τ_i) nem tapasztaltam szignifikáns különbséget: vad típusú csatornák esetén 0.869 ± 0.05 ms ($n = 26$), mutáns csatornák esetén pedig 0.933 ± 0.08 ms ($n = 20$) volt látható ($P = 0.4892$, 19. ábra A). Az egyensúlyi aktiváció és inaktiváció feszültségfüggésében a vad

típushoz képest a mutáns csatornák esetén egyaránt ~ 10 mV eltolódás volt megfigyelhető a pozitívabb membránpotenciálok irányába a függvény meredekségének szignifikáns emelkedésével: a WT- $\text{Na}_v1.5_{\text{GFP}}$ konstruktt esetén $V_{1/2} = -34.2 \pm 1.8$ mV, $s = 6.1 \pm 0.3$ mV ($n = 23$), R893C- $\text{Na}_v1.5_{\text{GFP}}$ esetén pedig $V_{1/2} = -24.9 \pm 2.1$ mV, $s = 8.9 \pm 0.7$ mV ($n = 12$) ($P = 0.0033$; $P = 0.0002$, $V_{1/2}$ és s esetén, 19. ábra B). Az egyensúlyi inaktiváció feszültségfüggését tekintve a vad típus esetén (WT- $\text{Na}_v1.5_{\text{GFP}}$) $V_{1/2} = -59.1 \pm 2.1$ mV, $s = -9.5 \pm 0.5$ mV ($n = 12$), R893C mutáns csatornák esetén pedig a $V_{1/2} = -47.4 \pm 3.0$ mV, $s = -11.3 \pm 0.7$ mV ($n = 10$) adódott ($P = 0.0037$; $P = 0.0455$, $V_{1/2}$ és s esetén, 19. ábra C). Az inaktivált állapotból való visszatérést kinetikájában nem tapasztaltam szignifikáns különbséget. WT- $\text{Na}_v1.5_{\text{GFP}}$ csatornák esetén $\tau_r = 3.38 \pm 0.19$ ms ($n = 22$), R893C- $\text{Na}_v1.5_{\text{GFP}}$ csatornáknál pedig $\tau_r = 3.65 \pm 0.36$ ms ($n = 12$) volt ($P = 0.4798$, 19. ábra D). A fent részletezett kísérletek eredményeit foglalja össze a 19. ábra és 2. táblázat.



19. ábra: Az R893C mutáció hatása a csatorna aktivációs és inaktivációs kinetikájára (A), a steady-state aktiváció (B) és inaktiváció (C) feszültségfüggésére, illetve az inaktivált állapotból való visszatérésre (D). Az alkalmazott feszültség-protokollok és az adott paraméterek meghatározása a 3.7.3. fejezetben részletesen leírásra került. Az ábrán minden egyes egyedi

adatpontot ábrázoltam, illetve az adott paraméterek átlag $\pm$ SEM értékeit tüntettem fel. *, **, ***, és **** jelzik a szignifikáns különbségeket $P < 0,05$, $P < 0,01$, $P < 0,001$, illetve $P < 0,0001$ esetén.

	Aktivációs kinetika		Inaktivációs kinetika		SSA feszültségfüggése			SSI feszültségfüggése			Visszatérés	
	csúcsáram ideje 0 mV-nál (ms)	n	τ_i 0 mV-nál (ms)	n	$V_{1/2}$ (mV)	s (mV)	n	$V_{1/2}$ (mV)	s (mV)	n	τ_r (ms)	n
WT-Nav1.5	0.413 $\pm$ 0.019	15	0.719 $\pm$ 0.065	15	-30.1 $\pm$ 2.4	5.8 $\pm$ 0.4	6	-54.2 $\pm$ 2.9	-8.4 $\pm$ 0.5	10	3.2 $\pm$ 0.40	9
WT-Nav1.5_{GFP}	0.493 $\pm$ 0.018	31	0.869 $\pm$ 0.047	26	-34.2 $\pm$ 1.8	6.1 $\pm$ 0.3	23	-59.1 $\pm$ 2.1	-9.5 $\pm$ 0.5	12	3.4 $\pm$ 0.20	22
R893C-Nav1.5_{GFP}	0.779 $\pm$ 0.079****	20	0.933 $\pm$ 0.085	20	-24.9 $\pm$ 2.1**	8.9 $\pm$ 0.7****	12	-47.4 $\pm$ 3.0**	-11.3 $\pm$ 0.7*	10	3.65 $\pm$ 0.36	12
Kevert	0.532 $\pm$ 0.013	46	1.082 $\pm$ 0.045*	47	-29.4 $\pm$ 1.5	7.6 $\pm$ 0.3	44	-52.1 $\pm$ 2.2	-9.7 $\pm$ 0.5	27	3.90 $\pm$ 0.19	45

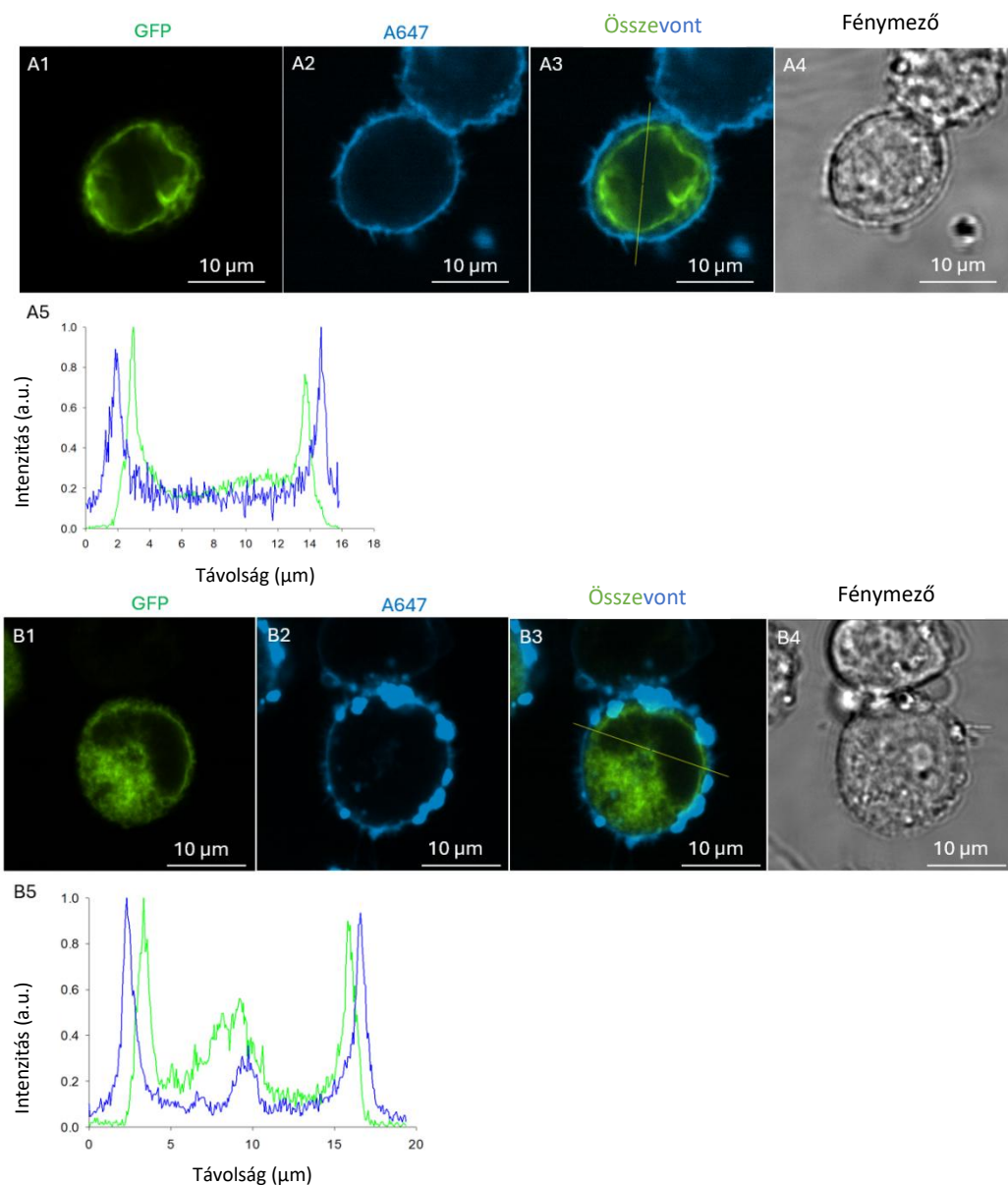
2. Táblázat: A CHO sejtekben kifejezett, különböző Nav1.5 konstruktok kapuzási paraméterei.

SSA – Steady-state aktiváció, SSI – Steady-state inaktiváció

4.4.1. Membránexpressziós vizsgálatok

A fent részletezett funkcióvesztés hátterében felmerült, hogy ezen mutáns csatornák nem helyeződnek ki a plazmamembránba, vagy egyszerűen nem megfelelő mértékben szintetizálódnak vagy szerelődnek össze. Ennek vizsgálatára konfokális mikroszkópos méréseket, illetve a transzfektált vad típusú és R893C mutáns sejtek membránjából kinyert fehérjék western blot vizsgálatát végeztük el. Ezekben a kísérletekben kihasználtuk a vad típusú és mutáns konstrukjtaink N-terminális GFP jelölését. A GFP-vel jelölt csatornák plazmamembránbeli lokalizációját konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk, az Alexa Fluor™ 647 NHS észter által kibocsátott, plazmamembránból származó fluoreszcencia intenzitás alapján. A

WT-Nav1.5_{GFP}-vel és R893C-Nav1.5_{GFP}-vel transzfektált sejtek pixelről pixelre történő normalizált intenzitásprofil-analízise megerősítette, hogy a GFP expresszió mindkét konstrukció esetében azonos módon történt (20. ábra). Negatív kontrollként natív, azaz nem transzfektált CHO sejtek is alkalmaztunk, amelyek esetében nem volt kimutatható GFP jel. Továbbá az intenzitásprofilok azt is mutatják, hogy a két csatornavariáns hasonló sejten belüli lokalizációt mutat (20. ábra), amely szintén a megfelelő „folding” és „trafficking” mellett szól. A fentiek alapján elmondható, hogy a mutáns csatorna esetében tapasztalt áramsűrűség csökkenése a csatorna hibás működésének eredménye, nem pedig az elégtelen szintézis vagy membránba való kihelyeződés következménye.

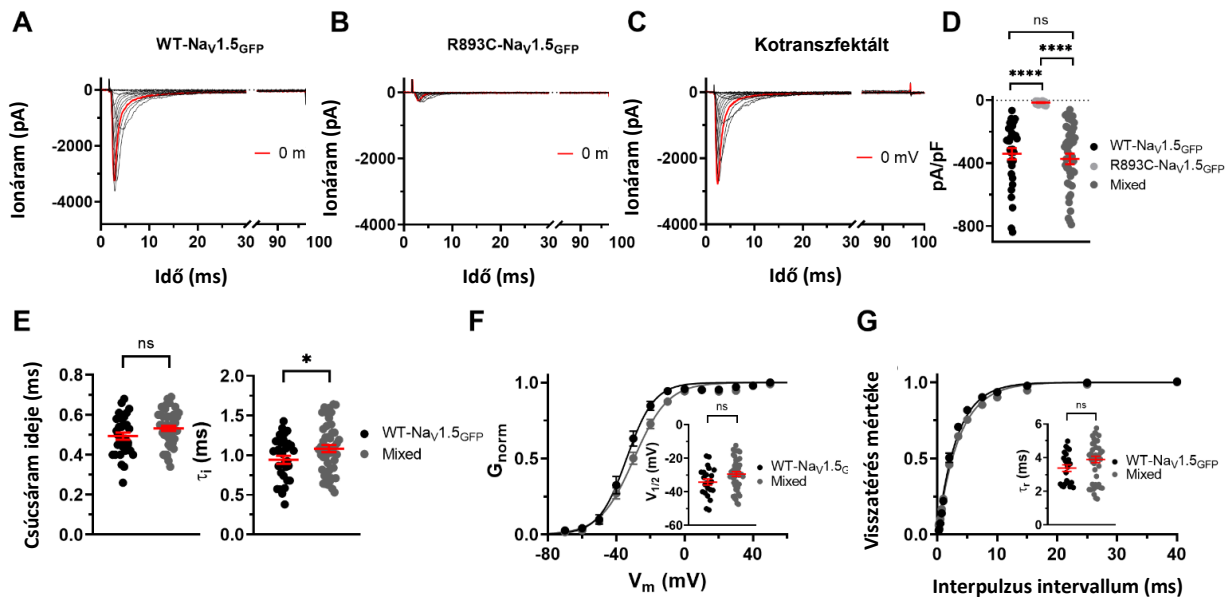


20. ábra: *Konfokális mikroszkópos felvételek WT-Nav1.5GFP (A) és R893C-Nav1.5GFP (B) plazmiddal transzfektált CHO sejtekben. A képek a CHO sejtek GFP fluoreszcenciajelét mutatják (A1, B1, zöld), valamint ugyanazon sejtek plazmamembránjának Alexa Fluor™ 647 NHS Ester fluoreszcenciajelét (A2, B2, kék). (A3, B3) - Az egyes csatornák összeolvasztott konfokális fluoreszcencia mikroszkópos képei. (A4, B4) - GFP-jelölt WT vagy R893C Nav1.5 csatornát expresszáló sejtek világos látóteres (fénymező) képei. A skálavonal minden panelen 10 μ m. A két fluorofór pixelről pixelre normalizált intenzitásprofil-analízisét különböző képeken kijelölt lineáris szakaszok mentén végeztem el a WT (A5) és az R893C Nav1.5 (B5) esetében. Az intenzitásprofil-analízis a WT és az R893C Nav1.5 hasonló membránlokalizációját jelzi.*

4.4.2. R893C mutáns csatornák hatása a vad típusú csatornák működésére

Betegünk heterozigóta státuszának modellezésére, illetve az R893C mutáns csatornák által, vad típusú csatornákra kifejtett lehetséges negatív-domináns hatás vizsgálatára, a korábbiakhoz hasonló patch-clamp méréseket végeztem a WT és R893C mutáns csatornák 1:1 arányú kotranszfekciójával (Kevert). Ebben a kísérletsorozatban 1 μ g WT és 1 μ g R893C plazmidot ko-transzfektáltam a CHO sejtekbe, így a „kevert” konstruktok ugyanannyi DNS-t (WT és R893C egyaránt) tartalmaztak, mint amennyit az egyedi transzfekciós kísérletek során használtam. Eredményeim alapján az R893C mutáns csatornák nem fejtenek ki negatív-domináns hatást a vad típusú csatornák működésére. A sejteket 0 mV-ra depolarizálva, a maximális áramsűrűség (pA/pF-ban) 340.6 ± 36.2 volt ($n = 31$) WT-Nav1.5_{GFP} és 373.4 ± 33.9 volt ($n = 47$) a Kevert csatornapopuláció esetén ($P = 0.7560$) (21. ábra; 3. táblázat). A vad típusú (WT-Nav1.5_{GFP}) és kotranszfektált sejtek esetében nem láttunk szignifikáns különbséget sem az egyensúlyi aktiváció-, sem az egyensúlyi inaktiváció feszültségfüggésében (WT-Nav1.5_{GFP}: $V_{1/2} = -34.2 \pm 1.8$ és $s = 6.1 \pm 0.3$ mV, $n = 23$; Kevert: $V_{1/2} = -29.4 \pm 1.5$ és $s = 7.6 \pm 0.3$ mV, $n = 44$; $P_{V_{1/2}} = 0.0520$, $P_s = 0.047$ az egyensúlyi aktiváció esetén; WT-Nav1.5_{GFP}: $V_{1/2} = -59.1 \pm 2.1$ és $s = -9.5 \pm 0.5$ mV, $n = 12$; Kevert: $V_{1/2} = -52.1 \pm 2.2$ és $s = -9.7 \pm 0.5$ mV, $n = 27$; $P_{V_{1/2}} = 0.0578$ és $P_s = 0.7522$ az egyensúlyi inaktiváció esetén) (21. ábra; 2. táblázat). Az aktivációs

kinetikában szintén nem tapasztaltam szignifikáns különbséget, a csúcscsúcs eléréséhez szükséges idő (time to peak) 0.493 ± 0.018 ms-nak adódott ($n = 31$) WT-Nav1.5_{GFP} esetén, a Kevert sejtpopulációra pedig 0.532 ± 0.013 ms adódott ($n = 46$) ($P=0.0515$) (21. ábra; 2. táblázat). Ezzel ellentétben, az inaktivációs időállandóban szignifikáns, azonban az inaktívált állapotból való visszatérést jellemző időállandóban nem szignifikáns növekedést tapasztaltam: a kotranszfektált sejtek esetén $t_i = 0.869 \pm 0.05$ ms ($n = 26$) volt WT-Nav1.5_{GFP} és $t_i = 1.082 \pm 0.05$ ($n = 47$) volt a kotranszfektált sejteknél ($P = 0.0457$); $t_r = 3.38 \pm 0.20$ ($n = 22$) volt WT-Nav1.5_{GFP} és $t_r = 3.90 \pm 0.19$ ($n = 45$) a Kevert csatornapopulációra ($P = 0.1020$) (21. ábra; 2. táblázat). Ebben a fejezetben részletezett kapuzási paramétereket és áramsűrűség értékeket a 21. ábra foglalja össze.



21. ábra: CHO sejtek depolarizációja során látható reprezentatív áramgörbék WT-Nav1.5_{GFP} (A), R893C-Nav1.5_{GFP} (B) és 1:1 arányban kotranszfektált sejtek esetén (C). Az ábra D-részen látható a maximális áramsűrűség eloszlása, a time-to-peak értékeket és inaktivációs időállandókat az ábra E-részen, a steady-state aktiváció feszültségfüggését az F, míg az inaktívált állapotból való visszatérést az ábra G-részen tüntettem fel. Az alkalmazott feszültség-protokollok és az adott paraméterek meghatározása a 3.7.3. fejezetben részletesen leírásra került. Az ábrán minden egyes egyedi adatpontot ábrázoltam, illetve az adott paraméterek átlag $\pm$ SEM értékeit tüntettem fel. A különbségeket szignifikánsnak tekintettem (****, ha $P < 0,0001$), kivéve a D panelt, ahol varianciaanalízist (ANOVA) alkalmaztam.

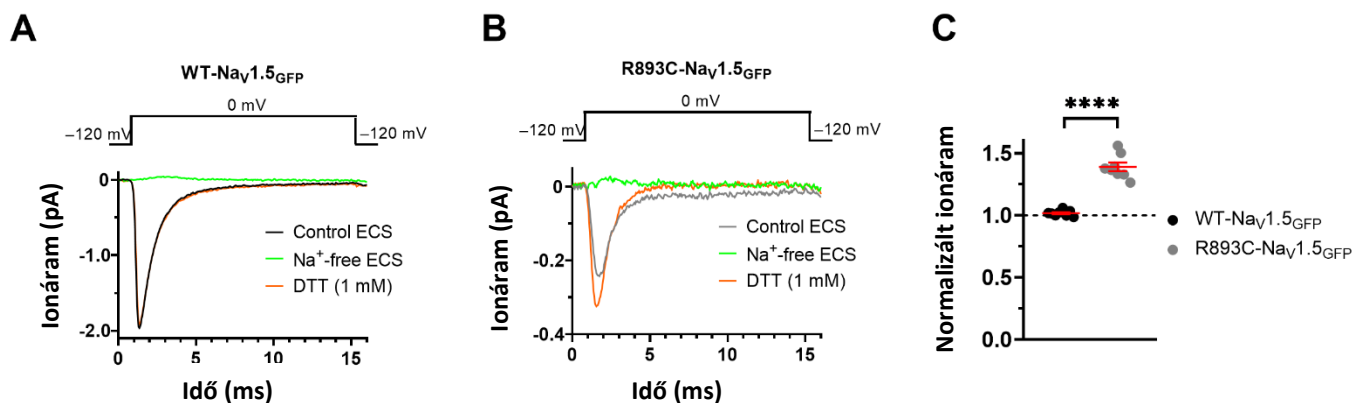
	Áramsűrűség	
	pA/pF	n
WT-Nav1.5	311.8 ± 31.8	15
WT-Nav1.5_{GFP}	340.6 ± 36.2	31
R893C-Nav1.5_{GFP}	15.8 ± 2.2****	19
Kevert	373.4 ± 33.9	47
R893H-Nav1.5_{GFP}	17.3 ± 3.5****	28

3. Táblázat: A CHO sejtekbe transzfektált különböző Nav1.5 konstruktok esetén mért maximális áramsűrűség értékek 0 mV-ra történő depolarizációt követően

4.4.3. Ditiotreitol (DTT) hatása az R893C mutáns csatornák működésére

A fenti kísérleteim bizonyítják, hogy a betegben azonosított SCN5A mutáció (R893C) a Nav1.5 funkcióvesztését okozza. Ezt követően a következő lépés a pontos molekuláris mechanizmus bizonyítása volt. Feltételezésünk szerint, a 893-as pozícióban létrejövő Arg->Cys csere a csatorna pórus régiójában diszulfid hidak képződéséhez vezethet. Ennek bizonyítására egy erős redukáló ágens, ditiotreitol (DTT) jelenlétében végeztem patch-clamp méréseket. A kiválasztott sejteket elsőként DTT hiányában, kontroll körülmények között, majd ezt követően 1 mM DTT jelenlétében 0 mV-ra depolarizáltam, majd normalizált ionáramot számoltam a következő képlet alapján: $I(t)/I_0$, melyben I_0 a DTT hiányában mért csúcsáram, $I(t)$ pedig a DTT modifikációs idő (t) után mért csúcsáram. WT-Nav1.5_{GFP} csatornákat kifejező CHO sejtek esetén, 2-3 perc DTT kezelést követően I_{Na} nem mutatott jelentős változást, a normalizált áram 1.02 ± 0.01 -nek ($n = 8$) adódott (22. ábra A). Ezzel szemben, az R893C-Nav1.5_{GFP} csatornákat kifejező CHO sejtek esetében, DTT applikációt követően az I_{Na} rendkívüli növekedését tapasztaltam: a normalizált áram 1.39 ± 0.03 ($n = 8$) volt ($P < 0.0001$, 22. ábra B, C). A fenti

eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a 893-as pozícióban lévő cisztein a pórus régióban található natív ciszteinekkel diszulfid hidak képződéséhez, és ezáltal a csatorna nyitási képtelenségéhez vezethet. DTT hozzáadása bontja ezeket a diszulfid hidakat és javítja a mutáns csatornák működését.

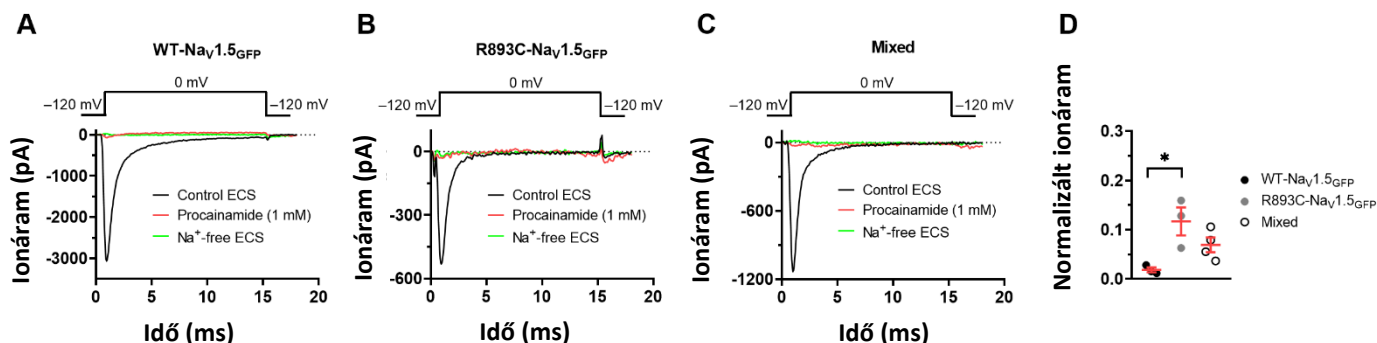


22. ábra: Reprezentatív teljes-sejt áramgörbék kontroll körülmények között (fekete/szürke), Na⁺ mentes külső oldattal (zöld) és DTT jelenlétében (narancs) WT-Nav1.5_{GFP} (A) és R893C-Nav1.5_{GFP} esetében (B). Az ábra C-részén a normalizált I_{Na} látható mindkét esetben. Az alkalmazott feszültség-protokollok és az adott paraméterek meghatározása a 3.7.3. fejezetben részletesen leírásra került. Az ábrán minden egyes egyedi adatpontot ábrázoltam, illetve az adott paraméterek átlag $\pm$ SEM értékeit tüntettem fel.

4.4.5. A prokainamid mutációfüggetlen hatása a Nav1.5 működésére

Betegünk esetében a BrS-ra típusos EKG eltérések reprodukálhatóak voltak prokainamid alkalmazásával, ezért szükségesnek láttuk igazolni, hogy az R893C mutáció esetén, a vad típushoz hasonlóan, a prokainamid érzékenység perzisztál. 1 mM prokainamiddal történt perfúzió hatására WT-Nav1.5_{GFP} és R893C-Nav1.5_{GFP} esetén egyaránt az I_{Na} teljes gátlása volt látható (23. ábra A és B). Ezen méréseket megismétltem a „kevert” csatornák esetében is, ahol a WT-Nav1.5_{GFP} és az R893C-Nav1.5_{GFP} együttesen expresszáldott. A prokainamid jelenlétében az I_{Na} gátlása ebben az esetben is teljes volt (23. ábra C). A 23. ábrán bemutatott kvantitatív analízis szerint az 1 mM prokainamid jelenlétében visszamaradó csúcsáram-frakció 0,12 alatt maradt, függetlenül a transzfektált konstruktól; a normalizált

áramértékek rendre $0,018 \pm 0,005$ ($n = 3$), $0,117 \pm 0,028$ ($n = 3$, $P = 0,0198$), illetve $0,069 \pm 0,015$ ($n = 4$, $P = 0,1796$) volt a WT-Nav_v1.5_{GFP}, R893C-Nav_v1.5_{GFP}, illetve kevert csatornák esetében.

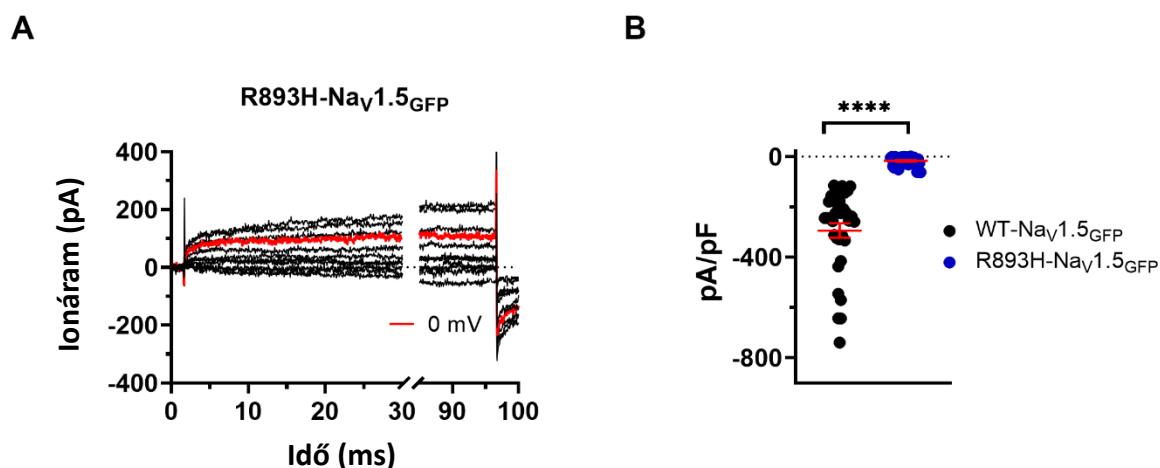


23. ábra: Extracellulárisan alkalmazott 1 mM prokainamid hatása a különböző Nav_v1.5 konstruktokra (A – WT-Nav_v1.5_{GFP}; B – R893C-Nav_v1.5_{GFP}; C – Kotranszfektált (kever) csatornák esetén) 0 mV-ra történő depolarizációt követően. Az alkalmazott feszültség-protokollok és az adott paraméterek meghatározása a 3.7.3. fejezetben részletesen leírásra került. Az ábrán minden egyes egyedi adatpontot ábrázoltam, illetve az adott paraméterek átlag $\pm$ SEM értékeit tüntettem fel.

4.4.6. Arg893 jelentősége a Nav_v1.5 működésében

A 893-as pozícióban lévő arginin (R893) evolúciós szempontból előnyös és nagy fokú konzerváltságot mutat (15. ábra). Ezen arginin jelentőségének bizonyítására elektrofiziológiai méréseket végeztem az R893H variánssal is. Amennyiben a funkcióvesztés oka nem a 893-as pozícióban lévő aminosav oldallánc töltésének változása, úgy R893H mutáns csatornák esetében is tapasztaltunk kell a korábban látott áramsűrűség csökkenést. R893H mutáns csatornákat kifejező CHO sejteken, teljes-sejt konfigurációban végeztem patch-clamp méréseket, mely során a mutáns csatornák jelentős funkcióvesztése volt tapasztalható: az R893H csatornát kifejező sejteket 0 mV-ra depolarizálva az áramsűrűség-értékekre (pA/pF-ban) a WT-Nav_v1.5_{GFP} esetén 340.6 ± 36.2 ($n = 31$) -, míg R893H-Nav_v1.5_{GFP} esetén 17.3 ± 3.5

($n = 28$) adódott ($P < 0.0001$, 24. ábra, 3. táblázat). Ezen eredmények alapján elmondható, hogy R893 jelenléte esszenciális a csatorna működésének szempontjából.

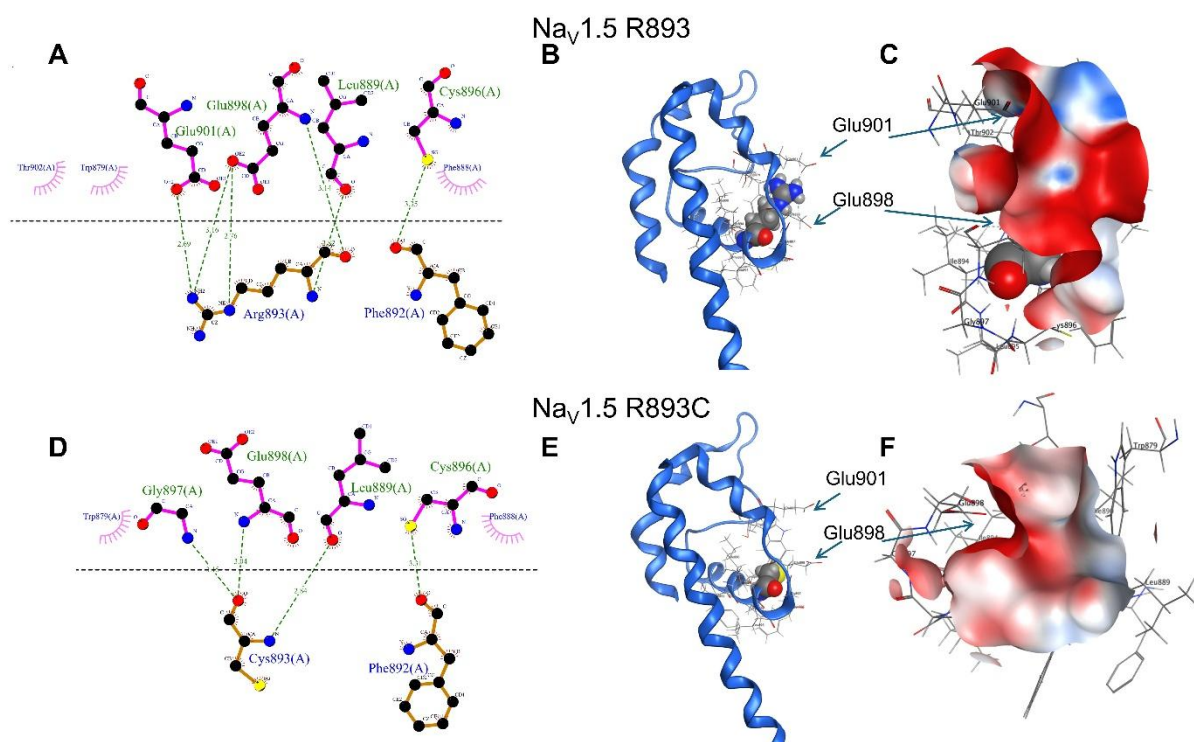


24. ábra: Az R893H mutáció hatása a Nav1.5 működésére. (A) Reprezentatív teljes-sejt áramgörbék -70 és $+50$ mV közötti tesztfeszültségeken, 10 mV-os lépésekben. (B) A 0 mV-ra történő depolarizáció során mért áramsűrűség-értékek. Egy adott sejt csúcsáram-sűrűségét legalább három, egymást 5 s-onként követő depolarizáló impulzus során kapott áramsűrűség-értékek átlagaként határoztam meg. Az ábrán minden egyes egyedi adatpontot ábrázoltam, az eredményeket átlag $\pm$ SEM formában adtam meg. **** jelzi a szignifikáns különbséget ($P < 0,0001$)

4.4.7. R893C Nav1.5 strukturális modellezése

Az R893 aminosav oldallánc ioncsatorna szerkezetet befolyásoló szerepének megértése érdekében megvizsgáltuk a humán Nav1.5 krio-elektronmikroszkópos felépítését (PDB: 7DTC). Ez alapján az R893 kulcsfontosságú szerepet játszik a pórus hélixének stabilizálásában, mivel három hidrogénkötést alakít ki az E898 és E901 glutamát-oldalláncokkal (25. ábra, A), ezáltal ezek negatív töltésű oldalláncait a pórus irányába orientálja (25. ábra, B). Ez a koordináció nagy valószínűséggel hozzájárul egy negatív töltésű elektrosztatikus környezet fenntartásához (25. ábra, C), amely elősegíti a Na^+ permeabilitást. Ezzel szemben az R893C mutáns esetében hiányzik az arginin térkitöltő oldallánca, amely szükséges lenne ezen koordinációhoz, így a fenti interakciók megszűnnek (25. ábra, D-E). Ennek következtében a

negatív töltéssűrűség ezen a területen jelentősen csökken (25. ábra, F), ami gátolhatja a Na⁺ ionok áthaladását a póruson.



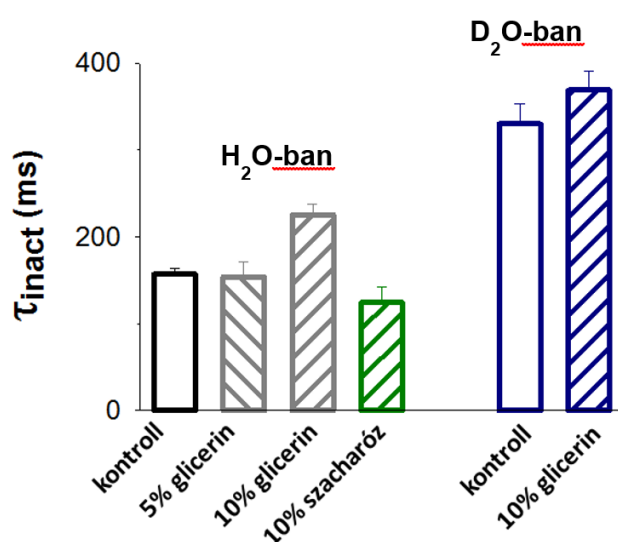
25. ábra: Az R893 nélkülözhetetlen a Na_v1.5 csatorna normál működéséhez. A szerkezeti jellemzők az (A–C) paneleken a WT-Na_v1.5GFP, míg a (D–F) paneleken az R893C-Na_v1.5GFP esetében kerülnek bemutatásra. (A, D): Az R893, illetve R893C két-dimenziós ligandum-interakciós ábrái. A fekete, piros, kék és sárga pontok rendre a szén-, oxigén-, nitrogén- és kénatomokat jelölik. Az atomokat és aminosav oldalláncokat körülvevő bíbor sugaras jelölés a környezeti expozíciót mutatja. A hidrogénkötések zöld szaggatott vonalakkal jelennek meg, feltüntetve a kötéshosszakat (Å). (B, E): Az R893, illetve R893C aminosav 3D-s interakciói a DII S5–S6 hurokban (kék szalagrészlet). Az atomokat gömbként, a környező oldalláncokat pedig pálcikaként ábrázoltuk. A nyilak az E898 és E901 glutamát oldalláncokra mutatnak, amelyek a pórus irányába orientálódnak. (C, F): A 893-as pozíció környezetéről (R893 és R893C) készített felszíni potenciáltérkép pillanatfelvételei, a csatorna pórusa felől nézve. A negatív töltés piros, a semleges fehér, a pozitív pedig kék színjelölést kapott.

5. Megbeszélés

5.1. A Shaker-IR K^+ -csatornák lassú inaktivációjának vizsgálata során nyert eredmények értékelése

Ugyan a C-típusú inaktiváció pontos mechanizmusa nem teljesen feltárt, ma már egyre biztosabbnak tűnik, hogy a folyamat stabilizálásában a szelektivitási szűrő mögötti régióban kialakuló hidrogénkötés-hálózat is fontos szerepet játszik. Molekuláris dinamikai modellszámítások alapján feltételezik, hogy a C-típusú inaktiváció során az inaktivált állapotot a szelektivitási filter mögé bejutó, úgynevezett inaktivációs vízmolekulák stabilizálják [Cordero-Morales és mtsai., 2011]. Ezen vízmolekulák jelenlétének kísérletes bizonyítására munkacsoportunk a nehézvíz inaktivációs kinetikára kifejtett hatásait vizsgálta [Tibor G. Szántó; Szabolcs Gaál és mtsai., 2021]. A nehézvíz előzőekben kifejtett inaktivációt, illetve az inaktivált állapotból történő visszatérést lassító hatásának oka a mai napig tisztázatlan. Felmerült, hogy a jelenség hátterében specifikus molekuláris kölcsönhatások, vagy nem specifikus hatásként a nehézvíz normál vízhez képest magasabb viszkozitása, illetve a K^+ -ionok megváltozó hidratációs energiája áll. Ezen utóbbi nem specifikus hatást munkacsoportunk korábban már sikeresen kizárta [Tibor G. Szántó; Szabolcs Gaál és mtsai., 2021]. Specifikus hatásokként felmerül az elsődleges, illetve másodlagos kinetikus izotópeffektus. A deutérium izotópeffektusai feszültségfüggő csatornákon már korábban bizonyítást nyertek. A normálvíz 99,8%-ának extra- illetve intracelluláris nehézvízre való cseréje egyaránt csökkentette a Na^+ és K^+ -konduktanciát tintahal (Meves, 1976; Conti és Palmieri, 1968) és Myxicola (Schauf és Bullock, 1979) óriás axonokon egyaránt. Később azt is megfigyelték, hogy bizonyos feszültségfüggő nátriumcsatornák aktivációs és inaktivációs kinetikája is lassabb nehézvíz jelenlétében, a normál vízhez képest (Starkus és mtsai., 1990). A kinetikus izotópeffektus által a protonáció/deprotonáció és/vagy H^+ -transzfer reakciók egyaránt érintettek, főleg amikor a H^+ közvetlenül részt vesz a reakció sebességmeghatározó

lépésében. A nehézvíz által kialakított hidrogénkötések a normál vízhez képest erősebbek, mivel a hidrogén és deutérium kötések relatív energiái közötti különbség, a zéró-pont vibrációs energia vagy molekuláris disszociációs energia (ZPVE) csökken. A zéró-pont vibrációs energia a kötések erősségének mérésére használható. Az O-H nyújtási vibrációra jelentős hatással van a deutérium jelenléte: a Hooke-törvény értelmében a hidrogént a vízmolekulában a nehezebb deutériumra cserélve a vibrációs frekvencia csökkenése, ezáltal egy kisebb ZPVE tapasztalható. Azonban, amikor egy atomot egy molekulában az izotópjára cserélünk, az erőállandó (k) nem változik. Tehát nehézvízben, ahogyan a hidrogénkötések is a molekulák között rövidebbé, úgy erősebbé is válnak. Mivel a fent leírt specifikus hatások érvényesülésének bizonyítása direkt árammérésekkel gyakorlatilag lehetetlen, kísérleteim során a viszkozitás hatásának kizárásával indirekt módon igyekeztem ezt megtenni. Eredményeim alapján a viszkozitás hatását ki lehet zárni, ugyanis a 26. ábráról leolvasható, hogy csak a 10%(m/m) glicerín vizes közegben volt képes szignifikáns változást okozni az inaktivációs időállandókban. A legnagyobb viszkozitású 10%(m/m) szacharózt tartalmazó oldat esetében és a valamivel kisebb viszkozitású 5%(m/m) glicerint tartalmazó oldat esetében sem tapasztaltam szignifikáns különbséget. A nehézvízes kontroll és a benne oldott 10%(m/m) glicerín hatása pedig nem mutatkozott additívnak, annak ellenére, hogy a viszkozitásuk különböző volt.



26. ábra: Különböző viszkozitású oldatok hatása Shaker-IR csatornák inaktivációs kinetikájára vizes, illetve nehézvízes közegben

Ezen információk alátámasztják korábbi feltevésünket, mely szerint a nehézvíz a szűrő mögötti régióba bejutva, molekuláris kölcsönhatások révén stabilizálja az inaktivált állapotot. Ezáltal egyfajta bizonyítékot nyertünk a korábban bemutatott inaktivációs vízmolekulák jelenlétéről a szelektivitási filter mögött. Ha a nehézvíz képes ebbe a régióba bejutni és direkt molekuláris kölcsönhatásokat létrehozni, akkor valószínűleg a normál víz is hasonlóképpen hat ebben a régióban és stabilizálja az inaktivált állapotot. Ezen tudás a későbbiekben hozzásegíthet minket a C-típusú inaktiváció mechanizmusának részletesebb megismeréséhez.

5.2. Nav1.5-R893C biofizikai karakterizálása során nyert eredmények értékelése

Tudományos munkám során egy 41 éves, sajátságos fenotípusos jellemzőket mutató, Brugada-szindrómával diagnosztizált férfibeteg genetikai vizsgálata során egy SCN5A mutációt (c.2677C>T, R893C) sikerült azonosítani, majd elektrofiziológiai módszerekkel karakterizáltam ezen mutáns fehérje biofizikai tulajdonságait. Betegünk esetében mind a korábban részletezett prokainamid teszt, mind invazív elektrofiziológiai vizsgálat során polimorf kamrai tachycardia (VT) volt indukálható. Tekintettel a spontán és provokált I. típusú Brugada-jelre, a visszatérő éjszakai eszméletvesztéses epizódokra, illetve a VT indukálhatóságra, primer prevenció ICD beültetése mellett döntöttünk, ugyanis ezen klinikai jellemzők magas hirtelen szívhalál rizikót jelentenek (Krahn és mtsai., 2022). Mindezek ellenére a beteg hosszútávú ritmuszavar mentessége alátámasztja, hogy szükség van új, megbízható prognosztikai markerek bevezetésére ezen betegpopulációban. Az SCN5A mutációt hordozókban a klinikai kimenetel rendkívül széles skálán változik a panaszmentességről, a hirtelen szívhalálig (Yan és Antzelevitch, 1999). Ezen kívül a betegség lefolyását genetikai és környezeti faktorok is befolyásolják (Hilber és mtsai., 2001; Tarradas és mtsai., 2013). A fentieket, és a betegség rendkívül változatos prognózisát figyelembe véve az SCN5A mutációk karakterizálása nagyon fontos a BrS patofiziológiájának megértéséhez és a további rizikóstratifikációhoz.

A c.2677 C>T nukleotid csere, a 893-as pozícióban arginin cisztein szubsztitúciót eredményez (R893C). Ez a pozíció az $\text{Na}_v1.5$ ioncsatorna II. doménjében, az S5-S6 szegmentumai között lévő extracelluláris hurok régióban található (5. ábra), amely részt vesz a csatorna pórusának alkotásában és a szelektivitási szűrő (SF) közvetlen közelében helyezkedik el. Ez a régió egy ún. mutációs “hotspot”-nak tekinthető a BrS mutációkat tekintve, ugyanis számos patogén variáció került már leírásra (Kapplinger és mtsai., 2010). Az általunk detektált heterozigóta R893C mutáció patogén voltát a következők alapján feltételeztük: 1) a szekvencia összehasonlítás alapján az R893 oldallánc evolúciós szempontból rendkívül konzervált a különböző emlős fajokban és human Na_v izoformákban egyaránt (15. ábra), ami feltételezi az arginin esszenciális voltát a normál csatornaműködés szempontjából; 2) az R893C irodalmi adatok és génmutációs adatbázisok alapján potenciálisan patogén voltának megfelelően rendkívül alacsony allélfrekvenciával rendelkezik [Kapplinger és mtsai., 2010; HGMD, Stenson és mtsai., 2020]; 3) R893C- $\text{Na}_v1.5_{\text{GFP}}$ csatornákon a vad típushoz képest drámai mértékű áramsűrűség csökkenést figyeltünk meg, amely alátámasztja ezen mutáció patogén voltát. BrS betegpopulációban a DII S5-S6 régióban számos mutációt írtak már le, beleértve a 893-as pozíciót is, azonban ez az első olyan vizsgálat, amely teljes biofizikai karakterizálás révén funkcionális információkat szolgáltat ezen mutáns fehérjék működéséről.

Kísérleteimben az N-terminálison GFP-vel jelölt $\text{Na}_v1.5$ konstruktokat használtam, ezáltal nyomon lehetett követni az ioncsatornák sejtfelszíni expresszióját. Elsőként karakterizáltam a WT- $\text{Na}_v1.5_{\text{GFP}}$ biofizikai paramétereit, majd összehasonlítottam a vad típusú, jelöletlen változattal (WT- $\text{Na}_v1.5$). Ezek a kísérletek igazolták, hogy az N-terminális GFP jelölés nem befolyásolja az $\text{Na}_v1.5$ normál funkcióját (17. ábra). R893C- $\text{Na}_v1.5_{\text{GFP}}$ csatornákat CHO és HEK293 sejtekben kifejezve drámai áramsűrűség-csökkenést és a csatornaműködést jellemző biofizikai paraméterek változását is tapasztaltam, bizonyítva ezzel, hogy a fenti mutáció a $\text{Na}_v1.5$ csatornák funkcióvesztését okozza (18. és 19. ábra). Általánosságban a BrS-

val összefüggésbe hozott $\text{Na}_v1.5$ mutációk LOF mutációknak tekinthetők, melyek leggyakrabban a csatornák kapuzási paramétereinek változtatása révén elégtelen ioncsatorna aktivációt, illetve az inaktív állapotból való visszatérés zavarát okozhatják (Tan és mtsai., 2003; Viswanathan és Balser, 2004). A befelé irányuló nátrium áram redukciója az akciós potenciál felszálló szárának meredekségét csökkenti, ezáltal a pitvari és kamrai ingervezetés lassulását, ami az EKG-n a PQ-szakasz megnyúlását és QRS szélesedését eredményezi (6. ábra). Heterozigóta BrS mutációk esetén az elérhető funkcióképes $\text{Na}_v1.5$ csatornák számának a csökkenése endo-epikardiális potenciálkülönbség kialakulásához és a jobb kamrai aktiváció késéséhez vezethet, ezáltal létrehozva a betegségre jellemző EKG eltéréseket a jobb prekordiális (V1-2) EKG elvezetésekben (Coronel és mtsai., 2005; Postema és mtsai., 2008) (6. ábra). Ezen endo-epikardiális feszültség, illetve a repolarizáció következményes heterogenitása adja a betegség „elektrofiziológiai aritmia szubsztrátját”. A csökkent Na^+ konduktancia hosszabb akciós potenciálhoz vezet, így az sebezhetőbbé válik a különböző korai és késői utódepolarizációk (Early Afterdepolarization - EAD és Delayed Afterdepolarization - DAD) számára, amelyek a tartós, akár fatális ritmuszavarok triggerei lehetnek. Amennyiben ezen depolarizáló impulzusok elérik a küszöb potenciál értékét, újabb akciós potenciált képesek létrehozni, amely az ún. „R on T” jelenség révén polimorf kamrai tachycardiát (VT) vagy kamrafibrillációt (VF) okozhat. Ezen kívül az AP plató (2.) fázisának megnyúlása fokozott diasztolés intracelluláris (ic.) Ca^{2+} beáramláshoz, ezáltal a szarkoplazmatikus retikulum (SR) Ca^{2+} túltöltöttségéhez és ezen keresztül gyakoribb korai és késői utódepolarizációk (EAD és DAD) megjelenéséhez vezethet [Gyorke and Terentyev, 2008]. A fenti eltéréseken kívül az R893C mutáns csatornák esetében lassabb aktivációs kinetikát és az egyensúlyi aktiváció feszültségfüggésének kisebb eltéréseit is megfigyeltem (19. ábra A és B). Meglepő módon, az R893C mutáció az $\text{Na}_v1.5$ egyensúlyi inaktiváció feszültségfüggésében is egy körülbelül 10 mV eltolódást okozott a pozitívabb membránpotenciálok felé (19. ábra C). Ezt a jelenséget már

korábban is leírták egy másik LOF $\text{Na}_v1.5$ mutáció (T1857I- $\text{Na}_v1.5$) esetében egy, a katekolaminerg polimorf kamrai tachycardia (CPVT) egy malignus fenotípusát mutató családban (Ghovanloo és mtsai., 2020). A pozitív membránpotenciálok felé való eltolódás növeli az elérhető, aktiválható csatornák számát, ezáltal a csökkent áramsűrűség miatti kompenzatorikus mechanizmusként játszik szerepet a mutáns csatornák működésében. Ez azt jelenti, hogy egy adott membránpotenciálon a mutáns csatornák inaktivációs valószínűsége csökken, ami az ingerlékenység fokozódásához vezet. Ezen elektrofiziológiai szubsztrát mellett BrS betegeken végzett invazív elektrofiziológiai vizsgálatok során a jobb kamrai kifolyó tractus (RVOT) epikardiális részén makroszkópos hegszövet képződés is megfigyelhető volt, mely a betegség “strukturális aritmia szubsztrátjának” tekinthető, ugyanis ezen területek radiofrekvenciás katéterablációja csökkenti a tartós ritmuszavarok indukálhatóságát és előfordulását (Krahn és mtsai., 2022). A fentiek értelmében az R893C mutáció által okozott funkcióvesztés és a következményes abnormális Na^+ homeosztázis egyaránt triggere és szubsztrátja is a tartós ritmuszavaroknak.

Vizsgálataink során számos kísérletben CHO sejteket használtam expressziós rendszerként. Ezen sejtek kiválóan alkalmazhatóak a legtöbb ioncsatorna biofizikai karakterizálására és farmakológiai vizsgálatokhoz annak ellenére, hogy gyakran fejeznek ki endogen nátrium csatornákat is, melyek kicsiny, befelé irányuló háttér áramot eredményezhetnek (Lalik és mtsai., 1993). Ezek tükrében fontos volt annak a kizárása, hogy a vad típushoz képest, az R893C mutáns $\text{Na}_v1.5$ csatornákon mért, kifejezetten alacsony I_{Na} valójában nem a CHO sejtekre jellemző endogén, hanem az R893C- $\text{Na}_v1.5_{\text{GFP}}$ -re specifikus ionáram. Az endogenitás kizárása a következő szempontok alapján történt: 1) Kísérleteim során rendkívül alacsony háttér Na^+ -áramot mértem. 2) R893C mutáns csatornákat endogén nátriumcsatornákkal nem rendelkező HEK293 sejtekbe transzfektálva, 0 mV-ra történő depolarizációt követően mért I_{Na} nem mutatott szignifikáns különbséget a CHO sejtekben

történő expresszióhoz képest. 3) Fluoreszcens konfokális mikroszkópiával kimutattuk az R893C-Nav1.5_{GFP} csatornák sejtmembránban történő expresszióját. 4) A tetrodotoxin (TTX) inszenzitív ($IC_{50} = 5.7 \text{ mM}$, (Gellens és mtsai., 1992; Lee and Ruben, 2008)) Nav1.5 csatornákkal ellentétben, az endogén nátriumcsatornák TTX szenzitívek [5 nM koncentrációban alkalmazott TTX az I_{Na} 60%-os csökkenését eredményezte (Lalik és mtsai., 1993)]. Kísérleteimben az R893C-Nav1.5_{GFP} csatornákhöz adott 0.5 uM TTX nem fejtett ki szignifikáns hatást az áramsűrűségre (18. ábra). A fentiek értelmében arra következtethetünk, hogy a CHO sejtekbe transzfektált, R893C mutáns csatornákon mért I_{Na} csökkenés nem a CHO sejtek endogén nátriumcsatornáinak, hanem a membránban kifejeződő, a megváltozott kapuzási tulajdonságai miatt funkcióját veszített Nav1.5 csatornák jelenlétének következménye.

A beteg heterozigóta mutációjára való tekintettel, vizsgáltam a szimultán expresszálódó WT-Nav1.5_{GFP} és R893C-Nav1.5_{GFP} hatását is a két variáns CHO sejtekben történő 1:1 arányú kotranszfekciójával (mindkét konstrukt esetén 1 ug plazmidot használtam), amely során meghatároztam az áramsűrűséget és a csatornák kapuzási paramétereit (21. ábra). Mivel minden kísérletben ugyanannyi DNS-t (azaz 1 μg WT csatornakódoló plazmidot) használtam, hasonló áramsűrűséget és kapuzási paramétereket vártam a vad típusú és kevert csatornák esetében. A mutáns csatornák jelenléte nem fejtett ki domináns negatív hatást a WT csatornák működésére, ugyanis a kotranszfektált (R893C-Nav1.5_{GFP} + WT-Nav1.5_{GFP}) és a WT csatornák esetében nem volt szignifikáns különbség sem az áramsűrűség-értékekben, sem pedig a kapuzási paraméterekben. Eredményeink hasonlóak négy, korábban már karakterizált heterozigóta SCN5A mutációhoz (T187I, D356N, K1678fs/52 és R1623X), melyeket ok-okozati összefüggésbe hoztak familiáris BrS, sick sinus szindróma (SSS) és AV blokk esetekkel: (Makiyama és mtsai., 2005). A fenti mutációk mindegyike funkcióképtelen Nav1.5 csatornák jelenlétéhez vezetett a vad típusú csatornákra kifejtett domináns negatív hatás nélkül, feltételezve ezzel, hogy a funkcióvesztés az SCN5A mutáció általános következménye.

Konfokális mikroszkópiával kimutattuk, hogy az R893C-Nav1.5_{GFP} és WT-Nav1.5_{GFP} esetén is hasonló a membránexpresszió, vagyis az R893C ioncsatornák is kijutnak a membránba, de funkcióképtelenek (20. ábra). Tekintettel arra a tényre, hogy betegünk esetében elvégzett prokainamid teszt sikeresen provokálta a BrS-ra jellegzetes EKG eltéréseket, vizsgáltuk az extracellulárisan alkalmazott 1 mM prokainamid hatását is, mely a mutációtól függetlenül teljes I_{Na} gátlást okozott (23. ábra).

Az R893C-Nav1.5_{GFP} csatornák funkcióvesztésének pontos molekuláris mechanizmusa teljesen még nem tisztázott. Az extracellulárisan alkalmazott 1 mM DTT részben helyreállította a mutáns csatornák működését (22. ábra). A krio-elektronmikroszkópos modellezés arra enged következtetni, hogy a 893-as pozícióban lévő cisztein diszulfid hidakat képezhet a környezetében lévő ciszteinekkel, például a C896-tal és C906-tal, illetve a Nav1.5 más doménjeiben található, azonos régióban lévő ciszteinekkel, mint például a C373 (DI), C1272 (DIII) vagy C1703 (DIV). Ezek a kötések megakadályozhatják a Nav1.5 natív konformációjának kialakulását, illetve destabilizálhatják a csatorna aktív konformációját. Hasonló mechanizmust mutattak ki az R878C mutáns Nav1.5 esetében, mely teljes funkcióvesztést és familiáris sick sinus szindrómát (SSS) okozott egy kínai családban (Zhang és mtsai., 2008). Az utóbbi időben egyre több irodalmi adat áll rendelkezésre, miszerint a Nav csatornák α -alegységei nem csak fizikai kölcsönhatásba lépnek egymással, hanem dimerként szerelődnek össze és működnek (Clatot és mtsai.). Bár néhány szabályozó régiót már sikerült feltárni (Clatot és mtsai.), a dimerizációs folyamat minden lépése még nem teljesen tisztázott. Ahogy korábban már említésre került, ezen pozíció a csatorna II. doménjének S5-S6 szegmentumait összekötő, pórust formáló, extracelluláris hurok régiójában, a szelektivitási szűrő (SF) közvetlen közelében található és rendkívül nagy evolúciós konzerváltságot mutat a különböző Nav izoformák között. A pórus régióban található mutációk konzisztensen befolyásolják a csatorna kapuzási paramétereit: a szelektivitási szűrő (SF) közelében lévő

mutációk több, mint 90%-a hatással van az áramsűrűsége, a csatorna funkcióvesztését okozva. Az SF mögötti régióban található konzervált argininek, mint az R367, R383, R878, R893 sóhidakat hoznak létre egyéb, negatív töltésű aminosav oldalláncokkal (Ahanger és mtsai., 2023). Ezen pozíciókban lévő argininek mutációi a fent említett kötések megszakadásához, ezáltal a SF konformáció változásához és a csatorna Na^+ permeabilitásának zavarához vezethetnek (Ahanger és mtsai., 2023). Ennek megfelelően, a 893-as pozícióban lévő arginin, két közelben lévő glutamáttal (E898 és E901) képez kritikus sóhidakat. Szerkezeti modellezés alapján az R893 a negatív töltésű glutamátokat a pórus felé irányítja, ezáltal kedvező elektrosztatikus potenciált tart fenn a Na^+ ionok permeációjához (25. ábra A és C). Ezzel szemben az R893C mutáció megzavarja a negatív töltéssűrűséget ebben a régióban, illetve a fent említett kötések megszakadásához, ezáltal a SF konformáció változásán keresztül pedig a Na^+ permeabilitás csökkenéséhez vezet.

A konzervált R893 kritikus szerepének megerősítésére, egy szintén BrS-ban szenvedő betegekben detektált misszensz mutáció, az R893H hatását is vizsgáltam (Kapplinger és mtsai., 2010; Kapplinger és mtsai., 2015). A hisztidin az argininhez hasonló fizikokémiai tulajdonságokkal bír, ugyanis mindkét aminosav rendelkezik pozitív töltésű oldallánccal, bár a hisztidin fiziológiás pH-n csak részben protonált. A mutáció funkcionális következményeinek vizsgálatára, az R893H- $\text{Na}_v1.5_{\text{GFP}}$ konstrukt biofizikai tulajdonságait tanulmányoztam CHO és HEK293 expressziós rendszerekben. A WT- $\text{Na}_v1.5_{\text{GFP}}$ -vel összehasonlítva, az R893H- $\text{Na}_v1.5_{\text{GFP}}$ -vel transzfektált sejteket 0 mV-ra depolarizálva nem sikerült makroszkopikus I_{Na} -t detektálni (24. ábra). Ezen eredmények alátámasztják a fent részletezett, konzervált arginin oldallánc jelentőségét a csatorna működésének szempontjából (Kapplinger és mtsai., 2010). Ennek megfelelően, a hasonlóképp konzervált R878 oldallánc mutációi (R878C és R878K), az irodalmi adatok alapján szintén funkcióképtelen csatornákat eredményeztek, a pozitív töltésű oldalláncok jelenlétének ellenére (Zhang és mtsai., 2008).

Összegzésképp elmondható, hogy egy BrS-val diagnosztizált, fiatal férfibeteg genetikai analízise során, egy $\text{Na}_v1.5$ pórus mutációt azonosítottunk (R893C). Ez a mutáció a $\text{Na}_v1.5$ funkcióvesztéséhez vezetett az I_{Na} drámai csökkenésén keresztül, illetve az egyensúlyi aktiváció és inaktiváció feszültségfüggésében egy pozitív eltolódást eredményezett, az inaktivált állapotból való visszatérés kinetikájának kismértékű változásai mellett. A mutáció által kiváltott biofizikai hatások, aritmogén környezetet teremtve, megalapozzák a betegnél megfigyelt fenotípusos jellemzőket. Habár az R893C mutáció ioncsatorna funkcióra gyakorolt hatása jelentős, nem zárhatjuk ki, hogy különböző élettani szabályozó mechanizmusok miatt, ezen változások natív kardiomiocitákban másképp mennek végbe, mint az általunk használt CHO és HEK293 expressziós rendszerekben. Eredményeim kiemelik a DII S5-S6 hurok régió jelentőségét a $\text{Na}_v1.5$ kapuzásában, illetve tovább erősítik a felvetést, miszerint az ioncsatorna szerkezet, a mutációk funkcionális hatásai és a klinikai kutatások közötti korrelációk feltárása segíti a különböző ioncsatorna betegségek mechanizmusának megértését. Ezen kívül a $\text{Na}_v1.5$ szerkezet-funkció megértése kulcsfontosságú prognosztikai információt szolgáltat a klinikusok számára, segítve ezzel a megfelelő betegszelekciót ICD beültetésre, illetve új megvilágításba helyezheti a hatékony gyógyszerek kifejlesztését a különböző SCN5A ioncsatorna-betegségekben szenvedő betegek részére.

6. Összegzés

Munkám során különböző, vad típusú és mutáns, feszültségkapuzott K^+ és Na^+ csatornák biofizikai karakterizálását végeztem el celluláris elektrofiziológiai vizsgálatok révén. Céлом egyrészt a szívizomban kifejeződő, gyors, feszültségfüggő nátriumcsatornát ($Na_v1.5$) kódoló SCN5A gén mutációival összefüggő, genetikailag meghatározott aritmia entitások molekuláris mechanizmusának feltárása, illetve a C-típusú inaktiváció molekuláris mechanizmusában szerepet játszó tényezők azonosítása révén a folyamat jobb megértése volt.

Kutatásom első részében a feszültségfüggő káliumcsatornák C-típusú inaktivációját stabilizáló, szelektivitási filter mögé bejutó, úgynevezett „inaktivációs vízmolekulák” által kialakított hidrogénkötés-hálózat jelenlétére kerestem kísérleti bizonyítékokat. Ennek céljából munkacsoportunk korábban a nehézvíz inaktivációt lassító hatását vizsgálta, mely feltételezésünk szerint specifikus molekuláris kölcsönhatások révén jön létre. Ezen specifikus hatások bizonyítása direkt árammérésekkel lehetetlen, így az aspecifikus hatások kizárásával ezt indirekt módon kívántuk megtenni. Munkám során a Shaker-IR csatornákon végzett mérések segítségével a nehézvíz magasabb viszkozitásának inaktivációt lassító hatását sikeresen kizártam, mely tovább erősíti a feltevést, hogy a nehézvíz, és ennek megfelelően a normál víz is bejut a szelektivitási filter mögé, stabilizálva a C-típusú inaktivációt.

Kutatásom második részében egy Brugada-szindrómával diagnosztizált betegnél felfedezett új mutáció teljes biofizikai karakterizálását végeztem el. A klinikai diagnosztikus algoritmust követően az azonosított R893C mutációt CHO és HEK sejtekben kifejezve patch-clamp technikával bizonyítottam annak patogén voltát, majd farmakológiai vizsgálatok és konfokális mikroszkópia segítségével feltártam a funkcióvesztés egy lehetséges mechanizmusának molekuláris részleteit, továbbá igazoltam a DII S5-S6 régió és bizonyos konzervált arginin oldalláncok kiemelt jelentőségét a csatornaműködés szempontjából.

Summary

In our present study, we performed biophysical characterization of various wild-type and mutant, voltage-gated potassium and sodium channels through cellular electrophysiological studies. Our goal was to explore the molecular mechanisms of genetically determined arrhythmias associated with mutations in the SCN5A gene, encoding the cardiac, fast, voltage-dependent sodium channel (Na_v1.5), and on the other hand, to better understand the process of C-type inactivation by identifying the factors involved using patch-clamp technique.

In the first part of our research, we were looking for evidence of the presence of a hydrogen bond network formed by „inactivation water molecules” behind the selectivity filter, that stabilize the C-type inactivation. For this purpose, our research group previously examined the inactivation slowing effect of heavy water on voltage-gated potassium channels, which we hypothesized to be caused by specific molecular interactions. Proving these specific effects through direct current measurements is impossible, so we aimed to do this indirectly by excluding nonspecific effects. In my work, through measurements conducted on Shaker-IR channels, I successfully ruled out the effect of heavy water's higher viscosity on slowing inactivation, which further strengthens the hypothesis that heavy water, and consequently normal water, enters behind the selectivity filter, stabilizing C-type inactivation.

In the second part of our research, we performed full biophysical characterization of a novel mutation discovered in a Brugada syndrome patient. After the clinical diagnostic protocol, we performed genealogical study and genetic testing, then expressed the detected mutation in CHO and HEK cells and confirmed its pathogenicity through patch-clamp studies. Subsequently, through confocal microscopy and pharmacological studies, we uncovered the molecular details of the loss of channel function, further confirming the critical importance of the DII S5-S6 region and certain conserved Arginine residues in channel function.

7. Új tudományos megállapítások

1. A nehézvíz magasabb viszkozitásának inaktivációt lassító hatását Shaker-IR csatornákon sikeresen kizártam, mely tovább erősíti a feltevést, hogy a nehézvíz, és ennek megfelelően a normál víz is bejut a szelektivitási filter mögé, stabilizálva a C-típusú inaktivációt.
2. Brugada-szindrómában szenvedő betegünknel genetikai vizsgálat során egy karakterizálatlan, potenciálisan patogén $Na_v1.5$ pórus mutációt sikerült detektálni (R893C).
3. Az R893C mutáns ioncsatornákon a vad típusú csatornákhöz képest szignifikánsan kisebb áramsűrűség volt mérhető, mely a mutáció patogén voltát feltételezi.
4. Konfokális mikroszkópos mérések során az R893C mutáns ioncsatornák megtartott membrán expresszióját mutattam ki.
5. Az R893C mutáns ioncsatornák jelenléte nem fejt ki negatív domináns hatást a vad típusú csatornák működésére.
6. Az extracellulárisan alkalmazott DTT részben helyreállította az R893C mutáns csatornák működését, mely a pórus régióban kialakuló Cys-Cys hidak jelenlétét feltételezi a funkcióvesztés hátterében.
7. Az evolúciós szempontból konzervált 893-as pozícióban lévő Arg oldallánc kritikus a $Na_v1.5$ működésének szempontjából, melyet a csatorna strukturális modellezése, illetve az R893H mutáns csatornák funkcióvesztése egyaránt igazolt.

New scientific achievements

1. I successfully excluded the possibility that the retarded inactivation induced by heavy water on Shaker-IR channels is due to its higher viscosity, which further supports the hypothesis that heavy water and consequently lightwater as well, can access the region behind the selectivity filter, thereby stabilizing C-type inactivation.
2. In our patient, diagnosed with Brugada syndrome, a previously uncharacterized, potentially pathogenic Nav1.5 pore-region mutation (R893C) was identified by genetic analysis.
3. R893C mutant ion channels exhibited significantly reduced current density compared to wild-type channels, supporting the pathogenic nature of the mutation.
4. Confocal microscopy measurements demonstrated preserved membrane expression of the R893C mutant ion channels.
5. The presence of R893C mutant ion channels did not exert a dominant-negative effect on the function of wild-type channels.
6. Extracellular application of DTT partially restored the function of R893C mutant channels, suggesting that the formation of Cys–Cys disulfide bonds in the pore region underlies the observed loss of function.
7. The evolutionarily conserved arginine at position 893 is critical for Nav1.5 function, as supported by structural modeling of the channel and the loss of function observed in R893H mutant channels.

8. Irodalomjegyzék

- Ahangar, A.A., E. Elhanafy, H. Blanton, and J. Li. 2023. Mapping Structural Distribution and Gating-Property Impacts of Disease-Associated Missense Mutations in Voltage-Gated Sodium Channels. *bioRxiv : the preprint server for biology*.
- Akai, J., N. Makita, H. Sakurada, N. Shirai, K. Ueda, A. Kitabatake, K. Nakazawa, A. Kimura, and M. Hiraoka. 2000. A novel SCN5A mutation associated with idiopathic ventricular fibrillation without typical ECG findings of Brugada syndrome. *FEBS Lett.* 479:29-34.
- Antzelevitch, C., P. Brugada, M. Borggrefe, J. Brugada, R. Brugada, D. Corrado, I. Gussak, H. LeMarec, K. Nademanee, A.R. Perez Riera, W. Shimizu, E. Schulze-Bahr, H. Tan, and A. Wilde. 2005. Brugada syndrome: report of the second consensus conference: endorsed by the Heart Rhythm Society and the European Heart Rhythm Association. *Circulation.* 111:659-670.
- Antzelevitch, C., and E. Nof. 2008. Brugada syndrome: recent advances and controversies. *Current cardiology reports.* 10:376-383.
- Andrew D. Krahn, MD, Elijah R. Behr, MBBS MD, Robert Hamilton, MD, MHSC, Vincent Probst, MD, PHD, Zachary Laksman, MD, MSC, Hui-Chen Han, MBBS, PHD. 2022. Brugada Syndrome. *JACC: Clinical Electrophysiology* Vol.8, NO. 3; March 2022: 386-405
- Benson, D.W., D.W. Wang, M. Dyment, T.K. Knilans, F.A. Fish, M.J. Strieper, T.H. Rhodes, and A.L. George, Jr. 2003. Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene (SCN5A). *J Clin Invest.* 112:1019-1028.
- Bezzina, C., M.W. Veldkamp, M.P. van Den Berg, A.V. Postma, M.B. Rook, J.W. Viersma, I.M. van Langen, G. Tan-Sindhunata, M.T. Bink-Boelkens, A.H. van Der Hout, M.M. Mannens, and A.A. Wilde. 1999. A single Na(+) channel mutation causing both long-QT and Brugada syndromes. *Circulation research.* 85:1206-1213.

- Blair, N.T., and B.P. Bean. 2002. Roles of tetrodotoxin (TTX)-sensitive Na⁺ current, TTX-resistant Na⁺ current, and Ca²⁺ current in the action potentials of nociceptive sensory neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 22:10277-10290.
- Brugada P, Brugada J. Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. *Circulation*. 1992;86(3):1011–1018.
- Brugada, J., and P. Brugada. 1997. Further characterization of the syndrome of right bundle branch block, ST segment elevation, and sudden cardiac death. *Journal of cardiovascular electrophysiology*. 8:325-331.
- Catterall, W.A., A.L. Goldin, and S.G. Waxman, *International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels*. Pharmacological reviews, 2005. **57**(4): p. 397-409.
- Cestèle, S. and W.A. Catterall, *Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels*. Biochimie, 2000. **82**(9-10): p. 883-892.
- Chen, P.S., and S.G. Priori. 2008. The Brugada syndrome. *Journal of the American College of Cardiology*. 51:1176-1180.
- Clairfeuille, T., H. Xu, C.M. Koth, and J. Payandeh. 2017. Voltage-gated sodium channels viewed through a structural biology lens. *Current opinion in structural biology*. 45:74-84.
- Clatot, J., M. Hoshi, X. Wan, H. Liu, A. Jain, K. Shinlapawittayatorn, C. Marionneau, E. Ficker, T. Ha, and I. Deschênes. Voltage-gated sodium channels assemble and gate as dimers.
- Cordero-Morales, J. F., Jogini, V., Chakrapani, S. & Perozo, E. A multipoint hydrogen-bond network underlying KcsA C-type inactivation. *Biophys J* **100**, 2387-2393, doi:10.1016/j.bpj.2011.01.073 (2011).

- Coronel, R., S. Casini, T.T. Koopmann, F.J. Wilms-Schopman, A.O. Verkerk, J.R. de Groot, Z. Bhuiyan, C.R. Bezzina, M.W. Veldkamp, A.C. Linnenbank, A.C. van der Wal, H.L. Tan, P. Brugada, A.A. Wilde, and J.M. de Bakker. 2005. Right ventricular fibrosis and conduction delay in a patient with clinical signs of Brugada syndrome: a combined electrophysiological, genetic, histopathologic, and computational study. *Circulation*. 112:2769-2777.
- de Lera Ruiz, M., and R.L. Kraus. 2015. Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications. *J Med Chem*. 58:7093-7118.
- Despa, S., and D.M. Bers. 2013. Na(+) transport in the normal and failing heart - remember the balance. *J Mol Cell Cardiol*. 61:2-10.
- Doyle, D. A. *et al*. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**, 69-77 (1998).
- Gabor Sandorfi, MD; Bela Clemens, MD, PhD; and Zoltan Csanadi, MD, PhD. 2013. Electrical Storm in the Brain and in the Heart: Epilepsy and Brugada Syndrome. *Mayo Clin Proc*. 2013;88(10):1167-1173
- Gellens, M.E., A.L. George, Jr., L.Q. Chen, M. Chahine, R. Horn, R.L. Barchi, and R.G. Kallen. 1992. Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89:554-558.
- Ghovanloo, M.R., J. Atallah, C.A. Escudero, and P.C. Ruben. 2020. Biophysical Characterization of a Novel SCN5A Mutation Associated With an Atypical Phenotype of Atrial and Ventricular Arrhythmias and Sudden Death. *Front Physiol*. 11:610436.
- Grandi, E., and A.W. Herren. 2014. CaMKII-dependent regulation of cardiac Na(+) homeostasis. *Front Pharmacol*. 5:41.

- Gyorke, S., and D. Terentyev. 2008. Modulation of ryanodine receptor by luminal calcium and accessory proteins in health and cardiac disease. *Cardiovasc Res.* 77:245-255.
- Harder, T., and K. Simons. 1997. Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol.* 9:534-542.
- Hilber, K., W. Sandtner, O. Kudlacek, I.W. Glaaser, E. Weisz, J.W. Kyle, R.J. French, H.A. Fozzard, S.C. Dudley, and H. Todt. 2001. The selectivity filter of the voltage-gated sodium channel is involved in channel activation. *J Biol Chem.* 276:27831-27839.
- Holmgren, M., P.L. Smith, and G. Yellen. 1997. Trapping of organic blockers by closing of voltage-dependent K⁺ channels: evidence for a trap door mechanism of activation gating. *J Gen Physiol.* 109:527-535.
- Itoh, H., M. Shimizu, H. Mabuchi, and K. Imoto. 2005. Clinical and electrophysiological characteristics of Brugada syndrome caused by a missense mutation in the S5-pore site of SCN5A. *Journal of cardiovascular electrophysiology.* 16:378-383.
- Juang, J.J., and M. Horie. 2016. Genetics of Brugada syndrome. *Journal of arrhythmia.* 32:418-425.
- J. López-Barneo, T. Hoshi, S.H. Heinemann, R.W. Aldrich, *Receptors Channels.* 1993;1(1):61-71.
- J. Ostmeyer, S. Chakrapani, A. C. Pan, E. Perozo & B. Roux, 2013, *Nature* vol. 501
- Mizusawa Y, Wilde AAM. Brugada syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2012;5:606-616
- Kapplinger, J.D., J.R. Giudicessi, D. Ye, D.J. Tester, T.E. Callis, C.R. Valdivia, J.C. Makielski, A.A. Wilde, and M.J. Ackerman. 2015. Enhanced Classification of Brugada Syndrome-Associated and Long-QT Syndrome-Associated Genetic Variants in the SCN5A-Encoded Na(v)1.5 Cardiac Sodium Channel. *Circ Cardiovasc Genet.* 8:582-595.
- Kapplinger, J.D., D.J. Tester, M. Alders, B. Benito, M. Berthet, J. Brugada, P. Brugada, V. Fressart, A. Guerchicoff, C. Harris-Kerr, S. Kamakura, F. Kyndt, T.T. Koopmann, Y.

- Miyamoto, R. Pfeiffer, G.D. Pollevick, V. Probst, S. Zumhagen, M. Vatta, J.A. Towbin, W. Shimizu, E. Schulze-Bahr, C. Antzelevitch, B.A. Salisbury, P. Guicheney, A.A. Wilde, R. Brugada, J.J. Schott, and M.J. Ackerman. 2010. An international compendium of mutations in the SCN5A-encoded cardiac sodium channel in patients referred for Brugada syndrome genetic testing. *Heart Rhythm*. 7:33-46.
- Keller, D.I., J.S. Rougier, J.P. Kucera, N. Benammar, V. Fressart, P. Guicheney, A. Madle, M. Fromer, J. Schlapfer, and H. Abriel. 2005. Brugada syndrome and fever: genetic and molecular characterization of patients carrying SCN5A mutations. *Cardiovasc Res*. 67:510-519.
- Kurata, H. T. & Fedida, D. A structural interpretation of voltage-gated potassium channel inactivation. *Prog Biophys Mol Biol* **92**, 185-208, doi:10.1016/j.pbiomolbio.2005.10.001 (2006).
- Lalik, P.H., D.S. Krafte, W.A. Volberg, and R.B. Ciccarelli. 1993. Characterization of endogenous sodium channel gene expressed in Chinese hamster ovary cells. *Am J Physiol*. 264:C803-809.
- Laskowski, R.A., and M.B. Swindells. 2011. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *J Chem Inf Model*. 51:2778-2786.
- Lee, C.H., and P.C. Ruben. 2008. Interaction between voltage-gated sodium channels and the neurotoxin, tetrodotoxin. *Channels (Austin, Tex.)*. 2:407-412.
- Li, Z., X. Jin, T. Wu, G. Huang, K. Wu, J. Lei, X. Pan, and N. Yan. 2021a. Structural Basis for Pore Blockade of the Human Cardiac Sodium Channel Na(v) 1.5 by the Antiarrhythmic Drug Quinidine*. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*. 60:11474-11480.
- Li, Z., X. Jin, T. Wu, X. Zhao, W. Wang, J. Lei, X. Pan, and N. Yan. 2021b. Structure of human Na(v)1.5 reveals the fast inactivation-related segments as a mutational hotspot for the

- long QT syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 118.
- Makiyama, T., M. Akao, K. Tsuji, T. Doi, S. Ohno, K. Takenaka, A. Kobori, T. Ninomiya, H. Yoshida, M. Takano, N. Makita, F. Yanagisawa, Y. Higashi, Y. Takeyama, T. Kita, and M. Horie. 2005. High risk for bradyarrhythmic complications in patients with Brugada syndrome caused by SCN5A gene mutations. *Journal of the American College of Cardiology*. 46:2100-2106.
- McPhee, J.C., D.S. Ragsdale, T. Scheuer, and W.A. Catterall. 1994. A mutation in segment IVS6 disrupts fast inactivation of sodium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91:12346-12350.
- McPhee, J.C., D.S. Ragsdale, T. Scheuer, and W.A. Catterall. 1995. A critical role for transmembrane segment IVS6 of the sodium channel alpha subunit in fast inactivation. *J Biol Chem*. 270:12025-12034.
- Meng, E.C., T.D. Goddard, E.F. Pettersen, G.S. Couch, Z.J. Pearson, J.H. Morris, and T.E. Ferrin. 2023. UCSF ChimeraX: Tools for structure building and analysis. *Protein Sci*. 32:e4792.
- Meregalli, P.G., H.L. Tan, V. Probst, T.T. Koopmann, M.W. Tanck, Z.A. Bhuiyan, F. Sacher, F. Kyndt, J.J. Schott, J. Albuissou, P. Mabo, C.R. Bezzina, H. Le Marec, and A.A. Wilde. 2009. Type of SCN5A mutation determines clinical severity and degree of conduction slowing in loss-of-function sodium channelopathies. *Heart Rhythm*. 6:341-348.
- Miyazaki T, Mitamura H, Miyoshi S, Soejima K, Aizawa Y, Ogawa S. Autonomic and antiarrhythmic drug modulation of ST segment elevation in patients with Brugada syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 1996;27:1061–1070.

- Nilsson, J., B. Persson, and G. von Heijne. 2005. Comparative analysis of amino acid distributions in integral membrane proteins from 107 genomes. *Proteins*. 60:606-616.
- Postema, P.G., P.F. van Dessel, J.M. de Bakker, L.R. Dekker, A.C. Linnenbank, M.G. Hoogendijk, R. Coronel, J.G. Tijssen, A.A. Wilde, and H.L. Tan. 2008. Slow and discontinuous conduction conspire in Brugada syndrome: a right ventricular mapping and stimulation study. *Circulation. Arrhythmia and electrophysiology*. 1:379-386.
- Ragsdale, D.S., J.C. McPhee, T. Scheuer, and W.A. Catterall. 1994. Molecular determinants of state-dependent block of Na⁺ channels by local anesthetics. *Science*. 265:1724-1728.
- Rivolta, I., H. Abriel, M. Tateyama, H. Liu, M. Memmi, P. Vardas, C. Napolitano, S.G. Priori, and R.S. Kass. 2001. Inherited Brugada and long QT-3 syndrome mutations of a single residue of the cardiac sodium channel confer distinct channel and clinical phenotypes. *J Biol Chem*. 276:30623-30630.
- Roden, D.M., R. Lazzara, M. Rosen, P.J. Schwartz, J. Towbin, and G.M. Vincent. 1996. Multiple mechanisms in the long-QT syndrome. Current knowledge, gaps, and future directions. The SADS Foundation Task Force on LQTS. *Circulation*. 94:1996-2012.
- Satin, J., J.W. Kyle, M. Chen, P. Bell, L.L. Cribbs, H.A. Fozzard, and R.B. Rogart. 1992. A mutant of TTX-resistant cardiac sodium channels with TTX-sensitive properties. *Science*. 256:1202-1205.
- Schmidt, D., Q.X. Jiang, and R. MacKinnon. 2006. Phospholipids and the origin of cationic gating charges in voltage sensors. *Nature*. 444:775-779.
- Shao, D., K. Okuse, and M.B. Djamgoz. 2009. Protein-protein interactions involving voltage-gated sodium channels: Post-translational regulation, intracellular trafficking and functional expression. *Int J Biochem Cell Biol*. 41:1471-1481.
- Sieira J, Conte G, Ciconte G, et al. A score model to predict risk of events in patients with Brugada syndrome. *Eur Heart J*. 2017;38:1756–1763.

- Sroubek J, Probst V, Mazzanti A, et al. Programmed ventricular stimulation for risk stratification in the Brugada syndrome: a pooled analysis. *Circulation*. 2016;133:622–630.
- Stenson, P.D., M. Mort, E.V. Ball, M. Chapman, K. Evans, L. Azevedo, M. Hayden, S. Heywood, D.S. Millar, A.D. Phillips, and D.N. Cooper. 2020. The Human Gene Mutation Database (HGMD(®)): optimizing its use in a clinical diagnostic or research setting. *Human genetics*. 139:1197-1207.
- Szántó GT, Zakany F, Papp F, Varga Z, Deutsch CJ, Panyi G. The activation gate controls steady-state inactivation and recovery from inactivation in Shaker. *J Gen Physiol*. 2020;152(8):e202012591. doi:10.1085/jgp.202012591
- Tan, H.L., C.R. Bezzina, J.P. Smits, A.O. Verkerk, and A.A. Wilde. 2003. Genetic control of sodium channel function. *Cardiovasc Res*. 57:961-973.
- Tarradas, A., E. Selga, P. Beltran-Alvarez, A. Perez-Serra, H. Riuro, F. Pico, A. Iglesias, O. Campuzano, V. Castro-Urda, I. Fernandez-Lozano, G.J. Perez, F.S. Scornik, and R. Brugada. 2013. A novel missense mutation, I890T, in the pore region of cardiac sodium channel causes Brugada syndrome. *PLoS One*. 8:e53220.
- Tibor G. Szanto, Szabolcs Gaal, Izhar Karbat, Zoltan Varga, Eitan Reuveny, and Gyorgy Panyi. 2021. Shaker-IR K⁺ channel gating in heavy water: Role of structural water molecules in inactivation. *Journal of General Physiology*. Vol. 153 No. 6
- Vecchietti, S., E. Grandi, S. Severi, I. Rivolta, C. Napolitano, S.G. Priori, and S. Cavalcanti. 2007. In silico assessment of Y1795C and Y1795H SCN5A mutations: implication for inherited arrhythmogenic syndromes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 292:H56-65.
- Veldkamp, M.W., P.C. Viswanathan, C. Bezzina, A. Baartscheer, A.A. Wilde, and J.R. Balser. 2000. Two distinct congenital arrhythmias evoked by a multidysfunctional Na(+) channel. *Circulation research*. 86:E91-97.

- Viskin S, Adler A, Rosso R. Brugada burden in Brugada syndrome: the way to go in risk stratification? *Heart Rhythm*. 2013;10:1019–1020.
- Viswanathan, P.C., and J.R. Balser. 2004. Inherited sodium channelopathies: a continuum of channel dysfunction. *Trends in cardiovascular medicine*. 14:28-35.
- Wang, Q., Z. Li, J. Shen, and M.T. Keating. 1996. Genomic organization of the human SCN5A gene encoding the cardiac sodium channel. *Genomics*. 34:9-16.
- Xiong, W., Y.Z. Farukhi, Y. Tian, D. Disilvestre, R.A. Li, and G.F. Tomaselli. 2006. A conserved ring of charge in mammalian Na⁺ channels: a molecular regulator of the outer pore conformation during slow inactivation. *The Journal of physiology*. 576:739-754.
- Yan, G.X., and C. Antzelevitch. 1999. Cellular basis for the Brugada syndrome and other mechanisms of arrhythmogenesis associated with ST-segment elevation. *Circulation*. 100:1660-1666.
- Zhang, Y., T. Wang, A. Ma, X. Zhou, J. Gui, H. Wan, R. Shi, C. Huang, A.A. Grace, C.L. Huang, D. Trump, H. Zhang, T. Zimmer, and M. Lei. 2008. Correlations between clinical and physiological consequences of the novel mutation R878C in a highly conserved pore residue in the cardiac Na⁺ channel. *Acta physiologica (Oxford, England)*. 194:311-323.
- Zimmer, T., C. Biskup, S. Dugarmaa, F. Vogel, M. Steinbis, T. Bohle, Y.S. Wu, R. Dumaine, and K. Benndorf. 2002. Functional expression of GFP-linked human heart sodium channel (hH1) and subcellular localization of the α subunit in HEK293 cells and dog cardiac myocytes. *J Membr Biol*. 186:1-12.
- Zimmer, T., and R. Surber. 2008. SCN5A channelopathies--an update on mutations and mechanisms. *Progress in biophysics and molecular biology*. 98:120-136.

9. Kulcsszavak

Brugada-szindróma, SCN5A, teljes genom szekvenálás, patch-clamp technika, farmakológia, arginin, Shaker-IR, C-típusú inaktiváció, nehézvíz, viszkozitás

Keywords: Brugada-syndrome, SCN5A, whole-genome sequencing, patch-clamp technique, pharmacology, arginine, Shaker-IR, C-type inactivation, heavy water, viscosity

10. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, **Dr. Szántó G. Tibornak**, aki már tudományos diákköri munkám kezdete óta segítette tudományos gondolkodásom kialakulását, segítséget nyújtott a kutatás megtervezésében, az eredmények értékelésében és a disszertáció elkészítésében, illetve **Dr. Csanádi Zoltán** professzor úrnak, aki lehetővé tette, hogy doktori tanulmányaimat a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Kardiológiai és Szívsebészeti Klinikáján végezzem, tanácsaival a kezdetek óta segítette tudományos munkámat, kardiológiai szemléletmódom kialakulását és eredményeim helyes értelmezését.

Köszönettel tartozom **Dr. Panyi György** professzor úrnak, hogy kutatásom kísérletes részét a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetében végezhettem. Köszönöm professzor úrnak, hogy biztosította a szükséges eszközöket, valamint szakmai és tudományos útmutatásait, melyekkel hozzájárult kutatásunk színvonalas kivitelezéséhez.

Hálával tartozom továbbá **Dr. Balogh István** professzor úrnak, hogy segített a genetikai vizsgálatok megtervezésében, kivitelezésében, valamint szakmai tanácsaival elősegítette az eredményeink értékelését, genetikai ismereteim fejlődését.

Külön köszönöm **Dr. Arnódi-Mészáros Beátának**, **Dr. Volkó Juliannának** **Dr. Vörös Orsolyának** és **Dr. Pethő Zoltánnak**, hogy hozzájárultak kísérleteim helyes kivitelezéséhez és az ehhez szükséges ismeretanyag elsajátításához, valamint szakmai tanácsaikkal segítették a tanulmány létrejöttét. Köszönet illeti meg **Nagy Cecília Rózsát** és **Bagosi Adrienn**nt, illetve a patch-clamp labor minden munkatársát, hogy szükség esetén rendelkezésemre álltak, gyors segítséget nyújtottak, és ezzel hozzájárultak a kutatás praktikus kivitelezéséhez.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni **családomnak** a munkám során nyújtott támogatást és biztatást.

11. Függelék



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/113/2026.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Gaál Szabolcs Máté
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10076653

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Gaál, S. M.**, Mészáros, B., Volkó, J., Bilakovics, N., Naseem, M. U., Pethő, Z., Sándorfi, G., Menkő, G., Vörös, O., Balogh, I., Panyi, G., Csanádi, Z., Szántó, G. T.: Characterization of the R893C NaV1.5 mutation in Brugada syndrome.
Front. Cardiovasc. Med. 13, 1-18, 2026.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fcvm.2026.1726536>
IF: 2.9 (2024)
2. Szántó, G. T., **Gaál, S. M.**, Karbat, I., Varga, Z., Reuveny, E., Panyi, G.: Shaker-IR K⁺ channel gating in heavy water: role of structural water molecules in inactivation.
J. Gen. Physiol. 153 (6), 1-27, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1085/jgp.202012742>
IF: 4

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 6,9

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 6,9

A DEENK a Jelölt által a Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2026.03.16.

