

# **DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Dr. Diszházi Gyula**

## **Kalcium függő ioncsatornák szerepe szekretoros epítéletek működésében**

**DEBRECENI EGYETEM**

**MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2022.**

# **DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

## **Kalcium függő ioncsatornák szerepe szekretoros epitésejtek működésében**

**Dr. Diszházi Gyula**

**Témavezető: Dr. Almássy János**



**DEBRECENI EGYETEM  
MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA  
Debrecen, 2022.**

Rövidítések.....	1
I. Bevezetés.....	2
II. Irodalmi áttekintés .....	4
II/1. Glanduláris epitélisejtek – Hasnyálmirigy és könnymirigy .....	4
II/2. A könnymirigy- és hasnyálmirigy acinus sejtek szekréciós mechanizmusa .....	4
II/3. Intracelluláris Ca <sup>2+</sup> homeosztázis .....	6
II/3.1. Az intracelluláris Ca <sup>2+</sup> raktárak szerepe .....	6
II/3.2 Az extracelluláris térből származó Ca <sup>2+</sup> szerepe .....	10
II/3.3 A Ca <sup>2+</sup> -oszcilláció szabályozása .....	11
II/3.4 Az intracelluláris Ca <sup>2+</sup> -szintet csökkentő mechanizmusok .....	12
II/3.5 A Ca <sup>2+</sup> -szerepe az akut hasnyálmirigy-gyulladásban.....	13
II/3.7 A Ca <sup>2+</sup> -szerepe a könnymirigy kórélettanában .....	14
II/4. A kalcium célmolekulái.....	16
II/4.1 Ca <sup>2+</sup> -függő klorid csatornák (Calcium activated chloride channels – CaCCs) .....	16
II/4.2 Ca <sup>2+</sup> -függő kálium csatornák.....	18
II/4.3 Ca <sup>2+</sup> -függő TRPM csatornák.....	20
III. Problémafelvetés és célkitűzés .....	23
III/1. A könnysekreációs modell újragondolása .....	23
III/2. A TRPM4, a membrán potenciál és a Ca <sup>2+</sup> beáramlás közötti kapcsoló .....	25
IV. Metodikák.....	27
IV/1. Acinus sejt izolálás .....	27
IV/2. A könnymirigy acinus sejteken végzett villanófény-fotolízis, elektrofiziológiai és mikrofluorimetriás [Ca <sup>2+</sup> ] -mérések.....	28
IV/3. A hasnyálmirigy acinus sejteken végzett elektrofiziológiai- és Ca <sup>2+</sup> -imaging mérések .....	30
IV/4. Immuncitokémia.....	32
IV/5. Statisztikai kiértékelés .....	33
IV/6. RNS izolálás, reverz transzkripció és kvantitatív real-time PCR .....	33

V. Eredmények.....	34
V/1. Könnymirigy acinus sejten végzett kísérletek eredményei.....	34
V/1.1 Térben limitált villanófény-fotolízis, Ca <sup>2+</sup> -imaging és elektrofiziológiai mérések.....	34
V/1.2 Immuncitokémia .....	41
V/2. Hasnyálmirigy acinus sejten végzett kísérletek eredményei.....	43
V/2.1 QPCR kísérletek.....	43
V/2.2 Elektrofiziológiai mérések.....	45
V/2.3 Ca <sup>2+</sup> -imaging mérések.....	50
VI. Megbeszélés.....	56
VII/a. Összefoglalás .....	63
VII/b. Summary.....	65
VIII. Új eredmények.....	67
IX. Irodalomjegyzék.....	68
X/a. Tárgyszavak.....	77
X/b. Key words .....	78
XI. Köszönetnyilvánítás.....	79

## **Rövidítések**

ACh – acetilkolin

CCK – kolekisztokinin

([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) - intracelluláris kalcium koncentráció

SOCE - Store operated calcium entry

STIM1 - stromal interaction molecule 1

SERCA - szarko- és endoplazmatikus retikulum Ca<sup>2+</sup> ATP-áz

TG – thapsigargin

CPA – ciklopiazonsav

TRP - tranziens receptor potenciál

CBA - 4-kloro-2-[[2-(2-klorofenoxi)acetil]amino]benzoesav

PM - plazmamembrán

AM – apikális membrán

LM – laterális membrán

BM – bazális membrán

NU - sejtmag

SG - szekretoros granulunok

ZG – zimogén

NKCC - Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> kotransporter

NKE - Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-pumpa

BK - Ca<sup>2+</sup>-függő K<sup>+</sup>-pumpa

CaCC - Ca<sup>2+</sup>-függő Cl<sup>-</sup>-csatorna

PMCA - plazmamembrán Ca<sup>2+</sup>-ATPáz

VT – vad típusú egér

TRPM4 KO – génkiütött egér

CPA – ciklopiazonsav

9-Ph - 9-Phenanthrol

CBA - 4-Chloro-2-[[2-(2-chlorophenoxy)acetyl]amino] benzoic acid

MP – membránpotenciál

A.U. – önkényes egység (arbitrary unit)

# I. Bevezetés

A kutatásom során enzimatiskus emésztéssel izolált könny- és hasnyálmirigy acinus sejteken vizsgáltam különböző ioncsatornák szerepét, plazma membránban való elhelyezkedését és működésbeli összefüggéseiket az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációval  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

Az elsődleges könnysekrétum kiválasztása az egyrétegű epitél sejtrétegen, egyirányba transzportált vízen és ionokon alapszik. Ez a mechanizmus mind a transzporterek, mind az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -jel aszimmetrikus apiko-bazális eloszlását követeli meg. Az egér könnymirigy acinus sejtekben a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő ioncsatornák azonosítása és lokalizálása volt a fő célunk. Az eredményeink azt mutatják, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{K}^+$ -áram paxillin érzékeny, elhelyezkedése apikálisan kifejezett, bazálisan elhanyagolható, és a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{Cl}^-$ -árammal azonos membránkompartimentben helyezkedik el. Mindebből feltételezhető, hogy a  $\text{K}^+$  és a  $\text{Cl}^-$  is az acinuslumenbe szekretálódik, amely magyarázatot ad a primer sekrétum magas lumenális  $\text{Cl}^-$  koncentrációjára ( $\sim 141$  mM), de ellentmond az alacsony  $\text{K}^+$ -koncentrációnak ( $< 17$  mM). Az előzőekből következik, hogy a  $\text{K}^+$  valamilyen mechanizmussal visszajut az acinus sejtbe az elsődleges könnysekrétumból, ezért feltételeztük a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pumpa jelenlétét a plazma membrán apikális részén. A hipotézist specifikus  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -pumpa antitest alkalmazásával végzett immunfestéssel ellenőriztük, és igazolást nyert, hogy a bazális mellett az apikális oldalon is található  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pumpa a könnymirigy acinus sejten. Eredményeink alapján egy új könnysekrétiós modellt javasolunk, melyben a paracelluláris  $\text{Na}^+$ -transzport kiegészül egy transzcelluláris útvonallal, az ehhez szükséges hajtóerőt pedig a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -pumpa biztosítja.

Az elsődleges hasnyálmirigy-sekrétum kiválasztásában jelentős szerepe van a hasnyálmirigy acinus sejt  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -jének, ezért célunk az acinus sejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -függő ioncsatornáinak feltérképezése, szerepük tisztázása volt. A QPCR tesztünk alapján nagy expressziót mutatott a TRPM4 csatorna a mirigyben, ezért kísérleteink során az egér hasnyálmirigy acinus sejtekben vizsgáltuk ezen csatorna szerepét. A TRPM4 csatorna egy  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált nem szelektív monovalens kation csatorna, ezért feltételeztük, hogy a szekretagóg stimulus hatására megemelkedő  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  aktiválja azt, és a rajta keresztül a sejtbe áramló kationok depolarizálják a sejtet, a  $\text{Ca}^{2+}$  hajtóereje lecsökken, így alacsonyabb lesz a beáramló  $\text{Ca}^{2+}$  mennyisége.

Kísérleteink során patch-clamp módszerrel igazoltuk, hogy egér hasnyálmirigy acinus sejten található  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált  $\text{Na}^+$ -áram, amely a TRPM4 gátlószereivel (CBA, 9-Phenanthrol) gátolható volt. Továbbá áram-clamp körülmények között igazoltuk, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{Na}^+$ -áram a sejtmembrán átlagos  $\sim 17$  mV-os depolarizációját okozza, amely szintén gátolható volt CBA-val. Annak érdekében, hogy tesztelhesük a depolarizáció hatását a  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlásra,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  méréseket végeztünk, amelyek alapján megállapítható, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlás meredeksége TRPM4 génkiütött és CBA-val kezelt acinus sejteken magasabb a kontrollhoz képest, míg a TRPM4 génkiütött sejteken a  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlásából származó intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -jel amplitudója is emelkedett. Az eredményeink alapján igazolást nyert a hipotézisünk, miszerint a TRPM4 aktivációja csökkenti a  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlás hajtóerejét a plazmamembránon keresztül.

## ***II. Irodalmi áttekintés***

Az epiteliális szövetek előfordulása a szervezetben nagyon széleskörű, többek között a mirigyhámot is epitélium építi fel. Fontos alaptulajdonságai ezen szöveteknek, hogy kevés a sejtközötti állományuk, a sejtek között pedig különböző típusú sejtkapcsolatok (junkciók) találhatóak, melyek rögzítik a sejtek egymáshoz viszonyított helyzetét. Az említett junkciók elválasztják a lumenális és az intersticiális folyadékteret, emellett megakadályozzák a sejtmembrán fehérjekomponenseinek mozgását, ezzel elválasztva a sejtek nagyon különböző fehérje-összetételű apikális és bazális membránrégióját. A sejtek polarizáltsága sejtorganellum szinten is megfigyelhető, vagyis az ellátott funkciónak megfelelően helyezkednek el a kompartmentumok (1,2).

### ***II/1. Glanduláris epitelsejtek – Hasnyálmirigy és könnymirigy***

A mirigyhámot (glanduláris epitélium) egy vagy többféle, különböző anyagok szintézisére és szekréciójára specializálódott epitelsejt alkotja. A mirigyek lehetnek belső elválasztásúak (endokrin), melyeknek nincs kivezetőcsövük (duktusz), ezért közvetlenül a környező szövetekbe szekretálnak, és lehetnek külső elválasztásúak (exokrin), melyek szekréta a duktuszon keresztül, közvetetten jut a külső környezetbe. A többsejtű, fehérjetermelő (szerózus) exokrin mirigyek esetében két, elhelyezkedését és működését tekintve is elkülöníthető sejtcsoportot különböztetünk meg: a tubulusokat kialakító duktális sejteket és a kis zsebekké záródott alveolusokat (acinus) alkotó acinus sejteket (1). A kutatómunkám során a hasnyálmirigy és könnymirigy exokrin elválasztásért felelős acináris epitelsejtjeinek működését (a továbbiakban acinus sejt) vizsgáltam.

### ***II/2. A könnymirigy- és hasnyálmirigy acinus sejtek szekréciós mechanizmusa***

Az exokrin mirigyek, mint a hasnyál-, könny- és nyálmirigy megfelelő szekretagóg (pl. acetilkolin (ACh) vagy kolecisztokinin (CCK)) hatására fehérjét és NaCl-ban gazdag folyadékot szekretálnak. A folyadékszékreció megértését a patch-clamp technika fejlődése tette lehetővé, amely segítségével különböző ionpermeabilitás változásokat mértek a szekreció alatt, és hasonló változásokat tapasztaltak  $Ca^{2+}$ -ionofór jelenlétében is. Ebből már az 1980-as években arra

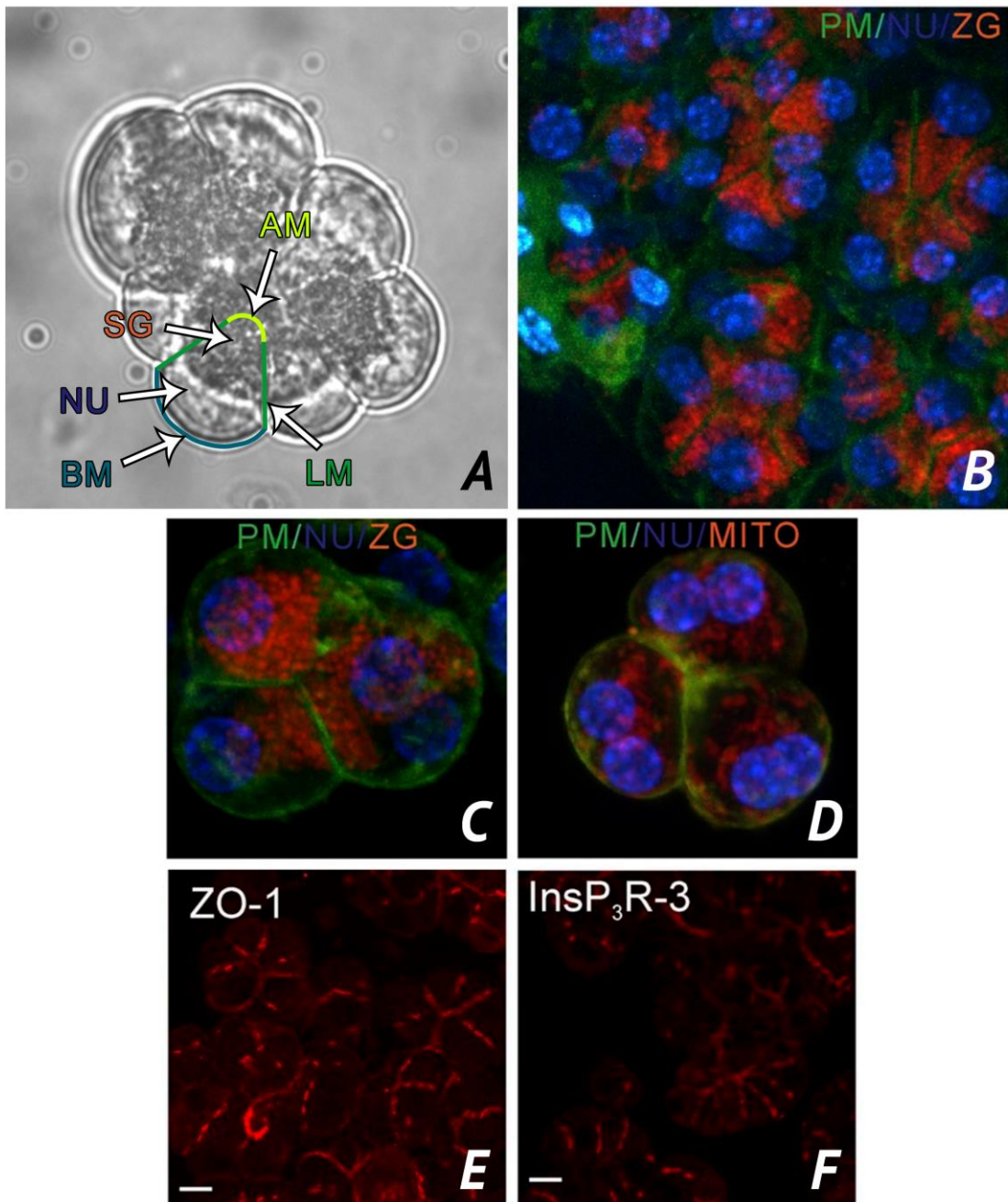
következtettek, hogy a szekretagóg stimulációnál a másodlagos hírvivő a  $\text{Ca}^{2+}$ , melynek emelkedése különböző csatornákat aktiválva elindítja a folyadék- és enzimszekréciót (2). Az exokrin acinus sejtek elektromos stimulus hatására nem alakítanak ki akciós potenciált (nem ingerlékeny sejtek), hanem különböző fiziológiás agonisták hatására a nyugalmi membránpotenciál jelentős változása nélkül, belső és külső kalciumforrásból emelkedik meg az intracelluláris kalcium koncentrációjuk ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). A megemelkedő  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  aktiválja az acinus sejtek szekréciós mechanizmusait, mely hatására az apikális oldalon az enzimek szekréciója valósul meg exocitózissal, illetve ezzel párhuzamosan folyadékszékreció is zajlik, mely folyamat során a sejt bazális oldala felől az apikális oldala felé az adott mirigyre jellemző ionösszetételű folyadék kerül továbbításra. Az egyirányú exocitózis és ionmozgatás feltétele az acinus sejtek polarizált felépítése, így a sejtalkotók a következőképpen helyezkednek el a sejtben: a durva endoplazmatikus retikulum (RER) és a sejtmag a sejt bazális oldalán, a Golgi ciszterna a sejtmag fölött, míg az exocitózissal felszabaduló granulumok a sejt apikális oldalán találhatóak. Az acinus sejtek közötti úgynevezett szoros kapcsolatok (nem valódi tight junction) találhatóak, melyek a sejtmembránt egy kisebb apikális és egy nagyobb bazolaterális membrán szakaszra osztják fel (1. ábra). A membrán polarizáltságára jellemző, hogy a szekretagógokra érzékeny receptorok csak a bazális membránban találhatóak, amelyek aktiválása elindítja az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  emelkedését előidéző belső jelátviteli folyamatokat. A bazolaterális oldalon található a  $\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+ \text{-} 2\text{Cl}^-$ -kotranszporter, amely a kloridot bejuttatja a sejtbe a sejt közötti térből. Kizárólag az apikális membránban található viszont a kalcium aktivált klorid csatorna (Calcium dependent chloride channel – CaCC, jelen esetben TMEM16A), amely a  $\text{Cl}^-$  kilépését biztosítja a lumen felé. A transzepiteliális folyadék kiválasztásának fő lépése a megemelkedő  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  hatására az apikális membránban található  $\text{Cl}^-$ -csatornák megnyílása. A folyamatos  $\text{Cl}^-$ -utánpótlást a  $\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+ \text{-} 2\text{Cl}^-$  kotranszporter biztosítja, melynek működéséhez a hajtóerőt a  $\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+$ -pumpa szolgáltatja. A szekretált kloridot követi a  $\text{Na}^+$  vagy a  $\text{K}^+$  kilépése, akár a sejtben kation csatornán keresztül, akár paracellulárisan (áteresztő tight junction) a sejt közötti térből (2. ábra) (3,4,5). Ezen ioncsatornák folyadékszékrecióban betöltött szerepéről később részletesebben lesz szó.

### ***II/3. Intracelluláris Ca<sup>2+</sup> homeosztázis***

A könny- és hasnyálmirigy acinus sejtek a fő fiziológiás szekretagóg anyagokat tekintve részben megegyeznek: muszkarinerg acetil-kolin receptor (mAChR) mindkettő sejtípus bazális membránjában jelen van, míg a pankreász acinus sejteken kolecisztoxinin receptor (CCKR) és a gasztrint felszabadító peptid receptor (gastrin-releasing peptide receptor – GRPR) is található. A vegetatív (paraszimpatikus) neurotranszmitter ACh, illetve a hormon CCK és a szintén neurotranszmitter bombezin azonos belső jelátviteli mechanizmussal emelik az [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-t. Az említett agonisták egy specifikus, egymással rokon 7-transzmembrán domén receptorhoz kötődnek, melynek hatására a receptorhoz kapcsolódó heterotrimer Gq fehérje aktiválódik. Az elindított belső jelátviteli folyamat megnöveli a foszfoinozítid (PI) specifikus foszfolipáz C aktivitását, amely a membránban található foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfátot (PIP<sub>2</sub>) bontja szolubilis inozitol-triszfoszfátra (IP<sub>3</sub>) és membrán kötött diacil-glicerolra (DAG). Az IP<sub>3</sub> az [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> emelkedését indukálja, a DAG pedig a protein kináz C-t (PKC) aktiválja (6, 7, 8, 9).

#### ***II/3.1. Az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> raktárak szerepe***

Mind a könnymirigy, mind a hasnyálmirigy acinus sejtek stimulációra adott Ca<sup>2+</sup>-jelei jellemző időbeli és térbeli tulajdonságokat mutatnak: akár szekretagóg stimulációval, akár a bazális oldalon mesterségesen kiváltott, teljes sejtre kiterjedő IP<sub>3</sub> felszabadítással (IP<sub>3</sub> uncaging) emeljük meg az IP<sub>3</sub>-szintet, a Ca<sup>2+</sup>-jel először az apikális sejtrészben figyelhető meg és csak ezt követően láthatunk teljes sejtre kiterjedő Ca<sup>2+</sup>-jelet (10). A kezdeti, apikálisan megjelenő Ca<sup>2+</sup>-jel egyik magyarázata, hogy az IP<sub>3</sub> receptorok nagyobb arányban az ER apikálisan található membránjában helyezkednek el (11). Másrészt a Ca<sup>2+</sup>-jel mintázatát árnyalhatja, hogy a szekretagóg receptorok és az IP<sub>3</sub> termelődése a tight junction-ök területére, vagyis a laterális membránszakasz apikális régiót körülölelő szakaszára tehető, és valószínűleg ez az IP<sub>3</sub> keletkezés és IP<sub>3</sub> receptorok közötti távolság is magyarázhatja a kezdeti Ca<sup>2+</sup>-jelek tér- és időbeli jellegzetességeit (12, 13). Az *1. ábra F panelén* az IP<sub>3</sub> receptorok elhelyezkedését igazoló, immunfestéssel készült képeket mutatja be (14).



**1. ábra Az acinus sejtek membránszakaszai, intracelluláris szerkezeti felépítése, és az  $IP_3$  receptorok elhelyezkedése**

Az A panelen kollagenáz emésztéssel nyert, néhány hasnyálmirigy acinus sejtből álló csoport látható áteső fényben. Különböző színnel láthatóak azok a sejtrészek, melyeket Almássy és mtsai. festettek fültőmirigy acinus sejteken, különböző immunfestékekkel (B, C, D, E, F panelek). A plazmamembrán (PM) három területe különíthető el: AM – apikális membrán, LM – laterális membrán, BM – bazális membrán. Élő sejtmarkerekkel festett sejtek láthatóak a B, C és D paneleken, a B panelen emésztetlen, míg a C és D paneleken emésztéssel nyert sejtripletek láthatóak. Zöld színnel a PM, a bazálisban elhelyezkedő sejtmag (NU), a perinukleáris mitokondrium sárgával, illetve a zimogéneket tartalmazó

*szekretoros granulunok (SG) szintén sárgával láthatóak. Az E és F panel fültőmirigy acinus sejtcsoport immunfestéséről készült képeket mutatja, az E panel a tight-junction-ök (Zonula occludens) elhelyezkedését, míg az F panel az IP<sub>3</sub> receptorok apikális pozícióját szemlélteti (14).*

A [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> emelkedése a sejt apikális régiójában jelenik meg először, amely az apikálisan elhelyezkedő ER (az úgynevezett „trigger zóna”) IP<sub>3</sub> receptorain keresztül felszabaduló Ca<sup>2+</sup> következménye, és amennyiben alacsonyabb fiziológiás agonista koncentráció (< 100 pM cholecystokinin (CCK), < 1 μM carbachol (CCh)) (15) indukál kalcium-felszabadulást az ER-ből, akkor nem alakul ki teljes sejtre kiterjedő Ca<sup>2+</sup>-hullám (12). Ezeknél a szubmaximális koncentrációknál jellegzetes, oszcilláló, relatíve rövid ideig tartó Ca<sup>2+</sup>-csúcsok regisztrálhatóak, melyek feltételezhetően energetikailag gazdaságos jelet biztosítanak a szekréciónak (12). Ezek az oszcilláló Ca<sup>2+</sup>-jelek az apikális/granuláris területen lokalizálódnak, tovaterjedő Ca<sup>2+</sup>-hullám nem figyelhető meg, mely részben az IP<sub>3</sub> receptorok apikális elhelyezkedésének (11), részben a mitokondriális barriernek köszönhető (16). A hasnyálmirigy acinus sejtekben három mitokondrium csoport különíthető el: 1) Perigranuláris mitokondrium: az apikális, granulomokat tartalmazó régióban található és funkciója a Ca<sup>2+</sup>-pufferelés (barrier szerep), illetve az ATP biztosítása a nagy energiaigényű szekréciónak mechanizmusokhoz. Feltételezhető, hogy szoros kapcsolatban van az ER-mal. 2) Perifériás mitokondrium: a bazális oldalon található, feladata az extraceluláris térből bejutó Ca<sup>2+</sup> felvétele. 3) Perinukleáris mitokondrium: a sejtmagot körülölelve védelmet nyújt a túl magas Ca<sup>2+</sup>-koncentráció okozta apoptózis ellen (17).

Ha nagyobb, de még mindig fiziológiás agonista koncentráció (> 300 pM CCK, > 1 μM CCh) (18) váltja ki a kalcium felszabadulást, akkor apiko-bazális irányban hullámszerűen terjedő emelkedő intracelluláris kalcium koncentráció emelkedés figyelhető meg, és ebben a folyamatban az apikális membránban nagy sűrűségben megtalálható IP<sub>3</sub> receptorokon kívül a bazálisan elhelyezkedő RyR-ök is szerepet játszanak. A RyR mind a 3 izotípusa kifejeződik a könny- és a hasnyálmirigyben, de eltérő arányban (19, 20, 21). A RyR-t az IP<sub>3</sub> receptoron keresztül az intracelluláris térbe jutó, ER-ből felszabaduló Ca<sup>2+</sup> aktiválja, és ezt az öngerjesztő folyamatot nevezzük kalcium indukált kalcium felszabadulásnak (CICR). Ugyanakkor az IP<sub>3</sub> receptort az IP<sub>3</sub> érzékenyíti a Ca<sup>2+</sup>-kötődésére, így az IP<sub>3</sub> receptoron felszabaduló Ca<sup>2+</sup> maga is aktiválja a csatornát (IP<sub>3</sub> jelenlétében). A RyR és az IP<sub>3</sub> receptor Ca<sup>2+</sup>-indukált regeneratív Ca<sup>2+</sup>-felszabadítása eredményezi a teljes sejtre kiterjedő Ca<sup>2+</sup>-szint emelkedést, amely még mindig fiziológiás válasznak tekinthető (22, 23, 24).

Szupramaximális szekretagóg koncentrációt (>1 nM CCK, >1 mM CCh) alkalmazva a RyR-ok oly mértékben felerősíthetik a  $\text{Ca}^{2+}$ -jelet, hogy az már patofiziológiássá válik. A magas  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  eredményeként a lizoszómák és a zimogén tartalmú vezikulumok fúzionálnak, a lizoszomális proteázok aktiválják a zimogéneket és az intracelluláris térben az aktív enzimek a sejt önmérsztését okozzák, ami hasnyálmirigy gyulladás kialakulásához vezet (25, 26, 27, 28, 29).

Az ER mellett más jelentős  $\text{Ca}^{2+}$ -raktárak is jelen vannak az acinus sejtekben, melyek a zimogéneket tartalmazó szekréciós granulumok és a lizoszómák. Ezeket a raktárakat savas  $\text{Ca}^{2+}$ -raktáraknak nevezzük, a vezikulumban uralkodó savas pH miatt, és a  $\text{Ca}^{2+}$  valamilyen proton –  $\text{Ca}^{2+}$  kicserélő mechanizmussal juthat be a raktárba. A teljes  $\text{Ca}^{2+}$ -jelhez 15%-ban járul hozzá a savas raktárakból felszabaduló  $\text{Ca}^{2+}$ , mintegy felerősíti a  $\text{Ca}^{2+}$ -szint emelkedést, melyet az  $\text{IP}_3$  receptor elindított. A savas organellumokból a  $\text{Ca}^{2+}$ -kiáramlás NAADP (nikotinsav adenin dinukleotid foszfát) receptorokon keresztül valósul meg. A NAADP receptora a TPC (two pore channel), amelyen közvetlenül kötődve hat a NAADP, míg a RyR-t és az  $\text{IP}_3$  receptort közvetetten aktiválja a CICR mechanizmuson keresztül. Sokat kutatott terület, hogy miként hat kölcsön a RyR, az  $\text{IP}_3\text{R}$  és a TPC a  $\text{Ca}^{2+}$ -jel kialakításában, és az oszcillációk generálásában, illetve hogy milyen kölcsönhatás van a raktárak között. Egyrészt térben elég közel vannak egymáshoz ahhoz, hogy kölcsönhassanak, másrészt szerepet játszanak olyan aktiválószerék a  $\text{Ca}^{2+}$ -jelátvitelben, melyek a  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadítást mind az ER-ből és mind a savas organellumokról aktiválják (az  $\text{IP}_3$ , a ciklikus adozin-difoszfát-ribóz (cADPr) és a NAADP), ezzel egy nagyon komplex szabályozó mechanizmust kialakítva, amely több pozitív visszacsatoló kört is tartalmaz. A savas organellumokból NAADP hatására felszabaduló kalciumnak egyre nagyobb szerepet tulajdonítanak az exocitózis szabályozásában (11, 30-35). A cADPr és a NAADP eltérő szerepet kap a hasnyálmirigy és a könnymirigy acinus sejtek intracelluláris kalcium koncentrációjának szabályozásában, ugyanis a cADPr indukált kalcium felszabadulás sokkal inkább CCK stimuláláshoz kapcsolódik, a könnymirigy acinus sejtek viszont nem rendelkeznek CCK receptorral, illetve a savas organellumok mennyisége és elhelyezkedése is eltérő, ami a cADPr jelentőségének különbözőségét okozza. Mindezek mellett fontos megemlíteni még, hogy fiziológiás koncentrációban az ACh nem, de a CCK aktiválja a foszfokináz A (PKA) enzimet, amely foszforilálja az  $\text{IP}_3$  receptort, ezzel növelve a kalcium felszabadulást (4, 36, 37).

### ***II/3.2 Az extracelluláris térből származó Ca<sup>2+</sup> szerepe***

Putney 1986-ban fogalmazta meg a receptor-vezérelt kalcium belépés modelljét, ahol az ER Ca<sup>2+</sup>-raktár ürülését követően az extracelluláris térből beáramló Ca<sup>2+</sup> segít a raktár újratöltésében. Mivel a felszabadult Ca<sup>2+</sup> egy részét a plazma membrán Ca<sup>2+</sup>-ATP-áz kijuttatja a sejtből, így a hosszan tartó Ca<sup>2+</sup>-jel fenntartásában, ezzel a szekréción mechanizmusok folyamatos működtetésében fontos szerepe van ennek a külső Ca<sup>2+</sup>-forrásnak. Kísérletesen IP<sub>3</sub>, ionomycin vagy EGTA kalcium kelátor alkalmazásával ürítették a raktárakat, melynek hatására egy elnyújtott, befelé irányuló Ca<sup>2+</sup>-áramot regisztráltak, amely az IP<sub>3</sub> adagolásának felfüggesztését követően egészen addig fennállt, míg az ER Ca<sup>2+</sup>-szint vissza nem állt a kiindulási értékre. Ezt a feszültség-függést nem mutató, befelé irányuló Ca<sup>2+</sup>-felszabadulás aktivált Ca<sup>2+</sup>-áramot nevezzük CRAC áramnak (calcium release activated calcium current – I<sub>crac</sub>, kapacitív Ca<sup>2+</sup>-áram) (56, 57). A raktárürítéshez kapcsolt kalcium beáramlás (Store operated calcium entry – SOCE) során beáramló Ca<sup>2+</sup> a bazális oldalon jut be a sejtbe, majd a perifériás mitokondriumba és ER-be kerül. A mitokondrium és az ER kapcsolatban áll egymással, illetve maga az ER is folytonos egésznek tekinthető, a felvett Ca<sup>2+</sup> pedig az ER-ben másodpercek alatt eljuthat a sejt apikális oldalára, ezzel biztosítva a folyamatos Ca<sup>2+</sup> utánpótlást. Viszont alacsony szekretagóg stimulálásra hosszú ideig képes oszcilláló Ca<sup>2+</sup>-jelet adni a sejt anélkül, hogy a SOCE működésbe lépne, mivel a SERCA pumpa vissza tudja venni a kis mennyiségű, szakaszosan felszabaduló kalcium nagy részét az ER-be (38-41), és így a plazma membrán kalcium ATP-áz (PMCA) elhanyagolható mértékben üríti az ER Ca tartalmát.

Miután az ICRAC áramot felfedezték a patch-clamp technika segítségével, elindult a molekuláris háttérmechanizmusok feltérképezése (42). Kiderült, hogy a SERCA pumpa irreverzibilis gátlószerével, a thapsigarginnal (TG) indukálható, úgynevezett TG-szenzitív áram, vagyis az ICRAC aktiválásában egy, az ER-ben található transzmembrán fehérje, a STIM1 (stromal interaction molecule 1) játszik kulcsszerepet (43). A STIM1 ER-be nyúló EF doménje érzékeli a raktár kalcium töltöttségét, és ha a Ca<sup>2+</sup>-koncentráció csökken, olyan konformáció változást szenved ennek hatására, amely a STIM1 oligomerizációját és transzlokációját eredményezi az ER plazmamembránhoz közeli részére. Azokon a pontokon, ahol nagyon közel tud kerülni egymáshoz a két membránszakasznak, úgynevezett pontok jönnek létre ilyenkor a STIM1 és az Orai fizikai kapcsolódása miatt (44, 45, 46), és ezeken a pontokon Ca<sup>2+</sup> lép be a sejtbe. Sokáig úgy gondolták, hogy csak jelentős raktárürülés

indíthatja be a SOCE-t, viszont alacsony, de hosszan tartó fiziológias szekretagóg stimuláció hatására is, mikor még csak az apikális  $\text{Ca}^{2+}$ -oszcilláció jelenik meg az acinus sejtekben, kimutatható olyan jelentős átmeneti  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció csökkenés az ER-ben, ami mobilizálja a STIM1-et (47).

A CRAC-ért felelős ioncsatorna a *Drosophila* S2 sejteken az olf186-F gén által kódolt, melyet Orai génnek neveztek el. Az ennek megfelelő humán gén a 12-es kromoszómán kódolódik, és mutációja súlyos kombinált immundefektust (SCID) okoz (48). Az Orai csatorna 6 alegységből épül fel (hexamer), melynek megnyílását a STIM1 direkt fizikai kontaktussal okozza, az úgynevezett SOAR régiójával (STIM1 Orai activating region) kapcsolódva az Orai csatornához (49, 50, 51).

Az Orai csatornán beáramló  $\text{Ca}^{2+}$  csak az egyik komponense a CRAC áramnak, emellett a tranziens receptor potenciál (TRP) csatorna család is szerepet játszik a SOCE áramban. Kezdetben TRP overexpresszáló Sf9 sejteken mutatták ki a thapsigargin-érzékeny  $\text{Ca}^{2+}$ -áramot, amelynek ionszelektivitása eltér az CRAC áramétól (52). Később, a TRP receptor-szuperfamilia farmakológiai modulátorainak fejlődésével sikerült azonosítani, hogy a SOCE-ban szereplő TRP receptorok a kanonikus család (TRPC) tagjai. Ezen belül az 1-es és 3-as típus az, ami mind a hasnyál-, mind a könnymirigy acinus sejtekben megtalálhatóak. Mindkettő nem szelektív  $\text{Ca}^{2+}$  csatorna. Különböző membrán lipidek ( $\text{PIP}_2$ , DAG, koleszterol) aktiválják a TRPC receptor családot (53, 54), de az Orai csatornához hasonlóan a STIM1 fehérje is aktiválhatja őket (55). Sőt, molekuláris és biokémiai adatok alapján úgy tűnik, hogy a STIM1/TRPC/Orai-1 tercier komplex részt vesz a CRAC áram kialakításában (56).

### ***II/3.3 A $\text{Ca}^{2+}$ -oszcilláció szabályozása***

Az alacsony szekretagóg stimulációra megjelenő  $\text{Ca}^{2+}$ -oszcilláció nagyon fontos szerepet játszik az acinus sejt szekréciónak tevékenységében. Az oszcilláció közvetlen kiváltója az  $\text{IP}_3$ - $\text{IP}_3\text{R}$  útvonal aktivációja, a visszacsatoló szabályozást pedig a  $\text{Ca}^{2+}$  adja. Két elmélet létezik az oszcilláció kialakulására:

- 1) Egyenletes  $\text{IP}_3$  koncentráció mellett, a  $\text{Ca}^{2+}$  váltakozva pozitív-negatív visszacsatoló mechanizmussal aktiválja-gátolja az  $\text{IP}_3$  receptort.
- 2) A változó  $\text{IP}_3$  koncentráció miatt alakul ki, ami annak köszönhető, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$  a foszfolipáz C-t ( $\text{IP}_3$  termelés) és a 3-kinázt ( $\text{IP}_3$  lebontás) is szabályozza (57).

Különböző sejtekben az oszcilláció extracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációtól való függése eltérő. Vannak sejtípusok, ahol csak az intracelluláris raktáraknak és vannak, melyeknél az extracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -nak is szerepe van az oszcilláció kialakításában. Érdekes, hogy a hasnyálmirigy acinus sejtben a 70 nM ACh-nal kiváltott oszcillációk megszűnnek, ha az extracelluláris térben a  $[\text{Ca}^{2+}]$ -t 1,2 mM-ról 100 nM-ra csökkentették, majd az ACh koncentrációt 100 nM-ra emelve újra kiváltható volt (58). Ennek az eredménynek az a magyarázata, hogy a nagyobb szekretagóg stimulációval több  $\text{Ca}^{2+}$  szabadult fel az ER-ből, amely a csökkentett extracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció ellenére is kiváltotta az oszcillációt. Megfordítva a gondolatmenetet pedig arra a következtetésre jutunk, hogy a sejt  $\text{Ca}^{2+}$ -töltöttsége (az ER és a citoplazma  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalma összesen) kulcsszerepet játszik az oszcilláció kialakulásában, a sejt megfelelően magas  $\text{Ca}^{2+}$ -töltöttsége nélkül az oszcilláció nem tud kialakulni. Ezt az elméletet az oszcillációk kialakulásának, frekvenciájának és amplitudójának megértéséhez kidolgozott matematikai modell is alátámasztja, mely szerint amennyiben a  $\text{Ca}^{2+}$ -töltöttség küszöb felett van, akkor elég citoplazmatikus  $\text{Ca}^{2+}$  van az  $\text{IP}_3\text{R}$  aktiválásához és elég  $\text{Ca}^{2+}$  van az ER-ben ahhoz, hogy a hajtóerő meglegyen a  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabaduláshoz. Amennyiben küszöb alá esik a  $\text{Ca}^{2+}$ -töltöttség, az oszcillációk leállnak (59). Az oszcilláció frekvenciájával foglalkozó kutatások egyre nagyobb szerepet tulajdonítanak a frekvenciakódolt szabályozásnak a különböző élettani folyamatokban, melyet eddig a tüdő és arteriola simaizmok esetén írtak le (60).

### ***II/3.4 Az intracelluláris $\text{Ca}^{2+}$ -szintet csökkentő mechanizmusok***

Ahhoz, hogy az acinus sejtek az akár 1  $\mu\text{M}$  koncentrációig emelkedő  $\text{Ca}^{2+}$ -szintet a nyugalmi 50-200 nM  $[\text{Ca}^{2+}]$ -ra vissza tudják állítani a szekretagóg stimulust követően, szükség van kalcium eltávolító mechanizmusokra. Az extracelluláris tér felőli nagy koncentráció grádiens, az ER-ből szivárgó  $\text{Ca}^{2+}$  és a negatív intracelluláris potenciál mind a citoplazmába hajtják a  $\text{Ca}^{2+}$ -ot, ezért a  $\text{Ca}^{2+}$ -szint csökkentése citoplazmában energiaigényes folyamat. Az egyik lehetőség, hogy a plazma membrán  $\text{Ca}^{2+}$  ATP-áz (PMCA) az extracelluláris térbe pumpálja a  $\text{Ca}^{2+}$ -ot. A PMCA aktivitása nyugalmi kalcium szintnél is megfigyelhető, de a  $\text{Ca}^{2+}$  és az agonista stimuláció okozta foszforiláció növeli az aktivitását egészen a 400 nM-os kalcium koncentrációnál jelentkező telítődéséig (61). A másik jól leírt mechanizmus a kalcium visszavétele az ER-be a szarko- és endoplazmatikus retikulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATP-áz segítségével (SERCA). A SERCA pumpa jól ismert gátlószerei a thapsigargin (TG) és

a ciklopiazonsav (CPA), melyek membrán-permeábilisek, így segítségükkel anélkül változtatható az ER-ben raktározott kalcium mennyisége és aktiválható a SOCE, hogy a sejtek károsodnának. A CPA nagyobb vízdékonyságú, mint a TG, ami lehetővé teszi a kimosását a sejtől, ezzel részleges raktárürítésre is alkalmas (62), míg a TG irreverzibilis gátlószer.

A harmadik  $\text{Ca}^{2+}$ -elimináló mechanizmus, a mitokondrium általi kalcium felvétel rengeteg kérdést válaszolt meg a  $\text{Ca}^{2+}$ -jel térbeli eloszlásával kapcsolatban. Sokáig úgy gondolták, hogy csak patológiásan magas kalcium szintnél van jelentősége, a mitokondriális kalcium uniporter (MCU) alacsony kalcium affinitása miatt. Viszont frissebb kutatások szerint fiziológias körülmények között is működik az MCU, aminek a magyarázata az lehet, hogy az MCU-ok nagyrészt az  $\text{IP}_3\text{R}$  mikro környezetében találhatóak, ahol nagyon magas kalcium koncentráció lehet lokálisan. A mitokondriumok egyik fontos feladata, hogy ATP-t szintetizálnak, mely folyamat sebességhatározó lépése a piruvát dehidrogenáz (PDH) enzim aktivitása. A megemelkedő  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  aktiválja a PDH enzimet, ezzel a mitokondrium ATP szintézisének sebessége nő, mely lehetővé teszi a hosszan tartó szekréciót. A mitokondrium másik fontos feladata a kalcium jel apikális régióra korlátozása. Az ER apikális régiójában mérhető a legnagyobb  $\text{IP}_3$  érzékenység, illetve az immunológiai mérések is azt támasztják alá, hogy az  $\text{IP}_3\text{R}$ -ok dominánsan az ER apikális régiójában helyezkednek el. Ennek következménye, hogy szekretagóg aktiváció hatására az apikális térben emelkedik meg először a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , azonban az apiko-bazális határon elhelyezkedő mitokondrium  $\text{Ca}^{2+}$  pufferként viselkedik és az MCU-k segítségével felveszi a felszabadult  $\text{Ca}^{2+}$  egy részét. Később a felvett  $\text{Ca}^{2+}$  fokozatosan szabadul fel a mitokondriális  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$  exchanger segítségével (63).

### ***II/3.5 A $\text{Ca}^{2+}$ -szerepe az akut hasnyálmirigy-gyulladásban***

Az acinus sejt ACh-val, CCK-val, epesavakkal, illetve bizonyos alkohol metabolitokkal, zsírsav-etil-észterekkel (FAEE) történő túlstimulálása az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  teljes sejtre kiterjedő, magas amplitudójú, hosszan tartó (csúcs-plató típusú) megemelkedését, a zymogének intraacináris aktiválódását, és a sejt önmérsztését okozza, ami végső soron akut hasnyálmirigy-gyulladáshoz vezet. A betegség leggyakoribb oka az epekő, mivel az epevezetékek elzáródása és az epe refluxa miatt az epesavak koncentrációja a hasnyálmirigyben rendkívül magas (mM) értéket érhet el (27). A pancreatitis másik rizikófaktora a mértéktelen alkoholfogyasztás, melynek

káros hatását az alkohol származékai, a FAEE-k közvetítik. Husein és Petersen munkacsoportja kimutatta, hogy a FAEE-ek és az epesavak az IP<sub>3</sub>R-ok közvetlen serkentésével váltják ki a toxikus mértékű Ca<sup>2+</sup>-felszabadulást. Kísérleteikben azonban a palmitoleinsav-etil-észter (POAEE) és a taurolitokolsav-3-szulfát (TLCS) az IP<sub>3</sub>R-ok teljes gátlása mellett is szabadított fel Ca<sup>2+</sup>-t, ami arra utal, hogy ezek a vegyületek nemcsak az IP<sub>3</sub>R-t, de a RyR-t is alloszterikus mechanizmussal aktiválják. Az sem zárható ki azonban, hogy a POAEE és a TLCS a savas vezikulumok kétpórusú Ca<sup>2+</sup> csatornáinak megnyitásával szabadítanak fel Ca<sup>2+</sup>-t, ami CICR-hez vezet (27, 64-67).

A RyR teljes sejtre kiterjedő Ca<sup>2+</sup>-jel kialakításában és felerősítésében betöltött szerepét igazolja, hogy a RyR gátlószer dantrolén alkalmazása hatékonyan bizonyult a szupramaximális szekretagóg agnistával (carbachol 1 mM, caerulein 100 nM) kezelt hasnyálmirigy acinus sejtekben a zimogének intracelluláris aktivációjának kivédésében (67). A másik, jelenleg intenzíven kutatott terület a SOCE hatása a különböző daganatok, illetve a hasnyálmirigy-gyulladás kialakításában. A kutatások eredménye azt mutatja, hogy a CCK receptor-agonista caerulein által indukált SOCE emeli a Ca<sup>2+</sup> koncentrációt a sejtben, a Ca<sup>2+</sup>-kötött calmodulin pedig a calcineurint aktiválja, amely különböző transzkripciós faktorok (NFAT, TFEB) aktiválásához vezet, mely kemokinek az önemésztéshez kapcsolható géneket aktiválják, ezzel a sejt gyulladását és önemésztődését eredményezik. A folyamatban mind a STIM1/Orai, mind a TRPC1 szerepet játszhat (68, 69). Az intracelluláris térben az emésztőenzim prekursor tripszinogén enzimatis hasítása tripszinné egy lizoszómális proteináz jelenlététől függ. A lizoszómális cistein proteináz catepsin B (CTSB) enzimet kódoló ctsb gén kiütésekor egerekben 90%-kal kisebb volt a caerulein-indukált hasnyálmirigy-gyulladás következtében megnövekedő tripszin aktivitás a kontrollhoz képest (71-72). A CTSB-t tartalmazó lizoszóma fúziója a tripszinogént tartalmazó vezikulummal makrofágokban is lejátszódhat, miután a hasnyálmirigy nekrozist követően fagocitálják a tripszinogént, mely folyamat szisztémás gyulladást idéz elő, mely súlyosabb hasnyálmirigy-gyulladáshoz vezet (72).

### ***II/3.7 A Ca<sup>2+</sup>-szerepe a könnymirigy kórlelettanában***

A szemszárazság a társadalom 5-10%-át érintő szemészeti probléma, ezért a könnysekreáció mechanizmusának megértése feltétlenül szükséges a patomechanizmus tisztázásához és új gyógyszer célpontok feltérképezéséhez. A

szemszárazságot a könnymirigy szekréciós tevékenységének elégtelen működése okozza. A legismertebb szemszárazsággal járó kórkép a Sjögren-szindróma, melyben a könnymirigy acinus sejtek beidegzése károsodik, legtöbb esetben a háromosztátú agyideg (Nervus trigeminus (V.)) érintett. Az autoimmun betegségben olyan gyulladáskeltő citokinek termelődnek, melyek csökkentik az idegvégződésből a neurotranszmitter felszabadulását, ezzel az acinus sejtek szekretagóg aktiválású beidegzése sérül (73). Alacsony szekretagóg stimulus hatására nem tud annyi  $Ca^{2+}$  felszabadulni a belső raktárakból, hogy megfelelően indukálódjon a SOCE, így az extracelluláris térből sem érkezik elegendő  $Ca^{2+}$ . A SOCE fontosságát az is hangsúlyozza, hogy a STIM1 és STIM2 génkiütött állat a Sjögren szindróma tüneteit mutatja (74). A megemelkedő intracelluláris  $Ca^{2+}$  aktiválja az aquaporin 5 csatornák membránba való kihelyeződését is, melynek hiányában szintén a folyadékszékreció csökkenése figyelhető meg (75, 76). A kalcium jelátvitel sok ponton hasonlít a könnymirigy és a hasnyálmirigy acinus sejtekben, van azonban egy igen fontos különbség a  $Ca^{2+}$ -oszcilláció mintázatukban. A hasnyálmirigy acinus sejt esetében korábban leírt  $Ca^{2+}$ -oszcilláció egy nagyon finoman szabályozott mechanizmus, a szekretagóg agonista koncentrációjának kis mértékű csökkenése felfüggesztheti, vagy növelése plató-szerű elnyúló  $Ca^{2+}$ -szint emelkedésbe válthatja át az oszcillációt. Ezzel szemben a könnymirigy acinus sejtekben viszonylag széles szekretagóg agonista koncentráció tartományban (0,5-1,5  $\mu$ M methacholin) megjelenik az oszcilláló  $Ca^{2+}$ -jel, amelynek jellegzettsége, hogy egy emelkedett  $Ca^{2+}$ -szinten látható az egyenletes frekvenciájú oszcilláció (75).

Tekintve, milyen sok embert érint a száraz szem szindróma, fontos a könnyszékreció mechanizmusának minél pontosabb feltérképezése, a szekréciós modell kiegészítése.

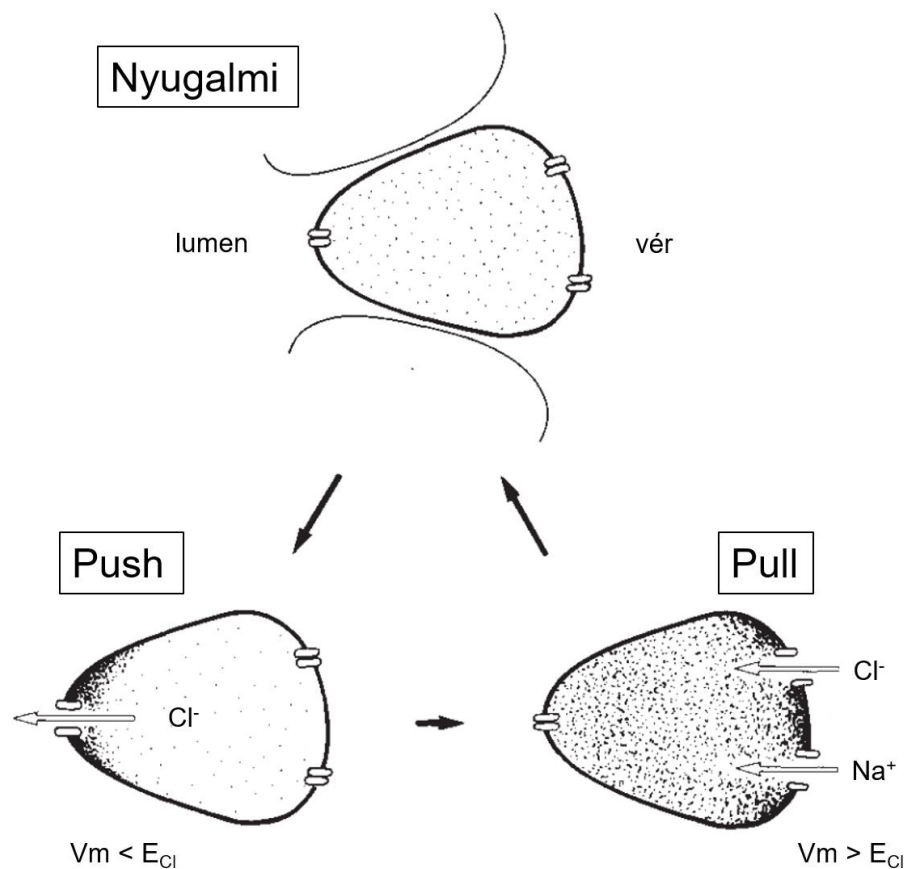
## ***II/4. A kalcium célmolekulái***

Az acinus sejtek szekréción mechanizmusában a  $\text{Ca}^{2+}$ -nak központi szerepe van. Az acinus sejtek plazmamembránja három fontos  $\text{Ca}^{2+}$ -függő csatornatípust tartalmaz: a lumenális membránban elhelyezkedő  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{Cl}^-$ , a bazális elhelyezkedésű  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{K}^+$ , és a bazális membránban helyet foglaló  $\text{Ca}^{2+}$ -függő nem-szelektív kation csatornákat (18).

### ***II/4.1 $\text{Ca}^{2+}$ -függő klorid csatornák (Calcium activated chloride channels – CaCCs)***

Az általunk vizsgált exokrin mirigyekben a neurotranszmitter vagy hormon stimuláció hatására megemelkedő  $[\text{Ca}^{2+}]_i$   $\text{Cl}^-$  gazdag folyadék szekréciónját indukálja. Az apikális oldalon a lumenbe kijutó  $\text{Cl}^-$ -dal azonos mennyiségű  $\text{Cl}^-$ -nak kell a bazolaterális membránon keresztül a sejtbe jutnia, melynek magyarázatára két elmélet is született.

Az első hipotézis alapja Kassai és Augustine 1990-ben publikált, az acinus sejt szekréciónját értelmező „push-pull” modellje. Szekretagóg stimulusra elsőként az apikális régióban emelkedik meg a  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció, így az apikálisan elhelyezkedő  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{Cl}^-$ -csatornák aktiválódnak az első fázisban (push). Ekkor a membránpotenciál ( $V_m$ ) negatívabb értéken van a  $\text{Cl}^-$  egyensúlyi potenciáljához ( $E_{\text{Cl}}$ ) képest, ezzel a hajtóerő biztosított a  $\text{Cl}^-$  sejtéből történő kilépéséhez. A második fázisban a  $\text{Ca}^{2+}$ -szint a bazális oldalon is megemelkedik, amely a bazálisan elhelyezkedő  $\text{Ca}^{2+}$ -függő nemszelektív kation- és  $\text{Cl}^-$ -csatornákat aktiválja. Az apikális  $\text{Cl}^-$ -szekréción és a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő kationáram eredményeként a membrán depolarizálódik, ezzel megváltozik a  $\text{Cl}^-$ -hajtóerő ( $V_m > E_{\text{Cl}}$ ), és  $\text{Cl}^-$  lép be a sejt bazális oldalán (pull). Ezt az elméletet nevezzük „push-pull” modellnek (77). A modell feltételezi, hogy bazolaterálisan is helyezkednek el CaCC-k, az apikális  $\text{Ca}^{2+}$ -jel és CaCC aktivitás gyorsan deaktiválódik, illetve egy  $\text{Ca}^{2+}$ -függő kationáram depolarizáló hatását, mely a  $\text{Cl}^-$ -hajtóerejét megfordítja, így az intracelluláris térbe juthat a  $\text{Cl}^-$  (2. ábra).



**2. ábra Az egyirányú Cl<sup>-</sup>-szekréciót magyarázó „push-pull” modell (Kassai és Augustine 1990).**

A kalcium koncentráció először az acinus sejt apikális oldalán emelkedik meg, a Cl<sup>-</sup>-csatornák is ezzel összehangoltan az apikális régióban nyílnak meg („push”), majd a bazolaterális régióba áttérjedő Ca<sup>2+</sup>-hullámnak köszönhető az ott elhelyezkedő Cl<sup>-</sup> csatornák megnyílása („pull”) (77).

A másik hipotézis kidolgozóit, Park és munkatársait, Ca<sup>2+</sup>-uncaging módszerrel vizsgálták a szekréciós mechanizmust. A hasnyálmirigy acinus sejt különböző régióiban a [Ca<sup>2+</sup>] megemelésével aktiválták a Ca<sup>2+</sup>-érzékeny Cl<sup>-</sup>-csatornákat, és párhuzamosan patch-clamp technikával végezték a Cl<sup>-</sup>-áram mérést, feltérképezve ezzel a CaCC-k térbeli elhelyezkedését. A Ca<sup>2+</sup>-uncaging során nitrophenyl-EGTA csapdázza (cage) a Ca<sup>2+</sup>-ot, amely 351 nm hullámhosszú lézerefény impulzussal szabadítható fel (uncaging), s a fény a sejt adott régiójára irányítva lokálisan okozott Ca<sup>2+</sup>-koncentráció emelkedést, melyet Fluo-4 Ca<sup>2+</sup>-érzékeny festékkel mértek. A méréseik eredménye azt mutatja, hogy csak az apikális membránban találhatóak CaCC-k, mivel csak az apikális membrán mellett végzett Ca<sup>2+</sup>-uncaging során jelent meg Cl<sup>-</sup>-áram (4). Azokban a szövetekben, ahol a CaCC-akat leírták, immunhisztokémiai vizsgálatok az anoctamin1 (ANO1) gén által kódolt

transmembrane protein 16a (TMEM16a) csatornát mutatták ki. Az acinus sejteken végzett immunhisztokémiai vizsgálatok nagyfokú ANO1 expressziót mutattak, és a festődés a sejtek apikális régiójában volt kifejezett (78). Ezen vizsgálatok a korábban leírt „push-pull” modellt elvetették, hiszen a bazális oldalon CaCC-k nem találhatóak. A folyamatos szekrécióhoz a Cl<sup>-</sup>-forrást a bazálisan elhelyezkedő Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2 Cl<sup>-</sup>-kotranszporter biztosítja.

A TMEM16a csatorna aktivitását viszont nem csak a Ca<sup>2+</sup> befolyásolja, hanem a feszültség is. A membránpotenciál minél pozitívabb, a kalcium affinitása a csatornához annál nagyobb, amely úgy is értelmezhető, hogy a Ca<sup>2+</sup> feszültség-független módon kötődik a feszültség-érzékeny konformációjú csatornához (79). 2017-ben Dang S. és mtsai. krio-elektromikroszkóp segítségével meghatározták a TMEM16a szerkezetét és azonosították a Ca<sup>2+</sup>-kötőhelyet kialakító aminosavakat. A szerkezet ismeretében és a TMEM16a overexpresszált HEK293 sejteken végzett patch-clamp méréseik alapján megállapították, hogy az első Ca<sup>2+</sup>-kötődése (30 nM Ca<sup>2+</sup>) olyan konformációváltozást idéz elő, amely lehetővé teszi a csatorna feszültség-függő megnyílását, míg ha a második Ca<sup>2+</sup>-kötőhely is telítődik (1 mM Ca<sup>2+</sup>), megjelenik egy feszültség-független áramkomponens is (80, 81).

A szekretoros epitelsejtekben a nyugalmi Ca<sup>2+</sup>-koncentráció 50-200 nM, míg a nyugalmi membránpotenciál -50 mV körüli érték, és ilyen körülmények között a CaCC-k nem aktívak. A CaCC-k szerepe domináns az acinus sejtek folyadék- és elektrolit-szekréciójában, ugyanis szekretagóg stimulációra a [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> elérheti az 1 μM-os értéket, míg a membránpotenciál változatlan marad, így a CaCC-k aktiválódnak és a sejt apikális oldalán Cl<sup>-</sup> áramlik ki (1).

## ***II/4.2 Ca<sup>2+</sup>-függő kálium csatornák***

Általánosságban három különböző típusát különböztetjük meg a Ca<sup>2+</sup>-függő K<sup>+</sup>-csatornáknak: nagy (big – BK), közepes (intermediate – IK) és kis (small – SK) konduktanciájúakat. A csatorna család legmeghatározóbb tagja a BK csatorna (KCa1.1), amely a szekretos sejtektől az agyig mindenhol megtalálható a szervezetben. A nagy konduktanciája (~100-300 pS) miatt maxiK néven is említett csatornát mind a membrán depolarizáció, mind az [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> emelkedése aktiválja, és a membrán repolarizációját és a feszültség-függő Ca<sup>2+</sup>-csatornák zárását okozza, negatív visszacsatolással szabályozva a sejt [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> homeosztázisát (82). A

kutatásaim során nem ingerlékeny sejteket használtam, amelyeken feszültség függő kalcium csatorna nem található.

A BK csatorna fehérjét a Slo1 gén kódolja, négy fehérje alegység alakít ki egy funkcionális csatornát. A Slo1 fehérje 7 transzmembrán alegységet tartalmaz (S0-S6) és egy nagy citoplazmatikus C-terminális szakaszt. A feszültség érzékelésért az S1-S4 alegységek (voltage sensing domain – VSD), a pórus formálásáért az S5-S6 alegységek (pore-gate domain – PGD), az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  érzékeléséért pedig a C-terminális alegység felel (regulatory domain for  $\text{K}^+$  conductance – RCK domain). Mivel négy alegység alakít ki egy működő csatornát, ezért négy RCK domain van, és négy  $\text{Ca}^{2+}$ -kötőhely áll rendelkezésre. A csatorna  $\text{Ca}^{2+}$  kötődése nélkül is nyílik depolarizáció hatására, hiszen a VSD hasonlóan működik, mint egy hagyományos feszültség-érzékeny  $\text{K}^+$ -csatorna ( $\text{Kv}$ ) esetében, viszont ilyenkor a félaktiváló feszültség magas. A  $\text{Ca}^{2+}$ -kötőhelyek töltődésével tolódik egyre inkább balra az áram-feszültség görbe, ami egy kooperatív kölcsönhatással magyarázható, vagyis minden egyes  $\text{Ca}^{2+}$  kötődésével egy másik, feszültségre érzékenyebb konformációt vesz fel a csatorna. Viszont önmagában a  $\text{Ca}^{2+}$  kötődése is nyithatja a csatornát, depolarizáció nélkül. Az IK és az SK csatornák szintén  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenyek, de feszültség érzékenységet nem mutatnak. Érdekes ezen kívül az is, hogy bizonyos sejtekben, melyekben az IK és BK csatornák is kifejeződnek, azok egymáshoz közel helyezkednek el a membránban, és az IK csatorna aktivációjakor gátolja a BK csatornát (83, 84, 85).

Az elsődleges könny-, hasnyál- és nyálszekréciók alacsony  $\text{K}^+$ -tartalmúak, illetve a plazmához hasonló  $\text{Na}^+$  és  $\text{Cl}^-$  összetételű izoozmotikus oldatok. A könnymirigy-szekréció kialakításában a  $\text{Na}^+$  bazo-apikális irányú elektrokémiai grádiense játszik kulcsszerepet, melyet a  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPáz hoz létre, és ez szolgál hajtóerőként a  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ - $2\text{Cl}^-$  kotranszporter, a  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$  antiporter és végső soron a  $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$  antiporter működéséhez is. Jelenlegi tudásunk szerint az említett transzporterek a bazolaterális membránban helyezkednek el. A transzporterek működése eredményeként a  $\text{K}^+$  és a  $\text{Cl}^-$  felhalmozódik a citoplazmában. Amikor az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  megemelkedik, akkor a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{Cl}^-$  csatornák megnyílnak, mely transzepteliális hajtóerőt biztosít a  $\text{Na}^+$ -nak. A folyamatot  $\text{Cl}^-$ -vezérelt  $\text{Na}^+$ -szekréciónak is nevezünk. A folyamatban fontos szerepet kap a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{K}^+$ -csatorna is, amely megnyílásával a membránpotenciált a -45 mV-os nyugalmi membránpotenciál közelében tartja, biztosítva ezzel a  $\text{Cl}^-$ -hajtóerő folyamatos

fenntartását (18, 86). A Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pumpa és a BK-*IK* csatornák szerepét a szekréciónban alátámasztja, hogy akár a pumpa gátlása oubainnal, akár a BK és *IK* csatorna gének kiütése a szekrétum csökkenését okozzák. Bár bizonyos kísérletes eredmények arra utalnak, hogy mindhárom transzporter a bazolaterális membránban van, a folyadékszekréción legújabb matematikai modellezése azt jósolja, hogy nagyobb szekréción sebesség várható, ha az apikális membrán K<sup>+</sup> konduktanciája nem nulla (83, 87, 88).

### ***II/4.3 Ca<sup>2+</sup>-függő TRPM csatornák***

#### *A TRP csatornák rövid története*

1969-ben, Cosens és Manning a viselkedési fenotípusa alapján egy spontán mutálódott *Drosophila melanogaster* törzset fedezett fel. Úgy találták, mintha vakok lennének a mutáns rovarok. A tapasztaltak megértéséhez elektroretinográfia (ERG) vizsgálatot végeztek, amely fény indukálta transz-retinális ionmozgások okozta potenciál változást rögzít. Az elektroretinogramon a mutáns genotípusú rovar szemének fényre adott válasza átmeneti (tranzien) és lassan tér vissza újra ingerelhető állapotba. Az említett tulajdonságok miatt 1975-ben Minke és munkatársai nevezték el az említett mutáns *Drosophila* törzset tranzien receptor potenciál (TRP) mutánsnak, melyet később a nemzetközi bizottság adaptált a teljes TRP szuper családra (89).

1995-ben írták le az első humán TRP homológ gén teljes szekvenciáját, amely a TRPC1 volt (90). Jelenlegi tudásunk szerint 28 TRP csatorna létezik, melyből 27-et a humán genom is kódol. Acinus sejteken a már említett TRPC3 csatornán kívül már leírták a TRPV4 (91), a TRPM2 és a TRPM4 (92) csatornákat is, melyek közül a Ca<sup>2+</sup>-permeábilis, nem szelektív kation csatorna TRPM2-t és a Ca<sup>2+</sup>-impermeábilis, nem szelektív monovalens kation csatorna TRPM4-et az [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> emelkedése aktiválja.

#### *TRPM4 csatorna élettani-biofizikai tulajdonságai*

A TRPM4 csatorna homotetramer, az alegységei 6 transzmembrán domént tartalmaznak, amelyek közül az S1-S4 a feszültség érzékeny domain és az S5-S6 a pórus formáló domain. Annak ellenére, hogy a szelektivitási szűrő rövid és tág, csak egyértékű kationokra permeábilis, Ca<sup>2+</sup>-ra és Mg<sup>2+</sup>-ra impermeábilis. Az

egyértékű kationok közül a Na<sup>+</sup>-ot és K<sup>+</sup>-ot hasonló mértékben vezeti a csatorna, ezt követi a sorban a Cs<sup>+</sup> és a Li<sup>+</sup> (93, 94).

Széleskörűen kifejeződik a szervezetben, és számos sejttípusban jelentős szerepet játszik a depolarizációban, aktiválva ezzel például a feszültség-függő Ca<sup>2+</sup>-csatornákat (pl.: a légzési ritmusgeneráló idegsejtek és az agyi arteriolák esetén), vagy éppen csökkentve a Ca<sup>2+</sup> hajtóerejét, alacsonyabb CRAC áramot eredményez (pl.: hízósejtekben és T-limfocitákban) (95-99). A TRPM4 csatornát kezdetben a nem ingerlékeny sejtekben a Ca<sup>2+</sup>-jel modulációjával összefüggésben tartották fontosnak, de miután kimutatták a feszültség-érzékenységét, egyre nagyobb figyelmet kapott az ingerlékeny sejtekben betöltött szerepe is. A feszültség-függése extrém kifelé mutató egyenirányítást mutat. Negatív membrán potenciáloknál lassú deaktiváció, míg pozitív feszültségeken lassú aktiváció jellemzi (100). Már 1982-ben Maruyama és Petersen munkacsoportjának sikerült hasnyálmirigy acinus sejteken egy kationáramot izolálni, amely a TRPM4 tulajdonságaival rendelkezett, de farmakológiai és genetikai eszközök hiányában nem tudták szekréciós funkcióban betöltött szerepét pontosan meghatározni (101).

#### *A TRPM4 csatorna szabályozása*

Nilius és munkatársai arra lettek figyelmesek, hogy a TRPM4 áram megszűnik inside-out konfigurációban, amikor a csatorna intracelluláris közege teljesen lecserélődik, illetve teljes sejtes konfigurációban az áram folyamatos csökkenése volt megfigyelhető. Kísérleteikben azt igazolták, hogy a szekretagóg stimulációkor megemelkedő PLC aktivitás folyamatosan csökkenti a PIP<sub>2</sub> szintet, amely a TRPM4 nyitvatartási valószínűségét csökkenti. A PIP<sub>2</sub> ugyan nem képes nyitni a TRPM4 csatornát alacsony [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> mellett, tehát közvetlenül nem aktiválja azt, de érzékenyíti a csatornát mind a Ca<sup>2+</sup>-ra, mind a feszültségre. A PIP<sub>2</sub> szint emelésével mintegy 100-szoros Ca<sup>2+</sup>-érzékenység növekedést lehet tapasztalni, és a csatorna feszültség-érzékenysége is jelentősen eltolódik a negatív membrán potenciálok irányába, amely nagymértékben növeli a TRPM4 csatorna nyitvatartási valószínűségét a fiziológiásan releváns membrán potenciál tartományban (102).

#### *A TRPM4 csatorna farmakológiája*

A difenilamin-2-karboxilsav (DPC) származékok jól ismert Cl<sup>-</sup> csatorna gátlószerek, és a nem szelektív kation csatornákra kifejtett gátló hatását is leírták. A

DPC két származékának, a 3'-5-dikloro-DPC és az 5-nitro-2-(3-fenilpropil-amino)-benzoésav (NPPB) kifejlesztésével sikerült a nem szelektív kation csatornákra kifejtett gátló hatás erősségét növelni, viszont a Cl<sup>-</sup> csatornákat ezek a molekulák is gátolták (103). Ezt követően folyamatos törekvés volt olyan TRPM4 gátló molekulák kifejlesztésére, amelyek megfelelő hatáserősséggel és szelektivitással rendelkeznek. Az első szelektívnek gondolt molekula a 9-Phenanthrol volt, mely szelektivitását csak heterológ overexpresszálo rendszerben vizsgálták, TRPM5 és CFTR (cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor) csatornák vonatkozásában (104). Később azonban nem specifikus gátló hatásaira is fény derült, például primer kamrai szívizomsejteken végzett kísérletekben (105). A további kutatások elvezettek egy újabb molekulához, a 4-kloro-2-[[2-(2-klorofenoxi)acetyl]amino]benzoésavhoz (CBA), amely hatáserőssége a 9-Phenanthrolhoz képest 10-szeres és a szelektivitása is nagyobb fokú (106). Kísérleteinkben az említett pozitív tulajdonságai miatt a CBA-t használtuk, és szelektivitását magunk is teszteltük a kísérleteinkben a nem kívánt Cl<sup>-</sup> csatorna gátló hatás tekintetében.

### **III. Problémafelvetés és célkitűzés**

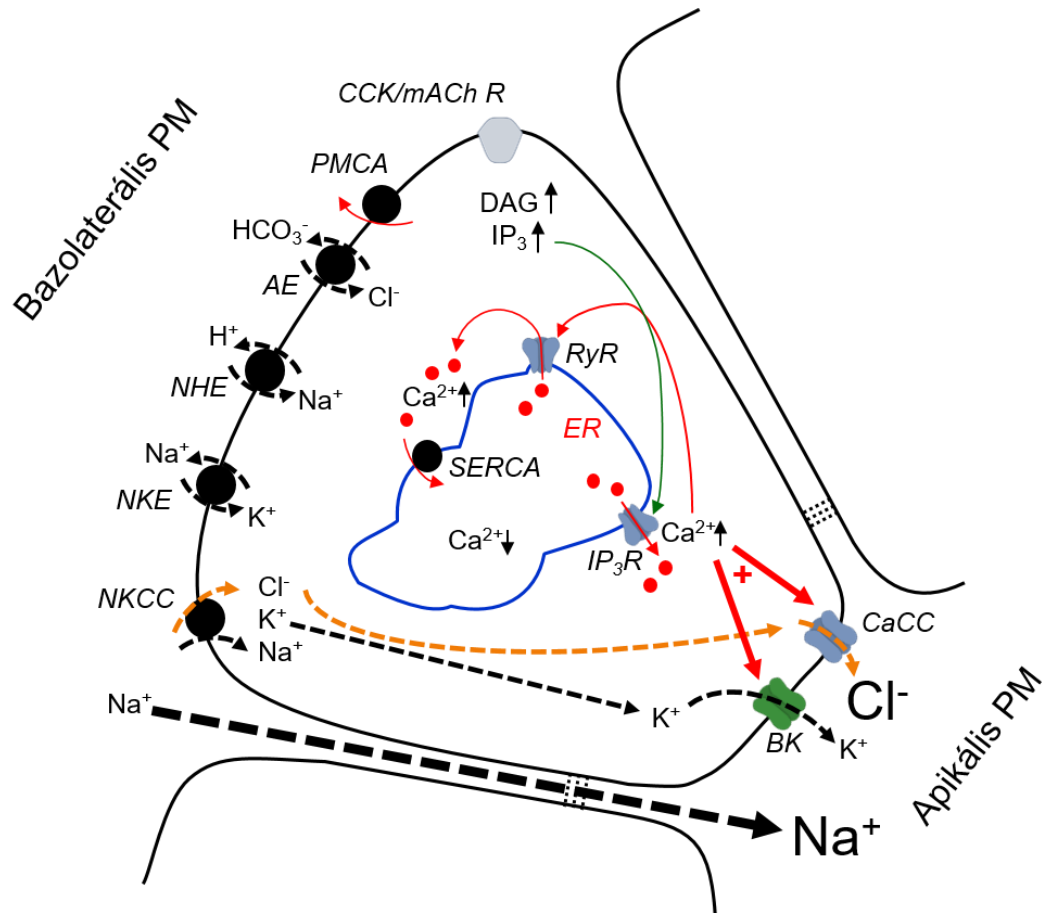
#### **III/1. A könny szekréciós modell újragondolása**

A könny szekréció alapvető fontosságú a szaruhártya és a kötőhártya megfelelő működéséhez. Ha a termelt könny mennyisége vagy a minősége csökken és a szemfelszín nedvesítése romlik, az száraz szem szindrómához (keratoconjunctivitis sicca) vezethet. A könny szekréciós jelentős hányadát a könny mirigy acinus sejtjei termelik, így ezen sejtek szekréciós mechanizmusának ismerete a kórfolyamat megértése szempontjából nagyon fontos (107).

Az elsődleges folyadékszékreció az egyirányú só- és víztranszporttal valósul meg az egyrétegű szekretoros epitélisejteken keresztül. A szekreció modell alapja az ion transzporterek ( $K^+$ - és  $Cl^-$ -csatornák) polarizált elhelyezkedése. A  $Na^+K^+2Cl^-$  kotranszporter, a  $Na^+H^+$  és a  $Cl^-HCO_3^-$  kicserélők működéséhez szükséges elektrokémiai hajtóerőt a  $Na^+K^+$  pumpa biztosítja. Eddigi tudásunk szerint az említett transzporterek a bazolaterális membránban foglalnak helyet. Amikor stimuláció hatására az  $[Ca^{2+}]_i$  megemelkedik, az apikális membránban elhelyezkedő  $CaCC$ -k megnyílnak és  $Cl^-$  szekretálódik a lumenbe, amely transepiteliális hajtóerőt létrehozva paracelluláris  $Na^+$ -transzportot generál (3. ábra). A  $Cl^-$ -kiáramlás a nyugalmi membránpotenciált ( $\sim -45$  mV) eltolná pozitív irányba, a  $Cl^-$  egyensúlyi potenciáljához közeli értékre ( $-30$  mV), a lecsökkenő elektrokémiai gradiens mellett pedig nem valósulna már meg hatékony  $Cl^-$ -efflux (14, 77, 108). A hosszan tartó  $Cl^-$ -szekreció fenntartásában a lumen felé elhelyezkedő  $Ca^{2+}$ -függő  $K^+$  csatornáknak van nagy szerepe, mivel a rajtuk keresztül a lumenbe kiáramló  $K^+$  segít a nyugalmi érték körül stabilizálni a membránpotenciált és fenntartani a lumen felé irányuló  $Cl^-$ -hajtóerőt (88, 127) (3. ábra). Azonban a szekréciós  $K^+$  és  $Cl^-$  koncentrációja között -a feltételezett  $K^+$  szekreció ellenére- jelentős eltérés van (17 mM vs 152 mM), miközben a citoszolikus koncentrációk 112 és 61 mM. Ez a különbség egy  $K^+$  reabszorpciós folyamatot feltételez az acinus sejt lumen felé elhelyezkedő membránjában. Azonban az ellentmondás alternatív feloldása az is lehet, hogy a korábbi megfigyelések ellenére a lumen felé elhelyezkedő  $Ca^{2+}$ -függő  $K^+$ -csatornák, így az alacsony lumen felé  $K^+$  koncentráció oka a transzcelluláris  $K^+$  szekreció hiánya, vagy alacsony volta lenne.

Kutatócsoportunk egyik célja az volt, hogy teljes sejt konfigurációjú patch-clamp,  $Ca^{2+}$ -imaging és  $Ca^{2+}$ -uncaging módszerek kombinációjával ellenőrizze a  $Ca^{2+}$ -függő ioncsatornák membrán lokalizációját könny mirigy acinus sejtekben és a

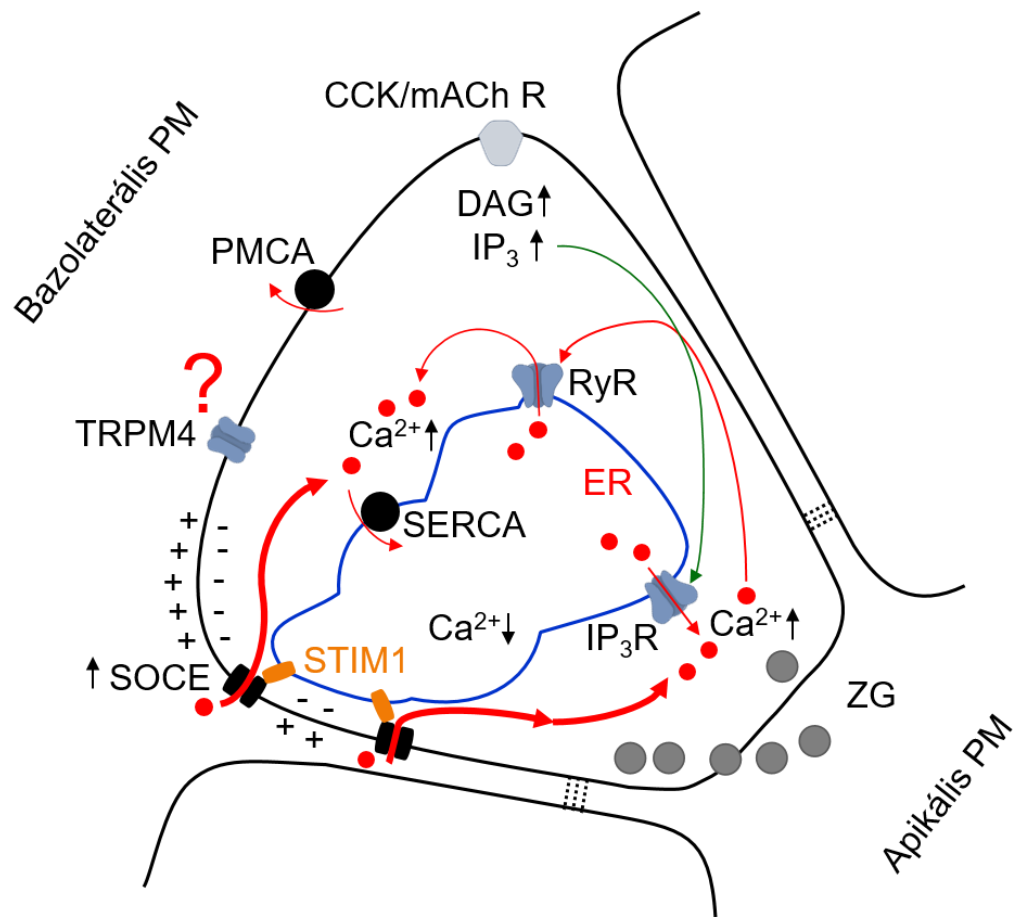
luminális membránban azonosítson egy esetleges  $K^+$  visszavételi mechanizmust. Célunk, hogy az új eredmények felhasználásával kiegészítsük az eddigi nyálszekréciós modellt és egy olyan új modellt alkossunk, ami az eddiginél pontosabban írja le a folyamatot.



**3. ábra A könny szekréció (acinus sejt folyadékszekréció) modellje**  
 Az ábrán egy acinus sejt sematikus rajza látható, melyhez oldalról további két sejt csatlakozik tight-junction-nel. Megfigyelhető a sejt polarizált felépítése, a különböző csatornák és transzporterek elhelyezkedése, illetve a  $Ca^{2+}$ -jel kialakításában szerepet játszó alap mechanizmusok. Az ábra a könnymirigy szekréciós modellje alapján készült, más sejt típusokban eltérő lehet a BK csatorna és a NKE elhelyezkedése.  
 Az ábra Wood RL. és Mircheff AK. 1986-os cikke alapján készült (109).

### ***III/2. A TRPM4, a membrán potenciál és a Ca<sup>2+</sup> beáramlás közötti kapcsoló***

Kutatásunk másik célkitűzése az volt, hogy olyan potenciális mechanizmusokat találjunk, amelyek a Ca<sup>2+</sup>-túltöltődés ellen védhetik a hasnyálmirigy acinus sejtet. 2002-ben már Pierre Launay és mtsai. TRPM4 overexpresszált HEK293 sejteken végzett Ca<sup>2+</sup>-méréseik alapján azt javasolták, hogy a TRPM4 szerepet játszhat a Ca<sup>2+</sup> hajtóerő csökkentésében a SOCE aktiválódásakor, és feltételezték, hogy egymáshoz közel helyezkedik el a TRPM4 és a SOCE csatorna (93). A hasnyálmirigy-gyulladás kórfolyamatában az acinus sejtek Ca<sup>2+</sup>-raktára olyan mértékben ürül, amely erőteljes SOCE aktivációt okoz, így az érdeklődésünk középpontjába került a TRPM4 csatorna, mint potenciális Ca<sup>2+</sup>-túltöltődés elleni védő mechanizmus (4. ábra). Mivel az egér hasnyálmirigy acinus sejteken végzett QPCR alapján magas expressziós szintű, az IP<sub>3</sub> receptorhoz hasonló mennyiségű TRPM4-et kódoló mRNS volt detektálható, elkezdtük hipotézisünk kidolgozását. Elméletünk szerint a megemelkedett [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> aktiválja a TRPM4 csatornát, Na<sup>+</sup> áramlik a sejtbe, depolarizálva azt. Bár a csatorna Na<sup>+</sup> és K<sup>+</sup> átteresztő képessége közel azonos, mégis a hajtóerő viszonyok a Na<sup>+</sup>-beáramlásnak kedveznek, mivel a nyugalmi membránpotenciálnál az elektrokémiai hajtóerő Na<sup>+</sup>-ra nagyobb, mint a K<sup>+</sup>-ra. Ha a membrán potenciál pozitívabb (de még mindig negatív) értékre tolódik a Na<sup>+</sup>-beáramlás miatt, úgy az időközben ürülő raktárak hatására aktiválódott Ca<sup>2+</sup> beáramlás hajtóereje alacsonyabb lesz, így lassítva a Ca<sup>2+</sup>-beáramlást és csökkentve a bejutó Ca<sup>2+</sup> mennyiségét. Elméletünket az [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> mikrofluorimetriás követésével ellenőriztük.



**4. ábra SOCE az acinus sejtben -  $Ca^{2+}$ -túltöltődés**

Az ábrán egy acinus sejt sematikus rajza látható, melyekhez további két-két sejt csatlakozik tight-junction-nel. A zimogének excitózáért felelős  $[Ca^{2+}]_i$  emelkedést kiváltó folyamatokat szemlélteti az ábra.

## **IV. Metodikák**

### **IV/1. Acinus sejt izolálás**

Minden szerv/szövet izolálás megfelelt a 2010/63/EU és a 40/2013. (II. 14.) Korm. rendeletnek, illetve mind a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottság által jóvá lett hagyva.

#### ***Acinus sejtek izolálása egér könnymirigyből***

A könnymirigy acinus sejtek enzimatiséus emésztéssel kerültek szétválasztásra. Az enzimeket SMEM (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA) tápoldatban oldottuk fel. A 3-4 hónapos egereket CO<sub>2</sub> gázzal és ezt követő cervikális diszlokációval történő leölése után a könnymirigyet azonnal kivettük, sebészi ollóval finomra aprítottuk, majd 37 °C-os vízfürdőben, rázatás alkalmazása mellett 8 percig emésztettük 28 µg/ml tripszin tartalmú oldatban. Ezt követően mostuk a szövetet SMEM oldattal, melyhez tripszin inhibitorot adtunk, és ezután további kettő, egyenként 20 perces emésztési ciklus következett 10-10 ml emésztőoldattal, melyek 0.18 Wunsch unit/ml koncentrációban Liberase TL (kollagenáz enzimek keveréke; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) enzimet tartalmaztak. A használt tápoldatokat folyamatosan karbogén gázzal (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) buborékoltattuk, így biztosítva az élettanilag megfelelő, stabil pH-t. Annak érdekében, hogy a szövet szétessen, többször keresztül pipettáztuk 10 ml-es szerológiai pipettára erősített, vágott 200 µl-es pipettahegyen. Az így kapott sejteket 100 µm átmérőjű nylon szűrőn szűrtük, mostuk, centrifugáltuk (200xg, 3 perc) és a végén felszuszpendáltuk BME tápoldatban.

#### ***Acinus sejtek izolálása egér hasnyálmirigyből***

A hasnyálmirigy acinus sejtek enzimatiséus emésztéssel kerültek szétválasztásra. A Collagenase P (kollagenáz enzimek keveréke; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) enzimet 100 U/ml koncentrációban DMEM:HAM'S F12 (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA) tápoldatok 1:1 arányú keverékében oldottuk fel. A 3-4 hónapos egerek CO<sub>2</sub> altatást követő cervikális diszlokációja után a hasnyálmirigyét azonnal kivettük, 2x1 ml emésztőoldattal injektáltuk a szövetet, majd 37 °C-os vízfürdőben, rázatás alkalmazása mellett kettő fázisban, 10 és 15 percig emésztettük 100U/ml Collagenase P, 0,1 mg/ml tripszin inhibitor és 2,5 mg/ml BSA (bovine serum albumine) tartalmú oldatban. A használt tápoldatokat folyamatosan karbogén gázzal

(95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) buborékoltattuk, így biztosítva az élettanilag megfelelő, stabil pH-t. A szövet az emésztést követően 4-6 alkalommal szerológiai pipettával szétfújtuk, ezután fémhálós szűrőn (60 mesh vagy 250 µm átmérőjű) szűrtük. Ezt követően nagy koncentrációjú (400 mg/ml) BSA oldalra rétegeztük a sejteket, és óvatos kézi centrifugálással átmostuk azon. A kapott pelletet 2 ml DMEM-ben mostuk, újra óvatosan lecentrifugáltuk és ismét felvettük ezt követően 2 ml DMEM-ben a sejtcsoportokat, melyeket szobahőn tartottunk, amíg a „Ca<sup>2+</sup>-imaging” mérésekhez fel nem használtuk őket (maximum 2-3 óra).

Annak érdekében, hogy egyedi sejteket nyerhessünk az acinus sejtcsoportokból és elektrofiziológiai méréseket végezhesünk rajtuk, még egy további emésztési ciklust alkalmaztunk, mely során 10 percig 100 U/ml Collagenase P tartalmú Ca<sup>2+</sup> és Mg<sup>2+</sup>-mentes PBS-ben emésztettük tovább a sejtcsoportokat és a végén 5 ml-es szerológiai pipettával széteszteltük őket.

#### ***IV/2. A könnymirigy acinus sejteken végzett villanófény-fotolízis, elektrofiziológiai és mikrofluorimetriás [Ca<sup>2+</sup>] -mérések.***

A könnymirigy acinus sejtek esetében egy kombinált metodikát alkalmaztunk, melyben az acinus sejtek [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-jának emelkedését villanó UV-fénnyel indukáltuk (NP-EGTA jelenlétében), melyet fluorimetriás mikroszkópos (Ca<sup>2+</sup>-imaging) módszerrel követtünk és ezzel párhuzamosan a Ca<sup>2+</sup>-aktivált K<sup>+</sup>- vagy Cl<sup>-</sup>-áramokat mértük.

A teljes sejt áramot Digidata 1322A analóg-digitál átalakítóhoz kapcsolt (Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA) Axopatch 200B erősítővel mértük feszültség-zár (voltage-clamp) körülmények között. Az áram felvétele 50 kHz frekvenciájú mintavételezéssel és 5 kHz frekvenciájú szűréssel (alul áteresztő Bessel szűrő) történt, az adatok rögzítését pedig pClamp 9 szoftverrel (Axon Instruments) végeztük. A boroszilikát üvegkapillárisokból (Warner Instruments, Hamden, CT) horizontális húzóval 5-7 MΩ ellenállású pipettákat készítettünk. Az acinus sejtek áramának folyamatos követését feszültség-zár (voltage-clamp) módszerrel végeztük, amennyiben K<sup>+</sup>-áramot mértünk, +40 mV-on, míg ha Cl<sup>-</sup>-áramot mértünk, -20 mV-on rögzítettük a feszültséget. A pipetta oldat (intracelluláris oldat) a következő összetételű volt: 135 mM K<sup>+</sup>-glutamate, 10 mM HEPES, 10 mM NP-EGTA, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, és 250 µM Fluo-4-K, pH=7,2. A Fluo-4 kálium sója nem tud átjutni a membránon vízdékony tulajdonsága miatt, ezért adtuk a pipetta oldathoz. A külső oldatok összetételét úgy

terveztük meg, hogy egymástól elkülönítve vizsgálhassuk a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő áramokat. A  $\text{K}^+$ -áram mérését alacsony  $\text{Cl}^-$ -tartalmú oldatban végeztük, mely az alábbi összetételű volt: 135 mM  $\text{Na}^+$ -glutamát, 5 mM  $\text{K}^+$ -glutamát, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , és 10 mM HEPES, pH=7,2. A  $\text{Cl}^-$ -áram mérésekor a  $\text{K}^+$ -áramot tetraetil-ammoniumnal (TEA) gátoltuk, így az oldatösszetétel a következő volt: 140 mM TEACl és 10 mM HEPES, pH=7,2.

A Fluo-4  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékeny festék monitorozását egy monokromátor-alapú leképező rendszerrel (Polychrome IV) és egy nagy sebességű CCD kamerával (mindkét eszköz TILL Photonics gyártmányú) végeztük. A festéket 488 nm hullámhosszon gerjesztettük, majd a fluoreszcenciát 525 nm-es sávszűrőn keresztül gyűjtöttük. A 20 ms expozíciós idővel készült képek tömörítést követően (2 x 2 binning – egymással közös oldallal rendelkező 4 pixel átlagolása egy képkockává) 20 Hz-es frekvenciával rögzítettük azokat. Az adatokat a  $\Delta F/F_0 = (F - F_0)/F_0$  képlettel számoltuk, ahol az F a rögzített fluoreszcencia és az  $F_0$  a képsorozat első 10 képének fluoreszcenciájának az átlaga (alapvonal). A képek 4096 árnyalatú (16 bit) szürke szintezettséget kaptak, amelyeket utólag szivárványskála színezéssel láttunk el, ahol a hideg színek alacsony, míg az egyre melegebb színek magasabb  $[\text{Ca}^{2+}]$ -nak felelnek meg. A villanófény-fotolízishez 375 nm hullámhosszú (UV) lézer diódát (18 mW maximális kimenet, Toptica) használtunk, amely egy invert mikroszkóphoz (Nikon TE200) volt csatlakoztatva optikai kábellel, UV-fény kondenzátoron (TILL Photonics) keresztül. Az UV-fényt egy 40x (NA=1,3) nagyítású olaj-immersiós objektívvel (Nikon) fókuszáltuk a tárgylemezre. A lézerpont kiterjedése a félmaximum értéknél 0,7  $\mu\text{m}$  volt x és y irányban, illetve 2,0  $\mu\text{m}$  z irányban. A teljes sejt árammérést, a fluoreszcens képképzést és a lézer fény villantásának idejét Polychrome IV illesztőegység szinkronizálta és a Vision program vezérelte (TILL Photonics). A villanófény-fotolízishez alkalmazott  $\text{Ca}^{2+}$ -puffer a nitrofenil-EGTA (NP-EGTA) volt, amely fotolabilisen köti a  $\text{Ca}^{2+}$ -ot, emiatt UV-villanófény segítségével az általa kötött  $\text{Ca}^{2+}$  egy része felszabadítható. Az általunk végzett méréseknél 50 ms időtartamú UV fény expozíciót alkalmaztunk. A lézert a megfelelő plazmamembrán szakasz közelébe irányítva az adott térrészre korlátozott  $\text{Ca}^{2+}$ -jel alakítható ki. Fontos a megfelelő puffer -  $\text{Ca}^{2+}$  arány, hogy ne alakuljon ki az egész sejtre tovaterjedő  $\text{Ca}^{2+}$ -jel, amelyet a mi mérési elrendezésünkben 10 mM NP-EGTA és 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  alkalmazásával tudunk elérni.

### ***IV/3. A hasnyálmirigy acinus sejteken végzett elektrofiziológiai- és Ca<sup>2+</sup>-imaging mérések***

#### ***Árammérések***

A teljes sejt patch-clamp méréseket szobahőmérsékleten, egy Axopatch 200B erősítő és egy Digidata 1320A analóg-digitál konverter (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) segítségével végeztük feszültség-zár (voltage-clamp) körülmények között, az adataokat 50 kHz frekvenciájú mintavételezéssel és 5 kHz frekvenciájú szűréssel (alul áteresztő Bessel szűrő) nyertük. A boroszilikát üvegapillárisokból (Warner Instruments, Hamden, CT) horizontális húzóval 5-7 MΩ ellenállású pipettákat készítettünk. Az intra- és extracelluláris oldatok összetételétől függően TRPM4 vagy TMEM16a csatornán folyó áramot mértünk. A TRPM4 áram méréséhez -100 és +120 mV közötti feszültség rámpa protokollt használtunk, míg a Cl<sup>-</sup>-áram méréséhez -60 és +120 mV közötti 1 másodperc időtartamú depolarizáló lépcső protokollt alkalmaztunk. Minden egyes mérésnél legalább 70%-os soros ellenállás kompenzációt alkalmaztunk.

A TRPM4 csatorna árammérésekkor a pipettákba töltött intracelluláris oldat a következő volt: 144 mM Cs-glutamát, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 μM EGTA, 48,6 μM CaCl<sub>2</sub> (100 nM ionozált Ca<sup>2+</sup>), 10 mM HEPES, 3 mM ATP, pH: 7,3. Az extracelluláris oldat összetétele az alábbi volt: 140 mM Na-glutamát, 4 mM CsCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, pH=7,4.

A Ca<sup>2+</sup>-függő Cl<sup>-</sup>-áram mérésekor a pipettaoldat összetétele a következő volt: 100 mM NMDG-Cl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,72 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM EGTA (1 μM ionozált Ca<sup>2+</sup>), 10 mM HEPES, pH= 7,2. Az extracelluláris oldat összetétele pedig a következő volt: 140 mM NMDG-Cl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM glukóz, 10 mM HEPES, pH=7,3.

#### ***Membránpotenciál mérések***

A patch-clamp mérőrendszer áram-zár (current-clamp) mérési módját alkalmazva mértük az acinus sejtek membrán potenciálját. Annak érdekében, hogy minél érintetlenebb maradjon az intracelluláris környezet, és ezáltal minél értékelhetőbb feszültség értékeket kapjunk, a perforált patch-clamp módszert választottuk a kísérleteink kivitelezéséhez. A módszer lényege, hogy a pipetta oldathoz olyan polién makrolid antimikrobiális szert adunk (amfotericin B vagy nisztatin), amely a pipetta alatti membránterületbe (patch) épülve pórusokat alakít ki azon, melyeken keresztül

az egyértékű ionok (például  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) a hajtóerőnek megfelelően szabadon áramolhatnak, viszont a kétértékű ionok (Például  $\text{Ca}^{2+}$ ) és a glükóz nagyságú vagy annál nagyobb töltés nélküli molekulák nem tudnak átjutni azokon (111, 112). A kísérleteink során a pipetta oldathoz 300  $\mu\text{g/ml}$  amphotericin B-t adtunk, majd ezzel a pipettát úgy töltöttük, hogy a pipetta hegyébe amphotericin B mentes, míg mögötte amphotericin B-t tartalmazó oldat került, így van idő a nagy ellenállású kapcsolat (Gigaseal) kialakulására, mielőtt az amphotericin B a pipettahegybe diffundálna. A sejt és a pipetta között a Gigaseal kialakulása után 5-10 perc alatt beépül az amphotericin B a sejtmembránba, ilyenkor a perforációt a lassan csökkenő soros ellenállás és az emelkedő sejtkapacitás mutatja. Az áram-clamp méréseknél használt pipetta oldat a következő összetételű volt: 85 mM K-glutamát, 45 mM KCl, 15 mM NaCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100  $\mu\text{M}$  EGTA, 48,6  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ , 10 mM HEPES, 300  $\mu\text{g/ml}$  Amphotericin B, pH: 7,3. Extracelluláris oldatként Tyrode oldatot használtunk, melynek összetétele: 144 mM NaCl, 5,5 mM KCl, 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1,2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 8,3 mM glükóz, 5 mM Tris-HCl puffer, pH: 7,4.

### ***Ca<sup>2+</sup>-imaging***

A  $\text{Ca}^{2+}$ -imaging mérésekhez Fura-8-AM (AAT Bioquest) ráciometrikus  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékeny festéket használtunk, amelynek 2  $\mu\text{M}$  koncentrációjú oldatában 30 percig sötétben inkubáltuk szobahőmérsékleten az acinus sejtcsoportokat. Ez idő alatt a festék zsírdékony acetoximetil-észter (AM) formája bejut a sejtbe és az intracelluláris térben található észterázok lebontják azt, így csapdázva a festéket a sejtben. A töltés után a hasnyálmirigy acinus sejteket üvegaljú Petri csészére (Ibidi) pipettáztuk, ahol 10 percig hagytuk, hogy letapadjanak. A sejtek Tyrode oldattal perfundáltuk, hogy kimossuk az extracelluláris térből a festéket. Amennyiben a mérési protokollban  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes Tyrode oldatot alkalmaztunk, az oldat 0,5 mM EGTA-t tartalmazott, hozzáadott  $\text{Ca}^{2+}$  nélkül. Amennyiben megfelelően töltődik a sejt festékkal, a sejt egészséges, élettani tulajdonságait megtartotta. A ráciometrikus festékek előnyös tulajdonsága, hogy két, különböző excitációs hullámhosszon nyert emissziós intenzitásérték arányát feleltetjük meg a  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációnak, ezért nem kell számolni az eltérő festéktöltődésből és a festék fakulásából eredő hibával. A Fura-8-AM excitációját 1 Hz-es frekvenciával, FuraLed 365 és 405 nm-es fényforrással (Cairn Research Ltd, Faversham, UK) végeztük, az emittált fényt pedig egy 520 nm fölötti hullámhossz tartományban áteresztő szűrőn keresztül gyűjtöttük. A leképezéshez Zeiss Axiovert 135

mikroszkópot, Zeiss 21 HE szűrőkészletet, 40x Fluor (1.3 NA) objektívet és QImaging Retiga R3 CCD kamerát használtunk. A mikrofluorimetriás rendszert egy illesztőegységen keresztül irányítottuk Micromanager szoftver segítségével. A fluoreszcens adatokat Image J szoftverrel és Fiji kiegészítővel értékeltük. A 360/405 nm-es emissziók fluoreszcencia intenzitás arányait a háttér fluoreszcencia levonását követően számoltuk, majd a 360/405 nm-es fluoreszcencia arányokat az első 5 pont átlagára normalizáltuk ( $F/F_0$ ). A sejtcsoportok egyes sejtjeiből nyert  $F/F_0$  adatokat átlagoltuk, majd az így kapott, az egyes sejtcsoportokra vonatkozó  $F/F_0$  értékeket tovább átlagoltuk, melyeket átlag  $\pm$  SEM (standard error of the mean) formában mutatunk. Az ábrán az esetszámok a  $Ca^{2+}$ -imaging adatok esetén *n=kísérletek száma/kiértékelt sejtek száma*, míg a patch-clamp adatoknál *n=kiértékelt sejtek száma* formában vannak feltüntetve.

#### ***IV/4. Immuncitokémia***

A könnymirigy acinus sejteket izolálást követően 15 percig jéghideg metanolban fixáltuk.  $Na^+$ - $K^+$  ATP-áz ellenes nyúl monoklonális antitestet (Abcam, Cambridge, UK, ref. szám ab76020) alkalmaztuk, emellett okkludin antitest (Novus, NBP1-87402) jelölést is használtunk, mely szintén egy nyúlban termelt monoklonális antitest, melyeket rendre 1:250 és 1:100 arányú hígításban adtunk a sejtekhez. Az ezt követő lépésben DyLight 488 lóban termelt nyúl elleni másodlagos antitesttel (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA) kezeltük a mintát. Végül az acinus sejteket tárgylemezre tettük és felvételeket készítettünk róluk egy Zeiss 510 Meta (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) konfokális mikroszkóppal, mely a megfelelő dióda- és gáz lézerekkel volt felszerelve.

#### ***IV/5. Statisztikai kiértékelés***

Az adatok kiértékelését Origin 7.0 (Microcal Software, Northampton, MA, USA) vagy Microsoft Excel programokkal végeztük. Az adatok, amelyeket bemutatunk, legalább három állatból származó és legalább három független mérésből származó adatok átlaga. Az ábrán feltüntetett értékek átlag  $\pm$  SEM (standard error of the mean) formában vannak kifejezve. A statisztikai értékelést Student-féle T-próba vagy ANOVA tesztekkel végeztük. Az érintett mintákat összetartozó mintás varianciánálizissel értékeltük és Bonferroni-teszttel vizsgáltuk a páronkénti átlagok különbségét. Annak megállapítására, hogy statisztikailag jelentős különbség van-e a vizsgált és a kontroll értékek között, 5%-os szignifikancia szintet alkalmazva hasonlítottuk össze az adatokat ( $p < 0.05$ ).

#### ***IV/6. RNS izolálás, reverz transzkripció és kvantitatív real-time PCR***

A QPCR elemzéseket Roche LightCycler 480 készüléken, (Roche) az 5' nukleáz assay alkalmazásával végeztük. A teljes RNS-t TRIzol (Life Technologies Hungary Ltd) segítségével izoláltuk, a DNáz kezelést a gyártó protokollja szerint kiviteleztük, majd a nyert RNS 1  $\mu$ g-ját reverz transzkriptáltuk komplement DNS-sé High-Capacity cDNA Kit-et (Life Technologies Hungary Ltd) használva. A PCR sokszorosítást TaqMan Gene Expression Assay (assay IDs: Mm01175211\_m1 - RYR1, Mm00465877\_m1 - RYR2, Mm01328421\_m1 - RYR3, Mm00439907\_m1 – inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (ITPR) type 1, Mm00444937\_m1 ITPR type 2, Mm01306070\_m1 ITPR type 3, Mm00613173\_m1 - TRPM4, Mm01129032\_m1 - TRPM5, and Mm00444690\_m1 - TRPC3) és TaqMan universal PCR master mix protokoll (Applied Biosystems) alkalmazásával végeztük. Belső kontrollként a háztartási gén (GAPDH; assay ID: Mm99999915\_g1) transzkriptumát használtuk. A transzkriptumok mennyiségét a háztartási génre normalizáltuk a  $\Delta$ CT módszerrel.

## V. Eredmények

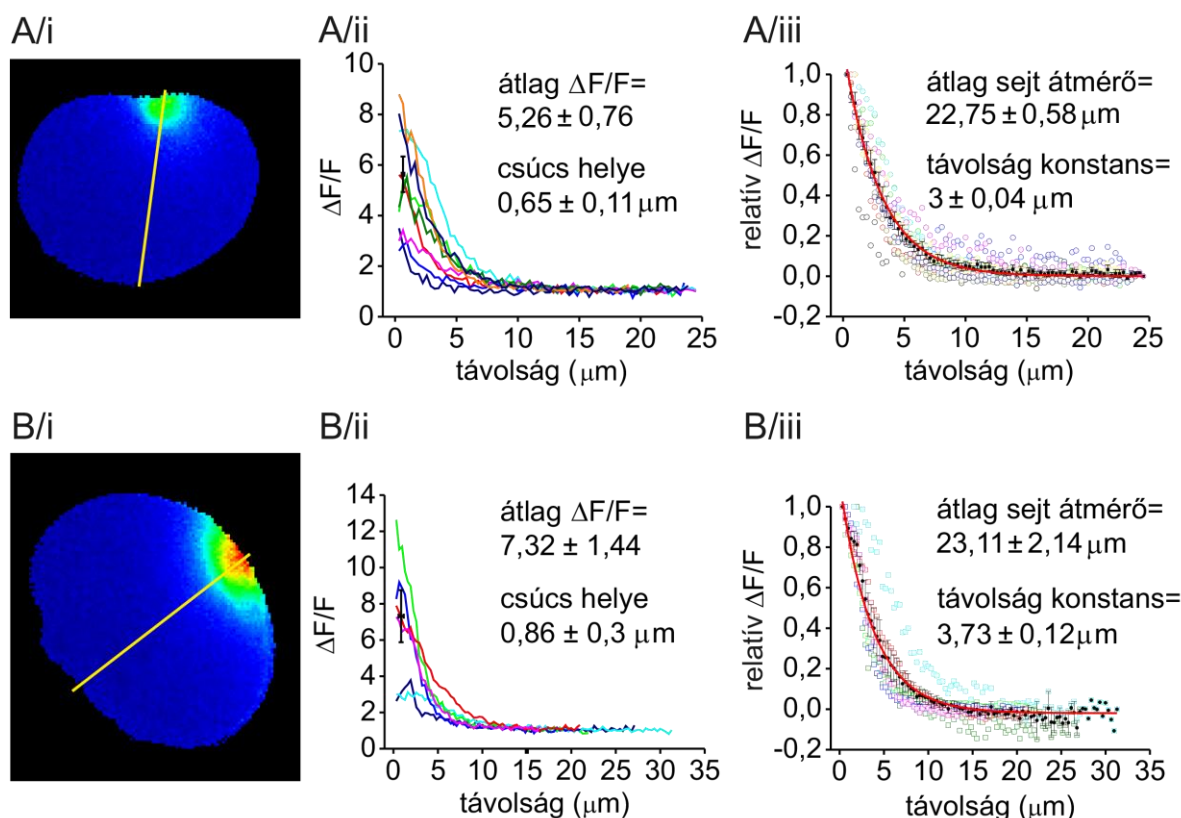
### V/1. Könnyimirigy acinus sejten végzett kísérletek eredményei

#### V/1.1 Térben limitált villanófény-fotolízis, $\text{Ca}^{2+}$ -imaging és elektrofiziológiai mérések

Annak érdekében, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált  $\text{K}^+$ -csatornák plazma membránban való elhelyezkedését meghatározhassuk, villanófény-fotolízissel olyan rövid életidejű  $\text{Ca}^{2+}$ -jeleket alakítottunk ki, melyek a sejt bazális vagy az apikális régiójára korlátozódott, és ezzel párhuzamosan a teljes sejt áramát mértük. Az acinus sejteket a patch pipettán keresztül töltöttük NP-EGTA által csapdázott  $\text{Ca}^{2+}$ -mal és Fluo-4 festékkel, és a sejtekre úgy irányítottuk az 50 ms időtartamú villanófényt, hogy az UV lézerpont ( $\sim 0.7 \mu\text{M}$  átmérőjű) a sejt bazális vagy apikális plazmamembránhoz közeli intracelluláris sejtrészre essen. Az intracelluláris Fluo-4 fluoreszcencia intenzitása alapján látható, hogy a csapdázott  $\text{Ca}^{2+}$  villanófény-fotolízise térben jól elkülönülő, helyi  $\text{Ca}^{2+}$ -jelet adott, melyet az 5. ábra szemléltet.

Az 5. ábrán a villanófény-fotolízist követően elkészített képek láthatóak, amikor 10 mM NP-EGTA és 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalmú intracelluláris oldatot alkalmaztunk. A képeket utólag szivárványskála színezéssel láttuk el, ahol a hideg színek alacsony, míg az egyre melegebb színek magasabb  $[\text{Ca}^{2+}]$ -nak felelnek meg. A villanófényt célzottan az apikális vagy a bazális régióra irányítottuk, amelyet az intenzív fluoreszcencia jelek mutatnak. A képek tisztán mutatják, hogy a fotolízis területén nagymértékű, rövid életidejű és lokális kiterjedésű  $\text{Ca}^{2+}$ -jel hozható létre ilyen körülmények között, anélkül, hogy a sejtben a fluoreszcencia-emelkedés jelentősen kiterjedne, vagy tovaterjedne. Az 5. ábra A panelén a lézerpontot az apikális membránrégió közelébe helyeztük. Az apikális régiót a granulumok elhelyezkedéséből azonosítottuk. Az 5. ábra A/ii panelén látható, hogy az átlagos fluoreszcencia emelkedés  $5,26 \pm 0,76$ -szor nagyobb volt az alapvonalhoz képest. Minden egyes fluoreszcencia jel térbeli kiterjedésének elemzése az apikális membrántól a sejt bazális membránjáig futó sárga vonalon történt, amely vonal mentén mérhető nyers és normalizált fluoreszcencia intenzitás értékeket az 5. ábra A/ii és A/iii panelén tüntettem fel. Ezek a vizsgálatok azt mutatják, hogy a fluoreszcencia csúcs növekedése az apikális membrántól átlagosan  $0,65 \pm 0,11 \mu\text{m}$  távolságra alakult ki, és a fotolízis helyétől átlagosan  $3 \pm 0,04 \mu\text{m}$  térkonstanssal exponenciálisan csökkent le,

míg a sejtek átlagos átmérője  $22,8 \pm 0,6 \mu\text{m}$  volt. Ugyanilyen kiértékelést végeztünk a bazális területre fókuszált villanófény-fotolízisnek kitett sejtek esetén is, melyek hasonló eredményt mutatnak: a normalizált fluoreszcencia intenzitás csúcs  $7,32 \pm 1,44$ -nek adódott az alapvonalhoz viszonyítva, a bazális membránhoz viszonyított távolsága  $0,86 \pm 0,3 \mu\text{m}$  volt és az intenzitás térbeli csökkenésének térkonstansa  $3,73 \pm 0,12 \mu\text{m}$  volt. Ezeknek a sejteknek az átlagos átmérője  $23,1 \pm 2,1 \mu\text{m}$  volt.



### 5. ábra A könnymirigy acinus sejteken kiváltott lokális $\text{Ca}^{2+}$ -jel

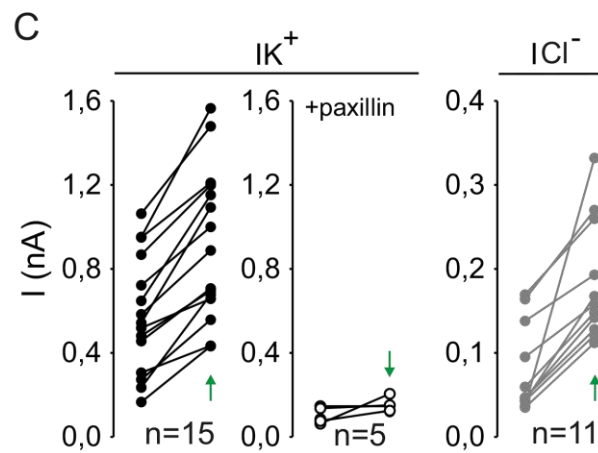
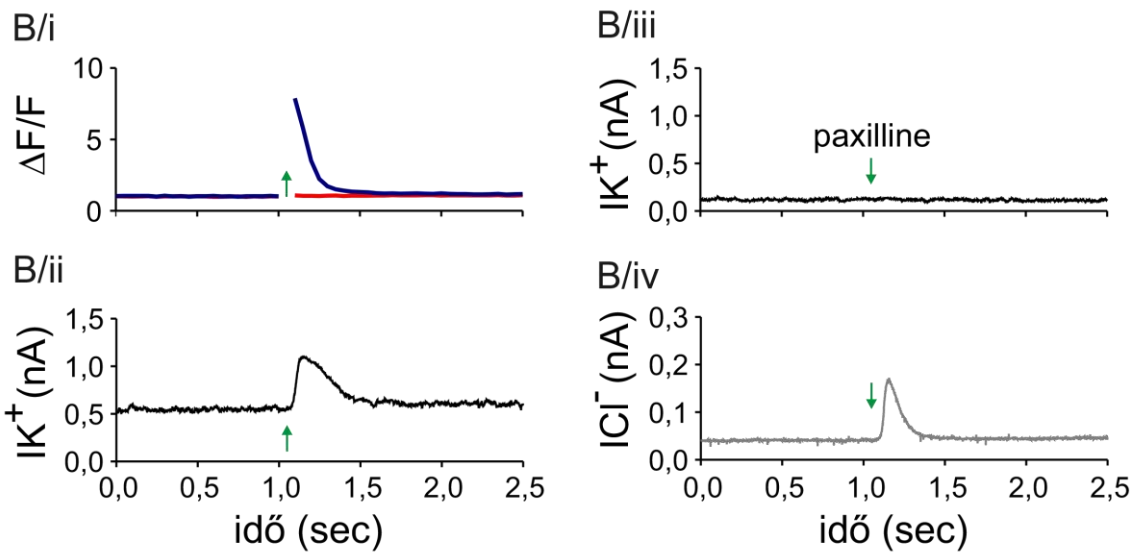
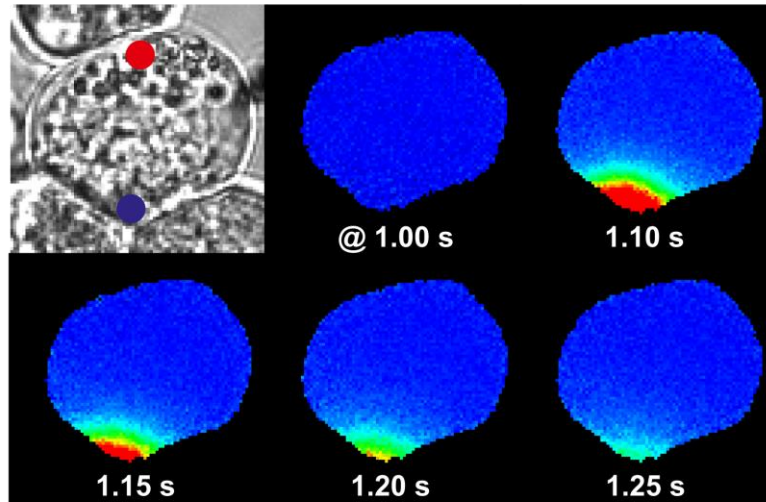
A szívárványskálán színezett fluoreszcens képek készítésekor a lézerpontot a sejt apikális (A/i) vagy a bazális membránszakaszának (B/i) közelébe helyeztük. A sejtekre fektetett sárga vonal mentén kiolvasott fluoreszcencia intenzitás értékeket ábrázoltuk a lézer besugárzási pontjától ( $0 \mu\text{m}$ ) mért távolság függvényében (A/ii és B/ii). A fekete négyszög a fluoreszcencia intenzitás csúcsok ( $0 \mu\text{m}$ ) átlag  $\pm$  SEM értékét mutatja. Hasonló grafikon látható az A/iii. és B/iii. ábrákon, itt viszont a fluoreszcencia intenzitás csúcsokra normalizált független mérési adatok kerültek ábrázolásra (üres karikák), melyek átlag  $\pm$  SEM értékeit fekete szimbólumok mutatják. A piros vonal az adatsorra illesztett exponenciális függvényt szemlélteti. A térkonstans  $3 \pm 0,04 \mu\text{m}$ , és az átlagos sejt átmérő  $22,75 \pm 0,58 \mu\text{m}$  az apikálisan célzott (A/iii), míg rendre  $3,73 \pm 0,12 \mu\text{m}$ , és  $23,11 \pm 2,14 \mu\text{m}$  a bazálisan célzott mérések (B/iii) esetén. Témavezető segítségével készült eredmények

Az 5. ábrán bemutatott adatok azt bizonyítják, hogy ilyen pufferviszonyok mellett (10 mM NP-EGTA és 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) a választott intenzitású lézertény hatására az adott sejtrégióban nagymértékben lokalizált  $\text{Ca}^{2+}$ -szint emelkedés alakult ki, és a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  növekedés nem terjed át a sejt ellenkező oldalára. Ezen adatok alapján megállapítható, hogy a módszer alkalmas az acinus sejtek  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -nak pólus-szelektív emelésére.

Miután beállítottuk és validáltuk a metodikát, az első kísérletek célja annak megvizsgálása volt, hogy az apikális membránban vannak-e funkcionális  $\text{K}^+$ -csatornák. Ennek vizsgálatára a villanófény-fotolízist a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{K}^+$ - és  $\text{Cl}^-$ -áramok teljes sejtés mérésével kombináltuk. Az apikális membránt a granuláris régió segítségével ismertük fel, és a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{Cl}^-$ -áram jelenlétével azonosítottuk, mivel a  $\text{Cl}^-$ -csatornák kizárólag az apikális membránban találhatóak meg (14, 75). Az adatokat kis sejtcsoportokból gyűjtöttük (2-3 sejt). A 6. ábra A panelén egy ilyen kis, 3 sejtből álló sejtcsoport látható egy világos látóterű mikroszkópos felvételen. A sejtcsoport középső sejtjébe olyan patch pipettával törtünk be, amely Fluo-4  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékeny festéket és csapdázott  $\text{Ca}^{2+}$ -ot tartalmazott. A  $\text{K}^+$ -áram és a Fluo-4 fluoreszcencia párhuzamos rögzítése az anyagok és módszerek részben leírtak szerint történt. Az UV lézertényt az apikális membrán közelébe pozícionáltunk, amelyet az ábrán feltüntetett kék pont jelöl. Az áram felvételének indítását követően 1,05 másodperccel történt az 50 ms időtartamú lézer megvilágítás, melyet a 6/B. ábrán zöld nyíllal jelöltünk. A 6/B/i ábrán láthatóak az apikális (kék vonal) és a bazális membrán régióban (piros vonal) mért fluoreszcencia értékek, melyek egyértelműen mutatják, hogy a villanófényt követően az apikális oldalon egy nagyjából 250 ms ideig tartó  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  emelkedés volt tapasztalható, míg a bazális oldalon a fluoreszcencia intenzitás változatlan maradt. A 6/B/ii. ábrán az ezzel párhuzamosan rögzített teljes sejt áramot mutatom be, amely jelentős  $\text{K}^+$ -áram növekedést mutat a helyileg kialakuló  $\text{Ca}^{2+}$ -jel eredményeképpen. A feltüntetett mérésnél az alapvonal 0,5 nA kiindulási  $\text{K}^+$ -áramot jelez, amely a +40 mV-on rögzített membránpotenciálból következik, ugyanis ilyen feszültség hatására a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{K}^+$ -csatornák (BK csatorna) feszültség-függő módon nyílnak. A BK csatorna gátlószer paxillin jelenlétében viszont amellet, hogy a háttéráram (az alapvonal) csökkent, elmaradt a fotolízis okozta  $\text{K}^+$ -áram növekedés is (6/B/iii. ábra). A  $\text{K}^+$ -áram mérést követően a  $\text{Na}^+$ - és  $\text{K}^+$ -glutamát alapú extracelluláris oldatot 140 mM TEA-Cl tartalmú oldatra cseréltük, amely gátolta a  $\text{K}^+$ -áramot, de elegendő  $\text{Cl}^-$ -ot biztosított az intracelluláris térbe irányuló (outward)  $\text{Cl}^-$ -áram méréshez. Ebben az

oldatban, azonos pontba fókuszált villanófény-fotolízis hatására jelentős Cl<sup>-</sup>-áramot mértünk (6/B/iv. ábra), ami arra utal, hogy a lézerrel valóban az apikális oldalt céloztuk. Az említett megfigyelések egybehangzóak voltak mind a 15 vizsgált sejt esetén. A K<sup>+</sup>- és a Cl<sup>-</sup>-áramok amplitudójának kvantitatív kiértékelése a fotolízis előtt és után, illetve paxillin jelenlétében az 6/C. ábrán látható.

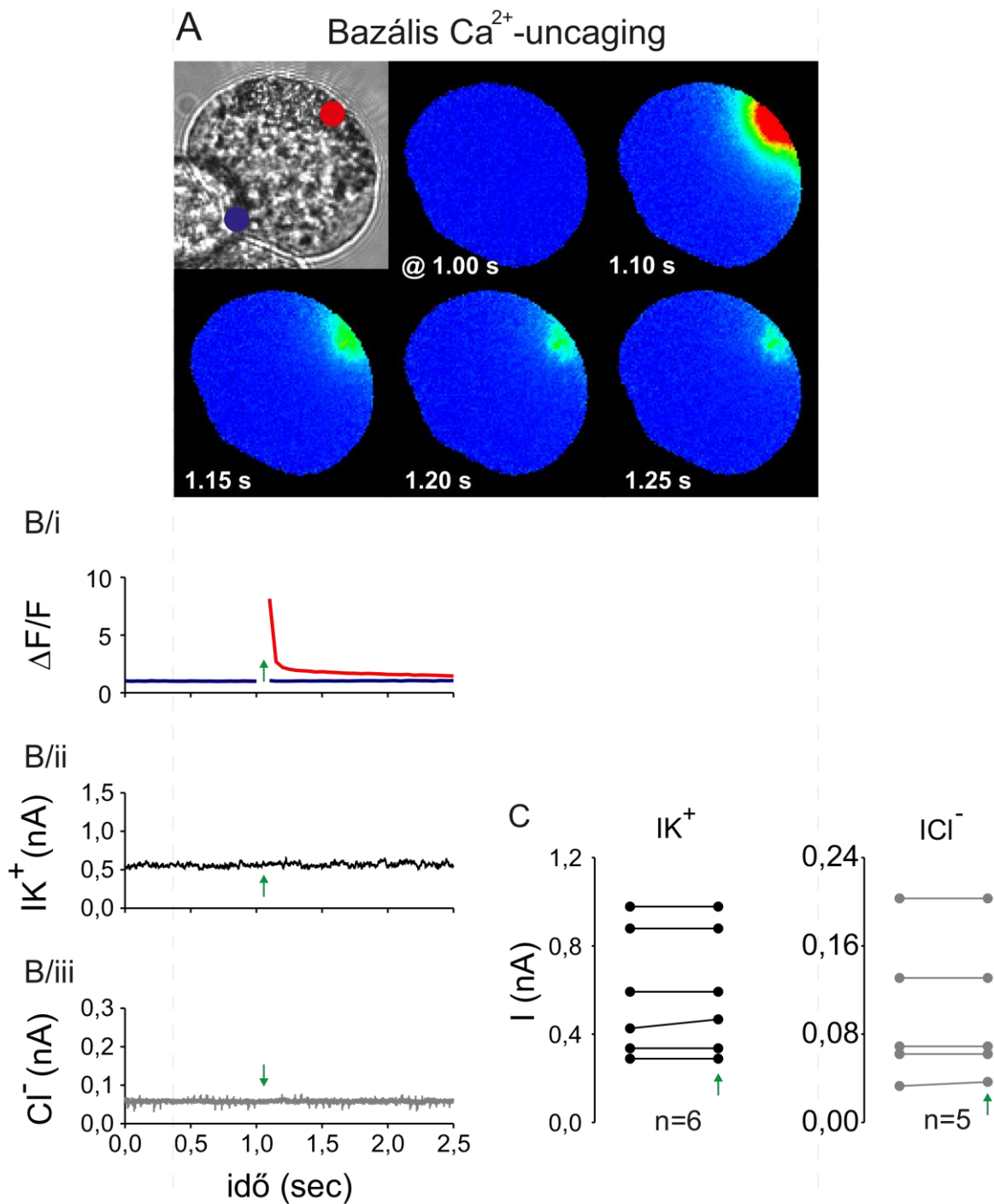
**A** Apikális  $\text{Ca}^{2+}$ -uncaging



### **6. ábra Az apikális régió K<sup>+</sup>- és Cl<sup>-</sup>-áramai**

*Az A panelen az NP-EGTA-val és Fluo-4-gyel töltött sejtek szivárványskálán színezett fluoreszcens képeinek sorozata látható, az UV lézer villanófény (kék pont) előtt és után. A lézert 1,05 másodperccel az áramfelvétel elindítása után villantottuk 50 ms időtartamig (zöld nyíl). A fluoreszcencia-változás időbeli változását a B/i grafikon ábrázolja, késsel az apikális, míg pirossal a bazális intenzitás értékeket jelöltük. A [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> növekedés okozta K<sup>+</sup>-áram változás a B ábrán figyelhető meg kontroll körülmények között (B/ii) és 1 μM paxillin jelenlétében (B/iii). Az apikális membrán mellé irányzott lézerpont hatására, 140 mM TEA-Cl oldatban mérhető Cl<sup>-</sup>-áram a B/iv panelen látható. A nyugalmi- és csúcsáram-párok adatait a C panel vonalábrája mutatja, villanófény előtt és után (zöld nyíl). Témavezető segítségével készült eredmények*

Ezt követően ugyanezzel a kísérleti elrendezéssel, de más sejteken teszteltük a bazális membránrégió K<sup>+</sup>- és a Cl<sup>-</sup>-áramait (7. ábra). Morfológiailag a retikuláris szerkezet, míg funkcionálisan a Ca<sup>2+</sup>-függő Cl<sup>-</sup>-áram hiánya segített a membránszakasz azonosításában. Bár ezeknél a méréseknél némiképp nagyobb [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> emelkedés volt mérhető (5/B. és 7/B/i. ábra), mégsem aktiválódott sem a K<sup>+</sup>-áram, sem az apikális árammarkerként szolgáló Cl<sup>-</sup>-áram (7/B/ii. és 7/B/iii. ábra). A 7/C. ábra hat különböző sejtől származó áram amplitudó értékeit ábrázolja.



**7. ábra A bazális régió  $\text{K}^+$ - és a  $\text{Cl}^-$ -áramai**

Az A panelen az NP-EGTA-val és Fluo-4-gyel töltött sejtek szivárványskálán színezett fluoreszcens képeinek sorozata látható, az UV lézer villanófény (piros pont) előtti és utáni pillanatokban. A bazális (piros vonal) és az apikális régió (kék vonal) Fluo-4 fluoreszcenciájának kinetikáját a B/i panel ábrázolja, a fotolízis időpontját a zöld nyíl jelzi. A  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadítás eredményeként mérhető teljes sejt  $\text{K}^+$ - és a  $\text{Cl}^-$ -áramokat a B/ii és B/iii panelek mutatják. Az egyes teljes-sejt áram párok adatait a C panel vonalábrája mutatja, villanófény előtt és után (zöld nyíl).

Témavezető segítségével készült eredmények

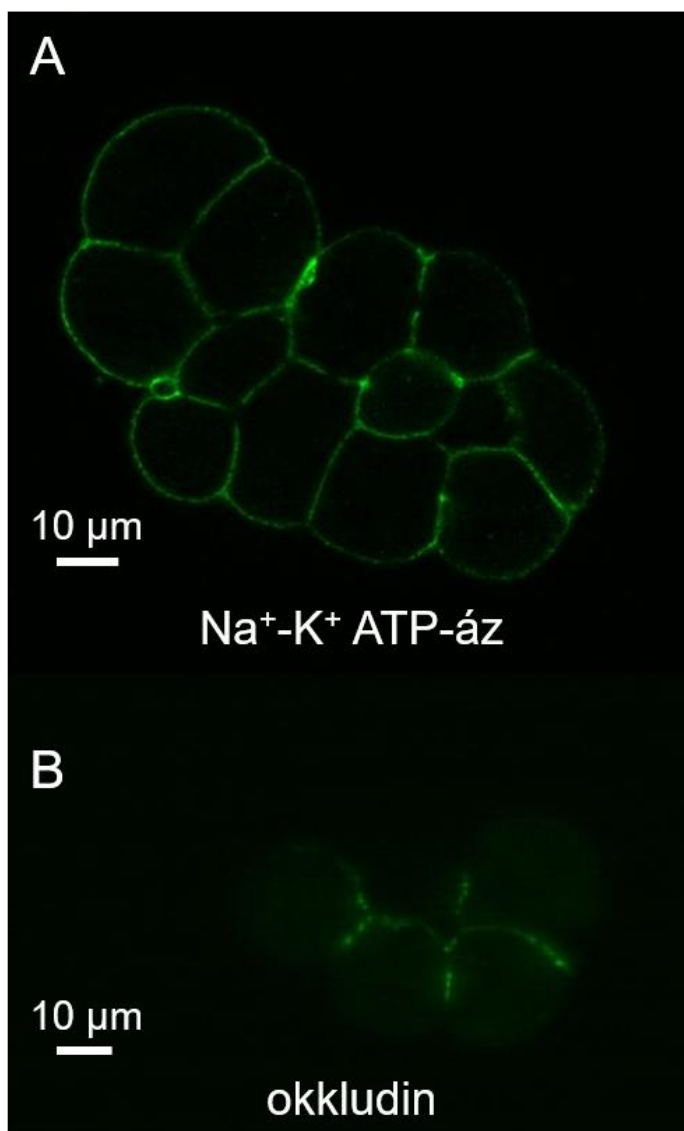
Ezek az adatok azt igazolják, hogy az egér könnymirigy acinus sejtekben a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{Cl}^-$ -csatornával azonos membránszakaszban, a plazma membrán apikális régiójában fejeződnek ki a BK csatornák. Ez az eredmény nagy segítséget jelent a könnymirigy szekréciónak mechanizmusának pontosabb megértésében.

## **V/1.2 Immuncitokémia**

A  $\text{K}^+$ -csatornák apikális elhelyezkedése jelentős  $\text{K}^+$ -szekréciónak feltételez az acinus sejtek stimulálása során, amely felveti a kérdést, hogy ennek ellenére miért lehet a primer könny viszonylag alacsony  $\text{K}^+$  tartalmú. A mi feltételezésünk, hogy ez az ellentmondás az acinus lumenből történő  $\text{K}^+$ -visszavétellel magyarázható. A hipotézisünkben szereplő, reabszorpcióért felelős  $\text{K}^+$ -transzporter működése nem depolarizáló, hogy az agonista stimuláció alatt a membránpotenciál hiperpolarizált maradjon. Emiatt a legjobban a  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  pumpa illeszkedik be a modellünkbe, mint  $\text{K}^+$ -visszavételi mechanizmus. Ennek tesztelésére az anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint végeztük el a frissen izolált acinus sejt csoportokon a  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  pumpák immunfestését. A 8/A. ábra egy ilyen acinus sejtcsoportról készült fluoreszcens képet mutat, amelyen a kötődött  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -pumpa elleni antitest helyzetét DyLight488 másodlagos antitesttel tettük láthatóvá. Figyelemre méltó, hogy a  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  pumpa egyenletesen helyezkedik el a teljes membránfelszínben, beleértve az apikális membránszakaszt is. Az immunfestés eredménye megerősíti a hipotézisünket (de ellentmond egyes korábbi adatoknak), mely szerint az acinus lumenéből, az apikális membránon keresztül a  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  pumpa végzheti a  $\text{K}^+$ -visszavételt.

Az apikálisan elhelyezkedő  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  pumpa funkcionális jelentőségét nagyban meghatározza az apikális membránszakasz aránya a teljes membránfelülethez viszonyítva. Az apikális membrán kiterjedésének megbecslése céljából az apikális membránmarkerként ismert tight-junction fehérjét, az okkludint immunfestéssel tettük láthatóvá (115). Az okkludint az ellene termeltetett antitesttel jelöltük, majd DyLight488 másodlagos antitesttel jelöltük a kötődött elsődleges antitestet. A 8/B. ábrán bemutatott immunfestés eredménye szerint a sejtkerület jelentős hányada ~30%-a fluoreszcens festődést mutat, ami arra utal, hogy az apikális membrán ennek megfelelő arányú membránfelületet képvisel. Ez alapján azt feltételezzük, hogy az apikális membránnak, és az abban elhelyezkedő  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  pumpáinak a nagy membrán-kiterjedés és a bazális membránnal megegyező

pumpasűrűség miatt igen meghatározó szerepe van az elsődleges könny szekréció összetételének kialakításában.



**8. ábra A Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP-áz elhelyezkedése a könnymirigy acinus sejtben (immunfluoreszcens festés)**

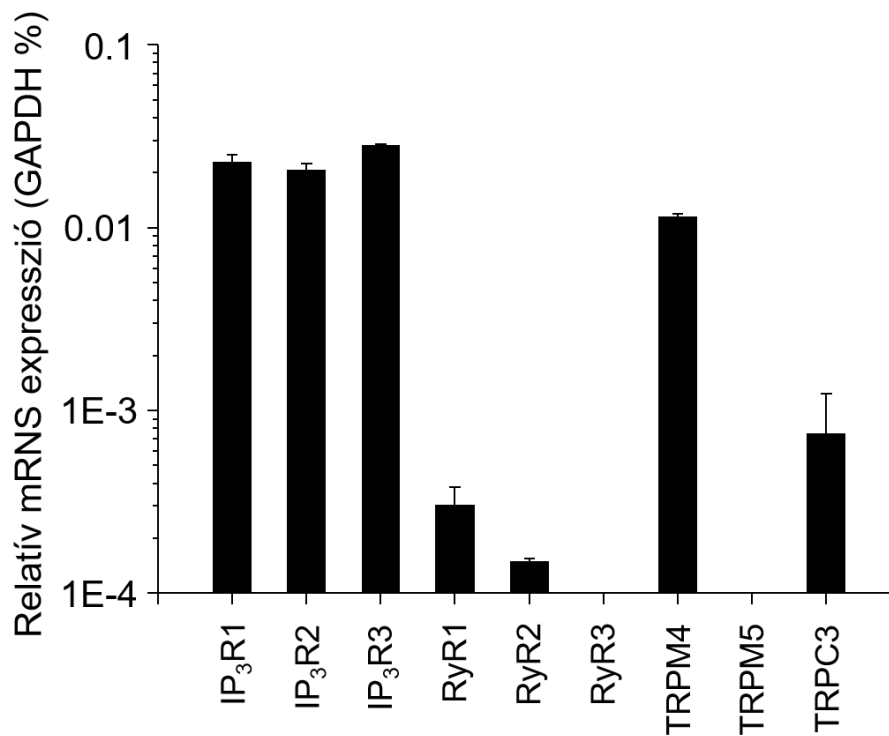
A könnymirigy acinus sejtek mind a bazolaterális, mind az apikális membránban kifejeznek Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pumpát (A). A B panelen az apikális membránt jelző okkludin fehérje eloszlása látható.

Saját eredmények

## ***V/2. Hasnyálmirigy acinus sejten végzett kísérletek eredményei***

### ***V/2.1 QPCR kísérletek***

Először real time kvantitatív polimeráz láncreakciót (RT-qPCR) végeztünk, melyhez egér hasnyálmirigy lizátumot használtunk, és a két  $\text{Ca}^{2+}$ -függő kation csatorna típus (TRPM4 és TRPM5) DNS primerjét. Ezzel párhuzamosan az  $\text{IP}_3\text{R}$  három izoformájára, a RyR három izoformájára és a TRPC3 csatornára tervezett primereket is alkalmaztunk, melyek belső kontrollként szolgáltak. Referencia-génként a GAPDH háztartási gént választottuk (9. ábra). Az  $\text{IP}_3\text{R}$  izoformák magas, viszonylag egyforma szintű, míg a RyR izoformák alacsony, közülük is a RyR1 („vázizom típusú”) a legmagasabb szintű kifejeződést mutattak. Ezek az eredmények megegyeznek a korábbi tapasztalatokkal, miszerint az  $\text{IP}_3\text{R}$  jelentős, míg a RyR csak kiegészítő szerepet játszik a hasnyálmirigy acinus sejt  $\text{Ca}^{2+}$ -szignalizációjában. A TRPM4 kifejeződési szintje összevethető az  $\text{IP}_3$  receptorokéval, és mintegy tízszer magasabb, mint TRPC3 csatornáé, mely az acinus sejtek SOCE mechanizmusért felelős egyik  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna. A TRPM5 kifejeződésének szintje viszont a kimutatható határérték alatt volt. Mivel ismert a TRPM5 magas kifejeződése az endokrin hasnyálmirigyben, a nálunk tapasztalt negatív eredmény azt támasztja alá, hogy a hasnyálmirigy mintánk Langerhans-sziget tartalma nem befolyásolja az adatainkat. Másrészt megállapíthatjuk, hogy a TRPM4 kifejeződési szintje magas a hasnyálmirigy acinus sejtekben.



**9. ábra Egér hasnyálmirigy lizátumon végzett RT-qPCR elemzés eredménye**

*Az ábrán a különböző ioncsatornák mRNS-ének GAPDH-ra normalizált, relatív kifejeződési szintje látható (n=3).*

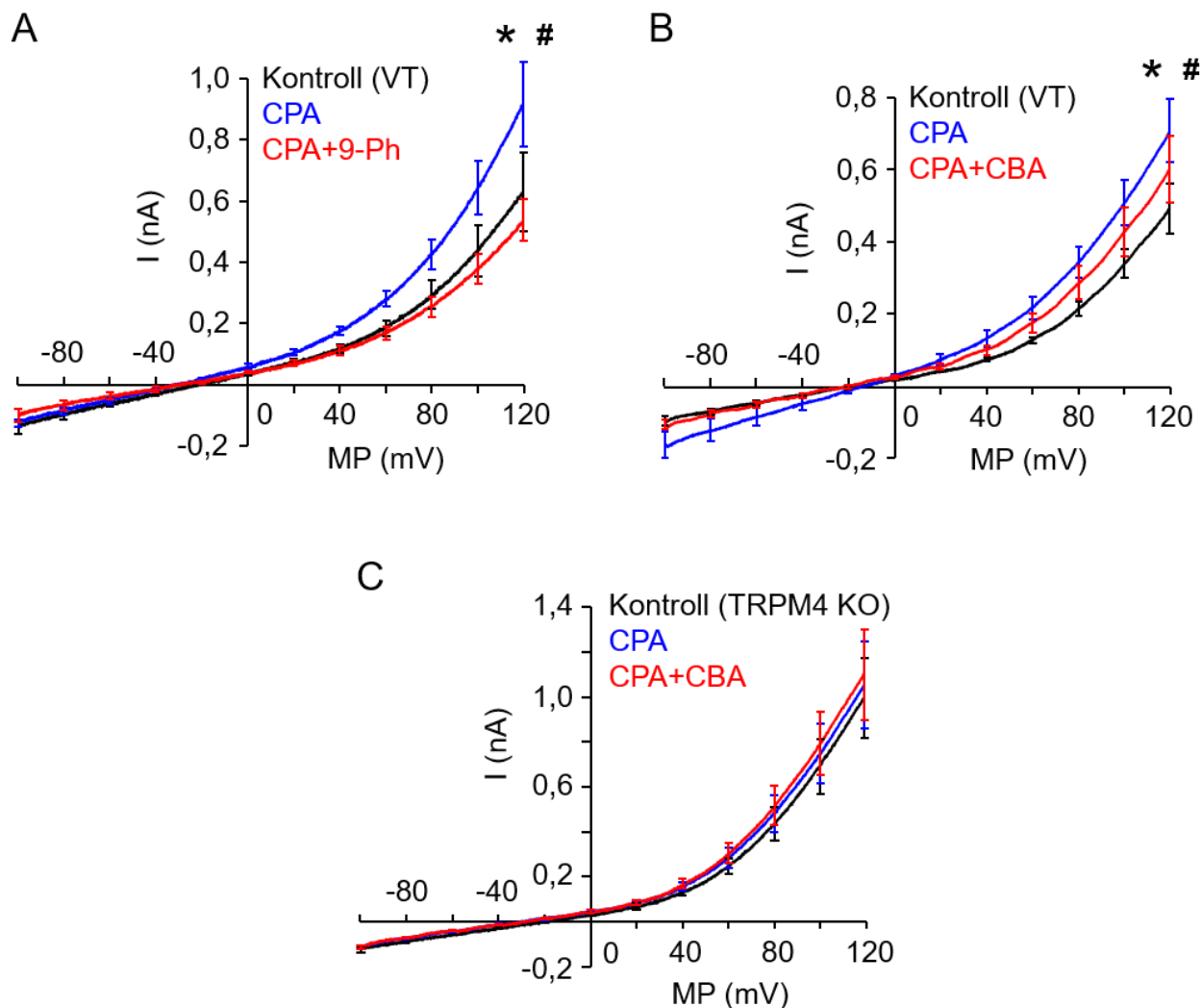
*A mérés Lisztes Erika és Tóth István Balázs segítségével készült*

## V/2.2 Elektrofiziológiai mérések

### Árammérések (TRPM4, CaCC)

A következő kísérlet-sorozat a TRPM4 funkcionális jelenlétének igazolását célozta meg, melyhez a feszültség-zár módban alkalmaztuk a patch-clamp technika teljes sejtes konfigurációját. Az intra- és extracelluláris oldatok összetételét úgy terveztük meg, hogy specifikusan nemszelektív kationcsatorna mérésre legyen alkalmas. Ennek megfelelően az oldatokban a  $\text{Cl}^-$  nagy részét lecseréltük glutamátra, ezáltal elkerülhető volt a  $\text{Cl}^-$ -áram megjelenése, míg a pipetta oldatban a  $\text{K}^+$ -ot  $\text{Cs}^+$ -mal helyettesítettük, így gátolva a  $\text{K}^+$ -áramot. A 10. ábra a  $-60$  mV-tól  $+120$  mV-ig futó rámpa feszültség protokoll futtatásakor mért áramjeleket mutatja. Kontroll körülmények között egy inward kation áram figyelhető meg, ami enyhe feszültség-függést mutat a pozitív feszültség tartományban. Amikor ugyanezt a sejtet a SERCA pumpa specifikus gátlószerével, a CPA-val kezeltük, az áram szignifikánsan megnőtt. A CPA alkalmazása egy gyakran használt módszer az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  növelésére, mivel gátolja a SERCA pumpa által végzett  $\text{Ca}^{2+}$ -visszavételt az ER-be, amely nyugalomban az ER-ből történő  $\text{Ca}^{2+}$ -csorgást kompenzálja, ezért az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  emelkedését okozza. A CPA használata azért előnyös erre a célra a szekretagóg szemben, mert a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  növelése mellett megőrzi a plazma  $\text{PIP}_2$  tartalmát is, ezzel a TRPM4 működéséhez szükséges  $\text{PIP}_2$  a mérés végéig megmarad, megelőzve a TRPM4 áram nem-specifikus csökkenését. Emellett a CPA - más gátlószerekkel ellentétben - vízdékonysága miatt kimosható a sejtéből, ezzel megteremtve az önkontrollos kísérleti elrendezés lehetőségét. Miután a CPA hatására a TRPM4 áram állandó értéket vett fel, megkezdtük a széles körben használt TRPM4 gátlószer, a 9-Phenanthrol  $100 \mu\text{M}$  koncentrációjú oldatának perfúzióját, amely jelentősen gátolta az áramot (10/A. ábra). Sajnos a 9-Phenanthrol alacsony specificitású, a TRPM4 csatorna mellett a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{Cl}^-$ -csatornát is gátolja. Mivel mind a két említett csatorna árama depolarizáló hatású, a hasnyálmirigy acinus sejteken tervezett kísérleteink kivitelezéséhez (fiziológiás,  $157 \text{ mM Cl}^-$  tartalmú sóoldatban) a 9-Phenanthrolt a jelentős  $\text{Cl}^-$  áram gátlás depolarizáló hatása miatt nem tudtuk volna TRPM4 gátlószerként alkalmazni. A mérési melléktermékek elkerülése érdekében egy másik, sokkal specifikusabb TRPM4 gátlószerre volt szükségünk, ezért egy nemrégiben szelektált molekula, a CBA (4-Chloro-2-[[2-(2-chlorophenoxy)acetyl]amino] benzoic acid) hatását is teszteltük (106).

Azt tapasztaltuk, hogy a CBA 10  $\mu\text{M}$  koncentrációban 100  $\mu\text{M}$  9-Phenanthrolhoz hasonló hatásossággal gátolta a TRPM4 áramot (10/B. ábra).



**10. ábra A  $\text{Ca}^{2+}$ -függő kation áram biofizikai és farmakológiai tulajdonságai hasnyálmirigy acinus sejtekben**

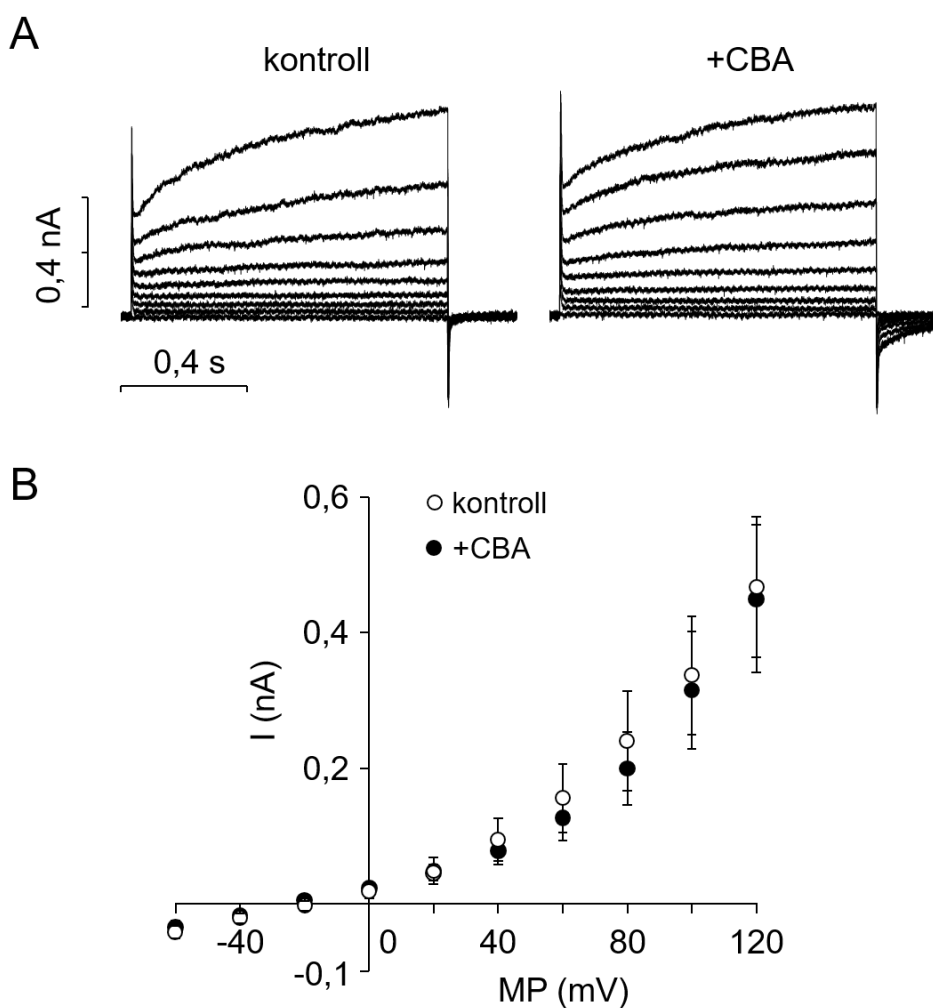
Patch-clamp körülmények között rámpa feszültség protokolt alkalmaztunk, és az így kapott teljes sejt áramfelvételek átlagát ábrázoltuk. A méréseket egyedi sejteken vagy 2-3 sejtes csoportokon végeztük. Az acinus sejteket vad típusú (A, B), vagy TRPM4 KO (C) egerekből izoláltuk.

\* - szignifikáns különbség a kontrollhoz képest; # - szignifikáns különbség a CPA kezeléshez képest; (A,  $n=7$ ; B,  $n=5$ ; C,  $n=6$ ).

Saját eredmények

A 11. ábrán bemutatott kiegészítő kísérletünk a CBA szelektivitásának ellenőrzésére irányult. Arra voltunk kíváncsiak, hogy a hasnyálmirigy acinus sejtek  $\text{Cl}^-$ -áramát gátolja-e a CBA az előző kísérletben alkalmazott, 10  $\mu\text{M}$ -os koncentrációban. A patch-clamp méréseknél feszültség-lépcső protokolt alkalmaztunk, -60 - +120 mV

tartományban. Az áramméréseken jól megfigyelhető a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{Cl}^-$ -áram jellegzetes karaktere: a feszültség-független, konstans konduktanciájú komponens, amely lineárisan növekszik a feszültség függvényében, illetve a feszültség-függő áramkomponens, amely csak megfelelően nagy ( $\sim +40$  mV) feszültségen jelenik meg és kialakulása időfüggő (11. A ábra). A 11. B ábrán a különböző feszültség értékekhez tartozó áramok átlaga látható, mely alapján egyértelműen látszik, hogy  $10 \mu\text{M}$  CBA nem gátolja az acinus sejt  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{Cl}^-$ -áramát. Az előnyös szelektivitási tulajdonságai miatt a további kísérleteinkben is a CBA-t alkalmaztuk a hasnyálmirigy acinus sejt TRPM4 áramának gátlására.



### 11. ábra CBA hatása a hasnyálmirigy acinus sejt $\text{Cl}^-$ -áramára

Az A panelen a teljes sejt áramok reprezentatív mérései láthatóak kontroll körülmények között és  $10 \mu\text{M}$  CBA jelenlétében. A feszültség-lépcső protokoll  $-60$  mV és  $+120$  mV között,  $20$  mV-os lépcsőkben depolarizálta a sejtmembránt, miközben a pipettában a  $[\text{Ca}^{2+}]$   $1 \mu\text{M}$  volt. A mérések átlagait a B panel mutatja. ( $n=5$ ).

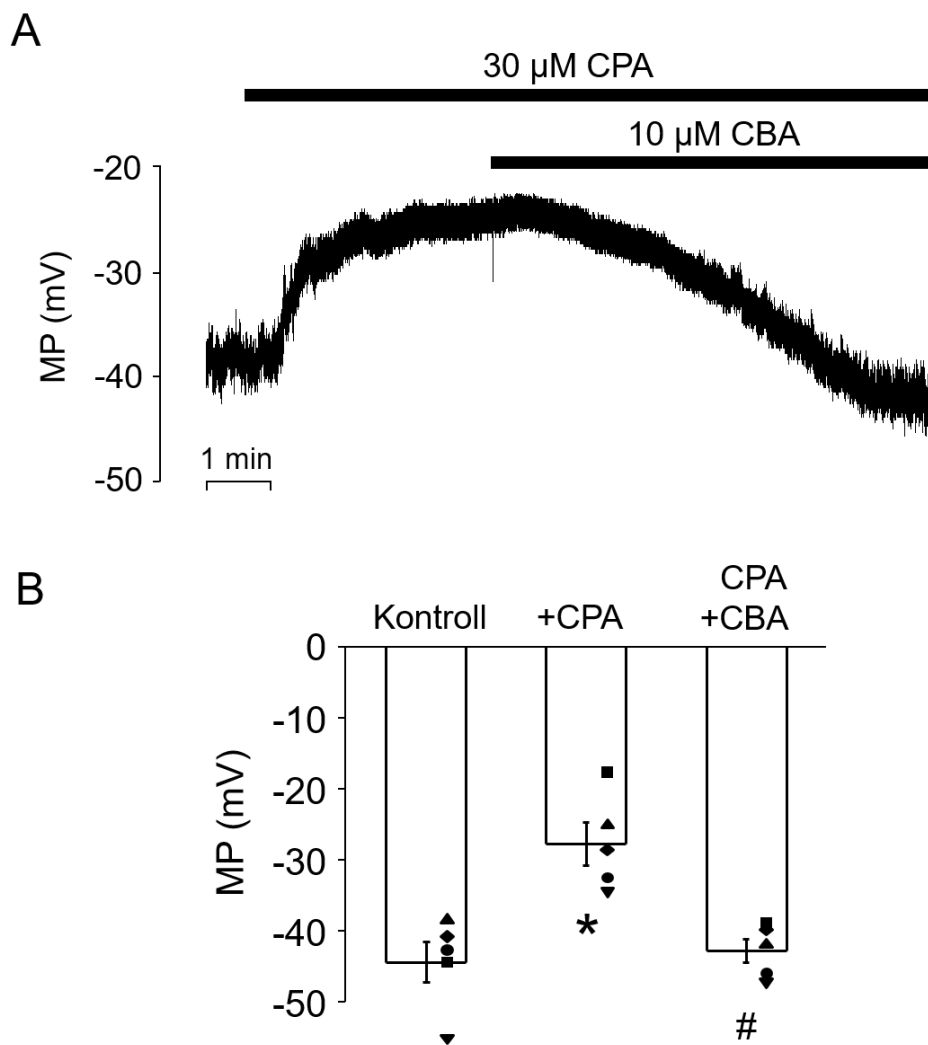
Saját eredmények

A továbbiakban olyan hasnyálmirigy acinus sejteken is végeztünk ugyanilyen kísérleti elrendezésben kationáram méréseket, amelyeket TRPM4 csatorna fehérjét kódoló gént nem expresszáló (TRPM4 génkiütött - TRPM4 KO) egerekből izoláltunk. Bár ezekben a sejtekben a háttéráram magasabb volt a kontrollhoz képest, amely CPA hatására nem növekedett és CBA-ra sem volt érzékeny (10/C. ábra). Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a TRPM4 funkcionálisan is kifejeződik a hasnyálmirigy acinus sejtekben, mégpedig jelentős mennyiségben.

### ***Membránpotenciál mérések***

A TRPM4 áram membrán potenciálra gyakorolt hatását a perforált patch clamp módszerrel vizsgáltuk, az áram zár (current-clamp) konfigurációt alkalmazva. A kontroll körülmények között mérhető  $-44,38 \pm 2,88$  mV-os ( $n=5$ ) nyugalmi membrán potenciál  $30 \mu\text{M}$  CPA kezelés hatására lassan emelkedni kezdett, míg elérte a  $-27,70 \pm 2,99$  mV-os ( $n=5$ ) egyensúlyi feszültségértéket. Ezt követően  $10 \mu\text{M}$  CBA-t tartalmazó oldattal perfundáltuk a sejteket, melynek eredményeképpen a membránpotenciál visszaállt a nyugalomhoz közeli  $-42,86 \pm 1,65$  mV-os ( $n=5$ ) feszültség értékre (12. ábra).

Ezen kísérleti eredményeink alapján arra következtetünk, hogy a hasnyálmirigy acinus sejt membránpotenciálja TRPM4 csatornán keresztül,  $\text{Ca}^{2+}$ -függő módon depolarizálódik. Mindemellett feltételezzük, hogy a membrán potenciál depolarizációja eléggé lecsökkenti a  $\text{Ca}^{2+}$  elektrokémiai hajtóerejét ahhoz, hogy jelentősen csökkenjen a  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlás az extracelluláris térből.



**12. ábra A TRPM4 csatorna szerepe a membrán depolarizációban**

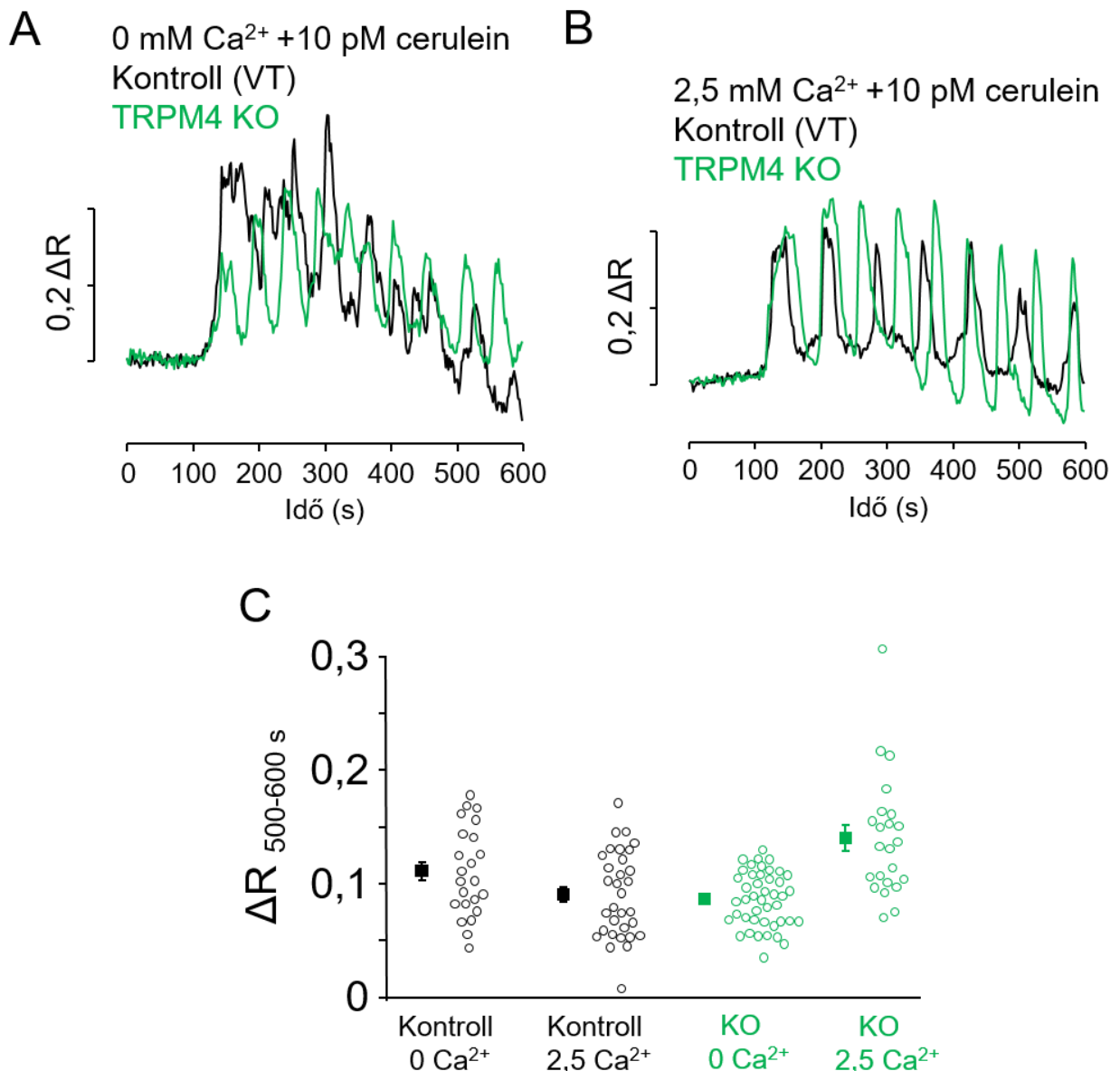
Az A panelen egy reprezentatív membránpotenciál (MP) felvétel látható kontroll extracelluláris oldatban, majd 30  $\mu$ M CPA, és azt követően 10  $\mu$ M CBA hozzáadása után. A különböző kísérleti körülmények között mért átlagos membránpotenciál értékeket a B panelen ábrázoltuk, megjelenítve az egyedi mérések értékeit is ( $n=5$ ).

\* - szignifikáns különbség a kontrollhoz képest ( $P<0,05$ ); # - szignifikáns különbség a CPA kezeléshez képest ( $P<0,05$ )

Saját eredmények

### V/2.3 Ca<sup>2+</sup>-imaging mérések

Annak ellenőrzésére, hogy a TRPM4 áram okozta depolarizáció valóban csökkenti a Ca<sup>2+</sup>-beáramlás hajtóerejét, hasnyálmirigy acinus sejtcsoportokon [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> méréseket végeztünk ráciometrikus, fluorescens mikroszkópos eljárással. Hosszú ideig tartó, alacsony koncentrációjú (10 pM) cerulein kezeléssel stimuláltuk a sejteket. A cerulein a CCK-val egyenértékű hatású peptid. Kísérleteinket 2,5 mM Ca<sup>2+</sup>-ot tartalmazó és Ca<sup>2+</sup> mentes extracelluláris oldatban is elvégeztük vad típusú és TRPM4 KO sejteken egyaránt. A folyamatos 10 pM cerulein kezelés a [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> szabályszerű oszcillációját eredményezte minden csoportban (13. ábra A és B panelek), amely arra utal, hogy a sejtek az izolálás után is megtartották a fiziológias válaszkészségüket. A görbék értékelésekor a cerulein kezelés 500-600 másodperce között kialakuló Ca<sup>2+</sup>-tűskét vizsgáltuk. Azért választottuk ezt az időablakot, mert ennyi idő után várhatóan már az extracelluláris térből beáramló Ca<sup>2+</sup> is részt vesz a Ca<sup>2+</sup>-jel kialakításában (9). A Ca<sup>2+</sup>-tartalmú és a Ca<sup>2+</sup>-mentes oldatban mért tűskék átlagos amplitúdója a vad típusú sejtek esetében nem különbözött ( $\Delta R_{500-600\text{ s}}$ :  $0,111 \pm 0,008$  és  $0,091 \pm 0,007$ ), míg a TRPM4 KO sejtek esetén a Ca<sup>2+</sup>-tartalmú oldatban jelentősen magasabb volt ( $\Delta R_{500-600\text{ s}}$ :  $0,087 \pm 0,004$  és  $0,140 \pm 0,011$ ). Az adatok azt mutatják, hogy 500 másodperces cerulein kezelést követően a TRPM4 KO sejtekben jelentős mértékű Ca<sup>2+</sup>-beáramlás van jelen, amely a TRPM4 csatornát tartalmazó vad típusú sejtekben nem tapasztalható (13. ábra C panel). Emellett fontos megjegyezni, hogy a kontroll és a TRPM4 KO sejtek Ca<sup>2+</sup>-mentes oldatban mérhető tűskéinek átlagos amplitúdója lényegében azonos nagyságú volt, amely arra utal, hogy a kezelés végére az ER Ca<sup>2+</sup>-tartalma hasonló volt a két sejttypusban. A görbe alatti terület (AUC – area under curve; ez esetben az 500-600 másodperc között kialakult Ca<sup>2+</sup>-tüske alatti terület, amely arányos az intracelluláris tér össz Ca<sup>2+</sup>-szintjével az adott időben) az amplitúdóhoz hasonló szabályszerűséget követett, de a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns. A Ca<sup>2+</sup>-tűskék hasonló frekvenciával ismétlődtek a vad típusú és a TRPM4 KO acinus sejtekben. Összefoglalva, a Ca<sup>2+</sup>-tartalmú extracelluláris oldatban a vad típusú és a TRPM4 KO acinus sejtek Ca<sup>2+</sup>-jelében mérhető különbség arra utal, hogy a TRPM4 csatorna fiziológiásnak tekinthető szekretagóg stimulus mellett jelentős szerepet játszik a Ca<sup>2+</sup>-beáramlás negatív visszacsatolású szabályozásában.

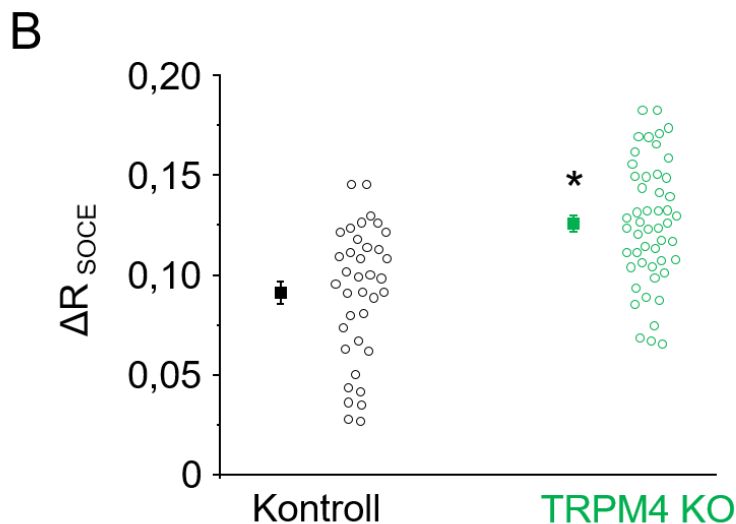
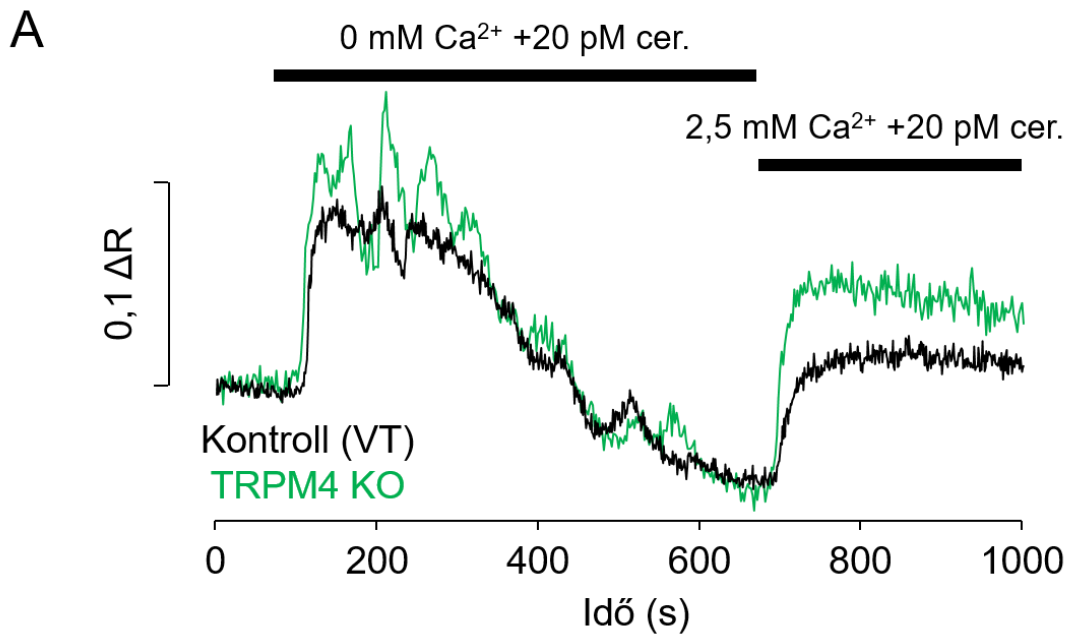


### 13. ábra A TRPM4 áram hatása a Ca<sup>2+</sup>-oszcillációra

A vad típusú vagy TRPM4 KO egérből izolált hasnyálmirigy acinus sejteket Fura-8 AM festékkel töltöttük, majd ezt követően ráciometrikus fluoreszcens Ca<sup>2+</sup>-imaging mérést végeztünk. Az A és B paneleken a fluoreszcencia intenzitás arányokat ( $\Delta R$ ) mutatjuk be. Az izolált acinus sejtcsoport fluoreszcencia adatainak kiértékelése sejtenként történt. A 10 pM cerulein kezelésre adott oszcilláló [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-t 0 és 2,5 mM Ca<sup>2+</sup>-ot tartalmazó extracelluláris oldatban is megmértük (A és B panelek). Az 500 és 600 s között kialakuló Ca<sup>2+</sup>-tűskék jel-intenzitását értékeltük ki ( $\Delta R$  500-600 s). Az egyedi sejtek (üres kör) és a sejtcsoport átlag  $\pm$  SE (négyzet) értékei a C panelen láthatóak ( $n$ = mérésszám/sejtszám;  $n_{CTRL}$  0 Ca<sup>2+</sup>= 3/23;  $n_{CTRL}$  2,5 Ca<sup>2+</sup>= 4/33;  $n_{KO}$  0 Ca<sup>2+</sup>= 6/44;  $n_{KO}$  2,5 Ca<sup>2+</sup>= 3/23). \* - szignifikáns különbség a kontrollhoz képest ( $P < 0,05$ , független mintás ANOVA, Bonferroni korrekció)

Saját eredmények

Az elméletünk igazolására további kísérleteket terveztünk, melyekben az ER jelentős mértékű ürítésével értük el a SOCE kialakulását. A hasnyálmirigy acinus sejt ER ürítését 10 percig végeztük 20 pM ceruleint tartalmazó  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes extraceluláris oldatban. Ez a magasabb koncentrációjú ceruleinnel történő kezelés minőségileg más, tónusosabb jellegű  $\text{Ca}^{2+}$  jeleket eredményezett, ami alkalmas az ER gyors kiürítésére. A kezelés által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$  válasz amplitudója fokozatosan csökkent, amely az ER ürülése miatt lép fel, köszönhetően annak, hogy a plazmamembrán  $\text{Ca}^{2+}$ -pumpa (PMCA) a  $\text{Ca}^{2+}$  egy részét az extracelluláris térbe juttatja, ami extracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  hiányában  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlással nem pótlódik. Ezután az extracelluláris oldatot 2,5 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációjú oldatra cseréltük, ami a  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlás miatt tónusos  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  növekedést eredményezett (14. ábra A panel). A görbék kiértékelésekor meghatároztuk a 2,5 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -ban mért fluoreszcens intenzitások értékét és azt tapasztaltuk, hogy a vad típusú acinus sejtekhez képest ( $\Delta R_{\text{SOCE}}: 0,091 \pm 0,005$ ) a TRPM4 KO sejteken mérhető amplitudó ( $\Delta R_{\text{SOCE}}: 0,126 \pm 0,004$ ) szignifikánsan magasabb volt (14. ábra B panel).



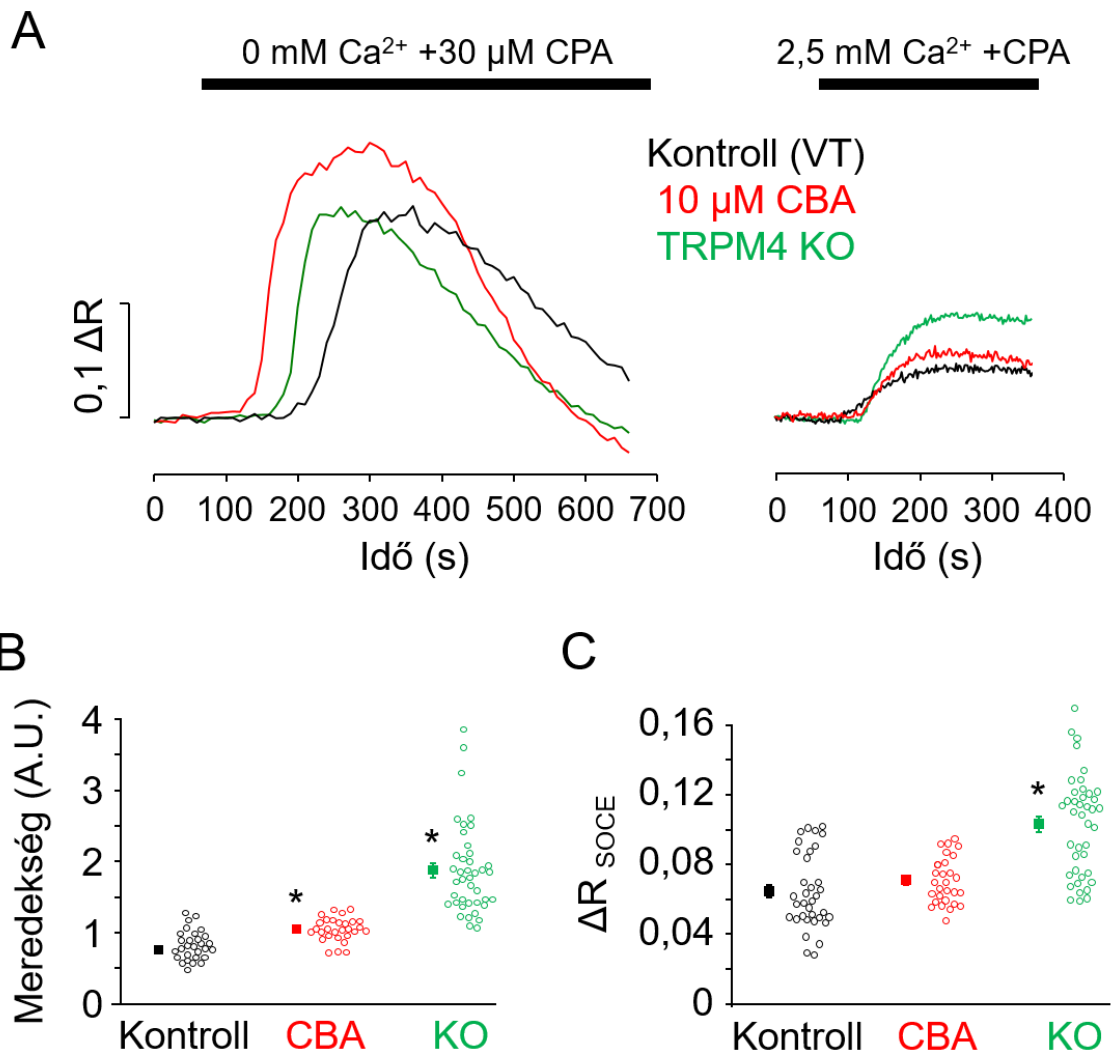
**14. ábra A TRPM4 áram hatása a szekretagóg stimulussal kiváltott SOCE-re**

A vad típusú és TRPM4 KO acinus sejtek Ca<sup>2+</sup>-jelei láthatóak az A panelen (fekete, illetve zöld vonalak). A 20 pM cerulein kezelés Ca<sup>2+</sup>-mentes extracelluláris oldatban indult, majd 2,5 mM Ca<sup>2+</sup>-tartalmú oldatban folytatódott. A B panel a 2,5 mM Ca<sup>2+</sup>-tartalmú oldatban mért fluoreszcencia amplitudók statisztikáját mutatja (ΔR<sub>SOCE</sub>; n= mérésszám/sejtszám; nCTRL= 6/37; nTRPM4 KO= 7/50)

\* - szignifikáns különbség a kontrollhoz képest (P<0,05, független mintás Student-féle T-próba).

Saját eredmények

A SOCE még specifikusabb vizsgálatára további kísérleteket végeztünk, melyekben az ER ürítéséhez cerulein helyett CPA-t használtunk. Ez a kísérleti elrendezés lehetőséget ad arra, hogy elkerüljük a szekretagóg stimulációkor fellépő, a  $\text{Ca}^{2+}$ -jelre hatást gyakorló egyéb tényezőket (például PIP2 bomlás). Az ER  $\text{Ca}^{2+}$  szivárgását 30  $\mu\text{M}$  CPA-t tartalmazó  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes extracelluláris oldattal váltottuk ki. A kezdeti fázisban a kezelés hatására a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  megnövekedett, majd azt követően lassan lecsökkent, amely azt mutatja, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$  szivárgás utánpótlása az ER kiürülése miatt megszűnt és a  $\text{Ca}^{2+}$ -ot az intracelluláris térből a PMCA kipumpálta az extracelluláris térbe. Az ER kiürítése alatt mért  $\text{Ca}^{2+}$ -jelek nem különböztek a kontroll, a CBA-kezelt és a TRPM4 KO sejtekben ( $0,18 \pm 0,02$ ,  $0,22 \pm 0,01$  and  $0,21 \pm 0,03$ ), amely arra utal, hogy a két sejtípus ER-je kezdetben hasonló mennyiségű  $\text{Ca}^{2+}$ -ot tartalmazott. Miután a fluoreszcencia intenzitás újra elérte az alap értéket, a  $\text{Ca}^{2+}$ -mentes extracelluláris oldatot 2,5 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalmú oldatra cseréltük, amely jelentős  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  növekedést okozott, ami a  $\text{Ca}^{2+}$  extracelluláris térből történő beáramlásának volt köszönhető (15. ábra A panel). Hasonló kísérleteket CBA jelenlétében és TRPM4 KO acinus sejteken is végeztünk. A TRPM4 csatorna gátlószer CBA adagolását csak az ER teljes ürítését követően indítottuk, hogy elkerüljük a CBA esetleges, az ER ürülésére és  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalmára gyakorolt nemkívánt mellékhatását. A  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlásról információt nyújtó fluoreszcencia intenzitás arányok értékelése azt mutatja, hogy a TRPM4 KO acinus sejtek esetén a fluoreszcencia változás meredeksége és amplitudója is nagyobb volt a kontrollhoz viszonyítva. Emelett a CBA kezelés hatására szignifikánsan nőtt a fluoreszcencia jel meredeksége, míg az amplitudóban nem tapasztaltunk változást (meredekség, CTRL:  $0,76 \pm 0,04$ ; CBA:  $1,06 \pm 0,03$ ; TRPM4 KO:  $1,88 \pm 0,1$  A.U. (önkéntes egység);  $\Delta R_{\text{SOCE}}$ : CTRL:  $0,065 \pm 0,004$ ; CBA:  $0,071 \pm 0,002$ ; TRPM4 KO:  $0,103 \pm 0,005$ ). Ezek a mérési eredmények egybehangzóak a 14. ábrán láthatóakkal, és tovább erősítik az elméletünket, miszerint a TRPM4 negatív visszacsatolással szabályozza a  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlást egér hasnyálmirigy acinus sejteken.



**15.ábra A TRPM4 áram hatása a CPA-val kiváltott SOCE-ra**

Az A panelen a kontroll, a CBA-kezelt és a TRPM4 KO acinus sejtekben folyamatos 30 μM CPA perfúzió hatására mérhető Ca<sup>2+</sup>-jelek láthatóak, Ca<sup>2+</sup>-mentes, majd oldatcserét követően 2,5 mM Ca<sup>2+</sup>-ot tartalmazó extracelluláris oldatban. A B és C panelek a 2,5 mM Ca<sup>2+</sup> jelenlétében mért fluoreszcens jel meredekségét és amplitudóját (ΔR) ábrázolják (n= mérésszám/sejtszám; nCTRL= 5/35 ; NCBA: 4/29; nKO: 5/41)

\* - szignifikáns különbség a kontrollhoz képest (P<0,05, független mintás Student-féle T-próba)

A.U. – önkényes egység (arbitrary unit), normalizált értékekből meghatározott meredekség

Saját eredmények

## VI. Megbeszélés

### *Az új könnysekreációs modell*

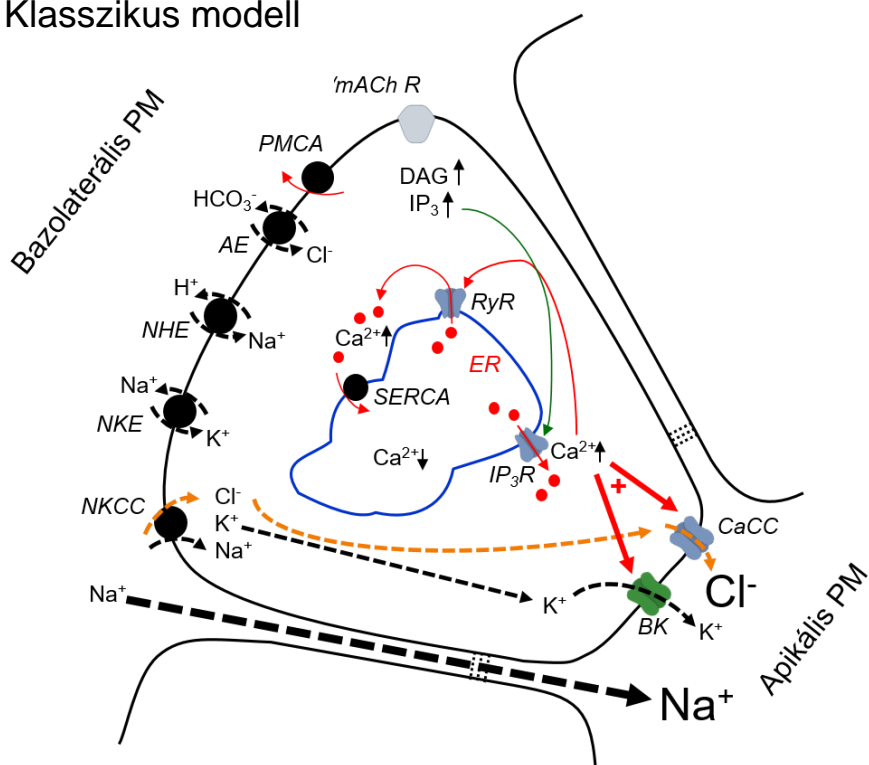
Az eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a  $K^+$ -csatornák a  $Cl^-$ -csatornákkal együtt az apikális membránban helyezkednek el, ahol  $Na^+$ - $K^+$  pumpasűrűség a bazális membránéval azonos. Ezek alapján egy új könnymirigy szekréciós modellt hoztunk létre. A jobb összehasonlíthatóság érdekében a régi és az új modellt egy ábrán szemléltetem (16. ábra). Bár az új modell alap elgondolása nagyon hasonló a régi, Wood és Mircheff által 1986-ban megalkotott modelljéhez (109), mégis sokkal nagyobb részletességgel és pontosabban írja le a membránon keresztül folyó ionmozgásokat az új eredményeket figyelembe véve. A BK csatorna szekretoros epitelsejtekben fontos szerepet játszik a  $Na^+$  és  $Cl^-$  gazdag folyadék szekréciójában. A szekretagóg stimulációra megemelkedő  $[Ca^{2+}]_i$  aktiválja a CaCC csatornákat, viszont az extracelluláris térbe kilépő  $Cl^-$  kompenzáló mechanizmus nélkül a membránpotenciált a saját egyensúlyi potenciálja felé mozdítaná, lecsökkentve a  $Cl^-$ -szekréció hajtóerejét. A BK csatorna a  $Cl^-$ -szekréció finom szabályozásában játszik szerepet oly módon, hogy a  $Ca^{2+}$ -jelre a CaCC-val párhuzamosan a BK csatorna is aktiválódik, és a kilépő  $Cl^-$ -ot követi a  $K^+$  kiáramlása is, ezzel kiegyensúlyozva a membránpotenciált és biztosítva a folyamatos  $Cl^-$ -hajtóerőt. Az említett folyamat feltétele, hogy a BK csatorna az apikális membránban helyezkedjen el, mely hipotézis könny- és hasnyálmirigy acinus sejtek esetén is igazolást nyert a  $Ca^{2+}$ -uncaging és immunfluoreszcens technikák segítségével (14, 110). A régi modell szerint a citoplazmába történő  $Na^+$ -transzport a  $Na^+$ - $K^+$ - $2Cl^-$  és a  $Na^+$ - $H^+$  kotranszportereken keresztül valósul meg, és a  $Na^+$ - $K^+$  ATPáz segítségével a  $Na^+$  körforgást végez a bazális membránon. A  $K^+$  és a  $Cl^-$  szintén a bazolaterális membránon keresztül, a  $Na^+$ - $K^+$ - $2Cl^-$  és  $Cl^-$ - $HCO_3^-$  kotranszporterek segítségével jut a sejtbe. Ezek az ionok az apikális membránon át jutnak ki a lumenbe a  $Ca^{2+}$ -függő  $K^+$  és  $Cl^-$ -csatornákon keresztül (115). Az előbb leírt mechanizmus szerint elsődlegesen a  $K^+$ -szekréció felelős az ozmotikus gradiens kialakításában, ezzel csökkentve az epitéliumon keresztüli  $Na^+$ -hajtóerőt, és következésképp a  $Na^+$ -szekréciót. Ezt az elméletet viszont a könnyfolyadékban az ionok koncentráció-aránya nem támasztja alá, ezért feltételeztünk egy apikális  $K^+$  visszavételi mechanizmust.

Tehát, megerősítettük Trautmann és Marty eredményeit, mely szerint a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{K}^+$  és  $\text{Cl}^-$ -csatornák mind a könnymirigy acinus sejt apikális membránjában helyezkednek el, és feltételeztünk egy apikális  $\text{K}^+$ -visszavételi mechanizmust, mely alacsony  $\text{K}^+$ -koncentrációt alakít ki az acinus lumenben. Az elméletünket alátámasztják az immunfluoreszcens felvételeink, amely a  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  pumpa egyenlő sűrűségű eloszlását mutatja az apikális és a bazolaterális membránszakaszban. Az eredményeink alátámasztják a  $\text{K}^+$ -reabszorpció a könnysekrécióban betöltött jelentős szerepét, amely összhangban van több korábbi tanulmánnyal is (109, 116). Bár ahhoz, hogy a  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  pumpa valós funkcionális jelentőségét megítélhessük, szükséges a transzporter apikálisan található mennyiségét arányítani a bazolaterálisan előfordulóhoz. Immunfluoreszcens eredményeinkre alapozott becsléseink alapján az apikális membránszakasz aránya a bazolaterális membránrégióhoz képest 3:7, amely alapján úgy gondoljuk, hogy az apikális membrán elég nagy ahhoz, hogy jelentős  $\text{K}^+$ -reabszorpció valósuljon meg a lumenből rajta keresztül.

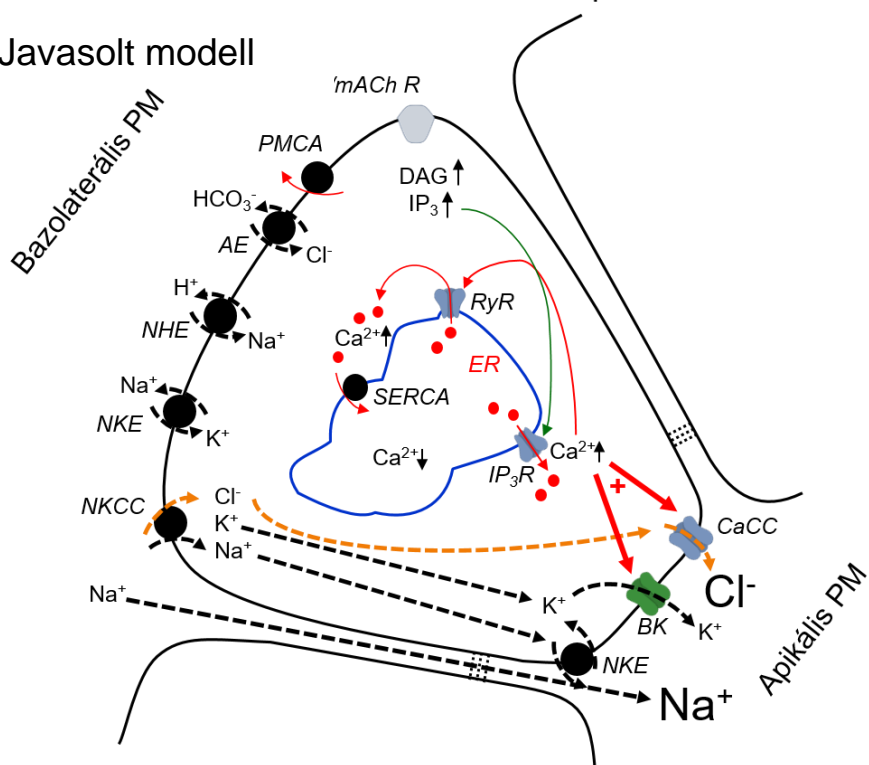
A kutatócsoportunk közreműködésével nemrég megjelent közleményben hasonló eredményeket közöltek nyálmirigy acinus sejtek vonatkozásában. A szekréciós mechanizmusra kollaborációs partnereink egy matematikai modellt dolgoztak ki. Ebben a modellben a folyadékszekréció akkor mutatkozott optimálisnak, amikor a modell az apikális membránba illesztette a teljes  $\text{K}^+$ -konduktancia 40%-át és a  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  pumpa aktivitás 30%-át. Ilyen feltételek mellett a szekretált  $\text{Na}^+$  27%-a származna a transzcelluláris  $\text{Na}^+$ -szekrécióból, míg apikális  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  pumpa hiányában kizárólag a paracelluláris  $\text{Na}^+$ -szekréció érvényesülne (89, 117). A hasonló eredmények miatt a könnysekréciós modellünk esetén is hasonló mechanizmust feltételezünk.

Modellünkből az is következik, hogy a  $\text{K}^+$ -visszavétel függ a szekréció sebességétől. Stimuláció során (reflexes vagy érzelmi könnyezés), amikor a magas folyadék szekréciós sebesség rövidebb időt enged a  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  cserének az acinus sejt luminális membránján keresztül, az elsődleges könny  $\text{K}^+$  tartalma magasabb marad, míg a  $\text{Na}^+$ -koncentrációja kisebb az alacsony szekréciós sebesség lassabb áramlási sebességeihez képest.

## Klasszikus modell



## Javasolt modell



### 16. ábra A klasszikus és a javasolt könny szekréciós modell vázlatja

Az ábrával kapcsolatos leírás a megbeszélésben található.

NKCC -  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ - $2\text{Cl}^-$  kotranszporter, NKE -  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -pumpa, BK -  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{K}^+$ -pumpa, CaCC -  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{Cl}^-$ -csatorna, PMCA - plazmamembrán  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPáz

## ***A TRPM4 szerepe a hasnyálmirigy acinus sejtek SOCE-jének szabályozásában és az esetleges patológiai vonatkozások***

Elsőként igazoltuk a TRPM4 funkcionális jelenlétét egér hasnyálmirigy acinus sejteken és kimutattuk, hogy negatív visszacsatolós mechanizmussal gátolja a  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlást, így mérsékli az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  megemelkedését.

A hasnyálmirigy acinus sejtek  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -jának kóros mértékű, tartós megemelkedése ( $\text{Ca}^{2+}$ -túltöltése) olyan kritikus, korai kóros esemény, amely idő előtti intracelluláris zimogén aktivációhoz, önmésztéshez és végül akut hasnyálmirigy-gyulladásához vezet (65, 118, 119). Mivel a SOCE elengedhetetlen a  $\text{Ca}^{2+}$ -túltöltéshez és az ORAI1 gátlószerek alkalmazásakor az akut hasnyálmirigy-gyulladás súlyosságának enyhüléséről számoltak be, adataink felvetik annak lehetőségét, hogy a TRPM4 csatorna működésének a patológiás  $\text{Ca}^{2+}$ -szignalizáció kivédésében lehet szerepe (120). Ezen hipotézis a betegség állatmodelljeinek vizsgálatával további ellenőrzésre szorul. Az állatkísérletek eredményeinek tükrében később a TRPM4 csatorna transzlációs és terápiás lehetőségeit is értékelni kell.

A TRPM4 munkacsoportunk által leírt szerepéhez hasonló élettani szerepet korábban már T-limfocitákban és a hízósejtekben is megfigyeltek. Ezek szerint a TRPM4 gén csendesítése miatt a Jurkat T-sejtekben a  $\text{Ca}^{2+}$ -oszcillációk helyett tartós  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  emelkedések alakultak ki és megnövekedett az IL-2 termelés, ami összhangban van azzal az elképzeléssel, hogy a TRPM4 csökkenti a  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlását a sejtbe azáltal, hogy depolarizálja a plazma membránt és csökkenti a  $\text{Ca}^{2+}$  elektrokémiai hajtóerejét (99). Ezzel egybehangzóan acinus sejteken kapott eredményeink arra utalnak, hogy a TRPM4 áram csökkenti a  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlást azáltal, hogy alacsonyabb  $\text{Ca}^{2+}$ -hajtóerőt alakít ki a membránpotenciál depolarizálásával. Azonban Park és munkatársainak eredményei egy másik lehetőséget is felvetnek. HEK293T sejtekben kimutatták, hogy a TRPM4 kölcsönhatásba lép a TRPC3-mal (az egyik  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulás aktiválta  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornával), amely a TRPC3 csatorna aktivitásának csökkenését eredményezi (112). Mivel a TRPC3 nagymértékben kifejeződik a hasnyálmirigy acinus sejtekben (9. ábra), ez is egy lehetséges magyarázatot kínál az eredményeinkre. Ezenkívül a TRPC3 TRPM4 általi alloszterikus gátlásával is magyarázható az az eredményünk, hogy a várakozásokkal ellentétben a CBA nem tudta jelentősen növelni a SOCE amplitúdóját. Ezzel kapcsolatban azt feltételezzük, hogy a TRPM4 és a TRPC3 gátló kölcsönhatását a CBA nem befolyásolja, így CBA jelenlétében a TRPC3 továbbra is TRPM4 általi gátolt állapotban

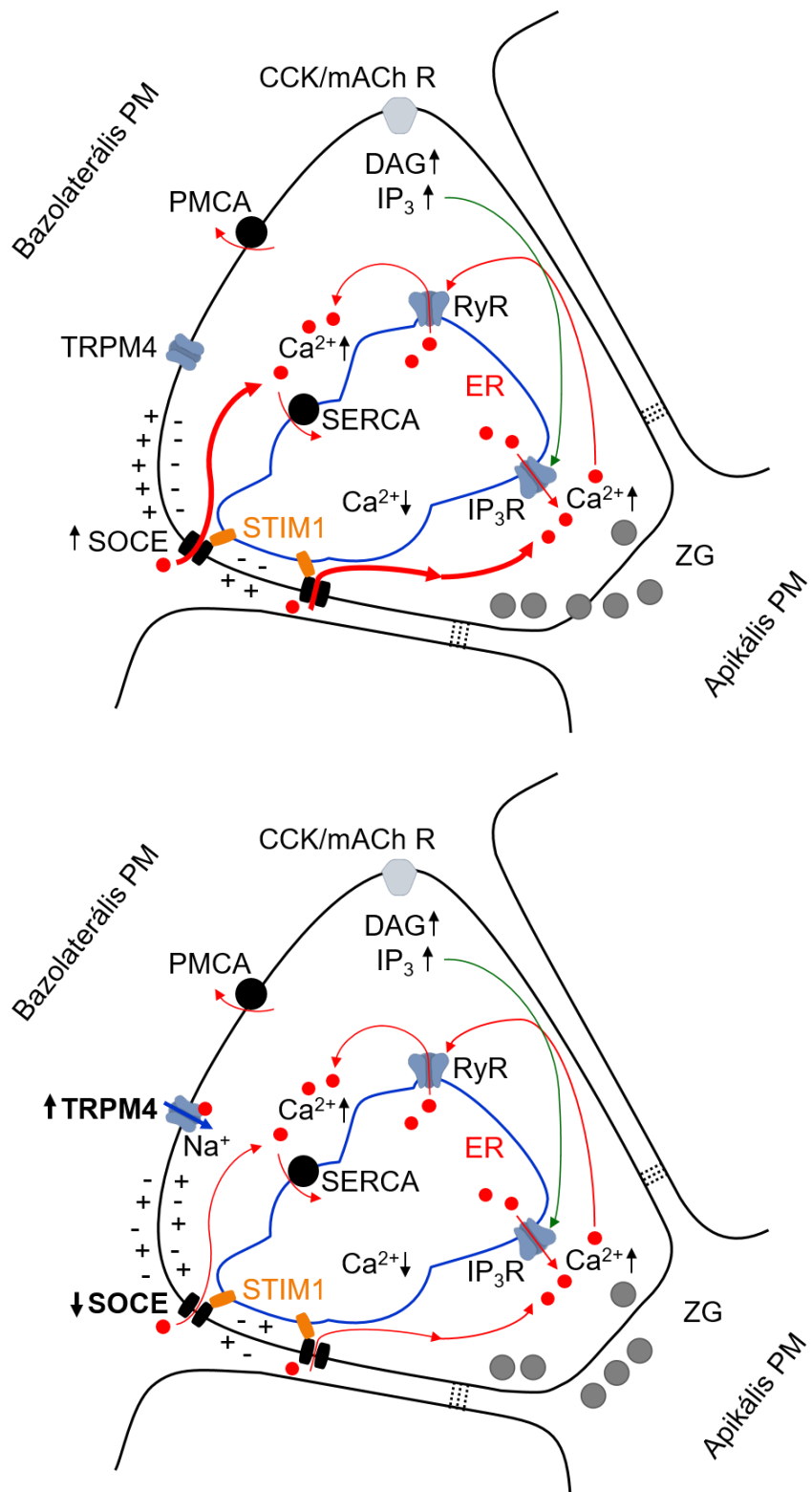
maradt ami megmagyarázná, hogy a CBA kezelés után a SOCE amplitúdója változatlan maradt.

A hasnyálmirigy acinus sejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -függő kation árama fontos szerepet játszik a transzepithelialis  $\text{Cl}^-$ -szekréció szabályozásában is. Ezt az összefüggést Kasai és Augustine beépítették a primer könny szekréció „push-pull” modelljébe. A modell figyelembe veszi, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$ -hullám apiko-bazális terjedése a szekretagóg stimuláció során először az apikálisan lokalizált  $\text{Cl}^-$ -csatornákat aktiválja. Az aktiválás  $\text{Cl}^-$ -kiáramlást eredményez, mivel a membránpotenciál negatívabb, mint a  $\text{Cl}^-$  egyensúlyi potenciálja („push” fázis). Később a bazális plazmamembránt elérő  $\text{Ca}^{2+}$ -hullám aktiválja az ezen a területen elhelyezkedő  $\text{Ca}^{2+}$ -függő kationcsatornákat (azaz a TRPM4-et), amelyek a membránt depolarizálják a  $\text{Cl}^-$  egyensúlyi potenciálja fölé, és így hajtóerőt hoznak létre a  $\text{Cl}^-$ -csatornákon keresztüli  $\text{Cl}^-$  beáramlásához („pull” szakasz). A vezetőképességeknek ez a váltott aktiválása egyirányú  $\text{Cl}^-$  és folyadékáramlást eredményezne a hámiban (77). Egy másik hipotézis szerint a  $\text{Cl}^-$  felvétel a bazális membránban elhelyezkedő  $\text{Na}^+/\text{K}^+-2\text{Cl}^-$  kotranszporterek segítségével valósul meg (121). Ezt a modellt erősen alátámasztotta egy meggyőző tanulmány, miszerint a  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált  $\text{Cl}^-$ -csatornák kizárólag az apikális plazmamembránban fejeződnek ki (17, 121). Ez az új elmélet elveti a „push-pull” modellt, és a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő kationáramnak a folyadékszekréció szempontjából nem tulajdonít szerepet.

Az is nyilvánvaló, hogy a  $\text{Cl}^-$ -áram (a közelmúltban azonosított TMEM16a csatornán keresztül) szintén jelentős depolarizáló áramként működik a hasnyálmirigy acinus sejtekben (78, 122-126), amely felveti a kérdést, hogy miért fejeznek ki az acinus sejtek azonos szerepet betöltő ioncsatornákat, melyek azonos liganddal aktiválható ionáramokért felelnek. A  $\text{Ca}^{2+}$ -függő kationáramról korábban azt feltételezték, hogy szerepük lehet a  $\text{Na}^+$  felvétele a bazolaterális membránon keresztül, amely egy lehetséges transzcelluláris  $\text{Na}^+$ -transzport útvonalat biztosítana a  $\text{Na}^+$ -nak. A  $\text{Cl}^-$  egyensúlyi potenciálján rögzített árammérések azonban nem mutattak megnövekedett kationáramot, ameddig a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  szintje kizárólag a sejt apikális régiójában emelkedett meg, kizárólag csak azután, hogy a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  értéke megnőtt a teljes intracelluláris térben. (77). Bár immunfluoreszcencia vizsgálatainkhoz megfelelő TRPM4 antitestek hiányában nekünk sajnos immunfestéssel nem sikerült bizonyítanunk a TRPM4 kifejeződését hasnyálmirigy acinus sejtekben, az említett korábbi tanulmány határozottan arra utal, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált kationcsatornák csak a plazmamembrán

bazális régiójában fejeződnek ki. Kasai és Augustine munkája arra is utal, hogy az apikális membrán nem közvetít jelentős kationáramokat, következésképpen a hasnyálmirigy acinusban a  $\text{Na}^+$ -szekréció egyetlen útja a paracelluláris lehet, és a TRPM4 valószínűleg nem vesz részt a transzcelluláris  $\text{Na}^+$ -transzport és így a transzepitélialis folyadékszekréciónak a közvetítésében. Ezért arra a következtetésre jutottunk, hogy a TRPM4 kiegészítő depolarizáló áramként funkcionál, amely helyspecifikusan helyezkedik el annak érdekében, hogy negatívan szabályozza a CRAC csatornákon keresztüli  $\text{Ca}^{2+}$ -belépést, és így, közvetett módon a folyadék- és enzimszekréciót.

Összefoglalva, eredményeink alapján igazolást nyert az, hogy a TRPM4 csatorna megnyílásával negatív visszacsatoló mechanizmusként gátolja a SOCE folyamatát, mintegy védelmet biztosít a  $\text{Ca}^{2+}$ -túltöltődés ellen. A folyamat megértését a 17. ábra segíti. A szekretagóg stimuláció hatására a hasnyálmirigy acinus sejtben az  $\text{IP}_3$ -út vonal aktiválódik, ezzel  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulást okozva mind az  $\text{IP}_3$  csatornán, mind a RyR csatornán keresztül ( $\text{Ca}^{2+}$ -indukált  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulás). A belső raktárból (ER) felszabadult  $\text{Ca}^{2+}$  az ER ürülését eredményezi, amelynek következménye a raktár vezérelt  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlás (SOCE). Az ER-ből és az extracelluláris térből érkező  $\text{Ca}^{2+}$  adja a teljes  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  növekedést, amely kulcsszerepet játszik a zimogének excitózisában, és patológiás esetben a korai, intraacináris aktivációjukban. A SOCE kialakulásával párhuzamosan a megemelkedő  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  aktiválja a TRPM4 csatornát,  $\text{Na}^+$  áramlik a sejtbe, és depolarizálja azt. A depolarizáció miatt a  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlás hajtóereje csökken, viszont a PMCA által végzett  $\text{Ca}^{2+}$  kiáramlás megtartott, ezzel a  $\text{Ca}^{2+}$ -mozgás a kilépés irányába tolódik, amely csökkenti az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t és védelmet biztosíthat a  $\text{Ca}^{2+}$ -túltöltődéssel szemben.



**(17. ábra) A TRPM4 áram negatív visszacsatoló szerepe a SOCE-ra**  
 Az ábrával kapcsolatos leírás a megbeszélésben található.  
 ZG – zimgén

## VII/a. Összefoglalás

A könnyimirigy acinus sejteken végzett kísérleteink során egy új, a korábbi kiegészítő könny szekréciós modell kidolgozása volt a célunk. Az első kísérletsorozat célja a könnyimirigy acinus sejtek apikális membránjában található  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{K}^+$ -csatornák működésének vizsgálata volt. A célzott  $\text{Ca}^{2+}$ -uncaging és a teljes sejt árammérés kombinálásával helyileg aktiválódó  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{K}^+$ - és  $\text{Cl}^-$ -áramokat mértünk. Az apikális régióban a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  lokális növekedése a  $\text{K}^+$ -áram jelentős megemelkedését eredményezte, és ha BK csatorna-gátló paxillin kezelést alkalmaztunk, akkor az áram aktivációja elmaradt. Ezután ugyanazon technikai megközelítés alkalmazásával a bazális membrán  $\text{K}^+$ - és  $\text{Cl}^-$ -áramait is vizsgáltuk. Bár ezekben a kísérletekben a lokális  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  változás kissé nagyobb volt, mégsem tapasztaltunk aktiválódó  $\text{K}^+$ - és  $\text{Cl}^-$ -áramokat. Ezek az adatok határozottan arra utalnak, hogy az egér könnyimirigy acinus sejtjeiben az elsődleges  $\text{K}^+$ -csatorna a BK-csatorna, amely együtt lokalizálódik az apikális plazmamembránban a  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivált  $\text{Cl}^-$ -csatornával. Ezenkívül az immunfestés azt mutatta, hogy az apikális membrán területe viszonylag nagy (a látszólagos membránkerület ~30%-a) és  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -pumpát is tartalmaz. Ez az eredmény azt is sugallja, hogy az apikális  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -pumpa aktivitása funkcionálisan jelentős lehet az elsődleges könnyfolyadék ionösszetételének meghatározásakor. Összefoglalva, új modellünk azt javasolja, hogy  $\text{K}^+$ -szekréció történik az apikális membránon, ezt követően azonban a  $\text{K}^+$ -ot azonnal visszaveszi az apikális  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATP-áz, ami  $\text{Na}^+$ -szekrécióval jár. Ez a folyamat tehát a  $\text{Na}^+$  szekréciót a paracellulárisról részben a transzcelluláris útvonalra irányítja át. Ezenkívül a  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -pumpa elektronegatív transzportja segít megtartani a stimuláció során hiperpolarizált membránpotenciált, ezzel fenntartja a  $\text{Cl}^-$ -szekréció elektrokémiai hajtóerejét.

A hasnyálmirigy-acinus sejtek ioncsatornáinak vizsgálatát célzó kísérletsorozat eredményeit összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a TRPM4 ioncsatorna mRNS-e magas szinten expresszálódik egér hasnyálmirigy acinus sejtekben. A TRPM4 funkcionális jelenlétét árammérésekkel is igazoltuk. Azt találtuk, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő kationáramot 10  $\mu\text{M}$  CBA és 100  $\mu\text{M}$  9-Phenanthrol hasonlóan gátolja, viszont a CBA a  $\text{Cl}^-$ -áramot nem befolyásolja. Mivel a CBA egy specifikus TRPM4 csatorna blokkoló, ezek az eredmények határozottan arra utalnak, hogy a TRPM4 vad típusú hasnyálmirigy acinus sejtben funkcionálisan is jelentős mennyiségben expresszálódik. Megmutattuk a TRPM4 áramának a

membránpotenciálra gyakorolt hatását is. Megállapítottuk, hogy a hasnyálmirigy acinus sejt plazma membránja  $\text{Ca}^{2+}$ -függő módon depolarizálódik, melyben jelentős szerepet játszik a TRPM4 csatorna aktivitása. Ezenkívül a  $[\text{Ca}^{2+}]$  mérési adataink is azt mutatták, hogy 10 pM cerulein kezelés 8 perc elteltével jelenetős  $\text{Ca}^{2+}$ -belépést okozott a TRPM4 KO acinus sejtekben, míg a kontroll sejtekben nem, amely azt jelzi, hogy a TRPM4 részt vesz a  $\text{Ca}^{2+}$ -belépésének negatív visszacsatolású szabályozásában. Sőt, amikor  $\text{Ca}^{2+}$ -belépést 20 pM CCK kezeléssel váltottunk ki (SOCE), a  $\text{Ca}^{2+}$  jel nagysága szignifikánsan magasabb volt a TRPM4 KO sejtekben a kontrollhoz képest. Ezen eredmények igazolására a SOCE-t még specifikusabban megvizsgáltuk úgy, hogy az ER  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalmát az esetleges kísérleti melléktermékek kialakulásának elkerülése érdekében receptor-független módon, CPA-val ürítettük. A  $\text{Ca}^{2+}$ -jel elemzése azt mutatta, hogy a jel kialakulásának meredeksége és amplitúdója nagyobb a TRPM4 KO hasnyálmirigy acinus sejtekben a kontrollhoz képest. Ezenkívül TRPM4 gátlószerrel is végeztünk kísérleteket, melyek azt mutatják, hogy a CBA kezelés jelentősen megnövelte a fluoreszcencia jel emelkedésének sebességét. Összefoglalva, azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a TRPM4 áram  $\text{Ca}^{2+}$ -függő módon depolarizálja a hasnyálmirigy acinus sejteket és negatív visszacsatolással szabályozza a  $\text{Ca}^{2+}$  bejutását a sejtbe. A TRPM4 egy kiegészítő funkciójú depolarizáló áramként funkcionál, amely specifikusan lokalizálódik annak érdekében, hogy negatívan szabályozza a  $\text{Ca}^{2+}$ -belépést a CRAC csatornák közelében.

## ***VII/b. Summary***

In the case of our experiments on lacrimal gland secretion, our goal was to develop a new model of tear secretion. The aim of the first series of experiments was to investigate the function of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$ -channels in the apical membrane of lacrimal acinar cells. Local  $\text{Ca}^{2+}$  uncaging (flash photolysis of NP-EGTA) was combined with  $\text{Ca}^{2+}$  imaging and whole-cell current recording of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$ - and  $\text{Cl}^-$ -currents. In the apical region, a local increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  resulted in a significant increase in  $\text{K}^+$  current, but when the cells were treated with the BK channel inhibitor paxillin, no current activation was observed. Next, the basal membrane was probed for  $\text{K}^+$ - and  $\text{Cl}^-$ -currents by using the same approach. Although, in these experiments, the change in local  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  was slightly higher, it failed to activate either  $\text{K}^+$ - or the  $\text{Cl}^-$ -currents. These data strongly suggest that the primary  $\text{K}^+$ -channel in the mouse lacrimal acinar cell is the BK channel, which co-localizes with the  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$ -channels in the apical plasma membrane. Moreover, immunostaining shows that the area of the apical membrane is relatively large (~30% of the apparent membrane section circumference) and also contains  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  pumps. This result suggests that apical  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  pump activity may be functionally significant in determining the ionic composition of the primary tear fluid. In summary, our new model suggests that  $\text{K}^+$ -secretion occurs on the apical membrane, but thereafter,  $\text{K}^+$  is immediately taken up by apical  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPase, which is associated with  $\text{Na}^+$  secretion. Thus, this process redirects  $\text{Na}^+$  secretion from the paracellular pathway in part to the transcellular pathway. In addition, the electronegative transport of the  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  pump helps maintain the hyperpolarized membrane potential during stimulation, thus maintaining the electrochemical driving force of  $\text{Cl}^-$ -secretion.

My PhD project also involved studying the ion channels in pancreatic acinar cells (PAC), which can be summarized as follows. We found that the TRPM4 ion channel mRNA is highly expressed in mouse pancreatic acinar cells. The functional presence of TRPM4 was confirmed by current measurements using the whole cell configuration of the patch-clamp technique. We found that both 10  $\mu\text{M}$  CBA and 100  $\mu\text{M}$  9-Phenanthrol inhibited the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent cation current similarly, but CBA did not affect the  $\text{Cl}^-$ -current. As CBA is a specific TRPM4 channel blocker, these results strongly suggest that TRPM4 is functionally expressed in PACs in significant amounts. We also showed the effect of TRPM4 current on membrane potential. We found that

the plasma membrane of the pancreatic acinar cell is depolarized in a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent manner, which was reverted by treating the cells with CBA. Furthermore, our  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  measurements showed that 10 pM cerulein treatment induced significant  $\text{Ca}^{2+}$ -entry after 8 min in TRPM4 KO acinar cells, but not in control cells, indicating that TRPM4 is involved in the negative feedback regulation of the  $\text{Ca}^{2+}$ -entry. Moreover, when  $\text{Ca}^{2+}$ -entry was induced by higher CCK concentration (20 pM), the magnitude of the  $\text{Ca}^{2+}$ -signal was significantly higher in TRPM4 KO cells compared to the control. To confirm these results, SOCE was examined even more specifically by depleting the  $\text{Ca}^{2+}$ -content of the ER in a receptor-independent manner using a SERCA pump inhibitor CPA to avoid the formation of possible experimental artefacts. Analysis of the  $\text{Ca}^{2+}$ -signal in  $\text{Ca}^{2+}$  containing saline showed that the slope and amplitude of the  $\text{Ca}^{2+}$  signal were higher in TRPM4 KO PACs compared to wild types. Experiments performed with CBA showed that the treatment significantly increased the slope of the fluorescence signal.

Summarizing our results, it can be concluded that the TRPM4 current depolarizes PACs in a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent manner and regulates  $\text{Ca}^{2+}$ -entry with a negative feedback mechanism. Therefore, we conclude that TRPM4 functions as a complementary depolarizing current that is specifically localized in order to negatively regulate  $\text{Ca}^{2+}$ -entry near CRAC channels.

## ***VIII. Új eredmények***

1. Megállapítottuk, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{Cl}^-$ -csatornák a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{K}^+$ -csatornákkal azonos, apikális membránrégióban helyezkednek el a könnymirigy acinus sejtekben.
2. A könnyszekréció sejt szintű modelljének tökéletesítése, melynek legfontosabb eleme a  $\text{Na}^+\text{K}^+$  pumpa jelenlétének igazolása az acinus-sejtek apikális membránjában. A  $\text{Na}^+\text{K}^+$  pumpa a bazális membránhoz hasonló sűrűségben van jelen az apikális membránban, és ez a membránfelület elég nagy ahhoz, hogy jelentős  $\text{K}^+$ -reabszorpció valósuljon meg azon keresztül. Ez magyarázatot ad a könny mérhetően nagyobb  $\text{Na}^+$  és kisebb  $\text{K}^+$  tartalmára a régi modellből következő koncentrációkhoz képest. A mérési eredményeink alapján egy új könnyszekréciós modellt alkottunk meg, mely nagyobb részletességgel és pontosabban írja le a membránon keresztül folyó ionmozgásokat.
3. Elsőként igazoltuk, hogy a TRPM4 csatorna az exokrin pancreas acinus-sejtjein mind morfológiai, mind funkcionális szempontból jelentős mértékben van jelen. A TRPM4 csatorna hozzájárul a  $\text{Ca}^{2+}$ -belépés szabályozásában negatív visszacsatolás biztosításával.

## ***IX. Irodalomjegyzék***

- 1 – Betts JG. et al. (2017): Anatomy and Physiology. Volume 4.2. Epithelial Tissue. Openstax, Rice University.
- 2 – Petersen OH.. Physiology of Acinar Cell Secretion. In: Hans G. Beger (2018): The Pancreas: An Integrated Textbook of Basic Science, Medicine, and Surgery. Third Edition. John Wiley & Sons Ltd. 43-55.
- 3 - Petersen OH. et al. (1985): Human Pancreatic Acinar Cells: Studies of Stimulus-Secretion Coupling. Gastroenterology. 89:109-117.
- 4 – Park MK. et al. (2001): Local uncaging of caged  $\text{Ca}^{2+}$  reveals distribution of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  channels in pancreatic acinar cells. PNAS. 98(19):10948-10953.
- 5 – Petersen OH. (1992): Stimulus–secretion coupling: cytoplasmic calcium signals and the control of ion channels in exocrine acinar cells. Journal of Physiology. 448:1–51.
- 6 – Putney JW. és Bird GS. (2014): Calcium Signaling in Lacrimal Glands. Cell Calcium. 55(6): 290–296.
- 7 – Toescu EC. et al. (1992): Spatial and temporal distribution of agonist-evoked cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  signals in exocrine acinar cells analysed by digital image microscopy. The EMBO Journal. 11(4):1623-1629.
- 8 – Petersen OH. (2018): The Pancreas: An Integrated Textbook of Basic Science, Medicine, and Surgery. Third Edition. John Wiley & Sons Ltd. 4:43-55.
- 9 – Yule D. (2015):  $\text{Ca}^{2+}$  Signaling in Pancreatic Acinar Cells. Pancreapedia.
- 10 – Won JH. et al. (2007):  $\text{Ca}^{2+}$  release dynamics in parotid and pancreatic exocrine acinar cells evoked by spatially limited flash photolysis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 293(6):G1166-77.
- 11 – Yule DI. et al. (1997): Evidence that zymogen granules are not a physiologically relevant calcium pool. Defining the distribution of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in pancreatic acinar cells. J Biol Chem. 272(14):9093-8.
- 12 – Thorn P. et al. (1993): Local and global cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in exocrine cells evoked by agonists and inositol trisphosphate. Cell 74: 661–668.
- 13 – Kasai H. et al. (1993): Subcellular distribution of  $\text{Ca}^{2+}$  release channels underlying  $\text{Ca}^{2+}$  waves and oscillations in exocrine pancreas. Cell. 74(4):669-77.
- 14 – Almássy J. et al. (2012): Apical  $\text{Ca}^{2+}$ -activated potassium channels in mouse parotid acinar cells. J Gen Physiol. 139(2):121–133.

- 15 – Yule DI. et al.(1996): Intercellular calcium waves in rat pancreatic acini: mechanism of transmission. *Am J Physiol.* 271(4 Pt 1):C1285-94.
- 16 – Tinel H. et al. (1999):Active mitochondria surrounding the pancreatic acinar granule region prevent spreading of inositol trisphosphate-evoked local cytosolic Ca<sup>2+</sup> signals. *EMBO J.* 18(18): 4999–5008.
- 17 – Park MK. et al. (2001): Perinuclear, perigranular and sub-plasmalemmal mitochondria have distinct functions in the regulation of cellular calcium transport. *EMBO J.* 20(8):1863-74.
- 18 – Trautmann A. et al. (1984): Three types of calcium-dependent channel in rat lacrimal glands. *Journal of Physiology.* 357:293-325.
- 19 – Medina-Ortiz WE. (2007): Identification and Functional Distribution of Intracellular Ca<sup>2+</sup> Channels in Mouse Lacrimal Gland Acinar Cells. *Open Ophthalmol J.* 1: 8–16.
- 20 – Fitzsimmons TJ. et al. (2000): Multiple isoforms of the ryanodine receptor are expressed in rat pancreatic acinar cells. *Biochem J.* 351(Pt 1): 265–271.
- 21 – Leite MF. et al. (1999): Expression and subcellular localization of the ryanodine receptor in rat pancreatic acinar cells. *Biochem J.* 337(Pt 2): 305–309.
- 22 – Straub SV. et al. (2000): Calcium wave propagation in pancreatic acinar cells: functional interaction of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors, ryanodine receptors, and mitochondria. *J Gen Physiol.* 116(4):547-60.
- 23 – Shin DS. (2001): Polarized expression of G protein-coupled receptors and an all-or-none discharge of Ca<sup>2+</sup> pools at initiation sites of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> waves in polarized exocrine cells. *J Biol Chem.* 2001 Nov 23;276(47):44146-56.
- 24 – Lee MG. (1997): Polarized expression of Ca<sup>2+</sup> channels in pancreatic and salivary gland cells. Correlation with initiation and propagation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> waves. *J Biol Chem.* 272(25):15765-70.
- 25 – Orabi AI. et al. (2010): Dantrolene mitigates caerulein-induced pancreatitis in vivo in mice. *Am J Physiol Gastrointest. Liver. Physiol.* 299(1): 196-204.
- 26 – Husain SZ. et al. (2005) The ryanodine receptor mediates early zymogen activation in pancreatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 4(102): 14386-14391.
- 27 – Husain SZ. et al. (2012) Ryanodine receptors contribute to bile acid-induced pathological calcium signaling and pancreatitis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 302(12):G1423-33.

- 28 - Geyer N. et al. (2015) Bile acids activate ryanodine receptors in pancreatic acinar cells via a direct allosteric mechanism. *Cell Calcium*. 58(2):160-70. doi: 10.1016/j.ceca.2015.03.009.
- 29 - Raraty M. et al. (2000) Calcium-dependent enzyme activation and vacuole formation in the apical granular region of pancreatic acinar cells. *PNAS*. 97(24): 13126–13131.
- 30 - Cancela JM. et al. (1999) Coordination of agonist-induced Ca<sup>2+</sup>-signalling patterns by NAADP in pancreatic acinar cells. *Nature*. 398:74–76.
- 31 - Gerasimenko OV. et al. (1996) Inositol Trisphosphate and Cyclic ADP-Ribose–Mediated Release of Ca<sup>2+</sup> from Single Isolated Pancreatic Zymogen Granules. *Cell*. 84(3):473-480.
- 32 - Thorn P. et al. (1994) Cyclic ADP-ribose regulation of ryanodine receptors involved in agonist evoked cytosolic Ca<sup>2+</sup> oscillations in pancreatic acinar cell. *EMBO J*. 13(9):2038-2043.
- 33 - Cancela JM. et al. (2002): Transformation of local Ca<sup>2+</sup> spikes to global Ca<sup>2+</sup> transients: the combinatorial roles of multiple Ca<sup>2+</sup> releasing messengers. *EMBO J*. 21(5):909-19.
- 34 - Gerasimenko JV. et al. (2006): NAADP, cADPR and IP<sub>3</sub> all release Ca<sup>2+</sup> from the endoplasmic reticulum and an acidic store in the secretory granule area. *Journal of Cell Science* 119:226-238.
- 35 - Gerasimenko JV. et al. (2015): Both RyRs and TPCs are required for NAADP-induced intracellular Ca<sup>2+</sup> release. *Cell Calcium* 58(3):237–245.
- 36 - Lee HC. (2001): Physiological functions of cyclic ADP-ribose and NAADP as calcium messengers. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:317–345.
- 37 - Imbery JF. et al. (2016): cAMP-dependent recruitment of acidic organelles for Ca<sup>2+</sup> signaling in the salivary gland. *Am J Physiol Cell Physiol*. 311(5):697-709.
- 37 - Imbery J. F. et al. (2016): cAMP-dependent recruitment of acidic organelles for Ca<sup>2+</sup> signaling in the salivary gland. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 311(5):697-709.
- 38 - Park MK. (2001): Perinuclear, perigranular and sub-plasmalemmal mitochondria have distinct functions in the regulation of cellular calcium transport. *EMBO J*. 20(8):1863-74.
- 39 - Rizzuto R. et al. (1993): Microdomains with high Ca<sup>2+</sup> close to IP<sub>3</sub>-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science*. 262(5134):744-7.

- 40 - Gicomello M. et al. (2010): Ca<sup>2+</sup> hot spots on the mitochondrial surface are generated by Ca<sup>2+</sup> mobilization from stores, but not by activation of store-operated Ca<sup>2+</sup> channels. *Mol Cell*. 23;38(2):280-90.
- 41 - Park MK. et al. (2000): The endoplasmic reticulum as one continuous Ca<sup>2+</sup> pool: visualization of rapid Ca<sup>2+</sup> movements and equilibration. *EMBO J*. 19(21):5729-39.
- 42 - Hoth M. és Penner R. (1992): Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *355(6358)*:353-6.
- 43 - Roos J. et al. (2005): STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca<sup>2+</sup> channel function. *J Cell Biol*. 169(3):435-45.
- 44 - Huang Y. et al. (2009): A single EF-hand isolated from STIM1 forms dimer in the absence and presence of Ca<sup>2+</sup>. *FEBS J*. 276(19): 5589–5597.
- 45 - Zhang SL. et al. (2005): STIM1 is a Ca<sup>2+</sup> sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca<sup>2+</sup> store to the plasma membrane. *437(7060)*:902-5.
- 46 - Perni S. et al. (2015): Nanoscale patterning of STIM1 and Orai1 during store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *PNAS*. 112(40):5533-5542.
- 47 - Bird GS. et al. (2013): STIM1 is a Calcium Sensor Specialized for Digital Signaling. *Curr Biol*. 19(20): 1724–1729.
- 48 - Zhang SL. et al. (2006): Genome-wide RNAi screen of Ca<sup>2+</sup> influx identifies genes that regulate Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channel activity. *PNAS*. 103(24): 9357-9362.
- 49 - Yuan JP. et al. (2009): SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels. *Nat Cell Biol*. 11(3):337-43.
- 50 - Hou X. et al. (2012): Crystal structure of the calcium release-activated calcium channel Orai. *Science*. 338(6112): 1308–1313.
- 51 - Luik RM. et al. (2006): The elementary unit of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions. *J Cell Biol*. 174(6):815-25.
- 52 - Vaca L. et al. (1994): Activation of recombinant trp by thapsigargin in Sf9 insect cells. *Am J Physiol*. 267(5 Pt 1):C1501-5.
- 53 - Lemonnier L. et al. (2008): Complex Regulation of the TRPC3,6,7 Channel Subfamily by Diacylglycerol and Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Cell Calcium*. 43(5): 506–514.
- 54 - Oikawa M. et al. (2013): Effects of protease-activated receptors (PARs) on intracellular calcium dynamics of acinar cells in rat lacrimal glands. *Histochem. Cell Biol*. 140(4):463-76.

- 55 - Huang GN. et al. (2006): STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, Icrac and TRPC1 channels. *Nature Cell Biology* 8(9):1003–1010.
- 56 - Liao Y. et al. (2008): Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/Icrac channels. *PNAS*. 105(8): 2895–2900.
- 57 - Sneyd J. et al. (2006): A method for determining the dependence of calcium oscillations on inositol trisphosphate oscillations. *PNAS*. 103(6): 1675–1680.
- 58 - LeBeau AP. et al. (1999): Agonist-dependent Phosphorylation of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor. *J Gen Physiol*. 113(6): 851–872.
- 59 - Sneyd J. et al. (2003): Control of calcium oscillations by membrane fluxes. *PNAS*. 101(5): 1392–1396.
- 60 - Sneyd J. et al. (2016): On the dynamical structure of calcium oscillations. *PNAS*. 114(7): 1456–1461.
- 61 - Carafoli E. (1991): Calcium pump of the plasma membrane. *Physiol. Rev.* 71, 129–153
- 62 - Bird GS. et al. (2008): Methods for Studying Store-Operated Calcium Entry. *Methods*. 46(3): 204–212.
- 63 - Petersen OH. et al. (2012): Specific mitochondrial functions in separate sub-cellular domains of pancreatic acinar cells. *Pflugers Arch*. 464(1):77-87.
- 64 - Gerasimenko VJ. et al. (2006): Bile Acids Induce Ca<sup>2+</sup> Release from Both the Endoplasmic Reticulum and Acidic Intracellular Calcium Stores through Activation of Inositol Trisphosphate Receptors and Ryanodine Receptors. *J Biol Chem*. 281(52):40154-40163.
- 65 - Gerasimenko JV. et al. (2009): Pancreatic protease activation by alcohol metabolite depends on Ca<sup>2+</sup> release via acid store IP<sub>3</sub> receptors. *PNAS*. 30(106): 10758-10763.
- 66 - Orabi AI. et al. (2010): Dantrolene mitigates caerulein-induced pancreatitis in vivo in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 299(1): 196-204.
- 67 - Husain SZ. et al. (2005) The ryanodine receptor mediates early zymogen activation in pancreatitis. *PNAS*. 4(102): 14386-14391.
- 68 - Zhu ZD. et al. (2018): SOCE induced calcium overload regulates autophagy in acute pancreatitis via calcineurin activation. *Cell Death Dis*. 9(2):50.
- 69 - Elzamzamy OM. et al. (2020): The Role of TRPC1 in Modulating Cancer Progression. *Cells*. 9(2):388.

- 70 - Halangk W. et al. (2000): Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis. *J Clin Invest.* 106(6): 773–781.
- 71 - Lerch MM. and Halangk W. (2006): Human pancreatitis and the role of cathepsin B. *Gut.* 55(9): 1228–1230.
- 72 - Sandler M. et al. (2018): Cathepsin B-Mediated Activation of Trypsinogen in Endocytosing Macrophages Increases Severity of Pancreatitis in Mice. *Gastroenterology.* 154:704–718
- 73 - Dartt DA. et al. (2009): Neural regulation of lacrimal gland secretory processes: Relevance in dry eye diseases. *Progress in Retinal and Eye Research.* 28(3): 155-177.
- 74 - Cheng KT. et al. (2012): STIM1 and STIM2 protein deficiency in T lymphocytes underlies development of the exocrine gland autoimmune disease, Sjögren's syndrome. *PNAS.* 109(36): 14544–14549.
- 75 - Putney JW et al. (1998): Calcium signalling in lacrimal acinar cells. *Adv Exp Med Biol.* 438:123–8.
- 76 - Ishikawa Y. et al. (1998): Acetylcholine acts on M<sub>3</sub> muscarinic receptors and induces the translocation of aquaporin5 water channel via cytosolic Ca<sup>2+</sup> elevation in rat parotid glands. *Biochem Biophys Res Commun.* 245(3):835-40.
- 77 - Kasai H. és Augustine GJ. (1990): Cytosolic Ca<sup>2+</sup> gradients triggering unidirectional fluid secretion from exocrine pancreas. *Nature.* 348:735-738.
- 78 - Yang YD. et al. (2008): TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature.* 455(7217):1210-1215.
- 79 - Arreola J. et al. (1996): Activation of calcium-dependent chloride channels in rat parotid acinar cells. *J Gen Physiol.* 108(1):35-47.
- 80 - Tien J. et al. (2014): A comprehensive search for calcium binding sites critical for TMEM16A calcium-activated chloride channel activity. *Elife.* 3:02772.
- 81 - Dang S. et al. (2017): Cryo-EM structures of the TMEM16A calcium-activated chloride channel. *Nature.* 552(7685): 426–429.
- 82 - Romanenko VG. et al. (2010): Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in parotid acinar cells. *Channels (Austin).* 4(4): 278–288.
- 83 - Cui J. et al. (2009): Molecular Mechanisms of BK Channel Activation. *Cell Mol Life Sci.* 66(5): 852–875.
- 84 - Yuan P. et al. (2012): Open Structure of the Ca<sup>2+</sup> Gating Ring in the High-Conductance Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channel. *Nature.* 481(7379): 94–97.

- 85 - Thompson J. (2009): Mechanistic details of BK channel inhibition by the intermediate conductance,  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel. *Channel (Austin)*. 3(3): 194–204.
- 86 - Dartt DA. et al. (1981): Lacrimal gland electrolyte and water secretion in the rabbit: localization and role of  $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ -activated ATPase. *J Physiol*. 321: 557–569.
- 87 - Poulsen JH. et al. (1974): Effects of ouabain on two types of active cation transport in the cat submandibular gland. In: Thorn NA, Petersen OH (eds) *Secretory mechanisms of exocrine glands*. Munksgaard, Copenhagen, pp 570–581
- 88 - Almassy J. et al. (2017): New saliva secretion model based on the expression of  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  pump and  $\text{K}^+$  channels in the apical membrane of parotid acinar cells. *Pflugers Arch*. 470(4):613-621.
- 89- Minke B. (2010): The history of the *Drosophila* TRP channel: The birth of a new channel superfamily. *J. Neurogenet*. 24(4): 216–233.
- 90 - Montell C. (2011): The history of TRP channels, a commentary and reflection. *Pflugers Arch. – Eur. J. Physiol*. 461:499–506
- 91 - Derouiche S. et al. (2018): TRPV4 heats up ANO1-dependent exocrine gland fluid secretion. *The FASEB Journal*. 32(4):1841-1854.
- 92 - Marabita F. and Islam L. (2017): Expression of Transient Receptor Potential Channels in the Purified Human Pancreatic  $\beta$ -Cells. *Pancreas*. 46(1):97-101.
- 93 - Guo K. et al. (2017): Structures of the calcium-activated, non-selective cation channel TRPM4. *Nature*. 552: 205–209.
- 94 - Paige A. (2017): Electron cryo-microscopy structure of a human TRPM4 channel. *Nature*. 552: 200–204.
- 95 - Guinamard R. et al. (2004): Activation of the  $\text{Ca}^{2+}$ -activated nonselective cation channel by diacylglycerol analogues in rat cardiomyocytes. *J. Cardiovasc. Electrophysiol*. (15):342–348.
- 96 - Earley, S. et al. (2004): Critical role for transient receptor potential channel TRPM4 in myogenic constriction of cerebral arteries. *Circ. Res*. 95:922–929.
- 97 - Gonzales AL. et al. (2010) Pharmacological inhibition of TRPM4 hyperpolarizes vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. (299):1195–1202.
- 98 - Barbet, G. et al. (2008): The calcium-activated nonselective cation channel TRPM4 is essential for the migration but not the maturation of dendritic cells. *Nat. Immunol*. 9:1148–1156.

- 99 - Vennekens R. (2007): Insights into TRPM4 function, regulation and physiological role. *Handb Exp Pharmacol.* (179):269-85.
- 100 - Nilius B. et al. (2003): Voltage Dependence of the Ca<sup>2+</sup>-activated Cation Channel TRPM4. *The Journal of Biological Chemistry.* 278(33): 30813-30820.
- 101 - Nilius B. et al. (2006): The Ca<sup>2+</sup>-activated cation channel TRPM4 is regulated by phosphatidylinositol 4,5-biphosphate. *The EMBO Journal.* 25: 467–478.
- 102 - Maruyama Y és Petersen OH. (1982): Cholecystokinin activation of single-channel currents is mediated by internal messenger in pancreatic acinar cells. *Nature.* 300(5887):61-3.
- 103 - Gögelein H. (1989): The nonselective cation channel in the basolateral membrane of rat exocrine pancreas. *Pflügers Arch.* 413: 287-298.
- 104 - Grand T. et al. (2008): 9-phenanthrol Inhibits Human TRPM4 but Not TRPM5 Cationic Channels. *Br. J. Pharmacol.* 153(8): 1697-705.
- 105 - Veress R. et al. (2018): Transient Receptor Potential Melastatin 4 Channel Inhibitor 9-phenanthrol Inhibits K<sup>+</sup> but Not Ca<sup>2+</sup> Currents in Canine Ventricular Myocytes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 96(10): 1022-1029.
- 106 - Ozhathil L. C. et al. (2018): Identification of potent and selective small molecule inhibitors of the cation channel TRPM4. *Br. J. Pharmacol.* 175(12): 2504-2512.
- 107 - Tóth-Molnár E. et al. (2007): New experimental method to study acid/base transporters and their regulation in lacrimal gland ductal epithelia. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48:3746–3755.
- 108 - Romanenko V. G. et al. (2007): Regulation of membrane potential and fluid secretion by Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in mouse submandibular glands. *J. Physiol.* 581:801–817.
- 109 - Wood RL. and Mircheff AK. (1986): Apical and basal-lateral Na/K-ATPase in rat lacrimal gland acinar cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 27:1293–6.
- 110 - Walcott B. et al. (1998): The lacrimal gland and its veil of tears. *News Physiol Sci.* 13:97–103.
- 111 - Almassy J. (2019): Expression of BK channels and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pumps in the apical membrane of lacrimal acinar cells suggests a new molecular mechanism for primary tear-secretion. *Ocul Surf.* 17(2):272-277.
- 112 - Park JY. (2008): TRPM4b channel suppresses store-operated Ca<sup>2+</sup> entry by a novel protein–protein interaction with the TRPC3 channel. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 368:677–683.

- 113 - Horn R. and Marty A. (1988): Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *Journal of General Physiology*. 92(2):145-59.
- 114 - Rae J. (1991): Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B. *Journal of Neuroscience Method*. 37:15-26.
- 115 - Larina O. et al. (2005):  $Ca^{2+}$  dynamics in salivary acinar cells: distinct morphology of the acinar lumen underlies near-synchronous global  $Ca^{2+}$  responses. *J Cell Sci*. 115:4131–9.
- 116 - Selvam S. et al. (2007): Transepithelial bioelectrical properties of rabbit acinar cell monolayers on polyester membrane scaffolds. *Am J Phys Cell Physiol*. 293:C1412–9.
- 117 - Palk L. et al. (2010): A dynamic model of saliva secretion. *J Theor Biol*. 266:625–40.
- 118 - Gerasimenko JV. et al. (2014): The role of  $Ca^{2+}$  in the pathophysiology of pancreatitis. *J Physiol*. 592: 269-280.
- 119 - Ward JB. et al. (1995): Is an elevated concentration of acinar cytosolic free ionised calcium the trigger for acute pancreatitis? *Lancet*. 346: 1016-1019.
- 120 - Gerasimenko JV. et al. (2013):  $Ca^{2+}$  release-activated  $Ca^{2+}$  channel blockade as a potential tool in antipancreatitis therapy. *PNAS*. 110; 13186-13191.
- 121 - Vizvári E. et al. (2016): Characterization of  $Na^+K^+2Cl^-$  Cotransporter Activity in Rabbit Lacrimal Gland Duct Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 57: 3828-3835.
- 122 - Iwatsuki N. és Petersen OH. (1977): Pancreatic acinar cells: localization of acetylcholine receptors and the importance of chloride and calcium for acetylcholine-evoked depolarization, *J Physiol*. 269: 723-733.
- 123 - McCandless M. et al. (1981): Mouse pancreatic acinar cells: Voltage-clamp study of acetylcholine-evoked membrane current. *J Physiol*. 318: 57-71.
- 124 - Caputo A. et al. (2008): TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science*. 322: 590-594.
- 125 - Huang F. et al. (2009): Studies on expression and function of the TMEM16A calcium-activated chloride channel. *PNAS*. 106: 21413-21418.
- 126 - Ousingsawat J. et al. (2009): Loss of TMEM16A causes a defect in epithelial  $Ca^{2+}$ -dependent chloride transport. *J Biol Chem*. 284: 28698-28703.
- 127 - Tan YP et al, (1992): High density of  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^+$  and  $Cl^-$  channels on the luminal membrane of lacrimal acinar cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 11229-11233.

## ***X/a. Tárgyszavak***

könnymirigy

folyadékszécréción

acinus sejt

BK csatorna

Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pumpa

TMEM16A

hasnyálmirigy

SOCE

TRPM4

patch-clamp

## ***X/b. Key words***

lacrimal gland

fluid secretion

acinar cell

BK channel

Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump

TMEM16A

pancreas

SOCE

TRPM4

patch-clamp

## ***XI. Köszönetnyilvánítás***

Köszönöm szépen **Prof. Dr. Csernoch Lászlónak**, az ÁOK Élettani Intézet és a Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola vezetőjének, hogy gyógyszerészhallgató koromtól biztosította a tudományos munkámhoz szükséges feltételeket az Intézetben. Köszönöm szépen **Prof. Dr. Jóna Istvánnak** a bizalmat, amelyet megszavazott nekem a kutató csoportjában, és a folyamatos szakmai háttérrel, amellyel támogatott. Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Almássy Jánosnak**, aki szakmai irányításán túl barátilag is támogatott az elmúlt évek során. Köszönöm **Magyar Zsuzsanna Éduának** a sok segítséget és a közös munkát a laborban. Köszönöm kollaborációs partnereinknek, **Yule I. Davidnek** a Rochesteri Egyetemről, és **Rudi Vennekensnek** a Leuveni Egyetemről az együttműködést. Köszönettel tartozok emellett **Prof. Dr. Nánási Péter Pálnak** és **Dr. Tóth István Baláznak** a rendszeres tanácsokért, amelyekkel segítették a kutatási témák fejlődését. Köszönöm továbbá az Élettani Intézet valamennyi munkatársának a közös munkát és a segítséget.



Nyilvántartási szám: DEENK/523/2021.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Diszházi Gyula

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Diszházi, G.**, Magyar, Z. É., Lisztes, E., Tóth-Molnár, E., Nánási, P. P., Vennekens, R., Tóth, I. B., Almássy, J.: TRPM4 links calcium signaling to membrane potential in pancreatic acinar cells. *J. Biol. Chem.* 297 (3), 101015, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101015>  
IF: 5.157 (2020)
2. Almássy, J., **Diszházi, G.**, Skaliczki, M., Márton, I., Magyar, Z. É., Nánási, P. P., Yule, D. I.: Expression of BK channels and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pumps in the apical membrane of lacrimal acinar cells suggests a new molecular mechanism for primary tear-secretion. *Ocul. Surf.* 17 (2), 272-277, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtos.2019.01.007>  
IF: 12.336

### További közlemények

3. Matta, C., Lewis, R., Fellows, C. R., **Diszházi, G.**, Almássy, J., Miosge, N., Dixon, J. E., Uribe, M. C., May, S., Póliska, S., Barrett, J. R., Fodor, J., Szentesi, P., Hajdú, T., Keller-Pintér, A., Henslee, E., Labeed, F. H., Hughes, M. P., Mobasheri, A.: Transcriptome-based screening of ion channels and transporters in a migratory chondroprogenitor cell line isolated from late-stage osteoarthritic cartilage. *J. Cell. Physiol.* 236 (11), 7421-7439, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.30413>  
IF: 6.384 (2020)
4. Skaliczki, M., Lukács, B., Magyar, Z. É., Kovács, T., Bárdi, M., Novák, S., **Diszházi, G.**, Sárközi, S., Márton, I., Péli-Szabó, J., Jóna, I., Nánási, P. P., Almássy, J.: 4-chloro-orto-cresol activates ryanodine receptor more selectively and potently than 4-chloro-meta-cresol. *Cell Calcium.* 88, 102213, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102213>  
IF: 6.817





5. Fanczal, J., Pallagi, P., Görög, M., **Diszházi, G.**, Almássy, J., Madácsy, T., Varga, Á., Csernay-Biró, P., Katona, X., Tóth, E., Molnár, R., Rakonczay, Z., Hegyi, P., Maléth, J.: TRPM2-mediated extracellular Ca<sup>2+</sup> entry promotes acinar cell necrosis in biliary acute pancreatitis. *J. Physiol.* 598 (6), 1253-1270, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1113/JP279047>  
IF: 5.182
6. **Diszházi, G.**, Magyar, Z. É., Mótán, J. A., Csernoch, L., Jóna, I., Nánási, P. P., Almássy, J.: Dantrolene Requires Mg<sup>2+</sup> and ATP To Inhibit the Ryanodine Receptor. *Mol. Pharmacol.* 96 (3), 401-407, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1124/mol.119.116475>  
IF: 3.664
7. Magyar, Z. É., **Diszházi, G.**, Péli-Szabó, J., Szentesi, P., Collet, C., Csernoch, L., Nánási, P. P., Almássy, J.: The diamide insecticide chlorantraniliprole increases the single-channel current activity of the mammalian skeletal muscle ryanodine receptor. *Gen. Physiol. Biophys.* 38 (2), 183-186, 2019.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.4149/gpb\\_2019007](http://dx.doi.org/10.4149/gpb_2019007)  
IF: 1.07
8. Vincze, J., Geyer, N., **Diszházi, G.**, Csernoch, L., Bíró, T., Jóna, I., Dienes, B., Almássy, J.: Laser induced calcium oscillations in fluorescent calcium imaging. *Gen. Physiol. Biophys.* 37 (3), 253-261, 2018.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.4149/gpb\\_2017054](http://dx.doi.org/10.4149/gpb_2017054)  
IF: 1.309
9. Geyer, N., **Diszházi, G.**, Csernoch, L., Jóna, I., Almássy, J.: Bile acids activate ryanodine receptors in pancreatic acinar cells via a direct allosteric mechanism. *Cell Calcium.* 58 (2), 160-170, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2015.03.009>  
IF: 2.909

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 44,828**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
17,493**

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

Debrecen, 2021.12.09.

