

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Intracelluláris kalcium koncentráció-változások vizsgálata nyálmirigyben és vázizomban

Dr. Skaliczki Marianna

Témavezető: Dr. Almássy János

Prof. Dr. Nánási Péter Pál



DEBRECENI EGYETEM

FOGORVOSTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2022

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Intracelluláris kalcium koncentráció-változások vizsgálata nyálmirigyben és vázizomban

Dr. Skaliczki Marianna

Témavezető: Dr. Almássy János

Prof. Dr. Nánási Péter Pál



DEBRECENI EGYETEM

FOGORVOSTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2022

**Intracelluláris kalcium koncentráció-változások vizsgálata nyálmirigyben és
vázizomban**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében az Elméleti orvostudományok
tudományágban

Írta: Dr. Skaliczki Marianna
okleveles fogorvos

Készült a Debreceni Egyetem Fogorvostudományi Doktori Iskolája
(Élettan és Neurobiológia programja keretében)

Témavezetők: Prof. Dr. Nánási Péter Pál, MTA doktora
Dr. Almássy János, PhD

A doktori szigorlat bizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, MTA doktora

tagok: Dr. Dér Péter, PhD

Dr. Matta Csaba, PhD

A doktori szigorlat helye és időpontja: Debreceni Egyetem, GYTK, Gyógyszerhatástani
Tanszék könyvtára 2023. január 17., 13 óra.

Az értekezés bírálói:

Dr. Mikó Edit, PhD

Dr. Pallagi Petra, PhD

A bírálóbizottság:

Elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, MTA doktora

Az értekezés bírálói: Dr. Mikó Edit, PhD

Dr. Pallagi Petra, PhD

tagok: Dr. Dér Péter, PhD

Dr. Matta Csaba, PhD

Az értekezés védésének helye és időpontja: Debreceni Egyetem, Élettudományi Központ 008-
009-as terem, 2023. január 17., 14 óra.

Bevezetés

Az intracelluláris kalcium koncentráció ($[Ca^{2+}]_i$) változásai alapvető és általános szabályozó szerepet játszanak a sejtműködés szabályozásában gyakorlatilag minden szervben és szövettípusban. A Ca^{2+} e kiemelt szabályozó szerepét több tényezőnek köszönheti. Egyrészt bivalens töltése miatt könnyen kötődik szerves molekulákhoz, továbbá ugyanez okból kifolyólag transzport fehérjék (ioncsatornák ill. mobil carrierek) nélkül nehezen jut át a sejtmembránon. Így a sejtek viszonylag hatékonyan képesek az $[Ca^{2+}]_i$ -t alacsony szinten tartani, ami elengedhetetlen feltétele az $[Ca^{2+}]_i$ robbanásszerű megnövekedésének, ami a stimulus eredményeként bekövetkező legfontosabb jelátviteli lépés.

Munkám során két jól körülhatárolt területet vizsgáltam az $[Ca^{2+}]_i$ változások szabályozó szerepével kapcsolatban. Az egyik kísérletsorozatban a vázizom szarkoplazmatikus retikulumában (SR) található Ca^{2+} -csatornák (rianodin receptor, RyR1) agonista molekuláinak különböző típusait vizsgáltam összehasonlítva azok hatását hatékonyságuk és szelektivitásuk szerint. Munkám további részében a nyáltermelés szabályozásának Ca^{2+} -függő aspektusait elemeztem, melynek eredményeként egy új, módosított nyálszekréciós modellt sikerült megalkotni, ami az eddigieknél pontosabban írja le a szekréciós folyamatot.

Célkitűzések

A vázizmon végzett kísérleteink során a három vizsgált klorokrezolnak a RyR1 csatornára és a SERCA pumpára irányuló hatását kvantitatív módon hasonlítottuk össze abból a célból, hogy kiválasszuk a RyR1-re ható legszelektívebb agonistát. Ehhez lipid kettősrétegbe ágyazott RyR1 receptorokon ionáramokat mértünk, SR-ből izolált nehéz és könnyű membrán vezikulákon Ca^{2+} -transzport kísérleteket és ex vivo vázizom kísérleteket végeztünk.

A nyálmirigy acinus sejtjein végzett méréseink korábbi tájékozódó kísérletek eredményeire épülnek, amelyek alapján joggal feltételezhettük, hogy a jelenleg kanonikusan elfogadott nyálszekréciós mechanizmus pontosításra szorul. Ezt a pontosítást tűztük ki célul az acinus sejteken végzett elektrofiziológiai és morfológiai kísérleteinkben.

Irodalmi áttekintés

A rianodin receptor

A rianodin receptor (RyR) a szarkoplazmatikus retikulum ligand függő kalcium csatornája. A RyR működését számos endogén tényező (Ca^{2+} , Mg^{2+} , nukleotidok) és exogén tényező (metilxantinok, fenol származékok, ezen belül különösen a krezolok) módosíthatja.

A Ca^{2+} a RyR1 legfontosabb természetes regulátora, mivel a RyR1 más ligandjai vagy képtelenek aktiválni Ca^{2+} hiányában a csatornát, vagy a maximális hatás kiváltásához Ca^{2+} -ot igényelnek. A csatorna nyitvatartási valószínűsége (P_o) és a Ca^{2+} -koncentráció között haranggörbe alakú összefüggés van. Nanomolnyi Ca^{2+} -koncentrációnál a P_o közel nulla. A citoszolikus Ca^{2+} koncentráció 50-100 μM -ig aktiválja RyR1-et, míg ennél magasabb Ca^{2+} -koncentráció gátolja a csatornát ($\text{IC}_{50} = 300\text{-}500 \mu\text{M}$) (Smith et al., 1986; Sárközi et al., 2000; Szigeti et al., 2007). A Ca^{2+} hatása egy aktiváló és egy alacsony affinitású, gátló kötőhellyel magyarázható, melyek a fehérje citoplazmatikus oldalán helyezkednek el.

A Mg^{2+} mikromólos koncentrációban gátolja a RyR működését. A Mg^{2+} gátló hatása azzal magyarázható, hogy a Mg^{2+} a Ca^{2+} -kötőhelyekhez kötődve zárja a csatornát (Smith et al., 1986; Jóna et al., 2001).

Az adenin-nukleotidok aktiválják a RyR csatornát. A leghatékonyabb aktivátornak az ATP bizonyult, hatékonyság szempontjából ezt követi az ADP, AMP és a cAMP. A csatorna maximális aktivációjához a Ca^{2+} és az ATP szimultán jelenléte szükséges (Meissner, 1994; Zucchi and Ronca-Testoni 1997).

A metilxantinok közül a koffein növeli a RyR1 nyitvatartási valószínűségét, ezért izomkontraktúrát hoz létre. P_o -növelő hatását a Ca^{2+} -aktivációs helyek érzékenységének növelésével éri el. Erre utal az is, hogy a 0,5-2 mM-ban alkalmazott koffein μM körüli Ca^{2+} -koncentrációnál váltja ki aktiváló hatását, míg 5-10 mM-os koncentrációban alkalmazva már pikomólos Ca^{2+} -koncentrációnál is folyamatosan nyitva tartja a RyR1-et. A többi metilxantin a koffeinhez hasonló hatással rendelkezik. A metilxantinok hatásossági sorrendje a következő: methylxantin > theobromin ~ theophyllin > koffein ~ dimethylxantin (Zucchi and Ronca-Testoni, 1997). Kísérletes körülmények között a legszélesebb körben használt RyR1-agonista a koffein, mely felbecsülhetetlen értékű információt szolgáltatott a RyR1 izomműködésben betöltött

szerepéről (Endo, 1975; Fryer and Neering, 1989; Allen and Westerblad, 1995; Hermann-Frank et al, 1999). De a koffein távolról sem ideális kísérleti eszköz az izomműködés szabályozásának vizsgálatára, részben mert az erősen hidrofób molekulát nehéz kimosni és csak nagy (több mM) koncentrációban idéz elő Ca^{2+} felszabadulást (Westerblad et al., 1998; Wendt and Stephenson, 1983). Ráadásul szelektivitása sem megfelelő, mivel további hatásokkal is rendelkezik: foszfodieszteráz-gátló tulajdonsága révén növeli a rostban a cAMP szintet, fokozza a myofibrillumok Ca^{2+} érzékenységet, megváltoztatja a SERCA, az IP_3 receptorok továbbá számos ioncsatorna működését (Hirose et al., 1993; Zahradník and Palade, 1993; Islam et al., 1995).

A fenol származékok nagy szerepet játszanak a gyógyászatban, gyógyszeriparban, kozmetikumok előállításában és festékekben. A legtöbb természetes fenolszármazékot antifungális és antibakteriális hatása miatt alkalmazzák, mint például a timolt és annak szerkezeti analógjait (karvakrol, vanilin, cineol). A timol az aneszteziológiában is megjelenik, mint a halotán tartósító és stabilizáló vegyülete. A kozmetikai iparban és gyógyászatban az eugenolt és ánizsaldehidet kellemes illatuk miatt is alkalmazzák. A timol submillimoláris koncentrációban Ca^{2+} -felszabadulást vált ki a vázizomból izolált SR vezikulumokból. Sárközi és munkatársai a természetes fenol származékok hatását vizsgálták a vázizom SERCA pumpáján és RyR1-én. Eredményeik alapján a timol és a karvakrol gátolta legintenzívebben az SERCA pumpát, míg a RyR1 aktiválásán keresztül koncentráció-függő módon Ca^{2+} -felszabadulást indukált a vázizom nehéz SR vezikuláiból. A timol és karvakrol fokozzák a Ca^{2+} -csatorna nyitvatartási valószínűségét. A timol jó oldhatósága, a kísérletek ismételhetősége és alacsony hatásos koncentrációja ($k_d=160 \mu\text{M}$) miatt, akár ideális RyR1 agonista is lehet (Sárközi et al., 2007).

A krezolok olyan fenolszármazékok, melyek benzol gyűrűjéhez egy metilcsoport és egy hidroxil csoport kapcsolódik. Attól függően, hogy az említett funkcionális csoportok egymáshoz képest hogyan helyezkednek el a benzol gyűrűn, három izomert különböztetünk meg: orto-krezolt, meta-krezolt és para-krezolt. Ezek klórozott változatai a klorokrezolok.

A koffein használata által okozott technikai nehézségeket jelentős mértékben kiküszöbölhetjük a koffeinnél sokkal specifikusabb RyR1 agonisták, a klorokrezolok alkalmazásával. A klorokrezol molekula egy benzol gyűrűbe szubsztituált hidroxil csoportot, metil csoportot, valamint egy klór atomot tartalmaz. Ezek egymáshoz

viszonyított pozíciója alapján megkülönböztetjük a 4-kloro-orto-krezolt (4-COC), a 4-kloro-meta-krezolt (4-CMC), és a 3-kloro-para-krezolt (3-CPC).

Korábbi tanulmányok szerint a 4-CMC, melyet gyógyszerekben tartósítószerként használnak, növeli a triciált ryanodin kötődését a nehéz SR vezikulumokhoz, azokból Ca^{2+} -felszabadulást vált ki és növeli a RyR1 csatornák nyitvatartási valószínűségét, valamint hatékonyan gátolja az SR Ca^{2+} ATP-áz (Zorzato et al., 1993; Tegazzin et al., 1996; Herrmann-Frank et al., 1996). A 3-CPC és a 4-COC szelektivitása RyR1-en és a SERCA pumpán mindeddig tisztázatlan, bár arra találtam adatot, hogy a 4-CMC gátolja a SERCA működését (Al-Mousa and Michelangeli, 2009). Az eltérő molekulaszervezetek alapján várható, hogy a különböző szerkezetű klorokrezolok eltérő mértékben stimulálják a RyR1-et illetve gátolják a SERCA-t, továbbá különbség lehet a vegyületek szelektivitásában is. Kísérleteink célja ezen különbségek feltárása volt, ami lehetővé teszi a leghatékonyabb és legszelektívebb RyR1 agonista kiválasztását.

Az SR Ca^{2+} pumpa működése

Az SR-be a felszabadult Ca^{2+} -ot egy aktív transzportfolyamat juttatja vissza. A SERCA működése során az egyik legfontosabb lépés az enzim foszforilálása, amely egy átmeneti $\text{E}_1\text{-E}_2$ konformációváltozáshoz vezet. Egy ATP hidrolízise kapcsán az E_1 -konformációs állapotú fehérje két Ca^{2+} -ot juttat az SR longitudinális tubulusába. Ezt követően a Ca^{2+} -ot kötött fehérje Mg^{2+} jelenlétében ATP-t hidrolizál, mely során a pumpafehérje foszforilálódik, ezen folyamat stabilizálja a pumpa E_2 konformációs állapotát. A SERCA a nagy affinitású Ca^{2+} -transzportrendszerekhez tartozik (K_m kb. 400 nM), emiatt a pumpa aktivitása Ca^{2+} -függő, amelynek koncentráció-optimuma 2 μM Ca^{2+} körül van.

A parotis acinus sejtjeinek struktúrája

A parotis piramis alakú serosus acinus sejtjei szerkezetileg és funkcionálisan is polarizáltak. Tevékenységük eredménye a primer nyál.

A polarizáltság eredményeként az acinus sejtek membránja is két részre osztható. A sejt lumen felé tekintő kisebb felszínnel rendelkező része az apikális (luminális) membrán, ahol a szekréttummal telt vezikulák helyezkednek el. A folyadék és enzimszekréció a luminális membránon keresztül a lumen felé történik. A sejt lamina bazális felé tekintő relatíve szélesebb része a basolaterális membrán. Az apikális

membrán kiterjedése korábbi becslések szerint a teljes membránfelszín aránylag kis részét teszi ki. A polarizált szerkezetű acinus sejtek funkcionálisan is polarizáltak, ami azt jelenti, hogy a transzporterek és ioncsatornák elhelyezkedése is eltérő a bazolaterális és az apikális membránon. A nyálmirigyek acinus sejtjei állítják elő a primer nyálat, mely izozmotikus folyadék. A folyadék- és enzimszekréció az apikális membránon keresztül történik. Az acinus sejtek közötti mechanikus kapcsolatot a zonulla ocludens (ZO) a felelős, más néven tight junction (TJ) sejtkapcsoló struktúra. A TJ az apikális membrán közelében található, szinte övszerűen helyezkedik el a sejten. A TJ a sejtek közötti kapcsolaton túl szerepet játszik a membránfehérjék laterális diffúziójának a megakadályozásában, megtartva az acinus sejtek polarizált felépítését (Tsukita et al., 2001; Baum, 1993).

Az acinus sejteket paraszimpatikus és szimpatikus posztganglionáris rostok idegzik be. A reflex mechanizmus a paraszimpatikus posztganglionáris rostok idegvégződéseiből acetil-kolint (ACh) szabadít fel. Az ACh M_3 típusú ACh-receptorhoz kapcsolódik, ami az acinus sejtek bazolaterális membránjában található (Melvin et al., 2005; Cook et al., 1994). A receptor aktiválódás eredményeként végül IP_3 keletkezik. Az IP_3 , mint másodlagos hírvivő az endoplazmás retikulumon (ER) lévő IP_3 receptorhoz kapcsolódva Ca^{2+} felszabadulást eredményez (Clapham, 1995; Ambudkar, 2000; Bootman, 2001). Az ionmozgásokat a nyálmirigy acinus sejtekben bekövetkező paraszimpatikus stimuláció hatására megnövekvő intracelluláris Ca^{2+} koncentráció indítja be, mely során megnyílnak az acinus sejt lumenális régiójában elhelyezkedő Ca^{2+} -függő Cl^- -csatornák (Bootman, 2001; Iwatsuki et al., 1985; Maruyama et al., 1986; Maruyama et al., 1983; Petersen, 1992; Petersen and Gallacher, 1988). Ezeket a csatornákat TMEM16A-ként azonosították (Yang et al., 2008; Romanenko et al., 2010).

A nyálszekréciót leíró jelenlegi modell szerint a folyadékszekréció hajtóerejét az acinus sejtek bazolaterális membránjában elhelyezkedő Na^+/K^+ pumpa illetve az általa felépített Na^+ -gradiens adja, amit egyértelműen bizonyít, hogy ouabainnal a nyáltermelés teljes mértékben felfüggeszthető (Petersen and Poulsen, 1967; Poulsen, 1974; Silva et al., 1977). Na^+ gradiens terhére a $Na^+/K^+/2Cl^-$ elektroneutrális kotranszporter a bazolaterális membránon keresztül Cl^- -ot juttat az intracelluláris térbe (Evans et al., 2000; Martinez et al., 1983; Novak et al., 1986). Azonosítottak egy további bazolaterális kloridfelvételi útvonalat is, mely két anionporter, a Na^+/H^+ exchanger (NHE1) és a Cl^-/HCO_3^- csere (AE2) koordinált működésével valósul meg,

de ennek jelentősége egyelőre vitatott (Catalán et al., 1999; Nakamoto et al., 2007). A modell szerint csak az intracelluláris Cl^- koncentráció emelkedik meg, mert a $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ transzporter által bevitt Na^+ és K^+ gyakorlatilag körforgást végeznek a bazolaterális membránon keresztül. A belépő Na^+ -ot a Na^+/K^+ pumpa távolítja el, míg a K^+ K^+ -csatornákon keresztül távozik -mindkettő a bazolaterális membránon keresztül. A Cl^- a lumenális membránban lévő Ca^{2+} -függő Cl^- csatornákon elektrokémiai gradiense irányába az acinus lumenébe áramlik, ennek következtében az acinus sejt lumene elektronegatívvá válik, ezért elektromos gradienst hoz létre a Na^+ -ok számára (Kasai et al., 1998). A primer szekréció kialakulása során az interstitiumból Na^+ lép a lumenbe paracelluláris útvonalon. Az acinus lumenében ily módon belépő Cl^- és Na^+ -ok paracelluláris vízbeáramlást indukálnak, így a primer nyál izozmotikus lesz (Begenisich and Melvin, 1998). A modell lényeges eleme, hogy a sejtbe különböző mechanizmusok segítségével belépő K^+ a pumpával azonos, azaz a bazolaterális oldalon, konduktív K^+ -csatornákon keresztül hagyja el a sejtet.

A folyamat során a Cl^- számára az elektrokémiai hajtóerő állandó, mivel a Ca^{2+} -függő K^+ -csatornák ($\text{K}_{\text{Ca}^{2+}}$) ellenárama folyamatosan biztosítja a negatív membránpotenciált. A K^+ legalább kétféle K^+ -csatornán keresztül juthat vissza az intersticiumba: a nagy konduktanciájú $\text{K}_{\text{Ca}^{2+}}$ (BK, KCa1.1) valamint a közepes konduktanciájú SK4 csatornán (KCa3.1) át. Az SK4 Ca^{2+} -függő K^+ -csatorna, a BK pedig Ca^{2+} és feszültség-függő módon is szabályozott (Nehrke et al, 2003; Romanenko et al., 2007). A nyálszekréció során a Ca^{2+} -függő K^+ -csatornák szerepe tehát az, hogy a Cl^- számára állandó elektrokémiai hajtóerőt biztosítson, így a $\text{K}_{\text{Ca}^{2+}}$ ellenárama folyamatosan fenntartja a negatív membránpotenciált. A K^+ -okat Na^+/K^+ ATP-áz pumpálja vissza az acinus sejtbe. A $\text{K}_{\text{Ca}^{2+}}$ -nak fontos szerepére utal, hogy a folyadékszekréciós folyamat a $\text{K}_{\text{Ca}^{2+}}$ csatorna gátló paxillinnel valamint ouabainnal is felfüggeszthető. Fentiek értelmében a Ca^{2+} -függő szekréció szabályozás azon alapszik, hogy az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció növekedése a folyamatos szekrécióhoz szükséges Cl^- és K^+ és csatornákat egyaránt megnyitja. Korábbi kutatási eredmények szerint a $\text{K}_{\text{Ca}^{2+}}$ csatornák a sejtek bazolaterális membránjában foglalnak helyet. A jelenlegi nyálszekréciós modell ezzel magyarázza, hogy a primer nyál K^+ -ban szegény, és a Na^+/K^+ ATP-ázt a $\text{K}_{\text{Ca}^{2+}}$ csatornával megegyező helyre, a bazolaterális membránba helyezi (Catalán et al, 2009; Mangos et al., 1973; Almassy et al., 2012). Dolgozatomban bemutatott eredményeink ezt a klasszikus nyálszekréciós modellt kérdőjelezzik meg, mivel jelentős mennyiségű $\text{K}_{\text{Ca}^{2+}}$ csatorna és Na^+/K^+ pumpa

funkcionális jelenlétét bizonyítják a lumenális membránban. A transzport fehérjék morfológiai- és funkcionális vizsgálatával kapott eredményeink alapján egy új nyálszekréciós modellt készítettünk.

Módszerek

A vázizom Ca^{2+} transzportereinek vizsgálatára alkalmazott módszerek

SR mikroszóma preparátumok készítése nyúl vázizomból

Az SR terminális ciszternáit tartalmazó mikroszóma frakciót (nehéz SR vezikulumok, HSRV) és a longitudinális tubulusok vezikulumait (könnyű SR vezikulumok, LSRV) nyúl vázizomból izoláltuk differenciál centrifugálás és cukor gradiensen történő centrifugálás segítségével (Sárközi et al., 2007). Az LSRV SERCA pumpát, míg a HSRV RyR-t és SERCA pumpát egyaránt tartalmaz.

Kalcium felszabadulás mérése SR vezikulumokból

A nehéz SR vezikulumokat pufferben (92,5 mM KCl, 18,5 mM MOPS, 1 mM MgCl_2 , 1 mM ATP, és 250 μM antipyrylazo III, pH=7,0), üvegeküvetében diszpergáltuk (Rousseau et al., 1987). Az oldat extravezikuláris Ca^{2+} tartalmát a metallokróm Ca^{2+} -indikátor festék, az antipyrylazo III transzmittanciájának segítségével követtük 710 nm-en egy Spex-Fluoromax típusú spektrofluoriméterrel. A kísérlet elején a nehéz SR vezikulumokat Ca^{2+} -mal a SERCA pumpa segítségével megtöltöttük. Miután a Ca^{2+} -felvétele befejeződött, klorokresolok különböző dózisaival Ca^{2+} -felszabadulást váltottunk ki. Az adatok értékelésekor a felszabaduló Ca^{2+} mennyiségét és a Ca^{2+} felszabadulás sebességét határoztuk meg.

Ionáram mérések RyR1-csatornákon

A csatorna aktivitást mesterséges sík lipid kettősrétegbe ágyazott RyR-okon, az ionáram méréssel követtük. A RyR-t nehéz SR vezikulumok sík lipid membránba való fúzionáltatásával építettük be (Sárközi et al., 2007). A lipid kettősréteget egy delrin anyagú csésze (mérőkamra, Warner Instruments Inc.) falába fúrt, 200 μm átmérőjű lyukon alakítottuk ki, ami így két oldatrészt választott el. A mérőkamra mérőoldatot tartalmazott, amelynek összetétele a következő volt: 50 mM $\text{CsCH}_3\text{O}_3\text{S}$, 100 μM $\text{K}_2\text{H}_2\text{EGTA}$, 150 μM CaCl_2 , 20 mM HEPES, pH=7,2. A lipid oldat phosphatidylethanolamint, phosphatidylserint és phosphatidylcholint tartalmazott 5:4:1 arányban és n-decánban volt feloldva, 20 mg/ml koncentrációban. A RyR1 sikeres beépítése után a szabad Ca^{2+} koncentrációt a cis oldalon EGTA hozzáadásával 50 μM -ról 100 nM-ra csökkentettük, majd a RyR1 citoplazmatikus oldalának megfelelő

oldatfélhez klorokresolt adtunk a kívánt koncentrációban. Az ionáramokat Axopatch-200 erősítő segítségével detektáltuk, majd 1 kHz-en egy 8-pólusú Bessel szűrővel szűrtük és 3 kHz-en digitalizáltuk. Végül az áramjeleket pCLAMP 6.03 szoftver (Axon Instruments) segítségével rögzítettük. A csatornák nyitvatartási valószínűségét Clampfit 10 szoftverrel határoztuk meg.

ATP-áz aktivitás mérése

Az LSRV vezikulumok ATP-áz aktivitását kapcsolt enzim assay-vel határoztuk meg egy 100 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 0,42 mM phosphoenolpyruvát, 1 μM A23187 ionofor, 0,2 mM NADH, 7,5 U/ml pyruvátkináz, és 18 U/ml lactatedehydrogenáz tartalmú közegben (pH=7,5, t=37°C). Az assay-t 1 μM ionizált Ca²⁺ mellett végeztük, hogy biztosítsuk a maximális SERCA aktivitást. A teljes hidrolitikus aktivitást a NADH 340 nm-en mért abszorpciós csúcsának optikai denzitáscsökkenésén keresztül mértük (Sárközi et al., 2007).

Vázizom kontraktilitásának mérése

A patkányból kimetszett extensor digitorum longus izom egyik inát a mérőkamra aljához, míg a másikat az erőmérő (transzducer) karjához rögzítettük függőleges pozícióban. Az izomtónust izometriás körülmények között mértük, miután az izom előterhelését 10 g-ra állítottuk be. A mérőkamra Tyrode oldatot tartalmazott, melyhez különböző koncentrációban 4-COCt adagoltunk.

Parotis acinus sejtek vizsgálatára alkalmazott módszerek

Parotis acinus sejtek izolálása

Elektrofiziológiai mérések céljára a parotis acinus sejteket a parotis szövetének enzimatis emésztésével állítottuk elő (Martinez and Cassity, 1983; Romanenko et al., 2010; Thompson and Begenisich 2006). A leölt egerekből a parotis mirigyeket gyorsan eltávolítottuk, éles ollóval finomra aprítottuk és 37°C-on vízfürdőben 8 percig rázva 28 μg/ml trypsinnel emésztettük. Ezután a szövetet trypsin inhibitorral mostuk, majd 40 percig tovább emésztettük 10 ml 0,18 Wünsch egység/ml Liberase TL, kollagenáz tartalmú enzimkeverékben (Roche Diagnostics GmbH). A mosás után Liberase-emésztést további 20 percig végeztük. A parotis sejteket szerológiai pipettával történő triturálással választottuk szét.

Immunocitokémia

Az acinus sejthalmokat rögtön az izolálás után jéghideg methanolban fixáltuk (szuszpenzióként 15 percig). Ezután a sejteket centrifugálással összegyűjtöttük, majd 3% BSA-t tartalmazó PBS-ben (foszfáttal pufferelt sóoldat) blokkoltuk. Ezután 1:250, 1:50 és 1:100 hígításban a következő antitestek egyikével kezeltük: $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pumpa antiszérum (Abcam), IP_3R_3 antiszérum (BD Biosciences), és TMEM16A antiszérum (Santa Cruz Biotechnology Inc). PBS-ben történő mosást követően a sejteket Dylight 488 ló nyúl elleni, Cy3 kecske egér elleni és Dylight 488 ló kecske elleni másodlagos antitestekkel kezeltük (ThermoFisher Scientific Inc.) 1:2000 vagy 1:1000 hígításban. Többszöri mosás után a sejteket Zeiss 510 Meta (Carl Zeiss Microscopy GmbH) konfokális mikroszkóp segítségével vizsgáltuk.

Immunohisztokémia

A parotis szövetet standard hisztokémiai protokoll szerint készítettük elő immunfestéshez. A $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pumpa elleni antitestet (Abcam) egy éjszakán keresztül 4°C-on 1:100 hígításban alkalmaztunk. Ezt követően a sejteket Dylight 488 ló nyúl elleni másodlagos antitesttel kezeltük.

Ionáramok mérése parotis acinus sejteken

A patch-clamp technika teljes sejt konfigurációban végzett kísérletek során az ionáramokat Digidata 1322A A/D kártya által vezérelt Axopatch 200 típusú erősítő (mindkettő: Axon Instruments Inc) segítségével rögzítettük. A mintavétel 50 kHz frekvenciával történt és az áramjeleket 8 pólusú Bessel szűrővel 5 kHz-en szűrtük. Az adatokat pClamp 9 szoftvercsomag (Axon Instruments Inc.) segítségével gyűjtöttük és elemeztük. Az acinus sejtek K^+ -áramát +40 mV feszültségen, míg a Cl^- -áramot -20 mV-on mértük. A pipettát intracelluláris oldattal töltöttük meg, mely a következőket tartalmazta: 135 mM K-glutamát, 10 mM HEPES, 10 mM NP-EGTA, 2 mM CaCl_2 és 0,25 mM Fluo-4-K (pH=7,2). A külső oldat összetételét úgy választottuk meg, hogy alkalmas legyen a Ca^{2+} függő K^+ és Cl^- áramok izolált vizsgálatára. Ennek megfelelően K^+ -áramméréskor a külső oldatban 135 mM Na-glutamát, 5 mM K-glutamát, 5 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 és 10 mM HEPES volt (pH=7,2). A Cl^- áram mérésekor az extracelluláris oldatban a K^+ -áramot tetraetilammoniummal blokkoltuk (az oldatban ilyenkor 140 mM TEA-Cl és 10 mM HEPES volt, pH=7,2). Az áramjeleket pCLAMP

6.03 szoftver (Axon Instruments) segítségével rögzítettük. Az áramokat Clampfit 10 szoftverrel elemeztük.

Ca²⁺-felszabadítás fotolízis segítségével

Az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció változásait a Fluo-4 fluoreszcencia követésével, egy monokromátor alapú képalkotó rendszer (Polychrome IV) és egy nagy sebességű CCD kamera (TILL Photonics GmbH.) segítségével kísértük figyelemmel. A sejteket 488 nm hullámhosszúságú fénnel világítottuk meg és a fluoreszcenciát egy 525 nm-es sávszűrőn (Chroma Technology Corp.) keresztül gyűjtöttük. A képalkotást 40-52 ms intervallumban 20 ms expozíciós idővel végeztük. A fluoreszcenciában bekövetkező változásokat a kezdeti fluoreszcenciára normalizálva adtuk meg: $\Delta F/F_0 = (F - F_0)/F_0$, ahol F a mért fluoreszcencia és F₀ a képsorozat első 10 kockájának átlag fluoreszcenciája. A hisztogramokat 4096 egységig skáláztuk be és színekkel láttuk el. Az NP-EGTA (kötött Ca²⁺) fotolízisét villanó UV lézer és megfelelő kondenzor segítségével végeztük (Almassy et al., 2012). A 375 nm-es dióda lézert (Toptica Photonics AG) egy TE200 típusú mikroszkóphoz (Nikon Corp.) csatlakoztattuk egy optikai szálon és egy UV kondenzoron keresztül (TILL Photonics GmbH.). A lézert egy 40-szeres olajimmerziós objektív (Nikon Corp.) segítségével fókuszáltuk a minta síkjára. A lézerpont fél maximum-intenzitás értékénél a lézerpont kiterjedése az x és y síkokban kb. 0,7 μM, míg a z síkban 2,0 μM volt, amely felbontás elegendő volt arra, hogy az acinus sejt egy-egy előre meghatározott kicsiny területét izoláltan megvilágítsuk. Mindez lehetővé tette, hogy az apikális és bazolaterális régiókban izoláltan váltsunk ki fotolízist, azaz okozzunk lokalizáltan Ca²⁺-felszabadulást. A sejteket 40-52 ms időtartamokra világítottuk meg, a lézer teljesítményét 4 és 6 mW között szoftver kontrollálta. Az áramjelek rögzítését, a fluoreszcens kép rögzítését és a lézer expozíció kioldását Polychrome IV illesztőegység segítségével szinkronizáltuk és Vision szoftver csomaggal (TILL Photonics GmbH.) irányítottuk.

Eredmények

Vázizmon nyert eredmények

Koffein hatása a Ca^{2+} -felszabadulásra HSR vezikulán

A koffein és a klorokrezolok SR-ből történő Ca^{2+} -felszabadulásra gyakorolt hatását mikroszóma frakciókból nyert HSR vezikulumokon vizsgáltuk. A HSR vezikulumokat Ca^{2+} indikátor APIII tartalmú pufferben szuszpendáltuk, amelynek segítségével az extravezikuláris tér Ca^{2+} -tartalmát monitoroztuk. Minden kísérlet elején a vezikulumokat a Ca^{2+} pumpa felhasználásával azonos mennyiségű Ca^{2+} -nal töltöttük fel. Koffein hozzáadását követően az extravezikuláris tér relatív transzmittanciája szignifikánsan lecsökkent, ha az alkalmazott koffein koncentrációja elérte a 4 mM-t, annak jeleként, hogy a koffein Ca^{2+} -felszabadulást váltott ki a Ca^{2+} -nal feltöltött vezikulumokból. A koffein hatására bekövetkező Ca^{2+} -felszabadulás sebessége 4 és 8 mM koffein esetében egyforma volt, 16 mM koffein esetén valamivel alacsonyabb értéket kaptam. Ezen eredmények alapján is tisztán látszik az a régi kísérletes tapasztalat, hogy a koffeinnel való munka nehezen standardizálható, használata farmakológiai szempontból előnytelen, mivel hatása inkább minden vagy semmi törvényt követ, ami felveti egy RyR-re specifikusabb és koncentráció-függő hatással rendelkező agonista igényét. További munkám során ilyen, megfelelőbbnek tűnő jelöltek (a klorokrezolok) hatását teszteltem a RyR1 és a SERCA pumpa működésére.

Klorokrezolok hatása a Ca^{2+} -felszabadulásra HSR vezikulán

A fentiekhez hasonló kísérleti feltételek mellett végeztük a három klorokrezol molekula (4-COC, 4-CMC és 3-CPC) Ca^{2+} -felszabadulásra kifejtett hatásának vizsgálatát. Ebből a célból különböző koncentrációjú klorokresolt (100, 300 és 500 μM) injektáltunk a küvettába, melyet az extravezikuláris közeg gyors transzmittancia-esése követett jelezvén, hogy a klorokrezolok Ca^{2+} -ot szabadítanak fel a HSR vezikulumokból. A reakció specifitását igazolandó 500 μM klorokrezolt a RyR1-inhibitor rutheniumvörös (RR, 5 μM) jelenlétében is alkalmaztuk. Ezekben az esetekben elmaradt a Ca^{2+} felszabadulás, tehát a ruténiumvörös előkezelés a klorokrezol hatását teljes mértékben kivédte, ami a hatás specifitására utal.

A Ca^{2+} -felszabadulás ütemét a különböző klorokrezol-koncentrációknál az intenzitásváltozás kezdeti szakaszára illesztett egyenes segítségével határoztuk meg.

Az egyenes meredekségének reciprokát ábrázoltuk a klorokrezol-koncentráció függvényében. Az adatokat a Hill-egyenlettel illesztve meghatároztuk az EC_{50} értékeket, ami $175 \pm 39 \mu M$ a 4-CMC, $182 \pm 37 \mu M$ a 3-CPC és $113 \pm 36 \mu M$ a 4-COC esetében.

A felszabadított Ca^{2+} relatív mennyiségét szintén meghatároztuk a különböző klorokrezol koncentrációknál. A félhatásos koncentrációk a következők voltak: $121 \pm 20 \mu M$ a 4-CMC, $71 \pm 7 \mu M$ a 3-CPC és $55 \pm 14 \mu M$ a 4-COC esetén.

A teljes felszabadított Ca^{2+} mennyisége a legnagyobb ($500 \mu M$) koncentráció jelenlétében a különböző klorokrezolokra eltérő volt. A relatív steady-state transzmittanciák azt mutatják, hogy a 3-CPC kétszer annyi Ca^{2+} -t szabadított fel, mint a 4-CMC. Ezen érték valamivel magasabb volt a 4-COC esetében is, de a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns.

Klorokrezolok hatása a SERCA ATP-áz aktivitására

A különböző klorokrezolok hatását az SR Ca^{2+} pumpákra az LSR vezikulumok ATP-áz aktivitásának mérésével koncentráció-függő módon. A 4-CMC és 4-COC az ATP-áz aktivitást egyértelműen gátolta. Hill-egyenletet illesztve az adatokra a következő IC_{50} értékeket kaptuk: $167 \pm 8 \mu M$ a 4-CMC és $1370 \pm 88 \mu M$ a 4-COC esetében. A 3-CPC bifázisos hatást mutatott: alacsonyabb koncentrációknál fokozta ($EC_{50} = 91 \pm 17 \mu M$), míg magasabb koncentrációkban csökkentette ($IC_{50} = 848 \pm 90 \mu M$) a SERCA ATP-áz aktivitását.

4-COC hatása az izolált RyR1 csatorna áramára

Azért, hogy több információt nyerjünk a 4-COC hatásának molekuláris mechanizmusáról, a 4-COC-t lipid kettősrétegbe ágyazott RyR1 csatornák áramain tovább teszteltük. Kontroll körülmények között a RyR1 áramokat a csatorna citoplazmatikus oldalán $100 \text{ nM } Ca^{2+}$ jelenlétében rögzítettük. Ilyenkor a csatornák az idő nagy részében zárva vannak, ezért megnyílási valószínűségük alacsony (három kísérlet átlagában $P_o = 0,006$). Amikor a csatornákat $110 \mu M$ 4-COC-al kezeltük, a nyitási valószínűség négyszeresére nőtt ($P_o = 0,025$), a gyakoribb nyitási eseményeknek köszönhetően.

4-COC által kiváltott kontraktúra

A következő kísérletsorozatban azt teszteltük, hogy a 4-COC módosítja-e a vázizom mechanikus aktivitását. Patkányból kimetszett extensor digitorum longus izom tónusát erőmérő segítségével folyamatosan követtük, miközben az izmot kumulatív növekvő 4-COC koncentrációkkal kezeltük. Először 1,6 mM 4-COC-koncentrációt állítottunk be, mely hatástalannak mutatkozott. Ezután további 4-COC injekciók hozzáadásával lépésenként 0,2 mM-lal emeltük a koncentrációt a 2 mM-ig, amely már képes volt kis mértékben fokozni az izomtónust. Amikor a 4-COC koncentrációja elérte a 2,2 mM-t, hirtelen az izomtónus markáns növekedése következett be. Az oldószerként alkalmazott DMSO önmagában hatástalan volt. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a 4-COC a Ca^{2+} felszabadító apparátus specifikus aktivációján keresztül vált ki vázizmon kontraktúrát.

Parotis sejteken nyert eredmények

A Ca^{2+} -függő K^{+} - és Cl^{-} -csatornák apiko-bazális lokalizációja

Bár korábbi kutatási eredmények szerint a $\text{K}_{\text{Ca}^{2+}}$ csatornák egyértelműen a sejtek bazolaterális membránjában foglalnak helyet, újabb matematikai modellek megkérdőjelezték ezt az álláspontot (Palk et al., 2010). A kérdés tisztázása céljából a teljes sejt patch-clamp mérések során a sejt bazális vagy apikális membránja alatti területen hozzunk létre villanó UV-fény segítségével térben lokalizált Ca^{2+} -felszabadulást. A kísérletekben a Ca^{2+} -szint megemelkedése az acinus sejt apikális vagy a sejt bazális régiójában történt. A Ca^{2+} koncentráció mérés tanúsága szerint a Ca^{2+} jel nem érintette az ellentétes oldali régiót, lokális maradt, azaz sejt távolabbi régióban nem jelent meg Ca^{2+} -tranziens. Az apikális Ca^{2+} felszabadítás esetén kifejezett K^{+} -és Cl^{-} -áram emelkedést regisztráltunk a Ca^{2+} -jellel egyidőben, míg a bazálisan alkalmazott Ca^{2+} -felszabadítás nem aktivált sem K^{+} - sem Cl^{-} -áramot. A Cl^{-} -áram az apikális membrán funkcionális markereként szolgál, azaz azt mutatja, hogy a Ca^{2+} koncentráció megemelkedése valóban az apikális membrán mellett történt és hogy a Ca^{2+} függő ionáramok aktiválásához elégséges nagyságú volt.

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a Ca^{2+} -függő K^{+} -csatornák az acinus sejtek apikális membránjában helyezkednek el - a Ca^{2+} -függő Cl^{-} -csatornákhöz hasonlóan. Mindez a korábban ismert nyálszekréciós modell alapjait kérdőjelezi meg, mivel felvetik azt a kérdést, hogy a jelentős mennyiségű lumenális K^{+} -kilépés ellenére miért alacsony a parotis primer nyálának a K^{+} -koncentrációja (~5 mM). A kérdésre egy

lehetséges válasz az lehet, hogy az apikális membrán is tartalmaz Na^+/K^+ -pumpa molekulákat, melyek a szekretált K^+ -t reabszorbeálják. Ezt a lehetőséget immunfluoreszcens módszerrel vizsgáltuk meg a továbbiakban.

A Na^+/K^+ -pumpa apiko-bazális lokalizációja

A Na^+/K^+ -pumpa elhelyezkedését a parotis acinus sejtjeinek membránjában immunfluoreszcens módszerrel vizsgáltuk Na^+/K^+ -pumpa ellenes antitestek segítségével. A Na^+/K^+ -pumpa a sejtmembrán teljes területén kimutatható volt - beleértve az apikális membránt is. Ezekben a kísérletekben az apikális régió jelölését az IP_3 receptorok festésével végeztük. Ezek a kísérletek meggyőzően bizonyítják, hogy -szemben a korábbi elképzelésekkel- a Na^+/K^+ -pumpa az apikális membránban is markánsan jelen van. Szemben az acinus sejteken nyert immuncitokémiai eredményekkel, immunhisztokémiai vizsgálatokban a ductus sejteken csak a bazolaterális membrán festődött a Na^+/K^+ -pumpa, az apikális nem. Ezek az eredmények az antitest specificitását bizonyítják, valamint azt mutatják, hogy a Na^+/K^+ -pumpa kizárólag az acinus sejteken helyeződik ki az apikális membránba.

Az apikális membrán relatív nagyságának meghatározása

Mivel a Cl^- -csatorna kizárólag az acinus sejtek apikális membránjában expresszálódik, ezért mint kiváló apikális marker, alkalmas az apikális membrán relatív kiterjedésének meghatározására. A Cl^- -csatorna jelenlétét (amelyet TMEM16A (ANO 1) fehérjeként azonosítottunk) az apikális membránban immunfluoreszcens festéssel mutattuk ki. A festés egyértelműen az apikális membránt jelöli. Szemben a korábbi irodalmi adatokkal, melyek szerint az apikális membrán a teljes sejtmembrán mindössze 5-8%-át teszi ki, az általunk elvégzett festés a membrán jelentős részét apikális membránként azonosította, ami becsléseink szerint a teljes membránfelszín kb. 30%-át teszi ki.

Az új nyálszekréciós modell

A nyálmirigy acinus sejtjein kapott eredményeim nem illeszthetők be maradéktalanul a nyáltermelés mechanizmusával kapcsolatos korábban elfogadott modellbe. Megállapítottuk ugyanis, hogy (1) csak a nyálmirigy apikális régiójában aktiválódnak a Ca^{2+} -függő K^+ -csatornák, továbbá (2) acinus sejteken a Na^+/K^+ -pumpa az apikális membránban is masszívan jelen van és (3) az acinus sejtek membránja az eddig

gondoltnál lényegesen nagyobb. Fentiek figyelembevételével a nyál szekréciójának új modelljét szükséges feltételeznünk. Ez a régi modelltől abban tér el, hogy a lumenbe történő Na^+ -kilépés nem kizárólag paracelluláris útvonalon valósul meg, hanem az apikális membránban található Na^+/K^+ -pumpa segítségével transzcelluláris, elsődlegesen aktív Na^+ -kilépés is történik. Eredményeink alapján Elias Siguenza és James Sneyd (Department of Mathematics, University of Auckland, Új-Zéland) modellszámításokat végzett, amelyek az eddigieknél pontosabban írják le a nyálszekréció során bekövetkező eseményeket (Almássy et al., 2018).

Megbeszélés

Klorokrezolok hatásának elemzése vázizomban

Kísérleteink azt mutatják, hogy a három vizsgált klorokrezol sztereoizomer közül a legpotensebb és legszelektívebb RyR1 agonista a 4-COC, mivel ennek volt a legalacsonyabb EC_{50} értéke a Ca^{2+} -felszabadulás vonatkozásában, és ami még fontosabb, a 4-COC befolyásolta legkisebb mértékben a SERCA pumpa aktivitását (azaz itt a 4-COC-nek volt a legmagasabb, 1370 μM az IC_{50} értéke).

A maximálisan alkalmazott koncentrációk (500 μM) mellett összehasonlítva a klorokrezolokat a 3-CPC-nek volt a legmarkánsabb hatása a Ca^{2+} -felszabadulásra, de ezt a hatást nem lehet szelektív agonistaként hasznosítani a komplex bifázisos SERCA-hatás miatt. A 3-CPC ugyanis alacsony dózisban stimulálta ($EC_{50}=91 \mu M$), míg magasabb koncentrációknál ($IC_{50}=848 \mu M$) gátolta a SERCA pumpa működését. A vizsgált farmakológiai tulajdonságok alapján a 4-CMC helyett a 4-COC használatát javasoljuk a RyR1 aktiválásának céljára, mert sokkal szelektívebb és sokkal effektívebb Ca^{2+} felszabadító agonista, mint a 4-CMC, (és a koffein) ami adott kísérleti körülmények között előnyös lehet. Bár a 4-COC aktivitása minőségileg nem különbözik a 4-CMC aktivitásától, de annál sokkal szelektívebb agonista a RyR1 receptor vonatkozásában. Így a kísérleti körülmények között a 4-COC alkalmazása esetén feltehetően kevesebb, a SERCA aktivitás-változásából adódó interferenciára számíthatunk.

A nyálelválasztás mechanizmusa parotis acinus sejteken

A parotis acinus sejtein végzett kísérleteink egyértelműen bizonyítják a K^{+} -csatornák jelenlétét az apikális membránban, és azt is, hogy itt a K^{+} -csatornák denzitása jóval nagyobb, mint amennyi a bazolaterális membránra esik. Ebből egyenesen következik, hogy az acinus sejtek ingerlésének hatására jelentős mértékű K^{+} -szekréció kell történjen a lumen irányába, aminek ellentmond a primer nyál alacsony K^{+} -tartalma. Ez az ellentmondás feloldható, ha a K^{+} -csatornákon az apikális oldalon kilépett K^{+} -ot valamilyen mechanizmus visszaviszi a sejt belsejébe. Eredményeink szerint ez a mechanizmus az apikális membránban masszívan előforduló Na^{+}/K^{+} -pumpa mennyiség. Valóban, immuncitológiai módszerekkel nemcsak a Cl^{-} -csatornákat, hanem a Na^{+}/K^{+} -pumpa molekulákat is kimutattuk az apikális membránban. Ennek a

jelentőségét azok az eredményeink hangsúlyozzák, melyek szerint az eddig gondolt alacsony (<8%-os) apikális membránfelszín helyett az apikális membrán felülete a teljes membránfelszín kb. 30%-ára becsülhető, ami jelentős mértékű transzcelluláris aktív Na^+ -transzportot tesz lehetővé a lumen irányába. Ezen eredményeink ellentmondanak a parotis acinus sejtek eddig elfogadott szekréciós modelljének, amely transzcelluláris Cl^- -transzport mellett gyakorlatilag kizárólag paracelluláris Na^+ -transzportot feltételez, ami összeeseng a Na^+/K^+ -pumpa bazolaterális membránra szorítkozó lokalizációjával.

A rendelkezésünkre álló -egyébként egymásnak is meglehetősen ellentmondó- irodalmi adatok az acinus sejtek apikális felszínét jelentősen alulbecsülték (Bundgaard et al., 1977; Contreas et al., 1986; Garrett et al., 1998; Garrett et al., 1992; Iwano et al., 1987; Nakagaki et al., 1978; Petersen, 1971; Winston et al., 1988; Winston et al., 1990). Ennek fényében nem látszott igazán lényegi kérdésnek az esetlegesen apikálisan előforduló Na^+/K^+ -pumpamolekulák szerepének tisztázása, így az érintett kutatók arra a konszenzusra jutottak, hogy ezek szerepe - ha van is egyáltalán - csak minimális lehet (Garrett et al., 1998; Petersen and Poulsen, 1967). Az apikális membránfelszín meghatározásában elkövetett alapvető hiba onnan eredt, hogy olyan elektronmikroszkópos felvételeken alapult, ahol az apikális membránfelszínt a sejtek közötti centrális lyukakkal azonosították - figyelmen kívül hagyva azokat a nem elhanyagolható méretű intercelluláris membránszakaszokat, amelyek szintén az apikális membránhoz tartoznak (Larina and Thorn, 2005). Ezzel szemben a TMEM16A-val végzett saját immunfluoreszcens eredményeink alapján az apikális membrán a teljes membránfelszín legalább 30%-ára tehető.

Kísérleti eredményeink alapján módosítanunk kellett az eddig kanonikusnak tartott szekréciós modellt oly módon, hogy a TMEM16A Cl^- -csatorna mellett jelentős mennyiségű Ca^{2+} -függő K^+ -csatornát, valamint Na^+/K^+ -pumát helyeztünk a sejtmembrán apikális részébe. A K^+ -és Cl^- -csatornák apikális colokalizációja, mivel mindkettő Ca^{2+} -által aktiválódik, kézenfekvő szabályozási lehetőséget biztosít a nyálszekréció serkentésére. Az apikálisan kihelyezett K^+ -csatornák szerepe egyrészt abban áll, hogy az általuk közvetített outward áram megelőzze -illetve kompenzálja- a Cl^- -efflux miatt kialakuló depolarizációt, ami a további Cl^- -kilépést akadályozná. Másrészt az itt kilépő K^+ -kat a szintén apikálisan is jelen lévő Na^+/K^+ -pumpa viszi vissza a sejtbe, miközben ez a mechanizmus is hozzájárul a lumenbe irányuló Na^+ -

szekrécióhoz. Tehát modellünkben a másodlagosan aktív paracelluláris útvonalat kiegészíti az elsődlegesen aktív transzcelluláris mechanizmus.

Mérési eredményeinket alapul véve Elias Siguenza és James Sneyd (Department of Mathematics, University of Auckland, Új-Zéland) modellszámításokat végzett, amelyben a régi és az új modell által jósolt K^+ - és Na^+ -koncentrációkat számította a primer nyálra vonatkozóan, modellezte továbbá a paracelluláris Na^+ -transzport által generált áram nagyságát, valamint a nyálszekréció intenzitását (Almássy et al., 2018). Minden esetben az új modell alapján végzett számítások jobban közelítették a méréssel meghatározott értékeket, mint a régi modell alapján készült kalkuláció. Megállapíthatjuk tehát, hogy az általunk javasolt új modell az eddigieknél pontosabban írja le a nyálszekréció során bekövetkező eseményeket.

Összefoglalás

A PhD munkám két részre tagolódik: az első részében különböző klorokrezol sztereoizomerek vázizom típusú rianodin receptorra (RyR1) gyakorolt hatását vizsgáltam azzal a céllal, hogy közöttük megtaláljam a legspecifikusabb RyR1 agonistát, ami kísérletekben a koffein alternatívájaként szolgálhat. A másik részében Ca^{2+} -függő ioncsatornák plazma membránban való elhelyezkedését vizsgáltam parotis acinus sejtekben.

A klorokrezolok Ca^{2+} felszabadulásra gyakorolt hatásának vizsgálata során a leghatásosabbnak a 4-chloro-orto-cresol (4-COC) ($\text{EC}_{50}=55\pm 14\ \mu\text{M}$), bár a 3-chloro-para-cresol (3-CPC) hatékonyabb volt, mivel több Ca^{2+} -t volt képes felszabadítani a vázizom HSR vezikulákból. A 3-CPC stimulálta a SERCA hidrolitikus aktivitását ($\text{EC}_{50}=91\pm 17\ \mu\text{M}$), míg a 4-COC a SERCA aktivitást csak millimólos koncentrációban gátolta ($\text{IC}_{50}=1370\pm 88\ \mu\text{M}$). A 4-chloro-meta-cresol (4-CMC) is gátolta a SERCA pumpát ($\text{IC}_{50}=167\pm 8\ \mu\text{M}$), ami azt jelenti, hogy a 4-CMC nem specifikus RyR agonista, mivel a RyR-t is hasonló koncentrációban aktiválta ($\text{EC}_{50}=121\pm 20\ \mu\text{M}$). Eredményeink szerint a 4-COC kísérletes alkalmazása a 4-CMC-től kedvezőbb olyan kísérletekben, ahol a cél Ca^{2+} -felszabadulás kiváltása a SERCA befolyásolása nélkül.

Munkám másik felében a teljes-sejtes árammérés, intracelluláris Ca^{2+} koncentráció mérés együttes alkalmazásával kimutattuk, hogy az apikális membrán mellett, fotolabilis Ca^{2+} kelátorból történő lokális Ca^{2+} felszabadítás a K^{+} és Cl^{-} -áramok jelentős megemelkedését okozta, ami arra utal, hogy a parotis stimulációjakor jelentős mennyiségű K^{+} szekretálódik az acinus lumenébe. Ugyanakkor a primer nyál K^{+} tartalma alacsony, ami arra utal, hogy a K^{+} az apikális membránon keresztül reabszorbeálódik. Ezért megvizsgáltuk a Na^{+} - K^{+} pumpák elhelyezkedését is és kimutattuk, hogy a pumpafehérjék a teljes plazma membránban (beleértve az apikális membránt is) egyenletesen oszlanak meg. Adataink felhasználásával egy új nyálszekréciós modellt alkottunk, amiben a Na^{+} - K^{+} pumpák K^{+} -t reabszorbeálnak a lumenből, miközben Na^{+} -t szekretálnak, ami részben kiváltja a hagyományos paracelluláris Na^{+} szekréciós útvonalat.

Irodalomjegyzék

- Allen and Westerblad, *J Physiol.*, 487 (1995) pp. 33-42.
- Almássy et al., *Pflügers Archiv Eur J Physiol.* 470 (2018) 613-621.
- Almassy et al. *J Gen Physiol.* 139 (2012) pp. 121-133.
- Almassy and Yule, *Cold Spring Harb Protoc.* (2013) <https://doi.org/10.1101/pdb.prot072769>
- Al-Mousa and Michelangeli, *Pharmacol Rep.* 61 (2009) pp. 838-842.
- Ambudkar, *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine.* 11 (2000) pp. 4-25.
- Begenisich and Melvin, *J Membr Biol.* 163 (1998) pp. 77-85.
- Baum, *Ann NY Acad Sci.* 694 (1993) pp. 17-23.
- Bootman et al., *Semin Cell Dev Biol.* 12 (2001) pp. 3-10.
- Bundgaard et al., *J Physiol.* 273 (1977) pp. 339-353.
- Catalán et al., *J Med Invest.* 56 (2009) Suppl pp. 192-196.
- Clapham, *Cell* 80 (1995) pp. 259-268.
- Conteas et al., *Am J Phys.* 250 (1986) pp. 430-441.
- Cook et al., *Physiology of the gastrointestinal tract.* 3rd ed. Johnson (1994)
- Endo, *Proc Jpn Acad.* 51 (1975) pp. 479-484.
- Evans et al., *J Biol Chem.* 275 (2000) pp. 26720-26726.
- Fryer and Neering, *J Physiol.*, 416 (1989) pp. 435-454.
- Garrett et al., *Front Oral Biol Basel, Karger.* 10 (1998) pp. 55-72.
- Garrett et al., *Arch Oral Biol.* 37 (1992) pp. 711-716.
- Herrmann-Frank et al., *Biochim Biophys Acta.* 1289 (1996) pp. 31-40.
- Hermann-Frank et al., *J Muscle Res Cell Mot.* 20 (1999) pp. 223-237.
- Hirose et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 194 (1993) pp. 726-732.
- Islam et al., *Biochem J.* 306 (1995) pp. 679-686.
- Iwatsuki et al., *Jpn J Physiol.* 35 (1985) pp. 933-944.
- Iwano et al., *J Histochem Cytochem.* 35 (1987) pp. 871-879.
- Jóna et al., *Pflugers Arch.* 441 (2001) pp. 729-738.
- Kasai et al., *Cell.* 74 (1993) pp. 669-677.
- Larina and Thorn, *J Cell Sci.* 118 (2005) pp. 4131-4139.
- Mangos et al. *Am J Phys.* 225 (1973) pp. 450-455.
- Mangos et al., *Am J Phys.* 225 (1973) pp. 18-24.
- Martinez and Cassity, *Am J Phys.* 245 (1983) pp. 711-716.
- Maruyama et al., *Jpn J Physiol.* 36 (1986) pp. 219-223.
- Maruyama et al., *Nature.* 302 (1983) pp. 827-829.
- Meissner, *Annu. Rev. Physiol.* 56 (1994) pp. 485-508.
- Melvin, et al., *Annu Rev Physiol.* 67 (2005) pp. 445-469.
- Nakagaki et al., *J Histochem Cytochem.* 26 (1978) pp. 835-845.
- Nakamoto et al., *Am J Physiol. Regul Integr Comp Physiol.* 292 (2007) pp. 2380-2390.
- Nehrke et al., *Am J Physiol Cell Physiol.* 284 (2003) pp. 535-546.
- Novak and Young, *Pflugers Arch.* 407 (1986) pp. 649-656.
- Palk et al., *J Theor Biol.* 266 (2010) pp. 625-640.
- Petersen, *J Physiol.* 448 (1992) pp. 1-51.
- Petersen, *Oral physiology: proceedings of the international symposium held in Wenner-Gren center* (edited by: Nils Emmelin, Yngve Zotterman) Pergamon Press Ltd. (1971) 21-31.
- Petersen and Gallacher, *Annu Rev Physiol.* 50 (1988) pp. 65-80.
- Petersen and Poulsen, *Acta Physiol Scand.* 71 (1967) pp. 194-202.
- Poulsen, *Pflugers Arch.* 349 (1974) pp. 215-220.
- Romanenko et al. *Channels (Austin).* 4 (2010) pp. 278-288.
- Romanenko et al. *J Physiol.* 581 (2007) pp. 801-817.
- Romanenko et al., *J Biol Chem.* 285 (2010) pp. 12990-13001.
- Rousseau et al., *Am J Physiol.* 253 (1987) pp. 364-368.
- Sárközi et al., *J Muscle Res Cell Motil.* 21 (2000) pp. 131-138.

Sárközi et al., J Muscle Res Cell Motil. 28 (2007) pp. 167-174.
 Silva et al., Am J Phys. 233 (1977) 298-306.
 Smith et al., J Gen Physiol. 88 (1986) pp. 573-588.
 Szigeti et al., Pflugers Arch. 455 (2007) pp. 541-553.
 Tegazzin et al. Anesthesiology. 84 (1996) pp. 1380-1385.
 Thompson and Begenisich, J Gen Physiol. 127 (2006) pp. 159-169.
 Tsukita et al., Nat Rev Mol Cell Biol. 2 (2001) pp. 285-293.
 Yang et al., Nature. 455 (2008) pp. 1210-1215.
 Westerblad et al., Cell Calcium. 24 (1998) pp. 105-115.
 Wendt and Stephenson, Pflugers Arch. 398 (1983) pp. 210-216.
 Winston et al., J Histochem Cytochem. 36 (1988) pp. 1139-1145.
 Winston et al., J Histochem Cytochem. 38 (1990) pp. 1187-1191.
 Zahradník and Palade, Pflugers Arch. 424 (1993) pp. 129-136.
 Zorzato et al., Mol Pharmacol. 44 (1993) pp. 1192-1201.
 Zucchi and Ronca-Testoni, Pharmacol. Rev. 49, (1997) pp. 1-51.



Nyilvántartási szám: DEENK/104/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Skaliczki Marianna

Doktori Iskola: Fogorvostudományi Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **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
2. Almássy, J., Siguenza, E., **Skaliczki, M.**, Matesz, K., Sneyd, J., Yule, D. I., Nánási, P. P.: New saliva secretion model based on the expression of Na⁺-K⁺ pump and K⁺ channels in the apical membrane of parotid acinar cells. *Pflugers Arch.* 470 (4), 613-621, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-018-2109-0>
IF: 3.377





További közlemények

3. Almásy, J., Diszházi, G., **Skaliczki, M.**, Márton, I., Magyar, Z. É., Nánási, P. P., Yule, D. I.:
Expression of BK channels and Na⁺-K⁺ 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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 22,53

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
10,194**

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, 2022.03.03.

