

(PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Kalcium függő ioncsatornák szerepe szekretoros epitésejtek működésében

Dr. Diszházi Gyula

Témavezető: Dr. Almássy János



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

KALCIUM FÜGGŐ IONCSATORNÁK SZEREPE SZEKRETOROS EPITÉLSEJTEK MŰKÖDÉSÉBEN

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

Írta: Dr. Diszházi Gyula okleveles gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskolája
(Élettan és neurobiológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Almássy János, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Varga Zoltán, MTA doktora
Dr. Bartók Ádám, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Virág László, MTA doktora
tagok: Dr. Szöllősi András, PhD
Dr. Gesztelyi Rudolf, PhD

Az értekezés védésének (online formátumban) időpontja: 2022. június 21. 11:00 óra.

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben részt kíván venni, úgy jelezze a diszhazi.gyula@med.unideb.hu e-mail címre küldött üzenetben a vitát megelőző nap (2022. június 20.) 16 óráig. A határidő lejártát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

KALCIUM FÜGGŐ IONCSATORNÁK SZEREPE SZEKRETOROS EPITÉLSEJTEK MŰKÖDÉSÉBEN	2
I. Bevezetés.....	1
II. Előzmények és célkitűzés	3
II/1. A könny szekréciónak modell újragondolása	3
II/2. A TRPM4, a membrán potenciál és a Ca ²⁺ beáramlás közötti kapcsoló	4
III. Metodikák	5
III/1. Acinus sejt izolálás	5
III/2. A könnymirigy acinus sejteken végzett villanófény-fotolízis, elektrofiziológiai és Ca ²⁺ -imaging mérések	6
III/3. A hasnyálmirigy acinus sejteken végzett elektrofiziológiai és Ca ²⁺ -imaging mérések	8
III/4. Immuncitokémia	10
III/5. Statisztikai kiértékelés	11
III/6. RNS izolálás, reverz transzkripció és kvantitatív real-time PCR	11
V. Eredmények.....	12
IV/1. Könnymirigy acinus sejten végzett kísérletek eredményei.....	12
IV/1.1 Térben limitált villanófény-fotolízis, Ca ²⁺ -imaging és elektrofiziológiai mérések.....	12
IV/1.2 Immuncitokémia	14
IV/2. Hasnyálmirigy acinus sejten végzett kísérletek eredményei.....	15
IV/2.1 QPCR kísérletek.....	15
IV/2.2 Elektrofiziológiai mérések.....	16
IV/2.3 Ca ²⁺ -imaging mérések.....	17
V. Megbeszélés	20
VI. Összefoglalás	25

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

Az elsődleges hasnyálmirigy-sekrétum kiválasztásában jelentős szerepe van a hasnyálmirigy acinus sejt $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -jának, ezért célunk az acinus sejtek 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 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 Ca^{2+} hajtóereje lecsökken, így alacsonyabb lesz a beáramló Ca^{2+} mennyisége. Kísérleteink során

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

II. Előzmények és célkitűzés

II/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 szekrétió jelentős hányadát a könny mirigy acinus sejtjei termelik, így ezen sejtek szekréciós mechanizmusának ismerete a kórfolyamat megértése szempontjából nagyon fontos.

Az elsődleges folyadékszékreció az egyirányú só- és víztranszporttal valósul meg az egyrétegű szekretoros epitelsejteken 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. A Cl^- -kiáramlás a nyugalmi membránpotenciált (~ -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. A hosszan tartó Cl^- -szekreció fenntartásában a lumenbe 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 lumenbe irányuló Cl^- -hajtóerőt. Azonban a szekreció 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^+ reabszorpció folyamatot feltételez az acinus sejt lumenbe fordított membránjában. Azonban az ellentmondás alternatív feloldása az is lehet, hogy a korábbi megfigyelések ellenére a lumenbe fordított membránban mégsem helyezkednek el Ca^{2+} -függő K^+ -csatornák, így az alacsony lumenbe fordított K^+ koncentráció oka a transzcitoplazmális K^+ szekreció hiánya, vagy alacsony volta lenne.

Kutatócsoportunk egyik célja az volt, hogy teljes sejtes 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.

II/2. A TRPM4, a membrán potenciál és a Ca^{2+} beáramlás közötti kapcsoló

Kutatásunk másik célkitűzése az volt, hogy olyan potenciális mechanizmusokat találjunk, amelyek a Ca^{2+} -túltöltődés ellen védhetik a hasnyálmirigy acinus sejtet. 2002-ben már Pierre Launay és mtsai. TRPM4 overexpresszált HEK293 sejteken végzett Ca^{2+} -méréseik alapján azt javasolták, hogy a TRPM4 szerepet játszhat a Ca^{2+} hajtóerő csökkentésében a SOCE aktiválódásakor, és feltételezték, hogy egymáshoz közel helyezkedik el a TRPM4 és a SOCE csatorna. A hasnyálmirigy-gyulladás kórfolyamatában az acinus sejtek Ca^{2+} -raktára olyan mértékben ürül, amely erőteljes SOCE aktivációt okoz, így az érdeklődésünk középpontjába került a TRPM4 csatorna, mint potenciális Ca^{2+} -túltöltődés elleni védő mechanizmus. Mivel az egér hasnyálmirigy acinus sejteken végzett QPCR alapján magas expressziós szintű, az IP_3 receptorhoz hasonló mennyiségű TRPM4-et kódoló mRNS volt detektálható, elkezdtük hipotézisünk kidolgozását. Elméletünk szerint a megemelkedett $[Ca^{2+}]_i$ aktiválja a TRPM4 csatornát, Na^+ áramlik a sejtbe, depolarizálva azt. Bár a csatorna Na^+ és K^+ átteresztő képessége közel azonos, mégis a hajtóerő viszonyok a Na^+ -beáramlásnak kedveznek, mivel a nyugalmi membránpotenciálnál az elektrokémiai hajtóerő Na^+ -ra nagyobb, mint a K^+ -ra. Ha a membrán potenciál pozitívabb (de még mindig negatív) értékre tolódik a Na^+ -beáramlás miatt, úgy az időközben ürülő raktárak hatására aktiválódott Ca^{2+} beáramlás hajtóereje alacsonyabb lesz, így lassítva a Ca^{2+} -beáramlást és csökkentve a bejutó Ca^{2+} mennyiségét. Elméletünket az $[Ca^{2+}]_i$ mikrofluorimetriás követésével ellenőriztük.

III. Metodikák

III/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, mind az Animal Welfare Committee of the University of Rochester által jóvá lett hagyva.

Acinus sejtek izolálása egér könnymirigyből

A könnymirigy acinus sejtek enzimatisus emésztéssel kerültek szétválasztásra. Az enzimeket SMEM (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA) tápoldatban oldottuk fel. A 3-4 hónapos egerek cervikális diszlokációját követően a könnymirigyet azonnal kivettük, finomra aprítottuk sebészi ollóval, 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 inhibitor 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% O₂, 5% CO₂) 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 enzimatisus 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 CO₂ altatást követő cervikális diszlokációja után a hasnyálmirigyet 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% O₂, 5% CO₂) 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 Ca²⁺-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, melyben 10 percig 100 U/ml Collagenase P tartalmú Ca²⁺ és Mg²⁺-mentes PBS-ben emésztettük tovább a sejtcsoportokat és a végén 5 ml-es szerológiai pipettával széteszteltük őket.

III/2. A könnymirigy acinus sejteken végzett villanófény-fotolízis, elektrofiziológiai és Ca²⁺-imaging mérések

A könnymirigy acinus sejtek esetében egy kombinált metodikát alkalmaztunk, melyben az acinus sejtek [Ca²⁺]_i-jának emelkedését villanó UV-fénnyel indukáltuk (NP-EGTA segítségével), melyet Ca²⁺-imaging módszerrel követtünk és ezzel párhuzamosan a Ca²⁺-aktiválta K⁺- vagy Cl⁻-áramokat mértük.

A teljes sejt áramot Digidata 1322A analóg-digitál átalakító (Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA) által vezérelt Axopatch 200A 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 üvegapillárisokból (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⁺-áramot mértünk, +40 mV-on, míg ha Cl⁻-áramot mértünk, -20 mV-on rögzítettük a feszültséget. A pipetta oldat (intracelluláris oldat) a következő összetételű volt: 135 mM K⁺-glutamate, 10 mM HEPES, 10 mM NP-EGTA, 2 mM CaCl₂, 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 Ca²⁺-függő áramokat. A

K⁺-áram mérését alacsony Cl⁻-tartalmú oldatban végeztük, mely az alábbi összetételű volt: 135 mM Na⁺-glutamát, 5 mM K⁺-glutamát, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, és 10 mM HEPES, pH=7,2. A Cl⁻-áram mérésekor a 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 Ca²⁺-érzékeny festék monitorozását egy monokromátor-alapú leképező rendszerrel (Polychrome IV) és egy nagy sebességű CCD kamerával (mindkét eszköz TILL Photonics gyártmányú) végeztük. A sejtek 488 nm hullámhosszon voltak megvilágítva, majd a fluoreszcencia 525 nm-es sávszűrőn keresztül volt gyűjtve. 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 $\Delta F/F_0 = (F - F_0)/F_0$ formulával ábrázoltuk, ahol az F a felvett fluoreszcencia és az F₀ a képsorozat első 10 képének fluoreszcenciájának átlaga (alapvonal). A képek 4096 árnyalatú (16 bit) szürke szintezettséget kaptak, amelyeket utólag szivárványskála színezéssel láttuk el, ahol a hideg színek alacsony, míg az egyre melegebb színek magasabb [Ca²⁺]-nak felelnek meg. A villanófény-fotolízishez 375 nm hullámhosszú (UV) lézer diódát (maximális kimenet 18 mW, 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-immerziós objektívvel (NIKON) fókuszáltuk a tárgyasztalra. A lézerpont kiterjedése a félmaximum értéknél 0,7 μm volt x és y irányban, illetve 2,0 μm 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 Ca²⁺-puffer a nitrofenil-EGTA (NP-EGTA) volt, amely fotolabilisen köti a Ca²⁺-ot, emiatt UV-villanófény segítségével az általa kötött Ca²⁺ egy része felszabadítható. A lézert a megfelelő plazmamembrán szakasz közelébe irányítva az adott térrészre korlátozott Ca²⁺-jel alakítható ki. Fontos a megfelelő puffer - Ca²⁺ arány, hogy ne alakuljon ki az egész sejtre tovaterjedő Ca²⁺-jel, amelyet a mi mérési elrendezésünkben 10 mM NP-EGTA és 2 mM Ca²⁺ alkalmazásával tudunk elérni.

III/3. A hasnyálmirigy acinus sejteken végzett elektrofiziológiai és Ca^{2+} -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) kaptuk meg. A boroszilikát üvegapillárisokból (Warner Instruments, Hamden, CT) horizontális húzóval 5-7 M Ω ellenállású pipettákat készítettünk. Az intra- és extracelluláris oldatok összetételétől függően TRPM4 vagy TMEM16a csatornán átfolyó áramot mértünk. A TRPM4 áram méréséhez -100 és +120 mV közötti feszültség rámpa protokollt használtunk, míg a Cl⁻-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 MgCl₂, 100 μ M EGTA, 48,6 μ M CaCl₂ (100 nM ionozált Ca²⁺), 10 mM HEPES, 3 mM ATP, pH: 7,3. Az extracelluláris odatösszetétele az alábbi volt: 140 mM Na-glutamát, 4 mM CsCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH: 7,4.

A Ca²⁺-függő Cl⁻-áram mérésekor a pipettaoldat összetétele a következő volt: 100 mM NMDG-Cl, 1 mM MgCl₂, 1,72 mM CaCl₂, 2 mM EGTA (1 μ M ionozált Ca²⁺), 10 mM HEPES, pH= 7,2. Az extracelluláris odatösszetétele pedig a következő összetételű volt: 140 mM NMDG-Cl, 1 mM MgCl₂, 5 mM glucose, 10 mM HEPES, pH= 7,3.

Membránpotenciál mérések

A patch-clamp mérőrendszer áram-zár (current-clamp) mérési módját alkalmazva mértük az acinus sejtek membránpotenciálját. 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 metódus 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 Na^+ , K^+ , Cl^-) a hajtóerőnek megfelelően szabadon áramolhatnak, viszont a kétértékű ionok (Például Ca^{2+}) és a glükóz nagyságú vagy annál nagyobb töltés nélküli molekulák nem tudnak átjutni azokon. 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 MgCl_2 , 100 μM EGTA, 48,6 μM CaCl_2 , 10 mM HEPES, 300 $\mu\text{g/ml}$ Amphotericin B, pH: 7,3. Extracelluláris oldatként normál Tyrode oldatot használtunk, melynek összetétele: 144 mM NaCl, 5,5 mM KCl, 2,5 mM CaCl_2 , 1,2 mM MgCl_2 , 8,3 mM Glükóz, 5 mM Tris-HCl puffer, pH: 7,4.

Ca²⁺-imaging

A hasnyálmirigy acinus sejteket üveg edénybe (Ibidi) pipettáztuk, ahol 10 percig hagytuk, hogy letapadjanak. A sejtek normál Tyrode oldattal voltak perfundálva, melynek összetétele: 144 mM NaCl, 5,5 mM KCl, 2,5 mM CaCl_2 , 1,2 mM MgCl_2 , 8,3 mM Glükóz és 5 mM Tris-HCl puffer, pH: 7,4. Amennyiben a mérési protokollban Ca^{2+} -mentes normál Tyrode oldatot alkalmaztunk, abban az esetben 0,5 mM EGTA-t tartalmazott az oldat. A Ca^{2+} -imaging mérésekhez Fura-8-AM (AAT Bioquest) ráciometrikus Ca^{2+} -érzékeny festéket használtunk, amelynek 2 μM koncentrációjú oldatában 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten az acinus sejtcsoportokat. Ez idő alatt a festék zsíroldékony acetoximetil-észter (AM) formája bejut a sejtbe és az intracelluláris térben található észterázok lebontják azt, így csapdázva a festéket a sejtben. Amennyiben megfelelően töltődik a sejt festékekkel, abban az esetben a sejt egészséges, élettani tulajdonságait megtartotta. A ráciometrikus festékek előnyös tulajdonsága, hogy két, különböző excitációs hullámhosszon nyert emissziós intenzitásérték arányát feleltetjük meg a Ca^{2+} -koncentrációnak, ezért nem kell számolni az eltérő festéktöltődésből eredő hibával. A Fura-8-AM excitációját 1 Hz-es frekvenciával, FuraLed 365 és 405 nm-es fényforrással (Cairn Research Ltd, Faversham, UK) végeztük, a fluoreszcensen kibocsátott fényt pedig egy 520 nm fölötti

hullámhossztartományban 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 leképező rendszert egy illesztőegységen keresztül irányítottuk Micromanager szoftver segítségével. A fluoreszcens adatokat Image J szoftverrel és Fiji kiegészítővel értékeltük ki. 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 mean) formában mutatunk. Az ábrán az esetszámok a Ca^{2+} -imaging adatok esetén $n = \text{kísérleti állatok száma} / \text{kísérletek száma} / \text{kiértékelt sejtek száma}$, míg a patch-clamp adatoknál $n = \text{kiértékelt sejtek száma}$ formában vannak feltüntetve.

III/4. Immuncitokémia

A könnymirigyek acinus sejteket izolálást követően 15 percig jéghideg metanolban fixáltuk. Ugyanazt a Na^+ - K^+ ATP-áz ellenes nyúl monoklonális antitestet (Abcam, Cambridge, UK, ref. szám ab76020) alkalmaztuk, emellett occludin antitest (Novus, NBP1-87402) jelölést is használtunk, mely szintén egy nyúlban termelt monoklonális antitest, melyeket rendre 1:250 és 1:100 arányú hígításban adtuk a sejtekhez. Az ezt követő lépésben teszteltük az elsődleges antitestek kötődésének mértékét a DyLight 488 lóban termelt nyúl elleni másodlagos antitesttel (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA). 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 lézerrel volt szerelve.

III/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 kiértékelést Student-féle T-próba és ANOVA tesztekkel végeztük. Az érintett mintákat összetartozómintás varianciavizsgálattal értékeltük és Bonferroni-teszttel korrigálva vizsgáltuk a páronkénti átlagok különbségét. Annak megállapítása érdekében, hogy jelentős különbség van-e a vizsgált és a kontroll értékek között, 5%-os szignifikancia szintet alkalmazva hasonlítottuk össze az adatokat ($p < 0.05$).

III/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 kivitelezte, majd a nyert RNS 1 μ 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 Δ CT módszerrel.

V. Eredmények

IV/1. Könnymirigy acinus sejten végzett kísérletek eredményei

IV/1.1 Térben limitált villanófény-fotolízis, Ca^{2+} -imaging és elektrofiziológiai mérések

Annak érdekében, hogy a Ca^{2+} -aktivált K^+ -csatornák plazmamembránban való elhelyezkedését meghatározhassuk, villanófény-fotolízissel olyan rövid életidejű Ca^{2+} -jeleket alakítottunk ki, amely sejtnek vagy a 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 Ca^{2+} ionnal 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 sejt részre essen. Az intracelluláris Fluo-4 fluoreszcencia intenzitása alapján látható, hogy a csapdázott Ca^{2+} villanófény-fotolízise térben jól elkülönülő, helyi Ca^{2+} -jelet adott.

A villanófény-fotolízis kivitelezéséhez 10 mM NP-EGTA és 2 mM 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 Ca^{2+} -jel hozható létre ilyen körülmények között, anélkül, hogy a sejtben jelentősen tovaterjedne. Amikor a lézerpontot az apikális membránrégió közelébe fókuszáltuk (a régiót a granulomok elhelyezkedéséből azonosítottuk), az átlagos fluoreszcencia emelkedés $5,26 \pm 0,76$ -szor nagyobb volt az alapvonalhoz képest. Minden egyes mérés térbeli kiterjedésének elemzése az apikális membrántól a sejt bazális membránjáig futó vonalon történt. 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. 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 vizsgálata volt, hogy az apikális membránban vannak-e funkcionális K^+ -csatornák. Ennek vizsgálatára a villanófény-fotolízist és a Ca^{2+} -függő K^+ - és Cl^- -csatornák áramának teljes sejt konfigurációjú árammérésével kombináltuk. Az apikális membránt a granuláris régió segítségével ismertük fel, és a Ca^{2+} -függő Cl^- -áram jelenlétével azonosítottuk, mivel a Cl^- -csatornák kizárólag az apikális membránban találhatóak meg. Az adatokat kis sejtcsoportokból gyűjtöttük (2-3 sejt). A kiválasztott sejtcsoport középső sejtjébe olyan patch pipettával törtünk be, amely Fluo-4 Ca^{2+} -érzékeny festéket és csapdázott Ca^{2+} -ot tartalmazott. A K^+ -áram és a Fluo-4 fluoreszcencia párhuzamos rögzítése az anyagok és módszerek részben leírtak szerint történt. Az UV lézert az apikális membrán közelébe pozícionáltunk, majd az áram felvételének indítását 1,05 másodperccel követően történt az 50 ms időtartamú lézer megvilágítás. Eredményeink egyértelműen mutatják, hogy a villanófényt követően az apikális oldalon egy nagyjából 250 ms ideig tartó $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedés tapasztalható, míg a bazális oldalon a fluoreszcencia intenzitás nem változott. A teljes sejt áramméréseink jelentős K^+ -áram növekedést mutatnak a helyi Ca^{2+} -jel eredményeképpen. A mérések alapvonala 0,5 nA kiindulási K^+ -áramot jelez, amely a +40 mV-on rögzített membránpotenciálból következik, ugyanis ilyen feszültség hatására a Ca^{2+} -függő 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 K^+ -áram növekedés is. A K^+ -áram mérést követően a Na^+ - és K^+ -glutamát alapú extracelluláris oldatot 140 mM TEA-Cl tartalmú oldatra cseréltük, amely gátolta a K^+ -áramot, de elegendő Cl^- -ot biztosított az intracelluláris térbe irányuló (outward) Cl^- -áram méréshez. Ebben az oldatban, azonos pontba fókuszált villanófény-fotolízis hatására jelentős Cl^- -áramot mértünk, ami arra utal, hogy a lézerral valóban az apikális oldalt céloztuk. Az említett megfigyelések egybehangzóak voltak mind a 15 vizsgált sejt esetén.

Ezt követően ugyanezzel a kísérleti elrendezéssel teszteltük a bazális membránrégió K^+ - és a Cl^- -áramait. Morfológiailag a retikuláris szerkezet, míg funkcionálisan a Ca^{2+} -függő Cl^- -áram hiánya segített a membránszakasz

azonosításában. Bár ezeknél a méréseknél némiképp nagyobb $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés volt mérhető, mégsem aktiválódott sem a K^+ -áram, sem a Cl^- -áram.

Ezek az adatok azt igazolják, hogy az egér könnyimirigy acinus sejtekben a Ca^{2+} -függő Cl^- -csatornával azonos membránszakaszban, a sejt apikális régiójában fejeződik ki a BK csatorna. Ez az eredmény nagy segítséget jelent a könnyimirigy szekréción mechanizmusának pontosabb megértésében.

V/1.2 Immuncitokémia

A K^+ -csatornák apikális elhelyezkedése jelentős K^+ -szekréción feltételez az acinus sejtek szekréción aktiválása során, amely felveti a kérdést, hogy ennek ellenére miért lehet a könny viszonylag alacsony K^+ tartalmú. A mi feltételezésünk, hogy ez az ellentmondás az acinus lumenből történő K^+ -visszavétellel magyarázható. A hipotézisünkben szereplő, reabszorpcióért felelős K^+ -transzporter működése nem depolarizáló, hogy az agonista stimuláció alatt a membránpotenciál hiperpolarizált maradjon. Emiatt a legjobban a Na^+-K^+ pumpa illeszkedik be a modellünkbe, mint K^+ -visszavételi mechanizmus. Ennek tesztelésére az anyagok és módszerek fejeztben leírtak szerint végeztük a frissen izolált acinus sejt csoportokon a Na^+-K^+ pumpák immunfestését. Figyelemre méltó, hogy a Na^+-K^+ pumpa egyenletesen helyezkedik el a teljes membránfelszínen, beleértve az apikális membránszakaszt. Az immunfestés eredménye megerősíti a hipotézisünket, mely szerint az acinus lumenéből, az apikális membránon keresztül a Na^+-K^+ pumpa végzheti a K^+ -visszavételt.

Az apikálisan elhelyezkedő Na^+-K^+ pumpa funkcionális jelentőségét nagyban meghatározza az apikális membránszakasz aránya a teljes membránfelülethez viszonyítva. Az apikális membrán fedettségének becslése céljából az apiko-bazális határvonalat jelentő tight-junction fehérjét, az occludint immunfestéssel tettük láthatóvá. Az occludint az ellene termeltetett antitesttel jelöltük, majd DyLight488 másodlagos antitesttel teszteltük a kötődött elsődleges antitestet. Az immunfestés eredménye szerint az apikális membrán jelentős nagyságú, a teljes membránszakasz ~30%-ának megfelelő felületű. Ez alapján azt feltételezzük, hogy az apikális membránnak, és az abban elhelyezkedő Na^+-K^+ pumpáinak a nagy membrán-kiterjedés és a bazális membránnal megegyező pumpasűrűség miatt igen meghatározó szerepe van az elsődleges könny szekrétum összetételének kialakításában.

IV/2. Hasnyálmirigy acinus sejten végzett kísérletek eredményei

IV/2.1 QPCR kísérletek

Először reverz transzkriptáz kvantitatív polimeráz láncreakciót (RT-qPCR) végeztünk, melyhez egér hasnyálmirigy lizátumot használtunk, és a két Ca^{2+} -függő kation csatorna típus (TRPM4 és TRPM5) DNS primerjét. Ezzel párhuzamosan az IP_3R 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. Az IP_3R 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 IP_3R jelentős, míg a RyR csak kiegészítő szerepet játszik a hasnyálmirigy acinus sejt Ca^{2+} -szignalizációjában. A TRPM4 kifejeződési szintje összevethető az IP_3 receptorokéval, és mintegy tízszer magasabb, mint TRPC3 csatornáé, mely az acinus sejtek SOCE mechanizmusért felelős egyik 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.

IV/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 Cl⁻ nagy részét lecseréltük glutamátra, ezáltal elkerülhető volt a Cl⁻-áram megjelenése, míg a pipetta oldatban a K⁺-ot Cs⁺-mal helyettesítettük, így gátolva a K⁺-áramot. A -60 mV-tól +120 mV-ig futó rámpa feszültség protokoll futtatásakor kontroll körülmények között egy inward kation áram figyelhető meg, enyhe feszültség-függést mutatva a pozitív feszültség tartományban. Amikor ugyanazt a sejtet a SERCA pumpa specifikus gátlószerevel, a CPA-val kezeltük, az áram szignifikánsan megnőtt. A CPA alkalmazása egy gyakran használt módszer az [Ca²⁺]_i növelésére, mivel gátolja a SERCA pumpa által végzett Ca²⁺-visszavételt az ER-be, amely nyugalomban az ER-ből történő Ca²⁺-csorgást kompenzálja, ezért az [Ca²⁺]_i emelkedését okozza. Továbbá azért is előnyös erre a célra a CPA használata a szekretagóg aktiváló anyagokkal szemben, mert a [Ca²⁺]_i növelése mellett megőrzi a plazma PIP₂ tartalmát is, ezzel a TRPM4 működéséhez szükséges PIP₂ 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 gátlószert, a 9-Phenanthrol 100 μM koncentrációjú oldatának perfúzióját, amely teljesen legátolta az áramot. Sajnos a 9-Phenanthrol alacsony specificitású, a TRPM4 csatorna mellett a Ca²⁺-függő Cl⁻-csatornát is gátolja, és mivel mind a két említett csatorna árama depolarizáló hatású, a hasnyálmirigy acinus sejteken tervezett kísérleteink kivitelezéséhez (fiziológiás sóoldatban) a 9-Phenanthrolt nem tudjuk TRPM4 gátlószerként alkalmazni. Annak érdekében, hogy ne fedhesse el más csatorna árama a TRPM4 áram okozta depolarizációt, egy másik, sokkal specifikusabb TRPM4 gátlószert szükséges. Reményeink szerint egy nemrégiben szelektált molekula, a CBA alkalmas lesz a további kísérleteinkhez. A CBA 10 μM koncentrációban 100 μM 9-Phenanthrolhoz hasonló hatásossággal gátolta a TRPM4 áramot.

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

Membránpotenciál mérések

A TRPM4 áram membránpotenciálra 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 membránpotenciál 30 μ M CPA kezelés hatására lassan emelkedni kezdett, míg elérte a $-27,70 \pm 2,99$ mV-os (n=5) egyensúlyi feszültségértéket. Ezt követően 10 μ 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) feszültségértékre.

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

IV/2.3 Ca^{2+} -imaging mérések

Annak igazolására, hogy a TRPM4 áram okozta depolarizáció valóban csökkenti a Ca^{2+} -beáramlás hajtóerejét, hasnyálmirigy acinus sejtcsoportokon $[\text{Ca}^{2+}]_i$ méréseket végeztünk ráciometrikus, fluorescens mikroszkópos eljárással. Hosszú ideig tartó, alacsony koncentrációjú (10 pM) cerulein kezeléssel stimuláltuk a sejteket. A cerulein élettanilag fontos szekretatog, a CCK-val egyenértékű hatású peptid. Kísérleteinket 2,5 mM Ca^{2+} -ot tartalmazó és Ca^{2+} mentes extracelluláris oldatban is elvégezzük kontroll és TRPM4 KO sejteken egyaránt. A folyamatos 10 pM cerulein kezelés a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ szabályszerű oszcillációját eredményezte minden csoportban, amely arra utal, hogy a sejtek az izolálás után is megtartották a fiziológiás válaszkészségüket. A görbék kiértékelésekor a cerulein kezelés 500-600 másodperce között kialakuló

Ca²⁺-tűskét vizsgáltuk. Azért választottuk ezt az időablakot, mert ennyi idő után várhatóan az extracelluláris térből beáramló Ca²⁺ is részt vesz a Ca²⁺-jel kialakításában. A Ca²⁺-tartalmú és a Ca²⁺-mentes oldatban mért tűskék átlagos amplitudója a kontroll 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 Ca²⁺-tartalmú oldatban jelentősen magasabb volt ($\Delta R_{500-600\text{ s}}$: $0,087 \pm 0,004$ és $0,140 \pm 0,011$). Az adatok alapján 500 másodperces cerulein kezelést követően a TRPM4 KO sejtekben szignifikáns Ca²⁺-beáramlás van jelen, amely a TRPM4 csatornát tartalmazó kontroll sejtekben nem tapasztalható. Emellett fontos, hogy a kontroll és a TRPM4 KO sejtek Ca²⁺-mentes oldatban mérhető tűskéinek átlagos amplitudója lényegében azonos nagyságú volt, amely arra utal, hogy a kezelés végére az ER Ca²⁺-tartalma hasonló volt a két sejtípusban. A görbe alatti terület (AUC – area under curve; ez esetben az 500-600 másodperc között kialakult Ca²⁺-tüske alatti terület, amely arányos az intracelluláris tér össz Ca²⁺-szintjével az adott időben) az amplitudóhoz hasonló szabályszerűséget követett, de a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns. A Ca²⁺-tűskék hasonló frekvenciával ismétlődtek a kontroll és a TRPM4 KO acinus sejtekben. Összefoglalva, a Ca²⁺-tartalmú extracelluláris oldatban a kontroll és a TRPM4 KO acinus sejtek Ca²⁺-jelében mérhető különbség arra utal, hogy a TRPM4 csatorna jelentős szerepet játszik a Ca²⁺-beáramlás negatív visszacsatolású szabályozásában.

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 Ca²⁺-mentes extracelluláris oldatban. A kezelés által kiváltott oszcilláló Ca²⁺-tűskék amplitudója fokozatosan csökkent, amely az ER ürülése és a Ca²⁺-visszavétel csökkenése miatt lép fel, köszönhetően annak, hogy a plazmamembrán Ca²⁺-pumpa (PMCA) a Ca²⁺ egy részét az extracelluláris térbe juttatja. Ezután az extracelluláris oldatot 2,5 mM Ca²⁺-koncentrációjú oldatra cseréltük, amely a Ca²⁺-beáramlás miatt tónusos [Ca²⁺]_i növekedést eredményezett. A görbék kiértékelésekor meghatároztuk a 2,5 mM Ca²⁺-ban mért fluoreszcens intenzitások értékét és azt tapasztaltuk, hogy a kontroll acinus sejtekhez képest (ΔR_{SOCE} : $0,091 \pm 0,005$) a TRPM4 KO sejteken mérhető amplitudó (ΔR_{SOCE} : $0,126 \pm 0,004$) szignifikánsan magasabb volt.

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

Ca²⁺-jelre hatást gyakorló egyéb tényezőket (például PIP2 bomlás). Az ER Ca²⁺ szivárgását 30 μM CPA-t tartalmazó Ca²⁺-mentes extracelluláris oldattal váltottuk ki. A kezdeti fázisban a kezelés hatására a [Ca²⁺]_i megnövekedett, majd azt követően lassan lecsökkent, amely azt mutatja, hogy a Ca²⁺ szivárgás utánpótlása az ER kiürülése miatt megszűnt és a Ca²⁺-ot az intracelluláris térből a PMCA kipumpálta az extracelluláris térbe. Az ER kiürítése alatt mért Ca²⁺-jelek nem különböztek a kontroll, a CBA-kezelt és a TRPM4 KO sejtekben (0,18 ± 0,02, 0,22 ± 0,01 and 0,21 ± 0,03), amely arra utal, hogy a két sejtípus ER-je kezdetben hasonló mennyiségű Ca²⁺-ot tartalmazott. Miután a fluoreszcencia intenzitás újra elérte az alap értéket, a Ca²⁺-mentes extracelluláris oldatot 2,5 mM Ca²⁺-tartalmú oldatra cseréltük, amely jelentős [Ca²⁺]_i növekedést okozott. 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 Ca²⁺-tartalmára gyakorolt nemkívánt mellékhatását. A Ca²⁺-beáramlásról információt nyújtó fluoreszcencia intenzitás arányok értékelése azt mutatja, hogy a TRPM4 KO acinus sejtek esetén a fluoreszcencia változás meredeksége és amplitúdója is nagyobb volt a kontrollhoz viszonyítva. Emelett a CBA kezelés hatására szignifikánsan nőtt a fluoreszcencia jel meredeksége, míg az amplitúdóban nem tapasztaltunk változást (meredekség, CTRL: 0,76 ± 0,04; CBA: 1,06 ± 0,03; TRPM4 KO: 1,88 ± 0,1 A.U. (önkényes egység); ΔR_{SOCE}: CTRL: 0,065 ± 0,004; CBA: 0,071 ± 0,002; TRPM4 KO: 0,103 ± 0,005). Ezek a mérési eredmények egybehangzóak az előzőekkel, és tovább erősítik az elméletünket, miszerint a TRPM4 negatív visszacsatolással szabályozza a Ca²⁺-beáramlást egér hasnyálmirigy acinus sejteken.

V. Megbeszélés

Az új könnysekréciós 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. Bár az új modell alap elgondolása nagyon hasonló a régi, Wood és Mircheff által 1986-ban megalkotott modelljéhez, 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. A régi modell szerint a citoplazmába történő Na^+ -transzport a Na^+ - K^+ - $2Cl^-$ és a Na^+ - H^+ kotranszporterekén 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 jut be a sejtbe, a Na^+ - K^+ - $2Cl^-$ és Cl^- - HCO_3^- kotranszporterek segítségével. Ezek az ionok a sejtből az apikális membránon át jutnak ki a lumenbe a Ca^{2+} -függő K^+ és Cl^- -csatornákon keresztül. 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 Ca^{2+} -függő K^+ és Cl^- -csatornák mind a könnymirigy acinus sejt apikális membránjában

helyezkednek el, és feltételeztünk egy apikális K^+ -visszavételi mechanizmust, mely alacsony K^+ -koncentrációt alakít ki az acinus lumenben. Az elméletünket alátámasztják az immunfluoreszcens felvételeink, amely a Na^+ - K^+ pumpa egyenlő sűrűségű eloszlását mutatja az apikális és a bazolaterális membránszakaszban. Az eredményeink alátámasztják a K^+ -reabszorpció a könnysekre betöltött jelentős szerepét, amely összhangban van több korábbi tanulmánnyal is. Bár ahhoz, hogy a Na^+ - 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 K^+ -reabszorpció valósuljon meg a lumenből rajta keresztül.

A kutatócsoportunk közreműködésével nemrég megjelent közleményben a nyálmirigy acinus sejtek szekréciós mechanizmusára dolgoztak ki munkatársaink egy matematikai modellt. A modellben a folyadékszékreció akkor mutatkozott optimálisnak, amikor a modell az apikális membránba illesztette a teljes K^+ -konduktancia 40%-át és a Na^+ - K^+ pumpa aktivitás 30%-át. Ilyen feltételek mellett a szekretált Na^+ 27%-a származna a transzcelluláris Na^+ -székrecióból, míg apikális Na^+ - K^+ pumpa hiányában kizárólag a paracelluláris Na^+ -székreció érvényesülne. A hasonló eredmények miatt a könnysekre betöltött modelltünk esetén is hasonló mechanizmust feltételeztünk.

A TRPM4 szerepe a hasnyálmirigy acinus sejtek SOCE-jében és ennek patológiai vonatkozásai

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

A hasnyálmirigy acinus sejtek $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -jának kóros mértékű, tartós megemelkedése (Ca^{2+} -túltöltése) olyan kritikus, korai kóros esemény, amely idő előtti intracelluláris zimogén aktivációhoz, önmésztéshez és végül akut hasnyálmirigy-gyulladásához vezet. Mivel a SOCE elengedhetetlen a Ca^{2+} -túltöltéshez és az ORA1 gátlószerek alkalmazásakor az akut hasnyálmirigy-gyulladás súlyosságának enyhüléséről számoltak be, adataink felvetik annak lehetőségét, hogy a TRPM4 csatorna működésének a patológiás Ca^{2+} -szignalizáció kivédésében lehet szerepe. 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 szerepét korábban megfigyelték a T-limfocitákban és a hízósejtekben. Ezek szerint a TRPM4 gén csendesítése miatt a Jurkat T-sejtekben a 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 Ca^{2+} beáramlását a sejtbe azáltal, hogy depolarizálja a plazma membránt és csökkenti a Ca^{2+} elektrokémiai hajtóerejét. Ezzel egybehangzóan acinus sejteken kapott eredményeink arra utalnak, hogy a TRPM4 áram csökkenti a Ca^{2+} -beáramlást azáltal, hogy alacsonyabb Ca^{2+} -hajtóerőt alakít ki a membránpotenciál depolarizálásával. Azonban Park és munkatársainak eredményei egy másik lehetőséget is felvetnek. Ezek szerint HEK293T sejtekben kimutatták, hogy a TRPM4 kölcsönhatásba lép a TRPC3-mal (egy Ca^{2+} -felszabadulás aktiválta Ca^{2+} -csatornával), amely a TRPC3 csatorna aktivitásának csökkenését eredményezi. Mivel a TRPC3 nagymértékben kifejeződik a hasnyálmirigy acinus sejtekben, 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 Ca^{2+} -függő kation árama fontos szerepet játszik a transzepithelialis Cl^- -szekréció szabályozásában is. Ezt az összefüggést Kasai és Augustine beépítették a primer könny szekréció „push-pull” modelljébe. A modell figyelembe veszi, hogy a Ca^{2+} -hullám apiko-bazális terjedése a szekretagóg stimuláció során először az apikálisan lokalizált Cl^- -csatornákat aktiválja. Az aktiválás Cl^- -kiáramlást eredményez, mivel a membránpotenciál negatívabb, mint a Cl^- egyensúlyi potenciálja („push” fázis). Később a bazális plazmamembránt elérő Ca^{2+} -hullám aktiválja az ezen a területen elhelyezkedő Ca^{2+} -függő kationcsatornákat (azaz a TRPM4-et), amelyek a membránt depolarizálják a Cl^- egyensúlyi potenciálja fölé, és így hajtóerőt hoznak létre a Cl^- -csatornákon keresztüli Cl^- beáramlásához („pull” szakasz). A vezetőképességeknek ez a váltott aktiválása egyirányú Cl^- és folyadékáramlást eredményezne a hámban. Egy másik hipotézis szerint a Cl^- -felvétel a bazális membránban elhelyezkedő $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ kotranszporterek segítségével valósul meg. Ezt a modellt erősen alátámasztotta egy meggyőző tanulmány, miszerint a Ca^{2+} -aktivált Cl^- -csatornák kizárólag az apikális plazmamembránban fejeződnek ki. Ez az új elmélet elveti a „push-pull” modellt, és a Ca^{2+} -függő kationáramnak a folyadékszekréció szempontjából nem tulajdonít szerepet.

Az nyilvánvaló, hogy a Cl^- -áram (a közelmúltban azonosított TMEM16a csatornán keresztül) szintén jelentős depolarizáló áramként működik a hasnyálmirigy acinus sejtekben, amely felveti a kérdést, miért fejeznek ki az acinus sejtek azonos szerepet betöltő ioncsatornákat, melyek azonos liganddal aktiválható ionáramokért felelnek. A Ca^{2+} -függő kationáramról korábban azt feltételezték, hogy szerepük lehet a Na^+ felvétele a bazolaterális membránon keresztül, amely egy lehetséges transzcelluláris Na^+ -transzport útvonalat biztosítana a Na^+ -nak. A 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. Bár immunfluoreszcencia vizsgálatainkhoz megfelelő TRPM4 antitestek hiányában nem sikerült bizonyítanunk immunfestéssel a TRPM4 kifejeződését hasnyálmirigy acinus sejtekben, az említett korábbi tanulmány határozottan arra utal, hogy a Ca^{2+} -aktivált kationcsatornák csak a plazmamembrán bazális régiójában fejeződnek ki. Kasai és Augustine arra is utal, hogy az apikális membrán nem közvetít

jelentős kationáramokat, következésképpen a hasnyálmirigy acinusban a Na⁺-szekréció egyetlen útja a paracelluláris lehet, és a TRPM4 valószínűleg nem vesz részt a transzcelluláris Na⁺-transzport és így a transzepitélialis folyadékszékreciónak 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 Ca²⁺-belépést.

Eredményeink alapján igazolást nyert az, hogy a TRPM4 csatorna megnyílásával negatív visszacsatoló mechanizmusként gátolja a SOCE folyamatát, mintegy védelmet biztosítva a Ca²⁺-túltöltődés ellen. A szekretagóg stimuláció hatására a hasnyálmirigy acinus sejtben az IP₃-útvonal aktiválódik, ezzel Ca²⁺-felszabadulást okozva mind az IP₃ csatornán, mind a RyR csatornán keresztül (Ca²⁺-indukált Ca²⁺-felszabadulás). A belső raktárból (SR) felszabadult Ca²⁺ az SR ürülését eredményezi, amelynek következménye a raktár vezérelt Ca²⁺-beáramlás (SOCE). A SOCE aktiválását közvetlenül a STIM1 fehérje konformációváltozása váltja ki. Az SR-ből és az extracelluláris térből érkező Ca²⁺ adja a teljes [Ca²⁺]_i növekedést, amely kulcsszerepet játszik a zimogének exocitózisában, és patológiás esetben a korai aktivációjukban. A SOCE kialakulásával párhuzamosan a megemelkedő [Ca²⁺]_i aktiválja a TRPM4 csatornát, Na⁺ áramlik a sejtbe, és depolarizálja azt. A depolarizáció miatt a Ca²⁺-beáramlás hajtóereje csökken, viszont a PMCA által végzett Ca²⁺ kiáramlás megtartott, ezzel a Ca²⁺-mozgás a kilépés irányába tolódik, amely védelmet biztosít a túlzott Ca²⁺-töltődéssel szemben.

VI. Összefoglalás

A könnyemirigy acinus sejteken végzett kísérleteink során egy új, a korábbi kiegészítő könnysekreációs modell kidolgozása volt a célunk. Az első kísérletsorozat célja a könnyemirigy acinus sejtek apikális membránjában található Ca^{2+} -függő K^+ -csatornák működésének vizsgálata volt. A célzott Ca^{2+} -uncaging és a teljes sejt árammérés kombinálásával helyileg aktiválódó Ca^{2+} -függő K^+ - és Cl^- -áramokat mértünk. Az apikális régióban a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ lokális növekedése a 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 K^+ - és Cl^- -áramait is vizsgáltuk. Bár ezekben a kísérletekben a lokális $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változás kissé nagyobb volt, mégsem tapasztaltunk aktiválódó K^+ - és Cl^- -áramokat. Ezek az adatok határozottan arra utalnak, hogy az egér könnyemirigy acinus sejtjeiben az elsődleges K^+ -csatorna a BK-csatorna, amely együtt lokalizálódik az apikális plazmamembránban a Ca^{2+} -aktivált Cl^- -csatornával. Ezenkívül az immunfestés azt mutatta, hogy az apikális membrán területe viszonylag nagy (a látszólagos membránkerület ~30%-a) és Na^+ - K^+ -pumpát is tartalmaz. Ez az eredmény azt is sugallja, hogy az apikális Na^+ - K^+ -pumpa aktivitása funkcionálisan jelentős lehet az elsődleges könnyfolyadék ionösszetételének meghatározásakor. Összefoglalva, új modellünk azt javasolja, hogy K^+ -szekréció történik az apikális membránon, ezt követően azonban a K^+ -ot azonnal visszaveszi az apikális Na^+ - K^+ ATP-áz, ami Na^+ -szekrécióval jár. Ez a folyamat tehát a Na^+ szekréciót a paracellulárisról részben a transzcelluláris útvonalra irányítja át. Ezenkívül a Na^+ - K^+ -pumpa elektronegatív transzportja segít megtartani a stimuláció során hiperpolarizált membránpotenciált, ezzel fenntartja a 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 Ca^{2+} -függő kationáramot 10 μM CBA és 100 μM 9-Phenanthrol hasonlóan gátolja, viszont a CBA a 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 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 Ca^{2+} -belépést okozott a TRPM4 KO acinus sejtekben, míg a kontroll sejtekben nem, amely azt jelzi, hogy a TRPM4 részt vesz a Ca^{2+} -belépésének negatív visszacsatolású szabályozásában. Sőt, amikor Ca^{2+} -belépést 20 pM CCK kezeléssel váltottunk ki (SOCE), a 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 Ca^{2+} -tartalmát az esetleges kísérleti melléktermékek kialakulásának elkerülése érdekében receptor-független módon, CPA-val ürítettük. A 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 gátlószerekkel 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 Ca^{2+} -függő módon depolarizálja a hasnyálmirigy acinus sejteket és negatív visszacsatolással szabályozza a Ca^{2+} bejutását a sejtbe. A TRPM4 egy kiegészítő funkciójú depolarizáló áramként funkcionál, amely specifikusan lokalizálódik annak érdekében, hogy negatívan szabályozza a Ca^{2+} -belépést a CRAC csatornák közelében.



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⁺-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

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., Mobasher, 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 Ca²⁺ 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., Mótyán, J. A., Csernoch, L., Jóna, I., Nánási, P. P., Almássy, J.: Dantrolene Requires Mg²⁺ 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
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
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 tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2021.12.09.

