

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**Béta-adrenerg stimuláció hatása a kutya kamrai
szívizomsejtek késői káliumáramaira**

Dr. Harmati Gábor



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2011

Tartalomjegyzék

1., Bevezetés	4
2., Irodalmi áttekintés	6
2.1., Káliumáramok és káliumcsatornák a szívizomsejteken.....	7
2.1.1., A káliumcsatornák szerkezeti felépítése	8
2.1.2., Feszültségfüggő káliumcsatornák	10
2.1.2.1., <i>Tranziens kifelé irányuló áram (I_{to})</i>	10
2.1.2.2., <i>A befelé egyenirányító káliumáram (I_{K1})</i>	12
2.1.2.3., <i>Késői káliumáram (I_K)</i>	12
2.1.2.3/A., <i>A késői káliumáram ultragyors komponense (I_{Kur})</i>	14
2.1.2.3/B., <i>A késői káliumáram lassú komponense (I_{Ks})</i>	15
2.1.2.3/C., <i>A késői káliumáram gyors komponense (I_{Kr})</i>	16
2.2., A β -adrenerg stimuláció	17
2.2.1 Az adrenerg receptorok	17
2.2.2., Az adrenerg receptorokhoz kapcsolódó jelátviteli útvonalak	20
2.2.2.1., <i>cAMP/PKA útvonal</i>	20
2.2.2.2., <i>Az EPAC útvonal</i>	22
2.2.2.3., <i>A PLC/PKC útvonal</i>	24
3., Célkitűzés	27
4., Metodikák	28
4.1., Kutya bal kamrai szívizomsejtek izolálása	28
4.2., A hERG csatornát expresszáló HEK sejtek	29
4.3., Elektrofiziológiai mérések izolált sejteken	30
4.3.1., Az I_{Kr} mérése.....	32
4.3.2., Az I_{hERG} mérése.....	32
4.3.3., Az I_{Ks} mérése.....	32
4.4., Az analízis során felhasznált matematikai formulák.....	33
4.5., Statisztikai elemzés	34
5., Eredmények	35
5.1., Az izoproterenol hatása az I_{Kr} -re.....	35
5.2., Az izoproterenol hatásmechanizmusa.....	36
5.3., A PKA moduláció hatása az I_{Kr} -re	38

5.4., A PKC moduláció hatása az I_{Kr} -re	41
5.5., A PKC közvetlen gátlásának hatása az I_{Kr} -re.....	49
5.6., Az izoproterenol hatása az I_{Ks} -re.....	51
5.7., A PKA moduláció hatása az I_{Ks} -re.....	51
5.8., A chelerythrine és GF-109203X hatása az I_{Ks} -re	54
6., Megbeszélés.....	56
7., Összefoglalás	60
8., Summary	61
9., Irodalomjegyzék	62
10., Az értekezésben gyakran használt rövidítések jegyzéke	69
11., Tárgyszavak.....	70
12., Köszönetnyilvánítás	71
13., Függelék	72

1., Bevezetés

A késői káliumáram elsődleges szerepet játszik a szívizom akciós potenciáljának repolarizációjában. Az áramot létrehozó csatornafehérjék szerkezetének megváltozása vagy farmakológiai befolyásolása az áram-, és így az akciós potenciál hosszának megváltozásához és aritmiák kialakulásához vezethet (veleszületett és szerzett long-QT szindrómában, kamrai tachycardiában és torsades de pointes kamrai tachycardiában). Az így létrejövő aritmiák minden előjel nélkül, gyakran fiatal korban jelentkezhettek, így kiemelkedő szerepük lehet a hirtelen szívhalál fellépésében [56]. A késői káliumáram lassú komponenséről (I_{Ks}) számos emlősfaj szívizomsejtjein kimutatták, hogy β -adrenerg stimuláció hatására nő az amplitúdója [25, 93], azonban az ezen áram gyors komponensére (I_{Kr}) vonatkozó irodalmi adatok ellentmondásosak [21, 22, 127]. Egészen a közelmúltig azt gondoltuk, hogy β -adrenerg stimuláció nem módosítja az I_{Kr} -t [22], újabb vizsgálatok során azonban a cAMP többféle módosító hatását is leírták. Expresszált $K_v11.1$ csatornákon kimutatták, hogy a cAMP csökkenti az I_{Kr} -t egyrészt a csatornához kötődve, másrészt a csatorna protein kináz A (PKA) mediált foszforilációja által [20]. Hasonlóak az eredmények tengerimalac szívizomsejtek β -adrenerg stimulációja esetén is. Ezzel ellentétben állnak azok a tanulmányok, melyekben a β -adrenerg stimuláció hatására növekedett az I_{Kr} amplitúdója, a csatornák befelé egyenirányításának mérséklődése miatt. Ezt a szerzők a β -adrenerg hatásra bekövetkező intracelluláris kalciumkoncentráció növekedés, és a következményes PKC aktiválódás hatásának tulajdonították [35].

Vizsgálataink során arra voltunk kíváncsiak, hogy miként befolyásolja a késői káliumáram komponenseit a közvetlen β -adrenerg stimuláció, illetve a β -adrenerg receptorok által aktivált jelátviteli útvonalak — protein kináz A, protein kináz C — aktiválása illetve gátlása. Kísérleteinket kutya kamrai szívizomsejteken végeztük, mivel elektrofiziológiai szempontból ez a legelfogadottabb humán modell.

Méréseink során izoproterenol alkalmazásával aktiváltuk a β -adrenerg receptorokat, elsőként a következményes áram-amplitúdó változásokat vizsgáltuk. Munkánk következő lépéseként a β -adrenerg stimuláció közvetítéséért felelős β -adrenerg receptor-altípust kerestük, specifikus gátlószerek segítségével.

A receptor azonosítását követte a hozzájuk kapcsolódó jelátviteli útvonalak azonosítása, ezen kísérletekben a PKA, EPAC és PKC útvonal érintettségét vizsgáltuk. Ezeket a kísérleteket specifikus enzimaktivátorok és gátlószerek alkalmazásával végeztük.

Megvizsgáltuk, egy-egy ilyen enzimaktivátor vagy gátlószer jelenléte befolyásolja-e az izoproterenol késői káliumáram-aktiváló hatását. A kapott eredményeket összegezve következtettünk a vizsgált útvonal érintettségére.

Számos, a PKC útvonalat befolyásoló gátlószerről ismert, hogy direkt csatornahatásai is vannak [103]. Annak érdekében, hogy a méréseink során nyert eredményekből megfelelő következtetést tudjunk levonni, szerettük volna kizárni az általunk alkalmazott két PKC gátlószer, a chelerythrine és GF109203X direkt káliumcsatorna gátló hatását. Ezeket a méréseket hERG csatornákon végeztük, melyeket HEK-293 sejtvonalon stabilan expresszáltattunk.

Megvizsgáltuk a β -adrenerg stimuláció I_{Ks} -re kifejtett hatását is. A kísérleti elrendezés — az I_{Ks}/I_{Kr} elkülönítésére használt gátlószerek kivételével — azonos volt az I_{Kr} -nél használttal. Az irodalomból jól ismert a β -adrenerg stimuláció I_{Ks} -t aktiváló hatása [25, 93], így az irodalmi adatokkal megegyező adatainkat az alkalmazott módszer helyességének igazolására, önkontrollként használhattuk.

Eredményeinket összegezve és az irodalmi adatokkal összevetve komplex képet alkottunk a kutya kamrai szívizomsejteken megjelenő késői káliumáram-komponensek β -adrenerg stimuláció általi szabályozásáról. Vizsgálataink ugyanakkor számos kérdést is felvetettek: a későbbiekben vizsgálni szeretnénk a késői káliumáram lassú és gyors komponensének PKA általi szabályozásában megjelenő különbségek pontos molekuláris mechanizmusait, illetve keressük a különböző PKC gátlószerek esetén megjelenő direkt ioncsatorna hatások molekula szintű magyarázatát.

2., Irodalmi áttekintés

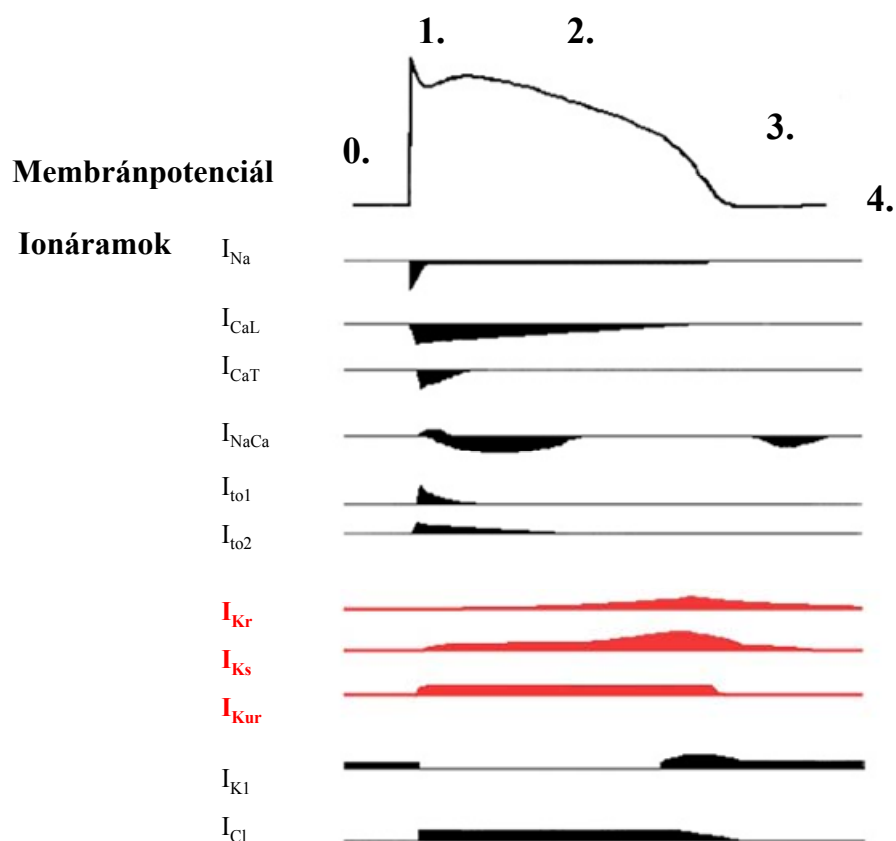
A szívizomsejtek akciós potenciálját számos ionáram finom összjátéka alakítja ki [137]. Ezek az ionáramok az akciós potenciál különböző fázisaiban aktiválódnak, és különböző hatással bírnak annak lefutására.

Az akciós potenciál nulladik fázisában (az AP felszálló szára) idő-, és feszültségfüggő gyors Na^+ csatornák aktiválódnak, sokszorosára növelve az addig alacsony Na^+ konduktanciát. A Na^+ ionokra jelentős elektrokémiai hajtóerő hat, ezáltal a csatorna nyitása jelentős befelé irányuló áramot eredményez, így a membránpotenciál aktuális értéke a Na^+ egyensúlyi potenciálja felé mozdul, tehát a membrán depolarizálódik. A gyors Na^+ csatornák a depolarizáció hatására gyorsan inaktiválódnak és a kiindulási zárt állapotba — ahol ismét ingerelhetőek lesznek — majd csak a membrán repolarizációja során kerülnek.

A depolarizáció hatására egy korai kifelé irányuló áram (“transient outward current”, I_{to}) aktiválódik. Ez a repolarizáló hatású áram a felelős az akciós potenciál első fázisának, a gyors, átmeneti repolarizáció kialakításáért. A depolarizáció tartós fennállása aktiválja a lassú típusú feszültségfüggő kalciumcsatornákat ($I_{\text{Ca,L}}$). Ez a depolarizáló hatású áram a membránpotenciált ismét a pozitív irányba tolja el (ún. plató fázis). A plató fázis alatt nem történik jelentősebb mértékű repolarizáció az I_{to} inaktiválódása és a K^+ csatornák lassú aktivációja miatt.

Az AP harmadik fázisában kezdődik meg a repolarizációs folyamat, amely visszaállítja a membránpotenciál nyugalmi értékét (az AP negyedik fázisa). A repolarizációt számos áram együtt hozza létre. A kezdeti szakaszt az $I_{\text{Ca,L}}$ inaktivációja határozza meg leginkább, később egyre nagyobb szerep jut a késői K^+ áram (delayed rectifier, I_{K}) komponenseinek, majd a repolarizációt az I_{K1} teszi teljessé.

Az AP negyedik fázisa során az extranodális (automáciával nem rendelkező) szívizomsejtek — így a kamrai sejtek — membránpotenciálja is a nyugalmi értéken marad egészen az újabb AP kezdetéig. A negyedik fázist meghatározó nagy K^+ konduktancia (amely az I_{K1} -et eredményezi) felelős azért, hogy a kamrai miociták nyugalmi membránpotenciálja a K^+ ionok egyensúlyi potenciáljához közeli érték.



1. ábra: A kamrai szívizomsejtek akciós potenciáljának fázisai és az ezeknek megfelelő ionáramok. Az AP mellett feltüntetett arab számok az AP egyes fázisait jelölik. A nulla vonal felett látható jelek kifelé irányuló (“outward”), míg a vonal alatti jelek befelé irányuló (“inward”) áramokat reprezentálnak. Varró és mtsai. [112] közleménye alapján módosítva.

2.1., Káliumáramok és káliumcsatornák a szívizomsejteken

A szívizomsejteken a káliumáramok számos formája jelenik meg [23, 83]. Működésük szerint feloszthatjuk őket feszültségfüggő (pl. I_{to} , I_{Kur} , I_{Kr} , I_{Ks} , I_{K1}) és ligandvezérelt (pl. $I_{K,Ach}$, $I_{K,ATP}$, $I_{K,2P}$) káliumáramokra.

Mivel a membránpotenciál a szív ciklus során mindig pozitívabb, mint a K^+ egyensúlyi potenciálja, ezért a nettó K^+ áram mindig kifelé irányuló, és a membrán repolarizációját,

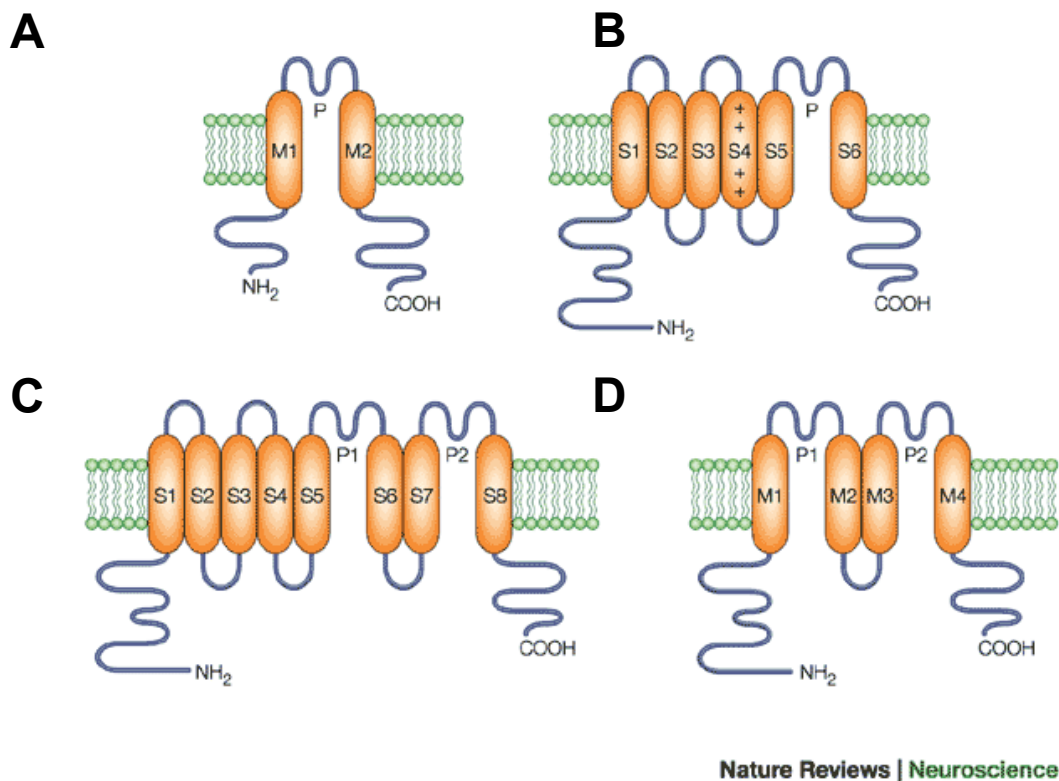
illetve a nyugalmi membránpotenciál fenntartását segíti elő. Élettani körülmények között ezt a szerepet főként a feszültségkapuzott csatornák játsszák. A szívizomzat kóros működésekor azonban a ligandvezérelt csatornák által létrehozott áramok jelentősége is növekedhet, pl. az ATP által gátolt káliumáram ($I_{K,ATP}$) és az arachidonsav által kapuzott káliumcsatornák árama ($I_{K,AA}$).

2.1.1., A káliumcsatornák szerkezeti felépítése

A káliumcsatornák szerkezeti felépítése az ioncsatornák felépítésének általános elveit követi, miszerint pórusformáló α -alegységből és járulékos β -alegységekből épülnek fel [18]. Szerkezeti felépítésük szerint a humán káliumcsatornákat 2TM (transzmembrán), 4TM és 6TM egységből felépülő csoportokra oszthatjuk.

- Két transzmembrán egységből (M1 és M2), intracelluláris N- és C-terminális részből és egy pórusformáló szegmensből épülnek fel (2TM/1P) a befelé egyenirányító K^+ csatornák (inward rectifier, I_{Kir}). A pórus szelektivitási filterként *Gly-(Tyr/Phe)-Gly* szekvenciát tartalmaz. Ez a struktúra jellemző a K_1 -, K_{ATP} - és K_{ACh} csatornákra, melyek jellegzetesen homo- vagy heterotetramereket alkothatnak.
- A négy transzmembrán alegységből és két pórusformáló szegmensből (4TM/2P) álló K_{2P} csatornák dimereket építenek fel. A K^+ szelektivitásért az első pórusban a konvencionális *Gly-(Tyr/Phe)-Gly* szekvencia, a második pórusban *Gly-(Phe/Leu)-Gly* szekvencia a felelős. A K_{2P} csatornák csekély idő- vagy feszültségfüggést mutatnak, és a nyugalmi membránpotenciál szabályzásáért felelősek.
- A hat transzmembrán egységből és egy pórusformáló egységből álló, ún. 6TM/1P csatornák szerkezeti felépítése típusos a feszültségfüggő K_v csatornákon belül. A depolarizáció során ezek a csatornák zárt állapotból először aktivált, majd inaktív állapotba kerülnek, mely az ionáram lecsengéséhez vezet. Inaktivációjuknak két formája ismert: *N-típusú inaktiváció*, mely a pórus intracelluláris részének elzárása útján alakul ki „ball and chain” mechanizmus útján. A másik forma a *C-típusú inaktiváció*, mely a pórus extracelluláris részénél lévő struktúrák átrendeződése folytán zárja el az ioncsatornát [109]. Ez utóbbi, C-típusú inaktiváció érzékeny a csatornához kötődő farmakonokra, illetve az extracelluláris tér K^+ koncentrációjára [72]. A K_v -ioncsatornák α -alegysége hat transzmembrán részből (S1-6), intracelluláris N- és C-terminális doménből, valamint az S5 és S6 szegmens között elhelyezkedő

pórusformáló részből áll, melyben megtalálható a *Thr-X-Gly-Tyr-Gly* K^+ szelektivitásért felelős filterszekvencia [84]. A feszültségszenzor szerepét itt is a minden harmadik pozícióban megtalálható *Arg/Lys* aminosavakkal bíró S4 szegmens tölti be [59]. A legtöbb K_v csatorna S6 szegmense egy *Pro-X-Pro* szekvenciát tartalmaz, mely az aktivációs kapu közelében egy éles hajlatot képez az S6 szegmens α -hélixében, szűkítve a pórus belső járatát [133]. A K_v -csatornák négy identikus alegység tetramerizációjával hoznak létre funkcionális csatornát. A K_v1 alcsaládban az N-terminális intracelluláris T1 domén a felelős a tetramerizációért [1], míg a K_v11 (erg) és K_v7 (KCNQ) alcsaládokban a C-terminális domének tűnnek fontosnak a tetramerizáció kialakításában [128].



2. ábra: A káliumcsatornák szerkezete. Az **a** panel a 2TM/1P struktúráját, a **b** panel a 6TM/1P struktúráját, a **c** panel a 6TM/1P és 2TM/1P formák hibridizációjából létrejött, eddig még csak élesztőkben leírt 8TM/2P formát, míg a **d** panel a 4TM/2P struktúráját szemlélteti. Choe munkája alapján [18].

2.1.2., Feszültségfüggő káliumcsatornák

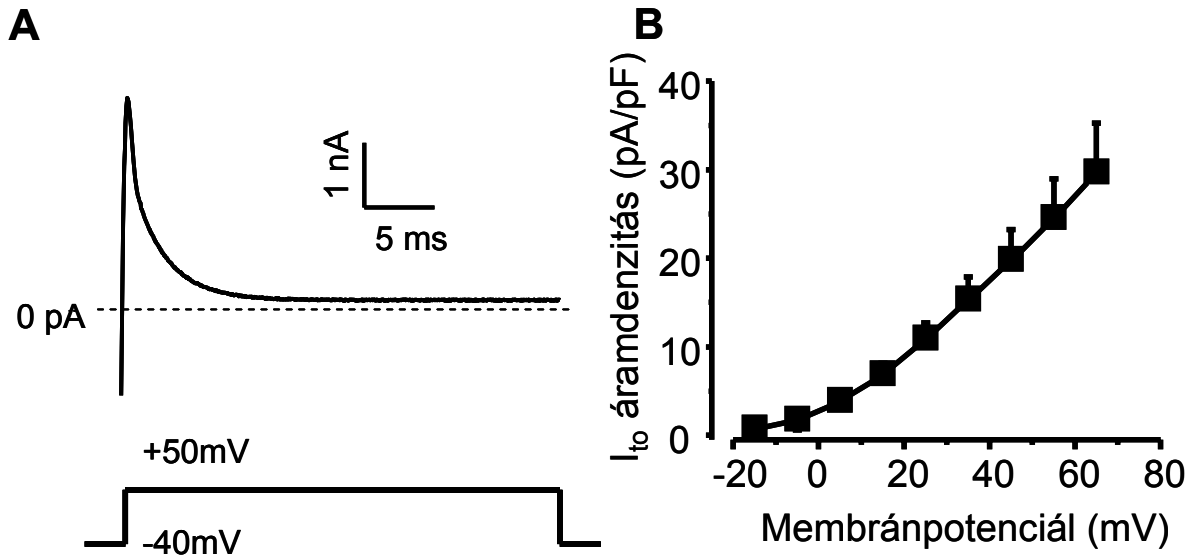
A káliumcsatornák közül a feszültségfüggő káliumcsatornák és a rajtuk átfolyó I_{to} , I_{K1} és I_K vesznek részt a szívizomsejtek akciós potenciáljának kialakításában [96].

2.1.2.1., *Tranziens kifelé irányuló áram (I_{to})*

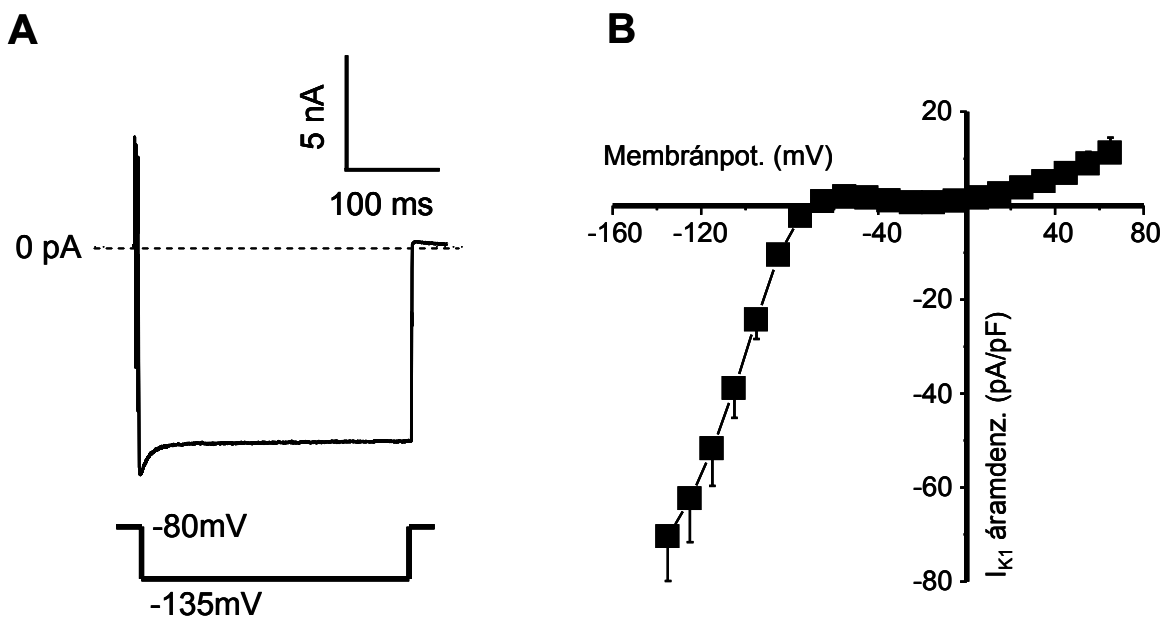
Az I_{to} -t létrehozó csatornák a szív minden sejtípusában megtalálhatók — a nodalis sejteket is beleértve [68]. Az I_{to} depolarizáció hatására aktiválódik, a káliumcsatornákon keresztül csak rövid ideig folyik áram (transient outward current, I_{to} , azaz átmeneti kifelé irányuló áram). Az I_{to} két komponensből tevődik össze, melyeket I_{to1} és I_{to2} -nek nevezünk. Az I_{to1} 4-aminopyridin érzékeny káliumáram, az I_{to2} egy Ca^{2+} aktivált Cl^- áram, mely szintén rövid ideig fennálló kifelé irányuló áramként jelenik meg [37].

A tranziens kifelé irányuló áram (I_{to1}) kinetikai szempontok alapján két komponensből tevődik össze: egy gyors (I_{tof}) és egy lassú (I_{tos}) komponensből. Az I_{to} két komponensének kifejeződése jelentős fajok közti [113], és területi különbséget mutat [101, 102]. Emberben az áram mindkét komponensét leírták, a pitvari sejteken csak a gyors komponens található meg, a kamrai myocytákon mindkettőt azonosították [69]. Kutya és humán munkaizomsejteken eddig csak az I_{tof} került leírásra, aminek létrehozásáért a $K_v4.3$ csatornafehérjék lehetnek a felelősek [49]. A $K_v1.4$ szintén expresszálódik a humán miokardiumban, ez eredményezi az I_{tos} létrejöttét a szubendokardium sejtrétegében [49]. Bár a csatornák sűrűsége a szívizom minden területén meglehetősen alacsony, az áram nagysága nagymértékű eltérést mutathat. A pitvarokban és a kamra epi- és midmiokardiális területein nagy, míg a szubepikardiális területeken viszonylag kis I_{to} mérhető [101].

A tranziens kifelé irányuló áram megváltozását több kórképben is leírták. Krónikus pitvarfibrilláció során csökkent az I_{to} csatornafehérjék expressziója a pitvari szívizomsejteken [32]. Szívelégtelen betegekben [5], illetve pacemakeres kamrai ingerlés során szintén csökkent csatornafehérje expresszió figyelhető meg a kamrai munkaizomsejteken [135]. Ezzel szemben szívelégtelenek pitvari szívizomsejtjein az I_{to} denzitását nagyobbak találták, és az áram kinetikája is megváltozott, ami hozzájárulhat az akciós potenciál rövidüléséhez [92].



3.ábra: A kutya kamrai szívműködése során mérhető tranziens kifelé irányuló áram (I_{to}). **A:** egy analóg áramgörbe, melyet -40 mV-os tartópotenciálról $+50$ mV-ra történő depolarizáció váltott ki. **B:** az áram feszültségfüggése. Szabó és mtsai. munkája alapján [101].



4.ábra: A kutya kamrai szívműködése során mérhető befelé egyenirányító káliumáram (I_{K1}). **A:** egy analóg áramgörbe, melyet -80 mV-os tartópotenciálról -135 mV-ra történő hiperpolarizáció váltott ki. **B:** az áram feszültségfüggése. Szabó és mtsai. munkája alapján [101].

2.1.2.2., *A befelé egyenirányító káliumáram (I_{K1})*

Az I_{K1} -et az IRK csoportba tartozó, erősen befelé egyenirányító tulajdonságú ioncsatornák hozzák létre. Az I_{K1} denzitása legnagyobb a Purkinje sejteken és a kamrai munkaizomsejteken [40], kisebb a pitvari kardiomiocitákon [36]. Az áramot eddig sem a szinusz csomó, sem az AV-csomó sejtjein nem írták le. Az I_{K1} legvalószínűbb csatornaalkotó fehérjéje a $K_{ir}2.1$ [136].

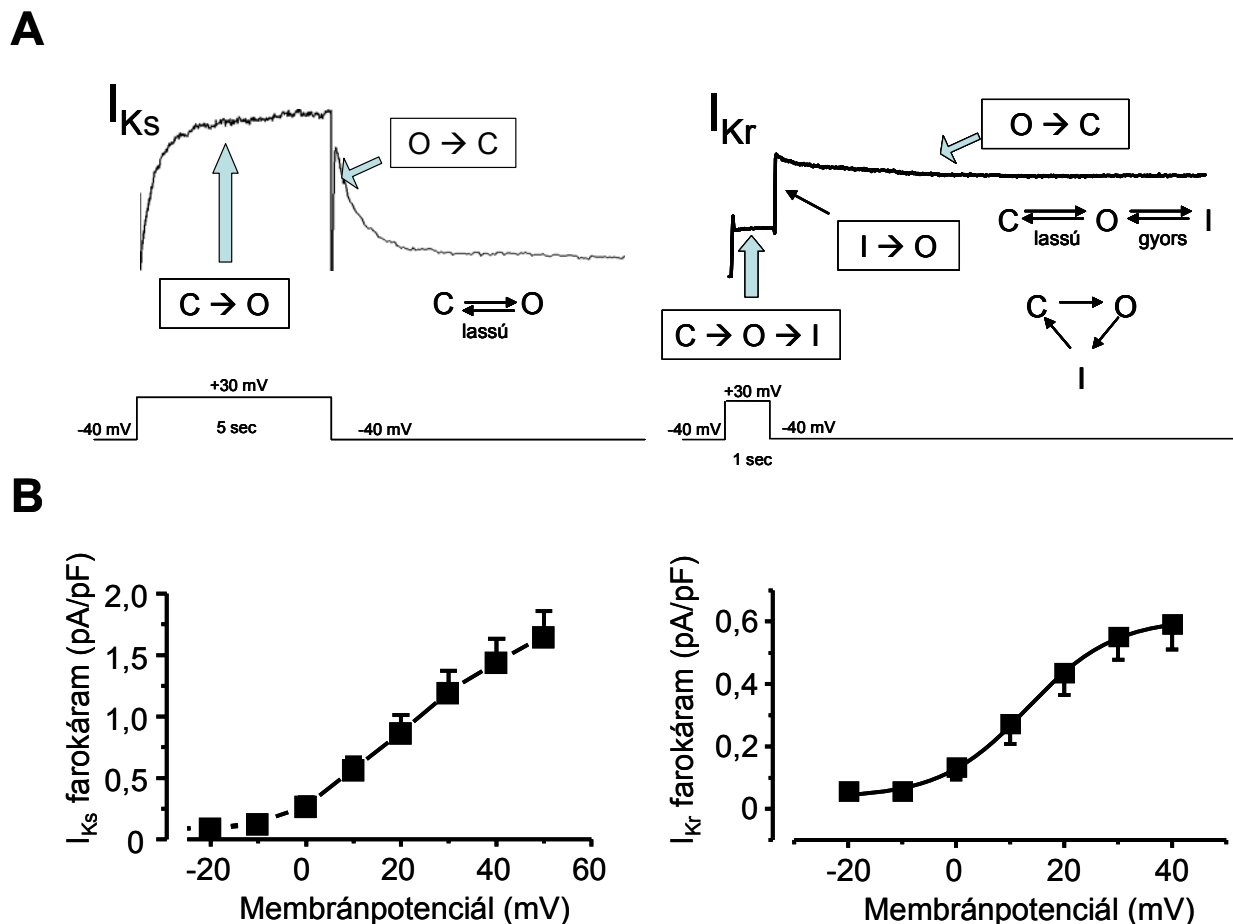
A csatornák erősen befelé egyenirányító karakterisztikájúak, amelyért Mg^{2+} [111], valamint poliaminok (putreszcin²⁺, spermidin³⁺, spermin⁴⁺) csatornához való feszültség- és időfüggő kötődése a felelős [59]. Befelé egyenirányításuk miatt ezeken az ioncsatornákon a nyugalmi membránpotenciálnál negatívabb feszültségértékek esetén jelentős áram folyhat keresztül, míg a -40 mV-nál pozitívabb membránpotenciálok esetén folyó kifelé irányuló áram kicsi. [137].

A csatorna működését számos tényező befolyásolja [85]. Az extracelluláris kálium koncentráció növekedése növeli a $K_{ir}2.1$ csatornák konduktanciáját [76], míg az intracelluláris acidózis, oxidatív stressz [62], Cs^+ és Ba^{2+} extracelluláris alkalmazása [43], több antiaritmiás szer (pl. kinidin, amiodaron) illetve lizofoszfátidil-kolin [90] gátolja. Humán kamrai szívizomsejtekben β -adrenerg hatás gátolja az I_{K1} -et PKA által közvetített foszforiláció következtében. A csatorna β -adrenerg modulációja szignifikánsan csökken szívelégtelenségben [54]. Az I_{K1} nagymértékű csökkenését tapasztalták mind pitvari, mind kamrai miocitákon szívelégtelenségben szenvedő betegeken [5].

2.1.2.3., *Késői káliumáram (I_K)*

A késői káliumáramot létrehozó ioncsatornák depolarizáció hatására nyílnak meg és negatívabb feszültségértékek mellett meglehetősen lassan zárulnak. A csatornákon keresztül folyó káliumáram (I_K) a feszültség és idő függvényében változik és fontos szerepet játszik az akciós potenciál repolarizációjában. A késői káliumáramot kinetikai- és egyenirányító tulajdonságok, gátlószer érzékenység valamint intracelluláris moduláció szempontjából három komponensre bonthatjuk [16, 71, 88]. Ezek az ultragyors komponens (I_{Kur}), a gyors komponens (I_{Kr}) és a lassú komponens (I_{Ks}). Az I_{Kur} gyorsan aktiválódik, majd nem, vagy csak nagyon lassan inaktiválódik [137]. Az I_{Kr} az I_{Kur} -nél lényegesen lassabban

aktiválódik, majd inaktiválódik. Az I_{Ks} aktivációja lassabb, mint az I_{Kr} -é, de az I_{Ks} nem inaktiválódik, hanem deaktiválódik. A deaktiváció azt jelenti, hogy ez esetben az ionszatórnák nyitott állapotból közvetlenül zárt állapotba kerülnek, és nem inaktív állapotba, mint teszik azt az inaktiváció során. Az I_{Ks} deaktivációja gyorsabb, mint az I_{Kr} -é.



5. ábra: Az I_{Ks} és I_{Kr} viselkedése depolarizáló négyszögimpulzus hatására. **A:** Az I_{Ks} a depolarizációt követően lassan aktiválódik, majd a -40 mV-ra történő repolarizáció hatására lassan deaktiválódik. Az I_{Ks} nem, vagy csak nagyon lassan inaktiválódik. Az I_{Kr} depolarizáció hatására aktiválódik és ugyanekkor inaktiválódik is, majd a sejtmembránt -40 mV-ra repolarizálva az ionszatórnák gyorsan visszatérnek az inaktivációból. Ezt követően az I_{Kr} lassú deaktiválódása zajlik. C: zárt ionszatórnák; O: nyitott ionszatórnák; I: inaktív ionszatórnák. **B:** Az I_{Ks} és I_{Kr} farokáramok feszültségfüggése. Szentandrassy és mtsai. munkája alapján [102].

A késői káliumáram jelenlétét minden típusú szívizomsejtben leírták, ám az egyes komponensek áramsűrűsége jelentősen eltér a különböző fajokat, illetve a miokardium egyes régióit tekintve [74]. Az I_{Ks} és I_{Kr} mind pitvari, mind kamrai munkaizomsejteken megtalálható [57, 126], az I_{Kur} jelenlétét humán miokardiumban eddig még csak pitvari sejteken bizonyították [71]. A késői káliumáram komponenseinek a szív bal kamrájában eltérő szívcsúcs-szívbázis irányú, illetve transzmurális expressziója figyelhető meg. Nyúl preparátumokon mind az I_{Ks} , mind az I_{Kr} kisebb az apikális miocitákon, mint az anulus fibrosus felé eső, ún. „bázis” részen [14]. Kutya szívizomsejteken az I_{Kr} tekintetében nem figyelhető meg szignifikáns apiko-bazális eltérés, ám az I_{Ks} kisebb a bázis részen a szívcsúcsához képest [102]. A miokardium egyes rétegeit tekintve az I_{Kr} áramsűrűségében nincs szignifikáns különbség, ám az I_{Ks} kisebb a kamra midmiokardialis rétegében a szub-epikardiumhoz viszonyítva [101].

A késői káliumáram elsődleges szerepet játszik a szívizom akciós potenciáljának repolarizációjában. Az áramot létrehozó csatornafehérjék szerkezetének megváltozása vagy farmakológiai befolyásolása az áram — és így az akciós potenciál hosszának megváltozásához és aritmiák kialakulásához vezethet. Ezek közül a legjellemzőbbek a long-QT szindrómák különböző formái. Ezekben a betegségekben az akciós potenciál megnyúlása miatt fokozódik a korai utódepolarizációk és a torsades de pointes kamrai tachycardia kialakulásának valószínűsége, így gyakrabban fordul elő hirtelen szívhalál.

2.1.2.3/A., A késői káliumáram ultragyors komponense (I_{Kur})

Humán pitvari szívizomsejteken kizárólag 4-aminopyridin érzékeny I_{Kur} mutatható ki, kamrai preparátumokon még nem igazolták a jelenlétét [57]. Gyorsan aktiválódó K^+ áram, mely nem, vagy csak nagyon lassan inaktiválódik [71].

Az I_{Kur} -t egyesek, mint az I_K ultragyors komponensét írják le, azonban sokan az I_{to} nem inaktiválódó komponensének tartják. Az áram kinetikája és farmakológiai tulajdonságai fajtól és szövettípustól függően változóak. Az I_{Kur} eltérő sajátságai a különböző csatornaalkotó fehérjék eltérő expressziós mintázatával magyarázható, de nem zárható ki a járulékos fehérjék szerepe sem. A KCNA5 gén által kódolt $K_v1.5$ fehérje a humán pitvarban megfigyelhető I_{Kur} áram legvalószínűbb molekuláris jelöltje. Egyéb preparátumokon a $K_v3.1$ (KCNC1), $K_v1.2$ (KCNA2) és $K_v2.1$ (KCNB1) jöhet szóba, mint csatornaalkotó fehérje [125].

2.1.2.3/B., A késői káliumáram lassú komponense (I_{Ks})

A szívizomsejteken észlelhető I_{Ks} -t a 11. kromoszóma rövid karján levő KCNQ1 (korábbi nevezéktan szerint K_vLQT1) gén által kódolt $K_v7.1$ csatornaféherje és a MinK, mint járulékos féherje együttes expressziója hozza létre [4]. A KCNQ család K^+ csatornáit a feszültségfüggő K^+ csatornák doménjeinek klasszikus, hat transzmembrán szegmensből álló felépítése jellemzi, azonban az α -alegységekből hiányzik a K_v csatornákra jellemző tetramerizációhoz szükséges régió. A 21. kromoszóma hosszú karján található KCNE1 gén által kódolt MinK féherje egyetlen transzmembrán doménből áll, és önmaga nem képez ioncsatornát. Szerepe, hogy a KCNQ1 féherjéhez β -alegységként kapcsolódva modulálja a pórusformáló alegység farmakológiai befolyásolhatóságát és működését. A veleszületett long-QT szindróma leggyakoribb formájáért, az 1-es típusú long-QT szindrómáért (LQT1) a KCNQ1 gén mutációja felelős [123]. A KCNE1 gén mutációját szintén leírták; ez a mutáció felelős a long-QT szindróma 5. típusának (LQT5) kialakításáért [26].

Az I_{Ks} depolarizáció hatására lassan aktiválódik és nincs inaktív állapota. Az aktiváció feszültségfüggését vizsgálva a félmaximális depolarizáló potenciál értékeit -13 mV és $+26$ mV között mérték [3, 61]. Az áram aktivációját biexponenciális függvény illesztésével jellemezhetjük, az aktiváció időfüggésének gyors időállandója $+50$ mV-ra depolarizálva 350 ms körüli, a lassú időállandó $8,5$ s körülinek adódik humán kamrai szívizomsejteken [57]. A deaktiváció időbelisége jelentősen fajfüggő; tengerimalac esetén lassú (360 ms), kutya és humán mintákon viszonylag gyors (60 - 150 ms) [31, 47].

Az I_{Ks} -t főként K^+ ionok hordozzák, de a csatorna kevésbé szelektív K^+ ionokra, mint az I_{Kr} -t létrehozó KCNH2 ioncsatorna [61]. Különböző emlősfajokban mérve egyetlen ioncsatorna konduktanciája mintegy 3 – 5 pS-nek adódik [3]. Az extracelluláris K^+ koncentráció nincs közvetlen hatással a csatornák vezetőképességére, azonban az intracelluláris Na^+ és Ca^{2+} koncentráció emelkedése növeli az I_{Ks} -t [73].

Irodalmi adatokból ismert, hogy β -adrenerg stimuláció hatására az áram aktivációjának feszültségfüggése negatívabb membránpotenciálok irányába tolódik, illetve lassul az áram deaktivációja [120]. α -adrenerg hatás növeli [119], egyes farmakonok — például amiodaron — krónikus adagolása, illetve hypothyroidismus csökkenti az I_{Ks} -t [7, 8]. Kutyaiban komplett AV-blokk miatti szívizom hipertrófiában mindkét szívkamra sejtjein kisebb az I_{Ks} amplitúdója, mint a kontroll körülmények között [117].

2.1.2.3/C., A késői káliumáram gyors komponense (I_{Kr})

Az I_{Kr} -t létrehozó ioncsatorna a feszültségfüggő K^+ csatornák *eag* családjának *erg* alcsaládjába tartozik. A csatornaalkotó $K_v11.1$ fehérjét a 7. kromoszóma hosszú karján elhelyezkedő *KCNH2* gén (korábbi neve: *hERG*) kódolja [87]. A *MiRP1* fehérje az ioncsatornával kölcsönhatásba kerülve módosítja annak kapuzását és permeabilitását [64]. A *MiRP1*-et a 21. kromoszóma hosszú karján elhelyezkedő *KCNE2* gén kódolja. A $K_v11.1$ -hez járulékos alegységként a korábban már említett *minK* is kapcsolódhat.

A *KCNH2* mutációja a long-QT szindróma 2. típusát (LQT2) okozhatja [22], míg a *KCNE2* gén mutációja felelős a long-QT szindróma 6. típusáért (LQT6) [15].

Az I_{Kr} gyorsan aktiválódik, az aktiváció félmaximális feszültségértéke -20 mV és -5 mV között van. A csatorna aktivációja független az extracelluláris kálium koncentrációjától [94]. Az aktiváció és deaktiváció időállandói fajonként eltérőek, és függenek a membránpotenciáltól is. Az I_{Kr} aktivációs időállandója mintegy 100 – 500 ms ($+50$ mV) [11, 88], humán szívmű esetén nagyjából 100 – 200 ms ($+50$ mV) [114, 115], ami jóval gyorsabb aktivációt jelent, mint az I_{Ks} esetén megfigyelhető. Humán és kutya szívműsejteken azonban az I_{Kr} lassabban deaktiválódik, mint az I_{Ks} [31, 47], ennek megfelelően időbeli lefutása is jóval elnyújtottabb az I_{Ks} -énél.

Az egészséges konfigurációban mért áramjel időbeli lefutása szaturációt mutat az inaktiváció legcsekélyebb jele nélkül. A steady-state áram feszültségfüggése 40 mV környékén mutat maximumot, és nagyobb mértékű depolarizáció hatására az áram-amplitúdó csökken. Kimutatták, hogy az I_{Kr} ezen tulajdonságáért valójában egy nagyon gyors inaktivációs lépés felelős mely a csatorna lassú megnyílását követi [132]. A $K_v11.1$ csatornák ezen tulajdonsága tehát nem a klasszikus értelemben vett egyenirányítás, hanem az ioncsatornák kapuzási kinetikájából következő sajátosság.

A csatorna főként K^+ ionokra nézve permeabilis, bár K^+ szelektivitása közel sem olyan nagymértékű, mint pl. az I_{K1} -et létrehozó $K_{ir}2.1$ fehérjékből álló ioncsatornának. Élettani körülmények között egyetlen ioncsatorna konduktanciája 2 pS körüli [52].

Az I_{Kr} szelektív gátlószerei, mint az E-4031, a dofetilid vagy a D-sotalol metánszulfonilid szerkezetű vegyületek, melyek jelentősen növelik a kamrai akciós potenciál hosszát [39, 88, 98]. Ezen tulajdonságuk alapján az I_{Kr} gátlószereket a III. osztályú antiaritmiás gyógyszerek közé sorolják [12]. Az I_{Kr} gátlását nem csak antiaritmiás szerek jelenlétében figyelhetjük meg, hanem például egyes antihisztamin szerek (pl. terfenadin, astemizol, cetirizin), mikroba-ellenes szerek (pl. erythromycin, ketokonazol), gyomor-

bélrendszerre ható gyógyszerek (pl. cisaprid), illetve antipszichotikumok (pl. haloperidol) is hasonló hatást gyakorolnak rá [67]. Közös vonása a fent felsorolt szereknek, hogy legalább egy aromás gyűrűt tartalmaznak, valamint, hogy I_{Kr} blokkoló hatásukat az által fejtik ki, hogy a nyitott állapotú csatornák pórusába kötődnek, majd a csatorna aktivációs kapujának záródása után ottrekednek és eldugítják azt. Az extracelluláris káliumkoncentráció csökkenése csökkenti az I_{Kr} amplitúdóját [89], és egyúttal érzékenyebbé teszi a csatornákat dofetilid vagy kinidin által okozott gátlással szemben [131]. A külső tér felől ható kétértékű kationok szintén gátolják a $K_v11.1$ csatornát [38, 97]. Az I_{Kr} csökken a szervezet acidózisának hatására is — ekkor egyrészt gyorsul az áram deaktivációja, másrészt az aktiváció feszültségfüggése is módosul [116].

A késői káliumáramot létrehozó csatornák expressziója változik az egyedfejlődés során [134]. Egér modellen végzett vizsgálatokban azt tapasztalták, hogy az embrióban főként $K_v11.1$ ioncsatornák (I_{Kr}) expresszálódnak, újszülött egerekben az arány megfordul a $K_v7.1$ ioncsatorna (I_{Ks}) javára; ugyanakkor felnőtt egerekben sem I_{Kr} sem I_{Ks} nem mutatható ki [122].

Kutya modellen létrehozott teljes AV-blokk, és következményes kamrai hipertrófia során az I_{Kr} áramsűrűsége csökkent a jobb kamrai kardiomiocitákban a kontroll csoporthoz képest, míg a bal kamrában nem volt szignifikáns eltérés [117].

2.2., A β -adrenerg stimuláció

2.2.1 Az adrenerg receptorok

Az adrenerg receptorok a sejtfelszíni 7-transzmembrán receptorok (7-TM-R) családjába tartoznak. Ezek a receptorok elsősorban intramembrán szerkezetűek, részben pedig a primer szerkezet homológiája alapján szupercsaládot képeznek. A szupercsalád tagjai valamennyien monomer fehérjék, egyetlen hosszú polipeptidláncból állnak, amely hét hidrofób α -hélix szakasszal kigyózik át a plazmamembránon, amelyeket 3 intracelluláris hurok (i1-3) és 3 extracelluláris hurok (e2-4) köt össze. A fehérje N-terminálisa extracellulárisan, C-terminálisa intracellulárisan helyezkedik el. Valamennyi 7-TM-receptor jelkövetítési mechanizmusában közös, hogy az agonista ligand megkötését követően a jelkövetítés első lépése a

plazmamembrán belső felszínén elhelyezkedő heterotrimer G-proteinek ($G\alpha\beta\gamma$ - guanin nukleotid kötő fehérje) valamelyik típusának az aktiválása [55].

Az adrenerg receptorokat aminosav-szerkezetük és ligandaffinitásuk alapján osztályozhatjuk. Ezek szerint megkülönböztethetünk α_1 , α_2 , β_1 , β_2 és β_3 -adrenerg receptorokat [46].

Az α_1 -adrenerg receptor G_q fehérjéhez kapcsolódik. Agonistái a noradrenalin, phenylephrin, methoxamin, cirazolin és xylometazolin. Antagonistái közül az alfuzosin, doxazosin, phenoxybenzamin, phentolamin és prazosin a legjelentősebbek [30, 66].

Az α_2 -adrenerg receptorok G_i fehérjéhez kapcsolódnak és gátolják a membránkötött adenilát-cikláz (AC) enzimaktivitását. Legismertebb agonistái a dexmedetomidin, a medetomidin, a romifidin, a clonidin és a xylazolin. Antagonistái többek között a phentolamin, az yohimbin, a idazoxan és az atipamezol [30].

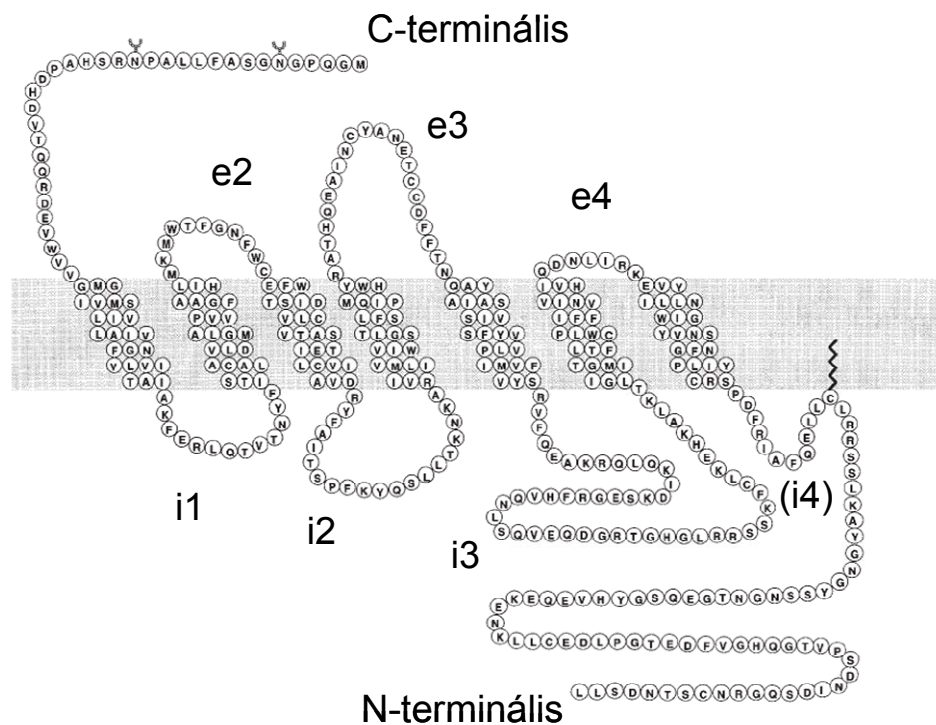
A β -receptor izomerek valamennyien G_s fehérjéhez kapcsolódnak, aktiválódásukkor növelik a sejtek AC aktivitását, ezen keresztül az intracelluláris cAMP szintet. Agonista-specifitásáért az $\alpha_3,6$ és 7 helixek a felelősek, amelyek mintegy ligandkötő zsebet alkotnak. A receptor G_s fehérje interakcióját a fehérje C-terminálisa, a G-fehérje szelektivitását az i2 hurok és az i3 hurok amino- és karboxiterminálisa biztosítja.

A β_1 -receptorok fehérjét a 10. kromoszómán (10q24-q26) elhelyezkedő ARDB1 gén kódolja. β_1 -receptorok a pitvari és kamrai szívizomsejteken, a vese juxtaglomeruláris apparátusának renintermelő sejtjein és a gyomor P/D1 sejtjein található. Aktiválódásuk többek között pozitív chronotróp, pozitív dromotróp, pozitív inotróp és bathmotróp hatást közvetít, fokozza a vese renin és a gyomor ghrelin elválasztását [138]. Agonistái az adrenalin, izoproterenol, denopamin és xamoterol. Antagonistái a legismertebb II. osztályú antiaritmiás szerek: metoprolol, bisoprolol, atenolol, nebivolol, stb. [30].

A β_2 -receptorok szerkezetüket tekintve nagyfokú homológiát mutatnak a β_1 -receptorokkal [99]. Agonistái ismert asthma- és tokolítikus gyógyszerek: adrenalin, izoproterenol, salbutamol, salmeterol, terbutalin és a ritodrin. Szelektív antagonistája a butoxamin, de gátolja az összes nemszelektív II. osztályú antiaritmiás szer is [30]. A fehérjét az 5. kromoszómán (5q31-q32) elhelyezkedő ARDB2 gén kódolja.

A β_3 -receptorok a receptorcsalád legutoljára felfedezett tagjai. Legismertebb előfordulási helyük a zsír és barnazsír szövet, funkciójuk a lipolízis és a hőtermelés fokozása. Néhány specifikus β_3 -receptor agonistáról ismert anxiolitikus hatása, így feltételezhetően a receptorok a központi idegrendszerben is előfordulnak, funkciójuk azonban még nem teljesen tisztázott [95]. Kimutatták őket az epehólyag falában, a húgyhólyag falában (relaxáló hatásuk

van) és az agy zsírszövetében is. A fehérjét az 8. kromoszómán (8p12) elhelyezkedő ARDB3 gén kódolja. Specifikus agonistái az amibegron, solabegron és nebivolol. Antagonistája a SR 59230A, amely molekula azonban α_1 -gátló hatással is bír.



6.ábra: A humán β_2 -adrenerg receptor szerkezete. A C-terminális vég az extracelluláris, az N-terminális az intracelluláris térben van. i1-3 intracelluláris hurkokat, e2-4 extracelluláris hurkokat jelölnek. A C-terminális közelében lévő cisztein membránhoz kötődése miatt egyes szerzők i4 hurkot is megkülönböztetnek. Ligget munkája alapján [58].

2.2.2., Az adrenerg receptorokhoz kapcsolódó jelátviteli útvonalak

Az intracelluláris jelátviteli útvonalak közös tulajdonsága, hogy reverzibilis fehérje-foszforiláció és defoszforiláció révén valósulnak meg. A foszforilációs folyamatot protein-kinázok katalizálják és foszfoprotein-foszfatazok szüntetik meg. A fehérjék foszforiláltsági állapotát a két enzimaktivitás egyensúlya határozza meg. Az általunk vizsgált útvonalak a cAMP/PKA és a PLC/IP₃-DAG útvonalak voltak.

2.2.2.1., cAMP/PKA útvonal

Az útvonal G_s és G_i -fehérje kapcsolt receptorok ligandkötésével aktiválódik. Ennek hatására a G-fehérjék α alegysége GTP kötött formában aktiválja vagy gátolja az adenilát-cikláz. Az aktív adenilát-cikláz fokozza a sejt cAMP szintjét, a cAMP PKA-hoz kötődve aktiválja azt [108, 130].

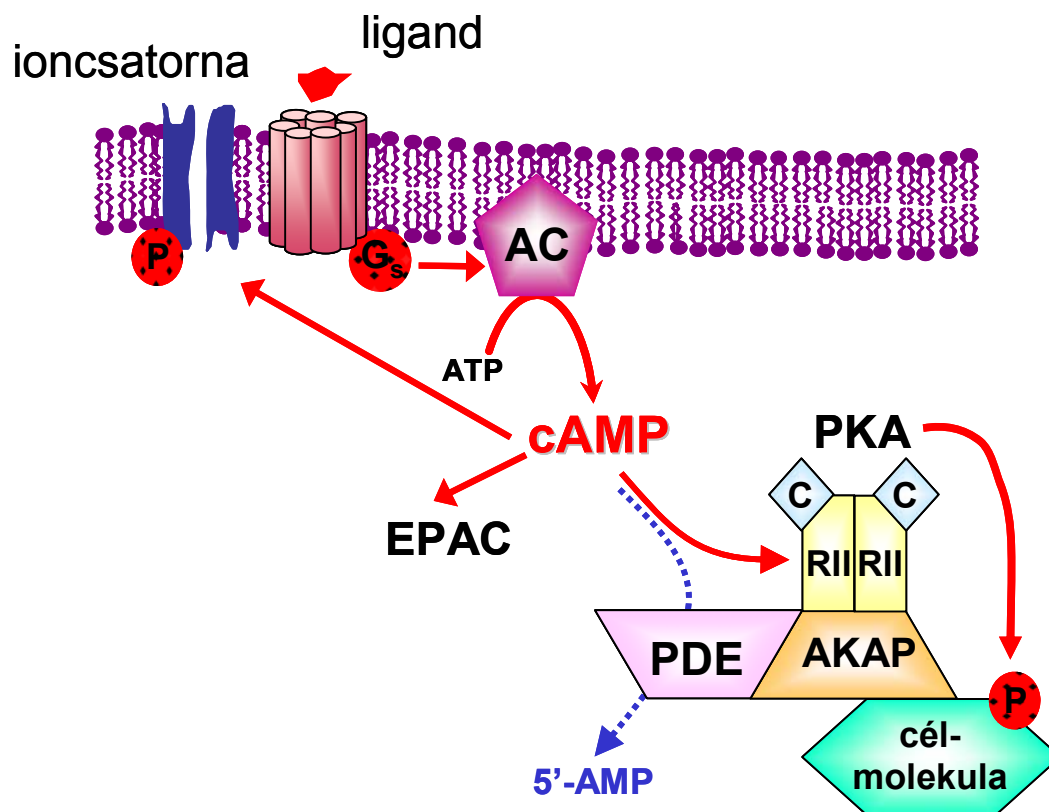
A G_s- és G_i-fehérjék szerkezetüket tekintve heterotrimer proteinek, G α , G β és G γ alegységekből állnak. A G_s-fehérjék aktiválják, a G_i-fehérjék gátolják az AC enzimet. Ez az enzim felelős a sejt cAMP szintjének emeléséért, az intracelluláris ATP cAMP-vé átalakításával. Az adenilát-cikláz enzimcsalád kilenc membránba horgonyzott [100] és egy szolubilis [9] izoformát foglal magába (AC1-10). A membránba horgonyzott formákat heterotrimer G-fehérjék képesek modulálni (aktiválni vagy gátolni), így ezek a formák kulcsszerepet játszanak egyes sejten kívülről érkező jelek feldolgozásában. A szolubilis forma működését ezzel szemben ezek a G-fehérjék nem képesek befolyásolni. A G_s α és G_q α alegységek növelik az AC aktivitását és így a cAMP szintet, a G_i α fehérjék ezzel szemben gátolják az AC aktivitást, így csökkentik a sejt cAMP szintjét. Az AC1, AC3, AC5, AC6 és AC9 izoforma aktivitást az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció is befolyásolja [19], így modulálhatja az érintett jelátviteli útvonalakat.

A szívizomban az AC4, AC5, AC6 és AC7 izoforma expresszálódik, de mRNS szinten az AC9 is jelen van. Az AC5 szintje az életkor előrehaladtával növekszik, míg AC6 szintje változatlan marad. Szívelégtelenségben az AC6 szintjének csökkenését írták le, az AC5 expressziója nem változik a kórfolyamat során [28].

Az AC által létrehozott cAMP egy ciklikus mononukleotid, amely intracelluláris — és esetenként extracelluláris [44] — jelátvivő molekulaként számos peptid- és aminosav-

szerkezetű hormon hatását mediálja. A cAMP fő forrása a sejt ATP tartalma, az átalakulást az AC enzim katalizálja. Elbontásáért a sejt foszfodiészteráz (PDE) enzimeit a felelősek, melyek 5'AMP-vé alakítják. Az aktuális cAMP szintet a két enzim (AC, PDE) egyensúlya határozza meg. A foszfodiészterázoknak számos izoformáját ismerjük, melyek eltérő aktivitással rendelkezhetnek. A szívizomban a PDE1-4 fordul elő. A PDE1 Ca^{2+} és kalmódulin érzékeny, a cAMP-n kívül a cGMP bontására is képes. Hasonló aktivitású a PDE2 is, ezt a formát a cGMP aktiválni képes. A cGMP-nek gátló hatása van a PDE3 izoformára, ez a forma a PDE2 és PDE4-gyel együtt csak a cAMP bontására képes. A szívizomban a foszfodiészterázok speciális szubmembrán elhelyezkedését írták le [82], ezáltal segíthetnek a cAMP függő folyamatok kompartmentalizációjában.

A PKA egy cAMP függő enzim, amely számos sejt folyamatban, többek között a génátírásban, sejtanyagcserében, a sejtciklus és apoptózis szabályozásában játszik szerepet. Az inaktív protein kináz A enzim négy alegységből — két katalitikus (C) és két regulatórikus, homo- vagy heterodimert alkotó (R) alegységből tevődik össze. A tetramerizációért az R-alegységek N-terminális doménjei felelősek. Az ebben az R-alegység kötött formában a C-alegységek enzimaktivitása elhanyagolható. Az R-alegységek két-két cAMP kötő helyet tartalmaznak, amely helyek kooperatív módon kötik a cAMP-t. A cAMP molekulák kötésekor a regulatórikus R-alegység dimerek disszociálnak a C-alegységekről, így a szabaddá váló C-monomerek felszabadulnak a gátlás alól. A regulatórikus alegységet négy gén kódolja: $\text{RI}\alpha$, $\text{RI}\beta$, $\text{RII}\alpha$ és $\text{RII}\beta$, a katalitikus alegységet három: $\text{C}\alpha$, $\text{C}\beta$ és $\text{C}\gamma$. A különböző szövetekben megfigyelhető PKA eloszlási, biokémiai és fizikai különbségekért leginkább az R-izoformák közti különbségek a felelősek, a C alegységek szerepe ebben a tekintetben elhanyagolható. A PKA enzimnek I (PKA1) és II (PKA2) típusát különíthetjük el, attól függően, hogy RI vagy RII alegységekből épül fel. A PKA1-et főként a citoplazmában, míg a PKA2-t különböző sejtorganellekhez asszociáltan találhatjuk. Ennek megfelelően a PKA2 — a PKA1-el ellentétben — nem egy „szabadon úszó” enzim, a kihorgonyzásáért az AKAP fehérjék felelősek. Ezek a horgonyzó fehérjék biztosítják a PKA2 enzim célspecificitását, illetve limitálják az enzim működését. Az így kihorgonyzott PKA molekulák csak a közelükben lévő fehérjék működését képesek befolyásolni, többek között feszültségfüggő ioncsatornákét [104] és az excitációs-kontrakciós kapcsolatában résztvevő fehérjék működését. Foszforilálni és így aktiválni képesek a rianodin receptort [60], a foszfolambánt [63], a troponin I -t illetve a miozinkötő protein C -t [13]. A PKA által foszforilált $\text{K}_v1.4$, $\text{K}_v4.2$ és $\text{K}_v4.3$ csatornákon átfolyó I_{to1} ugyanakkor csökken [110].

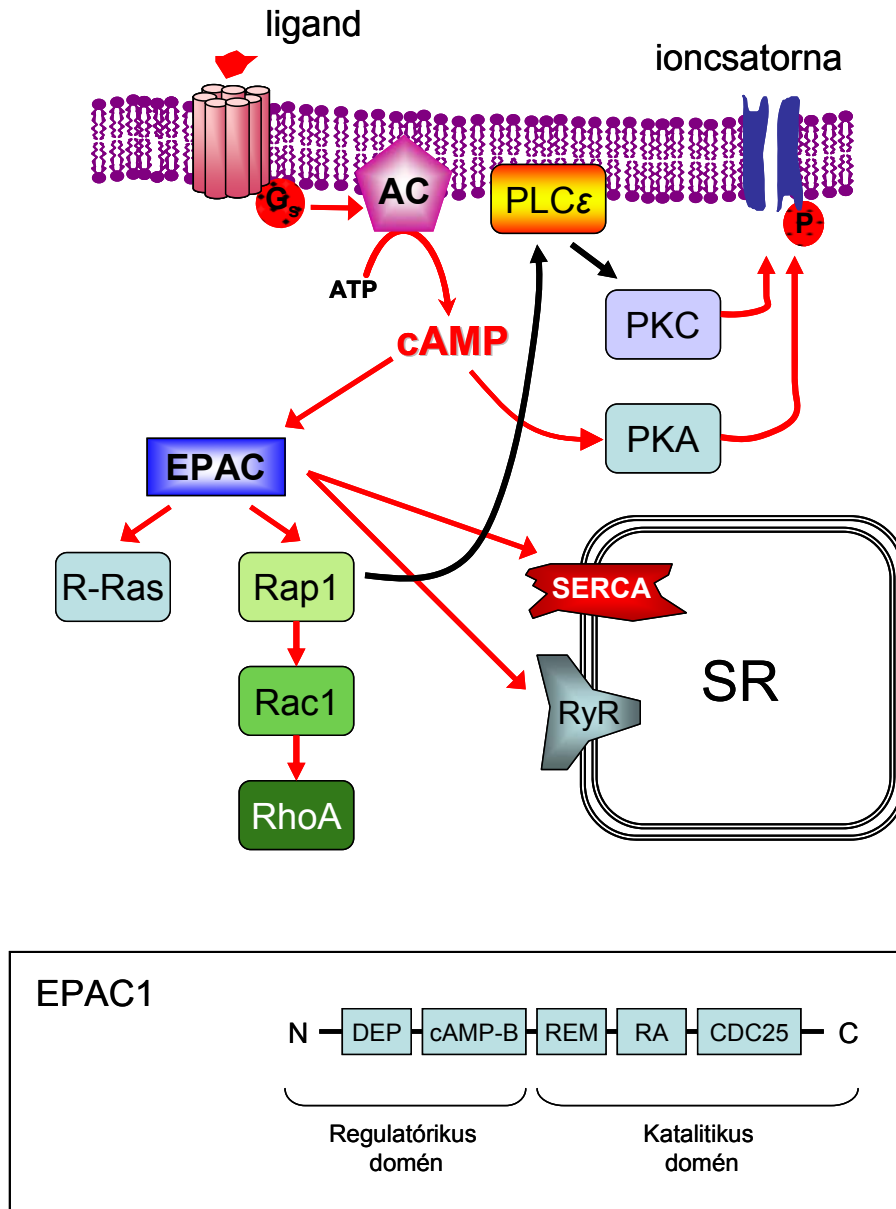


7. *ábra*: A cAMP/PKA útvonal. A sejtmembrán 7TM receptorai ligandkötésükkor G_s-fehérjéken keresztül AC-t aktiválnak, így növelik a sejt cAMP szintjét. A cAMP közvetlen ioncsatorna hatásai mellett, PKA-t aktivál, illetve hozzájárul az EPAC útvonal elindításához. A PKA membránköttött formában, vagy AKAP proteinek segítségével a célmolekulájához asszociáltan található, így tudja specifikusan foszforilálni azt. A cAMP elbomlását, így PKA aktivitásának megszűnését a sejt PDE molekulái biztosítják.

2.2.2.2., Az EPAC útvonal

A cAMP szint emelkedése a PKA-n kívül más célfehérjék működését is képes befolyásolni. Ilyen fehérje például az EPAC (Exchange Protein directly Activated by cAMP) [6]. Az EPAC egy, a monomer G-fehérjék GTP kötését fokozó GEF (Guanine Nucleotide Exchange) fehérje, ami segíti a monomer G-fehérjék aktivációját. Az EPAC két izoformáját írták le, az EPAC1-et és EPAC2-t. A két forma expressziós mintázata sejtspecifikus, és az életkor előrehaladtával is változhat. A szívizomban jellemzően az EPAC1 forma van jelen [51].

Az EPAC1 fehérje felépítése a PKA -hoz hasonlóan katalitikus és regulatórikus doménből áll. A C-terminális katalitikus régió CDC25 homológ domént tartalmaz, amely a GEF aktivitást biztosítja. Az ezt követő RA (Ras associating) és REM (Ras exchanger motif) domének a fehérje és Ras-GTPázok közti interakcióban játszhatnak szerepet.



8. ábra: Az EPAC útvonal. A sejt cAMP szintjének emelkedése a PKA útvonalon túl hozzájárul az EPAC útvonal elindításához is. Az EPAC aktiválja az R-Ras-t, a Rap1-et, amin keresztül a Rac1-et majd RhoA-t. A Rap1 PLCε aktivációhoz, ami a PKC útvonal elindításához, így számos fehérje, például ioncsatornák foszforilációjához vezet. Az EPAC közvetlenül aktiválja a RyR-t és a SERCA-t is. Az inzertben az EPAC1 felépítése van ábrázolva. Schmidt és mtsai. munkája alapján [91] módosítva.

Az N-terminális regulatórikus domén autoinhibítoros funkcióval bír, egy nagy affinitású cAMP kötő domén (cAMP-B) és egy pleckstrin domén építi fel. Utóbbi felelős a fehérje membránhoz kötéséért. Az EPAC2 a fenti összetételen felül alacsony affinitású cAMP kötő domént (cAMP-A) is tartalmaz, ennek biológiai funkciója még nem tisztázott, valószínűleg a PKA aktivációjában játszhat szerepet [81]. A sejten belül az EPAC fehérjék a membránhoz kötve, vagy a mikrotubulus rendszerhez asszociáltan találhatók. Funkciói közül kiemelendő az R-Ras és Rap1/RhoA aktivációja, ezen keresztül a migrációban, sejt polaritás kialakításában, az integrinek működésében, a sejtadhézióban és sejtalak változtatásában betöltött szerepe [65]. A Rap1 –en keresztül aktiválja PLC-t, így befolyásolhatja a PKC útvonalat is [121]. Az EPAC fehérjék modulálhatják az excitációs-kontrakciós kapcsolatot valamint az intracelluláris kalcium homeosztázist is, mivel direkt aktiváló hatással bírnak a RyR2-re és a SERCA pumpára [77].

2.2.2.3., A PLC/PKC útvonal

A PLC/PKC útvonal G_q -fehérjékhez kapcsolódó receptorok stimulációjával indul el. Az általuk aktivált fehérjék $G_q\alpha$ alegysége aktiválja foszfolipáz C-t, amely IP_3 -at és DAG-ot képez a sejtmembrán foszfolipidjeiből. Az IP_3 a DAG-gal együtt közvetlenül aktiválja a sejt PKC enzimeit, emellett növeli az intracelluláris kalcium koncentrációját az ER IP_3 -receptorainak stimulálásán keresztül. A felszabaduló kalcium számos sejt funkció szabályozásában szerepel, ezen kívül egyes PKC izoformák aktivátora.

A heterotrimer szerkezetű G_q -fehérjék a G_s - és G_i -fehérjékhez hasonlóan a sejtmembránhoz kötődve találhatók. Aktiválódásuk felelős a sejtmembránhoz asszociált foszfolipáz C (PLC) aktivációjáért. A PLC a sejtben membránhoz kötött formában van jelen, enzimaktivitása $G_q\alpha$ fehérje kötődésekor emelkedik meg. Az aktivált PLC a membrán foszfionozitol-biszfoszfát (PIP_2) tartalmát inozitol-1,3,5-trifoszfáttá (IP_3) és diacil-glicerollá (DAG) bontja.

A keletkező IP_3 vízdékony molekula. Képződésekor a citoplazmába kerül, amin keresztül eléri a sejt endoplazmatikus vagy szarkoplazmatikus retikulumát (ER, SR). Az endo- és szarkoplazmatikus retikulum membránjában IP_3 -receptorok találhatók, melyek IP_3 kötésekor kinyitnak, és rajtuk keresztül kalcium áramlik ki az a citoplazmába. Ez a folyamat alapvető az ER-rel rendelkező simaizom és mirigysejtek aktivációjában, azonban szerepe

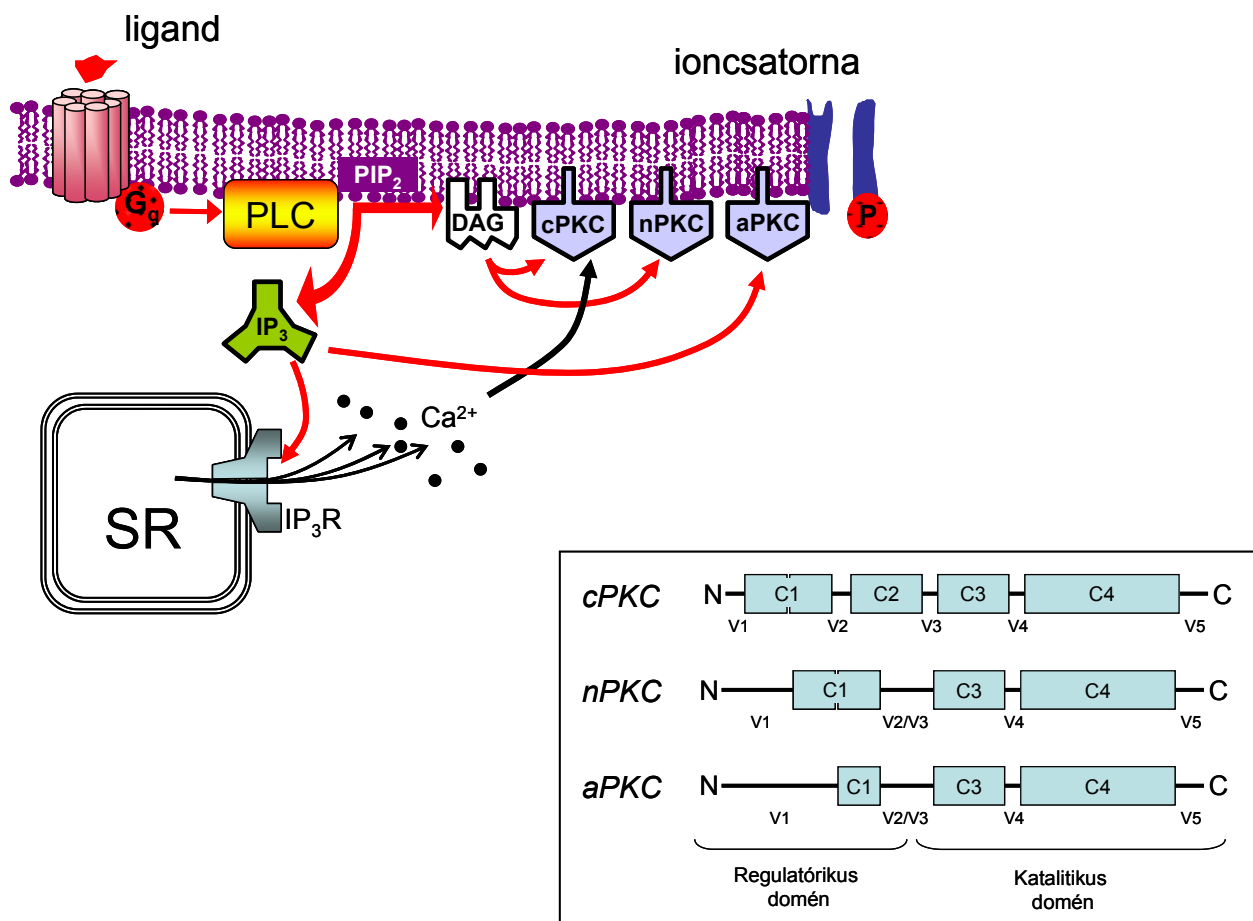
elhanyagolható szívizomsejtekben, az intracelluláris kalcium koncentráció emelésében. Bizonyos PKC izoformák aktivációjában az IP_3 is részt vehet, részben direkt módon, részben az intracelluláris kalcium koncentráció növelésén keresztül. A DAG lipofil molekula, így képződését követően mindvégig a sejtmembránban marad. Szerepe a membránkötött PKC aktivációjában van.

A PKC-t elsőként Inoué és munkatársai írták le 1977-ben, mint részleges proteolízis által aktivált foszforiláz aktivitást [42]. Napjainkban a PKC nem csupán egy enzimet, hanem egy egész enzimesaládot jelent, hisz legalább 12 féle PKC izoenzim került már leírásra [86] amely altípusokat a fehérje C-terminális végén elhelyezkedő, nagymértékben konzervált katalitikus és az N-terminális végen helyet foglaló variábilis regulatórikus domének alapján klasszifikálhatjuk [79].

A konvencionális enzimesalád (cPKC) tagjait mint kalcium és DAG függő enzimeket ismerjük [79]. Az enzimesalád tagjai az α PKC, β PKC, β IIPKC és γ PKC. A novel formák (nPKC) szerkezetükben nagyrészt a klasszikus típusokhoz hasonlítanak, azonban fehérjeláncuk nem tartalmazza kalciumkötő régiót, így a novel formák intracelluláris kalciumszinttől függetlenül működnek. Ezen család tagjai a δ PKC, ϵ PKC, η PKC és θ PKC, működésükhöz DAG és foszfolipidek szükségesek. A PKC enzimek harmadik alsaládját az atípusos formák képezik (aPKC). Szerkezetük nagyban eltér a klasszikus formától, sem kalciummal, sem DAG-gal nem aktiválhatók, foszfadil-szerin [33], inozitol-3,4,5-trifoszfát [70] és angiotenzin II [45] azonban képes a aktivációjára. Az enzimesalád tagjai a λ iPKC és a ζ PKC. Napjainkban egy negyedik PKC enzimesaládot is klasszifikáltak [34], melynek tagjai a ν PKC és μ PKC. A ν PKC enzimet számos szövetben, így például szívizomszövetben is megtalálták, felépítése és ubiquitináltsága alapján alapvető háztartási funkcióját feltételezik [34].

A szívizomsejtek PKC izoenzim összetétele jelentős kor- és fajfüggést mutat. Számos tanulmány számol be az α , δ és ϵ PKC altípusokról mind neonatális, mind felnőtt kamrai szívizomsejtekben [79]. A η PKC-t tenyésztett embrionális kamrai szívizomsejtekben mutatták ki, illetve kifejlett patkány és nyúl szívizom lizátumában [27, 78]. A ζ forma szintén embrionális szívizomsejtekben jelenik meg, azonban feltételezhető λ PKC-val történő keresztreakciója [24]. Az irodalmi adatok legellentmondásosabbak a β PKC izoforma esetén. Disatnik és munkatársai mind a β IIPKC, mind a β PKC izoformát kimutatták patkányembriók kamrai szívizomsejtjeiben [24], ugyanígy leírták már ezen formákat kifejlett állatok szívizomsejtjeiben is [129]. Ugyanakkor Rybin és munkatársai egyik izoformát sem találták meg sem embrionális sem felnőtt patkánymintákban [86].

Az aktivált PKC számos fehérje foszforilációjára képes, így számos sejt működését befolyásolhatja. Sokrétű funkciója közül kiemelendő az 3. típusú muszkarinos acetil-kolin receptoron (M₃AChR) keresztüli aktivációja, mely simaizom összehúzódáshoz és szekretoros mirigyek aktivációjához (nyál, könny) vezet. α1-adrenerg receptoron keresztüli aktivációja többek között az erek, bronchusok, húgyhólyag, urethra, gasztrointesztinális traktus simaizmának kontrakcióhoz, szívizomsejteken pozitív inotróp hatás kifejlődéséhez, zsírsejtekben és hepatocitákban a glikogénolízis és glükoneogenezis fokozásához vezet. Befolyásolja a neuronális ingerlékenységet, a sejtnövekedést és az immunfolyamatokat is. Feltételezhetően szerepe lehet a tanulási folyamatokban és a memória kialakításában [80].



9. ábra: A PKC útvonal. A sejtmembrán 7TM receptorai G_q fehérjét aktiválnak, amely a PLC aktivációjához vezet. A PLC a membrán PIP₂ tartalmát bontja DAG-gá és IP₃-má. Az IP₃ eléri a sejt endoplazmatikus retikulumát, amiből kalciumot szabadít fel. A DAG a sejtmembránban marad. A cPKC izoformák Ca²⁺ és DAG függő módon, a nPKC formák Ca²⁺-tól függetlenül aktiválódnak. Az aPKC formákat IP₃ aktiválja. Az inzertben a különböző PKC családok felépítése látható. C1- DAG kötő domén, C2- Ca²⁺ kötő domén. A C3 tartalmaz egy ATP kötőhelyet, mely a C4-gyel együtt alkotja a kináz régiót.

3., Célkitűzés

Számos munkacsoport vizsgálta mind a cAMP/PKA, mind a PLC/PKC útvonal I_{Kr} -re kifejtett hatását. A közölt adatok egymásnak ellentmondóak és speciesfüggőek, ezért célkitűzéseink a következők voltak:

1. a β -adrenerg stimuláció hatásának vizsgálata kutya kamrai szívműködő késői kálium áramának gyors komponensére (I_{Kr}) és annak kinetikai paramétereire
2. a hatás közvetítéséért felelős receptor altípus azonosítása
3. a késői kálium áram gyors komponensének szabályozásában résztvevő intracelluláris jelátviteli útvonalak feltérképezése
4. a PKC útvonal gátlószereinek (chelerythrine, GF109203X) közvetlen hERG csatorna gátló hatásának vizsgálata HEK sejteken
5. önkontrollként a β -adrenerg stimuláció kutya kamrai szívműködő késői kálium áramának lassú komponensére (I_{Ks}) kifejtett, az irodalomból már ismert aktiváló hatásának kimutatása.

4., Metodikák

4.1., Kutya bal kamrai szívizomsejtek izolálása

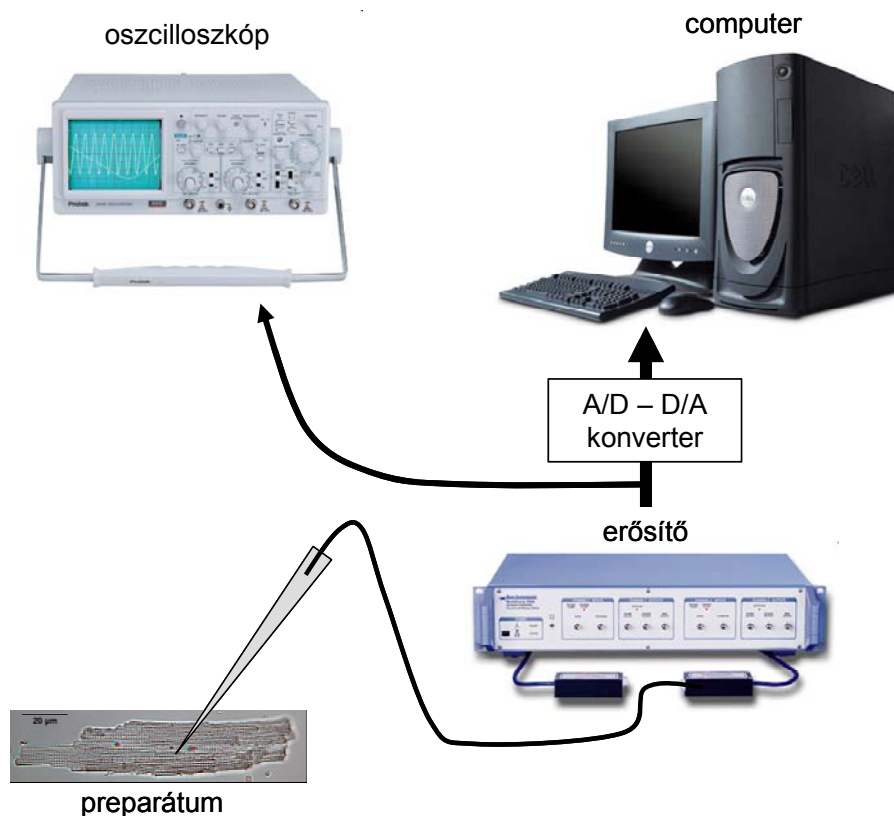
Kísérleteinket kutyák szívének bal kamrájából izolált szívizomsejteken végeztük. A sejteket ivarérett, kísérleti célra tenyésztett kutyák szívéből nyertük, az anterográd szegment-perfúziós technika [102] alkalmazásával. A 10–20 kg os állatokat 10 mg/kg ketamin-hidroklorid (Calypsolvet, SelBruHa Kft., Magyarország) és 1 mg/kg xylazin-hidroklorid (Sedaxylan, Eurovet Animal Health BV) alkalmazásával altattuk. A mellkas megnyitása után a szívet gyorsan kiemeltük, és a bal elülső leszálló koronária ágat kanuláltuk. Ezen artéria vérellátási területének megfelelően Langendorff apparátus segítségével perfundáltuk a miokardiumot. A perfúzió első 5 percében Ca^{2+} mentes, taurinnal (2,5 g/l), piruváttal (175 mg/l), ribózzal (750 mg/l), allopurinollal (13,5 mg/l) és NaH_2PO_4 -tal (200 mg/l) módosított JMM oldatot (Minimum Essential Medium Eagle; Joklik-féle módosítás, termékszám: M 0518; Sigma) alkalmaztunk a szövet Ca^{2+} és vértartalmának eltávolítása céljából.

Ezt a kimosási fázist követően a preparátumot megközelítőleg 30 percig perfundáltuk kollagenázzal (660 mg/l, 215 u/mg Type II.; Worthington), borjú albuminnal (2 g/l, Fraction V.; Sigma) és CaCl_2 -dal kiegészített (50 μM) „emésztő” JMM oldattal. A sejtizolálás során az oldatokat végig karbogénnel equilibráltuk és a perfúziós oldat hőmérsékletét 37 °C-on tartottuk. Az emésztőoldattal történő perfúzió végén a bal kamra falának midmiokardiális rétegét apró darabokra vágtuk, és a szövetdarabokat 50 μM kalciumot tartalmazó, a kimosáshoz is használt módosított JMM oldatban szuszpendáltuk. A sejtszuszenziót többször ülepítettük, szűrtük és mostuk az egyre növekvő kalciumkoncentrációjú módosított JMM oldattal. Az izolálást követően a szuszpenzióban levő sejtek mintegy 30–60 %-a pálcika alakú volt és tiszta harántcsíkolatot mutatott 2,5 mM kalciumot tartalmazó oldatban. A sejtizolálás befejezése után két-három órával kezdtük meg a kísérletek végzését. Felhasználásig a sejteket 14 °C-on tároltuk, Minimum Essential Medium Eagle oldatban (pH=7,4).

Minden elvégzett vizsgálat összhangban volt a „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (US NIH publication No 85-23. revised 1996) és a Helsinki Deklaráció alapelveivel. A kísérleti protokollt a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatetikai Bizottsága is jóváhagyta (No. 51-57/1997 OEJ).

4.2., A hERG csatornát expresszáló HEK sejtek

A hERG csatornákon átfolyó áram (I_{hERG}) vizsgálatához a csatornákat stabilan expresszáló HEK-293 sejt vonalat használtunk. A sejteket Dulbecco's Minimum Essential Medium- High Glucose Supplemented közegben tenyésztettük, melyet FBS-sel (10%), L-glutaminnal (2 mM), piruváttal (0,11 mg/ml), penicillin-G -vel (100 U/ml), Streptomycinnel (0,1 mg/ml, Invitrogen) és nem esszenciális aminosavakkal (Non-Essential Aminoacids, 5 ml, Sigma Aldrich). A sejtek 37°C-on, 5% CO₂-ot tartalmazó környezetben növekedtek.



10. ábra: Az elektrofiziológiai mérőrendszer vázlatja

4.3., Elektrofiziológiai mérések izolált sejteken

Kísérleteink kezdetekor a szívizomsejteket 37 °C hőmérsékleten tartott, 1 ml térfogatú plexiüveg mérőkádba helyeztük. A kádban levő szívizomsejteket Tyrode oldattal (144 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 1,2 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, 10 mM glükóz; pH=7,4), a HEK sejteket 140 mM Kolin-Cl, 5,0 mM KCl, 2,0 mM CaCl₂, 2,0 mM MgCl₂, 0,1 mM CdCl₂, 10 mM HEPES és 20 mM glükóz összetételű (pH=7,35) oldattal, 10 ml/perc sebességgel perfundáltuk. A mérések során ezeket az oldatokat egészítettük ki a megfelelő ioncsatorna-gátló szerekkel, illetve a vizsgált jelátviteli útvonalakat befolyásoló drogokkal (1. és 2. táblázat).

A mérésekhez 1,5-2,5 MΩ ellenállású boroszilikát mikroelektrodákat használtunk. A pipetta belső oldatának összetétele a különböző mérések során módosult, de minden esetben egy meghatározott összetételű alapoldat kiegészítésével. Az alap pipetta-belső oldat az alábbi anyagokat tartalmazta: 100 mM K-aszpartát, 45 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 3 mM K-ATP, 5 mM HEPES; pH=7,2. Ezt az alapoldatot az adott kísérletnek megfelelően a 2.táblázatban feltüntetett szerek valamelyikével egészítettük ki. A mérések során pipetta hegyét a sejt felszínéhez érintve enyhe szívást alkalmaztunk, elősegítve a nagyellenállású kapcsolat (1–10 GΩ; ún. „gigaseal”) kialakulását. A gigaseal kialakulása után további szívással, vagy 1–5 ms hosszú 1,5 V nagyságú elektromos impulzus alkalmazásával törtük át a pipetta hegye alatti membrándarabot az egészszejtes elrendezés eléréséhez. A sejtek membránfelületének kapacitását minden kísérlet előtt 10 ms hosszú, –10 mV-ról –20 mV-ra történő hiperpolarizáció segítségével megmértük, és az ionáramokat az így kapott sejtkapacitásra vonatkoztattuk. A feszültség-clamp kísérletekhez felhasznált szívizomsejtek átlagos kapacitása 128±7 pF volt. A mérési elrendezés teljes soros ellenállása általában 3–6 MΩ-nak adódott.

Az elektrofiziológiai mérések kivitelezéséhez Multiclamp 700A (Axon Instruments) erősítőt használtunk. A számítógépes vezérléshez és adatgyűjtéshez pClamp 9.0 szoftvert alkalmaztunk. Az erősítő és a számítógépes szoftver közötti kapcsolatot Digidata 1320 A/D-D/A (Axon Instruments) jelátalakító teremtette meg. Az erősítőtől származó analóg jeleket oszcilloszkópon is megjelenítettük.

Alkalmazott drog	Alkalmazott koncentráció	Hatás
Nifedipin	5 μ M	I _{Ca,L} gátlószer
HMR 1556	1 μ M	I _{Ks} gátlószer
E-4031	1 μ M	I _{Kr} gátlószer
Forskolin	3 μ M	PKA aktivátor
CGP-20712A	300 nM	Szelektív β_1 -receptor gátlószer
Izoproterenol	10, 100 nM	β -receptor aktivátor
Chelerytrine	0,03-1 μ M	PKC gátlószer
GF-109203X (bisindolylmaleimide I)	0,1-1 μ M	PKC gátlószer

1. táblázat: A mérések során használt drogok, koncentrációik és hatásuk

Alkalmazott drog	Alkalmazott koncentráció	Hatás
cAMP	250 μ M	PKA aktivátor
8-Br-cAMP	250 μ M	stabil cAMP analóg, PKA aktivátor
6-Bnz-cAMP	100 μ M	PKA aktivátor EPAC aktiváció nélkül
8-pCPT-2'-O-Me-cAMP	100 μ M	EPAC aktivátor PKA aktiváció nélkül
Rp-8-Br-cAMP	100 μ M	PKA gátlószer

2. táblázat: A pipetta-belső oldat kiegészítésére használt szerek, koncentrációik és hatásuk

4.3.1., Az I_{Kr} mérése

A szívizomsejteken mérhető ionáramokat farmakológiai és kinetikai sajátásaik alapján különítettük el. Az I_{Kr} -t egy 250 ms hosszú, +30 mV-ra történő depolarizációs impulzus segítségével aktiváltuk, majd a membránpotenciált -30 mV-ra állítottuk be. Az ingerlési frekvencia 0,033 Hz volt. A kísérletek során a sejteket -40 mV-os tartópotenciálon tartottuk, ami inaktív állapotban tartotta a feszültségfüggő nátrium csatornákat. A feszültségfüggő kalciumcsatornák aktivációját 5 μ M nifedipin alkalmazásával gátoltuk. Az áramgörbék analízise során a farokáram amplitúdóját mértük, melyet a -30 mV-ra történő repolarizáció során mért áram csúcsértékének és a nem inaktiválódó komponens amplitúdójának különbségéből határoztunk meg (5. ábra).

4.3.2., Az I_{hERG} mérése

Az I_{hERG} -t egy 3 másodperc hosszú, +30 mV-ra történő depolarizációs impulzus segítségével aktiváltuk. Az aktiváló impulzust követően a membránpotenciált a nyugalmi értékre állítottuk vissza. A kísérletek során a sejteket -80 mV-os tartópotenciálon tartottuk. Az ingerlési frekvencia 0,033 Hz volt. Mivel a sejtek kizárólag hERG csatornákat expresszáltak, így ezekben a kísérletekben nem volt szükség egyéb ioncsatorna gátlószer alkalmazására. Az áramgörbék analízise során ez esetben is a farokáram amplitúdóját határoztuk meg.

4.3.3., Az I_{Ks} mérése

Az I_{Ks} -t egy 3 másodperc hosszú, +30 mV-ra történő depolarizációs impulzus segítségével aktiváltuk. Az aktiváló impulzust követően a membránpotenciált a nyugalmi értékre állítottuk vissza. A kísérletek során a sejteket -40 mV-os tartópotenciálon tartottuk, ami inaktív állapotban tartotta a feszültségfüggő nátrium csatornákat. A feszültségfüggő kalciumcsatornák aktivációját ez esetben is 5 μ M nifedipin alkalmazásával gátoltuk. Az ingerlési frekvencia 0,1 Hz volt. A mérések analízise során ez esetben is a farokáram amplitúdóját mértük (5. ábra).

4.4., Az analízis során felhasznált matematikai formulák

$$I_{norm} = \frac{1}{1 + \left(\frac{E_{0,5}}{A}\right)^n} \quad \text{1. egyenlet}$$

ahol
 $E_{0,5}$ a félgátló koncentráció ($I_{norm}=0,5$),
A a vizsgált anyag koncentrációja,
n a görbe meredeksége, a Hill-koefficiens.

$$\frac{I}{I_{max}} = \frac{1}{1 + e^{\frac{V_{0,5}-V}{k}}} \quad \text{2. egyenlet}$$

ahol
 I/I_{max} a normalizált áram,
V az aktuális membránpotenciál értéke,
 $V_{0,5}$ az a membránpotenciál ahol $I=I_{max}/2$,
k a görbe meredeksége.

$$I = A_i(1 - e^{(-t/\tau_i)}) + C \quad \text{3. egyenlet}$$

ahol
A az amplitúdó,
 τ az időállandó,
C konstans.

$$I = \sum_{i=1}^n A_i e^{(-t/\tau_i)} + C \quad \text{4. egyenlet}$$

ahol
 A_1 és A_2 a gyors és lassú komponensek amplitúdói,
 τ_1 és τ_2 a gyors és lassú komponensek időállandói,
C konstans.

4.5., Statisztikai elemzés

A közölt adatok a kísérleti eredmények számtani középértékei \pm a középérték körüli standard hiba. A csoportok összehasonlítása során egyszempontos variancianalízist, Student-féle kétmintás t-próbát vagy önkontrollos t-próbát alkalmaztunk az adott statisztikai kérdéseknek megfelelően. Az adatok közötti korrelációk meghatározásához lineáris regressziót használtuk. Az eltéréseket $p \leq 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

5., Eredmények

5.1., Az izoproterenol hatása az I_{K_r} -re

Elsőként az izoproterenol kutya kamrai szívműködésére kifejtett hatását vizsgáltuk. Az I_{K_r} -t a 4.3.1 pontban részletezett módon aktiváltuk, majd az áram-amplitúdókat az idő függvényében ábrázoltuk. Ezen mérések során a sejteket 10, majd 100 nM izoproterenol tartalmú normál Tyrode oldattal perfundáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy az izoproterenol növelte a farokáram amplitúdóját, ahogy az a 11./A ábrán bemutatott reprezentatív kísérletben látható. Az ábrán fekete négyzetek jelölik a kontroll körülmények között rögzített áramot, zöld korongok 10 nM, piros háromszögek 100 nM izoproterenol jelenlétében mértéket. Üres háromszögek jelölik az izoproterenol kimosása alatti áramot. Ebben a kísérletben 10 nM izoproterenol 0,44 pA/pF-ról 0,53 pA/pF-ra, míg 100 nM izoproterenol 0,61 pA/pF-ra növelte a farokáram denzitását. A szer hatása gyorsan, mintegy 3 perc alatt kialakult. A mért áramot tiszta I_{K_r} -ként azonosítottuk, mivel a 100 nM izoproterenol mellett alkalmazott specifikus I_{K_r} gátlószer (1 μ M E-4031) a farokáramot eltüntette, értéke 0,62 pA/pF-ról 0,01 pA/pF-ra csökkent. A 11./B ábrán ennek a kísérletnek az analóg áramgörbéi láthatóak, melyeket az *a*, *b*, *c* és *d* –vel jelölt pontokban rögzítettünk.

Az izoproterenol hatása koncentráció függőnek bizonyult, ahogy azt a 11./C ábra mutatja. Ezekben a kísérletekben az izoproterenolt 1, 10, 100 és 1000 nM-os koncentrációban, kumulatív módon alkalmaztuk. Egy-egy koncentrációt a teljes hatás kifejlődéséig, mintegy 3-4 percig használtunk. Az ábra 5 kísérlet eredményéből számolt átlagokat és a standard hibát mutatja. Az eredményeket a kiindulási áramdenzitásra normalizáltuk, melyet 100 %-nak határoztunk meg. Azt tapasztaltuk, hogy 10 nM izoproterenol 13 \pm 4 %-kal, 100 nM izoproterenol 33 \pm 8 %-kal, 1 mM izoproterenol 34 \pm 5 %-kal növelte meg a farokáram denzitását. A különbség 10 nM -os koncentrációtól kezdve szignifikáns volt ($p \leq 0,05$, $n=5$). A kapott adatokat Hill-egyenlettel illesztettük meg (1. egyenlet). Az illesztéssel kapott félhatásos dózis (EC_{50}) értéke 13,63 \pm 2,47 nM-nak adódott, a Hill-koefficiens közel 1 volt (1,19 \pm 0,27). Mivel 100 nM izoproterenol maximális mértékben aktiválta az I_{K_r} -t, ezért a következő kísérleteinkben ezt a koncentrációt alkalmaztuk.

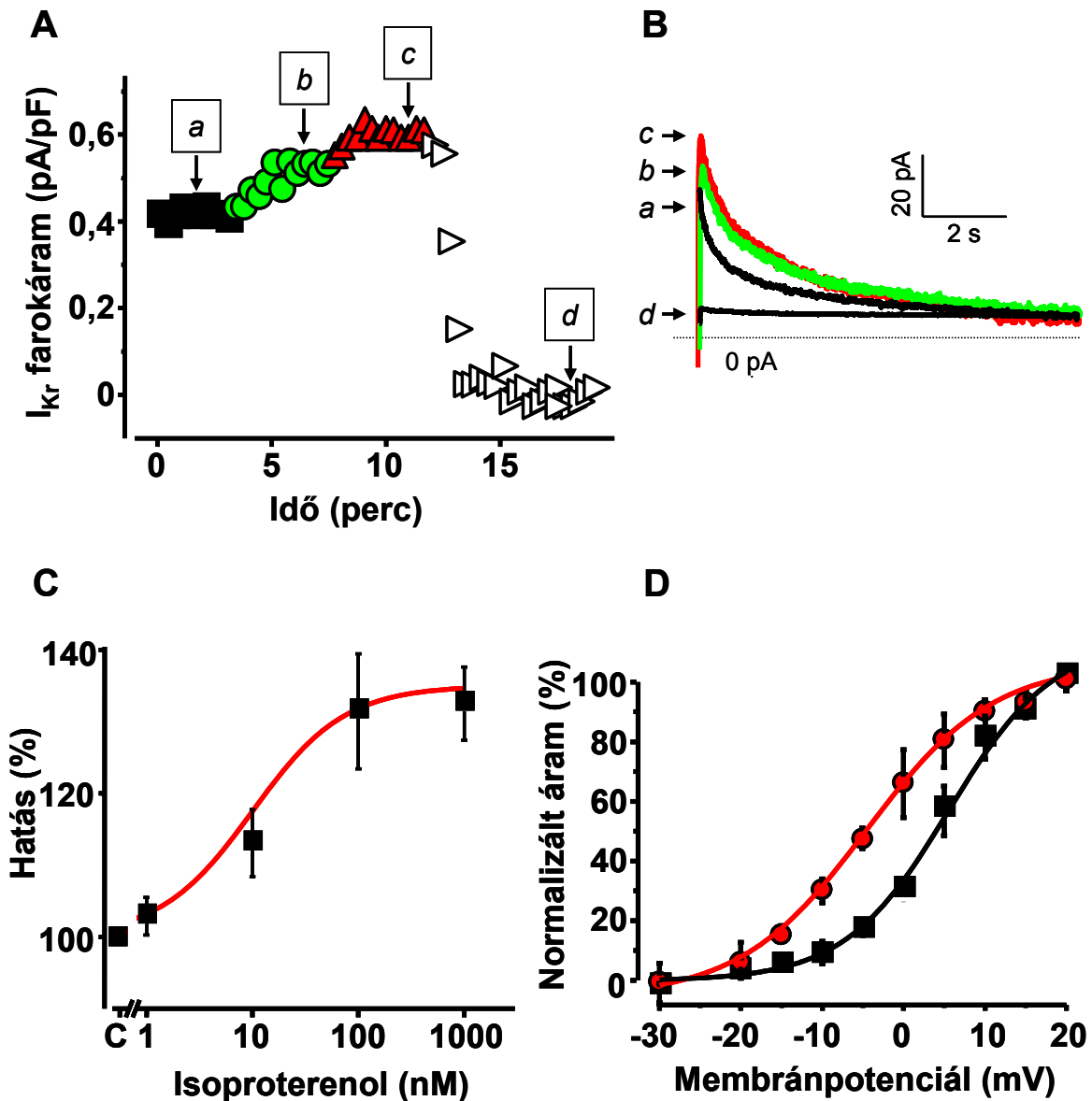
Az I_{K_r} aktivációjának feszültségfüggését 250 ms hosszú, -30 mV és $+20$ mV közötti depolarizáló impulzusokkal vizsgáltuk. Az egymást követő impulzusokat 5 mV-os lépcsőkben

alkalmaztuk. Az áram-amplitúdókat a +20 mV-nál mért áram-amplitúdókra normalizáltuk és az aktiváló impulzus nagyságának a függvényében ábrázoltuk. A 11./D ábra 4 mérés eredményét foglalja össze. Fekete szín jelöli a kontroll, piros 100 nM izoproterenol jelenlétében mért áramot. Megállapítottuk, hogy 100 nM izoproterenol az I_{Kr} feszültségfüggését balra tolta. Ez azt jelenti, hogy az áramot már kisebb mértékű depolarizáció aktiválja. A kapott adatokat Boltzmann-egyenlettel (2. egyenlet) illesztve a félaktivációs feszültségek ($V_{0,5}$) kontroll esetben $5,6 \pm 0,9$ mV-nak, míg 100 nM izoproterenol jelenlétében $-4,6 \pm 1,2$ mV-nak adódtak ($p \leq 0,05$, $n=4$). A görbék meredeksége nem változott jelentősen, izoproterenol kezelés hatására $6,7 \pm 0,5$ mV⁻¹ –ről $7,4 \pm 0,5$ mV⁻¹ –ra.

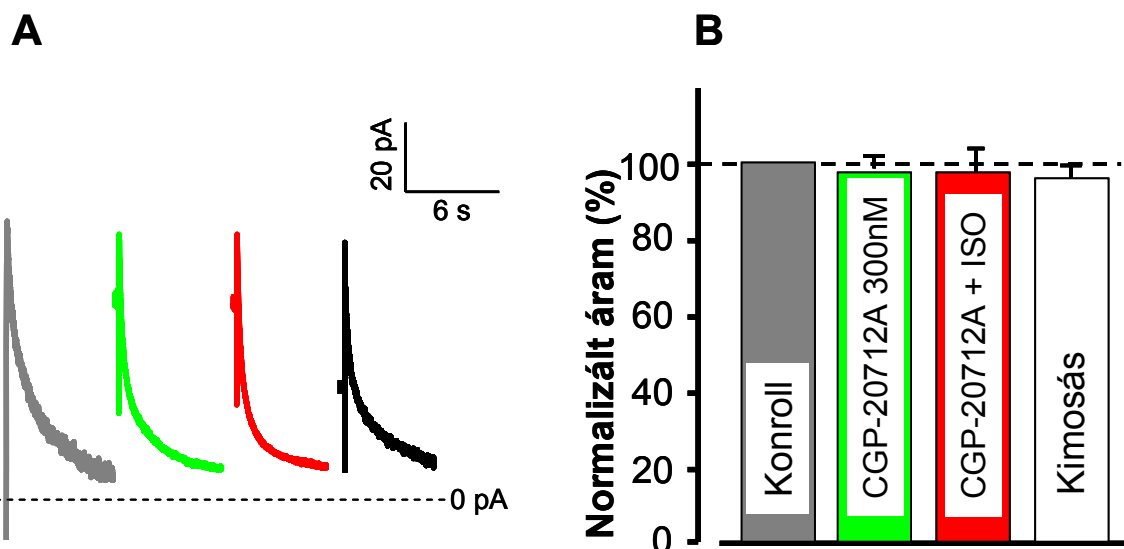
5.2., Az izoproterenol hatásmechanizmusa

Az izoproterenol nem specifikus β -adrenerg receptor agonista. Az irodalomból ismert, hogy szívműködés kalciumáramának módosító hatását a β_1 -receptorok aktiválásán keresztül fejt ki [124], azonban nem áll rendelkezésünkre adat arról, hogy a β -adrenerg receptorok melyik altípusa érintett kutya kamrai szívműködés késői káliumáram gyors komponensének szabályozásában. Elsőként a β_1 -adrenerg receptorokat vizsgáltuk. A mérések során a β_1 -receptorokat 300 nM CGP-20712A-val gátoltuk, ami a β_1 -adrenerg receptorok specifikus gátlószere. Az I_{Kr} mérését az alábbiak szerint végeztük: kontroll árammérést követően a sejteket 300 nM CGP-20712A-t tartalmazó mérőoldattal perfundáltuk, majd a β_1 -receptor gátlószer mellett 100 nM izoproterenolt alkalmaztunk. Ezt követte az izoproterenol kimosása CGP-20712A-t tartalmazó mérőoldatban. 12./A ábra egy reprezentatív kísérlet analóg farokáram-görbéit mutatja. Szürke szín mutatja a kontroll, zöld CGP-20712A jelenlétében, piros a gátlószer mellett 100 nM izoproterenol jelenlétében mért áramot. Fekete görbe az izoproterenol kimosása után mért áramot jelöli. Ahogy azt az analóg áramgörbék mutatják, 300 nM CGP-20712A nem befolyásolta jelentősen az I_{Kr} amplitúdóját (ebben a kísérletben 68 pA-ról 64 pA-re). A szer teljes mértékben kivédte a 100 nM izoproterenol által kiváltott I_{Kr} növelést, a farokáram nagysága ez esetben sem változott, 64 pA maradt. Jelentős változás az izoproterenol kimosása után sem történt, az áram nagysága 63 pA volt. A 12./B ábra 5 kísérlet eredményét foglalja össze. A mért farokáram amplitúdókat a kontroll értékre normalizáltuk, az ábrán az átlagokat és a standard hibát tüntettük fel. 300 nM CGP-20712A jelenlétében az

áram a kontroll $98\pm 3\%$ -a (N.S., $n=5$), míg 100 nM izoproterenol jelenlétében a kontroll $98\pm 4\%$ -a volt (N.S., $n=5$). Az izoproterenol kimosása után az áram a kiindulási érték $97\pm 3\%$ -a volt (N.S., $n=5$). Eredményeink alapján arra következtettünk, hogy az izoproterenol β_1 -receptorok aktiválásán keresztül fejti ki I_{Kr} növelő hatását, a β_2 -adrenerg receptorok valószínűleg nem játszanak szerepet a hatás közvetítésében.



11. ábra: Az izoproterenol I_{Kr} -re kifejtett hatása. **A**: Egy reprezentatív kísérletet ábrázol. Fekete négyzet jelöli a kontroll, zöld kör 10 nM , piros háromszög a 100 nM izoproterenol jelenlétében mért áramjeleket. Üres háromszög specifikus I_{Kr} gátló E-4031 alkalmazását jelzi. **B**: A kísérlet a, b, c, és d pontján rögzített analóg áramjeleket mutat. **C**: Az izoproterenol dózis-hatás görbéje, EC_{50} : $13.63\pm 2.47\text{ nM}$, Hill= 1.19 ± 0.27 , I_{max} : $138\pm 6\%$. **D**: Az I_{Kr} aktivációjának feszültségfüggése. Fekete szín jelöli a kontroll, míg piros 100 nM izoproterenol jelenlétében mért értékeket. Kontroll $V_{0,5}$: $5,6\pm 0,9\text{ mV}$, izoproterenol jelenlétében a $V_{0,5}$: $-4,6\pm 1,2\text{ mV}$. (átlag \pm SEM, $n=4$).



12. ábra: Az izoproterenol I_{Kr} -re kifejtett hatása specifikus β_1 -blokkoló drog jelenlétében. **A:** egy reprezentatív kísérlet során rögzített áramgörbék; szürke szín a kontroll, zöld a CGP-20712A jelenlétében, piros a gátlószer mellett izoproterenol jelenlétében rögzített görbékét jelöli. A fekete görbe az izoproterenol kimosása után rögzített. **B:** A kontroll áramra normalizált értékeket mutatja, zöld színnel 300nM CGP-20712A jelenlétében mért áram nagyságát, piros színnel a gátlószer és 100 nM izoproterenol jelenlétében mért áram nagyságát mutatja. Az izoproterenol kimosása utáni áramot üres oszlop mutatja. (átlag \pm SEM, n=5).

5.3., A PKA moduláció hatása az I_{Kr} -re

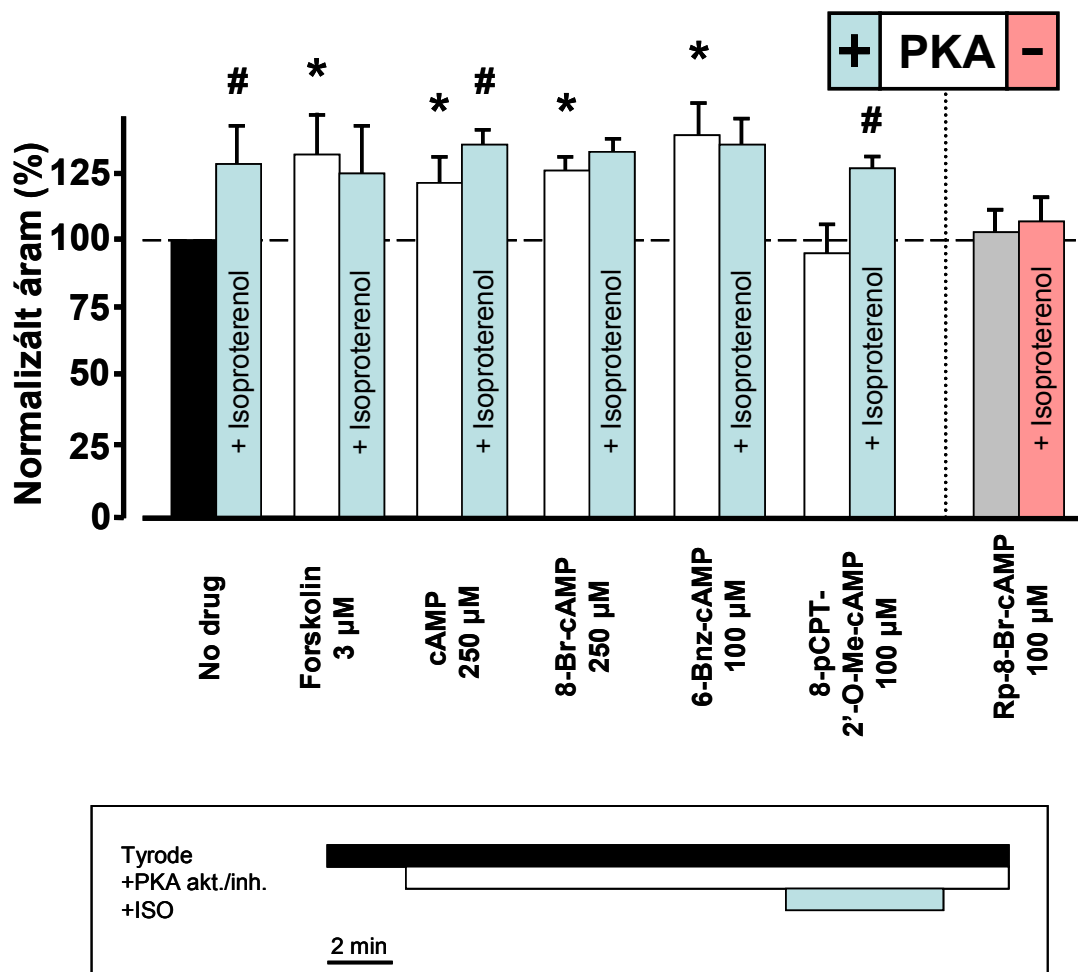
Az irodalmi adatok alapján azt feltételeztük, hogy az izoproterenol I_{Kr} -t növelő hatásában mind a PKA, mind a PKC jelátviteli útvonal szerepet játszhat. Elsőként megvizsgáltuk, miként befolyásolja az áramot, ha a PKA útvonalat receptorfüggetlen módon, közvetlenül aktiváljuk. Ezt a mérőoldathoz adott 3 μ M forskolinnal, vagy intracellulárisan, a pipetta-belső oldathoz adott 250 μ M cAMP-vel, 250 μ M 8-Br-cAMP-vel, vagy 100 μ M 6-Bnz-cAMP-vel végeztük. A forskolin és a foszfodiészteráz rezisztens cAMP analógok a cAMP-hez hasonlóan képesek a PKA aktiválására. A mérések során ezeket a molekulákat 10-12 percen keresztül alkalmaztuk (13. ábra inzert), majd az ekkor mérhető farokáram amplitúdóját a kísérletek elején mért amplitúdókhöz viszonyítottuk. 5-5 kísérlet eredményeit foglalja össze a 13. ábra.

Az ábrán fekete oszlop az aktivátorok alkalmazása előtt mért áram-amplitúdót jelöli, ezt tekintettük 100 %-nak. Kísérleteinkben a farokáram amplitúdója forskolin jelenlétében $31\pm 5\%$ -kal ($p\leq 0,05$, $n=5$), cAMP jelenlétében $21\pm 4\%$ -kal ($p\leq 0,05$, $n=5$), 8-Br-cAMP jelenlétében $25\pm 4\%$ -kal ($p\leq 0,05$, $n=5$), míg 6-Bnz-cAMP jelenlétében $39\pm 5\%$ -kal ($p\leq 0,05$, $n=5$) növekedett a kontroll áramhoz viszonyítva. Ez a növekedés csaknem azonos mértékű 100 nM izoproterenol által kiváltottal ($28\pm 5\%$ PKA aktiváció esetén, $38\pm 7\%$ izoproterenol jelenlétében).

Mivel a cAMP nemcsak a PKA-n keresztül fejtheti ki hatását, hanem az EPAC aktivációjával is, ezért 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP segítségével ellenőriztük az EPAC útvonal esetleges érintettségét is. A használt szelektív EPAC aktivátor molekula nem rendelkezik PKA aktivátor hatással. A pipetta-belső oldathoz adott 100 μ M 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP jelenlétében a farokáram amplitúdója nem változott szignifikánsan, $0,42\pm 0,07$ pA/pF-ot mértünk kontroll, $0,40\pm 0,09$ pA/pF-ot az EPAC aktivátor jelenlétében. Ez alapján arra következtethetünk, hogy az EPAC β -receptorokon keresztüli aktivációja nem vesz részt a késői káliumáram gyors komponensének szabályozásában.

A PKA közvetlen modulációjával egyidőben 100 nM izoproterenollal aktiváltuk a β -adrenerg receptorokat (13. ábra inzert). Az áram-amplitúdókat a kísérletek kezdetekor mért áramokhoz viszonyítottuk. Eredményeink azt mutatják, hogy a cAMP-vel előkezelt sejtek kivételével az izoproterenol nem volt képes tovább növelni a farokáramot. A farokáram nagysága forskolin alkalmazásakor $0,55\pm 0,06$ pA/pF majd $0,52\pm 0,09$ pA/pF, 8-Br-cAMP jelenlétében $0,52\pm 0,04$ pA/pF majd $0,54\pm 0,04$ pA/pF, 6-Bnz-cAMP jelenlétében $0,58\pm 0,06$ pA/pF majd $0,57\pm 0,05$ pA/pF volt (N.S., $n=5$). A cAMP-vel előkezelt sejteken az izoproterenol $0,50\pm 0,05$ pA/pF-ról $0,59\pm 0,05$ pA/pF-ra növelte az I_{Kr} amplitúdóját, ($p\leq 0,05$, $n=5$).

A PKA útvonal aktiválása mellett vizsgáltuk a PKA gátlás I_{Kr} -re kifejtett hatását is. Erre 100 μ M intracellulárisan alkalmazott Rp-8-Br-cAMP-t használtunk. Kontroll körülmények között a PKA gátlószer nem befolyásolta a farokáram amplitúdóját ($0,42\pm 0,07$ pA/pF volt kontroll, $0,43\pm 0,09$ pA/pF Rp-8-Br-cAMP jelenlétében, N.S., $n=5$), azonban a PKA gátlószer kivédte az izoproterenol aktiváló hatását, mivel jelenlétében az I_{Kr} amplitúdója $0,45\pm 0,09$ pA/pF volt (N.S., $n=5$). Eredményeink alapján arra következtettünk, hogy az izoproterenol β_1 -adrenerg receptorok aktiválásával, PKA függő módon növeli az áramot, illetve hogy a bazális PKA aktivitás nem befolyásolja a késői káliumáram gyors komponensét.

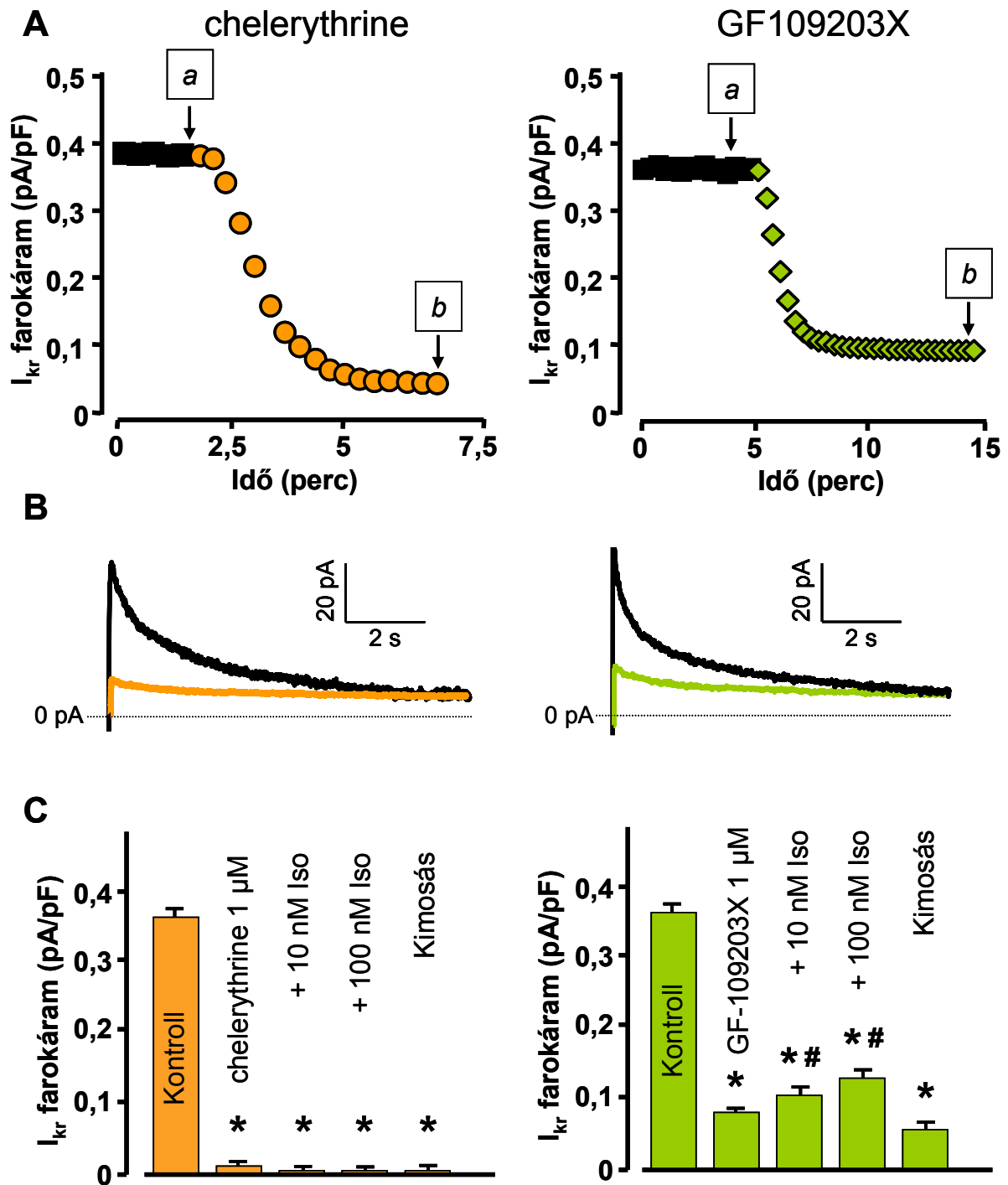


13. ábra: A PKA és EPAC útvonal modulációjának hatása az I_{Kr} -re. Az áram-amplitúdókat a fekete színnel jelölt kontroll áramra normalizáltuk. Üres oszlopok mutatják a PKA és EPAC aktivációja, szürke a PKA gátlása után mért áramot. A kontrollhoz képest szignifikáns különbségeket * jelöli ($p < 0,05$). Az útvonal aktiválása, vagy gátlása után izoproterenol jelenlétében mérhető áram-amplitúdókat kék és piros oszlopok mutatják. Az izoproterenol nélkül mért, de PKA modulált áramhoz képest szignifikáns különbséget # jelöli. ($p < 0,05$). (átlag \pm SEM, $n=5$). Az inzertben egy kísérlet sematikus bemutatása látható.

5.4., A PKC moduláció hatása az I_{Kr} -re

A PKC útvonal érintettségét két PKC gátlószer segítségével vizsgálatuk: a mérőoldatban 1 μ M chelerythrine-t vagy 1 μ M GF109203X-et alkalmaztunk. A két gátlószer eltérő PKC izoforma specificitásában különbözik. A 14./A és B ábra egy-egy reprezentatív kísérletet mutat be. Fekete szín a kontroll körülmények között mért áram-amplitúdókat és analóg görbéket, narancssárga az 1 μ M chelerythrine, míg zöld szín az 1 μ M GF109203X jelenlétében mért adatokat mutatja. Kísérleteinkben mind a chelerythrine, mind a GF109203X jelentősen lecsökkentette az I_{Kr} amplitúdóját. Chelerythrine jelenlétében 0,39 pA/pF-ról 0,04 pA/pF-ra, GF109203X jelenlétében 0,37 pA/pF-ról 0,11 pA/pF-ra csökkent az áram amplitúdója. A hatás kifejlődéséhez átlagosan 5 percet kellett várni. A 14./C ábra a PKC gátlószerekkel végzett 5-5 kísérlet eredményét foglalja össze. Megállapítottuk, hogy mindkét szer szignifikánsan csökkentette a farokáramot, 1 μ M chelerythrine 0,36 \pm 0,05 pA/pF-ról 0,01 \pm 0,001 pA/pF-ra, 1 μ M GF109203X 0,37 \pm 0,05 pA/pF-ról 0,11 \pm 0,03 pA/pF-ra ($p \leq 0,05$, $n=5$).

A gátlószerekkel történő előkezelést követően a PKC útvonalat β -receptor függő módon, izoproterenol segítségével aktiváltuk. Azt tapasztaltuk, hogy GF109203X jelenlétében az izoproterenol növelte az I_{Kr} amplitúdóját (100 nM izoproterenol 0,7 \pm 0,03 pA/pF-ról 0,12 \pm 0,05 pA/pF-ra, $p \leq 0,05$, $n=5$), ami azonban elmaradt ha chelerythrine-nel együtt alkalmaztuk (0,005 \pm 0,001 pA/pF 100 nM izoproterenol jelenlétében, N.S., $p=5$).

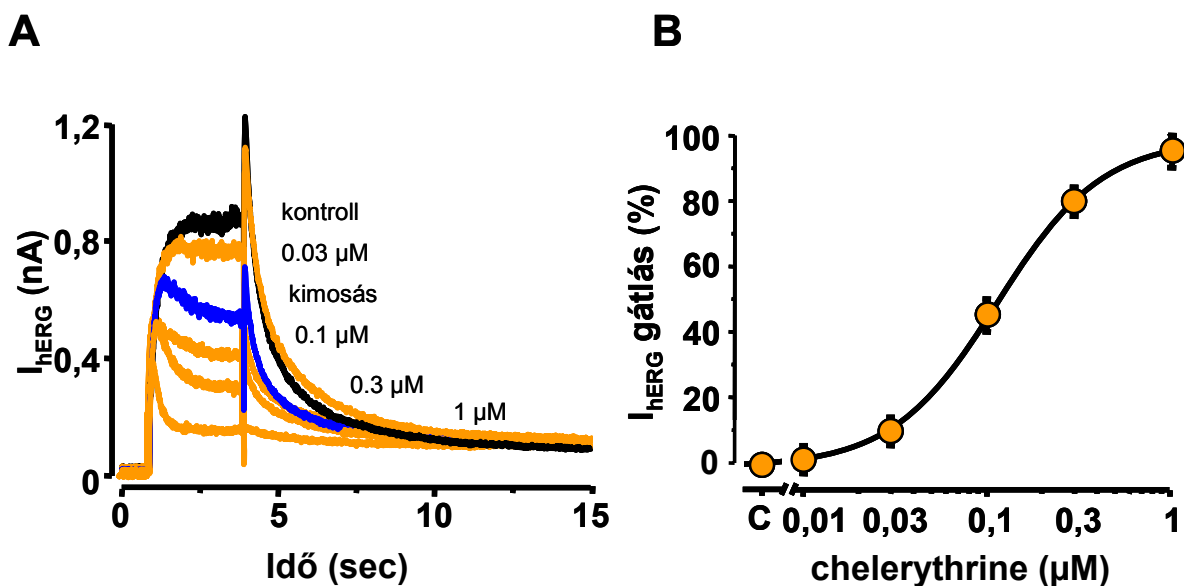


14. ábra: A PKC útvonal modulációjának hatása az I_{Kr} -re. **A**: Egy-egy reprezentatív kísérletet mutat, fekete négyzet jelöli a kontroll áramot, narancsszínű kör 1 μ M chelerythrine, zöld négyszög 1 μ M GF109203X jelenlétében mértet. **B**: egy-egy a és b pontban rögzített áramanalógot mutat. **C**: a gátlószerek alkalmazása után 10, majd 100 nM izoproterenol jelenlétében mért áram-amplitúdók. * jelöli a kiindulási áramhoz, # a gátlószer jelenlétében mért áramhoz képest szignifikáns különbségeket ($p < 0,05$). (átlag \pm SEM, $n=5$).

Ezen eredményeink azt sugallják, hogy a PKA útvonal β -adrenerg receptorokon keresztüli aktivációja mellett a PKC útvonal is hatékonyan részt vehet a késői káliumáram gyors komponensének szabályozásában, illetve már a nyugalmi PKC aktivitás is jelentős hatással bírhat az I_{K_r} -re. Ismert azonban, hogy számos, a PKC útvonalat befolyásoló gátlószer direkt csatornahatással is rendelkezhet. Annak érdekében, hogy a méréseink során nyert eredményekből megfelelő következtetést tudjunk levonni, ki kellett zárjuk az általunk alkalmazott két PKC gátlószer direkt káliumcsatorna gátló hatását. Ezekhez a mérésekhez HEK-293 sejt vonalat használtunk, amelyen stabilan expresszáztattuk a hERG csatornákat, azonban nem tartalmazta a PKC útvonal fehérjéit.

Elsőként a chelerythrine I_{hERG} -re és a csatornák kinetikai paramétereire kifejtett hatásait vizsgáltuk. A hERG áramot a 4.3.2. fejezetben leírt módom aktiváltuk. Méréseink során a mérőoldathoz adott chelerythrine koncentrációfüggő módon gátolta az I_{hERG} -et, ahogy azt a 15./A ábra reprezentatív kísérlete mutatja. A kísérletekben a PKC gátlószert kumulatív módon alkalmaztuk. Egy-egy koncentrációt a teljes hatás kifejlődéséig, mintegy 4-5 percig használtunk. A chelerythrine már 0,03 μM -os koncentrációban 1,21 nA-ról 1,09 nA-re csökkentette a farokáram amplitúdóját, 1 μM -os koncentrációban csaknem teljesen gátolta az I_{hERG} -et, a farokáram amplitúdója ez esetben 0,04 nA volt. A gátló hatás 5 perc alatt kimosható volt. A 15./B ábra 4 mérés eredményét foglalja össze. Az eredményeket a kiindulási áram-denzitásra normalizáltuk, majd az átlagokat és a standard hibát ábrázoltuk a chelerythrine koncentráció függvényében. A kapott adatokat Hill-egyenlettel illesztettük meg (1. egyenlet). Az illesztéssel kapott EC_{50} értéke $0,11 \pm 0,01 \mu\text{M}$ -nak adódott, a Hill-koefficiens értéke $1,52 \pm 0,18$ volt. A továbbiakban a chelerythrine 0,1 μM -os koncentrációját alkalmaztuk a szer I_{hERG} kinetikai paramétereire kifejtett hatásainak vizsgálatakor.

Az I_{hERG} aktivációjának feszültség-függését 250 ms hosszú, -50 mV és $+60 \text{ mV}$ közötti depolarizáló impulzusokkal vizsgáltuk. Az egymást követő impulzusokat 10 mV-os lépcsőkben alkalmaztuk. Az áram-amplitúdókat a $+60 \text{ mV}$ -nál mért áram-amplitúdókra normalizáltuk és az aktiváló impulzus nagyságának a függvényében ábrázoltuk. A 16./A ábra 4 mérés eredményét foglalja össze. Fekete szín jelöli a kontroll, narancssárga 0,1 μM chelerythrine jelenlétében mért áramot. A kapott adatokat Boltzmann-egyenlettel illesztettük meg (2. egyenlet), a félaktivációs feszültségek ($V_{0,5}$) kontroll esetben $0,6 \pm 2,7 \text{ mV}$ -nak, míg 0,1 μM chelerythrine jelenlétében $-12,6 \pm 3,7 \text{ mV}$ -nak adódtak ($p \leq 0,05$, $n=4$). A görbék meredeksége nem változott jelentősen ($7,7 \pm 0,6 \text{ mV}^{-1}$ és $8,1 \pm 0,5 \text{ mV}^{-1}$).

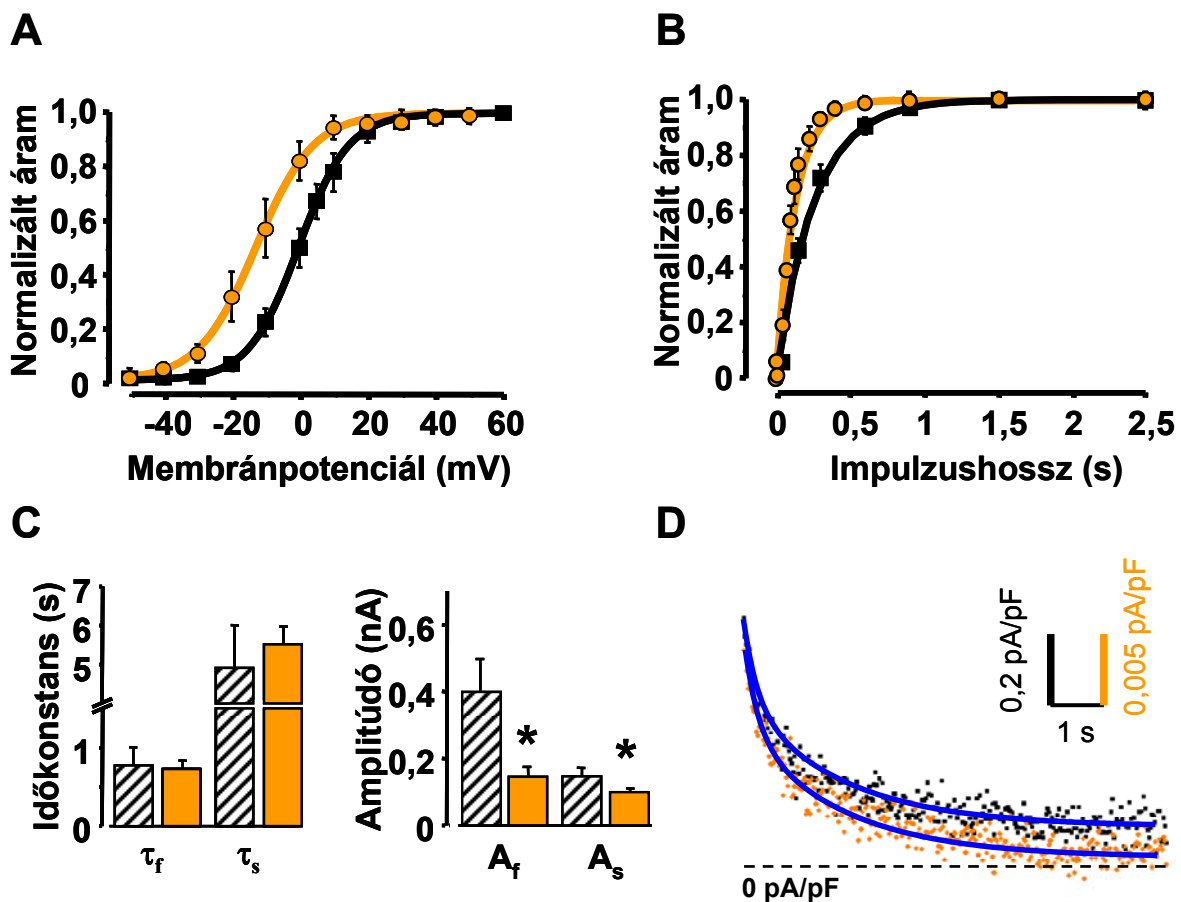


15. ábra: 1 μM chelerythrine hatása az I_{hERG} -re. **A:** Egy reprezentatív kísérletet mutat, fekete görbe a kontroll, narancsszínű 0,03- 1 μM chelerythrine jelenlétében mért áramot, kék görbe a szer kimosása után mért áramot mutatja. **B:** A chelerythrine dózis-hatás görbéje, IC_{50} : $11,63 \pm 0,11 \mu\text{M}$, Hill= $1,52 \pm 0,18$.

A chelerythrine az áram időfüggő aktivációját is módosította. Ennek meghatározásához az áramot +30 mV-ra történő depolarizáló impulzussal aktiváltuk és az impulzusok hosszát változtattuk 1 és 2500 ms között. Az eredményeket a legnagyobb áram-amplitúdóra normalizáltuk és ábráztuk az impulzushossz függvényében (16./B ábra). A kapott adatokat monoexponenciális egyenlettel illesztettük meg (3. egyenlet). Megállapítottuk, hogy 0,1 μM chelerythrine szignifikánsan gyorsította a csatornák aktivációját, az aktiváció időállandója 247 ± 19 ms-ról 146 ± 5 ms-ra csökkent ($p \leq 0,05$, $n=4$).

A szer I_{hERG} deaktivációjának időfüggésére kifejtett hatását a farokáram biexponenciális illesztésével jellemeztük (4. egyenlet). Eredményeink azt mutatják, hogy 0,1 μM chelerythrine nem befolyásolja jelentősen az I_{hERG} deaktivációs időállandóit, a deaktivációs paraméterek kontroll esetben $\tau_f = 0,76 \pm 0,02$ ms, $\tau_s = 4,9 \pm 0,98$ ms, $A_f = 0,40 \pm 0,97$ nA és $A_s = 0,15 \pm 0,04$ nA voltak, 0,1 μM chelerythrine jelenlétében $\tau_f = 0,69 \pm 0,01$ ms, $\tau_s = 5,5 \pm 0,41$ ms, $A_f = 0,15 \pm 0,04$ nA és $A_s = 0,1 \pm 0,02$ nA voltak. Szignifikáns különbséget csupán az amplitúdók esetén tapasztaltunk ($p \leq 0,05$, $n=4$).

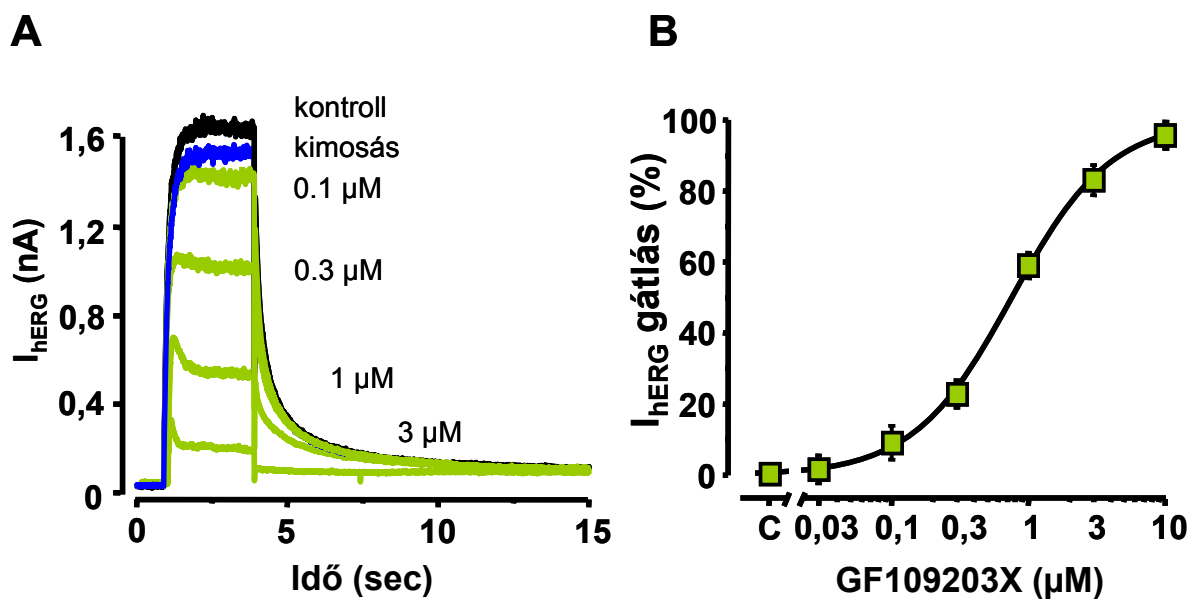
A fenti eredmények alapján arra utalnak, hogy a chelerythrine közvetlen gátló hatást fejt ki a hERG csatornákra és a 14. ábrán bemutatott I_{Kr} gátlásért elsősorban a chelerythrine közvetlen ioncsatorna gátló hatása lehet a felelős, nem a PKC gátló hatás.



16. ábra: 1 μ M chelerythrine hatása az I_{hERG} kinetikájára. Az ábrán fekete szín jelöli a kontroll, míg narancsszín a drog jelenlétében mért értékeket. **A:** Az I_{hERG} aktivációjának feszültségfüggése. Kontroll $V_{0,5}$: $0,6 \pm 2,7$ mV, 1 μ M chelerythrine jelenlétében a $V_{0,5}$: $-12,6 \pm 3,7$ mV. **B:** Az I_{hERG} aktivációjának időfüggése. $\tau_{kontroll}$ = 247 ± 19 ms, $\tau_{chel.}$ = 146 ± 5 ms. **C:** Az I_{hERG} deaktivációs paramétereinek változása. A szignifikáns különbségeket * jelöli ($p < 0,05$). **D:** Reprezentatív farokáramgörbék, melyek exponenciális illesztésével jellemeztük az áram deaktivációját.

Megvizsgáltuk a GF109203X közvetlen I_{Kr} gátló hatását is. Kísérleteinkben a mérőoldathoz adott GF109203X a chelerythrine-hez hasonlóan, koncentrációfüggő módon gátolta az I_{hERG} -et. A 17./A ábra egy reprezentatív kísérletet mutat. A gátló hatás már $0,1 \mu\text{M}$ -os koncentrációtól jelentkezett, ebben a koncentrációban a GF109203X $1,65 \text{ nA}$ -ról $1,33 \text{ nA}$ -re csökkentette a farokáram amplitúdóját. A GF109203X $3 \mu\text{M}$ -os koncentráció felett csaknem teljesen gátolta az I_{hERG} -et, a farokáram amplitúdója $10 \mu\text{M}$ GF109203X jelenlétében $0,02 \text{ nA}$ volt. A gátló hatás ez esetben is 3-4 perc alatt kialakult és 10 perc alatt teljes mértékben kimosható volt.

A 17./B ábra 4 mérés eredményét foglalja össze. Az eredményeket a kiindulási áramdenzitásra normalizáltuk, majd az átlagokat és a standard hibát ábrázoltuk. A kapott adatokat Hill-egyenlettel illesztettük. Az illesztéssel kapott EC_{50} értéke $0,76 \pm 0,04 \mu\text{M}$ volt, a Hill-koefficiens értéke $1,21 \pm 0,07$ -nek adódott.

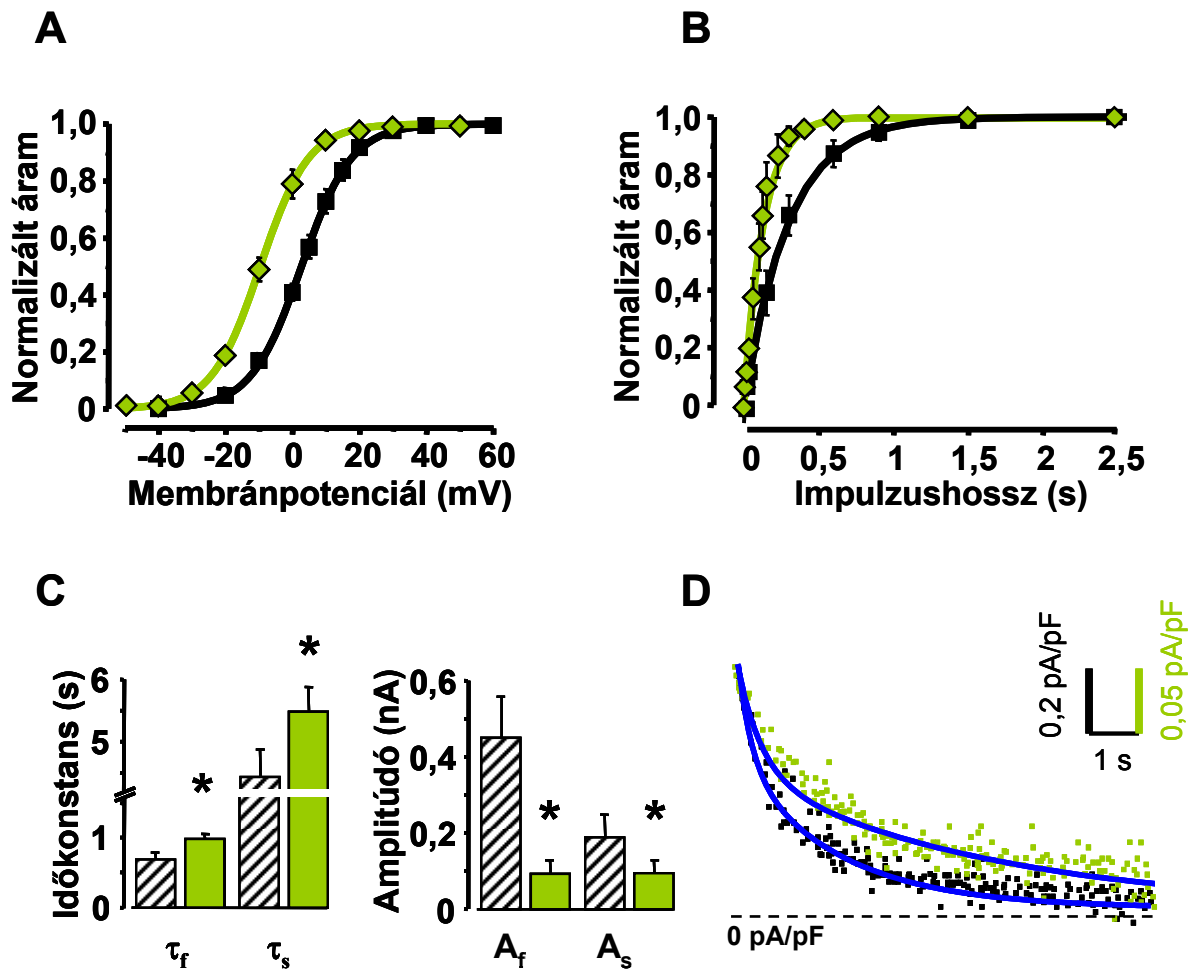


17. ábra: $1 \mu\text{M}$ GF-109203X hatása az I_{hERG} -re. **A:** Egy reprezentatív kísérletet mutat, fekete görbe a kontroll, zöld $0,03$ - $10 \mu\text{M}$ GF-109203X jelenlétében mért áramot, kék görbe a szer kimosása után mért áramot mutatja. **B:** A GF-109203X dózis- hatás görbéje, IC_{50} : $0,76 \pm 0,04 \mu\text{M}$, Hill= $1,21 \pm 0,07$.

A szer I_{hERG} kinetikai paramétereire kifejtett hatásainak vizsgálatokor $1 \mu\text{M}$ -os koncentrációt alkalmaztuk. A gátlószer I_{hERG} aktivációjának feszültségfüggésére kifejtett hatásának vizsgálatát a chelerythrine-nél ismertettek szerint végeztük. A 18./A ábra 4 mérés eredményét foglalja össze. Fekete szín jelöli a kontroll, zöld $1 \mu\text{M}$ GF109203X jelenlétében mért áramot. A kapott adatokat Boltzmann-egyenlettel illesztettük meg (2. egyenlet), a félaktivációs feszültségek ($V_{0,5}$) kontroll esetben $2,7 \pm 1,2$ mV-nak, míg $1 \mu\text{M}$ GF109203X jelenlétében $-9,5 \pm 1,4$ mV-nak adódtak. A görbék meredeksége nem változott jelentősen, $7,4 \pm 0,4$ mV⁻¹ és $7,2 \pm 0,3$ mV⁻¹ volt.

A GF109203X az I_{hERG} időfüggő aktivációját is módosította. Ennek meghatározását a chelerythrine-nél ismertettek szerint végeztük. Az eredményeket a legnagyobb áram-amplitúdóra normalizáltuk. A kapott adatokat monoexponenciális egyenlettel illesztettük (3. egyenlet). Megállapítottuk, hogy $1 \mu\text{M}$ GF109203X szignifikánsan gyorsította a csatornák aktivációját, az aktiváció időállandója 301 ± 57 ms-ról 143 ± 22 ms-ra csökkent ($p \leq 0,05$, $n=4$).

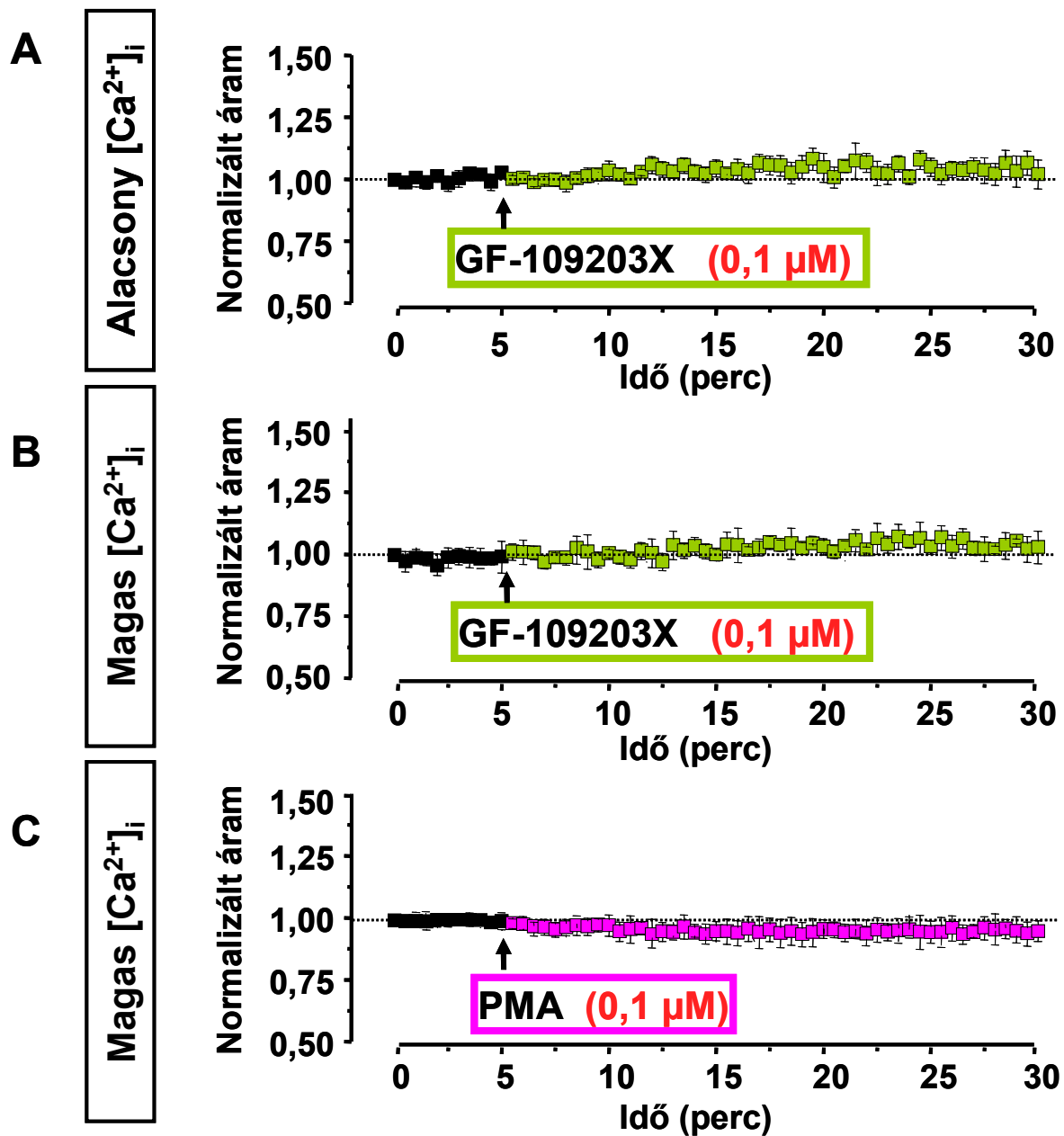
A GF109203X a chelerythrine-nel ellentétben szignifikánsan lassította a csatornák deaktivációját ($p \leq 0,05$, $n=4$). A deaktivációs paraméterek kontroll esetben $\tau_f = 0,65 \pm 0,02$ ms, $\tau_s = 4,4 \pm 0,94$ ms, $A_f = 0,44 \pm 0,14$ nA és $A_s = 0,19 \pm 0,07$ nA, $1 \mu\text{M}$ GF109203X jelenlétében $\tau_f = 0,99 \pm 0,01$ ms, $\tau_s = 5,4 \pm 0,83$ ms, $A_f = 0,09 \pm 0,03$ nA és $A_s = 0,09 \pm 0,02$ nA voltak ($p \leq 0,05$, $n=4$).



18. ábra: 1 μ M GF-109203X hatása az I_{hERG} kinetikájára. Az ábrán fekete szín jelöli a kontroll, míg zöld a drog jelenlétében mért értékeket. **A:** Az I_{hERG} aktivációjának feszültségfüggése. Kontroll $V_{0,5}$: $2,7 \pm 1,2$ mV, 1 μ M GF-109203X jelenlétében a $V_{0,5}$: $-9,5 \pm 1,4$ mV. **B:** Az I_{hERG} aktivációjának időfüggése. $\tau_{kontroll}$ = 301 ± 57 ms, τ_{GF} = 143 ± 22 . **C:** Az I_{hERG} deaktivációs paramétereinek változása. A szignifikáns különbségeket * jelöli ($p < 0,05$). **D:** Reprezentatív áramgörbék, melyek exponenciális illesztésével jellemeztük az áram deaktivációját.

5.5., A PKC közvetlen gátlásának hatása az I_{Kr} -re

Az előző kísérletek eredményei azt bizonyítják, hogy mind a chelerythrine, mind a GF109203X közvetlenül is gátolják a hERG csatornákat. A GF109203X 1 μ M-os koncentrációban 60 ± 4 % hERG gátlást okozott, míg a 14. ábrán bemutatott kísérletek során ugyanakkora koncentrációban 81 ± 5 %-kal csökkentette az I_{Kr} amplitúdóját. Ez felvetette annak a lehetőségét, hogy a GF109203X direkt csatornahatása mellett a PKC gátlásán keresztül is csökkentheti az I_{Kr} amplitúdóját. Ennek eldöntésére a további mérések során 0,1 μ M GF109203X hatását vizsgáltuk. Ebben a koncentrációban a szer közvetlen ioncsatorna hatása elhanyagolható, míg PKC gátló hatása már jelentős. A méréseket mind alacsony, mind magas citoszolikus kalcium koncentráció mellett elvégeztük, a kalcium szenzitív konvencionális és non-szenzitív novel PKC izoformák érintettségének elkülönítésére. Az alacsony kalcium-koncentrációt 10 mM EGTA-val biztosítottuk, a magas kalcium-koncentrációt a Fabiato programmal [29] 500 nM-ra állítottuk be. Pozitív kontrollként a PKC aktivátor PMA-t használtuk. A kontroll áram rögzítése után a sejteket 0,1 μ M GF109203X-szel vagy 0,1 μ M PMA-val 30 percen keresztül perfundáltuk. A mért áram-amplitúdókat a kiindulási, kontroll értékre normalizáltuk. A 19. ábra 4 kísérlet eredményét foglalja össze. Az ábrán az idő függvényében tüntettük fel a normalizált áramot. Fekete négyzetek mutatják a kontroll áramot, zöld négyzetek a PKC gátló GF109203X, rózsaszín az enzimet aktiváló PMA jelenlétében mértet. Eredményeink azt mutatják, hogy sem a PKC útvonal gátlása, sem az útvonal aktiválása nem befolyásolja jelentősen az I_{Kr} amplitúdóját. A normalizált áram nagysága alacsony intracelluláris kalcium-koncentráció mellett 0,1 μ M GF109203X jelenlétében $7\pm 3\%$ -kal, magas intracelluláris kalcium-koncentráció mellett 0,1 μ M GF109203X jelenlétében $6\pm 3\%$ -kal változott. A PKC útvonal aktiválása 30 perc elteltével sem befolyásolta az áram nagyságát, az értéke a kiindulási áram $94\pm 2\%$ -a volt (N.S., $p=4$).



19. ábra: 0,1 μ M GF-109203X hatása az I_{hERG} -re. Ebben a koncentrációban a szer közvetlen ionsatorna hatása elhanyagolható. A méréseket mind alacsony (A), mind magas (B) citoszolikus kalcium koncentráció mellett elvégeztük. Az ábrán fekete szín jelöli a kontroll, zöld szín a gátlószer jelenlétében mért áramokat. Pozitív kontrollként 0,1 μ M PMA-t használtunk (C), a jelenlétében mért áramokat lila szín jelöli.

5.6., Az izoproterenol hatása az I_{Ks} -re

Az eddigi méréseink kontrolljaként megvizsgáltuk a PKA és PKC útvonalak hatását az I_{Ks} -re. Az áramot a 2.1.2.3/B fejezetben részletezett módon aktiváltuk.

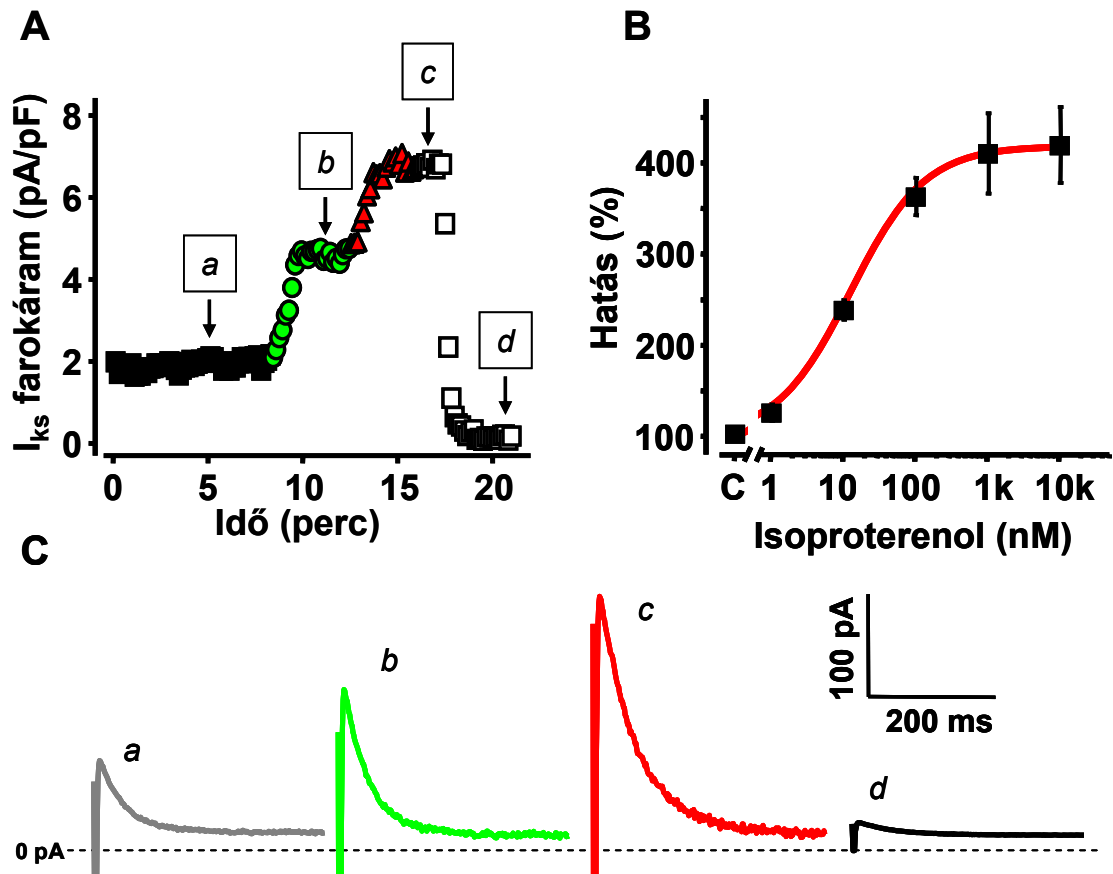
Kísérleteink során az izoproterenol koncentráció függő módon növelte az I_{Ks} amplitúdóját. A 20./A és C ábrán bemutatott kísérletben 10 nM izoproterenol 1,8 pA/pF-ról 4,6 pA/pF-ra, 100 nM izoproterenol 6,1 pA/pF-ra növelte az áramot. Ahogy az a 20./A ábra is mutatja az izoproterenol hatása mintegy 3 perc alatt kialakult. A mért áramot tiszta I_{Ks} -ként azonosítottuk, mivel a 100 nM izoproterenol mellett alkalmazott specifikus I_{Ks} gátlószer (1 μ M HMR-1556) jelenlétében a farokáram amplitúdója 6,15 pA/pF-ról 0,01 pA/pF-ra csökkent.

A különböző izoproterenol koncentrációk mellett mért farokáram amplitúdókat a kontrollra normalizáltuk és ábrázoltuk az izoproterenol koncentráció függvényében. A 20./B ábra 5 kísérlet eredményét foglalja össze. Az adatokat Hill egyenlettel illesztettük. Az illesztéssel kapott EC_{50} értéke $14,46 \pm 1,11$ nM-nak adódott, a Hill-koefficiens $0,84 \pm 0,04$ volt.

5.7., A PKA moduláció hatása az I_{Ks} -re

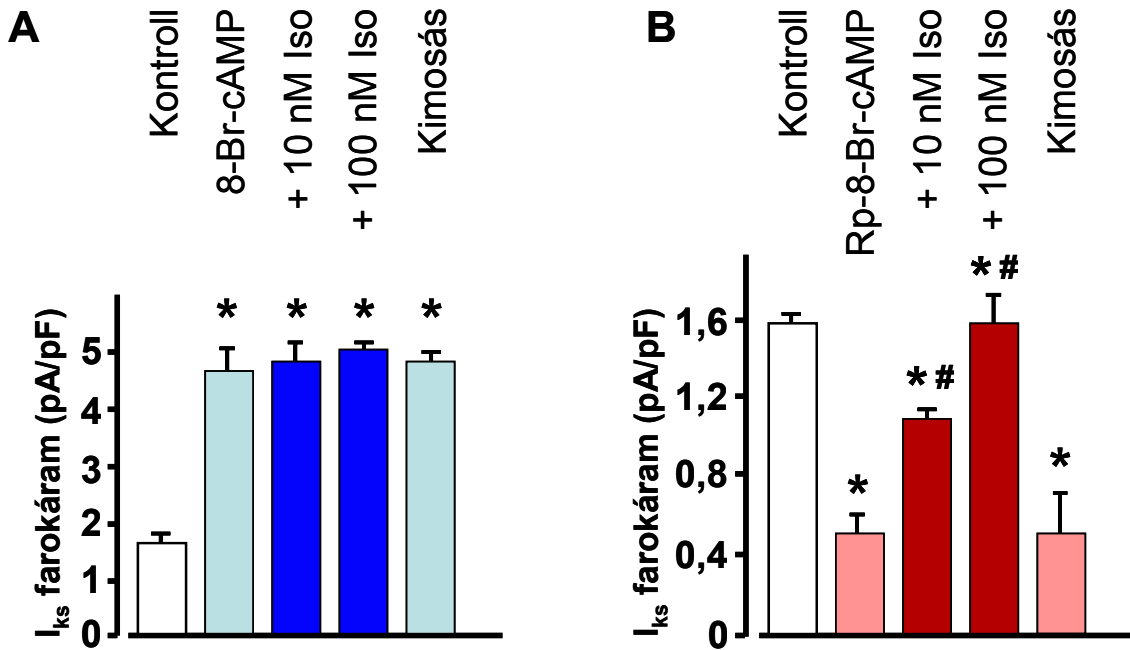
A további kísérletekben a PKA útvonalat receptorfüggő és receptorfüggetlen módon aktiváltuk, és figyeltük az I_{Ks} -re kifejtett hatást. A PKA receptorfüggetlen aktiválásához sejteket 250 μ M 8-Br-cAMP-vel kezeltük. Megállapítottuk, hogy az irodalmi adatokkal összhangban az I_{Ks} denzitása 8-Br-cAMP jelenlétében a kontroll érték mintegy háromszorosára növekedett, $1,7 \pm 0,15$ pA/pF-ról $4,6 \pm 0,47$ pA/pF-ra. ($p \leq 0,05$, $n=5$).

A következő mérésorozatban a PKA aktivátor 8-Br-cAMP-vel történt előkezelés után 10, majd 100 nM izoproterenollal aktiváltuk a β -adrenerg receptorokat. Ilyen körülmények között az izoproterenol már nem volt képes további áramnövekedést előidézni. A farokáram denzitása $4,6 \pm 0,47$ pA/pF, $4,8 \pm 0,45$ pA/pF, majd $5,0 \pm 0,28$ pA/pF volt (N.S., $n=5$).



20. ábra: Az izoproterenol I_{Ks} -re kifejtett hatása. **A:** Egy reprezentatív kísérletet ábrázol. Fekete négyzet jelöli a kontrollt, zöld kör 10 nM, piros háromszög a 100 nM izoproterenol jelenlétében mért áramjeleket. Üres háromszög specifikus I_{Ks} gátló HMR-1556 alkalmazását jelzi. **B:** Az izoproterenol dózis-hatás görbéje, EC_{50} : 14.46 ± 1.11 nM, Hill= 0.84 ± 0.04 , I_{max} : $433 \pm 46\%$ (átlag \pm SEM, $n=5$). A **C** panel a kísérlet a, b, c, és d pontján rögzített analóg áramjeleket mutatja.

Teszteltük a PKA gátlás I_{Ks} -re kifejtett hatását is. Ehhez a pipetta belsőoldatához adott 100 μM Rp-8-Br-cAMP-t használtunk. Kísérleteink során a PKA gátló Rp-8-Br-cAMP jelenlétében szignifikánsan csökkent a farokáram denzitása, $1,6 \pm 0,04$ pA/pF-ról $0,5 \pm 0,09$ pA/pF-ra ($p \leq 0,05$, $n=5$). Ha a PKA gátlása mellett izoproterenollal aktiváltuk a β -adrenerg receptorokat azt tapasztaltuk, hogy bár 100 μM Rp-8-Br-cAMP csökkentette az I_{Ks} -t, nem volt képes kivédeni az izoproterenol I_{Ks} aktiváló hatását. A kísérletek során a farokáram denzitása $0,5 \pm 0,09$ pA/pF-ról rendre $1,1 \pm 0,07$ pA/pF-ra majd $1,6 \pm 0,12$ pA/pF-ra növekedett ($p \leq 0,05$, $n=5$).



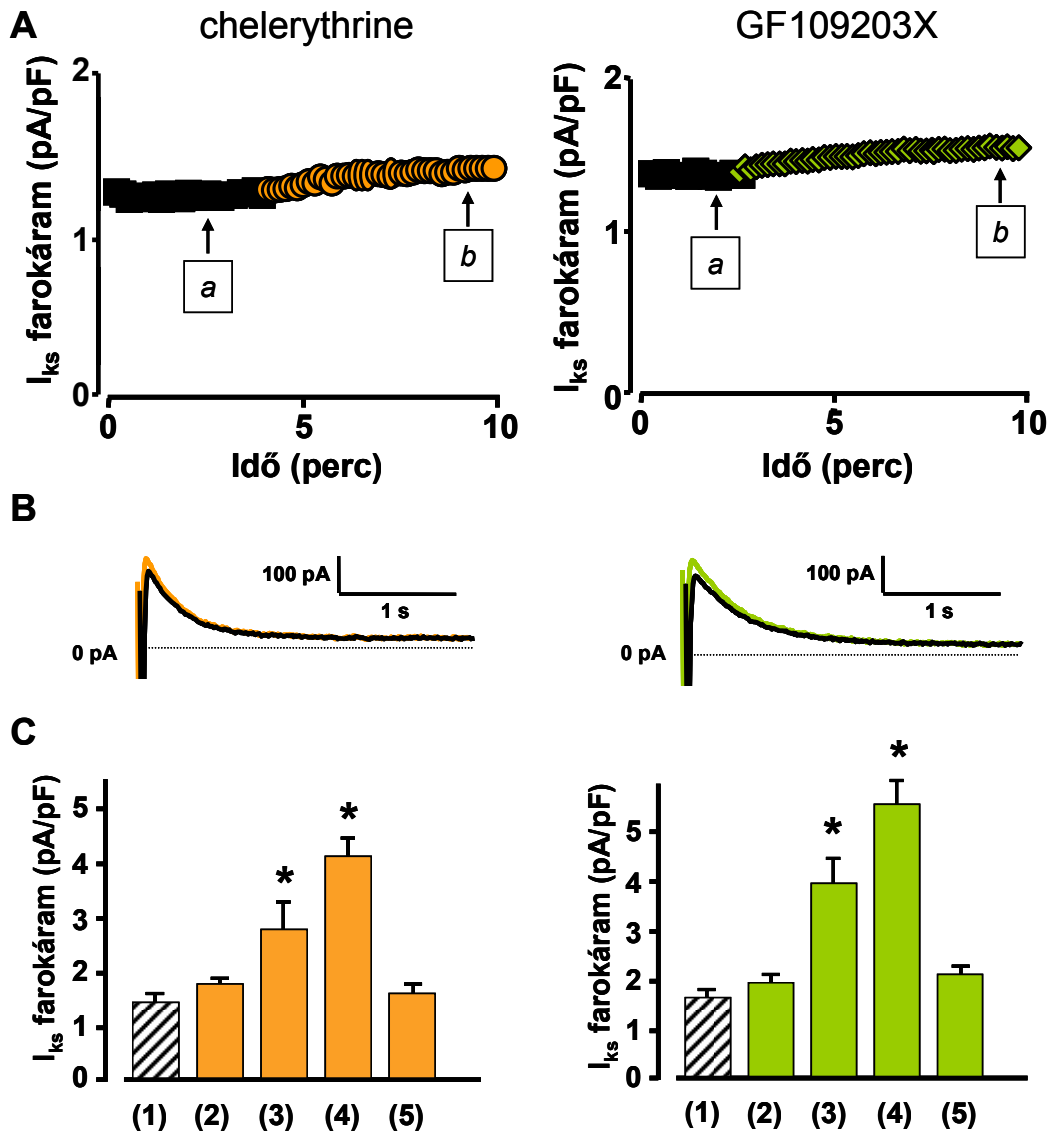
21. ábra: A PKA útvonal modulációjának hatása az I_{Ks} -re. Üres oszlopok jelölik a PKA befolyásolása előtti, kontroll áramot, Az útvonal aktiválása vagy gátlása után mérhető áram-amplitúdókat kék és piros oszlopok mutatják. Az útvonal modulációja után 10, majd 100 nM izoproterenol jelenlétében mért áram-amplitúdókat sötétkék és bordó színek jelölik, ezeket kimosás követi.* jelöli a kiindulási áramhoz, # a PKA modulátor jelenlétében mért áramhoz képest szignifikáns különbségeket ($p < 0,05$). (átlag \pm SEM, $n=5$).

5.8., A chelerythrine és GF-109203X hatása az I_{Ks} -re

A PKC útvonalat az I_{Kr} vizsgálatánál használt szerekkel, 1 μ M chelerythrine-nel vagy 1 μ M GF109203X-szel gátoltuk. Méréseink során azt tapasztaltuk, hogy sem a chelerythrine, sem a GF109203X nem befolyásolta szignifikánsan az I_{Ks} nagyságát. Az áram denzitása chelerythrine jelenlétében $1,3 \pm 0,41$ pA/pF majd $1,6 \pm 0,41$ pA/pF, GF109203X jelenlétében $1,2 \pm 0,34$ pA/pF majd $1,4 \pm 0,42$ pA/pF volt. A gátlószereket legalább 10 percen keresztül alkalmaztuk, s bár a farokáram nagyságában már 2-3 perc alatt kialakult egy enyhe növekedés, a különbség nem bizonyult szignifikánsnak (N.S., n=4).

A PKC-gátló szerekkel történt előkezelés után 10, majd 100 nM izoproterenollal aktiváltuk a β -adrenerg receptorokat. Kísérleteink során sem 1 μ M chelerythrine, sem 1 μ M GF109203X nem volt képes kivédeni az izoproterenol I_{Ks} növelő hatását. A farokáram denzitása chelerythrine jelenlétében $1,6 \pm 0,41$ pA/pF-ról rendre $2,7 \pm 0,55$ pA/pF-ra, majd $4,2 \pm 0,36$ pA/pF-ra, GF109203X jelenlétében $1,7 \pm 0,25$ pA/pF-ról $3,9 \pm 0,45$ pA/pF-ra, majd $5,5 \pm 0,49$ pA/pF-ra növekedett ($p \leq 0,05$, n=4). Az izoproterenol hatása teljes mértékben reverzibilis volt.

Eredményeink arra utalnak, hogy az izoproterenol elsősorban a PKA aktiválásán át fejtheti ki I_{Ks} növelő hatását. Nyugalmi körülmények között a kutya kamrai szívműködésének PKA útvonala részben aktivált és ezen keresztül a KCNQ csatornák részben foszforilált állapotban vannak.



22. ábra: A PKC útvonal modulációjának hatása az I_{Ks} -re. **A:** Egy-egy reprezentatív kísérletet ábrája, fekete négyzet jelöli a kontroll áramot, narancsszínű kör $1\mu\text{M}$ chelerythrine, zöld négyszög $1\mu\text{M}$ GF109203X jelenlétében mérték. **B:** egy-egy a és b pontban rögzített áramanalógot mutat. **C:** a gátlószerek alkalmazása után 10, majd 100 nM izoproterenol jelenlétében mért áram-amplitúdók. (1) kontroll, (2) gátlószer, (3) gátlószer +10nM izoproterenol, (4) gátlószer +100nM izoproterenol, (5) izoproterenol kimosása. * jelöli a kiindulási áramhoz képest szignifikáns különbségeket ($p < 0,05$). (átlag \pm SEM, $n=4$).

6., Megbeszélés

Jelen munkánkban a β -adrenerg receptor agonista izoproterenol kutya kamrai szívműködés késői káliumáramának gyors (I_{Kr}) és lassú (I_{Ks}) komponensére kifejtett hatásait vizsgáltuk. Munkacsoportunk elsőként mutatta ki a β -adrenerg stimuláció kutya kamrai szívműködés késői káliumáramának gyors komponensére kifejtett aktiváló hatását, aminek jelentőségét az adja, hogy fontos védekező mechanizmus lehet az akciós potenciál hosszának β -adrenerg stimuláció alatti nyúlása, és így aritmiák kialakulása ellen.

Eredményeink alapján arra következtettünk, hogy az izoproterenol β_1 -adrenerg receptorok aktiválásával, PKA függő módon növeli az áramot, mivel mind a PKA útvonal aktivációja, mind az útvonal gátlása kivédte az izoproterenol által kiváltott I_{Kr} aktiváló hatást. Ezen eredményeink ellentétben állnak azon irodalmi adatokkal, amelyek PKA aktivációt követően az I_{Kr} gátlását írják le oocytákon expresszált hERG csatornákon [104]. Az eltérő eredményekre az adhat magyarázatot, hogy az oocyták expresszálták ugyan a hERG csatornákat, a csatorna járulékos fehérjéit azonban nem. Hiányozhattak továbbá ebből az expressziós rendszerből a PKA jelátviteli útvonal egyes elemei is, valamint az egyes fajok közti izoenzim különbségek is állhatnak az eltérő eredmények hátterében.

Feltevésünket, miszerint az I_{Kr} a PKA jelátviteli útvonal aktivációján keresztül szabályozott, alátámasztják azok a kísérleteink amelyek során a PKA közvetlen aktivációját követően aktiváltuk a β -adrenerg receptorokat. Azt tapasztaltuk, hogy a receptorok aktivációja nem volt képes az I_{Kr} amplitúdójának növelésére. Megjegyzendő ugyanakkor, hogy a PKA aktivációjához elengedhetetlen cAMP alkalmazása — ellentétben a 8-Br-cAMP és 6-Bnz-cAMP használatával — nem volt képes kivédeni az izoproterenol aktiváló hatását. Ennek magyarázatát a PKA-ioncsatorna komplex kompartmentalizációja adhatja [48]. Az enzim-ioncsatorna komplex sejtmembránhoz asszociált formában található, a PKA aktivációjához elengedhetetlen a cAMP citoplazmából a membránban lévő komplexhez jutása. Ezt a sejtmembrán környezetében található foszfodiészteráz barrier akadályozhatja meg, amely a pipettából kidiffundáló cAMP-t még a PKA-ioncsatorna komplexhez jutás előtt részben elbonthatja. A barrier hatása viszont nem érvényesül a PDE rezisztens cAMP formák (8-Br-cAMP és 6-Bnz-cAMP) és a sejtmembránba az extracelluláris tér irányából beoldódó drogok esetén.

A PKA vizsgálatával párhuzamosan az EPAC útvonal esetleges érintettségét is tanulmányoztuk. Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy az EPAC β -adrenerg receptorokon keresztüli aktivációja valószínűleg nem vesz részt az I_{Kr} szabályozásában.

Méréseink eredménye összhangban áll a Heath és Terrar [35] által leírttal, kísérleteikben 10 nM izoproterenol 47 %-kal növelte a tengerimalac szívműködés késői kálium áramának gyors komponensét. Heath és Terrar azonban — a mi kísérletei elrendezésünkkel ellentétben — nem gátolták az L-típusú kalcium áramot és nem pufferelték az intracelluláris kalciumot, így az intracelluláris kalcium koncentráció emelkedése aktiválhatta a konvencionális PKC enzimet, ami felelős lehet az I_{Kr} növekedéséért. Irodalmi adatok azonban arról számolnak be, hogy a konvencionális PKC útvonal thymelatoxinnal történt specifikus aktivációja csökkenti az oocytákban expresszált ioncsatornákon átfolyó I_{Kr} -t [105]. A saját kísérleteink során tapasztalt I_{Kr} növekedés hátterében a konvencionális PKC útvonal aktivációja valószínűleg nem játszott szerepet, mivel az ionáramok mérése során a mérőoldathoz adott 5 μ M nifedipinnel teljes mértékben gátoltuk az L-típusú kalcium áramot, s emellett a pipetta töltőoldatához adott 10 mM EGTA-val kötött állapotban tartottuk az intracelluláris kalcium ionokat.

A β -adrenerg stimuláció I_{Ks} -re kifejtett aktiváló hatása az irodalomból jól ismert. Audigane és munkatársai nyúl szívműködésen [2], Severi és munkatársai tengerimalac szívműködésen [93], Imredy és munkatársai humán ioncsatornákon [41] mutatta ki a jelenséget. Az egybehangzó irodalmi adatok alapján valószínű, hogy az I_{Ks} növelő hatás közvetítéséért a PKA útvonal a felelős. Ezen irodalmi adatok ismeretében vizsgáltuk a β -adrenerg stimuláció hatását kutya kamrai szívműködés késői káliumáramának lassú komponensére. A kísérleti elrendezés — az I_{Ks}/I_{Kr} elkülönítésére használt gátlószerek kivételével — azonos volt az I_{Kr} -nél használttal. Eredményeink irodalmi adatokkal való egyezése miatt ezeket a méréseket önkontrollként használhattuk.

Megállapítottuk, hogy a PKA közvetlen aktiválásán keresztül megnövelt I_{Ks} -t az izoproterenol már nem volt képes tovább növelni. A PKA útvonal gátlása esetén jelentős különbségek mutatkoztak az I_{Kr} és I_{Ks} között. A PKA útvonal gátlása nem befolyásolta az I_{Kr} denzitását, azonban jelentős mértékben gátolta az I_{Ks} -t. Ez alapján arra következtettünk, hogy a bazális PKA aktivitás nem befolyásolja az I_{Kr} -t, ugyanakkor a bazális PKA aktivitás részben aktivált állapotban tartja az I_{Ks} létrehozásáért felelős ioncsatornákat. További különbségeket tapasztaltunk, ha a PKA gátlását követően izoproterenollal aktiváltuk a β -adrenerg receptorokat. I_{Kr} esetén a PKA gátlása teljes mértékben kivédte az izoproterenol aktiváló hatását, míg I_{Ks} esetén csupán csökkentette azt. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a PKA útvonal

részleges gátlása is elegendő az izoproterenol I_{Kr} -t aktiváló hatásának elnyomásához, és a PKA aktiváló hatása közel sem olyan effektív, mint I_{Ks} esetén. A tapasztalt különbségek magyarázataként nem zárható ki az a lehetőség sem, hogy a különböző, a csatornát aktiváló hatások kivitelezéséért különböző PKA izoenzimek felelősek, melyek eltérő gátlószer érzékenységet mutathatnak. Bár a β -adrenerg stimuláció a késői káliumáram mindkét komponensét növelte, a PKA aktivációjakor és gátlásakor tapasztalt különbségek pontos magyarázata további vizsgálatokat igényel.

A PKC útvonal érintettségét két PKC gátlószer segítségével vizsgáltuk: 1 μ M chelerythrine-t vagy 1 μ M GF109203X-et alkalmaztunk. Méréseink során mindkét gátlószer szignifikánsan csökkentette az I_{Kr} amplitúdóját. Számos, a PKC útvonalat befolyásoló gátlószerrel ismert azonban, hogy direkt csatornahatásai is vannak [50]. A direkt csatornagátló hatás kizárására a méréseket megismételtük HEK-293 sejteken expresszált hERG csatornákon is. Ezek a sejtek ugyanis nem expresszálják a PKC útvonal fehérjét.

Megállapítottuk, hogy mind a chelerythrine, mind a GF109203X koncentrációfüggő módon gátolta az I_{hERG} -et. Eredményeink arra utalnak, hogy az általunk alkalmazott PKC gátlószerrel közvetlen hERG csatorna gátló hatással bírnak. Feltevésünket alátámasztja a hatás kialakulási sebessége is, nevezetesen az I_{hERG} gátló hatás mindkét szer jelenlétében néhány perc alatt kialakult. Irodalmi adatok szerint a PKC útvonal aktivációja vagy gátlása ugyanis ennek az időnek többszörösét igényli [105]. A GF109203X direkt hERG csatorna hatása ugyan korábbról ismert [103], a chelerythrine hERG csatornára kifejtett közvetlen gátló hatását viszont munkacsoportunk írta le elsőként. A GF109203X alkalmazásával kapott eredményeink gyakorlatilag megegyeznek a Thomas és munkatársai által 2004-ben publikált adatokkal [103]. A tanulmány a szer félhatásos koncentrációját 1 μ M-nak mérte, ami a mi vizsgálatainkban 0,76 μ M-nak adódott. Kísérleteink során 1 μ M GF109203X 69,4 %-os I_{Kr} gátlást okozott, a tanulmány 69,2 %-ról ír. A nagymérvű hasonlóság mellett különbségek is adódtak. Thomas és munkatársai az I_{hERG} kapuzási kinetikájában nem számoltak be szignifikáns változásról. Ezzel ellentétben mi azt tapasztaltuk, hogy 0,1 μ M GF109203X az I_{hERG} feszültségfüggését 12,2 mV-tal balra tolt. A mért különbségek oka jelenleg nem tisztázott, a fajok közti különbségek mellett az eltérő metodika is szerepet játszhatott.

A chelerythrine-nek és a GF109203X-nek az I_{Kr} gátló hatása mellett ismert egyéb ioncsatornákra kifejtett negatív hatása is. Vuoltilainen-Myllyla és munkatársai [118] patkány kamrai szívizomsejtek feszültségfüggő kalcium és káliumcsatornáinak gátlásáról számolnak be, amely hatás — hasonlóan a mi eredményeinkhez — szintén PKC független módon zajlott.

Cho és munkatársai [17] a két gátlószer macskák pitvari szívizomsejtjeinek acetilkolin-aktivált káliumcsatornáira kifejtett gátló hatását írták le, Kim [53] és Park [75] egér és patkány ér-simaizomsejtek feszültségfüggő káliumcsatornáinak gátlásáról írnak. Ezzel ellentétes hatásról számol be egy 2008-ban született tanulmány [50], amely egy másik PKC gátlószer, a staurosporin szívizomsejtek $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ cserélő mechanizmusára kifejtett PKC-független aktiváló hatásait taglalja. Ígéretes témája lenne további vizsgálatoknak ezen molekulák kémiai szerkezetének összevetése: a direkt ioncsatornához kötődő szegmentek azonosítása és modifikációja talán növelhetné ezen molekulák PKC szelektivitását, és csökkenthetné a szerek ioncsatorna hatásait.

A PKC gátlószerekkel végzett kísérleteink arra utalnak, hogy ezek a gátlószerek nem igazán alkalmasak PKC I_{Kr} -t moduláló hatásának felderítésére. Az irodalomból ismert, hogy a GF109203X 0,1 μM -os koncentrációban már jelentősen blokkolja a PKC enzimet, de csak kismértékű, mintegy 10%-os I_{hERG} csökkenést okoz HEK sejteken. Ugyanílyen koncentrációban a szer nem csökkentette kutya kamrai szívizomsejteken az I_{Kr} amplitúdóját, sőt, mérsékelt áram-amplitúdó növekedést tapasztaltunk. Ezzel szemben a PKC útvonal PMA segítségével történő aktiválása jelzett mértékben csökkentette az I_{Kr} amplitúdóját. Az áram-amplitúdókban tapasztalható változások statisztikailag egyik esetben sem voltak jelentősek. Méréseink eredményéből arra következtethetünk, hogy kutyák kamrai szívizomsejtjeiben a késői káliumáram gyors komponensének szabályozásában a PKC útvonal valószínűleg nem játszik szerepet.

A megjelent közlemények, melyek a PKC szerepét taglalják az I_{Ks} szabályozásában, egymásnak ellentmondóak és jelentős fajok közti különbségekről tanúskodnak. A PKC aktivációja növelte például a tengerimalac szívizomsejtek I_{Ks} -ét [106, 107]. Egér vagy patkány csatornafehérjéket expresszáló sejteken viszont az I_{Ks} csökken, ha PKC útvonalukat aktiváljuk [10]. Saját méréseink során az I_{Kr} -hez hasonló eredményeket kaptunk: sem a chelerytrine, sem a GF109203X nem befolyásolta jelentősen az I_{Ks} amplitúdóját. Kísérleteink során egyik gátlószer sem volt képes kivédeni az izoproterenol I_{Ks} -t növelő hatását. Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy kutyák kamrai szívizomsejtjeiben a késői káliumáram lassú komponensének szabályozásában a PKC útvonal valószínűleg nem játszik szerepet.

7., Összefoglalás

Bevezetés: A késői káliumáram lassú komponenséről (I_{Ks}) számos emlősfaj szívműködésében kimutatták, hogy β -adrenerg stimuláció hatására nő az áram amplitúdója, azonban ezen áram gyors komponensére (I_{Kr}) vonatkozó irodalmi adatok ellentmondásosak. Vizsgálataink során arra voltunk kíváncsiak, hogy miként befolyásolja a késői káliumáram komponenseit a β -adrenerg stimuláció, illetve a jelátviteli útvonalak — protein kináz A, protein kináz C — aktiválása illetve gátlása.

Anyagok és módszerek: Kísérleteinket kutya kamrai szívműködésében és HEK-293 sejtekkel expresszált hERG csatornákon végeztük. A membránáramokat patch-clamp technikával mértük, egész sejt konfigurációban, 37°C hőmérsékleten.

Eredmények: Megállapítottuk, hogy az izoproterenol 30-50%-kal növelte az I_{Kr} amplitúdóját, hasonlóan a forskolin alkalmazásához, vagy intracellulárisan alkalmazott cAMP és analógjainak (cAMP, 8-Br-cAMP, 6-Bnz-cAMP) a hatásához. A PKA útvonal Rp-8-Br-cAMP-vel történt gátlása nyugalmi körülmények között nem befolyásolta az I_{Kr} amplitúdóját, de a β_1 -adrenerg receptor gátló CGP-20712A illetve a PKA gátló Rp-8-Br-cAMP teljes mértékben kivédte az izoproterenol I_{Kr} növelő hatását.

Méréseink során az izoproterenol közel háromszorosára növelte az I_{Ks} amplitúdóját. A PKA útvonal gátlása jelentősen csökkentette az áramot, azonban nem védte ki az izoproterenol aktiváló hatását.

A PKC útvonal vizsgálata során megállapítottuk, hogy mind a chelerythrine, mind a GF109203X szignifikánsan csökkentették az I_{Kr} amplitúdóját. Expresszált hERG csatornán végzett méréseink arra utalnak, hogy sem a PKC útvonal gátlása, sem az útvonal aktiválása nem befolyásolja jelentősen a késői káliumáram gyors komponensét, viszont az általunk alkalmazott PKC gátlószerek közvetlen hERG csatorna gátló hatással bírnak. A chelerythrine hERG csatornára kifejtett közvetlen gátló hatását munkacsoportunk írta le elsőként.

Összefoglalás: Eredményeink arra utalnak, hogy a β_1 -adrenerg stimuláció a PKA útvonal aktiválásán keresztül képes növelni kutya kamrai szívműködésében késői káliumáramának gyors és lassú komponensét. Megállapítottuk, hogy az áramok szabályozásában a PKC útvonal valószínűleg nem játszik szerepet, illetve hogy alkalmazott PKC gátlószerek közvetlen ioncsatorna gátló hatásuk miatt csak bizonyos körülmények között alkalmasak az ionáramok vizsgálatában.

8., Summary

Background and purpose: While the slow delayed rectifier potassium current (I_{Ks}) is known to be enhanced by the stimulation of β -adrenoceptors in several mammalian species, phosphorylation-dependent regulation of the rapid delayed rectifier potassium current (I_{Kr}) is controversial. In the absence of relevant human data we decided to study the effects of β -adrenoceptor stimulation and intracellular pathways on delayed rectifier potassium currents in ventricular cardiomyocytes of the dog.

Experimental approach: In our experiments effects of isoprenaline (ISO), activators and inhibitors of the protein kinase A (PKA) and protein kinase C (PKC) pathways on I_{Kr} and I_{Ks} was studied in canine ventricular myocytes or expressed hERG channels using the whole cell patch-clamp technique at 37 °C.

Results: I_{Kr} was significantly increased (by 30-50%) following superfusion with ISO, forskolin or intracellular application of PKA activator cAMP analogues (cAMP, 8-Br-cAMP, 6-Bnz-cAMP). Inhibition of PKA by Rp-8-Br-cAMP had no effect on baseline I_{Kr} . The stimulating effect of ISO on I_{Kr} was completely inhibited by selective β_1 -adrenoceptor antagonists CGP-20712A, by the PKA inhibitor Rp-8-Br-cAMP or by the PKA activator cAMP analogues.

In comparison, I_{Ks} was increased threefold by superfusion of ISO, and strongly reduced by the PKA inhibitor Rp-8-Br-cAMP. The ISO-induced enhancement of I_{Ks} was decreased by Rp-8-Br-cAMP and completely inhibited by 8-Br-cAMP.

Our results indicate that PKC inhibitor chelerythrine and GF109203X suppressed the I_{Kr} in canine ventricular cells. No significant effects of PKC activators or inhibitors were observed on hERG channels arguing against significant contribution of PKC to regulation of I_{Kr} .

Conclusion: Our results indicate that the stimulation of β_1 -adrenoceptors increases I_{Kr} , similar to I_{Ks} , via the activation of PKA in canine ventricular cells. Our results show that PKC has no importance in regulation of these currents, and the used PKC inhibitor molecules are not suitable for selective PKC blockade due to their direct ion channel inhibitory effects.

9., Irodalomjegyzék

1. Abbott G.W., et al., *Secondary structure, stability and tetramerisation of recombinant KVL1.1 potassium channel cytoplasmic N-terminal fragment*. Biochim Biophys Acta- Prot Struct Mol Enzym, 1997. **1341**(1): p. 71-78.
2. Audigane L, et al., *Rabbit, a relevant model for the study of cardiac β -adrenoceptors*. Exp Phys, 2009. **94**(4): p. 400-411.
3. Balsler JR, et al., *Time-dependent outward current in guinea pig ventricular myocytes. Gating kinetics of the delayed rectifier*. J Gen Physiol, 1990. **96**(4): p. 835-863.
4. Barhanin J, et al., *KVLQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the IKs cardiac potassium current*. Nature, 1996. **384**(6604): p. 78-80.
5. Beuckelmann DJ, et al., *Alterations of K⁺ currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure*. Circ Res, 1993. **73**(2): p. 379-385.
6. Bos J., *Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(9): p. 733-738.
7. Bosch RF, et al., *Electrophysiologic effects of chronic amiodarone therapy and hypothyroidism, alone and in combination, on guinea pig ventricular myocytes*. J Pharmacol Exp Ther, 1999a. **289**(1): p. 156-165.
8. Bosch RF, et al., *Electrophysiological mechanisms by which hypothyroidism delays repolarization in guinea pig hearts*. Am J Phys, 1999b. **277**: p. H211-220.
9. Buck J, et al., *Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1999. **96**(1): p. 79-84.
10. Busch AE, et al., *Regulation by second messengers of the slowly activating, voltage-dependent potassium current expressed in Xenopus oocytes*. J Physiol, 1992. **450**: p. 491-502.
11. Carmeliet E., *Voltage- and time-dependent block of the delayed K⁺ current in cardiac myocytes by dofetilide*. J Pharmacol Exp Ther, 1992. **262**(2): p. 809-817.
12. Carmeliet E, et al., *Antiarrhythmic drugs and cardiac ion channels: mechanisms of action*. Prog Biophys Mol Biol, 1998. **70**(1): p. 1-72.
13. Chen PP, et al., *Protein kinase A-induced myofilament desensitization to Ca(2+) as a result of phosphorylation of cardiac myosin-binding protein C*. J Gen Physiol, 2010. **136**(6): p. 615-627.
14. Cheng J, et al., *Heterogeneous distribution of the two components of delayed rectifier K⁺ current: a potential mechanism of the proarrhythmic effects of methanesulfonanilide class III agents*. Cardiovasc Res, 1999. **43**(1): p. 135-147.
15. Chiang CE, et al., *The long QT syndromes: genetic basis and clinical implications*. J Am Coll Cardiol, 2000. **36**(1): p. 1-12.
16. Chinn K, *Two delayed rectifiers in guinea pig ventricular myocytes distinguished by tail current kinetics*. J Pharmacol Exp Ther, 1993. **264**(2): p. 553-560.
17. Cho H, et al., *Inhibition of acetylcholine-activated K⁺ current by chelerythrine and bisindolylmaleimide I in atrial myocytes from mice*. Eur J Pharmacol, 2001. **424**: p. 173-178.
18. Choe S., *Potassium channel structures*. Nat Rev Neurosci, 2002. **3**(2): p. 115-121.
19. Cooper DM, et al., *Ca²⁺-sensitive adenylyl cyclases*. Adv Sec Mess Phosp prot Res, 1998. **32**: p. 23-51.

20. Cui J, et al., *Analysis of the cyclic nucleotide binding domain of the HERG potassium channel and interactions with KCNE2*. J Biol Chem, 2001. **276**(20): p. 17244-17251.
21. Cui J, et al., *Cyclic AMP regulates the HERG K⁺ channel by dual pathways*. . Curr Biol, 2000. **10**(11): p. 671-674.
22. Curran ME, et al., *A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome*. . Cell, 1995. **80**(5): p. 795-803.
23. Deal KK, et al., *Molecular physiology of cardiac potassium channels*. Physiol Rev, 1996. **76**(1): p. 49-67.
24. Disatnik MH, et al., *Localization of Protein Kinase C Isozymes in Cardiac Myocytes*. Exp Cell Res, 1994. **210**(2): p. 287-297.
25. Duchatelle-Gourdon I, et al., *Modulation of the delayed rectifier potassium current in frog cardiomyocytes by beta-adrenergic agonists and magnesium*. J Phys, 1989. **415**(1): p. 251-274.
26. Duggal P, et al., *Mutation of the gene for IsK associated with both Jervell and Lange-Nielsen and Romano-Ward forms of Long-QT syndrome*. Circulation, 1998. **97**(2): p. 142-146.
27. Erdbrügger W, et al., *Protein kinase C isoenzymes in rat and human cardiovascular tissues*. Br J Pharmacol, 1997. **120**(2): p. 177-186.
28. Espinasse I, et al., *Decreased type VI adenylyl cyclase mRNA concentration and Mg²⁺-dependent adenylyl cyclase activities and unchanged type V adenylyl cyclase mRNA concentration and Mn²⁺-dependent adenylyl cyclase activities in the left ventricle of rats with myocardial infarction and longstanding heart failure*. Cardiovasc Res, 1999. **42**(1): p. 87-98.
29. Fabiato A, et al., *Calcium and cardiac excitation-contraction coupling*. Ann Rev Physiol, 1979. **41**: p. 473-84.
30. Fürst Z., *Kémiai ingerületátvitel. Kolinerg és adrenerg transzmisszió*, in *Farmakológia*. 2004, Medicina Könyvkiadó Rt.: Budapest. p. 126-189.
31. Gintant G., *Two components of delayed rectifier current in canine atrium and ventricle. Does IKs play a role in the reverse rate dependence of class III agents?* Circ Res, 1996. **78**: p. 26-37.
32. Grammer JB, et al., *Molecular remodeling of Kv4.3 potassium channels in human atrial fibrillation*. . J Cardiovasc Electrophysiol, 2000. **11**(6): p. 626-633.
33. Gschwendt M, et al., *Protein kinase C zeta and eta in murine epidermis. TPA induces down-regulation of PKC eta but not PKC zeta*. FEBS Lett, 1992. **307**(2): p. 151-5.
34. Hayashi A, et al., *PKC[nu], a new member of the protein kinase C family, composes a fourth subfamily with PKC[mu]*. BBA - Mol Cell Res, 1999. **1450**(1): p. 99-106.
35. Heath BM, et al., *Protein kinase C enhances the rapidly activating delayed rectifier potassium current, I_{Kr}, through a reduction in C-type inactivation in guinea-pig ventricular myocytes*. J Physiol, 2000. **522** (Pt 3): p. 391-402.
36. Heidbüchel H, et al., *Different K⁺ channels in human atrial cells*. Pflügers Arch, 1989. **414**(Suppl 1): p. S171-172.
37. Hiraoka M., et al., *Calcium-sensitive and insensitive transient outward-current in rabbit ventricular myocytes*. J Physiol, 1989. **410**: p. 187-212.
38. Ho WK, et al., *Voltage-dependent blockade of HERG channels expressed in Xenopus oocytes by external Ca²⁺ and Mg²⁺*. J Physiol 1998. **507** (Pt 3): p. 631-638.
39. Hondeghem LM, et al., *Class III antiarrhythmic agents have a lot of potential but a long way to go. Reduced effectiveness and dangers of reverse use dependence*. . Circulation, 1990. **81**: p. 686-690.

40. Hume JR, et al., *Ionic basis of the different action potential configurations of single guinea-pig atrial and ventricular myocytes*. J Phys, 1985. **368**: p. 525-544.
41. Imredy JP, et al., *Modeling of the adrenergic response of the human IKs current (hKCNQ1/hKCNE1) stably expressed in HEK-293 cells*. Am J Phys - Heart Circ Phys, 2008. **295**(5): p. H1867-H1881.
42. Inoue M., et al., *Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain*. J Biol Chem, 1977. **252**(21): p. 7610-7616.
43. Ito H, et al., *Intracellular protons inhibit inward rectifier K⁺ channel of guinea-pig ventricular cell membrane*. Pflügers Arch, 1992. **422**(3): p. 280-286.
44. Jackson EK, et al., *Role of the extracellular cAMP-adenosine pathway in renal physiology*. Am J Phys - Ren Phys, 2001. **281**(4): p. F597-F612.
45. Jalili T, et al., *PKC translocation without changes in Gaq and PLC-β protein abundance in cardiac hypertrophy and failure*. Am J Phys - Heart Circ Phys, 1999. **277**(6): p. H2298-H2304.
46. Jenkinson D., *Classification and Properties of Peripheral Adrenergic Receptors*. Brit Med Bull, 1973. **29**(2): p. 142-147.
47. Jost N, et al., *Delayed rectifier potassium current in undiseased human ventricular myocardium*. Cardiovasc Res, 1998. **40**: p. 508-515.
48. Jurevicius J, et al., *cAMP compartmentation is responsible for a local activation of cardiac Ca²⁺ channels by β-adrenergic agonists*. Proc Natl Acad Sci USA, 1996. **93**: p. 295-299.
49. Käab S, et al., *Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density*. Circulation, 1998. **98**(14): p. 1383-93.
50. Kang T., *PKC-independent stimulation of cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger by staurosporine*. Korean J Physiol Pharmacol, 2008. **12**: p. 259-265.
51. Kawasaki H, et al., *A Family of cAMP-Binding Proteins That Directly Activate Rap1*. Science, 1998. **282**(5397): p. 2275-2279.
52. Kiehn J, et al., *Molecular Physiology and Pharmacology of HERG. Single-Channel Currents and Block by Dofetilide*. Circulation, 1996. **94**: p. 2572-2579.
53. Kim AK, et al., *Direct block by bisindolylmaleimide of the voltage-dependent K⁺ currents of rat mesenteric arterial smooth muscle*. Eur J Pharmacol, 2004. **483**: p. 117-126.
54. Koumi S, et al., *beta-Adrenergic modulation of the inwardly rectifying potassium channel in isolated human ventricular myocytes. Alteration in channel response to beta-adrenergic stimulation in failing human hearts*. J Clin Invest, 1995. **96**(6): p. 2870-2881.
55. Lamah J, et al., *Structure and Function of G Protein Coupled Receptors*. Pharm Res, 1990. **7**(12): p. 1213-1221.
56. Lazzara R., *Mechanisms and management of congenital and acquired long QT syndromes*. Arch Mal Coeur Vaiss 1996. **89**(Spec No 1): p. 51-5.
57. Li GR, et al., *Evidence for two components of delayed rectifier K⁺ current in human ventricular myocytes*. Circ Res, 1996b. **78**(689-696).
58. Liggett S., *Molecular and genetic basis of beta2 -adrenergic receptor function*. J Allergy Clin Immun, 1999. **104**(2, Supplement 1): p. S42-S46.
59. Long SB, et al., *Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling*. Science, 2005. **309**(5736): p. 903-908.
60. Marx SO, et al., *Regulation of the ryanodine receptor in heart failure*. Basic Res Cardiol, 2002. **97**(1): p. 149-51.

61. Matsuura H, et al., *An analysis of the delayed outward current in single ventricular cells of the guinea-pig.* . Pflügers Arch, 1987. **410**(6): p. 596-603.
62. Matsuura H, et al., *Effects of oxidant stress on steady-state background currents in isolated ventricular myocytes.* Am J Phys, 1991. **261**(5): p. H1358-1365.
63. Mattiazzi A, et al., *Role of phospholamban phosphorylation on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions.* Cardiovasc Res, 2005. **68**(3): p. 366-375.
64. Mazhari R, et al., *Molecular interactions between two long-QT syndrome gene products, HERG and KCNE2, rationalized by in vitro and in silico analysis.* Circ Res, 2001. **89**(1): p. 33-38.
65. Mei FC, et al., *Interplay between exchange protein directly activated by cAMP (Epac) and microtubule cytoskeleton.* Mol Biosyst, 2005. **1**(4): p. 325-31.
66. Melchiorre C., *Selectivity of alpha 1 and alpha 2 adrenergic agonists and antagonists.* Farmaco Sci, 1980. **35**(7): p. 535-50.
67. Mitcheson JS, et al., *A structural basis of drug-induced long QT syndrome.* . Proc Natl Acad Sci USA, 2000. **97**: p. 12329-12333.
68. Mitcheson JS, et al., *Characteristics of a transient outward current (sensitive to 4-aminopyridine) in Ca²⁺-tolerant myocytes isolated from the rabbit atrioventricular node.* Pflügers Arch, 1999. **438**(1): p. 68-78.
69. Näbauer M, et al., *Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle.* Circulation, 1996. **93**(1): p. 168-177.
70. Nakanishi H, et al., *Activation of the zeta isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate.* J Biol Chem, 1993. **268**(1): p. 13-16.
71. Nattel S, et al., *Cardiac ultrarapid delayed rectifiers: a novel potassium current family of functional similarity and molecular diversity.* . Cell Physiol Biochem, 1999. **9**(4-5): p. 217-226.
72. Nerbonne J., *Molecular basis of functional voltage-gated K⁺ channel diversity in the mammalian myocardium.* J Physiol, 2000. **525**: p. 285-298.
73. Nitta J, et al., *Subcellular mechanism for Ca²⁺-dependent enhancement of delayed rectifier K⁺ current in isolated membrane patches of guinea pig ventricular myocytes.* . Circ Res, 1994. **74**(1): p. 96-104.
74. Ono K, et al., *Properties of the delayed rectifier potassium current in porcine sinoatrial node cells.* J Physiol, 2000. **524**: p. 51-62.
75. Park WS, et al., *The protein kinase C inhibitor, bisindolylmaleimide (I), inhibits voltage-dependent K⁺ channels in coronary arterial smooth muscle cells.* Life Sci, 2005. **77**: p. 512-527.
76. Payet MD, et al., *Single-channel analysis of a potassium inward rectifier in myocytes of newborn rat heart.* J Membr Biol, 1985. **86**(2): p. 79-88.
77. Pereira L, et al., *The cAMP binding protein Epac modulates Ca²⁺ sparks by a Ca²⁺/calmodulin kinase signalling pathway in rat cardiac myocytes.* J Phys, 2007. **583**(2): p. 685-694.
78. Ping P, et al., *Ischemic Preconditioning Induces Selective Translocation of Protein Kinase C Isoforms {epsilon} and {eta} in the Heart of Conscious Rabbits Without Subcellular Redistribution of Total Protein Kinase C Activity.* Circ Res, 1997. **81**(3): p. 404-414.
79. Pucéat M, et al., *Differential regulation of protein kinase C isoforms in isolated neonatal and adult rat cardiomyocytes.* J Biol Chem, 1994. **269**(24): p. 16938-16944.
80. Rang HP, et al., *Chapter 10.*, in *Pharmacology.* 2003, Elsevier.
81. Rehmann H, et al., *Structure and regulation of the cAMP-binding domains of Epac2.* Nat Struct Mol Biol, 2003. **10**(1): p. 26-32.

82. Rochais F, et al., *A Specific Pattern of Phosphodiesterases Controls the cAMP Signals Generated by Different Gs-Coupled Receptors in Adult Rat Ventricular Myocytes*. *Circ Res*, 2006. **98**(8): p. 1081-1088.
83. Roden DM, et al., *Structure and function of cardiac sodium and potassium channels*. *Am J Phys*, 1997. **273**(2): p. H511-525.
84. Roden D.M., et al., *Cardiac ion channels*. *Ann Rev Physiol*, 2002. **64**(1): p. 431-475.
85. Ruppertsberg J., *Intracellular regulation of inward rectifier K⁺ channels*. *Pflügers Arch* 2000. **441**(1): p. 1-11.
86. Rybin VO, et al., *Protein kinase C isoform expression and regulation in the developing rat heart*. *Circ Res*, 1994. **74**(2): p. 299-309.
87. Sanguinetti MC, et al., *A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the I_{Kr} potassium channel*. *Cell*, 1995. **81**(2): p. 299-307.
88. Sanguinetti MC, et al., *Two components of cardiac delayed rectifier K⁺ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents*. *J Gen Physiol*, 1990a. **96**: p. 195-215.
89. Sanguinetti MC, et al., *Role of external Ca²⁺ and K⁺ in gating of cardiac delayed rectifier K⁺ currents*. *Pflügers Arch*, 1992. **420**(2): p. 180-186.
90. Sato T, et al., *Differential mechanism of block of palmitoyl lysophosphatidylcholine and of palmitoylcarnitine on inward rectifier K⁺ channels of guinea-pig ventricular myocytes*. *Cardiovasc Drugs Ther*, 1993. **7**(Suppl 3): p. 575-584.
91. Schmidt M, et al., *Epac and the cardiovascular system*. *Curr Op Pharm*, 2007. **7**(2): p. 193-200.
92. Schreieck J, et al., *Altered transient outward current in human atrial myocytes of patients with reduced left ventricular function*. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2000. **11**(2): p. 180-192.
93. Severi S, et al., *Mechanisms of [beta]-Adrenergic Modulation of IKs in the Guinea-Pig Ventricle: Insights from Experimental and Model-Based Analysis*. *Biophys J*, 2009. **96**(9): p. 3862-3872.
94. Shibasaki T., *Conductance and kinetics of delayed rectifier potassium channels in nodal cells of the rabbit heart*. *J Physiol*, 1987. **387**: p. 227-250.
95. Skeberdis V., *Structure and function of beta3-adrenergic receptors*. *Medicina (Kaunas)*, 2004. **40**(5): p. 407-13.
96. Snyders D., *Structure and function of cardiac potassium channels*. *Cardiovasc Res*, 1999. **42**(2): p. 377-390.
97. Song DK, et al., *Blockade of the delayed rectifier K⁺ currents, I_{Kr}, in rabbit sinoatrial node cells by external divalent cations*. *Pflügers Arch*, 1999. **438**(2): p. 147-153.
98. Spector PS, et al., *Class III antiarrhythmic drugs block HERG, a human cardiac delayed rectifier K⁺ channel. Open-channel block by methanesulfonanilides*. *Circ Res*, 1996. **78**(3): p. 499-503.
99. Stiles GL, et al., *The cardiac beta-adrenergic receptor. Structural similarities of beta 1 and beta 2 receptor subtypes demonstrated by photoaffinity labeling*. *J Biol Chem*, 1983. **258**(13): p. 8443-8449.
100. Sunahara RK, et al., *Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1996. **36**: p. 461-80.
101. Szabó G, et al., *Asymmetrical distribution of ion channels in canine and human left ventricular wall: epicardium versus midmyocardium*. *Pflügers Arch*, 2005. **450**: p. 307-316.

102. Szentadrassy N, et al., *Apico-basal inhomogeneity in distribution of ion channels in canine and human ventricular myocardium*. Cardiovasc Res, 2005. **65**: p.:851-860.
103. Thomas D, et al., *Direct block of hERG potassium channels by the protein kinase C inhibitor bisindolylmaleimide I (GF109203X)*. Cardiovasc Res, 2004b. **64**: p. 467-476.
104. Thomas D, et al., *Delation of protein kinase A phosphorylation sites in the HERG potassium channel inhibits activation shift by protein kinase A*. J Biol Chem, 1999. **274**: p. 27457-27462.
105. Thomas D, et al., *Regulation of HERG potassium channel activation by protein kinase C independent of direct phosphorylation of the channel protein*. Cardiovasc Res, 2003. **59**: p. 14-26.
106. Toda H, et al., *Stimulatory action of protein kinase C epsilon isoform on the slow component of delayed rectifier K⁺ current in guinea-pig atrial myocytes*. Br J Pharmacol, 2007. **150**: p. 1011-1021.
107. Tohse N, et al., *Protein kinase C activation enhances the delayed rectifier potassium current in guinea-pig heart cells*. J Mol Cell Cardiol, 1990. **22**: p. 725-734.
108. Trehwella J., *Protein kinase A targeting and activation as seen by small-angle solution scattering*. Eur J Cell Biol, 2006. **85**(7): p. 655-62.
109. Tristani-Firouzi M., et al., *Functional and clinical characterization of KCNJ2 mutations associated with LQT7 (Andersen syndrome)*. The Journal of Clinical Investigation, 2002. **110**(3): p. 381-388.
110. van der Heyden MAG, et al., *Molecular aspects of adrenergic modulation of the transient outward current*. Cardiovasc Res, 2006. **71**(3): p. 430-442.
111. Vandenberg C., *Inward rectification of a potassium channel in cardiac ventricular cells depends on internal magnesium ions*. Proc Natl Acad Sci USA, 1987. **84**(8): p. 2560-2564.
112. Varró A, et al., *The impact of single cell voltage clamp on the understanding of the cardiac ventricular action potential*. Cardioscience 1992. **3**(3): p. 131-144.
113. Varró A, et al., *Ionic currents and action potentials in rabbit, rat, and guinea pig ventricular myocytes*. Basic Res Cardiol., 1993. **88**(2): p. 93-102.
114. Veldkamp M., *Is the slowly activating component of the delayed rectifier current, I_{Ks}' absent from undiseased human ventricular myocardium?* Cardiovasc Res, 1998. **40**(3): p. 433-435.
115. Veldkamp MW, et al., *Delayed rectifier channels in human ventricular myocytes*. Circulation, 1995. **92**(12): p. 3497-3504.
116. Vereecke J, et al., *The effect of external pH on the delayed rectifying K⁺ current in cardiac ventricular myocytes*. Pflügers Arch, 2000. **439**(6): p. 739-751.
117. Volders PG, et al., *Downregulation of delayed rectifier K⁺ currents in dogs with chronic complete atrioventricular block and acquired torsades de pointes*. Circulation, 1999. **100**(24): p. 2455-2461.
118. Voutilainen-Myllyla S, et al., *Chelerythrine and bisindolylmaleimide I prolong cardiac action potentials by protein kinase C-independent mechanism*. Eur J Pharmacol, 2003. **466**: p. 41-51.
119. Walsh KB, et al., *Regulation of a heart potassium channel by protein kinase A and C*. Science, 1988. **242**(4875): p. 67-69.
120. Walsh KB, et al., *Distinct voltage-dependent regulation of a heart-delayed IK by protein kinases A and C*. Am J Physiol, 1991. **261**(6): p. C1081-1090.
121. Wang H, et al., *Phospholipase C {epsilon} Modulates {beta}-Adrenergic Receptor-Dependent Cardiac Contraction and Inhibits Cardiac Hypertrophy*. Circ Res, 2005. **97**(12): p. 1305-1313.

122. Wang L, et al., ***Developmental changes in the delayed rectifier K⁺ channels in mouse heart.*** *Circ Res*, 1996. **79**(1): p. 79-85.
123. Wang Q, et al., ***Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias.*** *Nat Genet*, 1996. **12**(1): p. 17-23.
124. Wang W, et al., ***β1-Adrenergic receptor activation induces mouse cardiac myocyte death through both L-type calcium channel-dependent and -independent pathways.*** *Am J Phys - Heart Circ Phys*, 2010. **299**(2): p. H322-H331.
125. Wang Z, et al., ***Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes. Evidence for a novel delayed rectifier K⁺ current similar to Kv1.5 cloned channel currents.*** *Circ Res*, 1993. **73**(6): p. 1061-1076.
126. Wang Z, et al., ***Rapid and slow components of delayed rectifier current in human atrial myocytes.*** *Cardiovasc Res*, 1994. **28**(10): p. 1540-1546.
127. Wei Z, et al., ***Protein kinase A-mediated phosphorylation of HERG potassium channels in a human cell line.*** *Chin Med J*, 2002. **115**: p. 668-676.
128. Wiener R., et al., ***The KCNQ1 (Kv7.1) COOH Terminus, a Multitiered Scaffold for Subunit Assembly and Protein Interaction.*** *J Biol Chem*, 2008. **283**(9): p. 5815-5830.
129. Wientzek M, et al., ***Characterization of calcium-dependent forms of protein kinase C in adult rat ventricular myocytes.*** *Mol Cell Biochem*, 1997. **166**(1-2): p. 11-23.
130. Willoughby D, et al., ***Ca²⁺ stimulation of adenylyl cyclase generates dynamic oscillations in cyclic AMP.*** *J Cell Sci*, 2006. **119**(5): p. 828-36.
131. Yang T, et al., ***Extracellular potassium modulation of drug block of I_{Kr}. Implications for torsade de pointes and reverse use-dependence.*** *Circulation*, 1996. **93**(3): p. 407-411.
132. Yang T, et al., ***Rapid inactivation determines the rectification and [K⁺]_o dependence of the rapid component of the delayed rectifier K⁺ current in cardiac cells.*** *Circ Res*, 1997. **80**(6): p. 782-789.
133. Yellen G., ***The voltage-gated potassium channels and their relatives.*** *Nature*, 2002. **419**(6902): p. 35-42.
134. Yokoshiki H, et al., ***Developmental changes of ion channels.***, in *Heart Physiology and Pathophysiology*, Y.K. N Sperelakis, A Terzic, MV Cohen, Editor. 2001, Academic Press: San Diego. p. 719-735.
135. Yu H, et al., ***Transient outward current, I_{to1}, is altered in cardiac memory.*** *Circulation* 1999. **99**(14): p. 1898-1905.
136. Zaritsky JJ, et al., ***The consequences of disrupting cardiac inwardly rectifying K⁺ current (I_{K1}) as revealed by the targeted deletion of the murine Kir2.1 and Kir2.2 genes.*** *J Phys*, 2001. **533**(Pt 3): p. 697-710.
137. Zaza A, ***The cardiac action potential.***, in *An introduction to Cardiac Cellular Electrophysiology*, M.R. A Zaza, Editor. 2000, Harwood Academic Publishers: Newark. p. 59-82.
138. Zhao T, et al., ***Ghrelin secretion stimulated by β1-adrenergic receptors in cultured ghrelinoma cells and in fasted mice.*** *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010. **107**(36): p. 15868-15873.

10., Az értekezésben gyakran használt rövidítések jegyzéke

AC	adenilát-cikláz
ATP	adenozin-trifoszfát
cAMP	ciklikus adenzin monofoszfát
DAG	diacil-glicerol
EPAC	Exchange Protein directly Activated by cAMP
GTP	guanozin-trifoszfát
hERG	human ether-a-go-go gene
I_{K1}	inward rectifier current- befelé egyenirányító káliumáram
I_{Kr}	A késői káliumáram gyors komponense
I_{Ks}	A késői káliumáram lassú komponense
I_{Kur}	A késői káliumáram ultragyors komponense
IP_3	inozitol 1,4,5-trifoszfát
I_{to}	transient outward current- tranziens kifelé irányuló áram
KChAP	K^+ channel accessory protein
KChIP	K^+ channel interacting protein
minK	minimal K^+ channel peptide
MiRP	minK related protein
mt sai.	munkatársai
PDE	foszfodiészteráz
PIP_2	foszfatidilinozitol 4,5-biszfoszfát
PKA	protein kináz A
PKC	protein kináz C
PLC	foszfolipáz C

11., Tárgyszavak

β -adrenerg receptor, cAMP, chelerytrine, GF109203X, I_{Kr} , I_{Ks} , izoproterenol, késői káliumáram, PKA, PKC, szívizomsejt,

12., Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Csernoch László Tanár Úrnak, a Molekuláris Doktori Iskola vezetőjének kutatásaink támogatását, Prof. Dr. Nánási Péter Pál Tanár Úrnak, munkacsoportunk vezetőjének a hatékony munkavégzés feltételeinek biztosítását.

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Magyar Jánosnak az értekezés megírásában nyújtott nélkülözhetetlen segítségét. Munkacsoportunk tőrzstagjainak, Dr. Bányász Tamásnak és Dr. Szentandrassy Norbertnek, hogy bevezettek az elektrofiziológia rejtjelmeibe. Köszönettel tartozom jelenlegi és volt munkatársaimnak, Dr. Bárándi László Viktornak, Dr. Horváth Balázsnak, Dr. Szabó Gergelynek és Dr. Ruzsnavszky Ferencnek a mérések elvégzésében nyújtott segítségért, Dr. Víghné Horváth Katalinnak a nélkülözhetetlen munkáért és az Élettani Intézet minden jelenlegi és volt munkatársának, hogy támogattak és segítettek munkámat.

Végül, de nem utolsósorban családomnak a türelemért és támogatásért.

13., Függelék



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK /146/2011.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Harmati Gábor

Neptun kód: H64KQ7

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Harmati, G.**, Bányász, T., Bárándi, L., Szentandrassy, N., Horváth, B., Szabó, G., Szentmiklósi, J.A., Szénási, G., Nánási, P.P., Magyar, J.: Effects of beta-adrenoceptor stimulation on delayed rectifier K(+) currents in canine ventricular cardiomyocytes. *Br. J. Pharmacol.* 162 (4), 890-896, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01092.x>
IF:5.204 (2009)
2. **Harmati, G.**, Papp, F., Szentandrassy, N., Bárándi, L., Ruzsnavszky, F., Horváth, B., Bányász, T., Magyar, J., Panyi, G., Krasznai, Z., Nánási, P.P.: Effects of the PKC inhibitors chelerythrine and bisindolylmaleimide I (GF 109203X) on delayed rectifier K(+) currents. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 383 (2), 141-148, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-010-0584-8>
IF:2.631 (2009)



További Közlemények

3. Szentandrásy, N., **Harmati, G.**, Bárándi, L., Simkó, J., Horváth, B., Magyar, J., Bányász, T., Lőrincz, I., Szebeni, A., Kecskeméti, V., Nánási, P.P.: Effects of rosiglitazone on the configuration of action potentials and ion currents in canine ventricular cells.
Br. J. Pharmacol. 163 (3), 499-509, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01215.x>
IF:5.204 (2009)
4. Szentmiklósi, J.A., Cseppentő, Á., **Harmati, G.**, Nánási, P.P.: Novel trends in the treatment of cardiovascular disorders: Site- and event- selective adenosinergic drugs..
Curr. Med. Chem. 18 (8), 1164-87, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00395-009-0082-7>
IF:4.708 (2009)
5. Virág, L., Jost, N., Papp, R., Koncz, I., Kristóf, A., Kohajda, Z., **Harmati, G.**, Carbonell-Pascual, B., Ferrero jr, J.M., Papp, G.J., Nánási, P.P., Varró, A.: Analysis of the contribution of Ito to repolarization in canine ventricular myocardium..
Br. J. Pharmacol. Epub ahead of print (2011)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01331.x>
IF:5.204 (2009)
6. Bárándi, L., Virág, L., Jost, N., Horváth, Z., Koncz, I., Papp, R., **Harmati, G.**, Horváth, B., Szentandrásy, N., Bányász, T., Magyar, J., Zaza, A., Varró, A., Nánási, P.P.: Reverse rate-dependent changes are determined by baseline action potential duration in mammalian and human ventricular preparations.
Basic Res. Cardiol. 105 (3), 315-323, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00395-009-0082-7>
IF:5.973 (2009)
7. Bárándi, L., **Harmati, G.**, Horváth, B., Szentandrásy, N., Magyar, J., Varró, A., Nánási, P.P., Bányász, T.: Drug-induced changes in action potential duration are proportional to action potential duration in rat ventricular myocardium.
Gen. Physiol. Biophys. 29 (3), 309-313, 2010.
DOI: http://dx.doi.org/10.4149/gpb_2010_03_309
IF:0.741 (2009)
8. Simkó, J., Szentandrásy, N., **Harmati, G.**, Bárándi, L., Horváth, B., Magyar, J., Bányász, T., Lőrincz, I., Nánási, P.P.: Effects of ropinirole on action potential characteristics and the underlying ion currents in canine ventricular myocytes.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 382 (3), 213-220, 2010.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-010-0538-1>

IF:2.631 (2009)

9. Bányász, T., Horváth, B., Virág, L., Bárándi, L., Szentandrassy, N., **Harmati, G.**, Magyar, J., Marangoni, S., Zaza, A., Varró, A., Nánási, P.P.: Reverse rate dependency is an intrinsic property of canine cardiac preparations.

Cardiovasc. Res. 84 (2), 237-244, 2009.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvp213>

IF:5.801

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2011.05.26

