

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

A kalcium-függő klorid áram szerepe szívműsejteken

Dr. Váczai Krisztina

Témavezető: Prof. Dr. Magyar János



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2016

A KALCIUM-FÜGGŐ KLORID ÁRAM SZEREPE SZÍVIZOMSEJTEKEN

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

Írta: Dr. Váczai Krisztina általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Élettan és Neurobiológia programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Magyar János, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Virág László, az MTA doktora
tagok: Dr. Jost Norbert, PhD
Dr. Pórszász Róbert, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
Orvosi Vegytani Intézet, ÉTK 3.311. szoba
2015. szeptember 28. 13.00 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Varga Zoltán, PhD
Dr. Zsembery Ákos, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Virág László, az MTA doktora
tagok: Dr. Pórszász Róbert, PhD
Dr. Varga Zoltán, PhD
Dr. Virág László, PhD
Dr. Zsembery Ákos, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2016. november 25. 13.00 óra Debreceni Egyetem ÁOK,
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme

Bevezetés

Nemzetközi statisztikák szerint 1000 emberből 53 ember szenved valamilyen szívritmuszavarban. Ezen betegségcsoport Magyarországon körülbelül 500000 embert érint. A ritmuszavarok jelentős halálteki tényezők nemcsak hazánkban, de más európai országban is. A hirtelen szívhalál 50-100 esetben fordul elő 100000 főre számítva a különféle statisztikák alapján. A szívritmuszavarok kialakulásának hátterében a myocyták elektromos aktivitásának kóros működése áll, melynek során megváltozik az akciós potenciál morfológiája, vagy egyes ioncsatornák aktivitása eltér a normálistól. A kóros működés az ingerületképzés, ingerületvezetés, vagy mindkét funkció károsodását idézi elő.

Az arrhythmiaák kezelésére különböző támadáspontú gyógyszermolekulák állnak rendelkezésre, ezek többsége a transzmembrán ioncsatornákon átfolyó ionáramok befolyásolásával fejtik ki hatásukat, és ezáltal megváltoztatják a sejtek repolarizációjának folyamatát, a refrakter periódust vagy az ingerületvezetés sebességét. Az arrhythmiaák kezelésére használt gyógyszerek azonban maguk is arrhythmogén (proarrhythmias) hatással rendelkeznek.

Annak ellenére, hogy a kation csatornákat moduláló szereket régóta alkalmazzák a szívritmuszavarok kezelésében, a betegek túlélése szempontjából ezek a szerekek csak mérsékelten hatékonyak. Számos esetben számoltak be proarrhythmias hatásokról, ezért alkalmazásuk nagy odafigyelést igényel. Ezen nem kívánt hatásuk miatt igény van új terápiás lehetőségek keresésére az arrhythmiaák kezelésében. A szívizomsejtek Ca^{2+} -függő Cl^- csatornáinak szerepe, jelentősége az akciós potenciál kialakításában nem vagy csak alig ismert. Néhány korábbi tanulmányban már vizsgálták a Ca^{2+} -függő Cl^- áram ($I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$) szerepét a késői utódepolarizáció kialakításában és felvetették az ionáram lehetséges szerepét a ritmuszavarok kiváltásában. Ezért a Ca^{2+} -függő Cl^- áram akciós potenciál kialakításában betöltött szerepének tisztázása, lehetőséget teremthet új antiarrhythmias gyógyszermolekulák fejlesztésére.

Célkitűzés

A szívizomsejtek működése szempontjából a Cl^- csatornák szerepe kevésbé tisztázott. Nem teljesen ismert a $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ kinetikája az akciós potenciál alatt, noha leírták, hogy a $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ hozzájárul a szív akciós potenciál kialakításához, mint I_{to} 2-es komponense. Célunk ezért a $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ vizsgálata volt:

- igazoljuk $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ jelenlétét kutya szívének bal kamrájából izolált szívizomsejteken;
- $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ gátlószereinek, a DIDS és a 9-antracén karboxilsav (9-AC) hatásainak összehasonlítása, és annak eldöntése, hogy melyik alkalmasabb a $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ sajátságainak tanulmányozására;
- jellemezzük a $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ membránpotenciál- és Ca^{2+} -függését;
- a $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ szerepének tisztázása az akciós potenciál során;
- a $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ potenciális csatornafehérjéi, a TMEM16A és Bestrophin-3 expressziójának a kimutatása humán és kutya szívizomsejteken;
- a TMEM16A és Bestrophin-3 és az L-típusú Ca^{2+} csatorna fehérjék lokalizációjának megismerése.

Anyagok és módszerek

Elektrofiziológia

Kísérleteinket kutya bal kamrájából izolált szívizomsejteken végeztük. Az általunk alkalmazott protokollok összhangban voltak a „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” alapelveivel. A kísérleti protokollt a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatetikai Bizottsága is jóváhagyta. A szívizomsejteket szegmentperfúziós technikával, kollagenáz emésztéssel izoláltuk. Az akciós potenciálokat egészsejtes elrendezésben, áram-clamp üzemmódban rögzítettük. A transzmembrán ionáram mérések a patch-clamp technika egész sejt konfigurációjában feszültség-clamp és akciós potenciál-clamp körülmények között történtek. A $I_{Cl(Ca)}$ mérésekor az áramot gátlószer érzékeny áramként definiáltuk, azonosításhoz a kontroll körülmények között rögzített áramjelekből kivontuk a gátlószer jelenlétében mért áramjeleket. Az ionáramokat minden esetben a sejt kapacitására normalizáltunk.

Az akciós potenciál-clamp technika alkalmazásával lehetőségünk van egynél több ionáram akciós potenciál alatti lefutásának tanulmányozására az ún. hagyma hámozás technika segítségével. Az akciós potenciál-clamp a feszültség-clamp technika egy speciális módja, ahol parancsjelként a sejt saját akciós potenciálját alkalmazzuk. Az akciós potenciálokat egészsejtes elrendezésben, áram-clamp üzemmódban rögzítettük, majd feszültség-clamp üzemmódra kapcsolva ezeket az akciós potenciálokat használtuk ugyanazon a sejten feszültségparancsként. Az elektrofiziológiai méréseket 37 °C-on végeztük.

Humán bal kamrai szívizomminták feldolgozása

A humán szívizommintákat és izolált szívizomsejteket a Szegedi Tudományegyetem Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézete bocsátotta rendelkezésünkre. A mintákat olyan egészséges donor szívekből nyerték, amelyekből a pulmonáris és aorta billentyűk kerültek transzplantációra.

A kísérletek összhangban voltak a Helsinkai Deklaráció alapelveivel. A kísérletek végrehajtását a Magyar Egészségügyi Minisztérium Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága valamint a Szegedi Egyetem Regionális Humán Orvosbiológiai Kutatásetikai Bizottsága is jóváhagyta. A humán szív bal kamrájából izolált szívizomsejteken immunfestést alkalmaztunk és konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

Intracelluláris Ca^{2+} koncentráció és sejrövidülés mérése

A sejrövidülést optikailag detektáltuk, az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció ($[Ca^{2+}]_i$) változást, Ca^{2+} érzékeny festék, FURA-2-AM alkalmazásával tettük láthatóvá.

Immunfestés

A $Ca_v1.2$, TMEM16A és Bestrophin-3 immunfestését kutya és humán kamrai szívizomsejteket végeztük. Az izolált sejteket TMEM16A elleni (nyúl 1:200), Bestrophin-3 elleni (kecske 1:200), $Ca_v1.2$ elleni (nyúl 1:200), ryanodin receptor elleni (egér 1:200) vagy cytochrome c elleni (egér 1:200) elsődleges antitesttel jelöltük. Az elsődleges antitesteket követően alkalmaztuk a megfelelő másodlagos antitesteket, melyek a következők voltak: biotinizált nyúl ellen termeltetett antitest, egér ellen termeltetett antitest vagy kecske ellen termeltetett antitest. Az immunfestés utolsó specifikus lépése a Streptavidine Alexa488-al történő inkubáció, illetve Cy3-jelölt, egér vagy nyúl elleni jelölés volt. A mintákat a sejtmagokat is jelölő 4',6-diamidino-2-phenylindole-t (DAPI) tartalmazó Vectashield mounting medium-mal fedtük. A fluoreszcens jelöléseket Zeiss lézer pásztázó konfokális mikroszkóppal detektáltuk. Annak érdekében, hogy számszerűsítsük a fluorofórok ko-lokalizációjának mértékét, Pearson korrelációs koefficiens-t határoztunk meg Zeiss LSM510 Software segítségével. A Pearson-féle korrelációs együttható a mérések közötti lineáris kapcsolat szorosságát méri.

Statisztikai elemzés

A közölt adatok a kísérleti eredmények számtani középértékei \pm a középérték körüli standard hiba. A csoportok összehasonlítása során egyszempontos variancia-analízist, Student-féle kétmintás t-próbát, illetve önkontrollos t-próbát alkalmaztunk az adott statisztikai kérdéseknek megfelelően. Az eltéréseket $p \leq 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

Eredmények

A kalcium-függő klorid áram jellemzése négyszögimpulzusok alkalmazásával

A $I_{Cl(Ca)}$ -ot 9-AC- vagy DIDS-érzékeny áramként azonosítottuk. A sejteket -100 mV és +100 mV közötti membránpotenciál tartományban, 20 mV-onként növekvő, 200 ms hosszú négyszögimpulzusokkal stimuláltuk öt másodpercenként. Kontrollnak tekintettük a gátlószer nélkül mért áramgörbéket. A kontroll áramgörbék felvételét követően a sejteket a két gyakorta használt klorid áram blokkolóval, 0,5 mmol/l 9-AC-val vagy 0,2 mmol/l DIDS-sel perfundáltuk, majd a gátlás kialakulása után ismét rögzítettük az áramgörbéket. A 9-AC-, illetve DIDS-szenzitív áramgörbéket úgy kaptuk meg, hogy kivontuk a kontroll körülmények között rögzített áramokból a gátlószer jelenlétében mért áramgörbéket. Eredményeink azt mutatják, hogy a 9-AC és a DIDS-szenzitív áram 15 ms-on belül aktiválódott, és az áram amplitúdója 30 ms-on belül gyakorlatilag nullára csökkent. Megállapítottuk, hogy a 9-AC- és DIDS-érzékeny áram amplitúdók nem különböznek szignifikánsan egymástól. Az áram-feszültség görbe mindkét gátlószer jelenlétében hasonló lefutású, harang alakú görbe. Legnagyobb áram amplitúdókat +60 mV membránpotenciál esetén mértünk.

A 9-AC és a DIDS hatása a kamrafal midmyocardiális sejtjeinek akciós potenciáljára

A két gátlószer akciós potenciál morfológiára kifejtett hatását a kamrafal középső rétegéből származó sejteken vizsgáltuk. Az akciós potenciálok mérésekor az ingerlési ciklushosszakat 0,3 s és 5 s között változtattuk. Kontrollnak a normál Tyrode oldattal perfundált sejtek akciós potenciálját tekintettük. A kontroll akciós potenciálok felvételét követően, a sejteket 0,2 mmol/l DIDS vagy 0,5 mmol/l 9-AC tartalmú normál Tyrode oldattal perfundáltuk. A gátlószer hatása minden esetben 7-8 perc alatt kialakult, és stabil maradt. Ekkor ismételten rögzítettük az akciós potenciálokat a különböző ingerlési ciklushosszokon. A mérés sorozat

végén a sejteket ismét gátlószermentes, normál Tyrode oldattal perfundáltuk. Megállapítottuk, hogy a DIDS és a 9-AC hatására az akciós potenciál morfológia hasonlóképpen változott, az akciós potenciál felszálló szára kivételével. A DIDS-sel, illetve a 9-AC-val végzett mérések eredményeit átlagolva megállapítottuk, hogy a vizsgált ingerlési frekvencia tartományban mindkét gátlószer szignifikánsan megnövelte az akciós potenciál 90%-os repolarizációjánál mérhető időtartamot (APD_{90}). Mindkét gátlószer szignifikáns mértékben csökkentette az első fázis repolarizáció nagyságát, de a ciklushossztól való függésük különbözött. A 9-AC az összes ciklushosszon azonos mértékben csökkentette az első fázis repolarizáció nagyságát. A DIDS rövidebb ciklushosszaknál a 9-AC-hoz hasonló gátlást okozott, viszont magasabb ciklushosszak esetén (2 és 5 s) a csökkenés mértéke szignifikánsan nagyobb volt. A DIDS szignifikánsan csökkentette az APA és a V_{max} értékét is, míg a 9-AC nem befolyásolta ezen paramétert. A nyugalmi membránpotenciál értékét egyik gátlószer sem befolyásolta szignifikáns mértékben.

A 9-AC dóziszfüggő hatása az akciós potenciál paramétereire

A megfelelő 9-AC koncentrációnak a kiválasztásához vizsgáltuk a 9-AC koncentráció-függő hatásait az akciós potenciál paramétereire. A 9-AC-t 0,05 mmol/l és 1 mmol/l koncentráció tartományban kumulatív módon alkalmaztuk. Újabb dózis alkalmazása előtt minden esetben legalább 8 percet vártunk a hatás beállításához. A sejteket 1 s-os ingerlési ciklushosszak mellett folyamatosan ingereltük. Eredményeink azt mutatták, hogy a 9-AC akciós potenciál nyújtó és első fázis repolarizációt csökkentő hatásai dóziszfüggőek: 0,3 mmol/l az a legkisebb 9-AC dózis, mely szignifikáns APD és első fázis repolarizáció változásokat okozott. A 0,5 mmol/l 9-AC tovább csökkentette az első fázis repolarizációt, és nyújtotta az APD-t. Az 1 mmol/l koncentrációjú 9-AC már nem okozott további változást az akciós potenciál paramétereiben. Ezért a további mérések során 0.5 mmol/l-es koncentrációt alkalmaztunk.

A 9-AC hatása az akciós potenciál kialakításában résztvevő ionáramokra

Ahhoz, hogy a 9-AC-at megbízhatóan alkalmazzuk akciós potenciál-clamp mérésekben, fontos volt megvizsgálnunk, hogy mennyire tekinthető specifikus gátlószernek, azaz 0,5 mmol/l koncentrációban milyen mértékben befolyásolja az akciós potenciál kialakításában résztvevő ionáramokat. Ezeket a méréseket négyszögimpulzusok alkalmazásával feszültség-clamp körülmények között végeztük. A sejteket ebben az esetben is legalább nyolc percig perfundáltuk 9-AC-vel. Megállapítottuk, hogy 0,5 mmol/l 9-AC nem befolyásolta szignifikánsan az $I_{Ca,L}$ amplitúdóját, mely $-5,34 \pm 0,44$ A/F-nak adódott kontroll körülmények között, illetve $-5,27 \pm 0,44$ A/F volt 9-AC jelenlétében. Megállapítottuk továbbá, hogy a 9-AC alkalmazása nem volt hatással a I_{Kr} farokáram-amplitúdójára, az áramdenzitások $0,73 \pm 0,05$ A/F-nak és $0,72 \pm 0,05$ A/F-nak adódtak kontroll, illetve 9-AC jelenlétében. Öt sejten mért adatok alapján elmondható, hogy a I_{Ks} amplitúdója nem változott 9-AC hatására, a sejtkapacitásra normalizált áramamplitúdó $1,66 \pm 0,03$ A/F és $1,61 \pm 0,05$ A/F volt kontroll körülmények között, illetve 9-AC perfúziója során. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a 9-AC nem változtatta meg az I_{K1} amplitúdóját, mely hat sejten átlagolva $-18,00 \pm 1,54$ és $-18,36 \pm 2,16$ A/F-nak adódott kontroll körülmények között, illetve 9-AC jelenlétében.

A Ca^{2+} -függő Cl^- áram Ca^{2+} -függésének tanulmányozása

A $I_{Cl(Ca)}$ Ca^{2+} -függésének tanulmányozásához két eltérő Ca^{2+} kötési kinetikával rendelkező kelátort, az EGTA-t és a BAPTA-t alkalmaztuk. 10 mmol/l BAPTA hatására a I_{9-AC} amplitúdók a vizsgált membránpotenciál tartományban nullára csökkentek, a +60 mV-nál mérhető áram $2,44 \pm 0,28$ A/F-ról $0,07 \pm 0,01$ A/F-ra csökkent. Ezzel szemben 10 mmol/l EGTA ugyan csökkentette a I_{9-AC} amplitúdóit, de nem szüntette meg az áramot és nem változtatta meg az áram membránpotenciál-függését. A +60 mV-nál mérhető áram amplitúdója $1,49 \pm 0,27$ A/F-nak adódott EGTA jelenlétében. A $I_{Cl(Ca)}$ Ca^{2+} -függésének további

vizsgálata során az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációt $1,1 \mu\text{mol/l}$ értékre állítottuk be, mely érték a systole alatt mérhető globális Ca^{2+} koncentrációnak felel meg. A $+60 \text{ mV}$ -ra történő depolarizációval mérhető áram denzitás ebben az esetben $0,31 \pm 0,06 \text{ A/F}$ volt, mely ugyan nagyobb, mint a 10 mmol/l BAPTA jelenlétében mért érték, de jóval kisebb, mint amit a kontroll körülmények között, puffermentes belső oldattal mértünk. Az extracelluláris Ca^{2+} szerepének a tisztázására, a méréseinket elvégeztük az L-típusú Ca^{2+} csatorna szelektív gátlószerének tekinthető nisoldipin jelenlétében is. $1 \mu\text{mol/l}$ nisoldipint alkalmazva mind az $I_{\text{Ca,L}}$, mind $I_{9\text{-AC}}$ amplitúdói közel nulla értékre csökkentek. Ezen adatok alapján arra következtethetünk, hogy a $I_{\text{Cl(Ca)}}$ fiziológiás aktivációjában nagy szerepe van az L-típusú Ca^{2+} csatornákon keresztül beáramló Ca^{2+} -nak.

A Ca^{2+} -függő Cl^- áram profilja az akciós potenciálja alatt

Annak érdekében, hogy tanulmányozzuk a $I_{\text{Cl(Ca)}}$ akciós potenciál kialakításához való hozzájárulását az akciós potenciál voltage-clamp technikát alkalmaztunk. Azért, hogy a $I_{\text{Cl(Ca)}}$ aktivációját fiziológiás körülmények között detektáljuk, nem befolyásoltuk a sejt Ca^{2+} homeostasisát, azaz nem puffereltük az intracelluláris Ca^{2+} -ot. Akciós potenciál voltage-clamp technika és egyidejű epifluoreszcens Ca^{2+} méréssel megvizsgáltuk a BAPTA és az EGTA hatását a $I_{\text{Cl(Ca)}}$ -ra és a Ca^{2+} tranziensre. A $I_{\text{Cl(Ca)}}$ mellett a $I_{\text{Ca,L}}$ -ot is láthatóvá tettük az ún. hagyma hámozás technika segítségével. Abban az esetben mikor 10 mmol/l EGTA-t vagy BAPTA-t adtunk a pipetta oldathoz a Ca^{2+} tranziensek eltűntek és a sejtek kontrakciója is megszűnt. BAPTA jelenlétében jelentősen megnyúlt az akciós potenciál, megemelkedett az akciós potenciál plateau potenciálja és csökkent az első fázis repolarizáció mértéke. Az EGTA hatására csupán az első fázis repolarizáció amplitúdója csökkent, de ez a változás kisebbnek adódott, mint BAPTA esetén. A nisoldipin szenzitív áram (I_{NISO}) lefutására is eltérő hatással volt az EGTA és a BAPTA. Amíg BAPTA jelenlétében szignifikánsan megnőtt a I_{NISO} amplitúdója

és az áram által szállított össztöltés mennyisége, addig az EGTA-nak nem volt hatása ezen paraméterekre. A I_{9-AC} egy korai outward és egy késői inward áramot metszett ki akciós potenciál voltage-clamp technikával (I_{9-AC}). Az outward komponens az első fázis repolarizációnak megfelelően jelentkezett, $5,5 \pm 0,6$ ms-mal az akciós potenciál csúcsát követően és $5,1 \pm 0,6$ ms-mal az első fázis repolarizáció legmélyebb pontját (notch) megelőzve. Az amplitúdója $1,62 \pm 0,06$ A/F-nak adódott. Az inward komponens amplitúdója $-0,16 \pm 0,02$ A/F volt, mely időben az akciós potenciál terminális repolarizációjának megfelelően jelentkezett. Az $I_{Ca,L}$ -mal összehasonlítva a $I_{Cl(Ca)}$ outward csúcsa időben $6,4 \pm 0,5$ ms-mal később jelentkezett, mint a $I_{Ca,L}$ inward csúcsa ($p < 0,05$; $n=6$). BAPTA hatására mindkét komponens amplitúdója közel nullára csökkent. Az EGTA csak az outward komponens amplitúdóját csökkentette szignifikáns mértékben $1,62 \pm 0,06$ A/F-ról $1,17 \pm 0,09$ A/F-ra ($p < 0,05$; $n=9$), de a csökkenés mértéke kisebb volt, mint amit BAPTA jelenlétében tapasztaltunk. Az áramok által szállított össztöltés mennyiségek összehasonlításával is hasonló eredményeket kaptunk. A BAPTA és az EGTA hatásaiban tapasztalt eltérésekért valószínűleg a BAPTA, EGTA-hoz viszonyított gyorsabb és ezáltal effektívebb Ca^{2+} kötése a felelős.

Az intracelluláris Cl^- koncentráció megváltoztatásának hatása a Ca^{2+} -függő Cl^- áramra

Annak érdekében, hogy bizonyítsuk, hogy az általunk vizsgált ionáram esetén a Cl^- -ok a töltéshordozók, megváltoztattuk az intracelluláris tér Cl^- koncentrációját. Az eddig bemutatott kísérletekben a pipetta oldat és így a sejten belüli tér Cl^- koncentrációja 47 mmol/l volt, amit 27 mmol/l-re (equimoláris aszpartáttal helyettesítve) csökkentettünk. Ezzel a Cl^- -ok egyensúlyi potenciáljának értéke -32 mV-ról -47 mV-ra változott. Megállapítottuk, hogy a Cl^- hajtóerejének megváltoztatásának hatására a I_{9-AC} outward komponensének amplitúdója és a

görbe alatti területe megnövekedett, emellett az inward komponens gyakorlatilag eltűnt.

A Ca^{2+} -függő Cl^- áram tanulmányozása két különböző ingerlési frekvencián

Ebben a kísérletsorozatban a sejteket előbb 1 Hz, majd 2 Hz frekvenciájú impulzussal stimuláltuk, és vizsgáltuk a I_{9-AC} amplitúdójának változását. Az előzetes várakozásainknak megfelelően, a I_{9-AC} amplitúdója és az általa szállított teljes töltés mennyisége is szignifikáns mértékben megemelkedett, amikor az ingerlési frekvenciát 1-ről 2 Hz-re növeltük.

Az L-típusú Ca^{2+} áram emelésével a Ca^{2+} -függő Cl^- áram is nő

A nisoldipin jelenlétében végzett kísérletek rávilágítottak arra, hogy a $I_{Cl(Ca)}$ aktivációjában kritikus szerepe van az $I_{Ca,L}$ -nak. Ennek további bizonyítása érdekében $I_{Ca,L}$ -ot két egymástól eltérő módon aktiváltuk, és vizsgáltuk a $I_{Cl(Ca)}$ -ra gyakorolt hatását. Az $I_{Ca,L}$ amplitúdóját indirekt módon, a β adrenerg jelátviteli útvonal aktiválásával, isoproterenol hozzáadásával valamint direkt módon egy ioncsatorna aktivátor, a Bay K8644 alkalmazásával növeltük. Megállapítottuk, hogy 10 nmol/l isoproterenol duplájára növelte a systoles Ca^{2+} koncentrációt és szignifikáns mértékben emelte az akciós potenciál plateau potenciál értékét és rövidítette az akciós potenciál hosszát is. Akciós potenciál voltage-clamp körülmények között az isoproterenol hatására megjelenő áramnak két komponense volt, melyek az $I_{Ca,L}$, a I_{Ks} illetve I_{Kr} aktivációjának tulajdoníthatóak. Isoproterenol jelenlétében szignifikánsan nagyobb I_{9-AC} outward és inward komponenszt mértünk a kontrollhoz képest. Az isoproterenol hatásához hasonlóan, 20 nmol/l Bay K8644 is szignifikáns mértékben növelte a Ca^{2+} tranziens amplitúdóját. A Bay K8644 hatására csökkent az első fázis repolarizáció mértéke, emelkedett az akciós potenciál plateau fázisa és megnövekedett az akciós potenciál időtartama. Akciós potenciál voltage-clamp körülmények között a Bay K8644 hatására megjelenő áramnak csak egy komponense volt, ami az $I_{Ca,L}$ -

nak tulajdonítható. Az I_{9-AC} outward és inward komponensei kétszeresére nőttek Bay K8644 hatására.

A fentiek alapján megállapítottuk, hogy az $I_{Ca,L}$ növelés esetén nő a I_{9-AC} amplitúdója. Ez a növekedés független a $I_{Ca,L}$ növelés módjától. Eredményeink alapján arra következtetünk, hogy a $I_{Cl(Ca)}$ aktivációjában fontos szerepe van a $I_{Ca,L}$ -nak.

A sarcoplasmaticus reticulumból történő Ca^{2+} felszabadulás gátlása csökkenti ugyan a Ca^{2+} -függő Cl^- áramot, de nem szünteti meg

A további kísérletekben a sarcoplasmaticus reticulumból történő Ca^{2+} felszabadulás hatását vizsgáltuk a $I_{Cl(Ca)}$ aktivációjában. A sarcoplasmaticus reticulumból történő Ca^{2+} felszabadulást 10 $\mu\text{mol/l}$ ryanodin 15 perces perfúziójával gátoltuk. A ryanodin kezelés megszüntette a szívműködés Ca^{2+} transziensét és a kontrakcióját. A ryanodin emelte az akciós potenciál plateau fázisát és csökkentette az első fázis repolarizáció mértékét. 9-AC és ryanodin együttes perfúziója során azonban az első fázis repolarizáció amplitúdója tovább csökkent. Az akciós potenciál voltage-clamp kísérletek során a 9-AC-val kimetszett áram amplitúdója és az általa szállított teljes töltés mennyisége szignifikánsan csökkent a ryanodin előkezelést követően, de az előzetes várakozásainkkal ellentétben a sarcoplasmaticus reticulumból történő Ca^{2+} felszabadulás gátlása nem csökkentette nullára az áramot. Ezek alapján megállapítottuk, hogy a $I_{Cl(Ca)}$ a ryanodin receptorok gátlása mellett is aktiválható, tehát a sarcoplasmaticus reticulumból történő Ca^{2+} felszabadulás nem nélkülözhetetlen az áram aktivációjához.

A Bestrophin-3, TMEM16A és az L-típusú Ca^{2+} csatorna ko-expressziója kutya szívéből izolált sejteken

A $I_{Cl(Ca)}$ -ért felelős potenciális csatornafehérjék expresszióját és szívműködésben való elhelyezkedését immuncytokémiai módszerekkel és konfokális mikroszkóp

segítségével vizsgáltuk. Ismert, hogy az L-típusú Ca^{2+} csatornák a T tubulusokban helyezkednek el. Eredményeink is megerősítették ezt, a Cav1.2 jelölés a T tubulusok mentén volt a legerősebb. A Bestrophin-3 festődése is a harántcsíkolatnak megfelelően volt a legkifejezettebb. A ko-lokalizáció számszerűsítésére a Pearson-féle korrelációs koefficiens értékét határoztuk meg. Értéke $0,74 \pm 0,03$ -nak adódott a Cav1.2 és Bestrophin-3 között ($n=8$). A Pearson-féle korrelációs koefficiens értéke a Bestrophin-3 és a TMEM16A jelölése során is magas, $0,74 \pm 0,06$ -nak adódott ($n=8$).

Egészséges humán izolált szívizomsejteken is elvégeztük az immunfestést. A képek elemzésével elsőként mutattuk ki, hogy mind a Bestrophin-3, mind a TMEM16A fehérjék expresszálódnak humán kamrai szívizmon. Hasonlóan a kutya szívizomsejtekhez a két fehérje erős ko-lokalizációt mutat. A Pearson-féle korrelációs koefficiens értéke a Cav1.2 és Bestrophin-3 esetén $0,84 \pm 0,02$ -nek adódott ($n=18$). A TMEM16A és Bestrophin-3 esetében ez az érték $0,85 \pm 0,02$ -nek adódott ($n=5$).

Annak érdekében, hogy kizárjuk a fehérjék festődésének véletlenszerű ko-lokalizációját, további fehérjék elhelyezkedését tanulmányoztuk. A cytochrome c és a ryanodin receptorok festődése esetén a ko-lokalizáció valószínűségét jelző Pearson-féle korrelációs együttható alacsony volt, $0,25 \pm 0,03$ a TMEM16A és cytochrome c esetén ($n=7$), és $0,36 \pm 0,05$ a Bestrophin-3 és a ryanodin receptor között ($n=3$).

Megbeszélés

Munkánk során a $I_{Cl(Ca)}$ szerepét tanulmányoztuk szívizomsejteken. Megállapítottuk, hogy a $I_{Cl(Ca)}$ fiziológias szerepének vizsgálatára a 9-AC előnyösebb, mint a DIDS, hiszen a 9-AC az általunk vizsgált koncentrációban nem gátolta az akciós potenciált kialakító főbb ionáramok (I_{Na} , $I_{Ca,L}$, I_{Kr} , I_{Ks} , I_{K1}) egyikét sem, míg DIDS gátolta a Na^+ csatornákat. Megállapítottuk továbbá, hogy a $I_{Cl(Ca)}$ időben az akciós potenciál első fázis repolarizáció és terminális repolarizáció alatt aktiválódik. Bizonyítottuk, hogy a 9-AC-érzékeny áram Ca^{2+} -függő és a Cl^- a töltéshordozó. Eredményeink arra is utalnak, hogy a $I_{Cl(Ca)}$ aktiválásához a csatorna közelében elhelyezkedő L-típusú Ca^{2+} csatornákon át történő Ca^{2+} belépés szükséges, a sarcoplasmaticus reticulumból felszabaduló Ca^{2+} felerősíti a $I_{Cl(Ca)}$ aktivációját. Elsőként mutattuk ki, hogy a TMEM16A-t és Bestrophin-3-at kutya bal kamrájából izolált szívizomsejteken és egészséges humán szívizommintákon. A TMEM16A és Bestrophin-3 expressziója a T tubulusok mentén a legkifejezettebb, hasonlóan az L-típusú Ca^{2+} csatornák elhelyezkedéséhez.

A 9-AC és DIDS összehasonlítása

Voltage-clamp méréseink során hasonló DIDS- és 9-AC-szenzitív áramamplitúdókat mértünk az általunk vizsgált valamennyi membránpotenciál értéken. Ez arra utal, hogy a 0,5 mmol/l 9-AC és a 0,2 mmol/l DIDS hasonló $I_{Cl(Ca)}$ gátló potenciállal rendelkezik.

Megállapítottuk, hogy mind a 9-AC, mind a DIDS-érzékeny áram feszültségfüggése harang alakú görbe. A $I_{Cl(Ca)}$ -20 mV-on vált detektálhatóvá, maximális értéket +60 mV-nál érte el. Az ennél pozitívabb membránpotenciálok az áram amplitúdója csökkent. Ennek hátterében az $I_{Ca,L}$ hajtóerejének csökkenését feltételezzük. Az áram időbeli aktivációja és inaktivációja egyaránt gyors, az áram nullára csökkent a depolarizáló impulzust követő 30 ms-on belül. Ezzel szemben expresszált TMEM16A csatornák

áramának egy fenntartott komponensét lehet megfigyelni. Ezen különbség háttérében a sejtvonalak és a natív sejtek közötti különbségek is állhatnak. A natív szívizomsejtekkel szemben a sejtvonalakban az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változása eltérő kinetikát mutat és a Ca^{2+} -ok intracelluláris kompartmentalizációja is sokkal kevésbé kifejezett.

A 9-AC és a DIDS akciós potenciálra kifejtett hatásának összehasonlításakor megállapítottuk, hogy a DIDS szignifikáns módon csökkentette az akciós potenciál felszálló szárának meredekségét (V_{\max}) és az akciós potenciál amplitúdóját. Az általunk vizsgált frekvencia tartományban (3-0,2 Hz) a $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ gátlása (9-AC vagy DIDS által) az első fázis repolarizáció amplitúdójának csökkenését és az akciós potenciál időtartamának növekedését okozta.

Az első fázis repolarizáció nagyságát több ionáram (I_{Na} , I_{to1} , $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ és $I_{\text{Ca,L}}$) is befolyásolja. A DIDS ezek közül a I_{Na} -ot, a $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ -ot is gátolja, míg a 9-AC a $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ -on kívül nem befolyásolja ezen áramokat. Az első fázis repolarizáció amplitúdójára jellemző a fordított frekvenciafüggés, mely azt jelenti, hogy hosszabb ciklushosszak mellett (alacsonyabb ingerlési frekvenciákon) nagyobb amplitúdóval rendelkeznek. Ezen jelenség annak a következménye, hogy az I_{to1} visszatérése az inaktivációjából lassú, ami magasabb frekvenciákon csökkent I_{to1} amplitúdót eredményez. A másik tényező, amely hozzájárul az első fázis repolarizáció amplitúdójának fordított frekvenciafüggéséhez a $I_{\text{Ca,L}}$, melynek amplitúdója a magasabb ingerlési frekvenciákon (rövidebb ciklushosszak esetén) nő, a Ca^{2+} -calmodulin protein kináz (CaMKII) függő szabályozó útvonal aktiválásával. A $I_{\text{Ca,L}}$ amplitúdójának növekedése hatására az akciós potenciál plateau potenciálja időben korábban emelkedik, ami csökkenti az első fázis repolarizáció amplitúdóját. Ez alapján nem meglepő, hogy a 9-AC gátló hatása is frekvenciafüggő, hiszen magasabb ingerlési frekvenciákon nagyobb amplitúdójú Ca^{2+} tranzienszt és általa nagyobb amplitúdójú $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ -ot mértünk. Ezzel szemben a DIDS első fázis repolarizációt csökkentő hatása fordított frekvenciafüggőnek

bizonyult. A 9-AC és a DIDS ezen eltérő hatását a DIDS minden frekvencián mutatózó állandó Na^+ csatorna gátlása magyarázhatja.

A 9-AC koncentráció-függő hatásait vizsgálva megállapítottuk, hogy 0,5 mmol/l 9-AC a megfelelő dózis a $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ tanulmányozására kutya szívéből izolált kamrai sejteken. A különféle irodalmi közleményekben 0,1 és 1 mmol/l közötti 9-AC koncentrációkat alkalmaztak a klorid csatornák gátlására. A 0,5 mmol/l-es 9-AC koncentráció első fázis csökkentő és akciós potenciál nyújtó hatása maximális volt, 1 mmol/l-es koncentráció nem okozott további változást.

Eredményeink rámutattak arra, hogy a Na^+ csatorna gátló hatása miatt a DIDS kevésbé használható $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ vizsgálatára akciós potenciál és akciós potenciál voltage-clamp mérések során. Hangsúlyoznunk kell azonban, hogy voltage-clamp mérésekben a DIDS ugyanolyan hatékonyan alkalmazható szer a $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ gátlására, mint a 9-AC, mert a -40 mV-os tartófeszültségen a feszültségfüggő Na^+ csatornák inaktivált állapotban vannak. Ezt demonstrálják voltage-clamp méréseink is, ahol nem találtunk különbséget a DIDS- és 9-AC-szenzitív áramok között.

A $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ tulajdonságai

Munkánk során célunk volt a $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ akciós potenciál alatti profiljának tanulmányozása. Noha a $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ -ot számtalan faj szívizomsejtjeiben kimutatták már, a $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ akciós potenciál alatti profilját akciós potenciál voltage-clamp technika segítségével fiziológias körülmények között ez idáig nem vizsgálták. Egyetlen tanulmányt publikáltak ez idáig, melyben a perforált patch-clamp technikát kombinálták az akciós potenciál voltage-clamp technikával, ahol egy tipikusnak mondott akciós potenciált alkalmaztak feszültségparancsként.

A méréseinket akciós potenciál voltage-clamp technikával végeztük, ahol minden esetben a vizsgált sejt saját akciós potenciálját használtuk parancsjelként. Ez a technika lehetőséget biztosított arra, hogy az ionáramok fiziológias aktivációját és akciós potenciál alatti profilját tanulmányozzuk. A mérések során nem alkalmaztunk intracelluláris Ca^{2+} puffert (kivételt képeznek azon méréseink, ahol

vizsgáltuk a $I_{Cl(Ca)} Ca^{2+}$ függését) ezáltal az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció valós kinetikával változott a sejt ingerlése során.

Megállapítottuk, hogy a $I_{Cl(Ca)}$ akciós potenciál alatti profilja (9-AC szenzitív áramként mérve) két komponensből tevődött össze: egy korai tranziens outward és egy késői inward áramcsúcsot lehetett elkülöníteni. Az outward komponens gyors aktivációt mutatott, majd az áram amplitúdója gyorsan nullára is csökkent annak ellenére, hogy az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció magas maradt és a Cl^- ok hajtóereje sem csökkent. A $I_{Cl(Ca)}$ -ot létrehozó csatornák időfüggő inaktivációja magyarázhatja a jelenséget, ennek azonban ellentmond Zygmunt és munkacsoportjának azon megfigyelése, hogy állandó intracelluláris Ca^{2+} koncentráció mellett, hosszú depolarizáló impulzusokat alkalmazva az áram nem mutatott időfüggő inaktivációt. Felvetődött egy alacsony Ca^{2+} affinitású kötőhelyen megvalósuló Ca^{2+} -függő inaktiváció lehetősége is. A Ca^{2+} -függő inaktiváció mechanizmusát TMEM16A-t expresszáló HEK sejtekben vizsgálták, és feltételezték, hogy a Ca^{2+} -calmodulin függő protein kináz II foszforilációja is állhat a jelenség hátterében. Ez a lehetőség viszont valószínűtlennek tűnik az akciós potenciál 200-300 msec-os időtartama miatt. Egy másik lehetséges magyarázat az áram gyors csökkenésére, hogy a junkcionális részben a Ca^{2+} koncentráció gyorsabban és nagyobb mértékben csökken a globális Ca^{2+} koncentráció változásához viszonyítva. Ezt a felvetést támogatják eredményeink is, nevezetesen a Cl^- csatornák és az L-típusú Ca^{2+} csatornák ko-lokalizációja, mert ezáltal lehetőség van arra, hogy a $I_{Ca,L}$ kontrollálja a közelében elhelyezkedő Cl^- csatornák kapuzását.

A $I_{Cl(Ca)}$ késői, inward komponensét a membránpotenciál és a megfelelő junkcionális Ca^{2+} koncentráció együttese hozza létre. A terminális repolarizáció alatt a membránpotenciál negatívabb, mint a E_{Cl} (kísérleteink során a E_{Cl} -32 mV volt, kivéve, azon kísérleteket, amikor a Cl^- koncentrációját megváltoztattuk), emiatt inward áram folyik a nyitott Cl^- csatornákon keresztül. A Cl^- csatornák újrainyúlásának, a késői, inward komponens kialakításának több mechanizmusa is

elképzelhető. Az áram aktiválódhat a megemelkedő intracelluláris Ca^{2+} koncentráció, vagy éppen ellenkezőleg, a csökkenő jukcionális Ca^{2+} koncentráció hatására is. A diastole alatt spontán Ca^{2+} felszabadulás történhet a ryanodin receptoron keresztül a Ca^{2+} -mal túltöltődött sarcoplasmaticus reticulumból. Így a jukcionális rész Ca^{2+} koncentrációja megemelkedhet, ami arrhythmogén, mert késői utódepolarizációk kialakulásához vezethet a forward módú NCX és a $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ aktivációja által. A $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ aktivációját igazolták késői utódepolarizációk kialakításában kutya és birka kamrai szívizomsejteken, birka Purkinje sejteken, mely eredmények felhívják a figyelmet a $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ kórélettani szerepére. Azokon a sejteken, amelyeken nem tapasztaltak Ca^{2+} -túltöltődést sokkal nehezebb magyarázatot találni a jukcionális rész Ca^{2+} koncentrációjának megemelkedésére az akciós potenciál terminális repolarizációjának során. A lehetséges magyarázatok között szerepelhet a L-típusú Ca^{2+} csatornák reaktivációja. Egy másik lehetséges magyarázat lehet, hogy az akciós potenciál terminális repolarizációja alatt a Ca^{2+} -ok disszociálódnak a myofilamentumokról, mely a lokális Ca^{2+} koncentráció megemelkedéséhez, és ezáltal a $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ és az NCX aktivációjához vezethet. Saját megfigyelésünk szerint - a $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ és a I_{NCX} ugyanazon sejten történő mérésekor - az akciós potenciál terminális repolarizációja során inward $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ -ot és inward I_{NCX} -ot mértünk.

A csökkenő jukcionális Ca^{2+} koncentráció is lehet felelős a Cl^- csatornák újranyitására. Az akciós potenciál plateau fázisa alatt a magas Ca^{2+} koncentráció a TMEM16A inaktiválódását okozhatja a calmodulinon keresztül. Csökkenő jukcionális Ca^{2+} koncentráció mellett a Ca^{2+} disszociál a calmodulin alacsony affinitású kötőhelyéről, és ezáltal a TMEM16A felszabadulhat a calmodulin függő inaktiváció alól.

A $I_{Cl(Ca)}$ fiziológias aktivációjához elégséges az L-típusú Ca^{2+} csatornákon beáramló Ca^{2+}

Nyúl pitvari szívműködéseken és Purkinje rostokon végzett korábbi kísérletek szerint a $I_{Cl(Ca)}$ aktiválásához elengedhetetlen a sarcoplasmaticus reticulumból felszabaduló Ca^{2+} . Ezzel szemben, kísérleteink során 15 perces ryanodin előkezelés esetén a I_{9-AC} amplitúdója valamennyi esetben szignifikáns mértékben kisebb volt, mint a ryanodin előkezelés nélküli kontroll, de nem csökkent nullára. Emellett azt is megfigyeltük, hogy a ryanodin kezelést követően a 9-AC tovább csökkentette az első repolarizáció mértékét is, és megszüntette mind a sejtek Ca^{2+} tranziensét, mind a sejtrövidülést. A különbség további lehetséges magyarázata az is lehet, hogy munkacsoportunk kutya kamrai szívműködéseit végezte méréseit, míg más tanulmányokban nyúl pitvari szívműködéseket és Purkinje rostot használtak. Teljes I_{9-AC} gátlást akkor tapasztaltunk, amikor nisoldipin hozzáadásával gátoltuk az L-típusú Ca^{2+} csatornákon keresztül megvalósuló Ca^{2+} belépést. Ezen eredményünk arra utal, hogy a $I_{Cl(Ca)}$ fiziológias aktivációjában az L-típusú Ca^{2+} csatornákon beáramló Ca^{2+} -nak nélkülözhetetlen szerepe van.

A Bay K8664-gyel és isoproterenollal végzett kísérleteink eredményei további bizonyítékot szolgáltatottak az L-típusú Ca^{2+} csatornákon beáramló Ca^{2+} -nak a $I_{Cl(Ca)}$ aktiválásában betöltött szerepéről. A BayK 8664 és az isoproterenol egyaránt növelték a $I_{Ca,L}$ -ot és hasonló mértékben növelték a I_{9-AC} amplitúdóját, noha a Ca^{2+} tranziens amplitúdó növelő hatásuk eltérő volt.

Az aktiváló szerekhez hasonlóan, az ingerlési frekvencia – 1 Hz-ről 2 Hz-re – növelése, szintén I_{9-AC} amplitúdó növelő hatású. Összességében elmondható tehát, hogy a $I_{Cl(Ca)}$ fiziológias aktivációjához elégséges az L-típusú Ca^{2+} csatornákon beáramló Ca^{2+} . A sarcoplasmaticus reticulumból felszabaduló Ca^{2+} növeli ugyan a $I_{Cl(Ca)}$ amplitúdóját, de nem alapvető fontosságú az aktiváció szempontjából.

Tankönyvi adat, hogy az L-típusú Ca^{2+} csatornák és a ryanodin receptorok egymás közelében helyezkednek el a diádikus résben. Az elektro-mechanikai kapcsolat során a junctionális rés Ca^{2+} koncentrációja sokkal magasabb értéket érhet el, és

gyorsabb kinetikával változhat, mint amit a globális Ca^{2+} koncentráció mérések alapján feltételezünk. A junkcionális rés Ca^{2+} koncentrációjának direkt mérése jelenleg még nem teljesen megoldott.

Véleményünk szerint a $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ -ot sokkal inkább a lokális Ca^{2+} koncentráció változások irányíthatják, mint a globális intracelluláris Ca^{2+} koncentrációban beálló változások. Ezen nézetünket támogatják azon kísérleteink, melyben az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációt $1,1 \mu\text{mol/l}$ értékre állítottuk be. Ez az érték a systole alatt mérhető maximális intracelluláris Ca^{2+} koncentrációnak felel meg. Ilyen körülmények között mért $I_{9\text{-AC}}$ amplitúdója sokkal kisebbnek adódott, mint a Ca^{2+} -ot és puffert sem tartalmazó pipetta oldatok esetén. Ezzel összhangban áll az a megfigyelés is, melyet egér légúti simaizomsejtekben tettek, ahol a $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ teljes aktiváláshoz $20\text{-}50 \mu\text{mol/l}$ -es intracelluláris Ca^{2+} koncentráció volt szükséges, annak ellenére, hogy az áram Ca^{2+} érzékenységének EC_{50} értékét $3,3 \mu\text{mol/l}$ -nek becsülték. Ezek alapján úgy gondoljuk, hogy a puffermentes pipettaoldattal mért szignifikánsan nagyobb $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ amplitúdó a magasabb junkcionális résben mérhető Ca^{2+} koncentrációnak a következménye.

A BAPTA és az EGTA $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ -ra és $I_{\text{Ca,L}}$ -ra gyakorolt hatása között tapasztalható különbség is megmagyarázható azzal, hogy eltérő Ca^{2+} kötési kinetikával rendelkeznek, emiatt a különböző subcelluláris kompartmentekben – junkcionális rés, intracelluláris tér – eltérő módon képesek a Ca^{2+} -t pufferelni. Ennek következtében a kelátorok a $I_{\text{Ca,L}}$ Ca^{2+} függő inaktivációjára és a $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ -ra eltérő hatékonysággal hathatnak. Noha mindkét puffer megszüntette a Ca^{2+} tranzienszt csak a BAPTA volt képes hatékonyan csökkenteni az $I_{\text{Ca,L}}$ Ca^{2+} -függő inaktivációját, ezzel szignifikánsan nagyobb I_{NISO} amplitúdót és az áram által szállított ösztöltés mennyiségét eredményezni. A $I_{\text{Ca,L}}$ Ca^{2+} -függő inaktivációjára gyakorolt hatással magyarázható a BAPTA által okozott hosszabb akciós potenciál is. BAPTA jelenlétében a $I_{9\text{-AC}}$ megszűnt, ezzel szemben az EGTA csupán csökkentette a $I_{9\text{-AC}}$ amplitúdóját és az áram által szállított ösztöltést. A

BAPTA és az EGTA eltérő hatékonysága azzal magyarázható, hogy a BAPTA mintegy százszor gyorsabb sebességgel képes a Ca^{2+} -ot megkötni, mint az EGTA.

A TMEM16A és a Bestrophin-3, valamint az L-típusú Ca^{2+} csatornák egymás közelében helyezkedik el

Munkánk során tanulmányoztuk a két legigéretesebb $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ -ért felelős csatornafehérje, a TMEM16A és Bestrophin-3 jelenlétét és lokalizációját szívizmon.

A Bestrophin-1 és Bestrophin-3 egér szívizmon való kifejeződését már korábban leírták. HEK sejtekben expresszált Bestrophin-1 vagy Bestrophin-3 a $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ -hoz hasonló áramot eredményezett. Humán szívizmon ez idáig csak mRNS szinten vizsgálták a Bestrophin-3 jelenlétét. Kutya szívizomsejteken és egészséges humán szívizommintákon azt találtuk, hogy a Bestrophin-3 a harántcsíkolt mintázatnak megfelelően jelölődött.

Munkacsoportunk elsőként írta le, hogy a TMEM16A kutya és humán szíven egyaránt expresszálódik. A Bestrophin-3 ko-lokalizálódik a $\text{Ca}_v1.2$ proteinnel (L-típusú Ca^{2+} csatorna pórusformáló alegysége) és a TMEM16A fehérjével, ezért feltételezzük, hogy a TMEM16A és az L-típusú Ca^{2+} csatornák is egymás közelében helyezkednek el. Ezen eredmények összhangban állnak a légutak simaizomsejtjein találtakkal, ahol a Ca^{2+} -függő Cl^- csatornák a ryanodin receptorok közelségében találhatóak és a lokális Ca^{2+} által vezéreltek. Felvetődött annak is a lehetősége, hogy a Bestrophinok a TMEM16A fehérjékhez kapcsolódnak és együttesen hozzák létre a funkcionális csatornát simaizom sejtekben. Ezt azonban meglehetősen nehéz tesztelni, mert a TMEM16A befolyásolja a Bestrophin expresszióját. A TMEM16A downregulációja nemcsak a Bestrophin expresszióját csökkentette, de az L-típusú Ca^{2+} csatornákét is. Arról is beszámoltak már, hogy a Bestrophinok, hasonlóan a TMEM16A fehérjéhez inkább homomer csatornákat alkot, mely megkérdőjelezi annak a lehetőségét, hogy a Bestrophin a TMEM16A-val közösen alkosson funkcionális csatornát.

A Bestrophin-3, TMEM16A, és $Ca_v1.2$ fehérjék jelölődése a harántcsíkolatnak megfelelően nagy valószínűséggel annak tudható be, hogy a fehérjék leginkább a T tubulusok membránjában fejeződnek ki. Hasonló mintázatú felvételeket kaptak egér és humán kamrai szívizomsejteken a $Ca_v1.2$ fehérjék jelölésével. A fehérjék ko-lokalizációjának véletlenszerű bekövetkezésének valószínűsége alacsony, hiszen a cytochrome c és TMEM16A közötti korrelációs faktor gyenge kapcsolatot mutatott. Ehhez hasonlóan a Bestrophin-3 és ryanodin receptorok közötti kapcsolat is gyengének mutatkozott.

Összefoglalás

Az ionáramoknak az akciós potenciál (AP) kialakításában betöltött szerepének megértése nagy jelentőséggel bírhat, hiszen ezen csatornák kóros működése arrhythmiai kialakulásához vezethet, melynek hirtelen szívhalál lehet a következménye. Annak ellenére, hogy a Ca^{2+} -függő Cl^- áramról ($I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$) ismert, hogy kóros működése arrhythmiaát okozhat, a $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ pontos szerepe az AP kialakításában kevésbé ismert. Feltételezik, hogy a TMEM16A és/vagy Bestrophin-3 proteinek lehetnek felelősek a csatorna kialakításáért. Kísérleteink célja az volt, hogy összehasonlítsuk két ismert gátlószer, a 9-antracén karboxilsav (9-AC) és a 4,4'-diisotiocianostilbén-2,2'-diszulfonsav (DIDS) hatásait, és eldöntsük, hogy melyik alkalmasabb a $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ detektálására. Továbbá, célunk volt a $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ AP alatti (Ca^{2+} puffer nélkül, AP voltage-clamp technika) és megváltozott intracelluláris Ca^{2+} koncentráció ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) melletti aktivációjának tanulmányozása kutya kamrai szívizomsejteken. A TMEM16A és a Bestrophin-3 expressziójának és esetleges $\text{Ca}_v1.2$ proteinnel való ko-lokalizációjának a vizsgálatát kutya kamrai szívizomsejteken és humán szívizommintákon is elvégeztük. Megállapítottuk, hogy a 9-AC (0,5 mmol/l) és a DIDS (0,2 mmol/l) is növelte az AP időtartamot. A voltage-clamp technikával mért DIDS- és 9-AC-érzékeny áram amplitúdók azonosak voltak. A DIDS, a 9-AC-val ellentétben szignifikánsan csökkentette a depolarizáció maximális sebességének értékét, ami a DIDS Na^+ áram gátló hatására utal. AP-clamp mérések során a 9-AC-érzékeny áramgörbe ($I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$) egy korai outward és egy késői inward komponensből tevődött össze, melyek időben az első fázis és a terminális repolarizációnak megfelelően jelentkeztek. A ryanodin és az EGTA mindkét komponens amplitúdóját csökkentette, míg a BAPTA teljesen megszüntette az áramkomponenseket. Az 1,1 $\mu\text{mol/l}$ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (a systoles $[\text{Ca}^{2+}]$ megfelelő érték) csökkentette a $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ amplitúdóját, ezzel szemben a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növelése Bay K8644, isoproterenol, és a magasabb ingerlési frekvencia által növelte a $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ -ot. Ezen eredmények arra utalnak, hogy az L-típusú Ca^{2+} csatornákon beáramló Ca^{2+} elengedhetetlen a $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ fiziológiás aktivációjához. A

TMEM16A és Bestrophin-3 erős ko-lokalizációt mutatott egymással és a $Ca_v1.2$ fehérjével kutya izolált szívizomsejteken és humán szívizommintákon egyaránt. Eredményeink arra utalnak, hogy a DIDS és a 9-AC egyformán jól használható voltage-clamp mérésekben, de a 9-AC kedvezőbb AP mérésekben, mert nem gátolja a Na^+ csatornákat. A $I_{Cl(Ca)}$ aktivációjához az L-típusú Ca^{2+} csatornákon át beáramló Ca^{2+} szükséges. A sarcoplasmaticus reticulumból felszabaduló Ca^{2+} nem nélkülözhetetlen az áram aktivációjához, az áram aktivációjának felerősödéséhez járul hozzá. A $I_{Cl(Ca)}$ aktivációjához magas $[Ca^{2+}]$ szükséges a diádikus részben, melyet a BAPTA megfelelően tud pufferealni.



Nyilvántartási szám: DEENK/279/2016.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Váczi Krisztina
Neptun kód: RDZWCZ
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

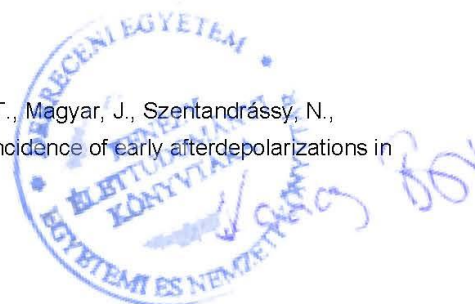
1. Horváth, B.*, **Váczi, K.***, Hegyi, B., Gönczi, M., Dienes, B., Kistamás, K., Bányász, T., Magyar, J., Baczkó, I., Varró, A., Seprényi, G., Csernoch, L., Nánási, P. P., Szentandrassy, N.: Sarcolemmal Ca²⁺-entry through L-type Ca²⁺ channels controls the profile of Ca²⁺-activated Cl⁻ current in canine ventricular myocytes.
J. Mol. Cell. Cardiol. 97, 125-139, 2016.
*The two first authors have equally contributed.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.05.006>
IF: 4.874 (2015)
2. **Váczi, K.**, Hegyi, B., Ruzsnavszky, F., Kistamás, K., Horváth, B., Bányász, T., Nánási, P. P., Szentandrassy, N., Magyar, J.: 9-Anthracene carboxylic acid is more suitable than DIDS for characterization of calcium-activated chloride current during canine ventricular action potential.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 388 (1), 87-100, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-014-1050-9>
IF: 2.376





További közlemények

3. Szentandrassy, N., Horváth, B., **Vácz, K.**, Kistamás, K., Masuda, L., Magyar, J., Bányász, T., Papp, Z., Nánási, P. P.: Dose-dependent electrophysiological effects of the myosin activator omecamtiv mecarbil in canine ventricular cardiomyocytes.
J. Physiol. Pharmacol. "Accepted by Publisher", 2016.
IF: 2.804 (2015)
4. Nánási, P. P., **Vácz, K.**, Papp, Z.: The myosin activator omecamtiv mecarbil: a promising new inotropic agent.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 94 (10), 1033-1039, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1139/cjpp-2015-0573>
IF: 1.704 (2015)
5. Kistamás, K., Szentandrassy, N., Hegyi, B., **Vácz, K.**, Ruzsnavszky, F., Horváth, B., Bányász, T., Nánási, P. P., Magyar, J.: Changes in intracellular calcium concentration influence beat-to-beat variability of action potential duration in canine ventricular myocytes.
J. Physiol. Pharmacol. 66 (1), 73-81, 2015.
IF: 2.804
6. Magyar, J., Kistamás, K., **Vácz, K.**, Hegyi, B., Horváth, B., Bányász, T., Nánási, P. P., Szentandrassy, N.: Concept of relative variability of cardiac action potential duration and its test under various experimental conditions.
Gen. Physiol. Biophys. 35 (1), 55-62, 2015.
DOI: http://dx.doi.org/10.4149/gpb_2015019
IF: 0.892
7. Szentandrassy, N., Kistamás, K., Hegyi, B., Horváth, B., Ruzsnavszky, F., **Vácz, K.**, Magyar, J., Bányász, T., Varró, A., Nánási, P. P.: Contribution of ion currents to beat-to-beat variability of action potential duration in canine ventricular myocytes.
Pflugers Arch. 467 (7), 1431-1443, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-014-1581-4>
IF: 3.654
8. Horváth, B., Hegyi, B., Kistamás, K., **Vácz, K.**, Bányász, T., Magyar, J., Szentandrassy, N., Nánási, P. P.: Cytosolic calcium changes affect the incidence of early afterdepolarizations in canine ventricular myocytes.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 93 (7), 527-534, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1139/cjpp-2014-0511>
IF: 1.704





9. Kistamás, K., Hegyi, B., **Váczai, K.**, Horváth, B., Bányász, T., Magyar, J., Szentandrassy, N., Nánási, P. P.: Oxidative shift in tissue redox potential increases beat-to-beat variability of action potential duration.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 93 (7), 563-568, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1139/cjpp-2014-0531>
IF: 1.704
10. Ruzsnavszky, F., Hegyi, B., Kistamás, K., **Váczai, K.**, Horváth, B., Szentandrassy, N., Bányász, T., Nánási, P. P., Magyar, J.: Asynchronous activation of calcium and potassium currents by isoproterenol in canine ventricular myocytes.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 387 (5), 457-467, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-014-0964-6>
IF: 2.471
11. Kormos, A., Nagy, N., Acsai, K., **Váczai, K.**, Ágoston, S., Pollesello, P., Levijoki, J., Szentandrassy, N., Papp, G. J., Varró, A., Tóth, A.: Efficacy of selective NCX inhibition by ORM-10103 during simulated ischemia/reperfusion.
Eur. J. Pharmacol. 740, 539-551, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.06.033>
IF: 2.532
12. Kistamás, K., Szentandrassy, N., Hegyi, B., Ruzsnavszky, F., **Váczai, K.**, Bárándi, L., Horváth, B., Szebeni, A., Magyar, J., Bányász, T., Kecskeméti, V., Nánási, P. P.: Effects of pioglitazone on cardiac ion currents and action potential morphology in canine ventricular myocytes.
Eur. J. Pharmacol. 710 (1-3), 10-19, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.03.047>
IF: 2.684
13. Szabó, L., Szentandrassy, N., Kistamás, K., Hegyi, B., Ruzsnavszky, F., **Váczai, K.**, Horváth, B., Magyar, J., Bányász, T., Pál, B., Nánási, P. P.: Effects of tacrolimus on action potential configuration and transmembrane ion currents in canine ventricular cells.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 386 (3), 239-246, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-012-0823-2>
IF: 2.36





14. Hegyi, B., Komáromi, I., Kistamás, K., Ruzsnavszky, F., **Váczai, K.**, Horváth, B., Magyar, J., Bányász, T., Nánási, P. P., Szentandrassy, N.: Tetrodotoxin Blockade on Canine Cardiac L-Type Ca²⁺ Channels Depends on pH and Redox Potential.
Mar Drugs. 11 (6), 2140-2153, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/md11062140>
IF: 3.512

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 36,075

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 7,25

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

Debrecen, 2016.10.18.

