

**Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei**

**A KALCIUMFELSZABADULÁS ELEM  
ESEMÉNYEINEK SZABÁLYOZÁSA ÉS  
MÓDOSULÁSA NORMÁL ÉS PATHOLÓGIÁS  
KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT**

**Sztretye Mónika Tünde**

**Témavezető: Dr. Szentesi Péter**



**DEBRECENI EGYETEM  
MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA  
Debrecen, 2010**

## **Betétlap**

### **A kalciumfelszabadulás elemi eseményeinek szabályozása és módosulása normál és pathológiás körülmények között**

Értekezés a doktori (Ph.D) fokozat megszerzése érdekében

**Írta: Sztretye Mónika Tünde**

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudományi Doktori Iskola  
Élettan és Neurobiológia Doktori Program keretében  
Témavezető: Dr. Szentesi Péter

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Kovács László, akadémikus  
tagok: Dr. Papp Zoltán, Ph.D.  
Dr. Zsembery Ákos, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja: 2010. március 23. 11 óra

Az értekezés hivatalos bírálói:

Dr. Krasznai Zoltán, Ph.D.  
Dr. Zádor Ernő, Ph.D.

Az értekezés nyilvános vitájának bíráló bizottsága:

elnök: Prof. Dr. Kovács László, akadémikus  
tagok: Dr. Papp Zoltán, Ph.D.  
Dr. Krasznai Zoltán, Ph.D.  
Dr. Zádor Ernő, Ph.D.  
Dr. Zsembery Ákos, Ph.D.

Az értekezés nyilvános vitájának időpontja: 2010. március 23. 13 óra

## Bevezetés

### *A vázizom felépítése és élettani sajátosságai*

A vázizomzat a mozgás aktív szerve, legfontosabb feladata a test vázát alkotó elemek elmozdítása egymáshoz képest, ezáltal a test helyének, illetve helyzetének a módosítása. A vázizomzat elemi egységei a vázizomrostok, amelyeknek alapvető működési formája az idegi utasításra bekövetkező összehúzódás (kontrakció). Az izomroston belül a myofilamentumok myofibrillumokba tömörülnek, utóbbiakat a vázizom igen fejlett intracelluláris membránrendszere, a sarcoplasmaticus reticulum (SR) veszi körül. A transzverzális vagy T-tubulusok a felszíni membrán betüremkedései, és a terminális ciszternákkal együtt alkotják a harántcsíkolt izom funkcionális egységét, a triádot. A kontrakció létrehozásához szükséges  $\text{Ca}^{2+}$  az SR terminális ciszternáiból szabadul fel az elektro-mechanikai kapcsolat során.

### *Az elektro-mechanikai kapcsolat*

Az elektro-mechanikai kapcsolat az a jelátviteli mechanizmus, mely során a felszíni membrán (sarcolemma) depolarizációja az intracelluláris  $[\text{Ca}^{2+}]$  átmeneti megemelkedésén keresztül az izom kontrakciójához vezet. A folyamat a sarcolemma transzverzális (T) tubulusainak membránjában lévő L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornák, más néven dihidropiridin receptorok (DHPR) és az SR  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornáinak (rianodinreceptor, RyR) az együttműködésével valósul meg. Emlősökben a rianodinreceptor három izoformája ismert (RyR1, RyR2, RyR3), melyek előfordulása szövetspecifikus: a RyR1 elsősorban a vázizomban expresszálódik, a RyR2 szívizomban és szinte az agy teljes területén, míg a RyR3 előfordulása univerzálisnak mondható.

Vázizomban a DHPR az izom akcióspotenciáljához képest hosszú aktivációs időállandója miatt nem nyílik meg, tehát nem működik funkcionális csatornaként, de közvetlen alloszterikus viszonyban áll az SR-ban vele szemben elhelyezkedő RyR-ok egy részével. A DHPR a sarcolemma depolarizációjakor

olyan konformáció-változást szenved, mely a depolarizáció által képviselt jelet az SR rianodinreceptoraira közvetíti, és azok megnyílását okozza. A RyR-okon keresztül felszabaduló  $\text{Ca}^{2+}$  aktiválja a környező, DHPR által közvetlenül nem vezérelt RyR-okat is. Ez utóbbi folyamatot  $\text{Ca}^{2+}$ -indukált  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulásnak (Calcium Induced Calcium Release, CICR) nevezzük.

### ***A kalciumfelszabadulás elemi jelenségei***

A  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulás folyamata az egyes terminális ciszternákra korlátozódik, lokális marad, mivel a T-tubulus és az SR szoros kapcsolata izolált működést tesz lehetővé. A  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulás terminális ciszterna szintjén megvalósuló működési egységét *spark*nak nevezzük. A fentiek alapján az egész rostra kiterjedő globális  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulás nem más, mint az akcióspotenciál által időben szinkronizált *spark*ok összege.

Korábbi megfigyelések alapján emlősök esetén az elemi kalciumfelszabadulási eseményeknek (Elementary Calcium Release Events, ECRE) két formája ismert. Egy nagyobb amplitúdóval jellemezhető, rövid ideg tartó esemény a *spark*, valamint egy hosszabb ideig tartó, kisebb amplitúdójú esemény az *ember*. A *spark*ok kialakulásáért embrionális vázizomban a RyR1 és RyR3 altípusok felelősek. A felnőtt emlősök elveszítik a 3-as típusú rianodinreceptorukat, és azt a képességüket is, hogy *spark*okat produkáljanak. Felnőtt korban már csak a diaphragma tartalmaz RyR3-at.

### ***Az ECRE-k jellegzetes paraméterei***

Mára tisztázódott, hogy a *spark* a kapcsolt RyR-ok kapuzási mechanizmusát közvetíti és ezáltal elsődleges információt nyújthat az SR-ből történő kalciumfelszabadulásról. A *spark*ok jellegzetes, általunk is vizsgált paraméterei: az amplitúdó (A), amely mint  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$  vagy normalizált fluoreszcencia növekedés ( $\Delta F/F_0$ ) adható meg, az esemény időbeli hossza, a maximális amplitúdó feléhez tartozó időtartam (Full Time at Half Maximal amplitude, FTHM), valamint a térbeli szélesség (Full Width at Half Maximal amplitude, FWHM), a csúcs eléréséhez szükséges idő (rise time) és a fél

relaxációs idő ( $\tau$ ). Egyszerű esetben (amikor nincsenek csatorna újramegnyílások) a rise time az SR-ből történő kalciumfelszabadulás időtartamára enged következtetni, míg a „Ca<sup>2+</sup> signal mass” (SM(t)) a felszabadult Ca<sup>2+</sup> mennyiségére utal.

### ***A krónikus szívelégtelenség és a vázizomgyengeség kapcsolata***

A krónikus szívelégtelenség (Chronic Heart Failure, CHF) olyan pathofiziológiai állapot, amikor a kóros szív működés miatt a szív pumpafunkciója nem elégíti ki a szervezet metabolikus szükségleteit. A szívelégtelenségben észlelt korai kompenzációs válasz fő tényezője a neurohormonális rendszer vazokonstriktor mechanizmusainak aktivációja (renin-angiotenzin II, noradrenalin, vazopresszin, endothelin), ami mind a perifériás érrendszer, mind a szívizomzat sejtjeinek átépüléséhez vezet. Súlyos CHF betegeknél a vázizom típusa és enzimprofilja is megváltozik. Megfigyelhető az izomrost megoszlásának változása (glikolitikus rostok az oxidatívak rovására), valamint a mitokondriumok számának csökkenése. A szívelégtelenségben szenvedő betegek terhelhetőségük csökkenéséről, izomgyengeségről, fáradékonyságról és légszomjról számolnak be, de a tünetek súlyossága nincs összefüggésben a perctérfogat-csökkenés mértékével. A csökkent terhelhetőség valószínűleg krónikus hatásokra bekövetkező másodlagos anyagcsere-, génexpressziós, morfológiai és funkcionális változások eredménye, melyek többek között az SR Ca<sup>2+</sup>-háztartásának zavarát okozzák.

Az elégtelen szív működés – és a legjellemzőbb tüneteként jelentkező vázizomgyengeség és fáradékonyság – hátterében álló okokként a legtöbb vizsgálat számos morfológiai és metabolikus elváltozást jelöl meg. Az izomgyengeség mértéke független a kardiális diszfunkció súlyosságától, és az izom perfúziójának lokális növelése, vagy a rendszeresen végzett könnyű torna a tüneteket csak részben enyhíti. Az ellentmondások miatt a szakirodalom az

utóbbi időben az SR transzport-mechanizmusainak másodlagos károsodását feltételezi, aminek legalább három lehetséges oka képzelhető el:

a DHPR-RyR jelátvitel hatásfokának csökkenése miatt az elektro-mechanikai kapcsolat működése módosul;

a RyR permeabilitása és/vagy  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékenysége változik meg postinfarktusos állapotban;

az SR  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalmának csökkenése miatt csökken a  $\text{Ca}^{2+}$ -gradiens.

### ***TPEN***

Az N,N,N',N'- tetrakis (2-piridilmetil) etiléndiamin (TPEN)-t először Anderegg és Wenk (1967) említette a kémiai irodalomban, míg membránpermeábilis nehézfém-kelátorként az első biológiai rendszeren végzett kísérletek Arslan és mtsai. (1985) nevéhez fűződnek.

A TPEN nagy affinitást mutat olyan nehézfémek iránt mint a  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , valamint alacsony affinitással rendelkezik az intracelluláris kalciumhomeosztázis vizsgálatában igen jelentős szerepet játszó ionok számára, mint a  $\text{Mg}^{2+}$ , illetve maga a  $\text{Ca}^{2+}$  (a disszociációs állandók ( $K_d$ ) rendre  $10^{-10,3}$ ,  $10^{-14,6}$ ,  $10^{-15,6}$ ,  $10^{-1,7}$ , valamint  $10^{-4,4}$  M, Arslan és mtsai., 1985 alapján). A tény, hogy a TPEN egy töltés nélküli membránpermeábilis puffer, lehetőséget ad az intracelluláris tér nehézfémjeinek, illetve az intraluminális  $\text{Ca}^{2+}$  gyors és reverzibilis megkötésére anélkül, hogy befolyásolná a cytosolikus szabad  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációt.

Annak ellenére, hogy a TPEN-t számos publikációban használták az intracelluláris raktárak  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalmának csökkentésére, az eredmények pontos és helyes értékeléséhez elengedhetetlen a  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázisban résztvevő fő molekulákat érintő direkt, illetve indirekt kölcsönhatások megismerése.

## Célkitűzések

A tézisekben összefoglalt munka keretében vizsgálni kívántam a vázizom elektro-mechanikai kapcsolatának egyes lépéseit különböző intraluminális kalciumkoncentrációk esetén, illetve az elemi kalciumfelszabadulási események kinetikája és az SR kalciumcsatorna közötti összefüggést. Tekintettel arra, hogy az SR kalciumtartalmának egészséges, valamint patológiás vázizomban egyaránt fontos szerepe van a kalciumfelszabadulás szabályozásában, kísérleteinkben e mechanizmus részleteit kívántuk pontosabban megismerni.

A felvetett kérdés két irányból közelíthető meg: az SR kalciumtartalmának növelésével vagy csökkentésével. Jelen munkában az utóbbi esetet tanulmányoztuk, amely cél megvalósításához egy membránpermeábilis, alacsony kalciumaffinitással rendelkező nehézfém ( $Zn^{2+}$ ) kelátort, a N,N,N,N – tetrakis-(2-piridilmetil)-etiléndiamin (TPEN)-t használtuk tekintettel arra, hogy az intralumináris  $[Ca^{2+}]$ -t gyorsan csökkenti és kimosható szer.

Az SR kalciumtartalmának csökkentése természetes módon vezet a felszabaduló kalcium mennyiségének változásához, amely változás az elemi események szintjén jól követhető. Igazolni kívántuk, hogy az intralumináris  $[Ca^{2+}]$  változása módosítja az elemi események létrehozásáért felelős, egyidejűleg aktiválódó csatornák számát. Rá kívántunk mutatni, hogy a RyR-ok közötti intermolekuláris kölcsönhatás, illetve az ezt befolyásoló intramolekuláris fehérjék állnak a jelenség hátterében.

Két modellrendszerrel használva szeretnénk volna körüljárni a témát:

1. egy immortalizált myoblast sejtvonal, az egér eredetű C2C12 sejteken végzett fluoreszcens intracelluláris  $[Ca^{2+}]$ -mérések során globális  $Ca^{2+}$ -tranzienseket rögzítettünk különböző TPEN-koncentrációk jelenlétében.

2. enzimatikusan (patkány), illetve mechanikusan (béka) izolált, szaponinnal permeabilizált felnőtt harántcsíktolt izomrostokon az elemi kalciumfelszabadulási események paramétereinek összehasonlító vizsgálatát végeztük.

Krónikus szívelégtelenségben a legjellemzőbb tünetekként jelentkező vázizomgyengeség és fáradékonyság mellett az elektro-mechanikai kapcsolat és a vázizomrost kalciumtranszport-mechanizmusainak molekuláris szintű sérülése feltételezhető. Mivel számos irodalmi adat számol be módosult elemi eseményekről patológiás körülmények között, kutatásaim másik részében egy postmiokardialis patkány állatmodellt alkalmazva, a rianodinreceptoron történő elemi kalciumfelszabadulási események összehasonlító vizsgálatát végeztem. Ehhez egészséges vázizomrostokról rögzített, fiziológiásnak tekinthető elemi kalciumfelszabadulási események paramétereit a miokardiális infarktuson átesett patkányok vázizomrostjain rögzített eseményekkel hasonlítottam össze.



## Anyagok és módszerek

### 1. Sejtek és sejtenyésztés

1.1. C2C12 egér vázizom sejt vonal tenyésztése: A C2C12 myoblastokat 15%-os FCS-t, valamint antibiotikumokat és antimikotikumot tartalmazó Dulbecco által módosított Eagles's Mediumban (DMEM) tenyésztettük. A sejteket 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> jelenlétében inkubáltuk. A differenciálódás indukciójához 5% FCS-t és 5% HS-t tartalmazó DMEM tápoldatot használtunk.

1.2. Egyedi vázizomrostok preparálása: Kísérleteinkhez kétélűek (*Rana esculenta*) és emlősök (*Wistar* patkány) vázizmait használtuk, tekintettel a bennük előforduló eltérő rianodinreceptor izoformákra. A békákból kiperaráltuk a *m. semitendinosus*-t, a patkányokból pedig a *m. extensor digitorum communis*-t használtuk. Ezt követően a béka izmokból mechanikus izolálással, míg a patkány izmokból enzimatis izolálással (kollagenáz, I. típus, Sigma, 1-1 ½ órán át 37°C-on) egyedi izomrostokat nyertünk. Az izomrostot K-glutamát alapú relaxáló oldatot tartalmazó mérőkádba rögzítettük, majd szaponin tartalmazó oldattal (0,004 % béka, valamint 0,002% patkány rostok esetén) 3 percig kezelve permeabilizáltuk a membránt, majd glutamát-oldattal mostuk a preparátumot. Ezután a patkány rostok esetén az oldatot lecseréltük egy káliumszulfát alapú belső oldatra (95 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mM Hepes, 1 mM EGTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Na<sub>2</sub>-ATP, 10 mM Na-foszfokreatin, 10 mM glükóz, 0,13 mM CaCl<sub>2</sub>, 8% dextrán és 0,1 mM fluo-3), majd a továbbiakban ebben az oldatban végeztük a méréseket. Béka rostok esetén méréseinket kálium-glutamát alapú belső oldatban végeztük. Méréseink egy részében az elemi események frekvenciájának növelése érdekében a belső oldat csökkentett [Mg<sup>2+</sup>]-t (4 mM) tartalmazott.

1.3. A postmyocardialis infarktusos patkány állatmodell. Hímnemű *Wistar* patkányokon (180-220 g) altatást követően lélegeztetés mellett, baloldali thoracotomiát végeztek. Az infarktust az *a. coronaria sinistra* - arteria interventricularis anterior ágának proximális helyzetben, egy 7-0 selyemfonallal

való elkötésével indukálták. Ugyanezt a műveletet elvégezték a majdani kontrollként szolgáló állatokon (altatás, közben lélegeztetés, feltárás, majd visszavarrás – sham operált patkányok). A myocardialis infarktuson átesett patkányokból (postmyocardialis infarktosos, PMI állat) a műtétet követő ~24. héten nyert vázizomrostokon végeztük méréseinket. Erre a célra azokat a patkányokat választottuk ki, melyek bal kamrafalában az elhalt, fibrotikus terület aránya legalább 50% volt, tehát a krónikus szívelégtelenség egyértelmű jeleit mutatták.

## **2. $[Ca^{2+}]_i$ változásainak követéséhez kapcsolódó módszerek**

2.1. Egyedi sejten történő fluoreszcens  $[Ca^{2+}]_i$  mérés: A sejtekbe juttatott fura-2 fluoreszcens festék 340 és 380 nm hullámhosszúságok között váltakozó gerjesztését a Photon Technology International (PTI) DeltaScan™ kettős monokromátoros berendezése biztosította. A fura-2 által kibocsátott fluoreszcens fényt 510 nm-en fotonelektron-sokszorozó segítségével detektáltuk. A két hullámhosszon történő gerjesztés során mért fluoreszcenciaértékek hányadosából számítottuk ki az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -koncentrációkat. A tranziens  $[Ca^{2+}]_i$ -változások paramétereit (amplitúdó, látencia, a tranziens kialakulásának maximális sebessége, a leszálló szár meredeksége, a csúcs eléréséhez szükséges idő, félértékszélesség) a munkacsoportunk által kifejlesztett számítógépes program segítségével határoztuk meg.

2.2. A  $Ca^{2+}$ -fluxus (FL) kiszámítása: Kalciumfluxusként a myoplasmába a külső térből be- és az intracelluláris raktárakból kilépő összes  $Ca^{2+}$  fluxusát definiáltuk. Ezt a  $FL=d(Ca_{tot}+Ca_{transzp})/dt$  képlet szerint határoztuk meg, ahol  $Ca_{tot}$  a myoplasmán belüli teljes kalciummennyiség,  $Ca_{transzp}$  pedig a kalciumeltávolító mechanizmusok által transzportált  $Ca^{2+}$ -mennyiség.  $Ca_{transzp}$  a pillanatnyilag a  $Ca^{2+}$ -eltávolító mechanizmusok (pumpák) által szállított kalciummennyiség, melyet arányosnak tekintettünk a pumpák relatív szaturációjával, ahol az arányossági tényező a  $Ca^{2+}$ -eltávolítás maximális

sebessége ( $PV_{\max}$ ). A  $PV_{\max}$  értékét minden vizsgált sejtre külön meghatároztuk egy KCl-depolarizációt követő  $Ca^{2+}$ -tranziens leszálló szárára legalább 3 másodperccel a csúc elérését követően illesztett exponenciális segítségével.

2.3. Vizsgálatok konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal: A fluo-3 fluoreszcens  $Ca^{2+}$ -kötő festékkel feltöltött sejteken spontán kialakuló elemi eseményeket az LSM 510 META pásztázó lézermikroszkóp (Zeiss, Oberkochen, Németország) segítségével rögzítettük. A normalizált fluoreszcencia-intenzitást vonalmenti pásztázás (line scan) (x,t), illetve kétdimenziós (x,y) leképezési módszerrel vizsgáltuk és jelenítettük meg.

A line scan képek (x,t) 1,15 ms/vonal, 512 pixel/vonal (0,142  $\mu$ m pixel méret) mérési paraméterekkel, 63X vízimmerziós objektív segítségével készültek, párhuzamosan a sejt tengelyével. A fluo-3 fluoreszcens festéket egy argonion lézerrel gerjesztettük (488 nm-en, 5% lézerintenzitással), az emittált fényt 500–570 nm-es áteresztő szűrőkön keresztül összegyűjtöttük és 12 bit-en rögzítettük.

*A számítógépes program működése:* Az eredmények feldolgozása egy, az Élettani Intézetben kifejlesztett, automatikus detektáló program segítségével történt. Az alkalmazott algoritmus stratégiája, hogy kiszűri az alapzajt meghaladó jeleket. Egyedülálló *spark* vizsgálatánál az alapfluoreszcenciától eltérő fluoreszcenciaérték adódik. Ezeket a területeket a program kivágja a felvett képből, és a megmaradt alapzaj fluoreszcenciája újra statisztikai értékelés alá kerül. Végül a *sparkok* az alapzajhoz viszonyított nagyságuk alapján osztályozzuk. Az alkalmazott algoritmus teljesen automatizált, az egyetlen paraméter, amelyet meg kell adnunk az a küszöbérték, amely felett eseményről van szó (méréseinkben a *sparkok* esetén ez az érték 0,2  $\Delta F/F_0$  volt, míg *emberök* esetén 0,05  $\Delta F/F_0$ ). A következő lépésben a kép normalizálása következik, ami a felvett képek fluoreszcenciájának átlagolásával történik. A *sparkok* esetén a normalizált fluoreszcencia érték nagyobb a kritériumnál.

### 3. A lipidkettősréteg-technika

3.1. SR-vezikula preparálása emlős vázizomból: A 2,5-3 kg-os nyulakból származó *m. longissimus dorsi* eltávolítását követően az izmot Waring Blendor homogénizátorral homogénizáltuk 4°C-on. Ezt követően centrifugálással (4500 g, 25 perc) eltávolítottuk az alakos elemeket, majd a felülúszó 30 percig tartó, 40000 g-s centrifugálásával nyert nyers mikroszómafrakcióból magas káliumtartalmú pufferrel kioldottuk az akto-miozint. Egy óra inkubálás után 109000 g-s, 30 perces centrifugálással összegyűjtöttük a mikroszóma-frakciót. Az üledéket reszuszpendáltuk, majd lineáris (25-45%) szacharóz-grádiensre vittük fel. A 16 órás, 86000 g-s centrifugálás után a gradiens 36-38%-os régiójában világos gyűrűként megjelenő nehéz-SR (**H**heavy **S**arcoplasmic **R**eticulum, HSR) vezikulákat összegyűjtöttük, és potterrel homogénizáltuk. Az összegyűjtött vezikulafrakcióhoz kétszerannyi térfogatú puffert adtunk, és újból lecentrifugáltuk (60 perc, 124000 g). A centrifugálás után a pelletet 300 mM szacharózt és 10 mM K-PIPES-t tartalmazó (pH=7,0) pufferben reszuszpendáltuk, és azonnal lefagyasztottuk cseppfolyós nitrogénben, majd -70 °C-on tároltuk további felhasználásig.

3.2. A rianodinreceptor izolálása: A rianodinreceptor-komplexeket az SR membránjából 3 ml HSR vezikula-oldat és 6 ml 1% detergenst tartalmazó szolubilizáló oldat felhasználásával oldottuk ki (2 óra, 4°C). A szolubilizációs elegy (9 ml) összeállítása után a minta egy részét (3 ml-t) [<sup>3</sup>H] rianodinnal (3 nM) jelöltük. A minták (jelölt és nem jelölt) inkubálását (2 óra, 4°C) követően a nem szolubilizált fehérjéket centrifugálással eltávolítottuk (20 perc, 59000 g). A szupernatánst (3-3 ml) lineáris (10-28%) szacharóz gradiensre vittük fel és kilendülő rotorban (Beckman SW-27) centrifugáltuk. A 16 órás, 90000 g-n történő centrifugálás után a gradiensekből 15 cseppe (~500 µl) frakciókat szedtünk. Az egyes frakciók radioaktivitását folyadék-szcintillátorral meghatároztuk ([<sup>3</sup>H]-rianodinnal jelölt minta) és megmértük a hozzájuk tartozó

törésmutatót. A beütésszámcsúcs alapján megállapítottuk, hogy melyik törésmutatójú frakcióban dúsult fel a  $[H^3]$ -rianodin. Az így azonosított frakciókból vett mintákat 10%-os poliakrilamid gélen futtattuk és Comassie-blue-val festettük. A festődés denzitása szemikvantitatív információt ad a gélen lévő fehérje mennyiségéről és az esetleges szennyeződés (főleg akto-miozin szennyeződés) mértékéről.

3.3. A  $Ca^{2+}$ -pumpa aktivitásának mérése „kapcsolt enzim-assay” segítségével: A nyúl vázizomból izolált könnyű SR vezikulák membránja döntően  $Ca^{2+}$ -ATPáz molekulákat tartalmaz (~80%). A pompa aktivációját piruvát-kináz „kapcsolt enzim-assay” technikával mértük úgy, hogy 37 °C-on, 334 nm-es hullámhosszon követve a NADH fogyást meghatároztuk a  $Ca^{2+}$ -ATPáz aktivitását. A módszer elve, hogy a pompa működése során ATP-t hasít, melyből ADP keletkezik. ADP jelenlétében a foszfoenol-piruvát piruváttá alakul piruvát-kináz enzim segítségével. Egy következő reakcióban a piruvátból laktát-dehidrogenáz révén laktát lesz, miközben NADH-ból  $NAD^+$  keletkezik.

A méréseket 37°C-on végeztük 100 mM KCl, 0,5 mM Mg Cl<sub>2</sub>, 20 mM Tris HCl (pH=7,5), 7,5 U/ml piruvát-kináz, 18 U/ml laktát dehidrogenáz, 0,42 mM foszfoenol-piruvát, valamint 0,2 mM NADH-t és 2 μM ionofór (A23187) jelenlétében. A NADH fogyásának detektálása fotométerrel történik a 334 nm-en bekövetkező abszorbanciaváltozás alapján. A  $Ca^{2+}$ -pumpa aktivitását – az SR vezikula frakció koncentrációjának figyelembevételével – a kapott görbe meredekségéből számoltuk ki. A TPEN-t az aktivitásmérés megkezdése előtt 5 perccel adtuk a vezikulához. A mérések során a  $Ca^{2+}$ - és EGTA-koncentráció úgy volt beállítva, hogy a szabad  $Ca^{2+}$ -koncentráció (~2 μM) a SERCA maximális aktivitását biztosítsa.

#### **4. Statisztikai analízis**

Kísérleti adatok csoportjainak összehasonlításához Student-féle t-próbát használtunk, szignifikáns különbséget  $p < 0,05$  esetén állapítottunk meg.

## Eredmények

### ***1. A TPEN hatásának tanulmányozása C2C12 egér myoblast sejtvonalon***

1.1. Eltérő TPEN-koncentrációk hatékonyságának vizsgálata: A C2C12 sejtvonal vizsgálatát 7-9 napos fejlett izomcsöveken, a TPEN hatékonysággörbéjének meghatározásával kezdtük, hogy megtudjuk, milyen TPEN-koncentráció vált ki maximális választ. A sejtek válaszkészségét minden esetben a maximálisan hatékonynak talált 100 mM KCl-al végeztük.

5  $\mu\text{M}$ -os koncentrációban alkalmazva a TPEN 28-ból 5 sejten (18%), míg 20  $\mu\text{M}$ -os koncentrációban 14-ből 7 sejten (50%) okozott spontán tranziens  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -emelkedést. Növelve a TPEN-koncentrációt a kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$ -tranziensek amplitúdói párhuzamosan, monoton növekedést mutattak egy adott koncentrációig (~50  $\mu\text{M}$ , amely a leghatásosabbnak bizonyult). Ezen koncentrációnál 14-ből 9 sejt (64%), illetve 26 kísérletből 15 alkalommal (58%) a TPEN adagolása tranziens  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -emelkedést eredményezett. Egy nagyságrenddel nagyobb koncentrációban alkalmazva a szert (500  $\mu\text{M}$ ) a 13 vizsgált sejten, mind a 21 próbálkozás hatástalannak bizonyult. Természetesen a hatás elmaradása önmagában nem feltétlenül jelenti azt, hogy 500  $\mu\text{M}$  TPEN használata nem befolyásolja valamilyen módon a sejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázisát.

1.2. TPEN hatása a myoplasmából való  $\text{Ca}^{2+}$ -eltávolítására: Következő lépésként az SR  $\text{Ca}^{2+}$ -pumpa hatékonyságát az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  szint helyreállításában kívántuk megvizsgálni. Ennek érdekében a  $\text{Ca}^{2+}$ -tranziensek leszálló szárának meredekségéből az időállandók meghatározásával kiszámoltuk a pompa  $\text{Ca}^{2+}$ -transzport képességét. 500  $\mu\text{M}$  TPEN jelenlétében két paraméter is változott: csökkent a tranziens amplitúdója, és lelassult a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  visszatérése a nyugalmi szintre. Minden bizonnyal ez utóbbiért az alacsonyabb fluxusérték a felelős. A fluxus kiszámításához használt maximális  $\text{Ca}^{2+}$ -eltávolítási sebesség ( $\text{PV}_{\text{max}}$ ) értékek rendre 585, 634 és 343  $\mu\text{Ms}^{-1}$ -nak adódtak. Mivel számszerűsíteni szeretnénk volna e változásokat, exponenciális függvényt illesztettünk a KCl-indukált tranziensek leszálló szárához és meghatároztuk az időállandókat ( $\tau$ ).

TPEN hiányában az időállandó  $3,38 \pm 0,28$ -nak adódott ( $n=17$ ), mely érték hasonló volt  $50 \mu\text{M}$  TPEN jelenlétben. Magasabb TPEN koncentráció használatát követően ( $500 \mu\text{M}$ ) azt találtuk, hogy a relatív időállandó jelentősen megnőtt. A továbbiakban a KCl-depolarizációt követő  $\text{Ca}^{2+}$ -tranziens leszálló szárára legalább 3 másodperccel a csúcs elérését követően exponenciálisan illesztettünk. Az így meghatározott  $PV_{\text{max}}$  érték TPEN hiányában  $444 \pm 83 \mu\text{Ms}^{-1}$ -nak adódott ( $n=10$ ). A normalizált  $PV_{\text{max}}$  érték  $50 \mu\text{M}$  TPEN adagolását követően enyhén emelkedett ( $113,5 \pm 6,9\%$ ,  $n=7$ ) a kontrollhoz képest, míg  $500 \mu\text{M}$  szer jelenlétében erőteljes gátlás jelentkezett, és a relatív  $PV_{\text{max}}$  érték lecsökkent a kontroll  $72,8 \pm 8,6\%$ -ára ( $n=15$ ).

### 1.3. Koffein és KCl-depolarizáció hatásának vizsgálata TPEN jelenlétében:

A fentiek alapján úgy tűnt, hogy a TPEN magas koncentrációban alkalmazva nemcsak a  $\text{Ca}^{2+}$ -eltávolítási mechanizmust módosítja, de a depolarizáció-indukált  $\text{Ca}^{2+}$ -tranziens amplitúdóját és az annak megfelelő fluxust is. Ezért ezt a tényezőt tovább kívántuk vizsgálni és az agonista-, illetve a depolarizáció-indukált  $\text{Ca}^{2+}$ -tranzienseket elemeztük TPEN jelenlétében.

Az ismételt  $15 \text{ mM}$  koffein, illetve  $100 \text{ mM}$  KCl adagolása nem deszenzitizálódó  $\text{Ca}^{2+}$ -tranzienseket eredményezett.  $50 \mu\text{M}$  TPEN adagolása nem módosította az agonista, illetve a depolarizáló ágens hatását a RyR receptorkomplex működését tekintve. Ugyanez viszont nem mondható el az egy nagyságrenddel nagyobb koncentrációban használt TPEN esetén, mivel  $500 \mu\text{M}$  TPEN jelentősen lecsökkentette a belső raktárakból való felszabadult  $\text{Ca}^{2+}$ -mennyiségét. Összegezve e kísérleteink eredményeit elmondhatjuk, hogy  $50 \mu\text{M}$  TPEN nem befolyásolta az agonista-, illetve depolarizáció-indukált  $\text{Ca}^{2+}$ -tranziensek relatív amplitúdóját. Ezzel szemben  $500 \mu\text{M}$  TPEN drasztikusan lecsökkentette azt (a kontroll  $28,3 \pm 5,62\%$ -ára koffein, valamint  $10,3 \pm 3,2\%$ -ára KCl esetén). Ez a hatás bizonyítottan nem az oldószer (DMSO) hatásának köszönhető, ami a kísérleteinkben használt legmagasabb koncentrációban ( $0,5\%$ ) sem okozott szignifikáns eltérést a kontrollhoz képest ( $1,13 \pm 0,1$  vs  $1,21 \pm 0,05$ ).

1.4. TPEN hatása a KCl-depolarizáció által kiváltott kalciumtranziensek amplitúdójának méretére fiziológias és alacsony extracelluláris  $[Ca^{2+}]$  jelenlétében: Továbbvizsgálva az összes, illetve szabad [TPEN] hatását a C2C12 izomsejteken kíváncsiak voltunk arra, hogy milyen összefüggés van a különböző TPEN-koncentrációk használata és a KCl-depolarizáció által kiváltott tranziensek méretére kifejtett gátló hatás között.

Ezért a következő kísérletsorozatban azt kívántuk megvizsgálni, milyen hatása van a mintegy felére csökkentett extracelluláris  $[Ca^{2+}]$ -nak (1,8 mM-ról 0,8 mM-ra) azonos [TPEN] használata mellett. Általunk meghatározott  $[Ca^{2+}]_e$  alkalmazva (1,8, valamint 0,8 mM) ismételt, 10 s-ig adagolt 100 mM-os KCl-al váltottunk ki  $Ca^{2+}$ -tranzienseket. Az összesített adatok azt bizonyítják, hogy 250  $\mu$ M TPEN gátolta az ismételt KCl-depolarizáció indukált  $Ca^{2+}$ -tranziensek relatív amplitúdóját az első - TPEN hiányában regisztrált - tranzienshez képest ( $0,75 \pm 0,06$ , amikor  $[Ca^{2+}]_e = 1,8$  mM volt vs  $0,86 \pm 0,05$ , amikor  $[Ca^{2+}]_e = 0,8$  mM-nak volt beállítva). Ezen adatok nem adódtak szignifikánsan különbözőnek ( $p > 0,06$ ). Szignifikánsan különbözőnek adódott viszont a fentebb említett 250  $\mu$ M TPEN jelenlétében regisztrált tranziensek relatív amplitúdója, az 500  $\mu$ M TPEN ( $[Ca^{2+}]_e = 1,8$  mM) adagolása mellett rögzített tranziensek relatív amplitúdójához viszonyítva ( $0,44 \pm 0,05$ ) ( $p < 0,0001$ ). Ezen adatok igen meglepőek voltak, hiszen a szabad [TPEN] a 250  $\mu$ M-os oldatban ( $[Ca^{2+}]_e = 0,8$  mM) azonos az 500  $\mu$ M-os oldatban lévő ( $[Ca^{2+}]_e = 1,8$  mM) szabad [TPEN]-vel, számszerint 40  $\mu$ M (ennek kiszámolására a Maxchelator számítógépes programot használtuk).

Ezen kísérletek végeredményeképpen elmondható, hogy az összes és nem a szabad [TPEN] az, amely a depolarizáció-indukált  $Ca^{2+}$ -tranziensek esetén tapasztalt hatásokért felelős.



## ***2. TPEN hatásának tanulmányozása patkányból enzimatikusan izolált egyedi izomrostokon***

Kísérleteinket szaponinnal (0,002%) permeabilizált patkány izomrostokon végeztük, szobahőmérsékleten. Amint az várható volt, kontroll körülmények között az emlős izomrostokon kétféle eseményt regisztráltunk: *sparkot* és *ember*t. A szívizmon elvégzett kísérletekkel ellentétben, ahol 20  $\mu\text{M}$ -os koncentrációban alkalmazva a TPEN spontán kialakuló SR kalciumfelszabadulást és tovaterjedő  $\text{Ca}^{2+}$ -hullámokat okozott, esetünkben 50  $\mu\text{M}$ -os koncentrációban alkalmazva a szer hatása elmaradt, és a spontán aktivitás enyhe gátlását figyeltük meg.

Kontrollban 574 db, 50  $\mu\text{M}$  TPEN jelenlétében 159 db, 500  $\mu\text{M}$  TPEN jelenlétében pedig 197 *sparkot* detektáltunk és analizáltunk. 50  $\mu\text{M}$  TPEN adagolását követően az *ember*ök száma drasztikusan lecsökkent a kontrollban rögzített 154-ről 6-ra, illetve 0-ra egy nagyságrenddel nagyobb (500  $\mu\text{M}$ ) TPEN-koncentráció használata esetén. Kontroll körülmények között a *sparkok* frekvenciája  $0,032 \pm 0,005 \text{ s}^{-1} \text{ sarc}^{-1}$  volt. Annak ellenére, hogy a *sparkok* frekvenciájában nem mutatkozott szignifikáns eltérés 50  $\mu\text{M}$  TPEN használatát követően a kontrollhoz képest ( $0,031 \pm 0,014 \text{ s}^{-1} \text{ sarc}^{-1}$ ,  $p > 0,9$ ), ez az érték szignifikánsan lecsökkent ( $0,021 \pm 0,014 \text{ s}^{-1} \text{ sarc}^{-1}$ ), amikor magas koncentrációban alkalmaztuk a szert. A csökkent frekvencia mellett az események morfológiája is változott, mely igen erőteljesnek bizonyult 500  $\mu\text{M}$  TPEN alkalmazását követően, a kontrollhoz viszonyítva.

## ***3. TPEN hatásának tanulmányozása békából mechanikusan izolált izomrostokon***

3.1. TPEN hatása alacsony  $[\text{Mg}^{2+}]_i$  alkalmazva: 0, 50, valamint 200  $\mu\text{M}$  TPEN adagolását követően összesen 4365, 9885, illetve 286 *sparkot* regisztráltunk. Adataink alapján elmondhatjuk, hogy csökkentve az  $[\text{Mg}^{2+}]_i$ ,

(5mM-ról 4mM-ra) a RyR1 gátlás ily módon bekövetkező oldása révén, nőtt a *sparkok* frekvenciája ( $0,23\pm 0,05 \text{ s}^{-1}\text{sarc}^{-1}$  vs  $0,19\pm 0,02 \text{ s}^{-1}\text{sarc}^{-1}$ ).

Az első szembetűnő megfigyelés a TPEN adagolását követően a módosult eseményfrekvencia volt. 50  $\mu\text{M}$ -os koncentrációban alkalmazva a szer serkentette az események kialakulását ( $0,33\pm 0,02 \text{ s}^{-1}\text{sarc}^{-1}$ ), a kontroll mintegy 143%-ára növelve azt, míg 200  $\mu\text{M}$ -os koncentrációban gátolta, a kontroll 39%-ára csökkentve a frekvenciát ( $0,09\pm 0,02 \text{ s}^{-1}\text{sarc}^{-1}$ ).

Egy másik szembetűnő változás a *sparkok* morfológiáját érintette. A TPEN hatására tovaterjedő, ún. „*makrosparkok*” jelentek meg. Ezen események három példája volt megfigyelhető: egy pontból kiinduló, egy irányban tovaterjedő *spark*; egy pontból kiinduló, két irányban terjedő *spark*; valamint két pontból kiinduló *spark*, amely egy közös pontba konvergál. Az események terjedési sebességét a hullámfront szögének kotangenséből számoltuk ki, és ez átlagosan  $273\pm 7 \mu\text{ms}^{-1}$ -nek adódott ( $n=62$ ), jól korrelálva az irodalmi adatokkal.

Tovább elemezve a szer elemi eseményekre kifejtett hatását, a bemutatott morfológiai változásokon felül szembetűnők a többi *spark*-paramétert érintő változások. A kontroll körülmények között rögzített *sparkok* amplitúdója ( $0,92\pm 0,005$ ), térbeli szélessége ( $2,12\pm 0,01 \mu\text{m}$ ), valamint időbeli hossza ( $41,3\pm 70,2 \text{ ms}$ ) rendre ez értékek 84,7, 113,6, valamint 102,3%-ára módosultak 50  $\mu\text{M}$  TPEN, illetve a kontroll 70,6, 82 és 73,4%-ára 200  $\mu\text{M}$  TPEN alkalmazását követően. Fontos megjegyezni, hogy a térbeli szélesség esetén tapasztalt növekedés 50  $\mu\text{M}$  TPEN alkalmazása során egy sokkal hatékonyabb CICR-ra utal, hisz valószínűleg az egy időben megnyíló szomszédos  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornák száma megnőtt a puffer hatására.

Végezetül egy értékes megállapítás a magasabb koncentrációban alkalmazott (200  $\mu\text{M}$ ) szer hatásának elmaradásából adódik, amely egy esetben sem eredményezett tovaterjedő eseményeket. Ez arra utalhat, hogy két eltérő mechanizmus létezhet, amelyek eltérő képpen aktiválódnak alacsony, valamint magas [TPEN] alkalmazása esetén.

3.2. TPEN hatása emelt  $[Mg^{2+}]_i$ -t alkalmazva: Mivel eredményeink arra utaltak, hogy a CICR-nek kulcsszerepe van az 50  $\mu$ M TPEN által kifejtett hatásra, egy következő kísérletsorozatban enyhén megemeltük az  $[Mg^{2+}]_i$ -t (5 mM-ról 5,5 mM-ra), ami gátlólag hat a CICR mechanizmusra. A megemelt  $[Mg^{2+}]_i$  mellett az 50  $\mu$ M TPEN hatása ellentétes volt az előzőekben leírt, alacsony  $[Mg^{2+}]_i$  alkalmazásakor észlelt hatáshoz képest, hiszen szignifikáns csökkenés volt tapasztalható a frekvenciát illetően ( $0,19 \pm 0,02$ -ről  $0,10 \pm 0,01$   $s^{-1} sarc^{-1}$ -re), valamint a többi paraméter esetén is. E szignifikáns csökkenés alól kivételt volt az amplitúdó, amely enyhén megnőtt a szer alkalmazását követően.

#### **4. TPEN hatásának vizsgálata izolált RyR-on**

Mivel az elemi események tanulmányozása során nyert adataink arra utaltak, hogy a TPEN esetlegesen direkt módon befolyásolja a  $Ca^{2+}$ -csatorna aktivitását, a vizsgálatainkat lipid kettősrétegbe ágyazott, izolált vázizom típusú RyR segítségével folytattuk. Ezen kísérletek TPEN jelenlétében, a csatorna kapuzási kinetikája tanulmányozására szolgáltak.

470 nM (ionizált)  $Ca^{2+}$ -koncentrációnál a beágyazott RyR-ok viszonylag alacsony nyitvatartási valószínűséggel ( $P_O$ ) rendelkeztek ( $P_O = 0,0076 \pm 0,0018$ ). 50, 100, valamint 200  $\mu$ M-os TPEN adagolását követően a  $P_O$  folyamatosan nőtt, ami direkt módon bizonyítja a szer RyR-ra kifejtett aktiváló hatását negatív membránpotenciálok. Ez a hatás jelen volt 1 mM  $Mg^{2+}$  *cis* oldali jelenlétében, valamint 50  $\mu$ M szabad  $Ca^{2+}$ -koncentráció esetén egyaránt, igaz módosult paraméterek mellett. Ezzel szemben pozitív membránpotenciálok esetén (+85 mV) ellenkező hatás volt megfigyelhető, hiszen 50  $\mu$ M TPEN adagolása jelentősen lecsökkentette a nyitvatartási valószínűséget ( $P_{O, kontroll} = 0,208 \pm 0,024$ -ről  $P_{O, TPEN} = 0,0014 \pm 0,002$ -re).

A TPEN jelenlétében a rianodin hatása nem változott, hiszen ekkor is jelen voltak az rianodin által létrehozott jellegzetes szubkonduktancia-állapotok.

## 5. TPEN hatása az SR $Ca^{2+}$ -pumpára

A C2C12 sejteken kapott eredményeink arra utaltak, hogy a TPEN jelenléte befolyásolhatja a  $Ca^{2+}$ -visszavételét az SR-be, mivel jelentősen megnyúlt a KCl-depolarizáció indukált  $Ca^{2+}$ -tranziensek leszálló szára. Hogy megbizonyosodjunk e feltevés helyességéről, a TPEN hatását izolált SR vezikulák segítségével tanulmányoztuk, és a vezikulás hidrolitikus aktivitást rögzítettük különböző [TPEN] alkalmazásakor. A TPEN dóziszfüggő módon gátolta az SR ATP-áz aktivitását. A méréseinkben legmagasabb koncentrációban alkalmazott TPEN (500  $\mu$ M) a SERCA-pumpa aktivitását mintegy felére csökkentette.

## 6. Az elemi kalciumfelszabadulási események funkcionális változásai PMI állatmodellen

Kísérleteinkben úgynevezett sham-operált, kontrollnak számító, valamint postmyocardialis infarktuson átesett (továbbiakban: PMI) patkányokból származó szaponinnal permeabilizált vázizomrostokat használtunk. A kontroll rostokon spontán kialakuló kalciumfelszabadulási eseményeket rögzítettünk, amelyek frekvenciája  $0,038 \pm 0,001 \text{ s}^{-1} \text{ sarc}^{-1}$  (733 felvétel, 10 rost), valamint morfológiai paraméterei mindenben megegyeztek az irodalmi adatokkal. A PMI állatokból származó rostokon az események frekvenciájának enyhe növekedése volt tapasztalható ( $0,041 \pm 0,001 \text{ s}^{-1} \text{ sarc}^{-1}$ , 522 felvétel, 8 rost), amit nem találtunk szignifikánsan eltérőnek ( $p > 0,8$ ) a kontroll csoporthoz képest.

Kontrollban az események megoszlása a következő képpen alakult: leggyakrabban (63,2%) *spark*ok fordultak elő, kevésbé voltak gyakoriak (22,4%) a magányos *ember*ök, illetve a *spark+ember*ök (14,4%). Ehhez képest a PMI rostokon rögzített események csupán 40,1% volt *spark*, 32,7% volt *ember*, és 27,7% volt *spark+ember*. Ezen adatokat értékelve érdekes megállapítás volt, hogy a PMI rostok esetén az *ember*ök *spark*okhoz viszonyított relatív aránya

jelentősen nagyobb volt (0,44) a kontrollban rögzített események azonos arányához képest (0,26).

A kontroll csoport esetén összesen 6 állat felhasználását és 10 izomrost tanulmányozását követően 1284 *spark*ot és 454 *ember*t rögzítettünk, míg a PMI csoport esetén 4 állat és 8 izomrost tanulmányozását követően 937 *spark*ot, valamint 765 *ember*t detektáltunk. A PMI patkányokból származó vázizomrostokon rögzített *spark*ok amplitúdója mintegy 40%-kal csökkent, míg az *ember*ök átlagos amplitúdója 20%-kal csökkent a kontrollhoz képest. A *spark*ok amplitúdójának drámai csökkenése valószínűleg a kevesebb nagy amplitúdójú *spark* kialakulásának köszönhető. A PMI rostok esetén a *spark*ok térbeli kiterjedése enyhén csökkent, ami miatt egy átlagos elemi esemény alatt felszabaduló  $\text{Ca}^{2+}$  becsült mennyisége is kevesebb, mint kontroll esetben.

Az egyes események kalciumfluxusának meghatározását a signal mass (SM(t)) függvény segítségével végeztük. Először Gauss-görbét illesztettünk a *spark*ok térbeli profiljának minden egyes időbeli pontjára és kiszámoltuk az SM(t) értéket. Majd az SM(t) függvény felszálló szárának egy egyenessel való illesztését követően az egyenes meredekségéből kaptuk meg kalciumfluxust. A kontroll *spark*ok SM(t) értéke szignifikánsan nagyobb volt a PMI patkányokon regisztrált *spark*okhoz viszonyítva ( $2,59 \pm 0,24$  vs  $1,42 \pm 0,25 \mu\text{m}^3 \text{ms}^{-1}$ ,  $p < 0,01$ ). Ez a megállapítás azt támasztja alá, hogy az elemi események alatt létrejövő kalciumfluxus szívelégtelenségben kisebb, ami a  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázis zavarára vezethető vissza.

## Megbeszélés

### *1. TPEN hatása a C2C12 sejtek $Ca^{2+}$ -homeosztázisára*

A teljes sejtés  $[Ca^{2+}]_i$  mérések során kiderült, hogy alacsony koncentrációban alkalmazva (20, 50  $\mu M$ ) a TPEN tranziens  $Ca^{2+}$ -felszabadulást eredményezett. Másrészt egy nagyságrenddel magasabb koncentrációban adagolva (500  $\mu M$ ) a szer alkalmazása nemcsak hatástalannak bizonyult, de úgy tűnik, hogy módosította a depolarizáció-, illetve agonista indukált  $Ca^{2+}$ -tranzienseket, valamint gátolta a cytoplazmatikus  $Ca^{2+}$ -eltávolító mechanizmust.

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy alacsony koncentrációban alkalmazva (~50  $\mu M$ ) a TPEN a vizsgált sejtek többségében (14-ből 9 sejt, 26-ből 15 kísérletben) képes volt az  $[Ca^{2+}]_i$  tranziens emelkedését kiváltani. Növelve a szer koncentrációját azt tapasztaltuk, hogy egyre kevesebb sejt volt képes  $Ca^{2+}$ -tranzienssel válaszolni olyannyira, hogy 500  $\mu M$ -os koncentrációban alkalmazva a szer teljesen hatástalannak bizonyult. Sajnos nem világos számunkra, hogy egyes sejtek miért, akár ismételten is, más sejtek pedig egyáltalán nem válaszoltak a TPEN adagolását követően. Egy lehetséges feltevés szerint a  $[Ca^{2+}]$  az SR membrán két oldalán (cytoplasmaticus, illetve lumináris) ún. előaktivált állapotba helyezi a RyR-okat, amelyek aztán a felszabadító impulzus hatására könnyebben nyílnak meg.

A TPEN hatásmechanizmusának megértése érdekében fontosnak tűnt tisztázni, hogy a szabad vagy a  $Ca^{2+}$ -ot kötött puffer hatását tapasztaltuk méréseink során. Azon kísérleteink, amelyeket csökkentett extracelluláris  $[Ca^{2+}]$  mellett végeztünk, arra engednek következtetni, hogy az összes és nem a szabad vagy  $Ca^{2+}$ -ot kötött [TPEN] felelős a tapasztalt hatásokért. Másrésztől nem tudjuk pontosan, hogy a szer serkentő hatását követően (alacsony koncentrációban alkalmazva) miért és hogyan eredményezett gátlást, ha növeltük az teljes [TPEN]-t.

Annak ellenére, hogy eredményeink azt mutatják, a TPEN alacsony koncentrációban alkalmazva serkentő, míg magasabb koncentrációban alkalmazva gátló hatást fejt ki a C2C12 sejtekre, ismereteinket nem tartjuk elegendőnek annak a lehetőségnek a kizárására, hogy magas koncentrációban a szer esetleg az SR membránban akkumulálódik. Ez, mint egy membrán impermeábilis  $\text{Ca}^{2+}$ -TPEN elegy, lecsökkentheti az intralumináris  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t, amely így a leírt hatásokat eredményezte. A csökkent SR  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalom (párhuzamosan a gátolt pumpamechanizmussal) magyarázatot adhatnak eredményeinkre. Kétségtelenül, vagy az SR-en belüli pufferhatás, vagy a RyR receptorkomplex direkt gátlása jelen van (vannak) a pumpamechanizmus gátlása mellett, hiszen önmagában a SERCA-pumpa gátlása az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  emelkedését eredményezné. A pontos hatásmechanizmus teljes ismeretének hiánya ellenére adataink egyértelműen azt bizonyítják, hogy az oldatban jelenlévő teljes TPEN-koncentráció, és nem pedig a szabad vagy  $\text{Ca}^{2+}$ -kötött TPEN felelős a  $\text{Ca}^{2+}$  tranziensekre kifejtett hatásokért.

## **2. TPEN hatása egyedi permeabilizált izomrostokon**

Az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -változás építőelemeinek számító elemi események vizsgálata egy fontos eszköz a sejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázisának tanulmányozásában. A permeabilizált rostokon kapott eredményeink azt mutatják, hogy a TPEN befolyásolta az izomrostok  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázisát miáltal direkt hatást gyakorolt a kalciumfelszabadulási mechanizmus két kulcsszereplőjére: a RyR-ra és a SERCA-pumpára. Alacsony koncentrációban használva (50  $\mu\text{M}$  TPEN) a béka vázizomrostokon rögzített *sparkok* frekvenciája nőtt, és a CICR mechanizmus hatékonyabbnak bizonyult; míg magas koncentrációban alkalmazva (200, 500  $\mu\text{M}$  TPEN) a szer gátolta a  $\text{Ca}^{2+}$  mozgását az SR membrán mindkét oldalán.

Béka vázizomrostokon 50  $\mu\text{M}$ -os koncentrációban a TPEN képes volt spontán kialakuló kalciumfelszabadulási eseményeket létrehozni, és nemcsak növelte az események frekvenciáját, de tovaterjedő *sparkok*at eredményezett.

Megjegyzendő, hogy e hatások egyike sem volt megfigyelhető emlős izomrostokon, valamint emelt  $[Mg^{2+}]_i$  körülmények között béka izomrostokon. Ezen adatok fényében úgy tűnt, hogy a TPEN elősegíti a CICR mechanizmust, amely aztán előidézi a  $Ca^{2+}$  által létrehozott RyR aktivációt. E megfigyelésekkel párhuzamosan hasonló koncentrációban (50  $\mu M$ ) a szernek jóval erőteljesebb hatása volt, izolált lipid bilayer-be ágyazott csatornákon, amikor a *cis*  $[Ca^{2+}]$  50  $\mu M$ -os volt az alacsonyabb 470 nM-os koncentrációhoz képest.

Várakozásainkkal ellentétben, amikor növeltük a szer koncentrációját, az elemi események gátlását figyeltünk meg, a csökkentett  $[Mg^{2+}]_i$  ellenére. E gátlás az események frekvenciájában, valamint a jellegzetes paraméterek értékeiben is megmutatkozott. Úgy gondoljuk, hogy e gátlásért legalább három különböző mechanizmus tehető felelőssé:

ha a megemelt TPEN koncentráció tovább stimulálja a csatorna nyitva tartását, az a raktár kiürüléséhez vezethet.

a SERCA pumpa gátlása révén a TPEN gátolhatja a  $Ca^{2+}$  visszavételét az SR-be, ami szintén a raktár kiürüléséhez vezet.

magas koncentrációkban a szer direkt módon gátolhatja a RyR-t. Izolált receptorokon végzett kísérleteink mindhárom lehetőségre nyújtottak információt.

### **3. TPEN hatása izolált RyR-on**

Az izolált RyR-on végzett méréseink azt bizonyították, hogy negatív membránpotenciál-értékek esetén, alacsony *cis*  $[Ca^{2+}]$  fenntartása mellett a TPEN-koncentráció növelését követően jelentősen megnőtt a csatorna nyitvatartási valószínűsége. E körülmények között 50  $\mu M$ -nál nagyobb [TPEN] használatát követően azt tapasztaltuk, hogy tovább nőtt a  $P_o$ , melynek következtében enyhén emelkedett  $[Ca^{2+}]_i$ -nak kellett volna jelentkeznie. Mivel a teljes sejtes  $Ca^{2+}$ -méréseink során az  $[Ca^{2+}]_i$  növekedése 500  $\mu M$  TPEN



használata során egyszer sem volt megfigyelhető, valószínűtlennek tűnik, hogy a szer gátló hatása csupán a csatorna aktivációját követően a raktár kiürülését befolyásolja. Adataink világosan mutatják, hogy a TPEN gátolja a SR pumpa hidrolitikus aktivitását. Ez a gátlás a puffer viszonylag magas koncentrációjának használatakor jelentkezik ( $EC_{50}$  nagyobb, mint  $600 \mu\text{M}$ ). Feltételezve, hogy  $500 \mu\text{M}$  TPEN jelenlétében a SERCA-pumpa gátlása mintegy 45%-os, mely gátlás elegendő az SR újratöltés megakadályozásához, logikus elvárásnak tűnt a korábban leírt pumpagátlók alkalmazása során (például tapszigargin) vagy megnőtt SR elcsorgás („leak”) esetén a magasabb  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . E jelenségek hiánya miatt csupán a magas koncentrációban alkalmazott TPEN-nek a RyR direkt gátlásával magyarázható a jelentősen lecsökkent SR kalciumfelszabadulás.

Összegzésként elmondható, hogy az SR kalciumcsatorna maximálisan aktiválható magas *cis*  $[\text{Ca}^{2+}]$  esetén  $50 \mu\text{M}$  TPEN által, míg pozitív membránpotenciál értékeknél magasabb [TPEN] alkalmazásakor egyértelmű gátlás jelentkezik. A lipid kettősrétegben kapott adataink rámutattak arra, hogy a TPEN aktiváló hatása a *cis*  $[\text{Ca}^{2+}]$  függvénye, de a pontos hatásmechanizmus tisztázatlan maradt. Minden bizonnyal kizárható a  $\text{Ca}^{2+}$  pufferelemzése a kelátor által, hiszen az izolált csatornán végzett mérések során különös figyelmet szenteltünk a szabad  $[\text{Ca}^{2+}]$  konstans értéken való tartására, valamennyi tesztelt [TPEN] esetén.

Adataink alapján a TPEN egy lehetséges hatásmechanizmusát a következőképpen gondoljuk: feltételezve, hogy a szer érzékenyíti a RyR-okat a  $\text{Ca}^{2+}$  révén felváltva aktiválva és inaktiválva azokat, a növelt TPEN-koncentráció egyre inkább balra tolódást eredményez a harang alakú aktivációs-inaktivációs görbén. Alacsony  $[\text{Ca}^{2+}]$ -nál, növelve a pufferkoncentrációt, növekvő aktivációt figyelhetünk meg, amely a harang alakú görbe felszálló szárán jelentkezik. Magasabb  $[\text{Ca}^{2+}]$ -nál a  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivációs és -inaktivációs görbe leszálló száránál a magasabb [TPEN] esetén gátlás figyelhető meg.

#### **4. Kalciumfelszabadulási események PMI állatmodellen**

A myocardialis infarktuson átesett állatok esetén mindkét elemi esemény típus (*spark* és *ember*) megfigyelhető volt azzal a különbséggel, hogy az *ember*ök *spark*okhoz viszonyított relatív aránya jelentősen nagyobb volt a kontrollban rögzített események azonos arányához képest.

Az események amplitúdója lecsökkent, és a  $\text{Ca}^{2+}$ -fluxus is kisebb volt a PMI rostokban ( $1,42 \pm 0,25 \mu\text{m}^3\text{ms}^{-1}$  vs  $2,59 \pm 0,24 \mu\text{m}^3\text{ms}^{-1}$ ). Konzekvens módon a megnövekedett csúcs eléréséhez szükséges idő mellett a *spark*ok rise time-ja is megnőtt (valószínűleg az alacsonyabb amplitúdó miatt). Ezen adatok alacsonyabb SR tartalomra utalnak, vagy a RyR-ok módosult működésével magyarázhatók. Mivel azonos SR  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalom mellett (Ward és mtsai., 2003 munkája alapján) a RyR-ok konduktanciája negatív membránpotenciál értékeknél változatlan. A csökkent SM és amplitúdó értékek, és a *spark-ember* arány megváltozása arra engednek következtetni, hogy krónikus szívelégtelenség esetén egy *spark* alatt az egyszerre megnyíló RyR-ok átlagos száma, a  $\text{Ca}^{2+}$  hajtóereje, vagy mindkettő lecsökken. Ezen adatok talán megmagyarázhatják a krónikus szívelégtelenségben jelentkező csökkent vázizom-kontraktilitást.

## Összefoglalás

Kísérleteink célja a tenyésztett, valamint felnőtt emlős, illetve béka vázizomsejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázisának, globális és lokális kalciumfelszabadulási eseményeinek vizsgálata volt egy alacsony affinitású nehézfém-kelátor, a TPEN jelenlétében. Vizsgálni kívántuk még a kalciumfelszabadulás elemi eseményeit egy, a krónikus szívelégtelenséget mutató állatmodell, a PMI patkányok esetén.

Kimutattuk, hogy tenyésztett C2C12 egér myoblastokban a sejtek válaszkészsége és a  $\text{Ca}^{2+}$ -tranziensek amplitúdója fokozódik alacsony (20, 50  $\mu\text{M}$ ) TPEN-koncentráció használatakor, míg magasabb koncentrációban (500  $\mu\text{M}$ ) a szer a  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulás gátlását eredményezte.

További kísérleteinkben sikerült meghatározni az egész sejtre kiterjedő kalciumfelszabadulások háttérében álló elemi kalciumfelszabadulási események jellemző paramétereit emlős, valamint béka vázizomban. Kimutattuk, hogy béka izomrostok esetén csökkentett  $[\text{Mg}^{2+}]_i$  mellett, alacsony koncentrációban a TPEN növeli az események előfordulási valószínűségét, valamint a térbeli kiterjedést és csökkenti az amplitúdót; valamint meglepő módon tovaterjedő eseményeket eredményez. Ezek a *makrosparkok* soha nem voltak megfigyelhetők enyhén megemelt  $[\text{Mg}^{2+}]_i$  használatakor vagy emlős rostokon.

Pathológiás körülmények között, például krónikus szívelégtelenségben, a  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázis zavara következik be, továbbá megváltozik az elemi események előfordulási aránya is. Az általunk vizsgált PMI patkányokban az *emberök* gyakrabban fordultak elő, mint kontroll körülmények között; továbbá az egyidejűleg megnyíló csatornák száma is szignifikánsan lecsökkent.

Úgy gondoljuk, hogy eredményeink hozzájárulhatnak a TPEN hatásmechanizmusának megértéséhez, amely így a vázizomsejtek  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázisának jobb megismeréséhez vezet normál, valamint patológiás körülmények között.

## Közlemények

**Megjegyzés:** A szerző 2007. március 16. óta férje családnevét (Sztretye) használja. Az ezelőtt született közleményeiben leánykori (Fehér) nevén szerepel.

*A tézisek alapjául szolgáló közlemények, előadások és posztterek.*

### KÖZLEMÉNYEK:

**Sztretye M.**, Almássy J., Deli T., Szentesi P., Jung C., Dienes B., Simut C.A., Niggli E., Jóna I., Csernoch L. (2009): Altered sarcoplasmic reticulum calcium transport in the presence of the heavy metal chelator TPEN. *Cell Calcium*, doi:10.1016/j.ceca.2009.10.002. [IF:4,481]

**Sztretye M.**, Deli T., Szentesi P., Szigeti Gy.P., Csernoch L. (2008): Effect of TPEN on the calcium release of cultured C2C12 mouse myotubes. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 28(7-8):421-8. [IF:1,731]

Szigeti Gy. P., Almássy J., **Sztretye M.**, Dienes B., Szabó L., Szentesi P., Sárközi S., Jóna I., Vassort G., Csernoch L. (2007): Alterations in the calcium homeostasis of skeletal muscle from postmyocardial infarcted rats. *Pflügers Arch.* 455(3):541-53. [IF: 3,842]

### Magyar nyelvű ELŐADÁSOK:

*Orvos- és Egészségtudományi Centrum Általános Orvostudományi Kar Ph.D. és TDK. Tudományos Diáktalálkozója:*

**Fehér M.**, Szentesi P., Csernoch L. (2007): A vázizom kalciumhomeostasisának vizsgálata miokardális infarktuson átesett patkányokon.

**Fehér M.**, Szentesi P., Csernoch L. (2006): Tovaterjedő elemi kalciumfelszabadulási események egy alacsony affinitású kalciumpuffer (TPEN) jelenlétében harántcsíktolt izmokon.

### Angol nyelvű ELŐADÁSOK:

**Sztretye M.**, Szentesi P., Csernoch L. (2008): Effect of the low affinity  $\text{Ca}^{2+}$  chelator TPEN on  $\text{Ca}^{2+}$  release from the sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle. *Journal Club*, Rush University Medical Center, Department of Molecular Biophysics & Physiology, Section of Cellular Signalling, Chicago, USA.

**Fehér M.**, Csernoch L. (2006): Effects of TPEN on Excitation-Contraction Coupling in mammalian and amphibian skeletal muscle fibers. *IHP Training Unit on Animal Welfare and Animal Models*, University of Siena, Olaszország.

**POSZTEREK:**

Szigeti Gy.P., **Fehér M.**, Szentesi P., Dienes B., Szabó L., Csernoch L. (2006): Changes in the calcium homeostasis of skeletal muscle from postmyocardial infarcted rats. *New frontiers in basic cardiovascular research conference*, Debrecen.

**Fehér M.**, Dienes B., Szabó L., Szentesi P., Csernoch L. (2006): The study of skeletal muscle fibers calcium homeostasis in the presence of a low affinity calcium chelator. *Magyar Élettani Társaság LXX Vándorgyűlése*, Szeged.

Szentesi P., **Fehér M.**, Almássy J., Dienes B., Jóna I., Csernoch L. (2006): Altered sarcoplasmic reticulum calcium transport in the presence of the heavy metal chelator TPEN. *Gordon Conference*, Colby-Sawyer College New London, USA.

*A tézisekben fel nem használt közlemények, előadások és poszterek.*

**KÖZLEMÉNYEK:**

**Sztretye M.**, Manno C., Ríos E. (2009): Buffering by BAPTA promotes intracellular calcium release operated by membrane depolarization in mouse muscle. *J. Physiol.*(közlésre beküldve). [IF: 4,540]

Bannwarth M., Corrêa Jr I. R., **Sztretye M.**, Pouvreau S., Fellay C., Aebischer A., Royer L., Ríos E., Johnsson K. (2009): Indo-1 derivatives for local calcium sensing. *ACS Chemical Biology*. 4(3):173-190. [IF: 4,741]

Fodor J., Gönczi M., **Sztretye M.**, Dienes B., Oláh T., Szabó L., Csoma E., Szentesi P., Szigeti Gy.P., Marty I., Csernoch L. (2008): Altered expression of triadin 95 causes parallel changes in localized  $Ca^{2+}$  release events and global  $Ca^{2+}$  signals in skeletal muscle cells in culture. *J. Physiol.* 586(Pt 23):5803-18. [IF: 4,580]

Lukács B., **Sztretye M.**, Almássy J., Sárközi S., Dienes B., Mabrouk K., Simut C.A., Szabó L., Szentesi P., De Waard M., Ronjat M., Jóna I., Csernoch L. (2008): Charged surface area of maurocalcine determines its interaction with the skeletal ryanodine receptor. *Biophys. J.* 95(7):3497-509. [IF: 4,627]

Almássy J., **Sztretye M.**, Lukács B., Dienes B., Szabó L., Szentesi P., Vassort G., Csernoch L., Jóna I. (2008): Effects of K-201 on the calcium pump and calcium release channel of rat skeletal muscle. *Pflügers Arch.* 457(1):171-83.

[IF: 3,842]

Deli T., Varga N., Ádám A., Kenessey A., Rásó E., Puskás L. G., Tóvári J., Fodor J., **Fehér M.**, Szigeti Gy.P., Csernoch L., Tímár J. (2007): Functional genomics of calcium channels in human melanoma cells. *Int. J. Cancer.* 121(1):55-65.

[IF: 4,555]

#### *ELŐADÁS:*

Fodor J., **Sztretye M.**, Dienes B., Gönczi M., Szentesi P., Csernoch L. (2007): Suppressed Trisk 95 expression modifies E-C coupling in rat primary myotubes. *Magyar Élettani Társaság LXXI Vándorgyűlése, Pécs.*

#### *POSZTEREK:*

**Sztretye M.**, Yi J., Royer L., Zhou J., Knollmann B., Allen P.D., Protasi F., Ríos E. (2010): D4cpv-Casq1. A novel approach for targeting biosensors yields detailed dynamic imaging of calcium concentration inside the sarcoplasmic reticulum of living cells. *Biophysical Society 54rd Annual Meeting, San Francisco, California, USA.*

**Sztretye M.**, Royer L., Manno C, Zhou J., Knollmann B., Allen P.D, Protasi F., Ríos E. (2010): Ca depletion and ablation of calsequestrin similarly increase the evacuability of the Ca store of skeletal muscle. *Biophysical Society 54rd Annual Meeting, San Francisco, California, USA.*

Manno C., **Sztretye M.**, Ríos E. (2010): Effects of high [BAPTA] inside mouse muscle fibers reveal a role of calcium in the termination of voltage-operated calcium release from the SR. *Biophysical Society 54rd Annual Meeting, San Francisco, California, USA.*

**Sztretye M.**, Yi J., Royer L., Pouvreau S., Zhou J., Ríos E. (2009): Targeting biosensors for the monitoring of calcium inside the sarcoplasmic reticulum of adult murine skeletal muscle. *Gordon Conference, Waterville Valley, New Hampshire, USA.*

**Sztretye M.**, Pouvreau S., Bannwarth M., Corrêa Jr I. R., Fellay C., Aebischer A., Royer L., Johnsson K., Ríos E. (2009): Indo-1 hybrid biosensors for calcium monitoring in cellular organelles. *Biophysical Society 53rd Annual Meeting, Boston, Massachusetts, USA.*

Szentesi P., **Sztretye M.**, Dienes B., Németh R., Jenés Á., Vincze J., Kertai P., Csernoch L. (2008): Effects of KOENZIM Q10 in fluvastatin therapy induced modified calcium homeostasis in rat skeletal muscle fibers. *Magyar Élettani Társaság LXXII Vándorgyűlése*, Debrecen.

Gönczi M., Fodor J., **Sztretye M.**, Dienes B., Szabó L., Szentesi P., Csernoch L. (2007): The role of triadin 95 on calcium homeostasis of skeletal muscle cells. *Joint meeting of The Slovak Physiological Society, The Physiological Society and The Federation of European Physiological Societies*, Bratislava, Slovakia. (Abstract: *Acta Physiologica* 2007. Vol.191, Supplement 658).

Dienes B., Fodor J., Bihari J., Oláh T., **Sztretye M.**, Gönczi M., Szentesi P., Csernoch L. (2007): Trisk 95 overexpression in rat primary myotubes suppresses E-C coupling mechanism. *Magyar Élettani Társaság LXXI Vándorgyűlése*, Pécs.

Csernoch L., Fodor J., **Fehér M.**, Dienes M., Deli T., Szentesi P., Szabó L., Marty I. (2007): Suppressed SR calcium release and modified elementary calcium release events in Triadin-overexpressing cultured myotubes, *Biophysical Society 51st Annual Meeting*, Baltimore, Maryland, USA (Abstract: *Biophys. J.*, 92 Suppl., 79a).

Szentesi P., Almássy J., **Fehér M.**, Dienes B., Simuț C.A., Jóna I., Ronjat M., Csernoch L. (2006): Mutations in the scorpion toxin maurocalcine alter its ability to modify the calcium release events in frog skeletal muscle, *XXXVth European Muscle Conference*, Heidelberg, Germany (Abstract: *J. Muscle Res. Cell Motil.* 27:516-517).

Szentesi P., Fodor J., **Fehér M.**, Dienes B., Szabó L., Csernoch L. (2006): Triadin modifies EC-coupling in C2C12 myotubes. *XXXVth European Muscle Conference*, Heidelberg, Germany.

Csernoch L., Lukács B., **Fehér M.**, Dienes B., Szentesi P., Jóna I. (2006): Mutations in the scorpion toxin maurocalcine alter its ability to modify the calcium release events in frog skeletal muscle. *Gordon Conference*, Colby-Sawyer College New London, USA.

**Összesített impakt faktor: 36,939**