# DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

# Dr. Skaliczki Marianna

# Intracelluláris kalcium koncentráció-változások vizsgálata nyálmirigyben és vázizomban

DEBRECENI EGYETEM FOGORVOSTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA Debrecen, 2022

# **DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

# Intracelluláris kalcium koncentráció-változások vizsgálata nyálmirigyben és vázizomban

Dr. Skaliczki Marianna

Témavezető: Dr. Almássy János Prof. Dr. Nánási Péter Pál



DEBRECENI EGYETEM FOGORVOSTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA Debrecen, 2022

Tartatomjegyzek	-
Rövidítésjegyzék	5
1. Bevezetés	7
2. Irodalmi áttekintés	8
2.1. Vázizom	8
2.1.1. A vázizom szerkezete és működése	8
2.1.2. A rianodin receptor fiziológiája és patológiája	11
2.1.3. A RyR1 farmakológiája	13
2.1.4. Az SR Ca <sup>2+</sup> pumpa működése	16
2. 2. Nyálmirigy	17
2.2.1. Nyálmirigyek általános szerkezete, felépítése, szövettana	17
2.2.2. A parotis acinus sejtjeinek struktúrája	18
2.2.3. A nyálszekréció szabályozása	19
2.2.4. A klasszikus nyálszekréciós modell	21
3. Célkitűzések	24
4. Módszerek	25
4.1. A vázizom Ca <sup>2+</sup> transzportereinek vizsgálatára alkalmazott módszerek	25
4.1.1. SR mikroszóma preparátumok készítése nyúl vázizomból	25
4.1.2. Kalcium felszabadulás mérése SR vezikulumokból	27
4.1.3. Ionáram mérések RyR1-csatornákon	27
4.1.4. ATP-áz aktivitás mérése	
4.1.5. Vázizom kontraktilitásának mérése	
4.2. Parotis acinus sejtek vizsgálatára alkalmazott módszerek	
4.2.1. Parotis acinus sejtek izolálása	
4.2.2. Immuncitokémia	
4.2.3. Immunhisztokémia	
4.2.4. Az acinus sejtek BODIPY FL ouabain jelölése	
4.2.5. Ionáramok mérése parotis acinus sejteken	
4.2.6. Ca <sup>2+</sup> -felszabadítás fotolízis segítségével	
5. Eredmények	
5.1. Vázizmon nyert eredmények	
5.1.1. Koffein hatása a Ca <sup>2+</sup> -felszabadulásra HSR vezikulán	
5.1.2. Klorokrezolok hatása a Ca <sup>2+</sup> -felszabadulásra HSR vezikulán	

# Tartalomjegyzék

5.1.3. Klorokrezolok hatása a SERCA ATP-áz aktivitására	.41
5.1.4. 4-COC hatása az izolált RyR1 csatorna áramára	.42
5.1.5. 4-COC által kiváltott kontraktúra	.43
5.2. Parotis sejteken nyert eredmények	.45
5.2.1. Ca <sup>2+</sup> -függő K <sup>+</sup> -áram analízise	.45
5.2.2. A Ca <sup>2+</sup> -függő K <sup>+</sup> - és Cl <sup>-</sup> -csatornák apiko-bazális lokalizációja	.46
5.2.3. A Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -pumpa apiko-bazális lokalizációja	.52
5.2.4. Az apikális membrán relatív nagyságának meghatározása	.55
5.2.5. Az új nyálszekréciós modell	.56
6. Megbeszélés	.58
6.1. Klorokrezolok hatásának elemzése vázizomban	.58
6.2. A nyálelválasztás mechanizmusa parotis acinus sejteken	.59
7/a. Összefoglalás	.62
7/b. Summary	.63
8. Irodalomjegyzék	.64
9. Tárgyszavak	.71
10. Köszönetnyilvánítás	.72
11. Függelék	.73
11.1. 4-chloro-orto-cresol activates ryanodine receptor more selectively and potens than 4-chloro-meta-cresol	.74
11.2. New saliva secretion model based on the expression of Na+-K+ pump and K+ channels in the apical membrane of parotid acinar cells	.80

# Rövidítésjegyzék

Ach acetil-kolin

ANO1, TMEM16A anoctamin cssatornák

ATP adenozin-trifoszfát

BEST bestrophin

BME sejttenyésztő médium

BODIPY FL 4,4-difluor-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacén-3-propionsav

cAMP ciklikus adenozin-monofoszfát

CGRP kalcitonin gén rokon peptid

4-COC 4-kloro-*orto*-krezol

4-CMC 4-kloro-meta-krezol

3-CPC 3-kloro-para-krezol

DAG diacil-glicerin

DICR depolarizáció indukált kalcium felszabadulás

DHP dihidropiridin

ER endoplazmatikus retikulum

EGTA etilénglikol-tetraecetsav

HEPES 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-yl]etánszulfonsav

HSRV nehéz SR vezikula

IP3 inozitol-trifoszfát

LSRV könnyű SR vezikula

MH malignus hyperthermia

MOPS 3 (N-morfológ) propánszulfansav

NADH nikotinamid-adenin-dinukleotid

Po nyitvatartási valószínűség

PBS foszfáttal pufferolt sóoldat

PLC foszfolipáz C

PIP2 foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát

PKA cAMP-dependes protein kináz

PCLAMP patch-clamp szoftver

RyR rianodin-receptor

SR szarkoplazmatikus retikulum

SERCA szarkoplazmatikus retikulum kalcium pumpa SP P-anyag SK4 kalcium-függő kálium csatorna SMEM szelektív minimál essential médium T-tubulus transzverzális tubulus TnC troponin C TJ tight junction VIP vaso intestinális peptid ZO zonula ocludens

#### 1. Bevezetés

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

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

#### 2. Irodalmi áttekintés

#### 2.1. Vázizom

#### 2.1.1. A vázizom szerkezete és működése

A vázizomzat szöveti egysége az izomrost, melyeknek harántcsíkolatát a myofibrillumok jellegzetes felépítése okozza. Az izomrost közös sejthártyával körülvett sokmagvú struktúra, amely lényegében az osztódások során szét nem vált sejtek közössége. A myofibrillumok közötti rést az izomrostok sejtplazmája, a szarkoplazma tölti ki. Az izomrostot körülvevő sejthártya a szarkolemma, melynek döntő szerepe van az izomkontrakciót létrehozó ingerület átvitelében. Az izom intracelluláris membrán rendszere az SR, mely longitudinális tubulusokból és terminális ciszternákból áll. A terminális ciszternákban, mint Ca<sup>2+</sup>-raktárakban a Ca<sup>2+</sup> részben kalszekvesztrinhez kötve, részben szabadon helyezkedik el. A szarkolemmáról az izomrost belsejébe az ingerületet a szarkolemma betűrődéseként értelmezhető transzverzális tubulusok (T-tubulus) mentén jut el. A T-tubulus mindkét oldalán egy-egy a szarkoplazmatikus retikulumhoz tartozó terminális ciszterna helyezkedik el, ezt hármas egységet TTC junkciónak vagy triádnak nevezzük.

A vázizom működését szabályozó [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> változásokban résztvevő mechanizmusokat az általam szerkesztett 1. ábrán szemléltetem.



1. ábra. A vázizom excitációs-kontrakciós kapcsolata

Fiziológiás körélmények között a vázizom kontrakcióját a szarkolemmán tovaterjedő akciós potenciál váltja ki. A depolarizációt a T-tubulus membránján haladó akciós potenciál juttatja az izomrost belsejébe, ahol a T-tubulusok membránjában helyet foglaló dihidropiridin (DHP) receptorok konformáció változását váltja ki. Ez a konformáció változás megnyitja az SR terminális ciszterna membránjában elhelyezkedő RyR1 receptort, melyen keresztül a Ca<sup>2+</sup> az SR terminális ciszternaiból az intracelluláris térbe jut. Ennek következtében megemelkedik a citoplazmában a Ca<sup>2+</sup>-koncentráció. A felszabadult Ca<sup>2+</sup> a troponin C (TnC) alegységhez kötődve elindítja az izom összehúzódását. A jelátvitelt tehát a felszíni membrán és az SR membrán között a feszültségszenzorként működő DHP receptor és az SR membránjában lévő RyR1 közötti közvetlen kommunikáció biztosítja [1-3].

A felszíni membrán depolarizációja és az izomkontrakció között eltelt latenciaidő alatt végbemenő történések összességét nevezzük elektromechanikai csatolásnak. Ez idő alatt a szarkolemma depolarizációját követően a Ca<sup>2+</sup> az intracelluláris tárolóhelyekből felszabadul - némi egyszerűsítéssel, az akciós potenciál Ca<sup>2+</sup>-jellé alakul. Az

elektromechanikai kapcsolat és a Ca<sup>2+</sup>-felszabadulás szerkezeti alapegységének (calcium release unit, CRU) tekintjük az egymással csoportosan elhelyezkedő DHP receptor - RyR1 komplexeket. Elektronmikroszkópos képeken a RyR1 homotetramer szerkezetű, melynek aminosavláncai a triád T-tubulus irányába nyúlnak - e képleteket nevezzük "foot-régiónak". A lábak áthidalják az SR és a T-tubulus közötti kb. 12 nm széles rést és párhuzamos sorokban helyezkednek el úgy, hogy minden második RyR1 csatornakomplexszel szemben helyezkedik el egy-egy DHP receptor [4-7]. Fenti térbeli viszonynak köszönhetően a vázizom elektromechanikai kapcsolata direkt mechanikai csatolással működik, ezt nevezzük depolarizáció indukálta Ca<sup>2+</sup>-felszabadulásnak (DICR) [8-10]. Kísérletek igazolták, hogy a DHP receptor  $\alpha$  alegységének II és III doménje között található citoplazmatikus hurok fontos szerepet tölt be a RyR1-re irányúló jelátvitelben, így az alegység ezen része tekinthető a közvetlen mechanikai kapcsolatnak a DHP receptor és a RyR1 megfelelő szakasza (Leu-922-Asp1112) között [11-12].

A magas intracelluláris Ca<sup>2+</sup>-szint azáltal váltja ki az izom összehúzódását, hogy a Ca<sup>2+</sup> a troponin C-hez kötődve konformáció változást idéz elő, lehetővé téve a kontraktilis elemek: a miozint tartalmazó vastag és az aktinból, tropomiozinból és troponinból felépülő vékony filamentumok kölcsönhatását. Nyugvó izomban a troponin I alegysége erősen rögzül az aktinhoz, a tropomiozin pedig lefedi azokat a helyeket, ahol a miozinfejek az aktinhoz képesek kötődni. Így a troponin-tropomiozin komplex gátolja az aktin és a miozin kapcsolódását. Amikor a depolarizáció hatására felszabadult Ca<sup>2+</sup> a troponin C-hez kötődik, meggyengül a troponin I kötődése az aktinhoz, és ez lehetővé teszi, hogy a tropomiozin az aktin alegységeken oldalirányában elmozduljon. Ezzel szabaddá válnak az aktin miozinfejre specifikus kötőhelyei, így az aktin és a miozin között keresztkötések alakulhatnak ki, mely a két filamentum egymáson történő elcsúszásához vezet (csúszófilamentum-elmélet) és végül létrejön az izomösszehúzódás [13].

Relaxációkor a RyR1 záródása után az SR longitudinális elemeinek membránjában található aktív Ca<sup>2+</sup>-pumpa (SERCA) juttatja vissza a Ca<sup>2+</sup>-ot az SR belsejébe. Itt a Ca<sup>2+</sup> jelentős része egy kalszekvesztrin nevű Ca<sup>2+</sup>-kötő fehérjéhez kapcsolódik, mely nagy kapacitással, de kis affinitással köti a Ca<sup>2+</sup>-ot, tehát Ca<sup>2+</sup>-puffer szerepet tölt be. A  $[Ca^{2+}]_i$  csökkenése miatt a Ca<sup>2+</sup> leválik a troponin C-ről, a miozin és az aktin közötti kapcsolat megszűnik, és az izom elernyed [13].

# 2.1.2. A rianodin receptor fiziológiája és patológiája

Emlősökben a rianodin receptor három izoformáját azonosították, így létezik a vázizom (RyR1), a szívizom (RyR2) és az agy-típusú (RyR3) receptor. A különböző izoformák szekvenciája 70%-os homológiát mutat. A vázizom SR Ca<sup>2+</sup> csatornája, a RyR1, a jelenleg ismert legnagyobb méretű ioncsatorna. A csatorna négylevelű lóhere alakú, 22-27 nm nagyságú homotetramer, mely nagy affinitással (Kd: kb. 2 nM) köti a rianodin nevű növényi alkaloidot (ezért nevezzük rianodin receptornak). A RyR1 monomer móltömege 565 kDa, szedimentációs koefficiense 30S és kb. 5400 aminosavból áll. A négy monomer egy alacsony szelektivitású de nagy vezetőképességű kationcsatornát hoz létre, amelynek Ca<sup>2+</sup>-ra számított konduktanciája 172 pS. Az ionvezető pórust alkotó struktúrák segítséget nyújtanak azonosításához a már részletesen feltérképezett  $K^+$ csatornadoménekkel homológ rianodin receptor szekvenciák. A fehérje amino-terminálisa egy nagy citoplazmatikus régiót hoz létre, amit az elektronmikroszkópos képeken is megfigyelhető foot-régiónak felel meg [14]. A RyR1 háromdimenziós képe cryoelektronmikroszkópos felvételek segítségével készült (2. ábra) [15].



#### 2. ábra. A rianodin receptor szerkezete [16]

Ezeken a nagyfelbontású képeken a citoplazmatikus vagy "foot" régió (zöld) 12 nm magas és alegységenként 12 globuláris doménra különíthető el. A rózsaszínnel jelölt transzmembrán domén rögzíti a RyR1-et az SR membránjában. Az ábrán a hármas sorszámmal a legnagyobb domén van jelölve, amit fülnek ("handle") neveztek el. Az 5-10 számú domének a sarkok csúcsait építik fel, amit kapocs ("clamps") hívunk. A RyR1 finomszerkezetének feltérképezése mellett a módszer lehetővé teszi a csatorna kapuzásához köthető morfológiai változások vizsgálatát és az egyes szabályozó fehérjék kötőhelyeinek térképezését is. A RyR1 zárt, illetve nyitott állapotáról készült háromdimenziós képek tanúsága szerint a RyR1 megnyílásakor egyes kapocs-domének kiemelkednek a többi közül, gyengül a 9-es és a 10-es közötti kapcsolat, a TM régió kicsit megnyúlik, oszlopszerű doménjai szétállnak, és néhány fokkal elfordulnak a citoplazmatikus részhez képest [15, 16].

A humán RyR1 citoplazmatikus N-terminális régiója több, genetikailag öröklődő mutációt is hordozhat. Klinikai szempontból a malignus hyperthermia jelentős, mely kialakulásáért a 19-es kromoszóma hosszú karján elhelyezkedő RyR1 több pontmutációja tehető felelőssé [17-20]. A mutációk miatt (pl: Arg163Cys, Gly248Arg, Gly341Arg, Tyr522Ser, Arg614Cys, Gly2433Arg) a mutációkat homozigóta formában hordozó betegek izomrostjainak Ca<sup>2+</sup>-indukált Ca<sup>2+</sup>-felszabadulása rendellenes, mert a kóros RyR1 és az egészséges csatornák Ca<sup>2+</sup>-függő aktiválódásának érzékenysége eltér [21-24]. A mutációk miatt módosul a RyR1 koffeinnel és az altatószerként széles körben használt halotánnal szemben mutatott érzékenysége is [25]. A terápiás koncentrációban alkalmazott halotán hatására is megnyíló kóros RyR1 miatt jelentősen megnő a citoplazmatikus Ca2+-szint, ami kontrollálatlan feszülésnövekedést, kontraktúrát okoz. A teljes vázizomzatra kiterjedő izomgörcsök miatt testszerte megnő a hőtermelés, ami malignus hyperthermiában manifesztálódik. Ezzel párhuzamosan megnő az aerob és glikolítikus metabolizmus intenzitása, ami metabolikus és respiratorikus acidózist okoz, továbbá hiperkalémia és aritmia is fellép [17, 26-29]. Izomrelaxáns (dantrolen) alkalmazása nélkül a folyamat végzetes kimenetelű [30]. A műtéti kockázat csökkentése céljából malignus hyperthermiagyanús betegek in vitro szűrésére használható a koffein, mivel a mutáns receptorok koffeinnel szemben mutatott érzékenysége fokozott [31].

A RyR1 ioncsatorna szelektivitását az egyes ionokra vonatkozó relatív permeabilitása jellemzi. A RyR1 a Ca<sup>2+</sup>-on kívül más élettanilag fontos kationokra is permeábilis. A monovalens szervetlen kationokra vonatkozó permeabilitása alig különbözik egymástól, míg jelentős szelektivitás mutatható ki a kétértékű kationok javára,

melyek között csekély különbséget találunk permeabilitás szempontjából [32, 33]. Ennek a bivalensek közötti viszonylag alacsony szelektivitásnak *in vivo* nincs különösebb jelentősége, mert a Ca<sup>2+</sup>-felszabadulás során kialakuló potenciálkülönbség az SR K<sup>+</sup>- és Cl<sup>-</sup>-csatornáin keresztülfolyó nagymértékű kompenzatórikus áram miatt nem, vagy csak átmenetileg generálódik, így a RyR1-on keresztül nagyrészt Ca<sup>2+</sup> folyik fiziológiás körülmények között [34, 35].

#### 2.1.3. A RyR1 farmakológiája

A RyR működését számos endogén tényező (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, nukleotidok) és exogén tényező (metilxantinok, fenol származékok, ezen belül különösen a krezolok) módosíthatja.

A Ca<sup>2+</sup> a RyR1 legfontosabb természetes regulátora, mivel a RyR1 más ligandjai vagy képtelenek aktiválni Ca<sup>2+</sup> hiányában a csatornát, vagy a maximális hatás kiváltásához Ca<sup>2+</sup>-ot igényelnek. A csatorna nyitvatartási valószínűsége (P<sub>o</sub>) és a Ca<sup>2+</sup>-koncentráció között haranggörbe alakú összefüggés van. Nanomólnyi Ca<sup>2+</sup>-koncentrációnál a P<sub>o</sub> közel nulla. A citoszolikus Ca<sup>2+</sup> koncentráció 50-100  $\mu$ M-ig aktiválja RyR1-et, míg ennél magasabb Ca<sup>2+</sup>-koncentráció gátolja a csatornát (IC<sub>50</sub> = 300-500  $\mu$ M) [36-38]. A bifázisos hatás azzal magyarázható, hogy a RyR1-nek két Ca<sup>2+</sup> kötőhelye van. Az egyik egy nagy Ca<sup>2+</sup>-affinitású aktivációs kötőhely, míg a másik egy kis affinitású gátló kötőhely. Ca<sup>2+</sup>-ra nézve a csatorna aktivációs és inhibitoros Hill-koefficiense egyaránt 1, ami arra utal, hogy minden egyes RyR1 egy aktivációs és egy inaktivációs kötőhellyel rendelkezik. A Ca<sup>2+</sup>-kötőhelyek a RyR1 citoplazmatikus doménjén helyezkednek el.

A RyR1 nem csak citoplazmatikus, hanem intraluminális oldalról is szabályozható, bár nem bizonyított, hogy a luminális oldalán vannak kötőhelyek. Ez azzal magyarázható, hogy a luminális oldalra adott nagy mennyiségű Ca<sup>2+</sup> a csatornán keresztül a citoplazmatikus oldalra átdiffundál, és ott kifejti hatását a Ca<sup>2+</sup>-kötőhelyekhez kötődve ("feed through" szabályozás). Ennek az elképzelésnek a helyességét az is alátámasztja, hogy RyR1 aktivitásának intraluminális (transz) oldalról, Ca<sup>2+</sup>-mal történő befolyásolása feszültség-függő [39, 40].

A Mg<sup>2+</sup> mikromólos koncentrációban gátolja a kalcium csatorna működését. A Mg<sup>2+</sup> gátló hatása azzal magyarázható, hogy a Mg<sup>2+</sup> a Ca<sup>2+</sup>-kötőhelyekhez kötődve zárja a csatornát [36, 41].

Az adenin-nukleotidok aktiválják a RyR1 csatornát. A leghatékonyabb aktivátornak az ATP bizonyult, hatékonyság szempontjából ezt követi az ADP, AMP és a cAMP. Az adenin-nukleotidokra nézve a csatorna Hill-koefficiense 2, tehát a RyR1-nek két, kooperatív adenin-nukleotid kötőhelye van. A csatorna maximális aktivációjához a Ca<sup>2+</sup> és az ATP szimultán jelenléte szükséges [9, 42].

A metilxantinok közül a koffein növeli a RyR1 nyitvatartási valószínűségét, ezért izomkontraktúrát hoz létre. Po-növelő hatását a Ca<sup>2+</sup>-aktivációs helyek érzékenységének növelésével éri el. Erre utal az is, hogy a 0,5-2 mM-ban alkalmazott koffein µM körüli Ca2+-koncentrációnál váltja ki aktiváló hatását, míg 5-10 mM-os koncentrációban alkalmazva már pikomólos Ca<sup>2+</sup>-koncentrációnál is folyamatosan nyitva tartja a RyR1-et. A többi metilxantin a koffeinhez hasonló hatással rendelkezik. A metilxantinok hatásossági sorrendje a következő: methylxantin > theobromin ~ theophylin > koffein ~ dimethylxantin [42]. Kísérletes körülmények között a legszélesebb körben használt RyR1-agonista a koffein, mely felbecsülhetetlen értékű információt szolgáltatott a RyR1 izomműködésben betöltött szerepéről [43-46]. De a koffein távolról sem ideális kísérleti eszköz az izomműködés szabályozásának vizsgálatára, részben mert az erősen hidrofób molekulát nehéz kimosni és csak nagy (több mM) koncentrációban idéz elő Ca<sup>2+</sup> felszabadulást [47, 48]. Ráadásul szelektivitása sem megfelelő, mivel további hatásokkal is rendelkezik: foszfodieszteráz-gátló tulajdonsága révén növeli a rostban a cAMP szintet, fokozza a myofibrillumok Ca<sup>2+</sup> érzékenységét, megváltoztatja a SERCA, az IP<sub>3</sub> receptorok továbbá számos ioncsatorna működését [49-51].

A fenol származékok nagy szerepet játszanak a gyógyászatban, gyógyszeriparban, kozmetikumok előállításában és festékekben. A legtöbb természetes fenolszármazékot antifungális és antibakteriális hatása miatt alkalmazzák, mint például a timolt és annak szerkezeti analógjait (karvakrol, vanilin, cineol). A timol az aneszteziológiában is megjelenik, mint a halotán tartósító és stabilizáló vegyülete. A kozmetikai iparban és gyógyászatban az eugenolt és ánizsaldehidet kellemes illatuk miatt is alkalmazzák. A timol submillimoláris koncentrációban Ca<sup>2+</sup>-felszabadulást vált ki a vázizomból izolált SR

vezikulumokból. Sárközi és munkatársai a természetes fenol származékok hatását vizsgálták a vázizom SERCA pumpáján és RyR1-én. Eredményeik alapján a timol és a karvakrol gátolta legintenzívebben az SERCA pumpát, míg a RyR1 aktiválásán keresztül koncentráció-függő módon Ca<sup>2+</sup>-felszabadulást indukált a vázizom nehéz SR vezikuláiból. A timol és karvakrol fokozzák a Ca<sup>2+</sup>-csatorna nyitvatartási valószínűségét. A timol jó oldhatósága, a kísérletek ismételhetősége és alacsony hatásos koncentrációja (kd=160  $\mu$ M) miatt, akár ideális RyR1 agonista is lehet [52].

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

A koffein használata által okozott technikai nehézségeket jelentős mértékben kiküszöbölhetjük a koffeinnél sokkal specifikusabb RyR1 agonisták, a klorokezolok alkalmazásával. A klorokrezol molekula egy benzol gyűrűbe szubsztituált hidroxil csoportot, metil csoportot valamint egy klór atomot tartalmaz. Ezek egymáshoz viszonyított pozíciója alapján megkülönböztetjük a 4-kloro-*orto*-krezolt (4-COC), a 4-kloro-*meta*-krezolt (4-CMC), és a 3-kloro-*para*-krezolt (3-CPC) (3. ábra).



3. ábra. Klorokrezol sztereoizomerek szerkezete

Korábbi tanulmányok szerint a 4-CMC, melyet gyógyszerekben tartósítószerként használnak, növeli a triciált rianodin kötődését a nehéz SR vezikulumokhoz, azokból Ca<sup>2+</sup>-

felszabadulást vált ki és növeli a RyR1 csatornák nyitvatartási valószínűségét, valamint hatékonyan gátolja az SR Ca<sup>2+</sup> ATP-ázt [53-55]. A 3-CPC és a 4-COC szelektivitása RyR1en és a SERCA pumpán mindeddig tisztázatlan, bár arra találtam adatot, hogy a 4-CMC gátolja a SERCA működését [56]. Az eltérő molekulaszerkezetek alapján várható, hogy a különböző szerkezetű klorokrezolok eltérő mértékben stimulálják a RyR1-et illetve gátolják a SERCA-t, továbbá különbség lehet a vegyületek szelektivitásában is. Kísérleteink célja ezen különbségek feltárása volt, ami lehetővé teszi a leghatékonyabb és legszelektívebb RyR1 agonista kiválasztását.

# 2.1.4. Az SR Ca<sup>2+</sup> pumpa működése

Az SR-be a felszabadult Ca<sup>2+</sup>-ot egy aktív transzportfolyamat juttatja vissza. A SERCA működése során – a többi P-típusú ATP-ázhoz hasonlóan - az egyik legfontosabb lépés az enzim foszforilálása, amely egy átmeneti E<sub>1</sub>-E<sub>2</sub> konformációváltozáshoz vezet. Egy ATP hidrolízise kapcsán az E<sub>1</sub>-konformációs állapotú fehérje két Ca<sup>2+</sup>-ot juttat az SR longitudinális tubulusába. Ezt követően a Ca<sup>2+</sup>-ot kötött fehérje Mg<sup>2+</sup> jelenlétében ATP-t hidrolízál, mely során a pumpafehérje foszforilálódik, ezen folyamat stabilizálja a pumpa E<sub>2</sub> konformációs állapotát. A SERCA a nagy affinitású Ca<sup>2+</sup>-transzportrendszerekhez tartozik (K<sub>m</sub> kb. 400 nM), emiatt a pumpa aktivitása Ca<sup>2+</sup>- függő, amelynek koncentráció-optimuma 2  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup> körül van. A SERCA molekula modelljén 3 fő régió különíthető el: (1) a citoplazmatikus oldalon elhelyezkedő feji rész, mely az ATP-kötő, a foszforilációs, és az ún. energia transzdukciós domént hordozza, (2) az intramembrán régió, mely 10 transzmembrán hélixből áll, és (3) a penta-helikális szár, ami összeköti a feji részt és az intramembrán szegmentumot. E két utóbbi részen Ca<sup>2+</sup>-kötőhelyek vannak, amelyek döntő szerepet játszanak a transzport folyamatban, valamint annak szabályozásában.

# 2. 2. Nyálmirigy

# 2.2.1. Nyálmirigyek általános szerkezete, felépítése, szövettana

A nyálmirigyek olyan exokrin mirigyek, melyek kivezető csövei a szájüregbe nyílnak és a szájüregbe vezetik a hipozmotikus nyálat. A nyálnak számos fontos funkciója van: glikoprotein tartalma miatt a szájnyálkahártyát nedvesen tartja, ami elengedhetetlen a rágáshoz, a nyelési folyamatokhoz és a beszédhez. Továbbá antibakteriális hatású az IgAantitesteknek és a lizozimnek köszönhetően. Embernél amilázt tartalmaz, mely a táplálék poliszacharidjait bontja. A nyál kalciumkötő fehérjéi védő bevonatot képeznek a fogakon. Méret szerint megkülönböztetünk kis és nagy nyálmirigyeket. A kis nyálmirigyek elszórtan a submucosában helyezkednek el (pl. glandulae labiales, glandulae palatinal stb.). A nagy nyálmirigyeket három pár mirigy alkotja: a fültőmirigy (glandula parotidea), a nyelv alatti mirigy (glandula sublingualis) és az állkapocs alatti mirigy (glandula submandibularis). A nyálmirigyek ectodermális eredetűek. A hámsejtek proliferációjával alakulnak ki a mirigyvégkamrák (acinusok) és azok kivezető csövei (ductus rendszer). Végül a proliferálódó sejtköteg benyomul a mesenchymába, amely a mirigy parenchymáját lebenyenyekre osztja. Így alakul ki az interstitium, amely egy ereket és idegeket tartalmazó laza kötőszövet. A szekréciós egység alapja a salivon, aminek komponensei: ductus excretorius, tubulus salivalis, tubulus intercalaris és az acinus. Az acinusok szekréciós tulajdonsága alapján csoportosíthatjuk a nagy nyálmirigyeket megkülönböztetve a serosus, mucinosus, valamint a kevert típusú mirigyeket. A serosus végkamra sejtjei fehérjetermelő sejtek. A végkamra gömb alakú, lumene szűk, falát piramis alakú köbhámsejtek alkotják. A sejtmag középen helyezkedik el, a sejt lumen felőli oldalán szekréciós granulumok helyezkednek el. A parotis a termelt szekrétum alapján tisztán serosus nyálmirigy [57].

# 2.2.2. A parotis acinus sejtjeinek struktúrája

A parotis piramis alakú serosus acinus sejtjei szerkezetileg és funkcionálisan is polarizáltak. Tevékenységük eredménye a primer nyál. A mikroszkóp alatt áteső fényben készült felvételen jól látszik a sejtek polarizáltsága (4.A ábra).



4. ábra. Parotisból izolált natív acinus sejtek fénymikroszkóp alatt (A) és immunfluoreszcens festést követően konfokális mikroszkóp alatt (B) [58]

A polarizáltság eredményeként - hasonlóan a legtöbb mirigyhez - az acinus sejtek membránja is két részre osztható. A sejt lumen felé tekintő kisebb felszínnel rendelkező része az apikális (luminális) membrán, ahol a szekrétummal telt vezikulák helyezkednek el. A folyadék és enzimszekréció a luminális membránon keresztül a lumen felé történik. A sejt lamina bazális felé tekintő relatíve szélesebb része a basolaterális membrán. Az apikális membrán kiterjedése korábbi becslések szerint a teljes membránfelszín aránylag kis részét teszi ki. A polarizált szerkezet következménye, hogy a sejtorganellumok elhelyezkedése is aszimmetrikus a sejten belül. Ezt jól szemlélteti a 4.B ábrán fluoreszcensen jelölt sejtalkotókról készült konfokális mikroszkópos felvétel, ahol a sejtmagok a DNS-t specifikusan kötő Hoechst-fluoreszcens kékkel jelölődtek. A magok középen, vagy a bazolaterális oldalhoz közel helyezkednek el. Pirossal az apikális

membránhoz közeli szekréciós granulumok láthatók. Festésük LysoTracker fluoreszcens festékkel történt, mely savas organellumok megfestésére alkalmas, míg a plazmamembránt FM-143 membrán specifikus zöld fluoreszcens festék tette láthatóvá [58].

A polarizált szerkezetű acinus sejtek funkcionálisan is polarizáltak, ami azt jelenti, hogy a transzporterek és ioncsatornák elhelyezkedése is eltérő a bazolaterális és az apikális membránon. A nyálmirigyek acinus sejtjei állítják elő a primer nyálat, mely izozmotikus folyadék. A folyadék- és enzimszekréció az apikális membránon keresztül történik. Az acinus sejtek közötti mechanikus kapcsolatért a *zonula ocludens* (ZO) a felelős, más néven tight junction (TJ) sejtkapcsoló struktúra. A TJ az apikális membrán közelében található, szinte övszerűen helyezkedik el a sejten. A TJ a sejtek közötti kapcsolaton túl szerepet játszik a membránfehérjék laterális diffúziójának a megakadályozásában, megtartva az acinus sejtek polarizált felépítését [59, 60]. Továbbá a TJ paracelluláris barrierként is fontos szereppel bír, mivel így tartja fent a transzepiteliális koncentráció grádienst, ami elengedhetetlen a membrántranszport folyamatokhoz [61].

# 2.2.3. A nyálszekréció szabályozása

A nyálelválasztás folyamata kizárólag neurális szabályozás alatt áll. A nyálelválasztás két reflexfolyamat eredménye. A feltétlen nyálelválasztási reflex egy olyan veleszületett reflex, amelyet az íz- és mechanoreceptorok ingerlése, orrnyálkahártyában elhelyezkedő szagérző receptorok ingerlése és a beszéd vált ki. A feltételes reflex tanult, melyet Pavlov kutyán végzett kísérlete bizonyít. A nyálelválasztás központja az agytörzsben van, a feltétlen reflexe itt csatolódik át az efferens pályákra (*nervus facialis és nervus glossopharyngeus*). Az acinus sejteket paraszimpatikus és szimpatikus posztganglionáris rostok idegzik be. A paraszimpatikus kolinerg rostok fontos szerepet játszanak az acinusok beidegzésében. A reflex a paraszimpatikus posztglanglionáris rostok idegvégződéseiből acetil-kolint (ACh), P-anyagot (SP) és vazoaktív intestinális peptidet (VIP) szabadít fel. Az ACh M<sub>3</sub> típusú ACh-receptorhoz kapcsolódik, ami az acinus sejtek bazolaterális membránjában található [62, 63]. A receptor aktivációját követően a G-fehérje  $\alpha$ -alegysége aktiválja a foszfolipáz C-t (PLC), mely a sejtmembránban elhelyezkedő, a foszfatidil-inozol-4,5-bifoszfátot (PIP<sub>2</sub>) diacil-glicerinre (DAG) és inozitol-1,4,5-

trifoszfátra (IP<sub>3</sub>) hidrolizálja. Az IP<sub>3</sub>, mint másodlagos hírvivő az endoplazmás retikulumon (ER) lévő IP<sub>3</sub> receptorhoz kapcsolódva Ca<sup>2+</sup> felszabadulást eredményez [64-66]. Az ionmozgásokat a nyálmirigy acinus sejtekben bekövetkező paraszimpatikus stimuláció hatására megnövekvő intracelluláris Ca<sup>2+</sup> koncentráció indítja be, mely során megnyílnak az acinus sejt luminális régiójában elhelyezkedő Ca<sup>2+</sup>-függő Cl<sup>-</sup>-csatornák [66-70].

A primer nyál keletkezésénél a Ca<sup>2+</sup> szignalizációnak döntő szerepe van, melyet a nyálmirigy acinus sejtekben paraszimpatikus stimuláció hatására megnövekvő intracelluláris Ca<sup>2+</sup> koncentráció indít be azáltal, hogy megnyitja az acinus sejt apikális régiójában elhelyezkedő Ca<sup>2+</sup>-függő Cl<sup>-</sup>-csatornákat [71-74]. Mivel az acinus sejtek Cl<sup>-</sup> koncentrációja megnő, a Cl<sup>-</sup> a gradiense mentén a lumináris plazmamembrán ioncsatornáján keresztül a lumenbe kerül [75-77]. Eddig számos olyan transzmembrán fehérjét azonosítottak, melyek Cl<sup>-</sup> -csatornaként is működnek. Ilyenek a bestrophin (BEST1, BEST2, BEST3, BEST4) és bizonyos anoctamin csatornák (TMEM16A vagy ANO1) [78-84]. Az említett Cl<sup>-</sup>-transzporterek nyálmirigyben való megjelenése között jellegzetes eltérések figyelhetőek meg. Például a TMEM16A-ként és Best2-ként azonosított Cl<sup>-</sup>csatorna legnagyobb mértékben a *glandula submandibularis* acinus sejtjeiben expresszálódik [81].

A szabályozás lényeges eleme, hogy a sejtorganellumok  $Ca^{2+}$  leadása pulzáló jellegű és a stimulált sejt szabad  $Ca^{2+}$ -koncentrációja oszcillál [85, 86]. A  $Ca^{2+}$  oszcillációja egy korábbi modell szerint a sejtvolumen oszcillációjától függ [87]. Újabb feltételezések szerint valószínűtlennek tűnik, hogy a parotis acinus sejteknek szüksége lenne arra, hogy a sejtvolumen változzon ahhoz, hogy  $Ca^{2+}$ -koncentráció-változást mutasson. Ezért inkább az IP<sub>3</sub> metabolizmusához kapcsolt feedbacket teszik felelőssé az intracelluláris  $Ca^{2+}$ - szint változásáért [88]. Pszichés izgalmak esetén a szimpatikus válasz az erősebb, mely az acinus sejtek  $\beta_2$ -receptorainak ingerlésével fokozza a fehérjeszekréciót. Az  $\alpha_1$ -adrenerg receptorokon keresztül az inger vazokonstrikciót okoz, így csökken a mirigy vérellátottsága, melynek következtében folyadék szekréció is csökken. Az említett következmények hatására a kiválasztott nyál sűrűbb és viszkózusosabbá válik. Ilyenkor a  $\beta_2$ -adrenerg receptorok stimulációja adenilát-cikláz aktiváláshoz és a következményes ciklikus adenozinmonofoszfát (cAMP) szint növekedéséhez vezet. A cAMP szint növekedése a protein-kináz A-t (PKA) aktiválja, amely egy foszforilációs mechanizmus

által kiváltja a szekretoros granulumok exocitózisát, illetve a fehérje termelést. Az IP<sub>3</sub> receptort a PKA foszforillája ezzel megnöveli a receptor érzékenységét, a növekedett Ca<sup>2+</sup>-koncentráció pedig a Ca<sup>2+</sup>-szenzitív adenilát-cikláz által megnöveli a cAMP-szintet. A cAMP szint növekedésével hatnak más neuropeptidek is, pl. a VIP és a CGRP (kalcitonin gén rokon peptid), melyek hatásmechanizmusához is szükség van a cAMP-re [89]. A parotis serosus sejtjeiben az α-amiláz, a glikoprotein és a kalciumot kötő fehérjék granulomokban raktározódnak, melyből exocytozissal kerülnek a lumenbe [90]. A parotisban paraszimpatikus és szimpatikus stimuláció hatására is megemelkedik a sejt Ca<sup>2+</sup>-koncentrációja. Tehát β-adrenerg és kolinerg receptor agonista hatására is fokozódik az exocytosis is, legfőbbképpen az α-amiláz szekréciója [91, 92].

## 2.2.4. A klasszikus nyálszekréciós modell

Az általam rajzolt 5. ábrán bemutatott nyálszekréciót leíró jelenlegi modell szerint a folyadékszekréció hajtóerejét az acinus sejtek basolaterális membránjában elhelyezkedő Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pumpa illetve az általa felépített Na<sup>+</sup> -gradiens adja, amit egyértelműen bizonyít, hogy ouabainnal a nyáltermelés teljes mértékben felfüggeszthető [93-95]. Na<sup>+</sup> gradiens terhére a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> elektroneutrális kotranszporter a bazolaterális membránon keresztül Cl-ot juttat az intracelluláris térbe [96-98]. Azonosítottak egy további bazolaterális kloridfelvételi útvonalat is, mely két antiporter, a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (NHE1) és a Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> csere (AE2) koordinált működésével valósul meg, de ennek jelentősége egyelőre vitatott [99-100]. A modell szerint csak az intracelluláris Cl<sup>-</sup> koncentráció emelkedik meg, mert a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> transzporter által bevitt Na<sup>+</sup> és K<sup>+</sup> gyakorlatilag körforgást végeznek a bazolaterális membránon keresztül. A belépő Na<sup>+</sup>-ot a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pumpa távolítja el, míg a K<sup>+</sup> K<sup>+</sup>-csatornákon keresztül távozik -mindkettő a bazolaterális membránon keresztül. A Cl<sup>-</sup> a luminális membránban lévő Ca<sup>2+</sup>-függő Cl<sup>-</sup> csatornákon elektrokémiai gradiense irányába az acinus lumenébe áramlik, ennek következtében az acinus sejt lumene elektronegatívvá válik, ezért elektromos gradienst hoz létre a Na<sup>+</sup>-ok számára [101]. A primer szekrétum kialakulása során az interstitiumból Na<sup>+</sup> lép a lumenbe paracelluláris útvonalon. Az acinus lumenében ily módon belépő Cl<sup>-</sup>- és Na<sup>+</sup>-ok paracelluláris vízbeáramlást indukának, így a primer nyál izozmotikus lesz [102]. A modell lényeges eleme, hogy a sejtbe különböző

mechanizmusok segítségével belépő K<sup>+</sup> a pumpával azonos, azaz a bazolaterális oldalon, konduktív K<sup>+</sup>-csatornákon keresztül hagyja el a sejtet.



5. ábra. A klasszikus nyálszekréciós modell

A folyamat során a Cl<sup>-</sup> számára az elektrokémiai hajtóerő állandó, mivel a Ca<sup>2+</sup>-függő K<sup>+</sup>csatornák (K<sub>Ca2+</sub>) ellenárama folyamatosan biztosítja a negatív membránpotenciált. A K<sup>+</sup> legalább kétféle K<sup>+</sup>-csatornán keresztül juthat vissza az interstitiumba: a nagy konduktanciájú K<sub>Ca2+</sub> (BK, KCa1.1) valamint a közepes konduktanciájú SK4 csatornán (KCa3.1, "Gárdos channel") át. Az SK4 Ca<sup>2+</sup>-függő K<sup>+</sup>-csatorna, a BK pedig Ca<sup>2+</sup> és feszültség-függő módon is szabályozott [103, 104]. A nyálszekréció során a Ca<sup>2+</sup>-függő K<sup>+</sup>-csatornák szerepe tehát az, hogy a Cl<sup>-</sup> számára állandó elektrokémiai hajtóerőt biztosítson, így a K<sub>Ca2+</sub> ellenárama folyamatosan fenntartja a negatív membránpotenciált. A K<sup>+</sup>-okat Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATP-áz pumpálja vissza az acinus sejtbe. A K<sub>Ca2+</sub>-nak fontos szerepére utal, hogy a folyadékszekréciós folyamat a K<sub>Ca2+</sub> csatorna gátló paxillinnel valamint ouabainnal is felfüggeszthető. Fentiek értelmében a Ca<sup>2+</sup>-függő szekréció szabályozás azon alapszik, hogy az intracelluláris Ca<sup>2+</sup>-koncentráció növekedése a folyamatos szekrécióhoz szükséges Cl<sup>-</sup> és K<sup>+</sup> és csatornákat egyaránt megnyitja. Korábbi kutatási eredmények szerint a K<sub>Ca2+</sub> csatornák a sejtek bazolaterális membránjában foglalnak helyet. A jelenlegi nyálszekréciós modell ezzel magyarázza, hogy a primer nyál K<sup>+</sup>-ban szegény, és a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATP-ázt a K<sub>Ca2+</sub> csatornával megegyező helyre, a bazolaterális membránba helyezi [99, 105-107]. Dolgozatomban bemutatott eredményeink ezt a klasszikus nyálszekréciós modellt kérdőjelezik meg, mivel jelentős mennyiségű K<sub>Ca2+</sub> csatorna és Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pumpa funkcionális jelenlétét bizonyítják a *luminális* membránban. A transzport fehérjék morfológiai- és funkcionális vizsgálatával kapott eredményeink alapján egy új nyálszekréciós modellt készítettünk.

#### 3. Célkitűzések

A vázizmon végzett kísérleteink során a három vizsgált klorokrezolnak a RyR1 csatornára és a SERCA pumpára irányuló hatását kvantitatív módon hasonlítottuk össze abból a célból, hogy kiválasszuk a RyR1-re ható legszektívebb agonistát. Korábban említett klorokrezol sztereoizomerek különböző molekulaszerkezete miatt feltételezhető, hogy eltérő mértékben stimulálják a RyR1-et illetve gátolják a SERCA-t, továbbá különbség lehet a vegyületek szelektivitásában is. Kísérleteink célja ezen különbségek feltárása volt, ami lehetővé teszi a leghatékonyabb és legszelektívebb RyR1 agonista kiválasztását. Ehhez lipid kettősrétegbe ágyazott RyR1 receptorokon ionáramokat mértünk, SR-ből izolált nehéz és könnyű membránvezikulákon Ca<sup>2+</sup>-transzport kísérleteket és *ex vivo* vázizom kísérleteket végeztünk.

A nyálmirigy acinus sejtjein végzett méréseink korábbi tájékozódó kísérletek eredményeire épülnek, amelyek alapján joggal feltételezhettük, hogy a jelenleg kanonikusan elfogadott nyálszekréciós mechanizmus szorul. pontosításra Munkacsoportunk korábbi mérései szerint a K<sup>+</sup> csatornák parotis acinussejteken főleg a luminális membránban helyezkednek el. Ez minden bizonnyal jelentős luminális K+ szekréciót eredményez. Ennek ellenére a primer nyál K<sup>+</sup> koncentrációja viszonylag alacsony, ami felveti annak lehetőségét, hogy a K<sup>+</sup> a Na/K pumpa segítségével a luminális oldalon reabszorbeálódik. Ez az eredmény arra utal, hogy a kálicum függő kálium csatornák is az apikális membránban helyezkednek el. Munkám során fluoreszcens mikroszkópos módszerekkel azt vizsgáltam, hogy a lumináris oldalon is helyezkednek e el Na/K pumpák. Ezt a pontosítást tűztem ki célul az acinus sejteken végzett elekrofiziológiai és morfológiai kísérleteinkben.

#### 4. Módszerek

# 4.1. A vázizom Ca<sup>2+</sup> transzportereinek vizsgálatára alkalmazott módszerek

## 4.1.1. SR mikroszóma preparátumok készítése nyúl vázizomból

Az SR terminális ciszternáit tartalmazó mikroszóma frakciót (nehéz SR vezikulumok, HSRV) és a longitudinális tubulusok vezikulumait (könnyű SR vezikulumok, LSRV) nyúl vázizomból izoláltuk differenciál centrifugálás segítségével [52]. Az LSRV SERCA pumpát, míg a HSRV RyR-t és SERCA pumpát egyaránt tartalmaz. A preparálási folyamat minden lépését 4°C-on végeztünk. Az felhasznált oldatokat proteáz inhibitorokkal egészítettük ki (200 µM pefabloc SC, 0,1 µM aprotinin, 1 µM leupeptin, 0,2 µM pepstatin-A, 500 µM benzamidin). Az izmot 450 ml pufferben (100 mM NaCl, 20 mM EGTA, 20 mM Na-HEPES) homogenizáltuk, amelynek pH-ja 7,4 volt. Ezt követően a sejttörmelék eltávolítása céljából egy centrifugálást alkalmaztunk 3500 x g fordulaton 35 percig egy kilendülő karos rotorral rendelkező asztali centrifuga segítségével. A felülúszót tovább centrifugáltuk 30 percig 40000 x g fordulaton egy Ti45 típusú rotorban. A nyers mikroszómákat tartalmazó pelletet reszuszpendáltuk 600 mM KCl, 10 mM K-PIPES, 250 mM sucrose, 1 mM EGTA, 0,9 mM CaCl<sub>2</sub>-ot tartalmazó oldatban (pH=7,0), majd 1 órán keresztül hidegszobában tároltuk. Az így kapott mikroszóma szuszpenziót 109000 x g fordulatszámon 30 percig centrifugáltuk. A pelletet reszuszpendálás után egy 20-45%-os lineáris sucrose gradiensre (105 mM NaCl, 10 mM PIPES, 0,1 mM EGTA, 0,09 mM CaCl<sub>2</sub>, pH=7,0) rétegeztük. Egy éjszakán át tartó centrifugálás után (90000 x g, 16 óra, SW-27 rotor) két látható gyűrűt (LSRV és HSRV) gyűjtöttünk a sucrose gradiens megfelelő (rendre 30-32%-os és 36-38%-os) régióiból. A mikroszómákat 10-szeres térfogatú pufferben (475 mM sucrose, 1 mM NaCl, 10 mM K-PIPES, pH=7,0) mostuk és centrifugálással ismét összegyűjtöttük (124000 x g, 60 perc, Ti45 rotor) A pelletet pufferben (300 mM sucrose, 10 mM K-PIPES, pH=7.0) reszuszpendáltuk. A végső fehérje koncentráció jellemzően 20

mg/ml felett volt. A vezikulákat kiporcióztuk, folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és további felhasználásig -70°C-on tároltuk.



1. Illusztráció: SR mikroszóma preparátumok készítése nyúl vázizomból

#### 4.1.2. Kalcium felszabadulás mérése SR vezikulumokból

A nehéz SR vezikulumokat (mérésenként 0,5 mg fehérje) 1,9 ml, 37°C-os pufferben (92,5 mM KCl, 18,5 mM MOPS, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, és 250 μM antipyrylazo III, pH=7,0), üvegküvettában diszpergáltuk [108]. Az oldat extravezikuláris Ca<sup>2+</sup> tartalmát a metallokróm Ca<sup>2+</sup>-indikátor festék, az antipyrylazo III transzmittanciájának segítségével követtük 710 nm-en egy Spex-Fluoromax típusú spektrofluoriméterrel. A kísérlet elején a nehéz SR vezikulumokat Ca<sup>2+</sup>-mal a SERCA pumpa segítségével megtöltöttük. A vezikulumok Ca<sup>2+</sup>-felvételét megfelelő mennyiségű CaCl<sub>2</sub> hozzáadásával indítottuk el. Miután a Ca<sup>2+</sup>-felvétele befejődött, klorokrzolok különböző dózisaival Ca<sup>2+</sup>-felszabadulást váltottunk ki. Az adatok értékelésekor a felszabaduló Ca<sup>2+</sup> mennyiségét és a Ca<sup>2+</sup> felszabadulás sebességét határoztuk meg. A Ca<sup>2+</sup>-felszabadulás sebességét a görbe kezdeti szakaszának meredeksége adta meg. A transmittancia-értékeket az első 5 adatpont átlagára normalizáltuk. Néhány kísérletben a vezikulumokat ruténium vörössel kezeltük elő a RyR1 folyamatban való részvételének bizonyítása céljából.

#### 4.1.3. Ionáram mérések RyR1-csatornákon

A csatorna aktivitást mesterséges sík lipid kettősrétegbe ágyazott RyR-okon, az ionáram mérésével követtük. A RyR-t nehéz SR vezikulumok sík lipid membránba való fúzionáltatásával építettük be [52]. A kettősréteget egy delrin anyagú csésze (mérőkamra, Warner Instruments Inc., Dixwell Ave, Hamden, Egyesült Államok) falába fúrt, 200 μm átmérőjű lyukon alakítottuk ki, ami így két oldatrészt választott el. A mérőkamra mérőoldatot tartalmazott, amelynek összetétele a következő volt: 50 mM CsCH<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S, 100 μM K<sub>2</sub>H<sub>2</sub>EGTA, 150 μM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM HEPES, pH=7,2. A lipid oldat phosphatidylethanolamint, phosphatidylserint és phosphatidylcholint tartalmazott 5:4:1 arányban és n-dekánban volt feloldva. A lipid koncentráció 20 mg/ml volt. A nehéz SR vezikulumoknak a kettősréteggel való fúzióját úgy idéztük elő, hogy a *cis* kamrában, ami a RyR1 citoplazmatikus oldalának felelt meg, a Cs<sup>+</sup>-koncentrációt 450 mM-al megnöveltük. Az ionáramot a Cs<sup>+</sup> koncentráció gradiense hajtotta, mialatt a membrán potenciál értékét 0 mV-on tartottuk. A RyR1 sikeres beépítése után a szabad Ca<sup>2+</sup>

koncentrációt a *cis* oldalon EGTA hozzáadásával 50 µM-ról 100 nM-ra csökkentettük. Ezután a RyR1 citoplazmatikus oldalának megfelelő oldatfélhez klorokrezolt adtunk a kívánt koncentrációban. Az ionáramokat Axopatch-200 erősítő segítségével detektáltuk, majd 1 kHz-en egy 8-pólusú Bessel szűrővel szűrtük és 3 kHz-en digitalizáltuk. Végül az áramjeleket pCLAMP 6.03 szoftver (Axon Instruments) segítségével rögzítettük. A csatornák nyitvatartási valószínűségét Clampfit 10 szoftverrel határoztuk meg. A foszfolipideket az AvantiPolarLipids-től (Alabaster, Alabama, Egyesült Államok), minden egyéb vegyszert a Sigma-Aldrich-tól (St. Louis, Missouri, Egyesült Államok) szereztünk be. A klorokrezol törzsoldatot DMSO felhasználásával készítettük.

#### 4.1.4. ATP-áz aktivitás mérése

Az LSRV vezikulumok ATP-áz aktivitását kapcsolt enzim assay-vel határoztuk meg egy 100 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM ATP, 0,42 mM phosphoenolpyruvát, 1  $\mu$ M A23187 ionofor, 0,2 mM NADH, 7,5 U/ml piruvát kináz, és 18 U/ml laktát dehidrogenáz tartalmú közegben (pH=7,5, t=37°C). Az assay-t 1  $\mu$ M ionizált Ca<sup>2+</sup> mellett végeztük, hogy biztosítsuk a maximális SERCA aktivitást. Az oldat ionizált Ca<sup>2+</sup>-tartalmát a Fabiato számítógépes program segítségével határoztuk meg. A vezikulumok Ca<sup>2+</sup>akkumulációjának megakadályozása céljából A23187 Ca<sup>2+</sup>-ionofort alkalmaztunk. A klorokrezolt 1 perccel mérés előtt adtuk a közeghez. Minden kísérletben 5,5  $\mu$ g/ml fehérjét használtunk. A teljes hidrolitikus aktivitást a NADH 340 nm-en mért abszorbciós csúcsának optikai denzitás-csökkenésén keresztül mértük. Az adatokat a következő képpen adtuk meg: szervetlen foszfát mikromólnyi mennyisége 1 mg fehérjében egy perc alatt [52].

#### 4.1.5. Vázizom kontraktilitásának mérése

A patkányból kimetszett extensor digitorum longus izom egyik inát a mérőkamra aljához, míg a másikat az erőmérő (transzducer) karjához rögzítettük függőleges pozícióban. Az izomtónust izometriás körülmények között mértük, miután az izom előterhelését 10 g-ra állítottuk be. Az izmot Tyrode oldatba merítettük, melyet a kísérlet során folyamatosan oxigenáltunk és 37°C hőmérsékleten tartottuk. A mérések során különböző koncentrációjú 4-COC oldatokat alkalmaztunk, melyeket 500 mM-os 4-COC törzsoldatból adtunk a mérőoldathoz a kívánt végkoncentráció eléréséhez.

#### 4.2. Parotis acinus sejtek vizsgálatára alkalmazott módszerek

## 4.2.1. Parotis acinus sejtek izolálása

Elektrofiziológiai mérések céljára a parotis acinus sejteket a parotis szövetének enzimatikus emésztésével állítottuk elő [97, 109, 110]. Az emésztő enzimeket SMEM-ben (ThermoFisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok) oldottuk, majd az oldatokat karbogénnel buborékoltattuk át használat előtt. A 3-4 hónapos egereket CO2vel és nyaki diszlokációnak extermináltuk. A parotis mirigyeket gyorsan eltávolítottuk, éles ollóval finomra aprítottuk és 37°C-on vízfürdőben 8 percig rázva 28 µg/ml trypsinnel emésztettük. Ezután a szövetet trypsin inhibitort tartalmazó SMEM oldatban mostuk, majd 40 percig tovább emésztettük 10 ml 0,18 Wünsch egység/ml Liberase TL, kollagenáz tartalmú enzimkeverékben (Roche Diagnostics GmbH, Engelhorngasse, Bécs, Ausztria). Végül a szövetet többször átpipettáztuk egy szerológiai pipettán és az így kapott sejthalmokat centrifugálással összegyűjtöttük. A kapott pelletet friss Liberase oldattal reszuszpendáltuk és a sejthalmokat további 20 percig emésztettük. A parotis sejteket szerológiai pipettával történő triturálással választottuk szét. Végül a parotis sejteket átszűrtük egy 50 µm-os nylon szűrőn, BME sejttenyésztő médiummal mostuk, centrifugáltuk (200×g, 3 perc) és BME-ben reszuszpendáltuk. Az immunofluoreszcens vizsgálatokhoz az izolálás folyamatát módosítottuk, hogy nagyobb sejthalmokat tudjunk gyűjteni. Elhagytuk a trypsines kezelést és a Liberase-zal történő emésztést csak 40 percig végeztük.

#### 4.2.2. Immuncitokémia

Az acinus sejthalmokat rögtön az izolálás után jéghideg methanolban fixáltuk (szuszpenzióként 15 percig). Ezután a sejteket centrifugálással összegyűjtöttük, majd 3% BSA-t tartalmazó PBS-ben (foszfáttal pufferolt sóoldat) oldottuk fel. A blokkolás után az acinus sejtszuszpenzióhoz rendre 1:250, 1:50 és 1:100 hígításban a következő anyagok egyikét adtuk: Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pumpa antiszérum (Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság), IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> antiszérum (BD Biosciences, San Diego, Egyesült Államok), és TMEM16A antiszérum (Santa Cruz Biotechnology Inc, Dallas, Texas, Egyesült Államok). PBS-ben történő mosást követően a sejteket Dylight 488 ló nyúl elleni, Cy3 kecske egér elleni és Dylight 488 ló kecske elleni másodlagos antitestekkel kezeltük (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok) 1:2000 vagy 1:1000 hígításban. A sejteket 1 órán keresztül inkubáltuk az antitestekkel szobahőmérsékleten és háromszor 5 percig mostuk őket 3% BSA-PBS oldatban reszuszpendálva. A mosási ciklusok között a sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze. Az elsődleges antitesteket a negatív kontroll kísérletekben elhagytuk. Végül az acinus sejthalmokat fedőlemezre cseppentettük ki és Zeiss 510 Meta (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Németország) konfokális mikroszkóp segítségével vizsgáltuk.

#### 4.2.3. Immunhisztokémia

A parotis szövetet standard hisztokémiai protokoll szerint készítettük elő immunfestéshez. Eltávolítottuk a parotist és Sainte-Marie fixálóban (99% abszolut etanol és 1% jégecet) tároltuk 1 napig 4°C-on. A mintákat paraffinba ágyaztuk, majd 8 µm vastag szeletekre vágtuk, melyeket szilán bevonatos tárgylemezre helyeztünk és hagytuk száradni egy éjszakán keresztül 37°C-on. A paraffin eltávolítása után a szeleteket rehidratáltuk, PBSben mostuk és 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -dal kezeltük 10 percig szobahőmérsékleten. A hisztokémiai és immunohisztokémiai reakciókat megelőzően az összes mintát 1% BSA-ban szobahőmérsékleten blokkoltuk 30 percig. A Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pumpa elleni antitestet (Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság) egy éjszakán keresztül 4°C-on 1:100 hígításban alkalmaztunk. Ezt követően a sejteket Dylight 488 ló nyúl elleni másodlagos antitesttel kezeltük. A tárgylemezeket ProLong® Diamond Antifade Mountant (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornia, Egyesült Államok) segítségével fedtük be. A mintákat az immunohisztokémiai vizsgálatok sorrendjében rögzítettük.

Primer antitestek			
Antitest neve	Forgalmazó cég neve és Katalógusszám	Hígítási arány	
Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> pumpa	Abcam, Cambridge, UK, ref. no. ab76020	1:1250	
IP3R3 BD	Biosciences, ref. no. 610312	1:50	
TMEM16A	Santa Cruz Biotechnology Inc., ref. no. sc- 135235	1:100	
Szekunder antitestek			
Dylight 488 horse anti-rabbit	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA	1:2000	
Cy3 goat anti- mouse	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA	1:1000	
Dylight 488 horse anti-goat	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA	1:.2000	

#### 1. táblázat

Kísérletben használt antitestek összefoglaló táblázata.

# 4.2.4. Az acinus sejtek BODIPY FL ouabain jelölése

A sejteket kis mennyiségű SMEM-ben reszuszpendáltuk és az oldatot 0,5 μM ouabainnal egészítettük ki, és azonnal egy perfúziós kamrában rögzített üveg fedőlemezre cseppentettük ki őket. A BODIPY FL ouabain egy fluorscensen jelölt Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pumpa gátlószer, amit élő sejtek pumpáinak jelölésére használtunk. A sejteket 5 perc inkubálás után extracelluláris sóoldattal mostuk, mely a következőket tartalmazta: 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub> és 10 mM HEPES (pH=7,4). A fluoreszcenciát 40-szeres objektívvel ellátott Zeiss LSM 5 LIVE (Carl Zeiss Microscopy GmbH) konfokális

mikroszkóppal detektáltuk. A fluorofort 488 nm-en gerjesztettük és az emittált fényt egy 520 nm-es sávszűrőn keresztül gyűjtöttük össze.

#### 4.2.5. Ionáramok mérése parotis acinus sejteken

A patch-clamp technika teljes sejtes konfigurációban végzett kísérletek során az ionáramokat Digidata 1322A A/D kártya által vezérelt Axopatch 200 típusú erősítő (mindkettő: Axon Instruments Inc.) segítségével rögzítettük. A mintavétel 50 kHz frekvenciával történt és az áramjeleket 8 pórusú Bessel szűrővel 5 kHz-en szűrtük. Az adatokat pClamp 9 szoftvercsomag (Axon Instruments Inc.) segítségével gyűjtöttük és elemeztük. Az acinus sejtek K<sup>+</sup>-áramát +40 mV feszültségen, míg a Cl<sup>-</sup>-áramot -20 mV-on mértük. A pipettát intracelluláris oldattal töltöttük meg, mely a következőket tartalmazta: 135 mM K-glutamate, 10 mM HEPES, 10 mM NP-EGTA, 2 mM CaCl<sub>2</sub> és 0,25 mM Fluo-4-K (pH=7,2). A külső oldat összetételét úgy választottuk meg, hogy alkalmas legyen a  $Ca^{2+}$  függő K<sup>+</sup> és Cl<sup>-</sup> áramok izolált vizsgálatára. Ennek megfelelően K<sup>+</sup>-áramméréskor a külső oldatban 135 mM Na-glutamát, 5 mM K-glutamát, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub> és 10 mM HEPES volt (pH=7.2). A Cl<sup>-</sup> áram mérésekor az extracelluláris oldatban a K<sup>+</sup>-áramot tetraetilammoniummal blokkoltuk (az oldatban ilyenkor 140 mM TEA-Cl és 10 mM HEPES volt, pH=7,2). Az áramjeleket pCLAMP 6.03 szoftver (Axon Instruments, East Hawthorn, Egyesült Államok) segítségével rögzítettük. Az áramokat Clampfit 10 szoftverrel elemeztük.



.2. Illusztráci: Parotis acinus sejtek izolálása és a sejteken végzett módszerek sémája.

# 4.2.6. Ca<sup>2+</sup>-felszabadítás fotolízis segítségével

Az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> koncentráció változásait a Fluo-4 floureszcencia követésével, egy monokromátor alapú képalkotó rendszer (Polychrome IV, Eugene) és egy nagy sebességű CCD kamera (TILL Photonics GmbH., Gräfelfing, Németország) segítségével kísértük figyelemmel. A sejteket 488 nm hullámhosszúságú fénnyel világítottuk meg és a fluoreszcenciát egy 525 nm-es sávszűrőn (Chroma Technology Corp., Bellows Falls, VT, Egyesült Államok) keresztül gyűjtöttünk. A képalkotást 40-52 ms intervallumban 20 ms expozíciós idővel végeztük. A fluoreszcenciában bekövetkező változásokat a kezdeti fluoreszcenciára normalizálva adtuk meg:  $\Delta F/F_0=(F-F0)/F_0$ , ahol F a mért fluoreszcencia és F<sub>0</sub> a képsorozat első 10 kockájának átlag floureszcenciája. A hisztogramokat 4096 egységig skáláztuk be és színekkel láttuk el. Az NP-EGTA (kötött Ca<sup>2+</sup>) fotolízisét villanó UV lézer és megfelelő kondenzor segítségével végeztük [107, 111-116]. A 375 nm-es dióda lézert (Toptica Photonics AG, München, Németország) egy TE200 tipusú mikroszkóphoz (Nikon Corp., Minato City, Tokió, Japán) csatlakoztattuk egy optikai szálon és egy UV kondenzoron keresztül (TILL Photonics GmbH., Gräfelfing, Németország). A lézert egy 40-szeres olajimmerziós objektív (Nikon Corp.) segítségével fokuszáltuk a minta síkjára. A lézerpont fél maximum-intenzitás értékénél a lézerpont kiterjedése az *x* és *y* síkokban kb. 0,7  $\mu$ M, míg a *z* síkban 2,0  $\mu$ M volt, amely felbontás elegendő volt arra, hogy az acinus sejt egy-egy előre meghatározott kicsiny területét izoláltan megvilágítsuk. Mindez lehetővé tette, hogy az apikális és bazolaterális régiókban izoláltan váltsunk ki fotolízist, azaz okozzunk lokalizáltan Ca<sup>2+</sup>-felszabadulást. A sejteket 40-52 ms időtartamokra világítottuk meg, a lézer teljesítményét 4 és 6 mW között szoftver kontrollálta. Az áramjelek rögzítését, a fluoreszcens kép rögzítését és a lézer expozíció kioldását Polychrome IV illesztőegység segítségével szinkronizáltuk és Vision szoftver csomaggal (TILL Photonics GmbH., Gräfelfing, Németország) irányítottuk.

## 5. Eredmények

# 5.1. Vázizmon nyert eredmények

# 5.1.1. Koffein hatása a Ca<sup>2+</sup>-felszabadulásra HSR vezikulán

A koffein és a klorokrezolok SR-ből történő Ca2+-felszabadulásra gyakorolt hatását mikroszóma frakciókból nyert HSR vezikulumokon vizsgáltuk. A HSR vezikulumokat Ca<sup>2+</sup> indikátor APIII tartalmú pufferben szuszpendáltuk, amelynek segítségével az extravezikuláris tér Ca<sup>2+</sup>-tartalmát monitoroztuk. Minden kísérlet elején a vezikulumokat a Ca<sup>2+</sup> pumpa felhasználásával azonos mennyiségű Ca<sup>2+</sup>-al töltöttük fel oly módon, hogy egymás után többször kis mennyiségű Ca<sup>2+</sup>-ot pipettáztunk a mintához. Ez látható a 6.A. ábra bal oldalán, ahol minden Ca<sup>2+</sup>-injekció hatására a transzmittancia csökkent, melv átmeneti csökkenés hamar helyreállt a vezikulák azonnali Ca<sup>2+</sup>-felvétele miatt. Koffein (koncentrációja mM-ban feltüntetve az ábra jobb oldalán) hozzáadását (nyíl) követően az extravezikuláris tér relatív transzmittanciája szignifikánsan lecsökkent, ha az alkalmazott koffein koncentrációja elérte a 4 mM-t, annak jeleként, hogy a koffein Ca<sup>2+</sup>-felszabadulást váltott ki a Ca<sup>2+</sup>-nal feltöltött vezikulumokból. A koffein hatására bekövetkező Ca<sup>2+</sup>felszabadulás sebessége 4 és 8 mM koffein esetében egyforma volt, 16 mM koffein esetén valamivel alacsonyabb értéket kaptam (6.B. ábra, n = 3-5). Ezen eredmények alapján is tisztán látszik az a régi kísérletes tapasztalat, hogy a koffeinnel való munka nehezen standardizálható, használata farmakológiai szempontból előnytelen, mivel hatása inkább minden vagy semmi törvényt követ, ami felveti egy RyR-re specifikusabb és koncentrációfüggő hatással rendelkező agonista igényét. További munkám során ilyen, megfelelőbbnek tűnő jelöltek (a klorokrezolok) hatását teszteltem a RyR1 és a SERCA pumpa működésére.



6. ábra. Koffein hatása a Ca<sup>2+</sup>-felszabadulásra HSR vezikulán
- A) Fotometriás eljárással, antypyrylazo III metallokróm Ca<sup>2+</sup> indikátor segítségével az extravezikuláris Ca<sup>2+</sup> koncentrációt mértük. Az ábrán ilyen mérések jellemző görbéi láthatóak. A HSR vezikulákat a SERCA pumpa segítségével Ca<sup>2+</sup>-mal töltöttük úgy, hogy kis mennyiségű Ca<sup>2+</sup> tartalmú törzsoldatot 11 alkalommal a mérőoldatba injektáltunk (pálcikával jelölve). Ez a művelet a transzmittancia átmeneti csökkenését, majd kezdeti értékre közelébe való visszatérését eredményezte, ami arra utal, hogy a hozzáadott Ca<sup>2+</sup> teljes mennyiségét a HSRV a SERCA segítségével felvette. Ezután a nyíllal jelölt időpontban a görbék mellett feltüntetett koncentrációkban (mM) koffeint injektáltunk a küvettába ami 4, 8 és 16 mM esetében gyors transzmittancia csökkenést okozott, ami arra utal, hogy a koffein a RyR aktiválásával Ca<sup>2+</sup>-t szabadított fel a vezikulákból. Az ábra egyetlen töltési szakasz- és 5 egymásra vetített, koffein-kezelés regisztrátumát ábrázolja.
- B) A Ca<sup>2+</sup> felszabadulás koncentráció-hatás összefüggése. A Ca<sup>2+</sup> felszabadulást a transzmittancia-csökkenés meredekségéből határoztuk meg és az ábrán 3-5 mérés átlagát (±SEM) tüntettük fel.

# 5.1.2. Klorokrezolok hatása a Ca<sup>2+</sup>-felszabadulásra HSR vezikulán

A fentiekhez hasonló kísérleti feltételek mellett végeztük a három klorokrezol molekula (4-COC, 4-CMC és 3-CPC) Ca<sup>2+</sup>-felszabadulásra kifejtett hatásának vizsgálatát. Ebből a célból különböző koncentrációjú klorokrezolt (100, 300 és 500  $\mu$ M) injektáltunk a küvettába, melyet az extravezikuláris közeg gyors transzmittancia-esése követett. A 7. ábrán egy-egy reprezentatív kísérlet eredménye látható, amelyek a klorokrezolok a RyR1 csatornát aktiváló hatását demonstrálják, jelezvén, hogy a klorokrezolok Ca<sup>2+</sup>-ot szabadítanak fel a HSR vezikulumból. A reakció specificitását igazolandó 500  $\mu$ M klorokrezolt a RyR1-inhibitor ruténium vörös (RR, 5  $\mu$ M) jelenlétében is alkalmaztuk. Ezekben az esetekben elmaradt a Ca<sup>2+</sup> felszabadulás, tehát a ruténiumvörös előkezelés a klorokrezol hatását teljes mértékben kivédte.



7. ábra. Klorokrezolok hatása a  $Ca^{2+}$ -felszabadulásra HSR vezikulán Az ábrán a 4-CMC (A), a 3-CPC (B) és a 4-COC (C) különböző koncentrációival (100, 300, 500  $\mu$ M) kiváltott  $Ca^{2+}$  felszabadulással összefüggő transzmittanciaváltozások egymásra vetített regisztrátumai láthatók. A klorokrezolok beadását nyíl, míg a ruténium vörös előkezeléssel készült regisztrátumot "RR" jelöli.

A Ca<sup>2+</sup>-felszabadulás ütemét a különböző klorokrezol-koncentrációknál az intenzitásváltozás kezdeti szakaszára illesztett egyenes segítségével határoztuk meg. Az egyenes meredekségének reciprokát ábrázoltuk a klorokrezol-koncentráció függvényében. Az adatokat a Hill-egyenlettel illesztve meghatároztuk az EC<sub>50</sub> értékeket, ami 175±39  $\mu$ M a 4-CMC, 182±37  $\mu$ M a 3-CPC és 113±36  $\mu$ M a 4-COC esetében (8. ábra).



8. ábra. Klorokrezolok hatása a Ca<sup>2+</sup>-felszabadulás sebességére.

Az ábrán a krezolok különböző koncentrációival kiváltott Ca<sup>2+</sup> felszabadulással összefüggő transzmittancia-változások egymásra vetített regisztrátumai láthatók. A görbék a mérés első öt értékének átlagára normalizált relatív értékeket tüntetik fel. A Ca2+ felszabadulás sebességét (nmol Ca2+/s) a transzmittancia-csökkenés meredekségéből, kalibrációs egyenes segítségével határoztuk meg. A relatív steadystate transzmittancia pedig a normalizált görbe egyensúlyi állapotának 1-hez mért csökkenését jelenti.

A felszabadított Ca<sup>2+</sup> relatív mennyiségét szintén meghatároztuk a különböző klorokrezol koncentrációknál (minden koncentrációt legalább 4 kísérletben vizsgáltunk) és kifejezett dózisfüggést tapasztaltunk (9. ábra). A félhatásos koncentrációk a következők voltak:  $121\pm20 \mu$ M a 4-CMC,  $71\pm7 \mu$ M a 3-CPC és 55 $\pm14 \mu$ M a 4-COC esetén.



9. ábra. Klorokrezolok hatása a felszabadított Ca<sup>2+</sup> mennyiségére. A maximálisan felszabadítható Ca2+ mennyiséget, azaz a minimálisan elérhető transzmittancia-értékeket megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a legkevésbé hatásos a 4CMC volt, míg a leghatásosabb a 3CPC bizonyult, azaz telítő koncentrációk mellett a 3CPC szabadította fel a legtöbb Ca2+-t.

A teljes felszabadított  $Ca^{2+}$  mennyisége a legnagyobb (500  $\mu$ M) koncentráció jelenlétében a különböző klorokrezolokra eltérő volt. A relatív steady-state

transzmittanciák azt mutatják, hogy a 3-CPC kétszer annyi Ca<sup>2+</sup>-t szabadított fel, mint a 4-CMC. Ezen érték valamivel magasabb volt a 4-COC esetében is, de a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns (10. ábra).



10. ábra. 500 μM klorokrezol hatása a felszabadított Ca<sup>2+</sup> mennyiségére.
 A relatív steady-state transzmittanciák azt mutatják, hogy a 3-CPC kétszer annyi
 Ca<sup>2+</sup>-t szabadított fel, mint a 4-CMC.

További fenolszármazékokat (fenol, toluol) is teszteltünk, azonban ezen vegyületek nem voltak képesek kiváltani a HSR vezikulumból a Ca<sup>2+</sup>-felszabadulást 2 mM koncentrációban sem, ami arra utal, hogy a benzol gyűrűben helyet foglaló klór atom elengedhetetlen a RyR1-agonista hatás kifejlődéséhez.

#### 5.1.3. Klorokrezolok hatása a SERCA ATP-áz aktivitására

A különböző klorokrezolok hatását az SR Ca<sup>2+</sup> pumpákra az LSR vezikulumok ATP-áz aktivitásának mérésével koncentráció-függő módon tanulmányoztuk (minden koncentrációt itt is legalább 4 kísérletben vizsgáltunk). A specifikus ATP-áz aktivitást 10  $\mu$ M thapsigargin (specifikus SERCA inhibitor) jelenlétében is meghatároztuk, ami azt mutatta, hogy a minták ATP-áz aktivitásának több mint 90%-a SERCA aktivitásához volt köthető. A különböző klorokrezol-koncentrációknál számolt pumpa aktivitást a kontroll aktivitásra normalizálva ábrázoltuk a klorokrezol-koncentráció függvényében (11. ábra). Az ábrán látható, hogy a 4-CMC és 4-COC az ATP-áz aktivitást egyértelműen gátolta. Hill-egyenletet illesztve az adatokra a következő IC<sub>50</sub> értékeket kaptuk: 167±8  $\mu$ M a 4-CMC és 1370±88  $\mu$ M a 4-COC esetében. A 3-CPC bifázisos hatást mutatott: alacsonyabb koncentrációknál fokozta (EC<sub>50</sub> = 91±17  $\mu$ M), míg magasabb koncentrációkban csökkentette (IC<sub>50</sub> = 848±90  $\mu$ M) a SERCA ATP-áz aktivitását. Sem a fenol, sem a toluol nem befolyásolta szignifikánsan az ATP-áz aktivitást.



11. ábra. Klorokrezolok hatása a SERCA ATP-áz aktivitására. Az ábrán a klorokrezollal nem kezelt (kontroll) minta ATP-áz aktivitás értékeire normalizált relatív értékek szerepelnek, azaz az aktiviásokat a kontroll érték arányában tüntetjük fel. Az ábrán több mérés normalizált értékének átlaga látható (+/-SEM).

#### 5.1.4. 4-COC hatása az izolált RyR1 csatorna áramára

Azért, hogy több információt nyerjünk a 4-COC hatásának molekuláris mechanizmusáról, a 4-COC-t lipid kettősrétegbe ágyazott RyR1 csatornák áramain tovább teszteltük. A 12. ábrán egy reprezentatív kísérlet eredményét mutatom be, ahol az egyes lefelé mutató kiugró áramcsúcsok jelzik a csatornanyitásokat. Kontroll körülmények között a RyR1 áramokat a csatorna citoplazmatikus oldalán 100 nM Ca<sup>2+</sup> jelenlétében rögzítettük. Ilyenkor a csatornák az idő nagy részében zárva vannak (Z) ezért megnyílási valószínűségük alacsony (három kísérlet átlagában P<sub>0</sub>=0,006), amint azt a csatorna nyitások ritkás csúcsai is jelzik. Amikor a csatornákat 110  $\mu$ M 4-COC-al kezeltük, a nyitási valószínűség négyszeresére nőtt (három kísérlet átlagában P<sub>0</sub> = 0,025), a gyakoribb nyitási eseményeknek köszönhetően.



12. ábra. 4-COC hatása az izolált RyR1 áramára

Mesterséges lipid kettős rétegbe épített RyR1 csatorna elemi áramai. A csatorna egyes megnyílásait lefelé mutató áramtüskék reprezentálják. A csatorna zárt állapotát "Z" jelöli. Kontroll körülmények között a csatorna citoszolikus (cis) oldalán 100 nM Ca<sup>2+</sup>-ot hoztunk létre. A 4-COC kezelést is a cis oldalon alkalmaztuk.  $P_o$  – nyitvatartási valószínűség.

#### 5.1.5. 4-COC által kiváltott kontraktúra

A következő kísérletsorozatban azt teszteltük, hogy a 4-COC módosítja-e a vázizom mechanikus aktivitását (13. ábra). Patkányból kimetszett *extensor digitorum longus* izom tónusát erőmérő segítségével folyamatosan követtük, miközben az izmot kumulatíve növekvő 4-COC koncentrációkkal kezeltük. Először 1,6 mM 4-COC-koncentrációt állítottunk be, mely hatástalannak mutatkozott. Ezután további 4-COC injekciók hozzáadásával lépésenként 0,2 mM-lal emeltük a koncentrációt a 2 mM-ig, amely már képes volt kis mértékben fokozni az izomtónust. Amikor a 4-COC koncentrációja elérte a 2,2 mM-t, hirtelen az izomtónus markáns növekedése következett be. Egy másik kísérletben a 4-COC koncentrációját 2,8 mM-ra emeltük fel, ahol az ily módon kiváltott kontraktúra amplitúdója és meredeksége nagyobb volt, mint az előző kísérletben (2,2 mM 4-COC esetében). Az oldószerként alkalmazott DMSO mennyiségét is megemeltük, de ez nem váltott ki kontraktúrát még kétszer akkora koncentrációban sem, mint amikor az a 2,8 mM-os 4-COC kezelés esetében volt jelen. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a 4-COC a Ca<sup>2+</sup> felszabadító apparátus specifikus aktivációján keresztül vált ki vázizmon kontraktúrát.





### 5.2. Parotis sejteken nyert eredmények

### 5.2.1. Ca<sup>2+</sup>-függő K<sup>+</sup>-áram analízise

A K<sub>Ca2+</sub> csatornák aktivitását úgy lehet legkézenfekvőbb módon követni, hogy patch-clamp körülmények között (natív, "cell-attached" konfiguráció) mérjük a K<sup>+</sup>-áramot, miközben megnöveljük az intracelluláris Ca<sup>2+</sup>-koncentrációt. Ezt egy fotolabilis Ca<sup>2+</sup> kelátorhoz kötött kalcium (ún. "caged Ca<sup>2+</sup>") rövid UV-fényvillanás hatására hirtelen bekövetkező felszabadításával érik el, ahogyan azt a 14. ábrán demonstráljuk. Ebben a kísérletben a Ca<sup>2+</sup>-ot NP-EGTA-AM-ból szabadítottuk fel UV-fény segítségével. Látható, hogy az UVfényvillanás hatására markánsan megnövekszik a pipetta szája alatt lévő membánfoltban elhelyezkedő K<sup>+</sup>-csatornák aktivitása (B panel), amely a villanást követő néhány másodperc elteltével valamennyit csökken (C panel), és közelít az eredeti kontroll értékhez (A panel). Hasonló jelenséget kizárólag az apikális membránrészlet közelébe helyezett pipetta esetén tapasztaltunk, a bazális membránon való próbálkozáskor viszont egyszer sem.



14. ábra.  $Ca^{2+}$ -függő  $K^+$ -áram izolált parotis sejteken

Egy parotis acinus sejt apikális membránjára helyezett "patch-clamp" pipetta alatti membránfoltban lévő csatornák áramának regisztrátuma. A csatornák megnyílását lefelé mutató áramlépcsők mutatják. A nulla áramjelet, azaz a csatornák zárt állapotát "Z" és szaggatott vonal jelöli. Az UV-megvilágítás (Ca<sup>2+</sup> felszabadítás) időpontját nyíl mutatja.

- A)  $K^+$  áram kontroll körülmények között.
- B) C) És UV-megvilágítás után.

# 5.2.2. A Ca<sup>2+</sup>-függő K<sup>+</sup>- és Cl<sup>-</sup>-csatornák apiko-bazális lokalizációja

Bár korábbi kutatási eredmények szerint a  $K_{Ca2+}$  csatornák egyértelműen a sejtek bazolaterális membránjában foglalnak helyet [117], újabb matematikai modellek megkérdőjelezték ezt az álláspontot [118]. A kérdés tisztázása céljából tovább finomítottuk a kísérleti rendszerünket oly módon, hogy a teljes sejt patch-clamp mérések során a sejt bazális vagy apikális membránja alatti területen hozzunk létre villanó UV-fény segítségével térben lokalizált Ca<sup>2+</sup>-felszabadulást. Ezen kísérletek egy-egy reprezentatív eredményét a 15. és 16. ábrákon mutatom be. Mindkét ábrán bal oldalt egy-egy acinus sejt látható, amelyben az UV-fény hatására megemelkedő fluoreszcencia (Ca<sup>2+</sup>-szint) változását monitorozztuk az idő függvényében (A panel). Az itt található számok az idő előrehaladásáról tájékoztatnak, és mutatják a sejt megfelelő régiójában hirtelen kialakuló Ca<sup>2+</sup>-felszabadulást, ami UV megvilágítás hatására a 0,88. másodperckor következett be mindkét kísérletben. Az ábrák jobb oldalán egymás alatt mutatjuk a Ca<sup>2+</sup>-szinttel arányos fluoreszcencia intenzitásokat (B panel) valamint az ezzel párhuzamosan kialakuló Ca<sup>2+</sup>függő K<sup>+</sup> és Cl<sup>-</sup>-áramokat az idő függvényében (C panel). A 15. ábrán bemutatott kísérletben a Ca<sup>2+</sup>-szint megemelkedése az acinus sejt apikális míg a 16. ábrán lévő esetben a sejt bazális régiójában történt és a B panelek tanúsága szerint a Ca<sup>2+</sup> jel nem érintette az ellentétes oldali régiót, lokális maradt, azaz sejt távolabbi régióban nem jelent meg Ca<sup>2+</sup>tranziens. Az apikális Ca<sup>2+</sup> felszabadítás esetén (15. ábra) kifejezett K<sup>+</sup>-és Cl<sup>-</sup>-áram emelkedést regisztráltunk a Ca<sup>2+</sup>-jelet követően, míg a 16. ábrán a bazálisan alkalmazott Ca<sup>2+</sup>-felszabadítás nem aktivált sem K<sup>+</sup>- sem Cl<sup>-</sup>-áramot. A Cl<sup>-</sup> -áram az apikális membrán funkcionális markereként szolgál, azaz azt mutatja, hogy a Ca<sup>2+</sup> koncentráció megemelkedése valóban az apikális membrán mellett történt és Ca<sup>2+</sup> függő ionáramok aktiválásához elégséges nagyságú volt.



15. ábra. Apikális Ca<sup>2+</sup>-felszabadítás következményei

A) Parotis acinus sejtek mikroszkópos képe áteső fényben, és a középső, Fluo-4gyel és NP-EGTA-val töltött sejt adott időpontokban készített fluoreszcens képsorozata. A 0,84. Másodpercben készített képkockával egyidőben a plazma membrán apikális oldalának közvetlen közelében az intracelluláris teret pontszerű kiterjedésű UV fénnyel világítottuk meg, melynek eredményeként limitált térbeli kiterjedésű és -életidejű Ca<sup>2+</sup> -jel keletkezett a membrán közelében, ami a fluoreszcencia-változással arányos. A fluorscencia-változás intenzitását szivárványskálán jelöltük, ahol az egyre melegebb színek egyre magasabb fluoreszcenciának (és Ca<sup>2+</sup> koncentrációnak) felelnek meg. Az áteső fénnyel készített képen kék és a piros pontokkal az apikális és a bazális membrán melletti azon régiókat jelölöm, melyekben a fluoreszcencia intenzitásának mérése történt.

- B) A kék és színes pontok által fedett területen mért fluoreszcencia értékek változása az idő függvényében. Az intracelluláris fluoreszcencia az UV villanás utáni időpontban (0,88 s) az apikális oldalon egy pár képkockányi ideig jelentősen megemelkedett, míg a bazális membrán mellett (a piros pontban) változatlan maradt.
- C) Az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> koncentrációval párhuzamosan mért teljes-sejt K<sup>+</sup> -és Cl<sup>-</sup> -áramok, melyek a fluoreszcencia megemelkedésének idejében jelentős emelkedést mutatnak.



16. ábra. Bazális Ca<sup>2+</sup>-felszabadítás következményei

A 15. ábrán bemutatott körülményekkel megegyező kísérleti elrendezés és ábrázolás.

- A) Parotis acinus sejt mikroszkópos képe áteső fényben. A fluoreszcencia mérése a kék (apikális) és a piros (bazális) ponttal jelölt régiókban történt. A bazális membrán közeli intracelluláris tért célzó UV-villanás következményeként kialakuló lokális fluoreszcencia változás szivárványskálán ábrázolva.
- B) A fluoreszcencia-változás időfüggése az apikális (kék) és bazális (piros) membránok közelében. A nyíl az UV-expozíciót időpontját jelöli.

C) Az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> koncentrációval párhuzamosan mért teljes-sejt K<sup>+</sup> -és Cl<sup>-</sup> -áramok, melyek a fluoreszcencia bazális membrán melletti megemelkedésének idejében változást nem mutatnak.

A 17. ábrán a 8 apikálisan besugárzott és 4 bazálisan besugárzott sejten végzett mérések átlagát mutatjuk a K<sup>+</sup>-áram vonatkozásában, mely szerint az apikálisan alkalmazott UVfény hatására szignifikánsan megnőtt a Ca<sup>2+</sup>-függő K<sup>+</sup>-áram amplitúdója, míg a bazálisan alkalmazott UV-fény nem okozott ilyen változást.



17. ábra. Apikális és bazális Ca<sup>2+</sup>-felszabadítás következményei a K<sup>+</sup> áramra. A sejteket egy patch clam elektróda segítségével fluoreszcens Ca<sup>2+</sup>-indikátorral és egy UV érzékeny Ca<sup>2+</sup> -kelátorral töltöttük fel. Ami lehetővé teszi, hogy egyszerre mérjük az intracelluláris kálcium koncentrációt és a sejt ionáramait. Adott időpontban az apikális membrán mellé irányított pontszerű UV lézerrel az adott pillanatban az UV érzékeny anyagból kálciumot szabadítotak fel. Mivel hogy a kálcium koncentráció növekedése kizárólag a sejt apikális részére korlátozódik, ezért ezzel egy időben a Ca<sup>2+</sup>-függő K<sup>+</sup>-áram átmenetileg megemelkedett. Ezzel szemben ha szelektíven a sejt bazális részén emeljük meg a kálcium koncentrációt, az nem váltott ki ionáram növekedést. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a Ca<sup>2+</sup>-függő K<sup>+</sup>-csatornák az acinus sejtek apikális membránjában helyezkednek el - a Ca<sup>2+</sup>-függő Cl<sup>-</sup>-csatornákhoz hasonlóan. Mindez a korábban ismert nyálszekréciós modell alapjait kérdőjelezi meg, mivel felvetik azt a kérdést, hogy a jelentős mennyiségű luminális K<sup>+</sup>-kilépés ellenére miért alacsony a parotis primer nyálának a K<sup>+</sup>-koncentrációja (~5 mM). A kérdésre egy lehetséges válasz az lehet, hogy az apikális membrán is tartalmaz Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pumpa molekulákat, melyek a szekretált K<sup>+</sup>-t reabszorbeálják. Ezt a lehetőséget immunfluoreszcens módszerrel vizsgáltuk meg a továbbiakban.

### 5.2.3. A Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pumpa apiko-bazális lokalizációja

A  $Na^{+}/K^{+}$ -pumpa elhelyezkedését a parotis acinus sejtjeinek membránjában immunfluoreszcens módszerrel vizsgáltuk Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pumpa ellenes antitestek segítségével. Amint az a 18.B. ábrán látható, a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pumpa (zöld) a sejtmembrán *minden részén* kimutatható volt - beleértve az apikális membránt is. Ezekben a kísérletekben az apikális membrán jelölését az IP<sub>3</sub> receptorok festésével végeztük. Bár az IP<sub>3</sub> receptorok -szemben az egyéb apikális markerekkel- nem a felszíni membránon helyezkednek el, hanem az endoplazmatikus retikulum apikális membránhoz közeli részénél, kiválóan alkalmasak az apikális régió láthatóvá tételére anélkül, hogy elfednék az ott lévő markerek festődését. A 18.A ábrán a sejteket IP<sub>3</sub> ellenes antitesttel jelöltük (piros). A kettős festéssel végzett kísérletek során Anti-Sodium Potassium ATPase antibody és Purified Mouse Anti-IP3R-3 primer antitesteket továbbá lóban készült Dylight 488 Anti Rabbit IgG és Cy3 Goat anti Mouse IgG szekunder antitesteket használtunk (18.C ábra). A primer antitest arányát a pumpa jelölésére a korábban optimalizált módon alkalmaztuk 1 µl / 250 µl arányban, míg az IP<sub>3</sub> receptor ellenes antitesteket a gyártó által ajánlott hígítási arányban  $(1 \mu l / 50 \mu l)$ vittük fel. A Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pumpa jelölésére használt szekunder antitest mennyisége 1  $\mu$ l / 2000 µl, míg az IP<sub>3</sub> szekunder antitest esetében a legkisebb ajánlott koncentrációt alkalmaztuk (1 µl / 500 µl). Ezek a kísérletek meggyőzően bizonyítják, hogy -szemben a korábbi elképzelésekkel- a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pumpa az apikális membránban is markánsan jelen van. Ebben a kísérletsororozatban a kettős festéssel párhuzamosan, ugyanazon izolált mintából negatív kontrollt is készítettünk, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy a pumpa és a receptor szekunder antitestje specifikusan kötődött-e. A mintákat konfokális mikroszkóppal vizsgálva nem volt nyoma detektálható fluoreszcenciának ezekben az esetekben. Szemben az acinus sejteken nyert immuncitokémiai eredményekkel, immunhisztokémiai vizsgálatokban a ductus sejteken csak a bazolaterális membrán festődött a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pumpa, az apikális nem (18.D ábra). Ezek az eredmények az antitest specificitását bizonyítják, valamint azt mutatják, hogy a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pumpa kizárólag az acinus sejteken helyeződik ki az apikális membránba.



18. ábra. A Na+/K+ pumpa lokalizációja a parotis acinus sejtek apikális régiójában

- A) B) C) IP<sub>3</sub> receptor és Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pumpa immunfluoreszcens festése izolált acinus sejteken.
- D) Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pumpa immunfluoreszcens festése paraffinba ágyazott parotisból készített metszeten. A ductusokat nyilak jelölik, míg a többi sejt acinus sejt.

További bizonyítékok szerzése érdekében a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pumpát fluoreszcens ouabainnal (*BODYPY FL Ouabain*) jelöltük az acinus sejteken. A sejteket 10 percen keresztül 1 µl fluoreszcens ouabainnal inkubáltuk, a nem kötődött ouabaint pedig Tyrode oldattal mostuk ki mikroszkóp munkaasztalára rögzített perfúziós kamrából. A 19. ábrán látható, hogy az acinus sejteken a *teljes* membránfelület kirajzolódott. A ouabain specifikus bekötődésének bizonyítására kompetíciós kísérletet végeztük. Ennek során 1 µl nem fluoreszcens ouabainnal inkubáltuk a sejteket 2 percen keresztül, majd azonos koncentrációban vittünk fel 1 µl fluoreszcensen jelölt ouabaint, mellyel további 8 percen keresztül inkubáltuk a sejteket. A nem kötődő ouabain kimosását követően mikroszkóppal vizsgálva nem találtunk olyan sejteket, ahol meggyőző fluoreszcencia detektálható lett volna. Tehát a fluoreszcens ouabain kötődése specifikusnak bizonyult.



19. ábra. Izolált parotis acinus sejtek jelölése BODIPY FL ouabainnal

#### 5.2.4. Az apikális membrán relatív nagyságának meghatározása

Mivel a Cl<sup>-</sup>-csatorna kizárólag az acinus sejtek apikális membránjában expresszálódik, ezért mint kiváló apikális marker, alkalmas az apikális membrán relatív kiterjedésének meghatározására. A Cl<sup>-</sup>-csatorna jelenlétét (amelyet TMEM16A (ANO 1) fehérjeként azonosítottunk) az apikális membránban immunfluoreszcens festéssel mutattuk ki. A kísérletekben primer antitestként *ANO 1 Antibody (s-20)*-at, míg szekunder antitestként lóban termelt *Dylight Anti Goat 488*–at alkalmaztunk. A primer antitestet a gyártó által ajánlott hígításban (1µl / 100µl), míg a szekundert 1µl / 2000µl arányban vittük fel. A 20. ábra B. paneljén a detektált fluoreszcencia rajzolódik ki. Ezt a fluoreszcens képet képelemző szoftver segítségével az áteső fényben készült képre (A panel) illesztettük, melyen jól láthatóak a sejtek, a festés pedig egyértelműen az apikális membránt jelöli. Az eredmény a C panelen látható. Szemben a korábbi irodalmi adatokkal, melyek szerint az apikális membrán a teljes sejtmembrán mindössze 5-8%-át teszi ki, az általunk elvégzett festés a membrán jelentős részét apikális membránként azonosította, ami becsléseink szerint a teljes membránfelszín kb. 30%-át teszi ki.



20. ábra. TMEM16A Cl<sup>-</sup>-csatornák lokalizációja a parotis acinus sejtek apikális régiójában (immunfluoreszcens festés)

### 5.2.5. Az új nyálszekréciós modell

A nyálmirigy acinus sejtjein kapott eredményeim nem illeszthetők be maradéktalanul a nyáltermelés mechanizmusával kapcsolatos korábban elfogadott modellbe. Megállapítottuk ugyanis, hogy (1) csak a nyálmirigy apikális régiójában aktiválódnak a Ca<sup>2+</sup>-függő K<sup>+</sup>-csatornák, továbbá (2) acinus sejteken a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pumpa az apikális membránban is masszívan jelen van és (3) az acinus sejtek membránja az eddig gondoltnál lényegesen nagyobb. Fentiek figyelembevételével a nyál szekréciójának új modelljét szükséges feltételeznünk, amelyet a 21. ábrán mutatunk be. Ez a régi modelltől abban tér el, hogy a lumenbe történő Na<sup>+</sup>-kilépés nem kizárólag paracelluláris útvonalon valósul meg, hanem az apikális membránban található  $Na^+/K^+$ -pumpa segítségével transzcelluláris, elsődlegesen aktív Na<sup>+</sup>-kilépés is történik. Eredményeink alapján Elias Siguenza és James Sneyd (Department of Mathematics, University of Auckland, Új-Zéland) modellszámításokat végzett, amelyek az eddigieknél pontosabban írják le a nyálszekréció során bekövetkező eseményeket [128].



21. ábra. A nyálszekréciós mechanizmus eddigi és az általunk javasolt új modellje

#### 6. Megbeszélés

#### 6.1. Klorokrezolok hatásának elemzése vázizomban

Kísérleteink azt mutatják, hogy a három vizsgált klorokrezol sztereoizomer közül a legpotensebb és legszelektívebb RyR1 agonista a 4-COC, mivel ennek volt a legalacsonyabb  $EC_{50}$  értéke a Ca<sup>2+</sup>-felszabadulás vonatkozásában (22. ábra), és ami még fontosabb, a 4-COC befolyásolta legkisebb mértékben a SERCA pumpa aktivitását (azaz itt a 4-COC-nek volt a legmagasabb, 1370  $\mu$ M az IC<sub>50</sub> értéke).



22. ábra. A klorokrezolok Ca<sup>2+</sup> -felszabadulásra gyakorolt hatásának összehasonlítása

A maximálisan alkalmazott koncentrációk (500  $\mu$ M) mellet összehasonlítva a klorokrezolokat a 3-CPC-nek volt a legmarkánsabb hatása a Ca<sup>2+</sup>-felszabadulásra, de ezt a hatást nem lehet szelektív agonistaként hasznosítani a komplex bifázisos SERCA-hatás miatt. A 3-CPC ugyanis alacsony dózisban stimulálta (EC<sub>50</sub>=91  $\mu$ M), míg magasabb koncentrációknál (IC<sub>50</sub>=848  $\mu$ M) gátolta a SERCA pumpa működését. A vizsgált farmakológiai tulajdonságok alapján a 4-CMC helyett a 4-COC használatát javasoljuk a

RyR1 aktiválásának céljára, mert sokkal szelektívebb és sokkal effektívebb Ca<sup>2+</sup> felszabadító ágens, mint a 4-CMC, (és a koffein) ami adott kísérleti körülmények között előnyös lehet. Bár a 4-COC aktivitása kvalitatíve nem különbözik a 4-CMC aktivitásától, annál sokkal szelektívebb agonista a RyR1 receptor vonatkozásában. Így kísérleti körülmények között a 4-COC alkalmazása esetén feltehetően kevesebb, a SERCA aktivitás-változásából adódó interferenciára számíthatunk.

#### 6.2. A nyálelválasztás mechanizmusa parotis acinus sejteken

A parotis acinus sejtjein végzett kísérleteink egyértelműen bizonyítják a K<sup>+</sup>-csatornák jelenlétét az apikális membránban, és azt is, hogy itt a K<sup>+</sup>-csatornák denzitása jóval nagyobb, mint amennyi a bazolaterális membránra esik. Ebből egyenesen következik, hogy az acinus sejtek ingerlésének hatására jelentős mértékű K<sup>+</sup>-szekréció kell történjen a lumen irányába, aminek ellentmond a primer nyál alacsony K<sup>+</sup> -tartalma. Ez az ellentmondás feloldható, ha a K<sup>+</sup>-csatornákon az apikális oldalon kilépett K<sup>+</sup>-ot valamilyen mechanizmus visszaviszi a sejt belsejébe. Eredményeink szerint ez a mechanizmus az apikális membránban masszívan előforduló Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pumpa mennyiség. Valóban, immuncitológiai módszerekkel nemcsak a Cl<sup>-</sup> -csatornákat, hanem a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pumpa molekulákat is kimutattuk az apikális membránban. Ennek a jelentőségét azok az eredményeink hangsúlyozzák, melyek szerint az eddig gondolt alacsony (kb. 8%-os) apikális membránfelszín helyett az apikális membrán felülete a teljes membránfelszín kb. 30%-ára becsülhető, ami jelentős mértékű transzcelluláris aktív Na<sup>+</sup>-transzportot tesz lehetővé a lumen irányába. Ezen eredményeink ellentmondanak a parotis acinus sejtek eddig elfogadott szekréciós modelljének, amely transzcelluláris Cl<sup>-</sup> -transzport mellett gyakorlatilag kizárólag paracelluláris Na<sup>+</sup>-transzportot feltételez, ami összecseng a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pumpa bazolaterális membránra szorítkozó lokalizációjával (21.A ábra).

A rendelkezésünkre álló -egyébként egymásnak is meglehetősen ellentmondóirodalmi adatok az acinus sejtek apikális felszínét jelentősen alulbecsülték [119-127]. Ennek fényében nem látszott igazán lényegi kérdésnek az esetlegesen apikálisan előforduló Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pumpamolekulák szerepének tisztázása, igy az érintett kutatók arra a konszenzusra jutottak, hogy ezek szerepe -ha van is egyáltalán- csak minimális lehet [121, 122, 93]. Az apikális membránfelszín meghatározásában elkövetett alapvető hiba onnan eredt, hogy olyan elektronmikroszkópos felvételeken alapult, ahol az apikális membránfelszínt a sejtek közötti centrális lyukakkal azonosították - figyelmen kívül hagyva azokat a nem elhanyagolható méretű intercelluláris membránszakaszokat, amelyek szintén az apikális membránhoz tartoznak [123]. Ezzel szemben a TMEM16A-val végzett saját immunflureszcens eredményeink alapján az apikális membrán a teljes membránfelszín legalább 30%-ára tehető.

Kísérleti eredményeink alapján módosítanunk kellett az eddig kanonikusnak tartott szekréciós modellt oly módon, hogy a TMEM16A Cl<sup>-</sup>-csatorna mellett jelentős mennyiségű Ca<sup>2+</sup>-függő K<sup>+</sup> -csatornát, valamint Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pumát helyeztünk a sejtmembrán apikális részébe (21.B ábra). A K<sup>+</sup>-és Cl<sup>-</sup>-csatornák apikális kolokalizációja, mivel mindkettő Ca<sup>2+</sup>-által aktiválódik, kézenfekvő szabályozási lehetőséget biztosít a nyálszekréció serkentésére. Az apikálisan kihelyezett K<sup>+</sup>-csatornák szerepe egyrészt abban áll, hogy az általuk mediált outward áram megelőzze -illetve kompenzálja- a Cl<sup>-</sup> -efflux miatt kialakuló depolarizációt, ami a további Cl<sup>-</sup> -kilépést akadályozná. Másrészt az itt kilépő K<sup>+</sup>-kat a szintén apikálisan is jelen lévő Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pumpa viszi vissza a sejtbe, miközben ez a mechanizmus is hozzájárul a lumenbe irányuló Na<sup>+</sup>-szekrécióhoz. Tehát modellünkben a másodlagosan aktív paracelluláris útvonalat kiegészíti az elsődlegesen aktív transzcelluláris mechanizmus.

Mérési eredményeinket alapul véve Elias Siguenza és James Sneyd (Department of Mathematics, University of Auckland, Új-Zéland) modellszámitásokat végzett, amelyben a régi és az új modell által jósolt K<sup>+</sup>- és Na<sup>+</sup>-koncentrációkat számította a primer nyálra vonatkozóan (23.A és B ábra), modellezte továbbá a paracelluláris Na<sup>+</sup>-transzport által generált áram nagyságát (23.C ábra) valamint a nyálszekréció intenzitását (23.D ábra) [128]. Minden esetben az új modell alapján végzett számítások jobban közelítették az ismert értékeket, mint a régi modell alapján készült kalkuláció. Megállapíthatjuk tehát, hogy az általunk javasolt új modell az eddigieknél pontosabban írja le a nyálszekréció során bekövetkező eseményeket.



23. ábra. Elias Siguenza és James Sneyd matematikai modellje [128]

### 7/a. Összefoglalás

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

A klorokrezolok  $Ca^{2+}$  felszabadulásra gyakorolt hatásának vizsgálata során a leghatásosabbnak a 4-chloro-orto-cresol (4-COC) (EC50=55±14 µM), bár a 3-chloro-paracresol (3-CPC) hatékonyabb volt, mivel több Ca2<sup>+</sup>-t volt képes felszabadítani a vázizom HSR vezikulákból. A 3-CPC stimulálta a SERCA hidrolitikus aktivitását (EC50=91±17 µM), míg a 4-COC a SERCA aktivitást csak millimólos koncentrációban gátolta (IC50=1370±88 µM). A 4-chloro-meta-cresol (4-CMC) is gátolta a SERCA pumpát (IC50=167±8 µM), ami azt jelenti, hogy a 4-CMC nem specifikus RyR agonista, mivel a RyR-t is hasonló koncentrációban aktiválta (EC50=121±20 µM). Eredményeink szerint a 4-COC kísérletes alkalmazása a 4-CMC-től kedvezőbb olyan kísérletekben, ahol a cél Ca<sup>2+</sup>-felszabadulás kiváltása a SERCA befolyásolása nélkül.

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

#### 7/b. Summary

The work presented in my PhD thesis divides into two parts: (1) investigating the effect of various chlorocresol stereoisomers, known agonists of the ryanodine receptor of the skeletal muscle (RyR1) in order to find the most specific RyR1 agonist among them as a caffeine alternative and (2) investigating the localization of  $Ca^{2+}$  dependent ion channels in parotid acinar cells.

Experiments investigating the Ca<sup>2+</sup>-releasing action of the chlorocresol isomers demonstrated that the most potent isomer was 4-chloro-orto-cresol (4-COC) (EC50=55±14  $\mu$ M), although 3-chloro-para-cresol (3-CPC) was more effective, as it was able to induce higher magnitude of Ca<sup>2+</sup> flux from isolated terminal cisterna vesicles. Nevertheless, 3-CPC stimulated the hydrolytic activity of the SERCA Ca<sup>2+</sup> pump with an EC50 of 91±17  $\mu$ M, while 4-COC affected SERCA only in the millimolar range (IC50=1370±88  $\mu$ M). IC50 of 4-chloro-meta-cresol (4-CMC) for SERCA pump was 167±8  $\mu$ M, indicating that 4-CMC is not a specific RyR agonist either, as it activated RyR in a similar concentration (EC50=121±20  $\mu$ M). Our data suggest that the use of 4-COC might be more beneficial than 4-CMC in experiments, when Ca<sup>2+</sup> release should be triggered through RyRs without influencing SERCA activity.

In the other part of my project, using a combination of single-cell electrophysiology and  $Ca^{2+}$ -imaging, we demonstrate that photolysis of  $Ca^{2+}$  close to the apical membrane of parotid acinar cells triggered significant K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> current, indicating that a substantial amount of K<sup>+</sup> is secreted into the lumen during stimulation. Nevertheless, the K<sup>+</sup> content of the primary saliva is relatively low, suggesting that K<sup>+</sup> might be reabsorbed through the apical membrane. Therefore, we investigated the localization of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pumps in acinar cells. We show that the pumps appear evenly distributed throughout the whole plasma membrane, including the apical pole of the cell. Based on these results, we creted a new model of salivary fluid secretion, where the pump reabsorbs K<sup>+</sup> from and secretes Na<sup>+</sup> to the lumen, which can partially supplement the paracellular Na<sup>+</sup> pathway.

## 8. Irodalomjegyzék

[1] L. Kovács, E. Ríos, M.F. Schneider, Calcium transients and intramembrane charge movement in skeletal muscle fibres, Nature. 279 (1979) pp. 391-396.

[2] G.D. Lamb, Voltage-sensor control of Ca2+ release in skeletal muscle: insights from skinned fibers, Front Biosci. 7 (2002) pp. 834-842.

[3] G.D. Lamb, Excitation-contraction coupling in skeletal muscle: comparisons with cardiac muscle, Clin Exp Pharmacol Physiol. 27 (2000) pp. 216-224.

[4] C. Franzini-Armstrong, A.O. Jorgensen, Structure and development of E-C coupling units in skeletal muscle, Annu Rev Physiol. 56 (1994) pp. 509-534.

[5] C. Paolini, F. Protasi, C. Franzini-Armstrong, The relative position of RyR feet and DHPR tetrads in skeletal muscle, J Mol Biol. 342 (2004) pp. 145-153.

[6] B.A. Block, T. Imagawa, K.P. Campbell, C. Franzini-Armstrong, Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle, J Cell Biol. 107 (1988) pp. 2587-600.

[7] F. Protasi, Structural interaction between RYRs and DHPRs in calcium release units of cardiac and skeletal muscle cells, Front Biosci. 7 (2002) pp 650-658.

[8] M.F. Schneider, Control of calcium release in functioning skeletal muscle fibers, Annu Rev Physiol. 56 (1994) pp. 463-484.

[9] G. Meissner, Ryanodine receptor Ca2+ release channels and their regulation by endogenous effectors, Annu. Rev. Physiol. 56 (1994) pp. 485-508.

[10] S. Fleischer, Personal recollections on the diccovery of the ryanodine receptors of muscle, Biochem. Biophys. Res. Commun. 369 (2008) pp. 195-207.

[11] T. Tanabe, K.G. Beam, B.A. Adams, T. Niidome, S. Numa, Regions of the skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation-contraction coupling, Nature. 346 (1990) pp. 567-569.

[12] P. Leong, D.H. MacLennan, A 37-amino acid sequence in the skeletal muscle ryanodine receptor interacts with the cytoplasmic loop between domains II and III in the skeletal muscle dihydropyridine receptor, J Biol Chem. 273 (1998) pp. 7791-7794.

[13] A. Fonyó, Az orvosi élettan tankönyve, Medicina. (1995)

[14] G. Meissner, Ryanodine receptor Ca2+ release channels and their regulation by endogenous effectors, Annu Rev Physiol. 56 (1994) pp. 485-508.

[15] T. Wagenknecht, R. Grassucci, J. Frank, A. Saito, M. Inui, S. Fleischer, Three-dimensional architecture of the calcium channel/foot structure of sarcoplasmic reticulum, Nature. 338 (1989) pp. 167-170.

[16] T. Wagenknecht, M. Samsó, Three-dimensional reconstitution of ryanodine receptors, Front Biosci. 7 (2002) pp. 1464-1474.

[17] D.H. MacLennan, M.S. Phillips, Malignant hyperthermia, Science 256 (1992) pp. 789-794.

[18] J. Fujii, K. Otsu, F. Zorzato, S. De Leon, V.K. Khanna, J.E. Weiler, P.J. O'Brien, D.H. Maclennan, Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia, Science. 253 (1991) pp. 448-451.

[19] T.V. McCarthy, K.A. Quane, P.J. Lynch: Ryanodine receptor mutations in malignant hyperthermia and central core disease, Hum Mutat. 15 (2000) pp. 410-417.

[20] N. Sambuughin, H. Holley, S. Muldoon et al, Screening of the entire ryanodine receptor type 1 coding region for sequence variants associated with malignant hyperthermia susceptibility in the North American population, Anesthesiology 102 (2005) pp 515-521.

[21] W. Feng, G.C. Barrientos, G. Cherednichenko, T. Yang, I.T. Padilla, K. Truong, P.D. Allen, J.R. Lopez, I.N. Pessah, Functional and biochemical properties of ryanodine receptor type 1

channels from heterozygous R163C malignant hyperthermia-susceptible mice, Mol Pharmacol. 79 (2011) pp. 420-431.

[22] M. Richter, L. Schleithoff, T. Deufel, F. Lehmann-Horn, A. Herrmann-Frank, Functional characterization of a distinct ryanodine receptor mutation in human malignant hyperthermia-susceptible muscle, J Biol Chem. 272 (1997) pp. 5256–5260.

[23] G.D. Lamb, Ca2+ inactivation, Mg2+ inhibition and malignant hyperthermia, J Muscle Res Cell Motil. 14 (1993) pp. 554-556.

[24] R.T. Dirksen, G. Avila, Distinct effects on Ca2+ handling caused by malignant hyperthermia and central core disease mutations in RyR1, Biophys J. 87 (2004) pp. 3193-31204.

[25] E. Hartung, M. Koob, M. Anetseder, P. Schoemig, R. Krauspe, G. Hogrefe, W. Engelhardt, Malignant hyperthermia (MH) diagnostics: a comparison between the halothane-caffeine- and the ryanodine-contracture-test results in MH susceptible, normal and control muscle, Acta Anaesthesiol Scand. 40 (1996) pp. 437-444.

[26] E.W. Jones, T.E. Nelson, I.L. Anderson, D.D. Kerr, T.K. Burnap, Malignant hyperthermia of swine, Anesthesiology 36 (1972) pp. 42-51.

[27] P.M. Hopkins, Malignant hyperthermia: advances in clinical management and diagnosis, Br J Anaesth. 85 (2000) pp 118-128.

[28] H. Rosenberg, M. Davis, D. James, N. Pollock, K. Stowell, Malignant hyperthermia, Orphanet J. Rare Dis. 2 (2007) pp. 1-14.

[29] H. Rosenberg, H. Rueffert, Clinical utility gene card for: malignant hyperthermia, European Journal of Human Genetics 19, (2011) pp. 732.

[30] M.E. Kolb; M.L. Horne, R. Martz, Dantrolene in human malignant hyperthermia, Anesthesiology. 56 (1982) pp. 254-262.

[31] P.A. Iaizzo, F. Lehmann-Horn, The in vitro determination of susceptibility to malignant hyperthermia, Muscle Nerve. 12 (1989) pp. 184-190.

[32] A.R.G. Lindsay, S.D. Manning, A.J. Williams Monovalent cation conductance in ryanodine receptor-channel of sheep cardiac muscle sarcoplasmic reticulum, J Physiol. 439 (1991) pp. 463-480.

[33] A. Tinker, A.J. Williams, Divalent cation conduction in the ryanodine receptor channel of sheep cardiac muscle sarcoplasmic reticulum, J Gen Physiol. 100 (1992) pp. 479-493.

[34] M. Yazawa, C. Ferrante, J. Feng, K. Mio, T. Ogura, M. Zhang, P.H. Lin, Z. Pan, S. Komazaki, K. Kato, M. Nishi, X. Zhao, N. Weisleder, C. Sato, J. Ma, H. Takeshima, TRIC channels are essential for Ca2+ handling in intracellular stores, Nature. 448 (2007) pp. 78-82.

[35] J.I. Kourie, D.R. Laver, G.P. Ahern, A.F. Dulhunty, A calcium-activated chloride channel in sarcoplasmic reticulum vesicles from rabbit skeletal muscle, Am J Physiol. 270 (1996) pp. 1675-1686.

[36] J.S. Smith, R. Coronado, G. Meissner, Single channel measurements of the calcium release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Activation by Ca2+ and ATP and modulation by Mg2+, J Gen Physiol. 88 (1986) pp. 573-588.

[37] S. Sárközi, C. Szegedi, I. Jóna et al, Regulation of the rat sarcoplasmic reticulum calcium release channel by calcium, J Muscle Res Cell Motil. 21 (2000) pp. 131-138.

[38] G.P. Szigeti, J. Almássy, I. Jóna et al. Alterations in the calcium homeostasis of skeletal muscle from postmyocardial infarcted rats, Pflugers Arch. 455 (2007) pp. 541-553.

[39] A. Herrmann-Frank, F. Lehmann-Horn, Regulation of the purified Ca2+ release channel/ryanodine receptor complex of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by luminal calcium, Pflugers Arch. 432 (1996) pp. 155-157.

[40] A. Tripathy, G. Meissner, Sarcoplasmic reticulum lumenal Ca2+ has access to cytosolic activation and inactivation sites of skeletal muscle Ca2+ release channel, Biophys J. 70 (1996) pp. 2600-2615.

[41] I. Jóna, C. Szegedi, S. Sárközi, P. Szentesi, L. Csernoch, L. Kovács, Altered inhibition of the rat skeletal ryanodine receptor/calcium release channel by magnesium in the presence of ATP, Pflugers Arch. 441 (2001) pp. 729-738.

[42] R. Zucchi, S. Ronca-Testoni, The sarcoplasmic reticulum Ca2+ channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states, Pharmacol. Rev. 49, (1997) pp. 1-51.

[43] M. Endo, Mechanism of action of caffeine on the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle, Proc Jpn Acad. 51 (1975) pp. 479-484.

[44] M.W. Fryer, I.R. Neering, Actions of caffeine on fast- and slow-twitch muscles of the rat, J Physiol., 416 (1989) pp. 435-454.

[45] D.G. Allen, H. Westerblad, The effects of caffeine on intracellular calcium, force and the rate of relaxation of mouse skeletal muscle, J Physiol., 487 (1995) pp. 33-42.

[46] A. Hermann-Frank, H.C. Luttgau, D.G. Stephenson, Caffeine and excitation-contraction coupling in skeletal muscle: a stimulating story, J Muscle Res Cell Mot. 20 (1999) pp. 223-237.

[47] H. Westerblad, F.H. Andrade, M.S. Islam, Effects of ryanodine receptor agonist 4-chloro-mcresol on myoplasmic free Ca2+ concentration and force of contraction in mouse skeletal muscle, Cell Calcium. 24 (1998) pp. 105-115.

[48] I.R. Wendt, D.G. Stephenson, Effects of caffeine on Ca-activated force production in skinned cardiac and skeletal muscle fibres of the rat, Pflugers Arch. 398 (1983) pp. 210-216.

[49] K. Hirose, M. Iino, M. Endo, Caffeine inhibits Ca2+-mediated potentiation of inositol 1,4,5trisphosphate-induced Ca2+ release in permeabilized vascular smooth muscle cells, Biochem Biophys Res Commun. 194 (1993) pp. 726-732.

[50] I. Zahradník, P. Palade, Multiple effects of caffeine on calcium current in rat ventricular myocytes, Pflugers Arch. 424 (1993) pp. 129-136.

[51] M.S. Islam, O. Larsson, T. Nilsson, P.O. Berggren Effects of caffeine on mytoplasmic free Ca2+ concentration in pancreatic B cells are mediated by interaction with ATP-sensitive K+ channels and L-type voltage-gated Ca2+ channels but not the ryanodine receptor, Biochem J. 306 (1995) pp. 679-686.

[52] S. Sárközi, J. Almássy, B. Lukács, N. Dobrosi, G. Nagy, I. Jóna, Effect of natural phenol derivatives on skeletal type sarcoplasmic reticulum Ca2+-ATPase and ryanodine receptor, J Muscle Res Cell Motil. 28 (2007) pp. 167-174.

[53] F. Zorzato, E. Scutari, V. Tegazzin, E. Clementi, S. Treves, Chlorocresol: an activator of ryanodine receptor-mediated Ca2+ release, Mol Phamacol. 44 (1993) pp. 1192-1201.

[54] V. Tegazzin, E. Scutari, S. Treves, F. Zorzato, Chlorocresol, an additive to commercial Succinylcholine, induces contracture of human malignant hyperthermia-susceptible muscles via activation of the ryanodine receptor Ca2+ channel, Anesthesiology. 84 (1996) pp. 1380-1385.

[55] A. Herrmann-Frank, M. Richter, S. Sarközi, U. Mohr, F. Lehmann-Horn, 4-Chloro-m-cresol, a potent and specific activator of the skeletal muscle ryanodine receptor, Biochim Biophys Acta. 1289 (1996) pp. 31-40.

[56] F. Al-Mousa, F. Michelangeli, Commonly used ryanodine receptor activator, 4-chloro-mcresol (4CmC), is also an inhibitor of SERCA Ca2+ pumps, Pharmacol Rep. 61 (2009) pp. 838-842.

[57] P. Röhlich, Szövettan, Semmelweis, (2006)

[58] J. Almassy, J.H. Won, T.B. Begenisich, D.I. Yule, Apical Ca2+-activated potassium channels in mouse parotid acinar cells, J Gen Physiol. 139 (2012) pp. 121-133.

[59] S. Tsukita, M. Furuse, M. Itoh, Multifunctional strands in tight junctions, Nat Rev Mol Cell Biol. 2 (2001) pp. 285-293.

[60] B.J. Baum, Principles of saliva secretion, 694 (1993) Ann NY Acad Sci. pp. 17-23.

[61] J.M. Anderson, Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport, News Physiol Sci. 16 (2001) pp. 126-130.

[62] J.E. Melvin, D. Yule, T. Shuttleworth, T. Begenisich, Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells, Annu Rev Physiol. 67 (2005) pp. 445-469.

[63] D.I. Cook, E.W. Van Lennep, M.L. Roberts, I.A. Young, Secretion by the major salivary glands. In: Physiology of the gastrointestinal tract. 3rd ed. Johnson (1994)

[64] D.E. Clapham Calcium signaling, Cell 80 (1995) pp. 259-268.

[65] I.S. Ambudkar, Regulation of calcium in salivary gland secretion, Critical Reviews in Oral Biology & Medicine. 11 (2000) pp. 4-25.

[66] M.D. Bootman, T.J. Collins, C.M. Peppiatt, L.S. Prothero, L. MacKenzie, P. De Smet, M. Travers, S.C. Tovey, J.T. Seo, M.J. Berridge, F. Ciccolini, P. Lipp, Calcium signaling-an overview, Semin Cell Dev Biol. 12 (2001) pp. 3-10.

[66] N. Iwatsuki, Y. Maruyama, O. Matsumoto, A. Nishiyama, Activation of Ca2+-dependent Cland K+ conductances in rat and mouse parotid acinar cells, Jpn J Physiol. 35 (1985) pp. 933-944.

[67] Y. Maruyama, A. Nishiyama, T. Teshima, Two types of cation channels in the basolateral cell membrane of human salivary gland acinar cells, Jpn J Physiol. 36 (1986) pp. 219-223.

[68] Y. Maruyama, D.V. Gallacher, O.H. Petersen, Voltage and Ca2+-activated K+ channel in basolateral acinar cell membranes of mammalian salivary glands, Nature. 302 (1983) pp. 827-829.

[69] O.H. Petersen, Stimulus-secretion coupling: cytoplasmic calcium signals and the control of ion channels in exocrine acinar cells, J Physiol. 448 (1992) pp. 1-51.

[70] O.H. Petersen, D.V. Gallacher, Electrophysiology of pancreatic and salivary acinar cells, Annu Rev Physiol. 50 (1988) pp. 65-80.

[71] H. Kasai, Y.X. Li, Y. Miyashita, Subcellular distribution of Ca2+ release channels underlying Ca2+ waves and oscillations in exocrine pancreas, Cell. 74 (1993) pp. 669-677.

[72] Y. Maruyama, G. Inooka, Y.X. Li, Y. Miyashita, H. Kasai, Agonist-induced localized Ca2+ spikes directly triggering exocytotic secretion in exocrine pancreas, 12 (1993) EMBO J. pp. 3017-3022.

[73] H. Takemura, S. Yamashina, A. Segawa, Millisecond analyses of Ca2+ initiation sites evoked by muscarinic receptor stimulation in exocrine acinar cells, Biochem Biophys Res Commun. 259 (1999) pp. 656-660.

[74] O. Larina, P. Thorn, Ca2+ dynamics in salivary acinar cells: distinct morphology of the acinar lumen underlies near-synchronous global Ca2+ responses, J Cell Sci. 118 (2005) pp. 4131-4139.

[75] D.R. Giovannucci, J.I. Bruce, S.V. Straub, J. Arreola, J. Sneyd, T.J. Shuttleworth, D.I. Yule, Cytosolic Ca(2+) and Ca(2+)-activated Cl(-) current dynamics: insights from two functionally distinct mouse exocrine cells, J Physiol. 540 (2002) pp. 469-484.

[76] A.R. Harmer, P.M. Smith, D.V. Gallacher, Local and global calcium signals and fluid and electrolyte secretion in mouse submandibular acinar cells, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 288 (2005) pp. 118-124.

[77] R. Greger, The membrane transporters regulating epithelial NaCl secretion, Pflugers Arch. 432 (1996) pp. 579-88.

[78] B.C. Schroeder, T. Cheng, Y.N. Jan, L.Y. Jan, Expression cloning of TMEM16A as a calciumactivated chloride channel subunit, Cell. 134 (2008) pp. 1019-1029.

[79] Y.D. Yang, H. Cho, J.Y. Koo, M.H. Tak, Y. Cho, W.S. Shim, S.P. Park, J. Lee, B. Lee, B.M. Kim, R. Raouf, Y.K. Shin, U. Oh, TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance, Nature. 455 (2008) pp. 1210-1215.

[80] K. Park, R.M. Case, P.D. Brown, Identification and regulation of K+ and Cl- channels in human parotid acinar cells, Arch Oral Biol. 46 (2001) pp. 801-810.

[81] V.G. Romanenko, M.A. Catalán, D.A. Brown, I. Putzier, H.C. Hartzell, A.D. Marmorstein, M. Gonzalez-Begne, J.R. Rock, B.D. Harfe, J.E. Melvin, Tmem16A encodes the Ca2+-activated Cl-channel in mouse submandibular salivary gland acinar cells, J Biol Chem. 285 (2010) pp. 12990-13001.

[82] M.A. Catalán, Y. Kondo, G. Peña-Munzenmayer, Y. Jaramillo, F. Liu, S. Choi, E. Crandall, Z. Borok, P. Flodby, G.E. Shull, J.E Melvin, A fluid secretion pathway unmasked by acinar-specific

Tmem16A gene ablation in the adult mouse salivary gland, Proc Natl Acad Sci U S A. 112 (2015) pp. 2263-2268.

[83] J. Arreola, K. Park, J.E. Melvin, T. Begenisich, Three distinct chloride channels control anion movements in rat parotid acinar cells, J Physiology. 490 (1996) pp. 351-362.

[84] J.K. Foskett, [Ca2+]i modulation of Cl- content controls cell volume in single salivary acinar cells during fluid secretion, Am J Physiol-Cell Physiol. 259 (1990) pp. 998-1004.

[85] P.T. Gray, Oscillations of free cytosolic calcium evoked by cholinergic and catecholaminergic agonists in rat parotid acinar cells, J Physiol. 406 (1988) pp. 35-53.

[86] P.T.A. Gray, Agonist-evoked oscillations of cytosolic free calcium in single rat parotid acinar cells. J Physiology. 396 (1988) pp. 116.

[87] E. Gin, E.J. Crampin, D.A. Brown, T.J. Shuttleworth, D.I. Yule, J. Sneyd, A mathematical model of fluid secretion from a parotid acinar cell, J Theor Biol. 248 (2007) pp. 64-80.

[88] P.J. Bartlett, I. Cloete, J. Sneyd, A.P. Thomas, IP3-Dependent Ca2+ Oscillations Switch into a Dual Oscillator Mechanism in the Presence of PLC-Linked Hormones, iScience. 23 (2020) 101062.
[89] J.E. Melvin, D. Yule, T. Shuttleworth, T. Begenisich, Regulation of fluid and electrolyte

secretion in salivary gland acinar cells, Annu Rev Physiol. 67 (2005) pp. 445-469. [90] R.J. Turner, H. Sugiya, Understanding salivary fluid and protein secretion, Oral Dis. 8 (2002) pp. 3-11.

[91] J.D. Castle, Protein secretion by rat parotid acinar cells. Pathways and regulation, 842 (1998) Ann N Y Acad Sci. pp. 115-124.

[92] A.M. Castle, A.Y. Huang, J.D. Castle, The minor regulated pathway, a rapid component of salivary secretion, may provide docking/fusion sites for granule exocytosis at the apical surface of acinar cells, 115 (2002) J Cell Sci. pp. 2963-2973.

[93] O.H. Petersen, J.H. Poulsen, Inhibition of salivary secretion and secretary potentials by g-strophantin, dinitrophenol and cyanide, Acta Physiol Scand. 71 (1967) pp. 194-202.

[94] J.H. Poulsen, Acetylcholine-induced transport of Na+ and K+ in the perfused cat submandibular gland, Pflugers Arch. 349 (1974) pp. 215-220.

[95] P. Silva, J. Stoff, M. Field, L. Fine, J.N. Forrest, F.H. Epstein, Mechanism of active chloride secretion by shark rectal gland: role of Na-K-ATPase in chloride transport, Am J Phys. 233 (1977) 298-306.

[96] R.L. Evans, K. Park, R.J. Turner, G.E. Watson, H.V. Nguyen, M.R. Dennett, A.R. Hand, M. Flagella, G.E. Shull, J.E. Melvin, Severe impairment of salivation in Na+/K+/2Cl- cotransporter (NKCC1)-deficient mice. J Biol Chem. 275 (2000) pp. 26720-26726.

[97] J.R. Martinez, N. Cassity, Effect of transport inhibitors on secretion by perfused rat submandibular gland. Am J Phys. 245 (1983) pp. 711-716.

[98] I. Novak, J.A. Young, Two independent anion transport systems in rabbit mandibular salivary glands, Pflugers Arch. 407 (1986) pp. 649-656.

[99] M.A. Catalán, T. Nakamoto, J.E. Melvin, The salivary gland fluid secretion mechanism, J Med Invest, 56 (2009) Suppl pp. 192-196.

[100] T. Nakamoto, A. V.G. Srivastava, C.E. Ovitt, P. Perez-Cornejo, J. Arreola, T. Begenisich, J.E. Melvin, Functional and molecular characterization of the fluid secretion mechanism in human parotid acinar cells, Am J Physiol. Regul Integr Comp Physiol. 292 (2007) pp. 2380-2390.

[101] H. Kasai, Y.X. Li, Y. Miyashita, Subcellular distribution of Ca2+ release channels underlying Ca2+ waves and oscillations in exocrine pancreas, Cell. 74 (1993) pp. 669-677.

[102] T. Begenisich, J.E. Melvin, Regulation of chloride channels in secretory epithelia, J Membr Biol. 163 (1998) pp. 77-85.

[103] K. Nehrke, C.C. Quinn, T. Begenisich, Molecular identification of Ca2+-activated K+ channels in parotid acinar cells, Am J Physiol Cell Physiol. 284 (2003) pp. 535-546.

[104] V.G. Romanenko, T. Nakamoto, A. Srivastava, T. Begenisich, J.E. Melvin, Regulation of membrane potential and fluid secretion by Ca2+-activated K+ channels in mouse submandibular glands, J Physiol. 581 (2007) pp. 801-817.

[105] J.A. Mangos, N. McSherry, K. Irwin, R. Hong, Handling of water and electrolytes by rabbit parotid and submaxillary glands, Am J Phys. 225 (1973) pp. 450-455.

[106] J. Mangos, N. McSherry, S. Nousia-Arvanitakis, K. Irwin, Secretion and transductal fluxes of ions in exocrine glands of the mouse, Am J Phys. 225 (1973) pp. 18-24.

[107] J. Almassy, J.H. Won, T.B. Begenisich, D.I. Yule, Apical Ca2+-activated potassium channels in mouse parotid acinar cells, J Gen Physiol. 139 (2012) pp. 121-133.

[108] E. Rousseau, J.S. Smith, G. Meissner, Ryanodine modifies conductance and gating behavior of single Ca2+ release channel, Am J Physiol. 253 (1987) pp. 364-368.

[109] V. Romanenko, J. Thompson, T. Begenisich, Ca2+-activated K channels in parotid acinar cells: the functional basis for the hyperpolarized activation of BK channels, Channels (Austin). 4 (2010) pp. 278-288.

[110] J. Thompson, T. Begenisich, Membrane-delimited inhibition of maxi-K channel activity by the intermediate conductance Ca2+-activated K channel, J Gen Physiol. 127 (2006) pp. 159-169.

[111] J. Almassy, D.I. Yule, Analyzing Ca(2+) dynamics in intact epithelial cells using spatially limited flash photolysis, Cold Spring Harb Protoc. (2013) https://doi.org/10.1101/pdb.prot072777 [112] J. Almassy, D.I. Yule, Investigating ion channel distribution using a combination of spatially limited photolysis, Ca(2+) imaging, and patch clamp recording, Cold Spring Harb Protoc. (2013) https://doi.org/10.1101/pdb.prot072769

[113] J. Almassy, D.I. Yule, Studying the activation of epithelial ion channels using global whole-field photolysis, Cold Spring Harb Protoc. (2013) https://doi.org/10.1101/pdb.prot072751

[114] J. Almassy, D.I. Yule, Photolysis of caged compounds: studying Ca(2+) signaling and activation of Ca(2+)-dependent ion channels, Cold Spring Harb Protoc. (2013) https://doi.org/10.1101/pdb.top066076

[115] M.K. Park, R.B. Lomax, A.V. Tepikin, O.H. Petersen, Local uncaging of caged Ca(2+) reveals distribution of Ca(2+)-activated Cl(-) channels in pancreatic acinar cells, Proc Natl Acad Sci U S A. 98 (2001) pp. 10948-10953.

[116] J.H. Won, W.J. Cottrell, T.H. Foster, D.I. Yule, Ca2+ release dynamics in parotid and pancreatic exocrine acinar cells evoked by spatially limited flash photolysis, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 293 (2007) pp. 1166-1177.

[117] Y. Maruyama, D.V. Gallacher, O.H. Petersen Voltage and Ca2+-activated K+ channel in basolateral acinar cell membranes of mammalian salivary glands. Nature. 302 (1983) pp. 827-829.

[118] L. Palk, J. Sneyd, T.J. Shuttleworth, D.I. Yule, E.J. Crampin, A dynamic model of saliva secretion, J Theor Biol. 266 (2010) pp. 625-640.

[119] M. Bundgaard, M. Moller, J.H. Poulsen, Localization of sodium pump sites in cat salivary glands, J Physiol. 273 (1977) pp. 339-353.

[120] C.N. Conteas, A.A. McDonough, T.R. Kozlowski, C.B. Hensley, R.L. Wood, A.K. Mircheff, Mapping subcellular distribution of Na+-K+-ATPase in rat parotid gland, Am J Phys. 250 (1986) pp. 430-441.

[121] J.R. Garrett, J. Ekström, L.C. Anderson (eds), Glandular mechanisms of salivary secretion, Front Oral Biol Basel, Karger. 10 (1998) pp. 55-72.

[122] J.R. Garrett, D.C Winston, G.B. Proctor, B.A. Schulte, Na-K-ATPase in resting and stimulated submandibular salivary glands in cats, studied by means of ouabain-sensitive, K(+)-dependent p-nitrophenylphosphatase activity, Arch Oral Biol. 37 (1992) pp. 711-716.

[123] T. Iwano, M. Akayama, A. Yamamoto, K. Omori, T. Kumazawa, Y. Tashiro, Quantitative immunoelectron microscopic localization of (Na+,K+)ATPase in rat parotid gland. J Histochem Cytochem. 35 (1987) pp. 871-879.

[124] I. Nakagaki, T. Goto, S. Sasaki, Y. Imai, Histochemical and cytochemical localization of (Na+-K+)-activated adenosine triphosphatase in the acini of dog submandibular glands, J Histochem Cytochem. 26 (1978) pp. 835-845.

[125] O.H. Petersen, Oral physiology: proceedings of the international symposium held in Wenner-Gren center (edited by: Nils Emmelin, Yngve Zotterman) Pergamon Press Ltd. (1971) 21-31. [126] D.C. Winston, R.A. Hennigar, S.S. Spicer, J.R. Garrett, B.A. Schulte, Immunohistochemical localization of Na+-K+-ATPase in rodent and human salivary and lacrimal glands. J Histochem Cytochem. 36 (1988) pp. 1139-1145.

[127] D.C. Winston, B.A. Schulte, J.R. Garrett, G.B. Proctor, Na+, K(+)-ATPase in cat salivary glands and changes induced by nerve stimulation: an immunohistochemical study, J Histochem Cytochem. 38 (1990) pp. 1187-1191.

[128] J. Almássy, E. Siguenza, M. Skaliczki, K. Matesz, J. Sneyd, D.I. Yule, P.P. Nánási,

New saliva secretion model based on the expression of Na+-K+ pump and K+ channels in the apical membrane of parotid acinar cells, Pflügers Archiv Eur J Physiol. 470 (2018) 613-621.

# 9. Tárgyszavak

ion csatorna, rianodin receptor, RyR, vázizom, Ca<sup>2+</sup> felszabadulás, Sarco-endoplasmatikus retikulum Ca<sup>2+</sup> ATP-áz, SERCA, klorokrezol, parotis, acinus sejt, folyadék szekréció, BK csatorna, TMEM16A, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATP-áz

ion channel, ryanodine receptor, RyR, skeletal muscle,  $Ca^{2+}$  release, Sarco-endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  ATP-ase, SERCA, chlorocresol, parotis, acinar cell, fluid secretion, BK channel, TMEM16A, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATP-ase

# 10. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Élettani Intézetének igazgatójának, Dr. Csernoch Lászlónak és témavezetőimnek, Dr. Almássy Jánosnak és Prof. Dr. Nánási Péternek, hogy lehetőséget biztosítottak arra, hogy ez a disszertáció elkészülhessen.

# 11. Függelék

Az értekezést megalapozó közlemények gyűjteménye.


DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400 Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/104/2022.PL Tárgy:

PhD Publikációs Lista

Jelölt: Skaliczki Marianna Doktori Iskola: Fogorvostudományi Doktori Iskola

## A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

- 1. Skaliczki, M., Lukács, B., Magyar, Z. É., Kovács, T., Bárdi, M., Novák, S., Diszházi, G., Sárközi, S., Márton, I., Péli-Szabó, J., Jóna, I., Nánási, P. P., Almássy, J.: 4-chloro-orto-cresol activates ryanodine receptor more selectively and potently than 4-chloro-meta-cresol. Cell Calcium. 88, 102213, 2020. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102213 IF: 6.817
- 2. Almássy, J., Siguenza, E., Skaliczki, M., Matesz, K., Sneyd, J., Yule, D. I., Nánási, P. P.: New saliva secretion model based on the expression of Na+-K+ pump and K+ channels in the apical membrane of parotid acinar cells. Pflugers Arch. 470 (4), 613-621, 2018. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/s00424-018-2109-0 IF: 3.377





DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400 Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

## További közlemények

 Almássy, J., Diszházi, G., Skaliczki, M., Márton, I., Magyar, Z. É., Nánási, P. P., Yule, D. I.: Expression of BK channels and Na+-K+ pumps in the apical membrane of lacrimal acinar cells suggests a new molecular mechanism for primary tear-secretion. *Ocul. Surf.* 17 (2), 272-277, 2019. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.jtos.2019.01.007 IF: 12.336

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 22,53 A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 10,194

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

Debrecen, 2022.03.03.

