

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**A szívizom L-típusú kalciumcsatornájának
tetrodotoxin-érzékenysége**

Dr. Hegyi Bence

Témavezető: Dr. Szentandrassy Norbert



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2014

**A szívizom L-típusú kalciumcsatornájának
tetrodotoxin-érzékenysége**

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

Írta: Dr. Hegyi Bence okleveles orvos

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

Témavezető: Dr. Szentandrassy Norbert, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

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

A doktori szigorlat időpontja: DE ÁOK Orvosi Vegytani Intézet
2014. december 1. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Tóth Attila, az MTA doktora
Dr. Acsai Károly, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Virág László, az MTA doktora
tagok: Dr. Tóth Attila, az MTA doktora
Dr. Acsai Károly, PhD
Dr. Pórszász Róbert, PhD
Dr. Virág László, PhD

Az értekezés védésének időpontja: DE ÁOK Belgyógyászati Intézet
„A” épület tanterme
2014. december 1. 13 óra

BEVEZETÉS

Általánosan elfogadott nézet, hogy az egyes tengeri élőlényekben előforduló tetrodotoxin (TTX) a feszültségfüggő Na^+ csatornák igen szelektív gátlószere az emlősök ingerlékeny szöveteiben. Valóban ez a helyzet vázizom és idegszövetben, ahol a TTX nanomólos koncentrációban gátolja a nátriumáramot (I_{Na}) (a félmáximális gátláshoz szükséges koncentráció (IC_{50}) $\sim 10 \text{ nM}$). Azonban szívizmon a TTX csak mikromólos koncentrációban fejt ki hatékony Na^+ áram gátló hatást. Ennek következtében a I_{Na} teljes gátlásának eléréséhez a TTX-t akár $30 \text{ }\mu\text{M}$ -os koncentrációban kell alkalmaznunk az emlős szívizomsejteken.

TTX-érzékeny Ca^{2+} áram komponenst már korábban azonosítottak szívizomszövetben olyan patológiás állapotokban, mint például a hipertrófiás tengerimalac szívizom és infarktuson átesett patkány szív esetén. Továbbá számos szívizomszövetben, többek között ember, tengerimalac és patkány miokardiumban is leírták már egy olyan TTX-érzékeny áram jelenlétét, amelyet extracelluláris Na^+ hiányában Ca^{2+} közvetít. Ezekből a kísérletekből arra lehet következtetni, hogy valószínűleg a Ca^{2+} a töltéshordozó ionja ennek a Na^+ -mentes külső környezetben a Na^+ csatornákon keresztül folyó áramnak. Az előbb említett vizsgálatoknak megfelelően (vagyis Na^+ -mentes körülmények között) szíven a T-típusú Ca^{2+} áramot közvetítő legfontosabb izoformák ($\text{Ca}_v3.1$ és $\text{Ca}_v3.2$) TTX-rezisztensnek bizonyultak. Másrésztől azonban kevés információval rendelkezünk a TTX hatásáról az L-típusú Ca^{2+} csatorna ($\text{Ca}_v1.2$) esetén, egy egereken végzett vizsgálat kivételével, ahol azonban a TTX hatástalannak bizonyult. A kérdés tisztázása végett célul tűztük ki, hogy újra megvizsgáljuk a TTX L-típusú Ca^{2+} áramra ($I_{\text{Ca,L}}$) kifejtett hatását kutya bal kamrából izolált szívizomsejteken. Azért választottuk ezt a preparátumot, mivel ennek az elektrofiziológiai paramétereiről tudjuk, hogy a transzmembrán

ionáramok megoszlásának és kinetikai sajátosságainak tekintetében leginkább hasonlít a humánhoz.

Azért, hogy részleteiben megértsük, miként gátolja a TTX a feszültségfüggő $\text{Ca}_v1.2$ csatornákat egy elméleti modellt fejlesztettük ki a TTX $\text{Ca}_v1.2$ csatornákhöz való kötődésére. Ez a modell a $\text{Na}_v1.4$ csatorna szelektivitási filter régiójának a TTX molekulával alkotott komplexén és a $\text{Na}_v1.4$, $\text{Na}_v1.5$ és $\text{Ca}_v1.2$ csatornák közötti ismert homológián alapszik.

A TTX mérsékelt szelektivitása továbbá rávilágíthat arra, hogy szívizom feszültségfüggő ioncsatornáit gátló szerek kutatásban való és terápiás alkalmazása esetén óhatatlanul számolnunk keresztreakciók fellépésével.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák

A sejtfelszíni membránban elhelyezkedő feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák a fő közvetítői a membrán depolarizáció lokális intracelluláris Ca^{2+} tranziensekké alakításának, amely számos élettani jelenség kiindulópontját képezi. A feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák a membrán depolarizációra megnyílnak, ekkor rajtuk keresztül Ca^{2+} beáramlás történik, amely sokféle különböző sejttypusban olyan intracelluláris folyamatokat szabályoz, mint például az izomkontrakció, a szekréció, a neurotranszmisszió, a génexpressziós folyamatok és számos enzim aktivitása.

A Ca^{2+} csatornák 4 vagy 5 alegységből felépülő komplex fehérjék, amelyek kódolásában relatíve sok gén vesz részt. Az alegységek közül a 190-250 kDa közötti α_1 a legnagyobb, amely magában foglalja a csatorna pórusát, a feszültség szenzort, a kapuzási apparátust és a csatorna szabályozásában szerepet játszó legtöbb kötőhelyet, amelyekhez másodlagos hírvivők, gyógyszerek, valamint bizonyos toxinok kötődhetnek. A Na^+ csatornák α alegységéhez hasonlóan a feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák α_1 alegysége is négy homológ

doménból (I-IV) épül fel, amelyek mindegyike hat transzmembrán szegmenst (S1-S6) tartalmaz. Feszültségérzékelőként itt is az S4 szegmens szolgál, valamint az S5 és S6 transzmembrán szegmensek közötti pórusformáló hurok határozza meg az ionszelektivitást és konduktanciát. A feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák szelektivitási filterét kialakító aminosav szekvencia a glutamát-glutamát-X-X (ún. EEXX gyűrű). A teljes egészében intracellulárisan elhelyezkedő β alegységek ($\beta_1 - \beta_4$) a csatorna kifejeződését közel tízszeresére növelik és gyorsítják az aktivációs és inaktivációs kinetikát. A transzmembrán helyzetű, diszulfid híddal kapcsolt α_2/δ alegység is szerepet játszik a legtöbb Ca^{2+} csatorna felépítésében. A γ alegység típusosan a vázizom Ca^{2+} csatornában található meg, míg hasonló alegységek az agyban és a szívben ugyancsak kifejeződésre kerülnek. Jóllehet ezek a járulékos alegységek befolyásolják a csatorna tulajdonságait, a Ca^{2+} csatornák farmakológiai és elektrofiziológiai sokfélesége elsősorban a különböző α_1 alegységek jelenlétéből fakad. A szívizomban döntően a $\text{Ca}_v1.2$ csatorna fordul elő, amely az ún. L-típusú kalciumáramot hozza létre.

Az L-típusú Ca^{2+} csatornák kamrai szívizomsejteken főként a szarkolemmában találhatók, mégpedig legnagyobb számban a T-tubulusoknak a szarkoplazmatikus retikulum (SR) felé eső felszínén. A $\text{Ca}_v1.2$ csatornák megnyílása közvetítette Ca^{2+} beáramlás az SR-ből történő Ca^{2+} -indukált Ca^{2+} -felszabadulási mechanizmus legfontosabb élettani kiváltó tényezője. Az $I_{\text{Ca,L}}$ fontos szerepet játszik az excitáció-kontrakció csatolásban, befolyásolja az akciós potenciál alakját és kóros működése szívritmuszavarok kialakulásához vezethet.

A L-típusú Ca^{2+} csatornákat -40 mV -nál pozitívabb feszültségértékek aktiválják, az áram 0 és $+10 \text{ mV}$ között éri el maximális amplitúdóját, tehát egy U alakú áram-feszültség összefüggéssel rendelkezik. Kinetikáját tekintve aktivációja gyors, inaktivációja viszonylag lassú. Az áram inaktivációjának időviszonyait egy gyors és egy lassú időkonstans összegeként lehet legjobban

leírni. Az aktivációs időállandója nagyságrendileg 2-3 ms, míg az inaktiváció gyors és lassú komponensének időállandói a 10 és a 100 ms-os tartományba esnek. Az $I_{Ca,L}$ időfüggő inaktivációja mind Ca^{2+} -, mind feszültségfüggő. A Ca^{2+} -függő inaktiváció relatív hozzájárulása a teljes inaktivációhoz negatív feszültségértékeken nagyobb, ahol a feszültségfüggő inaktiváció mértéke csekély. β -adrenerg stimuláció során is a Ca^{2+} -függő inaktiváció válik a meghatározó mechanizmussá, egyrészt a megnövekvő szisztolés ic. Ca^{2+} koncentráció, másrészt a feszültségfüggő inaktiváció lassulása következtében. A Ca^{2+} -függő inaktiváció a Ca^{2+} belépés szabályozásában egyfajta negatív visszacsatolási folyamatként szolgál és ezáltal egy élettani védelmi mechanizmust képezhet a sejtek veszélyes Ca^{2+} -túltöltődése ellen.

A tetrodotoxin hatása a feszültségfüggő Na^+ csatornákon

A tetrodotoxint széleskörűen használják a gyors Na^+ csatornák gátlására a kísérleti kutatásokban. A feszültségfüggő Na^+ csatornák szinte minden altípusát kimutatták már az emlős szív különböző régióiban, jóllehet az emlős kamrai miokardiumban túlnyomórészt a $Na_v1.5$ altípus van jelen. A vázizmokkal és idegszövettel ellentétben, ahol a fő feszültségfüggő Na^+ csatorna altípusok TTX-érzékenyek (nanomólos nagyságrendű a IC_{50} értéke), a $Na_v1.5$ csatorna viszonylag rezisztens a TTX-ra (mikromólos nagyságrendű a IC_{50} értéke). Az előbb említett TTX-érzékenységbeli különbségek következtében, közel százszor vagy ezerszer magasabb koncentrációjú TTX-ra van szükség a szív gyors Na^+ csatornájának gátlására, mint vázizom vagy idegi preparátumok esetében. Számos vizsgálat számolt már be azonban a Ca^{2+} -áram egy TTX által gátolható részéről ($I_{Ca(TTX)}$) is, amikor a toxint ilyen magas (mikromólos) koncentrációban alkalmazták.

Áttekintés az eddig leírt tetrodotoxin-érzékeny Ca^{2+} áramokról

TTX-érzékeny Ca^{2+} áram komponensét számos fajban leírták már, többek között szivárványos pisztráng, egér, patkány, tengerimalac, kutya és emberi szívműködésben. Továbbá heterológ transzfektált sejtekben és idegi preparátumokon is beszámoltak már TTX-érzékeny Ca^{2+} áram jelenlétéről. Egészen az utóbbi évekig a tetrodotoxint a feszültségfüggő Na^+ csatornák egyik legszelektívebb gátlószerének tekintették. Habár a TTX-által gátolható Ca^{2+} áramot már sok évvel ezelőtt felismerték, azt gondolták, hogy azt feltehetően Na^+ csatornák közvetítik. A tetrodotoxinnal gátolható kalciumáram eredete még most sem teljesen világos, azonban 2 alternatív elmélet alakult ki a magyarázatára. (1) A klasszikus gyors Na^+ csatornák kapuzási tulajdonságai változnak meg speciális körülmények között az ionszelektivitás csökkenését eredményezve. (2) A Na^+ csatornák egy külön populációjának feltételezi már fiziológiai körülmények között is bizonyos fajokban. Annak a ténye, hogy a $I_{\text{Ca(TTX)}}$ már fiziológiai ionkörnyezetben is kimutatható volt a második magyarázattal van összhangban.

Az első lehetőséget tekintve arra lehet következtetni, hogy a $I_{\text{Ca(TTX)}}$ csak speciális körülmények között fordul elő, mint pl. külső Na^+ -hiányában, a β -adrenerg útvonal izoproterenollal vagy cAMP-vel kiváltott aktivációja során, vagy kardioprotektív szteroidok, mint pl. ouabain és digoxin alkalmazását követően. Ezen első hipotézis szerint a Ca^{2+} a klasszikus szív Na^+ csatornákon ($\text{Na}_v1.5$) keresztül folyik Na^+ -mentes külső oldat esetén az ion szelektivitást reverzibilisen módosítva. Santana és mtsai. szerint pedig a klasszikus Na^+ csatornák foszforiláció (β -adrenerg aktiváció következtében) vagy nanomólos koncentrációjú kardioprotektív szteroid (pl. ouabain) hatására „promiszkuitus” válnak, lehetővé téve a Ca^{2+} átlépését is a megváltozott csatornán. A csatornaállapot e tulajdonságát a leírói „csúszó állapotú vezetőképességnek” (slip-mode conductance) nevezték el.

A második hipotézisnek megfelelően, Aggarwal és mtsai., valamint Chen-Izu és mtsai. felvetették, hogy a $I_{Ca(TTX)}$ -ot a klasszikus szívizom Na^+ csatornáktól ($Na_v1.5$) különböző, új Na^+ csatorna fehérje hozza létre. Ezt a feltevést számos tény támasztja alá. (a) Eltérő kinetikai tulajdonságokat észleltek: a $I_{Ca(TTX)}$ lassabban aktiválódik és inaktiválódik, mint a klasszikus szív Na^+ áram. (b) A $I_{Ca(TTX)}$ aktivációjának és inaktivációjának feszültségfüggése a negatívabb membránpotenciálok irányába tolódott. (c) Különböző permeabilitási sajátságok: a $Na_v1.5$ csatornák nagyon csekély permeabilitást mutatnak Ca^{2+} -ra és Cs^+ -ra, míg a $I_{Ca(TTX)}$ -ért felelős csatornák lényegesen nagyobb permeabilitással rendelkeznek ezen kationokra. (d) A TTX-érzékenység is valamelyest különböző, a $I_{Ca(TTX)}$ esetén magasabb a IC_{50} érték. (e) Az áram amplitúdója (és következésképpen a csatorna denzitása) jóval alacsonyabb a $I_{Ca(TTX)}$ esetén. Azonban a $I_{Ca(TTX)}$ -ot létrehozó csatornák mégis Na^+ csatornák, mert még magas extracelluláris Ca^{2+} koncentrációknál is nagyobb Na^+ permeabilitással bírnak, és farmakológiai profiljuk is a Na^+ csatornákéval vág egybe, mivel az áramot a nifedipin, a La^{3+} vagy a Ni^{2+} nem befolyásolja, míg a skorpió toxinokra és a veratridinre nagy érzékenységet mutatnak.

Su és mtsai., valamint Sun és mtsai. már korábban bebizonyították, hogy a nagy koncentrációjú saxitoxin gátolja a T-típusú és L-típusú Ca^{2+} csatornákat, és ez a felismerés némileg csorbította a heterociklikus guanidin csoportot tartalmalmazó tengeri toxinok kiemelkedő csatorna szelektivitását. Azonban a TTX direkt Ca^{2+} -csatorna gátló hatását még nem írták le szívizomsejteken. Továbbá mostanáig csak néhány kísérletben számoltak be a $I_{Ca(TTX)}$ -ról nagyobb emlősök (mint pl. kutya és ember) szívében. Ezek közül egyet szívelégtelenségben szenvedő humán preparátumon, kettőt pedig pitvari miocitákon végeztek. Szívelégtelenségben azonban a miokardiális sejtek eléggé különböző ioncsatorna expressziós mintázatot mutatnak az egészségesekhez képest. Fiziológias körülmények között nagyobb emlősök szívében a Na^+ csatornák által létrehozott $I_{Ca(TTX)}$ -ot még nem írták le, ezek a csatornák úgy

tűnik a rácsálók sajátosságai, mint pl. a patkány, az egér és a tengerimalac, illetve patológiás szívben is megfigyelhetőek miokardiális átépülés után.

A szív feszültségfüggő Na^+ és Ca^{2+} csatornáin ható szerek mérsékelt szelektivitása

A feszültségfüggő Na^+ és Ca^{2+} csatorna gátlószereit kiterjedten alkalmazzák a mindennapi gyakorlatban szinte az összes orvosi szakterületen és az orvosbiológiai kutatásokban is. Ezen szerek között olyan gyakori gyógyszercsoportok találhatóak, mint pl. a helyi érzéstelenítők, antiaritmiás szerek, antiepileptikumok, antidepresszánsok és egyes vérnyomáscsökkentők. A szív feszültségfüggő Na^+ és Ca^{2+} csatornáin ható szerek esetén azonban gyakorta számolnak be keresztreakcióról a szerkezetileg hasonló, viszont nem elsődlegesen érintett csatorna típussal (pl. Ca^{2+} csatorna gátlók a Na^+ csatornákra is hatnak és fordítva). Ez a kölcsönhatás általában nem előnyös, különösképp kísérleti körülmények között, amikor egy adott ioncsatorna áramát önmagában akarjuk megmérni, de a klinikai gyakorlatban is jelentős mellékhatásokat okozhat. Ez a jelenség jóval gyakoribb, mintsem hogy az csupán egy váratlan, nem kívánt esemény következménye lenne. Másrészt a keresztreakció elméletileg néhány speciális esetben akár hasznos is lehet, ideértve az olyan antiaritmiás szereket, mint pl. a lidokain és a verapamil, jóllehet a proaritmiás tulajdonságuk ezáltal szintén növekedhet. A Na^+ és Ca^{2+} csatorna gátlók kiterjedt klinikai alkalmazását tekintve valószínűnek tűnik, hogy a korlátozott szelektivitás nem jelent szükségszerűen hátrányt, mivel az ezen szerekkel végzett kezelés gyakran nagyon hatásos. A molekuláris hasonlóságok alapján a feszültségfüggő Na^+ és Ca^{2+} csatornák egy közös őst feltételezik, így a jelenség a négy doménnel rendelkező csatornák evolúciójára vezethető vissza. A feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák a feszültségfüggő Na^+ és egyes feszültségfüggő K^+ csatornákkal együtt egy ioncsatorna szupercsalád tagjai.

CÉLKITŰZÉS

Számos munkacsoport vizsgálta már a TTX által gátolt Ca^{2+} áram sajátosságait különböző ingerelhető szövetekben, köztük szívizmon is. A közölt adatok fajfüggőek és egymásnak részben ellentmondóak, ezért célkitűzéseink a következők voltak:

1. A TTX koncentrációfüggő hatásának vizsgálata kutya kamrai szívizomsejtek L-típusú Ca^{2+} áramának amplitúdójára, feszültségfüggésére és inaktivációs kinetikájára.
2. A TTX gátlás használatfüggő tulajdonságának vizsgálata az L-típusú Ca^{2+} csatornán.
3. A TTX L-típusú Ca^{2+} csatornához való kötődésének befolyásolása a csatorna foszforilálása, a pH és a redoxpotenciál megváltoztatása által és ezen behatások eredményének részletes elemzése kötődési modell felhasználásával.
4. A TTX lehetséges kötődési helyének számítógépes modellezése a szívizom gyors, feszültségfüggő Na^+ - ($\text{Na}_v1.5$) és L-típusú Ca^{2+} csatornáján ($\text{Ca}_v1.2$).
5. A TTX hatásának vizsgálata HEK tsA-201 sejteken expresszált $\text{Ca}_v1.2$ csatornákon.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kutya bal kamrai szívizomsejtek izolálása

Kísérleteinket kutyák szívének bal kamrájából enzimatikusan izolált szívizomsejteken végeztük. A sejteket ivarérett, kísérleti célra tenyésztett kutyák szívéből nyertük, az anterográd szegmensperfúziós technika alkalmazásával.

Az izolálást követően a szuszpenzióban levő sejtek mintegy 30-60 %-a szabályos téglalap alakú, ép harántcsíkolatú, éles szélű és tiszta citoplazmával rendelkező. A sejtizolálás befejezése után 2-3 órával kezdtük meg a kísérletek

végzését. Felhasználásig a sejteket 14 °C-on Minimum Essential Medium Eagle oldatban (pH=7,3) tároltuk.

Ca_v1.2 csatornát expresszáló HEK tsA-201 sejtek előállítása

A Ca_v1.2 csatornát kódoló CACNA1C gént tartalmazó plazmidot (Prof. Dr. Charles Antzelevitch ajándéka) a zöld fluoreszcens proteint (EGFP) kódoló plazmiddal együtt HEK tsA-201 sejtekbe kotranszfektáltuk. Az EGFP pozitív transzfektált sejteket Nikon TE2000-U fluoreszcens mikroszkóp segítségével azonosítottuk. Az EGFP pozitív sejtek több mint 70 %-án fejeződött ki a Ca_v1.2 ioncsatorna. Az ionáram méréseket 24 órával a transzfekeciót követően végeztük.

Elektrofiziológiai mérések

A kísérletek kezdetekor a sejteket 37 °C hőmérsékleten tartott, 1 ml térfogatú plexi mérőkádba helyeztük. A kádban levő sejteket folyamatosan perfundáltuk oxigenizált Tyrode oldattal (pH=7,4). Az elektrofiziológiai mérések kivitelezéséhez Axoclamp 2B (Axon Instruments), illetve MultiClamp 700B (Molecular Devices) erősítőket használtunk. A kimenő jeleket Digidata 1440A készülékkel (Molecular Devices) végzett analóg-digitális átalakítás után 100 kHz-es mintavételezési gyakorisággal rögzítettük szoftveres kontroll mellett (pClamp 6.0 és 10.0).

A mérésekhez 2-3 MΩ ellenállású boroszilikát mikroelektrodákat használtunk a patch-clamp technika teljes-sejtes elrendezésében. A sejtek kapacitását minden kísérlet előtt egy rövid, -10 mV-ról -20 mV-ra történő hiperpolarizáló pulzus segítségével határoztuk meg és az ionáramokat az így kapott sejtkapacitásra vonatkoztattuk. A mérések során a soros ellenállás általában 4-8 MΩ-nak adódott, amelyet 50-80 %-ban kompenzáltunk. A mérések során a Ca²⁺-áramot megfelelő ioncsatorna-gátló szerek és feszültség protokollok alkalmazásával különítettük el.

Ionáram mérés akciós potenciál-clamp technika alkalmazásával

A szívizomsejtek akciós potenciálját áram-clamp üzemmódban rögzítettük a patch pipetta segítségével, miközben a sejteket folyamatosan 1 Hz-es frekvenciájú, 1 ms széles, küszöb feletti négyszögjellel ingereltük. A sejtekről így elvezetett akciós potenciált használtuk ugyanazon a sejten és ugyanolyan ingerlési frekvenciával feszültségparancsként, immár feszültség-clamp módban. Az így kapott áramjel - a kezdeti kapacitív tranziens kivételével — egy nulla értéken futó vízszintes vonal volt. A TTX-érzékeny áram profilját úgy kaptuk meg, hogy a szer alkalmazása után rögzített görbét kivontuk a szer előtt felvett áramjelből. Ennek megfelelően a TTX-érzékeny áram egy befelé irányuló (inward) áramnak felelt meg.

A tetrodotoxin kötődésének modellezése a $\text{Ca}_v1.2$ és $\text{Na}_v1.5$ csatornákhöz

A feszültségfüggő $\text{Na}_v1.4$ csatorna szelektivitási filter régiójának a tetrodotoxinnal alkotott komplexéről egy teoretikus struktúrát Tikhonov és Zhorov már korábban publikált, amelynek geometriáját kiindulópontnak tekintettük a humán $\text{Na}_v1.5$ és $\text{Ca}_v1.2$ csatornáknak a tetrodotoxinnal alkotott komplexéről készített modellünk tervezésekor. A $\text{Na}_v1.4$ és $\text{Na}_v1.5$, valamint a $\text{Na}_v1.4$ és $\text{Ca}_v1.2$ szekvenciája közötti egyezés Sun és mtsai., valamint Tikhonov és Zhorov közleményei alapján részletekbe menően ismert már, amelyet módosítás nélkül átvettünk. Ezen modellekben a Na^+ csatornák meglehetősen konzervált DEKA gyűrűje megfelel a Ca^{2+} csatornák konzervált EEXX gyűrűjének. A YASARA programcsomaggal végeztük a $\text{Na}_v1.4$ átalakítását $\text{Na}_v1.5$ -té és $\text{Ca}_v1.2$ -vé, a megfelelő módosítások végrehajtásával. Ugyanezen szoftver szolgált a TTX- $\text{Na}_v1.5$ és a TTX- $\text{Ca}_v1.2$ által alkotott komplexek kötődési energiáinak minimalizálására. A komplexek geometriájának grafikai ábrázolására a szoftvercsomag CHIMERA alkalmazását használtuk. A kötődési szimulációkat az AMBER 12 szoftvercsomag használatával hajtottuk végre, míg

a megjelenítést a vizuális molekuláris dinamikai (VMD) programcsomag alkalmazásával végeztük.

Statisztikai elemzés

A közölt adatok a kísérleti eredmények számtani középértékei $\pm$ a középérték körüli standard hiba. A csoportok összehasonlítása során egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA), Student-féle kétmintás t-próbát vagy önkontrollos t-próbát alkalmaztunk az adott statisztikai kérdésnek megfelelően. Az eltéréseket $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

Minden elvégzett vizsgálat összhangban volt a „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (US NIH publikációs száma: 85-23., 1996-ban revideált változat) és a Helsinki Deklaráció alapelveivel. A kísérleti protokollt a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatetikai Bizottsága is jóváhagyta.

EREDMÉNYEK

A tetrodotoxin L-típusú Ca^{2+} csatorna gátlása

Először a TTX hatását egy olyan viszonylag magas koncentrációban ($30 \mu\text{M}$) vizsgáltuk, amely koncentrációt ugyanakkor gyakorta használják különböző vizsgálatokban a szív nátriumáramának teljes gátlására. $30 \mu\text{M}$ TTX gyakorlatilag nullára csökkentette a nátriumáramot, azonban az L-típusú kalciumáramot is szignifikáns módon gátolta. Az $I_{\text{Ca,L}}$ amplitúdója a kontroll $8,61 \pm 1,09 \text{ pA/pF}$ értékről $30 \mu\text{M}$ TTX perfúzióját követően $6,08 \pm 1,05 \text{ pA/pF}$ -ra csökkent ($n=4$, $p < 0,01$). Ugyanakkor fontos azt is hangsúlyozni, hogy a TTX által kiváltott $I_{\text{Ca,L}}$ gátlás gyorsan kialakult és reverzibilisnek bizonyult minden alkalommal.

A tetrodotoxint emelkedő koncentrációban alkalmazva progresszív $I_{Ca,L}$ gátlást figyeltünk meg. Négy sejten mért értékek átlagát Hill egyenlettel illesztve a félgátló koncentráció értéke $55 \pm 2 \mu\text{M}$ -nak adódott. A Hill koefficiens megközelítőleg 1-es értéke ($1,01 \pm 0,04$) a TTX egy kötőhelyét sugallja a Ca^{2+} csatornán.

Mivel számos gátlószer úgy fejt ki hatását, hogy a csatornán folyó áram feszültségfüggését pozitívabb membránpotenciálok felé tolja el, ezért megvizsgáltuk a TTX hatását az L-típusú kalciumáram feszültségfüggésére. A TTX szignifikánsan csökkentette a csatornán átfolyó áram amplitúdóját a vizsgált teljes feszültségtartományban, azonban annak áram-feszültség karakterisztikáját nem változtatta meg, tehát a maximális áramamplitúdó a kontroll viszonyokhoz hasonlóan +5 mV-nál volt mérhető.

Az $I_{Ca,L}$ inaktivációja az irodalmi adatoknak megfelelően biexponenciális kinetikát követett, ennek megfelelően a szer $I_{Ca,L}$ inaktivációjának időfüggésére kifejtett hatását az áram biexponenciális illesztésével jellemeztük. Az inaktiváció időkonstansainak értékében nem volt megfigyelhető változás, azonban $30 \mu\text{M}$ TTX szignifikánsan csökkentette mind a gyors, mind a lassú komponens amplitúdóját.

Lényegbevágó volt annak igazolása, hogy a kísérleti körülmények között regisztrált áram valóban L-típusú Ca^{2+} áram. Ennek bebizonyítására $30 \mu\text{M}$ TTX hatását a $I_{Ca,L}$ egyik legszelektívebb gátlószerének tartott nizoldipin jelenlétében vizsgáltuk. Az $I_{Ca,L}$ $30 \mu\text{M}$ TTX általi részleges gátlása után fennmaradó áramot a nizoldipin sikeresen eliminálta. Majd egy másik kísérletsorozatban a nizoldipin az $I_{Ca,L}$ 93 %-át gátolta, és a TTX nizoldipin jelenlétében már nem változtatta meg szignifikánsan az áramot, ezzel bizonyítva, a mért áram L-típusú kalciumáram eredetét.

Egy ionáram profilja feltűnően különbözhet, amikor azt konvencionális feszültség-clamp és akciós potenciál-clamp körülmények között összehasonlítjuk. Az akciós potenciál feszültség-clamp technika egyik előnye,

hogy lehetővé teszi számunkra egy adott szívizomsejten a saját akciós potenciálja alatt folyó valódi áramprofil rögzítését. Akciós potenciál-clamp körülmények között vizsgálva a 30 μM TTX alkalmazásakor kapott áramgörbén két befelé irányuló (inward) áramcsúcs szerepelt. Az első befelé irányuló áramcsúcsnak további 2 komponensét lehetet elkülöníteni, amelyek közül az egyik a gyors nátriumcsatornák gátlásának a következménye, a másik pedig az L-típusú kalciumcsatorna gátlására jellemző mintázatot mutatott. Az akciós potenciál plató fázisára eső második áramcsúcs létrejöttében ugyanakkor kizárólag az L-típusú kalciumcsatorna szerepe valószínűsíthető. A munkacsoportunk már korábban megállapította azt, hogy a kétcsúcsú kalciumáram a szubepikardiális kamrai szívizomsejtek jellemző tulajdonsága. A TTX kimosását követően mindkét befelé irányuló áramcsúcs eltűnt, tehát a TTX ezen hatása teljesen reverzibilis volt. Ezt követően megismételtük a kísérletet nizoldipin jelenlétében. Ekkor 30 μM TTX alkalmazásakor csak egy igen keskeny befelé irányuló áramot figyelhetünk meg, amely a nátriumáram gátlásának felel meg. A TTX hatása ekkor is kimoshatónak bizonyult. Ezen eredmények határozottan alátámasztják azon feltételezésünket, hogy a kutya kamrai sejtekben talált TTX-érzékeny áram ténylegesen tartalmaz $I_{\text{Ca,L}}$ komponenst is.

A TTX okozta $I_{\text{Ca,L}}$ gátlás használatfüggő (use-dependens) jellege

A kalciumáramot az eddig bemutatott kísérletek során 200 ms hosszú depolarizáló impulzussal váltottuk ki 0,2 Hz-es frekvencián, vagyis 5 másodpercenként. Ez elég hosszú időintervallum ahhoz, hogy az L-típusú Ca^{2+} csatornák inaktivációból aktiválható állapotba való visszatérése teljes legyen, ezért a TTX ezen körülmények között megfigyelt hatását úgy tekinthetjük, mint a tónusos gátlás nagyságát. Azonban amikor az ingerlési ciklushosszat 1 másodpercre csökkentettük, szignifikáns frekvenciafüggő gátlást tapasztaltunk 10 μM TTX jelenlétében. A frekvenciafüggő gátlás nagysága $12,7 \pm 1,0$ % volt

szemben a TTX alkalmazása nélkül megfigyelhető $4,3 \pm 1,1$ %-os $I_{Ca,L}$ amplitúdó csökkenéssel ($p < 0,05$, $n=6$). Az ekkor alkalmazott hosszú impulzusok nem tették lehetővé a TTX hatásának vizsgálatát nagyobb ingerlési frekvenciák mellett, ezért arra rövid, csupán 10 ms hosszúságú depolarizáló impulzusokat alkalmaztunk. Meglepetésre, e rövid impulzusok 10 μ M TTX jelenlétében $I_{Ca,L}$ frekvenciafüggő növekedését okozták, viszont kontroll körülmények között semmiféle változás nem volt megfigyelhető. Az $I_{Ca,L}$ amplitúdó növekedése nagyobb volt magasabb ingerlési frekvenciáknál: 5 s, 1 s és 0,3 s ciklushosszak alkalmazásakor sorrendben $2,1 \pm 1,1$ %-ot, $3,9 \pm 1,2$ %-ot és $6,3 \pm 1,2$ %-ot ért el. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a TTX a tónusos gátláson felül egy frekvenciafüggő gátlást is kivált, jöllehet, ennek a gátlásnak a nagysága a tónusos komponenshez képest viszonylag mérsékelt volt. Még fontosabb, hogy a TTX által kiváltott $I_{Ca,L}$ gátlás úgy tűnik, hogy a nyugalmi és inaktivált csatornaállapotokra korlátozódik, mivel a csatorna gyakori nyitása (magas frekvenciájú rövid depolarizáló impulzusok alkalmazásával) a gátlás csökkenését eredményezte. Ez azt sugallja, hogy a TTX affinitása a nyitott csatorna állapot iránt feltűnően alacsonyabb.

Az $I_{Ca,L}$ modulációjának hatása a TTX általi áramgátlásra

Ioncsatorna foszforiláció hatása

Mivel a csatorna foszforilációja az $I_{Ca,L}$ szabályozásának egyik leghatékonyabb módja számos ingerlékeny és nem-ingerlékeny szövetben, ezért összehasonlítottuk a TTX gátló hatását natív- és protein-kináz A (PKA) által foszforilált kalciumcsatornákon. A forskolinról ismert, hogy az adenilát-cikláz stabil aktivációját váltja ki, amely a cAMP szint kifejezett emelkedését okozva aktiválja a PKA-t. A PKA felelős a kalciumcsatorna pórusformáló α_1 és a járulékos β alegység foszforilációjáért. Ez a foszforiláció – allosztérikus kölcsönhatásokon keresztül – jelentősen növeli a pórusformáló α_1 csatorna

alegység nyitási valószínűségét, míg a szelektivitási filteren kifejtett hatása csekély. 3 μM forskolin szignifikánsan növelte az $I_{\text{Ca,L}}$ amplitúdóját ($5,5 \pm 0,4$ pA/pF-ról $16,3 \pm 0,8$ pA/pF-ra, $n=5$). A TTX koncentrációfüggően és reverzibilisen gátolta az $I_{\text{Ca,L}}$ -ot a forskolinnal kezelt kardiomiocitákon. Az adatokat Hill-egyenlettel illesztve a kontroll körülményekhez nagyon hasonló IC_{50} értéket kaptunk forskolinban is, mégpedig 50 ± 5 μM -t ($n=5$). A Hill-koefficiens értéke $1,02 \pm 0,09$ volt forskolin jelenlétében.

Extracelluláris pH változtatás hatása

A kalciumcsatorna TTX-érzékenységeinek bemutatására konstruált modellünk azt vetíti előre, hogy a TTX a csatorna szelektivitási filteréhez kötődik. Pontosabban ez a kapcsolat a csatorna negatívan töltött szelektivitási filter régiója (fiziológias tartományhoz közeli pH értéken) és a toxin pozitívan töltött guanidin csoportja között jön létre. Következésképpen az elektrosztatikus interakció erősségének változtatása a protonált állapot növelésével vagy csökkentésével a csatorna szelektivitási filter régiójában vagy magában a TTX-ban vélhetően módosítja a TTX által kiváltott gátlás mértékét. Feltevésünk igazolódott, az 55 μM TTX által okozott $I_{\text{Ca,L}}$ gátlást (amely a fiziológias 7,4-es pH érték mellett a dózis-hatás görbe alapján pontosan 50 %) az alkalózis szignifikánsan csökkentette (pH=8,4 esetén 26 ± 2 %-ra, $n=6$), míg az acidózis növelte (pH=6,4 esetén 60 ± 2 %-ra, $n=6$).

Redoxpotenciál változtatásának hatása

A redoxpotenciál változtatások hatása nagyon hasonló volt ahhoz, ami a pH változtatásánál bemutatásra került. Ennek megfelelően a 100 μM H_2O_2 alkalmazásával létrehozott erősen oxidáló környezetben 55 μM TTX csak 31 ± 3 %-ban gátolta az $I_{\text{Ca,L}}$ -ot ($n=5$), ellentétben a redukáló környezetben

(1 mM redukált glutation + 1 mM aszkorbinsav + 1 mM ditiotreitolt) megfigyelt 62 ± 6 %-os $I_{Ca,L}$ gátlással ($n=8$).

A TTX kötődésének modellezése a $Na_v1.5$ és $Ca_v1.2$ csatornákhöz

Abból a célból, hogy részleteiben megértsük a feszültségfüggő $Ca_v1.2$ és $Na_v1.5$ csatornák TTX általi gátlását, elengedhetetlen információval rendelkezünk a szelektivitási filterük szerkezetéről. Az eredetileg $Na_v1.4$ csatornákra kidolgozott elméleti modell alapján terveztük meg a TTX-nak a szívizomban leginkább előforduló feszültségfüggő Na^+ és Ca^{2+} csatorna típusokhoz ($Na_v1.5$ és $Ca_v1.2$) való kötődését leíró modelljét. Kötődési modellünkben a TTX guanidin csoportja – a $Na_v1.4$ csatornákhöz hasonlóan – a $Na_v1.5$ csatorna szelektivitási filterének D (aszpartát) és E (glutamát) aminosavaihoz kötődik az I-es és II-es doménben. A szelektivitási filter régió további savas aminosavai szintén hozzájárulhatnak a ligand megkötéséhez direkt vagy indirekt módon. Ez a kapcsolat a ligand kötődés üregében egy negatív elektrosztatikus potenciál képződésével valósul meg. A TTX hidrofób oldala a triptofán oldalláncával kerül kölcsönhatásba, amely triptofán aminosavak (W904, W1421) feltételezhetően az ion áthaladásban is szerepet játszanak.

Annak ellenére, hogy a $Ca_v1.2$ szelektivitási filter régiójának erősen konzervált EEEE gyűrűje még inkább savi karakterű, csak egy E (glutamát) képes sóhidat kialakítani a TTX-nal (E736), amikor az a $Ca_v1.2$ -höz kötődik. Ezen kívül még egy, a már említett glutamátot követő aszpartát oldallánc (mindkettő a II-es doménben) járulhat hozzá a TTX megkötéséhez. Néhány további aminosav is részt vehet a TTX receptorhelyének kialakításában, azonban az ő hozzájárulásuk kevésbé tűnik fontosnak. Meg kell említeni azt is, hogy a konzervált triptofán aminosavaknak (W1145, W1146) nem elhanyagolható szerepük lehet a ligand kötődési üreg kialakításában és/vagy a ligand kötésének lipofil kölcsönhatásában. A modellünk szerint az is nyilvánvaló, hogy a TTX molekulával direkt kapcsolatba kerülő funkciós csoportok száma a $Ca_v1.2$ esetén

kisebb, mint a $\text{Na}_v1.5$ -nél. Ezen eredmények egy gyengébb kölcsönhatást jósolnak a $\text{Ca}_v1.2$ és a TTX között, mint a $\text{Na}_v1.5$ és a TTX komplexében, amely végső soron a TTX $\text{Ca}_v1.2$ -vel szembeni csökkent gátló hatékonyságát eredményezi.

Mivel a TTX molekula leginkább savi karakterű OH-csoportjának pK_a értéke (8,7) viszonylag közel esik a kísérleteink során alkalmazott 6,4 – 8,4-es pH tartományhoz, a TTX-nak mind a protonált formáját (azaz a protonált guanidin csoportja és a C-10-es pozíciójú semleges OH-csoportja következtében pozitív töltésű alakját), mind a semleges formáját (a TTX guanidin csoportja még protonált, viszont a C-10-es pozíciójú OH-csoport deprotonált $[-\text{O}^-]$) figyelembe vettük a számítások során. A dokkolási kísérletek felderítették, hogy a TTX mindkét állapotában a szelektivitási filterhez kötődik, azonban a kötés erősebb (8,22 kcal/mol vs. 7,55 kcal/mol), amikor a TTX pozitívan töltött, vagyis amikor a proton nem disszociált a C-10-es pozíciójú OH-csoportról. Ez a dominánsan negatív töltésű szelektivitási filter következtében jöhet létre.

A TTX nem gátolja a HEK sejteken expresszált $\text{Ca}_v1.2$ csatornák áramát

Meglepő módon a TTX nem váltott ki semmiféle gátló hatást CACNA1C génnel transzfektált, $\text{Ca}_v1.2$ csatornákat expresszáló HEK tsA-201 sejteken, amely egy új szint hoz a már eddig is változatos palettába. A $\text{Ca}_v1.2$ áram 30 és 100 μM TTX perfúzióját követően a kontroll érték $97,81 \pm 1,75$ %-a és $94,06 \pm 3,87$ %-a volt (nem szignifikáns eltérés, $n=5$).

A natív szívizomsejteken mérhető $I_{\text{Ca,L}}$ és a $\text{Ca}_v1.2$ áram kinetikájának összehasonlításakor az áram amplitúdók normalizálását követően meglehetősen jó átfedést kaptunk. Ez azt sugallja, hogy a transzfektált $\text{Ca}_v1.2$ csatornák áramának sok tulajdonsága azonos vagy legalábbis nagyon hasonló a natív $I_{\text{Ca,L}}$ -hoz, annak ellenére, hogy az előbbi esetében számos járulékos alegység (α_2 , β és δ) hiányzik. Tehát az egyetlen pórusformáló alegység (α_1) által létrehozott áram a natív áramhoz hasonló sajátságokat mutat – a TTX-érzékenység kivételével.

MEGBESZÉLÉS

A tetrodotoxin L-típusú Ca^{2+} csatorna gátlásának jelentősége szíven

Jóllehet a tetrodotoxin és a saxitoxin tekintetében általánosan elfogadott álláspont, hogy a gyors, feszültségfüggő Na^+ csatornák szelektív gátlószerei, az egyre halmozódó irodalmi adatok azt jelzik, hogy valójában nem egészen ez a helyzet. Például az utóbbi időben mindkét toxinról kimutatták, hogy hatnak a natív vagy klónozott T-típusú Ca^{2+} csatornákra, míg a saxitoxinról Su és mtsai. kimutatták már azt is, hogy gátolni képes a L-típusú Ca^{2+} csatornát. Ugyanakkor az ezen disszertációban bemutatott kísérletek képezik az első beszámolót, ami bizonyítja a TTX szívizom $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ gátló hatását.

A szívizom fő Na^+ csatornája ($\text{Na}_v1.5$), a vázizom és idegszöveti Na^+ csatornák túlnyomó többségéhez képest viszonylag érzéketlen a TTX iránt. Tehát akár 30 μM -os TTX koncentráció alkalmazása is szükségessé válhat a I_{Na} teljes gátlására kamrai szívizomsejtekben. Mivel egy ilyen magas TTX koncentráció 35 %-os $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ gátlást okozott a kutya kamrai szívizomsejtjeinkben, így ez súlyos értelmezési hibákhoz vezethet a kísérleti körülményektől függően. A probléma különösen hangsúlyossá válik akkor, amikor az ún. késői Na^+ áramot igyekszünk TTX használatával vizsgálni akciós potenciál feszültség-clamp körülmények között. Chorvatova és mtsai. kimutatták, hogy ezen áram amplitúdója néhány tíz pikoamperes tartományban van egészséges szívizomsejtekben és 200 pA-ig emelkedhet hipertrófiás szívben. Könnyű elképzelni a bekövetkező hiba nagyságát, ha a TTX az $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ csak egy kis hányadát is gátolja. Hasonlóképpen, az említett késői Na^+ áramban bekövetkező hipertrófia-indukált változások komolyan szennyeződhetnek a TTX által létrejövő $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ gátlással.

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a natív $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ TTX-érzékenységet mutatott kutya kamrai szívizomsejteken. Mivel azonban a TTX még így is viszonylag szelektívebbnek tűnik a I_{Na} -ra, mint az $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ -ra, így

továbbra is széleskörűen alkalmazzák az orvosbiológiai kutatásokban. Viszont a kísérleti körülményektől függően külön figyelmet igényel, amikor a tetrodotoxint a I_{Na} szelektív gátlására használjuk.

A tetrodotoxin és az L-típusú Ca^{2+} csatorna kölcsönhatásának molekuláris determinánsai, a pH- és redoxpotenciál-változások hatásának értelmezése

A TTX 55 μM -os IC_{50} értéke az L-típusú kalciumcsatornán relatíve magas, még akkor is, ha figyelembe vesszük, hogy a szív fő Na^+ csatorna izoformája ($Na_v1.5$) jóval kisebb affinitással bír a TTX iránt, mint a neuronális ($Na_v1.1-1.3$) vagy vázizom ($Na_v1.4$) Na^+ csatornák. A DEKA gyűrűt követő Asp aminosav aromás gyűrűjéről úgy gondolják, hogy kritikus jelentőségű a TTX-ioncsatorna interakcióban, és annak cseréje (pl. Cys-re a $Na_v1.5$ esetében) lehet a csökkent affinitás fő oka. A Tikhonov és Zhorov által javasolt szekvencia egyezés alapján, amelyet a modellünk kidolgozására használtunk a jelen tanulmányban, egy Gly aminosav található ebben a kulcspozícióban. Ez a tény kézenfekvő magyarázatot ad arra, hogy a TTX miért kötődik jelentősen kisebb affinitással a $Ca_v1.2$ -höz, mint a neuronális vagy vázizom Na^+ csatornához.

A pH változásnak a kalciumáram amplitúdójára kifejtett hatását tekintve a következő értelmezés adható. Ha figyelembe vesszük a csatorna pórusánál elhelyezkedő hisztidin aminosavak közel 6,5-ös pK_a értékét, akkor azok imidazol oldalláncai még enyhén savas közegben is protonáltak lehetnek. Ennek megfelelően a csatorna konduktív szakaszán (amely természetesen magában foglalja a szelektivitási filtert is) elhelyezkedő hisztidin aminosavak legalább részlegesen protonáltak a 6,4-es savas pH mellett, amely egy pozitív töltésű ion áthaladása számára egy kevésbé kedvező környezetet teremt. Továbbá a csatorna erősen negatív töltésű EEEE gyűrűjének egy (vagy több) glutamát oldallánca szintén protonált lehet, amely tovább csökkenti a kation áram nagyságát. Az eredményeinkkel összhangban korábbi közleményekben is a I_{Na}

és az $I_{Ca,L}$ csökkenését írták le savas közegben. Másrésről a TTX szinte teljes mértékben pozitívan töltött formában van jelen 6,4-es pH mellett, mivel a leginkább savi karakterűnek tekinthető C10-es pozíciójú hidroxil csoport pK_a értéke 8,7-hez közeli. Tehát a pozitívan töltött TTX molekula várhatóan növeli a TTX kötődésének mértékét a negatívan töltött szelektivitási filter régióhoz (a TTX neutrális ikerion formájához képest, amely a kifejezetten alkalikus pH tartományban dominál, de részlegesen jelen van 8,4-es pH-nál és kismértékben 7,4-es pH esetén is), ezáltal a kalciumcsatorna erősebb gátlását eredményezi. Továbbá az elektrosztatikus kölcsönhatás erősségének csökkenése következtében (amely érvényes mind a kétszeresen töltött Ca^{2+} -ra, mind – jóllehet kisebb mértékben – a protonált TTX molekulára, annak egyszeres pozitív töltése miatt) a nem-ionos hidrofil és hidrofób kölcsönhatások relatív hozzájárulása a TTX és a csatorna szelektivitási filterének kapcsolatához valószínűleg megnő. Mindezen hatások az L-típusú kalciumáram csökkenését eredményezik savas közegben, amely áramot ekkor a TTX még kifejezettebben képes gátolni. Ezzel szemben 8,4-es bázikus pH-n a legtöbb hisztidin oldallánc neutrális, és a cisztein szabad SH-csoportjainak nagyjából fele deprotonált, mivel az azoknak megfelelő pK_a érték 8,5. Ez bizonyára egy jóval kedvezőbb környezetet teremt (még a semleges állapothoz, vagyis a 7,4-es pH-hoz képest is) a pozitív töltésű Ca^{2+} ionok csatornához való vonzásához és kötődéséhez, következésképp a csatornán keresztüli ion fluxus megnőhet. Az enyhén bázikus pH értéken a C10-es pozíciójú OH-csoport deprotonálódása következtében a TTX részlegesen neutrális formában lehet jelen, amely a TTX és a szelektivitási filter között gyengébb elektrosztatikus vonzás kifejlődéséhez vezet. Bázikus közegben az erősebb Ca^{2+} csatorna kölcsönhatás egy gyengébb TTX és csatornafehérje közötti kölcsönhatással összeadódva szükségszerűen a TTX kisebb $I_{Ca,L}$ gátlásához vezet. Az alkalikus környezetben megfigyelt nagyobb amplitúdójú kalciumáram és kisebb TTX általi gátlás könnyen megmagyarázható a fentiekben áttekintett egyszerűsített elektrosztatikus modell

és a TTX ikerion protonáltsági egyensúlya alapján, amely jól egyezik a TTX-gátlás Na^+ csatornákon Ulbricht és Wagner által megfigyelt pH-függésével. A TTX nagyobb gátló hatása savas pH mellett mégis úgy tűnik, hogy ellentmond a korábbi eredményeknek, amelyek alacsony pH értékek mellett csökkent TTX gátlást vetítenek előre. Lehetséges, hogy a Ca^{2+} csatorna szelektivitási filter régiójának konformációja 6,4-es pH-n oly módon változik meg, hogy még inkább alkalmassá válik a TTX bekötődésére. Ezenfelül 7,4-es pH-n a TTX 3-5 %-nak becsült nem-hatásos (ikerion) frakciója kation formává alakul 6,4-es pH-n, amely szintén hozzájárulhat a TTX által okozott gátlás növekedéséhez.

A redoxpotenciál szerepének értelmezése az $I_{\text{Ca,L}}$ nagyságának megváltozásában és annak TTX általi gátlásában azonban kicsit több erőfeszítést igényel. Megfigyeléseinkkel összhangban számos emlős szívizomszövetében Guo és mtsai. kimutatták, hogy a hidrogén-peroxid növeli az $I_{\text{Ca,L}}$ amplitúdóját, míg Zhang és mtsai. redukáló közegben az áram csökkenését írták le. Mivel a H_2O_2 egy relatíve erős oxidáló ágens, a szabad szulfhidril-csoportokat diszulfidkötéssé oxidálja. Ellenben a redukáló környezet képes lehet megelőzni a diszulfid-hidak képződését vagy lebontani őket, ha már egyszer kialakultak. Ezen diszulfid-hidak úgy tűnik egy TTX-kötődésre viszonylag rezisztens struktúrát stabilizálnak; ily módon a TTX $I_{\text{Ca,L}}$ -ra kifejtett gátló hatása megnő redukáló környezetben, míg H_2O_2 jelenlétében csökken. Egy további magyarázat is felmerül, amikor arra gondolunk, hogy az $I_{\text{Ca,L}}$ nagysága jól korrelál a Ca^{2+} csatornák β alegységeinek Lao és mtsai. által megfigyelt oligomerizációjával. Feltételezve, hogy a H_2O_2 diszulfidhidak képzésével stabilizálni tudja az oligomer állapotot, mind a nagyobb $I_{\text{Ca,L}}$ amplitúdó, mind a gyengébb TTX általi gátlás magyarázhatóvá válik.

Ugyanakkor meg kell jegyezni, hogy a redukáló környezet $I_{\text{Ca,L}}$ amplitúdóra és annak TTX-nal való gátolhatóságára kifejtett hatása nagyon hasonlít ahhoz, amit savas pH-jú környezet esetén figyelhattunk meg. Ez határozottan arra utal, hogy egy redukáló szer alkalmazása a rendszer nagy

pufferkapacitása ellenére is elősegítheti néhány érzékeny csoport protonálódását. Ez magyarázhatja a TTX által okozott $I_{Ca,L}$ gátlás során megfigyelt jelentős egybeesést, a savas és bázikus pH, illetve a redukáló és oxidáló környezet összehasonlításakor.

A forskolin alkalmazásakor nyert eredmények azt sugallják, hogy az α_1 alegység struktúrájában a protein-kináz A közvetített foszforiláció által kiváltott allosztérikus változások jóllehet komoly következményekkel járnak a csatorna kapuzásának tekintetében, azonban a TTX kötődésére csak csekély behatással lehetnek. A Hill-koefficiens értéke kontroll körülmények között és a csatorna foszforilációját követően is megközelítőleg 1, ami megfelel annak, hogy az α_1 alegységen 1 TTX-kötőhely található.

A tetrodotoxin hatástalanságának lehetséges okai HEK tsA-201 sejteken expresszált $Ca_v1.2$ csatornákon

Az a jelenség, hogy a TTX nem gátolja az expresszált $Ca_v1.2$ csatornák áramát valóban ellentétes azzal, amit a natív kutya szívműködése nyert eredmények alapján várnánk. Ezen paradox tényállás magyarázatára számos egyéb faktort is tekintetbe kell venni, amelyek hatással vannak a Ca^{2+} csatornák struktúrájára és funkciójára. A legkézenfekvőbb magyarázat az lenne, hogy a TTX a L-típusú kalciumcsatorna valamelyik járulékos alegységéhez kötődik. Azonban a csatorna pH- és redoxpotenciál-változás, valamint a PKA-közvetített foszforiláció függvényében részletesen elemzett TTX-érzékenységen és az ez alapján készített 3D-s csatorna térszerkezeti modellen alapuló korábbi eredmények egyértelműen kimutatták, hogy a TTX kötőhelye mind a Ca^{2+} , mind a Na^+ csatornákon hasonló helyen található, mégpedig a csatorna pórus szelektivitási filterének területén. Természetesen annak lehetőségét nem lehet teljes mértékben kizárni, hogy a TTX az egyik járulékos alegységhez kötődik (ebből a szempontból az extracelluláris elhelyezkedése folytán az α_2 alegység

lehet a leginkább kézenfekvő jelölt), de ebben az esetben a feltételezett kötőhely kémiai környezetének nagyon hasonlónak kellene lennie a szelektivitási filteréhez, jóllehet éppen ezért ez a lehetőség elég valószínűtlennek tűnik. Sokkal inkább elfogadható azt feltételezni, hogy a TTX a csatorna pórusformáló α_{1C} alegységhez kötődik, de csak egy vagy több járulékos alegység jelenlétében. Mivel a natív sejteken további járulékos alegységek is jelen vannak, ezek allosztérikus kölcsönhatások következtében módosíthatják a csatorna struktúra végső összeszerelődését. Továbbá az α_1 alegységek számos, adott sejttípusra specifikus hasítási terméke (splice variánsa) ismert és ezek eltérő antagonistá-érzékenységgel bírhatnak.

Emellett az is lehetséges, hogy az expressziós rendszer önmaga felelős a megfigyelt kalciumcsatorna gátló hatás elmaradásáért a TTX alkalmazásakor, mivel nem kivételes eset, hogy a Ca^{2+} áramon egy jól dokumentált hatást nem lehet reprodukálni egy expressziós rendszerben. Ebben az esetben az elméleti lehetőségek skálája széles, ideértve a lipid környezet különbségeit, a belső elektrolit összetétel eltéréseit, a Ca^{2+} -kalmodulin-függő protein-kináz II (CaMKII) lehetséges szerepét, valamint olyan fontos másodlagos hírvivő molekulák jelenlétét vagy hiányát, mint a cAMP, a cGMP vagy a $[\text{Ca}^{2+}]_i$, amely tényezők szintén módosíthatják a csatorna funkcióját, ily módon eltérő TTX-érzékenységet eredményezve. Ennélfogva amíg nem találunk kielégítő magyarázatot a HEK sejteken expresszált $\text{Ca}_v1.2$ csatornák TTX-érzékenységének hiányára, addig külön óvatosságot igényel az expressziós rendszerekben végzett elektrofiziológiai és farmakológiai vizsgálatok eredményeinek értelmezése. Mindazonáltal a TTX tovább növeli azon szerek számát, amelyek a már jól ismert, rá jellemző specifikus hatáson felül Ca^{2+} csatorna gátló potenciállal is rendelkeznek.

A Na^+ és Ca^{2+} csatornákon ható szerek korlátozott szelektivitása

Nem rendkívüli esemény, hogy egy szelektívnek gondolt I_{Na} -ra ható szer kötődik és így módosít más transzmembrán ionáramot, így pl. az L-típusú Ca^{2+} csatornát. Ezek a keresztreakciók jól magyarázhatók a Na^+ és Ca^{2+} csatornák struktúrájában meglévő ismert hasonlósággal.

A tetrodotoxinnal eddig kapott eredmények azt mutatják, hogy néhány tíz nanomólos koncentrációjú IC_{50} értéke van idegi és vázizom Na^+ csatornákon, IC_{50} értéke körülbelül százszor-ezerszer magasabb a szív $\text{Na}_v1.5$ csatornán és ehhez nagyon hasonló a T-típusú Ca^{2+} csatornákon. A szívben túlnyomórészt jelen lévő Na^+ csatornához viszonyítva azonban 10-50-szer magasabb a TTX IC_{50} -ja az L-típusú Ca^{2+} csatornákon. Tehát a tetrodotoxinnal végzett vizsgálatok a közös őstől származó négy homológ domént tartalmazó feszültségfüggő Na^+ és Ca^{2+} csatornák evolúciójával egybevágó eredményeket szolgáltatottak. A korábbiakban említett adatok alátámasztják a tényt, hogy a klasszikus szívizom Na^+ csatornák pórus régiója közelebbi hasonlóságot mutat a T-típusú Ca^{2+} csatornákéhoz, mint az L-típusú Ca^{2+} csatornákéhoz.

Tehát egy általános, intrinzik tulajdonságnak tűnik, hogy csaknem minden Na^+ - és Ca^{2+} csatornán ható szer befolyásolja a másik, strukturálisan homológ csatorna típust is. E jelenség magyarázata az $I_{\text{Ca,L}}$ -ot, az $I_{\text{Ca,T}}$ -ot és a I_{Na} -ot létrehozó csatornák szerkezetében és aminosav szekvenciájában megfigyelhető hasonlóságban rejlik. Mindezek fényében elmondható, hogy a négy homológ doménnel rendelkező feszültségfüggő ioncsatornák közötti keresztreakciók elkerülhetetlennek tűnnek, ezért ennek figyelembe vétele elengedhetetlen a jövőbeli gyógyszerfejlesztésben, orvosi terápiában és kísérleti vizsgálatokban. Ennek a tulajdonságnak az ismerete nemcsak a szívre ható szerek alkalmazásakor lehet hasznos, hanem más célszervre ható szerek esetében is, mint pl. antiepileptikumok, antidepresszánsok, és a neurodegeneratív betegségek vagy a krónikus fájdalom gyógyszerei.

ÖSSZEFOGLALÁS

Bevezetés: A tetrodotoxint (TTX) a gyors, feszültségfüggő Na^+ csatornák legszelektívebb gátlószerének tekintik ingerelhető szövetekben, tehát ideg, váz- és szívizom szövetben, habár ez utóbbi TTX-érzékenysége legalább három nagyságrenddel kisebb az előzőekénél.

Anyagok és módszerek: Jelen vizsgálatban az L-típusú Ca^{2+} áram ($I_{\text{Ca,L}}$) TTX-érzékenységet tanulmányoztuk konvencionális feszültség-clamp és akciós potenciál-clamp technikával kutya bal kamrából izolált szívizomsejteken, 37 °C hőmérsékleten.

Eredmények: Az $I_{\text{Ca,L}}$ -ot a TTX dózisfüggő és reverzibilis módon gátolta, az áram inaktivációs kinetikájának megváltoztatása nélkül. Az áramgátlás mértékét Hill-egyenlettel illesztve a IC_{50} értékre $55 \pm 2 \mu\text{M}$ -t, míg a Hill koefficiensre $1,0 \pm 0,04$ -et kaptunk. A TTX már $30 \mu\text{M}$ -os koncentrációban $8,61 \pm 1,09 \text{ pA/pF}$ -ről $6,08 \pm 1,05 \text{ pA/pF}$ -ra csökkentette az $I_{\text{Ca,L}}$ -ot ($n=4$; $p<0,01$). Nizoldipin ($1 \mu\text{M}$) gátolta az áramot, megerősítve azt, hogy az valóban az $I_{\text{Ca,L}}$ volt. Akciós potenciál feszültség-clamp körülmények között a TTX-érzékeny áram az $I_{\text{Ca,L}}$ -hoz hasonló mintázatot mutatott, amely nizoldipin jelenlétében hiányzott.

A csatorna foszforilációja nem befolyásolta a TTX gátló potenciálját, $3 \mu\text{M}$ forskolin jelenlétében $50 \pm 4 \mu\text{M}$ IC_{50} értéket kaptunk. $55 \mu\text{M}$ TTX (fiziológias körülmények között a IC_{50} érték) savas közegben ($\text{pH}=6,4$) 60 ± 2 %-os $I_{\text{Ca,L}}$ gátlást okozott, míg lúgos közegben ($\text{pH}=8,4$) csak 26 ± 2 %-os gátlást figyeltünk meg. Hasonlóképpen, $55 \mu\text{M}$ TTX redukáló közegben (glutathion+aszcorbinsav+ditiotreitol, mindegyik 1 mM -os koncentrációban) 62 ± 6 %-kal csökkentette az $I_{\text{Ca,L}}$ amplitúdóját, ezzel szemben erős oxidálószer jelenlétében ($100 \mu\text{M}$ H_2O_2) 31 ± 3 % gátlást kaptunk. Ezen eredmények jó összhangban vannak a kötődési modellünk előrejelzésével, miszerint a TTX valóban a szív L-típusú Ca^{2+} csatornáinak szelektivitási filteréhez kötődik.

Következtetések: Munkacsoportunk elsőként számolt be arról, hogy a TTX gátolja az L-típusú kalciumcsatornát szívizmon. Ezt a toxint azonban továbbra is széleskörűen alkalmazzák a kutatásban, mivel még mindig szelektívebb a Na^+ áramra (I_{Na}) mint az $I_{\text{Ca,L}}$ -ra. A kísérleti körülményektől függően viszont a TTX-nak a I_{Na} szelektív gátlására történő alkalmazása fokozott körültekintést igényel. A feszültségfüggő Ca^{2+} és Na^+ csatornák egy közös evolúciós őstől származnak, ezáltal az ezen csatornákon ható szerek csekély szelektivitása a receptoraik intrinzik tulajdonságát jelzi, amelyet figyelembe kell venni a jövőben új, szívre ható gyógyszerek kifejlesztésekor akár az orvosi gyakorlatban, akár a kísérleti kutatásban.



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK

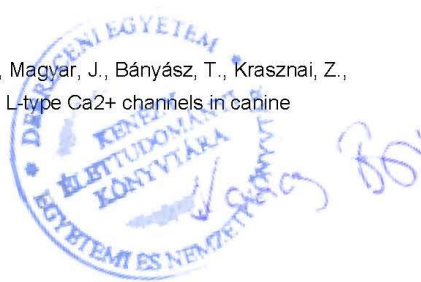


Iktatószám: DEENKÉTK/235/2014.
Tételszám:
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Hegyi Bence
Neptun kód: JEYC4Y
MTMT azonosító: 10032565
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Szentandrassy, N., Papp, F., **Hegyi, B.**, Bartók, Á., Krasznai, Z., Nánási, P.P.: Tetrodotoxin blocks native cardiac L-type calcium channels but not CaV1.2 channels expressed in HEK cells.
J. Physiol Pharmacol. 64 (6), 807-810, 2013.
IF:2.72
2. **Hegyi, B.**, Komáromi, I., Nánási, P.P., Szentandrassy, N.: Selectivity problems with drugs acting on cardiac Na⁺ and Ca²⁺ channels.
Curr. Med. Chem. 20 (20), 2552-2571, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/09298673113209990123>
IF:3.715
3. **Hegyi, B.**, Komáromi, I., Kistamás, K., Ruzsnavszky, F., Váczi, K., Horváth, B., Magyar, J., Bányász, T., Nánási, P.P., Szentandrassy, N.: Tetrodotoxin Blockade on Canine Cardiac L-Type Ca²⁺ Channels Depends on pH and Redox Potential.
Mar Drugs. 11 (6), 2140-2153, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/md11062140>
IF:3.512
4. **Hegyi, B.**, Bárándi, L., Komáromi, I., Papp, F., Horváth, B., Magyar, J., Bányász, T., Krasznai, Z., Szentandrassy, N., Nánási, P.P.: Tetrodotoxin blocks L-type Ca²⁺ channels in canine ventricular cardiomyocytes.
Pflügers Arch. 464 (2), 167-174, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-012-1114-y>
IF:4.866





További Közlemények

5. Ruzsnavszky, F., **Hegyi, B.**, Kistamás, K., Váczi, K., Horváth, B., Szentandrassy, N., Bányász, T., Nánási, P.P., Magyar, J.: Asynchronous activation of calcium and potassium currents by isoproterenol in canine ventricular myocytes.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 387 (5), 457-467, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-014-0964-6>
IF:2.36 (2013)
6. Bodnár, D., Geyer, N., Ruzsnavszky, O., Oláh, T., **Hegyi, B.**, Sztretye, M., Fodor, J., Dienes, B., Balogh, Á., Papp, Z., Szabó, L., Müller, G., Csernoch, L., Szentesi, P.: Hypermuscular mice with mutation in the myostatin gene display altered calcium signaling.
J. Physiol.-London. 592 (6), 1353-1365, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2013.261958>
IF:4.544 (2013)
7. Kistamás, K., Szentandrassy, N., **Hegyi, B.**, Ruzsnavszky, F., Váczi, K., Bárándi, L., Horváth, B., Szebeni, A., Magyar, J., Bányász, T., Kecskeméti, V., Nánási, P.P.: Effects of pioglitazone on cardiac ion currents and action potential morphology in canine ventricular myocytes.
Eur. J. Pharmacol. 710 (1-3), 10-19, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.03.047>
IF:2.684
8. Horváth, B., Bányász, T., Jian, Z., **Hegyi, B.**, Kistamás, K., Nánási, P.P., Izu, L.T., Chen-Izu, Y.: Dynamics of the late Na⁺ current during cardiac action potential and its contribution to afterdepolarizations.
J. Mol. Cell. Cardiol. 64, 59-68, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.08.010>
IF:5.218
9. Szabó, L., Szentandrassy, N., Kistamás, K., **Hegyi, B.**, Ruzsnavszky, F., Váczi, K., Horváth, B., Magyar, J., Bányász, T., Pál, B., Nánási, P.P.: Effects of tacrolimus on action potential configuration and transmembrane ion currents in canine ventricular cells.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 386 (3), 239-246, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-012-0823-2>
IF:2.36



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



10. Szentandrassy, N., Farkas, V., Bárándi, L., **Hegyi, B.**, Ruzsnavszky, F., Horváth, B., Bányász, T., Magyar, J., Márton, I., Nánási, P.P.: Role of action potential configuration and the contribution of Ca²⁺ and K⁺ currents to isoprenaline-induced changes in canine ventricular cells.
Br. J. Pharmacol. 167 (3), 599-611, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02015.x>
IF:5.067
11. Farkas, V., Szentandrassy, N., Bárándi, L., **Hegyi, B.**, Ruzsnavszky, F., Ruzsnavszky, O., Horváth, B., Bányász, T., Magyar, J., Márton, I., Nánási, P.P.: Interaction between Ca²⁺ channel blockers and isoproterenol on L-type Ca²⁺ current in canine ventricular cardiomyocytes.
Acta Physiol. 206 (1), 42-50, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-1716.2012.02448.x>
IF:4.382
12. Szentandrassy, N., Harmati, G., Farkas, V., Horváth, B., **Hegyi, B.**, Magyar, J., Szénási, G., Márton, I., Nánási, P.P.: Modified cAMP derivatives: Powerful tools in heart research.
Curr. Med. Chem. 18 (24), 3729-3736, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/092986711796642445>
IF:4.859

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 46,287

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 14,813

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

Debrecen, 2014.09.05.

