

A „Káliumáramok vizsgálata izolált szívizom-preparátumokon és klónozott csatornákon” című OTKA F-67879 számú projekt részletes szakmai beszámolója

A jelen kutatás célja a kardiális betegségekhez (ritmuszavarok, szívelégtelenség és hirtelen szívhalál) kialakulásban szereplő ioncsatornák rendellenes működésének (elektromos remodeling) vizsgálata volt. A vizsgálat során feltérképeztük a kamrai repolarizációt meghatározó főbb ionáramok molekuláris összetevőit, hogy megállapítsuk melyik alegységek játszanak szerepet az adott ionáram tulajdonságaiban (kinetika, gyógyszerérzékenység, stb). Ezenfelül új vizsgálati eljárást dolgoztunk ki a primer szívizomsejt kultúrában történő csendesítés technikájának kidolgozását. Ebben a témakörben előkészítettük a munkát, de jelenleg is folynak kutatások. A következő kutatási eredményeket értük el:

a) génbeviteli eljárás kidolgozása primer kutya szívizomsejt kultúrába herpesz vírussal (publikált eredmények)

b) a késői egyenirányító káliumáram szerepe a repolarizáció megnyújtásában alloxán diabétesz nyúlmodellben (publikált eredmények)

c) A transzmembrán káliumáramok szerepe az akciós potenciál jelformára humán és kutya szívizom preparátumokon (publikált eredmények több dolgozat formájában)

d) a befelé egyenirányító káliumáram szerepe a repolarizációban és az aritmia proaritmiakészségben humán és kutya szívizom preparátumokon (publikálásra már elküldött eredmények)

EREDMÉNYEK:

a) génbeviteli eljárás kidolgozása primer kutya szívizomsejtkultúrába herpesz vírussal

A kutatási téma során egy olyan új vírusalapú génbeviteli eljárást dolgoztunk ki, amely alkalmas géncsendesítésre (siRNS) is primer szívizomsejt-kultúrában nagytestű emlősállatok szívéből izolált miocitákon.

Sejtizolálás és sejtkultúra készítése:

A sejtenyészetekhez használatos szívsejtek izolálásakor alacsonyabb Ca^{2+} koncentrációjú izoláló és pihentető oldatot érdemes használni (ellentétben a patch-clamphez használt sejtekkel), szétbontani az intercelluláris kapcsolatokat, ezután az enzimes emésztéssel felbontani az extracelluláris mátrixot és végül mechanikai beavatkozással szeparálni az egyes sejteket. A sejtizolálás az irodalomban ismert Langendorff retrográd perfúziós módszerrel készült. A frissen emésztett szívizomsejtekből kultúrát készítettünk. Az izoláció után a frissen izolált sejteket, izolációs oldatban pihentetjük. Ezután egy centrifuga csőben steril flow alatt a leülepedett sejtekről óvatosan leszívjuk a pihentető tárló oldatot és steril PBS oldatra cseréljük, amiben a centrifugálás történik (saját protokoll szerint). A fugálás során sejtek kívánt mértékben, életben maradtak. A több lépcsős centrifugálásra a baktériumok, és egyéb fertőzésektől való tisztítás miatt van szükség, valamint a nehezebben süllyedő halott sejtek eltávolítása végett. A centrifugálás után a sejteket előre elkészített speciális összetételű tápoldatban (alapja SIGMA Medium 199 tápoldat) újra felfuszpendáljuk, majd kitapasztjuk. A sejteket lamininnel bevont steril üveg fedőlemezekre szélesztjük, tápoldatot teszünk rá, 37°C -on 5%-os CO_2 koncentráció mellett steril termosztátban tároljuk. A szívizom sejteket lamininnel bevont steril üvegfedőlemezekre kitapasztjuk. Tápoldat: M199 SIGMA (Hank's salts and sodium bicarbonate, without L-glutamine, liquid culture tested M7653). Tartalmaz még aminosavakat (kivéve glutamint), vitaminokat, a következő ionalkotókat: CaCl_2 1.8mM; NaCl , 116mM; Na acetát, 0.6mM; NaHPO_4 1mM; KCl 5.3mM; MgSO_4 0.8mM koncentrációban, valamint a szívizom sejtek anyagcsere folyamataiban hasznos

kiegészítőkkel is elláttuk: creatine, taurine, L-carnitine, pyruvate, inzulin. Antibiotikumként streptomycin neomicin keveréket, vagy a jobban bevált gentamicint használtuk.

Plazmid DNS konstrukciók klónozása és tesztelése, gének bejutása szívizomsejtekbe vírusvektorral

A célkitűzésekben megfogalmazott fluoreszcens Ca^{2+} szenzorokkal való Ca^{2+} koncentrációváltozás detektáláshoz első lépésként a mérésekhez alkalmazandó fluoreszcens fehérjék kódoló DNS-eit kellett beszerezni. Ezek nukleotid sorrendje, azaz kódoló szekvenciája mindenki számára hozzáférhető. A szekvenciák az NCBI honlapjáról elérhetőek és ingyenesen letölthető Nucleotide database ben található GeneBank és Protein Data Base (PDB) adatbázisokból. A molekuláris munka tervezési fázisában a bejuttatni kívánt fehérjék adatainak keresésével kezdődik. Ez a konstrukció két verzióban készült: Cameleon génnel és Troponin génnel. Mindkét konstrukciót vírus vektorba is beépítettük. Önmagában ez a két konstrukció már jól használható tesztelésre, transzfekciós reagensekkel, sejtvonalakon.

A tesztelt konstrukciók expressziós kazettáját a vírus vektor megfelelő ripít szakaszaiba (repeat region) klónoztuk. A Cameleon és Troponin gén már stabilan beépítésre került a vírus vektorba, egyelőre még targeting szekvenciák nélkül. A tervezett kísérletnek megfelelően, különböző idegen géneket juttathatunk be a már kész szívizomsejt kultúrába. Munkánk során a fluoreszcens Ca^{2+} indikátorokat céloztuk meg a genetikai konstrukciókkal.

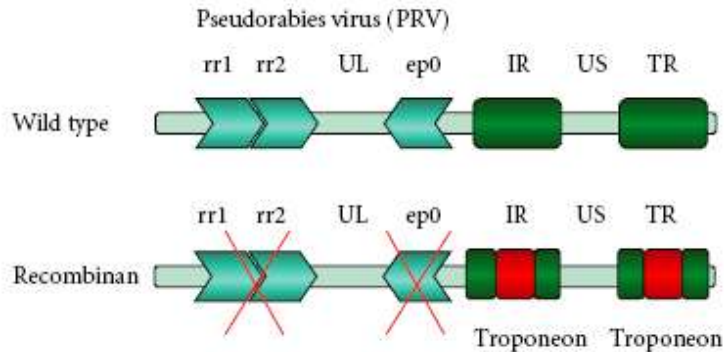
Elsődleges célként az intracelluláris szabad Ca^{2+} ion koncentráció detektálását foglalmaztuk meg fluoreszcens kalcium indikátor fehérjével. Ilyen fluoreszcens kalcium indikátor a Cameleon és a Troponin nevű komplex fehérje. A troponin kalcium szenzor gént két kópiában a vírus ún. antiszensz promóter régiójába építettük be. A rendelkezésre álló cameleont (Superior cameleon 3, YC3.60) és troponint (TN-L15) teszteltük. A Troponin a cameleon típusú molekulák csoportjába tartozik. Mindkét konstrukciót vírusba klónoztuk, kipróbáltuk először fenntartott pig kidney sejtvonalon, ezután a troponin további használata mellett döntöttünk. Ezt láthatjuk el különböző targeting szekvenciákkal, subcelluláris jelölés esetén. Aujeszky-féle vírus (AyV) az alfa herpesz vírusok közé tartozik. A vad típus sertések kórokozója, nem humán patogén. A módosított törzs lényege, hogy fertőz, de a vad típushoz képest nagyon legyengített, így nem pusztítja el a sejteket, viszont infekcióra képes és bejuttatja a genomjába klónozott fluoreszcens marker géneket a sejt génállományába.

Az (AyV) génbeviteli vektorként való alkalmazhatóságához homológ rekombináció által kiűtöttük a vírus rr és ep0 génjeit. Az rr gén a DNS alapanyagainak előállításáért felel ribonukleotid difoszfátokból dezoxiribonukleotid difoszfátokat állít elő. Hiánya esetén, a posztmitotikus sejtekben a vírus nem képes produktív infekcióra. Bizonyos sejtekben az rr gének kiűtése nem elegendő, ezért elimináltuk az ep0 gént is, ami többek között, a vírus látenciából való reaktivációjáért felelős. A troponin kalcium szenzor gént két kópiában a vírus ún. antiszensz promóter régiójába építettük be.

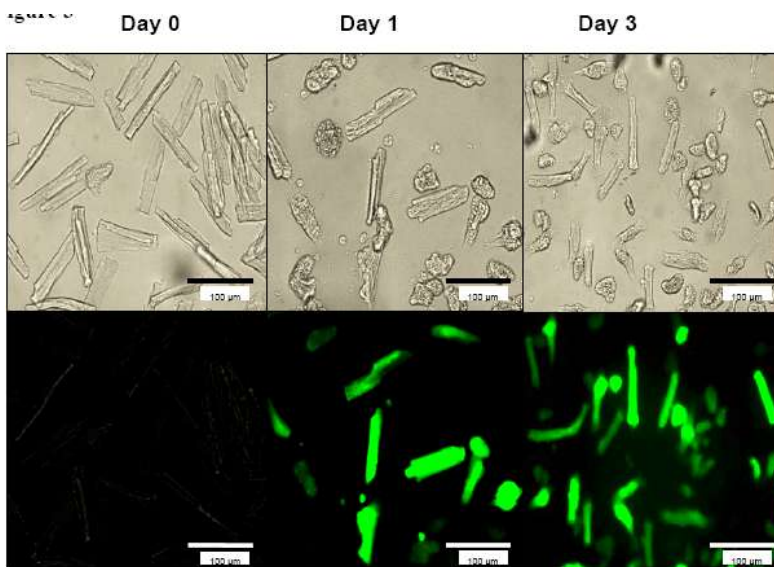
A módszer hatékonyságának ellenőrzése elektrofiziológiai és optikai kísérletekkel:

Célkitűzésünk egy herpeszvíruson alapuló, primer szívizomsejt-kultúrába történő génbeviteli módszer kifejlesztése volt. Ezt a módszert használjuk fel egy adott gén expressziójának RNS-interferenciával való gátlására, ami kis hajtű (sh)RNS bevitelével oldható meg. Ezzel a módszerrel lehetővé válik a tranziens kifelé haladó káliumáram (I_{to}) molekuláris összetevőinek a csendesítése. A csendesítés során lecsökkenthetjük, akár a pórusformáló α alegységeinek, akár a kiegészítő β alegységeinek az expressziója. Jelen vizsgálatsorozattal ennek a munkának az előkészítése, ugyanis először egy olyan vírusvektoros megbízható génbeviteli módszert kell kidolgozni, ami hatékonyan bejuttatja a vektort a sejtbe, rendelkezik génbeviteli szenzorral és nem módosítja a gazda sejt biológiai vagy biofizikai (elektrofiziológiai) tulajdonságait. A módszert ioncsatorna-gének, illetve új

típusú, fluoreszcens kalcium szenzorok (troponeon, cameleon) kifejezésére használjuk. A génbeviteli eljáráshoz a módosított, nem humán patogén, Aujeszky féle vírust használtuk (1. ábra). A primer sejt kultúrát kutyaszív bal kamrából izolált sejtekből készítettük (2. ábra).

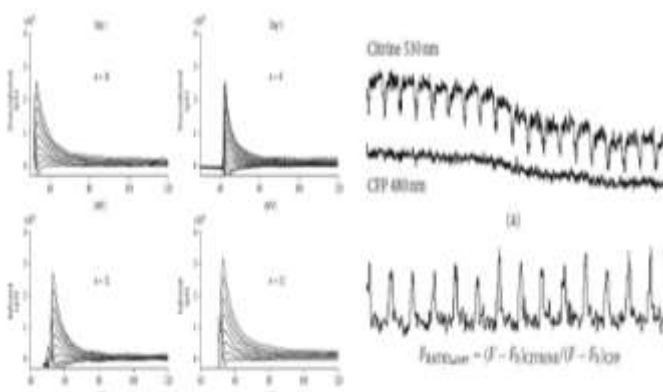


1. ábra. Az alkalmazott vírus vektor szerkezete.



2. ábra. Eredeti fény és fluoreszcens mikroszkóp felvételek a izolált kamrai kutya szívizomsejtekből készült kultúráról (0 nap), valamint 1-3 nap vírusinfekció után.

Eredményeink igazolják, hogy ez a herpesz vírusra alapozott génbeviteli módszer szívizomsejtekben hatékonyan alkalmazható, mivel a vírus az alkalmazott koncentrációban bejutott a sejtbe (2. ábra) és nem befolyásolja a tervezett elektrofiziológiai vizsgálatokat: ábra, I_{to} áram mérések és kalcium transziens mérések (3.ábra) vagyis alkalmas olyan plazmidok bevitelére, amelyek segítségével csendesíthető egy csatornagén funkciója.



3.ábra. Az I_{to} áram azonos nagyságú a frissen izolált és az egy illetve három napos a izolált kamrai kutya szívizomsejtekből készült kultúrában (bal oldali mező). Kalcium transziensek troponeont expresszálló szívizom-sejtekből (jobb oldali mező).

A kísérletsorozatból készített dolgozatot A Journal of Biomedicine és Biotechnology című tudományos folyóiratban közzétettük.

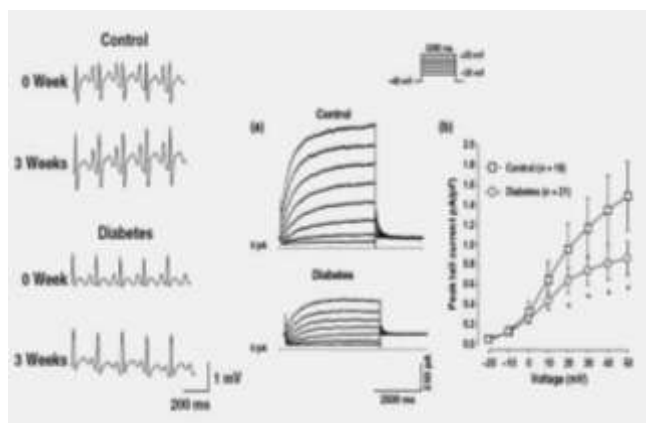
J. Prorok, PP Kovacs, A Kristof, N. Nagy, D. Tombacz, J.S. Toth, B. Ordog, N. Jost, L. Virag, J.Gy. Papp, A. Varró, A. Toth, Z Boldogkoi Herpesvirus – mediated delivery of a genetically encoded fluorescent Ca^{2+} sensor to canine cardiomyocytes.

J. Biomed Biotechnol, Volume 2009, Article ID 361795, 12 pages, 2009.

Impact factor (2009): 1.750

b) a késői egyenirányító káliumáram szerepe a repolarizáció megnyújtásában alloxán diabétesz nyúlmodellben (publikált eredmények)

Ismert, hogy számos olyan betegség van, amely mellékhatásként jelentősen rontja kardiovaszkuláris rendszer működését, és ezáltal közvetlenül befolyásolja az életminőséget. Ilyen betegség a diabétesz mellitus is. Ismert, hogy a diabéteszes betegeknek hosszabb lehet a QT szakaszuk, ezért kísérleteink célja az volt, hogy experimentálisan, alloxánnal kiváltott diabétesz modellben megvizsgáljuk, miképpen változnak meg a repolarizáló káliumáramok tulajdonságai. Megállapítottuk, hogy a betegség hatására, ha kismértékben is, de megnyúlt a frekvenciakorrigált QT szakasz (QTc) és ezzel összefüggésben csökkent a repolarizáló K^+ áram a diabéteszes állatokból származó szívpreparátumokban (4. ábra).



4. ábra. Eredeti EKG regisztrátumok kontroll és alloxán diabéteszes nyulakban (bal oldali mező). A lassú késői repolarizáló káliumáram lecsökken (down-reguláció) diabéteszes nyúl-modellben (jobb oldali mező).

A betegség okozta áramcsökkenés, hacsak kis mértékben is de megnöveli az AP időtartamát, ill. az EKG QT szakaszát, és ezáltal csökkenti a szív védekezési mechanizmusát a repolarizációs *rezervet*, ami magyarázatot szolgáltat annak az észrevételnek, hogy miért vannak a cukorbetegség fokozottabban veszélyeztetve a különböző letális kamrai ritmuszavaroknak. A kísérletsorozatból készített dolgozatot az *Acta Physiologica* című tudományos folyóiratban közzétettük.

Cs. Lengyel, L. Virág, P.P. Kovács, A. Kristóf, P. Pacher, E. Kocsis, Zs. M. Koltay, P. P. Nánási, M. Tóth, V. Kecskeméti, J.Gy. Papp, A. Varró, N. Jost. Role of slow delayed rectifier K^+ -current in QT prolongation in the alloxan-induced diabetic rabbit heart.

Acta Physiologica (Oxf), 192, 359-368, 2008

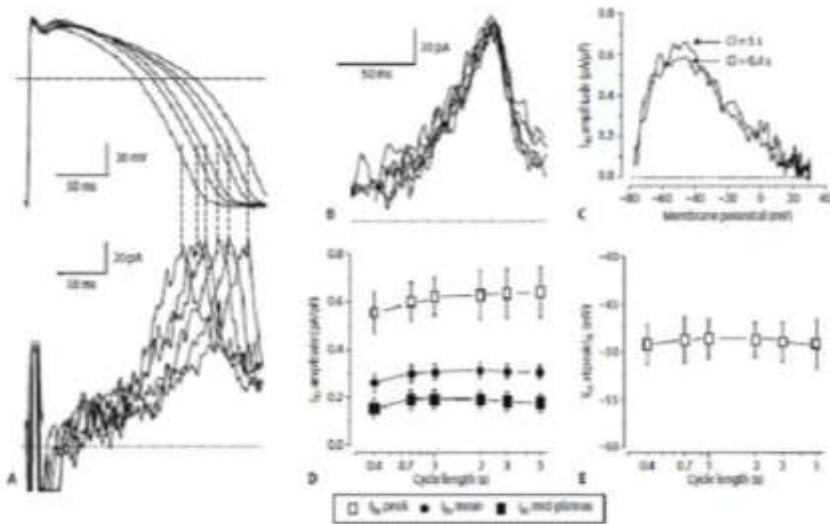
Impact factor (2009): 2.455

Citációk: 5

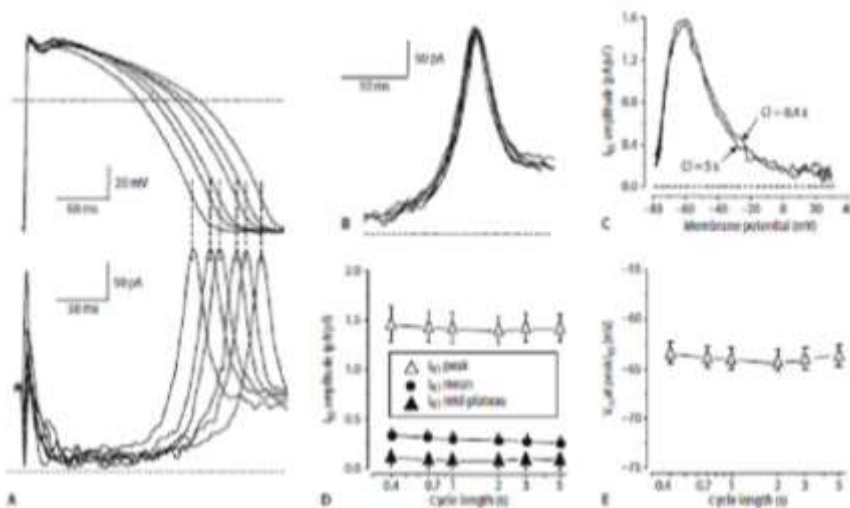
c) A transzmembrán káliumáramok szerepe az akciós potenciál jelformára humán és kutya szívizom preparátumokon (publikált eredmények)

Megvizsgáltuk, hogy két a repolarizációt közvetlenül befolyásoló áram, a késői egyenirányító káliumáram (I_{Kr}) és befelé egyenirányító káliumáram (I_{K1}) tulajdonságai mennyire függenek az akciós potenciál jelformától egészséges humán illetve kutya kamrai preparátumokban. A

kísérletes vizsgálat azt igazolta, hogy az akciós potenciál hossza és frekvenciafüggése közvetlenül nem befolyásolja az I_{Kr} és I_{K1} áramok nagyságát (5 és 6 ábrák) és kinetikai tulajdonságait (7. ábra).



5. ábra. E-4031 szenzitív (I_{Kr}) áramfelvételek különböző stimuláló frekvenciák esetében, kutya kamrai szívműsejtekben.



6. ábra. $BaCl_2$ szenzitív (I_{K1}) áramfelvételek különböző stimuláló frekvenciák esetében, kutya kamrai szívműsejtekben

Ebből arra következtettünk, hogy az akciós potenciál frekvenciafüggő tulajdonságait nem az I_{Kr} és I_{K1} áramok frekvenciafüggése határozza meg.

A kísérletsorozatból készített dolgozatot a Basic Research in Cardiology című tudományos folyóiratban közzeltük.

N. Jost, K. Acsai, B. Horváth, T. Bányász, I. Baczkó, M. Bitay, G. Bogáts, P.P. Nánási. Contribution of I_{Kr} and I_{K1} to ventricular repolarization in canine and human myocytes. Is there any influence of action potential duration?

Basic Res Cardiol, 104, 33-41, 2009.

Impact factor (2009): 5.973

Az előző munka folytatásában továbbra is az volt a célkitűzésünk, hogy mi lehet az akciós potenciál fordított frekvencianyújtó (FFN) hatás hátterében. Megállapítottuk, hogy bármilyen módon érjük el egy szerrel az akciós potenciál megnyújtását ez a megnyúlás fordított frekvenciafüggő módon fog megtörténni. AP megnyúlást kétféle módon lehet elérni: a)

depolarizáló áram fokozással (7. ábra), vagy repolarizáló áram gátlással (8. ábra). A kísérletsorozatból arra a következtetésre jutottunk, hogy az akciós potenciál fordított frekvenciányújtó tulajdonsága a egy intrinszik belső tulajdonsága a kamrai miocitáknak.

A kísérletsorozatból készített dolgozatot a Basic Research in Cardiology című tudományos folyóiratban közöltük.

Bárándi L, Virág L, **Jost N**, Horváth Z, Koncz I, Papp R, Harmati G, Horváth B, Szentandrassy N, Bányász T, Magyar J, Zaza A, Varró A, Nánási PP. Reverse rate-dependent changes are determined by baseline action potential duration in mammalian and human ventricular preparations.

Basic Res Cardiol, 105(3):315-23, 2010.

Impact factor (2009): 5.973

Egy a Temesvári Victor Babes Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem Kórélettani Intézetével végzett kooperációs munka során megvizsgáltuk miképpen függ össze a kamrai repolarizáció diszperziója a krónikus miokardiális infarktussal. Megállapítottuk, hogy kamrai repolarizáció diszperziója szoros összefüggésben van az infarktus kialakulásával, vagyis az a módszer kiválóan alkalmas az aritmiakészség rizikójának megállapítására.

A kísérletsorozatból készített dolgozatot az Acta Physiologica Hungarica című tudományos folyóiratban közöltük.

Mozos I, M. Hancu, **N. Jost**, A. Cristescu. Multipolar QRST isointegral maps and QT dispersion in old myocardial infarction.

Acta Physiol Hung, 97, 11-21, 2010.

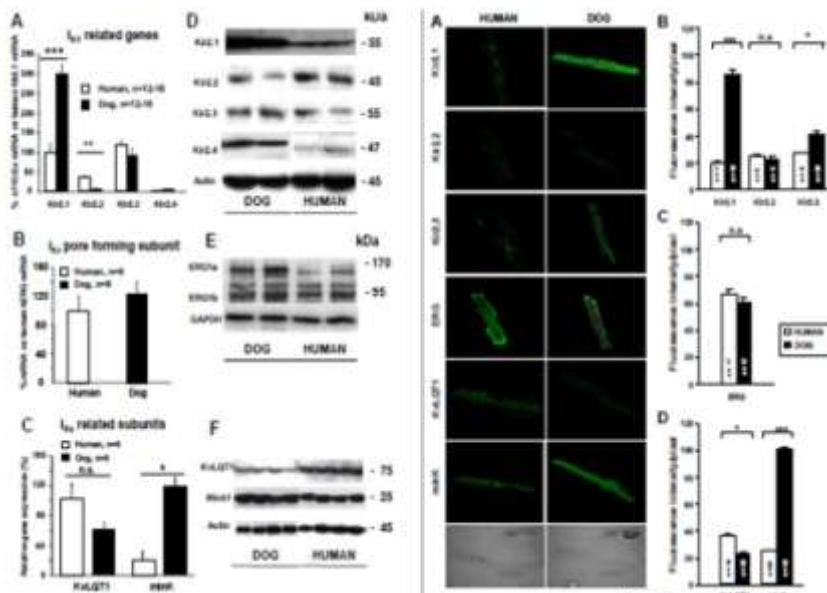
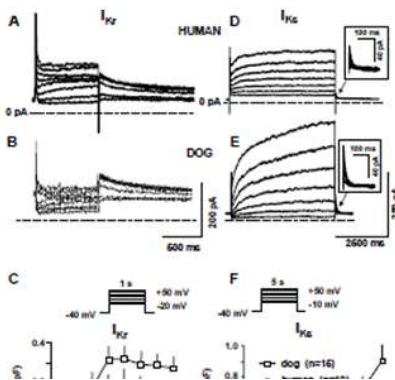
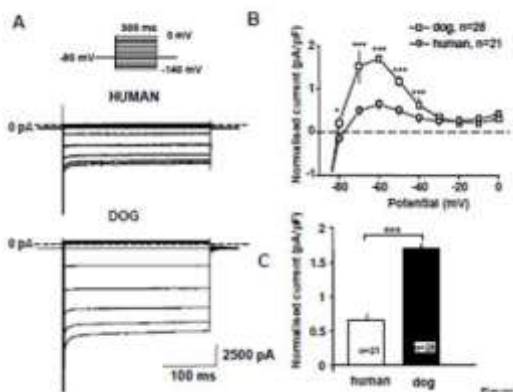
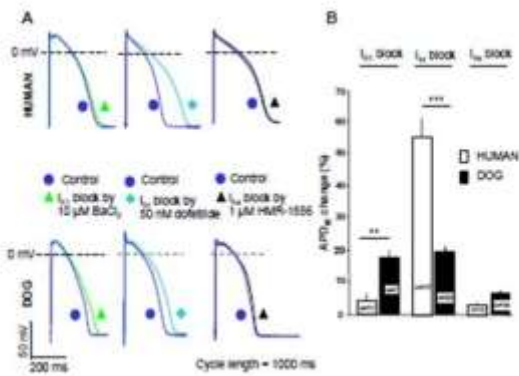
Impact factor (2009): 0.750

d) A befelé egyenirányító (I_{K1}) és a késői egyenirányító káliumáramok (I_{Kr} és I_{Ks}) repolarizációban játszott szerepének az összehasonlító vizsgálata humán és kutya szívekben

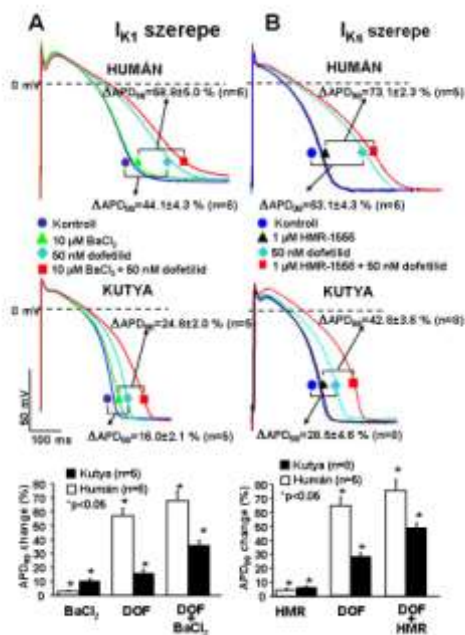
Régebbi megfigyelés, hogy a különböző speciesekben a késői egyenirányító káliumáram gyors komponensének a szelektív gátlói eltérő mértékben nyújtják meg a kamrai repolarizációt. Ennek az lehet az oka, hogy a különböző fajokban, eltérő mértékben járul hozzá a repolarizációhoz a többi káliumáram, pl a befelé egyenirányító káliumáram (I_{K1}). Kísérleteinkben megvizsgáltuk az I_{Kr} és I_{K1} áramok tulajdonságait elektrofiziológiai és molekuláris biológia módszerekkel.

Az I_{K1} áram szelektív gátlása (10 μ M BaCl₂) jobban megnyújtotta az akciós potenciál időtartamát (API₉₀) a kutya mint humán kamrai papilláris izomzatban. Ezzel ellentétesen az I_{Kr} áram szelektív gátlása (100 nM dofetilid) jobban megnyújtotta az API₉₀-ot humán, mint kutya kamrai izomzatban. Az I_{Ks} áram gátlása (1 μ M HMR-1556) mindkét speciesben csak elhanyagolható mértékben nyújtotta meg az API₉₀-et (7. ábra). Az ionáram mérések azt mutatták, hogy az I_{K1} áram denzitása kutya miocitákban, mintegy háromszor nagyobb volt, mint a humán szívizomsejtekben (8. ábra). Az I_{Kr} áram nagysága és kinetikai tulajdonságai hasonlóak voltak a két fajban, míg az I_{Ks} nagyobb kutyában (9. ábra).

Összehasonlítottuk és kvantifikáltuk az I_{K1} és I_{Kr} áramok pórusformáló α -alegységek mRNAs szintjeit qPCR technikával. A mérések során megállapítottuk, hogy Kir2.1 -Kir2.3 I_{K1} csatornagén mRNAs szintek sokkal kevésbé vannak expresszálódva a humán kamrai szívizomzatban, mint a kutyában, amíg a HERG (I_{Kr} génje) denzitása hasonló volt a két speciesben. Ezek az eredmények összhangban voltak a Western blot és immunfluoreszcens fehérje mérésekkel (10. ábra).



Amikor a repolarizációs tartalékot I_{Kr} áram gátlással előzetesen meggyengítettük, az additív I_{K1} gátlás humánban csekély, míg a kutya kamrai szívizomzatban további jelentős APD_{90} megnyúlást eredményezett (11. ábra).



11. ábra. Az I_{K1} és I_{Ks} áram gátlásának hatása az akciós potenciál időtartamára kutya és humán jobbkamrai papilláris izmon, I_{Kr} gátlással gyengített repolarizációs tartalék esetében.

Kísérleteink alapján arra következtettünk, hogy a humán miocitákban a kutyához viszonyított kisebb I_{K1} áram, az alacsonyabb Kir2.1 fehérje szint következménye. Az I_{Kr} áram hasonló mértékű farmakológiai gátlása kutyában kisebb repolarizáció megnyúlást eredményez, mint a humánban. Ezen észrevételre az I_{K1} áramnak a két species repolarizációjában tapasztalt különböző hozzájárulása ad megfelelő választ, nevezetesen, az, hogy a kutyában az I_{K1} áram részt vesz a repolarizáció kialakításában is, amíg az emberben pedig vélhetően csak a repolarizációs tartalék része.

Ezeket az eredményeket figyelembe kell venni, akkor, amikor kutyán végzett farmakológiai vizsgálatok eredményét humán használat céljából szeretnénk hasznosítani, ugyanis egy kutyaszíven bevizsgált I_{Kr} /HERG csatornagátló repolarizációra kifejtett hatását emberben könnyen alul lehet becsülni. Más szóval egy szer, amely kutyában nem bizonyul proaritmias hatásának emberben lehet, hogy súlyos aritmia forrása lehet.

Az ebből a munkából előkészítettük egy dolgozatot rangos nemzetközi konferencián mutattuk be (American Heart Association Kongresszus, 2008, november, Dallas, USA) de tudományos dolgozat formájában is benyújtottuk a Circulation Research nevű rangos folyóirathoz, és ahol ígéretesnek tűnő revízió alatt van.

Jost, Virag L, V. Szűts, P.P. Kovács, Gy. Seprényi, P. Biliczki, Cs. Lengyel, J Prorok, M Bitay, B. Ördög, I. Koncz, N. Nagy, J. Szabad, L. Puskás, S. Nattel, U. Ravens, J.Gy. Papp, Varro A, Nattel S: Weaker inward-rectifier (I_{K1}) and slow delayed-rectifier (I_{Ks}) potassium currents limit cardiac repolarization reserve in humans compared to dogs, *Circulation Research*, revízió alatt, 2010.

Egyéb publikációs tevékenység

A projekt időtartama során egy az egyetemi oktatási tevékenységemből származó tapasztalataimat is felhasználva egy felkért könyvfejezetet írtam. Témája: A szív akciós potenciálja és az azt meghatározó transzmembrán ionáramok tulajdonságai.

N. Jost. Transmembrane ionic currents underlying cardiac action potential in mammalian hearts. *In. Advances in cardiomyocyte research. Ed. Péter P. Nánási. Transworld Research Network, Tivandrum, Kerala, India. pp. 1-45, 2009, ISBN: 978-81-7895-418-9, 2009.*