

Ioncsatorna gének expressziós szintje és funkciója humán szívizomban

Ph.D. értekezés tézisei

Ördög Balázs, M.Sc.

Szeged

2010

Ioncsatorna gének expressziós szintje és funkciója humán szívizomban

Ph.D. értekezés tézisei

Ördög Balázs, M.Sc.

Szegedi Tudományegyetem,
Orvostudományi Kar,
Orvosi Biológiai Intézet

Témavezetők:

Professzor Szabad János, habil., Ph.D., D.Sc.

Professzor Boldogkői Zsolt, habil., Ph.D., D.Sc.

Szeged

2010

Bevezetés

A szív ritmikus összehúzódásait a szívizomban időről-időre végighaladó akciós potenciálok sorozata váltja ki és szabályozza. Az akciós potenciál transzmembrán ionáramok eredőjeként alakul ki. Az ionáramokat ioncsatornák vezetik. Kóros esetekben az ioncsatornák működése zavart szenved, amely nyomán a normálistól eltérő akciós potenciál zajlik le, amely végeredményben abnormális szívritmushoz és esetenként hirtelen szívhalálhoz vezethet.

Az ioncsatornák összetett fehérjék, amelyek ún. α - és β -alegységekből állnak. Az α -alegységek speciális szerkezete teszi lehetővé ionok mozgását a sejtmembránon keresztül, míg a β -alegységek szabályozó szerepet töltenek be. Számos példa bizonyítja, hogy az ioncsatorna komplex tartalmazhat hasonló szerkezetű, ám eltérő funkciót ellátó alegységeket is, az ioncsatorna komplex funkciója pedig elsősorban annak alegység-összetételétől függ.

Az emberi genom-szekvenciák vizsgálatakor megdöbbentően nagyszámú ioncsatorna alegységet kódoló gént találtak. Ezek közül is a K^+ -csatorna gének családja a legnépesebb: több mint 100 ilyen gént ismerünk. A fent említett nagyszámú ioncsatorna gén kifejeződéséről a humán szívizomban kevés adat áll rendelkezésre. Elmondhatjuk továbbá, hogy a legtöbb ioncsatorna pontos alegység-összetétele nem ismert, arról csak közvetett bizonyítékaink vannak. Kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy vajon mely ioncsatorna gének és milyen mértékben fejeződnek ki a humán szívizomban? Hogyan állapítható meg egy-egy ioncsatorna alegység specifikus funkciója?

Célkitűzéseink

Kérdéseink megválaszolásához elvégzendő legfontosabb feladatunk az volt, hogy átfogó képet alkossunk a humán szívizomban kifejeződő ioncsatorna génekről és azok expressziós szintjéről.

Célul tűztük ki továbbá egy olyan kísérleti rendszer kidolgozását, amelyben a virális génbeviteli technikát az RNS interferencia módszerével kombinálva az ioncsatorna alegységek specifikus funkciójára deríthetünk fényt.

További céljaink között szerepelt, hogy a funkcionális vizsgálatokra alkalmas molekuláris genetikai eszköztárat tovább bővítsük egy herpes víruson alapuló génbeviteli eljárás kidolgozásával.

Módszereink összefoglalása

A génexpressziós méréseket kvantitatív RT-PCR technikával végeztük el, amely módszer nagyszámú gén egyidejű vizsgálatára alkalmas. A szívizom-szövetminták egészséges donor szívekből, a bal kamra illetve a bal pitvar régiókból származtak. A kvantitatív RT-PCR kísérletek során a jól bevált módszereket, irányelveket alkalmaztuk.

RNS interferencia indukálására szívizomsejtekben lentivírus vektorokat használtunk. A vírus-termeléshez szükséges protokoll és az ún. pakoló plazmidok Didier Trono laboratóriumából származnak (<http://tronolab.epfl.ch/>, Ecole Polytechnique Federale de Lausanne, Lausanne, Switzerland). A MiRP2-specifikus shRNSmir szekvenciát Ravi Sachidanandam laboratóriumában kidolgozott algoritmussal terveztük (<http://katahdin.cshl.org/>, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA) és standard génebeszeti eljárásokkal klónoztuk a vektor plazmidban. Az RNS interferencia hatását patch clamp módszerrel vizsgáltuk kutya pitvarból izolált szívizomsejtekben.

A *Pseudorabies virus* deléciós változatait kettős homológ rekombinációval hoztuk létre. A szükséges plazmid konstrukciókat a jól bevált génebeszeti eljárásokkal állítottuk elő. A rekombináns vírusokat permisszív sertés vese sejtvonalon plakk-tisztítás módszerrel izoláltuk és szaporítottuk.

Eredményeink

A humán szív bal kamra és bal pitvar régióiból származó szövetmintákban 31 gén expressziós szintjét vizsgáltuk kvantitatív RT-PCR módszerével. A kísérletek megtervezésekor különös hangsúlyt fektettünk a legnagyobb funkcionális diverzitást mutató K^+ -ioncsatornákra. Irodalmi adatok alapján a korábban már sokak által tanulmányozott, jól ismert ioncsatorna gének mellett a tanulmányba bevontunk további géneket is, amennyiben a következő kritériumok valamelyike teljesült: i) a gén kifejeződését, illetve funkcióját modell állatok szívizomzatában már leírták ám humán szívben még nem, ii) kimutatható interakció a gén által kódolt ioncsatorna alegység és egy a szívben ismert funkciót ellátó ioncsatorna alegység között heterológ expressziós rendszerben.

Legfontosabb eredményeink a következők:

I_{to}- csatorna alegységek:

Három olyan gén mRNS-ét mutattuk ki nagy mennyiségben az emberi szívizomban, melyek funkciója a humán szívben ismeretlen (Kv1.7, Kv3.3 és Kv3.4). A három gén mindegyike feszültségszabályozott K^+ -ioncsatorna alegységet kódol, heterológ expressziós rendszerben kifejezve a humán I_{to} -hoz hasonló kinetikai paraméterekkel bíró áramot vezet. Feltételezzük, hogy a Kv1.7, Kv3.3 és Kv3.4 K^+ -csatorna alegységek szerepet játszanak a humán I_{to} kialakításában. Amennyiben fenti hipotézisünk a későbbiekben igaznak bizonyul, az nagy mértékben hozzájárul az I_{to} farmakológiájával kapcsolatos nézeteink kibővítéséhez.

I_{Kur}- csatorna alegységek:

Az I_{Kur} csatornákra jellemző K^+ áram a pitvarokban figyelhető meg, humán kamrai szívizomsejteken azonban nem mérhető. Adataink tanúsága szerint az I_{Kur} - csatorna alegységeket kódoló mRNS-ek a humán szív bal kamrájának izomzatában is kifejeződnek. Lehetséges, hogy bár az I_{Kur} áram kamrai

szívizomsejteken nem mérhető, az I_{Kur} - csatorna alegységek – más típusú ioncsatorna alegységekkel kombinálva – szerepet játszhatnak a kamrai repolarizációban. Ez utóbbi feltételezésünk alapján megmagyarázhatnánk, miért nem sikerült ez idáig olyan pitvar-specifikus I_{Kur} blokkoló szert találni, mely alkalmas lenne a pitvar ritmuszavarainak farmakológiai kezelésére, kamrai ritmuszavarok kockázatának növekedése nélkül.

K⁺-csatornák csendes α -alegységei

A csendes α -alegységek homomer formában áramot nem vezetnek, azonban heterológ expressziós rendszerben más feszültségszabályozott ioncsatorna alegységekkel kifejezve heteromer komplexeket alkotnak és módosítják az ioncsatorna funkcióját. A csendes α -alegységek *in vivo* szerepéről keveset tudunk. Ezért lehet különösen érdekes a Kv5.1 és Kv9.3 csendes α -alegységek nagy mértékű expressziója, amely a Kv5.1 esetében a bal pitvarban, a Kv9.3 esetében pedig mindkét általunk vizsgált régióban összemérhető más jól ismert funkciót ellátó alegységek expressziós szintjével. A Kv5.1 és Kv9.3 alegységek *in vivo* szerepének tisztázása nagymértékben hozzájárulhat az ioncsatorna alegységek közötti lehetséges interakciók természetére, a lehetséges kombinációk mennyiségére és az ioncsatornák szabályozásának lehetséges módjaira vonatkozó nézeteink kibővítéséhez.

A MiRP2 kifejeződése és funkciója a szívizomban

A MiRP2 szabályozó β -alegység mRNS-ét nagy mennyiségben mutattuk ki humán szívizomban. Minthogy a MiRP2 *in vivo* funkciójáról ez idáig csak közvetett bizonyítékaink voltak, további funkcionális vizsgálatokat végeztünk el. Olyan RNS interferenciát indukáló lentivírus vektort hoztunk létre, amely mesterséges mikroRNS-t, egy ún. shRNSmir konstrukciót kifejezve lecsendesíti a MiRP2 gén kifejeződését. A MiRP2-RNSi vírussal valamint kontrol vírussal pitvarból izolált szívizomsejteket fertőztünk, és patch clamp módszerrel tanulmányoztuk a MiRP2 lecsendesítés hatását az I_{to} makroszkopikus paramétereire. Megállapítottuk, hogy a MiRP2 lecsendesítése nincs hatással az I_{to} denzitására, aktivációs kinetikájára, valamint az áram steady-state paramétereire. A MiRP2-RNSi vírussal fertőzött szívizomsejtekben azonban az I_{to} inaktivációja lassabb a kontrol vírussal fertőzött sejtekben mérhető I_{to} inaktivációjához képest. Az eredmények fényében megállapítható, hogy a MiRP2 szabályozó alegység szerepet játszik az I_{to} szabályozásában pitvari szívizomsejtekben.

Herpes virus-alapú génbevitel szívizomsejtekben

A posztmitotikus sejtek – mint amilyenek a szívizomsejtek is – esetében a hagyományos, nem virális géntranszfer technikák nem használhatók hatékonyan. Az ismert virális génbeviteli technikák ugyanakkor, szem előtt tartva a kísérletes munka sokrétű kívánalmait és különösen az *in vivo* génterápia speciális követelményeit, nem mindenben felelnek meg a velük szemben támasztott

elvárásoknak. Ezért a vad típusú *Pseudorabies virus* genetikai manipulációjával létrehoztunk egy többszörösen módosított herpes vírust, amely génbevitelre alkalmazható szívizomsejtekben. Deléciókat generáltunk a vírus RR1, RR2 és EP0 génjeiben. A Δ RR1, RR2 és Δ EP0 mutációk hatása az irodalomból ismert, azokról kimutatták, hogy csökkentik a vírus virulenciáját, citotoxicitását. A Δ RR1, RR2, EP0 genetikai háttérű vírus ún. *antiszensz promóter* (ASP) régiójába - amely a vírus genomjában két kópiában van jelen, és amely hosszú távon is biztosítja a transzgén kifejeződését - a fluoreszcens Ca^{2+} -indikátor fehérjét kódoló *Cameleon* illetve *Troponin* riporter géneket építettük be. Az így előállított herpes víruson alapuló géntranszfer vektorral sikeresen fertőztünk kamrából izolált szívizomsejteket. A sikeres transzdukción fluoreszcens mikroszkópiával követtük nyomon. A bevitt transzgenek működőképességéről ún. FRET analízissel győződünk meg.

Összefoglalás

Nagyszámú, elsősorban K^+ -ioncsatorna alegységeket kódoló gén expressziós szintjét mértük humán szívizomban. A jól ismert ioncsatorna alegységeket kódoló gének mellett további olyan gének expresszióját is detektáltuk, amelyek kifejeződéséről korábban csak feltételezéseink voltak. Eredményeink alapul szolgálhatnak további funkcionális vizsgálatokhoz, így hozzájárulva a szívizomsejtek működésének alaposabb megértéséhez.

A világon az elsők között adtunk hírt a MiRP2 szabályozó β -alegység kifejeződéséről humán szívizomban. Megmutattuk, hogy a MiRP2, más lehetséges funkciók mellett az I_{to} csatornák szabályozásában játszik szerepet.

Sikeresen bővítettük a szívizomsejtek funkcionális vizsgálatára alkalmas metodikai palettát egy többszörösen módosított herpes víruson alapuló géntranszfer vektor kifejlesztésével.

Az értekezés pillérjeiként szolgáló közlemények

Ordog B, Brutyo E, Puskas LG, Papp JG, Varro A, Szabad J, Boldogkoi Z. Gene expression profiling of human cardiac potassium and sodium channels. *International Journal of Cardiology*; 2006; 111: 386–393.

Ördög Balázs és Szabad János. Miért dobog a szívünk? *Természet Világa*, 2006; 137. évfolyam, 3. szám.

Prorok J, Kovács PP, Kristóf AA, Nagy N, Tombác D, Tóth JS, Ördög B, Jost N, Virág L, Papp JG, Varró A, Tóth A and Boldogkői Zs. Herpesvirus-Mediated Delivery of a Genetically Encoded Fluorescent Ca²⁺ Sensor to Canine Cardiomyocytes. *J Biomed Biotechnol* 2009; 2009:361795.

Független közlemény

Hegy P, Ördög B, Rakonczai Jr Z, Takács T, Lonovics J, Szabolcs A, Sári R, Tóth A, Papp JG, Varró A, Kovács MK, Gray MA, Argent BE, Boldogkői Z. Effect of herpesvirus infection on pancreatic duct cell secretion. *World Journal of Gastroenterology*, 2005; 11(38): 5997-6002.

Konferencia absztraktok

Qi XY, Villeneuve LR, Ordog B, Chartier D, Van Wagoner DR and Nattel S. Abstract 1516: Role of Oxidative Stress in Atrial Tachycardia Remodelling. *Circulation*, Oct 2008; 118: S_341. *Absztrakt*.

Jost N, Varro A, Szuts V, Kovacs PP, Seprényi G, Biliczki P, Lengyel C, Prorok J, Bitay M, Ördög B, Szabad J, Varga-Orvos Z, Puskas L, Cotella D, Papp JG, Virag L and Nattel S. Abstract 1520: Molecular Basis of Repolarization Reserve Differences between Dogs and Man. *Circulation*, Oct 2008; 118: S_342. *Absztrakt*.

Kovács M, Rakonczay Z, Ördög B, Takács T, Lonovics J, Varró A, Tóth A, Papp JG, Gray M, Argent B, Boldogkői Z, Hegyi P. A novel possibility for gene transfer into the duct cells using non-replicating pseudorabies virus variants. *German Journal of Gastroenterology*, 2005; 43(05) *Absztrakt*.

Venglovecz V, Rakonczay Z, Ördög B, Takács T, Lonovics J, Szabolcs A, Varró A, Tóth A, Papp JG, Gray M, Argent B, Boldogkői Z, Hegyi P. Pseudorabies virus infection stimulates pancreatic ductal HCO₃⁻ secretion. *German Journal of Gastroenterology*, 2005; 43(05) *Absztrakt*.

Szűts V, Ördög B, Acsai K, Horváth Z, Virág L, Seprényi G, Szabad J, Papp JG, Varró A. Kv1.5 channels in ventricular preparations. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2004; 36(5): 762-762 *Absztrakt*.

Poszterek

Ördög B, Roska B, Szabad J, Boldogkői Z. Egy valós idejű genetikailag kódolt Ca^{2+} -szenzor (Cameleon) idegsejtekbe való bevitele vírus vektorral. 2005; VI. Magyar Genetikai Kongresszus / XIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Eger, Hungary. *Poszter*

Ördög B, Brutyó E, Szűts V, Seprényi G, Papp JG, Varró A. Is MIRP2 the main β -subunit of IKr channels of human heart? 28th Meeting of the European Working Group on Cardiac Cellular Electrophysiology, 2004; Szeged, Hungary. *Poszter*