

Az ioncsatorna funkció háttérben álló alegység
összetétel és kölcsönhatás

A doktori értekezés tézisei

Déri Szilvia, MSc



Témavezető: Dr. Ördög Balázs

Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet
Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

2023

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

I. Déri S*, Hartai T*, Virág L, Jost N, Labro AJ, Varró A, Baczkó I, Nattel S, Ördög B. A possible explanation for the low penetrance of pathogenic KCNE1 variants in Long QT syndrome type. *Pharmaceuticals* **2022**;15(12):1550.

IF: 4.6

II. Déri S*, Borbás J*, Hartai T, Hategan L, Csányi B, Visnyovszki Á, Madácsy T, Maléth J, Hegedűs Z, Nagy I, Arora R, Labro AJ, Környei L, Varró A, Sepp R, Ördög B. Impaired cytoplasmic domain interactions cause co-assembly defect and loss of function in the p.Glu293Lys KCNJ2 variant isolated from an Andersen-Tawil Syndrome patient. *Cardiovasc Res* **2021**;117(8):1923-1934.

IF: 14.239

Kumulatív impakt faktor: 18.839

Egyéb közlemények:

Polyák A, Topal L, Zombori-Tóth N, Tóth N, Prorok J, Kohajda Z, **Déri S**, Demeter-Haludka V, Hegyi P, Venglovecz V, Ágoston G, Husti Z, Gazdag P, Szlovák J, Árpádfy-Lovas T, Naveed M, Sarusi A, Jost N, Virág L, Nagy N, Baczkó I, Farkas AS, Varró A. Cardiac electrophysiological remodeling associated with enhanced arrhythmia susceptibility in a canine model of elite exercise. *Elife* **2023**;12:e80710.

Topal L, Polyák A*, Tóth N, Ágoston G, Kohajda Z, Prorok J, **Déri S**, Nagy N, Jost N, Virág L, Farkas AS, Varró A, Baczkó I. Endurance training-induced cardiac remodeling in a guinea pig athlete's heart model. *Can J Physiol Pharmacol* **2022**;100(10):993-1004.

Bitay G, Tóth N, **Déri S**, Szlovák J, Kohajda Z, Varró A, Nagy N. The Inhibition of the Small-Conductance Ca²⁺-Activated Potassium Channels Decreases the Sinus Node Pacemaking during Beta-Adrenergic Activation. *Pharmaceuticals* **2022**;15(3):313.

Kohajda Z, Virág L, Hornyik T, Husti Z, Sztojkov-Ivanov A, Nagy N, Horváth A, Varga R, Prorok J, Szlovák J, Toth N, Gazdag P, Topal L, Naveed M, Árpádfy-Lovas T, Pászti B, Magyar T, Koncz I, **Déri S**, Demeter-Haludka V, Aigner Z, Ördög B, Patfalusi M, Tálósi L, Tiszlavicz L, Földesi I, Jost N, Baczko I, Varro A. In vivo and cellular antiarrhythmic and cardiac electrophysiological effects of desethylamiodarone in dog cardiac preparations. *Br J Pharmacol* **2022**;179(13):3382-3402.

Kohajda Z, Farkas-Morvay N, Jost N, Nagy N, Geramipour A, Horvath A, Varga R, Hornyik T, Corici C, Acsai K, Horváth B, Prorok J, Ördög B, **Déri S**, Tóth D, Levijoki J, Pollesello P, Koskelainen T, Otsomaa L, Tóth A, Baczkó I, Leprán I, Nánási P, Papp JG, Varró A, Virág L. The Effect of a Novel Highly Selective Inhibitor of the Sodium/Calcium Exchanger (NCX) on Cardiac Arrhythmias in In Vitro and In Vivo Experiments. *PLoS One* **2016**;11(11):e0166041.

1. Bevezetés

A káliumion-csatornák széles körben elterjedtek az élővilágban. Három fő szerkezeti osztályba sorolhatóak: a két transzmembrán doménnel és egy P-hurokkal (2TM-1P), a kétpórusossal és négy transzmembrán doménnel (4TM-2P), valamint a hat transzmembrán doménnel, feszültség szenzorral és egy P-hurokkal (6TM-1P) rendelkező kálium ioncsatorna alegységek. A szívben a 2TM-1P osztály kiemelkedő képviselői az I_{K1} , $I_{K,ATP}$ és $I_{K,Ach}$ ioncsatornák. Érdekes módon ezek az ioncsatornák homo- és heterotetramer konfigurációban is létezhetnek. Ez utóbbi esetben az ioncsatorna különböző alegységekből áll össze, amelyek eltérő funkcionális tulajdonságokkal bírhatnak, de szerkezeti homológiájukból adódóan képesek összeszerelődni. A funkcionálisan különböző, de szerkezetiileg hasonló ioncsatorna-alegységek heteromerizációja nagyban hozzájárul az ioncsatornák és különösen a káliumcsatornák esetében megfigyelt funkcionális sokféleségéhez. A 4TM-2P alegységekből álló ioncsatornákat a szívben az úgynevezett TWIK, TASK, TREK és THIK alcsaládokba tartozó káliumcsatornák képviselik. Míg a tipikus kardiális feszültségfüggő káliumcsatornák (6TM-1P) az ether-a-go-go családdhoz tartozó ERG K^+ csatornák, a Shaker családdhoz kapcsolódó csatornák ($Kv1-4$), a Ca^{2+} -aktivált K^+ csatornák és a KCNQ csatornák.

Egy funkcionális K^+ csatornában a fent tárgyalt szerkezeti osztályok valamelyikébe tartozó ioncsatorna alegységek homo- vagy heteromer formában összeszerelődnék és létrehozzák az ioncsatorna alapvető pórus szerkezetét, innen a "pórusképző" vagy, másképpen α alegység elnevezés. A pórusképző alegységekkel azonban további különböző, úgynevezett kiegészítő- vagy β -alegységek is társulhatnak, így hozva létre multiprotein komplexeket. A legtöbb feszültségfüggő K^+ ioncsatornához kiegészítő alegységek társulnak, gyakran különbözőek, szervtől, szövettől- vagy sejttípustól, fejlődési stádiumtól vagy patológiai kontextustól függően. A kardiális I_{Ks} csatornák alapját a KCNQ1 gén által kódolt pórusképző alegységek (6TM-1P osztály) adják. Ha a KCNQ1-et a KCNE alegységek (KCNE1-5) bármelyikével együttesen expresszáljuk heterológ expressziós rendszerekben, akkor eltérő fenotípusú áramok figyelhetők meg. Ez azt jelzi, hogy valamennyi KCNE szabályozó alegység kölcsönhatásba léphet a KCNQ1 alegységgel és módosíthatja annak funkcióját. A KCNE1 például növeli az áram amplitúdóját és drasztikusan lelassítja a KCNQ1 csatornák aktiválódásának időbeli lefolyását, nagymértékben reprodukálva a kardiális I_{Ks} csatornák tulajdonságait. Emiatt úgy gondolják, hogy a kardiális I_{Ks} csatornák KCNQ1 és KCNE1 alegységekből állnak. Az I_{Ks} ioncsatorna mellett a KCNE2 és a KCNE3 képes összeszerelődni a KCNH2 gén által kódolt alegységgel, amely a pórusképző alegysége a késői egyenirányító káliumcsatorna gyors komponensének (I_{Kr}), valamint a hiperpolarizációra aktiválódó, ciklikus-nukleotid kapuzott csatornák (I_r) α alegységeivel (HCN1-HCN4) is. Ezek az eredmények jól példázzák a szabályozó ioncsatorna alegységek élettani szerepének sokrétűségét.

A pórusképző és szabályozó alegységek sztöchiometriai aránya az ioncsatorna-komplexen belül nagymértékben eltérő lehet. Például a sztöchiometriai arány 4:1 és 4:4 között változott a HCN és KCNE alegységek komplexei esetében egy krio-elektronmikroszkópos vizsgálat szerint az alegységek expressziós szintjétől és az alegységeket kódoló gének mutációitól függően. Fontos, hogy a KCNQ1 és a KCNE1 komplexek is léteznek különböző sztöchiometriai arányban, eltérő funkcionális viselkedést mutatva. Ezek az eredmények rávilágítanak a pórusképző és szabályozó ioncsatorna alegységek közötti kölcsönhatás fontosságára és összetettségére. A fenti tanulmányok ellenére azonban a különböző alegységek sztöchiometriai aránya az ioncsatornák makromolekuláris komplexein belül továbbra is feltérképezetlen és aktívan tanulmányozott terület. Érdekes például, hogy a KCNE2 deléciónak csak akkor okozott QT megnyúlást, ha bizonyos környezeti tényezők jelen voltak, úgy, mint a nyugati diéta vagy az öregedés. Továbbá a KCNE2 hiánya bizonyos környezeti tényezők jelenlétében hirtelen szívhalálhoz (SCD) is vezethetett. Ezek a bizonyítékok arra utalnak, hogy a pórusképző és a kiegészítő alegységek közötti kölcsönhatás meglehetősen dinamikus folyamat lehet a sejt- és/vagy környezeti tényezők hatására. A káliumcsatorna alegységek közötti lehetséges kombinációk nagy száma, valamint különösen a megfelelő kutatási módszerek hiánya miatt a kiegészítő alegységek pontos szerepe a káliumcsatornák fiziológiájában, valamint a patológiás folyamatokban továbbra sem ismert teljesen.

Az emlősfajok kardiomiocitáinak elektrofiziológiájában jelentős különbségek vannak, ami megnehezíti az állati modellekből származó eredmények emberi kontextusban történő interpretációját. Ezért klinikai jelentőségük mellett a kardiális channelopátiák régóta egyedülálló modellként szolgálnak az ioncsatornák kutatásához, felbecsülhetetlen értékű támpontokat nyújtva az ioncsatornák fiziológiájáról és patofiziológiájáról. Az ebben a tanulmányban levont következtetések különösen fontosak az LQT5 és az ATS kontextusában, ezért a következőkben röviden tárgyaljuk e betegségek genetikáját és patofiziológiáját.

A KCNE1 gén funkcióvesztéses mutációinak következtében alakul ki az LQT5. A KCNE1 egy olyan fehérjét kódol, ami egy transzmembrán doménnel rendelkezik és képes összeszerelődni a KCNQ1-el, valamint amelyről úgy gondolják, hogy a kardiális I_{Ks} csatornák alapvető szabályozó alegysége. Míg az LQT1-LQT3 genotípusú betegek körülbelül 75%-a tüneteket produkál, az LQT5 mutációk általános penetranciája csak 20%. Az LQT5 alacsony penetranciája azt jelenti, hogy nem mindig figyelhető meg QT-nyúlás, ami megnehezíti az LQTS diagnózis felállítását genetikai szűrés nélkül. Ezért az LQT5 különösen veszélyes lehet, mivel a tünetek hirtelen alakulhatnak ki az állapotukat nem ismerő pácienseknél, amennyiben további, a repolarizációt befolyásoló tényezőknek (például QT-nyújtó gyógyszerek) vannak kitéve. Az LQT5 mutációk alacsony penetranciájáért felelős mechanizmusok azonban jelenleg nem ismertek. Az első

genetikai LQT5 állapotmodellt a közelmúltban fejlesztették ki intézetünk hozzájárulásával, és ez új betekintést nyújtott az LQT5 patomechanizmusába. Az LQT5 nyúlmodell a jól ismert Gly52Arg-KCNE1 variáns szívspecifikus overexpresszióján alapul. A transzgénikus állatokban a QT megnyúlás mérsékelte, de szignifikáns volt. Azonban a QT-t nyújtó gyógyszerek jelenlétében a vad típusú (WT) állatokhoz képest jelentősen megnőtt az aritmiára való hajlam, ami összhangban van az LQT5 esetében végzett klinikai megfigyelésekkel. A Gly52Arg-KCNE1 erős domináns negatív hatást gyakorol a KCNQ1 áramamplitúdóra, amikor a KCNQ1 és WT-KCNE1 heterológ módon együttesen expresszálódik. Ennek alapján a Gly52Arg-KCNE1-et expresszáló LQT5 nyulakból izolált kardiomiocitákban csökkent I_{Ks} amplitúdóra lehetett számítani. Meglepő módon az I_{Ks} amplitúdója nem különbözött az LQT5 sejtekben a WT sejtekhez képest, csak a deaktivációs kinetika gyorsulása volt azonosítható. A látszólag ellentmondásos eredmények az LQT5 nyúlmodellben és az *in vitro* kísérletekben arra utalnak, hogy a kardiomiocitákban jelenlévő faktorok, amelyek a heterológ expressziós rendszerekben nem találhatók meg, enyhítik az Gly52Arg-KCNE1 variáns domináns negatív hatásait, ami nagyon enyhe tünetekhez és a Gly52Arg mutáció alacsony penetrációjához vezetnek alapkörülmények között. Az LQTS fenotípust menekítő faktorok természete azonban továbbra sem ismert.

Az ATS egy ritka genetikai rendellenesség, amelyet periodikus paralízis, kongenitális dysmorphia és szívritmuszavarok jellemeznek. A kardiális tünetek közé tartozhat a QT megnyúlás, a prominens U-hullám, a kamrai eredetű korai ütések és a bidirekcionális kamrai tachycardia. Több mint 70 ATS1-et okozó mutációt azonosítottak. Szinte valamennyi ATS-t okozó KCNJ2-mutáció különböző mechanizmusokon keresztül okoz funkcióvesztést, beleértve a szerkezeti változásokat, a kapuzásban bekövetkező változásokat és a fehérje traffickingjében bekövetkező hibákat.

A Szegedi Tudományegyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika és Kardiológiai Központjában dolgozó kollégáink egy tipikus ATS1 fenotípussal rendelkező beteg genetikai elemzését végezték el. A jelölt gének szekvenálásával a KCNJ2 gén *de novo* mutációját mutatták ki, amely a 293. pozícióban glutaminsav - lizin szubsztitúciót okoz. A Glu293Lys funkcionális hatásai vagy az ATS-ben betöltött potenciális patogén szerepe ismeretlen volt. A Glu293, amint azt később tárgyaljuk, a KCNJ2 alegységek citoplazmatikus doménjében található, az úgynevezett citoplazmatikus domén interfész (CD-I) régióiban belül, amely két szomszédos KCNJ2 alegység között helyezkedik el. Érdekes módon a befelé egyenirányító káliumcsatornák CD-I régiójának funkciója részletes vizsgálat tárgyát képezte. Colin G. Nichols professzor laboratóriumában kimutatták, hogy a funkcionális csatornák citoplazmatikus doménjének konformációját sóhidak hálózata stabilizálja. E sóhidak némelyike két, szomszédos alegységben elhelyezkedő aminosavak között jön létre, ezáltal összekapcsolva a két alegységet. A CD-I sóhid-hálózat károsodása nagymértékben csökkenti a csatorna aktivitását és érzékenységét a foszfátidil-inozitol-4,5-

biszfoszfátra (PIP₂), amely a befelé egyenirányító káliumcsatornák allosztérikus aktivátora. Arra a következtetésre jutottak, hogy a citoplazmatikus domén "szoros" konformációban létezhet, ha a CD-I sóhid-hálózat nem sérül. A "szoros" konformáció a KCNJ2 esetében nagyobb csatornaaktivitással jár. A CD-I sóhid-hálózat genetikai rendellenesége azonban a CD-I aminosavak elmozdulását eredményezi, ami összhangban van a lazább konformációval és a csökkent csatornaaktivitással. Azonban a Glu293 lehetséges szerepét a KCNJ2 csatorna szerkezet-funkció kapcsolataiban még nem vizsgálták.

2. Célkitűzések

A transzgenikus LQT5 nyúlmodellből származó legújabb eredmények, valamint a potenciálisan patogén Glu293Lys KCNJ2 mutáció felfedezése egy ATS betegben egyedülálló kutatási lehetőséget biztosítottak számunkra, hogy újszerű betekintést nyerjünk az I_{Ks} és I_{K1} ioncsatornák szerkezetének és működésének összefüggéseibe. E lehetőségek megragadása érdekében két párhuzamos kutatás keretében a következő kérdésekre kerestük a választ.

Az LQT5 kapcsán figyelembe vettük a transzgenikus LQT5 nyúl modellből származó meglepő eredményt, vagyis a Gly52Arg-KCNE1 allél I_{Ks} amplitúdókra gyakorolt gátló hatásának hiányát, ami érdekes figyelembe véve azt, hogy a Gly52Arg-KCNE1-nek erős domináns negatív hatása van a KCNQ1 áramra, amit az irodalomban és laboratóriumunkban is számos vizsgálat megerősített. Hasonlóan erős irodalmi bizonyítékok utalnak arra, hogy minden KCNE alegység képes módosítani a KCNQ1 funkcióját, és minden KCNE gén, bár eltérő mértékben, de kifejeződik a szívben. Mindezek alapján feltettük a kérdést, hogy lehetséges-e, hogy a KCNE alegységek részt vesznek az I_{Ks} csatornák szabályozásában? Módosítják-e az LQT5 fenotípus kialakulását? E lehetőségek kidolgozására olyan kísérleteket terveztünk és végeztünk, amelyek során vizsgáltuk a KCNE géncsalád legvalószínűbb jelöltjeinek a KCNQ1-alapú ioncsatornákon betöltött lehetséges szabályozó szerepét.

Az ATS kapcsán először az a kérdés merült fel, hogy lehet-e a Glu293Lys aminosav szubsztitúció ATS fenotípust okozó patogén mutáció? A Glu293Lys ATS-ben betöltött szerepének megállapítása érdekében a KCNJ2-áramokra gyakorolt funkcionális hatásának jellemzésére törekedtünk. Továbbá, figyelembe véve a Glu293Lys érdekes lokalizációját a KCNJ2 csatorna CD-I régiójában, valamint azt, hogy a Glu293-nak eddig nem tulajdonítottak funkcionális szerepet, kísérleteket terveztünk a klinikailag releváns Glu293Lys mutáció funkcionális következményeinek hátterében álló molekuláris mechanizmusok feltárására.

3. Anyagok és Módszerek

3.1. Heterológ expressziós rendszerek

A tranziens transzfekciót a következőképpen végeztük. Összesen 4 µg plazmid DNS-t 16 µg polietiléniminhez (PEI) adtunk 1,5 ml szérummentes tápoldatba, és szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk. Ezután a transzfekciós keveréket a sejtekhez (CHO-K1 vagy HEK-293) adtuk, majd a tenyésztőedényeket 2 órára visszahelyeztük a CO₂ inkubátorba. Az inkubációs idő végén a sejteket kétszer mostuk szérummentes tápoldattal, majd szérumos tápoldatot adtunk hozzájuk. Az összes kísérletet (pl. patch clamp vagy NanoBiT vizsgálatok) 48 órával a tranziens transzfekciót követően végeztük el.

3.2. Elektrofiziológiai technikák

A CHO-K1 sejteket normál Tyrode-oldattal szuperfundáltuk. A mikropipettákat boroszilikát üvegkapillárisokból készítettük horizontális húzó segítségével. A pipettaoldat tartalmazott (mmol/L): KOH 110, KCl 40, K₂ATP 10, HEPES 5, EGTA 5 és MgCl₂ 0,1; a pH-t 7,2-re állítottuk be aszparaginsavval.

Az áramokat 37°C-on rögzítettük GFP pozitív sejtekből. Az áramdenzitást az áram amplitúdó – sejt kapacitás hányadosaként definiáltuk. Minden felvételt a Clampfit szoftver segítségével elemeztünk ki.

3.2.1. A KCNQ1-alapú áramok jellemzése

A KCNQ1-alapú áramokat -80 mV-os holding potenciálról -20 és 50 mV közötti 5s hosszúságú teszimpulzusokkal váltottuk ki 10 mV-os lépésekben, majd ezt követte egy -40 mV-ra történő repolarizációs lépés a deaktiváló farokáram felvételének érdekében.

3.2.2. A KCNJ2-alapú káliumáram jellemzése

A KCNJ2-alapú áramokat a holding potenciáltól (-80 mV) 10 mV-os lépésekben -120 mV és +40 mV közötti teszimpulzusokkal váltottuk ki. Az áram amplitúdóit Ba²⁺ -szenzitív (cc: 30 µM) áramként rögzítettük a 300 ms-os teszimpulzus végén.

3.3. Immuncitokémia

A CHO-K1-et 4%-os formaldehid oldattal fixáltuk. A fixálás után a sejtmembránt búzacsíragglutinin Texas Red ellenanyaggal (1:400 hígítás) immunjelöltük szobahőmérsékleten 10 percig. A KCNJ2 alegység immunjelölését anti-KCNJ2 elsődleges antitesttel (1:1000 hígítás) történő inkubálással végeztük egy éjszakán át 4°C-on. Másnap a sejteket FITC-konjugált Anti-Rabbit IgG

másodlagos antitesttel (1:450 hígítás) inkubáltuk. Kétféle negatív kontrollt használtunk az immunfestés specificitásának ellenőrzésére.

A fluoreszcens képeket LSM880 konfokális mikroszkóppal készítettük. A képeket az ImageJ szoftverrel (1.52p) kvantitatív módon elemeztük.

3.4. A sóhidak előrejelzése a KCNJ2 citoplazmatikus doménjében

A homotetramer KCNJ2 csatornák citoplazmatikus doménjén (CD) belüli sóhidakat az ESBRI szoftver segítségével prediktáltuk az 1U4F és a 2GIX kristályszerkezetben. A hozzáférést a modellekhez az RCSB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) biztosította, és a RasWin Molecular Graphics Software (2.7.5.2) segítségével ábrázoltuk grafikusán.

3.5. Fehérje:fehérje kölcsönhatásvizsgálatok

A fehérje:fehérje kölcsönhatás vizsgálatokat a NanoBiT próbában megadott utasításokat követve végeztük el. Röviden, a transzfekciós eljárást követően 48 órával egy 96 lyukú lemezbe, lyukanként $1,6 \times 10^5$ sejtet töltöttünk. Elkészítettük a sejtpermeábilis NanoGlo Reagenst majd csökkentett megvilágítású környezetben a sejtekhez adtuk. A lemezt azonnal a 37 °C-ra előmelegített FLUOstar Optima Microplate Reader készülékbe helyeztük, és a mérést lumineszcencia üzemmódban elindítottuk.

3.6. Statisztikai analízis

A statisztikai tesztek a GraphPad Prism szoftver (8. verzió; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) segítségével végeztük el. Az LQT5 vizsgálat esetében az adatokat az átlag \pm 95%-os konfidenciaintervallum (95% CI) formájában mutattuk be, a csoportátlagokat egyszempontos ANOVA-val hasonlítottuk össze Holm-Sidak post hoc teszttel minden egyes kísérleti elrendezésben. Az ATS vizsgálat esetében az adatokat az átlag \pm 95%-os CI formájában mutatjuk be. A lumineszcenciaértékeket log-transzformáltuk a variancia homogén eloszlásának elérése érdekében. A csoportátlagokat Student T-tesztel vagy egyszempontos ANOVA-val hasonlítottuk össze, Bonferroni post hoc teszttel.

4. Eredmények és diszkusszió

4.1. Alegység kölcsönhatások az I_{Ks} ioncsatorna komplexen belül

A KCNQ1 a KCNE1-gyel együttesen lassan aktiválódó ioncsatornát alkot, és ez alapján a szív I_{Ks} csatornákát elsősorban KCNQ1 és a KCNE1 alegységekből álló heteromernek gondolták. Az LQT5 KCNE1 variánsok, mint például a transzgenikus LQT5 nyúlmodellben az LQT5 fenotípus kiváltására használt Gly52Arg-KCNE1 és az Asp76Asn-KCNE1 variáns, amelynek patogén szerepe az LQT5-ben jól ismert, erős domináns negatív hatással rendelkeznek, és gátolják a

KCNQ1+WT-KCNE1 csatornák áramamplitúdóját. A KCNE3 konstitutívan aktívvá teszi a KCNQ1 csatornát, és megfigyelték, hogy aktiválja a KCNQ1/KCNE1 komplexek által vezérelt áramokat. Ez utóbbi miatt a KCNE3 valószínűsíthetően egy olyan kiegészítő alegység, amely menekítheti az áram fenotípusát az LQT5 transzgenikus nyúlmodellben megfigyelt LQT5 KCNE1 allélok (pl. Gly52Arg-KCNE1) gátló hatásaitól. Annak érdekében, hogy feltárjuk a KCNE3 lehetséges szerepét a KCNQ1-alapú ioncsatornák modulációjában, a KCNQ1-et és a KCNE1-et további szabályozó alegységekkel együtt (beleértve az LQT5 KCNE1-et is), vagy azok nélkül, együttesen expresszáltuk.

4.1.1. A KCNE3 menekíti az áramdenzitást az LQT5 kontextusában

A KCNE3-at a KCNQ1-gyel és a WT-KCNE1-gyel együtt expresszáló 2-es csoport átlagos áramdenzitása hasonló volt, mint a csak KCNQ1-et és WT-KCNE1-et expresszáló 1-es csoporté. A 3-as és az 5-ös csoportban két LQT5 KCNE1-variánst, az LQT5 transzgenikus nyúlmodellben használt Gly52Arg-KCNE1-et és az LQT5-ben jól ismert patogén szerepet játszó KCNE1-variánst az Asp76Asn-KCNE1-et, együtt expresszáltuk a KCNQ1 és a WT-KCNE1 mellett. Ezek a csoportok képviselik a heterozigóta LQT5 genotípust, ha feltételezzük, hogy a KCNE1 az egyetlen kiegészítő alegység, amely a szív I_{Ks} csatornáit szabályozza. Mindkét LQT5 KCNE-variáns esetében az áramdenzitás jelentősen csökkent (3-as és 5-ös csoport) az 1. csoporthoz képest. A 3-as csoportban (KCNQ1 + WT-KCNE1 + Asp76Asn-KCNE1) az átlagos áramdenzitás 25,5 pA/pF volt, a KCNQ1, WT-KCNE1 és Gly52Arg-KCNE1-et együttesen expresszáló sejtekben (5-ös csoport) 31,7 pA/pF, mindkettő jelentősen alacsonyabb az 1-es csoportban tapasztalt áramdenzitáshoz képest (74,9 pA/pF). Ezek az adatok azt jelzik, hogy az Asp76Asn- és Gly52Arg-KCNE1-változatoknak erős domináns negatív hatása van KCNQ1 és WT-KCNE1 alapú ioncsatornákon.

Ezután a KCNE3-at a KCNQ1-gyel együttesen expresszáltuk a WT-KCNE1-gyel és az LQT5 mutáns KCNE1-változatok valamelyikével. Érdekes módon úgy tűnt, hogy a KCNQ1-alapú áramokat a KCNE3 még az LQT5 KCNE1-változatok jelenlétében is aktiválja. Az áramdenzitások szignifikánsan megnövekedtek, amikor az Asp76Asn-KCNE1 genetikai háttérnek (4-es csoport), valamint a Gly52Arg-KCNE1 genetikai háttérnek (6-os csoport) megfelelő csoportokba KCNE3-at adtunk, szemben a 3-as és 5-ös csoporttal, amelyek a megfelelő LQT5 genetikai háttérnek képviselték KCNE3 nélkül. Ezenkívül fontos, hogy az átlagos áramdenzitások statisztikailag nem különböztek az Asp76Asn- vagy Gly52Arg-KCNE1-variánsok jelenlétében (4-es és 6-os csoport) vagy hiányában (2-es csoport) a KCNE3-at tartalmazó csoportokban. Ezek az adatok azt mutatják, hogy az LQT5 KCNE1-variánsok KCNQ1-alapú csatornákra gyakorolt gátló hatását a KCNE3 mindkét különböző LQT5 genetikai háttér esetében menekítette.

4.1.1. A deaktivációs kinetika felgyorsul az LQT5 KCNE1 variánsok jelenlétében

A deaktivációs kinetika átlag felezési ideje nem mutat szignifikáns különbséget az 1-es csoport (KCNQ1+WT-KCNE1) és a 2-es csoport (KCNQ1+WT-KCNE1+KCNE3) között. A további cDNS-eket tartalmazó csoportokban (3-8-as csoportok) azonban a 2-es csoporthoz képest szignifikánsan csökkent a deaktivációs kinetika felezési ideje. Az LQT5 KCNE1 variánsok jelenlétében, függetlenül a KCNE3 jelenlététől megfigyelhető volt a felgyorsult deaktivációs kinetika.

4.1.3. Az aktivációs kinetika változatlan maradt az LQT5 KCNE1 variánsok vagy a KCNE3 jelenlétében.

Az átlagos időállandó minden kísérleti csoportban hasonló volt, mivel sem az LQT5 KCNE1 variánsok, sem a KCNE3 nem volt kimutatható hatással az aktivációs kinetikára.

4.1.4 Az aktiváció feszültségfüggése

Az aktiváció feszültségfüggését úgy jellemeztük, hogy a steady-state aktivációs görbék nemlineáris görbeillesztéséből kivontuk a fél-aktivációs feszültséget ($V_{1/2}$). A fél-aktivációs feszültségben nincs szignifikáns különbség az 1-es csoport (KCNQ1+WT-KCNE1) és a KCNE3-t tartalmazó 2-es csoport (KCNQ1+WT-KCNE1+KCNE3) között. A Gly52Arg-KCNE1 variáns jelenlétében nem volt megfigyelhető változás. Az Asp76Asn-KCNE1 variáns jelenlétében azonban a $V_{1/2}$ érték az 1-es csoporthoz képest szignifikánsan eltolódott pozitív irányba, függetlenül a KCNE3 jelenlététől. Az Asp76Asn-KCNE1 variáns esetén a steady-state aktivációs görbék jobbra tolódása ismert jelenség és közrejátszik dominánsan negatív funkcióvesztés kialakulásához.

Összefoglalva, a KCNE3-nak nincs hatása a KCNQ1 és a WT-KCNE1 alapú áramokra, de mindkét LQT5 variáns gátló hatását menekíti LQT5 kontextusban. A menekítő hatás azonban nem teljes, mivel a deaktivációs kinetika mindkét LQT5 KCNE1 variáns esetében gyorsult KCNE3 jelenlétében, és az Asp76Asn-KCNE1 variáns a KCNE3 jelenlététől függetlenül a steady state aktiváció pozitív irányba történő eltolódását okozza.

4.1.5 Az alegység sztöchiometria eltolódik KCNE3 jelenlétében a KCNQ1-alapú csatornakegységben

A patch clamp technika egész sejtes konfigurációjával a sejtmembránban jelen lévő összes ionsatorna által létrehozott transzmembrán áramok összeségét rögzítjük. Így ez a módszer nem nyújt információt arról, hogy a KCNE3 és a KCNE1 különálló ionsatorna-populációban van-e jelen, vagy együttesen egyazon ionsatorna-komplexben helyezkednek el. A NanoBIT fehérje-fehérje interakciós próbát használtuk, hogy betekintést nyerjünk ebbe a kérdéskörbe. A

Luciferáz enzim LgBiT és SmbiT fragmentjeit a KCNQ1 és a WT-KCNE1 C-terminális részéhez fuzionáltattuk, így jött létre a KCNQ1-LgBiT, illetve a KCNE1-SmbiT riporter konstrukt. A KCNQ1-LgBiT és a KCNE1-SmbiT riporter konstruktokat HEK-293 sejtekben különböző mennyiségű KCNE3-mal együtt expresszáltuk. Ezekben a kísérletekben a KCNQ1, KCNE1 és KCNE3 cDNS-kópiaszám arány 1:2:0, 1:2:1 és 1:2:2 volt.

Az átlagos relatív lumineszcencia (RLU) 158,4 volt az 1-es csoportban (1:2:0 cDNS arány), ami szignifikánsan különbözött a 2-es csoporttól (1:2:1 cDNS arány, 129,3 RLU). A 3-as csoportban (1:2:2 cDNS arány) azonban, ahol a HEK-293 sejtek azonos mennyiségű KCNE1-et és KCNE3-at tartalmaztak, az átlagos RLU csökkenés még kifejezettebb volt (96,7 RLU) az 1-es csoporthoz képest. Az alacsonyabb RLU értékek KCNE3 jelenlétében arra utalnak, hogy a KCNE3 csökkenti a KCNE1 mennyiségét a KCNQ1-alapú ioncsatorna komplexen belül. Mivel a KCNQ1 tetramerben csak korlátozott számú kötőhely van, amelyet a KCNE-hez hasonló kiegészítő alegységek foglalhatnak el, így ez azt jelentheti, hogy a KCNE3 képes elfoglalni ugyanazokat a kötőhelyeket, amelyeket a KCNE1 használ. A jövőben azonban még szükséges lenne vizsgálni ezeknek az alegységeknek a relatív kötődési affinitását a kötőhelyekhez.

Összefoglalva, a KCNE3 megakadályozza az LQT5 KCNE1 variánsok gátló hatását, ha heterológ módon együttesen vannak expresszáva. Továbbá a heterogén LQT5 genetikai hátteret képviselő alegység-összetétel KCNE3-mal kiegészítve gyorsított deaktivációs kinetikájú áramokat generál, ezáltal reprodukálja a transzgenikus LQT5 nyúlmodellben megfigyelt I_{Ks} tulajdonságait. A KCNE3 ezeket a hatásokat azáltal éri el, hogy helyettesíti a KCNE1 alegységet az I_{Ks} ioncsatorna makromolekuláris komplexén belül.

4.2. Alegység kölcsönhatások a KCNJ2 ioncsatorna komplexben

Egy új, korábban nem karakterizált mutációt fedeztek fel egy ATS-betegben (Glu293Lys), amely aminosavcsere okoz a KCNJ2 ioncsatorna CD-I régiójában. Annak érdekében, hogy megállapítsuk a Glu293Lys mutáció ATS-ben betöltött potenciálisan patogén szerepét, és betekintést nyerjünk a Glu293 aminosav szerepébe az ioncsatorna működésének tekintetében, valamint a Glu293Lys variáns esetén az ioncsatorna diszfunkciójához vezető molekuláris mechanizmusokba, a következőkben tárgyalt kísérleteket végeztük el. Pozitív kontrollként a Arg218Gln KCNJ2 variánsot alkalmaztuk, amelynek jól dokumentált domináns negatív hatása és patogén szerepe van az ATS-ben.

4.2.1 A Glu293Lys KCNJ2 variáns elektrofiziológiai jellemzése

A funkcionális hatások jellemzéséhez a WT és a mutáns KCNJ2 variánsok heterológ módon CHO sejtekben voltak expresszáva, és az áramokat egész sejtis patch clamp technikával jellemeztük.

A Glu293Lys variánst önmagában expresszáló sejtekben nem észleltünk áramot, ami a mutáció funkcióvesztő hatását jelzi. Ugyanezen körülmények között a WT KCNJ2 variánst önmagában vagy a WT és a Glu293Lys variánsok kombinációját expresszáló sejtek robusztus befelé egyenirányító áramot mutattak. A -60 mV-os tesztpulzusnál mért átlag áramdenzitás a WT KCNJ2-t egyedül expresszáló sejtekben voltak a legmagasabbak. A WT és egy mutáns KCNJ2 variáns együttes expressziója esetében pedig az áramdenzitás szignifikánsan kisebb volt mind a Arg218Glu, mind a Glu293Lys variáns esetében a homomer WT csatornákat expresszáló sejtekhez képest.

Összefoglalva, az adatok alapján a Glu293Lys variáns jelentős domináns-negatív hatást gyakorol a WT csatornákra, ami heterozigóta genetikai háttéren funkcióvesztést eredményez.

4.2.2 Az alegységek közötti sóhíd predikció a Glu293 közelében

A Glu293-nak az ionszatórna-komplexen belüli megfigyelése a KCNJ2 csatornák citoplazmatikus doménjének krisztallográfiai modelljével (1U4F; 2GIX) történt, amely felfedte, hogy a Glu293 a CD-I-nél helyezkedik el. Az ESBRI szoftver használatával kiderült, hogy a Glu293 részt vehet egy sóhíd-hálózat kialakításában, összesen négy aminosav bevonásával. E négy sóhíd mindegyike olyan aminosavak között jön létre, amelyek különböző alegységekben találhatóak, és ezért két egymással szomszédos alegységet kötnek össze, ez pedig hasonlóan prediktálható volt a KCNJ2 két független krisztallográfiai modelljében is.

A 293. pozícióban bekövetkező aminosav szubsztitúció, melynek eredményeként a pozitív töltésű glutaminsav negatív töltésű lizinre cserélődik ki, várhatóan károsítja az alegységek közötti sóhíd-hálózatot, ami viszont az alegységek közötti kapcsolatok zavarát eredményezheti.

4.2.3 A KCNJ2 alegységek szubcelluláris lokalizációjának vizsgálata

A Glu293Lys variáns esetében a CD-I-ben lévő sóhíd-hálózat károsodása befolyásolhatja a KCNJ2 alegységek összeszerelődését, ami a hibás térszerkezettel rendelkező fehérje komplexek (misfolded) citoplazmatikus felhalmozódását eredményezheti. Ennek a lehetőségnek a felderítéséhez immuncitokémiai kísérleteket végeztünk. A KCNJ2 átlagos fluoreszcencia-intenzitása mindhárom kísérleti csoportban szignifikánsan magasabb volt a membrán régióban, mint a citoplazmatikus régióban, míg a sejtmembránban és a citoplazmatikus régióban mért KCNJ2 immunjel aránya nem különbözött a kísérleti csoportok között. Érdekes módon a KCNJ2 és a WGA-TxRed kolokalizációja nem mutatott különbséget a WT és a Arg218Gln KCNJ2 variánsok esetében. A Glu293Lys variáns esetében a Pearson-féle korrelációs együttható azonban mind a WT, mind a Arg218Gln csoportokhoz képest szignifikánsan alacsonyabb volt. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a Glu293Lys variáns membránakkumulációja kevésbé hatékony a WT

és a Arg218Gln variánsokhoz képest. A citoplazmatikus felhalmozódásra azonban nem volt egyértelmű bizonyíték. Ezért úgy gondoljuk, hogy a Glu293Lys variáns tetramer komplexbe történő oligomerizációja elégtelen, és a misfolded Glu293Lys alegységek inkább a szubmembrán területen vannak jelen.

4.2.4 A KCNJ2 alegységek közötti fizikai interakciók vizsgálata

A Glu293Lys variáns elégtelen oligomerizációjának mechanikai megértése érdekében a NanoBiT próba két változata lett kifejlesztve. A NanoBiT rendszerben a Nanoluc luciferáz enzimet két fragmentumra, az úgynevezett nagy (LgBiT) és kis (SmBiT) fragmentumokra osztjuk. Az LgBiT és az SmBiT összekapcsolódva kiegészítik egymást, így funkcionális luciferáz enzimet hozva létre, amikor a két fragmens egymás közelében van. Érdekes módon, géntechnológia segítségével a két Nanoluc-fragmentum fuzionáltatható a kívánt fehérjékhez, és így egyfajta "közelségérzékelőként" használható. A lumineszcens jel megnő, ha az Lg- és SmBiT-fragmentumokkal megjelölt fehérjék fizikai közelségben vannak. Ebben a kísérlet sorozatban ezt a stratégiát alkalmaztuk az ioncsatorna-komplexen belüli alegység kölcsönhatások vizsgálatára.

Először az LgBiT és SmBiT tageket a KCNJ2 variánsok citoplazmatikus C-terminálisához fuzionáltattuk, így létrehozva az "intracelluláris" konfigurációt. Ebben az esetben az volt a célunk, hogy a szomszédos alegységek citoplazmatikus doménjeinek kapcsolatát vizsgáljuk a KCNJ2 ioncsatorna-komplexen belül. A második variációban, az úgynevezett "extracelluláris" konfigurációban a KCNJ2 variánsok C-terminálisai és az LgBiT vagy SmBiT fragmentumok közé egy extra transzmembrán domént, az úgynevezett Snorkel taget (-Sn-) terveztünk. Ebben a konfigurációban az LgBiT és SmBiT riportert konstruktok extracellulárisan jelennek meg, lehetőséget biztosítva számunkra annak felderítésére, hogy vajon a heteromer komplexek a membránba transzportálódnak és ott reprezentálódnak-e.

A homomer konfigurációban kifejeződő intracelluláris NanoBiT riporterek esetén az átlagos relatív lumineszcencia (RLU) értékek hasonlóak voltak a WT és a Arg218Gln csoportban. A Glu293Lys csoport esetében azonban a RLU értékek jelentősen alacsonyabbak voltak a WT vagy a Arg218Gln csoporthoz képest. Továbbá a Glu293Lys csoportban megfigyelt lumineszcencia értékek nem különböztek a negatív kontrolltól.

A heterozigóta genotípus modellezésére szolgáló heteromer konfigurációkat illetően az átlagos RLU értékek nem különböztek a WT-LgBiT és a Arg218Gln-SmBiT konstruktokat expresszáló sejtekben a pozitív kontrollhoz képest. Azonban WT-LgBiT és Glu293Lys-SmBiT konstruktok együttes expressziója esetében a lumineszcenciaértékek szignifikánsan alacsonyabbak voltak a pozitív kontrollhoz képest, ugyanakkor szignifikánsan magasabbak a negatív kontrollhoz viszonyítva. Ezek az adatok együttesen azt jelzik, hogy a Glu293Lys alegységek képesek

heteromert képezni a WT alegységekkel, de alacsonyabb hatékonysággal, mint a WT vagy a Arg218Gln változat. Ennek a megfigyelésnek a lehetséges magyarázata az lehet, hogy a Glu293Lys jelenlétében az oligomerizációs folyamat sérülést szenved.

Az "extracelluláris" NanoBiT riporterek esetében az átlag RLU hasonló volt a pozitív kontrollban a Arg218Gln-Sn-LgBiT+Arg218Gln-Sn-SmBiT, valamint a Glu293Lys-Sn-LgBiT+Glu293Lys-Sn-SmBiT csoportban is. Azonban az RLU szignifikánsan magasabb volt ezekben a csoportokban a negatív kontroll csoporthoz képest. Az extracelluláris NanoBiT riporterekkel végzett kísérletek során kapott eredmények azt mutatják, hogy mind a Arg218Gln, mind a Glu293Lys variánsok összeszerelődnek a WT alegységekkel, és ezek a heteromerek léteznek a sejtmembránban.

5. Összefoglalás és új eredmények

5.1. Az alegységek kölcsönhatásai az I_{Ks} ioncsatorna komplexen belül

1. A KCNQ1, a WT-KCNE1 és a Gly52Arg-KCNE1 variánsok KCNE3-mal történő együttes expressziója olyan in vitro ionáram fenotípust reprezentál, amely összhangban van az LQT5 transzgenikus nyúlmodellben in vivo megfigyelt I_{Ks} fenotípussal.
2. A KCNE3 eltolja a KCNQ1- és KCNE1 alapú ioncsatornák alegységeinek sztöchiometriai arányát azáltal, hogy csökkenti a KCNE1 átlagos mennyiségét ugyanazon ioncsatorna-komplexen belül.
3. Összességében eredményeink erősen alátámasztják azt a hipotézist, hogy a KCNE1 mellett más, szerkezetileg rokon kiegészítő alegységek, mint például a KCNE3, is részt vesznek az I_{Ks} csatornák kialakításában és szabályozásában a kardiomiocitákban.

5.2. Alegység kölcsönhatások a KCNJ2 ioncsatorna komplexben

1. A Glu293Lys KCNJ2 mutáció funkcióvesztést okoz és domináns negatív hatást gyakorol a KCNJ2 áramokra. Ezek az eredmények bizonyítékot szolgáltatnak a Glu293Lys KCNJ2 variáns AT51-ben betöltött kóroki szerepére.
2. A Glu293 szerepet játszik a KCNJ2 alegységek összeszerelődésében és a csatorna vezetőképességének fenntartásában, valószínűleg azáltal, hogy részt vesz egy alegységek közötti sóhíd-hálózat kialakításában a CD-I régióban.

5.3. Molekuláris próbák kidolgozása az ioncsatorna alegységek kölcsönhatásainak vizsgálatához

A NanoBiT próba két különböző konfigurációját fejlesztettük ki és alkalmaztuk a K^+ csatorna alegység kölcsönhatások vizsgálatára, ezzel bővítve a vonatkozó kutatási módszerek körét a területen.

1. A NanoBiT próba intracelluláris konfigurációját a pórusképző és szabályozó alegységek közötti kölcsönhatások vizsgálatára alkalmaztuk az LQT5, valamint az alegységek közötti kölcsönhatások vizsgálatára az ATS1 kontextusában.
2. A NanoBiT próba extracelluláris konfigurációját arra alkalmaztuk, hogy kimutassuk a KCNJ2 alegység membránban való prezentációját.

6. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Ördög Balázsnak a doktori tanulmányaim során nyújtott folyamatos iránymutatásáért. Az orvosbiológiai kutatás iránti elkötelezettsége mindig arra ösztönzött, hogy a lehető legjobbra törekedjek.

Őszinte köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Baczkó Istvánnak és Prof. Dr. Varró Andrásnak, a jelenlegi és a hajdani tanszékvezetőnek is, hogy lehetőséget biztosítottak kísérleteim kivitelezésére a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet berkein belül.

Szeretnék köszönetet mondani a társelsőszerzőknek és az együttműködő partnereknek, akiknek a munkája nélkül ez a doktori értekezés nem jöhetett volna létre: Hartai Teodórának, Dr. Borbás Jánosnak (II. sz. Belgyógyászati Klinika és Kardiológiai Központ, Szegedi Tudományegyetem), Dr. Sepp Róbertnek (II. sz. Belgyógyászati Klinika és Kardiológiai Központ, Szegedi Tudományegyetem), Alain J. Labornak, PhD (Alap- és Alkalmazott Orvostudományi Tanszék, Genti Egyetem).

Köszönettel tartozom továbbá kollégáimnak és barátaimnak, Dr. Demeter-Haludka Viviennek és Dr. Miskolczi Gottfriednek szüntelen támogatásukért.

Végül, de nem utolsósorban külön köszönet illeti férjemet, Lászlót, aki a legfőbb támaszom, valamint szüleimet és egész családomat a kimeríthetetlen szeretetükért és bátorításukért.