



Fakulta matematiky, fyziky a informatiky Univerzity
Komenského v Bratislave
Ústav klinického a translačného výskumu, Biomedicínske
centrum, Slovenská akadémia vied



Štúdium redoxnej regulácie mitochondriových chloridových kanálov kardiomyocytov

Bc. Jana Havlíková

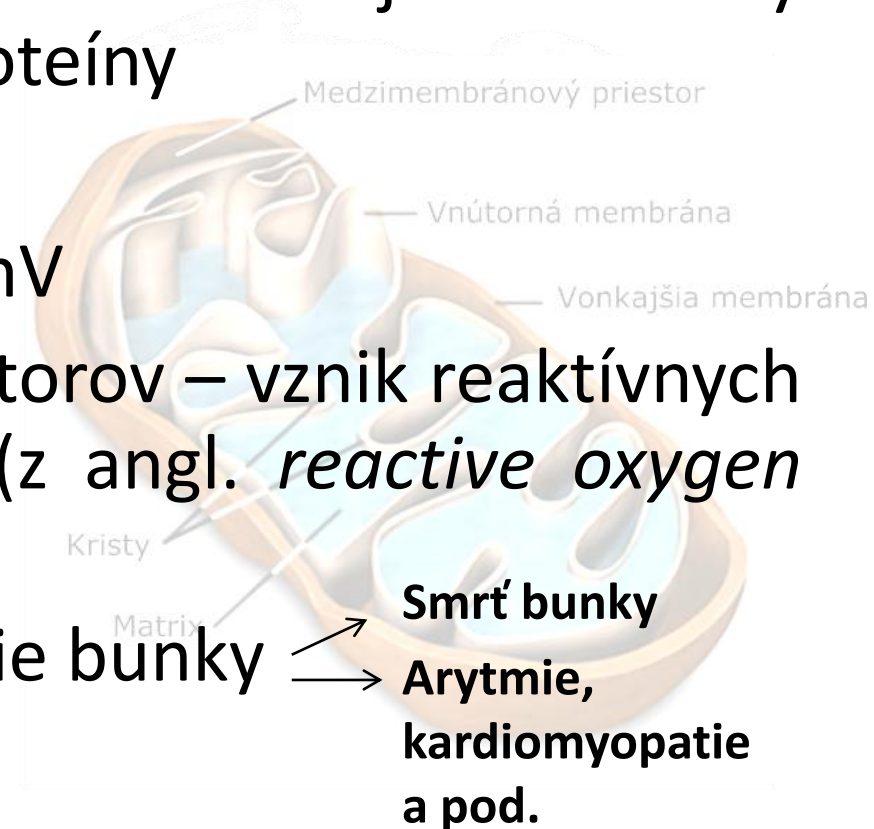
Školiteľ: Mgr. Marián Grman, PhD.



24.05.2016

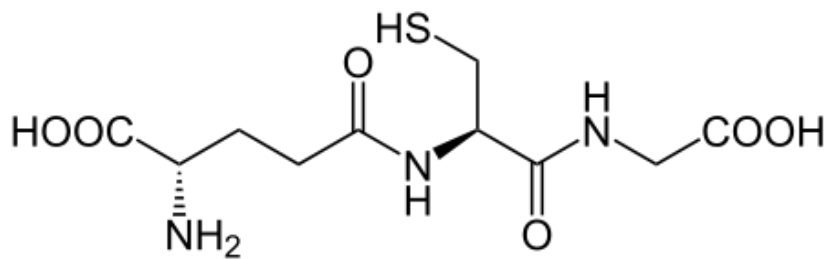
Mitochondria a transmembránový potenciál $\Delta\Psi_m$

- Mitochondria ako energetické centrum bunky
- Zloženie vnútornej mitochondriovej membrány (IMM) – až 70% tvoria proteíny
- Iónové kanály
- Udržiavanie $\Delta\Psi_m = -160 \text{ mV}$
- Pôsobenie stresových faktorov – vznik reaktívnych kyslíkových foriem ROS (z angl. *reactive oxygen species*)
- Porucha $\Delta\Psi_m$ – poškodenie bunky

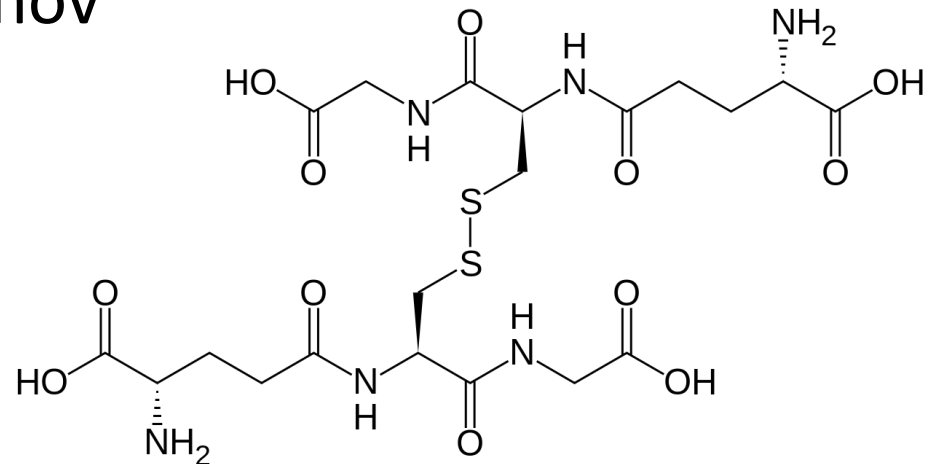


Iónové kanály a redoxná regulácia

- Mitochondriové chloridové iónové kanály (MitoCl) – úloha v redoxnej signalizácii a apoptotických procesoch
- ROS – poškodenie proteínov
- Antioxidant GSH



(A)



(B)

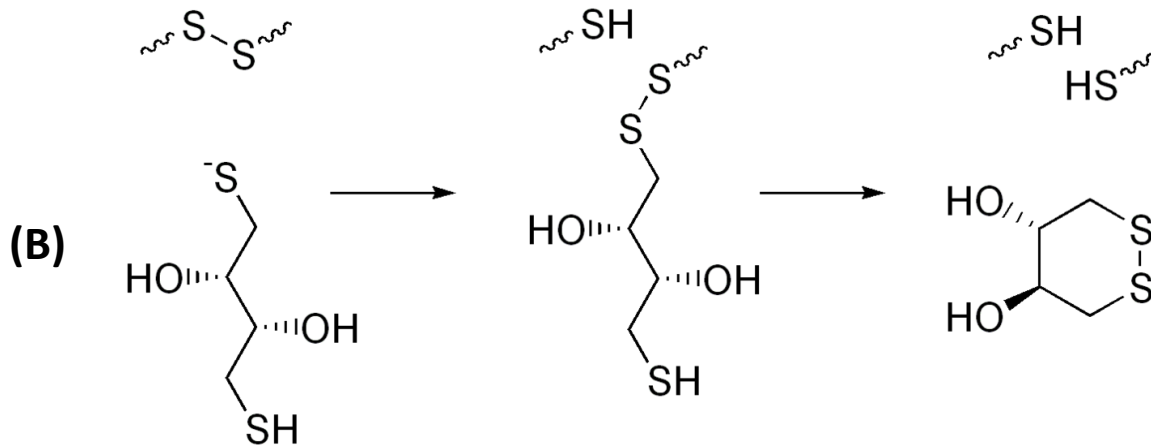
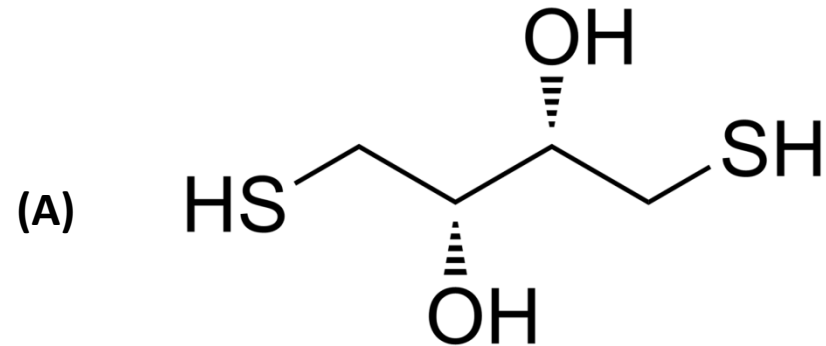
Obr. 1. (A) Redukovaná forma glutatiónu (GSH). (B) Oxidovaná forma glutatión-disulfid (GSSG).

(dostupné na <https://en.wikipedia.org/wiki/Glutathione> a

https://en.wikipedia.org/wiki/Glutathione_disulfide)

Iónové kanály a redoxná regulácia

- Ditioneitol (DTT) – reduktant disulfidových väzieb



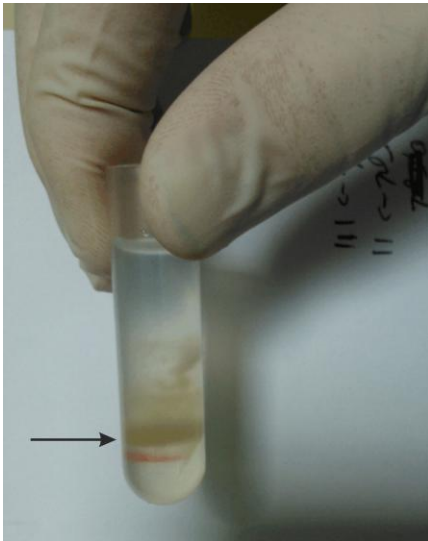
Obr. 2. (A) Štruktúrny vzorec DTT. (B) Priebeh redukcie disulfidovej väzby v prítomnosti DTT. (dostupné na <https://en.wikipedia.org/wiki/Dithiothreitol>)

Cieľ práce

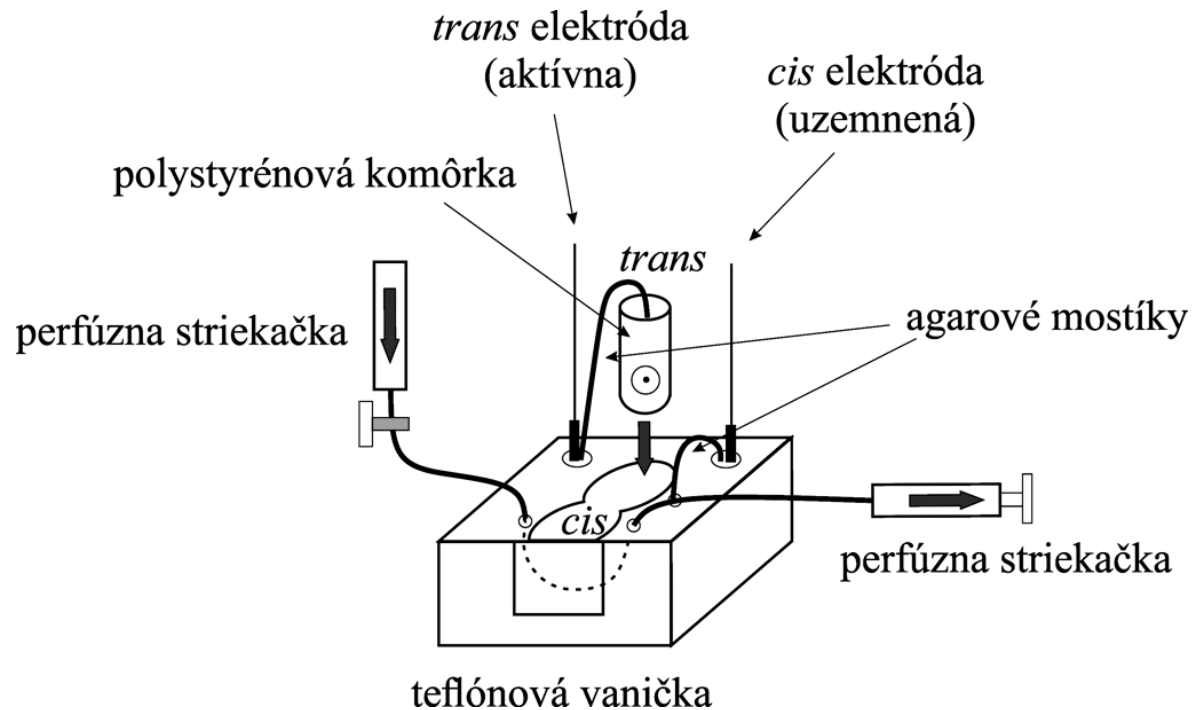
- Preskúmať účinok rôznych pomerov redukovanej (GSH) a oxidovanej (GSSG) formy glutatiónu a rôznych koncentrácií ditiotreitolu (DTT) na základné biofyzikálne vlastnosti chloridových kanálov mitochondrií izolovaných zo srdca potkana
- Preskúmať napäťovú závislosť chloridových kanálov mitochondrií izolovaných zo srdca potkana

Materiál a metódy

- Mitochondrie izolované zo srdc potkanov kmeňa Wistar
- BLM metóda (z angl. *bilayer/black lipid membrane*)



Obr. 3. Diferenciálna centrifugácia v Percoll gradiente, pomocou ktorej sme získali čistú mitochondriovú frakciu (odoberaná vrstva označená šípkou).



Obr. 4. Schéma aparatúry BLM.

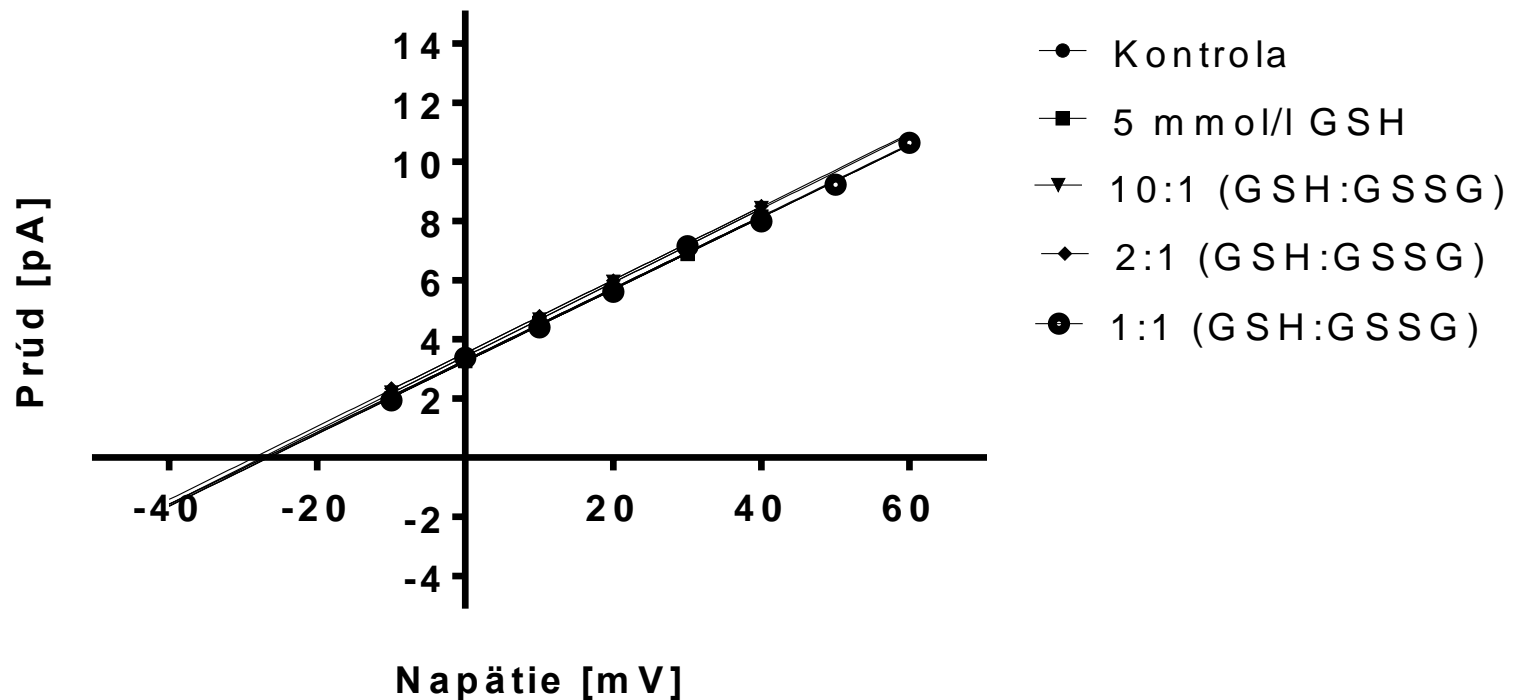
Výsledky

Vplyv rôznych pomerov GSH:GSSG

- Vplyv rôznych pomerov GSH:GSSG sme testovali postupným pridávaním GSSG do 5 mmol/l GSH do *cis* aj *trans* strany
- Fyziologické koncentrácie GSH v bunke 1 – 10 mmol/l

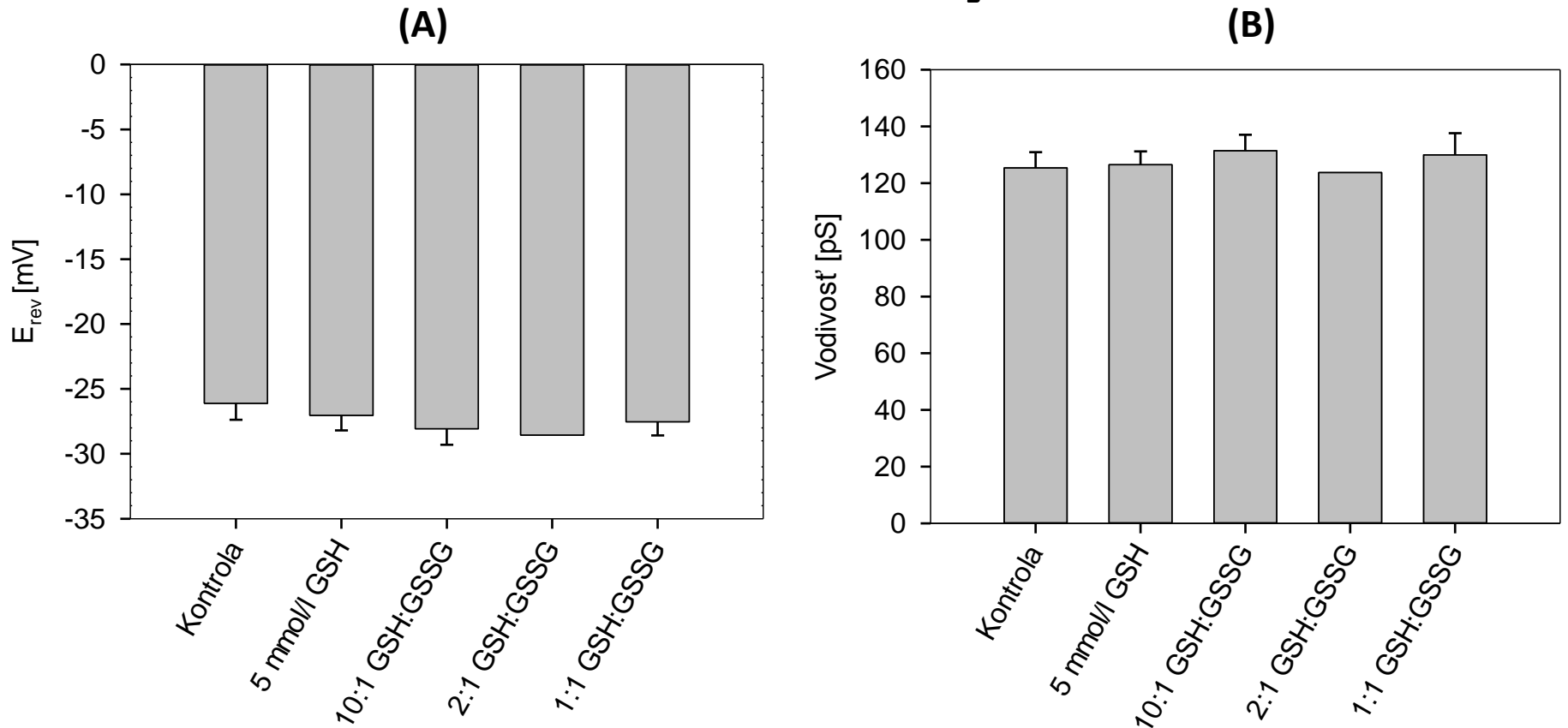
Vplyv rôznych pomerov GSH:GSSG z *cis* strany

I-V charakteristika



Obr. 5. Vplyv rôznych pomerov GSH a GSSG na I-V charakteristiku chloridového kanálu z *cis* strany (ukážková I-V charakteristika). Čiary sa prekrývajú a sú takmer identické, uvedené pomery GSH:GSSG nemajú vplyv na vlastnosti kanálu. Body boli preložené regresnou priamkou.

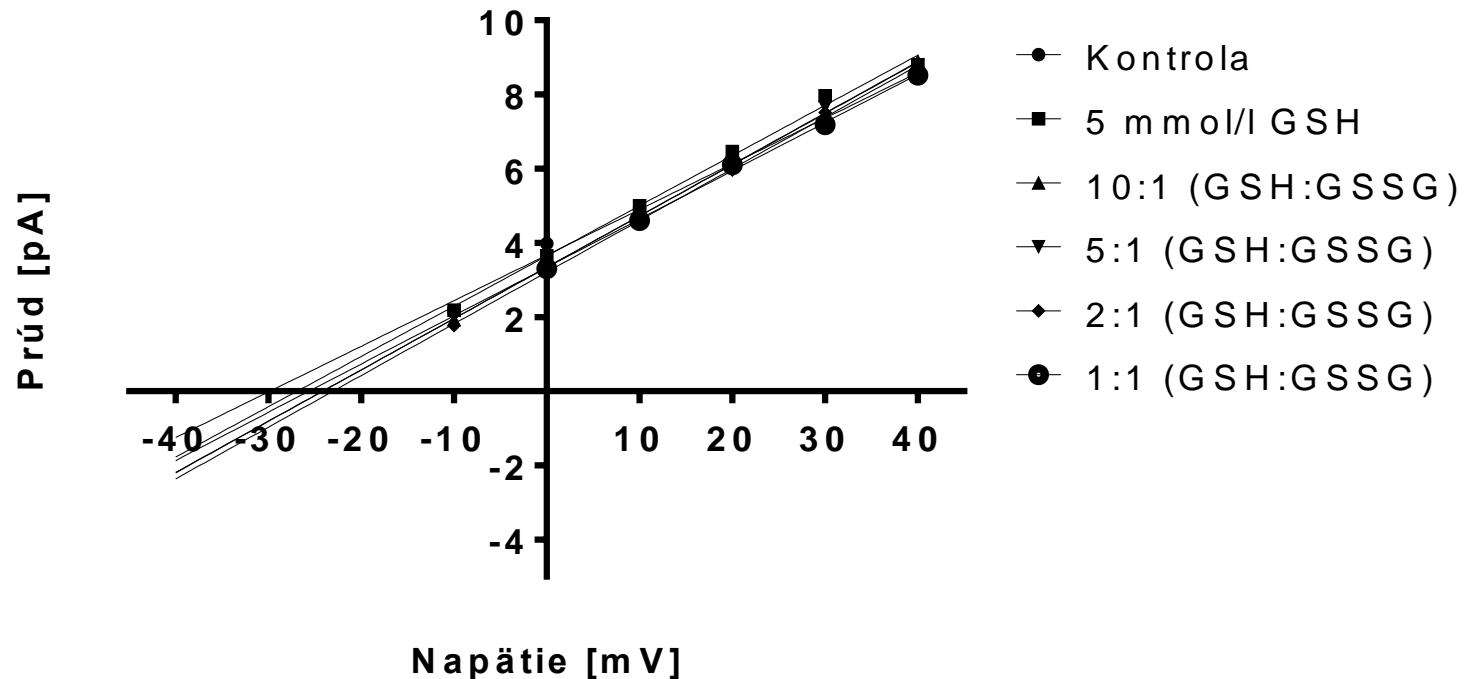
Vplyv rôznych pomerov GSH:GSSG z *cis* strany



Obr. 6. Vplyv rôznych pomerov GSH:GSSG z *cis* strany MitoCl kanálu. (A) Hodnoty reverzného potenciálu (jednofaktorový ANOVA test, 95% konfidenčný interval, $p = 0,92$, stredné hodnoty \pm SEM, $n = 4$). (B) Hodnoty vodivosti kanálu (jednofaktorový ANOVA test, 95% konfidenčný interval, $p = 0,94$, stredné hodnoty \pm SEM, $n = 4$).

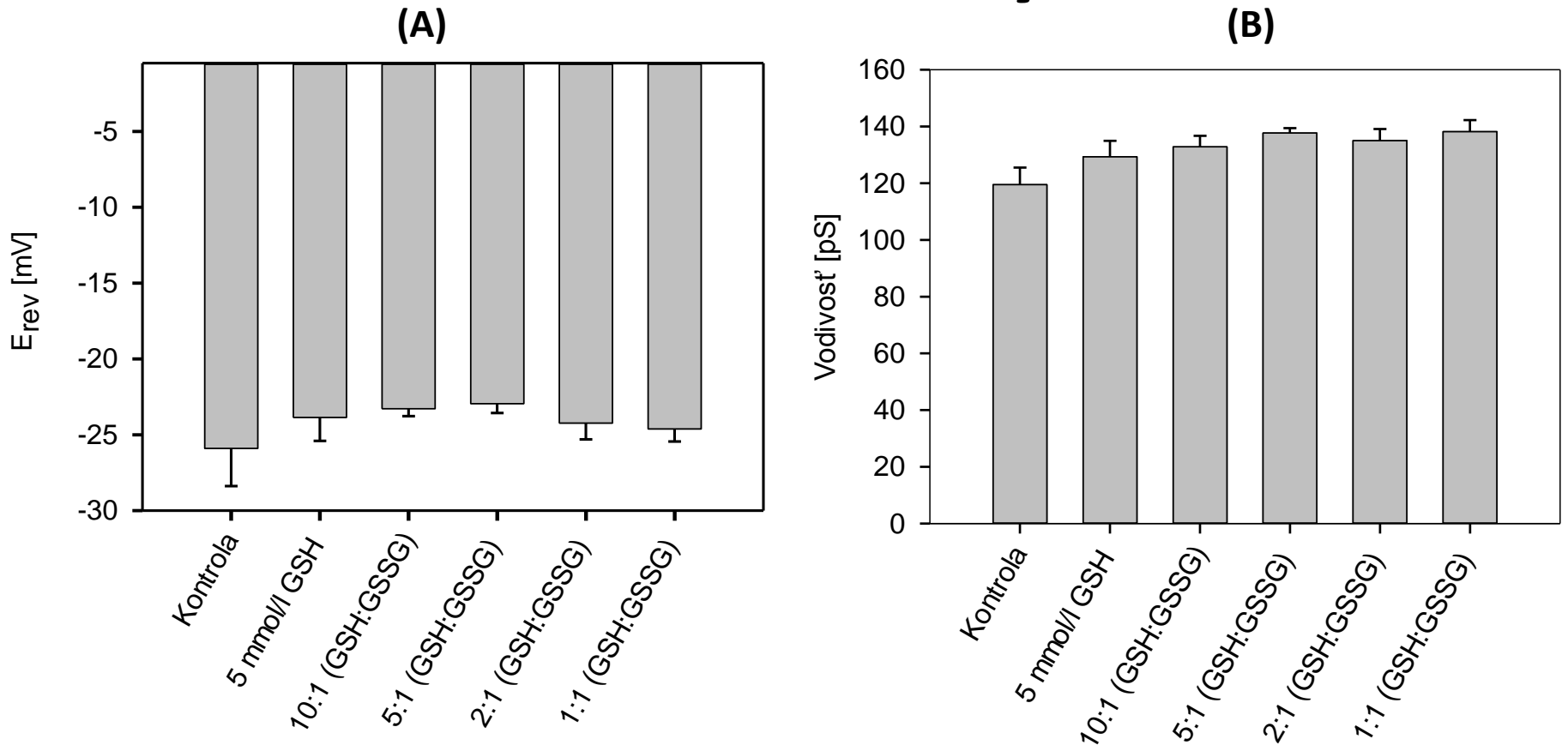
Vplyv rôznych pomerov GSH:GSSG z *trans* strany

I-V charakteristika



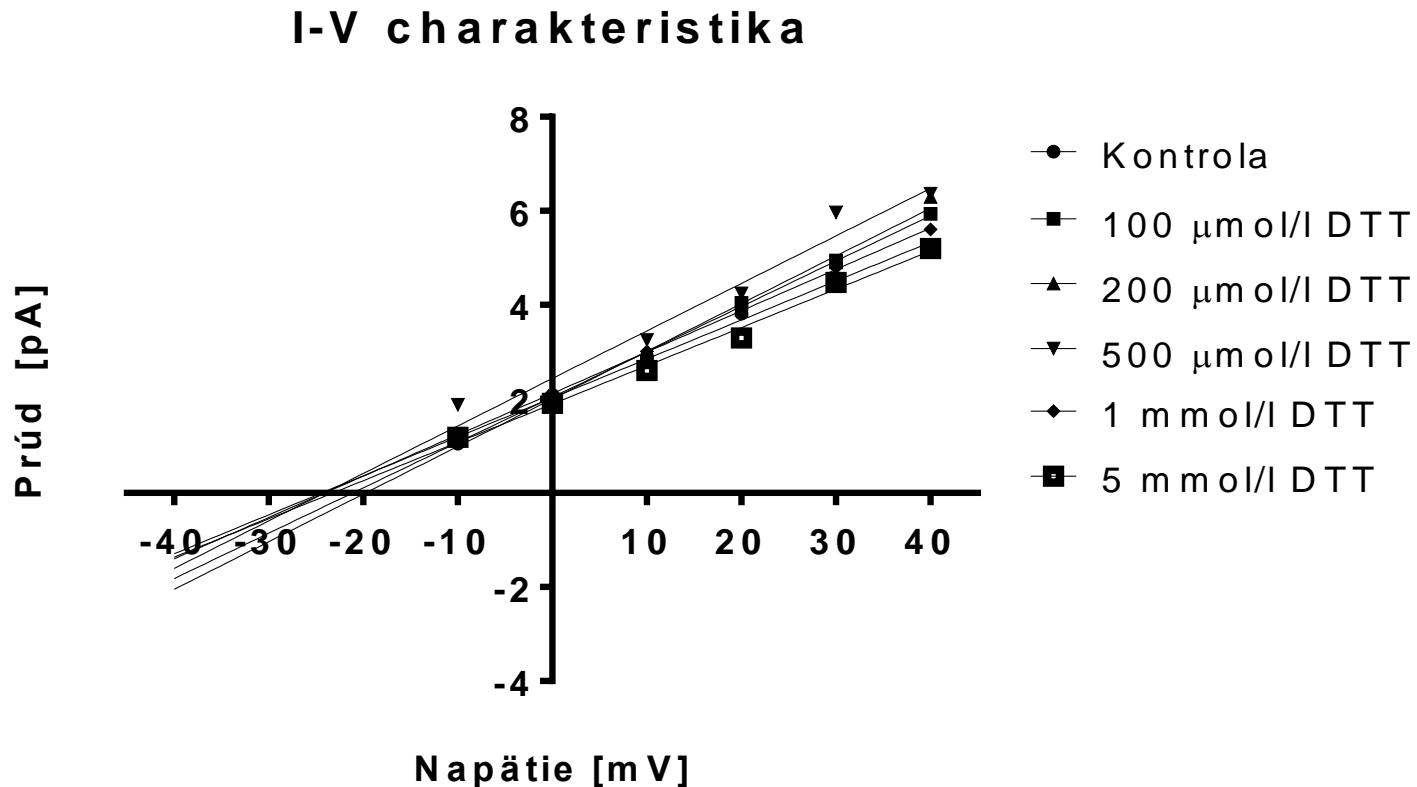
Obr. 7. Vplyv rôznych pomerov GSH a GSSG na I-V charakteristiku chloridového kanálu z *trans* strany (ukážková I-V charakteristika). Čiary sa prekrývajú a sú takmer identické, uvedené pomery GSH:GSSG nemajú vplyv na vlastnosti kanálu. Body boli preložené regresnou priamkou.

Vplyv rôznych pomerov GSH:GSSG z *trans* strany



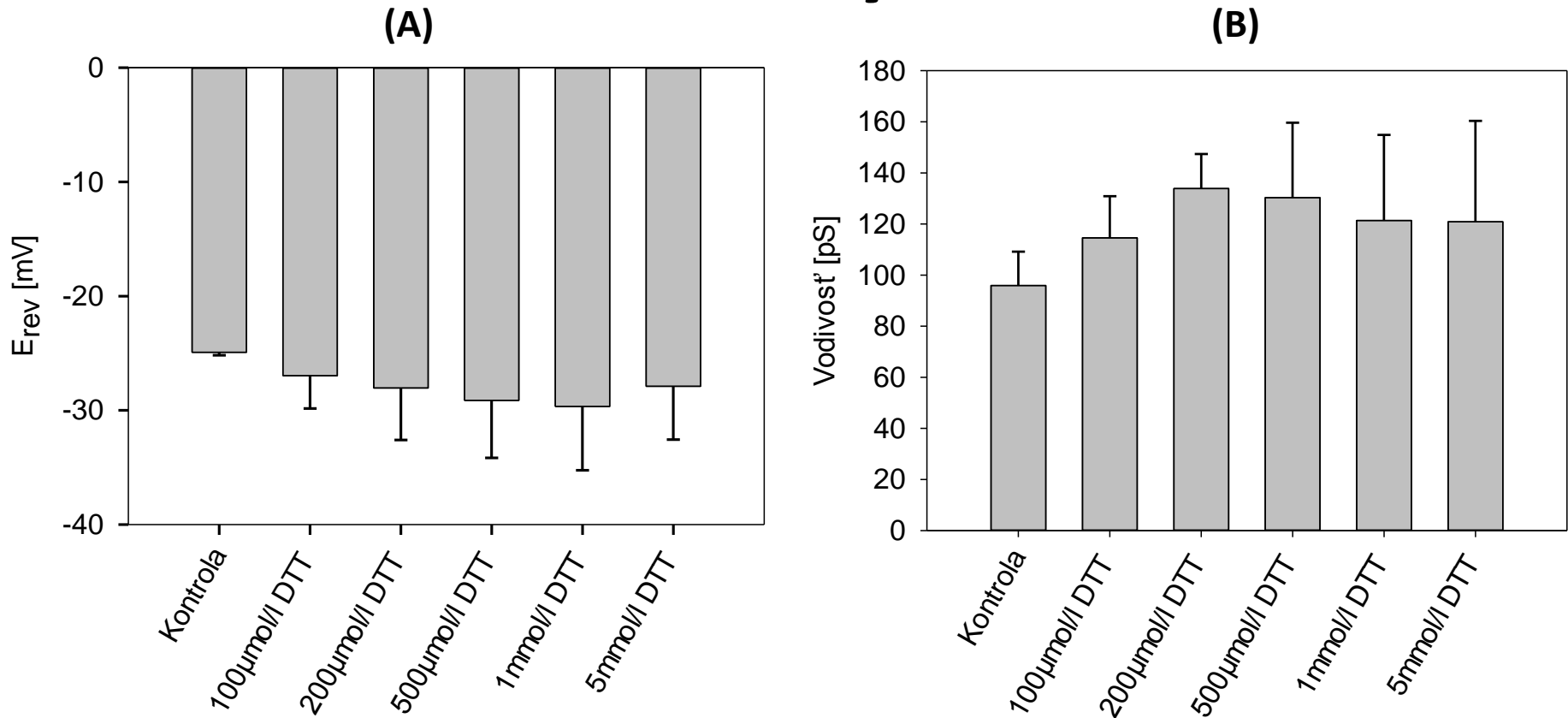
Obr. 8. Vplyv rôznych pomerov GSH:GSSG z *trans* strany MitoCl kanálu. (A) Hodnoty reverzného potenciálu (jednofaktorový ANOVA test, 95% konfidenčný interval, $p = 0,70$, stredné hodnoty \pm SEM, $n = 3$). (B) Hodnoty vodivosti kanálu (jednofaktorový ANOVA test, 95% konfidenčný interval, $p = 0,09$, stredné hodnoty \pm SEM, $n = 3$).

Vplyv rôznych koncentrácií DTT z *cis* strany



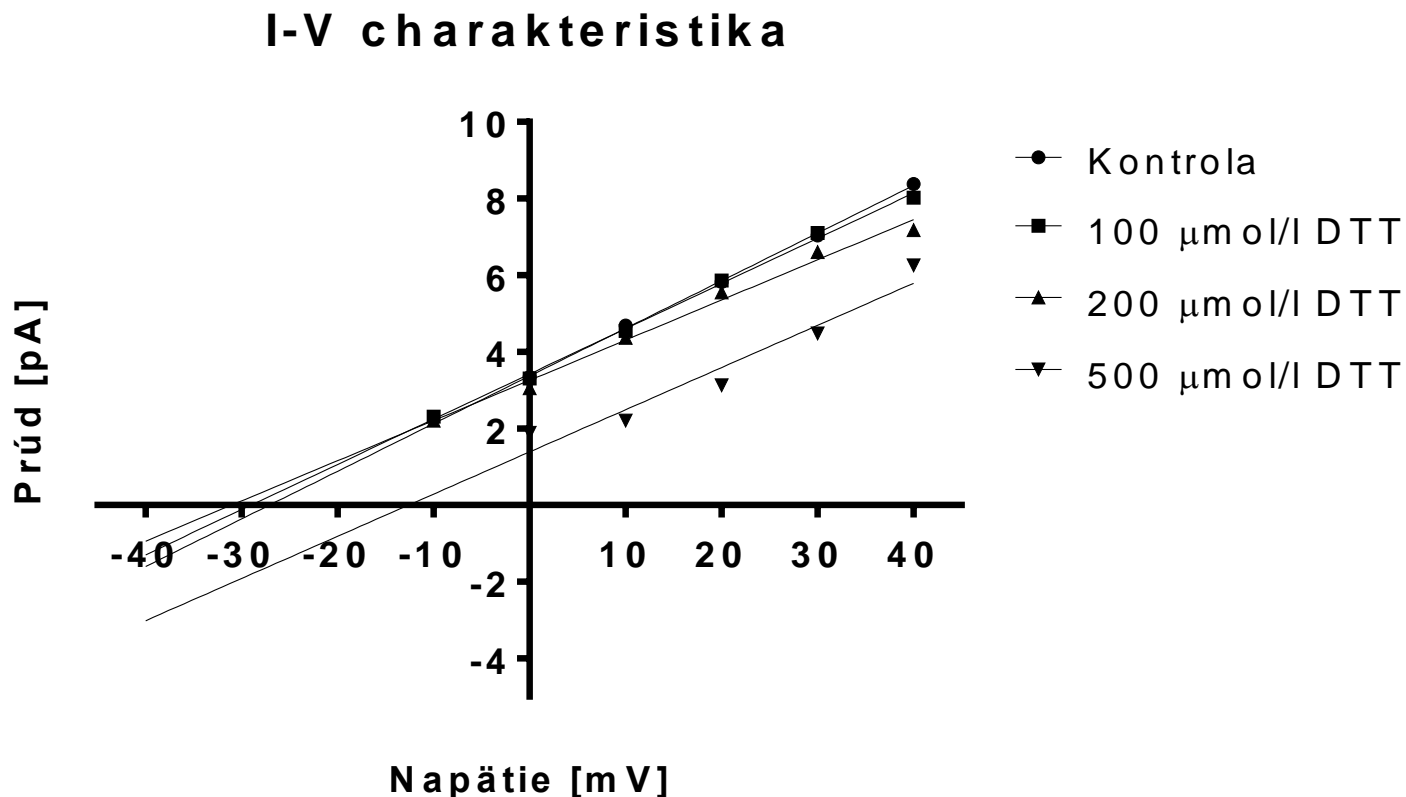
Obr. 9. Vplyv DTT na I-V charakteristiku chloridového kanálu z *cis* strany (ukážková I-V charakteristika). Čiary sa prekrývajú a sú takmer identické, uvedené koncentrácie DTT nemajú vplyv na vlastnosti kanálu. Body boli preložené regresnou priamkou.

Vplyv rôznych koncentrácií DTT z *cis* strany



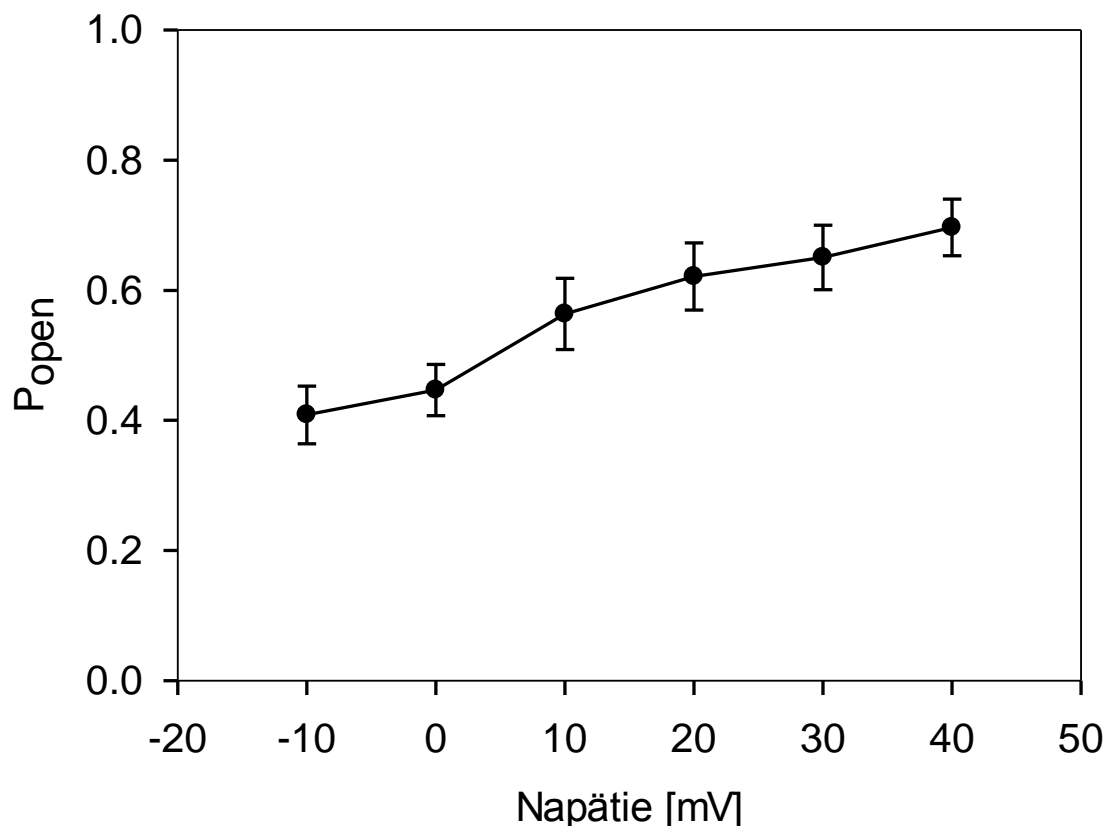
Obr. 10. Vplyv rôznych koncentrácií DTT z *trans* strany MitoCl kanálu. (A) Hodnoty reverzného potenciálu (jednofaktorový ANOVA test, 95% konfidenčný interval, $p = 0,82$, stredné hodnoty \pm SEM, $n = 4$). (B) Hodnoty vodivosti kanálu (jednofaktorový ANOVA test, 95% konfidenčný interval, $p = 0,74$, stredné hodnoty \pm SEM, $n = 4$).

Vplyv rôznych koncentrácií DTT z *trans* strany



Obr. 11. Vplyv DTT na I-V charakteristiku chloridového kanálu z *trans* strany (ukážková I-V charakteristika). Zmena I-V charakteristiky nastala pri koncentrácii 500 $\mu\text{mol/l}$ DTT. Body boli preložené regresnou priamkou.

Napätová závislosť MitoCl



Obr. 12. Napätová závislosť chloridových kanálov mitochondrií izolovaných zo srdca potkana. Zobrazený je vzťah pravdepodobnosti otvorenia kanálu od aplikovaného napätia (jednofaktorový ANOVA test, 95% konfidenčný interval, stredné hodnoty \pm SEM, $n = 15$).

Záver

- Vyšetřili sme vplyv látok GSH:GSSG a DTT na biofyzikálne vlastnosti mitochondriových chloridových kanálov izolovaných zo srdca potkana
- Rôzne pomery GSH:GSSG nemali vplyv ani z *cis* ani z *trans* strany na biofyzikálne vlastnosti MitoCl
- Vplyv DTT z *cis* strany taktiež nemal efekt
- Zvyšujúca sa koncentrácia DTT z *trans* strany pri koncentrácii 500 $\mu\text{mol/l}$ spôsobila zvýšenie hodnoty reverzného potenciálu – avšak nemáme dostatok experimentov

Záver

- Výsledky sme porovnali so štúdiou Singh a Ashley, 2007, ktorí však používali purifikovaný proteín CLIC4 (Chloride Intracellular Channel 4)
- Nami merané chloridové kanály sa hodnotou vodivosti ($\sim 100 - 120$ pS), odlišujú od kanálov v štúdiu Littler a kol. (~ 30 pS), preto látky GSH:GSSG a DTT nemuseli mať vplyv na biofyzikálne vlastnosti kanálu → Závislosť od podmienok
- Naše výsledky môžu byť podporené nedávnou štúdiou Ponnalagu a kol., ktorí ukázali, že CLIC4 je proteínom OMM a nie IMM. V IMM sa nachádza CLIC5, ktorý však doposiaľ nebol redoxne študovaný a mohol by byť totožný s nami študovaným MitoCl kanálom
- Napäťová závislosť – načrtnutie ďalšej možnej oblasti výskumu MitoCl

Ďakujem za pozornosť.

Použitá literatura

- Littler, D.R., Assaad, N.N., Harrop, S.J., Brown, L.J., Pankhurst, G.J., Luciani, P., Aguilar, M.I., Mazzanti, M., Berryman, M.A., Breit, S.N. a Curmi, P.M. Crystal structure of the soluble form of the redox-regulated chloride ion channel protein CLIC4. *Febs j.* 2005, **272**(19), 4996-5007.
- Nishida, H., Matsumoto, A., Tomono, N., Hanakai, T., Harada, S. a Nakaya, H. Biochemistry and physiology of mitochondrial ion channels involved in cardioprotection. *FEBS Letters.* 2010, **584**(10), 2161-2166.
- O'Rourke, B., Cortassa, S. a Aon, M.A. Mitochondrial ion channels: gatekeepers of life and death. *Physiology (Bethesda).* 2005, **20**, 303-315.
- Ponnalagu, D., Gururaja Rao, S., Farber, J., Xin, W., Hussain, A.T., Shah, K., Tanda, S., Berryman, M., Edwards, J.C. a Singh, H. Molecular identity of cardiac mitochondrial chloride intracellular channel proteins. *Mitochondrion.* 2016, **27**, 6-14.
- Singh, H. a Ashley, R.H. CLIC4 (p64H1) and its putative transmembrane domain form poorly selective, redox-regulated ion channels. *Mol Membr Biol.* 2007, **24**(1), 41-52.