

# Štúdium redoxnej regulácie mitochondriových chloridových kanálov kardiomyocytov

Jana Havlíková<sup>1\*</sup>  
Školiteľ: Marián Grman<sup>2‡</sup>

<sup>1</sup>Fakulta matematiky, fyziky a informatiky Univerzity Komenského v Bratislave, Mlynská Dolina, 842 48 Bratislava

<sup>2</sup>Ústav klinického a translačného výskumu, Biomedicínske centrum, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava

## Abstrakt

Mitochondrie sú typickým príkladom bunkových organel, ktorých funkcia je úzko spätá s udržiavaním redoxnej rovnováhy. Kyslík, ako jedna z kľúčových molekúl v procese oxidačnej fosforylácie, je vysoko reaktívna molekula, zodpovedná za produkciu tzv. reaktívnych kyslíkových foriem (ROS, z angl. *reactive oxygen species*), ktoré môžu ireverzibilne poškodiť proteíny a ich funkciu v membráne mitochondrií. K týmto proteínom patria aj iónové kanály, ktorých porucha môže spôsobiť vážne poškodenie funkcie buniek alebo dokonca ich smrť. V našej štúdii sme sa venovali výlučne iba mitochondriovým chloridovým kanálom kardiomyocytov izolovaných zo srdca potkana. Pre získanie čistej frakcie submitochondriových vezikúl (SMP) sme použili diferenciálnu centrifugáciu v Percoll gradiente. Na zisťovanie jedнокanálových (tzv. „single-channel“) charakteristík sme použili metódu inkorporácie iónových kanálov do planárnej lipidovej dvojvrstvy (BLM, z angl. *bilayer/black lipid membrane*). Redoxnú reguláciu týchto kanálov sme sledovali aplikovaním redukovanej a oxidovanej formy glutatiónu (GSH a GSSG) a ditiotreitolu (DTT), bežne používaného reduktanta disulfidových väzieb, na obe strany kanálu (tzv. *cis* a *trans* strana). Rôzne pomery GSH:GSSG z *cis* a *trans* strany nemali efekt, rovnako ako zvyšujúca sa koncentrácia DTT z *cis* strany. Koncentrácia DTT 500  $\mu\text{mol/l}$ , aplikovaná do *trans* oddielu, spôsobila zvýšenie reverzného potenciálu. Skúmaním napäťovej závislosti mitochondriových chloridových kanálov sme zistili, že sú napäťovo závislé – s rastúcim kladným napätím sa zvýšila pravdepodobnosť otvorenia kanálu  $P_{\text{open}}$ . Kanály, ktoré sme skúmali, pravdepodobne nezodpovedajú proteínu CLIC4. Keďže oxidačný stres úzko súvisí s transmembránovým potenciálom, experimentom

napäťovej závislosti sme načrtli ďalšiu možnú oblasť výskumu mitochondriových chloridových kanálov.

**Kľúčové slová:** mitochondriový chloridový kanál, BLM, redukovaný glutatión (GSH), oxidovaný glutatión (GSSG), ditiotreitol (DTT), napäťová závislosť

## 1 Úvod

### 1.1 Mitochondria a transmembránový potenciál

Mitochondrie sú organely najčastejšie oválneho tvaru, nachádzajúce sa takmer vo všetkých eukaryotických bunkách. V mitochondriách vzniká najväčšie množstvo využiteľnej energie pochádzajúcej z metabolizmu sacharidov a mastných kyselín. Táto energia je následne zabudovaná do molekúl ATP prostredníctvom procesu nazývaného oxidačná fosforylácia. Mitochondria sa skladá zo systému membrán – vonkajšej (OMM, z angl. *outer mitochondrial membrane*) a vnútornej (IMM, z angl. *inner mitochondrial membrane*), medzi ktorými sa nachádza medzimembránový priestor (Obr. 1). IMM tvorí výbežky, tzv. krysty, slúžiace na zväčšenie plochy pre prebiehajúce procesy. IMM vymedzuje veľký vnútorný priestor mitochondrie, tzv. mitochondriový matrix.

OMM aj IMM sa okrem lipidov skladajú aj z určitého množstva proteínov. IMM ich obsahuje viac než 70%. Medzi tieto proteíny patria aj iónové kanály. Sú to transmembránové proteíny, ktoré sa podieľajú na prenose iónov z/do mitochondriového matrixu. V skutočnosti je IMM takmer nepriepustná pre ióny, okrem  $\text{H}^+$  tvoriaceho hnciu silu pre vznik molekúl ATP.

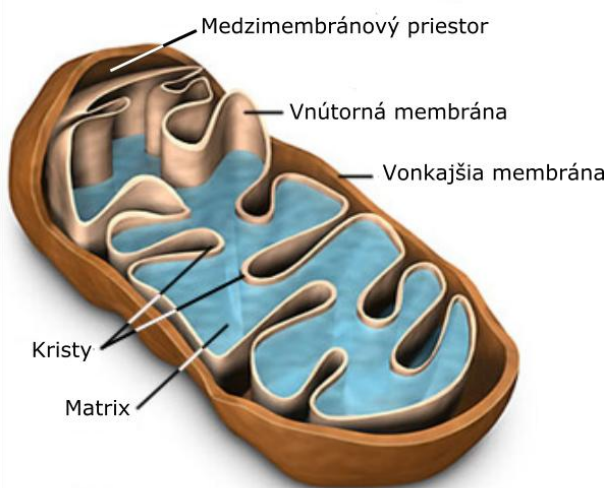
Elektrický potenciál, vytvárajúci sa v dôsledku nerovnomerného rozloženia iónov na vonkajšej a vnútornej strane IMM, vieme určiť z Nernstovej rovnice. Jeho hodnota je  $-160 \text{ mV}$  (negatívny

\* janka.havlik@gmail.com

‡ marian.grman@savba.sk

z vnútornej strany), v literatúre sa uvádza aj hodnota  $-180\text{ mV}$  [O'Rourke, 2007][Szabo a Zoratti, 2014].

Porucha transmembránového potenciálu mitochondrie  $\Delta\Psi_m$  môže mať pre bunku fatálne následky. Bunky sú neustále vystavované stresovým faktorom, pričom ich pôsobenie najčastejšie vyúsťuje do ischemicko-reperfúzneho poškodenia tkaniva a produkcie reaktívnych kyslíkových foriem (ROS, z angl. *reactive oxygen species*). Pre kardiomyocyty je esenciálne udržiavať  $\Delta\Psi_m$  a kontinuálny prísun ATP. Ischémiia myokardu spôsobuje poškodenie mitochondriovej štruktúry, zastavenie produkcie ATP a depolarizáciu IMM [Nishida et al., 2010]. Zmeny v  $\Delta\Psi_m$  môžu mať za následok dysfunkcie buniek (arytmie, kardiomyopatie a pod.) alebo dokonca odumretie srdcového tkaniva.



Obr. 1: Základná štruktúra mitochondrie.

## 1.2 Iónové kanály mitochondrie

Ako sme už spomínali vyššie, v OMM aj IMM sa nachádza množstvo proteínov. Funkcia iónových kanálov, ktoré tvoria osobitnú skupinu týchto proteínov, v mnohých prípadoch nie je známa. O doteraz popísaných iónových kanáloch vieme, že sú kľúčovými regulátormi intracelulárnych signálnych dráh, najčastejšie metabolických dráh, regulácie cytosolického  $\text{Ca}^{2+}$ , redoxnej signalizácie a zúčastňujú sa na apoptotickom procese bunky [Ryu et al., 2010]. Niektoré kanály, ako napr. draslíkové, však majú aj protektívny účinok pri srdcovom „preconditioningu“ (striedanie krátkych intervalov ischémiie a reperfúzie pred dlhým intervalom ischémiie), ktorý má pozitívny vplyv na obnovenie  $\Delta\Psi_m$  [O'Rourke et al., 2005]. V tejto

štúdií sa budeme venovať iba mitochondriovým chloridovým (aniónovým) kanálom IMM.

## 1.3 Aniónové kanály IMM

- **Vnútrotný mitochondriový aniónový kanál (IMAC, z angl. *inner mitochondrial anion channel*)** – pravdepodobne ide o kanál identický so  $108\text{ pS}$  kanálom (nazývaným aj angl. *mitochondrial centum picosiemens channel*, cpS, mCtS) a patrí medzi prvé kanály objavené v mitochondrii [Borecký et al., 1997][Sorgato et al., 1987]. Mitochondriový cpS kanál bol objavený v pečeni, mozgu, srdci a hneďom tukovom tkanive. Vodivosť tohto kanálu sa pohybuje v úzkom rozmedzí  $107 - 110\text{ pS}$  a vodivosť je závislá od teploty – mení sa podľa vzťahu  $1,2\text{ pS/K}$  [Borecký et al., 1997]. IMAC je mierne selektívny pre chloridové ióny,  $P_{\text{Cl}}/P_{\text{K}} \sim 4,5$  [Beavis a Powers, 2004]. Kanál je citlivý na teplotu, zmenu pH a je inhibovaný iónmi  $\text{Mg}^{2+}$  a  $\text{H}^+$  [Beavis a Garlid, 1987]. Mastné kyseliny, ako napr. kyselina myristová, zvyšujú permeabilitu IMM [Schonfeld et al., 2004]
- **Chloridový vnútrobunkový kanál (CLIC, mtCLIC, z angl. *chloride intracellular channel*)** – prvým identifikovaným CLIC v ľudskom tele bol CLIC4 (nazývaný aj p64 homológ 1). CLIC proteíny (CLIC1 – CLIC6) sa môžu nachádzať v rozpustnej aj integrálnej forme. CLIC4 bol objavený v mozgu a obličkách, okrem toho bola CLIC4 mRNA nájdená aj v tkanivách cicavcov ako pľúca, pečeň, kostrový sval a koža [Singh a Ashley, 2007]. Vodivosť kanálu je  $\sim 30\text{ pS}$  [Littler et al., 2005]. CLIC4 je slaboselektívny pre chloridové anióny, takisto ako CLIC5 ( $P_{\text{K}}/P_{\text{Cl}} \sim 2$ ), ktorý je slaboselektívny aj pre katióny [Singh et al., 2007]. Ponnalagu a kol. zistili, že CLIC4 a CLIC5 sa nachádzajú v kardiomyocytoch, CLIC4 je skôr proteínom OMM, zatiaľ čo CLIC5 je proteínom IMM [Ponnalagu et al., 2016]. CLIC4 je redoxne regulovaný, pričom nie je regulovaný cytoskeletovým aktínom ako proteín CLIC1 a CLIC5 [Singh a Ashley, 2007][Singh et al., 2007].
- **Mitochondriové chloridové kanály** – kanály prepúšťajúce anióny  $\text{Cl}^-$  pochádzajúce z mitoplastov, ktoré boli skúmané väčšinou metódou rekonštitúcie do lipidovej dvojvrstvy. Tomaskova a kol. uvádzajú selektivitu kanálov izolovaných zo srdca potkana  $P_{\text{Cl}}/P_{\text{K}} = 3,68 \pm 0,51$  s vodivosťou  $\sim 100\text{ pS}$ , pričom kanály neboli inhibované iónmi  $\text{Mg}^{2+}$  a ich napät'ová závislosť mala zvonovitý tvar [Tomaskova et al., 2007]. Kanály sú inhibované stilbénovými derivátmi [Koszela-Piotrowska et al., 2007]. Kominkova a kol. uvádzajú vodivosť

chloridových kanálov z SMP purifikovaných v Percoll gradiente  $130 \pm 27$  pS. V ich štúdií skúmali efekt ATP a  $Mg^{2+}$ , kde vo väčšine prípadov ATP znižovalo amplitúdu prúdu a vodivosť týchto kanálov a ióny  $Mg^{2+}$  inhibovali účinok ATP [Kominkova et al., 2010].

Chloridové iónové kanály zohrávajú dôležitú úlohu najmä v apoptotickom procese bunky. Overexpresia CLIC4 indukuje apoptózu sprostredkovanú p53 proteínom – nastáva depolarizácia membrány mitochondrie, uvoľnenie cytochrómu *c* a aktivácia kaspáz [Singh a Ashley, 2007]. Okrem toho sa CLIC kanály zúčastňujú aj na kontrole bunkového cyklu, modulácii ryanodínových receptorov, diferenciácii bunky, redoxnej regulácie a majú funkciu v cytoskelete bunky [Ponnalagu et al., 2016]. O'Rourke a kol. zistili, že depolarizácia niekoľkých mitochondrií môže spôsobiť oscilácie  $\Delta\Psi_m$  v bunke [O'Rourke et al., 2007]. Mnohé ďalšie úlohy chloridových kanálov v bunke nie sú ešte známe alebo vysvetlené a práve preto je potrebné im venovať pozornosť v ďalšom výskume.

#### 1.4 Redoxná regulácia v mitochondrii a jej vzťah k iónovým kanálom

Mitochondria je hlavným zdrojom ROS v bunke. V IMM sa nachádzajú komplexy dýchacieho reťazca I-IV, ktoré slúžia na transport elektrónov. Počas respirácie môže vzniknúť približne 1-2% superoxidových radikálov  $O_2^{\cdot-}$  kvôli tzv. „elektrónovému úniku“ v komplexe I alebo III [Handy a Loscalzo, 2012]. Superoxidové radikály sú vysoko reaktívne a majú schopnosť poškodzovať ďalšie molekuly. Preto sa v mitochondrii nachádzajú antioxidačné mechanizmy, medzi ktoré patrí aj redukovaná forma glutatiónu (GSH). GSH sa oxiduje na svoju oxidovanú formu glutatión-disulfid (GSSG), ktorá môže následne vstupovať do reakcie s NADPH katalyzovanej enzýmom glutatión reduktáza (GSR). Produktom tejto reakcie je opäť redukovaná forma GSH.

Nadmerná produkcia ROS môže spôsobiť poškodenie proteínov bunky, a teda aj iónových kanálov. Cieľovými skupinami pre oxidáciu sú najmä tiolové skupiny cysteínových zvyškov, ktoré predstavujú najreaktívnejšiu funkčnú skupinu proteínového reťazca. Oxidáciou tiolových skupín vznikajú sulfónové kyseliny, ktoré môžu byť ďalej modifikované procesmi glutatiolácie a nitrozácie, čo vedie k ďalšej zmene funkcie proteínov [Bogeski a Niemeyer, 2014].

Ako sme opísali vyššie, pôsobenie ROS v mitochondrii ovplyvňuje funkciu proteínov, v niektorých prípadoch môžu byť ich zmeny ireverzibilné. Preto sa v tejto práci zameriavame aj na efekt rôznych pomerov GSH:GSSG, ako významného redoxného páru, na chloridové iónové

kanály. Ako ďalšiu látku sme si zvolili ditiotreitól (DTT), najpoužívanejší reduktant disulfidových väzieb. Použité experimentálne metódy a výsledky uvádzame v ďalších kapitolách.

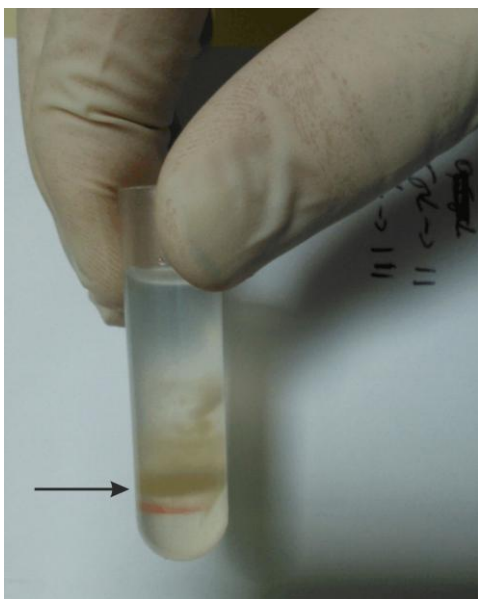
## 2 Materiál a metódy

### 2.1 Izolácia submitochondriových vezikúl

Samce potkanov kmeňa Wistar (hmotnosť približne 200 g, vek 8 týždňov) boli uspaté jednorazovou dávkou pentobarbitalu (10 mg/100 g živej váhy). Zviera bolo v celkovej anestéze usmrtené prerušením krčnej miechy. Následne sme z hrudnej dutiny extirpovali srdcia, jemne ich nastrihali na kašu a homogenizovali pomocou Potter-Elvehjem homogenizátora (sklený homogenizátor s teflonovým piestom) (cca. 30 cyklov). Všetky procesy sme vykonávali v chladovej miestnosti pri teplote 4 °C. Tkanivo bolo spracovávané na ľade. Všetky výkony boli uskutočnené v súlade s požiadavkami Slovenskej štátnej potravinovej a veterinárnej správy (číslo rozhodnutia: Ro-1715/11-221).

Po homogenizácii tkaniva nasledoval proces niekoľkých centrifugácií (centrifúga Beckman TL-100, rotor Beckman TLA 100.3, teplota  $4 \pm 0,1$  °C). Homogenát sme zriedili izolačným roztokom A (v mmol/l: 250 sacharóza, 0,25 EDTA, 10 HEPES; pH 7,3) a centrifugovali 4 min pri  $1350 \times g_{max}$ . Odobraté supernatanty sme doplnili roztokom A a centrifugovali pri  $7800 \times g_{max}$  10 min. Tento krok sme zopakovali dvakrát, pričom sme zakaždým odobrali pelety. Naposledy odobrané pelety sme rosuspendovali v 450  $\mu$ l roztoku A, pridali trypsin (40  $\mu$ g/ml) a inkubovali 180 s pre zbavenie sa častí sarkoplazmového retikula spojeného s vonkajšou mitochondriovou membránou [Szabo a Zoratti, 2014]. Po inkubácii sme do rozriedeného peletu pridali inhibítory proteáz na inhibíciu trypsinovej aktivity a centrifugovali 10 min pri  $7800 \times g_{max}$ . Odobraný pelet sme rozriedili v izolačnom roztoku B (v mmol/l: 50 sacharóza, 200 manitol, 0,5 EGTA, 10 MOPS, 0,2% BSA; pH 7,3), naliali na povrch roztoku Percoll-u a centrifugovali pri  $90000 \times g_{ave}$  35 min. Následne sme odobrali tzv. hRHM (z angl. *heavy rat heart mitochondria*) vrstvu (Obr. 2), ktorú bolo potrebné ešte zbaviť zvyškov Percoll-u. To sme dosiahli ďalšou centrifugáciou po dobu 45 min pri  $95000 \times g_{max}$ . Po tomto kroku sme odobrali mitochondriový pelet a sonikovali v piatich 15 s cykloch s 15 s pauzami medzi cyklami. Pelet sme opäť doplnili roztokom B a centrifugovali po dobu 5 min pri  $2700 \times g_{max}$ . Pelet, tzv. cSMP (z angl. *crude submitochondrial particles*), sme uskladnili pre ďalšiu potrebu získania submitochondriových vezikúl SMP. Supernatant sme ešte raz

centrifugovali po dobu 20 min pri  $135000 \times g_{\max}$  a po centrifugácii sme odobrali pelet. Ten sme rozriedili v 200  $\mu$ l roztoku B a uskladnili v plastových mikroskúmavkách v hlbokomraziacom boxe pri  $-80^\circ\text{C}$ .



Obr. 2: hRHM frakcia (označená šipkou).

## 2.2 Meranie chloridových kanálov metódou BLM

BLM (z angl. *bilayer/black lipid membrane*) je metóda rekonštitúcie iónových kanálov do planárnej lipidovej dvojvrstvy, ktorá umožňuje merať jednokanálové, tzv. „single channel” charakteristiky. Pozostáva z teflónovej vaničky, ktorá je tvorená dvomi oddielmi - *cis* a *trans*. Do *trans* oddielu umiestňujeme polystyrénovú komôrku. *Cis* aj *trans* sú vodivo spojené s elektródami pomocou agarových mostíkov (2% agar, 0,2% azid sodný, 1 mol/l KCl), pričom *cis* je prepojená s uzemnenou elektródou a *trans* s aktívnou elektródou. Experimentálna zostava BLM je znázornená na Obr. 3. Všetky experimenty boli vykonané pri teplote  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

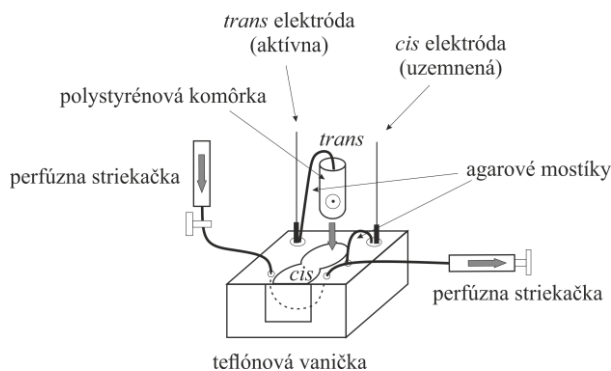
Na vytvorenie planárnej lipidovej dvojvrstvy sme používali zmes syntetických lipidov - DOPE (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfoetanolamín, Avanti Polar Lipids) a DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfocholín, Avanti Polar Lipids). Zásobný roztok lipidov (10 mg/ml) bol pripravený v chloroforme. Lipidy sme zmiešali v pomere 1:1, chloroform sme následne odparili pod argónovou atmosférou a zmes lipidov sme opätovne rozpustili v *n*-dekáne (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

*Cis* a *trans* oddiely obsahovali nasledovné pracovné roztoky: *cis* (v mmol/l: 250 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O, 100 HEPES, 46 Trizma base;

v  $\mu$ mol/l: 300 EGTA, 100 CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O; pH 7,4) a *trans* (v mmol/l: 50 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O, 100 HEPES, 46 Trizma base; v  $\mu$ mol/l: 300 EGTA, 100 CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O; pH 7,4).

Zmes lipidov sme nanášali na otvor polystyrénovej komôrky (veľkosť 50 – 150  $\mu$ m). Vytvorenie membrány nám indikovala zmena prúdu na zosilňovači z hodnoty „nekonečného” prúdu na 0 pA. Vzorku SMP sme nanášali sklenenou tyčinkou na lipidovú dvojvrstvu vytvorenú na otvore komôrky. Po určitom čase, ak nastala fúzia vezikuly s membránou, bolo možné pozorovať skokovité zmeny prúdu na zosilňovači.

Ak na zosilňovači pozorujeme kladný prúd, ide o kanál prepúšťajúci anióny (v našom experimente chloridové anióny), čo však platí v prípade, že *cis* elektróda je uzemnená. Pre zosilnenie prúdu sme používali zosilňovač BC-525C amplifier (Warner Instrument, Hamden, CT, USA), najčastejšie so zosilnením 100 mV/pA. Signál bol filtrovaný 8-pólovým Besselovým filtrom s frekvenciou 1 kHz. Na digitalizáciu dát sme používali digitalizátor NI USB-6221 (National Instruments, Austin, USA). Všetky údaje sme zaznamenávali pomocou softvéru Dewesoft 6.6.5 (DEWETRON, Graz, Austria) so vzorkovacou frekvenciou 5 kHz. Namerané dáta sme vyhodnocovali softvérom pClamp 6 (Axon Instruments, Foster City, CA, USA).



Obr. 3: Schéma experimentálnej zostavy BLM.

## 3 Výsledky

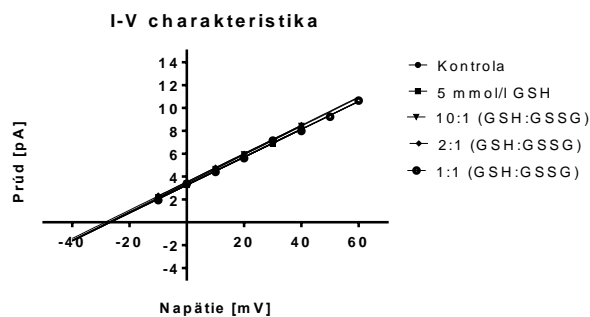
### 3.1 Vplyv GSH:GSSG

Vplyv rôznych pomerov GSH:GSSG sme testovali postupným pridávaním GSSG do *cis* a *trans* roztoku obsahujúceho 5 mmol/l GSH. Túto koncentráciu sme zvolili na základe predchádzajúcich faktov, že koncentrácie GSH v bunke sú rádovo v mmol/l (1 – 10 mmol/l). Najskôr však bolo potrebné preskúmať vplyv samotného 5 mmol/l GSH na aktivitu a biofyzikálne vlastnosti chloridového kanálu. Testovaná koncentrácia nemala vplyv na biofyzikálne vlastnosti chloridového kanálu ani

z *cis*, ani z *trans* strany. Pomery GSH:GSSG sme zvolili 10:1, 2:1 a 1:1 (t.j. 5:0,5, 5:1 a 5:5 mmol/l). Takéto pomery v bunke a mitochondriách nastávajú pri oxidačnom strese.

Z prúdovo-napät'ovej (I-V) charakteristiky kanálu sme zistili, že rôzne pomery GSH:GSSG nemajú za následok štatisticky významnú zmenu vodivosti či reverzného potenciálu, ako vidno z Obr. 4 (jednofaktorový ANOVA test, 95% konfidenčný interval,  $p = 0,92$  pre reverzný potenciál,  $p = 0,94$  pre vodivosť,  $n = 4$ ).

Hodnoty reverzných potenciálov pri aplikovaní GSH:GSSG do *trans* strany po štatistickom vyhodnotení taktiež neukázali významný rozdiel medzi skupinami (95% konfidenčný interval,  $p = 0,70$ ,  $n = 3$ ). O vodivosti nemôžeme jednoznačne tvrdiť, že sa v jednotlivých skupinách nelíši, i keď štatisticky pri použití jednofaktorového ANOVA testu vyšiel nesignifikantný výsledok (95% konfidenčný interval,  $p = 0,09$ ,  $n = 3$ ). Pre získanie presnejších výsledkov navrhujeme ešte doplniť viac meraní.

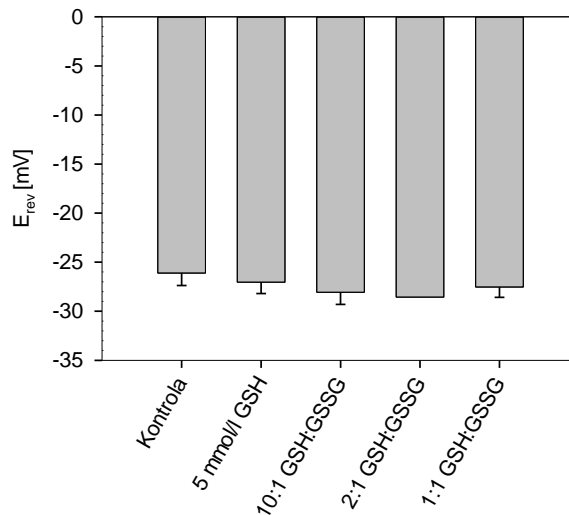


**Obr. 4:** Vplyv rôznych pomerov GSH a GSSG na I-V charakteristiku chloridového kanálu z *cis* strany (ukážková I-V charakteristika). Čiary sa prekrývajú a sú takmer identické, uvedené pomery GSH:GSSG nemajú vplyv na vlastnosti kanálu. Body boli preložené regresnou priamkou.

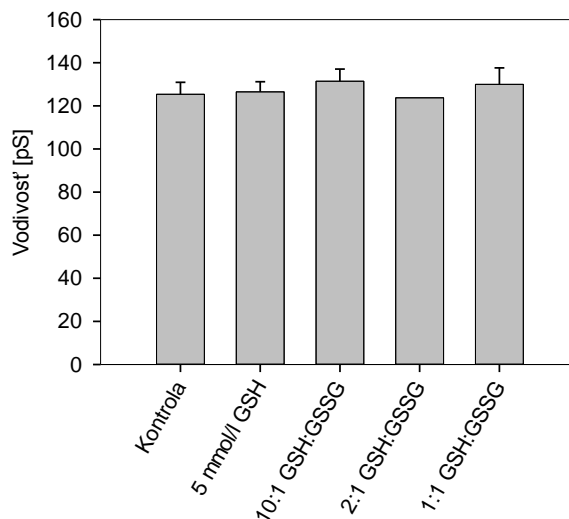
### 3.2 DTT

Podobne ako v predošlom prípade ani DTT nemalo vplyv na biofyzikálne vlastnosti chloridových kanálov z *cis* strany (Obr. 10 – Obr. 12). I-V charakteristika kanálu zostala po pridaní DTT v rôznych koncentráciách nezmenená. Hodnoty reverzných potenciálov sa v skupinách významne neodlišujú (jednofaktorová ANOVA, 95% konfidenčný interval,  $p = 0,82$ ,  $n = 4$ ), takisto ani hodnoty vodivosti (jednofaktorová ANOVA, 95% konfidenčný interval,  $p = 0,74$ ,  $n = 4$ ). Čo sa týka pridania DTT do *trans* oddielu, ukazuje sa, že zvyšujúca koncentrácia tejto látky by mohla zvyšovať hodnotu reverzného potenciálu. Pri koncentrácii 500  $\mu\text{mol/l}$  DTT v *trans* sa zmenila I-V charakteristika kanálu (Obr. 13). Vodivosť kanálu

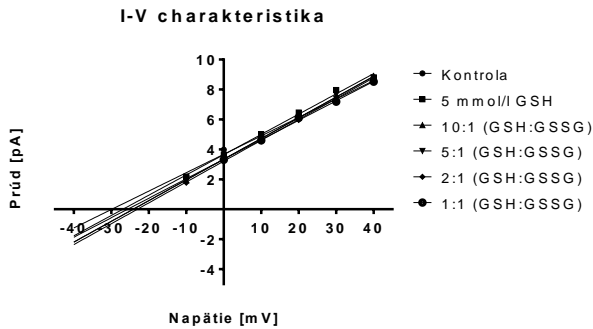
sa nemenila, ako môžeme pozorovať aj z Obr. 13 (vodivosť ako sklon priamky zostala rovnaká). Keďže ale nemáme dostatok experimentov a ani testovaných koncentrácií DTT, jeho vplyv z *trans* strany na vlastnosti kanálu je otázný a mal by byť ešte ďalej preskúmaný.



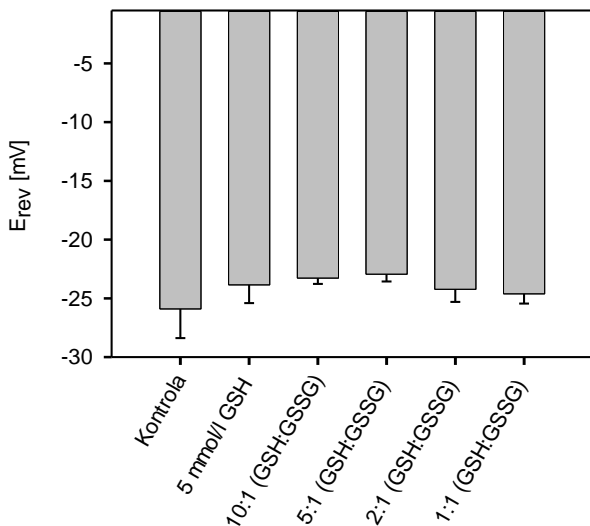
**Obr. 5:** Hodnoty reverzných potenciálov pri kontrole a rôznych pomeroch GSH:GSSG v *cis* časti. Pre zistenie významnosti rozdielov sme použili jednofaktorový ANOVA test (95% konfidenčný interval, stredné hodnoty  $\pm$  SEM,  $n = 4$ ).



**Obr. 6:** Hodnoty vodivosti pri kontrole a rôznych pomeroch GSH:GSSG v *cis* oddieli. Pre zistenie významnosti rozdielov sme použili jednofaktorový ANOVA test (95% konfidenčný interval, stredné hodnoty  $\pm$  SEM,  $n = 4$ ).



**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.



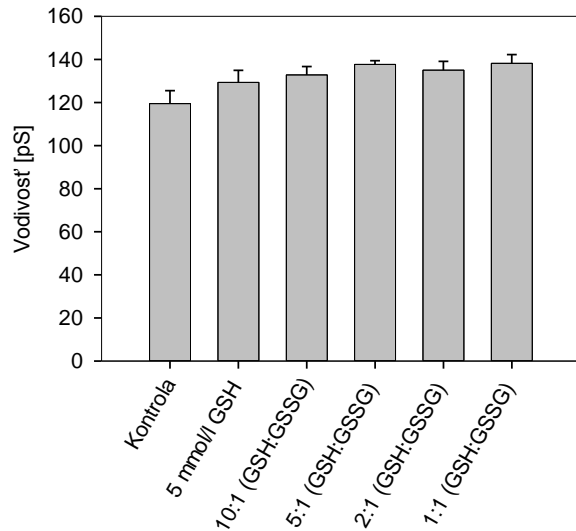
**Obr. 8:** Hodnoty reverzných potenciálov pri kontrole a rôznych pomeroch GSH:GSSG v *trans* časti. Pre zistenie významnosti rozdielov sme použili jednofaktorový ANOVA test (95% konfidenčný interval, stredné hodnoty  $\pm$  SEM,  $n = 3$ ).

### 3.3 Napät'ová závislosť

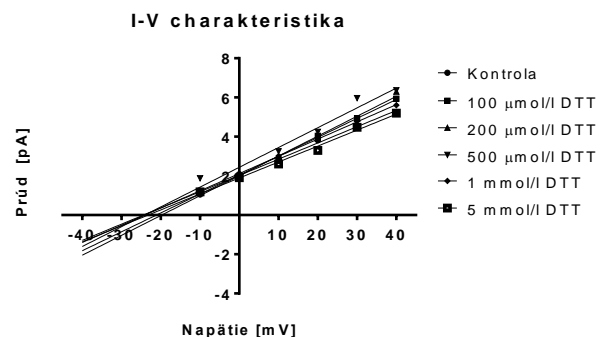
Okrem skúmania vplyvu GSH:GSSG a DTT sme vyšetrili napät'ovú závislosť chloridových kanálov. Vyhodnotili sme pravdepodobnosť otvorenia kanálu  $P_{open}$  pri napät'och -10, 0 +10, +20, +30 a +40 mV. Pre otestovanie rozdielu v hodnotách  $P_{open}$  medzi jednotlivými aplikovanými napät'iami sme použili jednofaktorový ANOVA test (95% konfidenčný interval,  $p = 0,0002$ ,  $n = 15$ ). Výsledok ukazuje, že medzi jednotlivými napät'iami sú významné rozdiely v  $P_{open}$ , teda nami merané mitochondriové chloridové kanály sú napät'ovo závislé. Pri -10 mV je  $P_{open}$  najnižšia, s rastúcim (kladne pridávaným) napät'ím táto pravdepodobnosť stúpa (Obr. 14).

Pre zistenie rozdielov medzi jednotlivými „napät'ovými“ skupinami sme zvolili Tukey-

Kramerov test pre ich viacnásobné porovnanie. Zistili sme, že významne sa líšia hodnoty v skupine -10 mV vs. 40 mV (95% konfidenčný interval,  $p = 0,0011$ ,  $n = 15$ ), -10 mV vs. 30 mV (95% konfidenčný interval,  $p = 0,0096$ ,  $n = 15$ ), -10 mV vs. 20 mV (95% konfidenčný interval,  $p = 0,0332$ ,  $n = 15$ ). Okrem toho sme ešte našli rozdiely v skupinách 0 mV vs. 40 mV (95% konfidenčný interval,  $p = 0,0044$ ,  $n = 15$ ) a 0 mV vs. 30 mV (95% konfidenčný interval,  $p = 0,0347$ ,  $n = 15$ ).

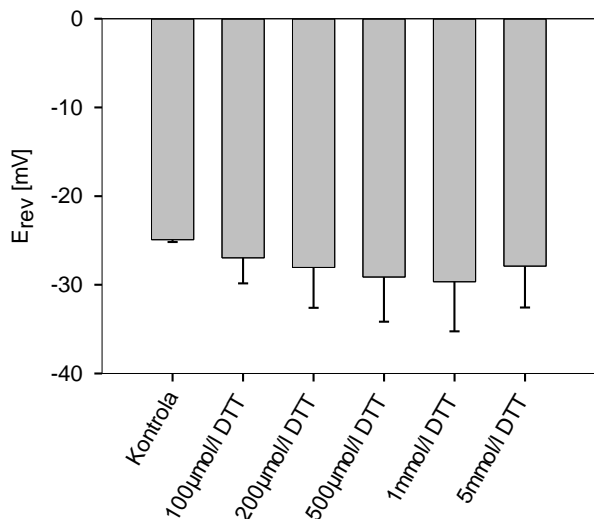


**Obr. 9:** Hodnoty vodivosti pri kontrole a rôznych pomeroch GSH:GSSG v *trans* časti. Pre zistenie významnosti rozdielov sme použili jednofaktorový ANOVA test (95% konfidenčný interval, stredné hodnoty  $\pm$  SEM,  $n = 3$ ).

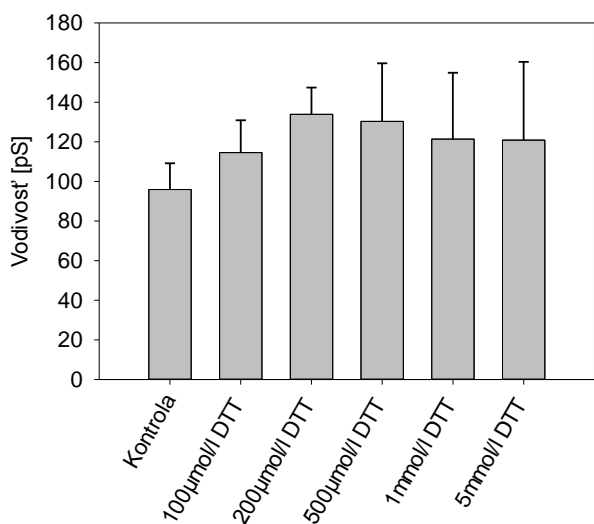


**Obr. 10:** Vplyv DTT na I-V charakteristiku chloridového kanálu z *cis* strany (ukážková I-V charakteristika). Čiary sa prekrývajú a sú takmer identické, uvedené koncentrácie DTT nemajú vplyv na vlastnosti kanálu. Body boli preložené regresnou priamkou.





**Obr. 11:** Hodnoty reverzných potenciálov pri kontrole a rôznych koncentráciách DTT v *cis* časti. Pre zistenie signifikantnosti rozdielov sme použili jednofaktorový ANOVA test (95% konfidenčný interval, stredné hodnoty  $\pm$  SEM,  $n = 4$ ).

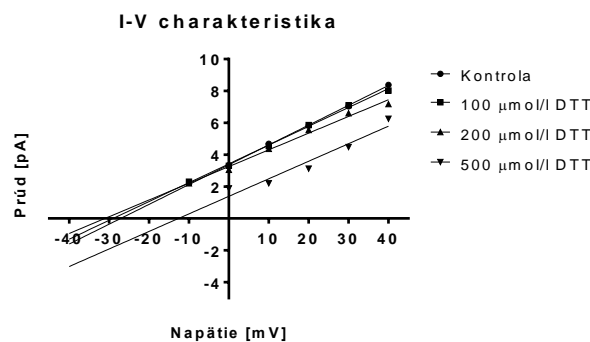


**Obr. 12:** Hodnoty vodivostí pri kontrole a rôznych koncentráciách DTT v *cis* časti. Pre zistenie signifikantnosti rozdielov sme použili jednofaktorový ANOVA test (95% konfidenčný interval, stredné hodnoty  $\pm$  SEM,  $n = 4$ ).

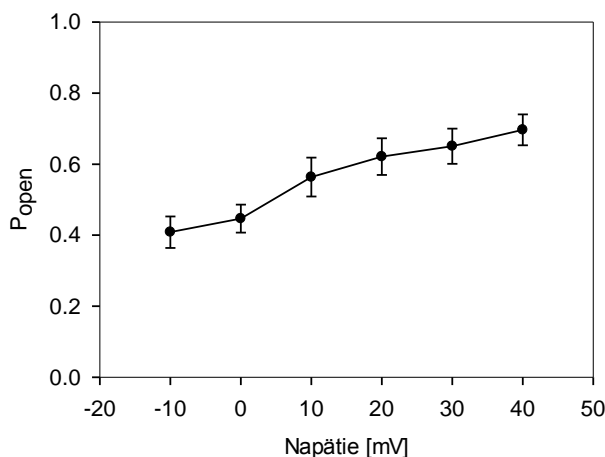
## 4 Diskusia

Výsledky z našej štúdie vplyvu rôznych pomerov GSH:GSSG sme porovnali s výsledkami Singh a Ashley, 2007, ktorí zistili, že GSH:GSSG na *cis* strane kanálu nemal žiadny efekt, ale zvyšujúci sa pomer GSH:GSSG 2:1, resp. 1:1 v *trans* časti signifikatne znížil amplitúdu elektrického prúdu iónov prechádzajúcich cez kanál. Singh a Ashley

využívali na inkorporáciu kanálu do lipidovej dvojvrstvy purifikovaný proteín CLIC4, pričom v našej štúdií sme použili SMP z nativných mitochondrií vyizolovaných diferencálnou centrifugáciou v Percoll gradiente. Je možné, že chloridové kanály, ktoré sme skúmali, neboli identické s CLIC4, a preto ani efekt rôznych pomerov GSH:GSSG nebol rovnaký ako v spomínanom experimente Singh a Ashley. CLIC4 je redoxne regulovaný a nami pozorované kanály nemusia súvisieť s redoxným stavom bunky. Taktiež ani vodivosti sa nezhodujú – nami nameraná vodivosť dosahuje hodnoty  $\sim 100$  –  $120$  pS, zatiaľ čo v literatúre sa uvádza  $\sim 30$  pS [Littler et al., 2005].



**Obr. 13:** 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.



**Obr. 14:** Napät'ová závislosť chloridových iónových kanálov mitochondrií izolovaných zo srdca potkana. Zobrazený je vzťah pravdepodobnosti otvorenia kanálu a aplikovaného napätia (95% konfidenčný interval, stredné hodnoty  $\pm$  SEM,  $n = 15$ ).

DTT sa ako účinný reduktant disulfidových väzieb fyziologicky v bunke nenachádza. Jeho vplyv sme skúmali, aby sme zistili, či nastane redukcia disulfidových väzieb v štruktúre chloridového kanálu (ak sa tam nachádzajú), pretože jeho redukčná schopnosť je oveľa väčšia v porovnaní s GSH. Keďže DTT nemalo vplyv na biofyzikálne vlastnosti kanálu z *cis* strany, môžeme sa domnievať, že z tejto strany kanálu sa disulfidové väzby, ktoré by boli prístupné reduktantom, nenachádzajú. Naopak, ako reprezentuje Obr. 13, zvýšenie hodnoty reverzného potenciálu kanálu nastalo po aplikovaní koncentrácie 500  $\mu\text{mol/l}$  DTT do *trans* oddielu. Či sa tam naozaj nachádzajú štruktúry obsahujúce disulfidovú väzbu, nemôžeme posúdiť z hľadiska nedostatku experimentov a malého rozsahu použitých koncentrácií. Preto, ako sme spomínali, by sa mal účinok DTT z *trans* strany ešte dôkladnejšie preskúmať.

Otázka môže vzniknúť, či by nebolo vhodnejšie skúmať kanály vzniknuté z purifikovaných proteínov než SMP. Keďže však okrem CLIC1 a CLIC4 nie je doteraz známa presná štruktúra vnútrobunkových chloridových kanálov, ich vlastnosti zatiaľ môžeme skúmať len pomocou spomínaných a aj rôznych iných chemických látok dôležitých vo farmakológii alebo fyziologických procesoch v bunke. Ako sme spomínali vyššie, kanály v našich experimentoch pravdepodobne nezodpovedajú CLIC4. To by mohlo korešpondovať s faktom, že CLIC4 sa nachádza prevažne vo vonkajšej membráne mitochondrií, zatiaľ čo väčšia (ak nie úplná) časť nami meraných kanálov pochádza z vnútornej membrány [Ponnalagu et al., 2016]. Navyše, izoláciou SMP v Percoll gradiente získavame proteíny v ich natívnej forme.

Oxidačný stres úzko súvisí s transmembránovým potenciálom. Preto sme sa rozhodli, že našim ďalším experimentom preskúmame napäťovú závislosť chloridových kanálov. Táto charakteristika vyjadruje závislosť pravdepodobnosti otvorenia kanálu  $P_{\text{open}}$  (aktivity kanálu) od aplikovaného napätia na aktívnej elektróde. Zistili sme, že v rozmedzí -10 až +40 mV  $P_{\text{open}}$  stúpa (Obr. 14), avšak pri iných hodnotách napätí už nedokážeme odhadnúť ďalší priebeh závislosti. Ako sme predpokladali, významné rozdiely sú práve medzi skupinami -10 mV vs. 40 mV a 0 mV vs. 40 mV. Keďže napäťová závislosť úzko súvisí s transmembránovým potenciálom mitochondrie, môže mať v súvislosti s vlastnosťami chloridových kanálov (ako napríklad ich úloha v apoptotickom procese bunky) významnú úlohu. Vyšetrovanie ďalších vlastností chloridových (aniónových) kanálov v spojitosti s napäťovou závislosťou môže byť námetom pre budúce experimenty.

## 5 Záver

V našej štúdii sme vyšetrili vplyv látok GSH:GSSG a DTT na biofyzikálne vlastnosti iónových kanálov. GSH:GSSG nemali vplyv na vlastnosti kanálov ani z *cis*, ani z *trans* strany. Po porovnaní s odbornou literatúrou sme zistili, že nami skúmané kanály sú odlišné kanály s inou vodivosťou, než sú kanály CLIC4. Vplyv DTT síce z *cis* strany nepreukázal žiadny efekt, z *trans* strany však koncentrácia 500  $\mu\text{mol/l}$  znižovala vodivosť kanálu. Kvôli nedostatku experimentov navrhujeme ďalšie preskúmanie jeho vplyvu na chloridové kanály.

Doplňkovým experimentom závislosti  $P_{\text{open}}$  od napätia sme načrtli možnú oblasť ďalšieho výskumu vlastností mitochondriových chloridových kanálov kardiomyocytov, ktoré môžu zohrávať dôležitú úlohu v rôznych fyziologických aj patologických procesoch bunky.

## Pod'akovanie

Chcela by som sa poďakovať najmä vedúcemu mojej diplomovej práce Mgr. Mariánovi Grmanovi, PhD. za jeho pomoc, odborné rady pri práci, ochotu a trpezlivosť. Taktiež by som sa chcela poďakovať aj ostatným kolegom v laboratóriu za ich cenné pripomienky pri BLM experimentoch.

Práca bola podporená projektom VEGA/2/0146/16.

## Literatúra

- [Beavis a Garlid, 1987] Beavis, A.D. a Garlid, K.D. The mitochondrial inner membrane anion channel. Regulation by divalent cations and protons. *J Biol Chem.* 1987, **262**(31), 15085-15093.
- [Beavis a Powers, 2004] Beavis, A.D. a Powers, M. Temperature dependence of the mitochondrial inner membrane anion channel. The relationship between temperature and inhibition by magnesium. *Journal of Biological Chemistry.* 2004, **279**(6), 4045-4050.
- [Bogeski a Niemeyer, 2014] Bogeski, I. a Niemeyer, B.A. Redox regulation of ion channels. *Antioxidants and Redox Signaling.* 2014, **21**(6), 859-862.
- [Borecký et al., 1997] Borecký, J., Ježek, P. a Siemen, D. 108-pS channel in brown fat mitochondria might be identical to the inner membrane anion channel. *Journal of Biological Chemistry.* 1997, **272**(31), 19282-19289.
- [Handy a Loscalzo, 2012] Handy, D.E. a Loscalzo, J. Redox regulation of mitochondrial function. *Antioxid Redox Signal.* 2012, **16**(11), 1323-1367.
- [Kominkova et al., 2010] Kominkova, V., Malekova, L., Tomaskova, Z., Slezak, P., Szewczyk, A. a Ondrias, K. Modulation of



- intracellular chloride channels by ATP and Mg<sup>2+</sup>. *Biochim Biophys Acta*. 2010, **1797**(6-7), 1300-12.
- [Koszela-Piotrowska et al., 2007] Koszela-Piotrowska, I., Choma, K., Bednarczyk, P., Dolowy, K., Szewczyk, A., Kunz, W.S., Malekova, L., Kominkova, V. a Ondrias, K. Stilbene derivatives inhibit the activity of the inner mitochondrial membrane chloride channels. *Cell Mol Biol Lett*. 2007, **12**(4), 493-508.
- [Littler et al., 2005] 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.
- [Misak et al., 2013] Misak, A., Grman, M., Malekova, L., Novotova, M., Markova, J., Krizanova, O., Ondrias, K. a Tomaskova, Z. Mitochondrial chloride channels: Electrophysiological characterization and pH induction of channel pore dilation. *European Biophysics Journal*. 2013, **42**(9), 709-720.
- [Nishida et al., 2010] 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 et al., 2005] O'Rourke, B., Cortassa, S. a Aon, M.A. Mitochondrial ion channels: gatekeepers of life and death. *Physiology (Bethesda)*. 2005, **20**, 303-315.
- [O'Rourke et al., 2007] O'Rourke, B., Cortassa, S., Akar, F. a Aon, M. Mitochondrial ion channels in cardiac function and dysfunction. *Novartis Foundation Symposium*. 2007, **287**, 140-151.
- [O'Rourke, 2007] O'Rourke, B. Mitochondrial ion channels. *Annual Review of Physiology*. 2007, **69**, 19-49.
- [Ponnalagu et al., 2016] 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.
- [Ryu et al., 2010] Ryu, S.Y., Peixoto, P.M., Tejjido, O., Dejean, L.M. a Kinnally, K.W. Role of mitochondrial ion channels in cell death. *BioFactors*. 2010, **36**(4), 255-263.
- [Schonfeld et al., 2004] Schonfeld, P., Sayeed, I., Bohnensack, R. a Siemen, D. Fatty acids induce chloride permeation in rat liver mitochondria by activation of the inner membrane anion channel (IMAC). *J Bioenerg Biomembr*. 2004, **36**(3), 241-248.
- [Singh a Ashley, 2007] 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.
- [Singh et al., 2007] Singh, H., Cousin, M.A. a Ashley, R.H. Functional reconstitution of mammalian 'chloride intracellular channels' CLIC1, CLIC4 and CLIC5 reveals differential regulation by cytoskeletal actin. *FEBS Journal*. 2007, **274**(24), 6306-6316.
- [Sorgato et al., 1987] Sorgato, M.C., Keller, B.U. a Stuhmer, W. Patch-clamping of the inner mitochondrial membrane reveals a voltage-dependent ion channel. *Nature*. 1987, **330**(6147), 498-500.
- [Szabo a Zoratti, 2014] Szabo, I. a Zoratti, M. Mitochondrial channels: Ion fluxes and more. *Physiological Reviews*. 2014, **94**(2), 519-608.
- [Tomaskova et al., 2007] Tomaskova, Z., Gaburjakova, J., Brezova, A. a Gaburjakova, M. Inhibition of anion channels derived from mitochondrial membranes of the rat heart by stilbene disulfonate-DIDS. *J Bioenerg Biomembr*. 2007, **39**(4), 301-311.