

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

Inga Andriulė

**ŠIRDIES MIOCITŲ
MAGNIUI JAUTRIŲ
TRPM6 IR TRPM7 KANALŲ
NUSTATYMAS IR JŲ RAIŠKOS
ANALIZĖ**

Daktaro disertacija
Gamtos mokslai,
biologija (N 010)

Kaunas, 2022

Disertacija rengta 2017–2021 metais Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Kardiologijos instituto Membranų biofizikos laboratorijoje.

Mokslinė vadovė

dr. Regina Mačianskienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

Disertacija ginama Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Biologijos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkė

prof. dr. Vilmantė Borutaitė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

Nariai:

prof. habil. dr. Vaiva Lesauskaitė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010);

prof. dr. Dainius Haroldas Pauža (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010);

prof. dr. Saulius Šatkauskas (Vytauto Didžiojo universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010);

doc. dr. Virginijus Valiūnas (Stony Brook universitetas (JAV), gamtos mokslai, biologija – N 010).

Disertacija bus ginama viešajame Biologijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2022 m. birželio 30 d. 12 val. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Kardiologijos instituto Posėdžių salėje.

Disertacijos gynimo vietos adresas: Sukilėlių pr. 15, LT-50103 Kaunas, Lietuva.

LITHUANIAN UNIVERSITY OF HEALTH SCIENCES

Inga Andriulė

**IDENTIFICATION OF TRPM6 AND
TRPM7 CHANNELS AND ANALYSIS
OF THEIR EXPRESSION
IN CARDIOMYOCYTES**

Doctoral Dissertation
Natural Sciences,
Biology (N 010)

Kaunas, 2022

Dissertation has been prepared at the Laboratory of Membrane Biophysics of Institute of Cardiology of Lithuanian University of Health Sciences during period 2017–2021.

Scientific Supervisor

Dr. Regina Mačianskienė (Lithuanian University of Health Sciences, Natural Sciences, Biology – N 010).

Dissertation is defended at the Biology Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences:

Chairperson

Prof. Dr. Vilmantė Borutaitė (Lithuanian University of Health Sciences, Natural Sciences, Biology – N 010).

Members:

Prof. Dr. Habil. Vaiva Lesauskaitė (Lithuanian University of Health Sciences, Natural Sciences, Biology – N 010);

Prof. Dr. Dainius Haroldas Pauža (Lithuanian University of Health Sciences, Natural Sciences, Biology – N 010);

Prof. Dr. Saulius Šatkauskas (Vytautas Magnus University, Natural Sciences, Biology – N 010);

Assoc. Prof. Dr. Virginijus Valiūnas (Stony Brook University (USA), Natural Sciences, Biology – N 010).

Dissertation will be defended at the open session of the Biology Research Council at 12 p. m. on the 30th of June 2022 in the Conference Hall of Institute of Cardiology of Lithuanian University of Health Sciences.

Address: Sukilėlių 15, LT-50103 Kaunas, Lithuania.

TURINYS

ĮVADAS	9
DARBO TIKSLAS, MOKSLINIS NAUJUMAS.....	11
1. LITERATŪROS APŽVALGA	13
1.1. TRP kanalų šeima	13
1.1.1. TRP kanalų atradimo istorija	13
1.1.2. TRP kanalų struktūra, klasifikacija ir savybės.....	13
1.1.3. Ca ²⁺ pralaidumas	14
1.1.4. TRP kanalų aktyvacijos mechanizmai.....	14
1.2. TRPM kanalų pošeimis.....	15
1.2.1. TRPM kanalų struktūra.....	15
1.2.2. TRPM kanalų savybės ir funkcijos	17
1.3. Magniui jautrūs TRPM6 ir TRPM7 pošeimio kanalai.....	20
1.3.1. TRPM6 ir TRPM7 kanalų atradimo istorija.....	20
1.3.2. TRPM6 ir TRPM7 kanalų struktūra.....	20
1.3.3. TRPM6 ir TRPM7 kanalų savybės	23
1.3.4. TRPM6 ir TRPM7 kanalų funkcijos.....	24
1.3.5. TRPM6 ir TRPM7 kanalų fiziologinė/patofiziologinė reikšmė.....	25
1.3.6. TRPM6 ir TRPM7 kanalų reguliaciniai mechanizmai.....	33
1.4. Magnis	34
1.4.1. Mg ²⁺ homeostazė.....	34
1.4.2. Mg ²⁺ kanalai ir nešikliai	37
1.4.3. TRPM6 ir TRPM7 kanalų reikšmė organizmo Mg ²⁺ homeostazės palaikyme	37
1.4.4. Mg ²⁺ poveikis širdies ir kraujagyslių ligoms	39
2. METODIKA.....	43
2.1. Etinis patvirtinimas	43
2.2. Tyrimo objektai.....	43
2.3. Reagentai ir medžiagos	45
2.4. Genų raiška	46
2.5. Imunofermentinė analizė (ELISA)	47
2.6. Imunoblotas (<i>Western blot</i>)	49
2.7. Histologija.....	50
2.8. Imunohistochemija.....	50
2.9. Fermentinis kardiomiocitų izoliavimas	51
2.10. Imunofluorescencija.....	53
2.11. <i>Patch-clamp</i>	54
2.12. Statistinė analizė	55

3. REZULTATAI	56
3.1. Molekuliniai širdies TRPM6 ir TRPM7 kanalų baltymų identifikavimo tyrimai.....	56
3.2. TRPM6 ir TRPM7 kanalų baltymų raiškos moduliacijos tyrimai	69
3.3. TRPM6 ir TRPM7 kanalų baltymų raiškos, kai buvo patologinis širdies pakitimas, tyrimai	81
3.4. Mg ²⁺ -jautrios srovės poveikio širdies elektriniams veikimo potencialams tyrimai	95
4. REZULTATŲ APTARIMAS	100
4.1. Širdies TRPM6 ir TRPM7 kanalų baltymų raiškos vertinimas ...	100
4.2. TRPM6 ir TRPM7 kanalų baltymų raišką moduliuojančių veiksnių vertinimas	102
4.3. TRPM6 ir TRPM7 kanalų baltymų raiškos pokyčių, kai buvo patologinis širdies pakitimas, vertinimas	104
4.4. Mg ²⁺ -jautrios srovės poveikio širdies elektriniams veikimo potencialams vertinimas.....	106
4.5. TRPM6 ir TRPM7 kanalų molekulinį ir elektrofiziologinių tyrimų atitikimo vertinimas	108
IŠVADOS	109
TYRIMO TRŪKUMAI	110
SUMMARY	111
LITERATŪROS SĄRAŠAS	142
MOKSLINĖS PUBLIKACIJOS	156
CURRICULUM VITAE	187
PADĖKA.....	188

SANTRUMPOS

2-APB	– 2-aminoetildifenilboratas
[Ca ²⁺] _v	– Ca ²⁺ koncentracija ląstelės viduje
[Mg ²⁺] _v	– Mg ²⁺ koncentracija ląstelės viduje
[Mg ²⁺] _{is}	– Mg ²⁺ koncentracija ląstelės išorėje
ADF	– adenzino difosfatas
ADF-ribozė	– adenzino difosfato ribozė
AMF	– adenzino monofosfatas
ATF	– adenzino trifosfatas
BDM	– 2,3-butandiono monoksimas
BSA	– jaučio kraujo serumo albuminas (angl. <i>bovine serum albumin</i>)
CABG	– vainikinių arterijų šuntavimas (angl. <i>coronary artery bypass grafting</i>)
cADF-ribozė	– ciklinė adenzino difosfato ribozė
cAMF	– ciklinis adenzino monofosfatas
CAR	– karvakrolis (5-izopropil-2-metil-fenolis; angl. <i>carvacrol</i>)
DMSO	– dimetilsulfoksidas
DNR	– deoksiribonukleino rūgštis
DP	– dešinysis prieširdis
DOX	– natrio deoksicholatas
DS	– dešinysis skilvelis
DV	– divalenčiai katijonai
DVK	– distaliniai (tolimieji) vingiuotieji inkstų kanalėliai
EDTA	– etilendiamintetraacto rūgštis
EGTA	– etilenglikoltetraacto rūgštis
ELISA	– imunofermentinė analizė (angl. <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
HE	– hematoksilinas-eozinas
HEPES	– 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinoetanosulfoninė rūgštis
HSH	– hipomagnezemija su antrine hipokalcemija
I _{CaL}	– lėta L-tipo Ca ²⁺ srovė
IDKM	– idiopatinė dilatacinė kardiomiopatija
IF	– imunofluorescencija
IHC	– imunohistochemija
I _{K1}	– vidinio išlyginimo K ⁺ srovė
IŠL	– išeminė širdies liga
KP	– kairysis prieširdis
KS	– kairysis skilvelis
LSMU	– Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
Mg·ATF	– magnio ir adenzino trifosfato kompleksas
Mg·GTF	– magnio ir guanozino trifosfato kompleksas
MIC	– magniu blokuojami kanalai (angl. <i>magnesium inhibited channels</i>)
mRNR	– informacinė (angl. <i>messenger</i>) ribonukleino rūgštis
NAD ⁺	– nikotinamido adenino dinukleotidas (oksiduotas)
PBS	– fosfatinis druskų tirpalas (angl. <i>phosphate-buffered saline</i>)
PFA	– paraformaldehidas
PGR	– polimerazinė grandininė reakcija

PIP ₂	– fosfatidilinozitolio difosfatas
PKA	– baltymų kinazė A
PLC	– fosfolipazė C
PPH	– pirminė plautinė hipertenzija
PV	– prieširdžių virpėjimas
RNR	– ribonukleino rūgštis
ROS	– reaktyviosios deguonies formos
RP	– ramybės potencialas
RT-PGR	– tikro laiko polimerazinė grandininė reakcija
Ser/Thr	– serinas/treoninas
SR	– sinusinis ritmas
šKB	– širdies kanalo baltymas
šKL	– širdies ir kraujagyslių ligos
šŅ	– širdies nepakankamumas
TA	– motorinių transporto priemonių avarija
TRP	– receptorių trumpalaikio atsako į potencialą kanalai (angl. <i>Transient Receptor Potential channels</i>)
TRPA	– ankirino TRP kanalai (angl. <i>TRP channels of Ankyrin</i>)
TRPC	– kanoniniai TRP kanalai (angl. <i>TRP channels of Canonical</i>)
TRPM	– melastatino TRP kanalai (angl. <i>TRP channels of Melastatin</i>)
TRPM6	– melastatino-6 šeimos TRP kanalai (angl. <i>Transient Receptor Potential channels of Melastatin-6 family</i>)
TRPM7	– melastatino-7 šeimos TRP kanalai (angl. <i>Transient Receptor Potential channels of Melastatin-7 family</i>)
TRPM6/TRPM7	– TRPM6 ir TRPM7 kanalų heteromerinė forma
TRPY	– mielių TRP kanalai (angl. <i>TRP channels of Yeast</i>)
TRPML	– mukolipino TRP kanalai (angl. <i>TRP channels of Mucolipin</i>)
TRPN	– TRP kanalai be mechanoreceptorinio potencialo
TRPP	– policistino TRP kanalai (angl. <i>TRP channels of Polycystin</i>)
TRPV	– vaniloidiniai TRP kanalai (angl. <i>TRP channels of Vanilloid</i>)
VP	– veikimo potencialas
VPT	– veikimo potencialo trukmė
WB	– imunoblotas (angl. <i>Western Blot</i>)
WGA	– kviečių gemalų aglutininas (angl. <i>Wheat Germ Agglutinin</i>)

ĮVADAS

Iki šiol, receptoriaus trumpalaikio atsako į potencialą kanalai (TRP; angl. *transient receptor potential*) [1] širdyje detaliau buvo ištirti tik fibroblastuose ir sinusinio mazgo ląstelėse [2]. Tačiau, kardiomiocituose šie kanalai tirti mažai, nes nėra selektyvių farmakologinių medžiagų, kurios padėtų juos atskirti nuo daugybės kitų joninių kanalų.

Melastatino šeimos TRPM7 kanalai ir jo homologiniai TRPM6 kanalai yra reguliuojami viduląsteliniu magniu. Nuo kitų joninių kanalų jie skiriasi tuo, kad yra bifunkciniai baltymai, turintys jonus transportuojantį kanalo segmentą ir kovalentiškai susietą fermentiškai aktyvią kinazės sritį [3]. Abu kanalai yra pralaidūs Ca^{2+} ir Mg^{2+} katijonams ir, šiuo metu, įvardijami, kaip pagrindiniai Mg^{2+} homeostazės reguliatoriai, tačiau jų raiška audiniuose yra skirtinga. Vyrauja nuomonė, kad TRPM7 kanalai yra gausiai aptinkami visose žinduolių ląstelėse, bet didžiausia jų raiška stebima širdyje ir inkstuose [4, 5], tuo tarpu TRPM6 raiška aptinkama tik inkstų, placentos ir žarnyno epitelio ląstelėse [6, 7]. Literatūros šaltinių duomenimis, TRPM6 ir TRPM7 kanalai vaidina svarbų vaidmenį įvairiuose fiziologiniuose ir patologiniuose procesuose, įskaitant viduląstelinę Ca^{2+} ir Mg^{2+} homeostazę [8], širdies ritmo reguliavimą [9], fibrozę ir uždegimą [10] bei kt. Šiuo metu, šių kanalų funkcinis apibūdinimas daugiausia pagrįstas elektrofiziologiniais tyrimais [11–15]. Tačiau, natūraliose širdies raumeninėse ląstelėse (kardiomiocituose) dauguma TRPM6 ir TRPM7 kanalų lokalizuojasi viduląstelinių pūslelių (vezikulių) membranose [16, 17], kurie nėra pasiekiami naudojant *patch-clamp* metodą.

Kardiomiocitų TRPM6- ir TRPM7-panašūs (angl. *TRPM6- and TRPM7-like*) kanalai aktyvuojasi sumažėjus viduląstelinei Mg^{2+} koncentracijai. Per šiuos kanalus į ląstelę teka maža dvalenčių (DV) katijonų srovė, o iš ląstelės – didelė vienvalenčių katijonų srovė. Tokie Mg^{2+} -jautrūs kanalai buvo nustatyti įvairių rūšių organizmų (žmogaus, kiaulės, jūrų kiaulytės, žiurkės, pelės) kardiomiocituose. Tačiau vis dar nenustatyta baltymų, dalyvaujančių TRPM6- ir/ar TRPM7-panašios srovės pernašoje, raiška.

Dauguma iki šiol atliktų TRPM6 ir TRPM7 kanalų raiškos tyrimų, naudojant sveikus [18] ir patologinių pakitimų paveiktus [19] žmogaus širdies audinius, buvo grindžiami tik genominių tyrimų duomenimis. Tačiau informacinės ribonukleino rūgšties (mRNR) duomenų apie *Trpm6* ar *Trpm7* raišką įvairiose širdies dalyse yra vos keletas ir paskelbti rezultatai yra prieštaringi, ypač dėl *Trpm6* raiškos. Daugelio tyrimų, atliktų su eksperimentinių gyvūnų ir žmogaus širdies audiniais, duomenimis *Trpm6* mRNR raiška nebuvo aptikta [20–22]. Tik vienos studijos duomenimis, naudojant žmogaus širdies

dešiniojo prieširdžio (DP) homogenatus, buvo aptikti TRPM6 mRNR ir baltymas bei nustatyta, kad jų raiška padidėjusi prieširdžių virpėjimu (PV) sergančių pacientų širdies mėginiuose [23]. Tačiau dauguma atliktų genetinių tyrimų išvis nepateikia informacijos apie *Trpm6* mRNR raišką [19, 24]. Taigi, neaišku ar TRPM6 baltymas yra kardiomiocituose. Taip pat išlieka atviras klausimas, ar TRPM6 ir TRPM7 baltymai gali būti aptinkami visose keturiose žmogaus širdies dalyse (prieširdžiuose ir skilveliuose).

Šiame tyrime, taikydami skirtingus molekulinį tyrimų metodus, siekėme nustatyti ir įvertinti žmogaus ir kiaulės širdies audinių ir kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 kanalų baltymų raišką, taip pat Mg^{2+} -jautrios TRPM6-TRPM7-panašios srovės poveikį širdies elektriniams veikimo potencialams (VP).

DARBO TIKSLAS, MOKSLINIS NAUJUMAS

Darbo tikslas

Nustatyti žmogaus ir kiaulės kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 kanalų baltymų raišką, įvertinti galimus šių kanalų raiškos pokyčius, kai yra patologiniai širdies pakitimai, bei galimą poveikį širdies elektriniam aktyvumui.

Uždaviniai:

1. Identifikuoti žmogaus ir kiaulės kardiomiocitų TRPM6 kanalo baltymą. Nustatyti skirtingų širdies dalių (prieširdžių ir skilvelių) kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 kanalų baltymų raišką.
2. Ištirti ir įvertinti TRPM6 ir TRPM7 kanalų baltymų raišką moduluojančių veiksnių (terpės joninės sudėties, acidozės ir TRP kanalų blokatorių) poveikį.
3. Įvertinti galimą TRPM6 ir TRPM7 kanalų baltymų raiškos pokytį, kai yra diagnozuota išeminė širdies liga ir prieširdžių virpėjimas.
4. Nustatyti ir įvertinti Mg^{2+} -jautrios srovės poveikį širdies elektriniams veikimo potencialams.

Mokslinis naujumas

Mg^{2+} -jautrių širdies TRPM6 ir TRPM7 kanalų vaidmuo dar nėra išaiškintas, ypač dėl abejotinos kardiomiocitų TRPM6 raiškos. Mes ištyrėme šių kanalų mRNR ir baltymų raišką, naudodami kontrolinių ir lėtinėmis ligomis (išemine širdies liga (IŠL) ir PV) sergančių pacientų dešiniojo prieširdžio ir eksplantuotų širdžių mėginius. Gautą informaciją taip pat palyginome su duomenimis, gautais tiriant eksperimentinius gyvūnus, tokius kaip kiaulė, kurios širdies-kraujagyslių sistema ir genetinė sudėtis yra artima žmogaus genomui. Naudodami imuninę fluorescencinę reakciją aptikome žmogaus ir kiaulės kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 baltymų raišką. Tačiau, fluorescencijos signalas nebuvo aptiktas inkubuojant kardiomiocitus be pirminių antikūnų arba naudojant blokuojančius peptidus. Taigi, mūsų rezultatai pirmą kartą patvirtina, kad kardiomiocituose tikrai yra TRPM6 kanalo baltymas. Mes taip pat pirmą kartą nustatėme žmogaus ir kiaulės širdies visų keturių dalių kardiomiocitų abiejų (TRPM6 ir TRPM7) baltymų raišką.

Gauti rezultatai taip pat atskleidė, kad įvairūs ekstraląsteliniai veiksniai (terpės joninė sudėtis, acidozė ir TRP kanalų blokatoriai), sukelia nepriklausomą ir dažnai priešingą TRPM6 ar TRPM7 baltymo imunofluorescencijos signalo moduliavimą. Tai mums leidžia teigti, kad šie kardiomiocitų kanalai tarpusavyje nesusiję ir gali funkcionuoti nepriklausomai vienas nuo kito. Be

to, mūsų tyrimų duomenys rodo farmakologinių poveikių atitikimą (angl. *concordance*) tarp išmatuotos baltymo imunofluorescencijos ir elektrofiologinių poveikių kanalo srovėms.

Taip pat yra atitikimas tarp lėtinės širdies ligos poveikio kanalo raiškai ir kanalo srovėms. Galime teigti, kad šis tyrimas suteikia naujų žinių apie TRPM6 ir TRPM7 baltymų, susijusių su širdies ligomis (būtent lėtine IŠL ir PV) remodeliavimaisi. IŠL padidino abiejų tiriamų baltymų raišką ir tai rodo, kad TRPM6 ir TRPM7 yra susiję su širdies ir kraujagyslių ligų patogenezė.

Mūsų tyrimai taip pat parodė, kad Mg^{2+} -jautri srovė gali dalyvauti formuojant elektrinius VP. Vis dėlto, nėra aišku kokiomis sąlygomis Mg^{2+} -jautrūs kanalai gali prisidėti prie širdies elektrinio aktyvumo. Tikėtina, kad Mg^{2+} -jautri srovė gali moduluoti veikimo potencialo trukmę (VPT), kai dėl reguliacinių procesų ar kanalų mutacijų sumažėja jautrumas viduląsteliniam Mg^{2+} , arba jei viduląstelinė Mg^{2+} koncentracija žymiai sumažėja dėl ligų, tokių kaip lėtinė hipomagnezemija. Taigi, mūsų rezultatai patvirtina, kad Mg^{2+} -jautrūs širdies kanalai dalyvauja reguliuojant širdies elektrinį aktyvumą. Mg^{2+} -jautrios srovės poveikis VPT gali būti svarbus norint suprasti terapinius procesus, kuriuose Mg^{2+} yra naudojamas aritmijų gydymui, ir taip pat norint susieti Mg^{2+} homeostazės pokyčius su kitomis širdies ligomis.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. TRP kanalų šeima

1.1.1. TRP kanalų atradimo istorija

Receptorių trumpalaikio atsako į potencialą (TRP; angl. *Transient Receptor Potential*) joniniai kanalai pirmą kartą buvo aptikti paprastojėje vaisinėje muselėje (lot. *Drosophila melanogaster*), kai įvyko spontaniinė genų mutacija į ištininės nepertraukiamos šviesos sukeltą signalą [25–27]. Dėl mutacijos, vaisinė muselė matė šviesą tik trumpą laiką [28]. Šis procesas aiškinamas sukelta membranos depoliarizacija, kurią nulėmė padidėjęs Ca^{2+} patekimas į ląstelės vidų. Dėl šios priežasties, *Drosophila melanogaster* matomas Ca^{2+} elektrinio signalo atsakas pavadintas receptoriaus trumpalaikiu atsaku į potencialą [29].

1.1.2. TRP kanalų struktūra, klasifikacija ir savybės

TRP joniniai kanalai sudaro didelę neselektyvių katijoninių kanalų šeimą. Šie kanalai yra randami įvairių rūšių ląstelių plazminėje membranoje ir viduląstelių organelių membranose, o tarpusavyje pasižymi tam tikrais struktūriniais panašumais. Pagal struktūrą TRP kanalai skirstomi į homo- ir heterotetramerus. Kiekvienas iš keturių tetramerų sudarančių subvienetų yra sudarytas iš šešių transmembraninių segmentų (S1–S6), kurie tarpusavyje sujungti kilpomis. Kanalo pora formuojasi keturių subvienetų centre, tarp S5 ir S6 segmentų. Šie kanalai, viduląstelinėje ląstelės dalyje, prasideda amino grupe ($-\text{NH}_2$) ir baigiasi karboksilo grupe ($-\text{COOH}$). TRP kanalai tarpusavyje skiriasi N- ir C- galų ilgiu ir juose esančiais segmentais (tam tikrų baltymų pasikartojimais (pvz., ankirino) ir fermentiniais subvienetais (pvz., kinazės)), kurie lemia skirtingas kanalų savybes ir funkcijas [30–34]. Specifiška TRP kanalų struktūra taip pat nulemia šių kanalų biofizikines savybes ir skirtingą atsakomąjį poveikį į egzogeninius ir endogeninius modulatorius [32, 35].

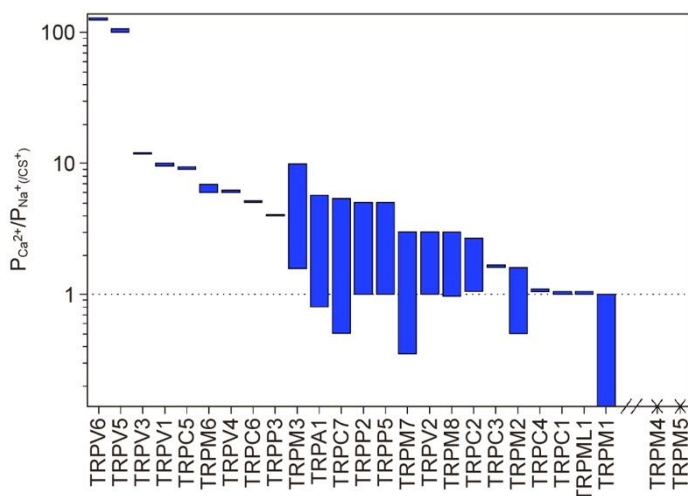
TRP kanalai yra grupuojami į šešis kanalų pošeimius: TRPC („C“ – *canonical*), TRPV („V“ – *vanilloid*), TRPM („M“ – *melastatin*), TRPA („A“ – *ankyrin*), TRPP („P“ – *polycystin*), TRPML („L“ – *mucolipin*) ir papildomi, t. y. TRPN (be mechanoreceptorinio potencialo) bei TRPY („Y“ – *yeast*) [36]. TRPC, TRPV ir TRPM pošeimius atitinkamai sudaro 7, 6 ir 8 skirtingi kanalai. TRPA grupę sudaro tik vienas kanalas, o TRPML ir TRPP pošeimius – po tris kanalus. TRPN pošemis aptiktas tik vaisinėse muselėse ir zebražuvėse, o TRPY – tik mielėse [4, 30, 36, 37].

Didžioji dalis TRP kanalų yra randami plazminėje membranoje. Tačiau, kai kurie iš šių kanalų (TRPV1 [38], TRPV2 [39], TRPM2 [40], TRPM7 [41],

TRPP2 [42]) yra aptinkami ir plazminėje membranoje ir viduląstelinėse organelėse, tokiose kaip endoplazminis tinklas, sinapsinės pūslelės ir lizosomos. TRPML kanalai yra lokalizuoti tik lizosomose [34].

1.1.3. Ca^{2+} pralaidumas

Dauguma TRP kanalų yra Ca^{2+} pralaidūs neselektyvūs katijoniniai kanalai ($P_{\text{Ca}^{2+}}/P_{\text{Na}^{+}} < 10$), išskyrus TRPM4 ir TRPM5, kurie yra selektyvūs vienvalečiai katijonams ($P_{\text{Ca}^{2+}}/P_{\text{Na}^{+}} < 0,05$) bei TRPV5 ir TRPV6, kurie labai selektyvūs Ca^{2+} ($P_{\text{Ca}^{2+}}/P_{\text{Na}^{+}} > 100$). TRPM6 ir TRPM7 yra pralaidūs Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} ir kitiems biologiškai svarbių metalų jonams, įskaitant sunkiųjų metalų jonus (pvz., Cu^{2+}) (1.1.3.1 pav.) [36].



1.1.3.1 pav. TRP kanalų selektyvumas Ca^{2+}

TRP kanalų selektyvumas Ca^{2+} , išreikštas $P_{\text{Ca}^{2+}}/P_{\text{Na}^{+}}(\text{Cs}^{+})$. Stulpeliai rodo didžiausias ir mažiausias literatūroje randamas reikšmes; TRPM4 ir TRPM5 yra nepralaidūs Ca^{2+} . Pritaikyta pagal [43].

1.1.4. TRP kanalų aktyvacijos mechanizmai

TRP kanalai neturi būdingo įtampos jutiklio ties ketvirtu transmembraniniu segmentu (S4), todėl nėra valdomi įtampa. Tačiau, šie kanalai gali reaguoti į šiluminius, mechaninius, cheminius, vietinius ląstelinis dirgiklius ir būti valdomi polimodaliniu būdu [29, 36]. TRPV1–TRPV4 ir TRPM3 kanalus aktyvina aukšta temperatūra, o TRPM8, TRPA1 ir TRPC5 – žema temperatūra [44–46]. TRPC kanalai gali būti suaktyvinti tiesiogiai, per fosfolipazės C signalinį kelią, dalyvaujant diacilgliceroliui (TRPC2, TRPC3, TRPC6, TRPC7) arba netiesiogiai, per dar nežinomą mechanizmą (TRPC1,

TRPC4, TRPC5) [47, 48]. TRPV5 ir TRPV6 yra pastoviai aktyvūs ir Ca^{2+} pralaidūs kanalai, tačiau endogeninių TRPV5 ir TRPV6 kanalų aktyvumo mechanizmai nežinomi [44]. Mg^{2+} jautrūs TRPM6 ir TRPM7 kanalai aktyvuojasi sumažėjus viduląstelinio Mg^{2+} koncentracijai (laisvo ar surišto su adozino trifosfatu (ATF)) [5, 6, 49]. Padidėjusi viduląstelinio Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_v$) koncentracija yra būtina sąlyga TRPM4 [50], TRPM5 [51], TRPM2 [52] ir TRPA1 [53] kanalų aktyvacijai. TRPM2 gali būti aktyvuotas veikiant keliems dirgikliams, įskaitant adozino difosfato ribozę (ADF-ribozę), oksiduotą nikotinamido adenino dinukleotidą (NAD^+) ir oksidacinį stresą [54, 55]. TRPM3 aktyvuoja padidėjusi $[\text{Ca}^{2+}]_v$, D-eritrosfingozinas ir aukšta temperatūra [45, 56, 57]. Polimodalinis TRP kanalų aktyvavimas nulemia įvairias fiziologines ir patofiziologines šių kanalų funkcijas [33].

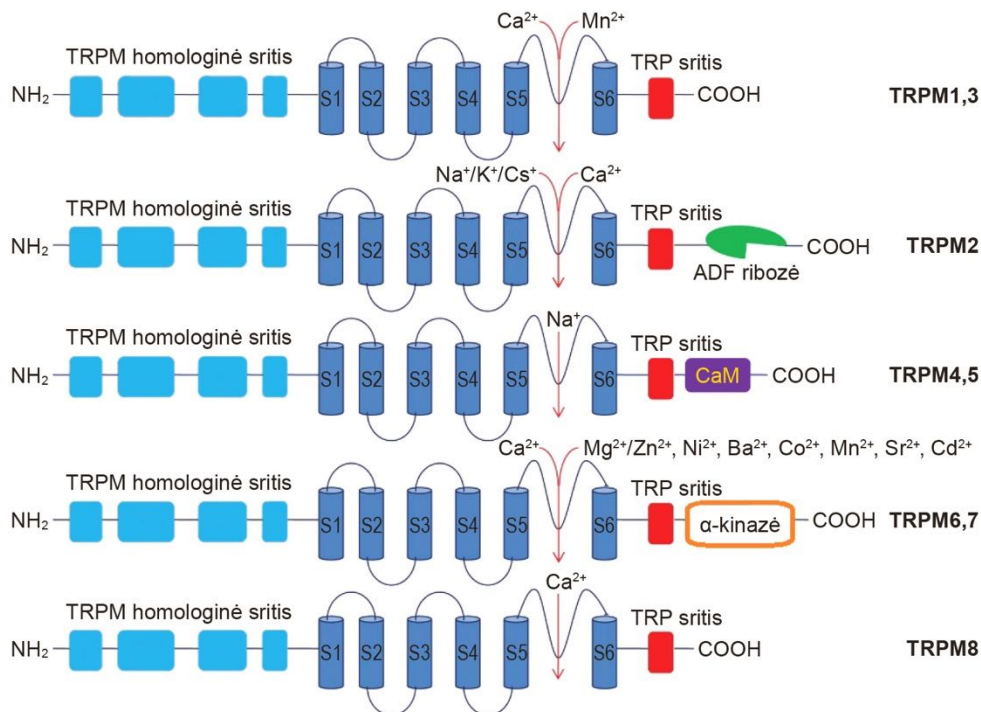
1.2. TRPM kanalų pošeimis

1.2.1. TRPM kanalų struktūra

Melastatino (TRPM) kanalų pošeimį sudaro 8 nariai (TRPM1–TRPM8). Šis kanalų pošeimis buvo pavadintas pagal pirmą atrastą narį TRPM1, kurio genas 1998 metais buvo identifikuotas melanomos audinyje [58]. TRPM kanalų baltymai taip pat yra sudaryti iš šešių transmembraninių segmentų, sujungtų citoplazminėmis ir necitoplazminėmis kilpomis, kurių terminaliniai galai baigiasi viduląstelinėje dalyje amino ir karboksilo grupėmis [59]. Citoplazminis N-galas turi vieną hidrofobinę sritį ir keturis TRPM pošeimiui būdingus homologinius segmentus, kurių biologinė reikšmė kol kas nėra žinoma. C-gale yra TRP dėžutė (angl. *TRP box*), sudaryta iš 25 amino rūgščių liekanų, sąveikaujančių su fosfatidilinozitolio difosfatu (PIP_2 ; kai kurių TRP kanalų reguliatoriumi). Spiralinis segmentas (angl. *coiled-coil*) galimai dalyvauja tetramerinės struktūros susidaryme. C-gale taip pat yra ir individualus, kiekvienam TRPM nariui būdingas, segmentas [60]. Nustatyta, kad TRPM4 kanalai C-gale turi CaM sritį, o TRPM2, TRPM6 ir TRPM7 kanalai C-gale turi fermentinį (angl. *chanzyme*) segmentą [61, 62]. TRPM2 fermentinis segmentas panašus į „Nudix“ hidrolazes, kuris hidrolizuoja ADF-ribozę į adozino monofosfatą (AMF) ir ribozės fosfatą [61]. TRPM6 ir TRPM7 kanalai turi kinazinį segmentą, kuris gali būti priskiriamas netipinėms alfa baltymų kinazėms (1.2.1.1 pav.) [63].

TRPM kanalų pošeimį galima sugrupuoti į tris grupes: TRPM1 ir TRPM3, TRPM4 ir TRPM5, TRPM6 ir TRPM7. Aminorūgščių homologija tarp šių porų atitinkamai yra 56, 41 ir 49 proc. TRPM2 ir TRPM8 nariai kartu grupuojami rečiau, nes jų aminorūgščių sekos atitikimas yra tik 30 proc. [31, 64]. Funkcinius TRPM kanalus sudaro 4 subvienetai (tetramerai), kuriuos gali

sudaryti vienodi arba skirtingi TRPM pošeimio nariai. Yra žinoma, kad heteromerinius tetramerus gali formuoti TRPM1 ir TRPM3 bei TRPM6 ir TRPM7 kanalai [65].



1.2.1.1 pav. TRPM pošeimio kanalų schema

TRPM pošeimio nariai yra suskirstyti į keturias grupes: TRPM1 ir TRPM3, TRPM2 ir TRPM8, TRPM4 ir TRPM5, TRPM6 ir TRPM7. Visi TRPM pošeimio kanalai turi TRPM homologinę sritį -NH₂ gale, po kurios išsidėsto šeši transmembraniniai segmentai (S1-S6). Šie segmentai formuoja tetramerus, kurie sudaro katijonams pralaidžią kanalo porą. Vartų mechanizmą ir selektyvumą jonams nulemia du transmembraniniai segmentai S5 ir S6. TRPM1 yra kanalas, pastoviai pralaidus Ca²⁺. TRPM2 kanalas C-gale turi fermentinį segmentą ir yra pralaidus Na⁺, Ca²⁺, K⁺ ir Cs²⁺. TRPM3 yra pralaidus DV katijonams, ypač Ca²⁺ ir Mn²⁺. TRPM4 ir TRPM5 yra pralaidūs vienvalečiams katijonams, bet nepralaidūs Ca²⁺. TRPM4 turi CaM sritį C-gale. TRPM6 pasižymi dideliu pralaidumu Mg²⁺ ir Ca²⁺. TRPM7 kanalas yra pralaidus visiems DV katijonams. TRPM8 yra pralaidus Ca²⁺. Pritaikyta pagal [66].

1.2.2. TRPM kanalų savybės ir funkcijos

TRPM pošėimio kanalai pasižymi įvairiomis funkcijomis. Šie kanalai yra pralaidūs vienvalenčiams jonams ir taip pat pasižymi kintamu selektyvumu Ca^{2+} , Mg^{2+} ir kitiems DV katijonams. Atskirus TRPM kanalus aktyvuoja įvairūs dirgikliai, įskaitant tempimą, Ca^{2+} , temperatūrą, lipidinius junginius ir kitus endogeninius bei egzogeninius veiksnius [67]. Tačiau kai kurių TRPM kanalų savybės ir fiziologinė funkcija yra mažai žinomi.

TRPM1 kanalas nustatytas melanocituose ir yra mažiausiai ištirtas TRPM pošėimio narys [68].

TRPM2 yra Ca^{2+} pralaidus katijoninis kanalas, kurį aktyvuoja viduląstelinė ADF-ribozė, pirimidino nukleotidai ir NAD^+ [55]. Šis kanalas yra ląstelinis redokso jutiklis, kurį aktyvuoja peroksidas, ar kitos medžiagos, kurios dalyvauja reaktyviųjų deguonies (ROS) ir azoto formų susidaryme [54]. Ciklinė ADF-ribozė (cADF-ribozė), arachidono rūgštis ir viduląstelinis Ca^{2+} teigiamai moduliuoja TRPM2 funkciją [54, 69, 70]. Tačiau TRPM2 kanalų, N-gale neturinčių dalies transmembraninių segmentų, moduliacija nėra pilnai išaiškinta [71].

TRPM3 yra Ca^{2+} ir Mn^{2+} pralaidus kanalas. Spontanines sroves per šiuos kanalus gali sukelti hipotoniniai ekstraląsteliniai tirpalai ir ląstelių pabrinkimas. Taip pat TRPM3 gali būti aktyvuojamas sfingolipidais [56].

TRPM4 ir TRPM5 yra neįprasti TRP šeimos kanalai, nes jie yra įtampa reguliuojami, Ca^{2+} aktyvuojami, vienvalenčiams katijonams selektyvūs joniiniai kanalai [72, 73]. Vienvalenčių jonų pralaidumą lemia trumpa rūgštinių aminorūgščių seka poros kilpoje [62]. Nustatyta, kad vienvalenčiams jonams selektyvių kanalų aktyvinimas gali sumažinti membranos potencialą ir Ca^{2+} patekimą per kitus kanalus [50]. TRPM4 ir TRPM5, panašiai kaip ir daugelio kitų TRP kanalų, aktyvumas yra moduliuojamas PIP_2 [51]. TRPM5 taip pat jautrus temperatūros pokyčiams ir aktyvuojasi 15–35 °C temperatūroje [74].

TRPM6 ir TRPM7 kanalai pasižymi ypatinga struktūra, nes C-gale turi fermentinį baltymų kinazės segmentą [5, 75]. Šie baltymai yra DV katijonams selektyvūs kanalai, kurie pralaidūs fiziologiniams DV jonams (pvz.: Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+}) ir sunkiųjų metalų jonams (pvz., Ni^{2+}) [76, 77]. TRPM7 aktyvumas yra reguliuojamas pH ir ATF. Sumažinus ekstraląstelinį pH nuo 7,0 iki 4,0, TRPM7 kanalo aktyvumas padidėja dešimt kartų [78]. Taigi, dalis TRPM7 kanalų galėtų būti rūgščioje aplinkoje, pavyzdžiui, rūgštinėse pūslelėse. ATF žymiai padidina per TRPM7 kanalus tekančias sroves [5], tačiau šis poveikis mokslinėje literatūroje yra vertinamas prieštaringai. TRPM7 aktyvumą gali sustiprinti ATF, susidarant magnio ir ATF kompleksams ($\text{Mg}\cdot\text{ATF}$), dėl to sumažėja laisvo viduląstelinio Mg^{2+} koncentracija [75]. Taip pat toks ATF poveikis gali būti dėl ATF suvartojimo PIP_2 gamybai,

nes dėl PIP₂ išsekvojimo sumažėja TRPM7 kanalų aktyvumas [79]. TRPM7 kinazės segmento reikšmė taip pat vertinama prieštaringai. Remiantis Runnels su kolegomis atliktų tyrimų duomenimis, kinazės segmento mutacijos ATF surišimo srityje sumažina kanalo aktyvumą [5]. Vėliau buvo nustatyta, kad mutacijos kinazės segmente netrukdo aktyvuoti kanalo, nors jos keičia kanalo jautrumą Mg²⁺ slopinimui [80]. TRPM7 kanalų slopinimas nukleotidais priklauso nuo nukleotidų surišimo sričių tiek kinazės segmente tiek kanalo išorėje [81]. Kinazės segmentas taip pat svarbus TRPM7 kanalo pralaidumui (angl. *trafficking*) [82].

TRPM8 yra nuo temperatūros priklausomas kanalas, kurį aktyvina 23–28 °C temperatūra arba junginiai, sukeliantys vėsimo pojūtį (pvz.: mentolis, eukaliptas, icilinas) [83, 84]. Aktyvaciją šalčiu ir mentoliu galima atskirti, nes kelios mutacijos turėjo didelį poveikį aktyvacijai mentoliu ir tik minimalų poveikį aktyvacijai šalčiu [85]. Šie duomenys atskleidė, kad aktyvacijos sritys kanale, susijusios su mentoliu ir temperatūra, yra skirtingose vietose. Tai patvirtino ir TRPM8 kanalo aktyvumo moduliacija keičiant terpės pH, kuri sukėlė priešingus poveikius aktyvuojant mentoliu ar inicilinu ir šalčiu [86]. Manoma, kad TRPV1 ir TRPM8 kanalų aktyvacijos mechanizmai, susiję su temperatūra, yra panašūs [77, 87]. TRPM8 aktyvumą taip pat reguliuoja PIP₂ [88], nes šio junginio išsekvojimas sumažina mentolio ar vėsesnės temperatūros sukeltą aktyvumą.

TRPM kanalai atlieka svarbų vaidmenį įvairiose srityse fiziologinėmis ir patologinėmis sąlygomis, kurios susijusios su jutimo funkcija, vėžiniais susirgimais [89, 90], inkstų ir širdies veikla, neurologinėmis ligomis [91, 92] ir endotelio disfunkcija [93]. Pagrindinės TRPM šeimos savybės (raiška, selektyvumas jonams, reguliacija) ir funkcijos apibendrintai pateiktos 1.2.2.1 lentelėje.

1.2.2.1 lentelė. TRPM kanalų savybės ir funkcijos (pritaikyta pagal [29, 68])

Kanalas	Raiška	Selektyvumas	Aktyvumo reguliavimas	Funkcija
TRPM1	Smegenys, odos melanocitai	Neselektyvūs	Aktyvuoja: La^{2+} , pregnenolono sulfatas Blokuoja: Zn^{2+}	Bipolinių ląstelių depoliarizavimas, melanomos metastazių slopinimas
TRPM2	Smegenys, kaulų čiulpai, blužnis	Neselektyvūs (prie +20 °C), Na^+ ir Ca^{2+} (prie +37 °C)	Aktyvuoja: ADF-ribozė, cADF-ribozė, 2-deoksi-ADF-ribozė, vandenilio peroksidas, Ca^{2+} Blokuoja: ekonazolas, klotrimazolas, (ADF-ribozės) polimerazės inhibitoriai ir kt.	Oksidacinio streso pojūtis, insulino sekrecija, imuninis atsakas
TRPM3	Kepenys, smegenys, hipofizė	Neselektyvūs: Na^+ , K^+ , Ca^{2+}	Aktyvuoja: hipo osmoliariškumas, D-eritrosfingozinas Blokuoja: La^{3+} , Gd^{3+}	Inkstų osmosinio slėgio homeostazė, gliukozės homeostazė
TRPM4	Prostata, gaubtinė žarna, širdis, inkstai, sėklidės	Selektyvūs vienvalečiams katijonams: Na^+ , K^+ , Cs^+	Aktyvuoja: Ca^{2+} Blokuoja: ATF, ADF, AMF, poliaminai	Kalcio reguliavimas, širdies laidumo sutrikimų prevencija, raumenų susitraukimo reguliacija
TRPM5	Žarnynas, kepenys, plaučiai, skonio svogūneliai	Selektyvūs vienvalečiams katijonams: Na^+ , K^+ , Cs^+	Aktyvuoja: Ca^{2+} , PIP_2 Blokuoja: trifenilfosforo oksidas	Insulino sekrecija, sensorinė transdukcija skonio ląstelėse
TRPM6	Inkstai, žarnynas	Selektyvūs DV katijonams: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} ir kt.	Aktyvuoja: Mg^{2+} sumažėjimas Blokuoja: rutenio raudonasis	Magnio pasisavinimas ir homeostazė inkstuose ir žarnyne
TRPM7	Inkstai, širdis, hipofizė, kaulai, riebalinis audinys	Selektyvūs DV katijonams: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} ir kt.	Aktyvuoja: Mg^{2+} sumažėjimas, PIP_2 skilimas, cAMF koncentracijos padidėjimas Blokuoja: Mg^{2+} , La^{3+} , Gd^{3+} , sperminas, 2-APB, CAR	Ląstelinė magnio ir kalcio homeostazė, ląstelių gyvybingumas
TRPM8	Sensoriniai neuronai, prostata, kepenys	Neselektyvūs: Na^+ , K^+ , Cs^+ , Ca^{2+}	Aktyvuoja: šaltis, mentolis, icilinas, linalolas, geraniolis Blokuoja: kapsazepinas	Temperatūros (šalčio) jutimas (< 28 °C)

Trumpinius žr. skyriuje – Santrumpos.

1.3. Magniui jautrūs TRPM6 ir TRPM7 pošeimio kanalai

1.3.1. TRPM6 ir TRPM7 kanalų atradimo istorija

Pirmą kartą TRPM7 kanalai buvo identifikuoti ir aprašyti tik 2001 metais trijų skirtingų mokslinių grupių (Clapham, Penner ir Ryazanov). Beveik vienu metu, šios trys mokslinės grupės nepriklausomai klonavo TRPM7 kanalo baltymą, kuris buvo pavadintas skirtingais pavadinimais, atitinkamai PLIK, LTRPC7 ir ChaK1 [5, 75, 94]. Po to buvo identifikuotas ir TRPM6 (TRP-PLIK2, LTRPC6, CHAK2, inkstų kinazė) – antrasis joninis kanalas, turintis kinazinį domeną [94]. Iš pradžių šie kanalai buvo vadinti MagNum – magnio nukleotidais reguliuojami metalo jonų kanalai (angl. *magnesium nucleotide regulated metal ion channels*), nes naudojant Mg·ATP buvo galima blokuoti jų funkcinį aktyvumą [75]. Tolimesni šių kanalų tyrimai parodė, kad laisvas viduląstelinis magnis taip pat pasižymi efektyviu blokuojamuoju poveikiu šiems kanalams, todėl jie pervadinti į MIC – magniu blokuojami kanalai (angl. *magnesium inhibited channels*) [95]. Naujausios mokslinės literatūros duomenimis, magnio jonams pralaidūs TRPM6 ir TRPM7 kanalai yra aktyvuojami sumažėjus viduląstelinio Mg²⁺ koncentracijai (tiek laisvo, tiek surišto su ATF). Todėl, literatūroje šiuo metu jie dažniausiai vadinami TRPM6 ir TRPM7 – pagal šiuos baltymus koduojančio geno pavadinimą.

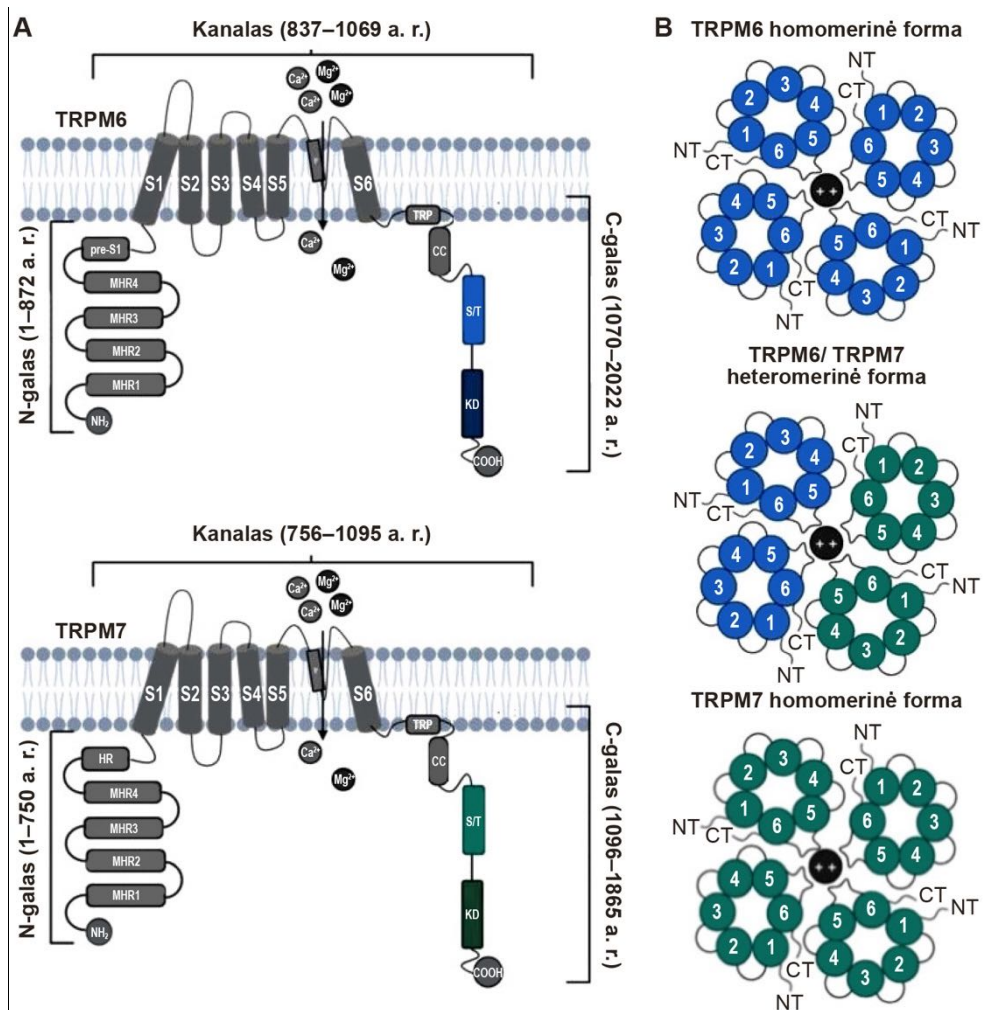
1.3.2. TRPM6 ir TRPM7 kanalų struktūra

Žmogaus TRPM6 kanalo baltymą (~231 kDa) koduoja 2022 aminorūgštys, o TRPM7 baltymą (~212 kDa) – 1865 aminorūgštys. Šie baltymai turi 50 proc. giminingą seką [96, 97]. TRPM6 ir TRPM7, kaip ir kiti TRPM kanalai, yra sudaryti iš keturių monomerų, turinčių po šešis transmembraninius segmentus (S1–S6), kurių centre yra pora (tarp S5–S6). Suformuota aktyvi TRPM6 ir TRPM7 kanalų pora valdoma įtampos pakitimu. Įtampa-valdomų kanalų ketvirtas transmembraninis segmentas yra įtampos sensorius, t. y. įkrautas teigiamu krūviu, nuo kurio priklauso kanalo būseną (atidarytas, uždarytas ar inaktyvuotas) [6, 98, 99].

Serino-treonino (Ser/Thr) aminorūgštimis turtingos sritys (homologiškos α -kinazės šeimai) turi kelias autofosforilinimo vietas, kurios atpažįsta substratą. TRPM melastatinui homologinės srities funkcija nėra žinoma, tačiau nustatyta, kad šio segmento aminorūgščių liekanos (87–326) sąveikauja su sinapsiniais baltymais [5]. Šie kanalai turi išskirtinį struktūrinį elementą – kinazinį segmentą C-gale [100]. Atlikti TRPM6 ir TRPM7 kanalų kinazės segmento tyrimai atskleidė, kad šis susideda iš dviejų skilčių, kurios ribojasi su nukleotidų jungimosi vietomis. Taip pat nustatytas struktūrinis panašumas

tarp kinazės segmento ir nuo ciklinio AMF (cAMF) priklausomos baltymų kinazės A [101, 102]. Kinazė nėra būtina kanalo veiklai tiesiogiai, bet gali lemti kanalų aktyvumo reguliavimą [75, 81, 100]. Kanalų struktūra pavaizduota 1.3.2.1 pav. A dalyje.

Dėl savo struktūrinių panašumų TRPM6 ir TRPM7 yra glaudžiai susiję ir, priklausomai nuo audinio, gali formuoti heterotetramerinius kompleksus (TRPM6/TRPM7), kai TRPM6 transfosforilina TRPM7 [6, 97]. Tetramerinius kanalus sudaro keturi homomeriniai (to paties baltymo) subvienetai arba po du skirtingus kiekvieno baltymo subvienetus (1.3.2.1 pav. B). Nuo šių tetramerų struktūros priklauso TRPM6 ir TRPM7 kanalų patofiziologinis vaidmuo [11, 103]. Remiantis literatūros duomenimis, kai kurios TRPM6/TRPM7 kompleksų savybės skiriasi nuo TRPM6 ir TRPM7 homomerinių kanalų savybių, įskaitant skirtingą pralaidumą Ni^{2+} , porų struktūrinius skirtumus, kurie sukelia skirtingą jautrumą rūgštiniam pH, ir, galiausiai, kanalo laidumo skirtumus (TRPM6: nuo 82 iki 84 pS; TRPM7: nuo 40 iki 105 pS; TRPM6/TRPM7: 56,6 pS) [5, 11, 56, 99, 104].



1.3.2.1 pav. TRPM6 ir TRPM7 kanalų struktūra bei TRPM6/TRPM7 tetramerų susidarymas

(A) N-galą sudaro keturi melastatinui homologiški segmentai (MHR) ir pre-S1 (TRPM6) arba HR (TRPM7). Kanalo srityje yra šeši transmembraniniai segmentai (S1-S6) ir porą formuojanti kilpa tarp S5 ir S6 segmentų. C-galą sudaro TRP, spiralinis (CC), serino-treonino (S/T) ir kinazės (KD) segmentai. (B) TRPM6 ir TRPM7 kanalai formuoja tetramerus, su keturiais homomerinės arba heteromerinės formos subvienetais, sudarančiais DV katijonams laidžią porą membranoje. S1-S6 – transmembraniniai segmentai; a. r. – amino rūgštis. Pritaikyta pagal [64].

1.3.3. TRPM6 ir TRPM7 kanalų savybės

TRPM6 ir TRPM7 yra bifunkciniai baltymai, kurie formuoja joninius kanalus, pralaidžius DV katijonams, ir savo struktūroje turi kinazinę sritį [94]. TRPM6 raiška yra specifinė tam tikriems audiniams ir organams (inkstai, žarnynas ir kt.), o TRPM7 yra plačiai aptinkamas įvairaus tipo ląstelėse, nepriklausomai nuo vietos organizme [21, 22]. TRPM6 ir TRPM6/TRPM7 heterotetramerai nėra taip išsamiai ištirti, kaip TRPM7, dėl to, kad nebuvo aišku ar TRPM6 sudaro atskirus homotetramerinius funkcinis kanalus. Panašiai, kaip TRPM7, TRPM6 kanalai pasižymi stipriu išoriniu laidumu, esant teigiamiems membranos potencialams, ir mažu vidiniu laidumu esant neigiamiems membranos potencialams [105].

Yra įrodyta, kad TRPM6 turi didesnę giminingumą Mg^{2+} nei Ca^{2+} [106]. TRPM6 kanalo pora yra pralaidi daugeliui DV katijonų, įskaitant Ba^{2+} , Mn^{2+} , Sr^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} ir Zn^{2+} [11, 106]. Kanalo aktyvumas yra reguliuojamas viduląstelinium Mg^{2+} ($[Mg^{2+}]_v$) ir slopinamas *ruthenium* raudonoju [106]. TRPM6, kaip ir TRPM7, yra jautrus viduląsteliniam Mg^{2+} , ATF, PIP_2 , vandenilio peroksidui, 17β -estradioliui ir sfingozinui [6, 11, 107–109]. Li su kolegomis atliktais moksliniais tyrimais parodė, kad TRPM6 gali formuoti atskirus, nepriklausomus nuo TRPM7, funkcinis kanalus, kurie pasižymi skirtingais pralaidumo profiliais, skirtingais pokyčiais nuo pH ir skirtinga reakcija į TRP kanalų moduliatorių 2-aminoetildifenilboratą (2-APB). Ši farmakologinė medžiaga aktyvavo TRPM6 ir blokavo TRPM7 (kai 2-APB koncentracija < 1 mM), tačiau aktyvavo TRPM7 (kai 2-APB koncentracija $> 1,5$ mM) [11].

Nustatyta, kad TRPM7 kanalai taip pat yra pralaidūs ne tik Ca^{2+} ir Mg^{2+} , bet ir kitiems DV katijonams [76]. Be to, Mg^{2+} dalyvauja šių kanalų reguliavime, t. y. sumažėjus viduląstelinei Mg^{2+} koncentracijai, kanalo aktyvumas sustiprėja, o didelė Mg^{2+} koncentracija slopina šių kanalų aktyvumą [75]. Esant fiziologiniams, neigiamiems membranos potencialams, TRPM7 pasižymi labai maža vidine srove ir perneša tik DV katijonus, tokius kaip Ca^{2+} ir Mg^{2+} , iš ekstraląstelinės erdvės į citozolį pagal koncentracijos gradientą. Tačiau, esant teigiamiems membranos potencialams, kai DV jonai neturi pakankamai varomosios jėgos patekti į ląstelę, padidėja viduląstelinų katijonų, tokių kaip K^+ arba Cs^+ , transportavimo greitis iš ląstelės, o membranos potencialui esant didesniai nei $+50$ mV, taip pat kaip ir TRPM6, išeinančių iš ląstelės vienvalečių katijonų srautai sukelia rektifikaciją. Tik visiškai pašalinus ekstraląstelinis DV katijonus, šie kanalai gali transportuoti vienvalečius katijonus į ląstelės vidų. Šis procesas išlygina (angl. *linearise*) srovės-įtampos santykį, atskleisdamas išskirtinį TRPM7 kanalų specifiškumą DV katijonų transportavimui [75]. Neįprastą TRPM7 pralaidumo profilį

patvirtina ir eksperimentiniai tyrimai, kuriuose buvo tiriamas kitų DV katijonų pralaidumas, lyginant su Ca^{2+} ($\text{Zn}^{2+} \approx \text{Ni}^{2+} \gg \text{Ba}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Mg}^{2+} \geq \text{Mn}^{2+} \geq \text{Sr}^{2+} \geq \text{Cd}^{2+} \geq \text{Ca}^{2+}$) [76]. TRPM7 selektyvumą gali reguliuoti ir ekstraląstelinis pH [78] bei kitos medžiagos (pvz.: 2-APB ar karvakrolis (CAR)) [11, 110].

1.3.4. TRPM6 ir TRPM7 kanalų funkcijos

TRPM6 raiška yra būdinga tik keliems ląstelių tipams, o TRPM7 yra plačiai paplitęs baltymas. Endogeninės TRPM7-panašios srovės registruojamos įvairių tipų ląstelėse. Tačiau, yra tik keli sistemingi bandymai apibūdinti TRPM6 vaidmenį magniui jautrioms srovėms. Li su kolegomis, naudodami linijines ląsteles (CHOK1, HEK-293, DMCT) pademonstravo, kad TRPM6 ir TRPM7 kanalai pasižymi skirtingu atsaku į 2-APB [11]. Kitame tyrime, Ryazanova su kolegomis naudodami pelių embrionines kamienines ląsteles nustatė, kad pašalinus *Trpm7* geną, išnyko ir endogeninės srovės per MIC/MagNum kanalus. Tai rodo, kad TRPM6 negali kompensuoti TRPM7 nebuvimo [111]. Ryazanov su kolegomis pasiūlė hipotezę, kad α -kinazės labiau fosforilina Ser/Thr liekanas, esančias α -spiralėse, priešingai nei įprastos baltymų kinazės, kurios fosforilina jų fiziologinius substratus β -klostėse ir kitose struktūrose [112–114]. Tyrimai *in vitro* parodė, kad TRPM6 ir TRPM7 baltymų kinazės gali fosforilinti IIA, IIB ir IIC tipo mioziną [115]. Todėl įmanoma, kad TRPM6 baltymo kinazė taip pat fosforilina ir kitus TRPM7 baltymo kinazės substratus (aneksinas A1, fosfolipazė *Cy2*) [116, 117]. Taip pat, TRPM6 baltymo kinazė gali autofosforilinti savo Ser/Thr liekanas [118], tačiau šis procesas nėra pilnai iširtas. Vis dėlto, nepaisant ypatingos šių kanalų svarbos, didžioji dauguma elektrofiziologinių tyrimų buvo atlikta tik ekspresavus TRPM7 baltymą į *Xenopus laevis* oocitus, įvairias linijines ląsteles (HEK293, CHOK1, HeLa, Jurkat T, RBL-2K3) [75, 119, 120] arba su transgeninių pelių širdies ląstelėmis [9]. Šių kanalų tyrimai natūraliuose širdies miocituose elektrofiziologiniais tyrimų metodais yra sudėtingi dėl įvairių joninių kanalų gausos ir buvo atlikti tik kelių mokslinių grupių [12, 121].

1.3.5. TRPM6 ir TRPM7 kanalų fiziologinė/patofiziologinė reikšmė

Nustatyta, kad tiek TRPM6, tiek TRPM7 kanalai yra glaudžiai susiję su Mg^{2+} ir Ca^{2+} homeostazės palaikymu organizme, o tai siejama su fiziologiniais procesais ir ligų vystymusi [122, 123].

TRPM6 kanalų įtaka Mg^{2+} homeostazei yra itin svarbi inkstuose ir plonojoje žarnoje [6]. Taip pat nustatyta, kad šie kanalai dėl magnio homeostazės svarbūs ir pieno liaukų epitelio [124] bei storosios žarnos [125] ląstelėms. Vėliau atlikti tyrimai su HEK923 ląstelėmis ir *Xenopus laevis* oocitais parodė, kad TRPM6 mutacijos nulemia TRPM6/TRPM7 kompleksų susidarymą, slopinant TRPM6 raišką. Manoma, kad šis procesas gali stipriai nulemti žarnyno veiklą ir Mg^{2+} reabsorbciją inkstuose [65, 126].

TRPM6 kanalai dalyvauja ir kituose svarbiuose fiziologiniuose procesuose, įskaitant ankstyvą embriono vystymąsi, kuriame TRPM6 yra būtinas išgyvenimui. Tyrimai atlikti su pelėmis rodo, kad šio baltymo trūkumas yra letalus [127, 128]. Vėlesni tyrimai su *Xenopus laevis* parodė, kad TRPM6 kanalo funkcijos sutrikimai embriogenezėje sukėlė gastruliacijos ir nervinio vamzdelio uždarymo defektus, o vertinant organų dydį kai kurie embrionai turėjo galvos, akių ir smegenų pakitimų [129].

TRPM7 kanalų pašalinimas iš DT-40 B limfocitų sukėlė šio tipo ląstelių žūtį [75]. Be to, naudojant šio tipo ląsteles buvo nustatyta, kad kinazinė dalis taip pat dalyvauja Ca^{2+} homeostazės palaikyme [130]. TRPM7 kanalai atsakingi už Ca^{2+} patekimą į adipocitus, kurį nulemia ląstelės Mg^{2+} koncentracija ir inhibitoriai (2-APB, vandenilio peroksidas ir kt.), slopinantys per TRPM7 kanalus tekančias sroves [131]. Parodyta, kad endotelio ląstelėse TRPM7 yra susiję su augimo ir proliferacijos procesu [132]. TRPM7 kanalo aktyvumas taip pat svarbus acetilcholiną išskiriančių sinapsinių pūslelių susiliejimui [17].

Neseniai atliktame tyrime, taikant genetinius ir elektrofiziologinius tyrimų metodus, buvo nustatyta, kad TRPM7 svarbus ne tik Ca^{2+} , bet ir kitų DV katijonų, tokių kaip Zn^{2+} , Mg^{2+} , balansui organizme palaikyti. Tyrimo autoriai nustatė, kad TRPM7 kanalas dalyvauja organizmo mineralų homeostazės palaikyme žarnyne ir inkstuose ir šio kanalo svarbą augimui ir vystymuisi po gimimo [133].

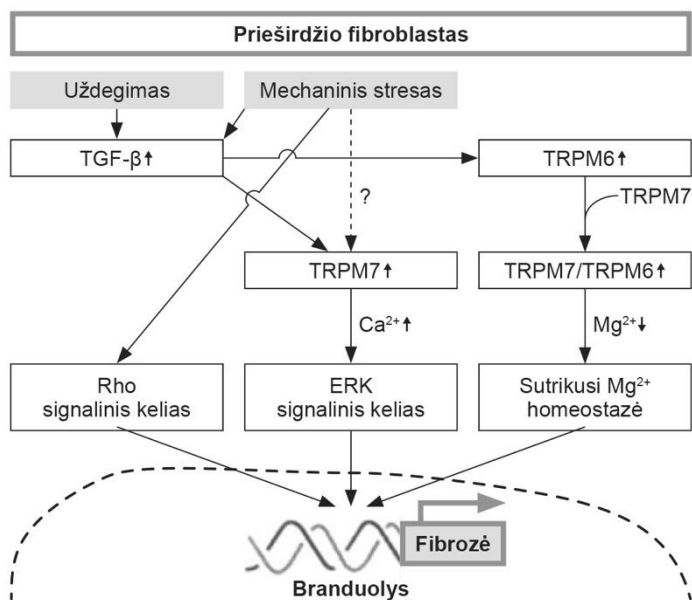
Mg^{2+} taip pat dalyvauja ir fermentinėse reakcijose. Dėl šios priežasties, medžiagų apykaitos sutrikimai, lemiantys šių jonų transportavimą per TRPM6 kanalus, sukelia sisteminius pokyčius ir patologinius pakitimus [134, 135]. Hipomagnezemija su antrine hipokalcemija (HSH) yra autosominiu recesyviniu būdu paveldima liga, kuriai būdingi neurologiniai sutrikimai, įskaitant traukulius ir raumenų spazmus, dėl Mg^{2+} trūkumo [136]. Buvo nustatyta, kad šeiminiai hipomagnezemijos atvejai yra susiję su 9q chromosoma

[106]. Atliekant genetinius tyrimus buvo nustatyta keletas TRPM6 mutacijų, sukeliančių šią ligą [7, 137, 138]. Sergant HSH, dėl *Trpm6* mutacijos, negali susidaryti TRPM6 ir TRPM7 heterotetrameriniai kompleksai [65]. Kito mokslinio tyrimo metu buvo nustatyta, kad įgimtą ir įgytą hipomagnezemiją nulemia skirtingos priežastys, tačiau, molekuliniai ligos vystymosi mechanizmai yra tokie patys [139]. TRPM6 gali dalyvauti ir autosominiu dominantiniu būdu paveldimos hipomagnezemijos patogenezėje [140].

TRPM6 sutrikimai taip pat susiję su komplikacijomis, atsirandančiomis dėl lėtinių ligų, tokių kaip diabetas [141, 142]. Naudojant pelių hipertenzijos modelį nustatyta, kad aldosterono infuzija paveikė TRPM6 kanalo baltymo raišką plazminėje membranoje, sukeldama hipomagnezemiją ir pablogindama hipertenzijos sukeltą inkstų pažeidimą. Atstatant Mg^{2+} koncentraciją, sumažėjo aldosterono sukeltas kraujospūdžio padidėjimas, inkstų fibrozės laipsnis ir oksidacinis stresas, nulemtas padidėjusios TRPM6 kanalo baltymo raiškos. Tai rodo glaudų TRPM6 kanalų ryšį su aldosterono sukeltu poveikiu širdies ir kraujagyslių bei inkstų funkcijai [143].

TRPM7 kanalai dalyvauja ne tik kalcio ir magnio jonų homeostazėje [144, 145], bet ir imuninės sistemos homeostazėje [146], embriono vystymosi procese [144], viduląstelių ligandų Ca^{2+} ir Mg^{2+} sukeltos hipo- ir hiperkalcemijos bei hipo- ir hiperagnezemijos procesų atsiradime ir/ar jų palaikyme.

TRPM7 kanalų aktyvumas registruojamas įvairiomis patologinėmis sąlygomis: sergant Alzheimerio liga, aneurizmomis [44, 147, 148], sergant arterine hipertenzija [149–152], diabetu [153, 154], esant smegenų išemijai ir hipoksijai [155]. TRPM7 dalyvauja širdies ir kraujagyslių ligų patogenezėje. Padidėjęs kanalo laidumas kalcio jonams gali nulemti prieširdžių fibroblastų fibrogenzę (1.3.5.1 pav.) [156, 157]. Šių kanalų aktyvumas registruojamas kai yra padidėjęs kraujospūdis ir yra įvairūs širdies ritmo sutrikimams (PV) ir kt. [14, 44, 147, 148]. TRPM7 kanalų aktyvumas taip pat susijęs su metaboliniu sindromu, pankreatitu ir širdies raumeninio audinio pažeidimu [158]. Be to, buvo parodyta, kad TRPM7 kanalo baltymo raiška ir aktyvumas yra susiję su inkstų kraujagyslių hiperpralaidumu ir inkstų funkcijos sutrikimu [93, 159].



1.3.5.1 pav. Hipotetinis signalinių kelių modelis, susijęs su prieširdžių fibrogeze ir TRPM6, TRPM7 kanalais

ERK – ekstraląstelinio signalo reguliuojama kinazė; Rho – guanozino trifosfato hidrolazė; TGF-β – transformuojantis beta augimo faktorius. Pritaikyta pagal [157].

TRPM7 kanalo funkcijos ir sutrikimai, stebimi įvairių piktybinių procesų patogenezėje [160, 161], įskaitant kasos adenokarcinomą [162, 163], retinoblastomą [164] ir melanomą [165]. Tyrimai atlikti su prostatos navikinėmis ląstelėmis parodė svarbų Ca^{2+}/Mg^{2+} santykio vaidmenį navikinio proceso patogenezėje [166, 167]. Navikiniai susirgimai gali išsivystyti dėl pokyčių procesuose (Mg^{2+} homeostazė, ląstelių proliferacija, diferencijacija ir migracija), kuriuose dalyvauja TRPM6 ir TRPM7 kanalai [168]. Be to, yra manoma, kad didelė TRPM7 kanalo baltymo raiška galėtų būti naudojama kaip išankstinis žymuo, skirtas nustatyti ankstyvų stadijų vėžinius susirgimus [169]. Pagrindiniai TRPM6 ir TRPM7 kanalų modulatoriai, jų fiziologinės funkcijos ir dalyvavimas ligų patogenezėje pateikti 1.3.5.1 lentelėje [64].

1.3.5.1 lentelė. TRPM6 ir TRPM7 kanalų veiklą fiziologinėmis ir patofiziologinėmis sąlygomis moduliuojantys veiksniai [pritaikyta pagal [64]]

Kanalas	Modulatorius	Aktyvini- mas arba slopinimas	Funkcija	Liga, tyrimo sąlygos	Tyrimo objektas
TRPM6	PIP ₂ ir fosfolipazė C	+	Mg ²⁺ srovė ir homeostazė	HSH	HEK-293 ląstelės
	Viduląstelinis Mg ²⁺	-	Mg ²⁺ srovė	Hipomagnezėmija	Pelės modelis
	EGF/ERK/AP-1 signalinis kelias	+	Mg ²⁺ transportas ir homeostazė	Fiziologinės sąlygos	HEK-293 ląstelės
	Insulinas	+	Mg ²⁺ homeostazė	Gliukozės tolerancija nėštumo metu	Pelės modelis
	Metforminas	-	Mg ²⁺ homeostazė ir TRPM6 raiška	2-tipo cukrinis diabetas	HEK-293 ir hCaco-2 storosios žarnos ląstelės
	Uromodulinas	+	Mg ²⁺ homeostazė inkstuose	Mažas magnio suvartojimas	Pelės modelis
	P ₂ X ₄ receptoriaus aktyvavimas	-	Mg ²⁺ transportas ir homeostazė	Fiziologinės sąlygos	Pelės modelis
	MsrB1	+	Mg ²⁺ homeostazė inkstuose	Oksidacinis stresas	HEK-293 ląstelės
	Farmakologinis aktyvumas	-	Mg ²⁺ absorbcija inkstuose ir žarnyne	Fiziologinės sąlygos	HEK-293 ląstelės
	Viduląstelinis Mg ²⁺	+	Mg ²⁺ srovė	Mažas magnio suvartojimas	Pieno liaukų epitelinės ląstelės
	Farmakologinis aktyvumas	-	Mg ²⁺ srovė	Fiziologinės sąlygos	Žmogaus storosios žarnos ląstelės
	TRPM6 delecija	-	Neuroninio vamzdelio uždarymas	Embriogenezė	<i>Xenopus laevis</i>
	Homozigotinė delecija	-	Mg ²⁺ homeostazė	Embrioninis vystymasis	Pelės modelis

1.3.5.1 lentelės tęsinys

Kanalas	Modulatorius	Aktyvumas arba slopinimas	Funkcija	Liga, tyrimo sąlygos	Tyrimo objektas
TRPM6	TRPM6 mutacija	-	Mg ²⁺ absorbcija inkstuose ir žarnyne	HSH	Žmogaus DNR
	TRPM6 mutacija	-	Mg ²⁺ homeostazė	Hipomagnezemia	Naujagimiai
	TRPM6 polimorfizmai	-	Mg ²⁺ ir Ca ²⁺ koncentracija kraujyje serume	Meningomielocelė	Žmogaus kraujo serumas
	TRPM6 polimorfizmai	-	Mg ²⁺ koncentracija kraujyje serume	Po-insultinė epilepsija	Žmogaus kraujo serumas
	Kolorektalinis vėžys	-	TRPM6 raiška	Kolorektalinis vėžys	Vėžinis storosios žarnos audinys
	Anti-EGFR vaistai; GW-9662 ir LE135	+/-	TRPM6 raiška ir reabsorbcija inkstuose	Vėžio gydymas	NRK-52E ląstelės
	Salvianolio rūgštis B	-	TRPM6 raiška ir priešuždegiminių citokininų sekrecija	Ūminis plaučių pažeidimas sepsio metu	Žiurkės modelis
TRPM7	Viduląstelinis pH ir Mg ²⁺	-	Ca ²⁺ srovės	Fiziologinės sąlygos	HEK-293 ir Jurkat T ląstelės
	cAMP/PKA signalinis kelias	+	Ca ²⁺ srovės	Fiziologinės sąlygos	HEK-293 ląstelės
	Izoproterenolis	+	Mg ²⁺ srovės	Neuroendotoksinas, sukkeliantis neuronų žūtį	Neuroblastomos SHSY-5Y ląstelės
	ROS	+	Ca ²⁺ srovės	Anoksinė neuronų žūtis	HEK-293 ir smegenų žievės neuronai
	ATF	+	Ca ²⁺ srovės	Fiziologinės sąlygos	CHO-K1 ląstelės

1.3.5.1 lentelės tęsinys

Kanalas	Modulatorius	Aktyvinimas arba slopinimas	Funkcija	Liga, tyrimo sąlygos	Tyrimo objektas
TRPM7	Mg·ATF ir Mg·GTF	–	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ stovės ir mirtingumas	Fiziologinės sąlygos	HEK-293 ir DT-40 B limfocitai
	S1296 liekana, iš TRPM7 TRP segmento	–	Ca ²⁺ stovės	Fiziologinės sąlygos	Neuroblastomos ląstelės
	Sumažintas viduląstelinis Mg ²⁺ , H ₂ O ₂ ir farmakologinis aktyvumas	+	Ca ²⁺ ir Mg ²⁺ stovės	Funkcija adipocituose	Adipocitai
	Kinazės segmento mutacija ir H ₂ O ₂	–	Viduląstelinio magnio kiekis ir Mg ²⁺ stovės	Oksidacinis stresas	HEK-293 ląstelės ir pelės modelis
	Farmakologinis aktyvumas	+	Ca ²⁺ stovės ir proliferacija	Fiziologinės sąlygos	DT-40 B limfocitai
	Mg·ATF, Gd ³⁺ , farmakologinis aktyvumas	–	Augimas ir proliferacija	Mažas Mg ²⁺ ir Ca ²⁺ kiekis aplinkoje	Endotelio ląstelės
	Kinazinio segmento trūkumas TRPM7 kanale	–	Mg ²⁺ homeostazė	Embrioninis vystymasis	Pelės modelis
	Bradikininas	+	Priešuždegiminių baltymų ir Mg ²⁺ srovių reguliavimas	Priešuždegiminis signalinis kelias	Lygiųjų raumenų ląstelės
	PIP ₂ hidrolizė ir PLC aktyvumas	–	Ca ²⁺ ir Mg ²⁺ stovės	Fiziologinės sąlygos	HEK-293T ir CHO-K1 ląstelės
	Lipopolisacharidai	+	Ca ²⁺ stovės ir endotelio fibrozė	Endotoksinės sąlygos	Endotelio ląstelės
	Lipopolisacharidai	+	Endotelio migracija	Endotoksinės sąlygos	Endotelio ląstelės

1.3.5.1 lentelės tęsinys

Kanalas	Modulatorius	Aktyvini- mas arba slopinimas	Funkcija	Liga, tyrimo sąlygos	Tyrimo objektas
TRPM7	Lipopolisacharidai kraujo plazmoje	+	Priešuždegiminių citokinų sekrecija, medžiagų apykaitos disfunkcija ir organų nepakankamumas	Endotoksemija	Žiurkės modelis
	Lipopolisacharidai kraujo plazmoje	+	Kraujagyslių pralaidumas, inkstų pažeidimas ir padidėjęs mirtingumas	Endotoksemija	Žiurkės modelis
	TRPM7 polimorfizmai	-	Mg ²⁺ srovės	Aritmija	HEK-293, CHO-K1 ir hiPSC iš kardiomiocitų
	Aripirazolas	-	Ca ²⁺ srovė	Uždegimas	Pirminė mikroglijos kultūra iš pelių modelių
	CAR, FTY720, sfingozinas, 2-APB	-	Ca ²⁺ ir Mg ²⁺ srovės	Fiziologinės sąlygos	HEK-293 ir Jurkat T limfocitai
	Į vaistus panašūs junginiai	+	Ca ²⁺ srovė	Fiziologinės sąlygos	HEK-293 ląstelės ir pelės modeliai
	Lipopolisacharidai kraujo plazmoje	+	TLR4 endocitozė, Ca ²⁺ srovė, NF-κB ir IRF3 transkripcija ir translokacija	Endotoksemija	Pelės modelis
	Lipopolisacharidai	+	Neuronų žūtis	Endotoksinės sąlygos	Hipokampo ir PC12 neuronai
	Inaktyvuota TRPM7 kinazė	-	Priešuždegiminių citokinų sekrecija, limfocitų diferenciacija į Th17	Fiziologinės sąlygos ir ūminė transplantato prieš šeimininką liga	Pelės modelis

1.3.5.1 lentelės tęsinys

Kanalas	Modulatorius	Aktyvini- mas arba slopinimas	Funkcija	Liga, tyrimo sąlygos	Tyrimo objektas
TRPM7	siRNR	-	Membranos įtampa ir pūslelių sintezė	Fiziologinės sąlygos	PC12 ląstelės
	siRNR	-	Neuronų išgyvenamumas ir atminties išlaikymas	Uždelsta neuronų žūtis po išeminės pažeidimo	CA1 neuronai ir žiurkės modelis
	Ca ²⁺ /Mg ²⁺ išorinis santykis ir hipoksija	+	Ca ²⁺ srovė, ląstelių proliferacija, HIF-1α kaupimasis ir RACK1 fosforilinimas	Prostatos vėžys	Prostatos vėžio ląstelės
	TRPM7 raiška	+	Naviko vystymasis, morfologija ir proliferacija	Uždegiminė žarnyno liga ir kolorektalinis vėžys	Vėžinis audinys ir kolorektalinio vėžio ląstelės
	Fibrozės stimuliacija	+	Inkstų atrofija, kanalėlių formavimasis ir ląstelių proliferacija	Nefropatija	Vieno šlapimtakio obstrukcijos modelis pelėse
	Hipoksijos ir išemijos patogenezė	+	Baltymo raiška, smegenų pažeida	Hipoksinė-išeminė encefalopatija	Hipoksinis-išeminis smegenų ląstelių žūties modelis
	Salvianolio rūgštis B	-	TRPM7 raiška ir priešūde- giminių citokinių sekrecija	Ūminis plaučių pažeidimas sepsio metu	Žiurkės modelis

HSH – hipomagnezija su antrine hipokalcemija; EGF – epidermio augimo faktorius; ERK – ekstraląstelinio signalo-reguliuojama kinazė; MsrB1 – metionino sulfoksido reduktazė B1; EGFR – epidermio augimo faktoriaus receptorius; cAMF – ciklinis adenozino monofosfatas; PKA – baltymų kinazė A; ROS – reaktyviosios deguonies formos; ATF – adenozino trifosfatas; Mg·ATF – magnio ir ATF kompleksas; Mg·GTF – magnio ir guanozino trifosfato kompleksas; PLC – fosfolipazė C; 2-APB – 2-aminoetildifenilboratas; RACK1 – aktyvuotos C kinazės 1 receptorius.

1.3.6. TRPM6 ir TRPM7 kanalų reguliaciniai mechanizmai

Magnio homeostazės palaikymui itin svarbus veiksnys yra magnio reabsorbcija inkstuose. Šį procesą kontroliuoja TRPM6 kanalai. Nuo jų pralaidumo priklauso Mg^{2+} balansas sveikame ir ligų paveiktame organizme [170]. TRPM6 kanalų reguliaciją molekuliniam lygmenyje lemia daugelis veiksnių, tokių kaip: adenohipofizės gaminami tropiniai hormonai, įvairūs viduląsteliniai faktoriai ir taip pat kinazinis domenas [171–173] (1.3.6.1 lentelė). Eksperimentiniais tyrimais nustatyta, kad TRPM6 yra EGF ir 17- β -estradiolio reguliacinis taikynys [172, 173]. Tačiau, išsami informacija apie TRPM6 kanalų pernašos funkciją išlieka neaiški. Todėl, tikimasi, kad tolimesni TRPM6 kanalų tyrimai suteiks daugiau informacijos apie Mg^{2+} homeostazę ir bus naudingi su šiuo veiksniumi susijusių ligų diagnozavimui ir valdymui [172].

1.3.6.1 lentelė. TRPM6 kanalų reguliaciją lemiantys veiksniai [pritaikyta pagal [172]]

Reguliacinis veiksnys	Poveikis	Paveiktas procesas
Magnis, gaunamas su maistu	↑	Transkripcija*
Estrogenas	↑	Transkripcija (inkstuose)
Takrolimas	↓	Transkripcija (inkstuose)
Ciklosporinas A	↓	Transkripcija (NRK-52E ląstelėse)
Chroninė metabolinė acidozė	↓	Transkripcija (inkstuose)
Chroninė metabolinė alkalozė	↑	Transkripcija (inkstuose)
NCC inhibicija	↓	Transkripcija (inkstuose)
Viduląstelinis magnis ir magnio nukleotidai	↓	Kanalo aktyvumas
EGF	↑	Kanalo aktyvumas
RACK1	↓	Kanalo aktyvumas
Prijungtas α -kinazinis domenas	Netiesioginis	Kanalo aktyvumas
Rūgštinis pH	↑	Vienvalenčių jonų srovė

*Sumažėjęs magnio suvartojimas, didina inkstų TRPM6 kanalų mRNR raišką, o magniu praturtintas maistas padidina TRPM6 kanalų mRNR raišką žarnyne. ↑ ir ↓ reikšmingai padidina arba sumažina atitinkamai nurodytą procesą, įskaitant genų transkripciją, divalenčių jonų pralaidumą ir TRPM6 kanalų aktyvumą. NRK-52E – žiurkės inkstų epitelio ląstelių linija, endogeniškai ekspresuojanti TRPM6; NCC – tiazidui jautrus NaCl katalizatorius; EGF – epidermio augimo faktorius; RACK1 – aktyvuotos C-kinazės receptorius.

TRPM7 kanalai gali būti pastoviai aktyvūs (iki 10 proc. net ir ląstelėse, esančiose ramybės būsenoje) ir/arba būti reguliuojami įvairių veiksnių. Vienas svarbiausių TRPM7 kanalų aktyvumo reguliatorių yra Mg^{2+} (tiek laisvas, tiek

ir komplekse su nukleotidais). Tyrimais parodyta, kad esant fiziologinei (3–4 mM) Mg·ATF koncentracijai, srovė per TRPM7 kanalus nepadidėjo, o didesnės koncentracijos turėjo slopinantį poveikį [75, 174]. TRPM7 slopinimas neapsiriboja tik adenino nukleotidais. Nustatyta, kad kiti purino ir pirimidino trifosfatai taip pat slopina sroves, tekančias per TRPM7 kanalą. Dinukleotidai taip pat gali slopinti šias sroves, tačiau silpniau. Tuo tarpu, nukleotidų monofosfatai negali sudaryti kompleksų su Mg^{2+} , todėl neturi jokio poveikio srovių per TRPM7 kanalus, reguliavimui [81, 174].

Literatūros duomenimis, šiuo metu yra nustatyti keli TRPM7 kanalų reguliaciniai mechanizmai. Vieningai sutariama, kad TRPM7 kanalas slopinamas kai yra padidėjusi tiek viduląstelinė laisvo Mg^{2+} koncentracija, tiek komplekse su ATF. Demeuse su kolegomis nustatė, kad TRPM7 kanalas gali būti reguliuojamas per TRPM7 kanale esančią laisvo Mg^{2+} rišimosi vietą ir kinazinėje dalyje esančią Mg·NTP (magnio ir vieno iš nukleotidų kompleksas) rišimosi vietą. Užblokavus kinazinę dalį, Mg^{2+} rišimosi vieta kanale išlieka aktyvi ir gali nepriklausomai reguliuoti kanalo vartinį mechanizmą [81]. Be to, manoma, kad šis kanalas gali būti reguliuojamas ir fosfolipazės C (PLC), kuri katalizuoja PIP₂ hidrolizę, ir cAMF [79, 175]. Tačiau dėl šių reguliacinių mechanizmų vieningos nuomonės nėra.

TRPM7 kanalo funkcija taip pat gali būti siejama ir su fosforiliniu. Nustatyta, kad TRPM7 mutacijos (T1482I (žuvų, amfibijų, paukščių bei primatų) bei Ser-1482 (žiurkių ir pelių)) yra susiję su TRPM7 C-gale esančio Ser/Thr α -kinazinio domeno autofosforiliniu. Kito tyrimo metu, rekombinantinis TRPM7 kanalas su T1482I mutacija buvo aptiktas HEK-293 ląstelėse, kuriose TRPM7 kanalai išliko funkcionalūs, tačiau buvo padidėjęs jautrumas Mg^{2+} slopinančiam poveikiui [75, 148, 176]. Kiti kanalo aktyvumą lemiantys veiksniai pateikti 1.2.2.1 lentelėje (žr. 1.2.2 skyrių).

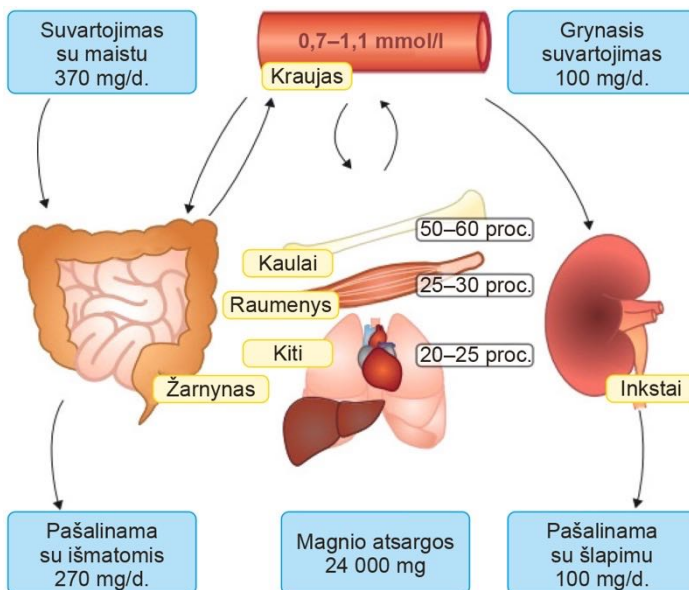
1.4. Magnis

1.4.1. Mg^{2+} homeostazė

Mg^{2+} yra antras gausiausias viduląstelinis katijonas gyvose ląstelėse, kuris atlieka daug gyvybiškai svarbių funkcijų organizme [177]. Šis elementas, kaip kofaktorius, aktyvina daugiau nei 300 fermentų. Mg^{2+} reguliuoja fermentų aktyvumą keliais būdais: prisijungdamas prie fermento aktyviojo centro; sąveikaudamas su substratais (pvz., ATF); sukeldamas fermento konformacinius pokyčius, lemiančius katalizuojamos reakcijos moduliavimą ir skatindamas fermentinių kompleksų susidarymą [177–179]. Mg^{2+} dalyvauja daugelyje gyvybiškai svarbių procesų, tokių kaip baltymų, riebalų ir riebalų rūgščių sintezė bei nukleorūgščių metabolizmas [179, 180]. Magnis reguliuo-

damas kitus joninius kanalus, padeda palaikyti transmembraninį kalio, kalcio ir natrio jonų gradientą. Magnio jonai veikia kaip Ca^{2+} antagonistas, todėl gali nulemti procesus, kuriuos reguliuoja ląstelinis Ca^{2+} . Šis procesas itin svarbus palaikant normalią raumenų ir nervų sistemos funkciją [178, 179].

Organizme magnio homeostazė palaikoma dėl pusiausvyros tarp magnio, gaunamo su maistu ir išskiriamo su šlapimu. Šią pusiausvyrą reguliuoja inkstai. 3–5 proc. į glomerulų filtratą patekusių magnio jonų išskiriama į šlapimą, tuo tarpu didžioji jonizuoto magnio dalis reabsorbuojama per Henlės kilpą ir distalinius vingiuotuosius kanalėlius (DVK) (1.4.1.1 pav.) [106].

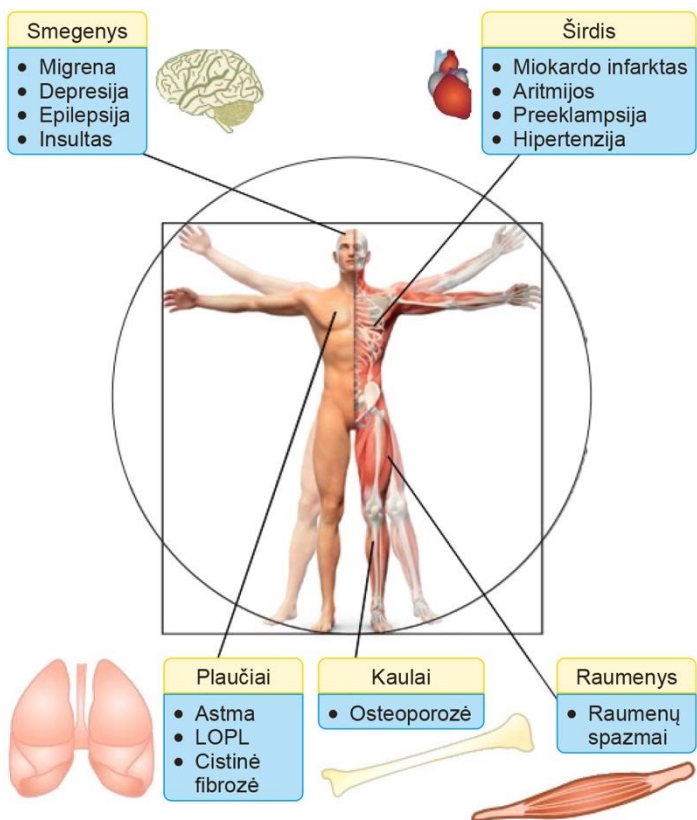


1.4.1.1 pav. Magnio homeostazės schema

Schemeje pavaizduotas per parą suvartojamas ir išskiriamas Mg^{2+} kiekis. Kasdien žarnyne yra absorbuojama apie 120 mg, o išskiriama apie 20 mg magnio. Todėl grynasis magnio suvartojimas per dieną yra apie 100 mg. Inkstų glomerulai per parą perfiltruoja apie 2400 mg Mg^{2+} , iš kurių 2300 mg yra reabsorbuojama inkstų kanalėliuose. Šis skirtumas atitinka magnio pasisavinimą žarnyne. Pritaikyta pagal [181].

Bendra ląstelinio Mg^{2+} koncentracija dažniausiai yra nuo 5 iki 10 mM daugelyje tirtų žinduolių ląstelių tipų, tačiau kai kuriose ląstelėse ji gali būti iki 20 mM. Labiausiai jonizuotas Mg^{2+} yra komplekse su ATF ir kitais nukleotidais, taip pat esantis mitochondrijose ir sarkoplazminiame tinkle. Mg^{2+} kaupimasis išvardintose organelėse atsiranda dėl šių jonų gebėjimo prisijungti prie baltymų, fosfolipidų, nukleorūgščių, nukleotidų ar chromatino [180, 182]. Daugumos tirtų ląstelių laisvo Mg^{2+} koncentracija citozolyje vyrauja nuo 0,5 iki 1 mM (~10 proc. viso ląstelinio Mg^{2+}) [180].

Magnis atlieka daug gyvybiškai svarbių funkcijų organizme, todėl sutrikusi šio elemento reguliacija gali nulemti patologinių būklių atsiradimą. Yra žinoma, kad magnis svarbus širdies darbui, palaiko ritmingą širdies veiklą, atpalaiduoja raumenis, plečia kraujagysles, tokiu būdu mažinant padidėjusį kraujo spaudimą. Nepakankamas magnio kiekis gali prisidėti prie širdies ir kraujagyslių ligų patogenezinių mechanizmų išsivystymo (pvz., hipertenzijos) (1.4.1.2 pav.) [143].



1.4.1.2 pav. Magnio jonų poveikio ligų patogenezei schema

Pagrindinės ligos, kuriomis sergant buvo nustatyti Mg^{2+} homeostazės sutrikimai ir/arba paskirtas gydymas magnio preparatais. LOPL – lėtinė obstrukcinė plaučių liga. Pritaikyta pagal [181].

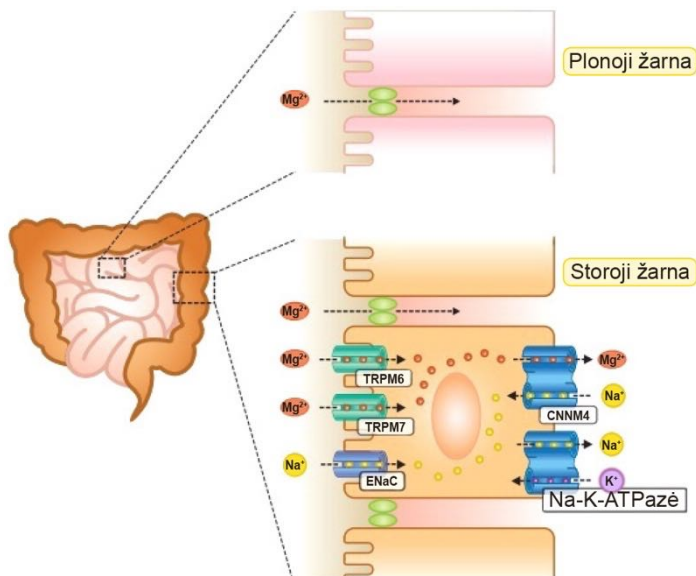
1.4.2. Mg²⁺ kanalai ir nešikliai

Baltymų ir deoksiribonukleino rūgšties (DNR) sintezė priklauso nuo viduląstelinio Mg²⁺ koncentracijos, todėl šio katijono koncentracija ląstelėje yra griežtai reguliuojama [181]. Pastovi viduląstelinio Mg²⁺ koncentracija yra palaikoma reguliuojant pusiausvyrą tarp Mg²⁺ įsisavinimo, viduląstelinio Mg²⁺ atsargų ir Mg²⁺ pašalinimo. Magnio jonai per ląstelės plazminę ir organelių membranas yra transportuojami per TRPM6, TRPM7 ir/ar kitus kanalus (Mg²⁺ patekimas) ir baltymus nešiklius (Mg²⁺ išmetimas). Magnio jonus transportuojantys kanalai gali būti specifiskesni Mg²⁺, arba būti pralaidūs įvairiems DV katijonams. Mg²⁺ pralaidūs kanalai yra randami plazminėje membranoje, mitochondrijose, endoplazminiame tinkle ir Goldžio aparate [180, 183]. Daugėjant atliktų genetinių tyrimų, tiriant įvairias žmonių ligas, buvo identifikuoti ir Mg²⁺ pernašoje dalyvaujantys baltymai (TRPM6, TRPM7, MagT1 (angl. *Magnesium transporter protein 1*), SLC41A1 (angl. *Solute carrier family 41 member 1*), ciklinas M2 (CNNM2), ciklinas M4 (CNNM4) ir kt.). Plačiai organizme aptinkami baltymai – TRPM7, MagT1 ir SLC41A1, bei audiniams specifiniai – TRPM6 (inkstai; storoji žarna), CNNM2 (inkstai) ir CNNM4; storoji žarna). Nors tikslios šių baltymų funkcijos dar tiriamos, buvo nustatyta, kad tik TRPM6 ir TRPM7 yra atsakingi už Mg²⁺ homeostazę organizme [181].

1.4.3. TRPM6 ir TRPM7 kanalų reikšmė organizmo Mg²⁺ homeostazės palaikyme

Žmogaus organizme Mg²⁺ homeostazė palaikoma dėl pusiausvyros tarp Mg²⁺ absorbcijos žarnyne ir Mg²⁺ išskyrimo per inkstus [178, 184, 185]. Magnio absorbcija vyksta plonajame ir storajame žarnyne, dviem skirtingais būdais: aktyviuoju viduląstelinio (angl. *transcellular*) ir pasyviuoju tarpląstelinio (angl. *paracellular*). Esant mažai viduląstelinei (angl. *intraluminal*) magnio koncentracijai, Mg²⁺ absorbuojamas viduląstelinio keliu, kurį lemia aktyvus Mg²⁺ pasisavinimas epitelinių ląstelių paviršiuje. Tarpląstelinis kelias svarbus, kai padidėja išorinė (angl. *luminal*) Mg²⁺ koncentracija. Šis procesas parodo pasyviąją Mg²⁺ pernašą per glaudžias jungtis tarp epitelio ląstelių [181, 184, 185]. Mg²⁺ absorbciją plonajame žarnyne skatina pasyvioji tarpląstelinė pernaša pagal elektrocheminį gradientą. Tuo tarpu, storajame žarnyne Mg²⁺ pernaša vyksta tik viduląstelinio keliu (1.4.3.1 pav.) [181]. TRPM6 kanalo baltymas yra dažniau aptinkamas storosios žarnos epitelio ląstelėse [7, 128]. Remiantis atliktais moksliniais tyrimais su pelėmis, buvo parodyta, kad Mg²⁺ įsisavinimas, per TRPM6 kanalus, yra svarbus žarnyno veiklai. Dėl to, kad žarnynui specifinė *Trpm6* abliacija pelėse sukėlė

hipomagnezemiją. Tai rodo, kad *Wild Type* pelių inkstai negali kompensuoti *Trpm6* nebuvimo žarnyne [128].



1.4.3.1 pav. Magnio jonų pernašos žarnyne schema

Plonajame žarnyne Mg^{2+} absorbuojamas pasyviuoju tarpląsteliniu būdu. Storajame žarnyne Mg^{2+} pernešamas aktyviuoju viduląsteliniu būdu, dalyvaujant baltymams (TRPM6, TRPM7, CNNM4). EnaC – epitelinis natrio jonų kanalas; CNNM4 – ciklinas M4. Pritaikyta pagal [181].

Inkstuose, maždaug apie 80 proc. viso kraujo serume esančio Mg^{2+} yra filtruojami glomeruluose, iš kurių daugiau nei 95 proc. reabsorbuojami išilgai nefrono atgal į kraują. Tik apie 3–5 proc. glomerulų filtrate esančio Mg^{2+} yra išskiriami su šlapimu fiziologinėmis sąlygomis, 10–15 proc. vėl absorbuojami inkstų proksimaliniuose vingiuotuosiuose kanalėliuose, o 60–70 proc. pasyviai reabsorbuojami kylančiojoje Henlės kilpos dalyje. Tik apie 5–10 proc. glomerulų filtrate esančio Mg^{2+} reabsorbuojami viduląsteliniu būdu DVK. Šis magnio kiekis apibūdina galutinį su šlapimu išskiriamo Mg^{2+} kiekį. TRPM6 kanalo baltymas aptinkamas DVK, todėl manoma, kad būtent jis yra atsakingas už reguliaciją, susijusią su galutiniu Mg^{2+} išsiskyrimu su šlapimu [179, 181, 184]. Tačiau, eksperimentiniai tyrimai su pelėmis, turinčiomis specifinę *Trpm6* inaktyvaciją inkstuose parodė, kad Mg^{2+} kiekis šių pelių kraujo plazmoje buvo normos ribose. Taip pat nustatyta, kad *Trpm6* svarbus Mg^{2+} transportui žinduolių placentoje ir trynio maišelyje [128]. Įvairių mokslinių grupių atlikti tyrimai rodo, kad TRPM6 yra pagrindinis Mg^{2+} homeostazės reguliatorius prenatalinio vystymosi metu ir suaugusiųjų organizme, dėl

kanalo aktyvumo placentos trofoblastuose ir žarnyno epitelio ląstelėse. Tačiau, specifinė TRPM6 ląstelinė funkcija vis dar kelia daug klausimų ir yra prieštaringai vertinama mokslinėje literatūroje. TRPM7 taip pat atsakingas už didžiąją į ląsteles patenkančių magnio jonų dalį. TRPM7 kanalo aktyvumas dažniausiai laikomas būtina sąlyga ląstelių gyvybingumui [75, 80]. Tačiau, yra tyrimų rodančių, kad TRPM7 trūkumas pelių T ląstelėse neturi poveikio ląstelių gyvybingumui ir Mg^{2+} koncentracijai [186]. Mokslinėje literatūroje yra nemažai prieštaringų duomenų apie TRPM6 ir TRPM7 kanalus. Tačiau yra teigiama, kad tiek TRPM6, tiek TRPM7 yra itin svarbūs Mg^{2+} homeostazei organizme palaikyti.

1.4.4. Mg^{2+} poveikis širdies ir kraujagyslių ligoms

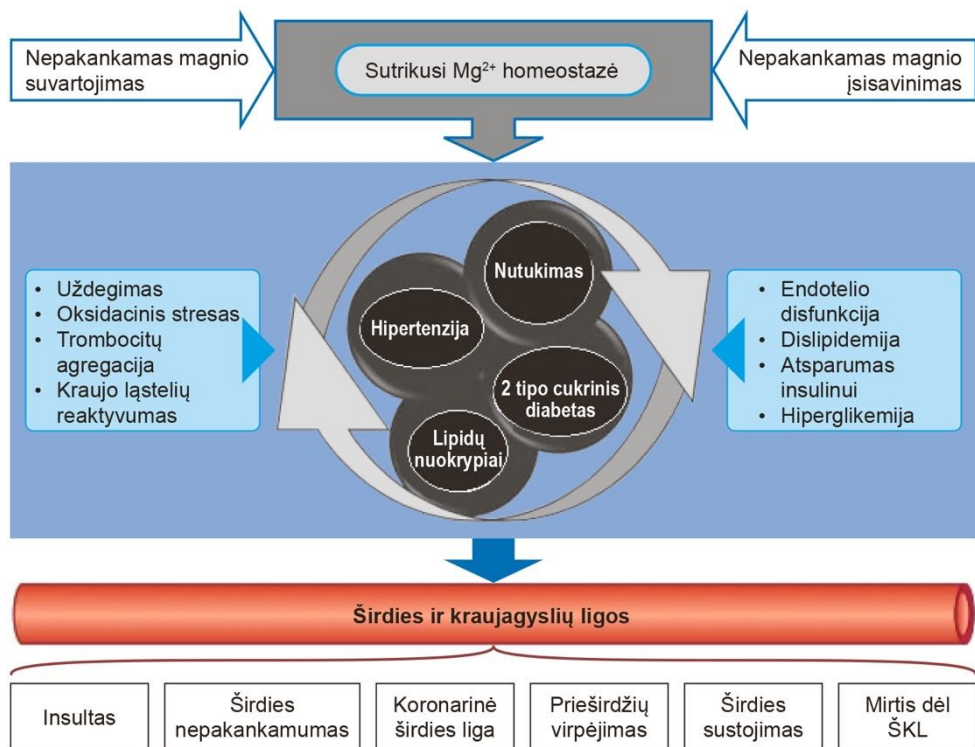
Nustatyta, kad didesnis magnio suvartojimas gali turėti teigiamą poveikį širdies ir kraujagyslių ligų (ŠKL) rizikos veiksniams, nes gerina gliukozės ir insulino metabolizmą bei lipidų profilį, stiprina nuo endotelio priklausomą kraujagyslių vazodilataciją, taip pat pasižymi antihipertenziniu ir priešūždegiminiu poveikiu [187].

Atliekant duomenų analizę buvo ieškoma sąsajų tarp magnio cirkuliuojančio kraujyje ir magnio išskiriamo su šlapimu, bei ŠKL, įskaitant širdies aritmijas, stazinį širdies nepakankamumą (ŠN), insultą ir staigią mirtį [188]. Taip pat, literatūroje yra duomenų, kad nėra sąsajų tarp Mg^{2+} , gaunamo su maistu, ir Mg^{2+} , esančio kraujo plazmoje [189, 190]. Tačiau kitais tyrimais nustatyta, kad mažas Mg^{2+} suvartojimas su maistu yra siejamas su maža Mg^{2+} koncentracija kraujyje. Neseniai atlikta duomenų meta-analizė parodė reikšmingas sąsajas tarp magnio papildų vartojimo, tarp kraujyje cirkuliuojančio Mg^{2+} ir per 24 valandas su šlapimu išskiriamo magnio kiekio [191].

Analizuojant duomenis apie magnio kiekį kraujyje ir ŠKL, nustatytos reikšmingos sąsajos tarp šių tiriamųjų veiksnių [192]. Cirkuliuojančio Mg^{2+} padidėjimas kraujyje 0,2 mM, buvo susijęs su 30 proc. mažesne ŠKL ir IŠL rizika. Šios meta-analizės metu buvo išanalizuota per 300 tūkst. pacientų klinikinių duomenų (4106 ŠKL ir 3215 IŠL). Iki šiol tai yra vienas patikimiausių įrodymų apie ryšį tarp magnio koncentracijos kraujyje ir ŠKL [188].

Mažas magnio kiekis kraujo serume siejamas su padidėjusia PV atsiradimo rizika po širdies operacijų. Tačiau nėra žinoma, ar hipomagnezemija nulemia PV atsiradimą įprastomis sąlygomis. Dviejuose atliktuose moksliniuose tyrimuose buvo tirtas ryšys tarp magnio koncentracijos kraujo serume ir PV rizikos. Tiriamąją grupę sudarė sveiki asmenys, tačiau turintys polinkį sirgti ŠKL. Remiantis Framinghamo sveikatos tyrimo (angl. *Framingham Health Study*) rezultatais, mažas Mg^{2+} kiekis kraujo serume buvo vidutiniškai susijęs su rizika išsivystyti PV asmenims, anksčiau nesirgusiems ŠKL [193]. ARIC (angl. *African Americans Atherosclerosis Risk in Communities*) grupėje taip pat buvo nustatytas ryšys tarp magnio koncentracijos kraujo serume ir PV išsivystymo. Didžiausia rizika sirgti PV buvo nustatyta tiems asmenims, kurių magnio kiekis kraujo serume buvo sumažėjęs, o mažesnė rizika – kai yra normalus ir padidėjęs magnio kiekis [194]. Ši tendencija vyrauja abiejuose atliktuose tyrimuose, tiriant dvi skirtingas populiacijas.

Atvirkščiai proporcingas ryšys tarp magnio suvartojimo ir atsparumo insulinui, hiperglikemijos, dislipidemijos, hipertenzijos ir uždegimo žymenų gali pateisinti apsauginį su maistu gaunamo magnio poveikį ŠKL. Epidemiologiniai tyrimai parodė, kad didesnis magnio suvartojimas su maistu ir/arba didesnė Mg^{2+} koncentracija kraujyje yra susiję su mažesne ŠKL rizika, pvz., IŠL ir staigia mirtimi dėl širdies ir kraujagyslių ligų. Atsižvelgiant į Mg^{2+} dalyvavimą įvairiuose biologiniuose procesuose, nenuostabu, kad magnio homeostazės pokyčiai gali nulemti įvairias ligas ir jų eigą (1.4.4.1 pav.). Daugybė mokslinių tyrimų įrodė, kad dėl magnio stokos padidėja oksidacinis stresas, įskaitant padidėjusią eritrocitų ir lipoproteinų peroksidaciją, susijusią su ankstyvomis ŠKL stadijomis ir jų progresavimu [195–199].



1.4.4.1 pav. Veiksniai lemiantys magnio homeostazę ir ŠKL atsiradimą

Mechanizmų, nulemtų kiekybinių magnio pokyčių organizme, sąsajos su pasekmėmis molekuliniam lygmenyje, kurios didina riziką susirgti ŠKL. ŠKL – širdies ir kraujagyslių ligos. Pritaikyta pagal [188].

Taigi, remiantis atliktais moksliniais tyrimais, nustatyta, kad gaunant pakankamą magnio kiekį su maistu ir/ar papildais, mažėja rizika susirgti ŠKL. Be to, šios išvados taip pat patvirtina, kad siekiant mažinti lėtinių ligų vystymąsi, svarbu didinti magnio turinčių maisto produktų vartojimą [188].

Iki šiol, TRPM6 ir TRPM7 baltymų raiškos vertinimai atlikti sveikoje [18] arba pakenktoje [19] žmogaus širdyje daugiausia buvo grindžiami tik genominiiais tyrimais. Tačiau, duomenų apie TRPM6 ir TRPM7 mRNR ir kanalų baltymų raišką skirtingose širdies dalyse yra itin mažai, jie prieštarinčiai vertinami, ypač, kurie susiję su TRPM6 raiška. Daugelio tyrimų, atliktų su eksperimentinių gyvūnų ir žmogaus širdies audiniais, duomenimis *Trpm6* mRNR raiška nebuvo aptikta [20–22]. Tik vienos studijos duomenimis, naudojant žmogaus širdies dešiniojo prieširdžio (DP) homogenatus, buvo aptikti TRPM6 mRNR ir baltymas bei nustatyta, kad jų raiška padidėjusi prieširdžių virpėjimu (PV) sergančių pacientų širdies mėginiuose [23]. Tačiau dauguma atliktų molekulinų tyrimų išvis nepateikia informacijos apie

TRPM6 raišką širdyje [19, 24]. Taigi, neaišku ar TRPM6 baltymas yra kardiomiocituose. Be to, nėra jokių duomenų apie galimą TRPM6 baltymo, o taip pat ir TRPM7 baltymo, raišką visose keturiose žmogaus širdies dalyse (prieširdžiuose ir skilveliuose).

Todėl, šio tyrimo metu, naudojant molekulinės biologijos metodus, mes siekėme nustatyti ar TRPM6 ir TRPM7 baltymai yra aptinkami žmogaus ir kiaulės širdyje. Kadangi, viduląstelinio Mg^{2+} sumažėjimas gali nulemti širdies patologinių pakitimų patogenezę, taip pat siekėme įvertinti galimus kiekybinius šių kanalų baltymų pokyčius ir sąsajas su išeminės ir neišeminės kilmės ŠN.

2. METODIKA

2.1. Etinis patvirtinimas

Disertacinio darbo metu atlikti eksperimentiniai tyrimai su žmogaus biologine medžiaga buvo vykdomi remiantis Europos bendrijos principais, kurie išdėstyti Helsinkio deklaracijoje. Tyrimams atlikti buvo gautas Lietuvos sveikatos mokslų universiteto (LSMU) Biomedicininų tyrimų etikos komiteto leidimas (2017-12-22, Nr. BE-2-71).

Eksperimentiniai tyrimai su gyvūnų biologine medžiaga buvo atlikti remiantis Laboratorinių gyvūnų priežiūros ir naudojimo vadovu (angl. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*). Šiems tyrimams atlikti buvo gautas Lietuvos Respublikos valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimas (2017-06-21, Nr. G2-68).

Gauti duomenys buvo apjungti į grupes, apdoroti matematiniais ir statistiniais metodais, todėl neteko individualumo. Pateiktos išvados yra tik apie bendras pokyčių tendencijas.

2.2. Tyrimo objektai

Tyrimuose buvo naudoti širdies (prieširdžio ir skilvelio) audiniai, kurie buvo pašalinti kardiochirurginių operacijų (aortos ar mitralinio vožtuvų protezavimo, vainikinių arterijų šuntavimo bei transplantacijų) metu, Kauno klinikų Širdies krūtinės ir kraujagyslių chirurgijos klinikoje, ir tyrimų tikslais suteikti LSMU. Pacientų klinikiniai duomenys pateikti 2.2.1 ir 2.2.2 lentelėse. Kontrolinę grupę sudarė pacientai su sinusiniu ritmu (SR) ir be išeminio pakenkimo.

Taip pat tyrimai atlikti su kiaulių (Lietuvos vietinės kiaulės veislė) ($n = 15$; abiejų lyčių; 35–40 kg svorio; 1–3 mėn. amžiaus) širdies audiniais.

2.2.1 lentelė. Pacientų, kuriems buvo atlikta širdies operacija, klinikiniai duomenys

Pacientų duomenys	Kontrolinė grupė	IŠL grupė	PV grupė
Amžius (metais)	37–82	50–87	45–85
Vidutinis amžius (metais) ± SEM	60,7 ± 2,4	67,4 ± 1,4	64,2 ± 3,5
Moterys, n (proc.)	10 (40,0)	17 (36,2)	22 (48,9)
Vyrai, n (proc.)	15 (60,0)	30 (63,8)	23 (51,1)
Visi, n (proc.)	25 (100)	47 (100)	45 (100)
Chirurginė intervencija			
Vožtuvų operacija, n (proc.)	25 (100)	0 (0)	23 (51,1)
CABG operacija, n (proc.)	0 (0)	32 (68,1)	14 (31,1)
CABG ir vožtuvų operacija, n (proc.)	0 (0)	15 (31,9)	8 (17,8)

IŠL – išeminė širdies liga; PV – prieširdžių virpėjimas; CABG – vainikinių arterijų šuntavimas; n – pacientų skaičius.

2.2.2 lentelė. Pacientų, kuriems buvo atlikta širdies transplantacija, ir kontrolinių (autoįvykių aukos) pacientų klinikiniai duomenys

Eil. Nr.	Lytis	Amžius (metais)	Diagnozė	Išmetimo frakcija (proc.)	Pagalbinio prietaiso implantacija į kairįjį skilvelį prieš širdies transplantaciją (trukmė mėnesiais)
1.	Vyr.	65	IŠL	15	Implantuotas 3 mėnesiams
2.	Vyr.	59	IŠL	16	Implantuotas 13 mėnesių
3.	Vyr.	65	IŠL	19	Implantuotas 3 mėnesiams
4.	Vyr.	57	IŠL	19	Implantuotas, bet trukmė nežinoma
5.	Vyr.	65	IŠL	15	Neimplantuotas
6.	Vyr.	65	IŠL	19	Implantuotas, bet trukmė nežinoma
7.	Vyr.	38	IDKM Širdies transplantacija atlikta prieš 15 metų. Chroninis širdies atmetimas.	25	Implantuotas, bet trukmė nežinoma
8.	Vyr.	56	IDKM	18	Implantuotas 15 mėnesių
9.	Vyr.	57	IDKM	24	Implantuotas 10 mėnesių
10.	Vyr.	38	IDKM	30	Implantuotas, bet trukmė nežinoma
11.	Vyr.	57	IDKM	17	Implantuotas, bet trukmė nežinoma

2.2.2 lentelės tęsinys

Eil. Nr.	Lytis	Amžius (metais)	Diagnozė	Išmetimo frakcija (proc.)	Pagalbinio prietaiso implantacija į kairįjį skilvelį prieš širdies transplantaciją (trukmė mėnesiais)
12.	Vyr.	53	IDKM	22	Implantuotas, bet trukmė nežinoma
13.	Vyr.	48	PPH	55	Neimplantuotas (dešiniojo skilvelio perkrova)
14.	Vyr.	29	TA	–	–
15.	Vyr.	50	TA	–	–
16.	Vyr.	41	TA	–	–
17.	Vyr.	48	TA	–	–
18.	Vyr.	75	TA	–	–

Vyr. – vyras; IŠL – išeminė širdies liga; IDKM – idiopatinė dilatacinė kardiomiopatija; PPH – pirminė plautinė hipertenzija; TA – motorinių transporto priemonių avarija.

2.3. Reagentai ir medžiagos

Atliekant tiriamąjį darbą, naudoti reagentai įsigyti iš Thermo Fisher Scientific (JAV), jei tekste nenurodyta kitaip. Darbe buvo tirti TRPM6 ir TRPM7 kanalų blokatoriai: 2-APB (2-aminoetil-difenilboratas; ab120124, Abcam, JK; tirpintas dimetilsulfoksido (DMSO)) ir karvakrolis (5-izopropil-2-metil-fenolis; grynumas ≥ 97 proc., Carl Roth GmbH+Co, Vokietija; tirpintas DMSO)). Nustatėme, kad tirpiklis (DMSO) neturėjo poveikio tirtoms medžiagoms. Baltymų raiškos tyrimuose naudoti antikūnai pateikti 2.3.1 lentelėje. Genų raiškos tyrimuose naudoti reagentai ir jų rinkiniai pateikti 2.3.2 lentelėje.

2.3.1 lentelė. Tyrimuose naudoti antikūnai

Nr.	Antikūnas (produkto kodas)	Tipas	Kilmė	Gamintojas	Metodas
1.	TRPM6 (ACC-046)	Polikloninis	Triušis	Alomone Labs	IF, WB
2.	TRPM6 (sc-365536)	Monokloninis	Pelė	Santa Cruz Biotechnology	IHC
3.	TRPM6 su AF-546 (sc-65536-AF546)	Monokloninis	Pelė	Santa Cruz Biotechnology	IF
4.	TRPM6 su AF-488 (sc-365536-AF488)	Monokloninis	Pelė	Santa Cruz Biotechnology	IHC
5.	TRPM7 (ACC-047)	Polikloninis	Triušis	Alomone Labs	IF, WB

2.3.1 lentelės tęsinys

Nr.	Antikūnas (produkto kodas)	Tipas	Kilmė	Gamintojas	Metodas
6.	TRPM7 su AF-488 (bs-9044R-A488)	Polikloninis	Triušis	Bioss Antibodies	IF, IHC
7.	TRPM7 (NBP1-20224)	Polikloninis	Triušis	Novus Biologicals	IHC
8.	TRPM7 (MA5-27620)	Monokloninis	Pelė	Thermo Fisher Scientific	WB
9.	TRPM7 (ab85016)	Monokloninis	Pelė	Abcam	WB
10.	β-aktinas (MA5-15739)	Monokloninis	Pelė	Thermo Fisher Scientific	WB

AF – Alexa Fluor; IF – imunofluorescencija; WB – *Western Blot*; IHC – imunohistochemija.

2.3.2 lentelė. Genų raiškos tyrimuose naudoti reagentai ir jų rinkiniai

Nr.	Reagentas ar jų rinkinys	Gamintojas
1.	mirVana™ miRNA Isolation Kit	Thermo Fisher Scientific, Lietuva
2.	TURBO DNA-free™ Kit	Thermo Fisher Scientific, Lietuva
3.	High Capacity RNA-to cDNA Kit	Thermo Fisher Scientific, Lietuva
4.	TaqMan® rinkinys (ID: Hs01019356_m1)	Thermo Fisher Scientific, JAV
5.	TaqMan® rinkinys (ID: Hs00559080_m1)	Thermo Fisher Scientific, JAV
6.	TaqMan® rinkinys (ID: Hs99999903_m1)	Thermo Fisher Scientific, JAV
7.	TaqMan® Universal MasterMix II, with UNG	Thermo Fisher Scientific, JAV
8.	GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, JAV

2.4. Genų raiška

Tyrimams naudotas prieširdžių ir skilvelių audinys buvo užpildytas skystu azotu ir grūstuvėlėje, rankiniu būdu, sutrintas. Visuminė ribonukleino rūgštis (RNR) išskirta naudojant reagentų rinkinį (žr. 2.3.2 lentelę, Nr. 1) ir Acid Phenol:CHCl₃ premix (Ambion, JAV) pagal gamintojo nurodytą darbo protokolą. Papildomai į lizės buferį buvo dedama RNA'zių inhibitorių (Applied Biosystems, JAV). Išskirtos visuminės RNR koncentracija ir kokybė buvo įvertinta naudojant analizatorių 2100 Agilent Bioanalyzer System (Agilent Technologies Inc., JAV).

Norint atlikti polimerazinę grandininę reakciją (PGR), RNR privalo būti transkribuota į komplementarią dvigrandę DNR. Iš RNR mėginių, prieš pradėdant kopijinės DNR sintezę, buvo pašalintas DNR užterštumas (angl. *contamination*), naudojant reagentų rinkinį (žr. 2.3.2 lentelę, Nr. 2), pagal gamintojo nurodytas instrukcijas. Atvirkštinė transkripcija atlikta naudojant

reagentų rinkinį (žr. 2.3.2 lentelę, Nr. 3) pagal gamintojo nurodytą darbo protokolą. Gauta kopijinė DNR buvo praskiesta tris kartus ir naudota tikro laiko PGR (RT-PGR) reakcijai atlikti.

RT-PGR reakcijoms atlikti buvo naudojami TaqMan® rinkiniai (žr. 2.3.2 lentelę, Nr. 4–6), TaqMan® reagentai (žr. 2.3.2 lentelę, Nr. 7) ir vanduo be nukleazių (Ambion, JAV). RT-PGR buvo atlikta naudojant termociklerį ABI 7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, JAV), pagal gamintojo nurodytas instrukcijas, kai reakcijos kiekis 20 μ l. Neigiama kontrolė buvo naudojama patikrinti reakcijos mišinio užterštumą, o DNR kontaminacijai tikrinti buvo naudojamos atvirkštinės transkripcijos kontrolės. β -aktinas naudotas kaip vidinė kontrolė. Mėginiai genotipuoti triplikatais. Norint nustatyti tiriamojo geno raišką, kiekvieno geno kiekybinė raiška palyginta su referentinio geno raiška. Genų raiška apskaičiuota naudojant Δ Ct metodą, išvedant dviejų Ct reikšmių vidurkį.

Kadangi RT-PGR yra atvirkščiai proporcinga nustatytai mRNR raiškai, tai kuo mažesnis RT-PGR įvertis, tuo yra didesnės baltymų koduojančios mRNR reikšmės. Todėl, siekiant aiškiau vizualizuoti gautus tyrimo rezultatus jie buvo pateikti dvejetainėje logaritmo skalėje. Tai reiškia, kad y ašyje ribinės reikšmės įgavo neigiamą įvertį.

PGR produktų specifiskumui patikrinti buvo atlikta gelio elektroforezė. PGR metodu gautų produktų gelio elektroforezei paruoštas 1 proc. agarozės gelis (1X TAE elektrofozerės buferinis tirpalas, 0,5 μ g/ml etidžio bromido tirpalas, agarozė (Cleaver Scientific, JK)). Elektroforezės kolonėlė buvo užpildyta 1X TAE buferiniu tirpalu. Elektroforezei naudoti mėginiai paruošti iš 10 μ l PGR produkto ir 1 μ l mėginių nešančio dažo TriTrack Loading Dye, atitinkamai kiekvienam mėginiui. Elektroforezė vyko 45 min., taikant 100 V elektrinę įtampą. Tyrimuose buvo naudotas markeris (žr. 2.3.2 lentelę, Nr. 8). Gelis analizuotas apšvietus UV spinduliais naudojant BDA Digital UV System (Biometra, Vokietija).

2.5. Imunofermentinė analizė (ELISA)

ELISA (angl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) tyrimo atlikimui buvo naudoti žmogaus širdies audiniai. Ruošiant mėginį, audinys nuplautas šaltu fosfatinio druskų tirpalu (PBS), pasvertas ir sukarpytas. Susmulkintos audinio dalys įdėtos į mėgintuvėlį, užpiltos 4 ml šalto PBS tirpalo ir homogenizuotos elektriniu homogenizatoriumi LabGEN 125 (Cole-Parmer, JAV). Mėgintuvėlis su gauta suspensija 2 min. sonikuotas ultragarsinėje vonelėje (Bioblock Scientific, Vokietija) leduose. Gautas homogenatas centrifuguotas šaldomąja centrifuga (Heraeus Biofuge Stratos Centrifuge,

Thermo Fisher Scientific, JAV) 5000×g (5 min.). Nusiurbtas supernatantas buvo išpilstytas mažais kiekiais ir saugotas –80 °C temperatūroje.

Baltymų koncentracija mėginiuose buvo nustatyta taikant Biureto metodą. Į mėgintuvėlį su tiriamuoju tirpalu įpilta 50 µl paruošto mėginio, 950 µl natrio deoksicholato (DOX; Sigma-Aldrich, JAV) tirpalo ir 4 ml Biureto reagento (Sigma-Aldrich, JAV). Kontrolinis tirpalas buvo sudarytas iš 1 ml DOX ir 4 ml Biureto reagento. Tirpalų optinis tankis matuotas Multiskan™ FC Microplate spektrofotometru (Thermo Fisher Scientific, JAV), kai nustatytas bangos ilgis – 536 nm. Remiantis gautomis tirpalų šviesos sugerties reikšmėmis, naudojant kalibracinę kreivę, buvo apskaičiuotas baltymo kiekis mėginiuose.

Imunofermeninės analizės ELISA tyrimams atlikti buvo naudoti komerciniai standartizuoti rinkiniai (MBS457216; MBS457214; MyBioSource, Inc., JAV). ELISA metodas atliktas laikantis pateiktų rinkinio gamintojo instrukcijų. Į atskirus mikroplokštelės šulinėlius, padengtus specifiniais TRPM6 arba TRPM7 antikūnais, buvo įpilta po 100 µl mėginio, teigiamos kontrolės arba kiekybinio standarto tirpalo ir inkubuota 2 val., +37 °C temperatūroje. Po inkubacijos, skystis iš mikroplokštelės buvo pašalinamas, o į kiekvieną šulinėlį įpilta po 100 µl reagento A ir inkubuota 1 val. tamsoje, +37 °C temperatūroje. Po to, mikroplokštelė plauta 3 kartus, 1–2 min., naudojant po 300 µl plovimo buferio, o po plovimo įpilta 100 µl reagento B ir inkubuota 1 val. tamsoje, +37 °C temperatūroje. Po inkubacijos, šulinėliai 5 kartus, 1–2 min. plauti naudojant po 300 µl plovimo buferio. Po to, į mikroplokštelės šulinėlius įpilta po 90 µl substrato ir inkubuota 20 min. tamsoje, +37 °C temperatūroje. Po inkubacijos, į šulinėlius įpilta po 50 µl blokuojančio tirpalo, kuris sustabdo reakciją vykstančią mikroplokštelėje. Tirpalo spalva šulinėliuose pasikeitė iš mėlynos į geltoną. Reakcijos metu atsiradusios spalvos intensyvumas yra proporcingas baltymų koncentracijai tiriamajame mėginyje. Tirpalų optinis tankis buvo matuotas spektrofotometru (Multiskan™ FC, Thermo Fisher Scientific, Finland), nustatytas bangos ilgis – 450 nm. Matavimai atlikti po 3 kartus. Pagal rezultatus, gautus išmatavus standartinių tirpalų optinius tankius, buvo nubraižyta standartinė kreivė. Remiantis šia kreive, apskaičiuotos tiriamųjų baltymų koncentracijos (pg/ml) mėginiuose. Statistinė duomenų analizė atlikta naudojant Excel 2010 (Microsoft Corporation, JAV) ir Curve expert 1.3 (Daniel G. Hyams, Hyams Development, JAV) programas.

2.6. Imunoblotas (Western blot)

Taikant Western Blot (WB) metodą, tyrimai atlikti naudojant žmogaus širdies audinio biopatus, kurie, po jų paruošimo, laikyti $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Ruošiant mėginį, į mėgintuvėlį su pasvertu audiniu įpilta 4 ml šalto RIPA lizės buferio ir homogenizuota automatinio homogenizatoriumi LabGEN 125 (Cole-Parmer, JAV). Į paruoštą homogenatą dėta 10 μl proteazių inhibitoriaus (Invitrogen, JAV) ir mėgintuvėliai 2 val. inkubuoti leduose ant vartyklės (Biometra GmbH, Vokietija). Po to, mėginiai buvo centrifuguoti šaldomąja centrifuga Heraeus Biofuge Stratos (Thermo Fisher Scientific, JAV) $10\ 000\times\text{g}$, 20 min., $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, o supernatantas perkeltas į sterilų mėgintuvėlį. Baltymų koncentracija tiriamuosiuose mėginiuose nustatyta naudojant Biureto metodą, kaip aprašyta 2.5 poskyryje.

Elektroforezei atlikti buvo pagaminti 5 proc. koncentruojantis ir 8 proc. frakcionuojantis poliakrilamidiniai geliai. Į gelyje suformuotus šulinėlius pilta pakaitinto 15 μl mėginio ir 5 μl užnešimo buferio mišinio. Elektroforezei buvo naudota Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, JAV) elektroforezės sistema. Elektroforezės metu naudotas dažytas molekulinės masės žymuo – Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard (Invitrogen, JAV). Elektroforezė vyko dviem etapais, skirtingomis sąlygomis: 30 min., 50 V, 3 A, 300 W ir 90 min., 200 V, 3 A, 300 W. Baltymų pernašai ant membranos atlikti buvo naudojama „The Novex® Semi-Dry Blotter“ sistema (Invitrogen, JAV). Naudota 45 μm porų dydžio polivinilideno difluorido membrana (PVDF; Roche Diagnostics GmbH, Vokietija). Baltymų pernaša vyko 60 min., šiomis sąlygomis: 20 V, 800 mA, 200 W. Po baltymų pernašos membrana su pirminiais antikūnais prieš TRPM7 (pelės monokloninis antikūnas (žr. 2.3.1 lentelę, Nr. 8)), (1:200–1:500) arba triušio polikloninis antikūnas (žr. 2.3.1 lentelę, Nr. 5), (1:200) arba pelės monokloninis antikūnas (žr. 2.3.1 lentelę, Nr. 9), (1:200)), prieš TRPM6 (triušio polikloninis antikūnas (žr. 2.3.1 lentelę, Nr. 1), (1:200)) ir prieš β -aktiną (pelės monokloninis antikūnas (žr. 2.3.1 lentelę, Nr. 10), (1:1000)), buvo inkubuota $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje per naktį. β -aktinas naudotas kaip citozolio vidinės kontrolės baltymas. Kitą dieną, membrana 1 val. inkubuota su antriniais polikloniniais antikūnais (ožkos prieš pelės IgG (H+L), Horseradish Peroxidase Conjugate (Novus Biologicals, JAV) arba ožkos prieš triušio IgG (H+L), Horseradish Peroxidase Conjugate (Novus Biologicals, JAV)). Nupylus antrinius antikūnus, ant atplautos membranos pilti 1,5 ml Amplex Red. Inkubuota 2 min. ir matuota chemiliuminescencija. Membranos fotografavimui naudota BioSpectrum Imaging System vaizdinimo sistema (UVP, JK) ir VisionWorks®LS software programa. Vertintos tik tos membranų nuotraukos, kuriose naudoti antikūnai (TRPM6, TRPM7 ir β -aktinas) atpažino tiriamuosius baltymus. Atliktuose tyrimuose naudoti

skirtingų gamintojų antikūnai, kad galėtume tiksliau įvertinti gautus rezultatus. Duomenų analizė atlikta su ImageJ (NIH, JAV) programa.

2.7. Histologija

Atliekant histologinę analizę, iš formaline fiksuotų ir parafine įlietų žmogaus širdies raumens audinių paruošti 3 μm storio pjūviai, naudojant Leica RM2235 Manual Rotary mikrotomą (Leica Biosystems, Vokietija), kurie buvo uždėti ant Super Frost plus objektinių stiklelių (Menzel, Vokietija). Paruošti audinių pjūviai džiovinti 60 °C temperatūroje 10 min., deparafinizuoti ir dažyti hematoksilinu-eozinu (HE) arba Pikro rūgšties-Sirijaus raudono (Pikrosirius) dažais. Dažymo procedūra buvo atlikta naudojant Shandon Varistain™ Gemini stiklelių dažymo automatą (Thermo Fisher Scientific, JAV). Po dažymo, audinių pjūviai buvo dengiami stikleliais, naudojant lašelį Shandon Consul-Mount histologinės terpės. Stikleliai su audinių pjūviais buvo analizuojami naudojant Olympus BX61 mikroskopą (Olympus Corporation, Japonija).

2.8. Imunohistochemija

Imunohistocheminė analizė buvo atlikta naudojant širdies preparatus. Iš formaline fiksuotų ir parafine įlietų širdies raumens audinių paruošti 3 μm storio pjūviai, naudojant Leica RM2235 Manual Rotary mikrotomą (Leica Biosystems, Vokietija), kurie buvo uždėti ant Super Frost plus objektinių stiklelių (Menzel, Vokietija). Atliekant imunohistocheminę analizę, audinių deparafinavimas atliktas automatu Shandon Varistain Gemini (Thermo Fisher Scientific, JAV) naudojant standartinę plovimo procedūrą: ksilenu (1 kartą, 5 min. ir 2 kartus po 4 min.; JT Baker, Olandija), 2-propanoliu (1 kartą, 2 min.; Sigma-Aldrich, Vokietija), 96 proc. etanoliu (2 kartus, po 2 min.; Stumbras, Lietuva) ir distiliuotu vandeniu (2 kartus, po 1 min.). Epitopas buvo išskirtas mikrobangų įrenginiu RHS-1 (Milestone Medical, Italija), inkubuojant preparatus TRIS/etilendiamintetraacto rūgšties (EDTA) (pH 9,0) buferyje, 110 °C temperatūroje (8 min.). Po to, imunohistocheminis žymėjimas buvo atliktas naudojant Shandon Coverplate plokšteles.

Po endogeninės peroksidazės blokavimo, audinių pjūviai buvo 1 val. inkubuoti su pirminiais triušio polikloniniais antikūnais prieš TRPM7 (skiedimas 1:250; žr. 2.3.1 lentelę, Nr. 7) arba pirminiais pelės monokloniniais antikūnais prieš TRPM6 (skiedimas 1:50; žr. 2.3.1 lentelę, Nr. 2). Po inkubacijos, audinių pjūviai žymėti naudojant chromogeninę imuninę reakciją. Pirminiais antikūnais prieš TRPM7 žymėti preparatai apdoroti DAKO

EnVision™ Flex, o pirminiais antikūnais prieš TRPM6 žymėti preparatai – DAKO EnVision™ Flex+ vizualizavimo sistema (Agilent Technologies Inc., JAV). Papildomai audinių pjūviai dažyti Majerio hematoksilinu. Po dažymo, audinių pjūviai dengti stikleliais, naudojant lašelį Shandon Consul-Mount histologinės terpės. Storosios žarnos naviko audinio pjūviai naudoti kaip teigiama kontrolė. Neigiamai imunohistocheminio tyrimo kontrolei buvo naudoti tos pačios klasės imunoglobulinai kaip ir pirminis antikūnas: pjūviuose su TRPM7 – triušio IgG izotipo kontrolė (MA5-16384, Invitrogen, JAV), o pjūviuose su TRPM6 – pelės IgG1 kapa monokloninė izotipo kontrolė (ab91353, Abcam, JK).

Paruošti audinių pjūviai, uždėti ant objektinių stiklelių, taip pat buvo žymimi antikūnais, konjuguotais su fluorescencine žyme (fluorescencinė imuninė reakcija). Audinių pjūviai 3 val. inkubuoti triušio polikloniniais antikūnais prieš TRPM7 konjuguotais su Alexa Fluor 488 (skiedimas 1:200; žr. 2.3.1 lentelę, Nr. 6) arba pelės monokloniniais antikūnais prieš TRPM6 konjuguotais su Alexa Fluor 488 (skiedimas 1:50; žr. 2.3.1 lentelę, Nr. 4). Po inkubacijos, ląstelių kontūrai dažyti su kviečių gemalų agliutininu (WGA; angl. *Wheat Germ Agglutinin*) konjuguotu su Alexa Fluor 555 fluorescencine žyme (W32464, Invitrogen, JAV; 5 µg/ml; 15 min.), o branduoliai – su Hoechst 33342 (B2261, Sigma-Aldrich, JAV; 1 µg/ml; 15 min.) dažais. Po žymėjimo objektiniai stikleliai buvo padengti apsauginiu ProLong Gold reagentu (P36934; Molecular Probes, JAV) ir uždengti dengiamaisiais stikleliais, o jų kraštai užlakuoti skaidriu laku.

Histopatologinė paruoštų mėginių analizė buvo atlikta naudojant konfokalinį Olympus FV1000 (Olympus Corporation, Japonija) mikroskopą.

2.9. Fermentinis kardiomiocitų izoliavimas

Tyrimuose naudoti širdies miokardo audiniai buvo patalpinti į mėgintuvėlį su Šv. Tomo kardiopleginiu tirpalu ir transportuoti į laboratoriją (2.9.1 lentelė, I tirpalas).

2.9.1 lentelė. Širdies ląstelių izoliavimui naudotų tirpalų sudėtys

Nr.	Tirpalas	Sudėtis (mM)	
I	Šv. Tomo kardiopleginis (audinių transportavimas)	NaCl 110 KCl 16 CaCl ₂ 1,2	MgCl ₂ 16 D-gliukozė 5 HEPES 10
II	Modifikuotas Tyrode (audinių karpymas)	NaCl 1135 KCl 5,4 MgCl ₂ 0,9 NaH ₂ PO ₄ 0,33	D-gliukozė 10 HEPES 10 BDM 30 EGTA 1
III	Modifikuotas Tyrode (sukarpyto audinio praplovimas)	NaCl 135 KCl 5,4 MgCl ₂ 0,9	NaH ₂ PO ₄ 0,33 D-gliukozė 10 HEPES 10
IV	Modifikuotas Tyrode (I ląstelių išskyrimo etapas)	NaCl 135 KCl 5,4 MgCl ₂ 0,9 NaH ₂ PO ₄ 0,33 D-gliukozė 10	HEPES 10 Proteazė 0,5 mg/ml Kolagenazė 1 mg/ml BSA 5 mg/ml
V	Modifikuotas Tyrode (II ląstelių išskyrimo etapas)	NaCl 135 KCl 5,4 MgCl ₂ 0,9 NaH ₂ PO ₄ 0,33	D-gliukozės 10 HEPES 10 Kolagenazė 1 mg/ml BSA 5 mg/ml
VI	Modifikuotas Tyrode (ląstelių laikymas)	NaCl 135 KCl 5,4 CaCl ₂ 0,18 MgCl ₂ 0,9	NaH ₂ PO ₄ 0,33 D-gliukozės 10 HEPES 10

Po transportavimo širdies audinys perkeltas į deguonimi prisotintą kambario temperatūros (+20 ± 2 °C) Tyrode tirpalą be kalcio (2.9.1 lentelė, II tirpalas), į kurį papildomai buvo įdėta 30 mM 2,3-butandiono monoksimo (BDM; sužadavimo-susitraukimo proceso atskyrejo; Sigma-Aldrich, JAV) ir 100 μM etilenglikoltetraacto rūgšties (EGTA; Ca²⁺-surišejo; Sigma-Aldrich, JAV). Po to, širdies audinys smulkiai sukarpytas (~1 mm³), pašalinant riebalinio ir jungiamojo audinio dalis, jeigu tokių buvo. Smulkūs audinių gabalėliai kelis kartus praplauti su deguonies prisotintu bekalciniu Tyrode tirpalu (2.9.1 lentelė, III tirpalas) ir 5 min. švelniai purtyti termostate-purtytuve (WNB14, Memmert, Vokietija), (+37 ± 0,2 °C), nuolat sotinant 100 proc. deguonimi. Į gautą suspensiją papildomai įdėta 1 mg/ml kolagenazės (215 U/mg, 2 tipo; Worthington Biochemical Corporation, JAV), 0,5 mg/ml proteazės (7–14 U/mg; Sigma-Aldrich, JAV) bei 5 mg/ml 98 proc. BSA (jaučio kraujo serumo albuminas; Sigma-Aldrich, JAV) (2.9.1 lentelė, IV tirpalas). Kolba su širdies audinio suspensija, sotinta 100 proc. deguonimi, įstatyta į +37 ± 0,2 °C vandeninį termostatą-purtytuvą (25–30 min., purtyta ~200 kartų per minutę intensyvu). Po to, nuo sukarpyto audinio buvo

nupiltas tirpalas su fermentais ir užpilta šviežiai paruošto bekalcinio Tyrode tirpalo su 1 mg/ml kolagenazės ir 5 mg/ml BSA (2.9.1 lentelė, V tirpalas). Kolba su audinio suspensija vėl įstatyta į termostatą-purtytuvą (15–20 min., sotinant 100 proc. deguonimi). Šis veiksmas buvo kartojamas 2-3 kartus, kas 5–10 min., šviesiniu mikroskopu tikrinant ląstelių kokybę ir kiekį. Pasiekus didžiausią manoma ląstelių išėigą, audinio suspensija supilta į mėgintuvėlį, o kardiomiocitai, centrifuguojant (1 min., 500–900 apsisukimų per minutę) nusodinti į mėgintuvėlio dugną. Po to, tirpalas atsargiai nupiltas, paliktos nuosėdos su ląstelėmis, kurios užpiltos 3–4 ml Tyrode tirpalo su 0,18 mM Ca^{2+} (2.9.1 lentelė, VI tirpalas). Toliau, gauta kardiomiocitų suspensija buvo laikoma fiziologiniame tirpale (mM: NaCl 135, KCl 5,4, CaCl_2 1,8, MgCl_2 0,9, NaH_2PO_4 0,33, HEPES 10, gliukozė 10, pH7,4) su DV katijonais ir be jų.

2.10. Imunofluorescencija

Kardiomiocitų suspensija buvo išpilstyta į 8 kamerų šulinėlių sistemas (2.10.1 pav.) po 100 μl . Po 15 min. šulinėliuose nusėdusios ląstelės uždengtos perforuotos agarozės lapeliais. Nusiurbus Normal Tyrode tirpalą, šulinėliai su ląstelėmis užpilti kambario temperatūros ($+20 \pm 2$ °C) PBS tirpalu ir plauti po 5 min., 3 kartus. Po to, ląstelės 15 min. fiksuotos 4 proc. paraformaldehido (PFA; angl. *Paraformaldehyde*; Sigma-Aldrich, JAV) tirpalu. Nusiurbus PFA, kardiomiocitai, 3 kartus po 10 min., plauti PBS tirpalu. Po plovimo, ląstelės 4 min. permeabilizuotos 0,1 proc. Triton X-100 (Sigma-Aldrich, JAV). Nusiurbus 0,1 proc. Triton X-100 buvo plauta 3 kartus po 10 min. su PBS tirpalu. Nespecifinis antikūnų rišimasis buvo blokuotas 1 val. naudojant 10 proc. jaučio kraujo serumo tirpalą. Nusiurbus tirpalą, kardiomiocitai buvo inkubuoti su pirminiu triušio polikloniniu antikūnu prieš TRPM6 (žr. 2.3.1 lentelę, Nr. 1) arba pirminiu triušio polikloniniu antikūnu prieš TRPM7 (žr. 2.3.1 lentelę, Nr. 5) 4 °C temperatūroje per naktį. Neigiamos kontrolinės grupės vaizdai gauti inkubuojant ląsteles be pirminio antikūno. Po inkubacijos, ląstelės plautos PBS tirpalu 3 kartus, po 10 min., ir 90 min. inkubuotos su antriniais antikūnais, turinčiais fluorescencinę žymę (asilo prieš triušio IgG (H+L) antikūnas (A21206; Alexa Fluor 488; Invitrogen, JAV; skiedimas 1:200) arba ožkos prieš triušio IgG (H+L) antikūnas (A11035; Alexa Fluor 546; Invitrogen, JAV; skiedimas 1:200)). F-aktino žymėjimui buvo naudojami (Phalloidin-Alexa Fluor® 546; A22283; Invitrogen, JAV; skiedimas 1:100; 30 min; arba Phalloidin-CF™ 405; 00034, Biotium, JAV; skiedimas 1:100; 30 min.) reagentai, o branduolio žymėjimui – Hoechst 33342 (B2261, Sigma-Aldrich, JAV; 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 10 min.) dažai. Po inkubacijos, ląstelės buvo plautos 3 kartus, po 10 min., PBS tirpalu.

Atliktuose tyrimuose, buvo naudoti ir antikūnai, konjuguoti su fluorescencine žyme: pelės monokloninis antikūnas prieš TRPM6 konjuguotas su Alexa Fluor 546 (žr. 2.3.1 lentelę, Nr. 3) ir triušio polikloninis antikūnas prieš TRPM7 konjuguotas su Alexa Fluor 488 (žr. 2.3.1 lentelę, Nr. 6). Atlikus dažymą, perforuotos agarozės lapeliai ir 8 kamerų šulinėlių sistemos buvo nuimti. Stikleliai su ląstelėmis padengti apsauginiu ProLong Gold reagentu (P36934; Molecular Probes, JAV), reikalingu apsaugoti ląsteles nuo išblukimo ir taip prailginti preparatų vizualizacijos laiką. Po to, preparatai uždengti dengiamaisiais stikleliais, o stiklelių kraštai užlakuoti skaidriu laku.

Paruošti preparatai buvo fotografuoti ir analizuoti naudojant lazerinį konfokalinį Olympus FV1000 mikroskopą (Olympus Corporation, Japonija). Gautų ląstelių vaizdų analizė atlikta naudojant kompiuterinę programą Image J.



2.10.1 pav. Schema, vaizduojanti veiksmų seką nuo ląstelių izoliavimo iki vaizdinimo

1 – ląstelių izoliavimas; 2 – izoliuoti kardiomiocitai; 3 – kardiomiocitų suspensijos išpilstymas į 8 kamerų šulinėlių sistemas; 4 – uždengimas perforuotos agarozės lapeliais; 5 – 2 val. arba 12 val. inkubacija su DV / be DV katijonų; 6 – 15 min. inkubacija su blokatoriais (tik tiriant jų poveikį); 7 – fiksavimas; 8 – kiti stiklelio paruošimo etapai (permeabilizacija ir kt.); 9 – inkubacija su antikūnais; 10 – stiklelio paruošimas vaizdinimui ir vaizdinimas.

2.11. Patch-clamp

Srovės registravimui per joninius kanalus naudotas visos ląstelės fiksuotos-įtampos „patch-clamp“ (angl. *whole-cell patch-clamp*) metodas [200], o VP registravimui – „current-clamp“ metodas, naudojant Axopatch 200B stiprintuvą ir pClamp 8.1 programinę įrangą (Axon instruments, JAV). Joninės srovės registruotos kambario temperatūroje, o VP registruoti esant 36 °C temperatūrai, naudojant stiklinius elektrodus (Drummond Scientific Company, JAV), užpildytus viduląsteliniiais tirpalais. Perfuzijai naudotų tirpalų sudėtys pateiktos 2.11.1 lentelėje. TRPM7-panašių joninių srovių registravimui naudoti 2 sek. trukmės „pjūkliniai“ protokolai (angl. „ramps“), pateikiant kas 10 sek. 1 mV trukmės fiksuotos įtampos šuoliukus nuo –120 mV iki +80 mV (kylančioji pjūklo šaka) ir atgal nuo +80 mV iki –120 mV (nusileidžiančioji pjūklo šaka), esant –80 mV palaikančiam potencialui. Pjūklinio protokolo kylančioji šaka skirta inaktyvuoti nuo įtampos

priklausančias Na^+ ir L-tipo Ca^{2+} srovės, o nusileidžiančioji pjūklo šaka skirta TRPM7-panašios srovės registracijai. VP registruoti pateikiant 2 msek. trukmės stačiakampius impulsus, 1 Hz dažniu. VPT buvo matuota esant 30 proc. (VPT_{30}), 50 proc. (VPT_{50}) ir 90 proc. (VPT_{90}) repoliarizacijai. Eksperimentiniai tyrimai buvo atlikti su šviežiai izoliuotomis, ruožuotomis, nepažeistomis miokardo ląstelėmis, kurios buvo tikrinamos ir stebimos naudojant invertuotą Olympus IX71 mikroskopą (Olympus Corporation, Japonija).

2.11.1 lentelė. *Elektrofiziologiniuose tyrimuose naudotų tirpalų joninės sudėtys*

Nr.	Tirpalas	Sudėtis (mM)	
1.	Viduląstelinės perfuzijos tirpalas su Mg^{2+}	KCl 155 MgCl ₂ 5,5 Na ₂ ATF 5	EGTA 1 Na ₂ GTF 0,1 HEPES 5
2.	Viduląstelinės perfuzijos tirpalas be Mg^{2+}	KCl 155 MgCl ₂ 0 Na ₂ ATF 5	EGTA 1 Na ₂ GTF 0,1 HEPES 5
3.	Ekstraląstelinės perfuzijos tirpalas su fiziologine Mg^{2+} koncentracija	NaCl 135 KCl 5,4 MgCl ₂ 0,9 CaCl ₂ 1,8	NaH ₂ PO ₄ 0,33 HEPES 10 D-gliukozė 10
4.	Ekstraląstelinės perfuzijos tirpalas su padidinta Mg^{2+} koncentracija	NaCl 135 KCl 5,4 MgCl ₂ 7,2 CaCl ₂ 1,8	NaH ₂ PO ₄ 0,33 HEPES 10 D-gliukozė 10

2.12. Statistinė analizė

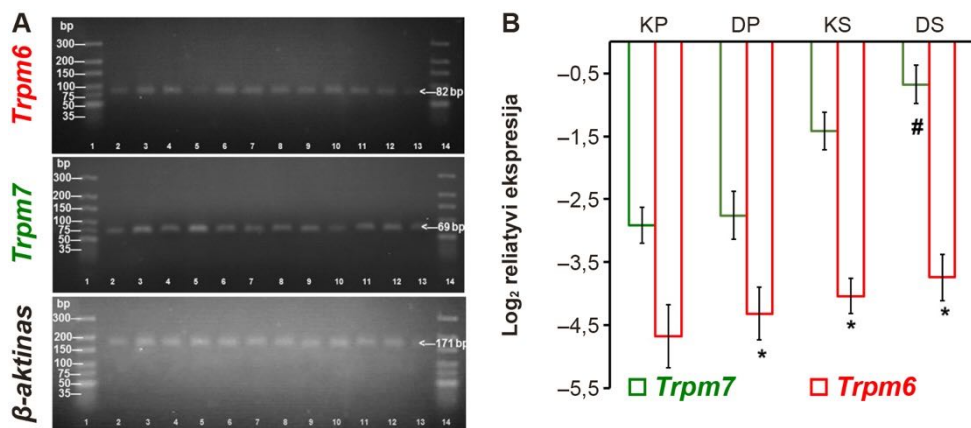
Duomenys pateikti kaip vidurkis \pm standartinė paklaida (SEM). Pateiktas n nurodo ląstelių skaičių. Vidurkiai lyginti taikant porinį t-testą arba ANOVA, siekiant atskleisti skirtumus, atitinkamai, tarp dviejų ar daugiau grupių. Statistiškai patikimi duomenys laikomi, kai $p < 0,05$.

3. REZULTATAI

3.1. Molekuliniai širdies TRPM6 ir TRPM7 kanalų baltymų identifikavimo tyrimai

TRPM6 ir TRPM7 širdies kanalų baltymus (šKB) koduojančių genų raiška žmogaus širdyje yra menkai ištirta. Be to, manoma, kad širdyje *Trpm6* geno iš viso nėra. Dėl šios priežasties, taikant RT-PGR, pirmiausia norėjome nustatyti *Trpm6*, o taip pat ir *Trpm7*, mRNR raišką žmogaus širdies mėginiuose.

Tuo tikslu, buvo atlikti šiems genams specifinės mRNR matavimai keturiose skirtingose širdies dalyse (kairiajame prieširdyje (KP), dešiniajame prieširdyje (DP), kairiajame skilvelyje (KS) ir dešiniajame skilvelyje (DS)), disekuotose iš trijų eksplantuotų širdžių, ŠN sergančių pacientų. *Trpm6* ir *Trpm7* mRNR raiškos lygiui širdies audiniuose nustatyti buvo naudotas RT-PGR metodas ir šiems genams specifiniai pradmenys, sukurti atpažinti žmogaus genus (žr. Metodika, 2.4. poskyris). β -aktinas buvo naudotas atlikti vidinei kontrolei. Pateiktame 3.1.1 pav. matyti, kad *Trpm6*, kaip ir *Trpm7* mRNR raišką galima nustatyti žmogaus širdies audiniuose. Kiekybinės RT-PGR reakcijos produktų kiekis ir specifiškumas vertintas taikant elektroforezės agarozės gelyje metodą (3.1.1 pav. A). Nustatėme, kad tiek *Trpm6*, tiek *Trpm7* genų raiška yra aptinkama visose keturiose širdies dalyse. Taip pat RT-PGR reakcija parodė, kad santykinė *Trpm6* geno raiška (3.1.1 pav. B, raudona spalva) buvo žymiai mažesnė lyginant su *Trpm7* geno raiška (3.1.1 pav. B, žalia spalva). Taip pat nustatyta, kad skilvelinių audinių *Trpm7* mRNR raiška 2–4 kartus didesnė lyginant su prieširdinių audinių raiška. Tiriant *Trpm6* mRNR raišką nebuvo nustatytas statistiškai reikšmingas skirtumas tarp dešinėsios ir kairiosios širdies pusių.



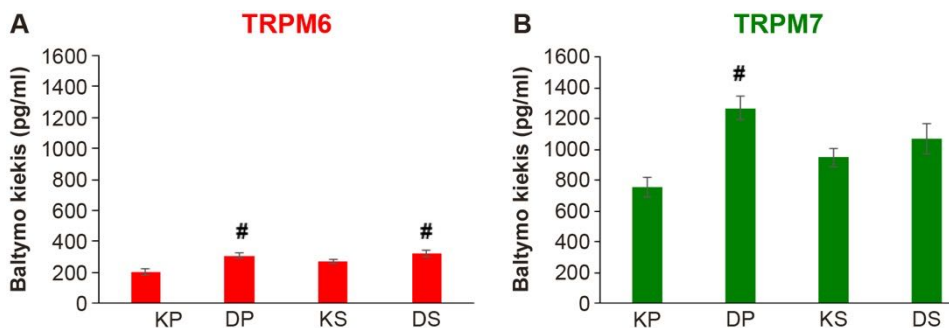
3.1.1 pav. Žmogaus širdies audinių *Trpm6* ir *Trpm7* mRNA raiška

(A) *Trpm6*, *Trpm7* ir β -aktino RT-PGR produktų elektroforegrama: 1 ir 14 takeliai – molekulinės masės žymuo (žr. Metodika, 2.3.2 lentelė, Nr. 8); 2–13 takeliai – 82 bazių porų *Trpm6*, 69 bazių porų *Trpm7* ir 171 bazių porų β -aktino RT-PGR produktai. *Trpm6* ir *Trpm7* mRNA raiška buvo nustatyta keturiuose žmogaus širdies dalyse iš trijų eksplantuotų širdžių mėginių (žr. iš kairės į dešinę): kairiajame prieširdyje (KP; 2–4 takeliai), dešiniajame prieširdyje (DP; 5–7 takeliai), kairiajame skilvelyje (KS; 8–10 takeliai) ir dešiniajame skilvelyje (DS; 11–13 takeliai). (B) Kiekybiniai *Trpm6* ir *Trpm7* mRNA raiškos lygiai, išreikšti santykiniais vienetais (vidurkis \pm SEM). Stulpelinėse diagramose raudona spalva pažymėtas *Trpm6*, žalia – *Trpm7*, (n = 3, kiekvienam). * $p < 0,05$ *Trpm7* lyginant su *Trpm6*; # $p < 0,05$ dešinioji širdies pusė lyginant su kairiaja širdies puse.

Gauti rezultatai leidžia teigti, kad žmogaus širdyje yra tiek TRPM6, tiek TRPM7 šKB koduojantys genai. Be to, pirmą kartą nustatėme, kad *Trpm6*, kaip ir *Trpm7* genų raiška yra aptinkama visose keturiuose žmogaus širdies dalyse.

Nustačius žmogaus širdies TRPM6 ir TRPM7 kanalus koduojančių genų raišką, tolimesniame tyrimų etape siekėme patikrinti gautos informacijos patikimumą, t. y. ar rezultatus būtų galima patvirtinti kitais molekuliniais metodais. Šiam tikslui įgyvendinti buvo pasirinktas ELISA metodas. Naudojant žmogaus širdies audinių homogenatus, buvo atlikta kokybinė ir kiekybinė TRPM6 ir TRPM7 šKB analizė. Iš 3.1.2 pav. pateiktų duomenų matyti, kad TRPM6 ir TRPM7 šKB raiška žmogaus širdies audinių homogenatuose, nustatyta ELISA metodu, buvo aptikta keturiuose žmogaus širdies dalyse. Vėlgi, TRPM7 šKB buvo nustatyta daugiau, negu TRPM6 šKB (3.1.2 pav., A lyginant su B). Taip pat didesni TRPM6 ir TRPM7 šKB kiekiai buvo aptikti dešiniuosiose širdies dalyse ($309,8 \pm 18,51$ pg/ml ir $1269,86 \pm 74,03$ pg/ml (DP); $322,85 \pm 21,23$ pg/ml ir $1070,05 \pm 99,66$ pg/ml (DS), atitinkamai), lyginant su kairiosiomis širdies dalimis ($201,53 \pm 20,18$ pg/ml

ir $754,22 \pm 63,72$ pg/ml (KP); $274,69 \pm 12,05$ pg/ml ir $947,90 \pm 59,50$ pg/ml (KS), atitinkamai).



3.1.2 pav. Kiekybinis žmogaus širdies audinių TRPM6 ir TRPM7 šKB raiškos įvertinimas

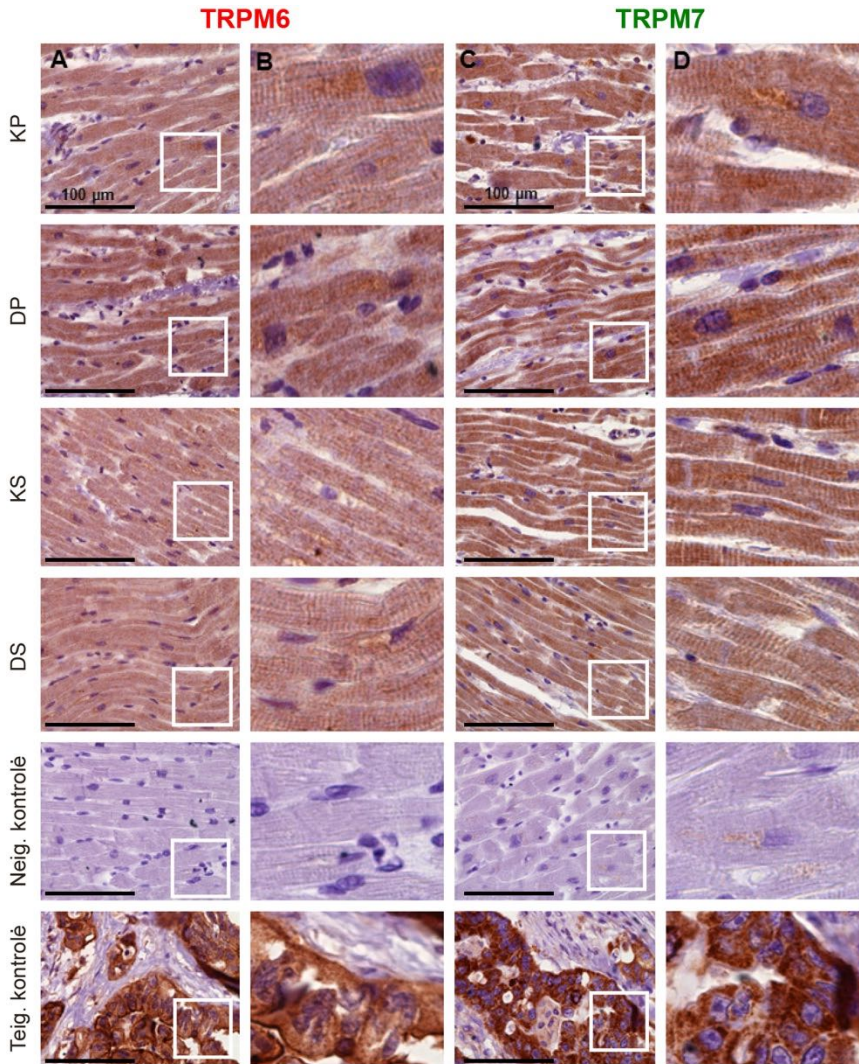
Stulpelinėse diagramose pateikti kiekybiniai keturių žmogaus širdies dalių TRPM6 (A) ir TRPM7 (B) šKB analizės rezultatai ($n = 6-47$), gauti taikant ELISA metodą (žr. Metodika, 2.5 poskyris). KP – kairysis prieširdis; DP – dešinysis prieširdis; KS – kairysis skilvelis; DS – dešinysis skilvelis. Kiekybinės reikšmės (vidurkis \pm SEM) išreikštos pg/ml. # $p < 0,05$ dešinioji širdies pusė lyginant su kairiąja širdies puse.

Gauti tyrimų duomenys patvirtina, kad tiek TRPM6, tiek TRPM7 šKB raiška yra aptinkama visose žmogaus širdies dalyse. TRPM7 šKB raiška buvo didesnė lyginant su TRPM6.

Papildomai, kokybinė TRPM6 ir TRPM7 šKB raiška buvo patvirtinta ir taikant Western Blot tyrimo metodą. Nustatėme, kad šių abiejų šKB raiška yra aptinkama žmogaus širdies audiniuose. Naudojant pirminius antikūnus, atlikti tyrimai parodė, kad TRPM6 šKB yra apie 231 kDa dydžio, o TRPM7 šKB – apie 212 kDa dydžio ($n = 3$, neilustruota). Šių tyrimų metu β -aktinas buvo naudojamas kaip vidinės kontrolės baltymas (apie 42 kDa dydžio).

Be to, ankstesniuose tyrimuose, taikant imunohistocheminį metodą, širdies audinių TRPM6 ir TRPM7 šKB nebuvo nustatyti [23, 201, 202]. Vietoj to, apie galimą TRPM6 ar TRPM7 šKB raišką buvo sprendžiama iš histologinių vaizdų, rodančių fibrozės sukeltus pokyčius užląsteliniame matrikse, aptiktus taikant skirtingas dažymo technikas. Literatūros šaltinių duomenimis, širdies fibroblastuose yra itin didelė TRPM7 raiška ir šių kanalų aktyvavimas yra siejamas su uždegimu, fibroze ir PV [156]. Todėl, tolimesniuose tyrimuose, norint parodyti žmogaus kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB raišką, buvo atliktas imunohistocheminis skilvelių ir prieširdžių mėginių tyrimas, paveikus pirminiais antikūniais prieš TRPM6 ir prieš TRPM7, bei nudažius su Mayer's hematoksilinu (žr. Metodika, 2.8 poskyris). Analizuojant histologinių pjūvių vaizdus buvo matomas rudos spalvos pigmentas, rodantis

TRPM6 ir TRPM7 raišką kardiomiocitų viduje (viduląstelinių organelių membranose). Literatūros šaltinių duomenimis dauguma šių kanalų yra aptinkami smulkių ($\leq 0,25 \mu\text{m}$ diametro) viduląstelinių vezikulių, kuriose gausu glutationo [16] (išskyrus endosomas ir/ar lizosomas), membranose [17]. Iš 3.1.3 pav. matyti, kad TRPM6 ir TRPM7 šKB buvo aptikti visų audinių pjūvių, keturių skirtingų širdies dalių, disektuotų iš eksplantuotų širdžių kontrolinių pacientų (autoįvykių aukos) kardiomiocitų viduląstelinių organelių membranose. Kokybiškai panašūs duomenys buvo gauti ir kitose šiai tyrimų grupei priskirtų pacientų (žr. Metodika, 2.2.2 lentelė) širdies histologinių pjūvių histotopogramose. Gauti rezultatai pirmą kartą patvirtino kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB raišką, kurie vaizdinti žmogaus širdies histologiniuose pjūviuose, taikant chromogeninę imuninę reakciją [203].



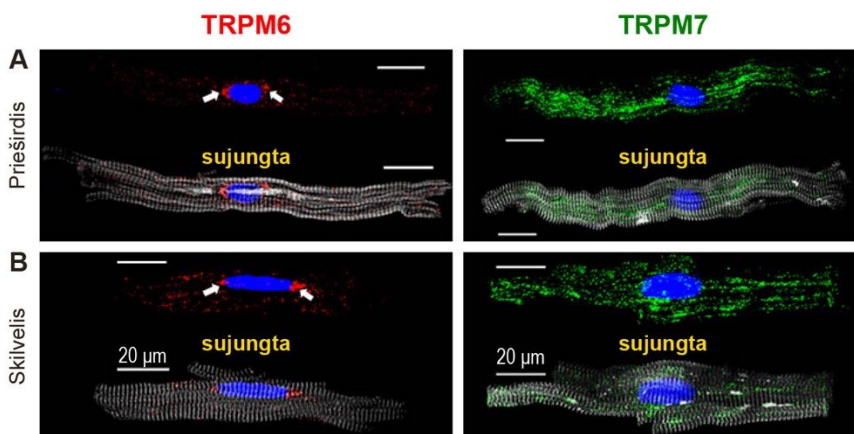
3.1.3 pav. Kontrolinių pacientų kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB raiška

Histologiniai vaizdai, iliustruojantys kontrolinių pacientų (santykinai sveiki asmenys, autoįvykių aukos; žr. Metodika, 2.2.2 lentelė) širdies audinių TRPM6 (A, B) ir TRPM7 (C, D) šKB raišką histologiniuose pjūviuose, taikant chromogeninę imuninę reakciją (žr. Metodika, 2.8 poskyris). Baltu kvadratu pažymėta sritis (A) ir (C) stulpeliuose atitinka didesniu masteliu pateiktus vaizdus (B) ir (D) stulpeliuose, atitinkamai. Rusvos spalvos pigmentai žymi žmogaus širdies audinių ląstelių šKB (x40 padidinimas). Dviejose apatinėse eilutėse pateikta neigiama kontrolė (KS audinys) bei teigiama TRPM6 ir TRPM7 kontrolė (navikinis gaubtinės žarnos audinys). Neigiamai imunohistocheminio tyrimo kontrolei atlikti buvo naudojami tos pačios klasės imunoglobulinai, kaip ir pirminiai antikūnai. KP – kairysis prieširdis; DP – dešinysis prieširdis; KS – kairysis skilvelis; DS – dešinysis skilvelis. Mastelio brūkšnis atitinka 100 μm.

Vis dėlto svarbu paminėti, kad genų aptikimas naudojant RT-PGR ir baltymų nustatymas audinių homogenatuose ELISA metodu, yra šiek tiek mažiau specifiški metodai, lyginant su imuniniu kardiomiocitų žymėjimu, nes tiriant audinių homogenatus, genų ar šKB raiška nustatoma ne tik kardiomiocituose, bet ir kitose širdies audinio ląstelėse (pvz.: fibroblastuose, kraujagyslių endotelio ląstelėse ir kt.). Todėl norėdami pademonstruoti izoliuotų kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB raišką, tolimesniuose tyrimuose naudojome imunofluorescencinį tyrimo metodą.

Tyrimė buvo naudojami prieširdžių ir skilvelių kardiomiocitai, kurie žymėti pirminiais antikūnais prieš TRPM6 ir prieš TRPM7 šKB, praėjus 2 val. arba 12 val. po ląstelių izoliavimo (žr. Metodika, 2.10 poskyris). Neigiama kontrolė buvo atlikta inkubuojant ląsteles be pirminio antikūno ir naudojant TRPM6 ir TRPM7 blokuojančius peptidus. Abiem atvejais, uždėjus antrinius TRPM6 ir TRPM7 antikūnus, nebuvo nustatytas imunofluorescencinis švytėjimas.

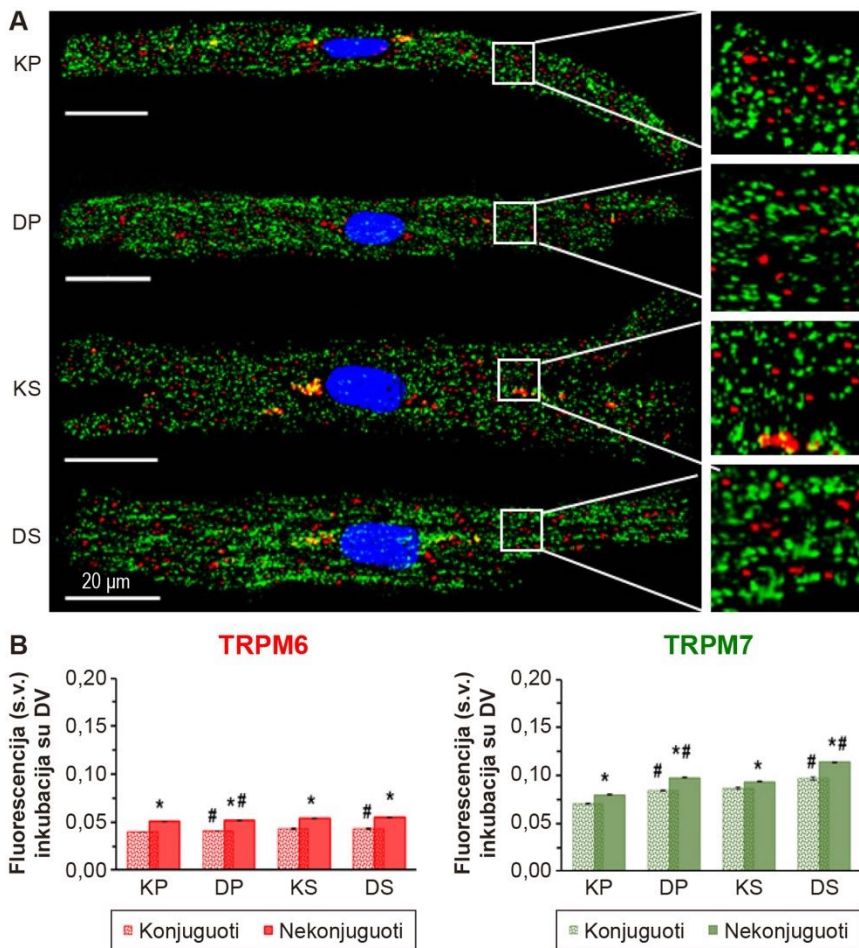
3.1.4 pav. pateikti pavyzdiniai prieširdžio ir skilvelio izoliuotų kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescenciniai vaizdai. Iš 3.1.4 pav. matyti, kad TRPM6 imunofluorescencinio švytėjimo intensyvumas yra mažesnis lyginant su TRPM7. Taip pat buvo pastebėta, kad žmogaus kardiomiocitų žymėto TRPM6 šKB imunofluorescencija, priešingai nei TRPM7 šKB, pasižymėjo didesniu fluorescenciniu intensyvumu perinuklearinėje srityje. Mūsų tyrimų duomenimis tokia TRPM6 šKB lokalizacija buvo nustatyta beveik pusėje ištirtų atvejų (44,7 proc., iš ~400 ląstelių; žr. 3.1.4 pav. A ir B, baltos rodyklės).



3.1.4 pav. Žmogaus kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB raiškos imunofluorescencinis pasiskirstymas

Pavyzdiniai žmogaus prieširdžio (A) ir skilvelio (B) kardiomiocitų vaizdai gauti naudojant pirminius nekonjuguotus antikūnus ir konfokalinį lazerinį mikroskopą Olympus FV1000. TRPM6 ir TRPM7 šKB buvo nustatyti taikant imunofluorescencijos metodą (žr. Metodika, 2.10 poskyris). Galutinis ląstelės vaizdas buvo gautas sujungus 10–12 išilginių ląstelės pjūvių vaizdų. TRPM7 šKB pažymėtas su Alexa Fluor 488 (*žalia spalva*), TRPM6 šKB pažymėtas su Alexa Fluor 546 (*raudona spalva*). F-aktinas pažymėtas su Alexa Fluor 405 (*mėlyna spalva*), kuri buvo dirbtinai pakeista į pilką, ląstelių branduoliai nudažyti su Hoechst 3334 (*mėlyna spalva*). Mastelio brūkšnyis atitinka 20 μm .

Kadangi aukščiau aprašyti tyrimai buvo atlikti naudojant nekonjuguotus antikūnus, mes taip pat patikrinome ar panaši tiriamų TRPM6 ir TRPM7 šKB raiška būtų aptikta naudojant konjuguotus antikūnus, kurie padėtų išvengti galimą žymėjimo nespecifiškumą (3.1.5 pav.). Be to, šie antikūnai leido pademonstruoti abiejų šKB, TRPM6 ir TRPM7, raišką toje pačioje širdies ląstelėje. Rezultatai patvirtina, kad TRPM6 ir TRPM7 šKB yra aptinkami visų keturių širdies dalių kardiomiocituose (3.1.5 pav. A). Lyginant rezultatus, TRPM7 šKB imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumas buvo didesnis negu TRPM6 šKB. Tačiau, kaip parodyta 3.1.5 pav. B ir 3.1.1 lentelėje, kardiomiocitų abiejų šKB imunofluorescencijos intensyvumas buvo šiek tiek mažesnis žymint pirminiais antikūnais konjuguotais su fluorescencine žyme, lyginant su žymėjimu pirminiais antikūnais be fluorescencinės žymės. Taip pat nustatyta, kad dešiniojos širdies pusės žymėtų TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencijos intensyvumas buvo statistiškai patikimai didesnis lyginant su kairiąja širdies puse (3.1.5 pav. B; skaitinės reikšmės pateiktos 3.1.1 lentelėje).



3.1.5 pav. To pačio žmogaus kardiomiocito abiejų TRPM6 ir TRPM7 šKB raiška

(A) Pavyzdiniai žmogaus kardiomiocitų vaizdai, iliustruojantys TRPM6 (raudona spalva) ir TRPM7 (žalia spalva) imunofluorescenciją iš KP, DP, KS ir DS širdies dalių, gauta naudojant pirminius antikūnus konjuguotus su fluorescencine žyme. Baltu kvadratu pažymėta sritis atitinka didesniu masteliu pateiktus vaizdus (dešinėje pusėje). Ląstelių vaizdinimui naudojome lazerinį konfokalinį mikroskopą Olympus FV1000. TRPM7 šKB pažymėtas su Alexa Fluor 488 (žalia spalva), TRPM6 šKB pažymėtas su Alexa fluor 546 (raudona spalva), ląstelių branduoliai nudažyti su Hoechst 3334 (mėlyna spalva). (B) Stulpelinėse diagramose pateikti kiekybiniai TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencinio švytėjimo intensyvumo rezultatai su konjuguotais (margi stulpeliai) ir nekonjuguotais (vienspalviai stulpeliai) pirminiais antikūnais. Gautos reikšmės (vidurkis \pm SEM) išreikštos sutartiniais vienetais (s.v.). KP – kairysis prieširdis; DP – dešinysis prieširdis; KS – kairysis skilvelis; DS – dešinysis skilvelis. * $p < 0,001$ konjuguoti pirminiai antikūnai lyginant su nekonjuguotais pirminiais antikūnais, # $p < 0,001$ dešinioji širdies pusė lyginant su kairiąja širdies puse. Mastelio brūkšnyis atitinka 20 μ m.

3.1.1 lentelė. Izoliuotų žmogaus kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 baltymų raiškos imunofluorescencinio švytėjimo intensyvumo skaitinės reikšmės nustatytos su konjuguotais ir nekonjuguotais antikūnais

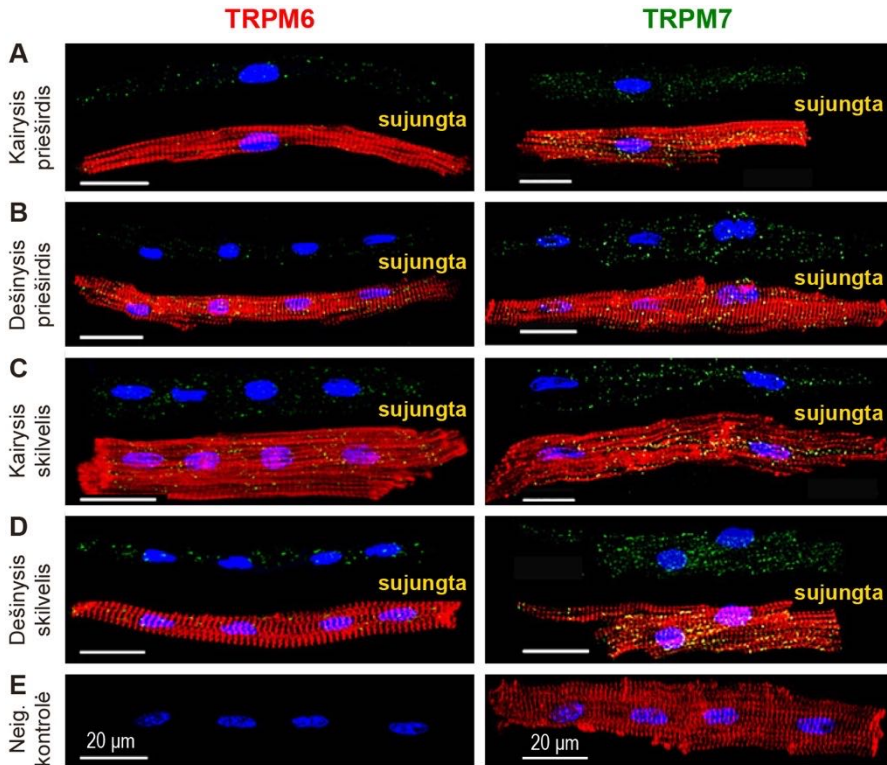
TRPM7	KP	DP	KS	DS
Konj. Ak	0,0706 ± 0,0004 n = 7	0,0840 ± 0,0004# n = 21	0,0866 ± 0,0008 n = 4	0,0972 ± 0,0017# n = 7
Nekonj. Ak	0,0796 ± 0,0005* n = 100	0,0978 ± 0,0005*# n = 100	0,093 ± 0,0005* n = 51	0,1137 ± 0,0007*# n = 27
TRPM6				
Konj. Ak	0,0371 ± 0,0005 n = 7	0,0424 ± 0,0001# n = 21	0,0451 ± 0,0004 n = 4	0,0479 ± 0,0003# n = 7
Nekonj. Ak	0,0504 ± 0,0003* n = 92	0,0519 ± 0,0003*# n = 105	0,0541 ± 0,0006* n = 65	0,0553 ± 0,0005* n = 43

Kardiomiocitai 2 val. buvo inkubuojami fiziologiniame tirpale su DV katijonais. Konj. Ak – pirminiai antikūnai konjuguoti su fluorescencine žyme; Nekonj. Ak – nekonjuguoti antikūnai (pirminiai antikūnai be fluorescencinės žymės); KP – kairysis prieširdis, DP – dešinysis prieširdis, KS – kairysis skilvelis, DS – dešinysis prieširdis; DV – divalenciai katijonai; n – ląstelių skaičius; * $p < 0,001$ konjuguoti antikūnai lyginant su nekonjuguotais antikūnais; # $p < 0,05$ dešinioji širdies pusė lyginant su kairiąja širdies puse. Skaitinės reikšmės (vidurkis ± SEM) pateiktos sutartiniais vienetais (s.v.).

Taigi, mūsų gauti rezultatai pirmą kartą patvirtino, kad žmogaus širdyje tikrai yra TRPM6 šKB. Tyrimo metu buvo aptikta tiek izoliuotų kardiomiocitų, tiek audinių TRPM6 raiška. Mes taip pat pirmą kartą nustatėme visų keturių žmogaus širdies dalių kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB raišką [203].

Tolimesnėje eksperimentų serijoje siekėme nustatyti, ar eksperimentinių gyvūnų, kurie yra sąlyginai jauni ir sveiki, širdies kardiomiocituose/audiniuose taip pat yra TRPM6 šKB. Šiems tyrimams buvo pasirinkti kiaulės širdies mėginiai, t. y. gyvūno, kurio širdies ir kraujagyslių sistema [204] bei genetinė sudėtis [205] yra artima žmogaus genomui. Šiuo metu, nėra jokių publikuotų duomenų apie kiaulės kardiomiocitų TRPM7 ir, ypač, apie TRPM6 šKB raišką (žr. Rezultatų aptarimas, 4.1 poskyris). Todėl siekėme nustatyti ir įvertinti ar kiaulės širdyje yra TRPM6 šKB ir/ar tiriamų šKB raiška yra panaši, kaip pataloginėmis sąlygomis.

Analogiškai, kaip ir tyrimuose su žmogaus kardiomiocitais, naudojome abiejų prieširdžių ir skilvelių kardiomiocitus. Be to, šKB žymėjimui naudojome tuos pačius antikūnus (žr. Metodika, 2.3.1 lentelė), kadangi rinkoje nėra jokių TRPM6 šKB specifiskų antikūnų, skirtų minėto baltymo identifikacijai kiaulės širdies ląstelėse ir/ar audiniuose (žr. Tyrimo trūkumai). 3.1.6 pav. (A, D) pateikti kiaulės širdies prieširdžių ir skilvelių kardiomiocitų imunofluorescenciniai TRPM6 ir TRPM7 vaizdai.



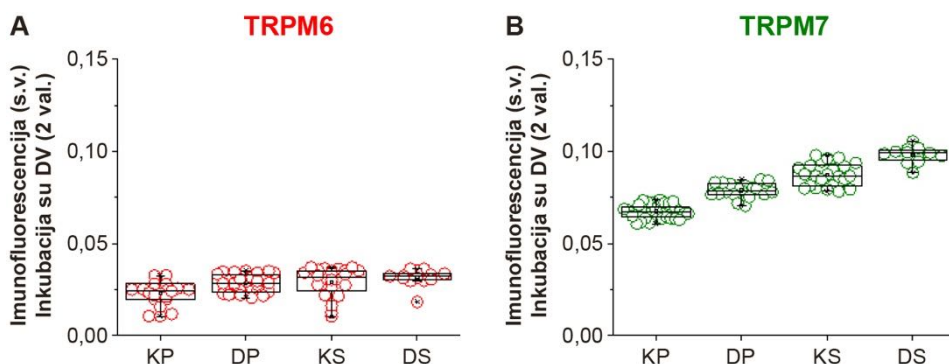
3.1.6 pav. Kiaulės kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB raiškos imunofluorescencinis pasiskirstymas

Pavyzdiniai kiaulės kardiomiocitų vaizdai iliustruojantys kairiojo prieširdžio, dešiniojo prieširdžio, kairiojo skilvelio ir dešiniojo skilvelio kardiomiocitų TRPM6 (*kairėje*) ir TRPM7 (*dešinėje*) šKB raišką, taikant imunofluorescencijos tyrimo metodą (žr. Metodika, 2.10 poskyris). TRPM6 ir TRPM7 šKB žymėti su Alexa Fluor 488 (*žalia spalva*). F-aktino ir branduolų vaizdinimui atitinkamai naudoti Alexa Fluor 546 (*raudona spalva*) ir Hoechst 33342 (*mėlyna spalva*) dažai. Ląstelės vaizdintos naudojant konfokalinį lazerinį mikroskopą Olympus FV1000. E dalyje pateiktas neigiamos kontrolės pavyzdys (inkubacija be pirminių antikūnų). Mastelio brūkšnys atitinka 20 μm.

Iš pateiktų pavyzdžių matyti, kad abu tiriami baltymai yra kiaulės širdies visų keturių dalių kardiomiocituose, tačiau aptikta TRPM6 šKB raiška buvo žymiai mažesnė lyginant su jų raiška žmogaus kardiomiocituose. Įdomu tai, kad skirtingai nei žmogaus kardiomiocituose, buvo stebimos daugiabranduolės širdies ląstelės, kaip anksčiau aprašyta kitų autorių darbuose [206]. Vis dėlto, priešingai nei tiriant žmogaus kardiomiocitų TRPM6 šKB, mes nepastebėjome šio baltymo fluorescencinio švytėjimo intensyvumo padidėjimo kiaulės kardiomiocitų perinuklearinėje srityje, galbūt todėl, kad šio kiaulės širdies baltymo raiška yra itin maža.

Siekiant įsitikinti, kad naudojami antikūnai tikrai pažymėjo tik TRPM6 ar tik TRPM7 šKB, buvo atliekami dvigubos neigiamos kontrolės tyrimai. Šių tyrimų metu kardiomiocitai buvo inkubuojami arba be pirminio antikūno (3.1.6 pav. E), tai leido įvertinti antrinio antikūno specifiškumą, arba į kardiomiocitų suspensiją buvo įdedami specifiniai blokuojantys peptidai, kurie inhibuoja pirminių antikūnų prieš TRPM6 ir prieš TRPM7 jungimąsi (žr. 3.2.4 pav. G, H). Šie tyrimai patvirtino, kad abiem atvejais nebuvo nustatytas kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencinis švytėjimas, kai baltymai nebuvo žymėti pirminiais antikūnais, ar kai jie buvo blokuojami su specifiniais peptidais.

3.1.7 pav. pateikti kiaulės prieširdžių ir skilvelių ląstelių TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumo analizės rezultatai. Akivaizdu, kad kiaulės kardiomiocitų TRPM6 šKB imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumas, kaip ir žmogaus kardiomiocitų, yra apie tris kartus mažesnis lyginant su TRPM7 šKB (3.1.7 pav; 3.2.2 lentelė). Tačiau tarp skirtingų širdies dalių, nebuvo nustatytas statistiškai patikimas imunofluorescencinio švytėjimo intensyvumo skirtumas.



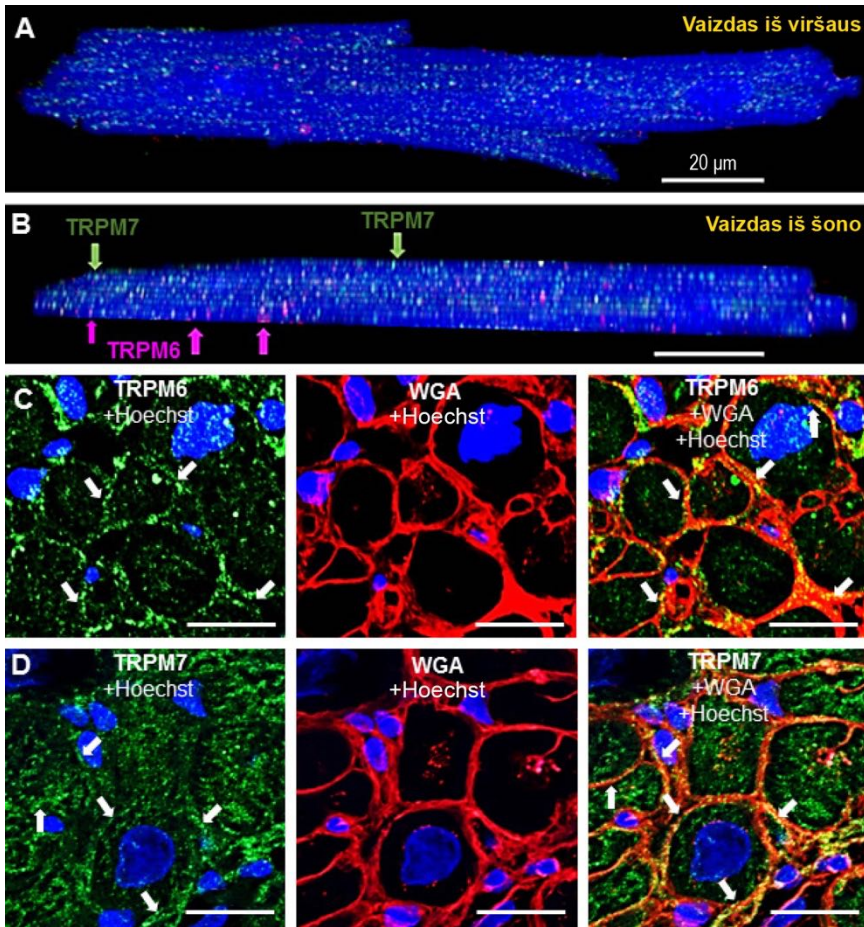
3.1.7 pav. Kiekybinis kiaulės kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencijos intensyvumo įvertinimas

Kiekybinis KP, DP, KS ir DS kardiomiocitų TRPM6 (A) ir TRPM7 (B) šKB įvertinimas naudojant imunofluorescencijos tyrimo metodą (žr. Metodika, 2.10 poskyris); TRPM6 (raudona spalva) ir TRPM7 (žalia spalva). KP – kairysis prieširdis; DP – dešinysis prieširdis; KS – kairysis skilvelis; DS – dešinysis skilvelis. Kiekybinės reikšmės (vidurkis ± SEM) pateiktos sutartiniais vienetais (s.v.).

Taip pat siekėme nustatyti, kur tiriami šKB yra lokalizuoti. Jau anksčiau parodėme [203], kad tiek žmogaus, tiek kiaulės kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB pasiskirstymas yra nehomogeniškas. Vis dėlto, nebuvo nustatyta ar jie yra ir plazminėje kardiomiocitų membranoje, ar tik viduląstelių organelių membranose. Kitų autorių publikuoti darbai yra priešaringi. Tiriant PC12

linijinių ir HEK293 ląstelių TRPM7-HA buvo pademonstruota, kad tik maža dalis TRPM7 kanalų yra plazminėje membranoje. Dauguma šių kanalų yra aptinkami smulkių ($\leq 0,25 \mu\text{m}$ diametro) viduląstelių vezikuliu, kuriose gausu glutationo [16] (išskyrus endosomas ir/ar lizosomas), membranose [17]. Taip pat teigiama, kad šiose vezikulėse TRPM7 „koordinuoja“ (angl. *coordinate*) Zn^{2+} ir ROS tiek vystymosi, tiek pažeidimų metu [16]. Tačiau, tiriant įvairių gyvūnų skilvelines ląsteles (nepublikuoti K. Mubagwa' mokslinės grupės duomenys, Leuveno universitetas, Belgija), buvo nustatyta, kad eksperimentinių gyvūnų kardiomiocitų TRPM7 kanalai didžiaja dalimi yra netolygiai pasiskirstę plazminėje membranoje, bet intensyvesnės imunofluorescencijos smailės atsiranda tuose pačiuose taškuose, kaip F-aktino signalo smailės Z-diskų vietoje. Visgi mūsų tyrimais nebuvo nustatyta didesnė TRPM7 baltymo sankaupa ląstelių galuose, kaip buvo pastebėta minėtoje laboratorijoje. Pastarasis reiškinys galbūt gali būti paaiškintas tuo, kad minėtoje laboratorijoje ir mūsų tyrimuose citoskeleto žymėjimui buvo naudojami F-aktino žymenys sujungti su skirtingu fluoroforu. Minėtoje laboratorijoje, tiek TRPM7 baltymo, tiek F-aktino žymėjimui buvo naudotos tos pačios (žalios) spalvos fluoroforas. Tuo tarpu mūsų tyrimuose naudojome F-aktiną su raudona fluorescencine žyme (Alexa Fluor 546), o TRPM7 baltymui naudojome antikūnus sujungtus su žalia fluorescencine žyme (Alexa Fluor 488). Tai padėjo nustatyti, kad kai kurių ląstelių galuose buvo padidėjęs F-aktino fluorescencijos intensyvumas (žr. aukščiau, 3.1.6 pav.), bet tose vietose neaptikome TRPM7 baltymo imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumo padidėjimo. Tuo tarpu, literatūros šaltiniuose visai nėra duomenų apie TRPM6 šKB raišką ir jo lokalizaciją širdies miocitų ląstelėse.

3.1.8 pav. pateiktas žmogaus DP izoliuoto kardiomiocito 3D vaizdas (A ir B) naudojant konjuguotus antikūnus prieš TRPM6 (*raudona spalva*) ir prieš TRPM7 (*žalia spalva*) toje pačioje ląstelėje ir žmogaus DP audinio histologiniai skerspjūvių vaizdai (C ir D), naudojant nekonjuguotus antikūnus prieš TRPM6 ir prieš TRPM7 (*žalia spalva*). Fluorescencinės mikroskopijos nuotraukose matyti netolygus TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencinio švytėjimo pasiskirstymas tiek širdies miocitų viduje (žali/rausvi taškai viduląstelių organelių membranose), tiek plazminėje membranoje (*parodyta rodyklėmis*). Taip pat matyti, kad didžioji jų dalis yra kardiomiocitų viduje. Šie tyrimai patvirtina, kad širdies miocitų abiejų, TRPM6 ir TRPM7, baltymų raiška yra aptinkama išorinėje ir viduląstelinėse membranose.



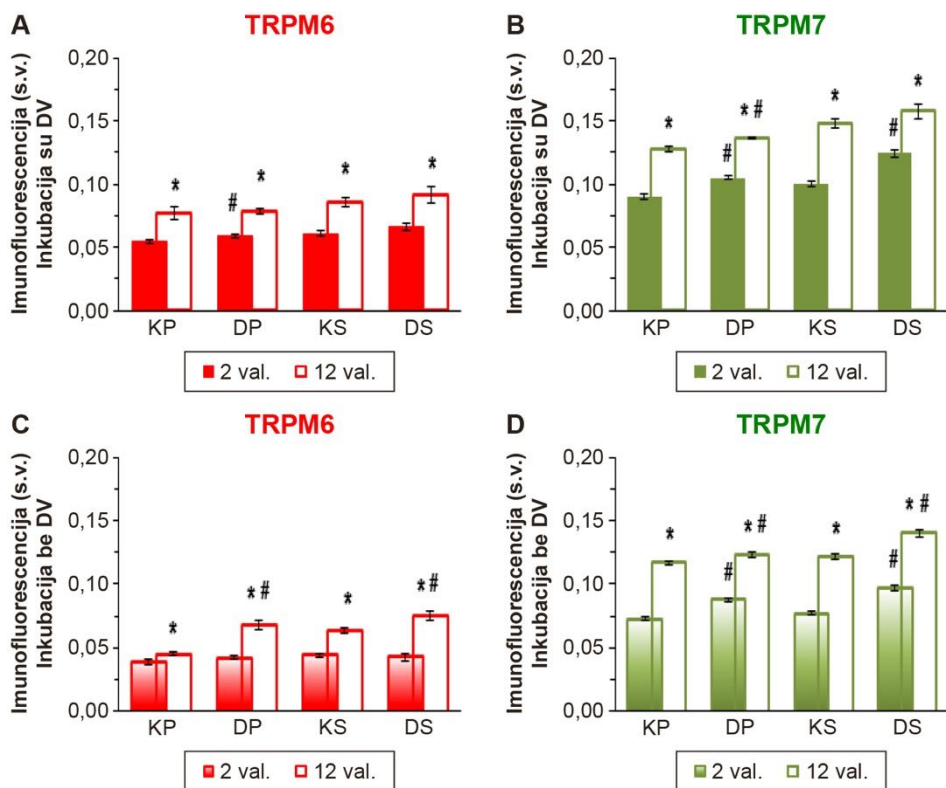
3.1.8 pav. Kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB lokalizacijos vaizdinimas

Pavyzdinis žmogaus DP kardiomiocito 3D vaizdas matomas iš viršaus (A) ir ląstelės pjūvio vaizdas iš šono (B). TRPM6 ir TRPM7 šKB vaizdinimui toje pačioje ląstelėje buvo naudojami antikūnai konjuguoti su skirtinga fluorescencine žyme (žr. Metodika, 2.8 poskyris). Alexa Fluor 546 (*raudona spalva*) naudotas TRPM6 šKB žymėjimui, Alexa Fluor 488 (*žalia spalva*) naudotas TRPM7 šKB žymėjimui, Alexa Fluor 405 (*mėlyna spalva*) naudotas F-aktino vaizdinimui. TRPM6 ir TRPM7 imunofluorescencinis švytėjimas buvo nustatytas plazminėje membranoje (*parodyta rodyklėmis*) ir viduląstelių organelių membranose (*žalia ir rausva spalva*). (C, D) Histologiniai vaizdai iliustruojantys žmogaus dešiniojo prieširdžio kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB raišką, naudojant imunohistocheminį dažymo būdą su fluorescencinėmis žymėmis (žr. Metodika, 2.8 poskyris). Alexa Fluor 488 (*žalia spalva*) naudotas TRPM6 ir TRPM7 šKB žymėjimui, Alexa Fluor 555 (*raudona spalva*) naudotas ląstelių membranų žymėjimui su WGA ir Hoechst 33342 naudotas branduolių dažymui (*mėlyna spalva*). Žalios spalvos pigmentai rodo TRPM6 ir TRPM7 šKB raišką plazminėje membranoje (*baltos spalvos rodyklės*) ir viduląstelių organelių membranose. Kardiomiocitų vaizdinimas buvo atliekamas konfokaliniu Olympus FV1000 mikroskopu. Izoliuotų kardiomiocitų ir histologinių pjūvių vaizdai atitinkamai gauti su x60 ir x20 mikroskopo objektyvu. Mastelio brūkšnyas atitinka 20 μm .

Apibendrinant pirmosios tyrimų dalies rezultatus galime teigti, kad mūsų gauti rezultatai pirmą kartą patvirtino žmogaus ir kiaulės kardiomiocitų TRPM6 šKB raišką, kuri yra kelis kartus mažesnė nei TRPM7 raiška. Mes taip pat pirmą kartą nustatėme tiek žmogaus, tiek kiaulės visų keturių širdies dalių kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 kanalų baltymų raišką. Dešinėsios širdies dalies šKB raiška buvo didesnė lyginant su kairiosiomis širdies dalimis. Tai, kad daugiau šių šKB yra ne išorinėje kardiomiocito membranoje, bet viduląstelinųjų organelių membranose, galimai rodo, kad abu kanalai veikia kaip viduląsteliniai kanalai.

3.2. TRPM6 ir TRPM7 kanalų baltymų raiškos moduliacijos tyrimai

Literatūros šaltinių duomenimis, TRPM6 ir TRPM7 kanalai dalyvauja Mg^{2+} ir kitų DV katijonų homeostazėje, o jų aktyvumas yra valdomas Ca^{2+} ir Mg^{2+} [75–77]. Todėl tolimesnėje eksperimentų serijoje siekėme įvertinti ar šių DV katijonų pašalinimas iš *Tyrode* fiziologinio tirpalo galėtų keisti TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumą. Tuo tikslu, kardiomiocitų suspensija buvo inkubuojama 2 val. ir 12 val. *Tyrode* tirpale (toliau, su DV) ir modifikuotame *Tyrode* tirpale iš kurio buvo pašalinti DV katijonai (toliau, be DV). Kaip pademonstruota 3.2.1 pav., kardiomiocitų šKB imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumas buvo didesnis inkubuojant su DV katijonais (tiek po 2 val., tiek po 12 val.), lyginant su inkubacija be DV katijonų (tiek po 2 val., tiek po 12 val.). Kiekybiniai šių tyrimų rezultatai pateikti 3.2.1 lentelėje.



3.2.1 pav. Dvivalenčių katijonų poveikis žmogaus kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumui

Stulpelinėse diagramose pateikti kiekybiniai kardiomiocitų TRPM6 (raudona spalva) ir TRPM7 (žalia spalva) šKB fluorescencijos rezultatai, kai buvo inkubuojama 2 val. (užpildyti stulpeliai) arba 12 val. (neužpildyti stulpeliai) terpėje su DV katijonais (A, B) ir be DV katijonų (C, D). KP – kairysis prieširdis; DP – dešinysis prieširdis; KS – kairysis skilvelis; DS – dešinysis skilvelis. Pastaba: fluorescencijos intensyvumas buvo nustatytas taikant „aklą“ tyrimo vertinimą (matuojant fluorescenciją nebuvo žinomos kardiomiocitų inkubavimo sąlygos). * $p < 0,05$ 2 val. lyginant su 12 val. ir # $p < 0,05$ dešinioji širdies pusė lyginant su kairiąja širdies puse. Kiekybinės reikšmės (vidurkis \pm SEM) pateiktos sutartiniais vienetais (s.v.).

3.2.1 lentelė. Divalentinių katijonų poveikio žmogaus izoliuotų kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumo skaitinės reikšmės

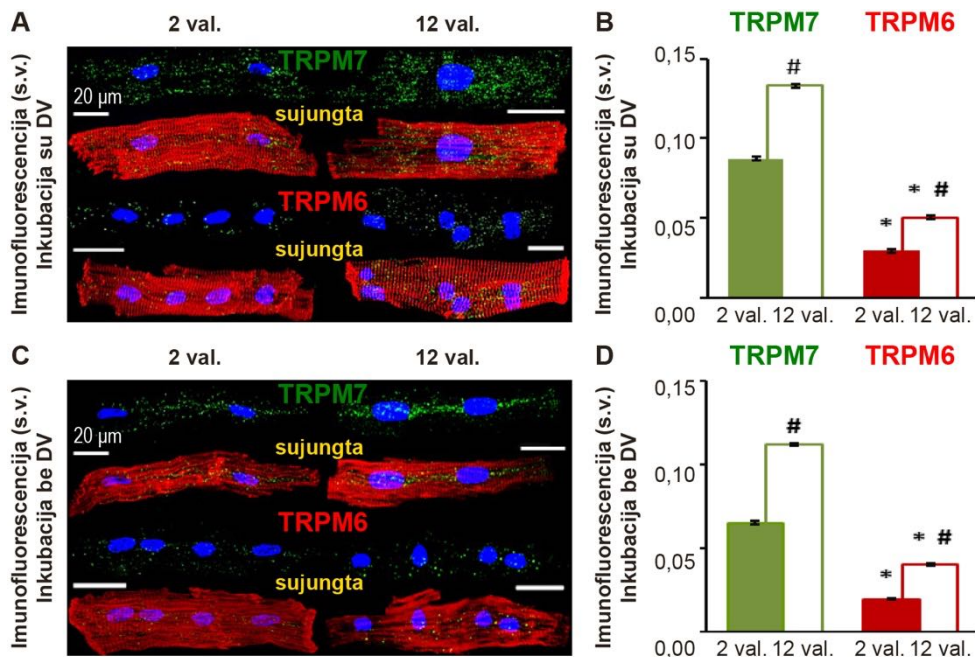
TRPM6	KP	DP	KS	DS
su DV, 2 val.	0,0541 ± 0,0012 n = 101	0,0590 ± 0,0015# n = 124	0,0610 ± 0,0019 n = 77	0,0666 ± 0,0029 n = 55
su DV, 12 val.	0,0771 ± 0,0054* n = 26	0,0787 ± 0,0018* n = 65	0,0859 ± 0,0038* n = 35	0,0917 ± 0,0063* n = 19
TRPM7				
su DV, 2 val.	0,0900 ± 0,0019 n = 125	0,1046 ± 0,0015# n = 120	0,0997 ± 0,0023 n = 58	0,1244 ± 0,0027# n = 39
su DV, 12 val.	0,1275 ± 0,0020* n = 36	0,1365 ± 0,0012*# n = 65	0,1481 ± 0,0032* n = 24	0,1577 ± 0,0058* n = 13
TRPM6				
be DV, 2 val.	0,0387 ± 0,0024 n = 37	0,0421 ± 0,0014 n = 119	0,0442 ± 0,0019 n = 76	0,0430 ± 0,0033 n = 24
be DV, 12 val.	0,0454 ± 0,0016 † n = 69	0,0683 ± 0,0033*# n = 70	0,0631 ± 0,0021* n = 61	0,075 ± 0,0036*# n = 37
TRPM7				
be DV, 2 val.	0,0727 ± 0,0013 n = 68	0,0879 ± 0,0011 # n = 125	0,0772 ± 0,0017 n = 57	0,0975 ± 0,0024 # n = 25
be DV, 12 val.	0,1170 ± 0,0014* n = 60	0,1237 ± 0,0023*# n = 36	0,1215 ± 0,0019* n = 35	0,140 ± 0,0026*# n = 34

KP – kairysis prieširdis, DP – dešinysis prieširdis, KS – kairysis skilvelis, DS – dešinysis skilvelis; DV – divalentiniai katijonai; n – ląstelių skaičius; * $p < 0,001$ ir † $p < 0,05$ 2 val. lyginant su 12 val.; # $p < 0,05$ dešinioji širdies pusė lyginant su kairiąja širdies puse. Skaitinės reikšmės (vidurkis ± SEM) pateiktos sutartiniais vienetais (s.v.).

Gautą informaciją apie DV katijonų poveikį žmogaus kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 imunofluorescencijos signalui taip pat palyginome su patologinių sąlygų nepaveiktų kardiomiocitų fluorescencijos duomenimis. Tuo tikslu buvo atlikta tokia pati eksperimentų serija su kiaulės kardiomiocitais. Kokybinė ir kiekybinė TRPM6 ir TRPM7 šKB analizė analogiškai buvo atlikta po 2 val. ir po 12 val. po ląstelių izoliavimo.

Kaip parodyta 3.2.2 pav., po 12 val. inkubacijos fiziologiniame tirpale su DV katijonais ar be jų, kiaulės KS kardiomiocitų žymėtų TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencinio signalo intensyvumas statistškai patikimai padidėjo. TRPM6 fluorescencija padidėjo nuo $0,029 \pm 0,0015$ s.v. iki $0,050 \pm 0,0012$ s.v. ($n = 3-24$, $p < 0,001$) ir nuo $0,020 \pm 0,0006$ s.v. iki $0,040 \pm 0,0009$ s.v. ($n = 7-21$, $p < 0,001$) terpėje su/be DV katijonų, atitinkamai. Žymėto

TRPM7 imunofluorescencija padidėjo nuo $0,087 \pm 0,0013$ s.v. iki $0,133 \pm 0,0011$ s.v. ($n = 3-23$, $p < 0,001$) ir nuo $0,065 \pm 0,0009$ s.v. iki $0,112 \pm 0,0006$ s.v. ($n = 4-25$, $p < 0,001$) terpėje su/be DV katijonų, atitinkamai. Kokybiškai panašūs tyrimų rezultatai buvo gauti kiaulės širdies visų keturių dalių kardiomiocituose ir po 2 val. inkubacijos su/be DV katijonų (3.2.2 lentelė).



3.2.2 pav. Dvivalenčių katijonų poveikis kiaulės kairiojo skilvelio kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumui

Pavyzdiniai kiaulės KS kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM šKB raiškos vaizdai (A, C) ir imunofluorescencinio signalo kiekybinės reikšmės (B, D), nustatytos po 2 val. (*užpildyti stulpeliai*) ir po 12 val. (*neužpildyti stulpeliai*) inkubuojant su DV katijonais (A, B) ir be DV katijonų (C, D). TRPM6 ir TRPM7 šKB pažymėti su Alexa Fluor 488 (*žalia spalva*), F-aktinas pažymėtas su Alexa Fluor 546 (*raudona spalva*) ir branduoliai nudažyti su Hoechst 33342 (*mėlyna spalva*). Ląstelės vaizdintos naudojant konfokalinį lazerinį mikroskopą Olympus FV1000. * $p < 0,001$ TRPM6 lyginant su TRPM7; # $p < 0,001$ 12 val. lyginant su 2 val. šKB fluorescencijos intensyvumas (vidurkis \pm SEM) išreikštas sutartiniais vienetais (s.v.). Mastelio brūkšnyis atitinka 20 μ m.

3.2.2 lentelė. Dvivalenčių katijonų poveikio (po 2 val. inkubacijos) kiaulės izoliuotų kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumo skaitinės reikšmės

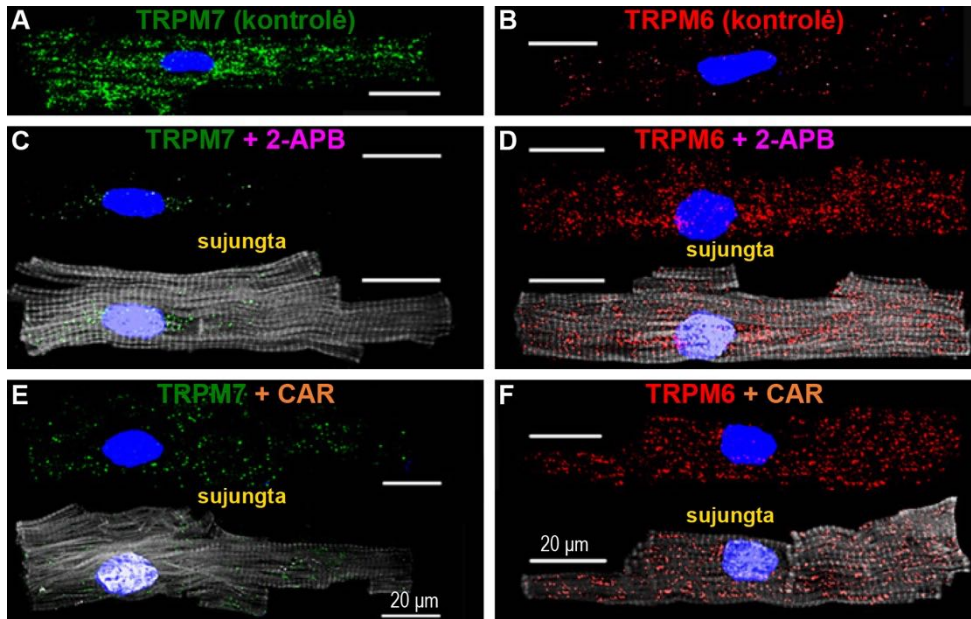
Širdies dalis	TRPM6		TRPM7	
	su DV	be DV	su DV	be DV
KP	0,023 ± 0,0013* n = 18	0,016 ± 0,0014** n = 20	0,067 ± 0,0006 n = 37	0,053 ± 0,0009# n = 13
DP	0,029 ± 0,0008* n = 32	0,018 ± 0,0011** n = 4	0,079 ± 0,0009 n = 21	0,059 ± 0,0010# n = 5
KS	0,029 ± 0,0015* n = 24	0,020 ± 0,0006** n = 21	0,087 ± 0,0013 n = 23	0,065 ± 0,0009# n = 25
DS	0,032 ± 0,0012* n = 14	0,025 ± 0,0020** n = 3	0,098 ± 0,0013 n = 12	0,076 ± 0,0016# n = 5

KP – kairysis prieširdis, DP – dešinysis prieširdis, KS – kairysis skilvelis, DS – dešinysis skilvelis; su/be DV – fiziologinis tirpalas su dvivalenčiais katijonais ir be šių katijonų, atitinkamai; n – ląstelių skaičius; * $p < 0,001$ – TRPM6 lyginant su TRPM7; # $p < 0,001$ – su DV lyginant su be DV. Skaitinės reikšmės (vidurkis ± SEM) pateiktos sutartiniais vienetais (s.v.).

Apibendrinant galime teigti, kad tiek TRPM6, tiek TRPM7 šKB imunofluorescencinio signalo intensyvumą nulemia terpės joninė sudėtis ląstelių inkubacijos metu. Be to, užregistruotos fluorescencinio signalo reikšmės buvo statistiškai patikimai didesnės po 12 val. lyginant su inkubacijos sąlygomis po 2 val.

Kitame tyrimų etape siekėme patikrinti ar farmakologinės medžiagos, tokios kaip TRP kanalų blokatoriai, moduliuojantys TRPM6 ir TRPM7 kanalų elektrofiziologines savybes [11], gali turėti panašų poveikį ir TRPM6 bei TRPM7 šKB imunofluorescencijos signalo intensyvumui. Tuo tikslu, žmogaus kardiomiocitai po 2 val. ir po 12 val. inkubacijos skirtingose terpėse (su DV ir be DV katijonų) toliau buvo 15 min. laikomi inkubacinėje terpėje papildytoje su 2-APB (500 μM) ar CAR (100 μM) (žr. Metodika, 2.10.1 pav.). 3.2.3 pav. pateikti pavyzdiniai kardiomiocitų TRPM7 (*žalia spalva*) ir TRPM6 (*raudona spalva*) šKB imunofluorescenciniai vaizdai kontrolinėmis sąlygomis (A, B), po inkubacijos su 2-APB (C, D) ir po inkubacijos su CAR (E, F). Iš gautų konfokalinių nuotraukų (3.2.3 pav.) matyti, kad kontrolinėmis sąlygomis žymėto TRPM7 šKB imunofluorescencinis signalas, kaip ir tikėtasi, buvo žymiai didesnis, lyginant su žymėto TRPM6 šKB imunofluorescencinio signalo intensyvumu. Tačiau po inkubacijos su 2-APB ar su CAR buvo stebimas priešingas žymėtų TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencinio signalo švytėjimo intensyvumo pokytis. TRPM7 šKB imunofluorescencinio švytėjimo intensyvumas abiejų

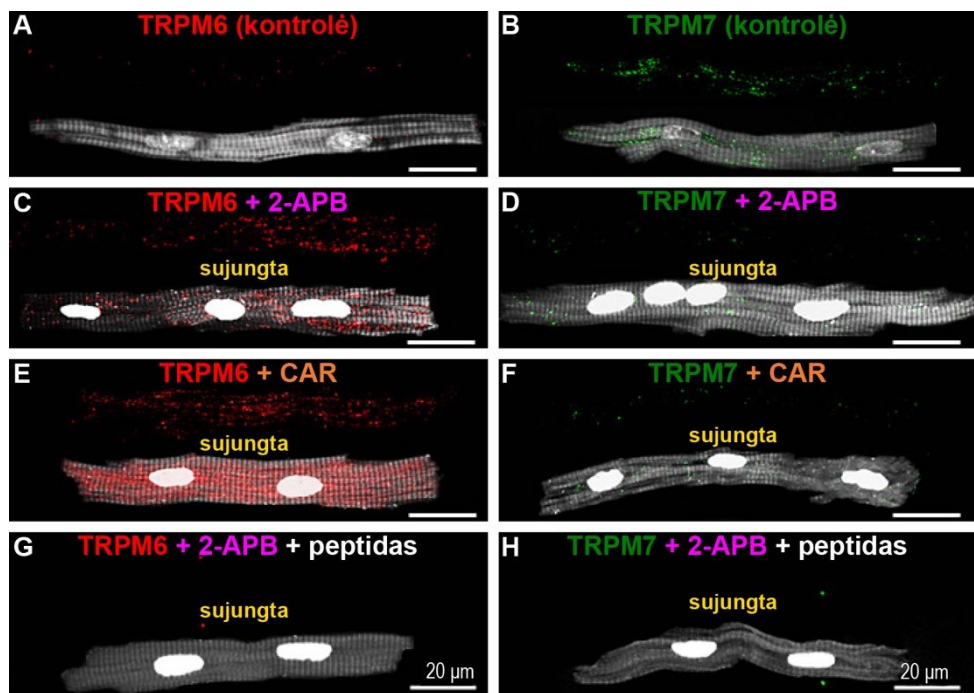
farmakologinių medžiagų poveikyje sumažėjo. Tačiau tomis pačiomis eksperimentinėmis sąlygomis TRPM6 šKB imunofluorescencinis švytėjimas žymiai padidėjo.



3.2.3 pav. *2-APB ir CAR poveikis žmogaus kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumui*

Pavyzdiniai žmogaus KS kardiomiocitų vaizdai, demonstruojantys žymėtų TRPM6 (**B, D, F**) ir TRPM7 (**A, C, E**) šKB imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumo pokyčius kontrolinėmis sąlygomis (**A, B**), po 15 min. inkubacijos su 500 μM 2-APB (**C, D**) ir po 15 min. inkubacijos su 100 μM CAR (**E, F**) (žr. Metodika, 2.10 poskyris). TRPM7 šKB pažymėtas su Alexa Fluor 488 (*žalia spalva*), TRPM6 šKB pažymėtas su Alexa Fluor 546 (*raudona spalva*), F-aktinas pažymėtas su Alexa Fluor 405 (*mėlyna spalva*), kuri buvo dirbtinai pakeista į pilką. Branduoliai nudažyti su Hoechst 33342 (*mėlyna spalva*). Ląstelės vaizdintos naudojant konfokalinį lazerinį mikroskopą Olympus FV1000. Mastelio brūkšnyis atitinka 20 μm .

Be to, analogiškai 2-APB (500 μM) ir CAR (100 μM) poveikio tyrimai buvo atlikti su kiaulės kardiomiocitais, siekiant įsitikinti, jog šiose ląstelėse taip pat gali būti sukeltas toks pat žymėtų TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencinio švytėjimo intensyvumo pokytis. Iš 3.2.4 pav. matyti, kad kiaulės, kaip ir žmogaus, kardiomiocitų TRPM6 šKB imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumas 2-APB ir CAR poveikyje padidėjo, o TRPM7 – sumažėjo.



3.2.4 pav. 2-APB ir CAR poveikis kiaulės kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencinio švytėjimo intensyvumui

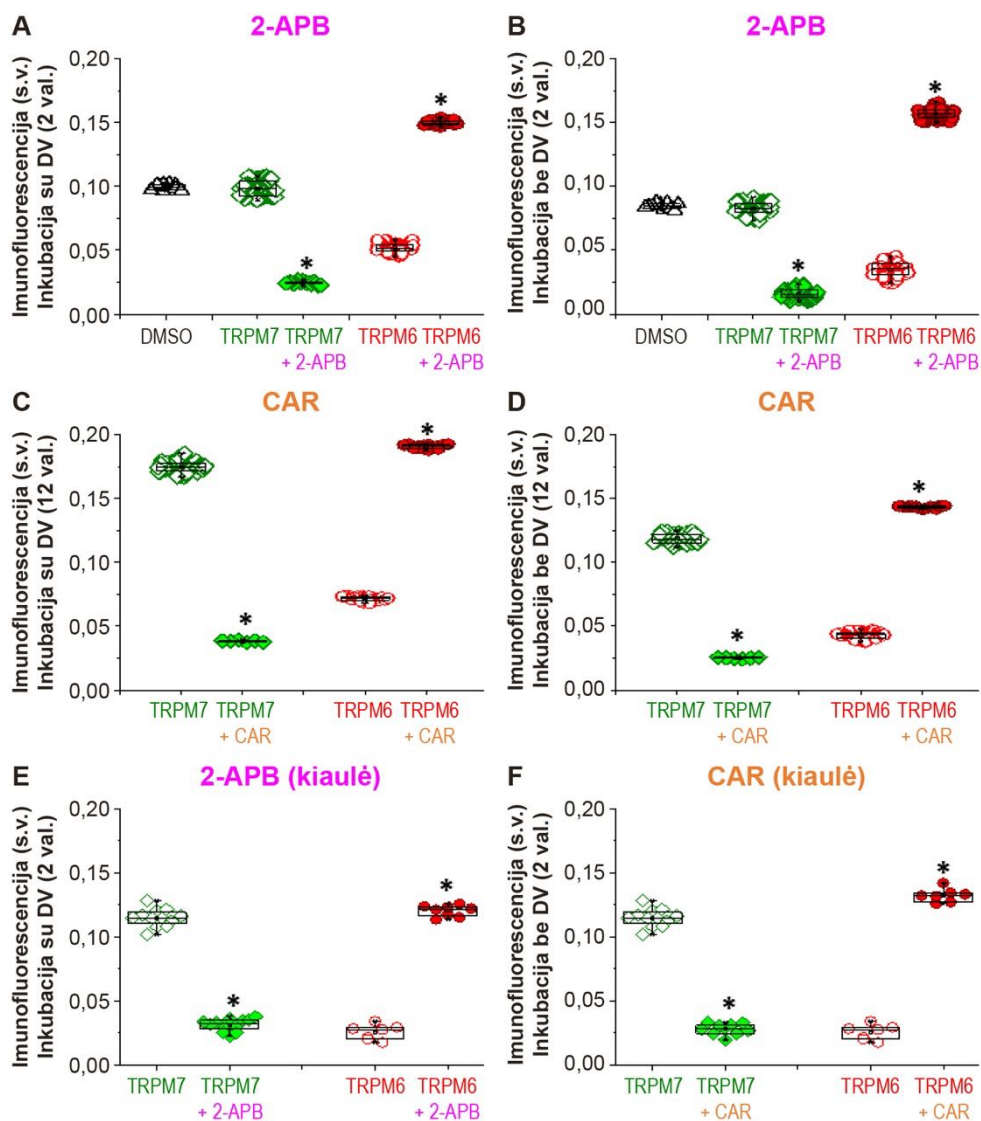
Pavyzdiniai kiaulės DP kardiomiocitų vaizdai, demonstruojantys žymėtų TRPM6 (B, D, F) ir TRPM7 (A, C, E) šKB imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumo pokyčius kontrolinėmis sąlygomis (A, B), po 15 min. inkubacijos su 100 μ M CAR (C, D), po 15 min. inkubacijos su 500 μ M 2-APB (E, F) ir po 15 min. inkubacijos su 500 μ M 2-APB + blokuojantis peptidas (G, H), (žr. Metodika, 2.10 poskyris). TRPM7 šKB pažymėtas su Alexa Fluor 488 (žalia spalva), TRPM6 šKB pažymėtas su Alexa Fluor 546 (raudona spalva), F-aktinas pažymėtas su Alexa Fluor 405 (mėlyna spalva), kuri buvo dirbtinai pakeista į pilką. Ląstelės vaizdintos naudojant konfokalinį lazerinį mikroskopą Olympus FV1000. Mastelio brūkšnys atitinka 20 μ m.

Siekiant įsitikinti, kad naudoti antikūnai tikrai pažymėjo tik TRPM6 ar tik TRPM7 šKB, dalis kardiomiocitų, prieš atliekant inkubaciją su 2-APB, pirmiau buvo paveikiami su specifiniais blokuojančiais peptidais, kurie inhibuoja pirminius antikūnus prieš TRPM6 ir prieš TRPM7. Kaip parodyta 3.2.4 pav. (G, H), fluorescencija nebuvo aptikta, kai 2-APB buvo pridėtas į inkubavimo terpę, kurioje jau buvo antikūną prieš TRPM6 ir prieš TRPM7 blokuojantys peptidai. Šiais tyrimais patvirtinome, kad specifiniai peptidai tikrai blokuoja pirminius antikūnus, todėl mes nenustatėme nei TRPM6, nei TRPM7 šKB imunofluorescencinio švytėjimo. Kadangi inkubacinėje terpėje su blokuojančiais peptidais taip pat buvo ir 2-APB, tai gauti rezultatai leidžia

daryti prielaidą, kad 2-APB ir peptidai, galimai, dalinasi ta pačia prisijungimo vieta (daugiau žr. Rezultatų aptarimas).

3.2.5 pav. (A–D) pateikti kiekybiniai 2-APB ir CAR poveikio TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencijos signalo intensyvumui duomenys. Rezultatai gauti naudojant žmogaus kardiomiocitus, kurie buvo 2 val. (A, B) arba 12 val. (C, D) inkubuojami terpėse be DV katijonų ir su DV katijonais bei paveikti su 2-APB (500 μ M) ar CAR (100 μ M). Nustatyta, kad naudotas tirpiklis DMSO, neturėjo poveikio tyrimų rezultatams ($0,0993 \pm 0,0008$ s.v. ir $0,0847 \pm 0,0007$ s.v., atitinkamai, tirpaluose su DV ir be DV katijonų; $n = 10–11$). Inkubuojant ląsteles su 2-APB (500 μ M), imunodetektuoto TRPM7 šKB fluorescencijos intensyvumas sumažėjo (nuo $0,0986 \pm 0,0006$ s.v. iki $0,0246 \pm 0,0003$ s.v., $n = 16–88$; $p < 0,001$, tirpaluose su DV katijonais ir nuo $0,0827 \pm 0,0005$ s.v. iki $0,0162 \pm 0,0004$ s.v., $n = 70–76$; $p < 0,001$, tirpaluose be DV katijonų). Tomis pačiomis eksperimentinėmis sąlygomis 2-APB (500 μ M) padidino TRPM6 šKB imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumą (nuo $0,0518 \pm 0,0003$ s.v. iki $0,1500 \pm 0,0004$ s.v., $n = 20–99$; $p < 0,001$ ir nuo $0,0354 \pm 0,0006$ s.v. iki $0,1569 \pm 0,0005$ s.v., $n = 70–87$; $p < 0,001$, atitinkamai su DV katijonais ir be jų). CAR (100 μ M) (3.2.5 pav., C, D) taip pat sukėlė kokybiškai panašius žmogaus kardiomiocitų imunofluorescencijos intensyvumo pokyčius po 2 val. (neilustruota) ir 12 val. inkubacijos su DV katijonais ir be jų. TRPM7 šKB imunofluorescencija sumažėjo nuo $0,1748 \pm 0,0006$ s.v. iki $0,0383 \pm 0,0003$ s.v., $n = 6–64$; $p < 0,001$; ir nuo $0,1188 \pm 0,0007$ s.v. iki $0,0251 \pm 0,0002$ s.v., $n = 6–32$; $p < 0,001$, atitinkamai su DV katijonais ir be jų. Priešingai, TRPM6 šKB imunofluorescencija padidėjo nuo $0,0717 \pm 0,0004$ s.v. iki $0,1907 \pm 0,0004$ s.v., $n = 16–20$; $p < 0,001$ ir nuo $0,0428 \pm 0,0004$ s.v. iki $0,1433 \pm 0,0002$ s.v., $n = 17–37$; $p < 0,001$, atitinkamai su DV ir be jų.

Be to, iš 3.2.5 pav. (E, F) ir 3.2.3 lentelės matyti, kad paveikus kiaulės širdies ląsteles su 2-APB ar CAR buvo stebimas toks pat žymėtų TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencijos signalo pokytis: 2-APB ir CAR sumažino TRPM7, bet padidino TRPM6 šKB fluorescencijos švytėjimo intensyvumą.



3.2.5 pav. 2-APB ir CAR poveikis TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumui

Kiekybiniai žymėtų TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumo pokyčiai: (A–D) žmogaus kardiomiocitų kontrolinėmis sąlygomis (inkubuoti 2 val. (A, B) ir 12 val. (C, D) su ir be DV katijonų) (*neužpildyti simboliai*) ir paveikus su 500 μ M 2-APB ir 100 μ M CAR (*užpildyti simboliai*), bei (E, F) kiaulės kardiomiocitų kontrolinėmis sąlygomis (2 val. inkubuoti terpėje su ir be DV katijonų) (*neužpildyti simboliai*) ir paveikus su 500 μ M 2-APB ir 100 μ M CAR (*užpildyti simboliai*). Tirpiklis DMSO (500 μ M, *juodi simboliai*) poveikio šKB imunofluorescencijos signalui neturėjo. * $p < 0,001$ 2-APB ar CAR lyginant su kontrole. DV – divalenti kationai. Kiekybinės reikšmės (vidurkis \pm SEM) pateiktos sutartiniais vienetais (s.v.).

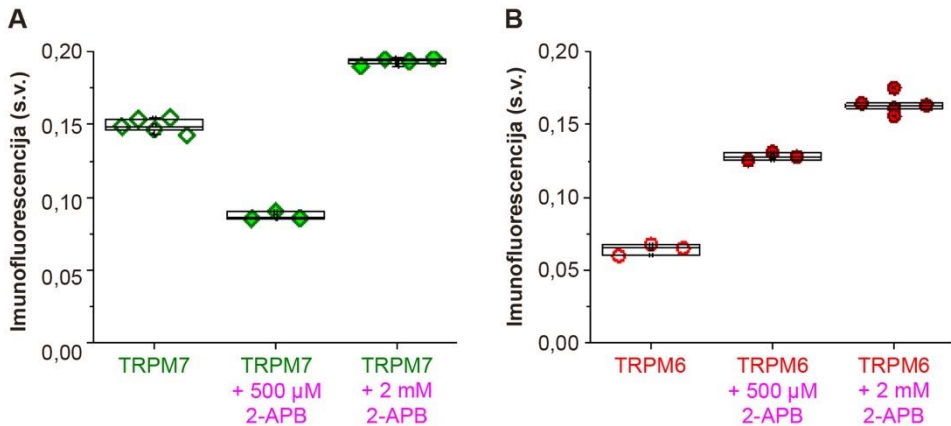
3.2.3 lentelė. 2-APB ir CAR poveikio kiaulės kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumo skaitinės reikšmės

	Kontrolė	2-APB (500 μM)	CAR (100 μM)
TRPM6	0,025 ± 0,0022 n = 7	0,1203 ± 0,0015* n = 8	0,1325 ± 0,0020# n = 7
TRPM7	0,1149 ± 0,0020 n = 20	0,0313 ± 0,0014* n = 20	0,0280 ± 0,0014# n = 10

n – ląstelių skaičius; * $p < 0,001$ lyginant su kontrole. Skaitinės reikšmės (vidurkis ± SEM) pateiktos sutartiniais vienetais (s.v.).

Įdomu tai, kad mūsų duomenys apie skirtingą 2-APB poveikį kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencinio signalo intensyvumui rodo atitikimą su kitų tyrėjų duomenimis apie skirtingą 2-APB poveikį linijinių (CHOK1, HEK-293, DMCT) ląstelių srovėms, tekančioms per TRPM6 ir per TRPM7 kanalus [11]. Elektrofiziologinių tyrimų duomenimis, 500 μM 2-APB koncentracija blokavo srovę per TRPM7 kanalus, tačiau žymiai padidino srovės tankį per TRPM6 kanalus. Mūsų tyrimų duomenimis, analogiškai, buvo aptiktas žymėto TRPM7 šKB imunofluorescencinio signalo intensyvumo mažėjimas, o TRPM6 padidėjimas. Kadangi yra duomenų, kad milimoliarinės (> 2 mM) 2-APB koncentracijos veikia priešingai, t. y. ne blokuoja, o didina TRPM7 kanalų aktyvumą [11], mes taip pat patikrinome ar ir šiuo atveju yra duomenų atitikimas.

3.2.6 pav. pateikti kiekybiniai kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumo pokyčių rezultatai, gauti inkubuojant su 500 μM ir 2 mM 2-APB. Vėlgi, su 500 μM 2-APB buvo užregistruotas kardiomiocitų TRPM7 šKB imunofluorescencinio signalo intensyvumo sumažėjimas nuo $0,1492 \pm 0,0022$ s.v. iki $0,0872 \pm 0,0015$ s.v. ($n = 3-5$, $p < 0,001$). Tačiau, su 2 mM 2-APB vietoj mažėjimo buvo užregistruotas imunofluorescencijos intensyvumo padidėjimas iki $0,1946 \pm 0,0019$ s.v. ($n = 4$, $p < 0,001$). Tuo tarpu inkubuojant kardiomiocitus su mikro- ir milimoliarine 2-APB koncentracija žymėto TRPM6 šKB fluorescencijos signalas buvo vienkryptis ir didėjo nuo $0,064 \pm 0,0023$ s.v. iki $0,1281 \pm 0,0016$ s.v. ($n = 3$, $p < 0,001$) ir iki $0,1641 \pm 0,0031$ s.v. ($n = 5$, $p < 0,001$).



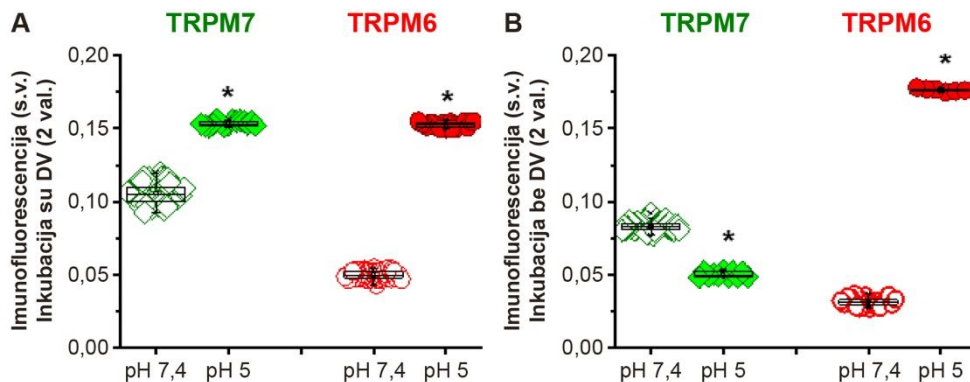
3.2.6 pav. Skirtingas 2-APB poveikis TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumui

(A, B) pateikti kiekybiniai žmogaus kardiomiocitų (PV sergančių pacientų) TRPM6 (raudoni simboliai) ir TRPM7 (žali simboliai) šKB imunofluorescencijos signalo pokyčiai kontrolinėmis sąlygomis (atviri simboliai) ir paveikus su 500 μM ar 2 mM 2-APB (užpildyti simboliai). * $p < 0,001$ 2-APB lyginant su kontrole. Kiekybinės reikšmės (vidurkis \pm SEM) pateiktos sutartiniais vienetais (s.v.).

Taigi, mūsų gauti duomenys apie nuo koncentracijos dydžio priklausomą dvikryptį 2-APB poveikį TRPM7 šKB imunofluorescencijai, atitinka elektrofiziologinių tyrimų duomenis apie priešingą poveikį šiems kanalams (blokavimas su mikromoliarine, bet aktyvavimas su milimoliarine 2-APB koncentracija). Gauti duomenys leidžia teigti, kad 2-APB ir CAR gali keisti žymėtų TRPM6 ir TRPM7 šKB ne tik imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumą, bet, priklausomai nuo koncentracijos, gali keisti jo kryptingumą, t. y. arba sumažinti, arba jį padidinti. Šie duomenys taip pat patvirtina, kad TRPM6 ir TRPM7 šKB gali funkcionuoti nepriklausomai vienas nuo kito.

Yra žinoma, kad ne tik terpės joninė sudėtis ar skirtingos farmakologinės medžiagos gali keisti TRPM6 ir TRPM7 kanalų funkcijas [11, 13]. Literatūros duomenimis ekstraląstelinės terpės pH pokyčiai taip pat gali keisti TRPM6 ir TRPM7 kanalų elektrinį aktyvumą [11, 12, 14, 15]. Todėl tolimesniame tyrimų etape įvertinome galimą ekstraląstelinės acidozės poveikį žmogaus kardiomiocitų šKB imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumui. Šių eksperimentų metu kardiomiocitai buvo 2 val. inkubuojami rūgštinėje terpėje (pH = 5) su ir be DV katijonais. 3.2.7 pav. A matyti, kad rūgštinėje aplinkoje padidėjo tiek TRPM6, tiek TRPM7 šKB imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumas: 3,06 ir 1,45 karto (iki $0,1524 \pm 0,0004$ s.v. ir iki $0,1536 \pm 0,0004$ s.v., atitinkamai; $n = 15-25$; $p < 0,001$), lyginant su imunofluorescencijos signalu ląstelėse inkubuotose pH 7,4 tirpale ($0,0498 \pm 0,0003$ s.v. ir $0,1057 \pm 0,0008$ s.v., atitinkamai; $n = 61-69$, $p < 0,001$). Tačiau

rūgštinėje aplinkoje be DV katijonų, kaip parodyta 3.2.7 pav. B, poveikis TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencijai buvo skirtingas: žymėto TRPM6 šKB imunofluorescencinio signalo intensyvumas padidėjo 5,62 karto (nuo $0,0314 \pm 0,0005$ s.v. iki $0,1765 \pm 0,0004$ s.v., $n = 6-25$; $p < 0,001$), o TRPM7 šKB – sumažėjo 1,66 karto (nuo $0,0830 \pm 0,0004$ s.v. iki $0,0500 \pm 0,0006$ s.v., $n = 11-51$; $p < 0,001$). Šie duomenys taip pat rodo, kad abu detektuoti šKB yra nepriklausomi vienas nuo kito, nes pasižymi individualiu atsaku į ekstraląstelinės terpės pH pokytį.



3.2.7 pav. pH poveikis žmogaus kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumui

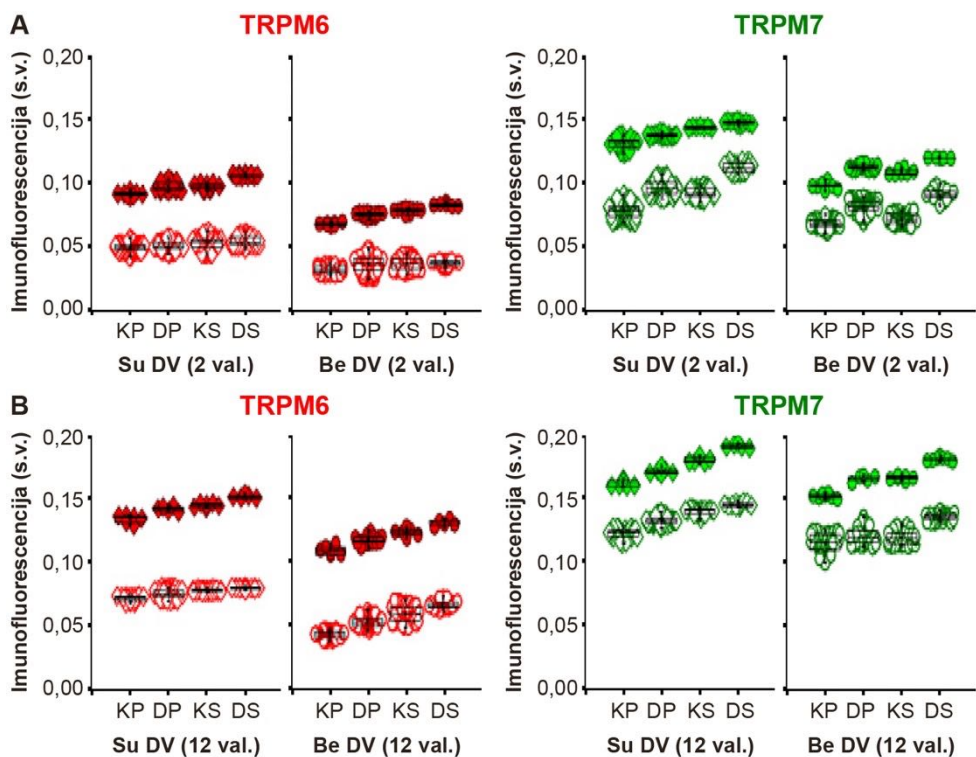
Kiekybinės imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumo reikšmės (vidurkis \pm SEM), kai pH 7,4 (atviri simboliai) ir kai pH 5,0 (uždari simboliai) pateiktos sutartiniais vienetais (s.v.). * $p < 0,001$ pH 5,0 lyginant su pH 7,4. DV – divalenciniai katijonai.

Apibendrinant TRPM6 ir TRPM7 kanalų moduliacijos tyrimų dalį, galime teigti, kad abiejų žymėtų šKB imunofluorescencinis švytėjimo intensyvumas priklausė nuo tyrimo sąlygų, kuriomis buvo inkubuojami kardiomiocitai. Įvairūs ekstraląsteliniai veiksniai, kaip terpės joninė sudėtis, acidozė ir TRP kanalų blokatoriai (2-APB ir CAR), sukelia nepriklausomą TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencijos signalo moduliaciją arba ta pačia, ar priešinga kryptimi (vieną sumažina, o kitą padidina). Tai leidžia mums teigti, kad kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 kanalai tarpusavyje nesusiję ir gali funkcionuoti nepriklausomai.

3.3. TRPM6 ir TRPM7 kanalų baltymų raiškos, kai buvo patologinis širdies pakitimas, tyrimai

Apie 70 proc. suaugusio žmogaus širdies ląstelių yra fibroblastai, kurie, esant mechaniniam, metaboliniam, išeminiam (arba oksidaciniam) ir neurohormoniniam stresui, transformuojasi ir migruoja į pažeistas vietas, sukeldami fibrozinius pokyčius. Dažniausios priežastys, sukeliančios šiuos patologinius pakitimus, yra miokardo infarktas, uždegimas (miokarditas, transplanto atmetimas) ir slėgio bei tūrio perkrovos, atsirandančios dėl įvairių hipertenzijos formų ir vožtuvų nepakankamumo (kuris sukelia regurgitaciją). Šie pokyčiai suaktyvina patologinės hipertrofijos procesus ir galiausiai sukelia ŠN. Išeminės kilmės ŠN yra vyraujantis ir išsivysto dėl IŠL progresavimo. Naujausi tyrimai parodė, kad fibrozės vystymosi procese dalyvaujantys Ca^{2+} jonai į fibroblastus patenka ne per Ca^{2+} -kanalus [4, 36], bet per TRP-panašius kanalus, įskaitant TRPM7, kurie atlieka pagrindinį vaidmenį Ca^{2+} pernašoje į fibroblastus [156]. Taip pat buvo nustatyta, kad per TRPM7 kanalus pernešamas Ca^{2+} srautas į fibroblastus drastiškai padidėja PV sergančių pacientų ląstelėse [156]. Literatūroje yra duomenų, kad širdies fibroblastai gali susijungti su kardiomiocitais [207] ir iš esmės paveikti jų ląstelių elektrines savybes. Remiantis ankstesnių Kardiologijos institute atliktų elektrofiziologinių tyrimų duomenimis [14], buvo pastebėta, kad IŠL didina TRPM7-panašios srovės tankį, todėl buvo tikslinga patikrinti, ar yra atitikimas tarp nustatytų elektrofiziologinių ir molekulinų (šKB imunofluorescencinio švytėjimo intensyvumo) pokyčių. Šiame tyrime naudojome kontrolinių ir IŠL sergančių pacientų izoliuotus kardiomiocitus ir širdies pjūvius. Tai suteikė mums galimybę įvertinti, ar IŠL keičia TRPM6 ir TRPM7 šKB raišką.

3.3.1 pav. pateikti kiekybiniai IŠL sergančių ir kontrolinės grupės pacientų kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencinio švytėjimo intensyvumo duomenys. Pateikti rezultatai rodo, kad nepriklausomai nuo eksperimentinių sąlygų, kuriomis buvo inkubuojami kardiomiocitai (su ir/ar be DV katijonų, fiksuoti po 2 val. (3.3.1 pav., A) ir/ar po 12 val. (3.3.1 pav., B)), žymėtų TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumas IŠL grupės pacientų ląstelėse (3.3.1 pav., *viršutinės reikšmės*) buvo statistiškai patikimai didesnis, lyginant su fluorescencija kontrolinės grupės pacientų ląstelėse (3.3.1 pav., *apatinės reikšmės*). Skaitinės reikšmės pateiktos 3.3.1 lentelėje.



3.3.1 pav. Žmogaus izoliuotų kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencijos intensyvumas, kai buvo ir nebuvo diagnozuota išeminė širdies liga

Kontrolinių (apatiniai, neužpildyti simboliai) ir IŠL sergančių (viršutiniai, užpildyti simboliai) pacientų kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencinio signalo reikšmės, kai buvo inkubuojama 2 val. (A) arba 12 val. (B). $p < 0,001$. DV – divalenciniai katijonai; KP – kairysis prieširdis; DP – dešinysis prieširdis; KS – kairysis skilvelis; DS – dešinysis skilvelis. Kiekybinės reikšmės (vidurkis \pm SEM) pateiktos sutartiniais vienetais (s.v.).

3.3.1 lentelė. Kontrolinės ir IŠL grupės pacientų izoliuotų kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumo skaitinės reikšmės

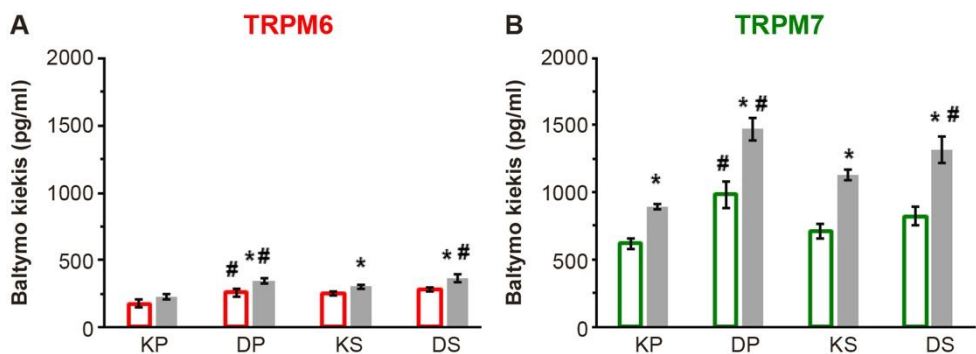
TRPM7 (DV)		KP	DP	KS	DS
2 val.	Kontrolinė grupė	0,079 \pm 0,0005 n = 100	0,098 \pm 0,0005# n = 100	0,094 \pm 0,0005 n = 7	0,114 \pm 0,0007# n = 27
	IŠL grupė	0,132 \pm 0,0009* n = 25	0,139 \pm 0,0003*# n = 20	0,145 \pm 0,0003* n = 7	0,149 \pm 0,0004*# n = 12
12 val.	Kontrolinė grupė	0,124 \pm 0,0006 n = 32	0,134 \pm 0,0004# n = 61	0,141 \pm 0,0005 n = 20	0,147 \pm 0,0005# n = 10
	IŠL grupė	0,159 \pm 0,0002* n = 6	0,171 \pm 0,0008*# n = 6	0,182 \pm 0,0017* n = 6	0,195 \pm 0,0011*# n = 5

3.3.1 lentelės tęsinys

TRPM6 (DV)		KP	DP	KS	DS
2 val.	Kontrolinė grupė	0,050 ± 0,0003 n = 92	0,052 ± 0,0003# n = 105	0,054 ± 0,0006 n = 65	0,055 ± 0,0005# n = 43
	IŠL grupė	0,092 ± 0,0006* n = 9	0,098 ± 0,0008*# n = 19	0,098 ± 0,0007* n = 12	0,107 ± 0,0003*# n = 12
12 val.	Kontrolinė grupė	0,072 ± 0,0004 n = 20	0,076 ± 0,0004# n = 62	0,078 ± 0,0002 n = 31	0,080 ± 0,0002# n = 16
	IŠL grupė	0,136 ± 0,0013* n = 6	0,144 ± 0,0012*# n = 5	0,147 ± 0,0009* n = 6	0,154 ± 0,0009*# n = 5
TRPM7 (be DV)					
2 val.	Kontrolinė grupė	0,069 ± 0,0009 n = 59	0,083 ± 0,0005# n = 103	0,073 ± 0,0005 n = 50	0,092 ± 0,0009# n = 20
	IŠL grupė	0,098 ± 0,0009* n = 9	0,113 ± 0,0004*# n = 22	0,109 ± 0,0008* n = 7	0,120 ± 0,0002*# n = 5
12 val.	Kontrolinė grupė	0,115 ± 0,0009 n = 56	0,120 ± 0,0011# n = 33	0,119 ± 0,0009 n = 33	0,135 ± 0,0005# n = 30
	IŠL grupė	0,149 ± 0,0004* n = 7	0,164 ± 0,0009*# n = 5	0,163 ± 0,0013* n = 6	0,180 ± 0,0005*# n = 7
TRPM6 (be DV)					
2 val.	Kontrolinė grupė	0,032 ± 0,0006 n = 30	0,036 ± 0,0006# n = 101	0,037 ± 0,0006 n = 62	0,037 ± 0,0004# n = 21
	IŠL grupė	0,068 ± 0,0005* n = 7	0,076 ± 0,0004*# n = 18	0,079 ± 0,0005* n = 14	0,084 ± 0,0007*# n = 6
12 val.	Kontrolinė grupė	0,043 ± 0,0003 n = 66	0,053 ± 0,0005 # n = 53	0,059 ± 0,0008 n = 57	0,066 ± 0,0005# n = 32
	IŠL grupė	0,107 ± 0,0012* n = 6	0,116 ± 0,0008*# n = 17	0,121 ± 0,0016* n = 6	0,130 ± 0,0012*# n = 5

Kontrolinė grupė – pacientai, kuriems nebuvo diagnozuota išeminė širdies liga; IŠL grupė – pacientai, kuriems buvo diagnozuota išeminė širdies liga. DV – divalenciniai katijonai; n – ląstelių skaičius; KP – kairysis prieširdis; DP – dešinysis prieširdis; KS – kairysis skilvelis; DS – dešinysis skilvelis. * $p < 0,05$ IŠL grupė lyginant su kontroline grupe # $p < 0,05$ dešinioji širdies pusė lyginant su kairiąja širdies puse. Skaitinės reikšmės (vidurkis ± SEM) pateiktos sutartiniais vienetais (s.v.).

Nustačius, kad izoliuotuose IŠL sergančių pacientų kardiomiocituose yra padidėjusi žymėtų TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencija, toliau patikrinome ar pacientų, sergančių šia liga, audinių homogenatuose taip pat yra didesnis tiriamų baltymų kiekis. Iš duomenų, pateiktų 3.3.2 pav. (A, B) ir 3.3.2 lentelėje, matyti, kad IŠL sergančių pacientų širdies mėginių homogenatuose buvo aptikti didesni TRPM6 ir TRPM7 šKB kiekiai.



3.3.2 pav. Kiekybinis žmogaus širdies audinių TRPM6 ir TRPM7 šKB įvertinimas, kai buvo ir nebuvo diagnozuota išeminė širdies liga

Stulpelinėse diagramose pateikti širdies audinių homogenatų kontrolinės grupės (n = 3–16, neužpildyti stulpeliai) ir IŠL sergančių pacientų grupės (n = 3–31, užpildyti stulpeliai) TRPM6 (A) ir TRPM7 (B) šKB kiekiai, nustatyti ELISA tyrimo metodu (žr. Metodika, 2.5 poskyris). KP, DP, KS ir DS žymėjimai atitinka žmogaus širdies kairiojo prieširdžio, dešiniojo prieširdžio, kairiojo skilvelio ir dešiniojo skilvelio audinius. * $p < 0,05$ IŠL grupė lyginant su kontroline grupe; # $p < 0,05$ dešinioji širdies pusė lyginant su kairiąja širdies puse.

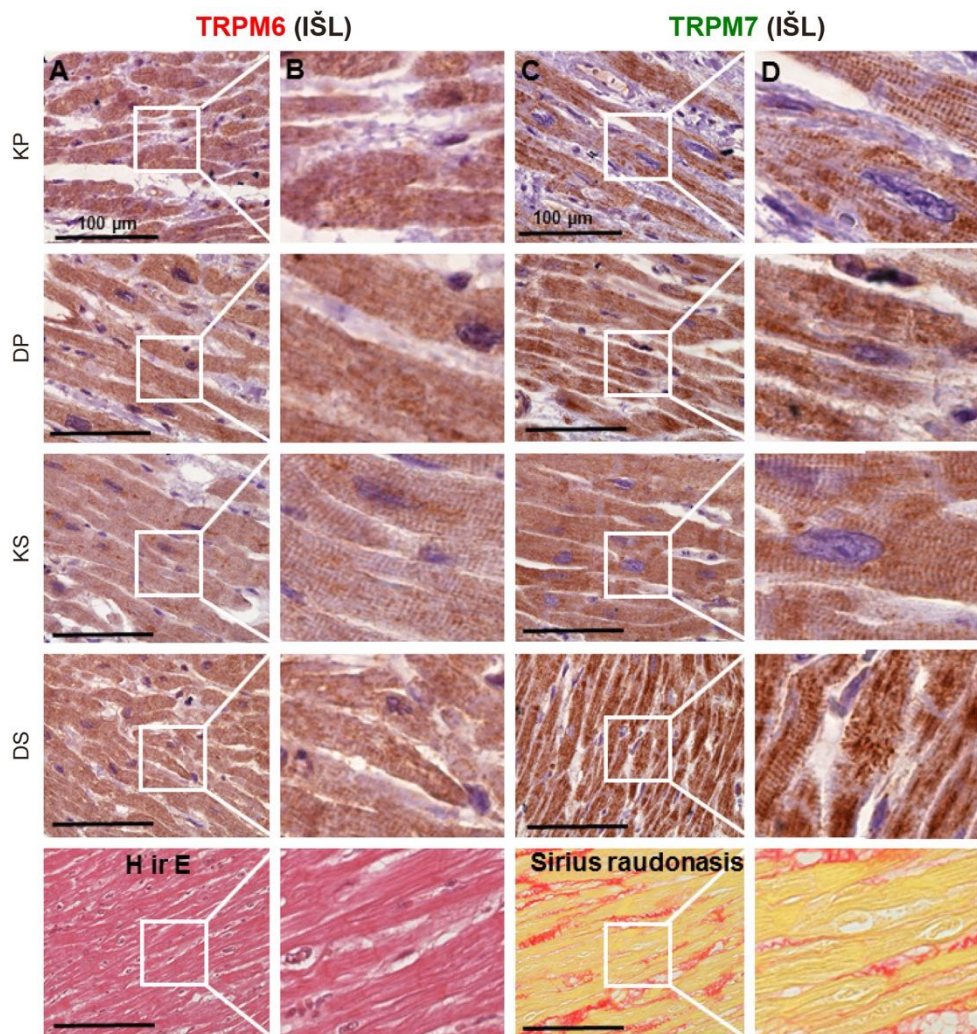
3.3.2 lentelė. Kontrolinės ir IŠL grupės pacientų širdies audinių TRPM6 ir TRPM7 šKB raiškos skaitinės reikšmės, nustatytos ELISA metodu

TRPM7	KP	DP	KS	DS
Kontrolinė grupė	618,76 ± 19,73 n = 3	980,99 ± 55,65# n = 16	712,05 ± 29,92 n = 13	821,75 ± 35,14 n = 5
IŠL grupė	889,69 ± 9,90* n = 3	1470,81 ± 47,51*# n = 31	1125,87 ± 22,80* n = 12	1318,35 ± 52,23*# n = 5
TRPM6				
Kontrolinė grupė	174,57 ± 14,16 n = 3	276,49 ± 17,25# n = 16	248,66 ± 8,07 n = 13	281,73 ± 8,31 n = 5
IŠL grupė	228,47 ± 11,26 n = 3	337,45 ± 12,91*# n = 31	302,88 ± 9,33* n = 12	363,68 ± 16,48*# n = 5

Kontrolinė grupė – pacientai, kuriems nebuvo diagnozuota išeminė širdies liga; IŠL grupė – pacientai, kuriems buvo diagnozuota išeminė širdies liga. KP, DP, KS ir DS žymėjimai atitinka žmogaus širdies kairiojo prieširdžio, dešiniojo prieširdžio, kairiojo skilvelio ir dešiniojo skilvelio audinius. Skaitinės reikšmės (vidurkis ± SEM) išreikštos pg/ml; * $p < 0,05$ kontrolinė grupė lyginant su IŠL grupe; # $p < 0,05$ dešinioji širdies pusė lyginant su kairiąja širdies puse.

Be to, mes įvertinome ar tiriamų šKB kiekis priklausė nuo KS vietos, iš kurios buvo paimtas audinio mėginys (epikardo lyginant su endokardu). Nustatėme, kad abiejų, TRPM6 ir TRPM7, šKB koncentracija buvo statistiškai patikimai ($p < 0,05$) didesnė tuose homogenatuose, kurie buvo paruošti iš subepikardinės širdies dalies ($324,33 \pm 22,22$ pg/ml ir $1313,75 \pm 15,81$ pg/ml, atitinkamai; $n = 3$) lyginant su subendokardine dalimi ($256,76 \pm 19,24$ pg/ml ir $1114,80 \pm 23,96$ pg/ml, atitinkamai; $n = 3$).

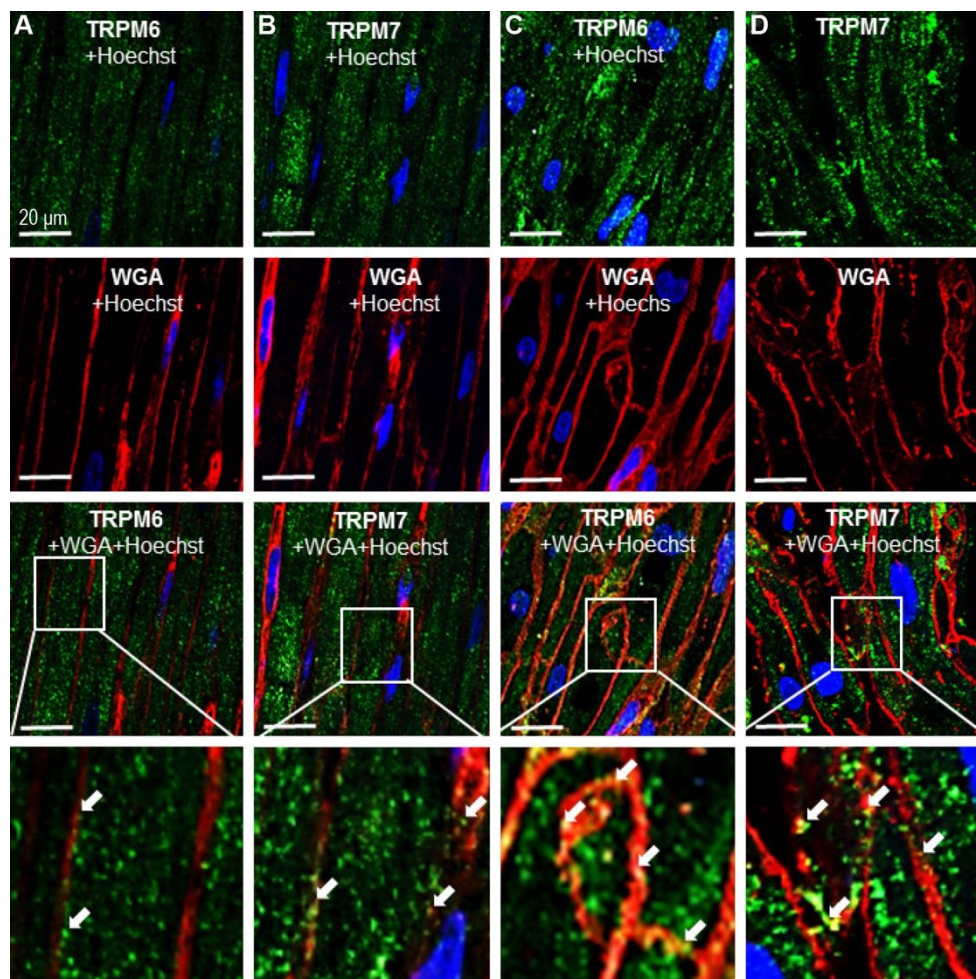
Kaip jau minėjome, šiuo metu literatūroje nėra publikuotų duomenų apie histologinių pjūvių TRPM7, ir ypač TRPM6, šKB raišką susijusią su širdies patologiniais pakitimais. Mūsų gauti rezultatai (žr. 3.1.3 pav.) pirmą kartą pademonstravo [203], kad abu šKB yra aptinkami abiejuose prieširdžiuose ir skilveliuose, kurie buvo disektuoti iš eksplantuotų širdžių, kontrolinės grupės pacientų (autoįvykių aukos). Palyginimui taip pat įvertinome, kaip keičiasi IŠL ir PV sergančių pacientų histologinių pjūvių TRPM6 ir TRPM7 šKB raiška. Tyrimus atlikome naudojant pirminius antikūnus prieš TRPM6 ir prieš TRPM7, taikant chromogeninę (3.3.3 pav.) ir fluorescencinę (3.3.4 pav.) imuninę reakciją (žr. Metodika, 2.8 poskyris). Kaip pademonstruota 3.3.3 pav., IŠL sergančių pacientų histologiniuose pjūviuose, taikant imunohistocheminį metodą (chromogeninė imuninė reakcija) yra matomas intensyviai rudas pigmentas. Tai demonstruoja, kad abu žymėti šKB, TRPM6 ir TRPM7, yra gausiai aptinkami visų keturių žmogaus širdies dalių kardiomiocitų viduląstelių organelių membranose. Kaip jau minėjome, literatūros šaltinių duomenimis dauguma šių kanalų yra aptinkami viduląstelių vezikulių membranose [17]. Analizuojant IŠL sergančių pacientų širdies miokardo audinius, pastebėti tam tikri miokardo ląstelių morfologiniai pokyčiai: kardiomiocitų hipertrofija, jų branduolių padidėjimas ir intersticinė fibrozė (3.3.3 pav., *apatinė eilutė*).



3.3.3 pav. Žmogaus kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB raiška, kai buvo diagnozuota išeminė širdies liga

Histologiniai vaizdai iliustruojantys IŠL sergančių pacientų širdies audinių TRPM6 (A, B) ir TRPM7 (C, D) šKB raišką histologiniuose pjūviuose, naudojant chromogeninę imuninę reakciją (žr. Metodika, 2.8 poskyris). Rudos spalvos pigmentai demonstruoja tiriamus šKB žmogaus širdies KP, DP, KS ir DS audinių ląstelėse (x40 didinimas). Paskutinėje eilutėje pateikti KS miokardo histologiniai vaizdai, demonstruojantys miokardo hipertrofiją/degeneraciją ir fibrozę, naudojant dažymo būdą hematoksilinu ir eozinu (H ir E; *kairėje*) bei sirius raudonu (dešinėje) dažymo būdą, atitinkamai (x20 didinimu ir kvadratu pažymėtos sritys vaizdus). KP – kairysis prieširdis; DP – dešinysis prieširdis; KS – kairysis skilvelis; DS – dešinysis skilvelis. Mastelio brūkšnys atitinka 100 μ m.

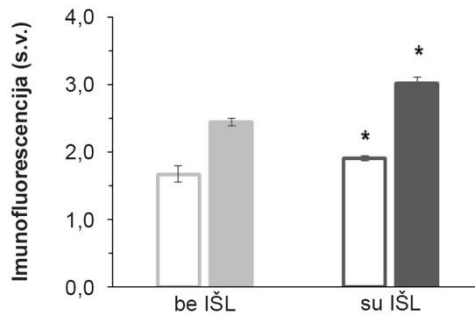
Taip pat atlikome histologinių vaizdų vertinimą naudojant fluorescencinę imuninę reakciją ir kiekybiškai įvertinome TRPM6 ir TRPM7 šKB raišką. 3.3.4 pav. pateikti pavyzdiniai imunofluorescenciniai histotopogramų vaizdai, iliustruojantys TRPM6 ir TRPM7 šKB raiškos pokyčius išilginiuose DP pjūviuose, naudojant kontrolinių ir širdies liga sergančių pacientų širdies mėginius. Iš gautų fluorescencinių histologinių vaizdų matyti, kad naudojant antikūnus prieš TRPM6 ir prieš TRPM7, buvo aptinkami abu TRPM6 ir TRPM7 šKB tiek sveikoje (3.3.4 pav. A, B), tiek IŠL pakenktoje (3.3.4 pav. C, D) žmogaus širdyje. Taip pat, kaip ir taikant chromogeninę imuninę reakciją, abu žymėti šKB yra nehomogeniškai pasiskirstę kardiomiocitų viduląstelinių organelių membranose (3.3.4 pav., *žalia spalva*), bet nedidė jų raiška aptinkama ir ląstelės plazminėje membranoje (3.3.4 pav., *žr. baltos rodyklės*). Be to, IŠL sergančių pacientų širdies audinių pjūviuose, skirtingai nei kontrolinės grupės pacientų pjūviuose (3.3.4 pav., C, D lyginant su A, B), buvo nustatyti morfologiniai pokyčiai, kaip kardiomiocitų hipertrofija, kardiomiocitų branduolių padidėjimas ir intersticinė fibrozė.



3.3.4 pav. Žmogaus dešiniojo prieširdžio kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB raiška, kai nebuvo ir buvo diagnozuota išeminė širdies liga

Histologiniai vaizdai iliustruojantys skirtingų tiriamųjų pacientų grupių širdies audinių TRPM6 ir TRPM7 šKB raišką išilginiuose histologiniuose pjūviuose, naudojant fluorescencinę imuninę reakciją (žr. Metodika, 2.8 poskyris). (A, B) Kontrolinės grupės pacientas (santykinai sveikas asmuo, autoįvykio auka); (C, D) IŠL grupės pacientas (kliniškai diagnozuota IŠL). Baltu kvadratu pažymėta sritis atitinka žemiau esančioje eilutėje didesniu masteliu pateiktus vaizdus. Alexa Fluor 488 (žalia spalva) naudotas TRPM6 ir TRPM7 šKB žymėjimui, Alexa Fluor 555 (raudona spalva) naudotas ląstelių membranų žymėjimui su WGA (angl. *wheat germ agglutinin*) ir Hoechst 33342 naudotas branduolių dažymui (mėlyna spalva). Rodyklės rodo TRPM6 ir TRPM7 šKB raišką plazminėje membranoje. Pastaba: fluorescencijos intensyvumas buvo nustatytas taikant „aklą“ tyrimo vertinimą (matuojant fluorescenciją nebuvo žinoma, kokiai grupei buvo priskirtas tiriamas histologinis pjūvis). Mastelio brūkšnyis atitinka 20 μ m.

3.3.5 pav. pateikti kiekybiniai žmogaus dešiniojo prieširdžio pjūvių kontrolinės ir IŠL grupės pacientų TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumo rezultatai, gauti iš histologinių vaizdų. Atlikus imunofluorescencinio švytėjimo intensyvumo analizę, kaip ir tikėtasi, nustatėme didesnę TRPM7 šKB fluorescencinį švytėjimą lyginant su TRPM6. Taip pat mes nustatėme statistškai patikimai didesnę imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumą IŠL sergančių pacientų kardiomiocituose ($1,9103 \pm 0,0421$ s.v. ir $3,0121 \pm 0,0909$ s.v., $n = 20$), lyginant su kontrolinių pacientų kardiomiocitų fluorescencija ($1,6728 \pm 0,1160$ s.v. ir $2,4442 \pm 0,0518$ s.v., $n = 15$) TRPM6 ir TRPM7, atitinkamai.



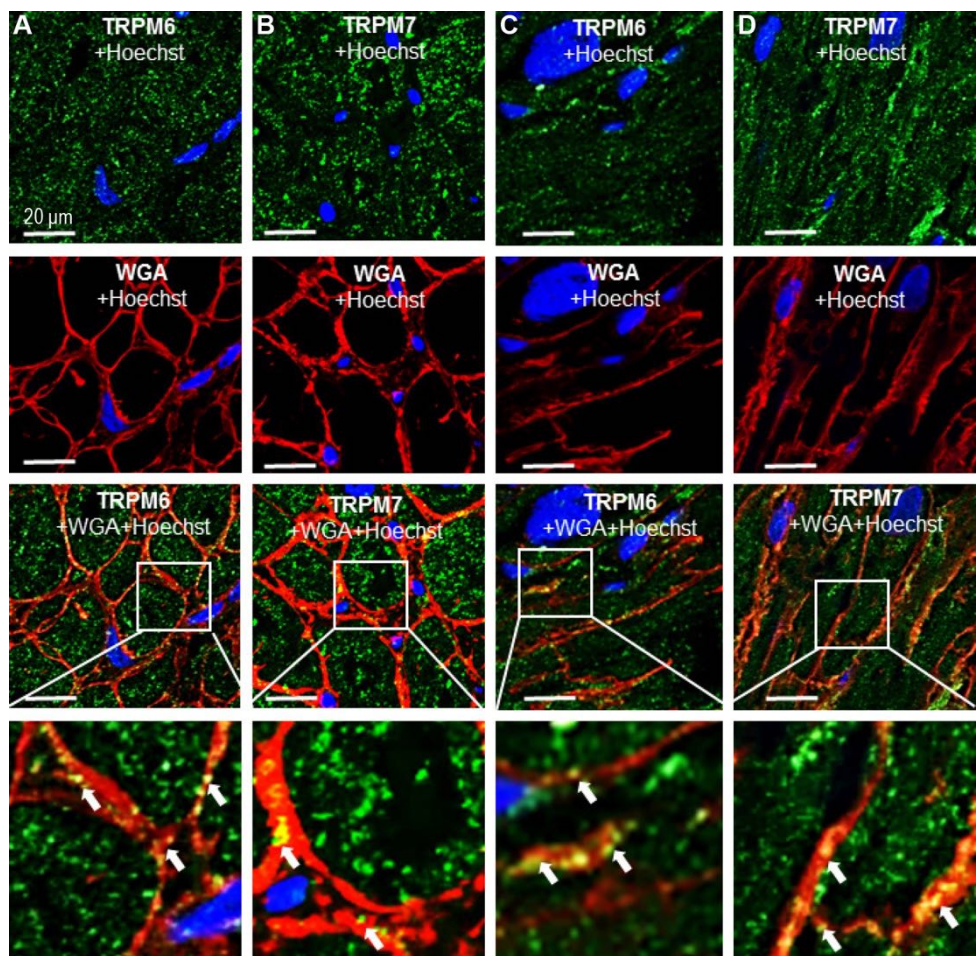
3.3.5 pav. Žmogaus dešiniojo prieširdžio histologinių pjūvių kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencijos intensyvumo kiekybinės reikšmės, kai nebuvo ir buvo diagnozuota išeminė širdies liga

Stulpelinėse diagramose pateikti kontrolinės ir IŠL grupės pacientų kiekybiniai imunohistologinių žmogaus dešiniojo prieširdžio pjūvių kardiomiocitų žymėtų TRPM6 (*neužpildyti stulpeliai*) ir TRPM7 (*užpildyti stulpeliai*) šKB imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumo rezultatai (žr. Metodai, 2.8 poskyris). * $p < 0,05$ IŠL lyginant su kontrole ($n = 6-11$). Kiekybinės reikšmės (vidurkis \pm SEM) pateiktos sutartiniais vienetais (s.v.).

Aukščiau pateikti rezultatai atskleidė, kad TRPM6 ir TRPM7 imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumas buvo didesnis IŠL sergančių pacientų izoliuotuose kardiomiocituose ir audiniuose. Be to, mūsų gauti molekuliniai tyrimų duomenys rodo kanalo raiškos ir kanalo srovių [14] atitikimą, kai nebuvo ir buvo diagnozuota IŠL. Šie rezultatai taip pat leidžia teigti, kad tiek TRPM6, tiek TRPM7 yra susiję su IŠL patogenezė.

Kaip jau buvo minėta aukščiau, TRPM7 kanalai yra sietini su miofibroblastų diferencijacija ir fibroze [156]. Taip pat buvo nustatyta, kad fibroblastuose per TRPM7 kanalus pernešamas Ca^{2+} srautas, drastiškai padidėja PV sergančių pacientų ląstelėse [156]. Svarbu akcentuoti, kad mokslinėje literatūroje yra vos kelios studijos [15, 23], susijusios su TRPM7 šKB, ir ypač su TRPM6, raiškos pokyčių vertinimais sergant PV. Vis dėlto, atliktose studijose apie TRPM6 [23] ir TRPM7 [15] raiškos padidėjimą, kai yra PV, buvo sprendžiama tik iš rezultatų, gautų tiriant DP audinių homogenatus. Be to, histologinių širdies pjūvių TRPM6 ir TRPM7 šKB raiška nebuvo pademonstruota [23, 201, 202]. Ankstesniuose tyrimuose buvo vertinami histologiniai pjūviai dažyti su sirius raudonu (ir/ar su kitais dažais) ir iš fibrozės pokyčių užląsteliniam matrikse buvo daroma prielaida apie galimą TRPM6 ar TRPM7 šKB raiškos padidėjimą, kai buvo PV (žr. 3.3.3 pav., apatinė eilutė), bet nenustatant TRPM6 ar TRPM7 šKB raiškos.

Todėl, tolimesnėje eksperimentų serijoje siekėme nustatyti ir įvertinti nuolatinį (permanentinį) PV sergančių pacientų dešiniojo prieširdžio histologinių pjūvių kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB raišką. Iš DP pjūvių histotopogramų, pateiktų 3.3.6 pav., matyti, kad naudojant imunofluorescencinę imuninę reakciją, tikrai buvo aptikta abiejų, TRPM6 ir TRPM7, raiška. TRPM7 šKB, lyginant su TRPM6, raiška buvo didesnė. Gauti rezultatai, panašūs kaip IŠL atveju (žr. 3.3.4 pav. C ir D), t. y. didelė abiejų šKB raiška viduląstelinėse organelių membranose, bet maža kardiomiocito plazminėje membranoje (žr. *baltas rodyklės*).

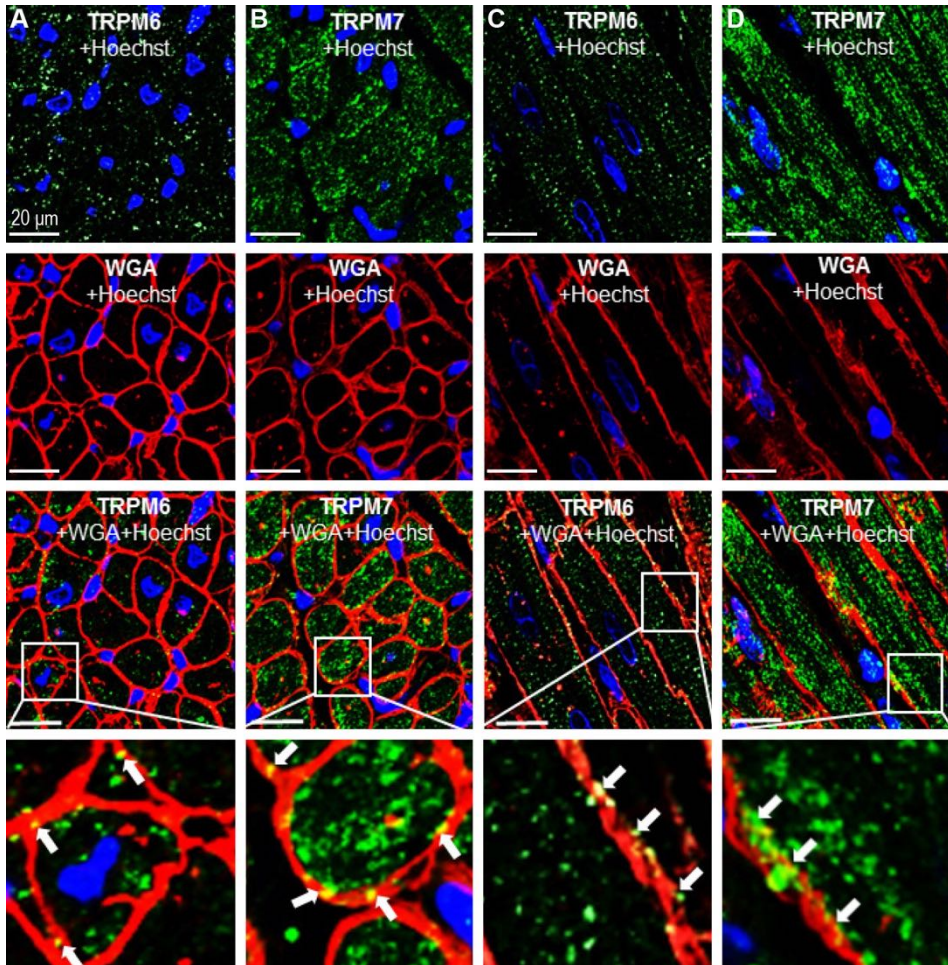


3.3.6 pav. Žmogaus dešiniojo prieširdžio kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB raiška, kai buvo diagnozuotas prieširdžių virpėjimas

Histologiniai skerinių (A, B) ir išilginių (C, D) pjūvių vaizdai iliustruojantys PV sergančių pacientų dešiniojo prieširdžio kardiomiocitų TRPM6 (A, C) ir TRPM7 (B, D) šKB raišką, naudojant fluorescencinę imuninę reakciją (žr. Metodika, 2.8 poskyris). Baltu kvadratu pažymėta sritis atitinka žemiau esančioje eilutėje didesniu masteliu pateiktus vaizdus. Alexa Fluor 488 (*žalia spalva*) naudotas TRPM6 ir TRPM7 šKB žymėjimui, Alexa Fluor 555 (*raudona spalva*) naudotas ląstelių membranų žymėjimui su WGA ir Hoechst 33342 naudotas branduolių dažymui (*mėlyna spalva*). Rodyklės rodo plazminės membranos TRPM6 ir TRPM7 šKB raišką. Mastelio brūkšnys atitinka 20 μm .

Taigi, taikant imunohistocheminį metodą (tiek chromogeninę, tiek fluorescencinę imuninę reakciją) gauti histotopogramų vaizdai pirmą kartą patvirtino, kad TRPM6 ir TRPM7 šKB tikrai yra aptinkami žmogaus širdyje, kai yra IŠL ir PV.

Tolimesnėje eksperimentų serijoje, palyginimui buvo tiriami ir kiaulės širdies DP audiniai (3.3.7 pav.), kaip papildoma kontrolė, galimai, be lėtinių širdies ligų ir senatvinių pokyčių, dėl kurių gali pasikeisti vertinamų šKB raiška.

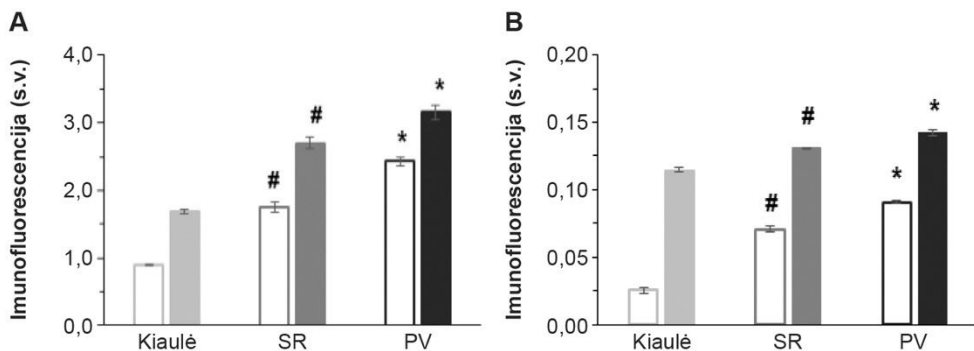


3.3.7 pav. *Kiaulės dešiniojo prieširdžio kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB raiška*

Histologiniai vaizdai iliustruojantys kiaulės dešiniojo prieširdžio kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB raišką, naudojant imunohistocheminį dažymo būdą (žr. Metodika, 2.8 poskyris). (A, B) pateikti skerspjūvių vaizdai ir (C, D) pateikti išilginių pjūvių vaizdai. Baltu kvadratu pažymėta sritis atitinka žemiau esančioje eilutėje didesniu masteliu pateiktus vaizdus. Alexa Fluor 488 (*žalia spalva*) naudotas TRPM6 ir TRPM7 šKB žymėjimui, Alexa Fluor 555 (*raudona spalva*) naudotas ląstelių membranų žymėjimui su WGA ir Hoechst 33342 naudotas branduolių dažymui (*mėlyna spalva*). Rodyklės rodo TRPM6 ir TRPM7 šKB raišką plazminėje membranoje. Pastaba: fluorescencijos intensyvumas buvo nustatytas taikant „aklą“ tyrimo vertinimą (matuojant fluorescenciją nebuvo žinoma, kokiai grupei buvo priskirtas tiriamas histologinis pjūvis). Mastelio brūkšnys atitinka 20 μm.

Šie imunohistocheminiu metodu gauti fluorescenciniai vaizdai patvirtina, kad kiaulės, kaip ir žmogaus, širdyje yra aptinkamas TRPM6 šKB. Imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumo analizė atskleidė, kad TRPM6 šKB raiška buvo pastebimai mažesnė lyginant su TRPM7 šKB raiška.

3.3.8 pav. pateikti kiaulės ir žmogaus DP audinių kardiomiocitų (A) ir izoliuotų kardiomiocitų (B) TRPM6 (*neužpildyti stulpeliai*) ir TRPM7 (*užpildyti stulpeliai*) šKB rezultatai, gauti taikant imunohistocheminį ir imunofluorescencinį tyrimo metodus. Palyginamiesiems tyrimams buvo naudojami kontrolinių ir PV sergančių pacientų bei kiaulės (santykinai sveiko gyvūno) DP mėginiai. Nustatyta, kad audinių pjūvių (3.3.8 pav. A) ir izoliuotų (3.3.8 pav. B) kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencijos intensyvumas statistiškai patikimai didesnis ($p < 0,05$), kai buvo PV. Skaitinės šių tyrimų reikšmės pateiktos 3.3.3 lentelėje.



3.3.8 pav. Žmogaus ir kiaulės kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumas

Stulpelinės diagramos demonstruoja kiekybinį TRPM6 ir TRPM7 šKB DP audinių histologinių pjūvių (A) ir izoliuotų (B) kardiomiocitų imunofluorescencijos intensyvumą kiaulės (*balti stulpeliai*), kontrolinės grupės pacientų (*pilki stulpeliai*) ir PV grupės pacientų (*juodi stulpeliai*) širdies mėginiuose. Kontrolinę grupę sudarė pacientai, be širdies ritmo sutrikimų (SR, sinusinis ritmas). Izoliuoti kardiomiocitai žymėti taikant imunofluorescencinį metodą (žr. Metodika, 2.10 poskyris). Audinių pjūvių kardiomiocitai buvo žymėti taikant imunohistocheminį tyrimo metodą (žr. Metodika, 2.8 poskyris). * $p < 0,05$ PV lyginant su SR; # $p < 0,05$ SR ar PV lyginant su kiaulės kardiomiocitais. Kiekybinės reikšmės (vidurkis \pm SEM) pateiktos sutartiniais vienetais (s.v.).

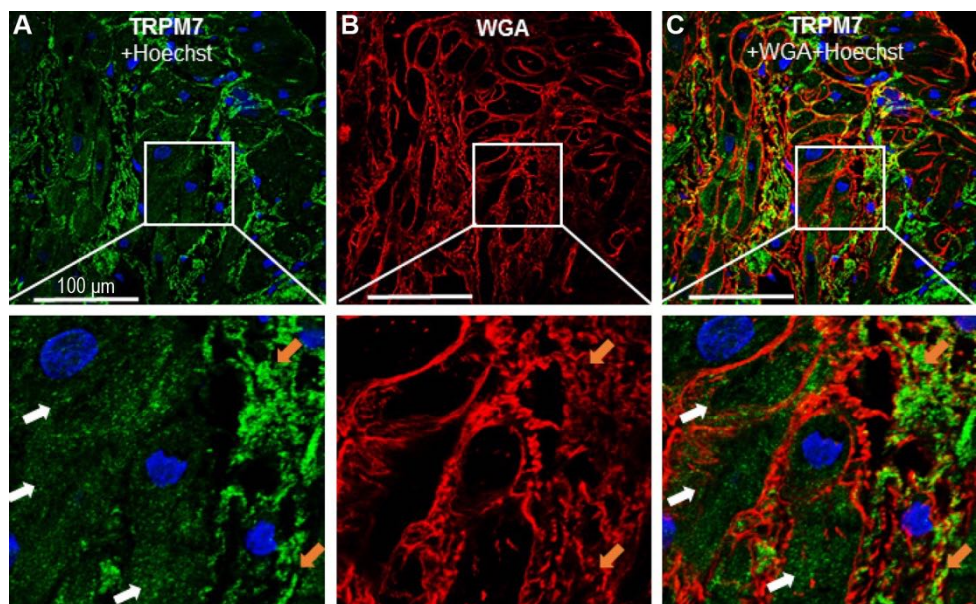
3.3.3 lentelė. Žmogaus ir kiaulės dešiniojo prieširdžio audinių histologinių pjūvių ir izoliuotų kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumo skaitinės reikšmės

IHC	Kiaulė	SR	PV
TRPM6	0,0059 ± 0,0009 n = 9	0,0078 ± 0,0010 n = 14	0,0107 ± 0,0007* n = 11
TRPM7	0,0083 ± 0,0002 n = 12	0,0095 ± 0,0004# n = 18	0,0110 ± 0,0004* n = 19
IF			
TRPM6	0,0255 ± 0,0022 n = 7	0,0705 ± 0,0023# n = 6	0,0908 ± 0,0008* n = 17
TRPM7	0,1149 ± 0,0020 n = 12	0,1308 ± 0,0003# n = 4	0,1427 ± 0,0023* n = 12

IHC – imunohistochemija; IF – imunofluorescencija; SR – sinusinis ritmas; PV – prieširdžių virpėjimas; n – kardiomiocitų ar audinių pjūvių vaizdų skaičius; * $p < 0,05$ PV lyginant su SR; # $p < 0,05$ SR lyginant su kiaulės kardiomiocitais. Skaitinės reikšmės (vidurkis ± SEM) pateiktos sutartiniais vienetais (s.v.).

Iš gautų rezultatų matyti, kad nepriklausomai nuo taikyto tyrimo metodo (audinių imunohistocheminio ar izoliuotų ląstelių imunofluorescencinio), PV sergančių pacientų kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB fluorescencijos švytėjimo intensyvumas buvo statistiškai patikimai didesnis lyginant su kontrolinės grupės pacientų ar kiaulės širdies ląstėmis. Tai rodo, kad TRPM6 ir TRPM7 yra susiję su PV patogenezė.

Svarbu paminėti, kad ŠN sergančių pacientų širdies histologinių pjūvių šKB fluorescencijos intensyvumo kiekybinis vertinimas yra mažiau tikslus, kadangi žymėto baltymo imunofluorescencija (3.3.9 pav., *žalia spalva*) aptinkama ne tik kardiomiocituose (3.3.9 pav., *baltos rodyklės*), bet ir įvairiose užląstelinėse stuktūrose (3.3.9 pav., *geltonos rodyklės*). Skirtinguose audinių pjūvių preparatuose kardiomiocitų užimamas plotas ir užląstelinio matrikso plotas buvo nevienodas. Gauti rezultatai rodo, kad kai yra širdies patologinis pakitimas įvyksta tiek kardiomiocitų, tiek užląstelinio matrikso struktūrų morfologiniai pokyčiai ir TRPM7 šKB raiška, o taip pat ir TRPM6 (neiliustruota), yra aptinkama tiek kardiomiocituose, tiek užląstelinėse struktūrose.



3.3.9 pav. Morfolginiai žmogaus dešiniojo prieširdžio kardiomiocitų ir užląstelinio matriksa pokyčiai, kai yra širdies nepakankamumas

Histologiniai vaizdai iliustruojantys ŠN sergančių pacientų dešiniojo prieširdžio TRPM7 šKB raišką, naudojant imunohistocheminį metodą (fluorescencinė imuninė reakcija; Metodika, 2.8 poskyris). Baltu kvadratu pažymėta sritis atitinka žemiau esančioje eilutėje didesniu masteliu pateiktus vaizdus. Alexa Fluor 488 (*žalia spalva*) naudotas TRPM7 šKB žymėjimui, Alexa Fluor 555 (*raudona spalva*) naudotas ląstelių membraną žymėjimui su WGA ir Hoechst 33342 naudotas branduolių dažymui (*mėlyna spalva*). Pastaba: kardiomiocitų kontūras buvo pažymėtas su WGA. Tačiau šis dažas taip pat žymi ir kitų ląstelių (pvz. kapiliarų) struktūras. Baltos rodyklės rodo kardiomiocitus, geltonos rodyklės rodo užląstelines struktūras. Mastelio brūkšnis atitinka 100 µm.

Taigi, galime teigti, kad mums pavyko pirmą kartą identifikuoti širdies histologinių vaizdų kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB raišką ir pademonstruoti šių baltymų raiškos padidėjimą, atsiradusį dėl lėtinių širdies ligų.

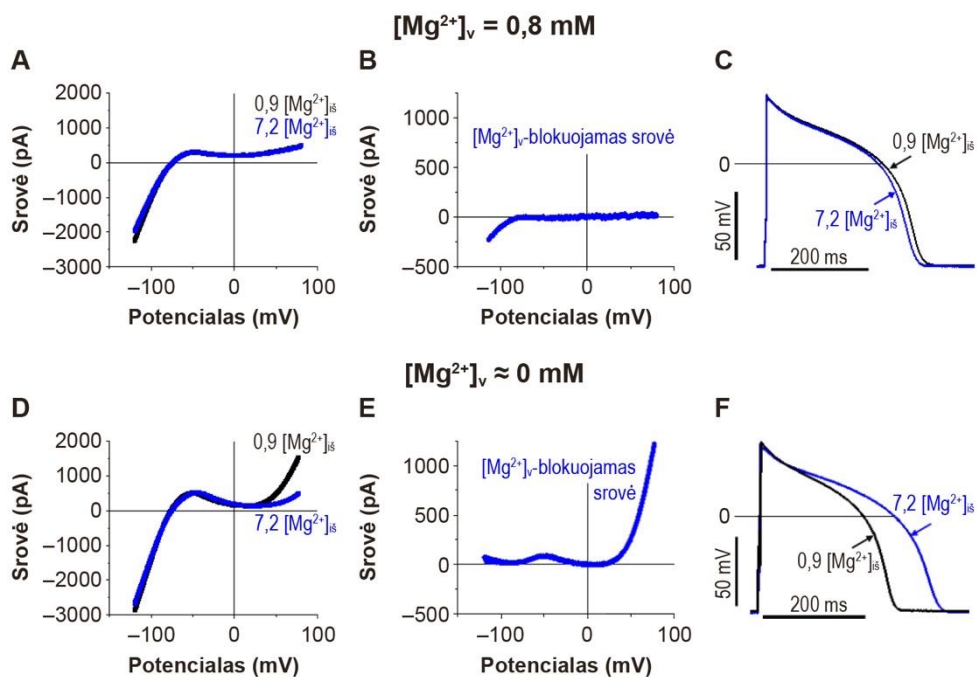
3.4. Mg^{2+} -jautrios srovės poveikio širdies elektriniams veikimo potencialams tyrimai

Vertinant TRPM6 ir TRPM7 kanalų funkciją, ankstesniais tyrimais įrodyta, kad širdyje šie kanalai yra pralaidūs Ca^{2+} ir Mg^{2+} katijonams [12]. Taip pat buvo iškelta prielaida, kad DV katijonai, patenkantys per šiuos kanalus į ląstelės vidų, membranos ramybės potencialo (RP) metu gali pakeisti viduląstelinę joninę koncentraciją [8]. Kita vertus, Mg^{2+} -jautrios TRPM6- ir TRPM7-panašios srovės poveikis kardiomiocitų elektriniam ak-

tyvumui nėra išaiškinta. Tikėtina, kad vienvalenčių jonų tekėjimas iš ląstelės per TRPM6- ir TRPM7-panašius kanalus nulemia VP teigiamų membranų potencialų srityje. Iki šiol, dar nėra tirta Mg^{2+} -jautrios TRPM6- ir TRPM7-panašios srovės poveikis kardiomiocitų VP, kurie yra svarbūs širdies sujaudinimo-susitraukimo procese. Todėl nėra aišku, kokį poveikį širdies VP formavimui gali turėti šios srovės pokyčiai. Tokiems tyrimams atlikti, tikslingai buvo pasirinkti kiaulės širdies kardiomiocitai dėl mažesnio K^+ srovių poveikio VP repoliarizacijai, kadangi juose nėra trumpalaikės išeinančios K^+ jonų srovės (angl. *transient outward current*) [208, 209], kuri inicijuoja ankstyvąją VP repoliarizacijos fazę.

Šiame tyrimų etape, norėdami nustatyti TRPM6- ir TRPM7-panašios srovės poveikį kardiomiocitų elektriniam aktyvumui, registravome bendrą srovę (angl. *total*) naudodami visos ląstelės fiksuotos įtampos (angl. *whole-cell voltage-clamp*) metodą, o RP ir VP registravimui naudojome fiksuotos srovės (angl. *current-clamp*) metodą. Mg^{2+} -jautri srovė buvo registruojama taikant simetrinį pjūklinį protokolą (žr. Metodai, 2.11 poskyris). Eksperimentai buvo atlikti naudojant viduląstelinius ir išorinės perfuzijos tirpalus su K^+ jonais, 36 °C temperatūroje. Mūsų atliktuose eksperimentuose, ląstelės buvo perfuzuojamos tiek su fiziologine Mg^{2+} koncentracija ($[Mg^{2+}]_{is} = 0,9$ mM), tiek su didele, t. y. aštuonis kartus padidinta Mg^{2+} koncentracija ($[Mg^{2+}]_{is} = 7,2$ mM), kuri, kaip buvo anksčiau nustatyta [12], sukelia visišką bet kurios aktyvuotos Mg^{2+} -jautrios srovės blokavimą. Ląstelių dializei buvo naudojami vidinės perfuzijos tirpalai, kurie blokuoja ($[Mg^{2+}]_v = 0,8$ mM) arba aktyvuoja ($[Mg^{2+}]_v \approx 0$ mM) Mg^{2+} -jautrią srovę (3.4.1 pav., A ir D, atitinkamai). $[Mg^{2+}]_v$ -blokuojamos srovės kreivė (3.4.1 pav., B ir E) buvo paskaičiuota, kaip skirtumas tarp srovės-įtampos priklausomybės kreivių, užregistruotų prie 0,9 mM $[Mg^{2+}]_{is}$ ir 7,2 mM $[Mg^{2+}]_{is}$.

Tuo atveju, kai ląstelių dializei buvo naudojamas vidinės perfuzijos tirpalas su fiziologine Mg^{2+} koncentracija ($[Mg^{2+}]_v = 0,8$ mM), kaip parodyta 3.4.1 pav. (A), tai Mg^{2+} -jautrūs kanalai nebuvo aktyvuojami, nes viduląstelinis Mg^{2+} slopino šių kanalų aktyvumą. Užregistruota srovės-įtampos priklausomybės kreivė rodo didelę į ląstelę tekančią srovę, kuri atitinka vidinio-išlyginimo (angl. *inward-rectifier*) K^+ srovę (I_{K1}) neigiamų membranų potencialų srityje (-75 mV). Tačiau teigiamų membranų potencialų srityje ši srovės-įtampos priklausomybės kreivės forma buvo plokščia (angl. *flat*) ir tai rodo, kad iš ląstelės tekanti srovė yra itin mažos amplitudės. Mūsų eksperimentuose $[Mg^{2+}]_{is}$ padidinimas iki 7,2 mM nepakeitė srovės-įtampos priklausomybės kreivės formos. Tai rodo, kad fiziologinėmis sąlygomis padidinta $[Mg^{2+}]_{is}$ neturėjo poveikio nei I_{K1} srovei, nei Mg^{2+} -jautriai srovei (3.4.1 pav. B).



3.4.1 pav. Mg^{2+} -jautrios srovės poveikis širdies veikimo potencialams

Charakteringi pavyzdžiai srovių, užregistruotų naudojant pjūklinį protokolą (žr. Metodika, 2.11 poskyris), ląstelėse dializuotose su $0,8 \text{ mM } [Mg^{2+}]_v$ (A) arba su $\approx 0 \text{ mM } [Mg^{2+}]_v$ (D) ir išoriškai perfuzuotose fiziologiniais tirpalais, kuriuose buvo $0,9 \text{ mM } [Mg^{2+}]_{is}$ arba $7,2 \text{ mM } [Mg^{2+}]_{is}$. $[Mg^{2+}]_{is}$ -jautrios srovės (B, E), paskaičiuotos kaip srovių skirtumai tarp $0,9 \text{ mM } [Mg^{2+}]_{is}$ ir $7,2 \text{ mM } [Mg^{2+}]_{is}$ iš duomenų pateiktų A ir D dalyse. VP (C, F) užregistruoti tose pačiose ląstelėse, kaip ir A, D.

Tačiau, kai ląstelių dializei buvo naudojami vidinės perfuzijos tirpalai be Mg^{2+} ($[Mg^{2+}]_v \approx 0 \text{ mM}$), kaip parodyta 3.4.1 pav. (D), buvo sukeltas laipsniškas Mg^{2+} -jautrių kanalų aktyvavimas [12]. Pastaroji sąlyga, kaip žinoma, dėl Mg^{2+} „išsiplovimo“ (sumažėja $[Mg^{2+}]_v$) ląstelės dializės metu, pašalina viduląstelinio Mg^{2+} sukeltą kanalo inhibiciją. Šiuo atveju srovės-įtampos priklausomybės kreivė, taip pat kaip dializuojant ląstelę su $[Mg^{2+}]_{is}$, rodo, kad yra I_{K1} srovė neigiamų potencialų srityje. Tačiau, kaip parodyta 3.4.1 pav (D), dializuojant ląstelę su vidiniu tirpalu be Mg^{2+} , prie teigiamų membranos potencialų laipsniškai išsivystė didelė išorinio-išlyginimo srovė (angl. *outward-rectifying current*). Ši į išorę išlygintos srovės komponentė teigiamų potencialų srityje buvo blokuojama esant padidintai $[Mg^{2+}]_{is}$ ($7,2 \text{ mM}$) ir tai, galimai, patvirtina Mg^{2+} -jautrios srovės dalyvavimą tame procese. Iš 3.4.1 pav. (E) matyti, kad Mg^{2+} -jautrios srovės kreivė, paskaičiuota, kaip srovės-įtampos priklausomybės kreivių skirtumas (užregistruotų perfuzuojant su $0,9 \text{ mM}$ ir $7,2 \text{ mM } [Mg^{2+}]_{is}$), turi į išorę išlygintos

srovės savybes, kuriomis pasižymi ir TRPM6 bei TRPM7 srovės (3.4.1 pav., E).

Užregistravus visos ląstelės srovės fiksuotos-įtampos metodu, toliau toje pačioje ląstelėje buvo registruojami VP (3.4.1 pav., C ir F) fiksuotos srovės metodu. Tuo tikslu, stiprintuvas buvo perjungiamas iš „voltage-clamp“ registravimo būsenos į „current-clamp“ registravimo būseną. Nustatyta, kad abiejose ląstelių grupėse (dializuotose su 0,8 mM $[Mg^{2+}]_v$ ar su ≈ 0 mM $[Mg^{2+}]_v$) nebuvo gautas statistiškai patikimas RP reikšmių skirtumas, kuris taip pat nepakito padidinus $[Mg^{2+}]_{is}$ nuo 0,9 mM iki 7,2 mM (žr. 3.4.1 lentelė).

3.4.1 lentelė. RP ir VPT skaitinės reikšmės nustatytos kiaulės širdies skilvelio ląstelėse, dializuotose su 0,8 mM $[Mg^{2+}]_v$ ir ≈ 0 mM $[Mg^{2+}]_v$, kai perfuzuojama su fiziologiniu Tyrode tirpalu (0,9 mM $[Mg^{2+}]_{is}$) ar su padidintu iki 7,2 mM $[Mg^{2+}]_{is}$

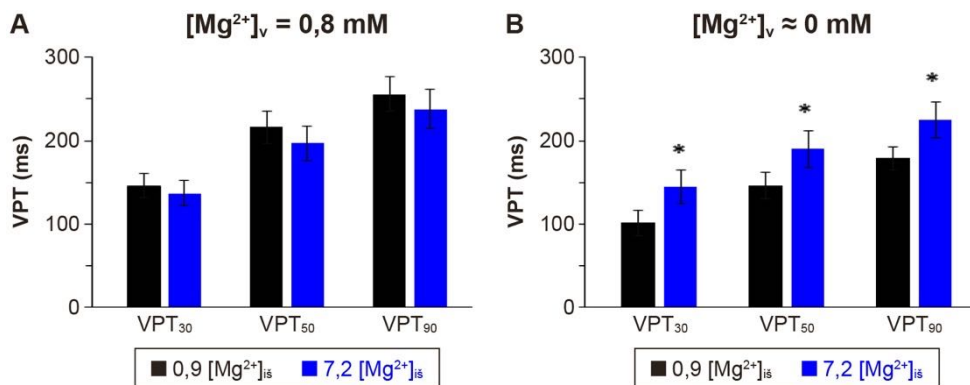
	0,8 mM $[Mg^{2+}]_v$ (n = 9)		≈ 0 mM $[Mg^{2+}]_v$ (n = 10)	
	0,9 mM $[Mg^{2+}]_{is}$	7,2 mM $[Mg^{2+}]_{is}$	0,9 mM $[Mg^{2+}]_{is}$	7,2 mM $[Mg^{2+}]_{is}$
RP (mV)	$-79,9 \pm 2,6$	$-81,0 \pm 2,1$	$-78,4 \pm 2,8$	$-77,4 \pm 3,7$
VPT ₃₀ (ms)	$145,5 \pm 14,5$	$136,5 \pm 15,1$	$100,4 \pm 14,8$	$143,6 \pm 19,9^*$
VPT ₅₀ (ms)	$216,6 \pm 19,6$	$196,6 \pm 21,0$	$145,6 \pm 16,1$	$189,8 \pm 22,4^*$
VPT ₉₀ (ms)	$238,0 \pm 48,0$	$231,0 \pm 46,0$	$178,9 \pm 14,2$	$225,2 \pm 21,3^*$

RP – ramybės potencialas; VPT – veikimo potencialo trukmė. VPT matuota esant 30 proc., 50 proc. ir 90 proc. repoliarizacijai (atitinkamai, VPT₃₀, VPT₅₀ ir VPT₉₀). Pastaba: ženklus VPT pailgėjimas ląstelėse dializuotose su ≈ 0 mM $[Mg^{2+}]_v$, kai išoriškai perfuzuojama su padidinta $[Mg^{2+}]_{is}$. Stimuliacijos dažnis: 1 Hz. * $p < 0,05$ (n = 9–10).

Visumoje, perfuzuojant kardiomiocitus su fiziologiniu Tyrode tirpalu, kuriame buvo 0,9 mM $[Mg^{2+}]_{is}$, kaip parodyta 3.4.1 pav. (C ir F), registruojami VP buvo trumpesni tose ląstelėse, kurios buvo dializuojamos su vidiniu tirpalu be Mg^{2+} (3.4.1 pav. F lyginant su 3.4.1 pav. C, *juodos kreivės*). Tačiau, $[Mg^{2+}]_{is}$ padidinimas iki 7,2 mM turėjo skirtingą poveikį VPT: ląstelėse dializuojamose be Mg^{2+} sukėlė ženklų VPT padidėjimą (3.4.1 pav. F, *mėlyna kreivė*), tuo tarpu ląstelėse dializuojamose su Mg^{2+} užregistruotų VP trukmė beveik nepasikeitė (3.4.1 pav. C, *mėlyna kreivė*).

3.4.2 pav. pateikti kiekybiniai VPT duomenys, gauti taikant skirtingas eksperimentines sąlygas, kai kardiomiocitai buvo dializuojami su 0,8 mM $[Mg^{2+}]_v$ (3.4.2 pav. A) arba su 0 mM $[Mg^{2+}]_v$ (3.4.2 pav. B). Ląstelėse dializuojamose su fiziologine $[Mg^{2+}]_v$, nebuvo nustatytas statistiškai patikimas VPT skirtumas tarp kardiomiocitų išoriškai perfuzuotų su 7,2 mM $[Mg^{2+}]_{is}$ lyginant su 0,9 mM $[Mg^{2+}]_{is}$ ($p > 0,05$; n = 9; žr. 3.4.1 lentelė). Priešingai,

ląstelėse dializuojamose su vidiniu tirpalu be Mg^{2+} , $[Mg^{2+}]_{is}$ padidinimas iki 7,2 mM sukėlė žymų VPT padidėjimą ($p < 0,05$; $n = 10$; žr. 3.4.1 lentelę).



3.4.2 pav. Kiekybinis Mg^{2+} -jautrios srovės poveikio VP trukmei įvertinimas

ląstelės dializuotos atitinkamai su 0,8 mM $[Mg^{2+}]_v$ (A) arba 0 mM $[Mg^{2+}]_v$ (B) ir išoriškai perfuzuotos su 0,9 mM $[Mg^{2+}]_{is}$ (juodi stulpeliai) ir 7,2 mM $[Mg^{2+}]_{is}$ (mėlyni stulpeliai). VPT matuotas esant 30 proc., 50 proc. ir 90 proc. repoliarizacijai (atitinkamai, VPT₃₀, VPT₅₀ ir VPT₉₀). Pastaba: statistiškai patikimas VPT padidėjimas buvo nustatytas ląstelėse dializuotose su 0 mM $[Mg^{2+}]_v$, kai išoriškai perfuzuojama su padidinta $[Mg^{2+}]_{is}$. Stimuliacijos dažnis: 1 Hz. * $p < 0,05$ ($n = 9-10$).

Kadangi, dializuojant kardiomiocitus su 0,8 mM $[Mg^{2+}]_v$ ir išoriškai perfuzuojant su padidinta (7,2 mM) $[Mg^{2+}]_{is}$ beveik nebuvo pastebimų VPT pokyčių, buvo padaryta prielaida, kad, galimai, vyksta du priešingi bet vienas kitą atsveriantys 7,2 mM $[Mg^{2+}]_{is}$ poveikiai, lėtai L-tipo Ca^{2+} (I_{CaL}) ir I_K srovėms, atspindintys I_{CaL} ir I_K slopinančių poveikių pusiausvyrą repoliarizacijai [210].

Apibendrinant, mūsų tyrimai atskleidė, kad Mg^{2+} -jautri srovė, kuri yra aktyvuojama dializuojant ląstelę su 0 mM $[Mg^{2+}]_v$ ir blokuojama su 7,2 mM $[Mg^{2+}]_{is}$, turi poveikį veikimo potencialams. Todėl tikėtina, kad tokiomis aplinkybėmis Mg^{2+} -jautri srovė gali nulemti VPT pokyčius, jei $[Mg^{2+}]_v$ jautrumą sumažina reguliaciniai veiksniai (šio tyrimo metu netirti). Iš kitos pusės, esant fiziologinei viduląstelio Mg^{2+} koncentracijai (0,8 mM), Mg^{2+} -jautri srovė, tekanti per TRPM6- ir TRPM7-panašius kanalus, galimai, neturi poveikio širdies VPT, kadangi Mg^{2+} -jautri srovė yra blokuojama su $[Mg^{2+}]_v$.

Be to, šiame tyrime parodėme, kad TRPM6 ir TRPM7 kanalų aktyvumas yra moduluojamas priklausomai nuo DV katijonų koncentracijos ekstraląsteliniuose tirpaluose. Taigi, Mg^{2+} -jautrios srovės poveikis veikimo potencialams gali skirtis priklausomai nuo ekstraląstelinės DV katijonų homeostazės.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

4.1. Širdies TRPM6 ir TRPM7 kanalų baltymų raiškos vertinimas

Atliktais tyrimais galime patvirtinti, kad TRPM6 ir TRPM7 šKB raiška yra aptinkama žmogaus širdies visų keturių dalių, abiejų prieširdžių ir skilvelių ląstelėse. Iki šiol literatūroje buvo galima rasti tvirtų įrodymų tik apie širdies audinių, įskaitant prieširdžių ir skilvelių kardiomiocitų, laidžiosios širdies sistemos ląstelių ir fibroblastų TRPM7 šKB raišką [2]. TRPM7 taip pat buvo aptikti vainikinių kraujagyslių ir periferinės kraujagyslių sistemos endotelio ląstelėse, bei lygiųjų raumenų ląstelėse [211]. Tačiau nuomonė dėl širdies TRPM6 baltymo raiškos yra ginčytina. Mokslinės literatūros duomenimis, šiuo metu nustatyta tik inkstų, placentos ir žarnyno epitelio ląstelių TRPM6 šKB raiška [6, 65]. Be to, nėra jokių žinių apie galimą visų keturių žmogaus širdies dalių (prieširdžių ir skilvelių) TRPM6 ir TRPM7 šKB raišką. Dėl to, norėdami nustatyti ir patvirtinti šių žmogaus ir kiaulės širdies kanalų baltymų raišką, naudojome daug skirtingų metodų bei eksperimentinių sąlygų jų kokybiniam ir kiekybiniam įvertinimui. Pirmiausia, naudojant RT-PGR metodą, identifikavome žmogaus širdies prieširdžių ir skilvelių *Trpm6* ir *Trpm7* mRNR raišką. Be to, taikant ELISA metodą, patvirtinome TRPM6 ir TRPM7 šKB raišką žmogaus širdies audinių homogenatuose. Taikant imunofluorescencijos metodą taip pat aptikome abiejų TRPM6 ir TRPM7 šKB raišką visuose kardiomiocituose iš bet kurios žmogaus ar kiaulės širdies dalies. Gautų imunofluorescencinių rezultatų pagrindu buvo atlikti kardiomiocitų imunohistocheminiai tyrimai. Histotopogramų duomenys taip pat patvirtino skirtingų žmogaus ir kiaulės širdies dalių kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB raišką.

Informacija apie žmogaus širdies TRPM6 šKB raišką tebėra labai negausi ir grindžiama tik genetinių tyrimų duomenimis gautais iš DP audinių [23]. Be to, informacija apie žmogaus DP audinių *Trpm6* mRNR raišką literatūros šaltiniuose buvo prieštaringa. Dviejuose tyrimuose nebuvo aptikta *Trpm6* mRNR raiška [15, 21], o viename tyrime *Trpm6* mRNR buvo aptikta ir nustatyta, kad raiška didesnė PV sergančių pacientų DP homogenatuose [23]. Literatūroje taip pat nėra genetinių tyrimų duomenų, parodančių skilvelių *Trpm6* raišką. *Trpm6* raiška nebuvo aptikta ŠN sergančių pacientų KS ir DS homogenatuose [212] ir naudojant skirtingų linijinių pelių širdies mėginius [22].

Svarbu paminėti, kad iki šiol nėra jokių publikuotų duomenų apie kiaulės kardiomiocitų TRPM7 ir ypač TRPM6 šKB raišką. Nors šio eksperimentinio

gyvūno širdies-kraujagyslių sistema [204] ir genetinė sudėtis [205] yra artima žmogaus genomui, tačiau TRPM6 ir TRPM7 šKB raiška nebuvo nustatyta, galimai, dėl to, kad nėra specifinių antikūnų, skirtų šKB identifikacijai kiaulės širdies ląstelėse ir/ar audiniuose (žr. Tyrimo trūkumai). Kita vertus, literatūros duomenimis, TRPM6 raiška aptikta tik pelės embriono širdyje [213], taikant PGR ir *in situ* hibridizacijos metodus. Tiek TRPM6, tiek TRPM7 yra itin svarbūs organogenezėje. Dėl to, nėštumo metu pakitę hormonų sąlygojami procesai gali nulemti vaisiaus magnio homeostazę ir širdies TRPM kanalų, ypač TRPM6, raišką [213]. Todėl, mokslinėje literatūroje vyrauja nuomonė, kad pilnai išsivysčiusioje širdyje TRPM6 kanalų iš viso nėra ir/arba jie yra neaktyvūs (angl. *silencing*). Tačiau, neatmetama prielaida, kad jie gali reaktyvuotis širdies ligų ar senėjimo metu.

Šiame tyrime mes taip pat atlikome TRPM6 ir TRPM7 šKB raiškos vertinimus tarp prieširdžių ir skilvelių ląstelių bei širdies kairiosios ir dešinėsios pusių. Nustatėme, kad prieširdžių ir skilvelių ląstelių TRPM6 ir TRPM7 šKB raiška nesiskyrė, tačiau ji buvo didesnė dešiniojoje širdies pusėje lyginant su kairiąja. Tyrime, kurį atliko Morine su kolegomis [212] nepavyko aptikti ŠN sergančių pacientų KS ir DS audinių *Trpm6* ir *Trpm7* mRNR raiškos. Vis dėlto, pelėse, kurioms dirbtinai sukelta aortos koarktacija, jiems pavyko pademonstruoti biventrikulinę abiejų kanalų mRNR raišką [212]. Naujausias tyrimas atliktas su linijinėmis pelėmis atskleidė skirtingą keturių pelės širdies dalių genų raišką. Buvo nustatyta, kad *Trpm4* ir *Trpm7* genų raiška ypač didelė prieširdžiuose, tačiau *Trpm6* genas nebuvo aptiktas [214]. Svarbu pažymėti, kad genų aptikimas galimai yra mažiau specifiškas nei kiti molekuliniai metodai (pvz., ląstelių imuninis žymėjimas), kurie yra skirti izoliuotų kardiomiocitų raiškos nustatymui, dėl didesnio kitų ląstelių (ne kardiomiocitų) priemaišų (kraujagyslių lygiųjų raumenų ir endotelio ląstelių, fibroblastų ir kt.). Taip pat yra duomenų, kad prieširdžių fibroblastų TRPM kanalų raiška yra didesnė lyginant su skilvelių raiška [215].

Vis dėlto, mes neturime paaiškinimo, kodėl kinta skirtingų širdies dalių TRPM6 ir TRPM7 šKB raiškos lygis. Kadangi šie kanalai yra jautrūs tempimui, viena iš priežasčių galėtų būti, kad skirtinga šKB raiška širdies dalyse yra susijusi su skirtingu mechaniniu poveikiu, patiriamu širdies darbo metu. Šiame tyrime parodėme, kad skilvelių ląstelės, patiriančios didesnę krūvį, pasižymi šiek tiek didesne TRPM6 ir TRPM7 šKB raiška, nors skirtumas lyginant su prieširdžių ląstelėmis nėra statistiškai patikimas. Remiantis šia prielaida, dešinioji širdies pusė patiria mažiau krūvio, dėl to TRPM6 ir TRPM7 šKB raiška šioje širdies pusėje turėtų būti mažesnė. Tačiau mūsų tyrimų duomenys rodo, kad būtent dešiniojoje širdies pusėje nustatyta didesnė TRPM6 ir TRPM7 šKB raiška. Jei širdies darbo metu patiriamas krūvis yra pagrindinis veiksnys, lemiantis TRPM6 ir TRPM7 šKB raiškos

kiekybius pokyčius, tai raiškos intensyvumas širdies dalyse turėtų pasiskirstyti tokia tvarka: KS, DS, KP ir DP.

Mokslinėje literatūroje yra duomenų, kad TRPM6 ir TRPM7 kanalai gali būti sudaryti iš homomerų, bet taip pat gali heteromerizuotis, sudarydami TRPM6/7 kompleksus [65, 216, 217]. Homo- ir heteromeriniai kanalai tarpusavyje skiriasi tiek jonų pralaidumu, tiek ir skirtingu jautrumu TRP kanalų modulatoriams [217, 218]. Ilgą laiką buvo manoma, kad TRPM6 kanalai funkciškai aktyviais tampa tik komplekse su TRPM7 [65, 216]. Tačiau mūsų tyrime nustatyta skirtinga TRPM6 ir TRPM7 šKB raiška ir tai, kad šių baltymų imunofluorescencinis signalas gali būti reguliuojamas priešingomis kryptimis (vieno sumažėjimas, o kito padidėjimas; žr. žemiau), atskleidžia, kad šie kardiomiocitų kanalai gali sudaryti ne tik heteromerus, bet ir homomerus. Be to, galimybė būti reguliuojamiems priešinga ir/ar ta pačia kryptimi taip pat yra įrodymas, kad mūsų tyrimuose naudoti antikūnai yra tinkami šių dviejų skirtingų šKB aptikimui.

Apibendrinant galime teigti, kad žmogaus ir kiaulės kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencinis švytėjimas buvo aptiktas naudojant antikūnus prieš TRPM6 arba prieš TRPM7. Tačiau, mes neaptikome žymėtų TRPM6 ir TRPM7 baltymų imunofluorescencijos signalo inkubuojant kardiomiocitus be pirminio antikūno arba naudojant bluokuojančius peptidus, kas leido įvertinti atitinkamai antrinio ir pirminio antikūno specifiškumą. Taigi, mūsų gauti duomenys pirmą kartą patvirtino, kad kardiomiocituose tikrai yra TRPM6 kanalo baltymas. Mes taip pat pirmą kartą nustatėme žmogaus ir kiaulės širdies visų keturių dalių kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB raišką.

4.2. TRPM6 ir TRPM7 kanalų baltymų raišką moduliuojančių veiksnių vertinimas

Gauti rezultatai atskleidė, kad įvairūs ekstraląsteliniai veiksniai (terpės joninė sudėtis, acidozė ir TRP kanalų blokatoriai), sukelia nepriklausomą žymėtų TRPM6 ar TRPM7 baltymų imunofluorescencijos signalo kitimą. Be to, mūsų tyrimų duomenys rodo atitikimą su elektrofiziologinių tyrimų duomenimis. Nustatyta, kad elektrofiziologinių tyrimų metu visi aukščiau paminėti veiksniai moduliavo sroves, tekančias per TRPM6 ir TRPM7 kanalus tiek kardiomiocituose [12–15, 219], tiek kitose širdies ląstelėse [11, 78, 110, 156].

Mūsų tyrime nustatytas joninės terpės sudėties poveikis kardiomiocitams, inkubuotiems su DV katijonais (padidėjęs TRPM6 ir TRPM7 imunofluorescencijos švytėjimas ląstelėse, kaip parodyta 3.2.1 pav.), yra priešingas,

nei anksčiau atliktuose tyrimuose, naudojant kitokio tipo ląsteles. Inkubuojant chondrocitus terpėje, kurioje yra maža DV katijonų koncentracija, buvo nustatyta padidėjusi *Trpm7* geno raiška [220]. Taip pat panašiomis eksperimentinėmis sąlygomis, į osteoblastus panašiose ląstelėse, inkubuotose terpėje, turinčioje mažai Ca^{2+} ir Mg^{2+} katijonų, buvo nustatytas TRPM7, bet ne TRPM6, šKB raiškos padidėjimas [221], o krūties vėžio epitelinių ląstelių inkubacija terpėje be Mg^{2+} sukėlė TRPM6 šKB raiškos padidėjimą [124]. Atsižvelgiant į TRPM6 ir TRPM7 kanalų vaidmenį, atliekant Ca^{2+} ir Mg^{2+} katijonų pernašos funkciją į ląsteles, šie pokyčiai gali būti interpretuojami kaip prisitaikantys procesai, skirti kompensuoti DV katijonų trūkumą arba sumažėjusį jų patekimą į ląsteles. Vis dėlto, lieka neaišku, kodėl mūsų tyrime TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencijos intensyvumas sumažėjo, o nepadidėjo, inkubuojant kardiomiocitus terpėje be DV katijonų. Tačiau, kiti pokyčiai, kuriuos sukelia DV katijonų pašalinimas (pvz., viduląstelinis Na^+ pokytis, kuris didėja, kai nėra DV katijonų išoriniuose tirpaluose [222]) arba signalinių kelių, susijusių su šių kanalų veikimu, pokyčiai) gali nulemti minėtus prisitaikymo procesus.

Nors mūsų atliktame tyrime nebuvo tirtas mažos ir padidintos Mg^{2+} koncentracijos poveikis kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB raiškai, kitų mokslinių tyrimų duomenimis, maža ekstraląstelinio Mg^{2+} koncentracija keičia kraujagyslių lygiųjų raumenų ir endotelio ląstelių TRPM7 raišką. Pavyzdžiui, parodyta, kad žmogaus bambos venos endotelio ląstelių (HUVEC, angl. *human umbilical vein endothelial cells*) TRPM7 (bet ne TRPM6) raiška buvo padidėjusi [223]. Tyrėjai interpretavo, kad minėti pokyčiai, kaip paaiškinta aukščiau, atsirado dėl prisitaikomumo. Tačiau, tiriant žmogaus mikrovaskulinės sistemos endotelio ląsteles (HMVEC, angl. *human microvascular endothelial cells*), buvo gauti priešingi rezultatai (sumažėjusi TRPM7 raiška) [224]. Šiuo metu, minėtiems skirtumams paaiškinimo nėra, išskyrus skirtingą oksidacinio streso, kurį padidina maža $[\text{Mg}^{2+}]_i$ HUVEC, bet ne HMVEC ląstelėse, poveikį [223]. Kalbant apie kardiomiocitus, reikia pažymėti, kad skirtingai nuo endotelio ląstelių, jie aktyviai nesidaugina. Taigi, viduląsteliniai jonų homeostazės pokyčiai vykstantys kardiomiocituose, galimai, prisideda palaikant kitokius procesus, lyginant su endotelio ląstelėmis, kur proliferacijos procesas vyksta ypač aktyviai.

Mūsų tyrime naudotos farmakologinės medžiagos (2-APB ir CAR), žinomos kaip TRP kanalų aktyvumo modulatoriai, sukėlė priešingą poveikį imunodetektuotų TRPM6 ir TRPM7 šKB fluorescencijos švytėjimo intensyvumui. Mes sąmoningai naudojome 500 μM 2-APB koncentraciją, nes literatūros duomenimis, būtent tokia koncentracija skirtingai veikia TRPM6 ir TRPM7 kanalų aktyvumą: reikšmingai didina srovių, tekančių per TRPM6 kanalus, tankį [11], bet mažina srovių, tekančių per TRPM7 kanalus, tankį

[164]. Mūsų duomenys apie 2-APB poveikį detektuotų TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumui, atitinka elektrofiziologinių tyrimų duomenis apie priešingą poveikį šiems kanalams. Įdomu tai, kad CAR, kaip ir 2-APB, taip pat kiekybiškai panašiai sumažino imunodetektuoto TRPM7 šKB, bet akivaizdžiai padidino TRPM6 šKB imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumą. Tačiau, kadangi nėra duomenų, patvirtinančių CAR poveikį TRPM6-panašioms srovėms, tekančioms per TRPM6 kanalą, neaišku ar taip pat egzistuoja atitiktis su elektrofiziologiniais duomenimis, kaip buvo nustatyta su 2-APB.

Atliktas tyrimas taip pat parodė, kad ląstelių inkubacinės terpės rūgštinimas iki pH 5 irgi sukėlė žymėtų TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumo pokyčius. Mūsų nustatyti TRPM7 šKB imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumo pokyčiai, atsirandantys dėl ekstraląstelinės terpės rūgštėjimo, yra tos pačios krypties, kaip ir TRPM7-panašios srovės [14]. Elektrofiziologiniais tyrimais nustatyta, kad ekstraląstelinės terpės rūgštėjimas didina žmogaus DP kardiomiocitų TRPM7-panašias sroves, kai išorinės perfuzijos fiziologiniuose tirpaluose yra DV katijonai [14, 15], bet mažina srovės amplitudę tirpaluose be DV katijonų [12, 14]. Tačiau, šiuo metu nėra jokių elektrofiziologinių tyrimų duomenų apie ekstraląstelinės acidozės poveikį srovėms tekančioms per TRPM6 kanalus, kai išorinės perfuzijos tirpaluose nėra DV katijonų, todėl tokia atitiktis taip pat nebuvo nustatyta.

Apibendrinant galime teigti, kad įvairūs ekstraląsteliniai veiksniai, kaip DV katijonų homeostazės pokyčiai, acidozė ir TRP kanalų blokatoriai (2-APB ir CAR), sukelia nepriklausomą žymėto TRPM6 ar TRPM7 baltymo imunofluorescencijos signalo moduliaciją arba ta pačia, ar priešinga kryptimi (vieną sumažina, o kitą padidina). Tai leidžia mums teigti, kad šie kardiomiocitų kanalai tarpusavyje nesusiję ir gali funkcionuoti nepriklausomai.

4.3. TRPM6 ir TRPM7 kanalų baltymų raiškos pokyčių, kai buvo patologinis širdies pakitimas, vertinimas

Gauti rezultatai atskleidžia tyrimų duomenų atitikimą tarp šKB raiškos ir srovių pokyčių kai yra lėtinė širdies liga (IŠL ir/ar PV). Pagal mūsų laboratorijoje anksčiau atliktų elektrofiziologinių tyrimų su žmogaus DP kardiomiocitais duomenis, lėtinės IŠL ir PV atveju buvo stebimas TRPM7-panašios srovės tankio padidėjimas [14], kaip ir imunodetektuotų TRPM6 ir TRPM7 šKB raiška (žr. 3.3.1 pav.). Mažai tikėtina, kad tiriamų šKB raiškos pokyčių skirtumas, nustatytas tarp kontrolinės (pacientai be IŠL) ir IŠL grupės pacientų, būtų paaiškintas nedideliu amžiaus skirtumu tarp abiejų tiriamųjų

grupių. Tuo labiau, kad vertinant TRPM6 ir TRPM7 šKB raišką, gautą taikant imunofluorescencijos ir ELISA metodus (žr. 3.3.2 lentelę), tarp amžiaus grupių (50–65 metų pacientai ir vyresni nei 65 metų pacientai) reikšmingas skirtumas nenustatytas, kai buvo tirtos tos pačios patologinės sąlygos (be IŠL, ar su IŠL). Nustatytas didesnis TRPM6 ir TRPM7 šKB raiškos lygis, sergant lėtine IŠL, išliko kiekvienoje amžiaus grupėje. Tačiau, dėl mažų amžiaus grupių imčių būtini papildomi tyrimai, siekiant patvirtinti, kad amžius neturi poveikio mūsų tyrime nustatyta šKB raiškai.

Kitas širdies patologinis pakitimas, lemiantis TRPM7 šKB raišką, yra PV. Nustatyta, kad *Trpm7* mRNR ir/arba šKB kiekis yra padidėjęs PV sergančių pacientų DP mėginių homogenatuose [15, 155] ir gyvūnų modelyje su SN [201]. Mes taip pat įvertinome lėtiniu PV sergančių pacientų ir kiaušės DP kardiomiocitų žymėtų TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumą imunohistocheminiuose preparatuose. Įdomu tai, kad abiem atvejais buvo aptiktas padidėjęs imunofluorescencijos švytėjimo intensyvumas lyginant su kontroline pacientų grupe (be PV). Be to, yra atitiktis tarp imunofluorescencinio intensyvumo padidėjimo ir TRPM7-panašios srovės pokyčių, užregistruotų elektrofiziologinių tyrimų metodais [14, 15, 156]. Tačiau, kalbant apie KS *Trpm7* raišką, literatūroje nėra vieningos nuomonės, nes kelios mokslininkų grupės gavo skirtingus rezultatus: *Trpm7* mRNR raiška buvo padidėjusi [202], sumažėjusi [24] ir visiškai neaptikta [212].

Vis dėlto, kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 kanalų vaidmuo širdies patogenezei lieka neaiškus. Širdies fibroblastų TRPM7 kanalų aktyvumas yra sietinas su uždegimu, fibroze ir PV [156], o baltymo struktūroje esantis fermentiškai aktyvus kinazės segmentas gali atlikti arba apsauginę [10], arba destruktivią funkciją [156]. Padidėjusi TRPM7 raiška širdyje taip pat siejama su didesne rizika išsivystyti skilvelinei aritmijai [202]. Remiantis kitų tyrėjų tyrimais, atliktais naudojant neuronus, kuriuose TRPM7 kanalai atlieka tarpininko vaidmenį tarp Ca^{2+} antplūdžio ir ląstelių žūtis išemijos metu [100], galima teigti, kad panašus mechanizmas gali veikti ir kardiomiocituose, tokiu būdu prisidedant prie ląstelių žūtis dėl miokardo išemijos ir/arba reperfuzijos. Ūminės išemijos poveikis kardiomiocitų TRPM7 ir TRPM6 šKB lieka nežinomas [201]. Tačiau lėtinės išemijos atveju, mūsų gauti tyrimų duomenys pirmą kartą pademonstravo padidėjusią IŠL sergančių pacientų kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB raišką [203]. Vėlgi, buvo pastebėtas gautų molekulinį ir elektrofiziologinių duomenų atitikimas. Atlikto tyrimo metu buvo nustatyta padidėjusi šKB raiška ir šie rezultatai dera su mūsų laboratorijoje anksčiau atliktų elektrofiziologinių tyrimų duomenimis apie padidėjusią IŠL sergančių pacientų kardiomiocitų TRPM7-panašios srovės tankį [14]. Kalbant apie reperfuziją, buvo nustatyta, kad ROS slopina

kardiomiocitų TRPM7 šKB raišką [225]. Priešingai, kita mokslinė grupė nustatė padidėjusią TRPM7 šKB raišką ilgalaikio oksidacinio streso sąlygomis [226].

Taigi, mūsų gauti tyrimų rezultatai patvirtina kitų mokslininkų pastebėjimą, kad PV didina žmogaus širdies audinių TRPM6 ir TRPM7 baltymų raišką. Mes savo tyrimais pirmą kartą pademonstravome, kad lėtinė širdies liga, tokia kaip IŠL, taip pat padidino abiejų tirtų baltymų raišką, o tai rodo, kad TRPM6 ir TRPM7 yra susiję su širdies ir kraujagyslių ligų patogenezė.

4.4. Mg^{2+} -jautrios srovės poveikio širdies elektriniams veikimo potencialams vertinimas

Mg^{2+} -jautrių TRPM6 ir TRPM7 kanalų vaidmuo širdyje dar nėra pilnai išaiškintas, ypač dėl abejotinos kardiomiocitų TRPM6 raiškos. Šiuo metu Mg^{2+} -jautrios srovės poveikis širdies elektriniam aktyvumui nėra žinomas. Mokslinėje literatūroje yra duomenų, kad neselektyvūs širdies katijoniniai kanalai gali prisidėti prie membranos RP palaikymo [227]. Tokiems neselektyviems kanalams gali būti priskiriami ir Mg^{2+} -jautrūs TRPM6- ir TRPM7-panašūs kanalai. Atsižvelgiant į tai, kad širdyje Mg^{2+} -jautri srovė neigiamų potencialų srityje yra labai maža, lyginant su didele I_{K1} srove, nereikėtų tikėtis, kad Mg^{2+} -jautrūs kanalai galėtų reikšmingai prisidėti prie foninio ne K^+ jonų pralaidumo, kai kardiomiocitai yra ramybės būsenoje. Tai patvirtina ir mūsų gauti duomenys, rodantys, kad Mg^{2+} koncentracijos padidinimas išorinės perfuzijos tirpaluose beveik nekeičia membraninio RP. Tačiau kitų audinių (pvz., kraujagyslių lygiųjų raumenų) neselektyvių katijoninių kanalų, iš kurių kai kurie yra panašūs į TRPM6 ir TRPM7 kanalus, indėlis RP palaikymui gali būti žymiai svarbesnis [228, 229].

Literatūroje yra duomenų, kad įvairūs neselektyvūs katijoniniai kanalai taip pat gali turėti poveikį širdies veikimo potencialams. Nustatyta, kad tempimo aktyvuoti neselektyvūs katijoniniai kanalai prisideda prie RP ir VP formavimo prieširdžių ląstelėse [230]. Tačiau Mg^{2+} -jautrių kanalų poveikis širdies elektriniams VP dar nėra žinomas. Mūsų atlikti imunofluorescenciniai tyrimai parodė, kad izoliuotų prieširdžių ir skilvelių kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 šKB raiška gali būti moduluojama inkubuojant juos ekstraląstelinėje terpėje be DV katijonų. Kadangi VP *plateau* fazėje grynoji jonų srovė yra maža, mes iškėlėme prielaidą, kad kai yra suaktyvinta Mg^{2+} -jautri srovė, dėl sumažėjusio $[Mg^{2+}]_v$, tai dideli vienvalencių katijonų srautai, tekantys per Mg^{2+} -jautrius kanalus teigiamų potencialų srityje, galimai, gali turėti reikšmingą poveikį VP. Mūsų gauti rezultatai patvirtino, kad širdyje Mg^{2+} -jautrių kanalų aktyvavimas ląstelėse dializuotose su ~ 0 mM $[Mg^{2+}]_v$

trumpino VPT. Tačiau, mažai tikėtina, kad VPT trumpėjo dėl iš ląstelės tekančios I_{K1} srovės padidėjimo, kai sumažėjus $[Mg^{2+}]_v$ yra pašalinamas jos blokavimas viduląstelinio Mg^{2+} . Tai galima paaiškinti tuo, kad endogeniniai poliaminai ir toliau užtikrintų pakankamą I_{K1} srovės blokavimą [231]. Be to, nustatyta, kad didelė $[Mg^{2+}]_i$ blokuoja iš ląstelės tekančias sroves (pvz., K^+ sroves), beveik neturėdama jokio poveikio į ląstelę tekančioms srovėms (pvz., L-tipo Ca^{2+} srovei) [210]. Gautų rezultatų pagrindu, galima daryti išvadą, kad kardiomiocituose, esant fiziologinei $[Mg^{2+}]_v$, srovės tekančios per TRPM6 ir TRPM7 kanalus beveik neturi poveikio VPT. Šie rezultatai dera su kitų tyrėjų duomenimis, apie srovės ir VP nekitimą, kai buvo kardiomiocitų kultūros TRPM7 geno mutacija [232].

Vis dėlto, svarbu išsiaiškinti kokiomis sąlygomis Mg^{2+} -jautrūs kanalai gali prisidėti prie širdies elektrinio aktyvumo. Tikėtina, kad esant fiziologinėms sąlygoms ($[Mg^{2+}]_v$ 0,8 mM; $IC_{50} \approx 0,25$ mM; [12, 233]) $[Mg^{2+}]_v$ stipriai blokuos šiuos kanalus. Tačiau Mg^{2+} -jautri srovė gali prisidėti prie VPT formavimo tuomet, kai dėl reguliacinių procesų ar kanalų mutacijų sumažėja jautrumas $[Mg^{2+}]_v$ arba, jei $[Mg^{2+}]_v$ itin sumažėja dėl ligų, tokių kaip lėtinė hipomagnezėmija. Iš tiesų, TRPM7 ir kiti giminingi gamtiniai kanalai yra pastoviai aktyvūs tokiose ląstelėse, kurių viduląstelinė jonų sudėtis (įskaitant $[Mg^{2+}]_v$) išlieka santykinai nepakitusi [76, 80, 119] ir tai leidžia manyti, kad, galimai, vyksta kiti reguliaciniai procesai. Mg^{2+} -jautrius kanalus širdies ląstelėse reguliuoja ne tik $[Mg^{2+}]_v$, bet taip pat ir pH pokyčiai bei membranos fosfolipidų metabolizmas [12, 121, 219]. Tačiau vis dar nėra žinoma, ar tokie reguliaciniai procesai gali sukelti pastovų šių kanalų aktyvumą. Mūsų tyrimo duomenys rodo, kad naudojant tirpalus be DV katijonų galima moduluoti TRPM6 ir TRPM7 kanalų raišką. Taigi, Mg^{2+} -jautrios srovės įtaka formuojant VP gali kisti priklausomai nuo ekstraląstelinės DV katijonų homeostazės būklės.

Ankstesni tyrimai parodė, kad kai yra užsitęsusi neuronų išemija, TRPM7 kanalus aktyvuoja laisvieji deguonies radikalai [234]. Iki šiol, funkcinis kardiomiocitų TRPM7 ir ypač TRPM6 vaidmuo yra mažiau suprantamas, lyginant su kraujagyslių lygiųjų raumenų ląstelėmis [211], neuronais ar kito tipo ląstelėmis [41, 235]. Molekuliniai ir elektrofiziologiniai TRPM7 kanalų tyrimai širdyje dažniausiai atliekami tik su fibroblastais. Įrodyta, kad TRPM7 aktyvacija žmogaus prieširdžių fibroblastuose sukelia fibrogenezę ir PV [156]. Be to, TRPM7-panašios srovės tankio variabilumas per žmogaus DP kardiomiocitų TRPM7 kanalus yra susijęs su klinikiniais duomenimis, nes šios srovės tankis buvo didesnis lėtinėmis ligomis kaip PV [14, 15] ir IŠL [14] sergančių pacientų kardiomiocituose.

Apibendrinant galime teigti, kad kardiomiocitų Mg^{2+} -jautri srovė beveik neturi poveikio membranos RP palaikymui. Be to, fiziologinėmis sąlygomis

Mg²⁺-jautri srovė, galimai, nedalyvauja formuojant širdies VP. Tačiau labai sumažėjus viduląstelinei Mg²⁺ koncentracijai, Mg²⁺-jautri srovė neabejotinai gali dalyvauti formuojant VP (ilginti VPT).

4.5. TRPM6 ir TRPM7 kanalų molekulinį ir elektrofiziologinių tyrimų atitikimo vertinimas

Aukščiau minėto atitikimo tarp įvairių eksperimentinių (inkubacinės terpės joninės sudėties, pH, TRP kanalų moduliatorių) ir patologinių (lėtinės širdies ligos) veiksnių poveikio detektuotų šKB imunofluorescencijos intensyvumui, ir srovėms per tuos kanalus, interpretacija yra sudėtinga. Daugelis elektrofiziologinių pokyčių, kuriuos sukelia minėti veiksniai, gali būti gauti per kelias sekundes, todėl mažai tikėtina, kad jie būtų susiję su šKB raiškos pokyčiais. Tačiau tikėtina, kad registruojant biofizikinius parametrus, susijusius su kanalo pora, per daugelį minučių užfiksuotas poveikis, remiantis šio tyrimo rezultatais, taip pat gali sukelti ir šKB tankio pasikeitimą membranoje. Šiuo metu nėra žinoma, ar įvairūs veiksniai gali nulemti jonų apykaitą tarp viduląstelių ir užląstelių katijonų telkinių (angl. *pools*) per TRPM6 ir TRPM7 kanalus. Pavyzdžiui, 2-APB poveikis gali būti paaiškintas tuo, jog šio junginio prisijungimas prie ryšio vietos kanale gali skatinti vieno šKB internalizaciją, bet slopinti kito šKB internalizaciją.

Taip pat gali būti, kad detektuotų TRPM6 ir TRPM7 šKB imunofluorescenciniai pokyčiai ląstelėse, inkubuotose su 2-APB arba CAR, gali atsirasti ir dėl šių farmakologinių medžiagų sukeltų baltymų konformacijų, kurios gali nulemti tyrime naudotų antikūnų prisijungimą. Tačiau, tai nebūtų tinkamas paaiškinimas, kodėl kinta tų šKB raiška kai yra išeminis miokardo pažeidimas. Manoma, kad sergant IŠL, įvyksta realus šKB raiškos pokytis. Išorinės terpės rūgštėjimas labai padidina srovę per TRPM6- ir TRPM7-panašius kanalus, sumažindamas kanalo jautrumą DV katijonų blokvimui ir padidindamas vienavalenčių jonų, tokių kaip Na⁺, ir, galbūt, paties H⁺, pralaidumą [49]. Daroma prielaida, kad protonai ir Ca²⁺ tiesiog konkuruoja dėl bendros ryšio vietos, iš kurios blokuojantį poveikį sukelia Ca²⁺, bet ne H⁺. Jei mūsų hipotezė, paaiškinanti pakitusią TRPM6 ir TRPM7 šKB raišką, yra teisinga, tuomet inkubacijos su didesne protonų koncentracija poveikis yra sudėtingesnis, ir taip pat gali būti susijęs su baltymų konformacijos pokyčiais.

IŠVADOS

1. Atliktais tyrimais mes pirmieji identifikavome žmogaus ir kiaulės kardiomiocitų TRPM6 kanalo baltymą. Taip pat pirmą kartą nustatėme visų keturių širdies dalių (prieširdžių ir skilvelių) TRPM6 ir TRPM7 kanalų baltymų raišką. Didesnė šių kanalų baltymų raiška buvo nustatyta dešiniuosiose širdies dalyse.
2. Įvairūs moduluojantys veiksniai (terpės joninė sudėtis, acidozė ir TRP kanalų blokatoriai, tokie kaip 2-APB ir karvakrolis) turėjo skirtingą poveikį žmogaus ir kiaulės kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 kanalų baltymų imunofluorescencijos intensyvumui. Todėl galima teigti, kad šie kanalai nėra tarpusavyje susiję, bei gali funkcionuoti nepriklausomai vienas nuo kito.
3. Lėtinė širdies liga (IŠL ir PV) didina žmogaus ir kiaulės kardiomiocitų TRPM6 ir TRPM7 kanalų baltymų raišką, o tai gali nulemti širdies ir kraujagyslių ligų patogenezę.
4. Fiziologinėmis sąlygomis kiaulės kardiomiocitų Mg^{2+} -jautri srovė galimai nedalyvauja formuojant širdies elektrinį aktyvumą. Tačiau prie pataloginių sąlygų (lėtinė hipomagnezemija) ar kanalų mutacijų, kai sumažėja viduląstelinė Mg^{2+} koncentracija, Mg^{2+} -jautri srovė gali dalyvauti formuojant širdies veikimo potencialus.

TYRIMO TRŪKUMAI

Tyrimo metu, grupuojant pacientų širdies audinio mėginius, buvo atsižvelgta tik į kliniškai patvirtintą pagrindinę diagnozę. Dėl šios priežasties, mėginiai nėra visiškai homogeniški. Siekiant didinti homogeniškumą, reikėtų plėsti tiriamąsias grupes ir grupuoti mėginius atsižvelgiant į pacientų gretutines ligas bei taikytą medikamentinį gydymą. Taip pat reikėtų atkreipti dėmesį ir į širdies remodeliavimosi (angl. *remodeling*) laipsnį (pvz., kompensacinė hipertrofija) ir kitų patologinių sąlygų sukeltus persitvarkymus, kurie gali skirtis priklausomai nuo pacientų grupės ir neabejotinai nulemti TRPM6 ir TRPM7 šKB raišką.

Mūsų tyrime, TRPM6 ir TRPM7 šKB žymėjimui žmogaus ir kiaulės širdyse buvo naudojami tie patys antikūnai. Tačiau, šie antikūnai yra sukurti TRPM6 ir TRPM7 šKB nustatymui žmogaus širdies ląstelėse/audiniuose ir nėra jokių publikuotų duomenų apie jų specifiškumą šiems šKB kiaulės širdyje. Šiuo metu, rinkoje apskritai nėra jokių TRPM6 šKB specifiškų antikūnų, skirtų šKB identifikacijai kiaulės širdies ląstelėse ir/ar audiniuose. Vis dėlto, atsižvelgiant į tai, kad kiaulės genomai turi daug panašumų su žmogaus genomu (84,1 proc. homologiškų genų) [205] ir tai, kad daug antikūnų gali atpažinti tiek žmogaus, tiek kiaulės širdyje esančius skirtingus epitopus [204], mes naudojome polikloninį TRPM6 antikūną (skirtą baltymo nustatymui žmogaus, pelės ir žiurkės ląstelėse/audiniuose), kuris, būdamas polikloninis, galimai galėtų prisijungti ir prie epitopų esančių kiaulės širdyje. Imuniniu metodu žymėtų šKB specifiškumo patvirtinimui, buvo atlikta dviguba neigiama kontrolė: 1) inkubuojant ląsteles be pirminio antikūno, kas leido įvertinti antrinio antikūno specifiškumą ir 2) naudojant TRPM6 ir TRPM7 blokuojančius peptidus, kas leido įvertinti pirminio antikūno specifiškumą. Abiem atvejais, uždėjus antrinius antikūnus su fluorescencine žyme, nebuvo nustatytas imunofluorescencinis švytėjimas.

Dar vienas šio tyrimo trūkumas siejamas su tuo, kad šiuo metu nėra farmakologinių medžiagų, kurios specifiškai blokuotų Mg^{2+} -jautrius kanalus. Atliktame tyrime, mes naudojome padidintą Mg^{2+} koncentraciją ekstraląsteliniame tirpale, kaip įrankį Mg^{2+} -jautriai srovei izoliuoti. Dėl to, galėjo susidaryti dviguba problema, nes $[Mg^{2+}]_i$ is taip pat blokuoja I_{CaL} ir I_K sroves. Tačiau, šiame tyrime, $[Mg^{2+}]_i$ is poveikis VP, kurį nulėmė I_{CaL} ir I_K srovių blokavimas, galimai buvo pakankamai gerai subalansuotas, nes šių srovių įtaką buvo galima atskirti nuo Mg^{2+} -jautrios srovės.

SUMMARY

INTRODUCTION

To date, the role of transient receptor potential (TRP) proteins [1] in the heart has been explored in fibroblasts and in pacemaker cells [2], but much less in cardiomyocytes, because there is no pharmacological agents which allow their isolation from multiple other ion channels expressed in cardiomyocytes.

TRPM7 and its homologue TRPM6 belong to the melastatin subfamily of TRP channels, and both are regulated by intracellular magnesium and are distinguished from other ion channels by unusual bifunctional activities, ion channel and protein kinase [3]. Both are permeable to Ca^{2+} and Mg^{2+} , and have now been identified as critical regulators of Mg^{2+} homeostasis, but their tissue expression levels appear to be different. Current evidence shows that TRPM7 is ubiquitously expressed in all mammalian cells, with the highest expression in the heart and kidney [4, 5], whereas TRPM6 expression is restricted to epithelial cells of the kidney, placenta and intestine [6, 7]. TRPM7 and TRPM6 are reported to play a role in various physiological or pathological processes, including intracellular Ca^{2+} and Mg^{2+} homeostasis [8], pacemaking [9], fibrosis and inflammation [10], etc. To date, the functional characterization of these channels has relied mainly on electrophysiological methods [11], including in cardiac myocytes [12–15]. In addition, in native cardiomyocytes the majority of TRPM6 and TRPM7 proteins appear to reside in intracellular vesicles [15–17], and are therefore inaccessible to patch-clamp recordings.

Like heterologously expressed TRPM6 and TRPM7 channels, cardiomyocyte TRPM6- and TRPM7-like channels are typically activated by low intracellular Mg^{2+} conditions and conduct small inward currents carried by divalent cations (DV) and large outward currents carried by monovalent cations. Cardiomyocyte Mg^{2+} -sensitive channels have been detected in various species, including human, rat, pig, guinea pig, and mouse. However, the nature of the proteins underlying the cardiac Mg^{2+} -sensitive, TRPM6- and TRPM7-like currents and the functional consequences of their cation fluxes have remained unclear.

To date, studies of TRPM6 and TRPM7 channel expression either in undiseased [18] or diseased [19] human heart has relied mainly on the genomic approach. However, data on *Trpm6* or *Trpm7* mRNA and protein expression in different parts of the heart has remained scant, and conflicting results have been reported, especially concerning TRPM6. In both animals and humans, some studies found that *Trpm6* mRNA was undetectable in the heart [20–22],

whereas one study identified *Trpm6* mRNA and protein in the human heart and showed their increase in right atrial (RA) homogenates from patients with atrial fibrillation (AF) [23]. In most others studies information of TRPM6 was not included [19, 24]. Thus, the presence of TRPM6 in the heart remains controversial and, more specifically, whether it and TRPM7 are expressed in all chamber walls of the heart is an open question.

In this work, by using different molecular approaches, we examined the expression of TRPM6 and TRPM7 proteins in human and porcine heart tissues and single cardiomyocytes and also examined the contribution of the Mg^{2+} -sensitive, TRPM6-, and TRPM7-like currents on the cardiac action potential (AP) formation.

AIM AND OBJECTIVES

Aim of the study:

To determine the expression of TRPM6 and TRPM7 channel proteins in human and porcine cardiomyocytes and evaluate possible changes in the expression of these channels in cardiac pathology as well as their role in cardiac electrophysiology.

Objectives and tasks of the study:

1. To examine whether TRPM6 is expressed in human and porcine cardiomyocytes. To determine its expression and that of TRPM7 channels in various parts of the heart.
2. To examine and evaluate the effect of factors modulating the TRPM6 and TRPM7 channel expression.
3. To evaluate the possible change in the expression of TRPM6 and TRPM7 channel proteins under cardiac pathology.
4. To determine and evaluate the role of Mg^{2+} -sensitive current on the formation of the cardiac action potentials.

Scientific novelty

The role of Mg^{2+} -sensitive TRPM6 and TRPM7 channels in the heart has not been elucidated, especially due to the uncertainty about TRPM6 expression in cardiomyocytes. We examined the mRNA and protein expression of both of these channels in right atria samples from patients with or without chronic diseases (ischaemic heart disease, IHD, or AF), and in the four-chamber walls of the explanted human hearts. We also evaluated the compatibility of these data with data obtained from pig, whose cardiovascular system and genetic conservation are quite close to the human genome. Using immuno-

labeling with anti-TRPM6 or anti-TRPM7 antibodies we detected TRPM6 and TRPM7 proteins by immunofluorescence in both human and porcine cardiomyocytes and by immunohistochemistry in tissue sections. In contrast, no fluorescence signal was detected by incubating cardiomyocytes without the primary antibody or by blocking the test proteins with their peptides. Our results confirm for the first time that cardiomyocytes indeed contain TRPM6 channel protein. We also found for the first time that both TRPM6 and TRPM7 proteins are expressed in all four-chamber walls of the human or the porcine heart.

The results also revealed that various extracellular factors (medium ionic composition, acidosis, and TRP channel blockers) cause independent and often opposite modulation of TRPM6 or TRPM7 protein immunofluorescence. This allows us to suggest that in cardiomyocytes these channels are unrelated and can function independently. Besides, our study shows a concordance between pharmacological effects on the measured expression level and electrophysiological effects on channel currents.

There is also concordance between effects of chronic disease on channel expression and on channel currents. The present study provides new knowledge about the remodeling of TRPM6 and TRPM7 proteins associated with cardiac pathologies (namely chronic IHD and AF). IHD increased the expression of both proteins, suggesting that TRPM6 and TRPM7 are involved in the pathogenesis of the cardiovascular disease.

Our research has also shown that Mg^{2+} sensitive current may contribute to the action potential. However, a key question concerns the conditions under which the Mg^{2+} -sensitive channels may contribute to cardiac electrical activity. The Mg^{2+} -sensitive current may contribute to action potential duration (APD) if the sensitivity for intracellular Mg^{2+} is decreased by pathological conditions or channel mutations, or if intracellular Mg^{2+} concentration is decreased to low levels by a disease such as chronic hypomagnesemia. Thus, the results confirm that Mg^{2+} -sensitive channels in the heart are involved in the regulation of electrical activity. The effect of the Mg^{2+} -sensitive current on the APD may be important in understanding the therapeutic processes in which Mg^{2+} is used to treat arrhythmias, as well as in linking the changes in Mg^{2+} homeostasis to other cardiac diseases.

2. METHODOLOGY

The study was carried out in accordance with the European Community guiding principles outlined in the Declaration of Helsinki and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH). All experiments on pigs were performed according to the European Community guiding principles and

approved by the State Food and *Veterinary* Service of the Republic of Lithuania (No. G2-68, 21 June 2017). Experiments on human atrial samples and on samples from explanted human hearts were approved by the Ethics Committee of Biomedical Research of Kaunas Region, Lithuania (No. BE-2-71, 22 December 2017).

Gene expression

Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect the mRNA levels of *Trpm6* and *Trpm7* in human heart muscle. The total RNA was isolated using the mirVana™ miRNA isolation kit (Thermo Fisher Scientific, Lithuania) and acid phenol: CHCl₃ premix (Ambion, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. RNA integrity was assessed using a 2100 Agilent Bioanalyzer System (Agilent Technologies Inc., USA). The RT-PCR reaction was used TaqMan® Assays (Hs01019356_m1; Hs00559080_m1; Hs99999903_m1; Thermo Fisher Scientific, USA). RT-PCR was performed by a ABI 7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, USA) based on the manufacturer's procedure in 20 µl reaction mixture. *β-actin* was used as the internal control. The relative expression of target genes was calculated using ΔCt method ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$).

Western Blot

The total protein of human heart tissue (42 µg) was separated by SDS-PAGE gel electrophoresis and transferred onto a polyvinylidene fluoride (Roche Diagnostics GmbH, Germany) membrane. The membrane was incubated with primary antibody (mouse monoclonal anti-TRPM7 [ThermoFisher, Rockford, USA], 1:200; rabbit polyclonal anti-TRPM6 [Alomone Labs, Israel], 1:500; mouse monoclonal β -actin (ThermoFisher, Rockford, USA), 1:1000) overnight (4 °C) and then incubated with horse radish peroxidase (HRP)-labeled IgG secondary antibodies (goat anti-mouse (Bio-Techne Ltd, UK), 1:2000; goat anti-rabbit [Bio-Techne Ltd, UK], 1:2000) for 1 hour at room temperature. Detection was done using chemiluminescent Amplex Red substrate (Thermo Fisher scientific, USA). Analysis was performed using UVP imaging system and Vision WorksLS Software (Ultra-Violet Products Ltd, UK).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA kits (MyBioSource, Inc., USA) were used to quantitatively determine concentrations of TRPM6 and TRPM7 in human tissue homogenates. Optical signals were recorded with a spectrometer (Multiskan MF, Thermo Fisher Scientific, Finland) at a wavelength of 450 ± 10 nm. The levels

of TRPM6 and TRPM7 were determined according to instructions provided by the ELISA kits: TRPM6 (MBS457214) and TRPM7 (MBS457216). After measuring the optical densities of the standard solutions, a standard curve was drawn using the Curve Expert 1.4 software (Daniel G. Hyams, Hyams Development, USA). The concentrations of TRPM6 and TRPM7 in the tissue homogenates were then determined by comparing the optical density of the samples to the standard curve.

Histology and Immunohistochemistry

For histological analysis, specimens of formalin-fixed and paraffin-embedded human heart muscle tissues were sliced in 3 μm and placed onto Super Frost Plus slides (Menzel, Germany). Collected tissue sections were deparaffinized and stained with hematoxylin-eosin (H & E) and Picro Sirius Red. Immunohistochemical staining was performed using Shandon Coverplate plates (Thermo Fisher Scientific, USA). The sections were incubated with primary rabbit polyclonal TRPM7 antibody (1:250 dilution; NBP1-20224, Novus Biologicals, USA) or primary mouse monoclonal TRPM6 antibody (1:50 dilution; sc-365536, Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA). The preparations were then processed with the DAKO EnVision Flex and DAKO EnVision Flex + visualization system (Agilent Technologies Inc., USA) for TRPM7 and TRPM6, respectively. Probed sections were additionally stained with Mayer's hematoxylin. The IgG of the same isotype as the primary antibody dilution solution served as negative control. The histopathological evaluation was performed using OlympusBX61 and Olympus FV1000 (Olympus Corporation, Japan) microscopes.

Immunofluorescence

Enzymatically dissociated cardiomyocytes were allowed to settle on the bottom of 8-chamber slides. The cells were permeabilized and incubated with primary rabbit polyclonal anti-TRPM7 (#ACC-047; Alomone Labs, Israel) or rabbit polyclonal anti-TRPM6 antibodies (#ACC-046; Alomone Labs, Israel). The cells were incubated with a fluorescently labeled secondary antibody (donkey anti-rabbit IgG; Alexa Fluor 488; A21206, Invitrogen, USA or goat anti-rabbit IgG; Alexa Fluor 546; A22283, Invitrogen, USA) co-stained (for 20 min) with Phalloidin-Alexa Fluor 546 (A22283, Invitrogen, USA) or Phalloidin-CF 405 (00034, Biotium, USA) and with Hoechst 33342 (B2261, Sigma-Aldrich, USA) for labeling of the F-actin cytoskeleton and of the nucleus, respectively. Cardiomyocytes were visualized under a confocal laser scanning microscope (Olympus FV1000, Olympus Corporation, Japan) from which images were taken using the same scanning parameters for both the

TRPM7 and TRPM6 proteins. The distribution of the fluorescence was analyzed using Image J software.

Electrophysiology

Whole-cell currents were recorded under a voltage-clamp, and the action potentials were recorded under a current-clamp. The membrane currents of interest (TRPM6- and TRPM7-like) were measured using 2 s descending voltage ramps from +80 mV to -120 mV applied every 10 s after a 600 ms pre-step at 0 mV from a holding potential of -80 mV, designed to inactivate voltage-dependent Na⁺ and L-type Ca²⁺ currents. The action potentials were induced by stimulating with a 2 ms rectangular pulse at a frequency of 1 Hz. The action potential duration (APD) was measured at 30% (APD₃₀), 50% (APD₅₀), and 90% (APD₉₀) repolarization. The current and voltage protocols were generated and data recorded online using the Axopatch 200B amplifier and pClamp 8.1 software via the Digidata 1322A acquisition system (Axon instruments, USA).

Data analysis

Average data are presented as mean ± standard error of the mean (SEM). Means were compared using the two-tailed *t*-test or ANOVA for evaluating differences between groups. *P* < 0.05 was taken as threshold for statistical significance.

3. RESULTS

3.1. Molecular detection of TRPM6 and TRPM7 channels in the heart

The expression of the genes encoding TRPM6 and TRPM7 protein in the human heart has been poorly studied. *Trpm6* is generally thought not to be expressed in the heart. For this reason, we first examined whether TRPM6- and TRPM7-specific mRNA can be detected in cardiac tissues from explanted human hearts (n = 3). Using RT-qPCR (see Methodology) with primers designed for the human genes, both *Trpm6* and *Trpm7* mRNAs were detected in cardiac tissues obtained from all four cardiac chamber walls. *Trpm7* mRNA expression was more than 2–4 fold higher in ventricular tissues compared to atria. Also, *Trpm7* has a higher expression level compared to *Trpm6* (see Fig. 6c and Table S6 in [203]). These data demonstrate for the first time that *Trpm6*, like *Trpm7*, is expressed in all four chambers of the human heart.

After confirming the expression of *Trpm6* and *Trpm7* in the heart, we wanted to check whether the results could be validated using another techni-

que. For this purpose, an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; see Methodology) was used. Qualitative and quantitative analysis of TRPM6 and TRPM7 proteins was performed using cardiac tissue homogenates obtained from the human hearts. Both TRPM6 and TRPM7 proteins were detected by ELISA in all four chambers of the human heart (see Fig. 6a-b and Table S5 in [203]). Also, as in mRNA studies, TRPM6 expression was much lower than TRPM7. Besides, higher expression levels of TRPM6 and TRPM7 proteins were detected in the right chambers (309.8 ± 18.51 pg/mL and 1269.86 ± 74.03 pg/mL for right atrial (RA), and 322.85 ± 21.23 pg/mL and 1070.05 ± 99.66 pg/mL for right ventricular (RV), respectively) compared to the left chambers (201.53 ± 20.18 pg/mL and 754.22 ± 63.72 pg/mL for left atrial (LA), and 274.69 ± 12.05 pg/mL and 947.90 ± 59.50 pg/mL for left ventricular (LV), respectively, $n = 6-47$, $P < 0.05$). In addition, qualitative expression of TRPM6 and TRPM7 proteins was confirmed by Western Blot. The data confirm that both TRPM6 and TRPM7 proteins are expressed in all four chambers of the human heart, with higher expression for TRPM7.

To further demonstrate TRPM6 and TRPM7 expression in the human heart, histologic preparations of ventricular and atrial tissues were exposed to primary antibodies and stained with Mayer's hematoxylin (see Methodology). Color intensity analysis of TRPM6 and TRPM7 in tissues showed noticeable brownish pigments in the intracellular space of cardiomyocytes in tissues from the four-chamber walls of the human heart (see Fig. 7 and Fig. 8 in [203]). Again, these data demonstrated for the first time the expression of both TRPM6 and TRPM7 proteins in the heart.

It is important to note that gene detection (by RT-PCR) or protein level detection (by ELISA), obtained in tissue homogenates, are likely less specific than cardiomyocyte immunostaining. This is because tissue homogenates contain not only cardiomyocytes but also other types of cells (e. g., fibroblasts, vascular endothelial cells, etc.). For this reason, further, we used an immunofluorescence assay to demonstrate the expression of TRPM6 and TRPM7 proteins in atrial and ventricular cardiomyocytes (see Methodology).

Fig. 3.1.1 shows typical examples of the immunofluorescence of TRPM6 and TRPM7 proteins obtained using the non-conjugated antibodies in isolated cardiomyocytes from atrial and ventricular tissues of the human heart. The immunofluorescence intensity of the TRPM6 is much lower than that of the TRPM7 (for mean data see below). Noticeably, the immunofluorescence of TRPM6 protein, in contrast to TRPM7, in about half cases (44.7 % from ~400 cells; see Fig. 3.1.1 A, B arrows) appeared to be highest in the perinuclear area. This indicates that part of the detected fluorescence is from the intracellular membranes.

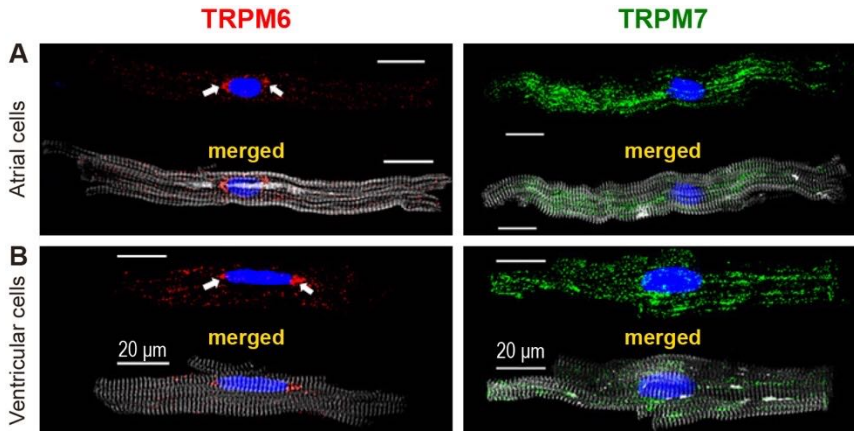


Fig. 3.1.1 Immunofluorescence of TRPM6 and TRPM7 proteins expression in human cardiomyocytes

Representative examples of immunofluorescence obtained with non-conjugated antibodies in left atrial (A) and left ventricular (B) cardiomyocytes of the human heart. Image acquisition performed using confocal laser scanning microscope (Olympus FV1000). Alexa Fluor 546 and Alexa Fluor 488 for TRPM6 and TRPM7 proteins appear in red and green, respectively. Alexa Fluor 405 for F-actin cytoskeleton appears in surrogate grey. Hoechst 33342 for nuclei appears in blue (the arrowheads indicate the localization of TRPM6 protein in the perinuclear area). Scale bars indicate 20 μm.

We also verified whether similar expressions of TRPM6 and TRPM7 proteins could be obtained with the conjugated antibodies. This allowed us to simultaneously detect both TRPM6 and TRPM7 proteins expression in the same cell. Typical examples of the immunofluorescence of both proteins obtained using conjugated antibodies in human cardiomyocytes obtained from the four heart chamber walls are shown in Fig. 3.1.2 A.

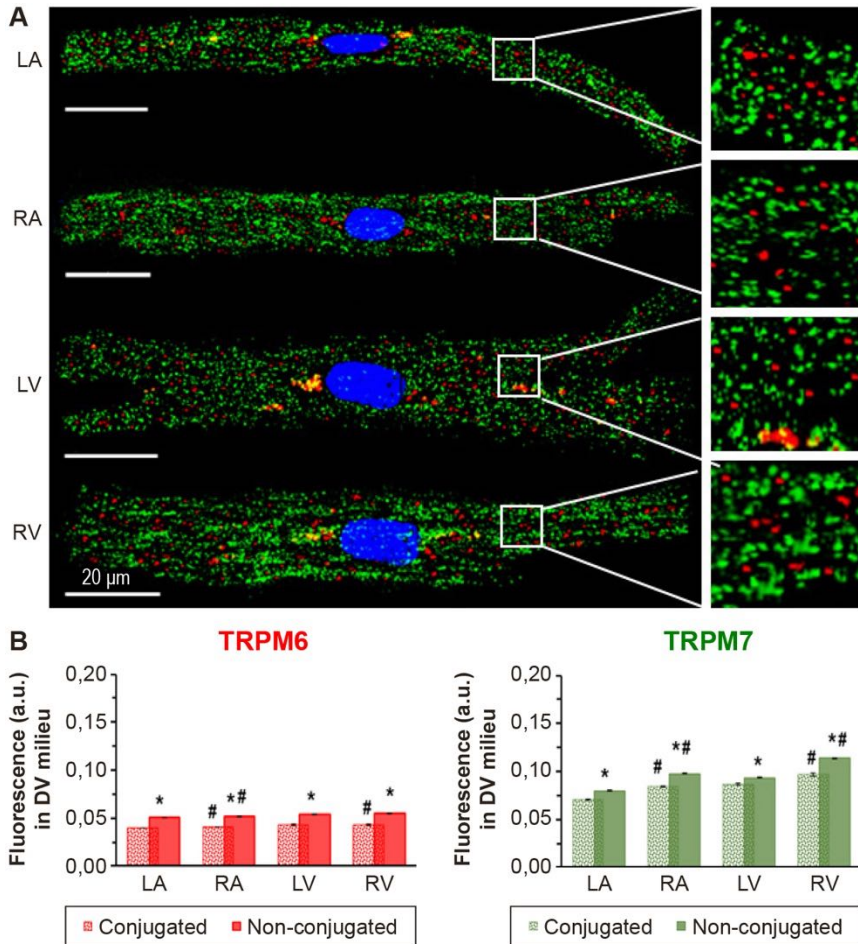


Fig. 3.1.2. Immunofluorescence images showing co-expression of both TRPM6 and TRPM7 proteins detected with conjugated antibodies in human cardiomyocytes

(A) Typical examples demonstrating co-expression of both TRPM6 (red) and TRPM7 (green) proteins in the same cardiomyocyte: from the left atrium (LA), right atrium (RA), left ventricle (LV), and right ventricle (RV) of the human heart. (B) Quantification of the staining intensity of the immunodetected conjugated antibodies (spotty columns) and non-conjugated antibodies (smooth columns) for both proteins in cardiomyocytes as indicated. Image acquisition performed using confocal laser scanning microscope (Olympus FV1000). Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 546 for the TRPM7 and TRPM6 protein appear in green and red, respectively. Hoechst 33342 for nuclei appears in blue. Mean data (n = 4–105) provided in arbitrary units (a.u.) (see Table S2 in [203]). * $P < 0.001$ conjugated antibodies vs. non-conjugated antibodies, # $P < 0.001$ right sided vs. left sided heart chambers. Scale bars indicate 20 μm .

Like with non-conjugated antibodies, levels of TRPM7 were higher *vs.* those of TRPM6. However, as presented in Fig. 3.1.2 B, the total fluorescence level was slightly lower for both proteins with the conjugated compared with the non-conjugated primary antibodies. In general, the results provide consistent evidence for a co-expression of both TRPM6 and TRPM7 in cardiomyocytes from the four chamber walls of the human heart.

In the next set of experiments, we aimed to search for the TRPM6 channel expression, by using quite young and healthy animals. The porcine heart was chosen, because of the similarity to the coronary system [204] and to genetic conservation [205] like in humans. Currently, there is in the literature no published data on TRPM7, especially on TRPM6 protein expression in pig cardiomyocytes.

As in the experiments with the human cardiomyocytes, to show the presence of TRPM6 and TRPM7 proteins, we used the immunostaining of the atrial and ventricular cardiomyocytes, performed after 2 h of cell isolation. Besides, we used the same antibodies as in the experiments with the human cells/tissues. Fig. 3.1.3 A–D shows immunofluorescent images of TRPM6 (left panels) and TRPM7 (right panels) of pig cardiomyocytes. Fig. 3.1.3 E shows a negative control (cardiomyocyte incubated in conditions similar to those of Fig. 3.1.3 A–D but with no primary antibody added in the incubation medium). The images show that all pig cardiomyocytes, like human cardiomyocytes, displayed staining with antibodies for TRPM6 and TRPM7. Again, the TRPM6 protein expression was noticeable lower than that in human cardiomyocytes. This could be due to the low expression of TRPM6 protein in the porcine heart. In addition, there was the multinucleated nature of the cells, as was previously noted for the pig cardiomyocytes [206].

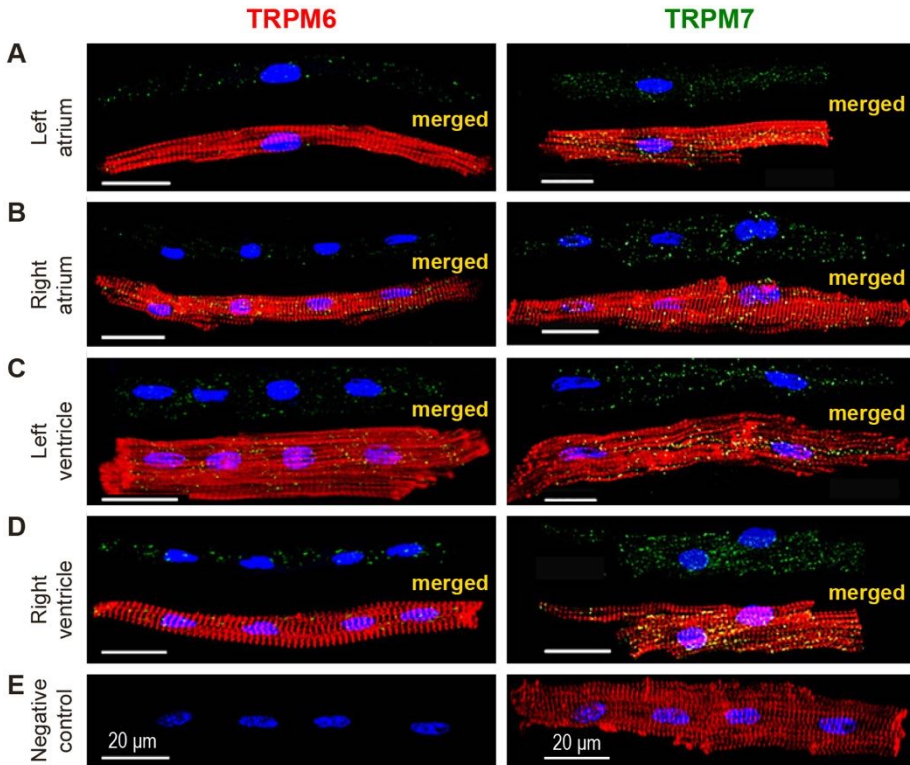


Fig.3.1.3 Immunofluorescence of TRPM6 and TRPM7 proteins in pig cardiomyocytes

Immunofluorescence images suggesting the presence of TRPM6 (*left*) and TRPM7 (*right*) proteins in pig cardiomyocytes from different cardiac chamber walls. (A–D): left atrium, right atrium, left ventricle, and right ventricle using Alexa Fluor 488 for TRPM6 and TRPM7 proteins (*stained in green*), Alexa Fluor 546 for the F-actin cytoskeleton (*stained in red*), and Hoechst 33342 for the nuclei (*stained in blue*). (E) Example of a negative control, where the primary antibody for TRPM6 and/or TRPM7 is not added, but the cardiomyocyte was subjected to Hoechst 33342 and Alexa Fluor 546. Notice that only immunofluorescence of the nuclei (*stained in blue*) and F actin cytoskeleton (*stained in red*) is detected. For mean values see in [210]. Scale bars indicate 20 μm.

Finally, we also tried to demonstrate the location at the cellular membrane. Typical examples of the immunofluorescence of both the TRPM6 (red fluorophore) and TRPM7 (green fluorophore) proteins expression obtained simultaneously in the same human cell using conjugated antibodies are shown in Fig. 3.1.4 (A and B).

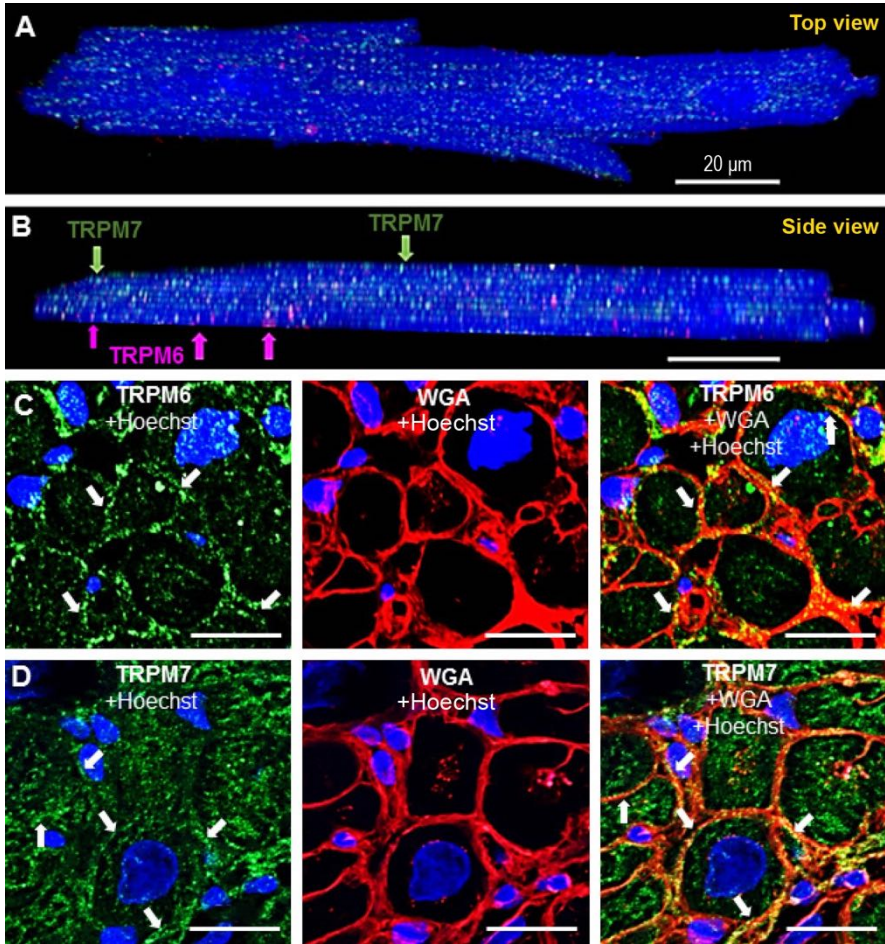


Fig. 3.1.4. Illustration of localization of TRPM6 and TRPM7 channels at the cell membrane in the same cardiomyocyte and in perpendicular tissue sections

Immunofluorescence in isolated cardiomyocyte (**A** – top view and **B** – side view) shows localization of TRPM6 and TRPM7 proteins under co-staining with conjugated antibodies (Alexa Fluor 546 and Alexa Fluor 488 for the TRPM6 and TRPM7 proteins appear in pink and green, respectively). Arrows indicate the localization of TRPM6 (pink) and TRPM7 (green) proteins in the cell membrane. Alexa Fluor 405 for F-actin cytoskeleton appears in blue. (**C**, **D**) show fluorescence images of immunolabeled TRPM6 and TRPM7 proteins, obtained from the RA tissues on the perpendicular slices, Alexa Fluor 488 for the TRPM6 and TRPM7 protein appear in green, Alexa Fluor 555 for the cell membrane surface labelling with wheat germ agglutinin (WGA) appear in red, and Hoechst 33342 for the nucleus staining appear in blue. Note: The membrane staining option was chosen for visualisation of cardiomyocyte contour. Arrows indicate channel localization in the cell membrane. Image acquisition performed using confocal laser scanning microscope (Olympus FV1000). Scale bars indicate 20 μm .

Color intensity analysis of TRPM6 and TRPM7 expression showed noticeable pink/green pigments in the intracellular space and to a much smaller amount in cell membrane (indicated by pink and green arrows). While Fig. 3.1.4 (C and D) show representative images of immunolabeled TRPM6 and TRPM7 proteins (green fluorophore), obtained from the RA tissues of human heart on the perpendicular tissue sections using non-conjugated antibodies. For the cell membrane surface labelling we used wheat germ agglutinin (WGA; appear in red). We demonstrate, that TRPM6, as well as TRPM7 proteins expression by immunohistochemistry in tissue sections, like in isolated cells, are inhomogeneously distributed mainly in the intracellular structures of cardiomyocytes, viewed by green fluorescence pigments. However, the expression also could be detected in the cell membrane region as well, but to a much smaller amount (indicated by white arrows).

Summarizing, our results confirm for the first time that cardiomyocytes indeed contain TRPM6 channel protein. We also found for the first time that both TRPM6 and TRPM7 proteins are co-localized in the cardiomyocytes in the four chamber walls of explanted human hearts as well as in all chambers of the pig heart. However, that expression in the porcine heart is noticeably lower. The predominant intracellular localization of TRPM6 and TRPM7 proteins in human and pig cardiomyocytes could indicate that both channels functions as intracellular channels.

3.2. Modulation of TRPM6 and TRPM7 channel expression by experimental conditions

According to the literature, the activity of TRPM6 and TRPM7 channels is regulated by Ca^{2+} and Mg^{2+} as well as by other divalent cations [75–77]. Therefore, here we also investigated the immunofluorescence of TRPM6 and TRPM7 proteins under different ionic compositions of the cell incubation medium (i.e., divalent cation-containing (DV) or divalent cation-free (DVF) extracellular conditions). We measured the immunostaining level of both TRPM6 and TRPM7 proteins of the atrial and ventricular cardiomyocytes, performed at 2 hours or at 12 hours after cell isolation. As presented in Fig. 3.2.1, the immunofluorescence level of both channel proteins in cardiomyocytes from all chamber walls was significantly higher following cell incubation in DV extracellular conditions vs. the following incubation in DVF conditions. In addition, the expression level for either TRPM6 or TRPM7 was higher when cells were fixed after 12 hours of cardiomyocyte conservation.

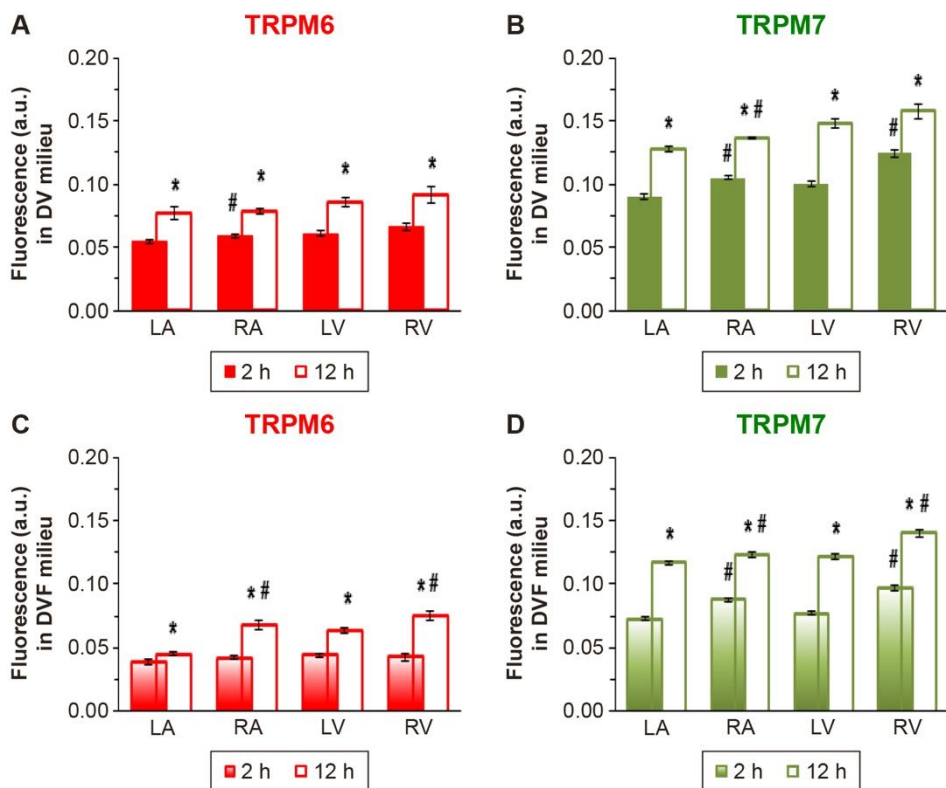


Fig. 3.2.1. Impact of divalent cations on the immunofluorescence of TRPM6 and TRPM7 proteins in human cardiomyocytes

Quantification of immunofluorescence levels of TRPM6 (red) and TRPM7 (green) proteins in cardiomyocytes from four chambers of the human heart (left atrium, LA; right atrium, RA; left ventricle, LV; and right ventricle, RV), under experimental conditions with (A) and without (B) divalent cations (DVF and DV, respectively) in the extracellular milieu, respectively. Cardiomyocytes were fixed following 2 h (filled columns) or 12 h (unfilled columns) after cell isolation. Mean data provided in arbitrary units (a.u.) (for mean values see Table S1 in [203]). A blinded study-design (with the investigator reading the fluorescence not knowing the cell incubation conditions) was used for the detection of fluorescence levels during various experimental conditions. * $P < 0.05$ 2 h vs. 12 h and # $P < 0.05$ right-sided vs. left-sided heart chambers.

Pharmacological drugs known to inhibit TRPM6 and TRPM7 channel function also had an effect on the immunofluorescence levels of TRPM6 and TRPM7. In our study the cardiomyocytes were exposed to 2-APB (500 μ M) or carvacrol (CAR; 100 μ M), added for 15 min after keeping the cells for 2 h or 12 h, but before cell fixation and subsequent incubation with primary antibodies. Fig. 3.2.2 A, B illustrates immunostaining images of TRPM7 (*green*) and TRPM6 (*red*) proteins under control conditions (i.e., without the drugs) as well as after pre-treatments with 2-APB (Fig. 3.2.2 C, D) or CAR (Fig. 3.2.2 E, F). In general, cells treated with these drugs displayed weaker TRPM7 fluorescence intensity but stronger TRPM6 intensity. Mean fluorescence levels are presented in Fig. 3.2.2 G–J, respectively (for more detailed description see in [203]).

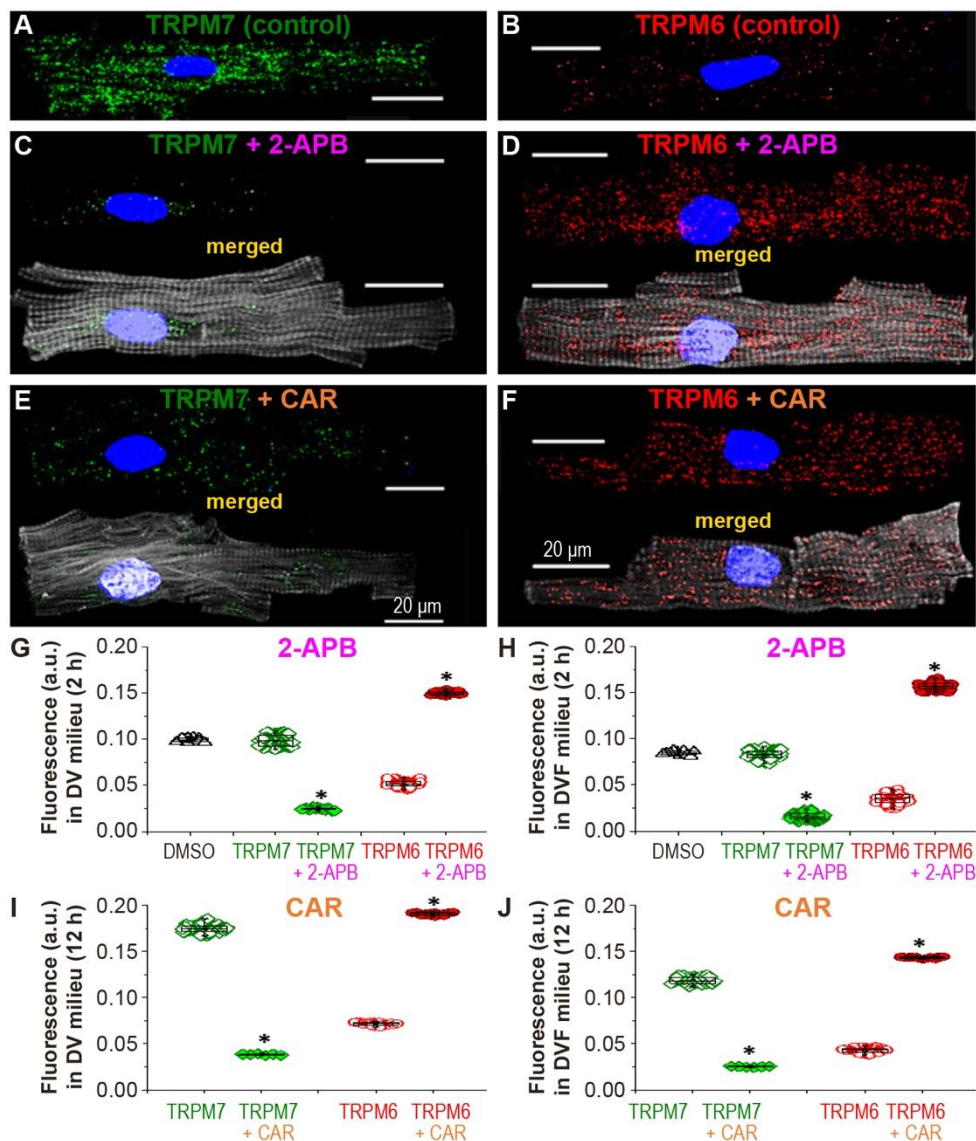


Fig. 3.2.2. Effect of 2-APB and CAR on the immunofluorescence of TRPM6 and TRPM7 in human cardiomyocytes

Illustration of cardiomyocyte staining with anti-TRPM7 (A, C, E) or anti-TRPM6 (B, D, F) in the absence of drugs (A, B) and in the presence of either 2-APB (C, D) or CAR (E, F). Quantification of the intensity of fluorescence (G–J) without drugs (*open*) and with the drugs (*filled*) under experimental conditions with and without divalent cations (DV and DVF, respectively) expressed in arbitrary units (a.u.). Note lack of influence of the solvent, DMSO, at 500 $\mu\text{mol/L}$ (*black triangles*). A blinded study-design (with the investigator reading the fluorescence not knowing the cell incubation conditions) was used for the detection of fluorescence levels during various experimental conditions. * $P < 0.001$ drug vs. no drug.

Qualitatively similar data were obtained when using cardiomyocytes of the porcine heart (Fig. 3.2.3). Like with the data obtained using cardiomyocytes from the human heart [203], 2-APB or of CAR reduced the immunofluorescence of the TRPM7 protein but increased the fluorescence signal of TRPM6 (for mean values see Table 2). Fig. 3.2.3 (bottom panels) also illustrates that no fluorescence was detected when 2-APB was added on top of the blocking peptide for the anti-TRPM6 antibody, or the blocking peptide with the anti-TRPM7 antibody.

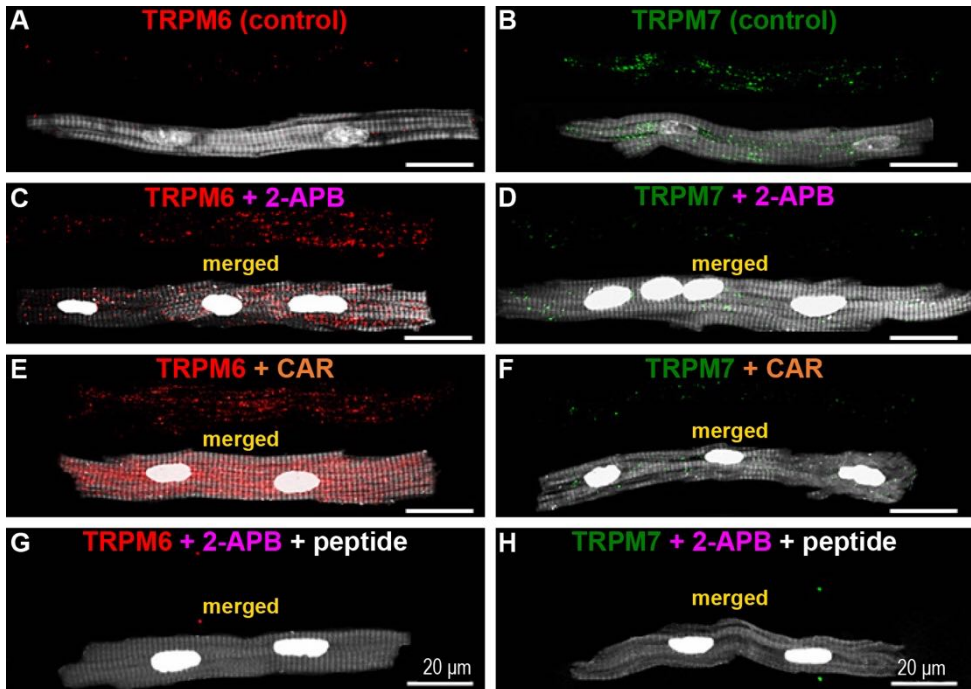


Fig. 3.2.3. Effect of 2-APB and CAR on the immunofluorescence of TRPM6 and TRPM7 in human cardiomyocytes

Illustration of cardiomyocyte staining with anti-TRPM7 (A, C, E) or anti-TRPM6 (B, D, F) in the absence (A, B) of drugs and in the presence of either 2-APB (C, D) or CAR (E, F). Note: the fluorescence was absent when the 2-APB was added to incubation media on top of TRPM6 or TRPM7 blocking peptides. * $P < 0.001$ drug vs. no drug.

These influences of 2-APB on the fluorescence intensity levels of immunodetected TRPM6 and TRPM7 proteins are in concordance with the electrophysiological data [11], where two opposing effects of 2-APB on the TRPM6 and TRPM7 currents have been shown: an up-regulation of the TRPM6 current, but the suppression of the TRPM7 current in CHOK1 cells transiently transfected with TRPM6 or TRPM7. Since electrophysiological data have

also shown that a high (2 mM) 2-APB concentration could have an opposite effect on the TRPM7 channels, i.e. to increase instead of reduce current, we also added into the incubation medium millimolar concentration of the 2-APB. As presented in Fig. 3.2.4, after 15 min pretreatment with 500 μ M and with 2 mM 2-APB, two opposite effects on the fluorescence intensity of immunodetected TRPM7 proteins were induced: reduction versus increase of the immunofluorescence level at 500 μ M and at 2 mM, respectively. With 500 μ M 2-APB the immunofluorescence of TRPM7 protein decreased from 0.1492 ± 0.0022 a.u. to 0.0872 ± 0.0015 a.u. ($n = 3-5$, $P < 0.001$), but with 2 mM the fluorescence of TRPM7 markedly increased to 0.1946 ± 0.0019 a.u. ($n = 4$, $P < 0.001$). In contrast, 2-APB action on the fluorescence level of immunodetected TRPM6 protein under the same experimental conditions was additive, i.e. at 500 μ M increase from 0.064 ± 0.0023 a.u. to 0.1281 ± 0.0016 a.u. ($n = 3$, $P < 0.001$) and at 2 mM increase to 0.1641 ± 0.0031 a.u. ($n = 5$, $P < 0.001$), respectively. These data further support the concordance with the electrophysiological data [11].

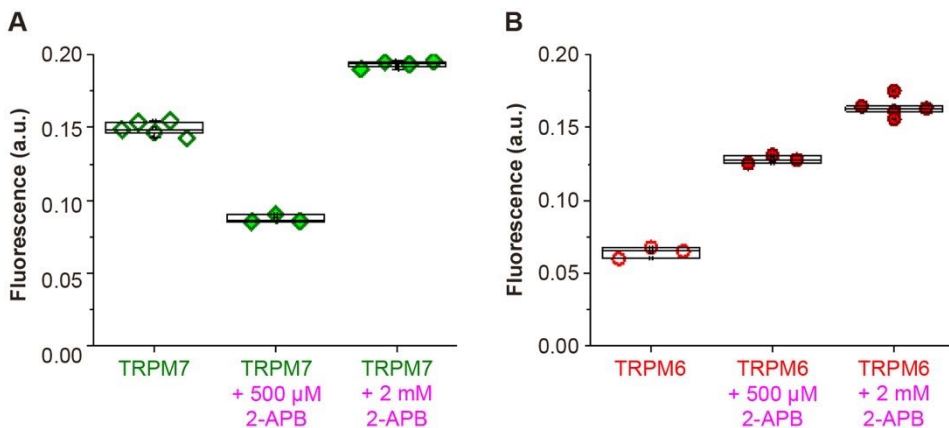


Fig. 3.2.4. Effect of micro- and macromolar concentrations of 2-APB on the immunofluorescence of TRPM6 and TRPM7 in human cardiomyocytes

Quantification of the intensity of fluorescence without 2-APB (*open*) and with the 2-APB (*filled*) expressed in arbitrary units (a.u.). Note: Opposite changes in intensity of fluorescence signal detected with 500 μ M and 2 mM 2-APB on TRPM7, but a qualitatively similar but more marked change of the TRPM6 fluorescence level. A blinded study-design (with the investigator reading the fluorescence not knowing the cell incubation conditions) was used for the detection during various experimental conditions * $P < 0.001$ drug vs. no drug.

Like extracellular divalent cations and pharmacological agents, extracellular pH is known to modulate TRPM6 or TRPM7 channel function [12, 14, 15]. The present study shows that acidification of the cell incubation medium also caused changes in the immunodetected TRPM6 and TRPM7 fluorescence signals. To investigate extracellular proton effects, we used cardiomyocytes that were pre-incubated for 2 h in an acidic extracellular milieu, containing or not containing divalent cations, just before fixation. Extracellular acidification to pH 5.0 in the DV milieu increased the immunofluorescence level of TRPM7 and TRPM6 by 1.45 fold and 3.06 fold, respectively. In contrast, a similar acidification to pH 5.0 in DVF milieu suppressed the fluorescence of TRPM7, but consistently increased that of TRPM6 protein (see Fig. 4 in [203]).

Again, for TRPM7 there is concordance with the electrophysiological data [14], as extracellular acidification increases current in extracellular solutions containing DV cations [14, 15], but decreases current in the DVF extracellular solution [14].

Thus, summarizing the results of this section, we could state that the intensity of fluorescence of TRPM6 and TRPM7 proteins depends on the experimental conditions under which the heart cells were incubated (medium ionic composition, extracellular protons concentration, TRP channel inhibitors, like 2-APB and CAR). Since 2-APB and CAR caused opposite effects on the fluorescence intensity of TRPM6 and TRPM7 proteins, this indicates that TRPM6 and TRPM7 proteins are modulated independently, suggesting that in human or porcine cardiomyocytes TRPM6 and TRPM7 compose distinct channels.

3.3. Investigations of changes of TRPM6 and TRPM7 protein expression by cardiac disease

Our earlier electrophysiological studies indicated an influence of ischemic heart disease (IHD) and AF on the density of TRPM7-like current [14]. Therefore, we also sought to determine whether such pathological conditions also influence the levels of immunodetected TRPM6 and particularly TRPM7 proteins. In this study, we compared the mean levels of both TRPM6 and TRPM7 proteins immunofluorescence obtained in cardiomyocytes from patients with a clinical history of IHD and without the disease condition. In general, as presented in Fig. 3.3.1, independently of the experimental conditions used to incubate cardiomyocytes (i. e., presence or absence of extracellular divalent cations at 2 h or 12 h incubation), the immunofluorescence levels of TRPM6 and TRPM7 was significantly higher in the cardio-

myocytes isolated from heart biopsies of IHD patients compared to those from non-IHD patients.

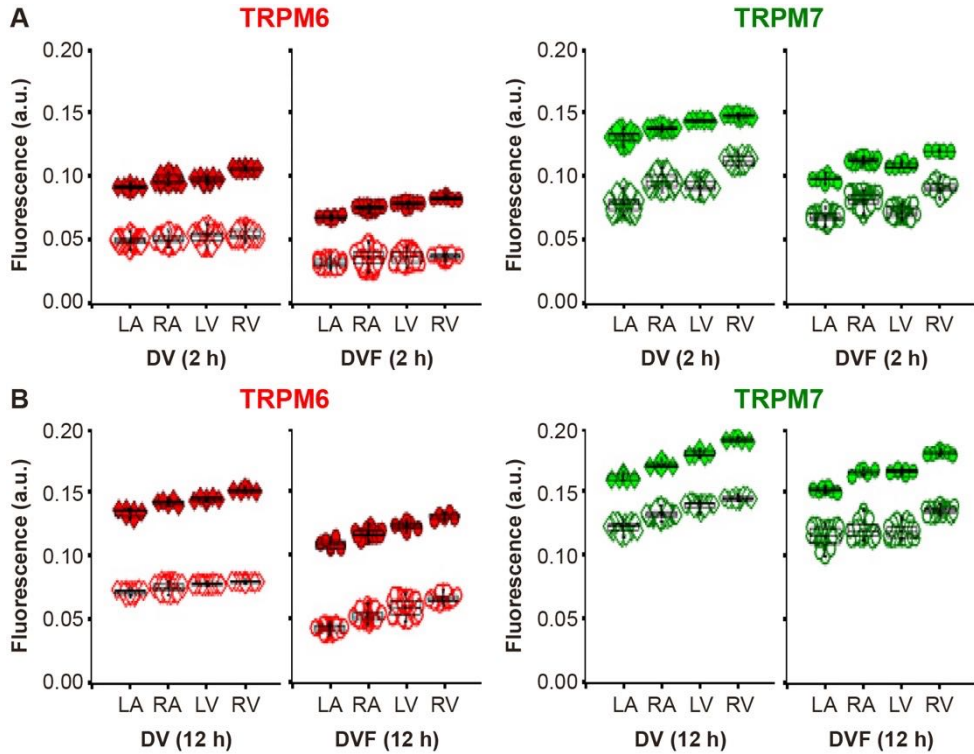


Fig. 3.3.1. Comparison of the levels of TRPM6 and TRPM7 immunofluorescence in human cardiomyocytes from patients with IHD vs. non-IHD

Quantification of the intensity of fluorescence in cardiomyocytes obtained from patients with IHD (*filled symbols*) and without such diagnosis (*unfilled symbols*) expressed in arbitrary units (a.u.). Cardiomyocytes were fixed following 2 h (**A**) or 12 h (**B**) after cell isolation under experimental conditions with and without divalent cations (DV and DVF, respectively). In all cells used $P < 0.001$ IHD vs. non-IHD. IHD increases the fluorescence level of the immunodetected TRPM6 (*red*) and TRPM7 (*green*) proteins expression. A blinded study-design was used for the detection of fluorescence levels during various experimental conditions.

These results were validated by protein measurements by the ELISA when using tissue homogenates of either non-IHD or IHD patients. ELISA also detected a higher expression of TRPM7 and TRPM6 proteins in all cardiac chamber walls of IHD patients vs. non-IHD patients [see also Fig. 6 (A, B) in [203]. Besides, in our study, the larger levels of TRPM6 and TRPM7 expression persisted for patients in the IHD-group independently of patients' age.

Currently, in the literature, there is no published data on TRPM7, especially on TRPM6 protein expression as assessed by immunohistochemistry. Therefore, we also investigated changes in TRPM6 and TRPM7 protein expression using immunohistologically stained tissues from either un-diseased or diseased human heart. Fig. 3.3.2 and Fig. 3.3.3 show representative histotopograms of TRPM6 and TRPM7 immunofluorescent images in the RA tissue slices of the human heart from different patients groups (i. e., the control, IHD, and AF). Both TRPM6 and TRPM7 proteins were detected with the immunohistochemical labeling with the anti-TRPM6 and anti-TRPM7 antibodies in the tissue slices of the un-diseased human heart (Fig. 3.3.2 A, B) and of the diseased human heart from patients with IHD (Fig. 3.3.2 C, D) and with AF (Fig. 3.3.3) In addition, analysis of cardiac myocardial tissue sections from patients with IHD or AF revealed certain morphological changes in myocardial cells: cardiomyocyte hypertrophy, cardiomyocyte nucleus enlargement, and interstitial fibrosis.

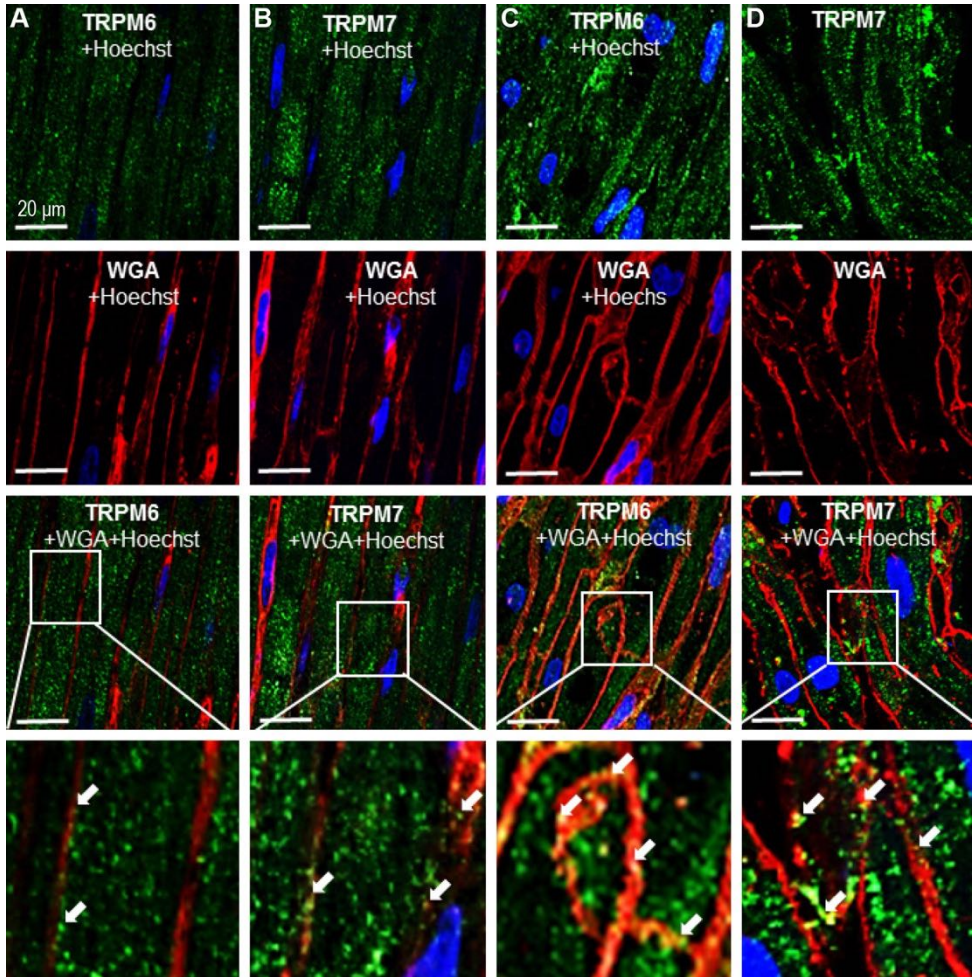


Fig. 3.3.2. *Demonstration of TRPM6 and TRPM7 expression by immunohistochemistry in the right atrium of the human heart*

Representative images of immunolabeled TRPM7 and TRPM6 proteins, obtained from the RA tissues on the longitudinal slices from two different patients: (A, B) control patient (car victims) and (C, D) IHD patient, respectively. The area labeled with the square bars corresponds to the images presented below on a larger scale. Alexa Fluor 488 for the TRPM6 and TRPM7 protein appear in green. Alexa Fluor 555 for the cell membrane surface labelling with WGA appear in red, and Hoechst 33342 for the nucleus staining appear in blue. Note: The membrane staining option was chosen for visualisation of cardiomyocyte contour. Arrows indicate channel localization in the cell membrane. The horizontal scale bars indicates 20 μm .

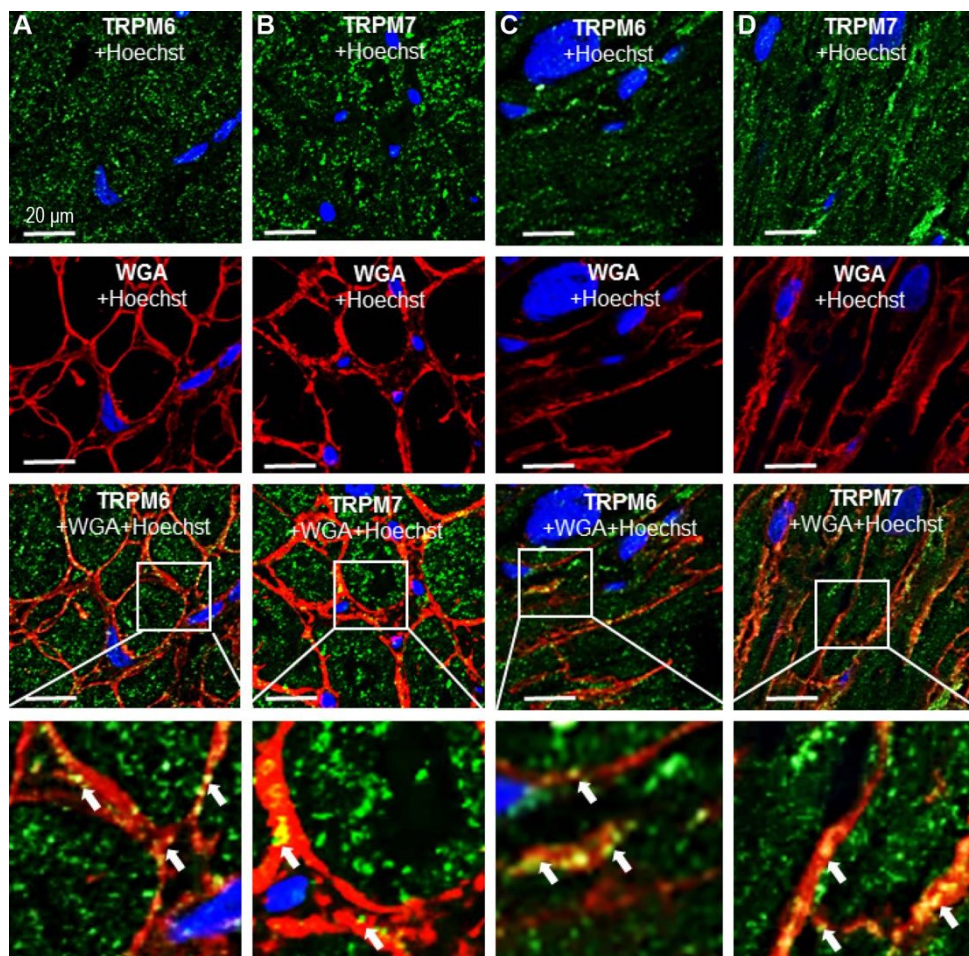


Fig. 3.3.3. Demonstration of TRPM6 and TRPM7 expression by immunohistochemistry in the right atrium of the human heart with AF

Representative images of immunolabeled TRPM7 and TRPM6 proteins, obtained from the RA tissues on the perpendicular (**A**, **B**) and longitudinal (**C**, **D**) slices from the patient with AF. The area labeled with the square bars corresponds to the images presented below on a larger scale. Alexa Fluor 488 for the TRPM6 and TRPM7 protein appear in green, Alexa Fluor 555 for the cell membrane surface labelling with wheat germ agglutinin (WGA) appear in red, and Hoechst 33342 for the nucleus staining appear in blue. Note: The membrane staining option was chosen for visualisation of cardiomyocyte contour. Arrows indicate channel localization in the cell membrane. The horizontal scale bars indicates 20 μ m.

To our knowledge, no reports have examined the expression of the TRPM6 and TRPM7 channels in histological sections of myocardium exposed to primary antibodies with the anti-TRPM6 and anti-TRPM7 and stained with Mayer's hematoxylin as well as with the immunofluorescence labeling. Generally, the existing studies focused on the quantitative evaluation of the fibrosis, in the histological preparations by using just the staining of the collagen tissues and demonstrating the presence of a large fibrotic area in the extracellular matrix during the terminal stage of heart failure or of atrial fibrillation of the human heart. In the present study, expression of both proteins was revealed in histological slices using either the chromogenic (see Fig. 7 and 8 in [203]), or the immunofluorescence staining (see Fig. 3.3.2 and Fig. 3.3.3). We demonstrate, that TRPM6, as well as TRPM7 proteins, are inhomogeneously distributed mainly in the intracellular structures of cardiomyocytes, viewed by green fluorescence pigments. However, the expression also could be detected in the cell membrane region as well, but to a much smaller amount (indicated by arrows in Fig. 3.3.2 and Fig. 3.3.3). In addition, a view from Fig. 3.3.4 suggests, in cases with the end-stage of HF, a lot of green immunofluorescences also could be obtained from the extracellular matrix, which is composed of cardiac fibroblasts, the endothelium cells of blood vessels, collagen fibers, and of the other structures.

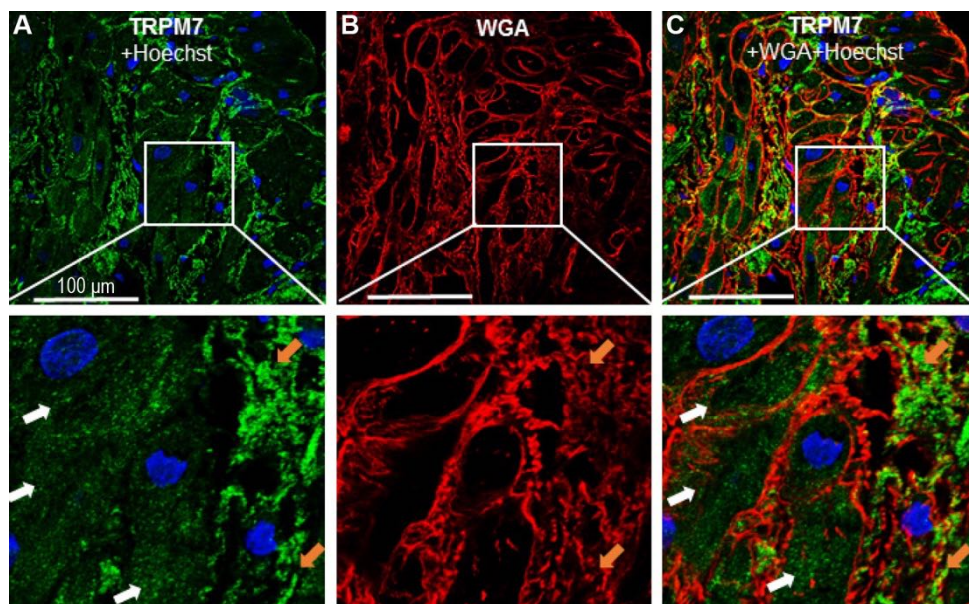


Fig. 3.3.4. *Demonstration of TRPM7 expression by immunohistochemistry in the right atrium of the human heart with the end-stage of HF*

Representative images obtained from the RA tissues obtained from an explanted human heart: Alexa Fluor 488 for the TRPM7 protein appear in green (A), Alexa Fluor 555 for the cell membrane surface labelling with WGA appear in red (B) and Hoechst 33342 for the nucleus staining appear in blue. Merged view of immunostaining is in (C). The area labeled with the square bars corresponds to the images presented below on a larger scale. Notice: WGA labels not only the cell membranes. According to the literature [236], the WGA stains both the cellular membranes and the capillaries. White and yellow arrows show cardiomyocytes and extracellular matrix, respectively. The horizontal scale bars indicates 100 µm.

Next, for comparison, we also verified whether or not similar distribution of the expressions of both TRPM6 and TRPM7 proteins could be obtained with the immunohistochemical examination of young and healthy porcine heart tissues (Fig. 3.3.5).

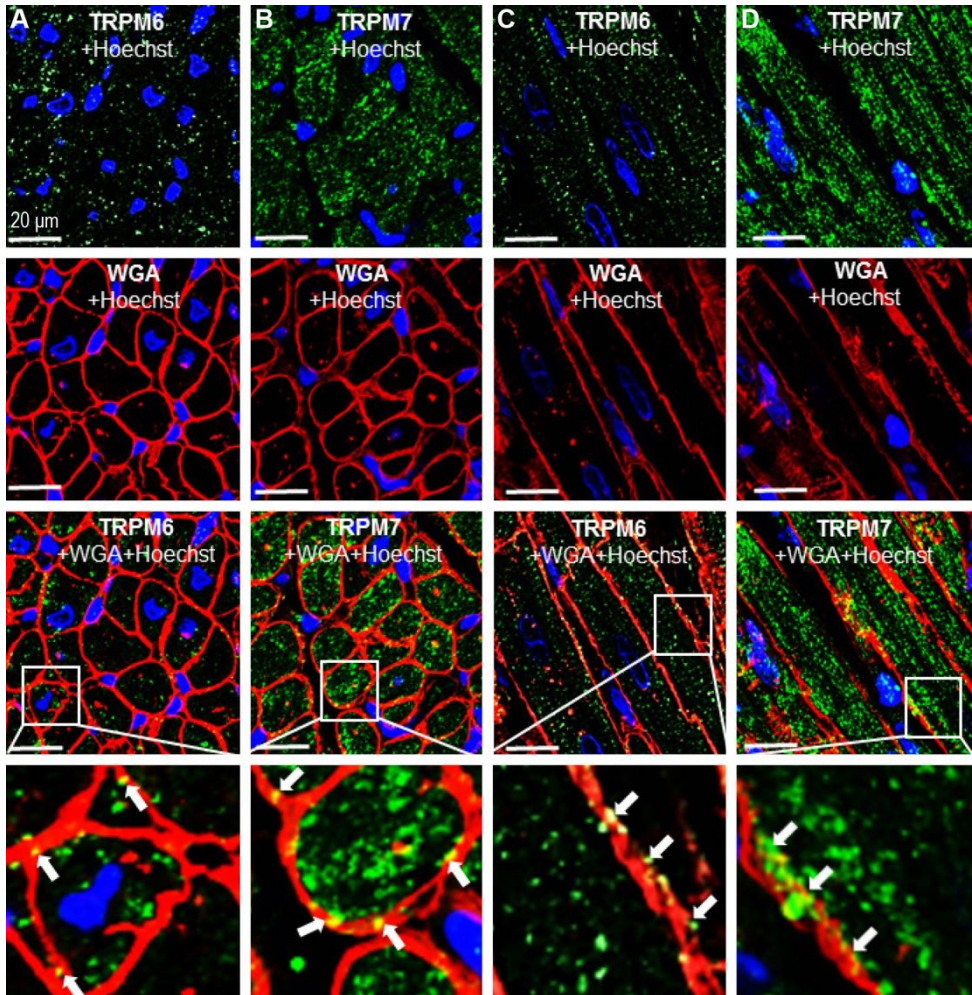


Fig. 3.3.5. Identification of TRPM6 and TRPM7 protein expression by immunohistochemistry in the right atrium of the pig heart

Representative immunofluorescence images were obtained from the RA tissue from the perpendicular (A, B) and longitudinal (C, D) slices, respectively. The area labeled with the square bars corresponds to the images presented below on a larger scale. Alexa Fluor 488 for the TRPM7 and TRPM6 protein appear in green, Alexa Fluor 555 for the cell membrane surface labelling with WGA appear in red, and Hoechst 33342 for the nucleus staining appear in blue. Notice: A smaller expression of the TRPM6 and TRPM7 proteins in the cell membrane (arrows) compared with their intracellular localization. The horizontal scale bars indicates 20 μm .

Evaluation of those histological samples confirmed, that in the porcine heart, like in humans, the TRPM6 protein is expressed, and could be detected by immunohistochemistry. The color intensity analysis revealed that the expression level of TRPM6 was noticeably lower than that of TRPM7 protein.

In addition, the membrane staining option, using WGA fluorescently conjugated with the Alexa Fluor 555 fluorophore, allowed localization of the TRPM6 and TRPM7 proteins in the cell membrane (indicated by arrows in the lowest row).

Fig. 3.3.6 illustrates the quantification analysis of immunofluorescence obtained from histological preparations (A and B) in comparison to those in isolated cardiomyocytes (C) detected from the experimental animals and from patients with different pathologies. These data demonstrate that independent on experimental conditions, the immunofluorescence level of both TRPM6 and TRPM7 proteins was significantly increased in cardiac tissues under such diseases as the IHD (from 1.6728 ± 0.1160 a.u. to 1.9103 ± 0.0421 a.u., and from 2.4442 ± 0.0518 a.u. to 3.0121 ± 0.0909 a.u., respectively; $n = 20$, $P < 0.05$) and the AF (from 1.7554 ± 0.0798 a.u. to 2.4268 ± 0.0665 a.u., and from 2.6966 ± 0.0836 a.u. to 3.1554 ± 0.1082 a.u., respectively; $n = 20-25$, $P < 0.05$). Whereas in porcine right atrial tissue slices the fluorescence of the TRPM6 and TRPM7 proteins was much lower and was 0.8920 ± 0.0175 a.u. and 1.6827 ± 0.0384 a.u., respectively ($n = 12-15$, $P < 0.05$). The same tendency was detected in isolated cardiomyocytes also (see Fig. 3.3.6 (C) and Fig. 3.3.1). Under both cardiac pathologies, such as IHD and AF, the expression of both tested proteins (TRPM6 and TRPM7) in human cardiomyocytes increases.

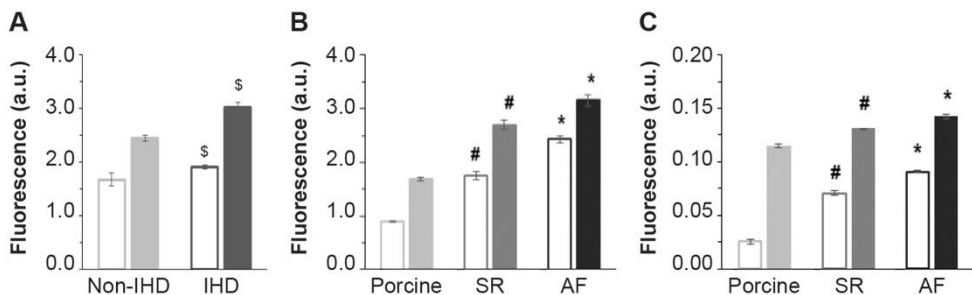


Fig. 3.3.6. *Quantification of both the TRPM6 and TRPM7 immunofluorescence intensity levels in the heart with and without the pathology*

Fluorescence intensity levels of TRPM6 (*open*) and TRPM7 (*filled*) channels calculated from the RA tissues in histological slices of the human heart, which were grouped according to absence or presence of heart disease of patients: into the non-IHD vs. IHD group (A), into the SR vs. AF group (includes all patients under investigation, i.e., with/without ischemic disease) (B) obtained by immunohistochemistry, and in isolated cardiomyocytes (C) obtained by immunofluorescence. For comparison data obtained from porcine RA tissues and cells are shown, as indicated. Mean data provided in arbitrary units (a.u.). # $P < 0.05$ human (SR) vs. pig; * $P < 0.05$ AF vs. SR; \$ $P < 0.05$ IHD vs. non-IHD.

In summary, the above results provide consistent evidence for the expression of both TRPM6 and TRPM7 proteins in the human heart and in the porcine heart. Just the expression level of TRPM6 and TRPM7 channels in the porcine heart is lower, compared to that in the human heart, especially for the TRPM6 channels. We also show, for the first time, that ischemic heart disease, also AF, upregulates the expression of TRPM6 and TRPM7 proteins in the human heart. Such an increase in the expression of both proteins suggests that both TRPM6 and TRPM7 channels are involved in the pathophysiology of IHD as well as AF. Also, these data are in concordance with our earlier observation of the electrical changes obtained on TRPM7-like currents.

3.4. Role of Mg^{2+} -sensitive currents in the cardiac action potentials

As was mentioned above, cardiac Mg^{2+} -sensitive channels [12, 219] are permeable to Ca^{2+} and Mg^{2+} [12], and both are involved in the homeostasis of Mg^{2+} [3, 76, 77, 79]. At the resting membrane potential (RP), the transmembrane potential gradient favors the inward flow of DV cations, such as Mg^{2+} , via Mg^{2+} -sensitive TRPM6- and TRPM7-like channels, consistent with the channel's role as a pathway for DV cation entry. Consequently, the inward flow of DV cations into cells through the channels could have an effect on the intracellular concentrations of the divalent cations [8]. The contribution of the Mg^{2+} -sensitive currents to the cardiomyocyte electrical activity is unknown. It could be supposed, that monovalent cation effluxes through Mg^{2+} -sensitive channels at positive potentials could contribute to action potentials (AP), but such the possibility has not been tested.

During an AP, the positive potentials reached can cause monovalent cation efflux via TRPM6- TRPM7-like channels, for which the role remains unclear. We, therefore, examined the role of the cardiac Mg^{2+} -sensitive current in the AP of pig cardiomyocytes, for which outward currents do not contain transient outward K^+ (I_{to}) since the corresponding channels are not expressed in this species [208, 209]. The experiments were performed at 36 °C using K^+ -containing intra- and extracellular solutions. To detect electrical activity of cardiac myocytes, we recorded the total currents using a whole-cell voltage-clamp, as well as the RP and AP using the current clamp (see Fig. 1 in [210]). The cells were internally dialyzed and extracellularly perfused with solutions known to activate (the Mg^{2+} -free solution ($[Mg^{2+}]_i \approx 0$ mM) or inhibit (the Mg^{2+} -free solution $[Mg^{2+}]_i = 0.8$ mM) the currents. The cells were extracellularly perfused with the Tyrode solution with either physiological levels of Mg^{2+} concentration ($[Mg^{2+}]_o = 0.9$ mM) or with high

Mg^{2+} ($[Mg^{2+}]_o = 7.2$ mM), which is known to cause a complete suppression of any activated Mg^{2+} -sensitive current [12].

In these two groups of cells, there was no difference in the RP, which were also not changed by raising $[Mg^{2+}]_o$ from 0.9 mM to 7.2 mM (Table 3.4.1).

Table 3.4.1. Summary data of RP and APD in cardiomyocytes dialyzed with 0.8 mM $[Mg^{2+}]_i$ and ≈ 0 mM $[Mg^{2+}]_i$ and superfused with extracellular solutions containing 0.9 mM $[Mg^{2+}]_o$ or 7.2 mM $[Mg^{2+}]_o$

	0.8 mM $[Mg^{2+}]_i$ (n = 9)		≈ 0 mM $[Mg^{2+}]_i$ (n = 10)	
	[0.9 $Mg^{2+}]_o$	[7.2 $Mg^{2+}]_o$	[0.9 $Mg^{2+}]_o$	[7.2 $Mg^{2+}]_o$
RP (mV)	-79.9 ± 2.6	-81.0 ± 2.1	-78.4 ± 2.8	-77.4 ± 3.7
APD ₃₀ (ms)	145.5 ± 14.5	136.5 ± 15.1	100.4 ± 14.8	143.6 ± 19.9
APD ₅₀ (ms)	216.6 ± 19.6	196.6 ± 21.0	145.6 ± 16.1	189.8 ± 22.4
APD ₉₀ (ms)	238.0 ± 48.0	231.0 ± 46.0	178.9 ± 14.2	225.2 ± 21.3

RP – resting membrane potential, APD₃₀, APD₅₀ and APD₉₀ – action potential duration measured at 30%, 50% and 90% of repolarization, respectively. Notice: noticeable APD lengthening in cells dialyzed with ≈ 0 mM $[Mg^{2+}]_i$ when extracellularly perfused with 7.2 mM $[Mg^{2+}]_o$. Stimulation frequency: 1 Hz. * $P < 0,05$ (n = 9–10).

Under voltage-clamp conditions using voltage ramps between -120 mV and $+80$ mV, an outward rectifying current was present at positive potentials in cells dialyzed with zero $[Mg^{2+}]_i$. The current was suppressed by raising $[Mg^{2+}]_o$ and was absent in cells dialyzed with physiological $[Mg^{2+}]_i$, indicating that it was due to the intracellular Mg^{2+} -sensitive (TRPM6- and TRPM7-like) current. Under these conditions, a large inward current consistent with the presence of the inward rectifier K^+ current I_{K1} was observed. There was no difference in the current-voltage relationship between the current after dialysis and superfusion with extracellular solution containing 0.9 mM $[Mg^{2+}]_o$ and that in the presence of 7.2 mM $[Mg^{2+}]_o$ (see Fig. 1 (A and C), insets in [210]), indicating that the changes of $[Mg^{2+}]_o$ did not affect I_{K1} .

After recording membrane currents under a voltage-clamp, we switched to the current-clamp mode to record the action potentials in the same cells (see Fig. 1 (B and D) in [210]). Under the control conditions (extracellular Mg^{2+} concentration, $[Mg^{2+}]_o$, of 0.9 mM), the AP was shorter in cells dialyzed with Mg^{2+} -free internal solution (~ 0 mM $[Mg^{2+}]_i$). Whereas raising extracellular Mg^{2+} ($[Mg^{2+}]_o$ to 7.2 mM) increased the APD in cells dialyzed with zero $[Mg^{2+}]_i$, but increasing ($[Mg^{2+}]_o$ had no effect in those dialyzed with 0.8 mM $[Mg^{2+}]_i$ (Table 3.4.1).

Taken together, these results show that the cardiac AP is modulated by an outward-rectifying current activated by dialysis with 0 mM $[Mg^{2+}]_i$, and suppressed by high $[Mg^{2+}]_o$. Since this current was absent in the cardiomyocytes with 0.8 mM Mg, it is likely due to TRPM6 and/or TRPM7.

These results suggest that, under physiological conditions, the Mg^{2+} -sensitive current is not expected to alter APD given that the current is largely suppressed by physiological $[Mg^{2+}]_i$. However, the current may contribute to APD if the sensitivity to physiological $[Mg^{2+}]_i$ is decreased by other regulatory factors. In the present study, we show that the expression of the TRPM6 and TRPM7 channels is modulated by incubation in DV cation-free extracellular solutions. Thus, the contribution of the Mg^{2+} -sensitive current to the AP may vary depending on the status of the extracellular divalent cation homeostasis.

CONCLUSIONS

1. In this study, we for the first time identified the presence of TRPM6 channel protein in both human and porcine cardiomyocytes. Also, we found for the first time that both TRPM6 and TRPM7 Mg^{2+} -sensitive channel proteins are co-expressed in all four parts of the heart. Higher protein expression of these channels was found in the right parts of the heart.
2. Assessing the effects of modulating factors (divalent cations, acidosis, and TRP channel blockers, such as 2-APB and carvacrol) in the cardiomyocytes of human and porcine heart, we found that these channels are not related and may function independently from each other.
3. We found that under chronic cardiac pathology, such as IHD and AF, the expression of both tested proteins (TRPM6 and TRPM7) in human cardiomyocytes increases, which may contribute to the pathophysiology of cardiovascular disease.
4. In studies with the cardiomyocytes of porcine heart we detected that under physiological conditions, Mg^{2+} -sensitive current is not involved in the formation of action potential. Conversely, when intracellular Mg^{2+} concentration decreases the duration of AP is shorter and sensitive to changes of extracellular Mg^{2+} concentration. It is likely that the Mg^{2+} -sensitive current may contribute to APD if the sensitivity for intracellular Mg^{2+} is decreased by pathological conditions or channel mutations or if intracellular Mg^{2+} concentration is decreased to low levels by a disease such as chronic hypomagnesemia.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Falcón D, Galeano-Otero I, Calderón-Sánchez E, Del Toro R, Martin-Bornez M, Rosado JA, et al. TRP channels: current perspectives in the adverse cardiac remodeling. *Frontiers in physiology*. 2019;10:159.
2. Hof T, Chaigne S, Recalde A, Salle L, Brette F, Guinamard R. Transient receptor potential channels in cardiac health and disease. *Nat Rev Cardiol*. 2019;16(6):344–360.
3. Fleig A, Chubanov V. Andrea Fleig and Vladimir Chubanov. *Handbook of experimental pharmacology*. 2014;222:521.
4. Montell C. The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE*. 2005;1–24.
5. Runnels LW, Yue L, Clapham DE. TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities. *Science*. 2001;291:1043–1047.
6. Voets T, Nilius B, Hoefs S, van der Kemp AWCM, Droogmans G, Bindels RJM, et al. TRPM6 forms the Mg^{2+} influx channel involved in intestinal and renal Mg^{2+} absorption. *J Biol Chem*. 2004;279(1):19–25.
7. Schlingmann KP, Weber S, Peters M, Niemann Ne-jsum L, Vitzthum H, Klingel K, et al. Hypomagne-semia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family. *Nat Genet*. 2002;31(2):166–170.
8. Tashiro M, Inoue H, Konishi M. Physiological pathway of magnesium influx in rat ventricular myocytes. *Biophys J*. 2014;107:2049–2058.
9. Sah R, Mesirca P, Mason X, Gibson W, Bates-Withers C, Van den Boogert M, et al. Timing of myocardial *trpm7* deletion during cardiogenesis variably disrupts adult ventricular function, conduction, and repolarization. *Circulation*. 2013;128:101–114.
10. Rios FJ, Zou ZG, Harvey AP, Harvey KY, Nosalski R, Anyfanti P, et al. Chanzyme TRPM7 protects against cardiovascular inflammation and fibrosis. *Cardiovasc Res*. 2020;116(3):721–735.
11. Li M, Jiang J, Yue L. Functional characterization of homo- and heteromeric channel kinases TRPM6 and TRPM7. *J Gen Physiol*. 2006;127(5):525–537.
12. Gwanyanya A, Amuzescu B, Zakharov SI, Mačianskienė R, Sipido KR, Bolotina VM, et al. Magnesium-inhibited, TRPM6/7-like channel in cardiac myocytes: permeation of divalent cations and pH-mediated regulation. *J Physiol*. 2004;559(3):761–776.
13. Macianskiene R, Martisiene I, Zablockaite D, Gendviliene V. Characterization of Mg^{2+} -regulated TRPM7-like current in human atrial myocytes. *Journal of biomedical science*. 2012;19(1):75.
14. Mačianskienė R, Almanaitytė M, Jekabsone A, Mubagwa K. Modulation of human cardiac TRPM7 current by extracellular acidic pH depends upon extracellular concentrations of divalent cations. *PLoS ONE*. 2017;12(1):e0170923.
15. Zhang YH, Sun HY, Chen KH, Du XL, Liu B, Cheng LC, et al. Evidence for functional expression of TRPM7 channels in human atrial myocytes. *Basic Res Cardiol*. 2012;107(5):282.
16. Abiria SA, Krapivinsky G, Sah R, Santa-Cruz AG, Chaudhuri D, Zhang J, et al. TRPM7 senses oxidative stress to release Zn^{2+} from unique intracellular vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017;114(30):E6079–E6088.
17. Brauchi S, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE. TRPM7 facilitates cholinergic vesicle fusion with the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(24):8304–8308.

18. Gaborit N, Le Bouter S, Szuts V, Varro A, Escande D, Nattel S, et al. Regional and tissues specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *J Physiol.* 2007;582(2):657–693.
19. Tsai FC, Lin YC, Chang SH, Chang GJ, Hsu YJ, Lin YM, et al. Differential left-to-right atria gene expression ratio in human sinus rhythm and atrial fibrillation: Implications for arrhythmogenesis and thrombogenesis. *Int J Cardiol.* 2016;222:104–112.
20. Dragun M, Gazova A, Kyselovic J, Hulman M, Matus M. TRP channels expression profile in human end-stage heart failure. *Medicina.* 2019;55(7):380.
21. Fonfria E, Murdock PR, Cusdin FS, Benham CD, Kessel RE, McNulty S. Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family. *J Recept Signal Transduct.* 2006;26:159–178.
22. Kunert-Keil C, Bisping F, Krüger J, Brinkmeier H. Tissue-specific expression of TRP channel genes in the mouse and its variation in three different mouse strains. *BMC Genom.* 2006;7(1):1-14.
23. Zhang YJ, Ma N, Su F, Liu H, Mei J. Increased TRPM6 expression in atrial fibrillation patients contribute to atrial fibrosis. *Exp Mol Pathol.* 2015;98(3):486–490.
24. Ortega A, Roselló-Lletí E, Tarazón E, Gil-Cayuela C, Lago F, González-Juanatey JR, et al. TRPM7 is down-regulated in both left atria and left ventricle of ischemic cardiomyopathy patients and highly related to changes in ventricular function. *ESC Heart Fail.* 2016;3(3):220–224.
25. Cosens DJ, Manning A. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature.* 1969;224(5216):285–287.
26. Minke B. *Drosophila* mutant with a transducer defect. *Biophys Struct Mech.* 1977;3(1): 59-64.
27. Montell C, Jones K, Hafen E, Rubin G. Rescue of the *Drosophila* phototransduction mutation *trp* by germline transformation. *Science.* 1985;230(4729):1040–1043.
28. Montell C, Rubin GM. Molecular characterization of the *Drosophila trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron.* 1989;2(4):1313-1323.
29. Venkatachalam K, Montell C. TRP channels. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:387–417.
30. Zhang L, Wang K, Klaerke DA, Calloe K, Lowrey L, Pedersen PA, et al. Purification of Functional Human TRP Channels Recombinantly Produced in Yeast. *Cells.* 2019; 8(2):148.
31. Vriens J, Owsianik G, Voets T, Droogmans G, Nilius B. Invertebrate TRP proteins as functional models for mammalian channels. *Pflugers Archiv: European journal of physiology.* 2004;449(3):213–226.
32. Hellmich UA, Gaudet R. Structural biology of TRP channels. *Handbook of experimental pharmacology.* 2014;223:963–990.
33. Yue Z, Xie J, Yu AS, Stock J, Du J, Yue L. Role of TRP channels in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* 2014; 308(3):H157-H182.
34. Cheng X, Shen D, Samie M, Xu H. Mucolipins: intracellular TRPML1-3 channels. *FEBS letters.* 2010;584:2013–2021.
35. Zubcevic L, Lee SY. The role of π -helices in TRP channel gating. *Curr Opin Struct Biol.* 2019;58:314–323.
36. Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature.* 2003;426(6966):517–524.
37. Nelson PL, Beck A, Cheng H. Transient receptor proteins illuminated: current views on TRPs and disease. *The Veterinary Journal.* 2011;187(2):153–164.

38. Turner H, Fleig A, Stokes A, Kinet JP, Penner R. Discrimination of intracellular calcium store subcompartments using TRPV1 (transient receptor potential channel, vanilloid subfamily member 1) release channel activity. *Biochem J.* 2003;371:341–350.
39. Iwata Y, Katanosaka Y, Arai Y, Komamura K, Miyatake K, Shigekawa M. A novel mechanism of myocyte degeneration involving the Ca²⁺-permeable growth factor-regulated channel. *J Cell Biol.* 2003;161:957–967.
40. Sumoza-Toledo A, Lange I, Cortado H, Bhagat H, Mori Y, Fleig A, Penner R, Partida-Sánchez S. Dendritic cell maturation and chemotaxis is regulated by TRPM2-mediated lysosomal Ca²⁺ release. *Faseb.* 2011;25:3529–3542.
41. Krapivinsky G, Mochida S, Krapivinsky L, Cibulsky SM, Clapham DE. The TRPM7 ion channel functions in cholinergic synaptic vesicles and affects transmitter release. *Neuron.* 2006;52:485–496.
42. Anyatonwu GI, Estrada M, Tian X, Somlo S, Ehrlich BE. Regulation of ryanodine receptor-dependent calcium signaling by polycystin-2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:6454–6459.
43. Gees M, Colsoul B, Nilius B. The role of transient receptor potential cation channels in Ca²⁺ signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology.* 2010;2(10):a003962.
44. Nilius B. TRP channels in disease. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1772:805–812.
45. Vriens J, Owsianik G, Hofmann T, Philipp SE, Stab J, Chen X, et al. TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat. *Neuron.* 2011;70:482–494.
46. Zimmermann K, Lennerz JK, Hein A, Link AS, Kaczmarek JS, Delling M, et al. Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 5 (TRPC5) is a cold-transducer in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108:18114–18119.
47. Venkatachalam K, Zheng F, Gill DL. Regulation of canonical transient receptor potential (TRPC) channel function by diacylglycerol and protein kinase C. *The J Biol Chem.* 2003;278: 29031–29040.
48. Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G. Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature.* 1999;397: 259–263.
49. Li M, Du J, Jiang J, Ratzan W, Su LT, Runnels LW, et al. Molecular determinants of Mg²⁺ and Ca²⁺ permeability and pH sensitivity in TRPM6 and TRPM7. *J Biol Chem.* 2007;282:25817–25830.
50. Launay P, Fleig A, Perraud AL, Scharenberg AM, Penner R, Kinet JP. TRPM4 is a Ca²⁺-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. *Cell.* 2002;109(3):397–407.
51. Liu D, Liman ER. Intracellular Ca²⁺ and the phospholipid PIP₂ regulate the taste transduction ion channel TRPM5. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(25):15160–15165.
52. Du J, Xie J, Yue L. Intracellular calcium activates TRPM2 and its alternative spliced isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;107:7239–7244.
53. Zurborg S, Yurgionas B, Jira JA, Caspani O, Heppenstall PA. Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca²⁺. *Nat Neurosci.* 2007;10:277–279.
54. Hara Y, Wakamori M, Ishii M, Maeno E, Nishida M, Yoshida T, et al. LTRPC2 Ca²⁺-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell.* 2002;9:163–173.
55. Perraud AL, Fleig A, Dunn CA, Bagley LA, Launay P, Schmitz C, et al. ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature.* 2001;411:595–599.

56. Grimm C, Kraft R, Sauerbruch S, Schultz G, Harteneck C. Molecular and functional characterization of the melastatin-related cation channel TRPM3. *J Biol Chem.* 2003; 278:21493–21501.
57. Grimm C, Kraft R, Schultz G, Harteneck C. Activation of the melastatin-related cation channel TRPM3 by D-erythro-sphingosine. *Mol Pharmacol.* 2005;67:798–805.
58. Duncan LM, Deeds J, Hunter J, Shao J, Holmgren LM, Woolf EA, et al. Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Res.* 1998;58:1515–1520.
59. Mederos y Schnitzler M, Wäring J, Gudermann T, Chubanov V. Evolutionary determinants of divergent calcium selectivity of TRPM channels. *FASEB J.* 2008;22(5): 1540–1551.
60. Huang Y, Fliegert R, Guse AH, Lü W, Du J. A structural overview of the ion channels of the TRPM family. *Cell Calcium.* 2020;85:102111.
61. Perraud AL, Shen B, Dunn CA, Rippe K, Smith MK, Bessman MJ, et al. NUDT9, a member of the Nudix hydrolase family, is an evolutionarily conserved mitochondrial ADP-ribose pyrophosphatase. *J Biol Chem.* 2003;278:1794–1801
62. Nilius B, Prenen J, Tang J, Wang C, Owsianik G, Janssens A, et al. Regulation of the Ca²⁺ sensitivity of the nonselective cation channel TRPM4. *Journal of biological chemistry.* 2005;280(8),6423-6433.
63. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science.* 2002;298:1912–1934.
64. Jimenez I, Prado Y, Marchant F, Otero C, Eltit F, Cabello-Verrugio C, et al. TRPM Channels in Human Diseases. *Cells.* 2020;9(12):2604.
65. Chubanov V, Waldegger S, Mederos y Schnitzler M, Vitzthum H, Sassen MC, Seyberth HW, et al. Disruption of TRPM6/TRPM7 complex formation by a mutation in the TRPM6 gene causes hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101:2894–2899.
66. Zhou W, Guo S, Xiong Z, Liu M. Oncogenic role and therapeutic target of transient receptor potential melastatin 7 channel in malignancy. *Expert opinion on therapeutic targets.* 2014;18(10):1177-1196.
67. Kraft R, Harteneck C. The mammalian melastatin-related transient receptor potential cation channels: an overview. *Pflügers Archiv.* 2005;451(1):204-211.
68. Harteneck C. Function and pharmacology of TRPM cation channels. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology.* 2005;371(4):307–314.
69. Perraud AL, Takanishi CL, Shen B, Kang S, Smith MK, Schmitz C, et al. Accumulation of free ADP-ribose from mitochondria mediates oxidative stress-induced gating of TRPM2 cation channels. *J Biol Chem.* 2005;280(7):6138–6148.
70. Kolisek M, Beck A, Fleig A, Penner R. Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels. *Mol Cell.* 2005;18(1): 61–69.
71. Zhang W, Chu X, Tong Q, Cheung JY, Conrad K, Masker K, et al. A novel TRPM2 isoform inhibits calcium influx and susceptibility to cell death. *J Biol Chem.* 2003; 278(18):16222–29.
72. Hofmann T, Chubanov V, Gudermann T, Montell C. TRPM5 is a voltage-modulated and Ca²⁺-activated monovalent selective cation channel. *Curr Biol.* 2003;13(13):1153–1158.
73. Nilius B, Prenen J, Droogmans G, Voets T, Vennekens R, Freichel M, et al. Voltage dependence of the Ca²⁺-activated cation channel TRPM4. *Journal of Biological Chemistry.* 2003;278(33): 30813-30820.

74. Talavera K, Yasumatsu K, Voets T, Droogmans G, Shigemura N, Ninomiya Y, et al. Heat activation of TRPM5 underlies thermal sensitivity of sweet taste. *Nature*. 2005; 438(7070):1022-1025.
75. Nadler MJ, Hermosura MC, Inabe K, Perraud AL, Zhu Q, Stokes AJ, et al. LTRPC7 is a Mg²⁺-ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature*. 2001; 411(6837):590-595.
76. Monteilh-Zoller MK, Hermosura MC, Nadler MJ, Scharenberg AM, Penner R, Fleig A. TRPM7 provides an ion channel mechanism for cellular entry of trace metal ions. *The Journal of general physiology*. 2003;121(1):49-60.
77. Voets T, Droogmans G, Wissenbach U, Janssens A, Flockerzi V, Nilius B. The principle of temperature-dependent gating in cold-and heat-sensitive TRP channels. *Nature*. 2004;430(7001):748-754.
78. Jiang J, Li M, You L. Potentiation of TRPM7 inward currents by protons. *J Gen Physiol*. 2005;126:137-150.
79. Runnels LW, Yue L, Clapham DE. The TRPM7 channel is inactivated by PIP₂ hydrolysis. *Nat Cell Biol*. 2002;4(5):329-336.
80. Schmitz C, Perraud AL, Johnson CO, Inabe K, Smith MK, Penner R, et al. Regulation of vertebrate cellular Mg²⁺ homeostasis by TRPM7. *Cell*. 2003;114:191-200.
81. Demeuse P, Penner R, Fleig A. TRPM7 channel is regulated by magnesium nucleotides via its kinase domain. *The Journal of general physiology*. 2006;127(4):421-434.
82. Matsushita M, Kozak JA, Shimizu Y, McLachlin DT, Yamaguchi H, Wei FY, et al. Channel function is dissociated from the intrinsic kinase activity and autophosphorylation of TRPM7/ChaK1. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(21):20793-20803.
83. McKemy DD, Neuhauser WM, Julius D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*. 2002;416:52-58.
84. Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, et al. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell*. 2002;108(5):705-15.
85. Bandell M, Dubin AE, Petrus MJ, Orth A, Mathur J, Hwang S, et al. High-throughput random mutagenesis screen reveals TRPM8 residues specifically required for activation by menthol. *Nat Neurosci*. 2006;9(4):493-500.
86. Andersson DA, Chase HW, Bevan S. TRPM8 activation by menthol, icilin, and cold is differentially modulated by intracellular pH. *J Neurosci*. 2004;24(23):5364-69.
87. Brauchi S, Orio P, Latorre R. Clues to understanding cold sensation: thermodynamics and electrophysiological analysis of the cold receptor TRPM8. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(43):15494-15499.
88. Liu B, Qin F. Functional control of cold-and menthol-sensitive TRPM8 ion channels by phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Neurosci*. 2005;25(7):1674-81.
89. Hantute-Ghesquier A, Haustrate A, Prevarskaya N, Lehen'kyi V. TRPM family channels in cancer. *Pharmaceuticals*. 2018;11(2):58.
90. Gao Y, Liao P. TRPM4 channel and cancer. *Cancer Lett*. 2019;454:66-69.
91. Belrose JC, Jackson MF. TRPM2: A candidate therapeutic target for treating neurological diseases. *Acta Pharmacol Sin*. 2018;39(5):722-732.
92. Samanta A, Hughes TET, Moiseenkova-Bell VY. Transient Receptor Potential (TRP) Channels. *Subcell Biochem*. 2018;87:141-165.
93. Gatica S, Villegas V, Vallejos A, Olivares P, Aballai V, Lagos-Meza F, et al. TRPM7 mediates kidney injury, endothelial hyperpermeability and mortality during endotoxemia. *Lab Investig*. 2020;100(2):234-249.

94. Ryazanova LV, Pavur KS, Petrov AN, Dorovkov MV, Ryazanov AG. Novel type of signaling molecules: Protein kinases covalently linked to ion channels. *Mol Biol.* 2001; 35(2):271–283.
95. Prakriya M, Lewis RS. Separation and characterization of currents through store-operated CRAC channels and Mg²⁺-inhibited cation (MIC) channels. *The Journal of general physiology.* 2002;119(5):487-507.
96. Chubanov V, Gudermann T. Trpm6. *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels*; 2014. p. 503-520.
97. Schmitz C, Dorovkov MV, Zhao X, Davenport BJ, Ryazanov AG, Perraud AL. The channel kinases TRPM6 and TRPM7 are functionally nonredundant. *J Biol Chem.* 2005;280(45):37763–37771.
98. Dhaka A, Viswanath V, Patapoutian I A. TRP Ion Channels and Temperature Sensation. *Annu Rev Neurosci.* 2006;29:135–161.
99. Schlingmann KP, Waldegger S, Konrad M, Chubanov V, Gudermann T. TRPM6 and TRPM7-Gatekeepers of human magnesium metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1772(8):813-821.
100. Aarts MM, Tymianski M. TRPM7 and ischemic CNS injury. *The Neuroscientist.* 2005;11(2):116-123.
101. Paravicini TM, Chubanov V, Gudermann T. TRPM7: a unique channel involved in magnesium homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44(8):1381-1384.
102. Yamaguchi H, Matsushita M, Nairn AC, Kuriyan J. Crystal structure of the atypical protein kinase domain of a TRP channel with phosphotransferase activity. *Mol Cell.* 2001;7(5):1047-1057.
103. Cabezas-Bratesco D, Brauchi S, Gonzalez-Teuber V, Steinberg X, Valencia I, Colenso C. The different roles of the channel-kinases TRPM6 and TRPM7. *Curr Med Chem.* 2015;22(25):2943–2953.
104. Cahalan MD. Channels as enzymes. *Nature.* 2001;411(6837):542–543.
105. Runnels LW. TRPM6 and TRPM7: A Mul-TRP-PLIK-cation of channel functions. *Current pharmaceutical biotechnology.* 2011;12(1):42-53
106. Agus ZS. Hypomagnesemia. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10(7):1616–1622.
107. Cao G, Lee KP, van der Wijst J, de Graaf M, van der Kemp A, Bindels RJ, et al. Methionine sulfoxide reductase B1 (MsrB1) recovers TRPM6 channel activity during oxidative stress. *J Biol Chem.* 2010;285(34):26081–26087.
108. Xie J, Sun B, Du J, Yang W, Chen HC, Overton JD, et al. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) controls magnesium gatekeeper TRPM6 activity. *Sci Rep.* 2011; 1(1):1-12.
109. Qin X, Yue Z, Sun B, Yang W, Xie J, Ni E, et al. Sphingosine and FTY720 are potent inhibitors of the transient receptor potential melastatin7 (TRPM7) channels. *Br J Pharmacol.* 2012; 168(8):1294–1312.
110. Parnas M, Peters M, Dadon D, Lev S, Vertkin I, Slutsky I, et al. Carvacrol is a novel inhibitor of Drosophila TRPL and mammalian TRPM7 channels. *Cell calcium.* 2009; 45(3):300-309.
111. Ryazanova LV, Rondon LJ, Zierler S, Hu Z, Galli J, Yamaguchi TP, et al. TRPM7 is essential for Mg²⁺ homeostasis in mammals. *Nat Commun.* 2010;1(1):1-9.
112. Dorovkov MV, Kostyukova AS, Ryazanov AG. Phosphorylation of annexin A1 by TRPM7kinase: a switch regulating the induction of an alpha-helix. *Biochemistry.* 2011;50(12):2187–2193.
113. Drennan D, Ryazanov AG. Alpha-kinases: analysis of the family and comparison with conventional protein kinases. *Prog Biophys Mol Biol.* 2004;85(1):1–32.

114. Ryazanov AG, Ward MD, Mendola CE, Pavur KS, Dorovkov MV, Wiedmann M, et al. Identification of a new class of protein kinases represented by eukaryotic elongation factor-2 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(10):4884–4889.
115. Clark K, Langeslag M, van Leeuwen B, Ran L, Ryazanov AG, Figdor CG, et al. TRPM7, a novel regulator of actomyosin contractility and cell adhesion. *EMBO J*. 2006;25(2):290–301.
116. Dorovkov MV, Ryazanov AG. Phosphorylation of annexin I by TRPM7 channel-kinase. *J Biol Chem*. 2004;279(49):50643–50646.
117. Perraud AL, Zhao X, Ryazanov AG, Schmitz C. The channel-kinase TRPM7 regulates phosphorylation of the translational factor eEF2 via eEF2-k. *Cell Signal*. 2010;23(3):586–593.
118. Clark K, Middelbeek J, Morrice NA, Figdor CG, Lasonder E, van Leeuwen FN. Massive autophosphorylation of the Ser/Thr-rich domain controls protein kinase activity of TRPM6 and TRPM7. *PLoS One*. 2008;3(3):e1876.
119. Kozak JA, Kerschbaum HH, Cahalan MD. Distinct properties of CRAC and MIC channels in RBL cells. *J Gen Physiol*. 2002;120(2):221–235.
120. Hermosura MC, Monteilh-Zoller MK, Scharenberg AM, Penner R, Fleig A. Dissociation of the store-operated calcium current ICRAC and the Mg²⁺-nucleotide-regulated metal ion current MagNuM. *J Physiol*. 2002;539(2):445–458.
121. Macianskiene R, Gwanyanya A, Vereecke J, Mubagwa K. Inhibition of the Magnesium-Sensitive TRPM7-like Channel in Cardiac Myocytes by Nonhydrolyzable GTP Analogs: Involvement of Phosphoinositide Metabolism. *Cell Physiol Biochem*. 2008;22(1-4):109–118.
122. Chubanov V, Mittermeier L, Gudermann T. Role of kinase-coupled TRP channels in mineral homeostasis. *Pharmacol Ther*. 2018;184:159–176.
123. Zou ZG, Rios FJ, Montezano AC, Touyz RM. TRPM7, Magnesium, and Signaling. *Int J Mol Sci*. 2019;20(8):1877.
124. Wolf FI, Trapani V, Simonacci M, Mastroianni L, Cittadini A, Schweigel M. Modulation of TRPM6 and Na⁺/Mg²⁺ exchange in mammary epithelial cells in response to variations of magnesium availability. *J Cell Physiol*. 2010;222(2):374–381.
125. Luongo F, Pietropaolo G, Gautier M, Dhennin-Duthille I, Ouadid-Ahidouch H, Wolf F, et al. TRPM6 is essential for magnesium uptake and epithelial cell function in the colon. *Nutrients*. 2018;10(6):784.
126. van der Wijst J, Blanchard Mg, Woodroof HI, Macartney TJ, Gourlay R, Hoenderop JG, et al. Kinase and channel activity of TRPM6 are co-ordinated by a dimerization motif and pocket interaction. *Biochem J*. 2014;460(2):165–175.
127. Woudenberg-Vrenken TE, Sukinta A, van der Kemp AW, Bindels RJM, Hoenderop JGJ. Transient receptor potential melastatin 6 knockout mice are lethal whereas heterozygous deletion results in mild hypomagnesemia. *Nephron Physiol*. 2011;117(2):11–19.
128. Chubanov V, Ferioli S, Wisnowsky A, Simmons DG, Leitzinger C, Einer C, et al. Epithelial magnesium transport by TRPM6 is essential for prenatal development and adult survival. *Elife*. 2016;5:e20914.
129. Komiya Y, Bai Z, Cai N, Lou L, Al-Saadi N, Mezzacappa C, et al. A nonredundant role for the TRPM6 channel in neural tube closure. *Sci Rep*. 2017;7(1):1-12.
130. Faouzi M, Kilch T, Horgen FD, Fleig A, Penner R. The TRPM7 channel kinase regulates store-operated calcium entry: TRPM7 modulation of SOCE. *J Physiol*. 2017;595(10):3165–3180.

131. Inoue H, Inazu M, Konishi M, Yokoyama U. Functional expression of TRPM7 as a Ca²⁺ influx pathway in adipocytes. *Physiol Rep*. 2019;7(20):e14272.
132. Inoue K, Xiong ZG. Silencing TRPM7 promotes growth/proliferation and nitric oxide production of vascular endothelial cells via the ERK pathway. *Cardiovasc Res*. 2009;83(3):547–557.
133. Mittermeier L, Demirkhanyan L, Stadlbauer B, Breit A, Recordati C, Hilgendorff A, et al. TRPM7 is the central gatekeeper of intestinal mineral absorption essential for postnatal survival. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019;116(10):4706–4715.
134. Jahnen-Dechent W, Ketteler M. Magnesium basics. *Clin Kidney J*. 2012;5:i3–i14.
135. DiNicolantonio JJ, O’Keefe JH, Wilson W. Subclinical magnesium deficiency: A principal driver of cardiovascular disease and a public health crisis. *Open Heart*. 2018;5(1):e000668.
136. Milla PJ, Aggett PJ, Wolff OH, Harries JT. Studies in primary hypomagnesaemia: Evidence for defective carrier-mediated small intestinal transport of magnesium. *Gut*. 1979;20(11):1028–1033.
137. Coulter M, Colvin C, Korf B, Messiaen L, Tuanama B, Crowley M, et al. Hypomagnesemia due to two novel TRPM6 mutations. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2015;28(11-12):1373–1378.
138. Walder RY, Landau D, Meyer P, Shalev H, Tsolia M, Borochowitz Z, et al. Mutation of TRPM6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Nat Genet*. 2002;31(2):171–174.
139. Bosman W, Hoenderop JG, de Baaij JH. Genetic and drug-induced hypomagnesemia: different cause, same mechanism. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2021;80(3):327–338.
140. Glaudemans B, van der Wijst J, Scola RH, Lorenzoni PJ, Heister A, van der Kemp AW, et al. A missense mutation in the Kv1.1 voltage-gated potassium channel-encoding gene KCNA1 is linked to human autosomal dominant hypomagnesemia. *J Clin Invest*. 2009;119(4):936–942.
141. Takashina Y, Manabe A, Hasegawa H, Matsunaga T, Endo S, Ikari A. Sodium citrate increases expression and flux of Mg²⁺ transport carriers mediated by activation of MEK/ERK/c-Fos pathway in renal tubular epithelial cells. *Nutrients*. 2018;10(10):1345.
142. Lee CT, Lien YHH, Lai LW, Chen JB, Lin CR, Chen HC. Increased renal calcium and magnesium transporter abundance in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Kidney Int*. 2006;69(10):1786–1791.
143. Yogi A, Callera GE, Antunes TT, Tostes RC, Touyz RM. Transient Receptor Potential Melastatin 7 (TRPM7) Cation Channels, Magnesium and the Vascular System in Hypertension. *Circ J*. 2011;75:237–245.
144. Duan J, Li Z, Li J, Hulse RE, Santa-Cruz A, Valinsky WC, et al. Structure of the mammalian TRPM7, a magnesium channel required during embryonic development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018;115(35):E8201–E8210.
145. Suzuki S, Lis A, Schmitz C, Penner R, Fleig A. The TRPM7 kinase limits receptor-induced calcium release by regulating heterotrimeric G-proteins. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(16):3069–3078.
146. Nadolni W, Zierler S. The Channel-Kinase TRPM7 as Novel Regulator of Immune System Homeostasis. *Cells*. 2018;7(8):109.
147. Landman N, Jeong SY, Shin SY, Voronov SV, Serban G, Kang MS, et al. Presenilin mutations linked to familial Alzheimer’s disease cause an imbalance in phosphati-

- dylinositol 4,5-bisphosphate metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(51):524-529.
148. Hermosura MC, Nayakanti H, Dorovkov MV, Calderon FR, Ryazanov AG, Haymer DS, et al. TRPM7 variant shows altered sensitivity to magnesium that may contribute to the pathogenesis of two Guamanian neurodegenerative disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(32):11510–11515.
 149. Antunes TT, Callera GE, He Y, Yogi A, Ryazanov AG, Ryazanova LV, et al. Transient Receptor Potential Melastatin 7 Cation Channel Kinase: New Player in Angiotensin II-Induced Hypertension. *Hypertension.* 2016;67(4):763–773.
 150. Touyz RM, He Y, Montezano AC, Yao G, Chubakov V, Gudermann T, et al. Differential regulation of transient receptor potential melastatin 6 and 7 cation channels by ANG II in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006;290(1):R73-R78.
 151. He Y, Yao G, Savoia C, Touyz RM. Transient receptor potential melastatin 7 ion channels regulate magnesium homeostasis in vascular smooth muscle cells: role of angio-tensin II. *Circ Res.* 2005;96(2):207-215.
 152. Zhang Z, Wang M, Fan XH, Chen JH, Guan YY, Tang YB. Upregulation of TRPM7 channels by angio-tensin II triggers phenotypic switching of vascular smooth muscle cells of ascending aorta. *Circ Res.* 2012;111(9):1137-1146.
 153. Huang Y, Leng TD, Inoue K, Yang T, Liu M, Horgen FD, et al. TRPM7 channels play a role in high glucose-induced endoplasmic reticulum stress and neuronal cell apoptosis. *J Biol Chem.* 2018;293(37):14393–14406.
 154. Chiang YF, Chen HY, Lee IT, Chien LS, Huang JH, Kolisek M, et al. Magnesium-responsive genes are downregulated in diabetic patients after a three-month exercise program on a bicycle ergometer. *J Chin Med Assoc.* 2019;82(6):495–499.
 155. Sun HS. Role of TRPM7 in cerebral ischaemia and hypoxia. *J Physiol.* 2017;595(10):3077–3083.
 156. Du J, Xie J, Zhang Z, Tsujikawa H, Fusco D, Silverman D, et al. TRPM7-mediated Ca^{2+} signals confer fibrogenesis in human atrial fibrillation. *Circ Res.* 2010;106(5):992–1003.
 157. Inoue R, Kurahara LH, Hiraishi K. TRP channels in cardiac and intestinal fibrosis. *Seminars in Cell and Developmental Biology.* 2019;94:40-49.
 158. Gatica S, Eltit F, Santibanez JF, Varela D, Cabello-Verrugio C, Simon F. Expression suppression and activity inhibition of TRPM7 regulate cytokine production and multiple organ dysfunction syndrome during endotoxemia: A new target for sepsis. *Curr Mol Med.* 2019;19(8):547–559.
 159. Liu A., Yang B. Roles of TRPM7 in Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *Curr Protein Pept Sci.* 2019;20(8):777–788.
 160. Voringer S, Schreyer L, Nadolni W, Meier MA, Woerther K, Mittermeier C, et al. Inhibition of TRPM7 blocks MRTF/ SRF-dependent transcriptional and tumorigenic activity. *Oncogene.* 2020;39(11):2328–2344.
 161. Yee NS. Role of TRPM7 in Cancer: Potential as Molecular Biomarker and Therapeutic Target. *Pharmaceuticals.* 2017;10(2):39.
 162. Rybarczyk P, Gautier M, Hague F, Dhennin-Duthille I, Chatelain D, Kerr-Conte J, et al. Transient receptor potential melastatin-related 7 channel is overexpressed in human pancreatic ductal adenocarcinomas and regulates human pancreatic cancer cell migration. *Int J Cancer.* 2012;131(6):E851-E861.

163. Yee NS, Chan AS, Yee JD, Yee RK. TRPM7 and TRPM8 ion channels in pancreatic adenocarcinoma: potential roles as cancer biomarkers and targets. *Scientifica*. 2012; 2012:415158.
164. Hanano T, Hara Y, Shi J, Morita H, Umebayashi C, Mori E, et al. In-volvement of TRPM7 in cell growth as a spontaneously ac-tivated Ca^{2+} entry pathway in human retinoblastoma cells. *J Pharmacol Sci*. 2004;95(4):403-419.
165. Guo H, Carlson JA, Slominski A. Role of TRPM in melanocytes and melanoma. *Exp Dermatol*. 2012;21(9):650-654.
166. Sun Y, Selvaraj S, Varma A, Derry S, Sahnoun AE, Singh BB. Increase in serum $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ratio promotes proliferation of prostate cancer cells by activating TRPM7 channels. *J Biol Chem*. 2013;288(1):255–263.
167. Yang F, Cai J, Zhan H, Situ J, Li W, Mao Y, et al. Suppression of TRPM7 inhibited hypoxia-induced migration and invasion of androgen-independent prostate cancer cells by enhancing RACK1-mediated degradation of HIF-1 α . *Oxidative Med Cell Longev*. 2020;2020:1–15.
168. Visser D, Middelbeek J, van Leeuwen FN, Jalink K. Function and regulation of the channel-kinase TRPM7 in health and disease. *Eur J Cell Biol*. 2014;93(10-12):455-465.
169. Middelbeek J, Kuipers AJ, Henneman L, Visser D, Eidhof I, van Horssen R, et al. TRPM7 is required for breast tumor cell metastasis. *Cancer Res*. 2012;72(16):4250-4261.
170. Tej A, Dworniczak B, Marzouk A, Soyah n, Tilouche S, Gribaa, M, et al. Hypomagne-semia with secondary hypocalcemia linked to a novel TRPM6 gene mutation. *Open Journal of Pediatrics*. 2016;6(4):290-294.
171. Wijst J, Hoenderop JGJ, Bindels RJM. Epithelial Mg^{2+} channel TRPM6: insight into the molecular regulation. *Magnesium Research*. 2009;22(3):127-132.
172. Cao G, Hoenderop JG, Bindels RJ. Insight into the molecular regulation of the epithelial magnesium channel TRPM6. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2008;17(4):373-378.
173. Groenestege WM, Hoenderop JG, van den Heuvel L, Knoers N, Bindels RJ. The epithelial Mg^{2+} channel transient receptor potential melastatin 6 is regulated by dietary Mg^{2+} content and estrogens. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(4):1035–1043.
174. Penner R, Fleig A. The Mg^{2+} and Mg^{2+} -nucleotide-regulated channel-kinase TRPM7. *Handb Exp Pharmacol*. 2007;179:313-328.
175. Takezawa R, Schmitz C, Demeuse P, Scharenberg AM, Penner R, Fleig A. Receptor-mediated regulation of the TRPM7 channel through its endogenous protein kinase domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(16):6009–6014.
176. Bae CY, Sun HS. TRPM7 in cerebral ischemia and potential target for drug development in stroke. *Acta Pharmacol Sin*. 2011;32(6):725-733.
177. Romani AM, Scarpa R. Regulation of cellular magnesium. *Front Biosci*. 2000;5(1): D720-D734.
178. Swaminathan R. Magnesium metabolism and its disorders. *Clin Biochem Rev*. 2003; 24(2):47-66.
179. Saris NE, Mervaala E, Karppanen H, Khawaja JA, Lewenstam A. Magnesium: An update on physiological, clinical and analytical aspects. *Clin Chim Acta*. 2000;294(1-2): 1-26.
180. Romani AM. Cellular magnesium homeostasis. *Arch Biochem Biophys*. 2011;512(1): 1-23.
181. De Baaij JH, Hoenderop JG, Bindels RJ. Magnesium in man: implications for health and disease. *Physiological reviews*. 2015.

182. Wolf FI, Trapani V. Cell physiology of magnesium. *Mol Aspects Med.* 2003;24(1-3): 11-26.
183. Quamme GA. Molecular identification of ancient and modern mammalian magnesium transporters. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010;298(3):C407-C429.
184. Konrad M, Schlingmann KP, Gudermann T. Insights into the molecular nature of magnesium homeostasis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004;286(4):F599-605.
185. Ayuk J, Gittoes NJ. Contemporary view of the clinical relevance of magnesium homeostasis. *Ann Clin Biochem.* 2014;51(2):179-188.
186. Jin J, Desai BN, Navarro B, Donovan A, Andrews NC, Clapham DE. Deletion of *Trpm7* disrupts embryonic development and thymopoiesis without altering Mg^{2+} homeostasis. *Science.* 2008;322:756–760.
187. Shechter M. Magnesium and cardiovascular system. *Magnes Res.* 2010;23(2):60–72.
188. Rosique-Esteban N, Guasch-Ferré M, Hernández-Alonso P, Salas-Salvadó J. Dietary magnesium and cardiovascular disease: a review with emphasis in epidemiological studies. *Nutrients.* 2018;10(2):168.
189. Chiuve SE, Sun Q, Curhan GC, Taylor EN, Spiegelman D, Willett WC, et al. Dietary and plasma magnesium and risk of coronary heart disease among women. *J Am Heart Assoc.* 2013;2(2):1–10.
190. Liao F, Folsom AR, Brancati FL. Is low magnesium concentration a risk factor for coronary heart disease: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am Heart J.* 1998;136(3):480–490.
191. Zhang X, Del Gobbo LC, Hruby A, Rosanoff A, He K, Dai Q, et al. The Circulating Concentration and 24-h Urine Excretion of Magnesium Dose- and Time-Dependently Respond to Oral Magnesium Supplementation in a Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Nutr.* 2016;146(3):595–602.
192. Del Gobbo LC, Imamura F, Wu JHY, Otto MCDO, Chiuve SE. Circulating and dietary magnesium and risk of cardiovascular disease: A systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Am J Clin Nutr.* 2013;98(1):160–173.
193. Khan AM, Lubitz SA, Sullivan LM, Sun JX, Levy D, Vasan RS, et al. Low serum magnesium and the development of atrial fibrillation in the community: The framingham heart study. *Circulation.* 2013;127(1):33–38.
194. Misialek JR, Lopez FL, Lutsey PL, Huxley RR, Peacock JM, Chen LY, et al. Serum and Dietary Magnesium and Incidence of Atrial Fibrillation in Whites and in African Americans – Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circ J.* 2013;77:323–329. (2012;CJ-12)
195. Barbagallo M, Dominguez LJ, Galioto A, Ferlisi A, Cani C, Malfa L, et al. Role of magnesium in insulin action, diabetes and cardio-metabolic syndrome X. *Mol Asp Med.* 2003;24(1-3):39–52.
196. Mazur A, Maier JAM, Rock E, Gueux E, Nowacki W, Rayssiguier Y. Magnesium and the inflammatory response: Potential physiopathological implications. *Arch Biochem Biophys.* 2007;458(1):48–56.
197. Blache D, Devaux S, Joubert O, Loreau N, Schneider M, Durand P, et al. Long-term moderate magnesium-deficient diet shows relationships between blood pressure, inflammation and oxidant stress defense in aging rats. *Free Radic Biol Med.* 2006; 41(2):277–284.
198. Freedman AM, Atrakchi AH, Cassidy MM, Weglicki WB. Magnesium deficiency-induced cardiomyopathy: Protection by vitamin E. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;170(3):1102–1106.

199. Freedman AM, Cassidy MM, Weglicki WB. Magnesium-deficient myocardium demonstrates an increased susceptibility to an in vivo oxidative stress. *Magnes Res.* 1991;4(3-4):185–189.
200. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Archiv : European journal of physiology.* 1981;391(2):85-100.
201. Demir T, Yumrutas O, Cengiz B, Demiryurek S, Unverdi H, Kaplan DS, et al. Evaluation of TRPM (transient receptor potential melastatin) genes expressions in myocardial ischemia and reperfusion. *Molecular biology reports.* 2014;41(5):2845-2849.
202. Parajuli N, Valtuille L, Basu R, Famulski KS, Halloran PF, Sergi C, et al. Determinants of ventricular arrhythmias in human explanted hearts with dilated cardiomyopathy. *Eur J Clin Invest.* 2015;45(12):1286–1296.
203. Andriulė I, Pangonytė D, Almanaitytė M, Patamsytė V, Kuprytė M, Karčiauskas D, et al. Evidence for the expression of TRPM6 and TRPM7 in cardiomyocytes from all four chamber walls of the human heart. *Sci Rep.* 2021;11(1):1–14.
204. Scalia CR, Gendusa R, Basciu M, Riva L, Tusa L, Musarò A, et al. Epitope recognition in the Human–Pig comparison model on fixed and embedded material. *J Histochem Cytochem.* 2015;63(10):805–822.
205. Fang X, Mu Y, Huang Z, Li Y, Han L, Zhang Y, et al. The sequence and analysis of a Chinese pig genome. *Gigascience.* 2012;1(1):2047-217X.
206. Gräbner W, Pfitzer P. Number of nuclei in isolated myocardial cells of pigs. *Virchows Archiv B.* 1974;15(1):279-294.
207. Yue L, Xie J, Nattel S. Molecular determinants of cardiac fibroblast electrical function and therapeutic implications for atrial fibrillation. *Cardiovascular research.* 2011;89(4): 744-753.
208. Macianskiene R, Moccia F, Sipido KR, Flameng W, Mubagwa K. Channels involved in transient currents unmasked by removal of extracellular calcium in cardiac cells. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology.* 2002;282(5):H1879-88.
209. Li GR, Du XL, Siow YLOK, Tse HF, Lau CP. Calcium-activated transient outward chloride current and phase 1 repolarization of swine ventricular action potential. *Cardiovascular research.* 2003;58(1):89-98.
210. Gwanyanya A, Andriulė I, Istrate BM, Easmin F, Mubagwa K, Mačianskienė R. Modulation of the Cardiac Myocyte Action Potential by the Magnesium-Sensitive TRPM6 and TRPM7-like Current. *International Journal of Molecular Sciences.* 2021;22(16):8744.
211. Touyz RM. Transient receptor potential melastatin 6 and 7 channels, magnesium transport, and vascular biology: implications in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;294(3):H1103–H1118.
212. Morine KJ, Paruchuri V, Qiao X, Aronovitz M, Huggins GS, DeNofrio D, et al. Endoglin selectively modulates transient receptor potential channel expression in left and right heart failure. *Cardiovasc Pathol.* 2016;25(6):478–482.
213. Cuffe JS, Steane S, Moritz KM, Paravicini TM. Differential mRNA expression and glucocorticoid-mediated regulation of TRPM6 and TRPM7 in the heart and kidney throughout murine pregnancy and development. *PLoS One.* 2015;10(2):e0117978.
214. Iacobas S, Amuzescu B, Iacobas DA. Transcriptomic uniqueness and commonality of the ion channels and transporters in the four heart chambers. *Sci Rep.* 2021;11(1):1–20.

215. Nilius B, Vennekens R. From cardiac cation channels to the molecular dissection of the transient receptor potential channel TRPM4. *Pflügers Archiv*. 2006;453(3):313-321.
216. Chubanov V, Mederos y Schnitzler M, Wäring J, Plank A, Gudermann T. Emerging roles of TRPM6/TRPM7 channel kinase signal transduction complexes. *Naunyn Schmiedabergs Arch Pharmacol*. 2005;371(4):334-341.
217. Ferioli S, Zierler S, Zaißerer J, Schredelseker J, Gudermann T, Chubanov V. TRPM6 and TRPM7 differentially contribute to the relief of heteromeric TRPM6/7 channels from inhibition by cytosolic Mg^{2+} and $Mg\cdot ATP$. *Sci Rep*. 2017;7(1):1-19.
218. Zhang Z, Yu H, Huang J, Faouzi M, Schmitz C, Penner R, et al. The TRPM6 kinase domain determines the $Mg\cdot ATP$ sensitivity of TRPM7/M6 heteromeric ion channels. *J Biol Chem*. 2014;89(8):5217-5227.
219. Gwanyanya A, Sipido KR, Vereecke J, Mubagwa K. ATP and PIP₂ dependence of the magnesium-inhibited, TRPM7-like cation channel in cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;291(4):C627-C635.
220. Lu D, Qu J, Sun L, Li Q, Ling H, Yang N, et al. Ca^{2+}/Mg^{2+} homeostasis-related TRPM7 channel mediates chondrocyte hypertrophy via regulation of the PI3K-Akt signaling pathway. *Mol Med Rep*. 2017;16(4):5699-5705.
221. Abed E, Moreau R. Importance of melastatin-like transient receptor potential 7 and cations (magnesium, calcium) in human osteoblast-like cell proliferation. *Cell Prolif*. 2007;40:849-865.
222. Bosteels S, Matejovic P, Flameng W, Mubagwa K. Sodium influx via a non-selective pathway activated by the removal of extracellular divalent cations: Possible role in the calcium paradox. *Cardiovasc Res*. 1999;43(2):417-425.
223. Baldoli E, Castiglioni S, Maier JAM. Regulation and function of TRPM7 in human endothelial cells: TRPM7 as a potential novel regulator of endothelial function. *PLoS ONE*. 2013;8(3):e59891.
224. Baldoli E, Maier JAM. Silencing TRPM7 mimics the effects of magnesium deficiency in human microvascular endothelial cells. *Angiogenesis*. 2012;15(1):47-57.
225. Inoue H, Murayama T, Tashiro M, Sakurai T, Konishi M. Mg^{2+} - and ATP-dependent inhibition of transient receptor potential melastatin 7 by oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2014;72:257-266.
226. Nuñez-Villena F, Becerra A, Echeverría C, Briceno N, Porrás O, Armisen R, et al. Increased expression of the transient receptor potential melastatin 7 channel is critically involved in lipopolysaccharide-induced reactive oxygen species-mediated neuronal death. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(9):2425-2438.
227. Isenberg G. Nonselective cation channels in cardiac and smooth muscle cells. *Nonselective Cation Channels*. 1993;66:247-260.
228. Zakharov SI, Mongayt DA, Cohen RA, Bolotina VM. Monovalent cation and L-type Ca^{2+} channels participate in calcium paradox-like phenomenon in rabbit aortic smooth muscle cells. *J Physiol*. 1999;514(1):71-81.
229. Bae YM, Park MK, Lee SH, Ho WK, Earm YE. Contribution of Ca^{2+} -activated K^{+} channels and non-selective cation channels to membrane potential of pulmonary arterial smooth muscle cells of the rabbit. *J Physiol*. 1999;514(3):747-758.
230. Zhang YH, Youm JB, Sung HK, Lee SH, Ryu SY, Ho WK, et al. Stretch-activated and background non-selective cation channels in rat atrial myocytes. *J Physiol*. 2000;523(3):607-619.
231. Lopatin AN, Makhina EN, Nichols CG. Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature*. 1994;372(6504):366-369.

232. Cartwright JH, Aziz Q, Harmer SC, Thayyil S, Tinker A, Munroe PB. Genetic variants in TRPM7 associated with unexplained stillbirth modify ion channel function. *Hum Mol Genet.* 2020;29(11):1797–1807.
233. Zakharov SI, Smani T, Leno E, Macianskiene R, Mubagwa K, Bolotina VM. Monovalent cation (MC) current in cardiac and smooth muscle cells: Regulation by intracellular Mg^{2+} and inhibition by polycations. *Br J Pharmacol.* 2003;138(1):234–244.
234. Aarts M, Iihara K, Wei WL, Xiong ZG, Arundine M, Cerwinski W, et al. A key role for TRPM7 channels in anoxic neuronal death. *Cell.* 2003;115(7):863–877.
235. Sun HS, Jackson MF, Martin LJ, Jansen K, Teves L, Cui H, et al. Suppression of hippocampal TRPM7 protein prevents delayed neuronal death in brain ischemia. *Nat Neurosci.* 2009;12(10):1300–1307.
236. Bensley JG, De Matteo R, Harding R, Black MJ. Three-dimensional direct measurement of cardiomyocyte volume, nuclearity, and ploidy in thick histological sections. *Scientific reports.* 2016;6(1):1-10.

MOKSLINĖS PUBLIKACIJOS

Publikacijos disertacijos tema duomenų bazėje Web of Science DB referuojamuose leidiniuose su citavimo rodikliu:

1. **Andriulė I**, Pangonytė D, Almanaitytė M, Patamsytė V, Kuprytė M, Karčiauskas D, Mubagwa K, Mačianskienė R. Evidence for the expression of TRPM6 and TRPM7 in cardiomyocytes from all four chamber walls of the human heart. *Scientific Reports*. 2021;11(1):1-14. [Citav. rodiklis: 4,379; kvartilis: Q1].
2. Gwanyanya A, **Andriulė I**, Istrate MB, Easmin F, Mubagwa K, Mačianskienė R. Modulation of the Cardiac Myocyte Action Potential by the Magnesium-Sensitive TRPM6 and TRPM7-like Current. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(16):1-15. [Citav. rodiklis: 5,923; kvartilis: Q1].

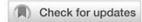
Kitos publikacijos:

1. **Andriulė I**. Magnio homeostazę organizme palaikantys kanalai: ekspresija, lokalizacija ir fiziologinė/patofiziologinė reikšmė. Lietuvos kardiologų draugijos ir Lietuvos mokslų akademijos konferencija: Jaunųjų mokslininkų pasiekimai fundamentinėje kardiologijoje. Vilnius, Lietuva. 2022 Vasario 23 d.
2. **Andriulė I**, Almanaitytė M, Mačianskienė R. Mg²⁺-sensitive TRPM6 and TRPM7 channels in human atrial cardiomyocytes: impact of atrial fibrillation and ischemic heart disease. *Health for all: Science and Innovation week 2019. International Doctoral and Resident Students Conference: Science for Health*. Kaunas, Lithuania. 8-12 April, 2019.
3. **Andriulė I**, Mačianskienė R. Non-homogeneous distribution of TRPM6 in the human heart. *Baltic Biophysics Conference*. Kaunas, Lithuania. 4-5 October, 2018.
4. Mačianskienė R, Martišienė I, Navalinskas A, Treinys R, **Andriulė I**, Jurevičius J. Metabolic inhibition induces transient increase of action potential duration in the rabbit heart. *Baltic Biophysics Conference*. Kaunas, Lithuania. 4-5 October, 2018.
5. **Andriulė I**, Mačianskienė R. Determination of TRPM7 expression in cardiomyocytes of ischemic cardiomyopathy patients. *XV International Conference of the Lithuanian Biochemical Society*. Dubingiai, Lithuania. 26-29 June, 2018.

6. **Andriulė I**, Almanaitytė M, Jekabsone A, Mačianskienė R. Determining TRPM7 in human cardiomyocytes. 1st International Scientific Doctoral Students' conference „Science for Health 2018“. Kaunas, Lithuania. 13 April, 2018.
7. **Andriulė I**, Jekabsone A, Mačianskienė R. Non-homogeneous distribution of TRPM7 in human ventricular cardiomyocytes. The COINS 2018: 13th international conference of life sciences. Vilnius, Lithuania. 28 February-2 March, 2018.

Kitos publikacijos duomenų bazėje Web of Science DB referuojamuose leidiniuose su citavimo rodikliu:

1. Mačianskienė R, Pudžiuvėlytė L, Bernatoniene J, Almanaitytė M, Navalinskas A, Treinys R, **Andriulė I**, Jurevičius J. Antiarrhythmic Properties of Elsholtzia ciliata Essential Oil on Electrical Activity of the Isolated Rabbit Heart and Preferential Inhibition of Sodium Conductance. *Biomolecules*. 2020;10(6):948. [Citav. rodiklis: 4,879; kvartilis: Q2].
2. Mačianskienė R, Martišienė I, Navalinskas A, Treinys R, **Andriulė I**, Jurevičius J. Mechanism of Action Potential Prolongation During Metabolic Inhibition in the Whole Rabbit Heart. *Front Physiol*. 2018;9:1077. [Citav. rodiklis: 3,201; kvartilis: Q2].



OPEN

Evidence for the expression of TRPM6 and TRPM7 in cardiomyocytes from all four chamber walls of the human heart

Inga Andriulė¹, Dalia Pangonytė¹, Mantė Almanaitytė¹, Vaiva Patamsytė¹, Milda Kuprytė¹, Dainius Karčiauskas², Kanigula Mubagwa^{3,4} & Regina Mačianskienė^{1,5}

The expression of the channels-enzymes TRPM6 and TRPM7 in the human heart remains poorly defined, and TRPM6 is generally considered not to be expressed in cardiomyocytes. We examined their expression at protein and mRNA levels using right atrial samples resected from patients (n=72) with or without ischemic heart disease (IHD) and samples from all chamber walls of explanted human hearts (n=9). TRPM6 and TRPM7 proteins were detected using immunofluorescence on isolated cardiomyocytes, ELISA on tissue homogenates, and immunostaining of cardiac tissue, whereas their mRNAs were detected by RT-qPCR. Both TRPM6 and TRPM7 were present in all chamber walls, with TRPM7 being more abundant. TRPM6 was co-expressed with TRPM7. The expression levels were dependent on cell incubation conditions (presence or absence of divalent cations, pH of the extracellular milieu, presence of TRP channel inhibitors 2-aminoethoxydiphenyl-borate and carvacrol). These drugs reduced TRPM7 immunofluorescence but increased that of TRPM6. TRPM6 and TRPM7 expression was increased in tissues from IHD patients. This is the first demonstration of the presence and co-expression of TRPM6 and TRPM7 in cardiomyocytes from all chamber walls of the human heart. The increased TRPM6 and TRPM7 expression in IHD suggests that the channels are involved in the pathophysiology of the disease.

TRPM7 and its homologue TRPM6 belong to the TRP channel melastatin subfamily, are regulated by intracellular magnesium and are distinguished from other ion channels by unusual bifunctional activities, ion channel and protein kinase¹⁻³. Both of them are permeable to Ca²⁺ and Mg²⁺, and are key regulators of Mg²⁺ homeostasis, but their tissue expression levels appear to be different. Current evidence shows that TRPM7 is ubiquitously expressed in all mammalian cells, with the highest expression in the heart and kidney^{3,4}, whereas TRPM6 expression is restricted to epithelial cells of the kidney, placenta and intestine^{5,6}. They are reported to play a role in various physiological or pathological processes, including intracellular Ca²⁺ and Mg²⁺ homeostasis⁷, pace-making⁸, fibrosis and inflammation⁹, etc. The functional characterization of these channels has relied mainly on electrophysiological methods¹⁰, including in cardiac myocytes¹¹⁻¹⁴. Except for a differential pharmacological sensitivity to some substances (e.g., 2-aminoethoxydiphenyl-borate (2-APB)), the biophysical properties of murine or human TRPM6 and TRPM7 constructs expressed in various cell lines are almost indistinguishable¹⁰. However, the electrophysiological characterization has been limited by the lack of specific blockers. In addition, in native cardiomyocytes the majority of TRPM6 and TRPM7 proteins appear to reside in intracellular vesicles^{15,16}, and are therefore inaccessible to patch clamp recordings.

To date, studies of TRPM6 and TRPM7 channel expression either in un-diseased¹⁷ or diseased¹⁸ human heart has relied mainly on the genomic approach. However, data on *Trpm6* or *Trpm7* mRNA and protein expression in different parts of the heart has remained scant, and conflicting results have been reported, especially concerning TRPM6. In both animals and humans, whereas some studies found that *Trpm6* mRNA was undetectable in the heart¹⁹⁻²¹, one study identified *Trpm6* mRNA and protein in the human heart and showed their increase in right atrial cardiomyocytes from patients with atrial fibrillation (AF)²². In most others studies information of TRPM6

¹Institute of Cardiology, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania. ²Department of Cardiac, Thoracic and Vascular Surgery, Hospital of Lithuanian University of Health Sciences Kauno Klinikos, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania. ³Department of Cardiovascular Sciences, Faculty of Medicine, KU Leuven, Leuven, Belgium. ⁴Department of Basic Sciences, Faculty of Medicine, Université Catholique de Bukavu, Bukavu, DR, Congo. ⁵email: regina.macianskiene@ismuni.lt

was not included^{18,23}. Thus, the presence of TRPM6 in the heart remains controversial and, more specifically, whether it and TRPM7 are expressed in all chamber walls of the heart is an open question.

The present study used different approaches, including protein detection by immunostaining of isolated cardiomyocytes or of cardiac tissue, protein measurements by ELISA in cardiac homogenates and mRNA detection by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), to examine TRPM6 and TRPM7 expression. The data confirm the presence of TRPM6 protein and gene alongside TRPM7 in the walls of all four chambers of the adult human heart. Moreover, we report on the modulation of the measured TRPM6 and TRPM7 fluorescence by the ionic composition of the cell incubation medium, by pharmacological drugs and by the pathological condition of ischemic heart disease.

Results

Immunofluorescence detection and co-expression of TRPM6 and TRPM7 in cardiomyocytes from the walls of all four chambers of the human heart.

We undertook to carry out an in-depth comparison of both TRPM7 vs. TRPM6 protein expression in the four cardiac chambers using several molecular approaches. First, we used the immunostaining of TRPM7 and TRPM6 proteins of atrial and ventricular cardiomyocytes, performed 2 h or 12 h after cell isolation. Figure 1 illustrates that all cardiomyocytes expressed both channels, with a lower expression level for TRPM6 (Fig. 1a,b). Noticeably, the immunofluorescence of TRPM6 protein, in contrast to TRPM7, appeared to be highest in the perinuclear area in about half cases (44.7% from ~ 400 cells; see Fig. 1a,b, arrows). This indicates that part of detected fluorescence is from the intracellular membranes, especially given the permeabilization with Triton-X. TRPM7 and TRPM6 protein expression was slightly but significantly higher for the right-sided vs. left-sided chambers (Fig. 1c,d; see also Supplementary Table S1 online). The expression level for either TRPM6 or TRPM7 was higher when cells were fixed after 12 h of cardiomyocyte conservation (Fig. 1c,d; compare filled and unfilled columns, respectively). In general, the immunofluorescence level of both channel proteins in cardiomyocytes from all chamber walls was significantly higher following cell incubation in divalent cation-containing (DV) extracellular conditions vs. following incubation in divalent cation-free (DVF) conditions (Fig. 1c vs. d).

Figure 2 illustrates immunofluorescence images obtained using conjugated primary antibodies to simultaneously detect both TRPM6 and TRPM7 proteins expression in the same cell. The data indicate a co-expression of TRPM6 and TRPM7 proteins in cardiomyocytes from the four heart chambers (Fig. 2a). Like with non-conjugated antibodies, levels of TRPM7 were higher vs. those of TRPM6 in all chamber walls. The fluorescence level with conjugated antibodies for both channels was lower compared with that of the non-conjugated primary antibodies (compare Fig. 2b with Fig. 1b, see also Supplementary Tables S1, S2 online). Altogether, the above results provide a consistent evidence for a co-expression of both TRPM6 and TRPM7 in cardiomyocytes from the four chamber walls of the human heart.

Opposite effects of 2-APB and CAR on immunofluorescence of TRPM6 and TRPM7 in the human heart.

In addition to the presence/absence of extracellular divalent cations, the presence of pharmacological drugs known to inhibit TRPM6 and TRPM7 channel function also had an effect on the immunofluorescence levels of TRPM6 and TRPM7. In our study the cardiomyocytes were exposed to 2-APB (500 $\mu\text{mol/L}$) or CAR (100 $\mu\text{mol/L}$), added for 15 min after keeping the cells for 2 h or 12 h, but before cell fixation and subsequent incubation with primary antibodies. Figure 3a,b illustrates immunostaining images of TRPM7 (green) and TRPM6 (red) proteins under control conditions (i.e., without the drugs) as well as after pre-treatments with 2-APB (Fig. 3c,d) or CAR (Fig. 3e,f). Cells treated with these drugs displayed weaker TRPM7 fluorescence intensity but stronger TRPM6 intensity. Mean fluorescence levels are presented in Fig. 3g,h, respectively. Whereas the vehicle, DMSO, did not change fluorescence intensity (0.0993 ± 0.0008 a.u. and 0.0847 ± 0.0007 a.u. in solutions with and without divalent cations, respectively; $n = 10-11$), with 2-APB (500 $\mu\text{mol/L}$) immunodetected TRPM7 was decreased (from 0.0986 ± 0.0006 a.u. to 0.0246 ± 0.0003 a.u., $n = 16-88$, $P < 0.001$, in solutions with divalent cations, and from 0.0827 ± 0.0005 a.u. to 0.0162 ± 0.0004 a.u., $n = 70-76$, $P < 0.001$, in solutions without divalent cations). Under the same experimental conditions 2-APB (500 $\mu\text{mol/L}$) caused an increase in TRPM6 fluorescence (from 0.0518 ± 0.0003 a.u. to 0.1500 ± 0.0004 a.u., $n = 20-99$, $P < 0.001$, and from 0.0354 ± 0.0006 to 0.1569 ± 0.0005 a.u., $n = 70-87$, $P < 0.001$, in solutions with and without divalent cations, respectively). Qualitatively similar changes were caused by CAR in cardiomyocytes incubated for 2 h (not illustrated) or for 12 h before addition of CAR (Fig. 3i,j): TRPM7 fluorescence decreased from 0.1748 ± 0.0006 a.u. to 0.0383 ± 0.0003 a.u., $n = 6-64$, $P < 0.001$; and from 0.1188 ± 0.0007 a.u. to 0.0251 ± 0.0002 a.u., $n = 6-32$, $P < 0.001$, respectively. In contrast, TRPM6 fluorescence increased from 0.0717 ± 0.0004 a.u. to 0.1907 ± 0.0004 a.u., $n = 16-20$, $P < 0.001$, and from 0.0428 ± 0.0004 a.u. to 0.1433 ± 0.0002 a.u., $n = 17-37$, $P < 0.001$, respectively.

Extracellular proton concentration affects the immunofluorescence of TRPM6 and TRPM7 in human cardiomyocytes.

Like extracellular divalent cations and pharmacological agents, extracellular pH is known to modulate TRPM6 or TRPM7 channel function^{11,12,14}. We also examined the possible impact of extracellular acidity on the immunofluorescence. Cardiomyocytes were pre-incubated for 2 h in an acidic extracellular milieu with and without divalent cations, just before fixation. As illustrated in Fig. 4a, extracellular acidification to pH 5.0 increased immunofluorescence level of TRPM7 and TRPM6 by 1.45 fold and 3.06 fold, respectively (to 0.1536 ± 0.0004 a.u. and to 0.1524 ± 0.0004 a.u., respectively; $n = 15-25$, $P < 0.001$), relative to the fluorescence detected in cells kept at pH 7.4 (0.1057 ± 0.0008 a.u. and 0.0498 ± 0.0003 a.u., respectively; $n = 61-69$, $P < 0.001$). In this case, an interaction was observed with extracellular divalent cations. Acidification to pH 5.0 during incubation without divalent cations changed the fluorescence level of immunodetected proteins differently, as presented in Fig. 4b: suppression of TRPM7 (from 0.0830 ± 0.0004 a.u. to 0.0500 ± 0.0006 a.u.,

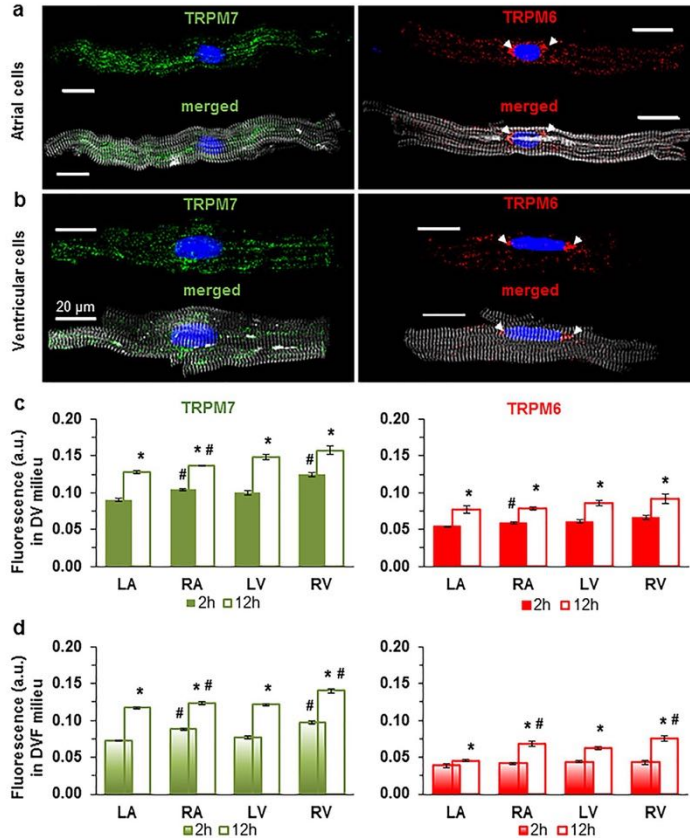


Figure 1. Immunofluorescence of TRPM7 and TRPM6 proteins in all cells used. Image acquisition performed using confocal laser scanning microscope (a, atria; b, ventricle). Immunofluorescence of confocal z-stack of cardiomyocytes with immunodetected TRPM7 and TRPM6 proteins, respectively. Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 546 for the TRPM7 and TRPM6 protein appear in green and red, respectively. Alexa Fluor 405 for F-actin cytoskeleton appears in surrogate grey. Hoechst 33342 for nuclei appears in blue (the arrowheads indicate the localization of TRPM6 protein in the perinuclear area). (c, d) Quantification of immunofluorescence levels of the TRPM7 (green) and TRPM6 (red) proteins in cardiomyocytes from four chambers of the heart (left atrium, LA; right atrium, RA; left ventricle, LV; and right ventricle, RV), under experimental conditions with (c) and without (d) divalent cations in the extracellular milieu, respectively. Cardiomyocytes were fixed following 2 h (filled columns) or 12 h (unfilled columns) after cell isolation. Mean data provided in arbitrary units (a.u.) (Supplementary Table 1 online). A blinded study-design (with the investigator reading the fluorescence not knowing the cell incubation conditions) was used for the detection of protein concentration during various experimental conditions. * $P < 0.05$ 2 h vs. 12 h and # $P < 0.05$ right-sided vs. left-sided heart chambers. Scale bars indicate 20 μm .

$n = 11-51$, $P < 0.001$), but enhancement of TRPM6 by 5.62 fold (from 0.0314 ± 0.0005 a.u. to 0.1765 ± 0.0004 a.u., $n = 6-25$, $P < 0.001$). The data indicate that both immunodetected proteins are not coupled and show individual regulation under extracellular acidification of the milieu.

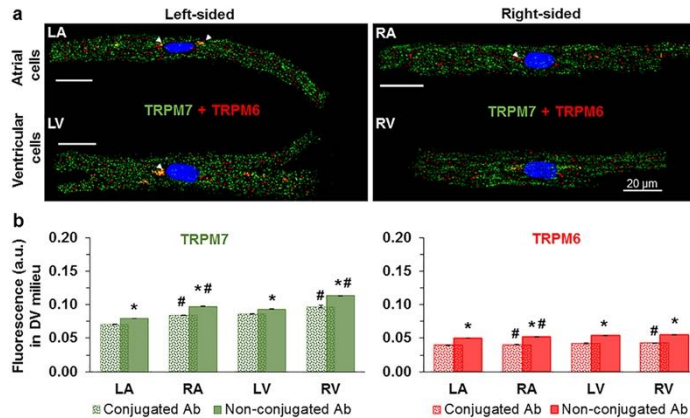


Figure 2. Immunofluorescence images depicting co-expression of TRPM6 and TRPM7 proteins in human cardiomyocytes. (a) The immunofluorescence of TRPM7 (green) and TRPM6 (red) in the same LA, RA, LV, and RV cardiomyocyte when using conjugated antibodies (the arrowheads indicate the localization of TRPM6 protein in perinuclear area). (b) Quantification of the staining intensity of the immunodetected conjugated antibodies (smooth) and non-conjugated antibodies (spotty) for both proteins in cardiomyocytes from the four chambers of the heart as indicated. * $P < 0.001$ 2 h vs. 12 h, # $P < 0.001$ right-sided vs. left-sided heart chambers. Other notations are the same as in Fig. 1.

Influence of underlying diseases on the immunodetected TRPM6 and TRPM7. Since our previous electrophysiological studies indicated an influence of IHD on the TRPM7 current density¹², we also sought to determine whether such a pathological condition also influences the levels of immunodetected TRPM6 and TRPM7 proteins. Figure 5 compares the mean levels of TRPM6 and TRPM7 protein immunostaining in cardiomyocytes from patients with or without a clinical history of IHD. In general, independently of the experimental conditions used to incubate cells (i.e. presence/absence of extracellular divalent cations, 2 h or 12 h incubation), the immunofluorescence levels of both channel proteins were much higher in cardiomyocytes of the IHD patient group compared to those from non-IHD patients (Fig. 5, upper values of each panel; see also Supplementary Tables S3, S4 online).

Validations of TRPM6 and TRPM7 proteins expression by ELISA and of their mRNA expression by RT-qPCR in the four chambers of the human heart. Having characterized TRPM6 and TRPM7 expression using immunofluorescence, we wanted to examine whether the results can be validated using a different technique, ELISA carried on tissue homogenates. Figure 6a,b illustrates that ELISA also detected the presence of TRPM7 and TRPM6 proteins in all cardiac chamber walls. The results are qualitatively similar to those obtained using immunofluorescence: higher expression of TRPM7 compared to TRPM6 (Supplementary Table S5 online), higher expression in right chambers compared to left chambers, increased expression in IHD. We also found that in the LV the expression of the TRPM7 and TRPM6 proteins was significantly ($P < 0.05$) higher in subepicardial homogenates (1313.75 ± 15.81 pg/mL and 324.33 ± 22.22 pg/mL, respectively; $n = 3$) compared with subendocardial homogenates (1114.80 ± 23.96 pg/mL and 256.76 ± 19.24 pg/mL, respectively; $n = 3$).

Figure 6c shows the results of RT-qPCR to assess TRPM6 and TRPM7 expression at the mRNA level using primers designed for the human genes (*Trpm6* and *Trpm7*). β -actin (ACTB) was used as internal control. Both *Trpm6* and *Trpm7* mRNAs were detected in cardiac tissues from explanted human hearts. Both had 100% qPCR efficiency for all four cardiac chamber walls (Fig. 6c). Here also RT-qPCR showed that the *Trpm6* gene relative expression was much lower compared to the *Trpm7* gene expression (Fig. 6c, Supplementary Figure S1, and Supplementary Table S6 online). *Trpm7* mRNA expression was more than two- to fourfold higher in ventricular tissue compared to atria (Fig. 6c, green). In general, RT-qPCR results are in agreement with the expression of the proteins. However, in contrast to results with immunofluorescence, there was no significant difference of the *Trpm6* mRNA expression level in right vs. left sides.

Demonstration of TRPM6 and TRPM7 expression by immunohistochemistry. Finally, to further demonstrate TRPM6 and TRPM7 expression in the human heart, histologic preparations of ventricular and atrial tissues were exposed to primary antibodies and stained with Mayer's hematoxylin. Color intensity analysis of TRPM7 (Fig. 7) as well as of TRPM6 (Fig. 8) in tissues showed noticeable brownish pigments in the intracellular space in tissues from the four chamber walls of non-ischemic heart (obtained from a victim of traffic acci-

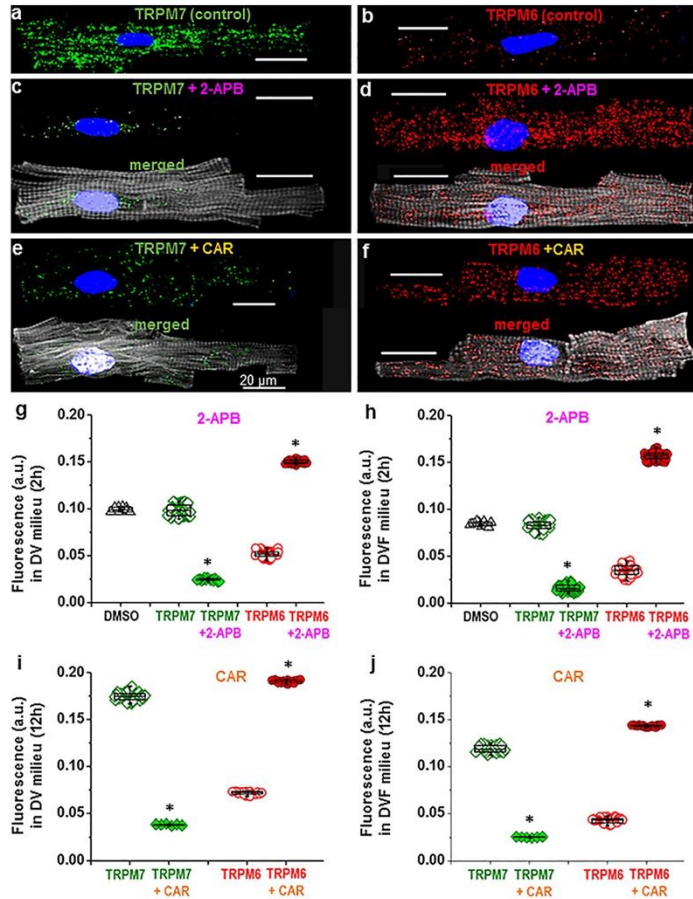


Figure 3. Effect of 2-APB and CAR on the immunofluorescence of TRPM6 and TRPM7 in human cardiomyocytes. (a–f): Cardiomyocyte staining with anti-TRPM7 (a, c, e) or anti-TRPM6 (b, d, f) in the absence (a, b) of drugs and in the presence of either 2-APB (c, d) or CAR (e, f). (g–j): Quantification of the intensity of fluorescence without drugs (*open*) and with the drugs (*filled*) expressed in arbitrary units (a.u.). Note lack of influence of the solvent, DMSO, at 500 μmol/L (triangles) but opposite change with 2-APB and CAR on TRPM7 vs. TRPM6, i.e. decrease of the immunofluorescence level of TRPM7 but increase of the TRPM6 fluorescence level. * $P < 0.001$ drug vs. no drug. Other notations are the same as in Fig. 1.

dent and serving as control; Figs. 7a,8a) and of an IHD heart (Figs. 7b,8b). Morphological changes of myocardial tissues from the IHD patients included cardiomyocyte hypertrophy and nuclear enlargement (see also Fig. 7e) as well as interstitial fibrosis (Fig. 7f). Qualitatively similar data on TRPM6 and TRPM7 staining were obtained in heart tissue sections from all subjects of this study (Supplementary Table S7 online).

Discussion

Our study provides evidence of cardiac co-expression of TRPM6 and TRPM7 in cardiomyocytes from all four chamber walls of the human heart. Till now there has been consistent evidence for the expression of TRPM7 in cardiac tissue, including in contractile (atrial and ventricular) cardiomyocytes and conduction cells as well as in fibroblasts (see²⁴). TRPM7 is likely also expressed in coronary vascular endothelial and smooth muscle cells like

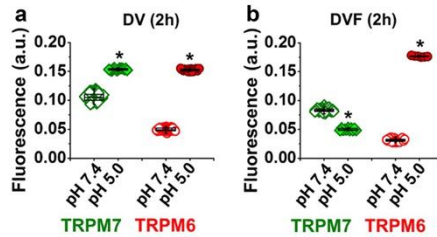


Figure 4. Effect on incubating human cardiomyocytes in acidic solution on the immunofluorescence of TRPM6 and TRPM7. (a, b) Quantification of the intensity of fluorescence at pH = 7.4 (open symbols) and at pH = 5.0 (filled symbols) expressed in arbitrary units (a.u.) with and without divalent cations, respectively. * $P < 0.001$ pH 5.0 vs. pH 7.4. Other notations are the same as in Fig. 1. Extracellular acidification differently changes the fluorescence level of the immunodetected TRPM7 (filled diamonds) and TRPM6 (filled circles) proteins in human cardiomyocytes depending on the presence of divalent cations in the milieu.

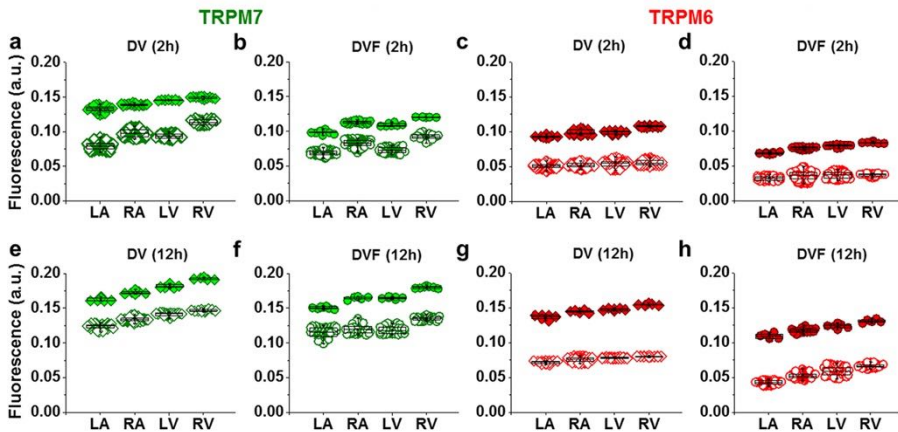


Figure 5. Comparison of the levels of TRPM6 and TRPM7 in IHD vs. non-IHD. (a–d, e–h) Quantification of the intensity of fluorescence in cardiomyocytes obtained from patients with IHD (filled symbols) and without such diagnosis (unfilled symbols) expressed in arbitrary units (a.u.) in presence/absence of divalent cations, 2 h and 12 h, respectively. In all cells used $P < 0.001$ IHD vs. non-IHD. Other notations are the same as in Fig. 1. IHD increases the fluorescence level of the immunodetected TRPM7 (green) and TRPM6 (red) proteins expression.

in peripheral vasculature²⁵. But controversy exists concerning the expression of TRPM6. In addition, investigation on TRPM6 and TRPM7 expression in all four chamber walls of the human heart was still lacking. Here, we employed different approaches to examine this expression. First, using immunofluorescence on cardiomyocytes isolated from any part of the human heart, we detected expression of TRPM6 alongside with TRPM7 expression. In support of these results, TRPM6 and TRPM7 proteins were also detected by immunohistochemistry, they were detected and quantified by ELISA and their corresponding mRNAs were identified by RT-qPCR. The TRPM7 expression level was consistently much higher than that of TRPM6. Thus, our data provide for the first time evidence of the expression of both channels in the walls of all four human heart chambers.

Information regarding the TRPM6 channel protein level in the human heart has remained scant, and has concerned only RA tissues²². Information regarding the *Trpm6* mRNA level in human RA has also been controversial, since in two studies no mRNA expression of *Trpm6* was detected^{14,20}, whereas in another study *Trpm6* mRNA was present and its expression found to be increased in RA cardiomyocytes from patients with AF²². There is no previous report showing the presence of TRPM6 in ventricular cells or tissues. In LV and RV tissues obtained from patients with advanced heart failure (HF)²⁶ or various mouse strains *Trpm6* channel gene was not detectable²¹.

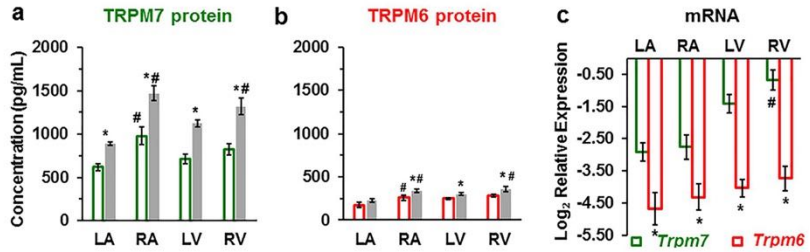


Figure 6. TRPM7 and TRPM6 protein levels and RT-qPCR mRNA relative expression levels in human heart tissue homogenates. (a, b) TRPM7 and TRPM6 proteins are increased in the walls of all heart chambers with IHD (filled columns) vs. non-IHD (unfilled columns). A blinded study-design (with the diagnosis unknown to the investigator) was used for the detection of protein concentration in the various samples. Values (mean \pm SEM) are in pg/mL and from 3–33 heart tissue homogenates. * $P < 0.05$ IHD vs. non-IHD, # $P < 0.05$ right-sided vs. left-sided using ANOVA with LSD test (Least Significant Difference). (c) mRNA relative expression levels of human *Trpm6* and *Trpm7* genes detected in the four cardiac chambers from explanted human hearts ($n = 3$, for each). * $P < 0.05$ *Trpm7* vs. *Trpm6*, # $P < 0.05$ right-sided vs. left-sided.

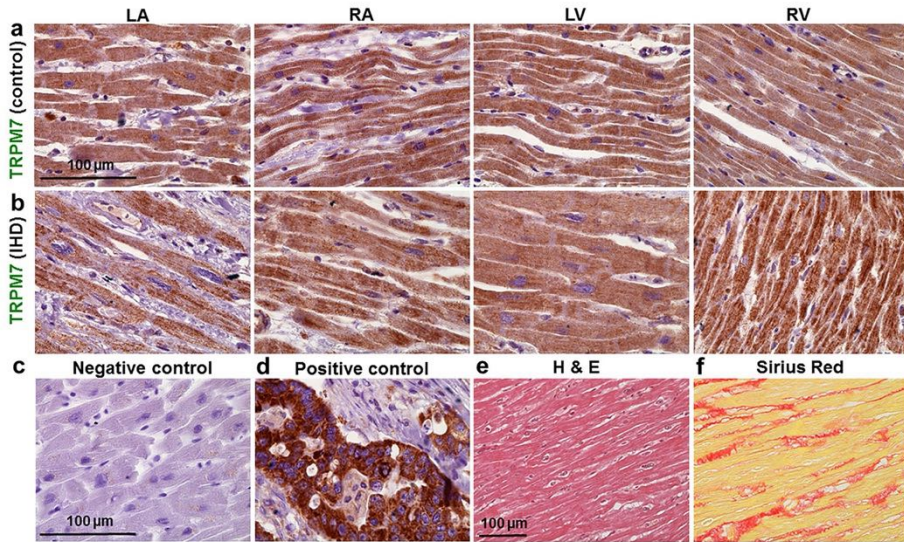


Figure 7. Representative histotopograms of TRPM7 images in the four chamber walls of the human heart. (a) Control subject after traffic accident. (b) IHD patient. The intensity of the brownish pigments shows areas with expression of TRPM7 in the heart ($\times 40$ magnification). (c) Negative control in the LV. (d) Positive control of TRPM7 in tumour of the colon (a–d, $\times 40$ magnification). Note: for negative control an irrelevant IgG of the same isotope as the primary antibody was used. (e, f) Representative images of the regional assessment (from the LV midmyocardial tissue sections) of myocardial hypertrophy/degeneration and fibrosis using hematoxylin and eosin (H & E) staining and picrosirius red staining, respectively ($\times 20$ magnification). Scale bars indicate 100 μ m.

The present study also provides information of the relative expression of the channels when comparing atrial vs. ventricular cells, or left vs. right cavity walls. TRPM6 or TRPM7 protein expression was of the same order of magnitude in atrial and ventricular cells, but expression was higher on the right side than on the left side. In the study by Morine and colleagues (2016)²⁶, while failing to detect *Trpm6* and *Trpm7* mRNA in LV or RV from human subjects with end-stage HE, they were however able to show a biventricular expression of both channel

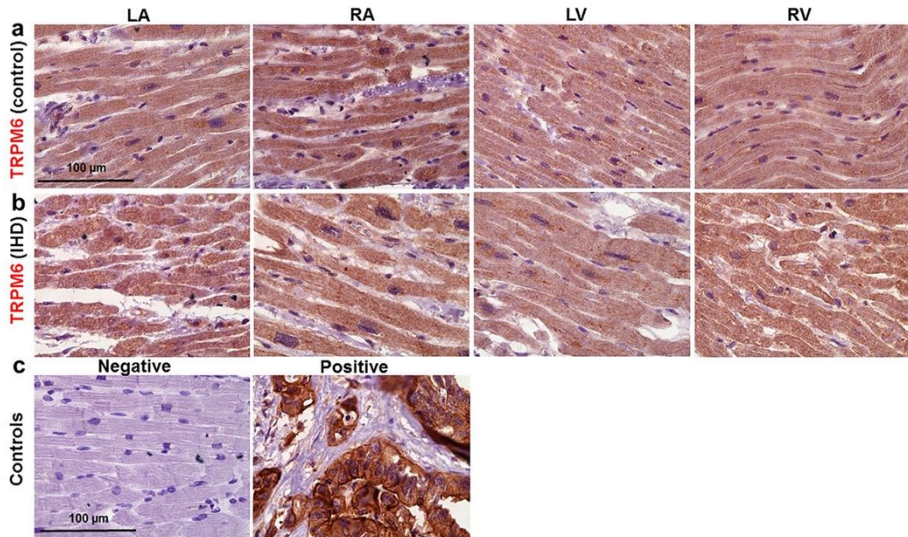


Figure 8. Representative histotopograms of TRPM6 images in the four chamber walls of the human heart. (a) Control subject after traffic accident. (b) IHD patient. The intensity of the brownish pigments shows areas with expression of TRPM6 in the heart ($\times 40$ magnification). (c) Negative control (left) in the LV, and positive control (right) of TRPM6 in tumour of the colon ($\times 40$ magnification). Scale bars indicate 100 μm . Other notations are the same as in Fig. 7.

mRNA in a mouse model of thoracic aortic constriction. A very recent study showed various gene expressions in the four chambers of the mouse hearts²⁷, and demonstrated that *Trpm4* and *Trpm7* are predominantly expressed at the atrial level. It should be noted that gene detection is likely to be less specific than the other methods (cell immunostaining and ELISA) for determining levels of expression in cardiomyocytes due to contamination by the numerically more abundant non-cardiomyocyte cells (endothelial and vascular smooth muscle cells as well as fibroblasts).

We have no explanation for the different levels in the various chamber walls. Because TRPM channels are stretch sensitive, one possibility could be that expression in the various chamber walls is related to stretch. Ventricular cells, which experience more stress are shown in the present study to have slightly higher TRPM7 and TRPM6 expression although, as stated above, the difference with levels in atrial cells did not reach statistical significance. However, right cardiac chamber walls where mechanical stress is expected to be lower than left chamber walls display higher TRPM7 and TRPM6 levels. If stretch was the main factor determining TRPM7 or TRPM6 expression, then the following order would be expected in the levels of expression: LV, RV, LA and RA.

TRPM6 and TRPM7 can form homomers but can also heteromerize^{28–30} to form TRPM6/TRPM7 complexes. There are differences in ion permeability, single channel conductance and sensitivity to modulators between the various homo- and heteromers^{10,30,31}. The different levels of expression of the two proteins, and the fact that their expression could be regulated in opposite directions (decrease of one vs. increase of the other; see below) indicate that these channels are likely to form homomers in addition to forming heteromers in cardiac myocytes. The possibility of being regulated in opposite or same directions is also good evidence that the antibodies used, directed towards these two channels, did not display promiscuous sensitivity to the two proteins.

Beside providing evidence for the presence of both TRPM6 and TRPM7, our data also show that experimental conditions such as the presence/absence of extracellular divalent cations, the presence of TRPM6 and TRPM7 channel current inhibitors 2-APB and CAR, and acidification of the cell incubation medium all cause a change in immunodetected channel protein levels. All these factors have been shown in electrophysiological studies to alter TRPM6 and TRPM7 channel current^{10,13,32,33}.

The effects of extracellular divalent cations in our study (decreased expression of TRPM6 and TRPM7 in cells incubated in the absence of extracellular divalent cation; see Figs. 1c,d and 3g–j) is opposite to the one observed in previous studies using other cell types. Incubating in media containing low concentrations of divalent cations led to an upregulation of TRPM7 gene expression in chondrocytes³⁴. Similarly, incubation in low extracellular Ca^{2+} and Mg^{2+} led to an increased expression of TRPM7 but not of TRPM6 in osteoblast-like cells³⁵, and incubation in low- Mg^{2+} media led to an upregulation of TRPM6 in mammary epithelial cells³⁶. Given the role of TRPM6/7 as pathways for the entry of Ca^{2+} and Mg^{2+} , these changes can be interpreted as adaptive processes, initiated in

order to compensate for the absence or decreased availability of the permeant divalents. It remains unclear why in our study TRPM6 and TRPM7 were downregulated instead of being upregulated in cells incubated in the absence of divalent cations, but other changes induced by the absence of divalent cations, e.g. alterations of intracellular ions such as Na^+ (which increases in the absence of extracellular divalents³⁷) or of signaling pathways linked to the functioning of these channels could add to and distort the above-mentioned adaptive process.

Although the present study did not investigate the effect of incubating cardiomyocytes in low or high Mg^{2+} , others have noted that low extracellular Mg^{2+} changes the levels of TRPM7 in vascular smooth muscle and endothelial cells. For example, TRPM7 (but not TRPM6) was shown to be upregulated in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)³⁸. These changes were interpreted as being adaptive, as explained above. However, opposite results, i.e. downregulation of TRPM7 was obtained in human microvascular endothelial cells (HMVEC)³⁹. At present, like for the opposite effects with extracellular Ca^{2+} , there is no definitive explanation for these differences, except for different involvements of oxidative stress, which is increased by low Mg^{2+} in HUVEC but not in HMVEC³⁸. As far as cardiomyocytes are concerned, it should be noted that they differ from endothelial cells in that they are not actively proliferating. Thus, changes of intracellular ion homeostasis may subservise different purposes compared to endothelial cells where cell proliferation is very intense.

In our study, 2-APB and CAR, two pharmacological agents known as modulators of TRP channel activity, caused opposite effects on the fluorescence intensity of immunodetected TRPM7 and TRPM6 proteins. We intentionally used 500 $\mu\text{mol/L}$ 2-APB since such a concentration has been demonstrated to differently regulate TRPM6 and TRPM7 channels: significant increase of the TRPM6 current¹⁰ vs. dramatic reduction of the TRPM7 current amplitude⁴⁰. Our data of the influence of 2-APB on the fluorescence of immunodetected TRPM6 and TRPM7 proteins are in concordance with these electrophysiological reports of opposite effects on the channels. Interestingly, CAR also caused quantitatively similar reduction of the fluorescence of the immunodetected TRPM7 but marked enhancement of the TRPM6 fluorescence level similar to the above described action of 2-APB. However, because there is no data investigating CAR effects on TRPM6 ion current it is unclear whether a concordance exists with electrophysiological data similar to that for 2-APB.

The present study shows that acidification of the cell incubation medium also caused changes in the immunodetected TRPM6 and TRPM7 channels. For TRPM7 the changes produced by extracellular acidification are also in the same direction as those observed for channel current. In cardiac myocytes extracellular acidification has been shown to increase the current attributed to TRPM7 in the presence of divalent cations^{2,14}, but to decrease the current in the absence of extracellular divalent cations^{11,12}. We are not aware of any electrophysiological study testing the effect of extracellular acidosis on TRPM6 currents in the absence of extracellular divalent cations.

Our study also shows a concordance between effects of chronic disease on channel expression and on channel currents. Chronic ischemic disease, which is associated with an increase of channel current density in electrophysiological studies focusing on atrial cells¹², was also associated with an increase in immunodetected channel protein expression in the present study (see Fig. 5). The observed difference between non-IHD and IHD is unlikely to be explained by the small age difference between the two groups of patients, especially since no significant difference was obtained between age groups (patients aged 50–65 vs. those aged > 65) within the same clinical condition (either non-IHD or IHD) for the level of TRPM6 and TRPM7 measured by immunofluorescence and by ELISA (see Supplementary Table S8). The larger levels of TRPM6 and TRPM7 with chronic ischemic disease persisted for each age group. However, due to the modest sample size of each age group, additional studies may be needed to confirm this lack of an effect of age on the level of the proteins.

The other cardiac pathology known to affect TRPM7 channel expression is AF, but was not investigated in the present study. *Trpm7* mRNA and/or protein levels have been reported to be up-regulated in AF patients^{14,41} and in an animal model of HF⁴². Here too, there has been controversy concerning the detection and regulation in the specific situation of the LV, since up-regulation⁴³, down-regulation²³, and no detection²⁶ of *Trpm7* mRNA expression levels were reported.

The role of cardiomyocyte TRPM7 and TRPM6 channels in cardiac pathology remains unclear. TRPM7 in cardiac fibroblasts has been implicated in cardiac inflammation and fibrosis as well as in atrial fibrillation, but the channel-enzyme has been considered either as a deleterious⁴¹ or as a protective factor⁹. Increased cardiac TRPM7 has also been associated with increased propensity to ventricular arrhythmia⁴³. Based on findings in neurons, where TRPM7 mediates Ca^{2+} influx and cell death during ischemia⁴⁴ it could be postulated that a similar mechanism operates in cardiomyocytes and contributes to cell death (infarction) during myocardial ischemia and/or reperfusion. The effect of acute ischemia on cardiomyocytes TRPM7 and TRPM6 remains unknown (but see²³). For chronic ischemia, increased expression of the channel has been reported as mentioned above¹². As far as reperfusion is concerned, instead of an activation of TRPM7 in cardiomyocytes by reactive oxygen species, these have been shown to inhibit TRPM7⁴⁵. In contrast, others found an increased expression of TRPM7 under conditions of prolonged exposure to oxygen stress⁴⁶.

The above-mentioned concordance between effects of various experimental and pathological factors on immunodetected channel protein on the one side and on channel current on the other side adds to the difficulty in interpreting the action of these factors in electrophysiology experiments. Many of the electrophysiological changes induced by these factors can be obtained within seconds, making it unlikely that they involve channel density changes. However, instead of consisting of purely biophysical mechanisms involving the channel pore, effects recorded over many minutes could also involve, based on the results of the present study, a change in channel protein density in the membrane. It is not known whether the various factors may influence channel turnover between intracellular and extracellular pools. For example, the effect of 2-APB might be accounted for if its binding were to promote channel internalization of one channel protein but to inhibit that of the other.

One could also envisage the possibility that changed immunodetected TRM6 and TRPM7 in cells incubated with 2-APB or CAR results from protein conformations induced by these drugs, with an effect of the new conformations on the binding of antibodies. However, this cannot be a satisfactory explanation for the changed

Patient data	Non-IHD	IHD
Age range (years)	37–82	50–87
Mean age (years) ± SEM	60.7 ± 2.4	67.4 ± 1.4
Female, n (%)	10 (40.0)	17 (36.2)
Male, n (%)	15 (60.0)	30 (63.8)
Total, n (%)	25 (100)	47 (100)
Surgical intervention		
Valve surgery, n (%)	25 (100)	0 (0)
CABG surgery, n (%)	0 (0)	32 (68.1)
CABG and Valve surgery, n (%)	0 (0)	15 (31.9)

Table 1. Clinical characteristics of the patients. CABG, coronary artery bypass graft; IHD, Ischemic heart disease.

expression in ischemic myocardium. For IHD, probably a real change in protein expression occurs. Extracellular acidification is noted to acutely increase current through TRPM6 or TRPM7 channels by decreasing the sensitivity of the channel to block by divalent cations and increasing the permeability of monovalent cations such as Na⁺ and probably H⁺ itself¹⁷. It is assumed that protons and Ca²⁺ simply compete for a common site from where blocking effect is exerted by Ca²⁺ but not H⁺. If our hypothesis to explain the changed expression is correct, then the effect of incubating with higher proton concentration is more complex, involving also a change in the channel protein conformation.

In summary, this study provides the first demonstration of co-expression of both TRPM6 and TRPM7 proteins and genes in the four chambers of the human heart. Our findings also suggest that a disease condition such as IHD could increase their expression, and this might indicate that TRPM7 as well as the TRPM6 are involved in the pathophysiology of cardiovascular diseases. TRP channel blockers such as 2-APB and CAR oppositely affected the levels of immunodetected proteins, i.e., both of them reduced immunofluorescence of TRPM7 but increased such of the TRPM6.

Materials and methods

Ethics. The study was carried out in accordance with the European Community guiding principles outlined in the Declaration of Helsinki, and was approved by the Ethics Committee of Biomedical Research of Kaunas Region, Lithuania (No.2R-1344 (2.6–1), 23 February 2018).

Patients. We used cardiac tissue specimens resected from patients (n = 72) undergoing open-heart surgery or from hearts removed from patients (n = 9) receiving heart transplantation.

Right atrial (RA) tissues were obtained during heart surgery for coronary artery bypass graft (n = 32) or valve surgery (n = 25) or both (n = 15) at the Hospital of the Lithuanian University of Health Sciences (LUHS). The overall characteristics of the open heart surgery patients are summarized in Table 1, which groups them depending on whether they had ischemic heart disease (IHD) (n = 47; of both sexes, with a mean age of 67.4 ± 1.4 years) or not (n = 25; of both sexes, with a mean age of 60.7 ± 2.4 years; *P* < 0.05 when comparing the ages of both groups). Written informed consent before surgical procedures was obtained. The specimens were transported from the hospital to the laboratory in cold (8–10 °C) St. Thomas cardioplegic solution (composition in mmol: 110 NaCl, 16 KCl, 1.2 CaCl₂, 16 MgCl₂, 5 glucose, 10 HEPES, pH adjusted to 7.4, with NaOH). A part of each sample was frozen for biobank storage.

We also used tissues from whole human hearts, which were explanted from patients (9 males, aged 55.3 ± 3.0 years, age range: 38–65 years) undergoing cardiac transplantation at the same Hospital. Informed consent for the use of the explants for research purposes was obtained before cardiac surgery. In addition, five hearts were obtained from subjects after traumatic death following traffic accident and served as control (5 males, aged 48.6 ± 8.5 years, age range: 29–75 years) for immunohistochemical studies. Clinical characteristics of the patients and control subjects are presented in Supplementary Table S7 online. The explanted hearts were transported in cold St. Thomas cardioplegic solution. Muscle tissue samples were excised from all four heart chamber walls. Transmural left ventricular samples (taken up to 3 mm away from epi- and endocardial surfaces) were dissected from the mid portion of the heart. Part of dissected samples was snap-frozen at – 80 °C for biobank storage.

Cardiomyocyte preparation. Cardiomyocytes were isolated as previously described^{12,13}. In short, a small tissue specimen (from left atrium (LA), right atrium (RA), left ventricle (LV) and right ventricle (RV)) was fine-cut in oxygenated nominally Ca²⁺-free Tyrode solution (see composition below) supplemented with 3 mg/mL 2,3-butanedione monoxime, which was washed out 2–3 times before enzyme application. The tissue chunks were transferred to a beaker with nominally Ca²⁺-free Tyrode solution supplemented with 1 mg/mL bovine serum albumin (BSA), 1 mg/mL collagenase (215 U/mg, type 2; Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA), and 0.5 mg/mL protease (7–14 U/mg, type XXIV; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and continuously bubbled with 100% O₂. After 30 min of shaking in a water bath at 37 °C, the solution with both enzymes was replaced by fresh solution containing only collagenase (1 mg/mL), and shaken until cardiomyocytes appeared in aliquots obtained from the mixture. When the yield appeared to be optimal, the leftover of

tissue chunks were resuspended in nominally Ca²⁺-free Tyrode and gently subjected to trituration by suction with a pipette. The cell suspension was filtered, centrifuged, and washed 2–3 times either with normal (divalent cation-containing) or with divalent cation-free Tyrode solution, and stored at room temperature. Dissociated cells were used for immunofluorescence studies.

Immunofluorescence. The methods used for the immunofluorescence were similar to those described in detail previously¹². Enzymatically dissociated cardiomyocytes were allowed to settle on the bottom of 8-chamber slides for 15–20 min. Afterwards, the cells were covered with hand-made perforated agarose coverslips, fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min and then washed in physiologic buffer solution (PBS). Triton X-100 (0.1%) was used during 3 min for permeabilisation. Non-specific binding of antibody was prevented by using blocking buffer containing 10% bovine serum (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in PBS for 1 h. Cells were incubated with primary rabbit polyclonal anti-TRPM6 antibody (ACC-046, Alomone labs, Jerusalem, Israel) or rabbit polyclonal anti-TRPM7 antibody (ACC-047, Alomone labs, Jerusalem, Israel) diluted (1:200) in PBS containing 3% BSA in blocking buffer overnight at 4 °C, and washed thereafter with PBS. For negative controls, incubation with primary antibody was omitted to check for non-specific binding of the secondary antibody. The cells were incubated for 1 h with fluorescence-labelled secondary antibody (either donkey anti-rabbit IgG; Alexa Fluor 488 conjugate; A21206, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA; dilution 1:200; or goat anti-rabbit IgG; Alexa Fluor 546 conjugate; A11035, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; dilution 1:200), co-stained (for 20 min) with Phalloidin-Alexa Fluor 546 (A22283, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA; dilution 1:100) or Phalloidin-CF 405 (00,034, Biotium, Fremont, CA, USA; dilution 1:100) and with Hoechst 33,342 (B2261, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; 25 µg/mL; for 10 min) for labelling of the F-actin cytoskeleton and of the nucleus, respectively. We also used conjugated antibodies: mouse monoclonal anti-TRPM6 conjugate with AF546 (sc-365536, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA) and rabbit polyclonal anti-TRPM7 conjugate with AF488 (bs-9044R-A488, Bioss Antibodies, Woburn, MA, USA). Finally, the agarose covering and media chambers were removed and glass slides covered with ProLong Gold Anti-fade Reagent (P36934, Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and coverslip glass, and sealed with clear nail polish. Cardiomyocytes were visualized under confocal laser scanning microscope by utilising sixty-time magnifying (× 60) oil immersion objectives (Olympus BX61, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) from which images were taken using the same scanning parameters (image acquisition control and spectral settings, etc.) for both TRPM6 and TRPM7 proteins in all cardiomyocyte preparations. Images are presented as stacks of 8–10 slices at fixed intensity. Cardiomyocyte area (pixels) and fluorescence intensity were measured in stacks using ImageJ 1.43 m (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) and Imaris 7.2.1 (Bitplane AG, Zurich, Switzerland; <https://imaris.oxinst.com/>) softwares. Immunodetected TRPM6 and TRPM7 protein levels were calculated by the formula: fluorescence intensity*1000/cell area. In order to reduce any statistical confounder, immunofluorescence reading was blinded as the conditions used to keep cells were unknown to the person performing the reading.

Preparation of homogenates from human heart tissues. We prepared tissue homogenates from all heart chamber walls. Small specimen were fine-cut in a dish on ice and placed in round-bottom centrifuge tubes. Ice-cold RIPA lysis buffer (150 mmol NaCl; 50 mmol Tris-HCl; 0.1% Triton X-100; 0.1% sodium dodecyl sulphate; 0.5% sodium deoxycholate) was added (~ 300 µL for ~ 5 mg of tissue) and the content was homogenized (LabGEN 125 Homogenizer, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA). Then 10 µL of a protease inhibitor cocktail were added and the homogenates was left on an orbital shaker for 2 h on ice. Afterwards the homogenate was centrifuged (Heraeus Biofuge Stratos Centrifuge, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for 20 min at 10,000 rpm and 4 °C, and the supernatant aspirated and placed in new tubes on ice. Pellets were discarded. The total protein concentration in the samples was determined using the Biuret method. Homogenates were used for ELISA.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). ELISA kits (MyBioSource, Inc., San Diego, CA, USA) were used to determine quantitative levels of TRPM6 and TRPM7 in human tissue homogenates. This method was performed based on the manufacturer's protocol. We prepared samples and different concentrations of the standard. One well was blank. In total, 100 µL of each standard and samples were added to the appropriate microtiter plate wells with a biotin-conjugated antibody preparation specific for TRPM6 or TRPM7. The enzyme–substrate reaction was terminated by the addition of sulphuric acid. Optical signals were recorded with a spectrometer (Multiskan MF, Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finland) at a wavelength of 450 ± 10 nm. The levels of TRPM6 and TRPM7 were determined according to instructions provided by the ELISA kits: TRPM6 (MBS457214) and TRPM7 (MBS457216). After measuring the optical densities of the standard solutions, a standard curve was drawn using the Curve Expert 1.4 software (Daniel G. Hyams, Hyams Development, Chattanooga, TN, USA; <https://curveexpert.software.informer.com/1.4/>). The concentrations of TRPM6 and TRPM7 in the tissue homogenates were then determined by comparing the optical density of the samples to the standard curve. The measurement of each single sample was read three times.

Gene expression. RT-qPCR was used to detect the mRNA levels of *Trpm6* and *Trpm7* in heart muscles obtained from four chamber walls of three explanted hearts (twelve samples of total human RNA). The total RNA was isolated using the mirVana miRNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania) and acid phenol:CHCl₃ premix (Ambion, Austin, TX, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. An additional RNase Inhibitor (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) was added to the lysis buffer. RNA integrity was assessed using a 2100 Agilent Bioanalyzer System (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA).

Prior to the start of cDNA synthesis, DNA contamination was removed from RNA samples using the TURBO DNA-free Kit (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania). Reverse transcription reactions were completed using a High Capacity RNA-to cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania). cDNA was further diluted three times with nuclease-free water. After reverse transcription, the reaction mixture (cDNA) was used for qPCR. The qPCR reaction was done using TaqMan Assays (assays ID: Hs01019356_m1, Hs00559080_m1, Hs99999903_m1; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), TaqMan Universal MasterMix II, with UNG (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and Nuclease-Free Water (Ambion, Austin, TX, USA). qPCR was performed by an ABI 7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) based on the manufacturer's procedure in 20- μ L reaction mixture. β -actin (ACTB) was used as the endogenous control. The relative expression of target genes was calculated using the Δ Ct method ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). $\Delta C_t = C_{t\text{target gene}} - C_{t\beta\text{-actin}}$, where Ct refers to the number of amplification cycles when the real-time fluorescence intensity reached the set threshold whereby the amplification procedure was in the logarithmic growth phase. Each reaction was carried out in triplicate.

Gel electrophoresis of PCR products was used to analyse reaction quality and yield. A 1% agarose gel was prepared using Agarose (Cleaver Scientific, Rugby, Warwickshire, UK), $1 \times$ TAE electrophoresis buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and 0.5 μ g/mL ethidium bromide solution. PCR product samples of 10 μ L were loaded onto a gel together with a 1 μ L of marker TriTrack Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Electrophoresis was performed under the following conditions: 45 min, 100 V. The GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder marker (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used in the study. The gel was analyzed under UV light using the BDA Digital UV System (Biometer, Göttingen, Germany).

Immunohistochemistry. For histological analysis, specimens of formalin-fixed and paraffin-embedded human heart muscle tissues were sliced in 3 μ m and placed onto Super Frost Plus slides (Menzel, Braunschweig, Germany). Collected tissue sections were deparaffinized and stained with hematoxylin–eosin (H & E) and Picro Sirius Red.

For immunohistochemical analysis, deparaffinized sections were washed with distilled water, and then the epitope was released by incubating the preparations in TRIS/EDTA buffer (pH 9.0) at 110 °C for 8 min using microwave tissue processor RHS-1 (Milestone Medical, Bergamo, Italy). Immunohistochemical staining was performed using Shandon Coverplate plates (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The sections were incubated with primary rabbit polyclonal TRPM7 antibody (1:250 dilution; NBPI-20224, Novus Biologicals, Centennial, CO, USA) or primary mouse monoclonal TRPM6 antibody (1:50 dilution; sc-365536, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA) for 1 h after blocking endogenous peroxidase. The preparations were then processed with the DAKO EnVision Flex and DAKO EnVision Flex + visualization system (Agilent Technologies Inc., Wood Dale, IL, USA) for TRPM7 and TRPM6, respectively. Probed sections were additionally stained with Mayer's hematoxylin and coated with cover glasses using a polystyrene coating material. Colon tumor tissue sections were used for positive immunohistochemistry control. The IgG of the same isotype as the primary antibody dilution solution served as negative control: rabbit IgG isotype control (MA5-16384, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for TRPM7, and mouse IgG1 kappa monoclonal isotype control (ab91353, Abcam, Cambridge, UK) for TRPM6.

The histopathological evaluation was performed using Olympus BX61 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) motorized microscope and Evolution QEi camera.

Chemicals. Carvacrol (CAR, $\geq 97\%$ purity) was purchased from Carl Roth GmbH + Co (Karlsruhe, Germany), 2-APB from Abcam (ab120124, Cambridge, UK), and other chemicals were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Water-insoluble compounds were initially dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) or ethanol to make stock solutions (100 mmol), which were then diluted. The highest concentration of the solvent was $< 0.1\%$ and did not affect the measurements.

Statistics. Average data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). Means were compared using the two-tailed *t*-test or ANOVA with LSD test (Least Significant Difference) for evaluating differences between groups. $P < 0.05$ was taken as threshold for statistical significance.

Data availability

All data are included in this manuscript and in its Supplementary materials.

Received: 4 May 2021; Accepted: 15 July 2021

Published online: 29 July 2021

References

- Clapham, D. E. TRP channels as cellular sensors. *Nature* **426**, 517–524 (2003).
- Fleig, A. & Penner, R. Emerging roles of TRPM channels. *Novartis Found. Symp.* **258**, 248–258 (2004).
- Montell, C. The TRP superfamily of cation channels. *Sci. STKE* **2005**, 1–24 (2005).
- Runnels, L. W., Yue, L. & Clapham, D. E. TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities. *Science* **291**, 1043–1047 (2001).
- Voets, T. *et al.* TRPM6 forms the Mg^{2+} influx channel involved in intestinal and renal Mg^{2+} absorption. *J. Biol. Chem.* **279**, 19–25 (2004).
- Schlingmann, K. P. *et al.* Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family. *Nat. Genet.* **31**, 166–170 (2002).

7. Tashiro, M., Inoue, H. & Konishi, M. Physiological pathway of magnesium influx in rat ventricular myocytes. *Biophys. J.* **107**, 2049–2058 (2014).
8. Sah, R. *et al.* Ion channel-kinase TRPM7 is required for maintaining cardiac automaticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, E3037–E3046 (2013).
9. Rios, F. *et al.* Chanzyme TRPM7 protects against cardiovascular inflammation and fibrosis. *Cardiovasc. Res.* **116**, 721–735 (2020).
10. Li, M., Jiang, J. & Yue, L. Functional characterization of homo- and heteromeric channel kinases TRPM6 and TRPM7. *J. Gen. Physiol.* **127**, 525–537 (2006).
11. Gwanyanya, A. *et al.* Magnesium-inhibited, TRPM6/7-like channel in cardiac myocytes: permeation of divalent cations and pH-mediated regulation. *J. Physiol.* **559**, 761–776 (2004).
12. Macianskiene, R., Almanaityte, M., Jekabsonė, A. & Mubagwa, K. Modulation of human cardiac TRPM7 current by extracellular acidic pH depends upon extracellular concentrations of divalent cations. *PLoS ONE* **12**, e0170923 (2017).
13. Macianskiene, R., Martisiene, I., Zablockaitė, D. & Gendvilienė, V. Characterization of Mg²⁺-regulated TRPM7-like current in human atrial myocytes. *J. Biomed. Sci.* **19**, 75 (2012).
14. Zhang, Y. H. *et al.* Evidence for functional expression of TRPM7 channels in human atrial myocytes. *Basic Res. Cardiol.* **107**, 282 (2012).
15. Abiria, S. A. *et al.* TRPM7 senses oxidative stress to release Zn²⁺ from unique intracellular vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **114**, E6079–E6088 (2017).
16. Brauchi, S., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L. & Clapham, D. E. TRPM7 facilitates cholinergic vesicle fusion with the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 8304–8308 (2008).
17. Gaborit, N. *et al.* Regional and tissues specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *J. Physiol.* **582**, 657–693 (2007).
18. Tsai, F. C. *et al.* Differential left-to-right atria gene expression ratio in human sinus rhythm and atrial fibrillation: Implications for arrhythmogenesis and thrombogenesis. *Int. J. Cardiol.* **222**, 104–112 (2016).
19. Dragun, M., Gazova, A., Kyselovic, J., Hulman, M. & Matus, M. TRP channels expression profile in human end-stage heart failure. *Medicina* **55**, 380 (2019).
20. Fonfria, E. *et al.* Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* **26**, 159–178 (2006).
21. Kunert-Keil, C., Bisping, F., Kruger, J. & Brinkmeier, H. Tissue-specific expression of TRP channel genes in the mouse and its variation in three different mouse strains. *BMC Genomics* **7**, 159 (2006).
22. Zhang, Y. J., Ma, N., Su, F., Liu, H. & Mei, J. Increased TRPM6 expression in atrial fibrillation patients contribute to atrial fibrosis. *Exp. Mol. Pathol.* **98**, 486–490 (2015).
23. Ortega, A. *et al.* TRPM7 is down-regulated in both left atria and left ventricle of ischemic cardiomyopathy patients and highly related to changes in ventricular function. *ESC Heart Fail.* **3**, 220–224 (2016).
24. Hof, T. *et al.* Transient receptor potential channels in cardiac health and disease. *Nat. Rev. Cardiol.* **16**, 344–360 (2019).
25. Touyz, R. M. Transient receptor potential melastatin 6 and 7 channels, magnesium transport, and vascular biology: implications in hypertension. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **294**, H1103–H1118 (2008).
26. Morine, K. J. *et al.* Endoglin selectively modulates transient receptor potential channel expression in left and right heart failure. *Cardiovasc. Pathol.* **25**, 478–482 (2016).
27. Jacobas, S., Amuzescu, B. & Jacobas, D. A. Transcriptomic uniqueness and commonality of the ion channels and transporters in the four heart chambers. *Sci. Rep.* **11**, 1–20 (2021).
28. Chubanov, V. *et al.* Emerging roles of TRPM6/TRPM7 channel kinase signal transduction complexes. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **371**, 334–341 (2005).
29. Chubanov, V. *et al.* Disruption of TRPM6/TRPM7 complex formation by a mutation in the TRPM6 gene causes hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 2894–2899 (2004).
30. Ferioli, S. *et al.* TRPM6 and TRPM7 differentially contribute to the relief of heteromeric TRPM6/7 channels from inhibition by cytosolic Mg²⁺ and Mg-ATP. *Sci. Rep.* **7**, 8806 (2017).
31. Zhang, Z. *et al.* The TRPM6 kinase domain determines the Mg-ATP sensitivity of TRPM7/M6 heteromeric ion channels. *J. Biol. Chem.* **289**, 5217–5227 (2014).
32. Jiang, J., Li, M. & You, L. Potentiation of TRPM7 inward currents by protons. *J. Gen. Physiol.* **126**, 137–150 (2005).
33. Parnas, M. *et al.* Carvacrol is a novel inhibitor of Drosophila TRPL and mammalian TRPM7 channels. *Cell Calcium* **45**, 300–309 (2009).
34. Lu, D. *et al.* Ca²⁺/Mg²⁺ homeostasis-related TRPM7 channel mediates chondrocyte hypertrophy via regulation of the PI3K-Akt signaling pathway. *Mol. Med. Rep.* **16**, 5699–5705 (2017).
35. Abed, E. & Moreau, R. Importance of melastatin-like transient receptor potential 7 and cations (magnesium, calcium) in human osteoblast-like cell proliferation. *Cell Prolif.* **40**, 849–865 (2007).
36. Wolf, F. I. *et al.* Modulation of TRPM6 and Na⁺/Mg²⁺ exchange in mammary epithelial cells in response to variations of magnesium availability. *J. Cell. Physiol.* **222**, 374–381 (2010).
37. Bosteels, S., Matejovic, P., Flameng, W. & Mubagwa, K. Sodium influx via a non-selective pathway activated by the removal of extracellular divalent cations: Possible role in the calcium paradox. *Cardiovasc. Res.* **43**, 417–425 (1999).
38. Baldoli, E., Castiglioni, S. & Maier, J. A. M. Regulation and function of TRPM7 in human endothelial cells: TRPM7 as a potential novel regulator of endothelial function. *PLoS ONE* **8**, e59891 (2013).
39. Baldoli, E. & Maier, J. A. M. Silencing TRPM7 mimics the effects of magnesium deficiency in human microvascular endothelial cells. *Angiogenesis* **15**, 47–57 (2012).
40. Hanano, T. *et al.* Involvement of TRPM7 in cell growth as a spontaneously activated Ca²⁺ entry pathway in human retinoblastoma cells. *J. Pharmacol. Sci.* **95**, 403–419 (2004).
41. Du, J. *et al.* TRPM7-mediated Ca²⁺ signals confer fibrogenesis in human atrial fibrillation. *Circ. Res.* **106**, 992–1003 (2010).
42. Demir, T. *et al.* Evaluation of TRPM (transient receptor potential melastatin) genes expressions in myocardial ischemia and reperfusion. *Mol. Biol. Rep.* **41**, 2845–2849 (2014).
43. Parajuli, N. *et al.* Determinants of ventricular arrhythmias in human explanted hearts with dilated cardiomyopathy. *Eur. J. Clin. Invest.* **45**, 1286–1296 (2015).
44. Aarts, M. M. & Tymianski, M. TRPMs and neuronal cell death. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **451**, 243–249 (2005).
45. Inoue, H., Murayama, T., Tashiro, M., Sakurai, T. & Konishi, M. Mg²⁺- and ATP-dependent inhibition of transient receptor potential melastatin 7 by oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **72**, 257–266 (2014).
46. Nuñez-Villena, F. *et al.* Increased expression of the transient receptor potential melastatin 7 channel is critically involved in lipopolysaccharide-induced reactive oxygen species-mediated neuronal death. *Antioxid. Redox. Signal.* **15**, 2425–2438 (2011).
47. Li, M., Du, J., Jiang, J., Ratzan, W. J. & Su, L. T. Molecular determinants of Mg²⁺ and Ca²⁺ permeability and pH sensitivity in TRPM6 and TRPM7. *J. Biol. Chem.* **282**, 25817–25830 (2007).

Acknowledgements

The authors wish to thank Vanda Burbulytė, Virginija Luckienė, Jūratė Dedelienė, Jūratė Šmitaitė, and Renata Valevičienė for providing excellent technical assistance.

Author contributions

R.M. conceived/designed the study. I.A., D.P., V.P., M.K., M.A. and D.K. participated in research design, conducted experiments and performed data analysis. R.M. and K.M. wrote and edited the manuscript. All authors contributed to the final version of the manuscript.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors. PhD students I.A., V.P. and M.K. received funding from LUHS for antibodies/reagents. K.M. is supported by VLIR-UOS in the frame of an Institutional University Cooperation between Flemish universities and the Université Catholique de Bukavu.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94856-4>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to R.M.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.




Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021



Article

Modulation of the Cardiac Myocyte Action Potential by the Magnesium-Sensitive TRPM6 and TRPM7-like Current

Asfree Gwanyanya^{1,2} , Inga Andriulė³, Bogdan M. Istrate¹, Farjana Easmin¹, Kanigula Mubagwa^{1,4} and Regina Mačianskienė^{3,*}

¹ Department of Cardiovascular Sciences, KU Leuven, 3000 Leuven, Belgium; asfree.gwanyanya@uct.ac.za (A.G.); istratem.bogdan@yahoo.com (B.M.I.); feasmin87@gmail.com (F.E.); kanigula.mubagwa@kuleuven.be (K.M.)

² Department of Human Biology, University of Cape Town, Cape Town 7925, South Africa

³ Institute of Cardiology, Lithuanian University of Health Sciences, 50103 Kaunas, Lithuania; inga.andriule@ismuni.lt

⁴ Department of Basic Sciences, Faculty of Medicine, Université Catholique de Bukavu, Bukavu, Congo

* Correspondence: regina.macianskiene@ismuni.lt

Abstract: The cardiac Mg²⁺-sensitive, TRPM6, and TRPM7-like channels remain undefined, especially with the uncertainty regarding TRPM6 expression in cardiomyocytes. Additionally, their contribution to the cardiac action potential (AP) profile is unclear. Immunofluorescence assays showed the expression of the TRPM6 and TRPM7 proteins in isolated pig atrial and ventricular cardiomyocytes, of which the expression was modulated by incubation in extracellular divalent cation-free conditions. In patch clamp studies of cells dialyzed with solutions containing zero intracellular Mg²⁺ concentration ([Mg²⁺]_i) to activate the Mg²⁺-sensitive channels, raising extracellular [Mg²⁺] ([Mg²⁺]_o) from the 0.9-mM baseline to 7.2 mM prolonged the AP duration (APD). In contrast, no such effect was observed in cells dialyzed with physiological [Mg²⁺]_i. Under voltage clamp, in cells dialyzed with zero [Mg²⁺]_i, depolarizing ramps induced an outward-rectifying current, which was suppressed by raising [Mg²⁺]_o and was absent in cells dialyzed with physiological [Mg²⁺]_i. In cells dialyzed with physiological [Mg²⁺]_i, raising [Mg²⁺]_o decreased the L-type Ca²⁺ current and the total delayed-rectifier current but had no effect on the APD. These results suggest a co-expression of the TRPM6 and TRPM7 proteins in cardiomyocytes, which are therefore the molecular candidates for the native cardiac Mg²⁺-sensitive channels, and also suggest that the cardiac Mg²⁺-sensitive current shortens the APD, with potential implications in arrhythmogenesis.

Keywords: TRPM6; TRPM7; ion channel; action potential; cardiac; magnesium; myocyte



Citation: Gwanyanya, A.; Andriulė, I.; Istrate, B.M.; Easmin, F.; Mubagwa, K.; Mačianskienė, R. Modulation of the Cardiac Myocyte Action Potential by the Magnesium-Sensitive TRPM6 and TRPM7-like Current. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 8744. <https://doi.org/10.3390/ijms22168744>

Academic Editors: Balazs Istvan Toth and Thomas Voets

Received: 30 June 2021

Accepted: 12 August 2021

Published: 14 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The cardiac cation channels involved in electrical activity and ion homeostasis include well-known ion-selective channels, as well as ion nonselective channels. Apart from the Na⁺- and K⁺-permeable pacemaker or funny (I_f) channels [1], not many nonselective cardiac cation channels have been fully characterized; hence, their molecular identities remain uncertain. During the past two decades, there has been a growing interest in transient receptor potential (TRP) proteins as molecular candidates for native cation nonselective channels, including those found in the heart [2]. TRP channels are a large superfamily of proteins expressed in several tissues where they are involved in diverse signaling processes and in disease [3]. Among the various TRP channels expressed in the cardiovascular system, canonical (e.g., TRPC1 and C3–C7), melastatin (e.g., TRPM4 and M7), vanilloid (e.g., TRPV1 and V2), and polycystin (e.g., TRPP1/2) channels are present in the heart and are implicated in the physiological functions and in cardiac abnormalities such as arrhythmogenesis and heart failure [4,5]. The role of cardiac TRP channels has been explored in fibroblasts and in pacemaker cells (see reference [3]) but much less in cardiomyocytes. The few TRPs

that have been electrophysiologically explored in cardiac myocytes include TRPC1 [6], TRPC3/6/7 [7,8], TRPV4 [9], TRPM4 [10], TRPM7 [11,12], and TRPP1/2 [13].

We have previously characterized cardiac Mg^{2+} -sensitive channels [14,15] with biophysical properties similar to those of the heterologous TRPM6 and TRPM7 channels, both of which are involved in the homeostasis of Mg^{2+} and other divalent cations [16–20]. Like the heterologously expressed TRPM6 and TRPM7 channels, the cardiomyocyte TRPM6- and TRPM7-like channels are typically activated by low intracellular Mg^{2+} concentration ($[Mg^{2+}]_i$) conditions and conduct small inward currents carried by divalent cations and large outward currents carried by monovalent cations. These cardiomyocyte Mg^{2+} -sensitive channels have been detected in various species, including humans, rats, pigs, guinea pigs, and mice. However, the nature of the proteins underlying the cardiac TRPM6- and TRPM7-like currents and the functional consequences of their cation fluxes have remained unclear.

Whereas TRPM7 protein expression has been systematically detected in cardiac tissues or cells, until recently, information regarding the TRPM6 channel protein expression in the heart has remained scant and has concerned only the right atrium [21]. However, very recent data on human atrial/ventricular cardiomyocytes and tissues has highlighted the co-expression of TRPM6 and TRPM7 in cardiomyocytes from all chamber walls of the human heart [22]. As far as function is concerned, we have previously shown the cardiac Mg^{2+} -sensitive channels to be permeable to Ca^{2+} and Mg^{2+} [15] and proposed that, at the resting membrane potential, the inward flow of divalent cations into cells through the channels could have an effect on the intracellular concentrations of the divalent cations (see reference [23]). On the other hand, the contribution of the TRPM6- and TRPM7-like currents to the cardiomyocyte electrical activity is unknown. The possibility that monovalent cation effluxes through Mg^{2+} -sensitive channels at positive potentials could contribute to action potentials has not been tested.

Here, we investigated the expression profile of TRPM6 and TRPM7 proteins in pig cardiac myocytes, as well as the role of the Mg^{2+} -sensitive, TRPM6-, and TRPM7-like currents on the cardiac action potential.

2. Results

2.1. Expression of TRPM6 and TRPM7 in Cardiac Myocytes

To show the presence of TRPM6 and TRPM7 proteins, we used the immunostaining of atrial and ventricular cardiomyocytes, performed after 2 h of cell isolation. Figure 1A–D shows confocal images of pig cardiomyocytes co-stained for the nucleus (blue), for either TRPM7 or TRPM6 protein (green), and for the F-actin-cytoskeleton (red), whereas Figure 1E shows a negative control (cardiomyocyte incubated in conditions similar to those of Figure 1A–D but with no primary antibody added in the incubation medium). All the cardiomyocytes displayed staining with antibodies for TRPM6 and TRPM7. Figure 1F shows the quantification of the immunodetected fluorescence of TRPM7 (left panel) and TRPM6 (right panel) in the four cardiac chamber walls: left atrium (LA), right atrium (RA), left ventricle (LV), and right ventricle (RV). Of note was the multinucleated nature of the cells, as previously noted for pig cardiomyocytes [24].

We found that the measured level of expression of the TRPM6 and TRPM7 proteins was influenced by the cell incubation conditions, such as the presence and absence of extracellular divalent cations. The immunofluorescence level of both channel proteins in the cardiomyocytes from all the cardiac chamber walls was significantly higher following cell incubation in divalent cation-containing (DV) extracellular conditions vs. incubation in divalent cation-free (DVF) conditions (see Table 1). In addition, the expression was also increased when incubating cells for a longer period before cell fixation and exposure to the primary antibodies. Figure 2 shows that the mean fluorescence levels for the immunodetected TRPM6 and TRPM7 were significantly increased in LV cardiomyocytes kept for 12 h in solutions with (Figure 2A,B) or without (Figure 2C,D) divalent cations. TRPM7 increased from 0.087 ± 0.0013 a.u. to 0.133 ± 0.0011 a.u., $n = 3–23$, $p < 0.001$ in the

DV solutions and from 0.065 ± 0.0009 a.u. to 0.112 ± 0.0006 a.u., $n = 4-25$, $p < 0.001$ in the DVF solutions. Under the same experimental conditions, the TRPM6 immunofluorescence increased from 0.029 ± 0.0015 a.u. to 0.050 ± 0.0012 a.u., $n = 3-24$, $p < 0.001$ and from 0.020 ± 0.0006 a.u. to 0.040 ± 0.0009 a.u., $n = 7-21$, $p < 0.001$ in the DV and DVF solutions, respectively. Qualitatively similar changes could be detected in the cardiomyocytes from the other cardiac chamber walls when incubated for 12 h (not illustrated).

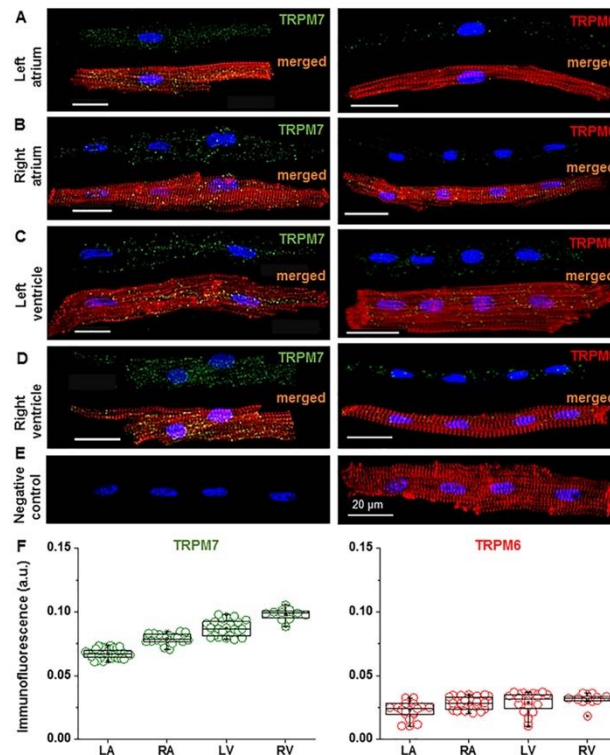


Figure 1. Immunofluorescence images suggesting the presence of TRPM6 and TRPM7 proteins in pig cardiomyocytes from different cardiac chamber walls. (A–D) Immunofluorescence of TRPM7 (left) and TRPM6 (right) in the left atrium (LA), right atrium (RA), left ventricle (LV), and right ventricle (RV) cardiomyocytes when using Alexa Fluor 488 for the TRPM7 and TRPM6 proteins (stained in green), Alexa Fluor 546 for the F-actin cytoskeleton (stained in red), and Hoechst 33342 for the nuclei (stained in blue). Scale bars indicate 20 μm. (E) Example of a negative control, where the primary antibody for TRPM6 and/or TRPM7 is not added, but the cardiomyocyte was subjected to Hoechst 33342 and Alexa Fluor 546. Under such conditions, only immunofluorescence of the nuclei (stained in blue) and F-actin cytoskeleton (stained in red) is detected. Note: same cardiomyocyte in the left and right (merged image) panels (F) Quantification of the staining intensity of the immunodetected fluorescence of TRPM7 and TRPM6 in the four cardiac chamber walls: LA, RA, LV, and RV. The mean data is provided in arbitrary units (a.u.) (see Table 1). A blinded study design (with the origin or treatment of cells unknown to the investigator) was used for the detection of immunofluorescence during the various experimental conditions.

Table 1. Immunofluorescence signals of the TRPM7 and TRPM6 proteins in pig hearts.

Heart Chamber	TRPM7 Signal (a.u.)		TRPM6 Signal (a.u.)	
	DV	DVF	DV	DVF
LA	0.067 ± 0.0006 <i>n</i> = 37	0.053 ± 0.0009 # <i>n</i> = 13	0.023 ± 0.0013 <i>n</i> = 18	0.016 ± 0.0014 # <i>n</i> = 20
RA	0.079 ± 0.0009 <i>n</i> = 21	0.059 ± 0.0010 # <i>n</i> = 5	0.029 ± 0.0008 <i>n</i> = 32	0.018 ± 0.0011 # <i>n</i> = 4
LV	0.087 ± 0.0013 <i>n</i> = 23	0.065 ± 0.0009 # <i>n</i> = 25	0.029 ± 0.0015 <i>n</i> = 24	0.020 ± 0.0006 # <i>n</i> = 21
RV	0.098 ± 0.0013 <i>n</i> = 12	0.076 ± 0.0016 # <i>n</i> = 5	0.032 ± 0.0012 <i>n</i> = 14	0.025 ± 0.0020 # <i>n</i> = 3

TRPM7 and TRPM6—transient receptor potential melastatin type 7 and 6 channels, LA—left atrium, RA—right atrium, LV—left ventricle, RV—right ventricle, DV—extracellular divalent cations, DVF—extracellular divalent cation-free, *n*—number of cells, a.u.—arbitrary unit, and #—*p* < 0.001 for DV vs. DVF.

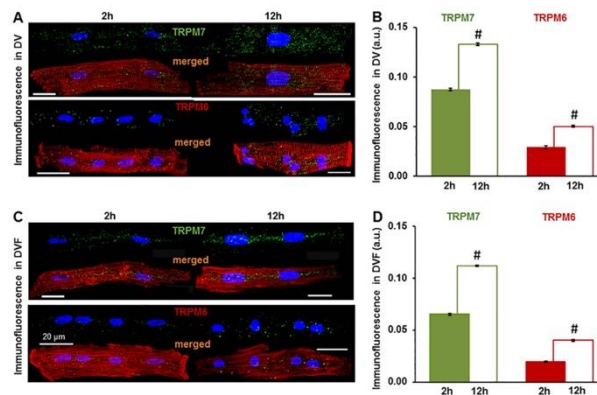


Figure 2. Comparison of the expression of TRPM6 and TRPM7 in left ventricular cardiomyocytes incubated for 2 h vs. 12 h in extracellular solutions with (A,B) and without (C,D) divalent cations (DV and DVF, respectively). (A,C) The cardiomyocytes were fixed after 2 h (filled columns) or 12 h (unfilled columns) of cell isolation: Alexa Fluor 488 for the TRPM7 and TRPM6 proteins (stained in green), Alexa Fluor 546 for the F-actin cytoskeleton (stained in red), and Hoechst 33342 for the nuclei (stained in blue). Scale bars indicate 20 μ m. (B,D) Quantification of the intensity of the fluorescence expressed in arbitrary units (a.u.). # *p* < 0.001 expression after 12 h vs. 2 h of cardiomyocyte incubation.

2.2. Impact of Mg^{2+} -Sensitive Currents on the Action Potential

To examine the role of Mg^{2+} -sensitive currents on the electrical activity of cardiac myocytes, we recorded the total currents using a whole-cell voltage clamp, as well as the resting and action potentials using the current clamp. The cells were internally dialyzed and extracellularly perfused with solutions known to activate or inhibit the currents. The cells were internally dialyzed with either physiological levels of free intracellular $[Mg^{2+}]_i$ ($[Mg^{2+}]_i = 0.8$ mM) or with the Mg^{2+} -free solution ($[Mg^{2+}]_i \approx 0$ mM). The latter condition is known to cause a progressive activation of Mg^{2+} -sensitive channels with time by removing the inhibition exerted by intracellular Mg^{2+} [15]. The cells were also extracellularly perfused with either physiological levels of $[Mg^{2+}]_o$ ($[Mg^{2+}]_o = 0.9$ mM) or with high Mg^{2+} ($[Mg^{2+}]_o = 7.2$ mM). High $[Mg^{2+}]_o$ is known to cause a complete suppression of any activated Mg^{2+} -sensitive current [15].

Figure 3 shows the whole-cell currents and action potentials measured in the cells dialyzed with either 0.8-mM $[Mg^{2+}]_i$ (Figure 3A,C,E) or with 0-mM $[Mg^{2+}]_i$ (Figure 3B,D,F). In these two groups of cells, there was no difference in the resting membrane potentials, which were also not changed by raising $[Mg^{2+}]_o$ from 0.9 mM to 7.2 mM (for 0.8 mM $[Mg^{2+}]_i$, the resting membrane potential: -79.9 ± 2.6 mV in the control vs. -81.0 ± 2.1 mV in high $[Mg^{2+}]_o$; for 0 mM $[Mg^{2+}]_i$: -78.4 ± 2.8 mV in the control vs. -77.4 ± 3.7 mV in high $[Mg^{2+}]_o$, $p = 0.308$, ANOVA; $n = 10$).

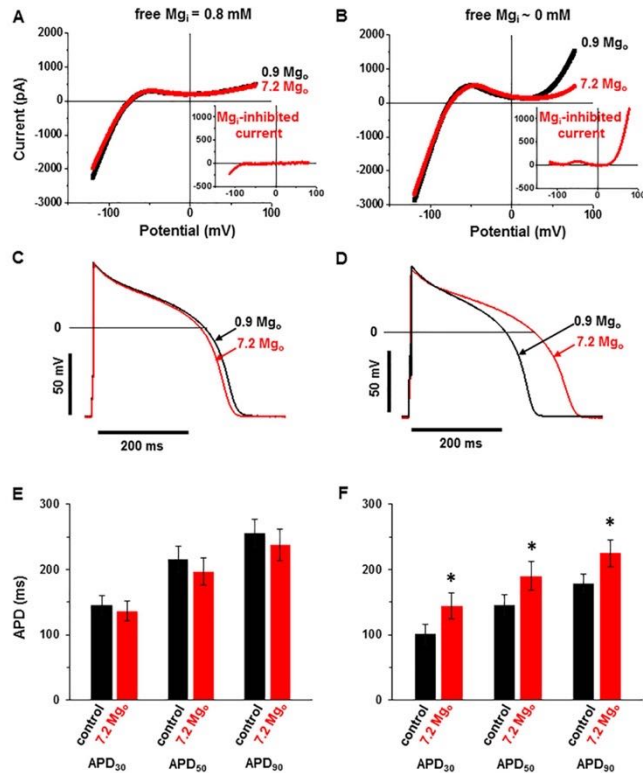


Figure 3. Effect of Mg^{2+} -sensitive current activation on the action potential. (A,B) Whole-cell currents obtained by voltage ramps in cells dialyzed with 0.8-mM $[Mg^{2+}]_i$ (A) or 0-mM $[Mg^{2+}]_i$ (B) and superfused with extracellular solutions containing 0.9-mM $[Mg^{2+}]_o$ or 7.2-mM $[Mg^{2+}]_o$. Insets: the $[Mg^{2+}]_o$ -sensitive currents calculated as the differences between currents in the presence of 0.9-mM $[Mg^{2+}]_o$ and those in 7.2-mM $[Mg^{2+}]_o$. Notice the outward-rectifying $[Mg^{2+}]_o$ -sensitive current in the cell dialyzed with 0-mM $[Mg^{2+}]_i$. (C–F) The action potentials in the same cells as above, and the summary data of the action potential durations (APD) from all the cells dialyzed with 0.8-mM $[Mg^{2+}]_i$ (C,E) or 0-mM $[Mg^{2+}]_i$ (D,F) and the effect of raising the $[Mg^{2+}]_o$ from 0.9 mM (black) to 7.2 mM (red). The APD was measured at 30%, 50%, and 90% repolarization (APD₃₀, APD₅₀, and APD₉₀, respectively). Notice the lengthening of the APD by high $[Mg^{2+}]_o$ in the cells dialyzed with low intracellular $[Mg^{2+}]_i$. Pacing frequency: 1 Hz. * $p < 0.05$ for 7.2-mM vs. 0.9-mM $[Mg^{2+}]_o$. $n = 9$ for the cells dialyzed with 0.8-mM $[Mg^{2+}]_i$; $n = 10$ for the cells dialyzed with 0-mM $[Mg^{2+}]_i$.

Figure 3A,B illustrates the membrane currents recorded under a voltage clamp during a descending ramp, following a preceding depolarizing ramp meant to inactivate the voltage-dependent Na^+ - and Ca^{2+} currents (see Methods). The experiments were performed at 36 °C using K^+ -containing intra- and extracellular solutions. In cells dialyzed with physiological levels of $[\text{Mg}^{2+}]_i$ (0.8 mM; Figure 3A), the current–voltage relationship was characterized by a large inward current, consistent with the presence of the inward rectifier K^+ current (I_{K1}) at potentials negative to -75 mV, and the current–voltage relationship was relatively flat at more positive potentials. Raising $[\text{Mg}^{2+}]_o$ to 7.2 mM did not affect the current–voltage relationship, indicating that the high $[\text{Mg}^{2+}]_o$ did not affect the I_{K1} and that no other Mg^{2+} -sensitive current was present (Figure 3A, inset). In the cells dialyzed with Mg^{2+} -free solution (0 mM $[\text{Mg}^{2+}]_i$; Figure 3B), the current–voltage relationship was characterized by the presence of I_{K1} but also showed an outward rectifying current at positive potentials. The outward rectifying component was suppressed by raising $[\text{Mg}^{2+}]_o$ to 7.2 mM, indicating the presence of a Mg^{2+} -sensitive current. This $[\text{Mg}^{2+}]_o$ -sensitive current, calculated as the difference in the current–voltage relationships between the two conditions with different $[\text{Mg}^{2+}]_o$, displays outward-rectifying properties similar to those of the TRPM6 and TRPM7 currents (Figure 3B, inset).

After recording membrane currents under a voltage clamp, we switched to the current clamp mode to record the action potentials in the same cells. Pig cardiomyocytes offer an experimental advantage when studying factors that affect the action potential, since channels carrying the transient outward K^+ current (I_{to}) are not expressed in this species [25,26]. Under the control conditions, with 0.9 mM $[\text{Mg}^{2+}]_o$, the action potentials were generally shorter in cells dialyzed with Mg^{2+} -free internal solution (compare Figure 3C,E vs. Figure 3D,F). In the cells dialyzed with physiological $[\text{Mg}^{2+}]_i$, raising $[\text{Mg}^{2+}]_o$ to 7.2 mM did not change the action potential durations during the stimulation at 1 Hz (APD; APD₃₀: 145.5 ± 14.5 ms vs. 136.5 ± 15.1 ms, APD₅₀: 216.6 ± 19.6 ms vs. 196.6 ± 21 ms, and APD₉₀: 238 ± 48 ms vs. 231 ± 46 ms in high $[\text{Mg}^{2+}]_o$ vs. in the control; $p > 0.05$, paired t -test; $n = 9$; Figure 3E). In contrast, in cells dialyzed with Mg^{2+} -free internal solution, raising $[\text{Mg}^{2+}]_o$ to 7.2 mM, caused a marked prolongation of the APD (APD₃₀: from 100.4 ± 14.8 ms to 143.6 ± 19.9 ms, APD₅₀: from 145.6 ± 16.1 ms to 189.8 ± 22.4 ms, and APD₉₀: from 178.9 ± 14.2 ms to 225.2 ± 21.3 ms; $p < 0.05$, paired t -test; $n = 10$; Figure 3F). Taken together, these results show that the cardiac action potential is modulated by an outward-rectifying current activated by dialysis with zero $[\text{Mg}^{2+}]_i$ and suppressed by high $[\text{Mg}^{2+}]_o$. Furthermore, given that this current was absent in the cells dialyzed with 0.8 mM $[\text{Mg}^{2+}]_i$, it is likely due to TRPM7 or/and TRPM6.

2.3. Effects of High Extracellular $[\text{Mg}^{2+}]$ on $I_{\text{Ca-L}}$ and I_{K}

Considering that the changes in the action potential produced by high $[\text{Mg}^{2+}]_o$ mainly affected the plateau and repolarization phases, we also examined the effect of $[\text{Mg}^{2+}]_o$ on other currents that play a role during these phases, such as the L-type Ca^{2+} current ($I_{\text{Ca-L}}$) and the delayed rectifier K^+ current (I_{K}). The analysis was done in cells dialyzed with 0.8-mM $[\text{Mg}^{2+}]_i$ to inhibit the Mg^{2+} -sensitive currents. For the measurements of I_{K} , K^+ -containing intracellular and extracellular solutions were used, and nifedipine (25 μM) was included in the external solution, whereas, for the measurements of $I_{\text{Ca-L}}$, K^+ was replaced by Cs^+ in the external and pipette solutions, and 10-mM BAPTA was used in the pipette solution instead of EGTA. Figure 4A shows the bidirectional effect of the $[\text{Mg}^{2+}]_o$ alteration on $I_{\text{Ca-L}}$. Where lowering the $[\text{Mg}^{2+}]_o$ by 10-fold to 0.09 mM reversibly increased the amplitude of $I_{\text{Ca-L}}$, continuously monitored at 0 mV ($I_{\text{Ca-L}}$ measured at the peak level: from -5.4 ± 0.43 pA/pF to -6.5 ± 0.41 pA/pF; $p < 0.05$, paired t -test; $n = 8$; Figure 4B), raising the $[\text{Mg}^{2+}]_o$ to 7.2 mM reversibly decreased the amplitude of $I_{\text{Ca-L}}$ (peak $I_{\text{Ca-L}}$: from -4.8 ± 0.39 pA/pF to -2.2 ± 0.17 pA/pF; $p < 0.001$, paired t -test; $n = 13$; Figure 4B; see reference [27]). As expected, the I_{K} blockers E4031 and HMR1556 had no effect on the $I_{\text{Ca-L}}$ (Figure 4A). When wanting to test the consequence of an eventual modulation of the $I_{\text{Ca-L}}$ by extracellular Mg^{2+} , we kept E4031 constantly from the beginning of the experiment. The

I_{Ca-L} -voltage relationships (see Figure 4A, inset) indicate that the $[Mg^{2+}]_o$ changes shifted the activation curve of I_{Ca-L} (to more negative potentials upon lowering the $[Mg^{2+}]_o$ and to more positive potentials upon raising $[Mg^{2+}]_o$; see reference [27]).

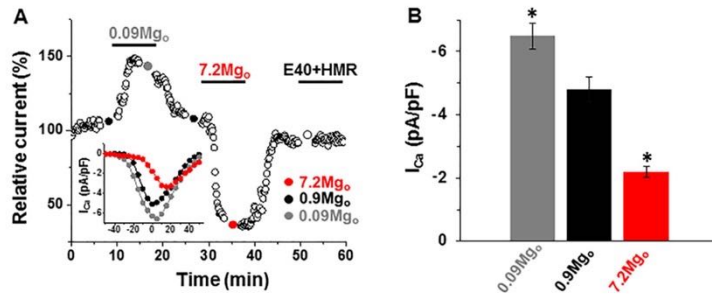


Figure 4. Effect of changing the external $[Mg^{2+}]_o$ on the L-type Ca^{2+} currents (I_{Ca-L}). (A) Time diary of the amplitude of the L-type Ca^{2+} currents obtained by using depolarizing steps for various potentials in a cell dialyzed with 0.8-mM $[Mg^{2+}]_i$ and superfused with extracellular solutions containing 0.09-mM, 0.9-mM, or 7.2-mM $[Mg^{2+}]_o$. Notice the increase vs. suppression of the I_{Ca-L} amplitude by low vs. high $[Mg^{2+}]_o$ and the lack of effect of the I_K inhibitors (E4031/HMR1556). Bottom inset: The current-voltage relations obtained by the depolarizing steps to the potentials ranging from -50 mV to $+50$ mV in the same cell. (B) Summary data of the peak I_{Ca-L} amplitude and the effects of lowering and raising the $[Mg^{2+}]_o$. * $p < 0.05$ vs. 0.9-mM $[Mg^{2+}]_o$ ($n = 8-13$).

Figure 5 shows that raising $[Mg^{2+}]_o$ also decreased the magnitude of the total I_K (Figure 5A at $+30$ mV to $+50$ mV $p < 0.05$ for 7.2-mM $[Mg^{2+}]_o$ vs. the control, paired t -test; $n = 4$) and only mildly shifted the activation curve to the right (voltage at the half-maximal current $V_{0.5}$: from ≈ -6 mV to ≈ -2 mV; $n = 4$; Figure 5B).

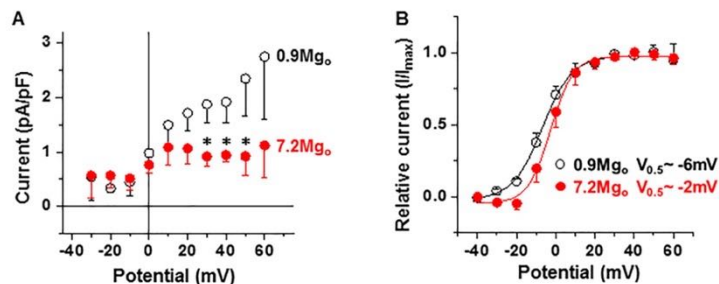


Figure 5. Effect of an increase of extracellular $[Mg^{2+}]_o$ on the total I_K . (A) The current-voltage relationship of the fully activated I_K and the effect of raising the $[Mg^{2+}]_o$. Notice the suppression of I_K by high $[Mg^{2+}]_o$. * $p < 0.05$ ($n = 4$). (B) Activation curves of I_K calculated from the tail currents ($n = 4$).

Since high $[Mg^{2+}]_o$ did not change the APD in cells dialyzed with 0.8-mM $[Mg^{2+}]_i$ (see Figure 3C,E), it is possible that there are two opposing and counterbalancing effects of high $[Mg^{2+}]_o$ on the I_{Ca-L} and I_K . To test for this possibility, we applied high $[Mg^{2+}]_o$ on cells in which the I_K was partly blocked to offset such a balance. We initially performed preliminary tests to determine the optimum concentrations of the I_K inhibitors (i.e., HMR1556 for the slow I_K component I_{Ks} and E 4031 for the rapid component I_{Kr}) effective in producing a

partial block of I_K without excessively prolonging the APD (not illustrated). Figure 6A shows the typical changes in action potentials in a perforated cell, whereas the summary data from four cells are presented in Figure 6B. Under the control conditions with 0.9-mM $[Mg^{2+}]_o$, the addition of small concentrations of I_K inhibitors (100-nM HMR1556 and 500-nM E4031) lengthened the APD, as expected from a decrease of the repolarizing K^+ current (at a pacing rate of 1 Hz, APD_{30} : from 134.6 ± 28.5 ms to 177.8 ± 19.9 ms, APD_{50} : from 192.9 ± 20.9 ms to 267.4 ± 24.1 ms, and APD_{90} : from 242.4 ± 17.5 ms to 358.0 ± 18.3 ms; * $p < 0.05$, except for the APD_{30} , for which $p > 0.05$, paired t -test; $n = 4$). Consistent with a decreased relative contribution of I_K , raising the $[Mg^{2+}]_o$ to 7.2 mM in the presence of the I_K blockers decreased the APD (to 163.9 ± 20.9 ms, to 246.0 ± 21.1 ms, and to 323.5 ± 15.5 ms for APD_{30} , APD_{50} , and APD_{90} , respectively), indicating a predominant effect of I_{Ca-L} suppression by high $[Mg^{2+}]_o$ under these conditions. Qualitatively similar results were obtained in three other cells dialyzed with 0.8-mM $[Mg^{2+}]_i$ under the ruptured cell membrane conditions (not illustrated). These results suggest that the lack of effect of raising $[Mg^{2+}]_o$ on the APD in cells dialyzed with 0.8-mM $[Mg^{2+}]_i$ reflects a balance in the effects of the decreases of both I_{Ca-L} and I_K on repolarization.

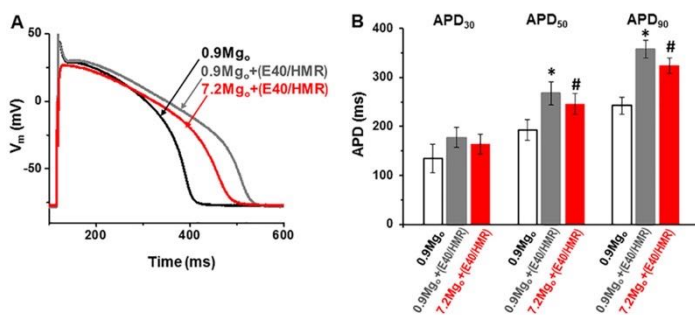


Figure 6. Effect of a partial I_K block and high $[Mg^{2+}]_o$ on the action potential. (A) APs recorded at 36 °C using K^+ -containing intra- and extracellular solutions under perforated patch conditions and initially superfused with control extracellular solutions containing 0.9-mM $[Mg^{2+}]_o$. A combination of HMR1556 (100 nM) and E4031 (500 nM) was then added in 0.9-mM $[Mg^{2+}]_o$ before applying 7.2-mM $[Mg^{2+}]_o$ together with the drugs. (B) Summary data of the AP duration (APD) at 30%, 50%, and 90% repolarization (APD_{30} , APD_{50} , and APD_{90} , respectively) measured under the control conditions (unshaded column) in the presence of the I_K inhibitors (grey column) and in the presence of the I_K inhibitors but with the $[Mg^{2+}]_o$ raised to 7.2 mM (red column). * $p < 0.05$ for the presence vs. absence of the I_K inhibitors (in 0.9-mM $[Mg^{2+}]_o$). # $p < 0.05$ for 7.2-mM vs. 0.9-mM $[Mg^{2+}]_o$ in the presence of the I_K inhibitors ($n = 4$). Notice the shortening of the APD_{50} and APD_{90} by high $[Mg^{2+}]_o$ in the presence of the I_K blockers.

3. Discussion

The results from the present study suggest the presence of TRPM6 and TRPM7 proteins in cardiac myocytes, given that immunofluorescent activity was detected in cells treated with the anti-TRPM6 or anti-TRPM7 antibody, but in contrast, no such activity was detected in the negative controls. Furthermore, the results showed that the cardiac myocyte action potential duration (APD) was shortened in the presence of a current likely due to TRPM6 or TRPM7 in that it was activated by dialysis with low $[Mg^{2+}]_i$, was absent in cells dialyzed with 0.8-mM $[Mg^{2+}]_i$ and was suppressed by high $[Mg^{2+}]_o$. Thus, the results are consistent with our previous proposal that the Mg^{2+} -sensitive channels in the heart are likely due to TRPM6 and/or TRPM7 proteins [15] and with a possible role of the cardiac Mg^{2+} -sensitive channels in modulating the electrical activity.

3.1. Molecular Candidate for Mg^{2+} -Sensitive Channels

Many TRP proteins form nonselective cation channels and are, therefore, the molecular candidates for similar native channels [28]. In determining the involvement of TRPs expressed in the heart, the inhibition by Mg^{2+}_i is a key distinguishing feature. For the TRPC4/C5 channels, Mg^{2+}_i causes a voltage-dependent partial block of the outward currents and results in a doubly rectifying current-voltage relationship [29,30]. Such a Mg^{2+}_i effect on the TRPC4/C5 channels is different from the voltage-independent slow inhibition seen in the Mg^{2+} -sensitive channels [15,31]. Rather, the Mg^{2+}_i inhibition and the biophysical characteristics of the cardiac channels [15] resemble those of the TRPM6 and TRPM7 channels [16,19]. Our detection of TRPM6 and TRPM7 proteins by immunofluorescence suggests that the channels are expressed in both the atrial and ventricular chambers. It appears that the TRPM6 and TRPM7 channel proteins were present in both the surface membrane and intracellularly. However, where exactly the proteins are located intracellularly could not be determined in the present study. Nonetheless, a novelty of the present findings is that TRPM6 was immunodetected in pig myocytes (but see Limitations of our Study below), whereas TRPM6 expression has been reported to be lacking in other studies of cardiac tissues [32]. As such, the present results suggest that TRPM6 and TRPM7 proteins are the most likely constituents of the Mg^{2+} -sensitive cardiac channels.

There are, however, slight differences in the divalent cation permeability profiles between the cardiac Mg^{2+} -sensitive channels [15] and overexpressed TRPM7 channels [16]. It is possible that, even though the core structure of the channel may be the same, different channel subunits or regulatory units may occur in the native cells. Furthermore, the TRPM7 channel activity has been shown to be altered by heteromultimeric interactions with TRPM6 [33]. Nevertheless, in order to ascertain the cardiac channel identity, further studies are still required to correlate the activity of the TRPM6 and TRPM7 proteins detected in myocytes with the Mg^{2+} -sensitive current.

3.2. Modulation of Cardiac Electrical Activity

The possible contribution of the Mg^{2+} -sensitive current to cardiac electrical activity is unknown. Like in other cells, nonselective cation channels contribute to the resting membrane potential in the heart [34]. These may include Mg^{2+} -sensitive channels. Given the small Mg^{2+} -sensitive inward current and the large I_{K1} at a negative potential in the heart, the Mg^{2+} -sensitive channels would not be expected to contribute significantly to the background non- K^+ permeability in resting cardiomyocytes. This is consistent with our findings here, showing no effect of raising the extracellular Mg^{2+} concentration on the resting membrane potential. However, in other tissues such as vascular smooth muscle, the contribution of nonselective cation channels, some of which resemble TRPM6 and TRPM7, could be more important [35,36].

Cation nonselective channels may also contribute to shaping the cardiac action potential. In atrial cells, a stretch-activated cation nonselective channel has been shown to contribute to both the resting and action potentials [37]. Since the net ion current is small during the plateau phase of the action potential, changes in the large monovalent cation effluxes through Mg^{2+} -sensitive channels at positive potentials may have significant effects on the action potential. Consistent with such an expectation, our present results showed that the activation of the cardiac Mg^{2+} -sensitive channels shortened the APD. It is unlikely that the APD shortening is due to a larger outward I_{K1} following the removal of the Mg^{2+}_i block in low $[Mg^{2+}]_i$ conditions, since endogenous polyamines would still continue to provide a sufficient block of the outward I_{K1} [38] and since high Mg^{2+}_o suppressed the outward current while having no effect on the inward currents. Our results suggest that there is practically no contribution of TRPM6 and TRPM7 currents to the AP when $[Mg^{2+}]_i$ is at the physiological levels. This result is consistent with a lack of changed currents through mutant TRPM7 channels expressed in cultured cardiomyocytes on the action potentials measured in such cells [39].

3.3. Clinical Implications

A key question concerns the conditions under which the Mg^{2+} -sensitive channels may contribute to cardiac electrical activity. Under the physiological conditions (free $[Mg^{2+}]_i$ 0.8 mM; $IC_{50} \approx 0.25$ mM; [15,31]), the channels are expected to be substantially inhibited by Mg^{2+}_i . However, the Mg^{2+} -sensitive current may contribute to APD if the sensitivity to $[Mg^{2+}]_i$ is decreased by regulatory processes or channel mutations or if $[Mg^{2+}]_i$ is decreased to low levels by disease conditions such as chronic hypomagnesaemia. Indeed, the TRPM7 and related native channels show constitutive activity, some of it in cells where the intracellular ion composition (including $[Mg^{2+}]_i$) remains relatively unperturbed [16,18,40], suggesting the presence of other regulatory processes. In cardiac cells, besides $[Mg^{2+}]_i$, the Mg^{2+} -sensitive channels are also regulated by factors such as the pH change and membrane phospholipid metabolism [14,15,41], but it is still not known whether such regulatory processes can induce the constitutive activity of the channels. In the present study, we show that the expression of the TRPM6 and TRPM7 channels is modulated by incubation in divalent cation-free extracellular conditions. Thus, the contributions of the Mg^{2+} -sensitive current to the AP may vary depending on the status of the extracellular divalent cation homeostasis.

Earlier studies demonstrated TRPM7 activation by free oxygen radicals during prolonged neuronal ischemia [42]. To date, the functional role of TRPM7 and especially that of TRPM6 are less clearly understood in heart cardiomyocytes compared to vascular smooth muscle cells [43], neurons, or other cell types [44,45]. The molecular and electrophysiological characterizations of TRPM7 in the heart have focused predominantly on cardiac fibroblasts. TRPM7 activation in human atrial fibroblasts leads to fibrogenesis and atrial fibrillation [46]. Additionally, the variability of the TRPM7 current density in human right atrial cardiomyocytes is related to the clinical history, being higher in disease conditions such as atrial fibrillation [47,48] and in ischemic heart disease [48]. Very recently, we also demonstrated the presence and co-expression of both TRPM6 and TRPM7 in cardiomyocytes from the four chamber walls of the human heart [22] and also showed that ischemic heart disease may increase their expression, suggesting that channels are involved in the pathophysiology of the disease.

3.4. Limitations of the Study

Given the current uncertainty about the detection of TRPM6 in cardiac cells, it is important to examine how convincing the evidence is for the presence of TRPM6 in our study.

The present study relied on immunostaining to detect the presence of TRPM7 and TRPM6. Previous studies have demonstrated limitations of antibody staining methods to determine the expression of TRP channels (e.g., see [49]). The specificity of the commercial antibodies used in our study was not directly tested, e.g., using blocking peptides or using cells lines in which the TRPM7 and TRPM6 genes were knocked out, silenced or overexpressed.

Our results, using swine cardiomyocytes, are in concordance to human TRPM6 and TRPM7 immunodetected fluorescence distribution, which also suggested both ion channel expression in the walls of all cardiac chambers [22]. In that study RT-PCR confirmed the presence of mRNA for both TRPM7 and TRPM6, hence supporting the immunostaining data, but the interpretation of RT-PCR also has limitations due to possible contamination by non-cardiomyocyte cells. We used on pig myocytes the same antibodies as in that study. Although these antibodies are recognized to work on human proteins, a key limitation of the present study is that there is no previous evidence of their specificity in pig cells and there are no readily available pig-specific TRPM6 antibodies in the market. Given that there is a great amount of antibody recognition between human- and pig epitopes in cardiac tissue [50], we used the same TRPM6 antibody (designed for human, mouse, and rat), which being polyclonal, would also be able to bind to epitopes in other species.

Although TRPM6 was detected in pig cardiomyocytes but not in negative controls, the specificity of the antibody in pig still requires verification in future studies.

An important limitation of the electrophysiological study is that there are, as yet, no known specific pharmacological blockers available for Mg^{2+} -sensitive- and related channels. Presently, we used the block by Mg^{2+}_o as an extracellular tool to isolate the Mg^{2+} -sensitive current. There was therefore a possible confounding issue in that Mg^{2+}_o could also suppress I_{Ca-L} and I_K . In other studies, the Mg^{2+}_o effect on I_K was more prominent on tail currents during repolarization [51], and increasing Mg^{2+}_o caused either a lengthening or a shortening of APD, depending on the level of Mg^{2+}_o [52]. However, in the present study, the Mg^{2+}_o effects on action potentials that were due to I_{Ca-L} and I_K seemed to balance each other out sufficiently for their effects to be isolated from those on the Mg^{2+} -sensitive current.

3.5. Conclusion

In conclusion, our results show the presence of TRPM7 and, to a certain extent, suggest that of TRPM6 proteins in pig cardiomyocytes, making these proteins the molecular candidates for cardiac Mg^{2+} -sensitive channels. The activation of the Mg^{2+} -sensitive channels shortened the cardiomyocyte APD. Although the pathophysiological conditions in which the channels are activated remain unclear, the effect of the Mg^{2+} -sensitive current on the APD may be important in understanding the therapeutic processes in which Mg^{2+} is empirically used to treat arrhythmias, as well as in linking the changes in Mg^{2+} homeostasis to other cardiac disease conditions.

4. Materials and Methods

We used isolated, single cardiomyocytes of a pig heart. This study was carried out in compliance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH). All experiments were performed according to the European Community guiding principles and approved by the State Food and Veterinary Service of the Republic of Lithuania (No. G2-68, 21 June 2017) and by the Belgian laboratory license No. LA-1210253.

4.1. Cell Isolation

The methods used for the dissociation of pig cells have been described before [15,25]. In short, for electrophysiology studies, a piece of the left ventricular wall was excised, and its supplying artery was cannulated and perfused at 37 °C and at constant pressure for 30 min with an oxygenated Ca^{2+} -free Tyrode solution, followed by a 20- to 25-min perfusion with a Ca^{2+} -free Tyrode solution containing 0.1-mg mL^{-1} protease (type XIV, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 1.4-mg mL^{-1} collagenase (type A, Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany). After a 15-min washing perfusion with a 0.18-mM Ca^{2+} Tyrode solution, the tissue was removed from the perfusion and was cut into small pieces. The cells were dispersed by gentle mechanical agitation. $[Ca^{2+}]_o$ was raised in a stepwise manner, and the cells were stored at room temperature (21–22 °C). Ca^{2+} -tolerant rod-shaped ventricular myocytes with clear striations were selected for the electrophysiological studies.

For the immunofluorescence studies, the cardiomyocytes were isolated from a small tissue specimen as previously described [53]. In short, each tissue specimen (LA, RA, LV, and RV) was fine-cut in an oxygenated nominally Ca^{2+} -free Tyrode solution (see the composition below) supplemented with 3-mg/mL 2,3-butanedione monoxime, which was washed out 2 to 3 times before the enzyme application. The cardiac tissue chunks were transferred to a beaker with nominally Ca^{2+} -free Tyrode solution supplemented with 1-mg/mL bovine serum albumin (BSA), 1-mg/mL collagenase (215 U/mg, type 2; Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA), and 0.5-mg/mL protease (7–14 U/mg, type XXIV; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and continuously bubbled with 100% O_2 . After 30 min of shaking in a water bath at 37 °C, the solution with both enzymes was replaced by fresh solution containing only collagenase (1 mg/mL) and shaken until cardiomyocytes appeared in the aliquots obtained from the mixture. When

the yield appeared to be optimal, the leftovers of the tissue chunks were resuspended in nominally Ca^{2+} -free Tyrode and gently subjected to trituration by suction with a pipette. The cell suspension was filtered, centrifuged, and washed 2 to 3 times either with normal (divalent cation-containing) or with divalent cation-free Tyrode solution and stored at room temperature.

4.2. Electrophysiology

Whole-cell currents were recorded under a voltage clamp, and the action potentials were recorded under a current clamp at 36 °C within 4 h after cell isolation. The membrane currents of interest were measured using 2-s descending voltage ramps from +80 mV to −120 mV applied every 10 s after a 600-ms pre-step at 0 mV from a holding potential of −80 mV, designed to inactivate the voltage-dependent Na^+ and L-type Ca^{2+} currents. For measuring the L-type Ca^{2+} currents ($I_{\text{Ca-L}}$), 400-ms depolarizations to various potentials were given after a 400-ms pre-step at −40 mV, designed to inactivate the voltage-dependent Na^+ current. The total delayed rectifier K^+ currents I_{K} were measured using voltage steps from a holding potential of −40 mV to various positive potentials, and the tail currents were then measured upon reverting to −50 mV. The action potentials were measured by stimulating with a 2-ms rectangular pulse at a frequency of 1 Hz. The action potential duration (APD) was measured at 30% (APD₃₀), 50% (APD₅₀), and 90% (APD₉₀) repolarization. The current and voltage protocols were generated and data recorded online using the Axopatch 200B amplifier and pClamp 8.1 software via the Digidata 1322A acquisition system (Axon instruments, Union City, CA, USA).

4.3. Immunofluorescence

Enzymatically dissociated cardiomyocytes were allowed to settle on the bottom of 8-chamber slides. The cells were permeabilized and incubated with primary rabbit polyclonal anti-TRPM7 (#ACC-047; Alomone Labs, Jerusalem, Israel) or rabbit polyclonal anti-TRPM6 antibody (#ACC-046; Alomone Labs, Jerusalem, Israel) diluted (1:200) in PBS containing 3% BSA in blocking buffer overnight at 4 °C. The TRPM6 and TRPM7 antibodies were obtained from the same company in order to minimize the possibility of cross-reactivity during immunolabeling. For the negative controls, incubation with the primary antibody was omitted to check for nonspecific binding of the secondary antibody. The cells were incubated for 1 h with a fluorescently labeled secondary antibody (donkey anti-rabbit IgG; Alexa Fluor® 488 conjugate; A21206, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA; dilution 1:200) co-stained (for 20 min) with Phalloidin-Alexa Fluor® 546 (A22283, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; dilution 1:100) and with Hoechst 33342 (B2261, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; for 10 min) for labeling of the F-actin cytoskeleton and of the nucleus, respectively. Cardiomyocytes were visualized under a confocal laser scanning microscope (Olympus BX61, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) from which images were taken using the same scanning parameters for both the TRPM7 and TRPM6 proteins in all the cardiomyocyte preparations.

4.4. Solutions and Drugs

The standard Tyrode solution used during cell dissociation contained (in mM): 135 NaCl, 5.4 KCl, 0.9 MgCl_2 , 1.8 CaCl_2 , 0.33 NaH_2PO_4 , 10 HEPES, and 10 glucose; the pH was adjusted to 7.4 with NaOH. During the patch clamp measurements, the cells were superfused with a solution of similar composition, except that, when necessary, K^+ was replaced by Cs^+ , and the Mg^{2+} levels were changed. The standard pipette solution was contained (in mM): 155 KCl, 5.5 MgCl_2 , 5 Na_2ATP , 1 EGTA, 0.1 Na_2GTP , and 5 HEPES (pH 7.25; adjusted with KOH) and was modified by changing the levels of Mg^{2+} , by replacing K^+ with Cs^+ , or by substituting EGTA with BAPTA. The phosphate-buffered saline (PBS) used in immunofluorescence contained (in mM): 155.2 NaCl, 2.71 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, and 1.54 KH_2PO_4 (pH 7.4; adjusted with NaOH).

HMR1556 was from Aventis Pharma, Frankfurt Am Main, Germany, and E-4031 was from Tocris, Bristol, UK. All the other drugs or chemicals were from Sigma-Aldrich (Bornem, Belgium) or Merck (Darmstadt, Germany). Nifedipine was prepared as a stock solution in ethanol and was protected from light, whereas HMR1556 was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO). All the other chemicals were dissolved in water.

4.5. Data and Statistical Analyses

An electrophysiology data analysis was performed using Clampfit 8.2 (Axon Instruments, Union City, CA, USA) and Origin 7 (Microcal, Northampton, MA, USA).

The distribution of the immunofluorescence was analyzed using the Olympus Fluoview FV1000 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) and ImageJ software. Sixty-times magnifying ($60\times$) of the oil immersion objectives were utilized for all the acquisitions. The images were presented as stacks of 8–10 slices at a fixed intensity. The cardiomyocyte area (pixels) and fluorescence intensity were measured in stacks using Imaris software (Bitplane AG, Zurich, Switzerland). The immunodetected TRPM6 and TRPM7 protein levels were calculated by the formula: fluorescence intensity \times 1000/cell area. In order to reduce the effect on any statistical confounder, the same parameters for fluorescence intensity detection (image acquisition control and spectral settings, etc.) were always applied. In addition, the immunofluorescence reading was blinded, as the conditions used to keep the cells were unknown to the person performing the reading.

The average data were presented as the mean \pm standard error of the mean (S.E.M) or box plots, with n indicating the number of cells studied under each condition. The means were compared using the two-tailed Student's t -test, whereas differences among the multiple groups were evaluated using an analysis of variance (ANOVA). $p \leq 0.05$ was taken as the threshold for statistical significance.

Author Contributions: Conceptualization, A.G., K.M., and R.M.; investigation, A.G., I.A., B.M.I., F.E., and R.M.; formal analysis, A.G., I.A., B.M.I., F.E., and R.M.; validation, A.G., K.M., and R.M.; and writing—review and editing A.G., K.M., and R.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by FWO (the Flemish Foundation for Science) Grant G.0634.07. AG was supported by the Belgian Technical Cooperation. RM was supported by the Research Council of the KULeuven Grant SF/08/021 and by the Research Council of Lithuania (LMTLT, Agreement No. VP1-3.1-ŠMM-08-K-01-022). The APC was funded by a VLIR-UOS grant to KM in the frame of an Institutional University Cooperation between Flemish universities and the Université Catholique de Bukavu.

Institutional Review Board Statement: All experiments were performed according to the European Community guiding principles and approved by the State Food and Veterinary Service of the Republic of Lithuania (No. G2-68, 21 June 2017) and by the Belgian laboratory license No. LA-1210253.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. DiFrancesco, D. Serious workings of the funny current. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2006**, *90*, 13–25. [CrossRef]
2. Falcón, D.; Galeano-Otero, I.; Calderón-Sánchez, E.; Del Toro, R.; Martín-Bornez, M.; Rosado, J.A.; Hmadcha, A.; Smani, T. TRP channels: Current perspectives in the adverse cardiac remodeling. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 159. [CrossRef] [PubMed]
3. Hof, T.; Chaigne, S.; Récalde, A.; Sallé, L.; Brette, F.; Guinamard, R. Transient receptor potential channels in cardiac health and disease. *Nat. Rev. Cardiol.* **2019**, *16*, 344–360. [CrossRef] [PubMed]
4. Hu, Y.; Li, Q.; Kurahara, L.H.; Shioi, N.; Hiraishi, K.; Fujita, T.; Zhu, X.; Inoue, R. An Arrhythmic Mutation E7K Facilitates TRPM4 Channel Activation via Enhanced PIP2 Interaction. *Cells* **2021**, *10*, 983. [CrossRef]
5. Feng, J.; Zong, P.; Yan, J.; Yue, Z.; Li, X.; Smith, C.; Ai, X.; Yue, L. Upregulation of transient receptor potential melastatin 4 (TRPM4) in ventricular fibroblasts from heart failure patients. *Pflügers Arch.* **2021**, *473*, 521–531. [CrossRef] [PubMed]
6. Seth, M.; Zhang, Z.S.; Mao, L.; Graham, V.; Burch, J.; Stiber, J.; Tsiokas, L.; Winn, M.; Abramowitz, J.; Rockman, H.A.; et al. TRPC1 channels are critical for hypertrophic signaling in the heart. *Circ. Res.* **2009**, *105*, 1023–1030. [CrossRef]

7. Alvarez, J.; Coulombe, A.; Cazorla, O.; Ugur, M.; Rauzier, J.M.; Magyar, J.; Mathieu, E.L.; Boulay, G.; Souto, R.; Bideaux, P.; et al. ATP/UTP activate cation-permeable channels with TRPC3/7 properties in rat cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2008**, *295*, H21–H28. [CrossRef] [PubMed]
8. Onohara, N.; Nishida, M.; Inoue, R.; Kobayashi, H.; Sumimoto, H.; Sato, Y.; Mori, Y.; Nagao, T.; Kurose, H. TRPC3 and TRPC6 are essential for angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *EMBO J.* **2006**, *25*, 5305–5316. [CrossRef]
9. Chaigne, S.; Cardouat, G.; Louradour, J.; Vaillant, F.; Charron, S.; Sacher, F.; Ducret, T.; Guinamard, R.; Vigmond, E.; Hof, T. Transient receptor potential vanilloid 4 channel participates in mouse ventricular electrical activity. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2021**, *320*, H1156–H1169. [CrossRef]
10. Guinamard, R.; Chatelier, A.; Demion, M.; Potreau, D.; Patri, S.; Rahmati, M.; Bois, P. Functional characterization of a Ca²⁺-activated non-selective cation channel in human atrial cardiomyocytes. *J. Physiol.* **2004**, *558*, 75–83. [CrossRef]
11. Sah, R.; Mesirca, P.; Van den Boogert, M.; Rosen, J.; Mably, J.; Mangoni, M.E.; Clapham, D.E. Ion channel-kinase TRPM7 is required for maintaining cardiac automaticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, E3037–E3046. [CrossRef] [PubMed]
12. Sah, R.; Mesirca, P.; Mason, X.; Gibson, W.; Bates-Withers, C.; Van den Boogert, M.; Chaudhuri, D.; Pu, W.T.; Mangoni, M.E.; Clapham, D.E. Timing of myocardial Trpm7 deletion during cardiogenesis variably disrupts adult ventricular function, conduction, and repolarization. *Circulation* **2013**, *128*, 101–114. [CrossRef] [PubMed]
13. Volk, T.; Schwoerer, A.P.; Thiessen, S.; Schultz, J.H.; Ehmke, H. A polycystin-2-like large conductance cation channel in rat left ventricular myocytes. *Cardiovasc. Res.* **2003**, *58*, 76–88. [CrossRef]
14. Gwanyanya, A.; Sipido, K.R.; Vereecke, J.; Mubagwa, K. ATP and PIP₂ dependence of the magnesium-inhibited, TRPM7-like cation channel in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2006**, *291*, C627–C635. [CrossRef]
15. Gwanyanya, A.; Amuzescu, B.; Zakharov, S.I.; Macianskiene, R.; Sipido, K.R.; Bolotina, V.M.; Vereecke, J.; Mubagwa, K. Magnesium-inhibited, TRPM6/7-like channel in cardiac myocytes: Permeation of divalent cations and pH-mediated regulation. *J. Physiol.* **2004**, *559*, 761–776. [CrossRef]
16. Monteilh-Zoller, M.K.; Hermosura, M.C.; Nadler, M.J.; Scharenberg, A.M.; Penner, R.; Fleig, A. TRPM7 provides an ion channel mechanism for cellular entry of trace metal ions. *J. Gen. Physiol.* **2003**, *121*, 49–60. [CrossRef]
17. Nadler, M.J.; Hermosura, M.C.; Inabe, K.; Perraud, A.L.; Zhu, Q.; Stokes, A.J.; Kurotsaki, T.; Kinet, J.P.; Penner, R.; Scharenberg, A.M.; et al. LTRPC7 is a Mg-ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature* **2001**, *411*, 590–595. [CrossRef]
18. Schmitz, C.; Perraud, A.L.; Johnson, C.O.; Inabe, K.; Smith, M.K.; Penner, R.; Kurotsaki, T.; Fleig, A.; Scharenberg, A.M. Regulation of vertebrate cellular Mg²⁺ homeostasis by TRPM7. *Cell* **2003**, *114*, 191–200. [CrossRef]
19. Voets, T.; Nilius, B.; Hoefs, S.; van der Kemp, A.W.; Droogmans, G.; Bindels, R.J.; Hoenderop, J.G. TRPM6 forms the Mg²⁺ influx channel involved in intestinal and renal Mg²⁺ absorption. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 19–25. [CrossRef]
20. Fleig, A.; Chubanov, V. TRPM7. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2014**, *222*, 521–546. [PubMed]
21. Zhang, Y.J.; Ma, N.; Su, F.; Liu, H.; Mei, J. Increased TRPM6 expression in atrial fibrillation patients contribute to atrial fibrosis. *Exp. Mol. Pathol.* **2015**, *98*, 486–490. [CrossRef]
22. Andriulė, I.; Pangonytė, D.; Almanaitytė, M.; Patamsytė, V.; Kuprytė, M.; Karčiauskas, D.; Mubagwa, K.; Mačianskienė, R. Evidence for the expression of TRPM6 and TRPM7 in cardiomyocytes from all four chamber walls of the human heart. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 1–14.
23. Tashiro, M.; Inoue, H.; Konishi, M. Physiological pathway of magnesium influx in rat ventricular myocytes. *Biophys. J.* **2014**, *107*, 2049–2058. [CrossRef]
24. Gräbner, W.; Pfitzer, P. Number of nuclei in isolated myocardial cells of pigs. *Virchows Arch. B Cell Pathol.* **1974**, *15*, 279–294.
25. Macianskiene, R.; Moccia, F.; Sipido, K.R.; Flameng, W.; Mubagwa, K. Channels involved in transient currents unmasked by removal of extracellular calcium in cardiac cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2002**, *282*, H1879–H1888. [CrossRef] [PubMed]
26. Li, G.R.; Du, X.L.; Siow, Y.L.; O, K.; Tse, H.F.; Lau, C.P. Calcium-activated transient outward chloride current and phase 1 repolarization of swine ventricular action potential. *Cardiovasc. Res.* **2003**, *58*, 89–98. [CrossRef]
27. Hartzell, H.C.; White, R.E. Effects of magnesium on inactivation of the voltage-gated calcium current in cardiac myocytes. *J. Gen. Physiol.* **1989**, *94*, 745–767. [CrossRef]
28. Clapham, D.E. TRP channels as cellular sensors. *Nature* **2003**, *426*, 517–524. [CrossRef] [PubMed]
29. Obukhov, A.G.; Nowycky, M.C. A cytosolic residue mediates Mg²⁺ block and regulates inward current amplitude of a transient receptor potential channel. *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 1234–1239. [CrossRef] [PubMed]
30. Schaefer, M.; Plant, T.D.; Obukhov, A.G.; Hofmann, T.; Gudermann, T.; Schultz, G. Receptor-mediated regulation of the nonselective cation channels TRPC4 and TRPC5. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 17517–17526. [CrossRef] [PubMed]
31. Zakharov, S.I.; Smani, T.; Leno, E.; Macianskiene, R.; Mubagwa, K.; Bolotina, V.M. Monovalent cation (MC) current in cardiac and smooth muscle cells: Regulation by intracellular Mg²⁺ and inhibition by polycations. *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *138*, 234–244. [CrossRef]
32. Schlingmann, K.P.; Weber, S.; Peters, M.; Niemann-Nejsum, L.; Vitzthum, H.; Klingel, K.; Kratz, M.; Haddad, E.; Ristoff, E.; Dinour, D.; et al. Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family. *Nat. Genet.* **2002**, *31*, 166–170. [CrossRef] [PubMed]
33. Chubanov, V.; Waldegger, S.; Mederos y Schnitzler, M.; Vitzthum, H.; Sassen, M.C.; Seyberth, H.W.; Konrad, M.; Gudermann, T. Disruption of TRPM6/TRPM7 complex formation by a mutation in the TRPM6 gene causes hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 2894–2899. [CrossRef]

34. Isenberg, G. Nonselective cation channels in cardiac and smooth muscle cells. *Nonselective Cation Channels* **1993**, *66*, 247–260.
35. Zakharov, S.I.; Mongayt, D.A.; Cohen, R.A.; Bolotina, V.M. Monovalent cation and L-type Ca^{2+} channels participate in calcium paradox-like phenomenon in rabbit aortic smooth muscle cells. *J. Physiol.* **1999**, *514*, 71–81. [CrossRef] [PubMed]
36. Bae, Y.M.; Park, M.K.; Lee, S.H.; Ho, W.K.; Earm, Y.E. Contribution of Ca^{2+} -activated K^+ channels and non-selective cation channels to membrane potential of pulmonary arterial smooth muscle cells of the rabbit. *J. Physiol.* **1999**, *514*, 747–758. [CrossRef]
37. Zhang, Y.H.; Youm, J.B.; Sung, H.K.; Lee, S.H.; Ryu, S.Y.; Ho, W.K.; Earm, Y.E. Stretch-activated and background non-selective cation channels in rat atrial myocytes. *J. Physiol.* **2000**, *523*, 607–619. [CrossRef] [PubMed]
38. Lopatin, A.N.; Makhina, E.N.; Nichols, C.G. Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature* **1994**, *372*, 366–369. [CrossRef]
39. Cartwright, J.H.; Aziz, Q.; Harmer, S.C.; Thayyil, S.; Tinker, A.; Munroe, P.B. Genetic variants in TRPM7 associated with unexplained stillbirth modify ion channel function. *Hum. Mol. Genet.* **2020**, *29*, 1797–1807. [CrossRef]
40. Kozak, J.A.; Kerschbaum, H.H.; Cahalan, M.D. Distinct properties of CRAC and MIC channels in RBL cells. *J. Gen. Physiol.* **2002**, *120*, 221–235. [CrossRef]
41. Macianskiene, R.; Gwanyanya, A.; Verecke, J.; Mubagwa, K. Inhibition of the magnesium-sensitive TRPM7-like channel in cardiac myocytes by nonhydrolysable GTP analogs: Involvement of phosphoinositide metabolism. *Cell Physiol. Biochem.* **2008**, *22*, 109–118. [CrossRef]
42. Aarts, M.; Iihara, K.; Wei, W.L.; Xiong, Z.G.; Arundine, M.; Cerwinski, W.; MacDonald, J.F.; Tymianski, M. A key role for TRPM7 channels in anoxic neuronal death. *Cell* **2003**, *115*, 863–877. [CrossRef]
43. Touyz, R. Transient receptor potential melastatin 6 and 7 channels, magnesium transport, and vascular biology: Implication in hypertension. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2008**, *294*, H1103–H1118. [CrossRef] [PubMed]
44. Sun, H.; Jackson, M.; Martin, L.; Jansen, K.; Teves, L.; Cui, H.; Kiyonaka, S.; Mori, Y.; Jones, M.; Forder, J.P.; et al. Suppression of hippocampal TRPM7 protein prevents delayed neuronal death in brain ischemia. *Nat. Neurosci.* **2009**, *12*, 1300–1307. [CrossRef] [PubMed]
45. Krapivinsky, G.; Mochita, S.; Krapivinsky, L.; Cibulsky, S.; Clapham, D. The TRPM7 ion channel function in cholinergic synaptic vesicles and affects transmitter release. *Neuron* **2006**, *52*, 485–496. [CrossRef] [PubMed]
46. Du, J.; Xie, J.; Zhang, Z.; Tsujikawa, H.; Fusco, D.; Silverman, D.; Liang, B.; Yue, L. TRPM7-mediated Ca^{2+} signals confer fibrogenesis in human atrial fibrillation. *Circ. Res.* **2010**, *106*, 992–1003. [CrossRef] [PubMed]
47. Zhang, Y.H.; Sun, H.Y.; Chen, K.H.; Du, X.L.; Liu, B.; Cheng, L.C.; Li, X.; Jin, M.W.; Li, G.R. Evidence for functional expression of TRPM7 channels in human atrial myocytes. *Basic Res. Cardiol.* **2012**, *107*, 282. [CrossRef] [PubMed]
48. Macianskiene, R.; Almanaityte, M.; Jekabsone, A.; Mubagwa, K. Modulation of human cardiac TRPM7 current by extracellular acidic pH depends upon extracellular concentrations of divalent cations. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0170923. [CrossRef]
49. Nilius, B.; Flockerzi, V. What do we really know and what do we need to know: Some controversies, perspectives, and surprises. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2014**, *223*, 1239–1280.
50. Scalia, C.R.; Gendusa, R.; Basciu, M.; Riva, L.; Tusa, L.; Musarò, A.; Veronese, S.; Formenti, A.; D’Angelo, D.; Ronzio, A.G.; et al. Epitope recognition in the Human–Pig comparison model on fixed and embedded material. *J. Histochem. Cytochem.* **2015**, *63*, 805–822. [CrossRef]
51. Po, S.S.; Wang, D.W.; Johnson, J.P., Jr.; Nie, L.; Bennett, P.B. Modulation of HERG potassium channels by extracellular magnesium and quinidine. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1999**, *33*, 181–185. [CrossRef] [PubMed]
52. Zhang, S.; Sawanobori, T.; Adaniya, H.; Hirano, Y.; Hiraoka, M. Dual effects of external magnesium on action potential duration in guinea pig ventricular myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **1995**, *268*, H2321–H2328. [CrossRef] [PubMed]
53. Macianskiene, R.; Martisiene, I.; Zablockaitė, D.; Gendviliene, V. Characterization of Mg^{2+} -regulated TRPM7-like current in human atrial myocytes. *J. Biomed. Sci.* **2012**, *19*, 75. [CrossRef] [PubMed]

CURRICULUM VITAE

Name, Surname: Inga Andriulė
Address: Institute of Cardiology, Lithuanian University of Health Sciences, Sukilėlių 15, LT-50103 Kaunas, Lithuania.
E-mail: inga.andriule@lsmuni.lt

Education:

2017–2021 Lithuanian University of Health Sciences,
PhD studies in Biology
2015–2017 Lithuanian University of Health Sciences,
Master's degree in Biology of Laboratory Medicine
2011–2015 Lithuanian University of Health Sciences,
Bachelor's degree in Medical and Veterinary Biochemistry

Work experience:

2017–present Lithuanian University of Health Sciences,
Institute of Cardiology, Laboratory of Membrane
Biophysics, junior researcher
2017–present Lithuanian University of Health Sciences,
Medical Academy, Faculty of Medicine,
Department of Biochemistry, assistant
2015–2017 Lithuanian University of Health Sciences,
Medical Academy, Faculty of Medicine,
Department of Biochemistry, laboratory technician

Memberships:

2017–present Lithuanian Biochemical Society
2017–present Lithuanian Biophysical Society

Scientific achievements:

2018 Best poster presentation (3th place) in international
conference „Baltic Biophysics Conference 2018“

PADĖKA

Už naudingus patarimus, vertingas žinias, kantrybę, mokslines idėjas, pasitikėjimą ir pagalbą rengiant daktaro disertaciją noriu nuoširdžiai padėkoti mokslinio darbo vadovei dr. Reginai Mačianskienei.

Už darbui nuteikiančią atmosferą, pagalbą ir patarimus dėkoju Membranų biofizikos laboratorijos bendradarbiams.

Už bendradarbiavimą ir patarimus dėkoju Kardialinės patologijos laboratorijos vedėjai prof. habil. dr. Daliai Pangonytei.

Už pagalbą, dalijimąsi žiniomis ir patirtimi dėkoju Biochemijos laboratorijos mokslininkei dr. Katrynai Pampuščenko.

Už patarimus ir pagalbą dėkoju Molekulinės kardiologijos laboratorijos mokslininkei dr. Vaivai Patamsytei.

Už vertingus pastebėjimus, komentarus ir paramą reagentų įsigijimui dėkoju Leuveno Katalikiško universiteto (Belgija) prof. Kanigula Mubagwa.

Už finansuotus doktoranto projektus dėkoju LSMU Mokslo fondui.

Už palaikymą, supratingumą ir kantrybę nuoširdžiai dėkoju savo šeimai.