DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Magyar Zsuzsanna Édua

A vázizom rianodin receptorának Ca²⁺-függő és gyógyszeres szabályozása

DEBRECENI EGYETEM MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA Debrecen, 2023

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A vázizom rianodin receptorának Ca²⁺-függő és gyógyszeres szabályozása

Magyar Zsuzsanna Édua

Témavezető: Dr. Almássy János



DEBRECENI EGYETEM MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA Debrecen, 2023

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke	5
I. Bevezetés	6
II. Irodalmi áttekintés	7
II/1. A harántcsíkolt izmok élettana	7
II/2. A rianodin receptor	10
II/3. A RyR szabályozása	16
II/3.1. A legfontosabb ligand; a Ca ²⁺	17
II/3.2. A "szuperkalcium"	21
II/3.3. A Mg²+ gátolja a RyR-t	22
II/3.4. A koffein egy Ca ²⁺ -érzékenyítő agonista	22
II/3.5. Az ATP és más adenin nukleotidok	23
II/3.6. RyR-t szabályozó fehérjék és poszttranszlációs módosítások	24
II/4. Rianopátiák	27
II/4.1. Malignus hipertermia szindróma	28
II/4.2. Katekolaminerg polimorf ventrikuláris tachycardia	30
II/4.3. A dantrolen alkalmazási lehetőségei rianopátiákban	31
III. Problémafelvetés és célkitűzés	34
III/1. A RyR luminális oldali Ca ²⁺ -kötőhelyének szelektív vizsgálata	34
III/2. A dantrolen hatásmechanizmusának nyomában	34
IV. Anyagok és módszerek	36
IV/1. Terminális ciszterna vezikula-frakció és tisztított rianodin receptor preparálás	36
III/1.1. Tisztított rianodin receptor izolálása	37
IV/2. Ca ²⁺ -felszabadulás mérés	37
IV/3. Single-channel árammérés sík lipid kettősrétegbe épített RyR-on	38
IV/4. Western blot	40
IV/5. Molekula modellezés	41
IV/6. Az Eu ³⁺ -kötőhelyének vizsgálata <i>in silico</i> módszerekkel	41
IV/7. Az adatok statisztikai elemzése	42
IV/8. Kísérleti állatok	42
V. Eredmények	44
V/1. A RyR szabályozása a luminális [Ca²+] által	44
V/2. Egy új eszköz a luminális Ca ²⁺ -kötőhelyek szelektív vizsgálatára	47
V/3. Az Y524S MHS-RyR1 szabályozása a luminális oldal felől	52
V/4. A dantrolen hatásmechanizmusának nyomában	55
V/5. A dantrolen és a magnézium Ca ²⁺ -felszabadulásra gyakorolt hatása	55

V/6. A dantrolen hatáshoz ATP is szükséges	56
V/7. Háttér Ca ²⁺ -szivárgás mérése TC vezikulákból	57
V/8. A dantrolen-hatás tesztelése Mg ²⁺ - és ATP-tartalmú oldatban single-channel árammérésekkel	59
V/9. A kalmodulin (CaM) szerepe a dantrolen-hatásban	61
VI. Megbeszélés	63
VI/1. Ca²+-raktárak szerepe a szarkoplazmás retikulum Ca²+- csatornájának szabályozásában fiziológiás és kóros állapotban	63
VI/2. Az Eu ³⁺ -kötőhelyének vizsgálata <i>in silico</i> módszerekkel	64
VI/3. A dantrolen általi RyR1-gátláshoz ATP és Mg ²⁺ szükséges	68
VI/4. A dantrolen-kötőhely feltérképezése a RyR1 szerkezetében	69
VII. Összefoglalás	73
VIII. Summary	74
IX. Irodalomjegyzék	75
X. Tárgyszavak	87
XI. Keywords	88
XII. Köszönetnyilvánítás	89
XIII. Függelék	90

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

[Ca ²⁺] _{EC}	extracelluláris kalciumion koncentráció			
[Ca ²⁺] _{IC}	intracelluláris kalciumion koncentráció			
CaM	kalmodulin			
CaMKII	Ca ²⁺ /kalmodulin-függő protein kináz II			
CaV1.1	feszültségfüggő kalciumcsatorna, vázizom izoforma			
CaV1.2	feszültségfüggő kalciumcsatorna, szívizom izoforma			
CHF	pangásos szívelégtelenség (congestive heart failure)			
CICR	Ca2+-indukált Ca2+-felszabadulás, (Ca2+-induced Ca2+-release)			
cisz	citoplazmatikus oldal			
СРVТ	katekolaminerg polimorf ventrikuláris tachycardia			
CSQ	kalszekvesztrin			
DHPR	dihidropiridin receptor (L-típusú Ca²+ csatorna, CaV)			
DP1	N-terminális domén peptid 1			
DR1, DR2, DR3	divergens régió 1-2-3			
ECC	elektromechanikai-kapcsolás			
Eu ³⁺	európiumion			
I _{Ca,L}	L-típusú kalciumáram			
krio-EM	krio-elektronmikroszkóp			
L-tubulus	longitudinális tubulus			
MHS	malignus hipertermia szindróma			
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -exchanger			
РКА	protein kináz A			
РМСА	plazmamembrán ATPáz			
Po	nyitvatartási valószínűség			
RyR	rianodin receptor			
RyR1	vázizom típusú rianodin receptor izoforma			
RyR2	szívizom típusú rianodin receptor izoforma			
SERCA	szarkoplazmás retikulum kalcium pumpa			
SOICR	raktár túltöltés-indukált Ca2+-felszabadulás (store overload-induced Ca2+-			
	release)			
SR	szarkoplazmás retikulum			
тс	terminális ciszterna			
ТМ	transzmembrán			
transz	SR-felőli-, luminális oldal			
T-tubulus	transzverzális tubulus			

I. BEVEZETÉS

A megfelelő sejtműködés fenntartásához elengedhetetlen az intracelluláris kalciumion koncentráció ([Ca²⁺]_{IC}) precíz szabályozása. A szabályozás fontos eleme a szarkoplazmás retikulum (SR) Ca²⁺ csatornája, a rianodin receptor (RyR), ami számos sejttípus [Ca²⁺]_{IC}-nak a megemelésében szerepel. Fontosságát jól mutatja, hogy a RyR genetikai hiánya az élettel összeegyeztethetetlen, pontmutációi pedig olyan rendellenes csatornaműködést eredményeznek, amely szívritmuszavarokhoz, izomgyengeséghez, vagy éppen fokozott izomtónushoz, malignus hipertermia szindrómához (MHS) vezethetnek. Ezeket a kórképeket összefoglaló néven rianopátiáknak nevezzük.

Munkánk során azt próbáljuk megérteni, hogy a RyR működését érintő, molekuláris szintű elváltozások hogyan függenek össze a vázizmokat és a szívet érintő tünetekkel, és hogy ezek a kóros folyamatok gyógyszeres terápiával hogyan fordíthatók vissza.

Az irodalomban elfogadott tény, hogy ha a kardiomiociták SR Ca²-töltöttsége meghalad egy bizonyos küszöbértéket, akkor a szívizom típusú RyR (RyR2) diasztoléban megnyílik, ami aritmiák kialakulásához vezet. Jelenleg azonban nem tisztázott, hogy a vázizom típusú RyR (RyR1) pontmutációi miatt kialakuló leggyakoribb kórkép – az MHS – hátterében szintén hasonló molekuláris mechanizmus áll-e. Ezért vizsgálataim ennek kiderítésére irányultak. Az MHS a mutáns RyR1-ek illékony altatógázokkal szembeni halálos kimenetelű, túlérzékenységi reakciója. A legelterjedtebb nézet szerint a rianopátiák közös jellemzője a RyR SR [Ca²⁺]-ja iránti túlérzékenysége, de az ezzel kapcsolatos eredmények ellentmondásai miatt a hipotézis MHS esetén ellenőrzésre szorult. Az ellentmondások oka a SR lumen felé néző Ca²⁺-kötőhelyek szelektív vizsgálatának nehézsége, ugyanis a Ca²⁺ a RyR pórusán keresztül a citoplazmatikus oldalra átjutva az ott található Ca²⁺kötőhelyeken keresztül is befolyásolhatja a csatorna működését, ami megnehezíti a luminális kötőhelyek szerepének elkülönítését. A probléma áthidalása érdekében a RyR Ca²⁺ általi szabályozásának vizsgálatára a Ca²⁺ helyett egy másik specifikus, de impermeábilis ligandot, az Eu³⁺-t használtuk, ami a RyR Ca²⁺-kötőhelyeinek oldalszelektív vizsgálatát tette lehetővé, így az MHS kórélettani folyamatának részleteit segített tisztázni.

Az egyetlen, MHS krízisben alkalmazható forgalomban lévő gyógyszer a nem-depolarizáló izomrelaxáns dantrolen, aminek a klinikai bevezetése az MHS miatti halálozások számát látványosan lecsökkentette. Bár a szert 1967 óta használják, pontos hatásmechanizmusa részleteiben máig tisztázatlan. A RyR1-hez való specifikus kötődését már régen igazolták, a hatásával kapcsolatos tudományos bizonytalanság oka az a régi megfigyelés, hogy míg intakt vázizomrostokban a dantrolen RyR1-specifikus módon képes gátolni a Ca²⁺-felszabadulást, a csatornafehérje tisztításával és mesterséges lipid membránba építésével a dantrolen iránti érzékenység látszólag elvész. Munkánk során feltártuk az érzéketlenség okát és megmutattuk, hogy a dantrolen általi gátláshoz Mg²⁺ és ATP együttes jelenléte szükséges.

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A Ca²⁺ harántcsíkolt izomműködésben betöltött szerepének vizsgálata közel 140 évvel ezelőtt Londonban kezdődött. Sydney Ringer izolált békaszíveket tanulmányozott, melyeket sóoldatos közegben (amihez bevallása szerint londoni csapvizet használt) egy erőmérőhöz csatlakoztatott és vizsgálta a szív összehúzódását. A szívek a csapvízben tökéletesen kontraháltak, ám amikor a csapvizet desztillált vízre cserélte megdöbbentő felfedezést tett. A szívek "dobogása" fokozatosan gyengült és néhány ütés után teljesen leállt. Az összehúzódás fenntartásához szükségesnek találta, hogy Ca²⁺ sókat adjon a közeghez. Ringer tehát felfedezte, hogy az addig kizárólag szerkezeti elemnek tekintett Ca2+ egy újszerű funkciót lát el; a szív összehúzódását elindító jelet hordozza. Ez mérföldkőnek számító megfigyelés volt, azonban évtizedekig nem keltett különösebb figyelmet. A Ca²⁺ hírvivő szerepét ezután csak néhány korát megelőző élettanász úttörő kísérletei erősítették meg. Ilyen volt például Lewis Victor Heilbrunn, aki békák izomrostjait úgy stimulálta, hogy Ca2+ sókat csepegtetett a végeikre. Heilbrunn helyesen következtetett arra, hogy a Ca²⁺ a belső kontraktilis elemekhez diffundál és így váltja ki azok összehúzódását. A 20. század közepén Kenneth Bailey kimutatta, hogy a Ca²⁺ a miozin ATPáz aktivitását fokozza és arra a következtetésre jutott, hogy a miozin a Ca2+-nal együtt irányítja az izomösszehúzódást. A Ca2+ mellett ekkorra elegendő bizonyíték állt rendelkezésre, de csak néhány ember volt képes átlátni a felfedezés jelentőségét, mint például Otto Loewy ("Igen, a kalcium, az minden!"). Ezeknek a korai felfedezéseknek köszönhetően a Ca²⁺ izomban betöltött szerepe iránti tudományos érdeklődés fokozatosan nőtt [1][2].

II/1. A harántcsíkolt izmok élettana

A szervezetünkben található váz- és szívizom harántcsíkolt izmok, amelyek számos szerkezeti és működésbeli hasonlósággal rendelkeznek. A harántcsíkolt izmok működésének megnyilvánulása az izmok kontrakciója, amely membránpotenciál-függő jelenség és fiziológiás körülmények között akciós potenciál hatására történik. Azt a folyamatot, amely során az akciós potenciálból, mint elektromos jelből mechanikai válasz, azaz izomösszehúzódás lesz, elektromechanikai-kapcsolásnak (excitation-contraction coupling, ECC) nevezzük [3]. Az elektromos információ átalakulásának feltétele egy harántcsíkolt izmokban megtalálható speciális membránstruktúra megléte, amit szívizomban diádnak, vázizomban pedig triádnak nevezünk. Kialakításában az izomrost plazmamembránjának (szarkolemma) kesztyűujjszerű betüremkedései, azaz a transzverzális tubulusok (T-tubulus), valamint az SR vesz részt. Harántcsíkolt izmokban az SR csövecskéi (longitudinális tubulusok

L-tubulusok) a T-tubulusok mentén kiszélesednek és úgynevezett terminális ciszternákat
 (TC) hoznak létre. Vázizomban egy T-tubulust két SR terminális ciszterna ölel körbe, és hozza
 létre a triádot (1.ábra), míg szívizomban egy T-tubulus egy TC-vel alkotja a diádot [4].

A triádok, illetve diádok azok a pontok, ahol a membrándepolarizáció SR-ből történő Ca²⁺felszabaduláshoz vezet, ezért Ca²⁺-felszabadulási egységeknek is nevezik őket. Ennek során



1. ábra. Triád struktúra vázizomban [169].

a T-tubulusokban elhelyezkedő feszültségérzékeny L-típusú Ca²⁺ csatornák (CaV), vagy más néven dihidropiridin receptorok (DHPR) érzékelik a membrán depolarizációját és aktiválják a terminális ciszternákban lévő rianodin receptorokat, amely aktiváció az SR-ből történő Ca²⁺felszabaduláshoz vezet. A RyR-ek aktivációja a két izomtípusban eltérő módon történik (3.ábra) [5].

Clay Armstrong és munkatársai békákból izolált vázizmon végzett kísérleteiben bemutatták, hogy a vázizom kontrakciója – a szívizommal ellentétben – az extracelluláris Ca²⁺ EGTA-val történő megvonása után is fennáll, azaz nem függ az $[Ca^{2+}]_{EC}$ -tól. Az $[Ca^{2+}]_{EC}$ -tól való függés különbözősége a váz- és a szívizomban lévő feszültségfüggő kalciumcsatornák eltérő tulajdonságaiban rejlik, valamint abban, hogy ezek hogyan kapcsolódnak az intracelluláris raktárakból történő Ca²⁺-felszabaduláshoz. A szívben a hosszú akciós potenciálok jelentős Ca²⁺ áramokat ($I_{Ca,L}$) indukálnak a CaV1.2 kalciumcsatorna izoformán keresztül, amely önmagában is hozzájárul a citoplazmatikus Ca²⁺ jelhez, és mindemellett aktiválja a szívizom típusú RyR-eket is. Így az ECC szívben Ca²⁺-indukált Ca²⁺-felszabadulás (CICR, Ca²⁺-induced Ca²⁺-release) mechanizmus révén valósul meg [3][6].

Ezzel szemben a vázizmokban az L-típusú kalciumcsatorna CaV1.1 izoformája elsősorban nem Ca²⁺ csatornaként, hanem feszültségérzékelőként működik, amely alloszterikus módon, fizikai kontaktus révén aktiválja a hozzá térben közel elhelyezkedő RyR1-eket. 1980-ban Clara laboratóriumában, Franzini-Armstrong fagyasztva töréses preparátumokon elektronmikroszkóppal tárták fel a CaV1.1 és RyR1 fizikai kapcsolatának ultrastrukturális alapját. Kimutatták, hogy a T-tubulusokban a CaV1.1 szabályosan, tetrádokba szerveződik. Ez a fajta elrendeződés a vázizom CaV1.1-RyR1 jelátviteli egység sajátossága, a szívizomban nincs jelen ilyen szervezettség (4. ábra). A két csatorna alloszterikus kapcsolatára utal, hogy a CaV1.1 génhiányos izomrostokban hiányoznak a tetrádok, de megjelennek a CaV1.1 heterológ expressziója esetén [6]. Jelenleg még nem eldöntött kérdés, hogy a CaV1.1 és RyR1 közvetlenül kapcsolódnak-e, vagy egy, vagy több kiegészítő fehérje közvetítésével (2. ábra). A CaV1.1 pórusformáló (α_1) alegységét 4 transzmembrán (TM) domén alkotja, amelyeket hurkok kötnek össze. Ezek közül a II. és III. domén közötti citoplazmatikus hurok elengedhetetlenül fontos az ECC-hez. 2013ban két laboratórium egymástól függetlenül egy kis fehérjét; a STAC3-at, mint a vázizom ECC fontos összetevőjét azonosította zebrahalakban és egerekben. Horstick és munkatársai egy olyan autoszómális recesszív módon öröklődő zebrahal mutációt találtak, amely következtében а halembriók immobilisak lettek és izmaik nem tudtak a vad típusú izmokhoz hasonló [Ca²⁺]_{IC} növekedést létrehozni ingerlés hatására. Az izmok ultrastruktúrája, ingerlékenysége, és az SRfunkció normális volt, ezért a szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy a fehérjének az ECC-ben lehet szerepe. A mutálódott gént STAC3 génként azonosították, ami a CaV1.1-



2. ábra. A vázizom ECC komponensei [10].

gyel és RyR1-gyel kolokalizációt mutatott [6][7]. A STAC3 gén mutációját emberben is leírták. Az elsőként Lumbee indiánoknál leírt, "indián miopátia" (Native American Myopathy=NAM) néven ismert autoszómális recesszív módon öröklődő betegség hátterében szintén ennek a génnek egy pontmutációja áll. A NAM tünetei közé tartozik a veleszületett izomgyengeség, a progresszív scoliosis, a légzési elégtelenség, a sajátos arckifejezés lefelé forduló szájszögekkel, az alacsony termet és a malignus hipertermia-hajlam [8].

Összeségében tehát elmondható, hogy vázizomban a CaV1.1 egyes alegységeinek-, illetve a CaV1.1-gyel és RyR1-gyel asszociált fehérjéknek az allosztérikus összjátéka vezet a RyR1ek aktiválásához. Bár vázizomban a CaV1.1 nem vezet Ca²⁺ áramot, a CICR-nek itt is fontos szerepe van, mivel a RyR1-ek fele nem kapcsolódik CaV1.1-hez. Ezeket a magányos RyR1eket a CaV1.1-ek által aktivált RyR1-eken keresztül felszabadult Ca²⁺ aktiválja.

A megemelkedett $[Ca^{2+}]_{IC}$ az aktomiozin cikluson keresztül az izmok kontrakciójához vezet. A relaxációs folyamat során helyreáll az $[Ca^{2+}]_{IC}$. Szívizomban a beáramló Ca²⁺ körülbelül 30%a extracelluláris eredetű, amit a Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX), illetve kisebb mértékben a plazmamembrán Ca²⁺ ATPáz (PMCA) távolít el a sejtből. A Ca²⁺ 70%-a pedig az SR-ből szabadul fel, amelynek visszavételét az SR membránban lévő SERCA pumpák működése biztosítja. Vázizomban – mivel a rángás Ca²⁺ tranzienseiért kizárólag az SR-ből származó Ca²⁺ felelős – az $[Ca^{2+}]_{IC}$ nyugalmi szintre való visszaállítását kizárólag SERCA pumpák végzik.



3. ábra. Az elektromechanikai kapcsolat egyszerűsített ábrája vázizomban (A) és szívizomban (B). (www.biorender.com felhasználásával keszült ábra.)



II/2. A rianodin receptor

A RyR-ek intracelluláris Ca²⁺ csatornák, amelyek a sejtek SR/ER membránjaiban találhatóak, és feladatuk, hogy Ca²⁺-ot szabadítsanak fel ezekből az intracelluláris Ca²⁺ raktárakból, ezzel fontos sejtfunkciókat aktiválva.

A RyR-ek alacsony szelektivitású (PCa²⁺/PK⁺ ~6, P=permeabilitás), nagy konduktanciájú (~700 pS K⁺-ra nézve és ~100 pS Ca²⁺ esetén) ligand vezérelt Ca²⁺ csatornák [9].

A rianodin európai felfedezése a 18. századra nyúlik vissza, amikor Martin Vahl dániai botanikus John Ryantől egy addig ismeretlen dél-amerikai növényből kapott mintát, amit a megtalálóról *Ryania speciosa-nak* nevezett el. A növény gyökeréből hatásos rovarölő oldat készíthető, amiből 1948-ban izolálták először a hatóanyagot, ami a rianodin nevet kapta. Később a radioaktívan jelölt rianodin tette lehetővé a RyR azonosítását és tisztítását [10]. A rianodin kettős hatást fejt ki a RyR-re. Szubmikromólos koncentrációban alkalmazva a RyR-t hosszantartó félig nyitott állapotban rögzíti. Az 5. ábrán ezt a hatást mutatom be egy, a laborunkból származó, mesterséges lipid kettősrétegbe épített RyR-ről felvett elemi (single channel) áram regisztrátumon (*5. ábra*). Az áramon jelentkező változás annyira jellegzetes és specifikus, hogy a rianodin segítségével a csatorna funkcionálisan egyértelműen azonosítható. Nagyobb koncentrációban alkalmazva a csatorna teljes záródását okozza [9][10][11].



5. ábra. **A rianodin hatása a RyR1-re single-channel árammérés során.** A rianodin hatását megelőzően a csatorna nyitott és zárt állapotai jellemzőek. 0,5 μM rianodin hozzáadását követően viszont a RyR szubkonduktív állapotba kerül, melyre jellemző az alacsonyabb áramamplitúdó és a magasabb nyitvatartási valószínűség (P₀).

A rianodin a két harántcsíkolt izomtípusban eltérő hatású, aminek oka a szív- illetve a vázizom különböző Ca²⁺-eltávolítási mechanizmusa. A szívizomban petyhüdt bénulást okoz, mivel a RyR2-ket félvezető állapotban rögzítve folyamatos Ca²⁺-szivárgást biztosít az SR-ből, amit a felszíni membrán transzporterei az extracelluláris térbe juttatva eltávolítanak a sejtből, így az intracelluláris raktárak végül kiürülnek. Ezzel szemben a vázizomrostokból nagyrészt hiányoznak ezek a Ca²⁺-eltávolító mechanizmusok, így a rianodin által kiváltott Ca²⁺-felszabadulás citoplazmatikus Ca²⁺-felhalmozódást okoz, ami a vázizom merev bénulását idézi elő [11].

Emlős szervezetekben a RyR-eknek három fő izoformája ismert (RyR1, RyR2, RyR3), amelyek három különböző gén termékei. A különböző izoformák kifejeződése szövetspecifikus. Vázizomban döntően RyR1 expresszálódik nagy mennyiségben, ezért vázizom típusú RyR-nek is nevezik. A RyR2 fehérje elsősorban a szívizomban előforduló izoforma (szívizom típusú izoforma). A RyR3-at először az agyban fedezték fel, de szintén megtalálható emlősök harántcsíkolt izmaiban kis mennyiségben. A RyR3 fehérje például a rekeszizomban a teljes RyR-populáció 0,6-5%-át képviseli. A RyR3 élettani szerepe kevésbé jelentős, hiánya más mechanizmusokkal kompenzálható mind a fejlődés során, mind felnőtt korban [9].

A RyR-ek létezése már azok izolálása előtt is régóta ismert volt, ugyanis a vázizmok struktúrájának elektronmikroszkópos vizsgálata során a SR és a T-tubulus betüremkedései között elektrondenz területekre, "lábakra" figyeltek fel. Ma már tudjuk, hogy ezek a "lábak" nem mások, mint a ma ismert legnagyobb ioncsatornák, azaz a RyR-ek. A RyR négy azonos alegységből áll (homotetramer), amelyek a csatornának egy gombához hasonlítható alakot kölcsönöznek. A négy alegység egyenként >550 kDa tömeggel rendelkezik, melyeket alegységenként >5000 aminosav épít fel, így egy teljes receptor >2,2 MDa nagyságú [10][11][12]. A különböző izoformák aminosav szekvenciái között ~65% homológia van, az eltérések pedig nagyrészt három divergens régióban (DR1, DR2, DR3) helyezkednek el [12]. A csatorna citoplazma felé tekintő oldala a gomba feje, míg a gomba tönkje a transzmembrán régió, vagy más néven transzmembrán domén (TMD). Mióta a RyR-ek izolálása és tisztítása lehetővé vált, a RyR-ek szerkezetét is vizsgálják. Számos krio-elektronmikroszkópos (krio-EM) technikával készített 3D-s szerkezet található meg az adatbázisokban, melyek a RyR-t különböző konformációkban mutatják be, ezért a csatorna kapuzási mechanizmusaira, mozgásaira is következtethetünk belőlük. Bár a 3D-s szerkezetek felbontása az utóbbi időben ugrásszerűen javult, jelenleg is problémát okoz az egyes régiók "rugalmas" természete, ami miatt a RyR különböző részeinek pontos helyzete körül továbbra is bizonytalanságok vannak. A RyR1 és RyR2 krio-EM struktúrái meglepően hasonlóak, így a funkcióban mutatkozó izoforma-specifikus különbségek többségét továbbra is homály fedi [10].

A jelenleg ismert szerkezetű doméneket az alábbi ábra mutatja *(6. ábra)*. Az egyes domének funkciójának-, egymáshoz való viszonyának-, valamint a csatorna szerkezetében való elhelyezkedésüknek a megértése fontos lépés a RyR szabályozásának megismeréséhez. A domének elnevezései az irodalomban nem követnek egységes nevezéktant, ezért igyekeztem a leggyakrabban használtakat, illetve a funkciójukat legjobban leíró elnevezéseket feltüntetni. A következő oldalon lévő táblázat tartalmazza a rövidítéseket és azok jelentését. Az egyes doménekhez tartozó szekvenciák csak közelítőleges elhelyezkedést biztosítanak a csatorna szerkezetében. A különböző módszerekkel meghatározott doménszekvenciák nem fednek át teljes mértékben, néhány aminosavnyi eltérés emiatt előfordul a szakirodalomban megjelent cikkekben. Az összehasonlíthatóság érdekében a táblázatban a RyR1-re és RyR2-re vonatkozó szekvencia adatok is szerepelnek, azonban a RyR2 szerkezetével kapcsolatos ismeretek jelenleg nem teljesek, ezért a hiányzó adatokat a táblázatban "?"-lel jelöltem.



6. ábra. A RyR1 domének sematikus ábrája [171].

RyR domén neve	Rövidítése	Klasszikus	RyR1-	RyR2-
		elnevezés**	szekvencia	szekvencia
Citoplazmatikus rész				
NH2-terminális domén	NTD		1-627	1-642
NH2-terminális domén A*	NTD-A	2. domén	1-208	1-222
NH2-terminális domén B*	NTD-B	4a. domén	209-392	223-407
NH ₂ -terminális szolenoid*	NSol/NTD-C	2a. domén	393-627	408-642
SPla és rianodin receptor domén 1	SPRY1	9. domén	628-849	643-837
(clamp = "fogó" domén része)				1459-1484
				1606-1641
SPIa és rianodin receptor domén 2	SPRY2		1055-1241	838-856
				1084-1254
SPIa és rianodin receptor domén 3	SPRY3	5. domén	1242-1656	1255-1458
				1485-1605
Tandem ismétlődő domén 1,2	Repeat12/P1	10. domén	850-1054	861-1066
(clamp = "fogó" domén része)				
Junkcionális szolenoid (handle =	JSol/Handle	3. domén	1656-2144	1642-2110
"nyel" domen)				
Hídszolenoid/Helikális domén 1	BSol/HD1	4. domén	2145-2712	2111-2679
Tandem ismétlődő domén 3,4	Repeat 34/P2	6. domén	2735-2938	2701-2907
Helikális domén 2 (clamp = "fogó"	HD2	8a, 8, 7. domén	3016-3572	2982-3528
domén része)				
Központi-, és pórus domén				
Shell-core linker peptide,	SCLP		3614-3666	?
kalmodulin (CaM)-, és JSol				
kötőhelyek				

Központi (central/core) szolenoid	CSol/CENTRAL	central	3667-4174	3613-4207
EF-hand domén	EF	11. domén	4060-4134	4036-4082
Thumb-and-forefinger domén, U-	TaF/U-motif/ U		4175-4253	4134-4207
alakú domén				
Kiegészítő transzmembrán hélixek	TMx		4322-4370	4281-4381
1. transzmembrán szegmens	S1		4559-4579	?
S1 és S2 közötti luminális hurok	S1-S2 loop		4580-4638	4538-4550
2. transzmembrán szegmens	S2		4639-4662	?
Feszültségérzékelő domén	pVSD/VSL		4541-4819	4552-4831
S2 és S3 közötti hurok*, a	(S2S3)*/ VSC		4666-4786	?
feszültségérzékelő domén				
citoplazmatikus szubdoménje				
3. transzmembrán szegmens	S3		4787-4805	?
4. transzmembrán szegmens	S4		4806-4819	?
S3-S4 közötti luminális hurok	S3-S4 loop		?	?
S4-S5 összekötő szegmens	S4-5 linker		4821-4831	?
5. transzmembrán szegmens	S5		4834-4858	?
S5-S6 közötti luminális hurok	S5-S6 loop		4859-4878	?
Pórus domén	Pore domain		4820-4956 /	4832-4966
			4879-4893	
Szelektivitási filter	SF		4894-4900	?
S5-6 linker*			4832-4956	4790-4840
6. transzmembrán szegmens			4940-4956	?
S6 citoszólikus kiterjedése*	(S6c)*/S6		4938-4956	?
Кари			lle4937	lle4868
COOH-terminális domén	CTD	CTD	4957-5037	4967-5048
Calstabin-2/FKBP12.6	Cs2			

* A sorban felette lévő domén aldoménje.

** A színkód a 7. ábrának felel meg.

RyR1 szerkezeti adatok: [13][14][15][16][17], RyR2 szerkezeti adatok: [18][19][20].

Ha a RyR1 tetramerre úgy tekintünk, mint egy gombára, akkor a "fejet" az első ~3600 aminosav alkotja, míg a pórus az üreges "tönk" ~1400 aminosavából áll össze. A szekvencia utolsó kb. 600 aminosava az SR membránba ágyazódik, míg a legutolsó 100 aminosavból álló szegmens visszafordul a citoplazmatikus tér felé és a C-terminális domént hozza létre *(6. ábra)* [17][14][13].

A csatorna citoplazmatikus része, amit eleinte az elektronmikroszkópos tanulmányok során "lábaknak" vagy "foot" régiónak neveztek, egy 275Å×275Å×120Å nagyságú, négyzet alakú, üregekkel szabdalt rész, amely a különböző, szabályozó ligandok számára biztosít számos kötőhelyet [21][16]. A következőkben a csatorna struktúráját tekintem át, kiemelve a disszertáció eredményei szempontjából fontos doméneket, amelyek nyomon követeséhez a 6. ábra nyújthat segítséget.

Szerkezetileg a csatorna citoplazmatikus oldalának nagy része négy ismétlődő α-hélixből áll össze, amelyek maguk is szuperhélix szalagokat (α-szolenoidokat) alkotnak. Ide tartozik az N-terminális szolenoid (NSol, NTD-C), a hídszolenoid (BSol), a magszolenoid (CSol), illetve a junkcionális szolenoid (JSol). Ezek a szolenoidok egyfajta állványzatot adnak a csatornának. Erre az állványzatra épülnek a globuláris szerkezetű domének [17][14][13].

A CSol a csatorna aktivációs domén része, amely összeköti a pórusdomént a citoplazmatikus héjjal. A CSol-t, BSol-t és az NSol-t – nevéhez hűen – a junkcionális szolenoid (JSol) fogja össze [14][13]. A különböző szolenoidokba épülő domének közé tartoznak az SPRY-domének (SPRY1-SPRY3), az EF-kéz (EF) domén, a tandem ismétlődő domének (RY12 és RY34) és az N-terminális domének (NTD-A és NTD-B) [10][17][14][13][16].

A homotetramer RyR alegységei közötti kapcsolatokat három fő kapcsolódási felület alakítja ki, amelyek az SPRY2 és a BSol, az NTD-A és az NTD-B, valamint az NTD-A és a BSol között jönnek létre. Ezek a kapcsolódási pontok szerepet játszanak a csatorna kapuzásában, és összekapcsolják a citoplazmatikus oldali héj mozgásait (ligandkötéskor) a pórusnyitással, amit alátámaszt, hogy az ezeken a pontokon bekövetkező pontmutációk rianopátiák kialakulásához vezetnek [17][14].

A pórust alegységenként 6 transzmembrán (6TM) szegmens veszi körül, ami egy pszeudofeszültség-érzékelő domént (pVSD) tartalmaz [17][14][13]. A RyR-ek a hagyományos 6TMcsatornákhoz hasonló transzmembrán szerkezettel rendelkeznek. Az ezektől való eltérést az adja, hogy az S6-hélixek nagyon hosszúak és a citoplazmatikus térbe nyúlnak (S6c). Az S6c a cink-ujjat tartalmazó C-terminális doménhez (CTD) kötődve kapcsolatot létesít a citoplazmatikus héjjal [10][14]. Ez a kapcsolat biztosítja az allosztérikus csatolást a pórus és a citoplazmatikus héj között. A csatorna zárt állapotában az S6 középső része elhajlik és ~45°os szögben állva, kialakítja a RyR kapuját [15][13]. A citoplazmatikus kapu, azaz az S6 helixekből álló köteg legszűkebb pontja az Ile4937-nél van a RyR1-ben. A feszültség által vezérelt ioncsatornákéhoz hasonló felépítés ellenére a RyR1 nem feszültség-vezérelt csatorna, mivel az S4-nek nincsenek pozitív töltésű aminosavai [16].

A RyR luminális oldalán, az egyes transzmembrán szegmensek között több hurok is található, melyek az SR lumenébe nyúlnak. Ezek a hurkok többszörösen negatív töltéssel rendelkeznek. A luminális hurkok vesznek részt például azon negyedleges kölcsönhatásokban, amit a RyR horgonyzó fehérjéken keresztül a kalszekvesztrinnel (CSQ), az SR fő Ca²⁺-pufferfehérjéjével alakít ki [16].



7. ábra. A RyR1 citoplazmatikus oldali doménjeinek elhelyezkedése a csatorna 3D-s szerkezetében. A domének szín- és számkóddal vannak ellátva, amelyekre a korábbi táblázatban hivatkozom. (A,B) citoplazmatikus oldal felőli nézet. (C,D) luminális oldal (SR felőli) nézet. (E,F) oldalnézet. A (G,J) panelek a belső doméneket mutatják [16].

II/3. A RyR szabályozása

Egy Ca²⁺-szelektív pórus kialakításához minimálisan elegendő lenne néhány membránon átívelő α-hélix is, ennek ellenére a RyR a legnagyobb ioncsatorna. Felmerül a kérdés, hogy miért volt szükség egy ekkora fehérje kialakítására. A válasz talán a kifinomult alloszterikus szabályozásban rejlik, ami kmáapcsolt struktúrákat is igényel. A Ca²⁺ kiemelkedően fontos másodlagos hírvivőként szolgál a sejtek életében, ezért a RyR-eken keresztüli citoplazmába jutását szigorúan szabályozni kell [11].

II/3.1. A legfontosabb ligand; a Ca²⁺

A RyR-ek ligand-függő ioncsatornák, melyek legfontosabb endogén ligandja maga a Ca²⁺. Ezért a Ca²⁺ változó koncentrációja a CICR mechanizmus révén döntő szerepet játszik az ECC-ben. A Ca²⁺ RyR működésben betöltött központi szerepe miatt a RyR fiziológiás



 abra. A RyR1 nyitvatartási valószínűsége a citoplazmatikus [Ca²⁺] függvényében [26].

szabályozásának megértéséhez elengedhetetlen volt a RyR Ca²⁺-függő működésének pontos leírása [22]. Már az első elemi áramméréseket tartalmazó közlemények beszámoltak arról, hogy a citoplazmatikus Ca²⁺ megemelésére a RyR rövid élettartamú (\leq 1 msec) megnyílásokkal reagál. Ez mind a RyR1-re, mind pedig a RyR2-re igaz, bár a RyR2 esetén előfordulnak hosszabb megnyílások is [23][24][25]. A csatorna nyitvatartási valószínűsége (P_o) a [Ca²⁺]_{IC}-val haranggörbe alakú összefüggést mutat (8. ábra) [12][26][27]. Ezért úgy gondoljuk, hogy a Ca²⁺-függésért

két citoplazmatikus Ca²⁺-kötőhely a felelős; egy nagy affinitású aktiváló (RyR1 esetén EC₅₀ = 10 μ M, RyR2 esetén EC₅₀ = 1 μ M) és egy alacsony affinitású gátló (RyR1 esetén IC₅₀ = 250 μ M, RyR2 esetén IC₅₀ = 10 mM) kötőhely. A citoplazmatikus aktiváló kötőhely a RyR Ca²⁺-indukált megnyílásáért, így a CICR-ért, míg a gátló kötőhely a csatorna inaktivációjáért felelős, aminek az izom relaxációjának megindításában tulajdonítanak szerepet [12][22][26][27].

A citoplazmatikus aktiváló Ca²⁺-kötőhely kialakításában öt aminosav vesz részt, amelyek a CSol és CTD domének kapcsolódási pontján helyezkednek el. A CSol 3893. glutamátjának (E3893), valamint a 3967. glutamátjának (E3967) karboxilláncai és a CTD 5001. treoninjának (T5001) a karbonilcsoportjai hozzák létre a kötőzsebet. Az ion koordinációjához szükséges még a 3970. glutamin (Q3970) és a 3895. hisztidin (H3895) is [14]. Az inaktivációs kötőhelyet az EF-kézben azonosították [20].

A RyR-nek valószínűleg egy harmadik Ca²⁺-kötőhelye is van, ami az SR-felől, luminálisan helyezkedik el [28][29][30][31]. Az SR [Ca²⁺]-ja általi szabályozás mechanizmusa jelenleg is ismeretlen, ráadásul az ezzel foglalkozó kutatócsoportok két ellentétes táborra oszlanak. Az egyik tábor szerint a luminális [Ca²⁺] változásai a csatorna luminális oldalán valódi Ca²⁺-kötőhelyekhez való kötődésükkel módosítják a csatorna kapuzását. Más kutatók szerint a luminális Ca²⁺ átfolyik a csatorna pórusán és a citoszólikus Ca²⁺-kötőhelyeken keresztül hat [32]. Utóbbit a továbbiakban "feed-through mechanizmusnak" nevezem.

A RyR luminális Ca²⁺ általi szabályozására először 1977-ben Makoto Endo kísérletei utaltak, aki vázizomrostokon kimutatta, hogy az SR bizonyos fokú töltöttsége szükséges ahhoz, hogy a RyR-en keresztül a Ca²⁺-felszabadulás megtörténhessen [33]. Ezután Alexandre Fabiato

kardiomiocitákon végzett kísérletei alapján leírta, hogy az SR töltöttségével nő a CICR [34]. A RyR2 luminális oldal felőli aktivációja intenzíven kutatott kérdés, mivel a raktár túltöltés által vezérelt Ca²⁺-felszabadulás (angolul: store overload-induced calcium-release, SOICR) összefüggésbe hozható szívritmuszavarokkal. Az irodalomban számos forrás található, amelyekben kardiomiocitákon végzett kísérletekben igazolták, hogy ha az SR Ca²-töltöttsége meghalad egy bizonyos küszöbértéket, akkor a RyR2 diasztoléban megnyílik, ami pedig aritmiák kialakulásához vezet [28][29][35][36][37][38]. A mechanizmus molekuláris szintű vizsgálatára elemi (single-channel) áramméréseket végeztek, amelyek igazolták, hogy a [Ca²⁺] növelése a csatorna luminális oldalán fokozza annak P₀-ját [30][31][33][39][40]. Ezek az eredmények egy széles körben elfogadott modell megalkotásához vezettek, amely szerint a RyR2 megnyílását a Ca²⁺ luminális oldali kötőhelyéhez való kötődése indítja el, és ezt a csatornapóruson átfolyó és a citoplazmatikus oldali aktiváló Ca²⁺-kötőhelyhez kötődő Ca²⁺ fokozza [39][41][42].

Ezzel szemben kutya szívizomból származó RyR2 esetén azt találták, hogy amikor a csatorna kizárólag citoplazmatikus Ca²⁺-nal volt előaktiválva, akkor a luminális Ca²⁺ által további aktiváció nem volt megfigyelhető. A szerzők szerint a Ca²⁺ luminális oldali aktiváló hatása csak akkor jelentkezik, ha valamilyen más RyR agonistát, például ATP-t, vagy koffeint is használnak. Azaz, ha a citoplazmatikus oldalon nincs jelen valamilyen más agonista, akkor a RyR2 magas luminális [Ca²⁺] mellett sem fog megnyílni. Tehát a magas luminális [Ca²⁺] önmagában nem vezethet a csatorna nyitásához, de csökkenti a citoplazmatikus oldal felőli Ca²⁺ általi aktivációhoz szükséges küszöböt [33][29].

A vázizom típusú rianodin receptor esetén a luminális oldal felőli szabályozást illetően a szakirodalomban egymásnak ellentmondó eredményeket találunk. A vázizomrostokban nehéz SOICR-t kiváltani, ezért az összes RyR1-re vonatkozó eredmény overexpresszáló sejtvonalakból származik. Ezeknek a vizsgálatoknak a hiányosságát az adja, hogy a sejtvonalak nem expresszálnak izomspecifikus járulékos fehérjéket, amelyek szükségesek lennének a RyR1 natív környezetben megfigyelt működéséhez. Mindeneserte, ilyen expressziós rendszerekben a RyR1 SOICR-érzékenysége a csatorna betegséghez vezető pontmutációi esetén jelentősen megnövekedett [43][44].

Más tanulmányok szerint a RyR1 esetén a luminális [Ca²⁺] növelése szintén növelheti a P_o-t, éppúgy, ahogy a RyR2 esetén [45][46][31][47]. Tripathy és Meissner, valamint Herrmann-Frank és Lehmann-Horn azonban nyúl RyR1-en végeztek méréseket és azt tapasztalták, hogy a luminális [Ca²⁺] növelése alacsony [Ca²⁺]-nál a P_o növekedéséhez vezet, viszont magasabb koncentrációknál éppen az ellenkezője történik, azaz a P_o csökken. A luminális Ca²⁺ gátló hatását feszültségfüggőnek találták, amiből mindkét kutatócsoport azt a következtetést vonta le, hogy a luminális Ca²⁺ átjut a csatorna túloldarára és a citoszólikus Ca²⁺-kötőhelyekhez kötődik [31][45]. Mások hasonlót tapasztaltak sertés vázizomból izolált RyR1 esetén is [48]. A nyúl RyR1-en végzett kísérletekkel szemben juh RyR1 esetén a luminális Ca²⁺-nak semmilyen hatása nem volt a P_o-ra, ha a csatorna kizárólag citoplazmatikus Ca²⁺-nal volt előaktiválva [45][31]. Ha Ca²⁺ mellett ATP-t is adtak a RyR citoplazmatikus oldalára, akkor a RyR2-höz hasonlóan az ATP érzékenyítette a csatornát a luminális Ca²⁺-ra. Az így aktivált csatornák nem mutattak feszültségfüggést, ezért azt valószínűsítették, hogy a luminális oldalon alkalmazott Ca²⁺, a luminális oldal felőli valódi Ca²⁺-kötőhelyekhez kötődik, azaz nem jut keresztül az elektromos erőtéren [33][47].

A folyamat megértését tovább bonyolítja, hogy a szabályozásban nem csak a Ca²⁺kötőhelyeknek lehet szerepe, hanem más RyR-hez asszociált szabályozó fehérjéknek is. Ilyen például a CSQ.

A CSQ Ca²⁺-kötő fehérjéje, az SR fő pufferfehérjéje, és a RyR-ek fontos szabályozója mind a két harántcsíkolt izomtípusban. Az SR-hez más fehérjék (triadin és junctin) révén horgonyzódik ki, és a luminális [Ca²⁺] növekedésével reverzibilis polimerizáción megy keresztül. Feladata, hogy a folyamat során folyamatosan magas helyi [Ca²⁺]-t biztosítson a RyR közvetlen közelében, és közvetítse a luminális [Ca²⁺] változásait a RyR-ek felé [49].

Kawasaki és Kasai szintén a RyR1 luminális oldal felőli szabályozását vizsgálták és azt találták, hogy a luminálisan növelt [Ca²⁺] a P_o növekedését okozta, de csak abban az esetben, ha a csatorna luminális oldalára CSQ-t is adtak. Ebből azt a következtetést vonták le, hogy a CSQ fontos lehet a RyR1 luminális oldali szabályozásában [50]. Qin és munkatársai a RyR1 és RyR2 luminális Ca²⁺-érzékenységét vizsgálták vázizom- (CSQ1), és szívizom (CSQ2) típusú CSQ izoformák jelenlétében. Eredményeik szerint a RyR2-k luminális Ca²⁺ iránti érzékenysége jelentős volt, ha bármelyik CSQ izoforma jelen volt. Ezzel szemben RyR1-ek esetén nem tapasztaltak jelentős luminális Ca2+-érzékenységét egyik CSQ izoforma jelenlétében sem. Így arra a következtetésre jutottak, hogy a RyR2 Ca²⁺-CSQ-függő luminális szabályozásának nincs CSQ izoforma specifitása, és hogy a Ca2+-CSQ-függő szabályozás a vázizomban valószínűleg viszonylag kis szerepet játszik (ha egyáltalán játszik), ami arra utal, hogy a CSQ1 szerepe ebben a szövetben a Ca2+ pufferelésére korlátozódik [51]. Szívizomsejtekben egyetlen akciós potenciál hatására a RyR2-kön keresztül az SR felszabadítható Ca²⁺-készletének ~50%-a kerül a citoplazmába [52][28]. Ez jelentős csökkenést eredményez az SR szabad [Ca2+]-ban, ami aktiválhatja a luminális Ca2+ általi szabályozó mechanizmusokat [51][53][54][55]. Vázizomban viszont egy akciós potenciál hatására az SR Ca²⁺-tartalmának csupán ~10%-a szabadul fel [56][57]. Ez az SR-en belüli [Ca2+] kismértékű változását eredményezi, ami valószínűleg nem elégséges a luminális oldali szabályozás aktiválásához. Ebből is az következik, hogy a CSQ-függő szabályozás fontosabb a szívben, mint a vázizomban [51][58].

Qin és munkatársai szerint a RyR-ek agonistákkal való előkezelése (ATP, koffein) nem jó megközelítés, ugyanis ennek hatására abnormálisan érzékennyé válik a csatorna. Ez

fogékonnyá teszi a RyR-t a luminális oldalról a citoszólikusra csurgó Ca²⁺ általi szabályozásra, ami megnehezíti a "feed-through" szabályozás és a luminális Ca²⁺-kötőhelyeken keresztüli szabályozás elkülönítését. Méréseikben a lumen-citoszól irányú Ca²⁺ áram nagysága kicsi, ~0,2 pA volt, ami körülbelül a fele, mint ami fiziológiás körülmények között is megfigyelhető a sejtekben, és amiről úgy gondolták, hogy elégtelen ahhoz, hogy "feed-through" mechanizmusokat indítson el [51][59]. Ezért a szerzők valódi luminális oldali szabályozást feltételeznek [51]. A luminális Ca²⁺ közvetlen, RyR2-n való hatását alátámasztja továbbá az is, hogy CSQ KO egerekben a luminális oldali aktiválhatóság megmarad, valamint hogy a tisztított (azaz CSQ mentesített) RyR2-k is megőrzik ezen tulajdonságukat [60][61][33]. Wayne Chen és munkatársai szerint az E4872 aminosav cseréje alaninra megszünteti a RyR2

Wayne Chen és munkatársai szerint az E4872 aminosav cseréje alaninra megszünteti a RyR2 luminális Ca²⁺ általi aktiválhatóságát, de nem befolyásolja a citoplazmatikus oldal felőli



9. ábra. **A RyR2 aktivációjában fontos strukturális elemek.** A W. Chen által javasolt luminális szabályozási mechanizmusban az E4872 aminosav kiemelt fontosságú [30].

szabályozást. Ezért azt feltételezték, hogy ez az aminosav kulcsfontosságú Ca²⁺-kötőzseb lehet luminális а kialakításában. Azonban, a RyR2 3D-s struktúrájának publikálásával, kiderült, hogy az E4872 nem a csatorna luminális, hanem citoplazmatikus oldalán helyezkedik el. Ennek ellenére mégis fontos lehet a RyR2 luminális oldali szabályozásában. A szerzők a következő mechanizmust feltételezik. Amikor a RyR2 zárt állapotban van, az E4872 sóhidat képez az R4874 és E4878 aminosavakkal, valamint hidrogénkötésen keresztül kapcsolódik a Q4879-

hez. Nyitott állapotban viszont az R4874 távolabb kerül az E4878-tól, és ezzel párhuzamosan az E4872, E4878 és Q4879 egymáshoz közelebb kerülve Ca²⁺-kötőzsebet formál. Emellett a csatorna 3D-s szerkezetében van egy glutaminokból álló gyűrű (Q4863) közvetlenül a csatorna kapujának luminális oldalán, aminek kísérletes mutációja csökkenti a RyR2 koffeinnel való aktiválhatóságát. Ezért úgy gondolják, hogy amikor az SR töltöttsége elér egy bizonyos szintet, a luminális Ca²⁺ belép a csatorna pórusüregébe, ahol kölcsönhatásba kerül a Q4863 aminosavval. A kölcsönhatás eredményeként meggyengülnek bizonyos, zárt állapotot stabilizáló sóhidak, ami rövid megnyílásokhoz vezet, így a Ca²⁺ átjut a póruson és kötődik az E4872 aminosavat tartalmazó új Ca²⁺-kötőhelyre. Ezek szerint a folyamat a luminális oldalon történő kötődéssel indul, ami végül a citoplazmatikus Ca²⁺-kötőhelyek aktivációjához vezet. Ennek ellenére a luminális Ca²⁺-kötőhely létezésének egyértelmű bizonyítása továbbra sem

történt meg, ennek ugyanis gátját képezi az a tény, hogy a RyR-ek a citoplazmatikus [Ca²⁺] hatására aktív és inaktív állapotba is kerülhetnek, így nem lehet kizárni, hogy a luminális Ca²⁺ hozzáférhet a citoszólikus kötőhelyekhez. Li Lien Ching és munkatársai ezért egy új megközelítést alkalmaztak. A mesterséges lipid kettősrétegbe épített RyR2-k luminális oldalát tripszines emésztésnek vetették alá. A tripszin a pozitív töltésű oldalláncokkal rendelkező aminosavak mellett hasít. A RyR-ek számos lizint és arginint tartalmaznak a C-terminális doménben, amelyek szomszédságában nagy gyakorisággal foglalnak helyet negatív töltésű aminosavak is, amelyek potenciális Ca²⁺-kötő régiókat alkothatnak. Azt tapasztalták, hogy a tripszines kezelést követően a luminális oldalon növekvő koncentrációban alkalmazott Ca²⁺ csökkentette a csatorna P₀-ját, azaz a luminális aktivációs kötőhelyek károsodtak. Mivel a tripszin nem hasítja a CSQ-t, kizárható, hogy a P₀ csökkenését a CSQ károsodása okozta volna [32].

A fentiekben szerettem volna bemutatni az irodalomban fellelhető ellentmondásokat. Ezek hátterében eltérő izolálási módszerek és kísérleti körülmények, például a kísérletekben használt állatfajok közötti különbségek, a mérések során beállított eltérő membránpotenciál értékek és a RyR-ek különböző módon történő előaktiválása állhat, amelyek megnehezítik a helyes konklúzió levonását. Az is látható, hogy a Ca²⁺ (és a többi divalens kation) nem alkalmas eszköz a luminális oldali Ca²⁺-kötőhelyek szelektív vizsgálatára, hiszen nem zárható ki, hogy a hatásokért nem a túloldalra csurgó Ca²⁺ a felelős. Mindezek miatt a luminális Ca²⁺-kötőhelyek vizsgálatára egy olyan ion lenne alkalmas, ami nagy affinitással kötődik a Ca²⁺-kötőhelyekhez, azonban a csatorna nem vezeti. Munkacsoportunk eredményei alapján ezen követelményeknek az európiumion (Eu³⁺) eleget tesz, így alkalmas a Ca²⁺-kötőhelyek oldalszelektív vizsgálatára [22].

II/3.2. A "szuperkalcium"

A periódusos rendszer f-mezőjének elemei; a lantanidák hasznos eszközei a Ca²⁺-kötő-, és transzportfehérjék vizsgálatának, ugyanis képesek a Ca²⁺-t a kötőhelyeiről leszorítani. Az 1970-es években jelent meg az első közlemény, amelyben leírták, hogy a gadolínium gátolja a vázizom kontrakcióját. Hatása a RyR1 gátlásán keresztül valósul meg, amelyet mind a citoplazmatikus, mind pedig a luminális oldal felől egyaránt és egyenlő K_d mellett (K_d = ~ 5 μ M) ki tud fejteni. A gadolínium mellett a többi lantanida is hasonló tulajdonságokkal rendelkezik [22][62].

Egy másik lantandia, az Eu³⁺ kémiai tulajdonságai, valamint ionrádiusza hasonló a Ca²⁺-éhoz. A Ca²⁺-kötőhelyekhez nagy affinitással kötődik, azonban a membránon képtelen átjutni. Ezen tulajdonságai alkalmassá teszik a Ca²⁺-kötőhelyek szelektív vizsgálatára, és így a RyR luminális oldali lehetséges Ca²⁺-kötőhelyének a kérdése is megválaszolásra kerülhet. Munkacsoportunk korábbi kísérletei kimutatták, hogy az Eu³⁺ koncentráció- és Ca²⁺- függő módon hat a RyR1-re citoplazmatikus oldali kezelés esetén. A tapasztalt hatások feszültségfüggésének elemzése arra utalt, hogy a citoplazmatikus aktiváló Ca²⁺-kötőhely a pórusban található (mint ahogy azt a 3D struktúra is igazolta) [22]. Ezen kísérletek mentén elindulva Gaburjakova és munkatársai Eu³⁺-nal vizsgálták a RyR2 luminális oldal felőli szabályozhatóságát szintén mesterséges lipid kettősrétegbe épített egyedi csatornákon. Az általuk kapott eredmények két, térben elkülönülő Ca²⁺-kötőhelyre utalnak a csatorna luminális oldalán. Az egyik feltehetően az első luminális hurokban található (I. és II. TM szegmens között), míg a másik a csatorna pórusában helyezkedhet el. Előbbi alacsony [Ca²⁺]-nál módosítja a RyR2 koffein érzékenységét, míg a pórusban lévő kőtőhely a kapuzásra lehet hatással [63].

II/3.3. A Mg²⁺ gátolja a RyR-t

A harántcsíkolt izmok nyugalmi állapotában a RyR-ek zárva vannak, amiért részben a Mg²⁺, felelős. A Mg²⁺-nak nincs külön kötőhelye a csatornán belül, a citoplazmatikus aktiváló Ca²⁺- kötőhelyek kompetitiív antagonistája, valamint a gátló kötőhelyekhez is képes kötődni, így csökkenti a RyR P₀-ját. A különböző RyR izoformák eltérő érzékenységet mutatnak a Mg²⁺-nal történő gátlással szemben, ami a Ca²⁺-kötőhelyeik eltérő affinitásával van összhangban. A RyR2 és RyR3 Ca²⁺-kötőhelyeinek affinitása Ca²⁺ iránt magasabb, mint a RyR1 esetén és nagyobb Ca²⁺ koncentrációt igényelnek az inaktivációjukhoz is, így ezzel őket a Mg²⁺ kevéssé gátolja [12][26]. A RyR1 a Mg²⁺-gátlás alól a CaV1.1 általi aktivációja során szabadul fel, ekkor a RyR1 Mg²⁺ iránti affinitása a tizedére csökken [64].

II/3.4. A koffein egy Ca²⁺-érzékenyítő agonista

A koffein az összes RyR izoforma széles körben használt agonistája. Hatását úgy fejti ki, hogy növeli a RyR-ek Ca²⁺ iránti érzékenységét. Kötőhelye RyR1-ben a CTD (I4996) és az S2S3 (W4716) domén között található, közel a citoplazmatikus Ca²⁺-kötőhelyhez *(10.ábra)*, ami RyR2-ben az F3715, W4646 és I4927 aminosavak által létrehozott koffein kötő zsebnek felel meg [14][65]. A CTD a Ca²⁺-kötőhely és koffein kötőhely között található. A koffein kötődése a CTD-t a Ca²⁺-kötőhely felé tolja, ami Ca²⁺ iránti megnövekedett affinitást és így a Ca²⁺-érzékenység növekedését eredményezi [65].

Egy csésze kávé 100 mg koffeint tartalmaz, ami körülbelül 20 µM-ra emeli a plazma koffeinszintjét [66]. Ez elegendő a koffein jól ismert idegrendszeri hatásának kiváltásához, azonban magasabb (>75 µM) plazmakoncentrációknál káros mellékhatások jelentkezhetnek. Szívet érintő mellékhatásai közül a leggyakoribb a fokozott szívfrekvencia, illetve a proaritmiás hatás. Egészen a közelmúltig úgy vélték, hogy a koffein pro-aritmiás hatása annak köszönhető, hogy a koffein eltolja a RyR2 citoplazmatikus Ca²⁺-érzékenységét egy olyan pontra, ahol a diasztolés Ca²⁺ is elegendő a csatorna aktiválódásához. Nemrégiben azonban Kong és munkatársai kimutatták, hogy a jelenség hátterében nem a RyR2 megváltozott citoplazmatikus Ca²⁺-érzékenysége áll, hanem a luminális oldali Ca²⁺-kötőhelyek felőli aktiváció érvényesülése [61]. Ezt alátámasztották Porta és munkatársai eredményei is, akik azt találták, hogy nagy dózisú koffein (≥2,5 mM) valóban érzékenyíti a RyR2-t a luminális Ca²⁺ra, ahogyan arról Kong és munkatársai beszámoltak. Ezen felül (vice-versa) a magasabb luminális Ca²⁺-szintek a csatornákat koffein-érzékenyebbé teszik [61][67][68]. Ezek az eredmények tehát arra utalnak, hogy a RyR2 koffein-aktivációs mechanizmusának valóban van luminális komponense. Portáék szerint azonban ez a komponens jelentéktelen a citoszólikus Ca²⁺-ra érzékenyítéshez képest. 1 mM koffein egyértelműen olyan nagy mértékben változtatja meg a RyR2 citoszólikus Ca²⁺-érzékenységét, hogy ehhez képest a luminális Ca²⁺-érzékenységre gyakorolt hatása elenyésző. Így tehát valószínűsíthető, hogy a RyR2 koffein általi aktivációt főleg a citoplazmatikus- és csak kismértékben a luminális Ca²⁺kötőhelyek közvetítik.

II/3.5. Az ATP és más adenin nukleotidok

A RyR-t az ATP aktiválja. Az ATP-kötőhely az S6c, CTD és TaF domének találkozási pontjában foglal helyet *(10.ábra)* [14]. Tekintettel a harántcsíkolt izmok nagy energiaszükségletére és magas citoplazmatikus ATP koncentrációjára (~5 mM), valószínűleg az ATP, vagy valamelyik analógja konstitutív módon kötődik a csatornához [12][14][69]. Az adeningyűrű fontosnak tűnik a receptorhoz való kötődéshez, mivel sem a GTP, sem pedig az inozin-monofoszfát nem aktiválja a RyR-eket [14][70]. A receptor-agonista kölcsönhatás során az ATP adenin bázisa az M4954, F4959, T4979 és L4985 által bélelt hidrofób hasadékba bújik, míg a ribózgyűrű és a trifoszfát farok kölcsönhatásba lép az S6c-vel és a TaF domén "mutatóujjaival" [14].

Az adenin nukleotidok hatásossága a RyR-en a ribózgyűrűkhöz kapcsolódó foszfátok számával arányos; ATP > ADP > AMP > adenozin > adenin. Az adenin és az adenozin csak minimális mértékben növeli a csatorna P_0 -ját [14][70].

A RyR1 esetén az ATP önmagában is képes növelni a P_o-t, de maximális aktivitás csak Ca²⁺ jelenlétében érhető el [71]. Ezzel szemben a RyR2 Ca²⁺ hiányában nem aktiválható ATP-vel, és az ATP jóval kisebb mértékben képes fokozni a RyR2 Ca²⁺-általi aktivációját mint a RyR1ét [72]. A sejtekben az ATP komplexet alkot a Mg²⁺-nal, ezért feltételezhetően a RyR szabályozása a MgATP komplex által történik. A magas intracelluláris [Mg²⁺] viszont erőteljes gátló hatást fejt ki a RyR-re, ami megnehezíteni az ATP és a MgATP hatásának elkülönített vizsgálatát [12].



10. ábra. Ca²⁺-, koffein- (Caf) és ATP-kötőhelyek helyzete a nyitott állapotban lévő RyR1 3D-s szerkezetében (Protein Data Bank: 5TAL) [172].

II/3.6. RyR-t szabályozó fehérjék és poszttranszlációs módosítások

Az ionok általi-, valamint a farmakológiai befolyásolhatóságon kívül, a RyR-hez asszociáltan találhatunk számos olyan kiegészítő fehérjét is, amelyek a csatorna működését szabályozzák. Ilyen például a RyR1 esetén a CaV1.1 megfelelő hurokszekvenciája, vagy az SR-ben található pufferfehérje, a kalszekvesztrin, melyekről a korábbi alfejezetekben már esett szó. A RyR nagy citoplazmatikus felülete lehetőséget biztosít számos más fehérje-fehérje kölcsönhatásra is, valamint több kináz számára tartalmaz foszforilációs helyet is, amelyeket jól mutat, ha megnézzük ezen fehérjék komplex interaktómját *(11.ábra)* [73]. A továbbiakban csak a leglényegesebb szabályozókat szeretném kiemelni.



11. ábra. A RyR1 és RyR2 ismert interakciós partnerei. HOMER1,2 = homer protein homológ 1,2, MYPN = myopalladin, PTN = pleiotrophin, FKBP1C, 1A = FKBP prolil izomeráz 1A, 1C, XIRP2 = xin actin-binding repeat-containing protein 2, CALM3 = kalmodulin, MYH1, 4 = miozin-1, 4, S100A1 = S100-A1 fehérje, ATP2A1, 2A2, 2A3 = SERCA 1,2,3, CACNA1S = L-típusú Ca²⁺ csatorna α_{1S}-alegység, PRKACA = cAMP-függő fehérje kináz α-alegység, CKMT2 = S-típusú kreatin-kináz, AKAP6 = A-kináz horgonyzó fehérje 6, PDE4D = cAMP-specifikus 3',5'-ciklikus foszfodiészteráz 4D [73].

II/3.6.1. Az FK-506-kötő fehérje

Az FK-506-kötő fehérjék (FKBP, calstabin) az immunofilinek családjába tartozó, peptidil-prolil cisz-transz izomeráz aktivitással rendelkező enzimek, amelyek izomeráz aktivitását az immunszupresszánsok (FK506=Tacrolimus, Rapamycin) gátolják. Közülük kettő; a 12 kD és 12.6 kD nagyságú FKBP-k a RyR-ekhez szorosan asszociáltak. A RyR1-en FKBP12/calstabin1, RyR2-n pedig FKBP12.6/calstabin2 és FKBP12 is található, oly módon, hogy minden alegységhez egy kötődik, így a csatorna négy alegységén összesen négy FKBP foglal helyet. Fő feladatuk azonban nem az enzimaktivitásukon alapszik, hanem a RyR négy alegységének összehangolt működését biztosítják azáltal, hogy a szomszédos RyR alegységek kapuzását szinkronizálják [9][14][74][75]. Az FKBP a RyR SPRY doménjei közelében, a csatorna sarkainál, a "fogó/clamp" doméneknél találhatók. A RyR nyitása és zárása során az SPRY domének lefelé billennek, és az óramutató járásával ellentétes irányba

forognak, így a "clamp"-ek mentén érintkező egymással szomszédos RyR-ek között szinkronizált kapuzás jöhet létre [75].

Ezen felül Marks és munkatársai szerint a RyR-FKBP interakció fontos a csatorna zárt állapotban tartásához, valamint a félig vezető állapotok elkerüléséhez is [76][77].

II/3.6.2. Kalmodulin

A kalmodulin (CaM) az EF-kézzel rendelkező Ca²⁺-kötő fehérjecsalád tagja, amely a RyR-hez kötődve közvetlenül szabályozza az SR-ből történő Ca2+-felszabadulást. A CaM hatása RyRre izoforma specifikus, és a [Ca2+]-tól függ. Alacsony [Ca²⁺] (nM) mellett gyengén aktiválja (apoCaM), míg magas [Ca²⁺] (µM) mellett gátolja (Ca-CaM) a RyR1-et és RyR3-at. A RyR2 esetén kizárólag gátló hatású [9][65][14].

Az apo-CaM és a Ca-CaM kötőhelyei átfedik egymást a "nyél/handle"-, HD1- és központi domének által alkotott hosszúkás hasadékban [65][14].

A CaM egy súlyzó alakú molekula, egy N-, és egy C-doménből áll, amelyek két-két Ca2+kötőhelyet tartalmaznak. "Apo" körülmények között a CaM a C-doménjén keresztül a RyR1 12. ábra. CaM és RyR1 kölcsönhatása "apo" CaM-3616-3643. aminosavak közötti [Ca²⁺] kötőhelyhez kötődik. Α további



körülmények között és emelkedett [Ca²⁺] esetén [78].

emelkedésekor a Ca2+-nal telített N-domén az 1975-1999. aminosavak által alkotott másik CaM-kötőhelyen keresztül kapcsolatot létesít a RyR1 alegységek között, és összezárva őket a csatorna gátlását okozza (12. ábra) [78].

A Ca2+ kötődése a CaM-hoz ezen kívül aktiválja a Ca2+-kalmodulin-függő protein kináz II-t (CaMKII), ami foszforilálja a RyR-t és ezzel növeli az SR-ből történő Ca2+-felszabadulást [79].

II.3.6.3. Foszforiláció

A fehérje-foszforiláció alapvető szabályozó mechanizmus, a kináz- és foszfatáz aktivitás számos biológiai folyamatot szabályoz. Ezek közé tartozik az ECC is. A szimpatikus idegrendszer aktiválódása, például a klasszikus Cannon-féle stresszválasz során katekolamin felszabaduláshoz és az izmok β-adrenerg stimulációjához vezet. A β-adrenerg receptorok G_sfehérjéken keresztül aktiválják az adenilát ciklázt és növelik a cAMP intracelluláris szintjét, ami pedig aktiválja protein kináz A-t (PKA). A PKA foszforilálja a Ca²⁺-háztartásában résztvevő fehérjéket (CaV1.1, RyR, SERCA) ezzel aktiválva őket, ami az [Ca²⁺]_{IC} fokozott-, és hosszantartó emelkedésén keresztül növeli az izom kontrakciós erejét.

A RyR citoplazmatikus régiójában számos konzervált, potenciális foszforilációs hely található. Ezel közül a RyR1 foszforilálása a 2843-as szerinen történik, a RyR2 pedig a 2808-as szerinen foszforilálódik PKA, valamint CaMKII által [77][80]. Más kinázok, mint például a protein kináz C és protein kináz G szintén foszforilálhatják a RyR-eket *in vitro*, ám ezeknek a foszforilációs eseményeknek az élettani jelentőségét még nem sikerült megállapítani [80]. A RyR-ek defoszforilációjáért a protein foszfatáz 1A és 2A felelős [77].

A RyR2 foszforilációjának kórélettani vonatkozásában megemlítendő, hogy Marx és munkatársai szerint szívben a RyR2 PKA-függő hiperfoszforilációja a S2808-nál az FKBP12.6 disszociációját okozza, ami az SR-ből diasztolés Ca²⁺-szivárgást eredményez, ez pedig rontja a kontraktilitást és aritmiák kialakulásához vezet [61][62]. Ugyanez a csoport számolt be a RyR2 fokozott foszforilációjáról szívelégtelenségben (heart failure, HF), valamint állati HF-modellekben is [62].

II/4. Rianopátiák

A RyR rendellenes működése következtében a Ca²⁺-homeosztázis zavara alakul ki, ami olyan betegségek kialakulásához vezet, mint a krónikus szívelégtelenség, szívritmuszavarok, miopátiák, és különböző neurodegeneratív betegségek [2]. Ezeket összefoglaló néven rianopátiáknak nevezzük.

Bizonyos rianopátiák öröklődő betegségek [81]. A RyR1 génben mára több mint 650 mutációt azonosítottak (Human Gene Mutation Database) [82][83]. Ezek közül a legtöbb (>200 mutáció) malignus hipertermia szindróma (MHS) kialakulásához vezet. Ezen kívül szintén gyakoriak a miopátiák, illetve a central core disease (CCD). A 650 mutációból több mint 80% missense/nonsense típusú pontmutáció [82].

Az adatbázis a RyR2 gén közel 370 mutációját tartalmazza, melyek többsége (>160 mutáció) katekolaminerg polimorf ventrikuláris tachycardiát (CPVT) okoz. Emellett gyakoriak a pangásos szívelégtelenséggel (CHF), 2-es típusú aritmogén jobb kamrai diszpláziával (ARVD2) és az úgynevezett "Ca²⁺-release Deficiency Syndrome"-mal (CRDS) járó kórképek [84][85]. Ahogy a RyR1-nél, úgy a RyR2-nél is szinte a teljes mutációs paletta hátterében missense/nonsense mutáció áll [84].



13. ábra. **Mutációs hot-spotok a humán RyR1 és RyR2-ben.** Az (A) panelen egyetlen RyR alegység látható. A (B) panelen a mutációk helyeinek eloszlása a humán RyR1- és RyR2-szekvenciákban [86].

A RyR1 és RyR2 mutációi miatt módosuló molekuláris mechanizmusok jelenleg tisztázatlanok. Általánosságban igaz, hogy а mutációk а csatorna szerkezetének kitüntetett helyein, úgynevezett forró pontokon, "hot-spot"okban találhatóak meg, melyek az Nterminális régióban, a csatorna központi régiójában és a C-terminális régiókban foglalnak helyet (13. ábra) [12][83][86]. Az utóbbi időben számos olyan RyR1

mutációt ismertünk meg, amelyek e területek között helyezkednek el, így a hot-spot klaszterek inkább a RyR2-re alkalmazhatóak. RyR2 esetén az egyre növekvő számban megismert mutációk továbbra is a hot-spot klaszterekre lokalizálódnak [82][83][84].

Dolgozatomban kiemelten foglalkozom a két leggyakoribb rianopátiával; a malignus hipertermia szindrómával és a katekolaminerg polimorf ventrikuláris tachycardiával.

II/4.1. Malignus hipertermia szindróma

Az MHS egy farmakogenetikai betegség, az altatás okozta halálozás egyik fő okozója. Az MHmutációt hordozó egyének látszólag egészségesek, viszont fokozottan érzékenyek az illékony altatószerekkel (pl. halotán, isoflurán sevoflurán), valamint a depolarizáló izomrelaxáns szukcinil-kolinnal szemben, ezért ez a rendellenesség csupán altatásakor jelentkezik. A betegség autoszómális domináns módon öröklődik, előfordulási gyakoriságát gyerekeknél 15000 altatásból 1-re, felnőtteknél pedig 50000-100000-ből 1-re becsülik, a halálozási ráta pedig 1,4-10% közé tehető [86][87][88].

Az altatószerek már terápiás koncentrációban is nyitják a mutáns RyR1-et, ami a mioplazma [Ca²⁺]-jának fokozott megemelkedéséhez vezet, ami tartós izomösszehúzódást, kontraktúrát okoz. A folyamatos izomösszehúzódás és az emelkedett [Ca²⁺]_{IC} komoly metabolikus igényt támaszt a sejtekkel szemben, ami lactoacidózishoz vezet. Az elhúzódó hipermetabolikus állapot nagyfokú hőtermeléssel jár, így MH krízis során a testhőmérséklet akár 43°C-ra is emelkedhet. Ezek az események jellemzően gyorsan jelentkeznek és kezelés nélkül halálhoz vezetnek. A kezelés magában foglalja a beteg hűtését minden lehetséges módon (4 °C-os intravénás fiziológiás sóoldat adása, a bőr jeges hűtése), valamint a dantrolen nevű gyógyszer adását, amely az egyetlen életmentő szer MH krízis során (*lásd: II.4.3. fejezet*) [86][89].

A kórállapot *in vitro* diagnosztikáját gyanú esetén végzik el (pl. családtörténet), mely során a betegtől izombiopsziát vesznek, amelyen agonisták (jellemzően koffein, halotán, rianodin) által indukált kontraktúra választ vizsgálnak [90][91][92]. Az MH mögötti molekuláris

mechanizmusok megértéséhez kezdetben ilyen izombiopsziák CICR-érzékenységét vizsgálták, és megállapították, hogy az MH mutációk fokozzák a RyR1 érzékenységét és aktiválhatóságát.

Az állatmodellek elterjedése nagy előrelépést jelentettek az MHS patofiziológiájának megértésében. A legszélesebb körben használt kísérleti állatok bizonyos sertésfajtákból származtak, amelyek MHS-ben szenvedtek. Bár a sertésmodell rendkívül hasznos volt például a terápiában használt dantrolén preklinikai vizsgálataiban, ennek a modellnek számos hátránya van. A leggyakrabban sertésekben vizsgált mutáció; az R615C például az összes humán mutációnak csak 2%-át képviseli [43][93][94]. Ezért a későbbiekben a genetikailag módosított egérmodellek vizsgálata terjedt el, amelyek között mind a három mutációs hotspotot lefedő típusokat találunk. Jelenleg négy MHS-RyR1 knock-in genotípus áll rendelkezésre: Y524S, R163C, G2435R és T4826I. Az Y524S volt a humán MHS (Y522S) első egérmodellje. A homozigóta egerek súlyos vázizom rendellenességeket mutatnak, és a méhen belüli élet korai szakaszában (17. nap) vagy nem sokkal a születés után elpusztulnak. A heterozigóta egerek életképesek és szaporodóképesek. A humán MHS-hez hasonlóan az Y524S mutációt hordozó egerekben az illékony anesztetikumok, valamint az emelkedett környezeti hőmérséklet MHS-szerű válaszreakciót vált ki, amit egész testre kiterjedő kontraktúra, hipertermia, hiperventilláció, rabdomiolízis és végül halál jellemez. Az ilyen egerekből származó izomrostokra jellemző az emelkedett nyugalmi [Ca²⁺]_{IC} [93][94]. Az R163C (emberben is R163C) egy domináns heterozigóta mutáció, amely nem mutat fenotípust, mindaddig amíg nem érintkezik valamely kiváltó ágenssel. A homozigóta egyedek életképtelenek. A G2435R mutációt hordozó egér a leggyakoribb humán MHS mutáció (G2434) modellje. Mind a homozigóta, mind a heterozigóta egerek életképesek és termékenyek, bár néhány homozigóta hím spontán elpusztult. A T4826I mutációra nézve heterozigóta vagy homozigóta knock-in egerek egyaránt túlélnek, bár a homozigóta állatok érzékenyebbek voltak a halotánra és a hőstresszre [94].

Az MHS okozta RyR1 rendellenességek másik széles körben alkalmazott vizsgálati modelljei a heterológ expressziós rendszerek. Ezen vizsgálatok alapján a legtöbb MH mutáció funkciónyerő, ami azt jelenti, hogy az MH-RyR1 nyugalmi állapotban is aktívabb, mint a vad típusú RyR1, ami Ca²⁺-szivárgást eredményez az SR-ből [44][95][96]. Chen és munkatársai kimutatták, hogy az MHS-RyR1-csatornák a vad típushoz képest alacsonyabb küszöbértéket mutatnak a raktár túltöltés által vezérelt Ca²⁺-felszabadulás (SOICR) során, és azt feltételezték, hogy a halotán azáltal váltja ki a Ca²⁺-felszabadulást, hogy tovább csökkenti ezt a küszöbértéket. A szerzők az alacsony SOICR küszöböt az MH rohamok kialakulási feltételeztek, ami azon alapult, hogy az MHS-RyR1-ek nemcsak az illékony anesztetikumok, hanem más fontos agonisták, például a citoplazmatikus Ca²⁺ iránt is túlérzékenyek. A magas agonistaérzékenység viszonylag nagy nyugalmi SR Ca²⁺-szivárgással jár együtt, amely tünetmentes maradhat mindaddig, ameddig az illető szervezetébe nem kerül MH-rohamot kiváltó ágens, mivel a szivárgást az SR Ca²⁺ pumpája kompenzálja. Ezt a Ca²⁺-egyensúlyt a halotánkezelés megzavarja, így a gyógyszer potencírozza a szivárgást és kóros Ca²⁺-felszabadulást okoz, amit súlyosbít az MHS-RyR1 fokozott érzékenysége a citoplazmatikus Ca²⁺-ra (azaz a Ca²⁺ feed-through aktiváció) [44].

Ezzel szemben más, elemi áramméréses vizsgálatok azt mutatták, hogy a [Ca²⁺] növelése a RyR1 luminális oldalán gátolja a csatornát. A gátlás membránpotenciáltól való függése alapján ezek a kutatók úgy magyarázták eredményeiket, hogy a luminális Ca²⁺ átjut a póruson, és eléri a csatorna citoplazmatikus oldalán található gátló Ca²⁺-kötőhelyet [45][31].

Úgy tűnik, hogy az irodalomban zavaros az adatok értelmezése, ami az összes ilyen kísérlet közös alapproblémájából ered, vagyis abból, hogy a feltételezett luminális Ca²⁺-kötőhely funkcióját nem lehet szelektíven vizsgálni, mert a Ca²⁺ átjut a csatorna pórusán.

II/4.2. Katekolaminerg polimorf ventrikuláris tachycardia

A RyR2-t a szisztolé során az L-típusú Ca²⁺ csatorna által szállított Ca²⁺ aktiválja. A Ca²⁺ áram a Ca²⁺-felszabadulás elindítójaként szolgál, de az összehúzódáshoz szükséges Ca²⁺ nagy része az SR-ből származik. Fiziológiás körülmények között a diasztolé kezdetén a Ca²⁺ felszabadulás megszűnik, és a RyR2-k a teljes relaxáció alatt zárva maradnak [3]. A szív kontraktilitása a szisztolés [Ca²⁺]_{IC} csúcsértékétől függ, amit az SR Ca²⁺ tartalma, az I_{Ca.L} nagysága és a RyR2 Ca2+-érzékenysége határozza meg. A szarkolemmán, és az SR-en keresztül történő Ca²⁺-áramlások dinamikus egyensúlya védi a kardiomiocitát a citoplazmatikus Ca²⁺-túlterheléstől, miközben fenntartja a Ca²⁺-felszabadulás amplitúdóját. Ennek az autoregulációnak az alapja, hogy (1) a RyR2 aktiválódik az SR [Ca2+] növekedésével, (2) az L-típusú Ca²⁺-csatorna inaktivációja Ca²⁺-függő, és (3) az NCX által közvetített Ca2+ eltávolítás sebességét az emelkedett [Ca2+]IC fokozza [97][98]. Az autoreguláció hátterében álló mechanizmus az NCX aktivitásával magyarázható: a magasabb [Ca²⁺]_{IC} tranziensek nagyobb Ca²⁺-kiáramlást biztosítanak az NCX-en keresztül, ami végül az SR Ca2+-tartalmát alacsonyabb szintre csökkenti. Ez az autoreguláció bizonyos szívbetegségekben sérül; például pangásos szívelégtelenségben (CHF) vagy katekolaminerg polimorf ventrikuláris tachycardiában (CPVT). Ezekben az esetekben az SR-ből kiszivárgó Ca²⁺ és az ebből eredő [Ca²⁺]_{IC} növekedés befelé irányuló áramot indukál az NCX-en keresztül, ami két problémát okoz: (1) késői utódepolarizációt (delayed afterdepolarization, DAD) generál, ami aritmiák kialakulásához vezet, és (2) az SR Ca²⁺-tartalmát vészesen alacsony (az autoregulációt megakadályozó) szintre csökkenti, ami pedig lecsökkenti a Ca²⁺felszabadulás amplitúdóját [99][100]. Látszólag ez a két pont logikailag ellentmondásos, mert bár az alacsony SR Ca²⁺-szint megmagyarázza a csökkent Ca²⁺-tranzienseket és

kontraktilitást CHF-ben, ennek alacsony aritmogén hajlammal kellene társulnia (mivel az SRdepléció miatt csökkenne a diasztolés Ca²⁺-csurgás is). Ezzel szemben azonban a Ca²⁺szivárgás paradox módon tartósan fennmarad a CHF-ben, ami magas aritmogenitással jár [85].

A következőkben a RyR2 azon funkcionális változásait mutatom be, amelyek a Ca2+felszabadulás autoregulációjának sérüléséhez vezetnek szívbetegségekben. A RyR2-höz köthető leggyakoribb betegség az 1-es típusú CPVT, ami a hirtelen szívhalál ismert oka. A betegeknél kamrai tachycardia csak katekolaminerg ingerlés során (pl. testmozgás vagy emocionális stressz) jelentkezik, egyébként tünetmentesek és nyugalomban normális EKG-t mutatnak. A szívük morfológiai eltérést nem mutat, ami azt jelzi, hogy az ECC alaphelyzetben ép [101][102][103][104]. Ezen túlmenően a fiziológiásan működő ECC azt jelenti, hogy CICR és így a RyR2 citoplazmatikus Ca²⁺ iránti érzékenysége is változatlan. Katekolaminerg stimuláció alatt azonban, amikor a foszfolamban foszforiláció miatt az SR Ca²⁺-tartalom megnő, CPVT alakul ki. Chen csoportja kimutatta, hogy a magas SOICR-hajlam a RyR2 luminális [Ca²⁺]-ra való alacsony nyitási küszöbének köszönhető, és ez felelős a CPVT-ért (gain-of-function) [35][105]. A túlérzékeny RyR2-ket diasztolé során a megnövekedett SR Ca²⁺-tartalom újra nyitja, ami diasztolés Ca²⁺-felszabadulást, korai utódepolarizációkat és tachycardiát okoz. Egy alternatív hipotézis szerint a mutáns RyR2-k akkor is fokozott aktivitást mutatnak, ha PKA által foszforilálódnak. Egy másik munkacsoport szerint a mutáns csatornáknak alacsonyabb az FKBP12.6 iránti affinitása, és a RyR2 PKA általi foszforilációja miatt az FKBP12.6 disszociál a RyR2-ről, ami szivárgó csatornákat hoz létre [106]. Ezt azonban más munkacsoportoknak nem sikerült alátámasztaniuk [107][108][109][110][111]. Az FKBP12.6 disszociációs modellt alátámasztva Marks csoportja kimutatta, hogy az FKBP12.6 knock-out egerekben gyakori a fizikai terhelés okozta hirtelen szívhalál előfordulása, valamint megnő a késői utódepolarizációk aránya is [106]. Ezzel ellentétben, Chen és munkatársai ugyanilyen genetikai háttérrel rendelkező egereknél nem figyeltek meg CPVT fenotípust (vagy bármilyen más rendellenességet) [112].

II/4.3. A dantrolen alkalmazási lehetőségei rianopátiákban

"Valószínűleg már megkapta a Dantrolent mielőtt elolvassa ezt a betegtájékoztatót. A sürgős kezelés szükségessége mindennél fontosabb volt, amikor kapta ezt a gyógyszert." – olvasható az OGYÉI által kiadott betegtájékoztatón [113]. A dantrolen az egyetlen olyan ismert hatóanyag, amely malignus hipertermia roham esetén életmentő szerként alkalmazható. A gyógyszer 1979-es bevezetését követően az altatás miatti halálozások száma drasztikusan lecsökkent [114].

Jelenleg kétféle készítmény áll rendelkezésre. A hagyományos változat Dantrium[®] néven van forgalomban. 20 mg-os injekciós üveges kiszerelésben kapható, amit 60 ml steril vízben kell feloldani. A Dantriumban az aktív hatóanyag a dantrolen-nátrium. A készítményre jellemző továbbá, hogy vízben nehezen oldódik. Egy átlagos felnőttnek 8-10 ampullára van szüksége kezdeti kezelésként. A Ryanodex[®] az FDA által jóváhagyott új, alternatív készítmény, amely 250 mg-os ampullákban kapható. Ennek feloldásához csak 5 ml steril vízre van szükség, és az oldhatósága is jobb, így már egyetlen ampulla beadása is elegendő. A krízist követően 48-72 órás utókövetés javasolt, ugyanis a betegek 25%-ánál a szindróma kiújul [92]. Ezeken kívül több országban is forgalmaznak Dantriumot kapszula formában, ami 25 vagy 100 mg dantrolen-nátriumot



Na +

kezelésére szolgál [115]. A dantrolen mellékhatásai rövid távú alkalmazás esetén enyhék; az esetek 9%-ában vénagyulladás, 21%-ban átmeneti izomgyengeség, 4%-ban gyomorbélrendszeri zavarok jelentkezhetnek [92]. A megfelelő dantrolen-kezelés ellenére az MHbetegek körülbelül 5%-ánál a roham letális kimenetelű, ezért a gyógyszer terápiás hatékonyságának javítása fontos kihívás, amelyhez ismerni kell a gyógyszerhatás ideális feltételeit is. Ezt az azonosítási folyamatot azonban hátráltatta a dantrolen hatásmechanizmusára vonatkozó ismereteink hiánya, amely több kutatócsoport egymásnak ellentmondó eredményeiből eredt [116][117][118]. Paul-Pletzer és munkatársai 2002-ben azonosították a lehetséges dantrolen-kötőhely szekvenciát a RyR1 primer szerkezetében [119]. Palnitkar és munkatársai már 1997-ben publikálták, hogy a dantrolen gátolja a Ca²⁺felszabadulást SR vezikulákból, valamint gátolja a [³H]-rianodin kötődését az SR membrán frakciókhoz [120]. Később azonosítottak egy 160 kD nagyságú SR membránfehérjét, ami nagy affinitással kötötte a [³H]-azidodantrolent, emiatt felmerült, hogy ez töltheti be a dantrolenkötőhely szerepét [121]. A feltételezett kötőhelyről végül kiderült, hogy ez a RyR1 Nterminálisával (DP1, N-terminal domain peptide) azonos szakasz [122]. A dantrolen a RyR1 N-terminálisán található 590-609-es pozícióban található aminosavak által alkotott helixbe kötődik [119]. Ez a szakasz megegyezik a DP1 régióval, amelyről ismert, hogy döntő fontosságú bizonyos interdomén kapcsolatok kialakításában, és ezáltal a csatorna szerkezetének stabilizálásában [123]. Fiziológiásan, a RyR aktiválásakor ez az interdomén kapcsolat meggyengül, ami lehetővé teszi a csatorna nyitott konformációba billenését. Az ezen a szakaszon lévő MH mutációk tehát közvetlenül destabilizálhatják a csatorna szerkezetét. A modell szerint a dantrolen ezeket a pontokat allosztérikus mechanizmus révén újra rögzíti, és ezzel biztosítja a zárt szerkezetet [123][124][125].

Az MH és a szívizom riánopátiák molekuláris patomechanizmusa közötti hasonlóság felvetette annak lehetőségét, hogy a dantrolen hatékony lehet antiaritmiás gyógyszerként is. MH rohamok során alkalmazott dantrolennél nem tapasztaltak szívgátló mellékhatásokat, de újabb vizsgálatok kimutatták, hogy a gyógyszer csökkenti a kamrai tachycardiák kialakulását [126][127]. Nyúl kardiomiocitákon végzett kísérletekben a dantrolen (1 µM-ban alkalmazva, míg a terápiás plazmakoncentráció MH-ban ≈10 µM) antiaritmiás hatást fejtett ki, és szívelégtelenségben fokozta az inotrópiát. Ezen hatása mögött valószínűleg a diasztolés Ca²⁺-szivárgás gátlása, a SOICR küszöbértékének növelése és az SR Ca²⁺-ürülés mértékének csökkentése állhat. Érdekes módon a dantrolen egészséges szívizomsejtekben hatástalan maradt [128]. Számos más kutatócsoport szolgáltatott bizonyítékot arra, hogy a dantrolen hatásos a CPVT knock-in egerekben, valamint gátolja a nyugalmi Ca²⁺-szivárgást és a spontán Ca²⁺-tranziensek kialakulását CPVT mutációt hordozó indukált pluripotens őssejt eredetű kardiomiocitákon [129][130][131][132][133]. Ezek az eredmények azonban felvetik a kérdést, hogy hogyan hat a dantrolen a két különböző RyR izoformára. A dantrolen kötőhely RyR1-ben azonosított szekvenciája megtalálható a RyR2 azonos régiójában is. A kísérletes adatok viszont arra utalnak, hogy ez a feltételezett kötőhely a RyR2-ben rejtve marad egészséges csatorna esetén, de a fehérje bizonyos patológiás módosításai után hozzáférhetővé válik a dantrolen számára. A mutációk és a poszttranszlációs módosítások szívizom eredetű rianopátiákban is azon domének közötti kölcsönhatás fellazításán keresztül hatnak, amelyek fontosak a zárt állapot stabilizálásában. Vélhetően a dantrolen ezeket a fellazult interdomén kapcsolatokat stabilizálja [134][123]. Egy alternatív magyarázat a dantrolen hatásmechanizmusára az lehet, hogy helyreállítja a CaM kötődését a RyR2-hez, ami lehetséges választ adna arra a kérdésre is, hogy miért csak a beteg szívekben hat [135][136]. A dantrolen krónikus alkalmazása során hepatotoxicitás léphet fel, ami kizárja a hosszútávú terápiás alkalmazás lehetőségét. Egy biztonságosabb és RyR2-szelektívebb dantrolen-származék kifejlesztése az antiaritmiás gyógyszerek hasznos, új osztályát eredményezhetné.

III. PROBLÉMAFELVETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

III/1. A RyR luminális oldali Ca²⁺-kötőhelyének szelektív vizsgálata

Bár az irodalomban számos adat áll rendelkezésre a RyR luminális oldali Ca²⁺ általi szabályozásáról, az eredmények értelmezését megnehezíti, hogy a luminális kötőhelyek vizsgálatára használt kétértékű ionok a csatorna pórusán átjutva a citoplazmatikus Ca²⁺-kötőhelyekhez kötődve is kifejthetik hatásukat. Ennek kizárására kísérleteinkben Eu³⁺-t használtunk, ami nagy affinitással képes kötődni a Ca²⁺-kötőhelyekhez, viszont a csatornán átjutni képtelen.

Szívizom típusú rianopátiákban Ca²⁺-felszabadulás a mutáns RyR luminális magas Ca²⁺érzékenysége miatt alakul ki, így az SR Ca²⁺-töltöttségének adott fokán a RyR diasztoléban megnyílik. A felszabaduló Ca²⁺ és az NCX tevékenysége miatt a membrán depolarizálódik és extraszisztolé alakul ki. MHS esetén is hasonló molekuláris kórfolyamatot feltételeznek. A RyR nyugalomban itt is aktívabb, de jelenleg nem tisztázott, hogy ezért a kóros aktivitásért valóban a RyR1 SR felőli, luminális oldali Ca²⁺-kötőhelyeinek túlérzékenysége a felelős, vagy a citoplazmatikus oldali Ca²⁺-kötőhelyeké, amit a Ca²⁺ a póruson átfolyva ér el, kötődik és ezzel aktiválja a csatornát.

- Munkánk során célul tűztük ki annak megértését, hogy hogyan szabályozza a luminális Ca²⁺-kötőhely a RyR1 és RyR2 működését.
- Kísérleteink második csoportjában arra a kérdésre kerestük a választ, hogy MHS-ben

 a szívizom rianopátiákhoz hasonlóan a raktár túltöltés által indukált Ca²⁺ felszabadulás mechanizmus áll-e a fokozott csatornaaktiváció mögött.
- Funkcionális adataink és *in silico* analízis segítségével célunk volt azonosítani azokat a RyR szekvenciákat, amelyek tartalmazhatják a luminális Ca²⁺-kötőhelyet.

III/2. A dantrolen hatásmechanizmusának nyomában

Bizonyítottnak tekinthető, hogy a dantrolen közvetlenül vagy közvetve RyR1-en hatva gátolja Ca²⁺-felszabadulást. A hatás intakt vázizomrostokban és SR vezikulákban is nyilvánvaló, single-channel kísérletekben azonban a tisztított RyR1-eket a dantrolen képtelen volt gátolni [116][44][85][117][122][127]. Ebből arra a következtetésre juthatunk, hogy a dantrolen hatásának egy fontos tényezője elvész a RyR tisztítási eljárása során. Így annak ellenére, hogy a dantrolen az egyetlen MHS kezelésében alkalmazott szer és már kötőhelyét is ismerjük a fehérje primer szekvenciájában, pontos hatásmechanizmusa még mindig ismeretlen. Ennek tisztázásához azonosítani kell a RyR gátlásához szükséges hiányzó tényező(ke)t [82][83].

A disszertációm alapjául szolgáló témát egy közelmúltbeli tanulmány motiválta, amely célja ezen ismeretlen összetevők azonosítása volt. Choi és munkatársai arra figyeltek fel, hogy a korábbi single-channel kísérletekben a mérőoldatból hiányzott a Mg²⁺, ezért feltételezték, hogy ez lehet a hatáshoz szükséges hiányzó faktor. Kimutatták, hogy 10 µM dantrolen mellett legalább 1 mM Mg²⁺ szükséges ahhoz, hogy a Ca²⁺-felszabadulást gátolja permeabilizált izomrostokban. A szerzők azonban nem szolgáltattak single-channel mérési adatokat az eredményeik megerősítésére, így a közvetlen bizonyíték arra, hogy a dantrolen hatását a Mg²⁺ közvetíti a RyR1-re, továbbra sem nyert bizonyítást [137].

- Ezért a jelen munka célja volt a tisztított (járulékos fehérjéktől mentes) RyR1-ek vizsgálata annak kiderítésére, hogy a csatorna dantrolen-érzékenységéhez valóban a Mg²⁺ közvetlen kötésére van-e szükség.
- Célunk volt továbbá a gyógyszer hatásának ellenőrzése különböző [Mg²⁺] mellett SR vezikulákból történő Ca²⁺-felszabadulásra.
- 3. Vizsgálni kívántuk az ATP szerepét a dantrolen hatásmechanizmusában a fent említett módszerek segítségével.

IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

IV/1. Terminális ciszterna vezikula-frakció és tisztított rianodin receptor preparálás



15. ábra. **TC-vezikula és tisztított RyR izolálás lépései** (Biorender felhasználásával keszült ábra).

Munkám során terminális ciszterna vezikulákból (TCV) Ca²⁺-felszabadulás kísérleteket, valamint tisztított rianodin receptorokon (single-channel) elemi áramméréseket végeztem. A TCV-ban megtalálható mind a SERCA, mind pedig a RyR1 (15. ábra). A TCV differenciál centrifugálással а következőképpen izolálható. A nyúlból/egérből kimetszett 50 g fehér izomhoz (musculus longissimus dorsi) vagy 50 g kutya kamrai szívizomhoz 480 ml puffert (100 mM NaCl, 20 mM EGTA, 20 mM HEPES, pH=7,5) adunk és 6×25 másodpercig konyhai turmixgépben homogenizáljuk. A homogenizálás során az SR is darabokra törik, majd vezikulákká zárul. A vezikuláknak két típusát különböztetjük meg. Az egyik (könnyű SR vezikula, vagy LSRV) a longitudinális tubulusokból keletkezik. A másik méréseinkhez а frakcióra. terminális ciszternákból kialakuló nehéz SR vezikulákra (HSRV), vagy más néven terminális ciszterna vezikulákra volt szükséa. А homogenizátumból centrifugálással (4500×g, 25 perc) eltávolítjuk az alakos elemeket, majd a felülúszót gézen keresztül szűrjük és további 30 percig centrifugáljuk 40000×g-n. Az így nyert üledéket az aktomiozin-szennyezettség csökkentése érdekében 1 órán keresztül magas ionerősségű pufferben (600 mM KCI, 10 mM PIPES, 250 mM szacharóz, 0,1 mM CaCl₂, 0,09 mM EGTA, pH=7,0) inkubáljuk. Ennek során a vezikulák felszínéhez tapadó aktomiozin feloldódik és felülúszóban marad. A mintát ezt követően centrifugáljuk (30 perc, 100000×g). A centrifugálás végén az LSRV és

TCV frakciók jól láthatóan elkülönülnek, oly módon, hogy a TCV centrifugacső alján sötétebb réteget képez, az LSRV pedig felette halványabb réteg formájában ülepszik le. Az LSRV-t ezt követően eltávolítjuk, majd a TCV frakciót izoozmotikus (300 mM szacharóz, 10 mM K-PIPES,
pH=7,0) pufferben vesszük fel és körülbelül 20-30 mg/ml végkoncentrációra hígítjuk. A preparálás minden lépését 4°C-on vagy jégen végezzük, proteáz inhibitorok (200 µM pefabloc, 0,1 µM aprotinin, 1 µM leupeptin, 0,2 µM pepstatin A, 500 µM benzamidin, 15 µM calpain inhibitor I, 15 µM calpain inhibitor II) jelenlétében. Ezután a mintát folyékony nitrogénben lefagyasztjuk, és -70 °C-on tároljuk. Az így elkészített TCV-t Ca²⁺-felszabadulás mérésre és RyR1 izolálásra használjuk fel.

III/1.1. Tisztított rianodin receptor izolálása

A rianodin receptorokat 3 ml, 27 mg fehérjét tartalmazó TCV-szuszpenzió, valamint 6 ml 1% detergenst és 0,45% foszfolipidet tartalmazó oldat (0,02 mM EGTA, 0,03 mM CaCl₂, 0,45% PC, 1% CHAPS, 1×10⁻⁴ mM DTT, proteáz inhibitorok, 20 mM Na-PIPES, pH=7,2) elegyében szolubilizáljuk. A minta egyharmadát triciált rianodinnal jelöljük, amelynek a későbbi azonosításban lesz szerepe. A szolubilizálás során a csatornakomplexek kioldódnak a membránból és egy detergens-úszógumit kapnak. A nem szolubilizált vezikulákat centrifugálással eltávolítjuk (59000×g, 20 perc). A felülúszó RyR1 mellett K⁺- és Cl⁻- csatornákat, valamint SERCA pumpákat is tartalmaz, ezért a mintát lineáris (10-28%)

szacharóz gradiensre rétegezzük fel és centrifugálással választjuk szét komponenseire (90000×g, 16 óra). Ahhoz, hogy megtaláljuk a RyR1et a gradiensen, a triciált-RyR1 minta gradienséből 15 cseppes frakciókat szedünk, majd szcintillációs módszerrel meghatározzuk az egyes frakciók radioaktivitását, valamint a hozzájuk tartozó cukorkoncentrációt megmérjük is refraktometriás módszerrel. А beütésszám-csúcs alapján következtethető, hogy a jelölt minta, mely frakcióiban dúsult fel a RyR. A jelöletlen gradiensek esetén is hasonló törésmutatójú frakciókban várhatóak a rianodin receptorok. A RyR1 jelenléte a későbbiekben 10%-os SDS-poliakrilamid gélen végzett gélelektroforézissel, valamint Coomassie-blue



RyR1 jelenlétének ábra. Α 16. ellenőrzése SDS-PAGE módszerrel. A festődés intenzitásából a gélben lévő fehérje mennyiségére következtethetünk, а további kísérletekhez csak azokat a frakciókat használjuk, amelyek a legnagyobb mennyiségben tartalmaznak RyR1-et. A RyR1 nagy molekulasúlya miatt a gél felső harmadában fut.

festéssel is ellenőrizhető *(16. ábra)*. A RyR-ban dús mintát 50 μl-es porciókra osztjuk, folyékony nitrogénben fagyasztjuk, és -70°C-on tároljuk.

IV/2. Ca²⁺-felszabadulás mérés

A nyúl vázizomból izolált TC vezikulában megtalálható mind a SERCA pumpa, mind a RyR1, ezért a SERCA segítségével Ca²⁺-nal feltölthető, majd pedig a RyR1 aktiválásával ismét

felszabadítható belőle a Ca²⁺. Az extravezikuláris oldat Ca²⁺-koncentrációja Ca²⁺-érzékeny festék (antipirilazo III) segítségével, spektrofotometriás méréssel 710 nm-en követhető nyomon. A vezikula feltöltése során használt oldat tartalma: 92,5 mM KCl, 0,5 mM MgCl₂, 0,5 mM ATP, 7,5 mM Na-pirofoszfát, 18,5 mM MOPS, 250 μM antipirilazo III, pH=7,0. A kellő mennyiségű Ca²⁺ felvételét elősegíti a Na-pirofoszfát, mely a vezikulába jutva a Ca²⁺ pufferelésében játszik szerepet. A töltés a Ca²⁺ kis adagjaival, fokozatosan történik, ameddig a TCV a későbbi Ca²⁺-felszabadulás detektálásához elegendő Ca²⁺-ot vesz fel. Miután a töltés megtörtént, a transzmittancia konstans értéken marad, ugyanis ekkor a vezikulából történő Ca²⁺-szivárgás, valamint a SERCA általi kompenzálás egyensúlyban van. A TCV feltöltése után vizsgálni kívánt vegyületet adjuk hozzá, majd mérjük a Ca²⁺-felszabadulást. A dantrolen hatásának vizsgálatához a mintához a preinkubációs fázis során 10 μM dantrolent adtunk a pufferhez, majd a RyR agonista 4-klór-meta krezol (4CMC, 400 μM) segítségével Ca²⁺-felszabadulást váltottunk ki.

IV/3. Single-channel árammérés sík lipid kettősrétegbe épített RyR-on

A RyR SR-beli elhelyezkedése miatt direkt elektrofiziológiai vizsgálata csak izolált csatornákon lehetséges. A szolubilizált RyR molekulákat ezért mesterséges lipid kettősrétegbe építjük és feszültség-clamp körülmények között mérjük a rajtuk keresztül folyó áramot. A lipid kettősréteget foszfatidil-etanolamin, foszfatidil-szerin és foszfatidil-kolin 5:4:1 tömegarányú keverékéből készítjük, majd n-dekánban 20 mg/ml lipidkoncentrációjúra oldjuk. A mesterséges membránt egy erre a célra tervezett küvetta 200 µm átmérőjű nyílásán hozzuk létre. Ehhez elsőként a nyílás peremét egy műanyagpálca segítségével lipidoldattal nedvesítjük, és hagyjuk megszáradni. A küvettát ezt követően behelyezzük a *17. ábrán* látható kamrába, majd mind a két oldalra mágneses keverőrudat helyezünk. A nyílás így két azonos térfogatú folyadékteret választ el, amelyekbe azonos összetételű (250 mM KCl, 100 µM EGTA, 150 µM CaCl₂, 10 mM HEPES, pH=7,2) oldatot teszünk. A módszer egyik előnye az, hogy ezen két szimmetrikus folyadéktér összetétele a mérés során tetszőlegesen változtatható. Az egyik oldalt *cisz* (citoplazmatikus), a másik oldalt *transz* (SR lumene felé néző) oldalnak nevezzük.



17. ábra. A mérőrendszer. A lipid kettősréteget egy 200 µm átmérőjű nyíláson hozzuk létre. A lipidkettősrétegbe épített egyedi RyR áramát Axopatch 200 erősítővel feszültség-clamp körülmények között mérjük. Az ábra alján a RyR1 reprezentatív árama látható. A csatorna a zárt és nyitott állapotok között kapuzik. A lefelé mutató áramtüskék a RyR1 megnyílásait jelzik.

Miután összeállítottuk a mérőrendszert (17. ábra), a membrán felfestése következik. A lipidfestés során egy műanyagpálcát használunk, amellyel lipidoldatot veszünk fel, majd a 200 µmes nyíláshoz érintjük. Ekkor a lipidréteg vastagsága több µm, de idővel magától kettősréteggé vékonyodik. Ezt a folyamatot a lipidfilmre ható hidrosztatikai nyomás indukálja, amely miatt a lipidréteg körül úgynevezett annuális fázis (vastag oldószer-lipid keverék) alakul ki. Az annuális fázis kialakulása miatt a középen elhelyezkedő lipid kettősréteg oldószertartalma csökken. A membrán alakulálását a következőképpen követjük nyomon. A lipid kettősréteg kondenzátorként viselkedik, azaz elektromos töltést tárol, amelynek kapacitása arányos a felületével. Így, ha egy háromszög-impulzust kapcsolunk rá (-5 – +5 mV), a kapacitív áram nagysága arányos lesz a lipid kettősréteg felszínével. A festés során folyamatosan ellenőrizzük a lipid membrán felületét. A lipid kettősréteg "nyúlása" a transzmembrán feszültség növelésével segíthető, az elektromos térerő ugyanis növeli az annuális fázis és membrán nyomását, utóbbiban méghozzá nagyságrendekkel jobban, ami elősegíti a lipidréteg megfelelően nagy felületűre való nyúlását. A megfelelő stabilitású és felületű membrán (I>100 pA kapacitív áramú) kialakulása a csatornabeépülés szempontjából kiemelkedően fontos. Miután kész vagyunk a membrán felfestésével, a RyR-szuszpenziót a cisz oldalra, a lipid kettősréteget megközelítve adjuk hozzá. A detergens-foszfolipid "úszógumival" ellátott RyRek az annuális-fázis lipidjébe ragadnak elsőként. A RyR lipid membránba való beépülésének elősegítéséhez intenzív keverést, valamint a membrán stabilitásától függően -300 - +300 mVos feszültséglépcsőket alkalmazunk. A hirtelen feszültségváltáskor a lipid kettősréteg felülete változik és az annulus-lipid membrán határán lévő csatornák nagyobb eséllyel jutnak a lipid kettősrétegbe. A membránt átszakadása esetén ismét felfestjük, majd a feszültség további változtatásával igyekszünk a RyR-t beépíteni. A csatorna beépülését az áramjel lépcsőzetes ingadozása jelzi. A RyR általában úgy épül be, hogy a cisz oldal felé néz a citoplazmatikus régiója, ekkor a negatív membránpotenciálok a fiziológiással megegyező ionáramot eredményeznek. Előfordulhat, hogy a csatorna beépülése fordított irányba történik, ekkor a mérést ennek megfelelően kell végezni. A csatorna orientációja a mérés végén beadott rianodin segítségével ellenőrizhető, ugyanis ennek kötőhelye a citoplazmatikus oldalon található, és kötődés esetén a RyR-t jellegzetes félvezető állapotban stabilizálja. Az ellenőrzés másik lehetősége a Ca²⁺-koncentráció változtatása, Mg²⁺ vagy ATP adása, ugyanis a csatorna aktivitását szabályozó Ca²⁺, Mg²⁺ és ATP kötőhelyek is a citoplazmatikus oldalon helyezkednek el. Méréseink során a töltéshordozó K⁺ volt, ezzel kiküszöbölve a csatornán a transzról a cisz oldalra jutó Ca²⁺ szabályozó szerepét. Mivel a lipid kettősréteg mindkét oldalán azonos ionösszetételű volt az oldat, az elektrokémiai gradiens fenntartását az Axopatch 200 erősítővel fenntartott +/- 60 mV nagyságú feszültségkülönbség biztosította. Minden új törzsoldat adagolását követően 1 percig intenzív keverést alkalmaztunk, majd 3 percet vártunk a steady-state állapot kialakulásáig. A továbbiakban 5 percig rögzítettük a csatornán átfolyó ionáramot. Az Axopatch 200 erősítővel létrehozott, feszültség-clamp körülmények között kapott áramjeleket 1 kHz-es frekvencián, 8 pólusú aluláteresztő szűrővel szűrtük, és 3 kHzen, pClamp 6.02 szoftverrel analóg-digitális konverzió után rögzítettük. A nyitvatartási valószínűség (P_o) értékek kiszámítása 3-5 perc hosszú reprezentatív szakaszokból történik. A nyitvatartási valószínűség megadja, hogy a csatorna a mérés hányad részében van nyitva. Nyitott állapotnak az tekinthető, amelynél az áramamplitúdó nagyobb, vagy egyenlő a maximális áramamplitúdó 50%-ánál.

IV/4. Western blot

A western blotra szánt minták fehérjekoncentráció meghatározása PierceTM BCA Protein Assay kittel (Thermo Scientific, 23225) történt a gyártó előírása szerint.

A fehérjekoncentráció meghatározást követően nem konvencionális módon (azaz nem ugyanannyi mennyiséget mindenből), hanem az alább részletezésre kerülő szempontokat

követve vittük fel a gélre a következő mintamennyiségeket: 1 µg kalmodulin, 120 µg SR mikroszóma frakció, 80 µg RyR1, 20 µg teljes vázizom homogenizátum. Az eltérő mintamennyiségek oka az volt, hogy a kísérletben nem a kalmodulin mintákban előforduló arányára voltunk kíváncsiak, hanem arra, hogy egyáltalán kimutatható-e.

A fehérjekoncentráció meghatározása után a következőképpen hajtottuk végre a kísérletet. A fehérje mintákat 7,5%-os SDS-poliakrilamid gélre vittük fel és 120 V-on 72 percig futtattuk. A gélekből kétféle antitesttel készült western blot a következők szerint. A fehérjék transzferálását nitrocellulóz membránra (1620115; Bio-Rad) 100 V-on, 60 percig végeztük. Ezt követte a blokkolási lépés, amelyet 2,5% tejporral kiegészített Tris-pufferelt sóoldatban (TBS, pH=7,5) történő inkubálással hajtottunk végre szobahőn, 60 percen keresztül. Ezt követte a membrán anti-kalmodulin antitesttel való kezelése (AB5494, Abcam). Az elsődleges antitesteket 0,1%-os tejporos TTBS (Tween 20-szal kiegészített TBS) oldatban hígítottuk (1:800) és egy éjszakán keresztül 4°C-on inkubáltuk. Másnap 3x10 percig mostuk a géleket TTBS oldattal, majd a másodlagos antitestel történő inkubáció következett (anti-mouse IgG, 1:5000X hígításban (A4416, Sigma)). Utóbbi hígítását szintén 0,1%-os tejporos TTBS oldatban végeztük el és 1 órán át, szobahőn inkubáltuk. Az antitest-kötést követően a membránokat 3x10 percig mostuk TTBS oldattal. Az előhívást Super Signal West Pico (Thermo Scientific, 34580X4) kemilumineszcens reagenssel végeztük.

A kemilumineszcens detektálás során a membránokat a gyártó utasításai szerint mostuk a kemilumineszcens reagenssel, majd a jel kimutatásához AGFA filmet használtunk, az expozíció után az előhíváshoz előhívő és fixáló oldatokban mostuk a röntgenfilmet.

A gélek blottolását, antitesttel való kezelését, és kemilumineszcens detektálást Dr. Mótyán János szerzőtársam végezte.

IV/5. Molekula modellezés

A koordinátafájlokat a Protein Data Bankból töltöttük le, és a PyMOL molekuláris grafikai rendszert (1.3. verzió; Schrödinger) használtuk a szerkezeti igazításhoz és a szerkezeti ábrák elkészítéséhez. Az N-terminális szolenoid (NSol) (590-609) és a junkcionális szolenoid (JSol) (1656-1672) hélixek relatív helyzetét a következő szerkezetek összehangolásával határoztuk meg: 5T9M, 5T15, 5T9V, 5TAX, 5TAS és 5TB1. A szerkezetelemzést Dr. Mótyán János szerzőtársam végezte.

IV/6. Az Eu³⁺-kötőhelyének vizsgálata in silico módszerekkel

Szerzőtársaim: Dr. Jacob Bauer és Dr. Vladena Bauerová-Hlinková a lehetséges luminális kötőhelyek azonosítására öt különböző módszert alkalmaztak. Ezek közé tartozott a Placevent és a Fold-X, amelyek biofizikai megfontolásokra támaszkodnak, a MIB, amely egy szerkezetet

hasonlít össze egy ismert kötőhelyeket tartalmazó sablonkönyvtárral, az IonCom, amely a szekvencia- és szerkezeti adatokat kombinálja, és a bindEmbed21, amely a kötőhelyeket az aminosav-szekvencia alapján keresi [138][139][140][141][142]. A szerkezeti információkon alapuló módszerek gyakran érzékenyek a bemeneti szerkezet adott konformációjára, emiatt hét különböző PDB struktúrát használtak bemeneti fájlként a Placevent, a Fold-X, a MIB és az IonCom számára: 3J8H, 5T15, 5GKY, 6M2W, 7TZC, 7TDI és 7T64 [143][144][145][146][147][148]. Ezeket a struktúrákat úgy választottuk ki, hogy reprezentatív mintát kapjunk a luminális oldalon elhelyezkedő hurkok lehetséges konformációs helyzetéről. Az elemzés során csak a csatornák luminális oldalát vettük figyelembe; ez a rész mind a négy monomerből a 4561-4663 és 4824-4935 aminosavat tartalmazza. Annak érdekében, hogy a szoftverek az egyedi láncok helyett a teljes struktúrát vegyék figyelembe, a négy különálló láncot egyetlen lánccá olvasztották össze az elemzéshez. Ezeket a struktúrákat közvetlenül a MIB webszerver (http://bioinfo.cmu.edu.tw/MIB/), valamint az IonCom és a Fold-X használták. A Placevent futtatásához először az AmberTools22 rism1d és rism3d programjaiban megvalósított integrálegyenlet-alapú referencia interakciós helyek modelljét (RISM) futatták le a korrelációk létrehozásához, majd a helyeket magával a Placeventtel jósolták meg [149]. Az Eu³⁺ paramétereket a RISM számításokhoz a Li és munkatársai által közölt, "Parameterization of highly charged metal ions using the 12-6-4 LJ-type nonbonded model in explicit water." című tanulmányából vették át [150].

IV/7. Az adatok statisztikai elemzése

A RyR-ek nyitvatartási valószínűségét (P_o) a pClamp szoftvercsomag (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) segítségével határoztuk meg. Megnyílásnak azokat az eseményeket tekintettük, ahol az amplitúdó a maximális áramaplitúdó 50±2,5%-nál nagyobb volt.

A statisztikai elemzést Origin 7.0 (OriginLab, Northampton, MA) és Excel 2021 (Microsoft, Redmond, WA) programban végeztük. Az eredményeket átlag ± SE-ben fejeztük ki. A relatív P_o adatokat úgy számoltuk ki, hogy minden adatpontkészletet a saját kontrolljukhoz normalizáltunk. A különbségek statisztikai szignifikanciáját egyirányú ANOVA-val értékeltük. Posthoc tesztként Tukey hsd tesztet végeztünk. Egyes adatok összehasonlítására független kétmintás t-próbát alkalmaztunk. Szignifikáns eltérésnek a p<0,05 értéket tekintettük.

IV/8. Kísérleti állatok

Minden kísérlet megfelelt a magyar állatjóléti törvénynek, az Európai Unió 2010/63/EU irányelvének, és a Debreceni Egyetem Állatjóléti Bizottsága is jóváhagyta azok elvégzését (22/2012/DEMÁB). A nyulakat (~4 kg testtömegű, 6-10 hónapos hímek, n=4) guillotine segítségével ölték le. A *musculus longissimus dorsi*-t kipreparálását követően 50 g-os

alikvotokban fagyasztottuk. Ezen alikvotok felhasználásával háromszor készítettünk terminális ciszterna vezikulákat, és ötször tisztítottunk RyR-csatornákat.

A RyR2-t kutya kamrai szívizomból tisztítottuk (n=5). A felnőtt beagle kutyákat 10 mg/kg ketamin-hidroklorid (Calypsol, Richter Gedeon, Magyarország) +1 mg/kg xilazin-hidroklorid (Sedaxylan, Eurovet Animal Health BV, Hollandia) i.m. injekcióval altatták a helyi állatgondozási bizottságok által jóváhagyott protokoll szerint (9/2015/DEMÁB).

Kísérleteinkben transzgenikus C57Bl/6 egerek is részt vettek, amelyek a RyR1 gén Y524S mutációját hordozták (n=20). Ez a mutáció megfelel a humán Y522S mutációnak, és széleskörben alkalmazott modellje a betegségnek. Mivel a homozigóta egerek méhen belüli életük korai szakaszában elpusztulnak, heterozigóta Y524S egereket használtunk. Kontrollként vad típusú alomtestvéreket választottunk (n=18). Az egereket CO₂-inhalációval altattuk, amelyet nyaki diszlokáció követett.

A foszfolipideket az Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL) cégtől szereztük be. Minden más vegyszert – ha nincs külön jelölve – a Sigma-Aldrich-tól (St. Louis, MO) szereztünk be.

V. EREDMÉNYEK

V/1. A RyR szabályozása a luminális [Ca²⁺] által

Elsőként a RyR-ek luminális Ca²⁺ általi szabályozásáról nyert eredményeinket szeretném bemutatni. A RyR2 SR felőli szabályozására vonatkozó ismeretek az irodalomban konzisztensek, ezért a RyR1-gyel végzett kísérleteink validálását arra alapoztuk, hogy a mi kísérleti elrendezésünkben sikerül-e reprodukálnunk a RyR2-re vonatkozó eredményeket. Az *18. ábra* első fele a RyR1 (*nyúl*)- és RyR2 (*kutya*)-csatornák reprezentatív áramgörbéit mutatja az aktiváló Ca²⁺-kötőhelyeket telítő citoplazmatikus (*cisz*) [Ca²⁺] (50 μM - RyR1 és 5 μM - RyR2) mellett. A luminális [Ca²⁺] növelésével a RyR1 erősen gátolt (*18/A ábra*), míg a RyR2-n folyó áramot nem befolyásolta a luminálisan (*lum*) növelt [Ca²⁺] (*18/B ábra*) telítő citoplazmatikus [Ca²⁺] mellett. A [Ca²⁺]_{lum} millimólos tartományában a RyR1 single-channel áram amplitúdója jelentősen csökkent, ami azt jelzi, hogy a K⁺ mellett a Ca²⁺] növelése a várakozásoknak megfelelően aktiválta a RyR2-re vonatkozó mérési eredmények megegyeznek a korábban publikált adatokkal, és a RyR1 adatok is összhangban vannak néhány korábban publikált eredménnyel [31][33][45][47].



18. ábra. A luminális Ca²⁺ aktiválja a RyR2-t (kutya), de gátolja a RyR1-et (nyúl). (A), (B), (C), (D) A bal oldalon a RyR1- vagy RyR2-csatornák reprezentatív áramai láthatóak. A mérési körülmények, a citoplazmatikus (cisz) és luminális (lum) Ca²⁺-koncentrációk a fejlécben vannak feltüntetve. A csatornák zárt állapotát "z"-vel jelöljük. A csatorna megnyílásait lefelé mutató áramkitérések jelzik. A jobb felső sarkokban a P_o értékek vannak feltüntetve. A luminális Ca²⁺-koncentráció ([Ca²⁺]_{lum}) függvényében ábrázolt relatív nyitvatartási valószínűségek (P_o) megfelelő átlag±SE értékei jobb oldalon láthatók. (n=5-7 (A), n=3-6 (B), n=3 (C), n=5-19 (D)). Az értékek a kontrollhoz (50 µM/100 nM cisz Ca²⁺ - RyR1, 5 µM/100 nM cisz Ca²⁺ - RyR2) viszonyítva vannak kifejezve.

Ezek az eredmények felvetik azt a kérdést, hogy miért eltérőek a RyR1 és a RyR2 válaszai. Az egyik lehetséges ok az, hogy a luminálisan növelt Ca²⁺ a grádiense mentén átjut a RyR1 pórusán, és kölcsönhatásba lép a citoszólikus, gátló Ca²⁺-kötőhellyel (az aktiváló kötőhely nem elérhető, mert 50 µM Ca2+-nal telített), ahogy azt Meissner korábban javasolta [31]. Ha ez igaz, akkor a RyR2 citoplazmatikus gátló kötőhelyének alacsonyabb affinitása miatt lenne az, ami miatt a RyR2 nem gátlódik. Ezt a "feed-through gátlás" hipotézist alátámasztja az a tény, hogy a luminális Ca²⁺ gátló hatása a RyR1-re rendkívül feszültségfüggő volt, és a negatív membránpotenciálokat preferálta. Ezek a feszültségek a luminális kationokat a póruson keresztül a túloldalra kényszerítik (19/A ábra). Ennek megfelelően a luminális [Ca²⁺] növelésének aktiválnia kellene a RyR1-et, ha a citoplazmatikus kötőhelyek telítetlenek (feedthrough aktiváció). Meglepő módon azonban a magas luminális [Ca²⁺] 100 nM citoplazmatikus Ca²⁺ mellett sem fokozta a RyR1 aktivitását semmilyen negatív membránpotenciálon. Ez az eredmény azt jelzi, hogy kísérleti körülményeink között a Ca²⁺ áram nem volt elég jelentős ahhoz, hogy befolyásolja a citoplazmatikus Ca²⁺-kötőhelyeket, legalábbis a RyR1-ben. Így ezek az adatok cáfolni látszanak a Meissner által javasolt "feed-through gátlás" hipotézist, és arra utalnak, hogy a luminális Ca²⁺ általi gátlás közvetlenül egy vagy több luminális Ca²⁺kötőhelyen keresztül valósul meg. Ebben az esetben a gátlás szélsőséges feszültségfüggése arra utal, hogy a kötőhely a csatorna pórusában, az elektromos erőtérben található, ahol a feszültség esik.



19. ábra. **A luminális Ca²⁺ feszültségfüggő hatása.** (A) A RyR1 (nyúl) reprezentatív egycsatornás áramai, amelyeket +60 (balra) és -60 mV-on (jobbra) rögzítettünk. A felső áramgörbéket kontroll körülmények között, 50 μM citoplazmatikus és luminális Ca²⁺ mellett rögzítettük. Az alsó áramgörbéket 50 μM cisz és 1 mM lum Ca²⁺ mellett vettük fel. A zárt állapotot "z"-vel jelöltük. (B) A relatív P₀% értékeket (P₀ 1 mM lum / P₀ 50 μM lum)-100-ban fejezzük ki, és a membránpotenciál függvényében ábrázoljuk (n=7). Az alsó ábra a Ca²⁺ hajtóerő által irányított mozgását ábrázolja ±60 mV-nál. A különbségek statisztikai szignifikanciájának megállapításárafüggetlen kétmintás t-próbát alkalmaztunk (*p<0,05).

V/2. Egy új eszköz a luminális Ca²⁺-kötőhelyek szelektív vizsgálatára

Annak a hipotézisnek a teszteléséhez, hogy a RyR1 valódi gátló Ca²⁺-kötőhelyet hordoz a fehérje luminális oldalán, és hogy elkerüljük a "visszaáramlási, feed-through" hatásokat, olyan kutatási eszközt kell választanunk, amellyel szelektíven vizsgálhatjuk a feltételezett luminális kötőhelyet. Kutatócsoportunk korábban már kimutatta, hogy az Eu³⁺ a RyR1 citoplazmatikus Ca²⁺-kötőhelyeinek specifikus és erős agonistája, valamint a póruson átjutni képtelen [22]. Ezeket a tulajdonságokat kihasználva a következő kísérletekben megvizsgáltuk az Eu³⁺ hatását, hogy kiderítsük, vajon az Eu³⁺ a luminális Ca²⁺-kötőhelynek is agonistája-e. Először a citoplazmatikus [Ca²⁺]-t 50 µM-ra állítottuk, és Eu³⁺-t adtunk a RyR1 (*nyúl*) luminális oldalára. A luminális Eu³⁺ jelentősen gátolta a RyR1 aktivitását, méghozzá koncentrációfüggő módon, 4,7 µM-os IC₅₀ értékkel (*20/A, B ábra*).

Α



20. ábra. A luminálisan alkalmazott Eu³⁺ gátolja a RyR1-et (nyúl) míg, a RyR2 (kutya) aktivitása bifázikus függést mutat. (A) A RyR1 reprezentatív áramfelvételei, amelyeket 50 µM citoplazmatikus és luminális [Ca2+] mellett és az ábrán látható [Eu3+] jelenlétében rögzítettünk. A csatorna zárt állapotát a "z" jelöli. A lefelé irányuló kitérések csatornanyitásokat jelentenek. A kalibrációs vonalak alul láthatóak. (B) A relatív Po átlagok (±SE). Az Eu3+ kezelt RyR1-ekből kapott Po értékeket a kontroll (kezeletlen) értékekre normalizáltuk, és a luminális Eu³⁺ koncentráció ([Eu³⁺]_{lum}) függvényében ábrázoltuk (n=4-19). (C) A RyR1 reprezentatív áramfelvételei, amelyeket 100 nM citoplazmatikus [Ca²⁺] mellett rögzítettünk kontroll körülmények között és Eu³⁺ kezelést követően. (D) A relatív Po-k átlagértékei. A Po értékeket a kontroll értékekre normalizáltuk 2 mM koffein hiányában (fehér négyzetek – Ø koffein) vagy jelenlétében (fekete gömbök – 2 mM koffein) (n=3-11 és n=4). (E) A RyR2 reprezentatív single-channel áramai, amelyeket 100 nM citoplazmatikus Ca²⁺ mellett és Eu³⁺ kezeléskor rögzítettünk. A csatorna zárt állapotát "z" jelöli. (F) A relatív P_o-k átlagértékei. A P_o értékeket a kontroll értékekre normalizáltuk (n=5).

Az Eu³⁺-t a pórusba kényszerítő, negatív membránpotenciálok (fiziológiás áramirány) esetén a RyR1 minőségileg eltérő állapotát is megfigyeltük, különösen az ion magas koncentrációjánál, ugyanis az Eu³⁺ kezelés során hirtelen egy hosszan tartó zárt állapot jelent meg, ami arra utal, hogy az ion elzárta a csatorna pórusát. Ezt a hatást csak \geq 5 µM Eu³⁺ esetén és negatív membránpotenciálokon tapasztaltuk. A blokkot az Eu³⁺ EGTA-val történő kelálása megszüntette *(21/A ábra)*, viszont olykor nem volt visszafordítható. Az EGTA hatásának hosszú (néhány másodperces) látenciája azt jelezte, hogy az Eu³⁺ erősen kötődött a RyR pórusán belül, tartós fizikai elzáródást okozva, ahogyan arról korábban az L-típusú Ca²⁺csatornák esetében is beszámoltak [151]. A RyR-ek vezetőképessége kontroll körülmények között ~800 pS volt és nem változott Eu³⁺ hatására *(21/B ábra)*. Ezek az adatok arra utalnak, hogy az Eu³⁺ nem képes áthatolni a csatornán, és ezért képtelen elérni a citoszólikus kötőhelyeket. Ezen kívül az Eu³⁺ és a Ca²⁺ hatásai közötti analógia közvetett bizonyítékot szolgáltat arra, hogy az Eu³⁺ a luminális Ca²⁺-kötőhelyek agonistája.



21. ábra. **Magas koncentrációban alkalmazott Eu³⁺ elzárja a RyR1 (nyúl) pórusát.** (A) A RyR1 10 μM Eu³⁺ jelenlétében időnként, de tartósan bezáródik, amit az Eu³⁺ ekvimoláris EGTA-val történő kelálása ~15 másodperc alatt megszüntet. (B) A vizsgált csatornák konduktanciája nem változik Eu³⁺ jelenlétében, ami szintén alátámasztja, hogy az Eu³⁺ számára nem permeábilis a csatorna (n=13).

A következő kísérletsorozatban többet szerettünk volna megtudni a RyR1 és RyR2 feltételezett luminális Ca²⁺-kötőhelyeinek működéséről, ezért a luminális Eu³⁺ hatását alacsony (nem telítő) citoplazmatikus [Ca²⁺] mellett vizsgáltuk. Először a citoplazmatikus [Ca²⁺]-ot 100 nM-ra állítottuk be és a csatorna luminális oldalára Eu³⁺-t adtunk. A luminális Eu³⁺ ebben az esetben is gátolta a RyR1 aktivitást *(20/C, D ábra)*. Mivel egyes kutatók arról számoltak be, hogy a luminális Ca²⁺ csak akkor aktiválja a RyR-t, ha a csatornát koffeinnel előkezelik, 2 mM koffein jelenlétében is elvégeztünk néhány kísérletet, de az Eu³⁺ gátló hatása ebben az esetben csak még nyilvánvalóbb volt *(20/D ábra)*. Összefoglalva tehát, a citoplazmatikus és luminális Ca²⁺ és Eu³⁺ (és a koffein) semmilyen koncentrációja és kombinációja nem aktiválta a RyR1-et, és az Eu³⁺ még erősebben gátolta a csatornát 100 nM citoplazmatikus Ca²⁺ esetén, amikor a P_o jelentősen alacsonyabb volt, mint 50 μ M cisz Ca²⁺ esetén.

Hasonló körülmények között RyR2-vel is végeztünk kísérleteket, amelyek azt mutatták, hogy az Eu³⁺ hatása kétfázisú: szubmikromoláris koncentrációban aktiválta a RyR2-t, de magasabb koncentrációban gátolta *(20/E, F ábra)*. Ezek az eredmények egyértelműen azt mutatják, hogy Ca²⁺ és Eu³⁺ általi szabályozás RyR1 és RyR2 tekintetében minőségileg hasonló, ami arra utal, hogy mind a RyR1, mind a RyR2 valódi luminális Ca²⁺-kötőhelyeket hordoz, de ezek a helyek a két izoformában ellentétes módon működnek. Emellett az a tény, hogy az Eu³⁺ hatása analóg volt a Ca²⁺ hatásával mind a RyR1-ben, mind a RyR2-ben, bizonyítékot szolgáltat arra, hogy a Ca²⁺ és az Eu³⁺ egyenértékű ligandumai a Ca²⁺-kötőhelyeknek. Így ezek az eredmények validálják a kísérleti megközelítésünket.

A luminális Ca²⁺ RyR1-re gyakorolt hatásának fent említett feszültségfüggése felveti a kérdést, hogy vajon az Eu³⁺ hatása is hasonlóan feszültségfüggő-e. A 22/A ábrán példákat mutatok a 8 µM Eu³⁺ jelenlétében, vagy hiányában +/- 60 mV-on felvett RyR-áramokra. A 22/B ábrán a P_o átlagok láthatóak különböző membránpotenciálokon, 50 µM citoplazmatikus Ca²⁺ mellett. Ezek az adatok azt mutatják, hogy az Eu³⁺ gátló hatása feszültségfüggő, a negatív feszültségeket preferálja, amelyek az Eu3+-t a csatorna pórusába hajtják (lásd a 22/B ábra sematikus rajzai). Pozitív membránpotenciálok esetén a gátlás gyengébb és a hajtóerő csökkenése +20 és +120 mV között fokozatosan gyengülő gátlással járt együtt. Az Eu³⁺ hatása alacsony (100 nM) citoplazmatikus [Ca²⁺] esetén is feszültségfüggő volt, a gátlás -60 mV-nál lényegesen erősebb volt, mint +60 mV-nál. Ezt mutatja a 22/C és D ábra. Az Eu³⁺ kezelés során különböző membránpotenciálok mellett mért Po-kat normalizáltuk az azonos, de kezeletlen csatornák megfelelő feszültségen mért P₀-jára és a P₀ változásának százalékában fejeztük ki. Az Eu³⁺ RyR2-re gyakorolt aktiváló hatásának feszültségfüggését 100 nM citoplazmatikus Ca²⁺ mellett is elemeztük. Amint a 22/E és F ábrán látható, a RyR2 Eu³⁺ általi aktiválása a membránpotenciáltól független volt, mivel -40 és +40 mV-on egyaránt körülbelül kétszeres P_o növekedés figyelhető meg. Mivel a RyR az Eu³⁺ számára impermeábilis, a RyR1 feszültségfüggő gátlása nem lehetett a csatornán keresztüli átáramlás (feed-through) következménye. Ezek a feszültségfüggést leíró eredmények tehát arra utalnak, hogy a RyR1 és RyR2 luminális oldali gátlásáért felelős Ca2+-kötőhelyek elektromos erőtérben, a csatorna pórusában helyezkednek el, míg a RyR2 aktiváló kötőhelyének a csatorna pórusának elektromos mezején kívül kell lennie.



22. άbra. **A luminális [Eu³⁺] feszültségfüggése.** (A), (C) A RyR1 (nyúl) reprezentatív single-channel áramfelvételei, amelyeket +60 (fent) és -60 mV-on (lent) rögzítettünk a jelzett ionkoncentrációk (50 μM és 100 nM Ca²⁺) mellett. Az alsó áramjeleket azt követően rögzítettük, hogy Eu³⁺-t adtunk ugyanannak a csatornának a luminális oldalához a jelzett koncentrációkban. A csatornák zárt állapotát "z" jelzi. (B) A P_o átlagok±SE 8 μM Eu³⁺ mellett a membránpotenciál függvényében ábrázolva. A mellékelt rajz az Eu³⁺ mozgás irányát mutatja negatív membránpotenciálok esetén (n=5). (E) +40 és -40 mV-on rögzített reprezentatív RyR2 (kutya) áramok. A Ca²⁺ és Eu³⁺ koncentrációk és a P_o értékek a fejlécben vannak feltüntetve. (D), (F) A relatív P_o értékeket (P_o 1 mM lum / P_o 50 μM lum)-100-ban fejeztük ki. Az átlag±SE értékeket a membránpotenciál függvényében ábrázoltuk (n=3 és n=3). A különbségek statisztikai szignifikanciájának megállapítására független kétmintás t-próbát alkalmaztunk (*p<0,05, n.s.=nem szignifikáns).

V/3. Az Y524S MHS-RyR1 szabályozása a luminális oldal felől

Eddigi eredményeink, miszerint a luminális Ca²⁺ és az Eu³⁺ gátolja a RyR1 működését, nem támasztják alá az MHS korábban javasolt molekuláris mechanizmusát (azaz, hogy a csökkent SOICR küszöbérték felelős a malignus hipertermia kialakulásáért). Elméletileg azonban a luminális Ca²⁺ által kiváltott Ca²⁺-felszabadulás az MHS vázizomzatban is előfordulhat, ha a luminális Ca²⁺ gátlás gyengébb az MHS-RyR1-ben, mint a vad típusban. Ezt a lehetőséget egér Y524S MHS-RyR1-ekkel teszteltük, és az eredményeket a 23. ábra mutatja be. A kísérleti elrendezés ugyanaz volt, mint korábban: először a citoplazmatikus [Ca²⁺]-t 50 µM (telítő) vagy 100 nM (nem telítő) Ca²⁺-ra állítottuk be, majd ezt követően módosítottuk a luminális [Ca²⁺]-t. Kontroll körülmények között az MHS csatornák P_o értéke 100 nM citoplazmatikus Ca²⁺ esetén szignifikánsan magasabb volt, mint a vad típusú (wt) csatornák P_o értéke, ahogy az az MHS fenotípustól várható (P_o wt 100 nM=0,0031±0,001 (n=5), P_o MHS 100 nM=0,02±0,007 (n=13) [152][153]. Az eredmények összhangban voltak az 18/A és D ábrán bemutatott adatokkal, vagyis az Y524S MHS-RyR1-et a luminális Ca2+ ugyanúgy gátolta, mint a vad típust (23/A,B ábra). A 23/B ábrán látható két adatsor statisztikailag nem különbözött egymástól. Hangsúlyoznunk kell, hogy 100 nM citoplazmatikus Ca²⁺ esetén is erős gátlást figyeltünk meg a luminális Ca²⁺ részéről, 5 mM Ca²⁺ felett pedig egy nagyon enyhe aktiválódás volt megfigyelhető, ami azt jelzi, hogy a Ca²⁺ fluxus általi önaktiválódás csak kis mértékben volt jelen kísérleteinkben (annak ellenére, hogy az MHS-RyR1 nagyobb érzékenységet mutat a citoplazmatikus Ca²⁺-ra) (23/C, D ábra).



23. ábra. **Az MHS-RyR1-et (egér) gátolja a luminális Ca²⁺**. (A) (C) Az Y524S MHS-RyR1 single-channel áramfelvételei, amelyeket 50 μM vagy 100 nM citoplazmatikus és különböző luminális Ca²⁺ koncentrációk mellett rögzítettünk. A csatornák zárt állapotát "z" -vel jelöljük. (B) Az értékeket a kontrollhoz viszonyítva fejeztük ki. A vad típusú RyR1 (egér, fehér gömbök) és az Y524S MHS-RyR1 (fekete négyzetek) 50 μM citoplazmatikus Ca²⁺ mellett rögzített átlagos relatív P_o±SE értékeit a luminális Ca²⁺ koncentráció függvényében ábrázoltuk (n=5-7 és n=6-8). (D) Az Y524S MHS-RyR1 100 nM cisz Ca²⁺ mellett rögzített Y524S relatív Po±SE átlaga a luminális Ca²⁺ koncentráció függvényében ábrázolva (n=4-22).

Az MHS-RyR1 Eu³⁺ általi gátlása hasonló mértékű volt a vad típusú csatornákéhoz mindkét (50 μM és 100 nM) citoplazmatikus [Ca²⁺]-nál *(24. ábra)*. Ezek az adatok a korábban publikált következtetések ellen szólnak, miszerint a SOICR iránti fokozott érzékenység releváns patomechanizmus lenne MHS-ben [44].



24. ábra. **Az MHS-RyR1-et (egér) gátolja a luminális Eu³⁺.** (A) (C) Y524S MHS-RyR1 single-channel áramai, amelyeket 50 µM vagy 100 nM citoplazmatikus Ca²⁺ és különböző koncentrációjú luminális Eu³⁺ mellett rögzítettünk. A zárt állapotokat itt is "z"-vel jelöltük. A RyR megnyílásait lefelé irányuló áramkitérések jelölik. (B) A vad típusú RyR1 (egér, fehér gömbök) és az Y524S MHS-RyR1 (fekete négyzetek) 50 µM citoplazmatikus (cisz) Ca²⁺ mellett rögzített átlagos relatív P₀±SE értékeit a luminális Eu³⁺ koncentráció függvényében ábrázoltuk (n=4-19 és (n=6-8). (D) Az Y524S MHS-RyR1 100 nM citoplazmatikus Ca²⁺ mellett mért átlagos relatív P₀±SE értékek a luminális Eu³⁺ koncentráció függvényében ábrázolva (n=3-8).

V/4. A dantrolen hatásmechanizmusának nyomában

A következő problémakör, amivel foglalkoztunk, a dantrolen hatása volt.

A dantrolen az egyedüli szer az MHS kezelésre, viszont a megfelelő alkalmazás ellenére is az MHS esetek 5%-a halállal végződik. Emiatt a terápiás hatékonyság javítása fontos feladat, amely nem végezhető el a gyógyszerhatás ideális feltételeinek meghatározása nélkül. Ezt az azonosítási folyamatot hátráltatja a dantrolen hatásmechanizmusára vonatkozó ismereteink hiánya, amely elsősorban az irodalomban fellelhető ellentmondásos adatokból ered [116][117][118]. Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy a gyógyszer gátolja a Ca²⁺-felszabadulást az intakt vázizomrostokból és az SR vezikulákból is, de nem gátolja az egyedi RyR1-csatornák áramát [116]. Ezért arra a következtetésre jutottunk, hogy a dantrolen hatásának egy fontos tényezője elvész a RyR tisztítási eljárás során. [119][134]. A dantrolen hatásmechanizmusának feltárásához próbáltuk azonosítani a RyR gátlásához szükséges hiányzó tényező(ke)t.

V/5. A dantrolen és a magnézium Ca²⁺-felszabadulásra gyakorolt hatása

Először Ca²⁺-felszabadulási kísérleteket végeztünk nyúl vázizomból izolált SR terminális ciszterna vezikulákon. Ezek a vezikulák RyR1-eket és SERCA pumpákat is tartalmaztak, ami lehetőséget nyújt arra, hogy aktívan, a SERCA pumpa segítségével töltsük fel őket Ca²⁺-nal, majd a RyR1-eket aktiválva Ca²⁺-felszabadulást váltsunk ki belőlük, és így vizsgáljuk a dantrolen Ca²⁺-felszabadulásra gyakorolt hatását.

Az SR vezikulákat elsőként 1 mM Mg²⁺ és 0,5 mM ATP tartalmú pufferben szuszpendáltuk. Méréseink során az extravezikuláris oldat Ca²⁺-koncentrációját Ca²⁺-érzékeny festék (antipirilazo III) segítségével, spektrofotometriásan követtük nyomon. Négy alkalommal Ca²⁺-t injektáltunk az oldatba, ekkor a festék transzmittanciája hirtelen lecsökkent. Ezután, a SERCA pumpa tevékenysége miatt a vezikula felvette a Ca²⁺-t, amit a transzmittancia fokozatos növekedése mutat. Miután a töltés megtörtént, a transzmittancia konstans értéken maradt, ugyanis ekkor a vezikulából történő spontán Ca²⁺-szivárgás és a SERCA pumpa általi Ca²⁺ felvétel egyensúlyban van. Ezután a feltöltött terminális ciszterna vezikulákból RyR agonistával (4CMC) Ca²⁺-felszabadulást váltottunk ki. A kísérletet 10 μ M dantrolen jelenlétében is megismételtük és azt tapasztaltuk, hogy a Ca²⁺-felszabadulás átlagosan 26 másodperc késéssel történt meg. A következőkben a puffer Mg²⁺-koncentrációját 3 mM-ra emeltük, ami kontroll körülmények között önmagában is átlagosan 108 másodperc késést okozott. 10 μ M dantrolennel való kezelés esetén azonban 3 mM Mg²⁺ mellett közel hétszer hosszabb késést (180 s) tapasztaltunk, mint 1 mM Mg²⁺ és 10 μ M dantrolen esetén (*25. ábra*).

Mindemellett a Ca²⁺-felszabadulás sebessége 3 mM Mg²⁺ jelenlétében szignifikánsan alacsonyabb volt, mint 1 mM Mg²⁺ esetén (2,04±0,08 vs. 0,9±0,07 nmol Ca²⁺/s, n=3-4), míg a

dantrolen csak kis mértékben csökkentette a felszabadulás sebességét (2,04±0,08 vs. 1,4±0,22 nmol Ca²⁺/s 1 mM Mg²⁺ mellett, és 0,9±0,07 vs. 0,73±0,03 nmol Ca²⁺/s 3 mM Mg²⁺ esetén). A dantrolen által okozott 180 másodperces késés 3 mM Mg²⁺ jelenlétében azt jelzi, hogy a dantrolen és a Mg²⁺ RyR1-re gyakorolt szuppresszív hatásai potencírozzák egymást.



25. ábra. A dantrolen és magnézium Ca²⁺-felszabadulásra gyakorolt hatása. 0,5 mM ATP és 1 mM Mg²⁺ jelenléte esetén a 4CMC adása után (fekete háromszög) azonnali Ca²⁺-felszabadulást tapasztaltunk. 1 mM Mg²⁺ és 10 μM dantrolen jelenléte esetén jelentős késést tapasztaltunk (a dantrolen hozzáadását fehér háromszög jelöli). A puffer Mg²⁺ koncentrációjának 3 mM-ra való emelése önmagában is átlagosan 108 másodperc késést okozott, azonban amikor a kísérletet 10 μM dantrolen jelenlétében ismételtük, közel tízszer hosszabb késést tapasztaltünk, mint a 1 mM Mg²⁺-nal és 10 μM dantrolennel végzett mérésekkor (n=3-4). A normalizálás a RyR1 agonista (4CMC) beadást megelőző szakasz 10 pontjának az átlagára történt, ezért indul 1-nél magasabb szintről a mérési görbe. Ezt minden mérésnél az adott vezikula, saját Ca²⁺-felszabadítását megelőző szakaszára számítottuk.

V/6. A dantrolen hatáshoz ATP is szükséges

Az, hogy a dantrolen a Ca²⁺-felszabadulás sebességét jelentősen nem csökkentette, hanem késleltette, arra utal, hogy a dantrolen mindaddig, ameddig ATP volt jelen a pufferben, képes volt maximális gátló hatását kifejteni. Úgy gondoljuk, hogy amikor a SERCA a vezikulákból történő Ca²⁺-szivárgás kompenzálására felhasználta az összes ATP-t, a dantrolen elvesztette gátló hatását és ekkor kezdődhetett meg a Ca²⁺-felszabadulás. A hipotézis ellenőrzésére a dantrolen hatását különböző ATP koncentrációk mellett is teszteltük.

Kontroll körülmények között 0,5 mM ATP-t és 1 mM Mg²⁺-t használtunk, és a 4CMC adása után azonnali Ca²⁺-felszabadulást tapasztaltunk. A dantrolen jelentősen késleltette a 4CMCvel kiváltott Ca²⁺-felszabadulást. Ugyanezt a kísérletet megismételve magasabb ATP koncentráció mellett (1,5 mM) a dantrolen átlagosan 158 másodperccel hosszabb késést okozott. Az ATP koncentráció megemelése azonban önmagában nem okozott késést a Ca²⁺-felszabadulásban (*26. ábra*).



26. ábra. **A dantrolen hatáshoz ATP is szükséges.** Az ATP koncentráció emelése (1,5 mM) és 10 μM dantrolen adása esetén jelentősen hosszabb késést tapasztaltunk, mint 0,5 mM ATP és 10 μM dantrolen jelenlétekor. Az ATP koncentráció emelése önmagában nem okozott jelentős változást a Ca²⁺-felszabadulásban (n=4). A normalizálás a RyR1 agonista (4CMC) beadást megelőző szakasz 10 pontjának az átlagára történt.

V/7. Háttér Ca²⁺-szivárgás mérése TC vezikulákból

A dantrolen által késleltetett Ca²⁺-felszabadulás egy másik magyarázataként szolgálhatna az, ha a RyR1-eken keresztüli spontán Ca²⁺-szivárgás jelentős lenne a mérés során (a dantrolen és a 4CMC beadása közötti időszakban), mivel ebben az esetben a SERCA pumpa folyamatos kompenzációs tevékenysége miatt jelentős ATP fogyás következne be. Ekkor a dantrolenes kísérletekben a háttérszivárgás gátlásával jelentős mennyiségű ATP-t takarítanánk meg. Következésképpen a SERCA hosszabb ideig lenne képes megakadályozni a 4CMC-vel kiváltott Ca²⁺-felszabadulást. Ezt a lehetőséget az SR vezikulákból történő nyugalmi szivárgás meghatározásával teszteltük, amihez egy SERCA pumpa inhibitort, thapsigargint használtunk 20 µM koncentrációban. Miután beadtuk a SERCA inhibitort, csak nagyon lassú spontán Ca²⁺felszabadulást tapasztaltunk a vezikulákból *(27. ábra)*.



27. ábra. **Spontán Ca²⁺-szivárgás a TC vezikulákból.** A háttér Ca²⁺-szivárgás ellenőrzésére 20 μM thapsigarginnal gátoltuk a SERCA pumpa működését (szürke háromszög) (n=4). A kísérlet végén, a vezikulafunkció integritásának ellenőrzéséhez 4CMC-t adtunk (fekete háromszög). A normalizálás a RyR1 agonista (4CMC) beadást megelőző szakasz 10 pontjának az átlagára történt.

Egy másik kísérletsorozatban a Ca²⁺-nal feltöltött vezikulákat kezeletlenül hagytuk és 25 percen keresztül végeztünk mérést. Ebben az esetben 25 percnél hosszabb idő után sem volt spontán Ca²⁺-felszabadulás megfigyelhető, ami arra utal, hogy a SERCA képes volt kompenzálni a bazális Ca²⁺-szivárgást, így a közegből ez idő alatt sem fogyott ki az ATP *(28.ábra)*.



28. ábra. **Spontán Ca²⁺-szivárgás ellenőrzése kezeletlen TC vezikulákból.** Thapsigargin kezelés nélkül több, mint 25 percig nem tapasztaltunk spontán Ca²⁺-felszabadulást (n=4). A kísérlet végén, a vezikulafunkció integritásának ellenőrzéséhez 4CMC-t adtunk (fekete háromszög). A normalizálás a RyR1 agonista (4CMC) beadást megelőző szakasz 10 pontjának az átlagára történt.

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az ATP fogyás a vezikulák dantrolennel való inkubálása (azaz a 4CMC hozzáadása előtti 60 másodperc) alatt elhanyagolható, legalábbis ahhoz a mennyiséghez viszonyítva, amit a töltéshez használtunk. Így a jelentős ATP fogyás lehetősége miatt felmerülő alternatív hipotézist elvetettük. Ezek a mérések azt igazolják, hogy a dantrolen RyR1-re kifejtett hatásához ATP jelenlétére is szükség van.

Hasonló kísérleteket (0,5 mM ATP és 1 mM Mg²⁺ mellett) kutya szívizomból izolált SR vezikulákon is végeztünk, de nem sikerült reprodukálnunk a vázizom SR vezikulákon kapott eredményeket *(29. ábra)*, ami összhangban van azzal, hogy a dantrolen RyR1 szelektív gátlószer.



29. ábra. A dantrolen hatásának ellenőrzése kutya szívizom SR vezikulákon Mg²⁺ és ATP jelenlétében. A szívizomból származó SR vezikulákból 0,5 mM ATP és 1 mM Mg²⁺ jelenléte esetén a 4CMC adása után minden esetben azonnali Ca²⁺-felszabadulást tapasztaltunk. A dantrolen hatástalannak bizonyult (n=4). A normalizálás a RyR1 agonista (4CMC) beadást megelőző szakasz 10 pontjának az átlagára történt.

V/8. A dantrolen-hatás tesztelése Mg²⁺- és ATP-tartalmú oldatban singlechannel árammérésekkel

A dantrolen hatásmechanizmusa körüli bizonytalanság egyik fő oka az volt, hogy a mesterséges lipid kettősrétegbe épített rianodin receptorokon végzett single-channel

árammérésekben korábban hatástalannak bizonyult [116]. Ezért vizsgálatunk legfontosabb kérdése az volt, hogy vajon a Mg2+-e a dantrolen hatáshoz szükséges hiányzó faktor ezekben a mérésekben, és képes-e a tisztított RyR-eket dantrolen-érzékennyé tenni. A 30. ábrán reprezentatív áramfelvételek láthatók. A csatornákat 50 µM Ca2+ jelenlétében, Mg2+-mentes mérőoldatban építettük be a lipid kettősrétegbe (kontroll), majd néhány perccel később 3 mM Mg²⁺-t adtunk ugyanennek a csatornának a citoplazmatikus oldalára, ami jelentősen csökkentette a csatorna nyitvatartási valószínűségét (Po), hiszen a Mg2+ az aktiváló Ca2+kötőhely kompetitív antagonistája. Ezt követően 1 mM ATP-t tettünk a mérőkamra ugyanazon rekeszébe, ami növelte a RyR aktivitását. A steady-state állapot elérése után 10 mM dantrolent adtunk szintén a RyR citoplazmatikus oldalának megfelelő térbe. Áramanalízisünk eredménye szerint a dantrolen 48±5%-kal csökkentette a MgATP-vel kezelt csatornák P_o -ját (P_o = 0,0177±0,025 vs. 0,0123±0,021, n=12). A 12 egyedi RyR átlagos P_o-ját (±SD) a 30/C ábra mutatja. Méréseink során négy esetben az [ATP]-t tovább emeltük 1 mM-ról 2 mM-ra a dantrolen kezelést követően. Ennek hatására, meglepő módon a Po tovább csökkent - ahelyett, hogy az agonista ATP növelte volna a csatornák áramát - a kontroll 17±8%-ára (0,0177±0,025 vs. 0,0018±0,003, n=4, hatás: -0,71;) (30/C ábra), ami összhangban van a gyógyszer terápiás hatásával. Eredményeink szerint tehát az ATP fokozza a dantrolen hatását. Amikor azonban a Mg²⁺-t kihagytuk a méréseinkből, a dantrolen 2 mM ATP jelenlétében hatástalan maradt (a kontroll 91%±3%-a, Po=0,38±0,35 vs. 0,35±0,33, n=10, hatás%: -0,08;) (30/C ábra), ami arra utal, hogy az ATP szükséges, de nem egyedüli feltétele a dantrolen hatásának.



30. ábra. **A dantrolen gátolja az egyedi RyR1-ek aktivitását.** (A és B) A RyR1 single-channel áramai. A csatorna megnyílásai lefelé irányuló kitéréseknek felelnek meg. (A) Egyetlen RyR1 reprezentatív áramai láthatóak kontroll körülmények között (50 μM Ca²⁺), illetve 1 mM Mg²⁺ és 0,5 mM ATP hozzáadása után. A steady-state állapot beállását követően 10 μM dantrolent adtunk a cisz oldalra, ami jelentősen gátolta a csatorna aktivitását. (B) Az ATP önmagában nem elegendő a dantrolen gátló hatásához. A kvantitatív adatokat a (C) panel mutatja, az egyedi csatornák P₀-it a kis pontok jelölik.

V/9. A kalmodulin (CaM) szerepe a dantrolen-hatásban

Oo és munkatársai egy 2015-ben publikált tanulmányban bemutatták, hogy a dantrolenérzékenységben fontos lehet a kalmodulin szerepe. Érvelésük szerint az SR vezikulákból történő RyR tisztítási folyamat során a RyR1-izolátum vélhetően elveszti CaM-tartalmát és ez lehet az oka annak, hogy tisztított RyR-eken nem tapasztalható a dantrolen gátló hatása. Az SR-mikroszóma frakció azonban lehetséges, hogy megőrzi CaM tartalmát (vagy egy részét), ezért feltételezhető, hogy a Ca²⁺-felszabadulási kísérleteinkben tapasztalt dantrolenérzékenység oka lehet a CaM jelenléte is. Az SR vezikula frakciónk és RyR1 izolátumunk CaM tartalmának ellenőrzésére ezért western blot analízist végeztünk. A *31/A ábrán* látható, hogy sem az SR-mikroszóma frakció, sem a tisztított RyR1 szuszpenzió nem tartalmazott kimutatható mennyiségű CaM-ot. Ezzel szemben a CaM-ot a teljes sejt homogenizátumban és a tisztított CaM-mintákban azonosítani tudtuk, amint azt a megfelelő sávok 15 kDa fehérje marker magasságában lévő sávjai jelzik. Mivel az a tény, hogy az SR vezikulák CaM tartalma kimutatási határ alatt van, és a dantrolen gátolta a Ca²⁺-felszabadulását ezekből a vezikulákból, nem támasztja alá azt az hipotézist, hogy CaM szükséges a dantrolen hatásához. Ezt követően tovább vizsgáltuk a dantrolen hatását single-channel árammérések során is 100 nM CaM jelenlétében, de Mg²⁺ nélkül. Ezek reprezentatív, öt másodperces szakaszai a *31/B ábrán* láthatóak kontroll körülmények között (100 nM Ca²⁺, 1 mM ATP, 100 nM CaM) és dantrolen kezelést követően. A *31/C panelen* 6 egyedi RyR1 P_o átlagai láthatóak CaM-ot tartalmazó közegben, és azt mutatja, hogy ilyen körülmények között a dantrolen nem gátolta a csatornát.



31. ábra. A dantrolen kalmodulin jelenlétében hatástalannak bizonyult. (A) A CaM western blot analízise SR-mikroszómákban és egy tisztított RyR1 mintában. Pozitív kontrollként teljes vázizom homogenizátumot és tisztított CaM-ot használtunk (A western blotot Dr. Mótyán János szerzőtársam végezte). (B) 100 nM Ca²⁺, 1 mM ATP és 100 nM CaM mellett rögzített single-channel árammérés RyR1-en kontroll körülmények között és dantrolen kezelést követően. Az áramok jobb felső sarkában a P_o átlagok±SE látható. (C) Hat egyedi RyR1 P_o átlagai kontroll körülmények között, CaM jelenlétében és dantrolen kezelést követően.

VI. MEGBESZÉLÉS

VI/1. Ca²⁺-raktárak szerepe a szarkoplazmás retikulum Ca²⁺- csatornájának szabályozásában fiziológiás és kóros állapotban

Bár régóta ismert tény, hogy az SR Ca²⁺-tartalma szabályozza a Ca²⁺-felszabadulást, azonban a pontos mechanizmus még nem került feltárásra. Az irodalomban számos tanulmány áll rendelkezésre, amelyek alapján egységes vélemény nem alakítható ki az olyan kérdések miatt, mint a Ca²⁺ általi feed-through hatás.

Kutatócsoportunk az irodalomban először hasonlította össze a két RyR izoforma luminális Ca²⁺ általi szabályozását ugyanazon vizsgálati körülmények között, melyek során a Ca²⁺-kötőhely ligandjának túloldalra való jutását a luminalis Ca²⁺-kötőhelyek specifikus agonistájának - az Eu³⁺-nak - az alkalmazásával kerültük el. Kimutattuk, hogy (1) a RyR2-t aktiválja a luminális Ca²⁺, míg a RyR1-et gátolja, (2) ezek az eredmények Eu³⁺ használatával reprodukálhatóak voltak, (3) kísérleti körülményeink között a feed-through szabályozás hatása a kimutatási határ alatt van, (4) az Eu³⁺ gátló hatása a RyR1-re erősen feszültségfüggő, míg a RyR2-re gyakorolt aktiváló hatása feszültségfüggetlen, és (5) az Y524S MHS-RyR1 csatorna luminális szabályozása ugyanolyan, mint a vad típusé. Az a tény, hogy a membránpotenciál depolarizálása enyhíti a gátlást, és hogy a gátlás negatív feszültségeknél erősebb, azzal magyarázható, hogy az Eu³⁺ az elektromos mezőben mozog a kötőhelye felé vezető úton *(lásd* a *32/C ábrán)*.

Rianopátiákban a Ca2+-felszabadulás szabályozásának a sérülése kontrollálatlan Ca2+felszabadulást (SOICR) eredményez, amely szívritmuszavarhoz vezethet például szívelégtelenségben vagy CPVT-ben, illetve vázizomban MHS-t okozhat [35][44][105][154]. Utóbbi kórállapotban a halotán egy erre érzékeny mutáns RyR aktiválásával malignus hipertermia rohamot vált ki [153][155]. Nemrégiben Chen csoportja egy alternatív patomechanizmust javasolt, amelyben a halotán a SOICR küszöbének csökkentésével váltja ki a Ca²⁺-felszabadulást MHS-ben [44]. Sajnos, mivel a SOICR kiváltása egészséges vázizomrostokban nem lehetséges, minden intracelluláris [Ca²⁺] mérésben nyert adatukat heterológ expressziós rendszeren végzett mérésekből kapták. 12 különböző MHS-RyR1overexpresszáló HEK sejtből (köztük az Y523S-nyúl RyR1-gyel, amely megfelel az egér Y524S-ének) képesek voltak SOICR-t kiváltani magas Ca²⁺-tartalmú extracelluláris oldatok segítségével, de csak akkor, ha a sejteket 2 mM koffeinnel kezelték elő, amelyről ismert, hogy érzékenyíti a RyR-t a citoplazmatikus Ca2+-ra. Ebből a tanulmányból hiányoznak a mesterséges lipid kettősrétegbe épített egyedi csatornákon végzett kísérletek, de a szerzők korábban már kimutatták, hogy a sertés R615C-RyR1-t millimoláris luminális [Ca2+] aktiválja [43][44]. Ezzel szemben a disszertációmban szereplő eredményeink azt mutatják, hogy mind

a vad típusú, mind az Y524S MHS-RyR1-et a Ca²⁺, és az Eu³⁺ is gátolja hasonló kísérleti körülmények között, ezzel cáfolva az ő eredményeiket. Ez az eltérés abból is adódhat, hogy a mi RyR-jeinket heterozigóta egerekből állítottuk elő, így a preparátumunk olyan RyR-tetramereket tartalmaz, amelyek vad típusú és Y524S MHS-RyR1 monomerekből állnak. A Chen és munkacsoportja által javasolt MHS patomechanizmus, azaz a fokozott SOICR-hajlam ellen szól, hogy a mi kísérleti elrendezésünkben a RyR-eket gátolja a luminális Ca²⁺, de a heterozigóta egerek mégis erős MHS fenotípust mutatnak [153][156]. Eredményeiket az MHS-RyR-ek feed-through aktiválódása jól magyarázná. Összességében arra a következtetésre jutottunk, hogy az alacsony SOICR-küszöb nem releváns mechanizmus az MHS-ben, így a CPVT és az MHS patomechanizmusa nem azonos. Az arra érzékeny egyénekben a halotán RyR agonistaként, direkt alloszterikus kötőhelyeken keresztül aktiválja a nyugalomban is aktívabb csatornát. A kórfolyamatot pedig tovább gyorsítja, hogy a mutáns RyR citoplazmatikus Ca²⁺-kötőhelyei érzékenyebbek és a Mg²⁺ általi gátlás gyengébb, amik miatt a CICR erősebb lesz.

VI/2. Az Eu³⁺-kötőhelyének vizsgálata in silico módszerekkel

A luminális kötőhely patológiai jelentősége miatt döntő fontosságú a luminális Ca2+-szenzor megtalálása, ezért szerzőtársainkkal szoros kollaborációban in silico kísérleteket végeztünk. Bár a RyR krio-EM szerkezete már feltárta a kapuzás és a ligandfüggő aktiváció szerkezeti alapjait, és több bizonyíték is azt mutatja, hogy létezik egy luminális Ca²⁺-kötőhely, annak pontos helye továbbra is ismeretlen. Chen csoportjának mutációelemző vizsgálatai alapján azonban elkészült a folyamat mechanisztikus modellje. A RyR2 kapujához (14867) közeli aminosav-maradékok szerepét vizsgálva kimutatták, hogy a luminális Ca2+-szabályozást az E4872 és A4860 aminosavak mutációi megzavarják. Az E4872 a kapu citoplazmatikus oldala felé néz, míg az A4860 a kapu luminális oldalán található. Szerkezeti elemzés alapján azt javasolták, hogy egy glutaminok által alkotott gyűrű (Q4863) biztosítja a Ca²⁺-kötőhelyet a kapu luminális oldalán. A Ca²⁺ kötődése ehhez a glutamingyűrűhöz indítja el a RyR2 nyitását, ami a kapu citoplazmatikus oldalán részben E4872 által kialakított új kötőhely kialakulásához kapcsolódik [30]. Ez a modell tökéletesen leírná a "luminális Ca²⁺ által kiváltott feed-through aktiválási" mechanizmus mechanikus koreográfiáját, de sajnos nem kompatibilis a jelenlegi eredményeinkkel. Mivel a luminális Ca²⁺ hatása a RyR2-re és a RyR1-re ellentétes, de a két izoforma elsődleges szekvenciái ebben a régióban azonosak, a modell valószínűtlennek tűnik. Azonban nem meglepő, hogy a kapu régió, ahol az összes konformációs változás együttesen konvergál, ennyire érzékeny a mutációkra.

Az a megfigyelésünk, hogy az Eu³⁺ hatása RyR2-n kétfázisú volt, jól korrelál más korábbi adatokkal, például a Ching és munkatársai által publikáltakkal, akik kimutatták, hogy a RyR2

kontroll körülmények között aktiválódott, de ez gátlásba fordult át, miután a csatornát tripszinnel kezelték [32]. Ez az eredmény arra utal, hogy a RyR2 luminális odalán két funkcionálisan különböző Ca²⁺-kötőhely van, és hogy a gátló hely működése érvényesül, ha az aktiváló hely a tripszin hasítás miatt megsemmisül. Ezt az elképzelést követve Gaburjakováék új kísérleteket terveztek és kimutatták, hogy a Sr²⁺, Mg²⁺ és Ba²⁺ a Ca²⁺-nal verseng a RyR2 luminális kötőhelyéért, és affinitásuk erős korrelációt mutat az EF-kéz motívumokra vonatkozó affinitásukkal. Elvégeztek egy EF-kéz-mintázat predikciós elemzést a RyR2 luminális oldalán, amely egy EF-kéz-szerű szekvenciát mutatott ki az 1-es és 2-es transzmembrán hélixet összekötő intraluminális hurokban (S1-S2 hurok, 4538-4550) (32/D ábra, felső szekvenciaillesztés, piros színnel) [157]. Sajnos a hurok a krio-EM szerkezetben feloldatlan, így a transzmembrán hélixekkel (pl. az S6 kapuval) való kapcsolata nem ítélhető meg. A RyR2 és RyR1 S1-S2 hurok primer aminosav szekvenciát összehasonlítva látható, hogy nagyon eltérőek ebben a régióban, és hogy a RyR1 esetén 10 aminosavval hosszabb is ez a régió. Úgy gondoljuk, hogy ez az EF-kéz-szerű szekvencia a luminális aktiváló Ca2+kötőhely a RyR2-ben, amely a RyR1-ben nincs jelen. Funkcionális eredményünk, miszerint a RyR2 aktivációja feszültségfüggetlen, összeegyeztethető ezzel a modellel, mivel az EF-kezet tartalmazó hurok nem része a pórusnak, ezért nem esik bele az elektromos erőtérbe.

Mivel a RyR1 gátlása erősen feszültségfüggő volt, ezért a pórusban kerestük a gátló Ca2+kötőhelyet. Ezt a helyet öt különböző számítási módszerrel próbáltuk azonosítani, a RyR1 hét ismert szerkezetét használva (lásd: Anyagok és módszerek). A Placevent, a MIB és az lonCom mind a hét szerkezetben azonosított lehetséges kötőhelyeket. A Placevent és a MIB egy lehetséges kötőhelyet javasolt, amely a 4893-4903-as aminosavakat foglalja magában, amelynek része a szelektivitási filter (GGGIG, 4894-4898.) is (32/A, B ábra). A Placeventtel végzett analízis során az Eu³⁺-t 10 mM koncentrációban alkalmazva a RyR1 kötötte az Eu³⁺ t. Az IonCom által leggyakrabban azonosított helyek a D4899 és az E4900 voltak, amelyeket a D4917 és a D4877 követett. Az első kettő a szelektivitási filterben van, a harmadik a szelektivitási filter mellett, míg a negyedik a két hely között helyezkedik el. A Fold-X csak egyetlen szerkezetben, a 3J8H-ban talált nagy affinitású kötőhelyet, ahol az Eu³⁺ ismét a 4899-4902-es aminosavakhoz kapcsolódva volt megtalálható. Végül a bindEmbed21, ami egy olyan módszer, amely csak aminosav-szekvencia információkat használ fel, szintén azt jósolta, hogy az E4900 részt vesz a Ca2+ kötésben. A bindEmbed21 képes volt megtalálni a RyR1 két EFkéz motívumát, a C-terminális doménben lévő Zn2+-kötőhelyet és az ismert citoszólikus Ca2+kötőhely egy aminosavát is, így valószínűleg az E4900-ra vonatkozó jóslata is megbízható. Továbbá, ezek az aminosavak (4893-4903) elég közel vannak az alegység határokhoz ahhoz, hogy ion megkötésével előidézze a transzmembrán hélixek elmozdulását. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a D4899 és az E4900 fontos szerepet játszanak az ionok vezetésében és a szelektivitásban [158][159]. Az egyik ilyen tanulmány azt is kimutatta, hogy

a D4917, az IonCom által Ca²⁺ kötésre jósolt egyik aminosav, szintén fontos a RyR1 vezetőképességében és Ca²⁺-általi szabályozásában [158]. A D4917 az S6 hélixben helyezkedik el, amelynek mozgása döntő fontosságú a csatorna kapuzása szempontjából. Elég közel van a szelektivitási filterhez ahhoz, hogy a Ca²⁺-kötőhely részét képezve, vagy kölcsönhatásba lépve más kötőhelyet alkotó aminosavakkal csatornanyílást okozhasson [13]. Egy nemrégiben végzett molekuladinamikai vizsgálat szintén rávilágított a 4899. és 4900. aminosavak fontosságára, és kimutatta, hogy a szelektivitási filter kétértékű Ca²⁺-nal való telítése megakadályozta a K⁺-ionok vezetését [160][161]. Feltehetően hasonló mechanizmus magyarázhatja az Eu³⁺ azon képességét is, hogy hatékonyan blokkolja a csatornát.

A 4893-4908 aminosav szekvencia erősen konzervált a két RyR izoforma és a fajok között is, ami arra utal, hogy a két izoformának megegyezik a gátló kötőhelye, ahogy azt eredményeink is sugallják *(32. ábra, alsó szekvenciaillesztés, zöld színnel)*.

Emellett vannak arra utaló *in silico* eredményeink is, hogy a csatorna pórusához (Q4933) való közvetlen kötődés is lehetséges, ami pedig összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy az Eu³⁺ nagy koncentrációban pórusblokkot okoz.



32. ábra. A RyR2 két legvalószínűbb Eu³⁺-kötőhelyének bemutatása a csatorna luminális oldalán. Az (A) és (B) panelen a csatorna luminális oldala felől nézve a RyR2 pórusát látjuk a PDB 5T15 struktúra alapján. (A) A sárga gömbök az Eu³⁺ lehetséges kötőhelyeit mutatják a Placevent által megjósolt módon. A 4893-4903 aminosavakból álló hely (szelektivitási filter) sárgával van színezve. A D4917, amely az lonCom előrejelzése szerint szintén potenciálisan kölcsönhatásba léphet a megkötött ionnal, narancssárga színű. Az S1-S2 luminális hurok helye (4538-4550) nincs jelölve, mivel az EMszerkezetben nincs feloldva. (B) A luminális pórus területének elektrosztatikus felülete. Az elektrosztatikus potenciálfelület -10 (piros) és +10 (kék) kT/e között van rámpázva. Látható, hogy a luminális száj, ahol a szelektivitási filter található összességében sokkal nagyobb negatív töltésfelülettel rendelkezik, mint a felületi hurkok. Az Eu³⁺ itt is sárga gömbökkel van jelölve. (C) Az S1-S2 hurokban (lila színnel) és a kapu közelében található feltételezett Ca²⁺-kötőhelyek elhelyezkedését szemléltető sematikus rajzok RyR1 és RyR2 esetén. Az Eu³⁺ sárga gömbökkel jelölve látható. (D) A különböző fajok RyR1 és RyR2 luminális hurok putatív helyének (fent) és a luminális pórus helyének (lent) szekvenciaillesztése. Az EF-kéz-szerű szekvencia piros-, a póruskötő hely pedig zöld betűkkel van jelölve. Az ábra (A) és (B) paneljét Dr. Jacob Bauer és Dr. Vladena Bauerová-Hlinková készítette.

Összefoglalva a szerkezeti elemzést és funkcionális adatainkat azt feltételezzük, hogy a RyR2 két luminális Ca²⁺-kötőhelyet hordoz: egy aktiváló helyet az S1-S2 hurokban és egy gátló helyet, amely a pórusban található *(lásd a 32/C ábrán)*. Az aktiváló hely dominál a gátló hely funkciójával szemben, amely utóbbinak jelentősége elhanyagolható. RyR1 esetén az aktiváló kötőhely hiányzik, és így a gátló hely hatása elég nagy ahhoz, hogy segítsen elnyomni a RyR1 aktivitását a nyugalmi izomban (az SR átlagos [Ca²⁺]-ja a jelen vizsgálat során alkalmazott tartományba esik) [162]. Ezzel szemben Ca²⁺-felszabadulás során, amikor az SR [Ca²⁺] csökken, a RyR1 fokozatosan felszabadul a gátlás alól, kompenzálva az SR ürülése miatt fellépő csökkenő hajtóerőt, így segít a Ca²⁺-felszabadulás sebességének fenntartásában. Eredményeink szerint MHS-ben a luminális Ca²⁺-kötőhely érzékenysége nem változik.

VI/3. A dantrolen általi RyR1-gátláshoz ATP és Mg²⁺ szükséges

Annak ellenére, hogy a dantrolen egy hatékony gyógyszer, MHS rohamban betegek a ~5%-a megfelelő kezelés ellenére is életét veszíti. Ebből az okból kifolyólag a gyógyszer terápiás hatékonyságának fokozása, az ideális gyógyszerhatás feltételeinek megteremtése fontos kihívás.

Ennek a témának a motivációját az adta, hogy szerettük volna feloldani a dantrolen hatásmechanizmusával kapcsolatos ellentmondásokat, amelyek abból adódtak, hogy a dantrolen képes volt a Ca²⁺-felszabadulást intakt vázizomrostokon gátolni, de hatását elvesztette mesterséges lipid kettősrétegbe épített rianodin receptorokon.

Munkánkat közvetlenül ösztönözte Choi és munkatársai publikációja, amelyben kimutatták, hogy a Mg²⁺ a dantrolen hatáshoz elengedhetetlen kofaktor vázizomrostokon végzett [Ca²⁺]_{IC}-mérések során [137]. A munkacsoportunk által dantrolennel végzett korábbi vizsgálatokban valóban kerülték a Mg²⁺ használatát, mivel a RyR1 oly mértékű gátlásához vezetett volna, amely a további gátlás kimutatását megnehezítette volna.

Az ellentmondások tisztázása érdekében célul tűztük ki, hogy a fent említett tanulmányokhoz kiegészítő adatként single-channel áramméréseket végzünk RyR-eken. A dantrolen hatását SR vezikulákból történő Ca²⁺-felszabadulás kísérletekben is ellenőriztük. A kétféle mérési körülmény beállítása során a Choi cikkében szereplőhöz hasonló közeget (3 mM Mg²⁺, 1 mM ATP) állítottunk be [137]. A várakozásnak megfelelően a dantrolen ilyen körülmények között jelentősen gátolta a RyR-ek aktivitását. A legfontosabb eredményünk az, hogy először sikerült

egyedi csatorna szinten bizonyítanunk, hogy a dantrolen megköveteli a Mg²⁺ közvetlen kötődését a RyR-hez, és a hatáshoz nincs szükség más járulékos fehérje jelenlétére. Továbbá kimutattuk, hogy a gátlás tovább nőtt az [ATP] növelésével, ami arra utal, hogy az ATP potencírozza a dantrolen hatását. Ezek a single-channel adatok jól korrelálnak a Ca²⁺-felszabadulás mérések során kapott eredményeinkkel. Így összefoglalva elmondható, hogy a Mg²⁺ mellett ATP is szükséges a gyógyszerhatáshoz.

Egy másik tanulmányban Oo és munkatársai arról számoltak be, hogy mesterséges lipid kettősrétegbe épített egyedi RyR-eken végzett kísérletekben CaM jelenléte szükséges ahhoz, hogy a dantrolen gátolja mind a szívizom-, mind a vázizom típusú RyR-t (Mg²⁺-t nem használtak a méréseik során), amit mi nem tudtunk megerősíteni. Az egyedi csatornákon végzett mérésekhez használt mérőoldatoknál szokatlan módon ők glutation segítségével ~2200 mV redoxpotenciálra pufferelték az oldatukat, redukáló környezetet biztosítva a fehérjék számára, ami magyarázatot adhat megfigyeléseikre [163]. Az eredményeink közötti ellentmondás másik lehetséges oka, hogy a RyR-ek szolubilizálása során az általunk használt detergens (CHAPS) megváltoztathatja a dantrolen fehérjéhez való kötődését.

VI/4. A dantrolen-kötőhely feltérképezése a RyR1 szerkezetében

A dantrolen kötőhelyét (DBS) elsőként fotoaffinitás-jelölési vizsgálatokkal az NSol doménben, az 590-609-es pozícióban lévő aminosavak által alkotott hélixben azonosították [119]. Később a domén-peptid szondás megközelítéssel végzett kísérletek azt sugallták, hogy ez a régió (DP1) és egy másik, a DP4 (2442-2477) elengedhetetlenül fontosak a domének közti kapcsolatok kialakításában, és kölcsönhatásban vannak egymással [123]. A legszélesebb körben elfogadott modell szerint az N-terminális (35-614) és a központi domének (2129-2458) által kialakított domének közötti kölcsönhatások zárt konfigurációja a pórus felé közvetíti a csatorna zárt konformációját. A RyR agonistákkal történő aktiválása feloldja ezeket a molekuláris kapcsolatokat, és a pórus megnyílását okozza. Hasonlóképpen, az N-terminálisnál lévő MHS mutációk közvetlenül feloldhatják és destabilizálhatják ezeket a kapcsolódási pontokat, ami agonistákra túlérzékeny csatornákat eredményez. A dantrolen ezeket a "hibákat" úgy javítja ki, hogy egy bizonyos ponton (az 590-609 aminosavak körül) allosztérikusan mintegy "kiékeli" és így rögzíti a meglazult szerkezetet, ezzel újra stabilizálja a teljes csatornát is [123][124][125][164][165]. A DP1 domén kapcsolatainak megértése érdekében ezt a domént a nyúl RyR1 háromdimenziós szerkezetében bejelöltük, és munkatársunk (Dr. Mótyán János) segítségével megvizsgáltuk a DP1 közelében lévő feltételezett kölcsönhatási felületeket [14][143][166][167]. Jól látható, hogy a DP1 és a DP4 távol helyezkedik el a Ca²⁺ (Mg²⁺), ATP és koffein kötőhelyektől. A DP1 az NSol-ban, a DP4 pedig a BSol doménben található, és ez a két szubdomén nem lép kölcsönhatásba egymással.

Részletes elemzésünk azonban számos interdomén interakciót mutatott ki a DP1 szomszédságában. A DP1 a JSol hélixéhez csatlakozik (1657-1678) (33/B ábra, bekarikázva), és N-terminális hurokja szoros kapcsolatba kerül a BSol domén 2166-2171. aminosavai által létrehozott hurokkal (33/B ábra, szaggatott kör). Ezek alapján úgy tűnik, hogy ezek az interdomén kapcsolódási pontok a szerkezet ezen régiójának kulcspontját képezik. Ez a kép összhangban van azzal a ténnyel, hogy ezek a szekvenciák nagymértékben konzerváltak a fajok között, és emellett négy jól ismert MHS mutációs helyet tartalmaznak (R614, R2163, V2168, T2206). Feltételezésünk szerint ezek a mutációk befolyásolhatják a dantrolen kötőhelyhez való affinitását. Továbbá, úgy tűnik, hogy a DP1 C-terminális vége kölcsönhatásba léphet még az SPRY3 szekvenciákkal (1591-1595) is (33/B ábra, szaggatott kör).



33. ábra. A DBS és a szomszédos domének közötti kapcsolatok ábrázolása a RyR1 3Dszerkezetében. (A) Két RyR1 alegység, valamint koffein, ATP és Ca²⁺ (5TAQ.pdb) látható oldalnézetben. Az NSol domén (393-627) ciánkék színnel van jelölve. A dantrolen kötőhelye (DBS, 590-609) pirossal van kiemelve. A DP4 régió (2442-2477) narancssárga színnel van jelölve. A szekvencia számozása a nyúl RyR1 szekvencia szerint van megadva. (B) Ez az ábra a feltételezett kölcsönhatási felületeket mutatja a DBS közelében. Az NSol domén (393-627) ciánnal, az SP1a/RyR domain 3 (SPRY3) domén (1242-1656) zölddel, a JSol domén (1657-2144) narancssárgával, a BSol domén (2145-3613) pedig lilával van kiemelve. A DBS (590-609) piros színnel látható. A DBS közelében található szomszédos domének régióit bekarikáztuk. Hidrogénkötések jöhetnek létre az N1678-Q618, G1677-R615, D1658-H597, Q2169-A613, és D591-R1594, D591-R1594, L590-R1594 között. A DBS körüli jól ismert mutációs helyek kék számokkal és nyilakkal vannak jelölve. A humán RyR1 R614-je megfelel a nyúl RyR1 R615-jének. Az ábrát készítette: Dr. Mótyán János.

Kísérleti adataink a dantrolen hatásának két lehetséges molekuláris mechanizmusára utalnak: 1) a dantrolen kötődése egy specifikus allosztérikusan módosított állapotot igényel, amelyet a Mg²⁺ és az ATP hoz létre, vagy hogy, 2) a dantrolen kötődése allosztérikusan növeli a RyR affinitását a Mg²⁺-hoz (és így a gátlás valójában a Mg²⁺-nak köszönhető). Az *in silico* elemzésünk az utóbbi lehetőséget támogatja, mivel a domének közötti relatív távolságok koffein, ATP és Ca²⁺ jelenlétében (nyitott állapotban, 5TAQ.pdb), illetve az EGTA által indukált zárt állapotban (5TB1.pdb) hasonlóak [14]. Ez a szerkezeti információ azt jelzi, hogy a dantrolen kötőhely nem esik szerkezeti átrendeződések alá a kapuzás során, ezért nagy valószínűséggel mindig hozzáférhető – függetlenül attól, hogy a Mg²⁺ elfoglalja-e a Ca²⁺kötőhelyeket –, ami arra utal, hogy a dantrolen valószínűleg úgy hat, hogy allosztérikusan növeli a Mg²⁺ RyR-hez való affinitását.

Choi és munkatársai, valamint Cannon és munkatársai szintén úgy vélik, hogy dantrolen jelenlétében a RyR1 olyan konformációs állapotban stabilizálódik, amely miatt megnő az affinitása a Mg²⁺ iránt. Arra a következtetésre jutottak, hogy az MH epizódok során a fokozott metabolizmus miatt hidrolizáló MgATP komplex, az ezzel együtt csökkenő [ATP] és az ennek következtében emelkedő szabad [Mg²⁺] lehet a gyógyszerhatás mögötti mechanizmus [137][168]. A mi eredményeink viszont azt sugallják, hogy a dantrolen elveszti a hatékonyságát súlyosan alacsony [ATP] mellett. Ez azt jelenti, hogy az MH-roham során létezhet egy optimális időablak a gyógyszer alkalmazására, amikor a Mg²⁺/ATP arány optimális, ami rávilágít az azonnali kezelés fontosságára is.
VII. ÖSSZEFOGLALÁS

A rianodin receptorok (RyR) a szarkoplazmás retikulum (SR) ligand-vezérelt ioncsatornái, melyek legfőbb ligandja a Ca²⁺. A Ca²⁺ a csatorna citoszólikus és luminális oldala felől is szabályozza a működést. A RyR luminális oldal felőli aktivációja sokat kutatott kérdés, mivel a raktár túltöltődése által kiváltott Ca²⁺-felszabadulást összefüggésbe hozták szívritmuszavarokkal és a malignus hipertermiával (MH) is. A RyR luminális oldali Ca2+-szabályozásáról elérhető adatok értékelését megnehezíti, hogy a luminális Ca2+-kötőhelyek vizsgálatára használt kétértékű ionok a csatorna pórusán átjutva a citoplazmatikus oldali kötőhelyekhez is kötődhetnek, emiatt a luminális Ca2+kötőhely szerepét nehéz megítélni [28][29][35][36][37][38]. Ezen probléma áthidalására kísérleteinkben Ca²⁺ helyett Eu³⁺-t használtunk, amely a Ca²⁺-kötőhelyek specifikus ligandja, azonban a csatornán nem jut át. A mechanizmus molekuláris szintű vizsgálatára elemi, "singlechannel" áramméréseket végeztünk vázizom- és szívizom típusú RyR-eken (RyR1 és RyR2). A RyR2 luminális oldalán a [Ca²⁺] megnövelése fokozta a csatorna nyitvatartási valószínűségét (P₀), míg a RyR1-et gátolta. Ezek az eredmények Eu³⁺-nal reprodukálhatók voltak. A malignus hipertermiára (MHS) hajlamosító mutációt (Y524S) hordozó RyR1 luminális szabályozása nem különbözött a vad típusétól. A RyR1 Eu³⁺ általi gátlása feszültségfüggő volt, míg a RyR2 aktiválás nem volt az. Ez arra utal, hogy a RyR1 gátló luminális Ca2+-kötőhelye a membrán elektromos erőterében, azaz a csatorna pórusában van, míg a RyR2 Ca²⁺ aktiválásért felelős kötőhelye azon kívül esik. In silico szerkezeti elemzés és méréseink alapján úgy véljük, hogy a RyR2 két luminális Ca²⁺-kötőhelyet hordoz: egy aktiváló helyet az S1-S2 hurokban és egy gátló helyet a pórusban. RyR2-ben az aktiváló kötőhely elnyomja a gátló hely működését, így annak jelentősége elhanyagolható. RyR1-ben azonban az aktiváló kötőhely hiányzik, és a gátló hely a nyugalomban lévő izom SR [Ca2+] mellett jelentősen gátolja a RyR1-et. Ca2+-felszabadulás során, amikor az SR [Ca2+] csökken, a RyR1 fokozatosan felszabadul a gátlás alól, kompenzálva a csökkenő hajtóerőt és segítve ezzel a Ca2+-felszabadulás sebességének fenntartását.

Disszertációm második felében a dantrolen hatásmechanizmusával foglalkoztam. A dantrolen egy RyR gátlószer, melyet az MHS terápiájában izomrelaxánsként használnak, pontos hatásmechanizmusa azonban bizonytalan. Ez főként arra vezethető vissza, hogy a dantrolen gátolja a vázizomrostok és SR vezikulák RyR-függő Ca²⁺-felszabadulását, de nem képes gátolni az egyedi RyR-ek áramát. Ebből arra következtethetünk, hogy a dantrolen hatásának egy fontos tényezője elvész a RyR áramméréshez való előkészítése során. Egy közelmúltban publikált, izomrostokon végzett kísérletek tanulsága szerint Mg²⁺ szükséges a gyógyszerhatáshoz. Mivel a korábbi elemi áramméréseknél használt közeg nem tartalmazott Mg²⁺-t, célunk az új eredmények ellenőrzése volt. 10 µM dantrolen 3 mM Mg²⁺ és 1 mM ATP jelenlétében jelentősen csökkentette a RyR P₀-ját, míg az [ATP] 2 mM-ra növelésével a P₀ tovább csökkent, és elérte a kezeletlen RyR P₀-jának 20%-át. Eredményeink alátámasztják a dantrolen Mg²⁺-függő hatásmechanizmusát, és emellett arra is utalnak, hogy a gyógyszerhatás Mg²⁺ mellett ATP-t is igényel.

VIII. SUMMARY

Ryanodine receptors (RyR) are ligand-gated Ca²⁺ channels of the sarcoplasmic reticulum (SR). Their main ligand is the Ca²⁺, which regulates channel function acting from both the cytosolic and luminal side of the RyR. Impaired regulation by Ca²⁺ leads to cardiac and skeletal muscle diseases. For instance, Ca²⁺ overload-induced Ca²⁺ release (SOICR) is associated with cardiac arrhythmias and malignant hyperthermia (MH). Data published on the luminal-Ca²⁺ regulation of RyR is difficult to interpret due to the fact that the divalent ions used to study luminal Ca²⁺-binding sites can also bind to cytoplasmic side binding sites as they flow through the channel pore. To overcome this problem, we used Eu³⁺ instead of Ca²⁺, which can specifically bind to Ca²⁺-binding sites but is not conducted by the channel. To investigate the mechanism at the molecular level, we performed single-channel current measurements using both skeletal muscle- and cardiac-type RyRs (RyR1 and RyR2). These measurements showed that increasing [Ca²⁺] on the luminal side of RyR2 increased channel open probability (P_0), while RyR1 was inhibited. These results were reproduced by using Eu³⁺. Luminal regulation of RyR1 carrying a mutation (Y524S) associated with MH was not different from wild type. Inhibition of RyR1 by Eu³⁺ was voltage dependent, whereas activation of RyR2 was not. These results suggest that the inhibitory luminal Ca2+-binding site of RyR1 is located in the membrane's electrical field, i.e., in the pore of the channel, whereas the luminal activation site of RyR2 is outside of this region. Based on these functional data and in silico analysis we predicted Ca²⁺-binding site sequences and suggest that RyR2 carries two luminal Ca²⁺-binding sites: an activation site in the S1-S2 loop and an inhibitory site in the pore. The activating site dominates over the function of the inhibitory site, thus its role is not relevant. In contrast, in RyR1 the activating binding site is absent, and the affinity of the inhibitory site is high enough to significantly suppress RyR1 activity in relaxed muscle, where the average [Ca²⁺] of SR falls within the range tested in this study. During Ca^{2+} -release, when SR [Ca^{2+}] decreases, RyR1 is gradually freed from inhibition, which compensates for the decreasing driving force.

In the second part of my dissertation, I sought to answer the question about the mechanism of action of dantrolene. Dantrolene is a RyR1 inhibitor which is as a non-depolarizing muscle relaxant in MH. Although it is known that dantrolene binds to the RyR protein, its mechanism of action is unknown, mainly due to the controversial results that dantrolene inhibits Ca²⁺-release from intact fibres and SR vesicles but is unable to inhibit purified RyRs. It is therefore concluded that an important factor of the effect of dantrolene is lost during the RyR purification process. Recently, it has been shown that Mg²⁺ is essential for RyR inhibition by dantrolene in Ca²⁺-release experiments in skeletal muscle fibers. Our experiments aimed to confirm these results at the single-channel level. 10 μ M dantrolene added along with 3 mM Mg²⁺ and 1 mM ATP significantly reduced the P₀ of RyR, and the channel P₀ was further reduced to ~20% of control when [ATP] was increased to 2 mM. Our results show that Mg²⁺ is required for the action of dantrolene and suggest that ATP is also needed.

IX. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] E. Carafoli, "Calcium signaling: A tale for all seasons," 2002. doi: 10.1073/pnas.032427999.
- [2] A. Kushnir, B. Wajsberg, and A. R. Marks, "Ryanodine receptor dysfunction in human disorders," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1865, no. 11, pp. 1687–1697, 2018, doi: 10.1016/j.bbamcr.2018.07.011.
- [3] A. Fonyó, *Az orvosi élettan tankönyve*, 7. Medicina Könyvkiadó Zrt., 2014.
- [4] L. Al-Qusairi and J. Laporte, "T-tubule biogenesis and triad formation in skeletal muscle and implication in human diseases," *Skelet. Muscle*, vol. 1, no. 1, pp. 1–11, 2011, doi: 10.1186/2044-5040-1-26.
- [5] S. Perni, "The Builders of the Junction: Roles of Junctophilin1 and Junctophilin2 in the Assembly of the Sarcoplasmic Reticulum–Plasma Membrane Junctions in Striated Muscle," *Biomolecules*, vol. 12, no. 1, pp. 1–14, 2022, doi: 10.3390/biom12010109.
- [6] B. E. Flucher and M. Campiglio, "BBA Molecular Cell Research STAC proteins : The missing link in skeletal muscle EC coupling and new regulators of calcium channel function ☆," BBA Mol. Cell Res., vol. 1866, no. 7, pp. 1101–1110, 2019, doi: 10.1016/j.bbamcr.2018.12.004.
- [7] E. J. Horstick *et al.*, "Stac3 is a component of the excitation-contraction coupling machinery and mutated in Native American myopathy.," *Nat. Commun.*, vol. 4, p. 1952, 2013, doi: 10.1038/ncomms2952.
- [8] M. Grzybowski, A. Schänzer, A. Pepler, C. Heller, B. A. Neubauer, and A. Hahn, "Novel STAC3 Mutations in the First Non-Amerindian Patient with Native American Myopathy," *Neuropediatrics*, vol. 48, no. 6, pp. 451–455, 2017, doi: 10.1055/s-0037-1601868.
- [9] M. Fill and Julio A. Copello, "Ryanodine receptor calcium release channels: An evolutionary perspective," *Physiol Rev*, vol. 82, pp. 893–922, 2002, doi: 10.1007/978-94-007-2888-2_7.
- [10] K. A. Woll and F. Van Petegem, "Calcium-release channels: Structure and function of IP3 receptors and ryanodine receptors," *Physiol. Rev.*, vol. 102, no. 1, pp. 209–268, 2022, doi: 10.1152/PHYSREV.00033.2020.
- [11] F. Van Petegem, "Ryanodine receptors: Structure and function," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 38, pp. 31624–31632, 2012, doi: 10.1074/jbc.R112.349068.
- [12] J. T. Lanner, D. K. Georgiou, A. D. Joshi, and S. L. Hamilton, "Ryanodine Receptors: Structure, Expression, Molecular Details, and Function in Calcium Release," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 2, pp. 1–21, 2010.
- [13] R. Wei *et al.*, "Structural insights into Ca2+-activated long-range allosteric channel gating of RyR1," *Cell Res.*, vol. 26, no. 9, pp. 977–994, 2016, doi: 10.1038/cr.2016.99.
- [14] A. des Georges *et al.*, "Structural Basis for Gating and Activation of RyR1," *Cell*, vol. 167, no. 1, pp. 145-157.e17, 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.08.075.
- [15] H. Hu and Q. Chen, "Structural insights into RyR channel gating modulated by intrinsic junctional protein," *Biol. Sci.*, 2022.
- [16] M. Samsó, "A guide to the 3D structure of the ryanodine receptor type 1 by cryoEM," *Protein Science*, vol. 26, no. 1. pp. 52–68, 2017. doi: 10.1002/pro.3052.

- [17] O. B. Clarke and W. A. Hendrickson, "Structures of the colossal RyR1 calcium release channel.," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 39, pp. 144–152, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.sbi.2016.09.002.
- [18] W. Peng *et al.*, "Structural basis for the gating mechanism of the type 2 ryanodine receptor RyR2," *Science (80-.).*, vol. 354, no. 6310, 2016, doi: 10.1126/science.aah5324.
- [19] H. Hadiatullah, Z. He, and Z. Yuchi, "Structural Insight Into Ryanodine Receptor Channelopathies.," *Front. Pharmacol.*, vol. 13, p. 897494, 2022, doi: 10.3389/fphar.2022.897494.
- [20] W. Guo *et al.*, "The EF-hand Ca2+ Binding Domain Is Not Required for Cytosolic Ca2+ Activation of the Cardiac Ryanodine Receptor.," *J. Biol. Chem.*, vol. 291, no. 5, pp. 2150–2160, Jan. 2016, doi: 10.1074/jbc.M115.693325.
- [21] I. I. Serysheva, "Structural insights into excitation-contraction coupling by electron cryomicroscopy," *Biochem.*, vol. 69, no. 11, pp. 1226–1232, 2004, doi: 10.1007/s10541-005-0068-5.
- [22] S. Sárközi, I. Komáromi, I. Jóna, and J. Almássy, "Lanthanides Report Calcium Sensor in the Vestibule of Ryanodine Receptor," *Biophys. J.*, vol. 112, no. 10, pp. 2127–2137, 2017, doi: 10.1016/j.bpj.2017.03.023.
- [23] J. S. Smith, R. Coronado, and G. Meissner, "Activation by Ca " and ATP and Modulation by Mg "," *J. Gen. Physiol.*, vol. 88, no. November, pp. 573–588, 1986.
- [24] R. Sitsapesan and A. J. Williams, "Gating of the native and purified cardiac SR Ca(2+)release channel with monovalent cations as permeant species," *Biophys. J.*, vol. 67, no. 4, pp. 1484–1494, 1994, doi: 10.1016/S0006-3495(94)80622-8.
- [25] R. H. Ashley and A. J. Williams, "Divalent cation activation and inhibition of single calcium release channels from sheep cardiac sarcoplasmic reticulum," *J. Gen. Physiol.*, vol. 95, no. 5, pp. 981–1005, 1990, doi: 10.1085/jgp.95.5.981.
- [26] S. Sarkozi, C. Szegedi, P. Szentesi, L. Csernoch, L. Kovacs, and I. Jona, "Regulation of the rat sarcoplasmic reticulum calcium release channel by calcium," *J. Muscle Res. Cell Motil.*, vol. 21, no. 2, pp. 131–138, 2000, doi: 10.1023/A:1005630321863.
- [27] J. E. C. Isaac N. Pessah, Andrew L. Waterhouse, "Ryanodine contracture muscle itself," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 128, no. 1, pp. 449–456, 1985.
- [28] T. R. Shannon, K. S. Ginsburg, and D. M. Bers, "Potentiation of fractional sarcoplasmic reticulum calcium release by total and free intra-sarcoplasmic reticulum calcium concentration," *Biophys. J.*, vol. 78, no. 1, pp. 334–343, 2000, doi: 10.1016/S0006-3495(00)76596-9.
- [29] V. Lukyanenko, I. Györke, and S. Györke, "Regulation of calcium release by calcium inside the sarcoplasmic reticulum in ventricular myocytes," *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, vol. 432, no. 6, pp. 1047–1054, 1996, doi: 10.1007/s004240050233.
- [30] P. P. Jones, W. Guo, and S. R. W. Chen, "Control of cardiac ryanodine receptor by sarcoplasmic reticulum luminal Ca2+," *J. Gen. Physiol.*, vol. 149, no. 9, pp. 867–875, 2017, doi: 10.1085/jgp.201711805.
- [31] A. Tripathy and G. Meissner, "Sarcoplasmic reticulum lumenal Ca2+ has access to cytosolic activation and inactivation sites of skeletal muscle Ca2+ release channel," *Biophys. J.*, vol. 70, no. 6, pp. 2600–2615, 1996, doi: 10.1016/S0006-3495(96)79831-4.

- [32] L. L. Ching, A. J. Williams, and R. Sitsapesan, "Evidence for Ca2+ activation and inactivation sites on the luminal side of the cardiac ryanodine receptor complex," *Circ. Res.*, vol. 87, no. 3, pp. 201–206, 2000, doi: 10.1161/01.RES.87.3.201.
- [33] R. Sitsapesan and A. J. Williams, "Regulation of current flow through ryanodine receptors by luminal Ca2+," *J. Membr. Biol.*, vol. 159, no. 3, pp. 179–185, 1997, doi: 10.1007/s002329900281.
- [34] F. F. Alexandre Fabiato, "Use of chlorotetracycline fluorescence to demonstrate Ca2+induced release of Ca2+ from the sarcoplasmic reticulum of skinned cardiac cells," *Nature*, vol. 281, pp. 146–148, 1979.
- [35] D. Jiang *et al.*, "RyR2 mutations linked to ventricular tachycardia and sudden death reduce the threshold for store-overload-induced Ca2+ release (SOICR)," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 35, pp. 13062–13067, 2004, doi: 10.1073/pnas.0402388101.
- [36] A. Fabiato, "Two kinds of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cardiac cells," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 311, pp. 245–262, 1991, doi: 10.1007/978-1-4615-3362-7_18.
- [37] H. Cheng, M. R. Lederer, W. J. Lederer, and M. B. Cannell, "Calcium sparks and [Ca2+]i waves in cardiac myocytes," *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.*, vol. 270, no. 1 39-1, 1996, doi: 10.1152/ajpcell.1996.270.1.c148.
- [38] A. Fabiato, "Simulated calcium current can both cause calcium loading in and trigger calcium release from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac purkinje cell," *J. Gen. Physiol.*, vol. 85, no. 2, pp. 291–320, 1985, doi: 10.1085/jgp.85.2.291.
- [39] D. R. Laver, "Regulation of the RyR channel gating by Ca2+ and Mg2+," *Biophys. Rev.*, vol. 10, no. 4, pp. 1087–1095, 2018, doi: 10.1007/s12551-018-0433-4.
- [40] L. Xu and G. Meissner, "Regulation of cardiac muscle Ca2+ release channel by sarcoplasmic reticulum lumenal Ca2+," *Biophys. J.*, vol. 75, no. 5, pp. 2302–2312, 1998, doi: 10.1016/S0006-3495(98)77674-X.
- [41] D. R. Laver, "Ca2+ stores regulate ryanodine receptor Ca2+ release channels via luminal and cytosolic Ca2+ sites," *Biophys. J.*, vol. 92, no. 10, pp. 3541–3555, 2007, doi: 10.1529/biophysj.106.099028.
- [42] D. R. Laver and B. N. Honen, "Luminal Mg2+, a key factor controlling RYR2-mediated Ca 2+ release: Cytoplasmic and luminal regulation modeled in a tetrameric channel," *J. Gen. Physiol.*, vol. 132, no. 4, pp. 429–446, 2008, doi: 10.1085/jgp.200810001.
- [43] D. Jiang *et al.*, "Reduced threshold for luminal Ca2+ activation of RyR1 underlies a causal mechanism of porcine malignant hyperthermia," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 30, pp. 20813–20820, 2008, doi: 10.1074/jbc.M801944200.
- [44] W. Chen *et al.*, "Reduced threshold for store overload-induced Ca2+ release is a common defect of RyR1 mutations associated with malignant hyperthermia and central core disease," *Biochem. J.*, vol. 474, no. 16, pp. 2749–2761, 2017, doi: 10.1042/BCJ20170282.
- [45] A. Herrmann-Frank and F. Lehmann-Horn, "Regulation of the purified Ca2+ release channel/ryanodine receptor complex of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by luminal calcium," *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, vol. 432, no. 1, pp. 155–157, 1996, doi: 10.1007/s004240050117.
- [46] R. Sitsapesan and A. J. Williams, "Cyclic ADP-ribose and related compounds activate sheep skeletal sarcoplasmic reticulum Ca2+ release channel," *Am. J. Physiol. Cell*

Physiol., vol. 268, no. 5 37-5, 1995, doi: 10.1152/ajpcell.1995.268.5.c1235.

- [47] A. J. W. R. Sitsapcsan, "The Gating of the Sheep Skeletal Sarcoplasmie Reticulum CaZ+-release Channel is Regulated by Luminal Ca z+," *J. Membr. Biol.*, vol. 146, pp. 133–144, 1994, doi: 10.1038/438577a.
- [48] M. Fill *et al.*, "Abnormal ryanodine receptor channels in malignant hyperthermia," *Biophys. J.*, vol. 57, no. 3, pp. 471–475, 1990, doi: 10.1016/S0006-3495(90)82563-7.
- [49] Q. Wang and M. Michalak, "Calsequestrin. Structure, function, and evolution," *Cell Calcium*, vol. 90, no. May, p. 102242, 2020, doi: 10.1016/j.ceca.2020.102242.
- [50] T. Kawasaki and M. Kasai, "Regulation of calcium channel in sarcoplasmic reticulum by calsequestrin," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 199, no. 3. pp. 1120–1127, 1994. doi: 10.1006/bbrc.1994.1347.
- [51] J. Qin *et al.*, "Ryanodine receptor luminal Ca2+ regulation: Swapping calsequestrin and channel isoforms," *Biophys. J.*, vol. 97, no. 7, pp. 1961–1970, 2009, doi: 10.1016/j.bpj.2009.07.030.
- [52] D. M. Bers, "Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 37, no. 2, pp. 417–429, 2004, doi: 10.1016/j.yjmcc.2004.05.026.
- [53] J. Qin *et al.*, "Luminal Ca2+ regulation of single cardiac ryanodine receptors: Insights provided by calsequestrin and its mutants," *J. Gen. Physiol.*, vol. 131, no. 4, pp. 325– 334, 2008, doi: 10.1085/jgp.200709907.
- [54] D. Terentyev *et al.*, "Protein-protein interactions between triadin and calsequestrin are involved in modulation of sarcoplasmic reticulum calcium release in cardiac myocytes," *J. Physiol.*, vol. 583, no. 1, pp. 71–80, 2007, doi: 10.1113/jphysiol.2007.136879.
- [55] N. Chopra *et al.*, "Modest reductions of cardiac calsequestrin increase sarcoplasmic reticulum Ca2+ leak independent of luminal Ca2+ and trigger ventricular arrhythmias in mice," *Circ. Res.*, vol. 101, no. 6, pp. 617–626, 2007, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.157552.
- [56] B. S. Launikonis, J. Zhou, L. Royer, T. R. Shannon, G. Brum, and E. Ríos, "Depletion 'skraps' and dynamic buffering inside the cellular calcium store," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 8, pp. 2982–2987, 2006, doi: 10.1073/pnas.0511252103.
- [57] B. S. Launikonis, J. Zhou, L. Royer, T. R. Shannon, G. Brum, and E. Ríos, "Confocal imaging of [Ca2+] in cellular organelles by SEER, shifted excitation and emission ratioing of fluorescence," *J. Physiol.*, vol. 567, no. 2, pp. 523–543, 2005, doi: 10.1113/jphysiol.2005.087973.
- [58] E. Ríos, B. S. Launikonis, L. Royer, G. Brum, and J. Zhou, "The elusive role of store depletion in the control of intracellular calcium release," *J. Muscle Res. Cell Motil.*, vol. 27, no. 5–7, pp. 337–350, 2006, doi: 10.1007/s10974-006-9082-5.
- [59] C. Kettlun, A. González, E. Ríos, and M. Fill, "Unitary Ca2+ current through mammalian cardiac and amphibian skeletal muscle ryanodine receptor channels under nearphysiological ionic conditions," *J. Gen. Physiol.*, vol. 122, no. 4, pp. 407–417, 2003, doi: 10.1085/jgp.200308843.
- [60] B. C. Knollmann *et al.*, "Casq2 deletion causes sarcoplasmic reticulum volume increase, premature Ca2+ release, and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia," *J. Clin. Invest.*, vol. 116, no. 9, pp. 2510–2520, 2006, doi: 10.1172/JCl29128.
- [61] H. Kong, P. P. Jones, A. Koop, L. Zhang, H. J. Duff, and S. R. W. Chen, "Caffeine

induces Ca2+ release by reducing the threshold for luminal Ca2+ activation of the ryanodine receptor," *Biochem. J.*, vol. 414, no. 3, pp. 441–452, 2008, doi: 10.1042/BJ20080489.

- [62] C. G. dos R. B. D. Hambly, "Responses of skeletal muscle fibres to lanthanide ions. Dependence of the twitch response on ionic radii," *Experientia*, vol. 33, pp. 1042–1044, 1977.
- [63] J. Gaburjakova, J. Almassy, and M. Gaburjakova, "Luminal addition of non-permeant Eu3+ interferes with luminal Ca2+ regulation of the cardiac ryanodine receptor," *Bioelectrochemistry*, vol. 132, p. 107449, 2020, doi: 10.1016/j.bioelechem.2019.107449.
- [64] D. R. Laver, "Coupled calcium release channels and their regulation by luminal and cytosolic ions," *Eur. Biophys. J.*, vol. 34, no. 5, pp. 359–368, 2005, doi: 10.1007/s00249-005-0483-y.
- [65] H. Ogawa, N. Kurebayashi, T. Yamazawa, and T. Murayama, "Regulatory mechanisms of ryanodine receptor/Ca2+ release channel revealed by recent advancements in structural studies," *J. Muscle Res. Cell Motil.*, vol. 42, no. 2, pp. 291–304, 2021, doi: 10.1007/s10974-020-09575-6.
- [66] S. E. O'Connell and F. J. Zurzola, "Rapid quantitative liquid chromatographic determination of caffeine levels in plasma after oral dosing," *J. Pharm. Sci.*, vol. 73, no. 7, pp. 1009–1011, 1984, doi: 10.1002/jps.2600730742.
- [67] M. Porta *et al.*, "Single ryanodine receptor channel basis of caffeine's action on Ca 2+ sparks," *Biophys. J.*, vol. 100, no. 4, pp. 931–938, 2011, doi: 10.1016/j.bpj.2011.01.017.
- [68] J. Gaburjakova and M. Gaburjakova, "Comparison of the effects exerted by luminal Ca2+ on the sensitivity of the cardiac ryanodine receptor to caffeine and cytosolic Ca 2+," J. Membr. Biol., vol. 212, no. 1, pp. 17–28, 2006, doi: 10.1007/s00232-006-7018z.
- [69] J. V. Greiner and T. Glonek, "Intracellular ATP Concentration and Implication for Cellular Evolution," *Biology (Basel).*, vol. 10, no. 1166, pp. 1–10, 2021, doi: 10.1002/9780470986363.ch4.
- [70] W. M. Chan, W. Welch, and R. Sitsapesan, "Structural factors that determine the ability of adenosine and related compounds to activate the cardiac ryanodine receptor," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 130, no. 7, pp. 1618–1626, 2000, doi: 10.1038/sj.bjp.0703459.
- [71] G. Meissner, "Adenine nucleotide stimulation of Ca2+-induced Ca2+ release in sarcoplasmic reticulum," J. Biol. Chem., vol. 259, no. 4, pp. 2365–2374, 1984, doi: 10.1016/s0021-9258(17)43361-8.
- [72] L. Xu, G. Mann, and G. Meissner, "Regulation of cardiac Ca2+ release channel (ryanodine receptor) by Ca2+, H+, Mg2+, and adenine nucleotides under normal and simulated ischemic conditions," *Circ. Res.*, vol. 79, no. 6, pp. 1100–1109, 1996, doi: 10.1161/01.RES.79.6.1100.
- [73] "STRING adatbázis." https://version-12-0.stringdb.org/cgi/network?taskId=bfv0qpTiouAO&sessionId=bdJKfEbML8HV
- [74] G. Meissner, "The structural basis of ryanodine receptor ion channel function," *J. Gen. Physiol.*, vol. 149, no. 12, pp. 1065–1089, 2017, doi: 10.1085/jgp.201711878.
- [75] L. A. Gonano and P. P. Jones, "FK506-binding proteins 12 and 12.6 (FKBPs) as regulators of cardiac Ryanodine Receptors: Insights from new functional and structural knowledge," *Channels*, vol. 11, no. 5, pp. 415–425, 2017, doi:

10.1080/19336950.2017.1344799.

- [76] M. Gaburjakova *et al.*, "FKBP12 Binding Modulates Ryanodine Receptor Channel Gating," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 20, pp. 16931–16935, 2001, doi: 10.1074/jbc.M100856200.
- [77] S. O. Marx *et al.*, "PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): Defective regulation in failing hearts," *Cell*, vol. 101, no. 4, pp. 365–376, 2000, doi: 10.1016/S0092-8674(00)80847-8.
- [78] R. A. Newman, B. R. Sorensen, A. M. Kilpatrick, and M. A. Shea, "Calcium-dependent energetics of calmodulin domain interactions with regulatory regions of the Ryanodine Receptor Type 1 (RyR1)," *Biophys. Chem.*, vol. 193–194, pp. 35–49, 2014, doi: 10.1016/j.bpc.2014.07.004.
- [79] X. Ai, J. W. Curran, T. R. Shannon, D. M. Bers, and S. M. Pogwizd, "Ca2+/calmodulindependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca2+ leak in heart failure," *Circ. Res.*, vol. 97, no. 12, pp. 1314– 1322, 2005, doi: 10.1161/01.RES.0000194329.41863.89.
- [80] J. Suko *et al.*, "Phosphorylation of serine 2843 in ryanodine receptor-calcium release channel of skeletal muscle by cAMP-, cGMP- and CaM-dependent protein kinase," *BBA* - *Mol. Cell Res.*, vol. 1175, no. 2, pp. 193–206, 1993, doi: 10.1016/0167-4889(93)90023-I.
- [81] S. G. Priori and C. Napolitano, "Cardiac and skeletal muscle disorders caused by mutations in the intracellular Ca2+ release channels," *J. Clin. Invest.*, vol. 115, no. 8, pp. 2033–2038, 2005, doi: 10.1172/JCI25664.
- [82] "The Human Gene Mutation Database RyR1 gene." https://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=RYR1
- [83] V. Bauerová-Hlinková, D. Hajdúchová, and J. A. Bauer, "Structure and Function of the Human Ryanodine Receptors and Their Association with Myopathies—Present State, Challenges, and Perspectives," *Molecules*, vol. 25, no. 18, pp. 1–29, 2020, doi: 10.3390/molecules25184040.
- [84] "The Human Gene Mutation Database RyR2 gene." https://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=RYR2
- [85] N. Szentandrássy, Z. Magyar, J. Hevesi, T. Bányász, P. P. Nánási, and J. Almássy, "Therapeutic Approaches of Ryanodine Receptor-Associated Heart Diseases," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 8, 2022, doi: 10.3390/ijms23084435.
- [86] M. J. Betzenhauser and A. R. Marks, "Ryanodine receptor channelopathies," *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, vol. 460, no. 2, pp. 467–480, 2010, doi: 10.1007/s00424-010-0794-4.
- [87] "OMIM Malignant hyperthermia susceptibility 1." https://www.omim.org/entry/145600
- [88] X. Bin, B. Wang, and Z. Tang, "Malignant Hyperthermia: A Killer If Ignored," J. Perianesthesia Nurs., vol. 37, no. 4, pp. 435–444, 2022, doi: 10.1016/j.jopan.2021.08.018.
- [89] "OMIM Malignant hyperthermia susceptibility 1."
- [90] H. Rosenberg, N. Pollock, A. Schiemann, T. Bulger, and K. Stowell, "Malignant hyperthermia: a review," Orphanet J. Rare Dis., vol. 10, no. 1, pp. 1–19, 2015, doi: 10.1186/s13023-015-0310-1.
- [91] X. Bin, B. Wang, and Z. Tang, "Malignant Hyperthermia: A Killer If Ignored," J.

Perianesthesia Nurs., vol. 37, no. 4, pp. 435–444, 2022, doi: 10.1016/j.jopan.2021.08.018.

- [92] H. Rosenberg, N. Pollock, A. Schiemann, T. Bulger, and K. Stowell, "Malignant hyperthermia: a review," Orphanet J. Rare Dis., vol. 10, no. 1, pp. 1–19, 2015, doi: 10.1186/s13023-015-0310-1.
- [93] H. J. Wang *et al.*, "Adaptive thermogenesis enhances the life-threatening response to heat in mice with an Ryr1 mutation.," *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, p. 5099, Oct. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-18865-z.
- [94] M. Sztretye et al., "From Mice to Humans: An Overview of the Potentials and Limitations of Current Transgenic Mouse Models of Major Muscular Dystrophies and Congenital Myopathies.," Int. J. Mol. Sci., vol. 21, no. 23, Nov. 2020, doi: 10.3390/ijms21238935.
- [95] J. M. Eltit *et al.*, "Malignant hyperthermia susceptibility arising from altered resting coupling between the skeletal muscle L-type Ca2+ channel and the type 1 ryanodine receptor," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 20, pp. 7923–7928, 2012, doi: 10.1073/pnas.1119207109.
- [96] S. Riazi, N. Kraeva, and P. M. Hopkins, "Malignant Hyperthermia in the Post-Genomics Era: New Perspectives on an Old Concept," *Anesthesiology*, vol. 128, no. 1, pp. 168– 180, 2018, doi: 10.1097/ALN.00000000001878.
- [97] D. A. Eisner, T. Kashimura, S. C. O'Neill, L. A. Venetucci, and A. W. Trafford, "What role does modulation of the ryanodine receptor play in cardiac inotropy and arrhythmogenesis?," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 46, no. 4, pp. 474–481, 2009, doi: 10.1016/j.yjmcc.2008.12.005.
- [98] M. E. Díaz, H. K. Graham, and A. W. Trafford, "Enhanced sarcolemmal Ca2+ efflux reduces sarcoplasmic reticulum Ca2+ content and systolic Ca2+ in cardiac hypertrophy," *Cardiovasc. Res.*, vol. 62, no. 3, pp. 538–547, 2004, doi: 10.1016/j.cardiores.2004.01.038.
- [99] L. A. Venetucci, A. W. Trafford, S. C. O'Neill, and D. A. Eisner, "Na/Ca exchange: Regulator of intracellular calcium and source of arrhythmias in the heart," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1099, pp. 315–325, 2007, doi: 10.1196/annals.1387.033.
- [100] L. A. Venetucci, A. W. Trafford, S. C. O'Neill, and D. A. Eisner, "The sarcoplasmic reticulum and arrhythmogenic calcium release," *Cardiovasc. Res.*, vol. 77, no. 2, pp. 285–292, 2008, doi: 10.1093/cvr/cvm009.
- [101] N. Liu, C. Napolitano, and S. G. Priori, "Mutations in the Cardiac Ryanodine Receptor Gene (hRyR2) Underlie Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia," *Electr. Dis. Hear. Vol. 1 Basic Found. Prim. Electr. Dis.*, pp. 551–560, 2013, doi: 10.1007/978-1-4471-4881-4_31.
- [102] C. H. George, G. V. Higgs, and F. A. Lai, "Ryanodine receptor mutations associated with stress-induced ventricular tachycardia mediate increased calcium release in stimulated cardiomyocytes," *Circ. Res.*, vol. 93, no. 6, pp. 531–540, 2003, doi: 10.1161/01.RES.0000091335.07574.86.
- [103] H. Uchinoumi *et al.*, "Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia is caused by mutation-linked defective conformational regulation of the ryanodine receptor," *Circ. Res.*, vol. 106, no. 8, pp. 1413–1424, 2010, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.209312.
- [104] S. G. Priori and S. R. W. Chen, "Inherited dysfunction of sarcoplasmic reticulum Ca2+ handling and arrhythmogenesis," *Circ. Res.*, vol. 108, no. 7, pp. 871–883, 2011, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.226845.

- [105] D. Jiang *et al.*, "Enhanced store overload-induced Ca2+ release and channel sensitivity to luminal Ca2+ activation are common defects of RyR2 mutations linked to ventricular tachycardia and sudden death," *Circ. Res.*, vol. 97, no. 11, pp. 1173–1181, 2005, doi: 10.1161/01.RES.0000192146.85173.4b.
- [106] X. H. T. Wehrens *et al.*, "FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death," *Cell*, vol. 113, no. 7, pp. 829–840, 2003, doi: 10.1016/S0092-8674(03)00434-3.
- [107] T. Guo *et al.*, "Kinetics of FKBP12.6 binding to ryanodine receptors in permeabilized cardiac myocytes and effects on Ca sparks," *Circ. Res.*, vol. 106, no. 11, pp. 1743– 1752, 2010, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.219816.
- [108] B. Xiao, C. Sutherland, M. P. Walsh, and S. R. W. Chen, "Protein Kinase A Phosphorylation at Serine-2808 of the Cardiac Ca 2+-Release Channel (Ryanodine Receptor) Does Not Dissociate 12.6-kDa FK506-Binding Protein (FKBP12.6)," *Circ. Res.*, vol. 94, no. 4, pp. 487–495, 2004, doi: 10.1161/01.RES.0000115945.89741.22.
- [109] B. Xiao *et al.*, "Characterization of a novel PKA phosphorylation site, serine-2030, reveals no PKA hyperphosphorylation of the cardiac ryanodine receptor in canine heart failure," *Circ. Res.*, vol. 96, no. 8, pp. 847–855, 2005, doi: 10.1161/01.RES.0000163276.26083.e8.
- [110] M. T. Jiang, A. J. Lokuta, E. F. Farrell, M. R. Wolff, R. A. Haworth, and H. H. Valdivia, "Abnormal Ca2+ release, but normal ryanodine receptors, in canine and human heart failure," *Circ. Res.*, vol. 91, no. 11, pp. 1015–1022, 2002, doi: 10.1161/01.RES.0000043663.08689.05.
- [111] M. Stange, L. Xu, D. Balshaw, N. Yamaguchi, and G. Meissner, "Characterization of Recombinant Skeletal Muscle (Ser-2843) and Cardiac Muscle (Ser-2809) Ryanodine Receptor Phosphorylation Mutants," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 51, pp. 51693–51702, 2003, doi: 10.1074/jbc.M310406200.
- [112] J. Xiao et al., "Removal of FKBP12.6 does not alter the conductance and activation of the cardiac ryanodine receptor or the susceptibility to stress-induced ventricular arrhythmias," J. Biol. Chem., vol. 282, no. 48, pp. 34828–34838, 2007, doi: 10.1074/jbc.M707423200.
- [113] "Országos Gyógyszerészeti és Élelmezés-egészségügyi Intézet Dantrolen por oldatos infúzióhoz." https://ogyei.gov.hu/gyogyszeradatbazis&action=show_details&item=15827
- [114] K. P. E. Glahn *et al.*, "Availability of dantrolene for the management of malignant hyperthermia crises: European Malignant Hyperthermia Group guidelines," *Br. J. Anaesth.*, vol. 125, no. 2, pp. 133–140, 2020, doi: 10.1016/j.bja.2020.04.089.
- [115] "EMC Dantrolene capsules." https://www.medicines.org.uk/emc/product/1098/pil#gref
- [116] P. Szentesi *et al.*, "Effects of dantrolene on steps of excitation-contraction coupling in mammalian skeletal muscle fibers," *J. Gen. Physiol.*, vol. 118, no. 4, pp. 355–375, 2001, doi: 10.1085/jgp.118.4.355.
- [117] P. L. Diaz-Sylvester, M. Porta, and J. A. Copello, "Halothane modulation of skeletal muscle ryanodine receptors: Dependence on Ca2+, Mg2+, and ATP," *Am. J. Physiol. -Cell Physiol.*, vol. 294, no. 4, 2008, doi: 10.1152/ajpcell.90642.2007.
- [118] L. E. Wagner, L. A. Groom, R. T. Dirksen, and D. I. Yule, "Characterization of ryanodine receptor type 1 single channel activity using 'on-nucleus' patch clamp," *Cell Calcium*, vol. 56, no. 2, pp. 96–107, 2014, doi: 10.1016/j.ceca.2014.05.004.

- [119] K. Paul-Pletzer *et al.*, "Identification of a dantrolene-binding sequence on the skeletal muscle ryanodine receptor," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 38, pp. 34918–34923, 2002, doi: 10.1074/jbc.M205487200.
- [120] S. S. Palnitkar, J. R. Mickelson, C. F. Louis, and J. Parness, "Pharmacological distinction between dantrolene and ryanodine binding sites: Evidence from normal and malignant hyperthermia-susceptible porcine skeletal muscle," *Biochem. J.*, vol. 326, no. 3, pp. 847–852, 1997, doi: 10.1042/bj3260847.
- [121] S. S. Palnitkar *et al.*, "[3H]Azidodantrolene: Synthesis and Use in Identification of a Putative Skeletal Muscle Dantrolene Binding Site in Sarcoplasmic Reticulum," *J. Med. Chem.*, pp. 1872–1880, 1999.
- [122] K. Paul-Pletzer, S. S. Palnitkar, L. S. Jimenez, H. Morimoto, and J. Parness, "The skeletal muscle ryanodine receptor identified as a molecular target of [3H]azidodantrolene by photoaffinity labeling," *Biochemistry*, vol. 40, no. 2, pp. 531–542, 2001, doi: 10.1021/bi001502s.
- [123] S. Kobayashi, M. L. Bannister, J. P. Gangopadhyay, T. Hamada, J. Parness, and N. Ikemoto, "Dantrolene stabilizes domain interactions within the ryanodine receptor," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 8, pp. 6580–6587, 2005, doi: 10.1074/jbc.M408375200.
- [124] N. Ikemoto and T. Yamamoto, "Regulation of calcium release by interdomain interaction within ryanodine receptors," *Front. Biosci.*, no. 5, pp. 671–683, 2002.
- [125] C. C. Tung, P. A. Lobo, L. Kimlicka, and F. Van Petegem, "The amino-terminal disease hotspot of ryanodine receptors forms a cytoplasmic vestibule," *Nature*, vol. 468, no. 7323, pp. 585–588, 2010, doi: 10.1038/nature09471.
- [126] B. R. Fruen, J. R. Mickelson, and C. F. Louis, "Dantrolene inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca2+ release by direct and specific action at skeletal muscle ryanodine receptors," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 43, pp. 26965–26971, 1997, doi: 10.1074/jbc.272.43.26965.
- [127] D. M. Roden and B. C. Knollmann, "Dantrolene: From better bacon to a treatment for ventricular fibrillation," *Circulation*, vol. 129, no. 8, pp. 834–836, 2014, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007657.
- [128] J. T. Maxwell, T. L. Domeier, and L. A. Blatter, "Dantrolene prevents arrhythmogenic Ca 2+ release in heart failure," *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.*, vol. 302, no. 4, pp. 953–963, 2012, doi: 10.1152/ajpheart.00936.2011.
- [129] S. Kobayashi *et al.*, "Dantrolene, a Therapeutic Agent for Malignant Hyperthermia, Markedly Improves the Function of Failing Cardiomyocytes by Stabilizing Interdomain Interactions Within the Ryanodine Receptor," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 53, no. 21, pp. 1993–2005, 2009, doi: 10.1016/j.jacc.2009.01.065.
- [130] S. Kobayashi *et al.*, "Dantrolene, a therapeutic agent for malignant hyperthermia, inhibits catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in a RyR2R2474S/+ knock-in mouse model," *Circ. J.*, vol. 74, no. 12, pp. 2579–2584, 2010, doi: 10.1253/circj.CJ-10-0680.
- [131] N. Zamiri *et al.*, "Dantrolene improves survival after ventricular fibrillation by mitigating impaired calcium handling in animal models," *Circulation*, vol. 129, no. 8, pp. 875–885, 2014, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.005443.
- [132] C. B. Jung *et al.*, "Dantrolene rescues arrhythmogenic RYR2 defect in a patient-specific stem cell model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia," *EMBO Mol. Med.*, vol. 4, no. 3, pp. 180–191, 2012, doi: 10.1002/emmm.201100194.

- [133] N. Hartmann *et al.*, "Antiarrhythmic effects of dantrolene in human diseased cardiomyocytes," *Hear. Rhythm*, vol. 14, no. 3, pp. 412–419, 2017, doi: 10.1016/j.hrthm.2016.09.014.
- [134] K. Paul-Pletzer *et al.*, "Probing a putative dantrolene-binding site on the cardiac ryanodine receptor," *Biochem. J.*, vol. 387, no. 3, pp. 905–909, 2005, doi: 10.1042/BJ20041336.
- [135] M. Ono *et al.*, "Dissociation of calmodulin from cardiac ryanodine receptor causes aberrant Ca2+ release in heart failure," *Cardiovasc. Res.*, vol. 87, no. 4, pp. 609–617, 2010, doi: 10.1093/cvr/cvq108.
- [136] T. Kajii *et al.*, "Dantrolene prevents ventricular tachycardia by stabilizing the ryanodine receptor in pressure- overload induced failing hearts," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 521, no. 1, pp. 57–63, 2020, doi: 10.1016/j.bbrc.2019.10.071.
- [137] R. H. Choi, X. Koenig, and B. S. Launikonis, "Dantrolene requires Mg2+ to arrest malignant hyperthermia," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 114, no. 18, pp. 4811– 4815, 2017, doi: 10.1073/pnas.1619835114.
- [138] J. W.H.Schymkowitz, F. Rousseau, I. C. M. Martins, J. Ferkinghoff-Borg, F. Stricher, and L. Serrano, "Prediction of water and metal binding sites and their affinities by using the Fold-X force field," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 29, pp. 10147–10152, 2005, doi: 10.1073/pnas.0501980102.
- [139] D. J. Sindhikara, N. Yoshida, and F. Hirata, "Placevent: An algorithm for prediction of explicit solvent atom distribution-Application to HIV-1 protease and F-ATP synthase," J. Comput. Chem., vol. 33, no. 18, pp. 1536–1543, 2012, doi: 10.1002/jcc.22984.
- [140] X. Hu, Q. Dong, J. Yang, and Y. Zhang, "Recognizing metal and acid radical ion-binding sites by integrating ab initio modeling with template-based transferals," *Bioinformatics*, vol. 32, no. 21, pp. 3260–3269, 2016, doi: 10.1093/bioinformatics/btw396.
- [141] Y. F. Lin, C. W. Cheng, C. S. Shih, J. K. Hwang, C. S. Yu, and C. H. Lu, "MIB: Metal Ion-Binding Site Prediction and Docking Server," *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 56, no. 12, pp. 2287–2291, 2016, doi: 10.1021/acs.jcim.6b00407.
- [142] M. Littmann, M. Heinzinger, C. Dallago, K. Weissenow, and B. Rost, "Protein embeddings and deep learning predict binding residues for various ligand classes," *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–15, 2021, doi: 10.1038/s41598-021-03431-4.
- [143] Z. Yan *et al.*, "Structure of the rabbit ryanodine receptor RyR1 at near-atomic resolution," *Nature*, vol. 517, no. 7532, pp. 50–55, 2015, doi: 10.1038/nature14063.
- [144] X. C. Bai, Z. Yan, J. Wu, Z. Li, and N. Yan, "The Central domain of RyR1 is the transducer for long-range allosteric gating of channel opening," *Cell Res.*, vol. 26, no. 9, pp. 995–1006, 2016, doi: 10.1038/cr.2016.89.
- [145] R. Ma *et al.*, "Structural basis for diamide modulation of ryanodine receptor," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 16, no. 11, pp. 1246–1254, 2020, doi: 10.1038/s41589-020-0627-5.
- [146] K. A. Iyer, Y. Hu, T. Klose, T. Murayama, and M. Samsó, "Molecular mechanism of the severe MH/CCD mutation Y522S in skeletal ryanodine receptor (RyR1) by cryo-EM," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 119, no. 30, pp. 1–11, 2022, doi: 10.1073/pnas.2122140119.
- [147] A. R. Nayak and M. Samsó, "Ca2+ inactivation of the mammalian ryanodine receptor type 1 in a lipidic environment revealed by cryo-EM," *Elife*, vol. 11, pp. 1–25, 2022, doi: 10.7554/eLife.75568.

- [148] Z. Melville *et al.*, "A drug and ATP binding site in type 1 ryanodine receptor.," *Structure*, vol. 30, no. 7, pp. 1025-1034.e4, Jul. 2022, doi: 10.1016/j.str.2022.04.010.
- [149] J. P. Koski *et al.*, "Water in an External Electric Field: Comparing Charge Distribution Methods Using ReaxFF Simulations.," *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 18, no. 1, pp. 580–594, Jan. 2022, doi: 10.1021/acs.jctc.1c00975.
- [150] P. Li, L. F. Song, and K. M. Merz, "Parameterization of highly charged metal ions using the 12-6-4 LJ-type nonbonded model in explicit water," *J. Phys. Chem. B*, vol. 119, no. 3, pp. 883–895, 2015, doi: 10.1021/jp505875v.
- [151] J. B. Lansman, "Blockade of current through single calcium channels by trivalent lanthanide cations: Effea of ionic raztius on the rates of ion entry and exit," *J. Gen. Physiol.*, vol. 95, no. 4, pp. 679–696, 1990, doi: 10.1085/jgp.95.4.679.
- [152] W. Feng *et al.*, "Functional and biochemical properties of ryanodine receptor type 1 channels from heterozygous R163C malignant hyperthermia-susceptible mice," *Mol. Pharmacol.*, vol. 79, no. 3, pp. 420–431, 2011, doi: 10.1124/mol.110.067959.
- [153] M. G. Chelu *et al.*, "Heat- and anesthesia-induced malignant hyperthermia in an RyR1 knock-in mouse.," *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 20, no. 2, pp. 329–330, Feb. 2006, doi: 10.1096/fj.05-4497fje.
- [154] D. Jiang, W. Chen, R. Wang, L. Zhang, and S. R. W. Chen, "Loss of luminal Ca2+ activation in the cardiac ryanodine receptor is associated with ventricular fibrillation and sudden death," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 46, pp. 18309–18314, 2007, doi: 10.1073/pnas.0706573104.
- [155] D. H. MacLennan and M. S. Phillips, "Malignant hyperthermia.," *Science*, vol. 256, no. 5058, pp. 789–794, May 1992, doi: 10.1126/science.1589759.
- [156] J. T. Lanner *et al.*, "AICAR prevents heat-induced sudden death in RyR1 mutant mice independent of AMPK activation.," *Nat. Med.*, vol. 18, no. 2, pp. 244–251, Jan. 2012, doi: 10.1038/nm.2598.
- [157] J. Gaburjakova and M. Gaburjakova, "Cardiac ryanodine receptor: Selectivity for alkaline earth metal cations points to the EF-hand nature of luminal binding sites," *Bioelectrochemistry*, vol. 109, pp. 49–56, 2016, doi: 10.1016/j.bioelechem.2016.01.002.
- [158] L. Gao, D. Balshaw, L. Xu, A. Tripathy, C. Xin, and G. Meissner, "Evidence for a role of the lumenal M3-M4 loop in skeletal muscle Ca2+ release channel (ryanodine receptor) activity and conductance," *Biophys. J.*, vol. 79, no. 2, pp. 828–840, 2000, doi: 10.1016/S0006-3495(00)76339-9.
- [159] Y. Wang, L. Xu, D. A. Pasek, D. Gillespie, and G. Meissner, "Probing the role of negatively charged amino acid residues in ion permeation of skeletal muscle ryanodine receptor," *Biophys. J.*, vol. 89, no. 1, pp. 256–265, 2005, doi: 10.1529/biophysj.104.056002.
- [160] L. P. Heinz, W. Kopec, B. L. De Groot, and R. H. A. Fink, "In silico assessment of the conduction mechanism of the Ryanodine Receptor 1 reveals previously unknown exit pathways," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–12, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-25061-z.
- [161] D. Gillespie, "Energetics of divalent selectivity in a calcium channel: The ryanodine receptor case study," *Biophys. J.*, vol. 94, no. 4, pp. 1169–1184, 2008, doi: 10.1529/biophysj.107.116798.
- [162] A. P. Ziman, C. W. Ward, G. G. Rodney, W. J. Lederer, and R. J. Bloch, "Quantitative measurement of Ca²(+) in the sarcoplasmic reticulum lumen of mammalian skeletal muscle.," *Biophys. J.*, vol. 99, no. 8, pp. 2705–2714, Oct. 2010, doi:

10.1016/j.bpj.2010.08.032.

- [163] Y. W. Oo *et al.*, "Essential role of calmodulin in RyR inhibition by dantrolene," *Mol. Pharmacol.*, vol. 88, no. 1, pp. 57–63, 2015, doi: 10.1124/mol.115.097691.
- [164] T. Yamamoto and N. Ikemoto, "Spectroscopic monitoring of local conformational changes during the intramolecular domain-domain interaction of the ryanodine receptor," *Biochemistry*, vol. 41, no. 5, pp. 1492–1501, 2002, doi: 10.1021/bi015581z.
- [165] S. Kobayashi, T. Yamamoto, J. Parness, and N. Ikemoto, "Antibody probe study of Ca2+ channel regulation by interdomain interaction within the ryanodine receptor," *Biochem. J.*, vol. 380, no. 2, pp. 561–569, 2004, doi: 10.1042/BJ20040112.
- [166] R. G. Efremov, A. Leitner, R. Aebersold, and S. Raunser, "Architecture and conformational switch mechanism of the ryanodine receptor," *Nature*, vol. 517, no. 7532, pp. 39–43, 2015, doi: 10.1038/nature13916.
- [167] R. Zalk *et al.*, "Structure of a mammalian ryanodine receptor," *Nature*, vol. 517, no. 7532, pp. 44–49, 2015, doi: 10.1038/nature13950.
- [168] S. C. Cannon, "Mind the magnesium, in dantrolene suppression of malignant hyperthermia.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 114, no. 18, pp. 4576–4578, May 2017, doi: 10.1073/pnas.1704103114.
- [169] "https://memorang.com/flashcards/54338/FGUnit+2+Muscle."
- [170] F. Protasi, "STRUCTURAL INTERACTION BETWEEN RYRS AND DHPRS IN CALCIUM RELEASE UNITS OF CARDIAC," *Front. Biosci.*, pp. 650–658, 2002.
- [171] G. Santulli, D. Lewis, A. des Georges, A. R. Marks, and J. Frank, "Ryanodine Receptor Structure and Function in Health and Disease.," *Subcell. Biochem.*, vol. 87, pp. 329– 352, 2018, doi: 10.1007/978-981-10-7757-9_11.
- [172] V. R. Chirasani, D. A. Pasek, and G. Meissner, "Structural and functional interactions between the Ca(2+)-, ATP-, and caffeine-binding sites of skeletal muscle ryanodine receptor (RyR1).," J. Biol. Chem., vol. 297, no. 3, p. 101040, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.jbc.2021.101040.
- [173] "National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 6604100, Dantrolene sodium." https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dantrolene-sodium.

X. TÁRGYSZAVAK

harántcsíkolt izom rianodin receptor rianopátia malignus hipertermia szindróma katekolaminerg polimorf ventrikuláris tachycardia dantrolen európium single-channel áram bilayer technika

XI. KEYWORDS

striated muscle ryanodine receptor ryanopathy malignant hyperthermia syndrome catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia dantrolene europium single-channel current bilayer technique

XII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet kollégáim, családom és barátaim irányába, akik nélkül ez a disszertáció nem készülhetett volna el.

Köszönetet szeretnék mondani Témavezetőmnek, *Dr. Almássy János*nak, hogy bevezetett a kutatás világába. Köszönöm a sok segítséget, szakmai iránymutatást és hogy mint kutatóra mindig példaképként tekinthettem rá. Az általa képviselt szakmai elveket a jövőben is szem előtt fogom tartani.

Köszönettel tartozom *Prof. Dr. Csernoch Lászlónak*, az Élettani Intézet Igazgatójának és a Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola vezetőjének, hogy Intézetében biztosította a szükséges feltételeket, és hogy kérdéseimmel bármikor fordulhattam hozzá. Támogató segítsége sokat jelentett a PhD-s éveim során.

Köszönöm *Dr. Jóna István* Tanár Úrnak a szakmai segítséget, és biztató szavakat. Minden találkozásunk motivációval töltött fel, ami sokszor segített túllendülni a nehezebb időszakokon.

Hálával tartozom PhD-s társaimnak: *Csemer Andreá*nak, *Dr. Hevesi Judit*nak, *Szabó László*nak, *Dr. Kovács Zsigmond*nak és *Dr. Diszházi Gyulá*nak, akikkel a közös munka (és kikapcsolódás is) vidáman telt.

A disszertációm alapjául szolgáló közlemények nem készülhettek volna el hazai és külföldi kollaborációs partnereink nélkül. Köszönöm *Dr. Mótyán János*nak, *Dr. Jacob Bauer*nek, *Dr. Vladena Bauerová-Hlinková*nak a RyR szerkezeti analízisben nyújtott segítségét. Köszönettel tartozom továbbá *Prof. Dr. Nánási Péter Pál*nak, aki szakmailag és anyagilag is támogatta a laborban folyó kutatómunkát. Köszönöm *Dr. Szentesi Péter, Dr. Jana Gaburjakova*nak és *Dr. Marta Gaburjakova* a szakmai segítségét.

Köszönöm a laboratóriumban nyújtott technikai segítségét *Sági Évá*nak és *Lövei Tamará*nak. Köszönöm a sok segítségét *Orosz József*nek, *Pongor Ildikó*nak és *Kiss Gyuláné Csillá*nak is.

Hálával tartozom az Élettani Intézet valamennyi munkatársának a közös munkáért és segítségért.

Végül, de nem utolsó sorban, a Családomnak szeretnék köszönetet mondani, akik lehetővé tették egyetemi tanulmányaimat. Hálás vagyok a Szüleimnek és Húgomnak, akik az évek során mindig mellettem álltak, támogattak, biztattak. Köszönöm a Páromnak, *Dr. Dienes Csaba Bálint*nak, hogy mindig számíthattam rá, és hogy együtt jártuk végig a PhD képzés (olykor) rögös útjait.

XIII. FÜGGELÉK

Az értekezést megalapozó közlemények gyűjteménye



Nyilvántartási szám: Tárgy: DEENK/372/2023.PL PhD Publikációs Lista

Jelölt: Magyar Zsuzsanna Édua Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola MTMT azonosító: 10068101

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

 Magyar, Z. É., Bauer, J., Bauerová-Hlinková, V., Jóna, I., Gaburjakova, J., Gaburjakova, M., Almássy, J.: Eu3+ detects two functionally distinct luminal Ca2+ binding sites in ryanodine receptors.

Biophys. J. [Epub ahead of print], 2023. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2023.07.029 IF: 3.4 (2022)

2. Diszházi, G.,* Magyar, Z. É.*, Mótyán, J. A., Csernoch, L., Jóna, I., Nánási, P. P., Almássy, J.: Dantrolene Requires Mg2+ and ATP To Inhibit the Ryanodine Receptor. *Mol. Pharmacol.* 96 (3), 401-407, 2019. DOI: http://dx.doi.org/10.1124/mol.119.116475
* These authors contributed equally this work. IF: 3.664

További közlemények

- 3. Szentandrássy, N., Magyar, Z. É., Gyöngyösiné Hevesi, J., Bányász, T., Nánási, P. P., Almássy, J.: Therapeutic Approaches of Ryanodine Receptor-Associated Heart Diseases. Int. J. Mol. Sci. 23 (8), 4435, 2022.
 DOI: http://dx.doi.org/10.3390/ijms23084435
 IF: 5.6
- 4. Diszházi, G., Magyar, Z. É., Lisztes, E., Tóth-Molnár, E., Nánási, P. P., Vennekens, R., Tóth J. B., Almássy, J.: TRPM4 links calcium signaling to membrane potential in pancreatic acinar cells. *J. Biol. Chem.* 297 (3), 101015, 2021.
 DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101015 IF: 5.486



- Skaliczki, M., Lukács, B., Magyar, Z. É., Kovács, T., Bárdi, M., Novák, S., Diszházi, G., Sárközi, S., Márton, I., Péli-Szabó, J., Jóna, I., Nánási, P. P., Almássy, J.: 4-chloro-orto-cresol activates ryanodine receptor more selectively and potently than 4-chloro-meta-cresol. *Cell Calcium.* 88, 102213, 2020. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102213 IF: 6.817
- Sztretye, M., Szabó, L., Dobrosi, N., Fodor, J., Szentesi, P., Almássy, J., Magyar, Z. É., Dienes, B., Csernoch, L.: From Mice to Humans: an Overview of the Potentials and Limitations of Current Transgenic Mouse Models of Major Muscular Dystrophies and Congenital Myopathies.

Int. J. Mol. Sci. 21 (23), 8935, 2020. DOI: http://dx.doi.org/10.3390/ijms21238935 IF: 5.924

- 7. Almássy, J., Diszházi, G., Skaliczki, M., Márton, I., Magyar, Z. É., Nánási, P. P., Yule, D. I.: Expression of BK channels and Na+-K+ pumps in the apical membrane of lacrimal acinar cells suggests a new molecular mechanism for primary tear-secretion. *Ocul. Surf.* 17 (2), 272-277, 2019. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.jtos.2019.01.007 IF: 12.336
- 8. Magyar, Z. É., Diszházi, G., Péli-Szabó, J., Szentesi, P., Collet, C., Csernoch, L., Nánási, P. P., Almássy, J.: The diamide insecticide chlorantraniliprole increases the single-channel current activity of the mammalian skeletal muscle ryanodine receptor. *Gen. Physiol. Biophys.* 38 (2), 183-186, 2019. DOI: http://dx.doi.org/10.4149/gpb_2019007 IF: 1.07

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 44,297 A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 7,064

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2023.08.16.