

**A VÁZIZOMGYENGESÉG ÉS A RIANODIN RECEPTOR
KAPCSOLATA KRÓNIKUS SZÍVELÉGTELENSÉGBEN**

Almássy János



Témavezető: Dr Jóna István

DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
ÉLETTANI INTÉZET

1. BEVEZETÉS

Az izomkutatás története Galvani 18. századi kísérletéig nyúlik vissza, amikor egy viharos nyári éjszakán egy kipreparált békalábhoz futó gerincvelői ideget egy hosszú, vékony dróttal hosszabbított meg, amit kivezetett a szabadba. Várakozásának megfelelően villámláskor a békaláb erősen összerándult. Azóta a téma önálló tudományággá fejlődött, melyen belül az izomműködés egyik meghatározó lépése, az elektromechanikai kapcsolat intenzíven kutatott terület.

Az elektromechanikai kapcsolat az a jelátviteli mechanizmus, mely során a felszíni membrán (szarkolemma) depolarizációja az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ átmeneti megemelkedésén keresztül az izom kontrakciójához vezet. A folyamat a szarkolemma transzverzális tubulusainak membránjában lévő L-típusú Ca^{2+} -csatornák, más néven dihidropiridin receptorok (DHPR), és a szarkoplazmatikus retikulum (SR) Ca^{2+} -csatornáinak (rianodin receptor, RyR) az együttműködésével valósul meg a szív- és vázizomban kétféle módon. Mindkét harántcsíkolt izomtípusban az elektromechanikai kapcsolat közös kulcslépése a RyR-ok aktiválódása következtében bekövetkező Ca^{2+} -felszabadulás. Vázizom esetén a DHPR, az izom akciós potenciáljához képest hosszú aktivációs időállandója miatt nem nyílik meg, tehát nem működik funkcionális csatornaként, de közvetlen alloszterikus viszonyban áll az SR-ben vele szemben elhelyezkedő RyR-ok egy részével. A DHPR a szarkolemma depolarizációjakor olyan konformáció-változást szenved, mely a depolarizáció által képviselt jelet az SR rianodin receptoraira közvetíti, és azok megnyílását okozza. A RyR-okon keresztül felszabaduló Ca^{2+} aktiválja környező, DHPR által közvetlenül nem vezérelt RyR-okat is. Ez utóbbi folyamatot Ca^{2+} -indukált Ca^{2+} -felszabadulásnak (CICR) nevezzük. Szívizomban nincs direkt mechanikai kapcsolat a DHPR és a RyR között, viszont a DHPR a szívizomrost hosszú akciós potenciálja alatt megnyílik, és Ca^{2+} -t enged a transzverzális tubulus és az SR közötti térbe, ami aktiválja a RyR-okat (CICR).

A Ca^{2+} -felszabadulás folyamata az egyes terminális ciszternákra korlátozódik, lokális marad, mivel a transzverzális tubulus és az SR szoros orientált kapcsolata

izolált működést tesz lehetővé. Ezt, a Ca^{2+} -felszabadulás terminális ciszterna szintjén megvalósuló működési egységét sparknak (szikra) nevezzük. A fenitek alapján az egész rostra kiterjedő globális Ca^{2+} -felszabadulás nem más, mint az akciós potenciál által időben szinkronizált sparkok összege.

A folyamat végeredménye mindkét harántcsíktípus esetében az intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ megemelkedése, és a kontraktilis rendszer Ca^{2+} -függő aktiválódása.

1.1. A rianodin-receptor

A rianodin egy növényi alkaloid, mely nagy affinitással kötődik az SR Ca^{2+} -csatornájához. A rianodin mesterséges lipid kettősrétegbe épített RyR-on végzett single channel árammérésekben félig nyitott szubkonduktív állapotban rögzíti a csatornát. A jelenség annyira jellegzetes és specifikus, hogy az a rianodint a RyR azonosításának leghitelesebb eszközévé teszi. A funkcionális csatorna-komplex homotetramer, az alegységek ~5400 aminosavból állnak és molekulatömegük egyenként 565 kDa. Emlősökben a rianodin receptor három izoformája ismert (RyR1, RyR2, RyR3), melyek előfordulása szövetspecifikus: a RyR1 elsősorban a vázizomban expresszálódik (vázizom típusú RyR), míg a RyR2 a szívizomban és szinte az agy teljes területén (szívizom típusú RyR). A RyR3-at először hámsejtekben és az agyban írták le, de előfordulása univerzálisnak mondható.

Williams munkacsoportjának eredményei szerint a RyR egy nagy vezetőképességű, alacsony szelektivitású kationcsatorna. A RyR áramának amplitúdója független az áram irányától, azaz feszültségfüggetlen módon, ohmikus ellenállásként viselkedik, áramamplitúdójának feszültségfüggése lineáris. Annak ellenére, hogy a szervezetben a RyR Ca^{2+} -csatornaként működik, a Ca^{2+} -on kívül más élettani szempontból releváns kationokra is permeábilis. Az 1a főcsoport monovalens kationjaira vonatkozó konduktanciája például meglepően magas, míg divalens kationokra nézve alacsonyabb (K^+ -ra vonatkozó maximális konduktanciája ~900, Ca^{2+} -ra ~135 pS). A szervetlen egyértékű kationokra vonatkozó permeabilitása alig különbözik egymástól, de jelentős szelektivitás

mutatható ki a kétértékű kationok javára, melyek között permeabilitás szempontjából nem tesz különbséget. A viszonylag alacsony szelektivitásnak *in vivo* nincs nagy jelentősége, mert a monovalens kationokra nézve nincs transzmembrán koncentráció-gradiens, a Ca^{2+} -felszabadulás során pedig potenciálkülönbség az SR K^+ - és Cl^- -csatornáin keresztül folyó nagymértékű kompenzatorikus áram miatt nem, vagy csak átmenetileg generálódik, így a RyR-on keresztül nagyrészt Ca^{2+} transzportálódik.

1.1.1. A rianodin receptor szabályozása

A RyR a transzverzális tubulus membránpotenciáljának (DHPR-RyR1 kapcsolat) és a citoplazma–SR lumen szolubilis faktorainak (Ca^{2+} , a Mg^{2+} , az ATP) kettős kontrollja alatt áll.

A Ca^{2+} RyR-ra gyakorolt hatása kétfázisú: nanomólos és millimólos koncentráció-tartományban a RyR nyitvatartási valószínűsége közel nulla, és $\sim 100 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]$ -nál maximális. A haranggörbe fel- és leszálló szárát Hill-egyenlettel illesztve mindkét görbe Hill-koefficiense 1, ami két Ca^{2+} -kötőhely létezésére utal. Az egyik egy nagy affinitású ($K_d \approx 10 \mu\text{M}$), jellegét tekintve aktiváló, a másik pedig egy alacsony affinitású ($K_d \approx 300 \mu\text{M}$) gátló (inaktiváló) kötőhely. A RyR Ca^{2+} -érzékenységét az ATP és a Mg^{2+} együttesen állítják be.

Az ATP a RyR leghatékonyabb endogén agonistája ($K_d = 350 \mu\text{M}$, $N_{\text{Hill}} = 2$), mely „ Ca^{2+} -mentes” oldatban is jelentősen növeli a RyR nyitvatartási valószínűségét. Jelentősége abban áll, hogy a DHPR direkt aktiváló hatása önmagában nem elég a Ca^{2+} -felszabadulás kiváltásához, agonista szolubilis faktorok is szükségesek. Az izomrost citoplazmatikus ATP koncentrációja (8 mM) mellett a RyR nyitvatartási valószínűsége nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$ -nál (100 nM) is maximális. Akkor vajon mi tartja zárva nyugalomban a RyR-t?

A Mg^{2+} és (vázizomban) maga a DHPR.

A DHPR öt alegységből áll (α_1 , α_2 , β , γ , δ), melyek közül az α_1 alegység II. és III. transzmembrán doménját összekötő intracelluláris hurok szerepe kulcsfontosságú a vázizom típusú (direkt) elektromechanikai kapcsolat kialakulása szempontjából. A

hurok 667.-696. aminosava közötti szakasz peptid formája („A peptid”) alacsony koncentrációban aktiválja mindkét RyR izoformát.

Az „A peptid” hatásának kritériuma egy bázikus (Arg, Lys) aminosavakat hordozó szakasz, melyhez hasonló oldalláncmintázat néhány toxin elsődleges szerkezetében is megtalálható. A homológia miatt ezek a toxinok az elektromechanikai kapcsolat vizsgálatának jó eszközei. Ilyen például a maurocalcine (MCa), melynek harmadlagos szerkezetében a homológ motívum más bázikus oldalláncú aminosavakkal együtt egy nagy kiterjedésű pozitív töltésű felszínt hoz létre.

Munkacsoportunk korábbi eredményei szerint a MCa növeli a RyR P_o -ját, és a csatorna maximális vezetőképességének ~40% -ának megfelelő szubkonduktancia-állapotokat (LLSS) okoz. Az LLSS polaritásfüggése az MCa és a pórus szájadékának elektrosztatikus kölcsönhatására utal. Ezt a feltételezést az is igazolja, hogy a töltött felszín aminosavainak semleges töltésű alaninra történő lecserélésével a MCa hatékonysága csökken. Az LLSS kiváltása szempontjából a 24-es pozícióban lévő arginin kritikus jelentőségű, mivel alaninnal helyettesítve az MCa növeli ugyan a csatorna P_o -ját, de LLSS-t kiváltani képtelen.

Bár a RyR-t a DHPR vezérli, a RyR finomhangolásában számos más fehérje is részt vesz. A következő rész róluk szól.

1.1.1.1. Az FK-506-kötő fehérje (FKBP) a RyR karmestere

A RyR tetramer monomerenként egy FKBP-t köt, izoformától függően különböző típust (RyR1–FKBP12 és RyR2–FKBP12.6), melyek makrolidek (FK506, rapamicin, ciklosporin A) hatására disszociálnak a csatornáról. Az FKBP-től megfosztott csatornák single channel áramregisztrátumán csökkent vezetőképességű szubkonduktancia-állapotok jelennek meg, mintha a négy alegység egymástól függetlenül kapuzna. Emellett az FKBP-depletált RyR P_o -ja magasabb, mint a kontrollé, mert a Ca^{2+} aktiváló hatásával szemben érzékenyebb. Az FKBP tehát a RyR alegységek koordinált működését biztosítja, és stabilizálja a tetramer, nyitott és zárt konformációs állapotát. További irodalmi adatok szerint az FKBP alloszterikus kapcsolatot teremt a szomszédos csatorna-komplexek között is,

működésüket összehangolja, lehetővé téve ezzel a szomszédos csatornák egyidejű nyílását, záródását (coupled gating). Kóros körülmények között az FKBP12.6 disszociációja miatt a csatornák kapuzása stochastikussá válik, az elektromechanikai kapcsolat hatékonysága és a Ca^{2+} -tranziens amplitúdója csökken, és az SR diasztolében is csurog. Emiatt a szív pumpafunkciója romlik és arithmogén hajlama nő.

1.1.1.2. Foszforiláció

A szimpatikus idegrendszer aktiválódásakor (például izommunka vagy vészreakció esetén) felszabaduló katekolaminok hatásának eredményeként cAMP-dependens protein kináz (PKA) aktiválódik. A PKA az izomrost Ca^{2+} -háztartását szabályozó fehérjék (DHPR, SERCA, RyR) foszforilálásával aktiválja azokat, így növekszik a Ca^{2+} -tranziens amplitúdója és a szívizom kontrakciós ereje.

Krónikus szívelégtelenségben, a szimpatikus aktivitás és a keringő katekolaminok szintje krónikusan magas, a Ca^{2+} -tranziens amplitúdója alacsony, lassú, és a SERCA pumpa aktivitása alacsony. Ezért mind arra utal, hogy a szív funkcióromlásának hátterében a miokardium sérülésének okától függetlenül az intracelluláris Ca^{2+} -homeosztázis- és az elektromechanikai kapcsolat zavara áll, ami a foszforilációs mechanizmus hibás működésére vezethető vissza. Egyes eredmények szerint a fenti változások oka a Ca^{2+} -transzport-fehérjék – köztük a RyR2 – túlzott PKA-függő foszforilációja. A RyR krónikus szívelégtelenségben a fiziológias szinthez képest hiperfoszforilált, mely az FKBP12.6 disszociációját okozza. A RyR2 Ca^{2+} -függését leíró haranggörbe az FKBP12.6 depléciója miatt extrém módon kiszélesedik, ezért az SR diasztolében is csurog. Számos közlemény beszámol arról, hogy szívelégtelenségben az I_{CaL} CICR kiváltásában mutatott hatékonysága csökken, ami az elektromechanikai kapcsolat FKBP12.6 disszociációjának kísérőjelensége, mivel ekkor a RyR kapuzása szinkronizálatlanná válik, mely így csökkenti a Ca^{2+} -felszabadulás hatékonyságát (EC-uncoupling) és a kontrakciós erőt. A Ca^{2+} -felszabadulás amplitúdójának csökkenéséhez emellett még az is hozzájárul, hogy az SR diasztolés csurgása és az

alacsony SERCA-aktivitás miatt csökken SR Ca^{2+} -tartalma. A RyR diaszolis aktiválódásának következménye késői utódepolarizáció, ventrikuláris tachikardia, kamrafibrilláció és a hirtelen szívhalál lehet.

A szívelégtelenségben szenvedő betegek terhelhetőségük csökkenéséről, izomgyengeségről, fáradékonyságról és légszomjról számolnak be, de a tünetek súlyossága nincs összefüggésben a perctérfogat-csökkenés mértékével. A csökkent terhelhetőség valószínűleg krónikus hatásokra bekövetkező másodlagos anyagcsere-, génexpressziós-, morfológiai- és funkcionális változások eredménye, melyek többek között az SR Ca^{2+} -háztartásának zavarát okozzák. A vázizmot érintő tünetek egy részét a RyR2-nél megismert analóg folyamatokkal magyarázzák: a hiperfoszforilált, FKBP12-mentes RyR1 az SR nyugalmi Ca^{2+} -csurgását, deplécióját okozza, és csökkenti a DICR hatásfokát.

Az ilyen irányú tudományos érdeklődés középpontjába egy RyR-támadáspontú gyógyszerjelölt vegyület került, a K201 (JTV519), mely növeli a RyR2 FKBP iránti affinitását, ezzel stabilizálja a RyR2 zárt állapotát, megakadályozza az SR diaszolis csurgását, de szisztolé alatt nem gátolja a Ca^{2+} -felszabadulást, ezzel kardioprotektív hatást fejt ki.

1.2. Célkitűzések

Munkám során az SR kalcium csatornáját, a rianodin receptort vizsgáltam posztmiokardiális infarktusos állatmodellen. Célom az elektromechanikai kapcsolat és a posztinfarktusos rianodin receptor funkcionális eltéréseinek feltárása mellett egy gyógyszerjelölt vegyület, a K201 rianodin receptorra gyakorolt hatásának vizsgálata volt, mely állatkísérletekben képes megelőzni a miokardiális infarktus utáni izomgyengeség kialakulását.

Munkacsoportunk figyelme az utóbbi időben a peptidtoxinok, különösképpen a MCa felé fordult, mivel a MCa a DHPR-RyR direkt mechanikai kapcsolatát megvalósító szakasszal („A szakasz”) homológ peptidmotívumai miatt az elektromechanikai kapcsolat vizsgálatának jó eszköze. Single-channel kísérleteinkkel korábban már részletesen jellemeztük a MCA vázizom típusú RyR-

re gyakorolt hatását, azonosítottuk a RyR-MCa között kialakuló elektrosztatikus viszony kialakításában kulcsfontosságú aminosavakat, és becslést adtunk jelentőségük mértékére. A kísérletsorozatot szívizom típusú RyR-en kívántuk folytatni, mivel hatásával kapcsolatban kérdésként merült fel, hogy vannak -e a MCa-nak izoformaspecifikus hatásai. Az esetleges különbségekből a vázizom típusú elektromechanikai kapcsolatra vonatkozó következtetéseket reméltünk levonni.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. Single channel árammérés mesterséges lipid-kettősrétegbe épített RyR-on

Méréseinket mesterséges lipid kettősrétegbe épített RyR1-en végeztük feszültség-clamp körülmények között. Ez a módszer egyetlen izolált RyR-on folyó áram mérését teszi lehetővé úgy, hogy közben a csatorna citoplazmatikus és lumenális oldalának megfelelő oldattér összetétele szabadon változtatható. A mesterséges membránt foszfatidiletanolamin, foszfatidilszerin és foszfatidilkolin 5:4:1 arányú keverékének 20 mg/ml koncentrációjú n-dekános oldatából hoztuk létre két szimmetrikus folyadékteret elválasztó 250 μm átmérőjű nyíláson. A lipid kettősréteg kialakulása után az egyik oldalra RyR1-szuszpenziót adtunk. A csatorna általában úgy épül be a bilayerbe, hogy erre az oldalra néz a citoplazmatikus régiója. Ekkor a negatív membránpotenciálok a fiziológiással megegyező áramirányt generálnak, míg a pozitívak ezzel ellentétes, reverz áramirányt. Ha a csatorna orientációja mégis ezzel ellentétes, a rajta folyó áramok is ennek megfelelően értékelendők. A RyR áramát 250 mM $[\text{K}^+]$ -jú pufferben (pH=7,2), 50 μM szabad kalcium jelenlétében mértük 80 mV potenciálkülönbség mellett. A RyR orientációjának megállapításához a RyR Ca^{2+} -érzékenységét teszteltük.

A membránon átfolyó áramot Axopatch 200 erősítővel mértük, majd 8 pólusú aluláteresztő szűrővel szűrtük. Az elektromos jeleket 3 kHz-es mintavételi frekvenciával digitalizáltuk, és számítógépen tároltuk. A mérések során kapott

rekordokat pClamp 6.02 programmal analizáltuk. A vizsgált vegyületeket minden esetben a RyR citoplazmatikus oldalának megfelelő oldattérben alkalmaztuk.

2.2. Tisztított rianodin receptor prepalálása

Vizsgálatainkat patkány vázizomból és kutya bal kamrából preparált tisztított RyR-okon végeztük. A RyR-preparálás első lépésében terminális cisztterna (TC) vezikula frakciót állítottunk elő differenciálcentrifugálással. A RyR-komplexeket a TC membránjából 1% detergenst (CHAPS) tartalmazó szolubilizáló oldat felhasználásával oldottuk ki. A szolubilizálás után a mintát lineáris szacharóz gradiensekre vittük fel. A 16 órás centrifugálás után a gradiensekből frakciókat szedtünk, és az egyes frakciókban azonosítottuk a RyR-t. Az így tisztított RyR-preparátumot a felhasználásig -70°C -on tároltuk.

A proteolízis elkerülésére a preparálás minden lépését 4°C -on végeztük, és a használt pufferek mindegyike proteáz-inhibitorokat tartalmazott.

2.3. A single channel rekordok kiértékelése

A rekordokat pClamp 6.02 programmal analizáltuk. A RyR működését a csatornán átfolyó áram maximális amplitúdójával (vezetőképességével), és a csatorna dinamikus paramétereivel jellemezzük (nyitvatartási valószínűség- P_o , átlagos nyitvatartási idő- τ).

A RyR megnyílásainak számát az egyes megnyílásokhoz tartozó áram amplitúdójának függvényében ábrázolva amplitúdó-hisztogramokat kapunk. A K201-gyel végzett méréseink során olyan alacsony amplitúdójú, rövid ideig tartó áramokkal találkoztunk, melyek kvantitatív jellemzésére több perces szakaszokból szerkesztett amplitúdó-hisztogramokat használtunk. A K201 által indukált, S1-nek és S2-nek elnevezett szubkonduktív állapotokhoz tartozó darabszámok csúcsértékeinek nyitott állapot eseményszámának csúcsértékére, vagy a csúcsértékek összegére ($S1+S2$ +nyitott+zárt) normalizált aránya (NS_x/NO és $NS_x/összes$) az egyes állapotok koncentráció-függő változásait könnyen értelmezhető értékkel jellemzi.

A maurocalcine a rianodin hatásához hasonló hosszantartó szubkonduktancia-állapotokat indukál, melyeket átlagos hosszukkal (ms) és megjelenési gyakoriságukkal (db/perc) jellemeztünk.

2.4. Ca^{2+} -felszabadulás

A HSRV a membránban található SERCA segítségével Ca^{2+} -mal aktívan feltölthető, és onnan a RyR aktiválásával felszabadítható. Az extravezikuláris Ca^{2+} -koncentráció-változás optikai módszerrel, Ca^{2+} -érzékeny abszorpciós festékkel történő követése RyR agonisták és -antagonisták kvalitatív- és kvantitatív farmakológiai vizsgálatát teszi lehetővé.

2.5. A modellálat

Kísérleteinkben posztmiokardiális infarktusos patkány állatmodellt használtunk. Az infarktust a coronaria sinistra -arteria interventricularis anterior ágának proximális elkötésével indukálták. A miokardiális infarktuson átesett patkányokból (posztmiokardiális infarktusos, PMI állat) nyert vázizomból a műtétet követő ~24. héten preparáltunk RyR-t. Erre a célra azokat a patkányokat választottuk ki, melyek bal kamrafalában az elhalt, fibrotikus terület aránya legalább 50% volt, tehát a krónikus szívelégtelenség egyértelmű jeleit mutatták.

2.6. Anyagok

A maurocalcinet (MCa) szilárd fázisú peptidszintézissel J. M. Sabatier munkacsoportja (Marseilles) készítette. A K201 az Aetas Pharma (Japán) bocsátotta rendelkezésünkre TMA keretében.

3. EREDMÉNYEK

3.1. A vázizom típusú RyR vizsgálata PMI állatmodellen

3.1.1. A RyR vezetőképessége

A kontroll és PMI patkányokból izolált RyR-ok áram-feszültség karakterisztikája egyaránt lineárisnak bizonyult, azzal a különbséggel, hogy a kontroll RyR-ok átlagos vezetőképessége a membránpotenciál előjelétől függetlenül 535 ± 32 pS-nek adódott – ami megfelel a korábbi eredményeinknek –, míg a PMI RyR-ok egyharmadának pozitív (a fiziológiással ellentétes áramot gerjesztő) potenciáloknál mért konduktanciája soha nem tapasztalt 785 ± 28 pS-es átlagot ért el. Ezek a csatornák enyhe egyenirányító működést mutattak, mivel negatív (a fiziológiással megegyező áramirányt biztosító) tartófeszültségeknél számolt vezetőképességük ennél sokkal alacsonyabb (575 ± 31). Ez az érték azonban statisztikailag nem magasabb, mint az egészséges patkányokból származó csatornáké (535 ± 32 pS és 575 ± 31 pS $p > 0,2$). A RyR-ok konduktancia-eloszlási hisztogramján egyértelműen két csatornapopuláció különül el: a 700 pS feletti vezetőképességű csatornák csoportja, és az ez alattiaké. A görbék szimpla, illetve dupla Gauss-függvénnyel történő illesztése után is hasonló eredményt kapunk: a függvény kontroll RyR-ok esetén egycsúcsú, $520,3 \pm 2,1$ pS-es maximummal, míg a PMI RyR-ok konduktancia-eloszlását jellemző görbe két csúcsa $519,5 \pm 3,2$ és $793,1 \pm 5,7$ pS-nél található. A negatív membránpotenciálnál kapott adatok elemzésekor is ugyanígy jártunk el. Ekkor a kontroll csatornákra az illesztés $529,2 \pm 3,8$ pS-es, PMI RyR-re pedig $573 \pm 4,3$ pS-es maximumot eredményezett.

3.1.2. A RyR aktivitásának Ca^{2+} -függése

A RyR-ok szubmikromólos $[Ca^{2+}]$ -tartományban zárva vannak, 50-100 μM $[Ca^{2+}]$ a legaktívabbak, és ennél magasabb $[Ca^{2+}]$ a csatorna inaktivációját okozza, ami a P_o csökkenésében nyilvánul meg. Ez a korábbról jól ismert eredmény a mi esetünkben azért érdemel említést, mert a 100 μM feletti koncentráció-tartományban a kontroll és a PMI állatból származó RyR-ok P_o -jának

statisztikailag is jelentős különbségét tapasztaltuk ($p < 0,05$). A Po-változás Hill-egyenlettel történő illesztésével a félaktiváló koncentráció 9,3 (kontroll) és 5,8 (PMI) μM -nak, a félgátló pedig 287 (kontroll) és 872 μM -nak adódik, azaz a haranggörbe a RyR-t inaktiváló $[\text{Ca}^{2+}]$ -ók felé a kontrollhoz képest jelentős mértékben kiszélesedett. Ez utóbbi eredmény arra utal, hogy a PMI RyR a Ca^{2+} gátló hatására kevésbé érzékeny. A görbék Hill koefficiense a felszálló száron 1,12 (kontroll) és 1,2 (PMI), valamint a leszálló száron 1,02 (kontroll) és 0,93 (PMI). Az 1 körüli értékek korábbi – nyúl vázizmon kapott – eredményeknek megfelelően egy aktiváló és egy gátló kötőhelyet feltételez.

3.2. A K201 hatása a RyR működésére

Ezt követően RyR1-en végzett single channel kísérleteinkkel a K201-nek a hatásmechanizmusát kívántuk felderíteni, melyről ismert, hogy az SR nyugalmi csurgásának megakadályozásával kardioprotektív hatást fejt ki, emellett szívelégtelenségben eredményesen növeli a vázizom terhelhetőségét, munkatűrőképességét, és csökkenti fáradékonyságát, de hatásmódját illetően ellentmondásos eredmények láttak napvilágot.

Kontroll körülmények között a RyR nyitott és zárt állapotai dominálnak, míg 10 μM K201 hozzáadása után az áramregisztrátumon a RyR minőségileg új állapotai jelentek meg. Ekkor a csatorna nem a kontrollban megszokott módon kapuzik, hanem a maximális konduktancia ~23% és ~13%-ának megfelelő csökkent vezetőképességű (szubkonduktív) állapotot képviselő mértékig nyílik meg (ezeket S1 és S2-nek neveztük el). A K201 koncentrációját 50 μM -ig növelve, az S állapotok előfordulási valószínűsége nő, a nyitott és a zárt állapotoké csökken, de nem azonos mértékben: a nyitott állapotok számának csökkenése jelentősebb, mint a zárté. Ennek megfelelően a K201 az összes alkalmazott koncentrációnál csökkenti a RyR P_o -ját. Az IC_{50} 25,1 $\pm$ 2,7 μM , a Hill-koefficiens pedig 1,74 $\pm$ 0,28. A szubkonduktancia-állapotokat csak a fiziológiással ellentétes áramirányt biztosító membránpotenciál-értékeknél tudtuk kimutatni, de ekkor már terápiás (1 μM) K201-koncentrációnál is jelentkeztek.

A dózisfüggést az Anyagok és módszerek fejezetben ismertetett módon, „all point” hisztogramokból meghatározott értékek felhasználásával jellemeztük úgy, hogy a szubkonduktancia-állapotok maximum értékeinek nyitott állapot csúcsértékeire normalizált arányát (NSx/NO) minden egyes K201-koncentrációnál meghatároztuk. Az $NS1/NO$ és a $NS2/NO$ hányadosok a K201 függvényében növekednek, de az $NS2/NO$ nagyobb mértékben, ami az S2 nagyobb előfordulási valószínűségét mutatja, és két kötőhely jelenlétére utal.

Ezt a P_o -változásra illesztett Hill-egyenlet Hill-koefficiense is megerősíti ($n_{Hill\text{ kontroll}}=1,74\pm0,28$; $n_{Hill\text{ PMI}}=1,98\pm0,17$). A K201 IC_{50} értéke ($IC_{50\text{ kontroll}}=25,1\pm2,7\text{ }\mu\text{M}$ és $IC_{50\text{ PMI}}=22,0\pm1,0\text{ }\mu\text{M}$), a szubkonduktancia-állapotok relatív amplitúdója ($S1_{\text{PMI}}=22,3\pm0,27\%$ és $S2_{\text{PMI}}=12,83\pm0,39\%$ $S1_{\text{kontroll}}=23,84\pm0,77\%$ és $S2_{\text{kontroll}}=14,47\pm0,59\%$) és a szubkonduktancia-állapotok relatív arányainak dózisfüggése a PMI RyR-oknál a kontrollhoz képest eltérést nem mutat.

Az S1 és az S2 állapot valószínűségének koncentráció-függése bifázisos jellegű: az S1 valószínűsége ($NS1/\text{összes}$) például $50\text{ }\mu\text{M}$ K201 koncentrációig nő, és $0,259\pm0,053$ értéket ér el a kontroll csatorna, és $0,196\pm0,041$ -et a PMI RyR esetében. Ezzel párhuzamosan a csatorna P_o -ja mellett a zárt állapot valószínűsége is csökken, tehát az S1 arányának növekedése a nyitott és a zárt állapotok rovására valósul meg. A K201 koncentráció további növelésével az S1 valószínűsége $0,02\pm0,006$ -ra csökken, miközben a zárt állapotok relatív száma emelkedik, és a P_o tovább esik. Ez utóbbi eredmény szerint a vegyület ebben a koncentráció-tartományban valószínűleg zárt állapotokat indukál. Az S2 valószínűségének koncentráció-függése hasonló karakterisztikát követ, és a valószínűségek kontroll-PMI RyR vonatkozásban nem különböznek.

Single channel eredményeinket HSR vezikulán végzett kísérleteink is megerősítették. A Ca^{2+} pumpa aktivitásának kihasználásával aktívan feltöltött vezikulákból $10\text{ }\mu\text{M}$ K201-gyel Ca^{2+} -felszabadulást váltottunk ki.

3.3. A maurocalcine (MCA) hatása a szívizom típusú RyR-ra

Munkám másik felében a maurokalcin (MCA) RyR2-re gyakorolt hatását vizsgáltam. RyR1-en végzett kísérleteink mintájára ezen vizsgálatainkban is 50 és 500 nM MCA-t használtunk a csatorna citoplazmatikus oldalának megfelelő oldattérben. A kísérleteket a toxin polaritásfüggő hatásainak tanulmányozhatósága érdekében -80 és +80 mV membránpotenciálnál is elvégeztük, ami a csatorna beépülésének irányától függően a fiziológiással megegyező, illetve azzal ellentétes, reverz áramirányt indukál. A peptid már nanomólos (5 nM feletti) koncentrációtartományban módosítja a csatorna kapuzását: nő a RyR P_o -ja ($P_{o\text{ kontroll}}=0,034\pm0,014$ és $P_{o\ 500\text{ nM MCA}}=0,068\pm0,023$), és megjelentek a csatorna már korábban ismert hosszantartó szubkonduktív állapotai (LLSS), melyeket gyakran hosszantartó zárt szakaszok (LLCS) szakítanak meg. A RyR-MCA elektrosztatikus kölcsönhatására utal, hogy LLSS és LLCS csak reverz áramirányt biztosító membránpotenciáloknál jelentkeznek. Munkám során az LLSS kvantitatív elemzését is elvégeztem, melyből kiderült, hogy 50 nM MCA-koncentrációnál az LLSS átlagos hossza $192,7\pm14,7$ ms és megjelenési gyakorisága $136,3\pm53,2$ db/perc. A MCA RyR1-re és RyR2-re gyakorolt hatásának részletes összehasonlítását a Megbeszélés fejezetben teszem meg.

4. MEGBESZÉLÉS

4.1. A RyR1 funkcionális változásai PMI állatmodellen

Az elégtelen szív működés – és a legjellemzőbb tüneteként jelentkező vázizomgyengeség és fáradékonyság – háttérben álló okokként a legtöbb közlemény számos morfológiai- és metabolikus elváltozást jelöl meg. Legkézenfekvőbb magyarázatuk az lenne, hogy a csökkenő perctérfogat miatt csökken a vázizom perfúziója, és csökken az egységnyi munkára jutó oxigén- és tápanyagmennyiség. Emiatt csökken a mitokondriumok oxidatív kapacitása, ami az aerob anyagcsere romlásához vezet. Ez azt jelenti, hogy a krónikus szívelégtelenségben szenvedő betegek ATP-termelése lassabb, mint az

egészségeseké, és a vérplazma laktát-koncentrációja fizikai munkavégzés során gyorsabban nő, és magasabb csúcserőket ér el (a plazma laktát-szintje összefüggésbe hozható a fáradással). A tünetek részben talán az anyagcsere-változásoknak köszönhetőek, de az okok listája még biztosan nem teljes, mivel a fenti eredmények külön-külön és együtt sem szolgálnak kielégítő magyarázattal a perifériás izomzat gyengeségének súlyosságát illetően. Az izomgyengeség mértéke ugyanis független a kardiális diszfunkció súlyosságától, és az izom perfúziójának lokális növelése, vagy a rendszeresen végzett könnyű torna a tüneteket csak részben enyhítik. Az ellentmondások miatt a szakirodalom az utóbbi időben az SR transzport-mechanizmusainak másodlagos károsodását feltételezi.

A vázizom elektromechanikai kapcsolatának vizsgálatára intézetünkben számos módszer áll rendelkezésre: vázizomrostokon a DHPR-ok feszültségfüggő intramembrán töltésmozgásából származó áram (gating current), és a Ca^{2+} -tranziens mérése, valamint a spontán elemi Ca^{2+} -felszabadulást tükröző fluoreszcencia-változások (sparkok és emberek) analízise és a RyR single channel áramainak elemzése lehetővé teszi az elektromechanikai kapcsolat teljeskörű jellemzését. Az intézet munkatársainak PMI állatmodellből származó vázizomrostokon végzett kísérleti eredményei szerint a DHPR intramembrán árama nem tér el a kontroll állatokból származó rostokon mértektől, viszont adott membránpotenciálnál az általa kiváltott Ca^{2+} -felszabadulás a kontrollhoz képest jelentősen alacsonyabb és lassabb.

Ezeknek az eredményeknek legalább három lehetséges oka képzelhető el:

- a DHPR-RyR szignáltranszdukció hatásfokának csökkenése miatt az elektromechanikai kapcsolat működése módosul
- a RyR permeabilitása, és/vagy Ca^{2+} -érzékenysége változik meg posztinfarktusos állapotban
- vagy az SR Ca^{2+} -tartalmának csökkenése miatt csökken a Ca^{2+} -gradiens.

A valódi ok az elemi események és a single RyR-channel mérések értékelésekor vált nyilvánvalóvá. A sparkok (szikrák) mellett a szakirodalom az embereket (parazsákat) tekinti elemi Ca^{2+} -felszabadulási eseményeknek, melyek a sparkoktól

jóval ritkábban előforduló alacsony amplitúdójú, hosszantartó események. Munkatársaim kísérleteiben a PMI patkányokból származó vázizomrostokon tapasztalt sparkok amplitúdója a kontrollhoz képest alacsonyabb, és az emberek sparkokhoz viszonyított relatív aránya nagyobb. A sparkok térbeli kiterjedése és felszálló szárának meredeksége csökken, ami miatt egy átlagos elemi esemény alkalmával felszabaduló Ca^{2+} becsült mennyisége is kevesebb, mint kontroll esetben. Az utóbbi adatok teljes összhangban vannak Ward és munkatársai eredményeivel, akik a sparkok fenti morfológiai változásait azzal magyarázzák, hogy krónikus szívelégtelenségben a RyR1 a PKA által hiperfoszforilálva van és ennek köszönhetően jóval kevesebb FKBP12-t hordoz, mint az egészséges patkányokból származó csatornák. Ugyanez a munkacsoport single channel kísérletekben kimutatta a RyR1 FKBP-hiányára utaló kapuzását: a PMI csatornák P_o -ja a kontrollhoz képest magas, és szubkonduktív-állapotokat mutatnak.

Munkánk során mi is single channel áramméréseket végeztünk, és a PMI patkányokból származó csatornák következő működésbeli módosulásait tártuk fel:

- a posztinfarktusos állatokból származó rianodin receptorok egy részénél reverz áramirány mellett a megszokott, 520 ps körüli értéknél ~50%-kal nagyobb, 785 ps-es átlagos vezetőképességet tapasztaltuk. Az I-V karakterisztikát leíró görbe megtört, azaz a csatorna vezetőképessége polaritásfüggővé vált, ugyanis az ellentétes feszültségeknél nem tapasztaltunk ilyen fokú vezetőképesség-növekedést.

- a Ca^{2+} egy nagy affinitású aktiváló-, és egy kis affinitású, gátló kötőhelyen szabályozza a RyR aktivitását. A beteg patkányokból származó RyR-ok esetében a csatornák nyitvatartási valószínűségének Ca^{2+} -függését leíró haranggörbe a magas ($>100 \mu\text{M}$) $[\text{Ca}^{2+}]$ -k felé kiszélesedett.

Aktiváló ($<100 \mu\text{M}$) $[\text{Ca}^{2+}]$ -knál a kontroll és a PMI RyR P_o -ja nem tér el jelentősen egymástól, azaz az aktiváló kötőhelyek affinitása hasonló. Tehát a PMI csatornák magas $[\text{Ca}^{2+}]$ -knál valószínűleg az alacsony affinitású, gátló kötőhely affinitás-csökkenése miatt aktívabbak a kontroll csatornáknál, azaz a RyR kevésbé érzékeny a Ca^{2+} inaktiváló hatásával szemben, ami arra utal, hogy a Ca^{2+} -

felszabadulás terminációja kevésbé hatékony, ezért magasabb $[Ca^{2+}]$ -nál következik be, ami a spark idejének nyúlását okozza. A sparkok nyúlásának következtében hosszútávon csökken az SR Ca^{2+} -tartalma, ami a Ca^{2+} -felszabadulás hajtóerejének csökkenése miatt csökkenti a spark amplitúdóját, a Ca^{2+} -tranziens nagyságát és így izomerő-csökkenéshez vezet. Single channel eredményeink azonban nem magyarázzák az emberek arányának növekedését, mivel az FKBP hiányára utaló szubkonduktív állapotokat nem tapasztaltunk.

4.1.1. A RyR1 funkcionális változásainak lehetséges okai, avagy mi történik a RyR-ral krónikus szívelégtelenségben?

Marks és munkatársai korábbi munkájuk során kimutatták, hogy krónikus szívelégtelenségben a vázizom típusú RyR hiperfoszforilációja következtében az FKBP disszociál a RyR-ról. Az FKBP-mentes csatornák szinkrolizátlanul működnek (sérül a coupled gating), és a monomerek összehangolatlan működése miatt szubkonduktancia-állapotokat produkálnak. Ezek a változások a CRU szintjén a spark amplitúdójának csökkenéséhez, és az emberek arányának növekedéséhez vezethetnek, ami megmagyarázza az izom kontrakciós erejének csökkenését is. Eredményeiket azonban számos munkacsoport, köztük Sitsapesan és munkatársai sem tudták megerősíteni. Tapasztalataik szerint a hiperfoszforilált RyR nem mutat szubkonduktív állapotokat, viszont aktívabb, mint kontroll körülmények között, és vezetőképessége is nagyobb. Ez utóbbi eredmények megerősítik munkacsoportunk eredményeit, amennyiben elfogadjuk, hogy a modellálatainkból izolált csatornák hiperfoszforiláltak. Ebben az esetben viszont felvetődik a kérdés, hogy miért nem tudtuk reprodukálni Marks munkacsoportjának eredményeit? Nagyon valószínűnek látszik, hogy a RyR működésének zavarához a hiperfoszforiláción kívül más tényezők is hozzájárulnak. Lehet, hogy a kísérletes megközelítés részletei mások, vagy a RyR egyéb posztranszlációs módosulásai is számítanak.

A RyR működését ugyanis a foszforiláción kívül olyan kovalens posztranszlációs módosulások is befolyásolják, mint az oxidáció és a nitroziláció, melyek

szabályozó szerepe hipoxiás körülmények között jelentőséget nyer, mivel a sejt reaktív oxigéngyök- és nitrogén monoxid-termelése ischaemia során emelkedik. Régóta ismert, hogy a RyR cisztein-oldalláncainak oxidációja vagy nitrozilációja a csatorna aktiválódásával jár, ugyanakkor az utóbbi időben olyan közlemények születtek, melyek azt állítják, hogy az oxidáció és a nitroziláció csökkenti a RyR FKBP iránti affinitását. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy szívelégtelenségben az SR Ca^{2+} -transzportjának zavarához nem, vagy nem egyedül a RyR hiperfoszforilációja, hanem oxidációja-nitrozilációja is hozzájárul, és a munkacsoportok által vizsgált RyR-ok oxidációs állapota más, vagy az izolálás során különbözőképpen módosul, ami módosíthatja a RyR-FKBP kapcsolat erősségét. A magyarázatot az is nehezíti, hogy egyetlen csatorna szintjén nem ismert az FKBP sztoichiometriája, és a kötőhelyek kooperativitása, azaz nem tudjuk, hogy pontosan hány FKBP molekula disszociációja vezet a RyR dezorganizált kapuzásához, és mennyi elégséges a szomszédos csatornák kapcsolt működéséhez.

A másik lehetőség, ami az eddig rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján számításba jön, hogy az ellentmondások oka a különböző kísérleti körülményekben rejlik. Egyes friss kutatási eredmények azt sugallják, hogy extrém magas lumenális $[\text{Ca}^{2+}]$ -k (53 mM) csökkentik a RyR FKBP iránti affinitását. Kísérleteinkben a lumenális $[\text{Ca}^{2+}]$ 50 μM , míg Marks munkatársai afiziológiásan magas, 53 mM-t használnak. Ha ilyen magas $[\text{Ca}^{2+}]$ tényleg gyengíti a hiperfoszforilált RyR egyébként is gyenge FKBP-vel való kölcsönhatását, elképzelhető, hogy ez az ellentmondások forrása, és rianodin receptorainkon az alacsony lumenális $[\text{Ca}^{2+}]$ miatt – bár gyengén –, de asszociálva marad az FKBP12.

4.2. A K201 hatása az SR Ca^{2+} -transzportjára

Single channel kísérleteinkben a K201 a RyR szubkonduktív állapotait indukálta, melyek már terápiásnak tekinthető (1 μM) K201-koncentrációnál is megjelennek. 10 μM feletti koncentrációban gátolja a csatorna P_o -ját, de HSR-vezikulákból Ca^{2+} -t szabadít fel.

4.2.1. Gátlásnak, vagy részleges aktiválásnak értékelendő-e a K201 RyR-ra gyakorolt hatása?

Az S1 és S2-nek elnevezett K201-függő szubkonduktív állapotok extrém feszültségfüggést (polaritásfüggést) mutatnak, mivel kizárólag olyan membránpotenciáloknál fordulnak elő, melyek a csatornán keresztül reverz áramirányt generálnak. Munkatársaink a spontán elemi Ca^{2+} -felszabadulási események vizsgálatakor már 1 μM K201 jelenlétében is markáns változásokat regisztráltak: a sparkok amplitúdója csökkent, az emberek sparkokhoz viszonyított aránya nőtt, de az elemi események előfordulásának frekvenciája változatlan maradt.

Az irodalom egyöntetű álláspontja, hogy az SR membrán magas K^{+} - és Cl^{-} permeabilitása miatt az SR membránpotenciálja 0 mV, de a Ca^{2+} -felszabadulás során tranziens membránpotenciál-változás generálódhat. A fenti eredmények ismeretében az a következtetés vonható le, hogy az izomrost RyR-aihoz sparkmentes állapotban („nyugalomban”), azaz 0 mV transzmembrán potenciálnál nem kötődik a K201, tehát nem is indukál Ca^{2+} -felszabadulást (ennek megfelelően az elemi események frekvenciája nem változik). Azonban a soronkövetkező elemi esemény olyan előjelű tranziens membránpotenciál-változással jár, ami kedvez a K201 kötődésének és a szubkonduktancia-állapotok kialakításának, ami megváltoztatja az elemi események paramétereit (csökken a sparkamplitúdó). Az előzőek alapján a K201 hatása egyfajta használatfüggő („use dependens”) hatásnak is tekinthető.

Az irodalom nem foglal egyértelmű állásfoglalást az emberek (parazsak) tekintetében. Egyes kísérleti eredmények arra utalnak, hogy egyetlen RyR megnyílásának felelnek meg, mások arra, hogy több RyR megnyílását tükrözik. Amplitúdójukat tekintve sokkal alacsonyabbak, mint a sparkok, tehát bizonyára kevesebb RyR nyílik meg egy ember, mint egy spark alkalmával, vagy ugyanannyi, de kisebb vezetőképességgel. Bárhogyan értelmezzük is őket, munkatársaink eredményei – miszerint a K201 hozzáadása után az emberek

résaránya nő, és az ember amplitúdó-ingadozásokat mutat – egyértelműen alátámasztják single channel eredményeinket (a K201 S1 és S2 állapotokat indukál).

Bár kísérleteinkben a K201 HSR vezikulákból Ca^{2+} -t szabadított fel, (aminek egyik lehetséges oka az lehet, hogy a negatív töltésű extravezikuláris Ca^{2+} -indikátor miatt membránpotenciál generálódik) a fenti eredmények arra utalnak, hogy a K201 a vázizomrost nyugalmi Ca^{2+} -csurgását biztosan nem fokozza, viszont csökkenti a Ca^{2+} -felszabadulás mértékét, ezért hatása egyértelmű gátlásként értelmezendő. Ezt támasztják alá Chen munkacsoportjának eredményei is, akik a K201 hatását az SR túltöltésével kiváltott Ca^{2+} -felszabadulásra (store-overload-induced Ca^{2+} -release SOICR,) gyakorolt hatását vizsgálta, és kardioprotektív hatását azzal az eredménnyel magyarázza, hogy az általunk is vizsgált koncentráció-tartományban csökkenti a SOICR amplitúdóját, de a nyugalmi citoplazmatikus Ca^{2+} -koncentrációt nem módosítja.

4.3. A M_{Ca} RyR1-re és RyR2-re gyakorolt hatásának összehasonlítása

Bár a szívizom típusú RyR és a DHPR között direkt mechanikai kapcsolat nem mutatható ki, elképzelhető, hogy a két fehérje közötti kapcsolat elvileg lehetséges, de ez *in vivo* azon izoformaspecifikus RyR- és DHPR szekvenciák miatt nem valósul meg, melyek alkalmatlanok a vázizom típusú elektromechanikai kapcsolat szempontjából elengedhetetlen struktúra szervezésére. Erre utal az is, hogy single channel kísérletekben az „A peptid” mindkét izoforma aktiválására képes. Ronjat és munkatársai korábban azt is kimutatták, hogy az „A peptid”- és a M_{Ca}-kötőhely a RyR1-en közös, amit munkacsoportunknak single channel módszerrel, M_{Ca}-„A peptid” kompetíciós kísérletekkel sikerült megerősíteni. Az „A peptid”-del igazoltan közös kötőhely a M_{Ca}-t az elektromechanikai kapcsolat vizsgálatának jól hasznosítható eszközei közé emeli.

A M_{Ca} a RyR egyik leghatásosabb aktivátora, mely már nanomólos koncentráció-tartományban növeli a csatorna nyitvatartási valószínűségét és a csatornát szubkonduktív állapotban (LLSS) rögzíti. A M_{Ca} felszínén bizonyos bázikus

oldalláncú aminosavak egy kiterjedt töltésfelszínt hoznak létre, melynek meghatározó szerepe van a RyR-MCa közötti kapcsolat kialakulása szempontjából. A kapcsolat nagy valószínűséggel elektrosztatikus jellegű, mivel a MCa pozitív töltésmezejét kialakító kulcsfontosságú aminosavak töltetlen alaninra történő cseréjével, azaz a töltött mező zsugorodásával a MCa hatásossága is csökken, az LLSS-ek átlagos hossza rövidül, mert azokat gyakrabban szakítják meg zárt, vagy a megszokott kapuzást mutató szakaszok.

Szerzőtársainkkal a MCa RyR2-re gyakorolt hatását vizsgáltuk, és arra az eredményre jutottunk, hogy a MCa szívizomból preparált HSR-vezikulákból nem szabadít fel Ca^{2+} -t, míg vázizom-HSRV-ből igen, és a MCa nem serkenti a RyR2 H^3 rianodin-kötését, míg a RyR1-ét igen. Single channel kísérleteink során azonban azt tapasztaltuk, hogy pozitív membránpotenciáloknál aktiválja a csatornát, és megjelennek a RyR2 hosszantartó szubkonduktív állapotai is, ami a MCa kötőhelyét a pórusba jósolja. Az LLSS-ek átlagos hossza rövidebbnek, frekvenciája pedig nagyobbak adódott, mint RyR1 esetében, ugyanakkor a RyR1-en tapasztalt hatásokkal ellentétben LLSS-ek kizárólag a reverz áramirányt biztosító tartófeszültségnél jelentkeztek. Ez mind arra utal, hogy a MCa kötődik ugyan a RyR2-höz, de sokkal kisebb affinitással, mint a RyR1-hez. Ennek egyik magyarázata az lehet, hogy a RyR2-ben a RyR1-gyel homológ szakaszokon szekvencia-eltérés van, mely csak kisebb erejű elektrosztatikus kölcsönhatást tesz lehetővé, ami a zárt állapotok megjelenésében, és az LLSS-állapotok rövidülésében nyilvánul meg. Ronjat munkacsoportja a RyR-MCa interakcióját molekuláris biológiai módszerekkel bizonyította. A MCa-nal kölcsönható RyR1- és RyR2-szegmenseket azonosították, és a két izoforma megfelelő szakaszain találták meg (F3 domén: 1033.-1622. aa és F7 domén: 3158.-3609. aa), melyek csupán 54% és 63%-os homológiát mutatnak. Ez a nagyfokú különbség amellet, hogy megmagyarázza eredményeinket, jól érzékelteti a DHPR kétféle elektromechanikai kapcsolatban betöltött különböző szerepét.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A szívinfarktust követő elégtelen szívműködés következtében a perifériás izomzat tömegének és kontrakciós erejének jelentős csökkenése figyelhető meg. Az izomgyengeség mértékét a romló perfúzió és a hosszas ágynyugalommal járó csökkenő fizikai aktivitás nem indokolja, ezért az elektromechanikai kapcsolat és a vázizomrost kalciumtranszport-mechanizmusainak molekuláris szintű sérülése feltételezhető.

Munkánk során az elektromechanikai kapcsolat egyik kulcsfehérjéjét, a szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} csatornáját (rianodin receptor, RyR) vizsgáltuk miokardiális infarktuson átesett patkányokon. Az állatok vázizmából RyR-t izoláltunk, majd mesterséges lipid kettősrétegbe építésük után feszültség-clamp körülmények között regisztráltuk a csatornák áramát. Célunk a posztinfarktusos RyR esetleges funkcionális eltéréseinek azonosítása mellett egy gyógyszerjelölt vegyület, a K201 rianodin receptorra gyakorolt hatásának vizsgálata volt, mely állatkísérletekben miokardiális infarktus után RyR támadásponttal javítja az izom teljesítményét.

Eredményeink szerint a beteg állatokból származó rianodin receptorok egy részének vezetőképessége ~50 százalékkal nagyobb, mint az egészséges patkányokból izoláltaké, valamint a csatornák a Ca^{2+} inaktiváló hatásával szemben mutatott érzékenysége alacsonyabb, mely a Ca^{2+} -felszabadulás terminációjának zavarát és az SR deplécióját okozhatja, ami az izom kontrakciós erejének csökkenéséhez vezethet.

A K201 RyR-re gyakorolt hatásával kapcsolatban megállapítottuk, hogy a vegyület a RyR-t dózisfüggő módon, kétféle csökkent vezetőképességű, szubkonduktancia-állapotban blokkolja, ezzel csökkentve annak nyitvatartási valószínűségét.

Munkánk másik felében egy skorpiótoxin, a maurocalcine (MCA) szívizom típusú RyR-ra gyakorolt hatását vizsgáltuk. A MCA egy 33 aminosavból álló peptid, mely homológ elsődleges szerkezetet mutat a DHPR azon szakaszával, mely a vázizomban a RyR-t közvetlen mechanikai kapcsolat útján megnyitja. Ez a hasonlóság a MCA-t az elektromechanikai kapcsolat vizsgálatának jó eszközévé teszi. Munkacsoportunk a MCA szív- és vázizom típusú RyR-ra gyakorolt hatásának különbözőségeit kívánta jellemezni. Eredményeink szerint a MCA – a vázizom típusú RyR-ra gyakorolt hatásához hasonlóan – a szívizom típusú RyR-t is hosszantartó szubkonduktív állapotban rögzíti, de azok átlagos hossza rövidebb és frekvenciája nagyobb, mint vázizom esetében.

AZ ÉRTEKEZÉST MEGALAPOZÓ *IN EXTENSO* KÖZLEMÉNYEK:

Almássy J., Sztretye M., Lukács B., Dienes B., Szabó L., Szentesi P., Vassort G., Csernoch L. & Jóna I. (2008) Effects of K-201 on the calcium pump and calcium release channel of rat skeletal muscle. *Pflugers Arch.* **457**, 171-183 IF: 3,842*

Szigeti G. P., **Almássy J.**, Sztretye M., Dienes B., Szabó L., Szentesi P., Vassort G., Sárközi S., Csernoch L. & Jóna I. (2007) Alterations in the calcium homeostasis of skeletal muscle from postmyocardial infarcted rats. *Pflugers Arch.* **455**, 541-553 IF:3,842

Altafaj X., France J., **Almassy J.**, Jona I., Rossi D., Sorrentino V., Mabrouk K., De Waard M. & Ronjat M. (2007) Maurocalcine interacts with the cardiac ryanodine receptor without inducing channel modification. *Biochem. J.* **406**, 309-315 IF: 4,009

TOVÁBBI *IN EXTENSO* KÖZLEMÉNYEK:

Lukács B., Sztretye M., **Almássy J.**, Sárközi S., Dienes B., Mabrouk K., Simut C., Szabó L., Szentesi P., De Waard M., Ronjat M., Jóna I. & Csernoch L. (2008) Charged surface area of maurocalcine determines its interaction with the skeletal ryanodine receptor. *Biophys. J.* **95**, 3497-3509 IF: 4,627*

Birinyi P., Tóth A., Jóna I., Acsai K., **Almássy J.**, Nagy N., Prorok J., Gherasim I., Papp Z., Hertelendi Z., Szentandrassy N., Bányász T., Fülöp F., Papp J. G., Varró A., Nánási P. P. & Magyar J. (2008) The Na⁺/Ca²⁺ exchange blocker SEA0400 fails to enhance cytosolic Ca²⁺ transient and contractility in canine ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* **78**, 476-484 IF: 6,127*

Sárközi S., **Almássy J.**, Lukács B., Dobrosi N., Nagy G. & Jóna I. (2007) Effect of natural phenol derivatives on skeletal type sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and ryanodine receptor. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* **28**, 167-174 IF: 1,731

A *-gal megjelölt adatok 2007-re vonatkoznak, mivel a 2008-as impakt faktorok még nem állnak rendelkezésre.