

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**VÁZIZOM TÍPUSÚ SR KALCIUM CSATORNA (RyR1)
VIZSGÁLATA**

Lukács Balázs



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

DEBRECEN, 2008

**VÁZIZOM TÍPUSÚ SR KALCIUM CSATORNA (RyR1)
VIZSGÁLATA**

Lukács Balázs

Témavezető:
Dr. Jóna István, tudományos tanácsadó



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

DEBRECEN, 2008

1. Alapok

1.1 A kontrakció-relaxáció ciklus

Az elektomechanikai csatolás első lépéseként az akciós potenciál végigfut a vázizomrostok felszíni membránján és beterjed a T-tubulusok (melyek a szarkolemma kesztyűujszerű betüremkedései az izomrost belsejébe) membránján az izomrost belsejébe, ahol a szarkoplazmatikus retikulum terminális ciszternájával határos területeken feszültségérzékelő elemek (molekulák) találhatók. A feszültség szenzor a dihidropiridin származékokkal gátolható L-típusú Ca^{2+} -csatorna (DHP-receptor, DHPR), mely a vázizom fiziológiás izomműködése esetén kizárólag feszültség szenzorként működik. Az akciós potenciál megváltoztatja a DHP-receptorok konformációját, ami a szarkoplazmatikus retikulum (SR) terminális ciszternáiban elhelyezkedő rianodin szenzitív Ca^{2+} -csatornák (RyR) megnyílását eredményezi a DHPR II-III hurok és a RyR1 kapcsolat révén.

Az intracelluláris térbe jutott Ca^{2+} diffúzióval jut el a kötőhelyekhez, melyek közül a legjelentősebb a troponin C. A kalcium a troponin C-hez kötődik, ezzel meggyengül a troponin I kötődése az aktinhoz, és a tropomiozin oldal irányba mozdul el. A folyamat végeredményeképpen a vékony filamentumok elcsúsznak a vastag filamentumokon (sliding mehanizmus) és létrejön a kontrakció. A mioplazmába kijutott Ca^{2+} visszavétele az SR-be aktív transzportfolyamat révén valósul meg. A mioplazmatikus Ca^{2+} -koncentráció mindaddig emelt szinten marad, amíg a kalcium vissza nem transzportálódik az SR-be, elsődlegesen a longitudinális SR lumenébe, melyek membránja igen nagy denzitással tartalmazza a Ca^{2+} -pumpa (SR Ca^{2+} ATP-áz) molekulákat.

1.2. A vázizom típusú kalcium csatorna (RyR1)

A rianodin receptor egy nagy vezetőképességű (520-600 pS), kis szelektivitású kation csatorna. A csatorna egy 4 polipeptid molekulából (4x560 kDa) álló homotetramer. A RyR1 (vázizom típus) mindenfajta harántcsikolt izomban valamint az agy bizonyos részein (cerebellum Purkinje-sejtjei), és egyes simaizmokban található. A polipeptid láncok jellemzője a nagy méretű extramembrán régió, mely a citoplazmatikus ún. "láb" (foot) struktúrát hozza létre.

A kalcium csatorna (humán RyR1) N-terminális régiója, mely a citoplazmatikus térben helyezkedik el, számos genetikusan öröklődő mutációt is hordoz(hat). A mutációk egy része (Arg163Cys, Gly248Arg, Tyr522Ser, Gly2433Arg, Gly341Arg, Arg614Cys stb.) kapcsolatba hozható a malignus hyperthermia (MH) nevű betegséggel.

1.3. DHPR, A-peptid, IpTx_a

A vázizomban a RyR legfontosabb fehérje természetű szabályozója a T-tubulus membránjában elhelyezkedő öt alegységből (α_1 , α_2 , β , γ , δ) felépülő DHPR. Kimutatták, hogy a DHPR α_1 alegységének II-es és III-as doménjét összekötő citoplazmatikus huroknak a 671 (Thr) és 690 (Leu) aminosava közötti fehérjeszakasz (az ún. „A-peptid”) önmagában is képes befolyásolni a RyR működését. A RyR és a peptid közötti kapcsolat kialakulásáért valószínűleg egy néhány bázikus aminosavból álló rövid peptidszakasz felelős (681 RKRRK 685).

Az A-peptidhez hasonló motívum található a *Pandinus imperator* skorpió mérgéből izolálható imperatoxin-A (IpTx_a) elsődleges szerkezetében is. Mind az IpTx_a mind az A-peptid képes fizikailag is kapcsolódni a RyR-hoz, fokozzák a rianodin kötést, és SR vezikulákból kalcium felszabadulást indukálnak. Az A-peptid jelenlétében az IpTx_a indukált rianodin kötés mértéke dóziszfüggő módon csökken, ami arra utal, hogy a két peptid verseng a kötőhelyekért.

1.4. A maurokalcin

A maurokalcin (MCa) a *Scorpio maurus palmatus* mérgéből nemrég izolált 33 aminosavból 3 diszulfid hídat tartalmazó peptid. A felszíni töltésmintázat alapján a molekula felszínén egy markáns bázikus mező jelenik meg. Szekvenciáját tekintve 82%-ban megegyezik a *Pandinus imperator*-ból izolált imperatoxin A-val (IpTx_a). Mind a MCa mind az IpTx_a már nanomólos koncentrációban aktiválják a rianodin receptort. Az MCa bizonyos szekvencia homológiát mutat az A-peptiddel is, viszont a DHPR és a RyR közötti kapcsolat kialakításában meghatározó szerepet játszó domén szerkezete (N-terminális végén egy α -helix) különbözik mind a maurokalcinétól, mind az imperatoxin A-tól. Vázizom esetében, a maurokalcin fő támadáspontja az I-es típusú RyR. Kimutatták, hogy a maurokalcin koncentrációfüggő módon aktiválja a kalcium felszabadulást SR vezikulákból ($EC_{50}=17,5$ nM), a toxin hatását a rianodin

(500 μM) és a ruténium vörös (5 μM) gátolta. Leírták, hogy a maurokalcin koncentrációfüggő módon fokozza ($\text{EC}_{50}=1,2 \text{ nM}$) a rianodin kötést.

Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a M Ca izolált csatornán („single channel”) feszültség clamp körülmények között egy ún. szubkonduktancia (csökkent vezetőképességű) állapotot hoz létre, melynek vezetőképessége a teljes konduktanciának mintegy 60%-a. A maurokalcin hatékonysága egy nélkülözhetelen aminosavnak, az Arg²⁴-nek köszönhető, melynek hiányában a toxin kalcium csatornát aktiváló hatása elmarad. Intézetünk másik munkacsoportja kimutatta, hogy a M Ca myotubulus tenyészetben a rianodin receptoron keresztül kalcium felszabadulást okoz, de nem befolyásolja a depolarizáció által kiváltott kalcium tranzienseket.

Kollaborációs partnereink kimutatták, hogy a M Ca az úgynevezett sejt-penetráló peptidekhez hasonlóan (cell penetrating peptides, CPPs) képes passzív módon átjutni a biológiai membránokon és bejutni különböző típusú sejtekbe. A maurokalcin ezen kívül képes nagyméretű nem membránpermeábilis molekulákat is átjutatni a membránon, ami felveti a maurokalcin illetve származékainak orvosi, diagnosztikai, technológiai alkalmazásának lehetőségét.

1.5. Gadolínium

A lantanidák vagy ritkaföldfémek csoportjába a periódusos rendszer 58-71 rendszámú elemeit soroljuk. A sorozat tagjaira jellemző, hogy a rendszám emelkedésével az ionátmérő csökken (lantanida-kontrakció). A lantanidák 3+ pozitív töltésű kationok, méretük a kalciumhoz hasonló. Ebbe a csoportba tartozik a 64-es rendszámú gadolínium, ami a korábban leírt jellemzők mellett kiváló paramágneses tulajdonsággal is bír. A gadolínium bizonyos vegyületei meglepő módon ferromágneses tulajdonságot mutatnak, és egyes vegyületeik az erek falán is könnyen átjutnak ezért az orvostudományban (MR-vizsgálat) alkalmazásuk széles körben elterjedt. Már a 70-es években leírták, hogy a lantanidák számos élettani folyamatot befolyásolnak, illetve ezek az ionok direkt módon hatnak kalciumot kötő és transzportáló membránfehérjékre. Leírták, hogy vázizomban a gadolínium mikromoláris tartományban képes leszorítani a kalciumot a szarkoplazmatikus retikulum külső membránjáról. További vizsgálatok alapján kimutatták, hogy a lantanidák ionátmérőtől függő módon gátolják a vázizom kontrakcióját, a vizsgált lantanidák közül a legerősebb gátlást a gadolínium mutatta. A gadolínium a vázizom kalcium homeosztázisát a szarkoplazmatikus retikulum kalcium pumpáján keresztül is képes módosítani.

Jóna és Martonosi leírták, hogy a gadolínium a kalcium kötőhelyeken keresztül gátolja az SR Ca^{2+} -ATPáz.

Problémafelvetés és célkitűzések

Korábbi irodalmi adatok rávilágítottak arra, hogy a maurokalcin nevű skorpió toxin, mely szoros homológiát mutat a RyR szabályozásában meghatározó A-peptiddel, módosítja a vázizom típusú RyR működését. Feltételezhető, hogy a 24-es pozíciójú Arg aminosavnak illetve a toxin felszínén megjelenő pozitív töltésű mezőnek meghatározó szerepe van a M Ca -RyR kölcsönhatás kialakulásában

RyR1-en végzett „single channel” mérésekkel tisztázni kívántuk, vajon a maurokalcin illetve mutánsai módosítják-e és ha igen milyen módon a RyR1 kapuzását és farmakológiáját. Ezen kívül meg akartuk vizsgálni, hogy a maurokalcin felszínén megjelenő bázikus mező valóban meghatározó-e a RyR-M Ca kölcsönhatás kialakításában. Továbbá „kapcsolt enzim-assay” technikával tisztázni kívántuk, vajon a maurokalcin módosítja-e a kalcium homeosztázisban ugyancsak alapvető szerepet játszó SR kalcium pumpa működését.

Ismert, hogy a lantanidák és ezen belül a gadolínium képes kötődni különböző kalciumkötő fehérjékhez módosítva a sejtek kalcium homeosztázisát. Leírták, hogy a gadolínium gátolja N-, T- és L-típusú kalcium csatornák és az SR Ca^{2+} ATP-áz működését.

Kísérleteink második részében ezért az volt a célunk, hogy „single channel” mérésekkel és vezikuláris technikákkal (rianodin kötés, rapid filtráció) megvizsgáljuk a Gd^{3+} RyR1-en kifejtett hatását, különös tekintettel arra, hogy a hatás milyen kötőhelyen vagy kötőhelyeken keresztül valósul meg.

2. Metodikák

2.1. SR-vezikula preparálása nyúl vázizomból

A 2,5-3 kg-os nyulakból származó *musculus longissimus dorsi* eltávolítását követően az izmot késes Waring Blendor homogenizátorral homogenizáltuk 4°C-on. A preparálás során használt oldatokhoz a proteolízis elkerülése céljából inhibitorokat adtunk. A homogenizálást

követően centrifugálással (4500g, 25 perc) távolítottuk el az alakos elemeket. A szupernatansból a mikroszómákat összegyűjtöttük (40000g, 30 perc). Az aktomiozint magas káliumtartalmú pufferrel oldottuk ki. Inkubálás után a mikroszóma frakciót összegyűjtöttük (109000g, 30 perc). A pelletet reszuszpendáltuk, majd lineáris (20-45 %) szacharóz-gradiensre vittük fel. A centrifugálás (86000 g, 16 óra) után a gradiens 36-38 %-os régiójából gyűjtöttük össze a nehéz vezikulákat (HSR), ahol az jól látható éles frakciót képez. Az összegyűjtött vezikula frakcióhoz kétszerannyi térfogatú puffert adtunk és újból lecentrifugáltuk (60 perc, 124000 g). Centrifugálás után a pelletet reszuszpendáltuk és azonnal lefagyasztottuk cseppfolyós nitrogénben, majd -70°C-on tároltuk további felhasználásig.

2.2. A rianodin receptor izolálása

A szolubilizáció 9 ml térfogatban történt, amiben a fehérje koncentrációja ≈ 3 mg/ml. A rianodin receptor komplexet az SR membránjából 1 % (v/v) CHAPS detergens segítségével oldottuk ki. A szolubilizációs elegy (9 ml) összeállítását követően, abból 3 ml-t kivettünk, és azt ^3H -rianodinnal jelöltük (3 nM). A minták (jelölt és nem jelölt) inkubálását (2h, 4°C) követően a nem szolubilizált fehérjéket centrifugálással eltávolítottuk (20 perc, 59000 g). A szupernatant (3-3 ml) lineáris (10-28%) szacharóz gradiensre (1 „hot” + 2 „cold”) vittük fel és kilendülő rotorban (Beckman SW-27) centrifugáltuk (16 óra, 90000 g). A centrifugálás után a gradiensekből 15 cseppe (≈ 500 μl) frakciókat szedtünk. Az egyes frakciók radioaktivitását folyadékszintillátorral meghatároztuk (^3H -rianodinnal jelölt minta) és megmértük a hozzá tartozó törésmutatót is. A beütésszám-csúcs alapján megállapítottuk, hogy milyen törésmutatójú frakcióban dúsult fel a [H^3]-rianodin. A nem jelzett gradiensekből szedett frakciók törésmutatóinak meghatározásával lehetővé válik, hogy a nem jelzett mintákból azokat a frakciókat használjuk a kísérleteinkben, amelyekben a RyR magas koncentrációban van jelen.

Az így azonosított frakciókból vett mintákat 10 %-os poliakrilamid gélen futtattuk és Coomassie-blue-val festettük. A festődés denzitása szemikvantitatív információt ad a gélen lévő fehérje mennyiségéről és az esetleges szennyeződés (főleg aktomiozin szennyeződés) mértékéről.

2.3. “Single-channel” mérés

Az izolált Ca^{2+} -csatorna vizsgálatát mesterséges lipid kettősrétegbe épített RyR1-en végeztük, feszültség-clamp körülmények között. A mesterséges membránt L- α -foszfatidiletanolamin, L- α -foszfatidilszerin és L- α -foszfatidilkolin 5:4:1 arányú keverékének 20 mg/ml koncentrációjú *n*-dekános oldatából hoztuk létre, két szimmetrikus folyadékteret elválasztó 250 μm átmérőjű nyíláson. A RyR1-et a membránba szimmetrikus pufferben 50 μM szabad kalcium jelenlétében építettük be. A két oldal között a csatorna aktivitásának mérése közben 40-80 mV potenciálkülönbséget tartottunk fenn. Annak érdekében, hogy a beépült RyR orientációját ellenőrizzük, vagy a *cisz* oldal szabad Ca^{2+} -koncentrációját csökkentettük EGTA-val 240 nM-ra, vagy a mérések végén a *cisz* oldalra rianodint adtunk.

A membránon átfolyó áramot Axopatch 200 erősítővel mértük, majd 8 pólusú aluláteresztő Bessel szűrővel szűrtük ($f_{\text{co}}=1$ kHz). Az elektromos jeleket 3 kHz-es vagy 10 kHz-es mintavételi frekvenciával digitalizáltuk, és számítógépen tároltuk. A mérések során kapott rekordokat pClamp 6.02 programmal analizáltuk. A szabad Ca^{2+} koncentrációt a Fabiato által leírt abszolút stabilitási állandók alapján az általa publikált számítógépes program segítségével számoltuk ki. A nyitvatartási valószínűséget az elfogadott 50%-os kritérium és 5%-os középső holt zóna alapján számoltuk. Az áram-amplitúdó eloszlást Origin (Microcal Software, Northampton, MA) program segítségével vizsgáltuk. Az LLSS arányt az alapján számoltuk, hogy a csatorna idejének hány százalékát töltötte a félvezető állapotban a mérési idő alatt, a számoláshoz Axoscope 10 szoftvert használtunk.

2.4. Rapid filtráció

Ezzel a technikával a rianodin receptort tartalmazó nehéz SR vezikula lumenében lévő kalcium mennyiségére, így a kalcium felszabadulás mértékére tudunk következtetni a kiindulási intra-luminális mennyiség ismeretében. A kísérletek során a vezikulákat passzívan (1 órán át, szobahőmérsékleten) töltöttük fel ^{45}Ca izotóppal. A mérés első lépésében a vezikulát tartalmazó oldatot szűrtük „át” a membránon (DA, pórusátmérő: 0,65 μm), ekkor a vezikulák a membrán felületén tapadnak meg, majd lemostuk a vezikula külső felületén adszorbeált ^{45}Ca -ot. A vizsgálandó anyagot tartalmazó oldat, az ún. mérő oldat szűrése előre beállított időtartamig

történt (20-30-60-300-stb μ s). A mérést követően a membránon visszamaradt radioaktivitást folyadékszintillációs módszerrel (Packard TRI-Carb 2200CA folyadékszintillációs spektrofotométer) határoztuk meg.

2.5. Rianodin kötés

A Ca^{2+} - csatornához (RyR) a rianodin akkor kapcsolódik, ha a csatorna nyitva van, tehát a rianodin kötődésének mértékével jellemezhető a csatorna aktív állapota. A folyamat detektálásához radioaktívan jelölt (^3H -rianodin) ligandot használtam. A vizsgálat során a mintákat (nyúl vázizom HSR vezikula) triciált rianodin jelenlétében inkubáltam 2 órán keresztül, 37°C -on. A Gd^{3+} hatásának vizsgálatakor a Gd^{3+} -ot 30 perccel a jelölt rianodin hozzáadása előtt adtam a mintához. A reakcióelegyek végtérfogata $50\ \mu\text{l}$, melyben $25\ \mu\text{g}$ fehérje volt. A nem specifikus kötődés meghatározásához a jelzett rianodin alkalmazása előtt az inkubáló oldathoz feleslegben adtam a nem jelzett („hideg”) rianodint ($50\text{--}100\ \mu\text{M}$). Inkubálást követően mosó pufferrel mostam át vízlégszivattyú segítségével a Millipore 50 típusú membránt (pórusátmérő: $0,45\ \mu\text{m}$). A mosás megismétlése és a membrán szárítását követően a membránból folyadék szcintillációval határoztam meg a vezikulákhoz kötődött triciált rianodin mennyiségét.

2.6. A Ca^{2+} -pumpa aktivitása

Kísérleteimben SR vezikulákat használtam (ezek tartalmazzák a Ca^{2+} -pumpát), melyet nyúl vázizmából izoláltunk. A pumpa működésének jellemzésére piruvát-kináz “kapcsolt enzim-assay” technikát alkalmaztam. A rendszer elve, hogy a pumpa működése során ATP-t hasít, így ADP-t termel, ami foszfoenol-piruvátból piruvát-kináz enzimmal piruvátot képez, ami egy következő reakcióban laktát-dehidrogenáz révén laktátot képez, miközben NADH-ból NAD^+ keletkezik.

A méréseket 37°C -on végeztem $100\ \text{mM}$ KCl, $0,5\ \text{mM}$ MgCl_2 , $20\ \text{mM}$ Tris HCl ($\text{pH}=7,5$), $7,5\ \text{U/ml}$ piruvát-kináz, $18\ \text{U/ml}$ laktát-dehidrogenáz, $0,42\ \text{mM}$ foszfoenol-piruvát valamint $0,2\ \text{mM}$ NADH-t és $2\ \mu\text{M}$ ionofór (A23187) jelenlétében. Fotométer segítségével a NADH-fogyást mértem a $340\ \text{nm}$ -en bekövetkező abszorbancia változás alapján. A Ca^{2+} -pumpa aktivitását – az SR vezikula frakció fehérje koncentrációjának figyelembevételével – a kapott görbe

meredekségéből számoltam ki. A Ca^{2+} -függő aktivitást az 5 μM thapsigargin jelenlétében mért aktivitás és a teljes aktivitás különbsége adta meg. (A thapsigargin az SR Ca^{2+} -pumpájának széles körben elterjedt inhibitora.) A mérések során a Ca^{2+} és EGTA koncentrációt úgy állítottam be, hogy a szabad Ca^{2+} -koncentráció ($\approx 2 \mu\text{M}$) a SERCA maximális aktivitását biztosítsa.

3. Eredmények

3.1. A maurokalcin hatása

3.1.1. A csatorna kapuzásának változása

A M_{Ca}-nak a kalcium csatorna működésére gyakorolt hatását mesterséges lipid kettősrétegbe épített RyR1-en vizsgáltuk 250 mM K^+ -t töltéshordozóként alkalmazva. 50 nM citoplazmatikus (*cis*) M_{Ca} koncentrációnál a csatorna működése során hosszantartó szubkonduktancia állapotok jönnek létre (LLSS = Long Lasting Subconductance State), melyek a csatorna maximális konduktanciájának ~60%-ának megfelelő csökkent vezetőképességű, tartósan nyitott állapotok. A vad típusú maurokalcin jelenlétében kialakuló LLSS-ok több ezerszer hosszabbak, mint a toxin adása előtti (azaz a kontroll) esetben mért átlagos nyitvatartási idő (τ_o = mean open time). Maurokalcin jelenlétében a LLSS-ok között a csatorna kapuzása normális jellegű, de aktivitása magasabb. A szubkonduktancia állapotok közötti (inter-LLSS) nyitvatartási valószínűség mintegy tízszeresére nőtt 200 nM (*cis*) M_{Ca} jelenlétében ($P_{o,\text{kontroll}} = 0,02 \pm 0,007$; $P_{o,\text{M}_{Ca}} = 0,21 \pm 0,016$). Jelentős tapasztalat, hogy a maurokalcinnal kezelt csatorna megtartja rianodin érzékenységét és együttes alkalmazásuk során (1 μM rianodin + 50 nM M_{Ca}) mindkét anyag hatása egymástól függetlenül megjelenik, ami arra enged következtetni, hogy a M_{Ca} és a rianodin a csatorna különböző szegmenseihez kötődik.

3.1.2. A mutációk hatása a kapuzásra

A szintetikus maurokalcin származékok növelik a csatorna P_o -ját, és szubkonduktancia állapotot indukálnak hasonló módon – de különböző mértékben – mint a vad típusú toxin. Ha a vad típusú M_{Ca}-ban a 24-es pozíciójú arginin aminosavat lecseréljük alaninra ([Ala²⁴]M_{Ca}

mutáns) a szubkonduktancia állapotok gyakorlatilag megszűnnek. A 20-as, 22-es, 23-as pozícióban mutált toxinoknál az LLSS-ban eltöltött idők egyre kisebbek annak megfelelően, hogy a mutált aminosav térben milyen távolságra helyezkedik el a 24-es pozíciójú aminosavhoz képest. Ezzel szemben a Lys8 vagy a Lys19 lecserélése Ala-ra a vad típusnál kapott LLSS arányt jelentősen nem módosítja, ugyanis ezek az aminosavak az előbb említett bázikus mezőtől távol helyezkednek el.

3.1.3. A hatás polaritásfüggése

A maurokalcin és mutánsai által indukált szubkonduktancia állapotok paramétereit befolyásolja az alkalmazott membránfeszültség polaritása illetve a csatornán átfolyó áram iránya. Mikor a töltés hordozó ion (méréseinkben K^+ , fiziológiásan Ca^{2+}) a *transz* (luminális) oldal felől mozog a *cisz* (citoszólikus) oldal felé, akkor az áram iránya azonos a kalcium felszabaduláskor az SR-ből kiáramló kalcium ionok irányával (“fiziológiás irány”). A “fiziológiás irány”-nak megfelelő polaritású membrán potenciált alkalmazva az LLSS arányok mindegyik vizsgált – vad és mutáns – toxin esetében jelentősen kisebbek, mint az ellentétes polaritáson (“ellentétes irány”) kapott értékek.

A toxinok Ca^{2+} -csatornára gyakorolt hatását megvizsgáltuk olyan módon is, hogy a tartófeszültséget lépcsőzetesen emeltük (feszültség lépcsők alkalmazása). Egy adott polaritásnál úgy tűnik, hogy a vizsgált 20-120 mV-os feszültség tartományban a toxinok hatása függ az alkalmazott membránfeszültségtől, mivel a transzmembrán feszültség emelése növelte a szubkonduktancia állapot relatív konduktanciáját (LLSS relatív konduktanciája = I_{llss} / I_{max}).

3.1.4. A különböző mutánsok eltérő hatásúak

Megvizsgáltuk a toxinok hatását az LLSS arányra és az egyes események hosszára 50 μM szabad kalcium jelenlétében. Mindegyik vizsgált koncentrációban (50 nM, 200 nM, 500 nM) a leghatásosabb a vad típus, míg a 24-es mutáns gyakorlatilag hatástalan. Minél közelebb van a mutáció helye a 24-es pozíciójú aminosavhoz, annál kisebb az LLSS arány. A LLSS-ok időtartama leghosszabb a vad típusnál, míg a legrövidebb a 24-es mutánsnál. Ráadásul a mutáció helye sokkal inkább hat az egyes események hosszára, mint az LLSS arányra, mivel a toxinoknál

– különösen a 8-as és 19-es mutánsnál – az LLSS-arány csökkenése nem olyan drámai mértékű, mint a LLSS-ok hosszában bekövetkező változás, ami arra utal, hogy az LLSS-arány csökkenésének hátterében inkább az egyes LLSS-ok rövidülése és nem a LLSS-ok frekvenciájának (LLSS-ok megjelenési gyakorisága) csökkenése áll. Ezen kívül az LLSS-arányt az alkalmazott toxin koncentrációja dóziszfüggő módon növeli, ezzel szemben a LLSS-ok hosszát a toxin koncentrációja alapvetően nem befolyásolja.

3.1.5. A kalcium koncentráció nem befolyásolja a toxin-csatorna kölcsönhatást

A maurokalcin és pontmutánsainak hatását nemcsak magas (50 μ M), hanem alacsony (240 nM) kalcium koncentrációnál is megvizsgáltuk. 240 nM kalcium jelenlétében a maurokalcin ugyancsak hosszantartó szubkonduktancia állapotokat indukált. Alacsony kalcium koncentrációnál is a leghatásosabb a vad típus volt, míg a 24-es mutáns gyakorlatilag hatástalannak bizonyult. Az egyes LLSS-ok hossza ugyancsak a vad típus esetében volt a legnagyobb. A toxinok polaritás-függő hatását 240 nM kalcium jelenlétében is sikerül kimutatni. A kapott eredmények alapján megállapítottuk, hogy a kalcium koncentráció a maurokalcin és mutánsainak kalcium csatornára gyakorolt hatását alapvetően nem befolyásolja, azaz a toxinok hatása független az alkalmazott kalcium koncentrációtól.

3.1.6. A maurokalcin és mutánsai nem befolyásolják az SR Ca^{2+} -pumpa aktivitását

A maurokalcin és mutánsainak SR kalcium pumpa hidrolitikus aktivitására gyakorolt hatását “kapcsolt enzim-assay” technikával vizsgáltuk. A toxinok vizsgálatát három koncentrációnál (50 nM, 200 nM, 500 nM) végeztük. A maurokalcin és mutánsai jelenlétében mért aktivitást minden esetben normalizáltuk a kontroll (toxin hiányában) méréseknél kapott aktivitásra. A kapott adatokat ábrázolva megállapítottuk, hogy sem a vad típusú maurokalcin (M_{Ca}), sem pedig annak mutánsai ([Ala⁸]M_{Ca}, [Ala¹⁹]M_{Ca}, [Ala²⁰]M_{Ca}, [Ala²²]M_{Ca}, [Ala²³]M_{Ca}, [Ala²⁴]M_{Ca}) a vizsgált koncentráció tartományban az SR kalcium pumpa hidrolitikus aktivitását nem módosítják.

3.2. A gadolínium hatása a RyR1-ra

3.2.1. A citoplazmatikus gátlás

A citoplazmatikus (*cisz*) oldalon mikromólos koncentráció tartományban alkalmazott gadolínium csökkentette a csatorna nyitvatartási valószínűségét (P_o). A csatorna $13,3 \mu\text{M}$ gadolínium jelenlétében gyakorlatilag teljesen bezáródott. A gátlás reverzibilis volt, mivel a gadolíniummal ekvimoláris EGTA alkalmazása után a csatorna aktivitása a kontrollhoz hasonló értékre tért vissza. Mindegyik mérésnél meghatároztuk a RyR nyitvatartási valószínűségét kontroll esetben és Gd^{3+} jelenlétében. A kiszámolt P_o értékeket ábrázoltuk a *cis* Gd^{3+} koncentráció függvényében, és a kapott pontokat Hill-egyenlettel illesztve meghatároztuk a félgátló koncentráció ($\text{IC}_{50}=5,65 \pm 0,3 \mu\text{M}$) és a Hill-koefficiens értékét ($n_{\text{Hill}}=4,71 \pm 0,8$).

3.2.2. A lúminális gátlás

Megvizsgáltuk a Gd^{3+} kalcium csatornára gyakorolt hatását a csatorna lúminális (*transz*) oldala felől alkalmazott Gd^{3+} esetén is. Annak érdekében, hogy a *transz* oldalon alkalmazott Gd^{3+} a csatorna pórusán átjutva *cisz* oldalon ne befolyásolja a RyR1 működését a *cisz* oldalon EGTA- Ca^{2+} puffert alkalmaztunk, mert méréseink azt mutatták, hogy a *transz* oldali Gd^{3+} ugyancsak koncentrációfüggő módon és reverzibilisen gátolja a csatorna működését. A *transz* oldali EGTA alkalmazása után a csatorna aktivitása néhány másodperc alatt visszatért, ami arra utal, hogy a gadolínium nem a csatornán átjutva, a *cisz* oldalra kerülve fejt ki hatását. A normalizált P_o -t ábrázoltuk a *transz* Gd^{3+} függvényében, a kapott görbe alapján az $\text{IC}_{50}=5,47 \pm 0,2 \mu\text{M}$ a Hill-koefficiens $4,31 \pm 0,6$

Azokat a rekordokat felhasználva, melyekből a P_o -t számoltam, “open time” (a megnyílések száma a megnyílések amplitúdójának függvényében) hisztogramot készítettünk. A hisztogramot egy komponensű exponenciális függvénnyel illesztve megkaptuk a τ_o -t (mean open time konstans, átlagos nyitvatartási idő). A gadolínium koncentrációfüggő módon csökkenti a rianodin receptor τ_o -ját mind *cisz*, mind *transz* oldal felől alkalmazva.

Négy mérés során különböző feszültség lépcsőket alkalmaztunk annak tisztázására, vajon a transzmembrán feszültségkülönbség hatással van-e a Gd^{3+} indukált gátlásra. A kísérletek során 2

$\mu\text{M Gd}^{3+}$ (*transz*) jelenlétében lépcsőzetesen változtattuk a tartófeszültséget. Az adott tartófeszültségen mért P_o -kat normalizáltam a Gd^{3+} -ot nem tartalmazó szakasz P_o -jára (kontroll) ez a $P_{o,\text{norm}}$. Az egyedi csatornaműködésből (Gd^{3+} -gátlás) adódó különbségek csökkentése érdekében, a négy normalizált nyitvatartási valószínűség átlagát ($P_{o,\text{átl}}$) képeztük, mint viszonyítási alapot, és ezzel osztottuk ismételtén a normalizált P_o -kat ($P_{o,\text{norm}}/P_{o,\text{átl}}$) és az így számolt értékeket ábrázoltam a tartófeszültség függvényében. A lineáris regresszió során kapott meredekség alacsony értéke arra utal, hogy a csatorna gátlását a tartófeszültség nem befolyásolja, ami azt valószínűsíti, hogy a gadolínium gátló hatását a lumenális oldalon fejt ki anélkül, hogy a citoplazmatikus oldalra átjutna.

3.2.3. A gátlás vizsgálata vezikuláris rendszeren

A “single-channel” mérések esetén alapvetően a szolubilizált Ca^{2+} -csatorna tulajdonságait mérjük. Ugyanakkor célszerű megvizsgálni, hogy a junkcionális membránban “in situ” jelenlévő ún. akcesszórius fehérjék befolyásolják-e, azaz módosítják-e a RyR- Gd^{3+} kölcsönhatást. Erre célszerűen HSR vezikulákon történő méréssel kerülhet sor.

A rapidfiltráció során vezikulákat passzívan töltöttük fel radioaktív kalciummal ($^{45}\text{Ca}^{2+}$), majd megvizsgáltuk, vajon a Gd^{3+} módosítja-e az ATP + koffein hatására bekövetkező kalcium felszabadulás mértékét. A minták aktivitását ábrázoltuk az ún. kontakt idő függvényében kontroll körülmények között és $20 \mu\text{M Gd}^{3+}$ jelenlétében. A kapott pontokat egy komponensű exponenciális függvénnyel illesztettük. A kontrollhoz képest $20 \mu\text{M}$ gadolínium jelenlétében az időállandó nőtt, azaz a kalcium felszabaduláshoz szükséges idő nőtt, miközben a maximálisan felszabadítható kalcium mennyisége nem változott. Az időállandó nagyobb értéke arra utal, hogy a Gd^{3+} csökkenti – “single channel” eredmények alapján – a feltehetőleg RyR-on keresztül megvalósuló kalcium felszabadulás sebességét.

A gadolínium RyR1-t moduláló hatását megvizsgáltam HSR vezikulákon rianodin kötéssel is. Gadolínium jelenléte ($5 \mu\text{M}$) növelte a rianodin kötés disszociációs állandóját, ami a RyR gátlására utal, miközben a B_{max} értéke szignifikánsan nem változott ($p < 0,05$). Meghatároztuk a rianodin kötés gadolínium függését, ahol állandó jelölt rianodin (18 nM) jelenlétében különböző gadolínium koncentrációkat alkalmaztunk. A kapott pontokat Hill-egyenlettel illesztve a rianodin

receptor gadolínium által történő gátlására a következő paramétereket kaptuk: $K_d=14,7 \pm 0,7$ nM, $n_{Hill}=3,16 \pm 0,42$.

4. Megbeszélés

4.1. A maurokalcin módosítja a csatorna működését

Korábbi irodalmi adatok alapján ismert, hogy a maurokalcin SR vezikulákból kalcium felszabadulást, mesterséges lipid kettősrétegbe épített rianodin receptoron, pedig szubkonduktancia állapotot indukál. "Single channel" méréseink kimutatták, hogy a vad típusú maurokalcin 50 nM-os citoplazmatikus (*cisz*) koncentrációnál a kalcium csatorna működését módosítva hosszantartó szubkonduktancia állapotokat okoz (LLSS), melyek a csatorna maximális konduktanciájának ~60%-ának megfelelő csökkent vezetőképességű, tartós fél-nyitott állapotok. Maurokalcin jelenlétében a LLSS-ok között a csatorna kapuzásában minőségi változás nem figyelhető meg, a csatorna aktivitása – a szubkonduktancia állapotok közötti normál kapuzású állapotban – tízszeresére nőtt. A vad típusú toxin jelenlétében kialakuló LLSS-ok igen hosszúak akár 10-20 másodperc is lehet az időtartamuk szemben a csatorna szokásos 300-600 μ s-os átlagos nyitvatartási idejével. Mind a csatorna aktivitásának emelkedése (magas P_o), mind a LLSS-ban eltöltött hosszú idő (magas LLSS arány) eredményezheti az SR vezikulákon korábban kimutatott nagy mértékű kalcium felszabadulást. Intézetünk másik munkacsoportja megvizsgálta a maurokalcin és mutánsainak elemi kalcium felszabadulási eseményeire gyakorolt hatását patkány illetve béka harántcsikolt izmain. A toxin beadását követően az elemi események amplitúdója csökkent, a térbeli kiterjedést viszont a toxin nem befolyásolta. Az elemi események amplitúdójának csökkenése összhangban van a „single channel” méréseink során tapasztalt csökkent vezetőképességű állapotok megjelenésével. A maurokalcinnal kezelt csatorna megtartja rianodin érzékenységét is, maurokalcin és rianodin együttes alkalmazása során (1 μ M rianodin + 50 nM MCa) mindkét anyag hatása megjelenik. A csatorna a maurokalcin illetve a rianodin által kiváltott szubkonduktancia állapotok között oszcillált. Mivel mindkét alkalmazott anyag hatása megjelent arra következtettünk, hogy a MCa és a rianodin a csatorna különböző szegmenseihez kötődnek.

4.2. A különböző mutációk hatása eltérő

A bázikus aminosavak jelentőségét a toxinok és a RyR1 kölcsönhatásaiban az IpTx_a és az A-peptid esetében is leírták. Az említett peptidek esetében akár egy aminosav módosítása az aktiváló hatás megszűnését eredményezte. Intézetünk másik munkacsoportja kimutatta, hogy a mutációk módosítják az elemi események jellemzőit is. A vad típushoz hasonlóan a 8-as és 19-es mutáns olyan hosszantartó kalcium felszabadulási eseményeket okozott, melyek kontroll körülmények között nem voltak megfigyelhetőek. Ezzel szemben a 22-es mutánsnál az elemi események szignifikánsan rövidebbek voltak, a 24-es mutáns, pedig gyakorlatilag hatástalan volt. Az izolált csatornán végzett mérések során a 8-as és 19-es mutáns hatásában nem különbözött jelentősen a vad típustól, míg a 20-, 22-, 23-as mutánsok rianodin receptorra kifejtett hatása csökkent, a 24-es mutáns pedig gyakorlatilag hatástalan volt. Az elemi kalcium felszabadulási események vizsgálata során nyert adatok és „single channel” méréseink értelmezése egymást megerősíti. A kollaborációs partnereink és saját adataink alapján valószínűsíthető, hogy a maurokalcin esetében a 24-es pozíciójú aminosav az, amely kritikus a toxin hatásának kialakításában. Amennyiben a mutáció térben a kritikus helytől távolabb következik be, a toxin hatása kevésbé változik meg a vad típushoz képest. Ahogy a korábban említett IpTx_a és az A-peptid esetében, úgy a MCa hatásában is a toxin felszínén megjelenő bázikus aminosavak felelősek a hatás kialakításáért (19 **KKCKRR** 24).

4.3. A maurokalcin hatása polaritásfüggő

Ismert, hogy a maurokalcinnal szoros szerkezeti homológiát mutató IpTx_a hatása feszültség- és polaritásfüggést mutat. Munkánk során mi is azt mutattuk ki, hogy a maurokalcin és mutánsai által indukált szubkonduktancia állapotok paramétereit befolyásolja az alkalmazott membránfeszültség polaritása illetve a csatornán átfolyó áram iránya. Mikor a töltés hordozó ion (K^+ vagy Ca^{2+}) a *transz* (luminális) oldalról áramlik a *cisz* (citoszólikus) oldalra az áram iránya azonos a kalcium felszabaduláskor az SR-ből kiáramló kalcium ionok irányával (“fiziológiás irány”). A “fiziológiás irány” (A töltéshordozó ion K^+ vagy Ca^{2+} a *transz* oldalról áramlik a *cisz* oldalra.) szerinti membrán potenciált alkalmazva az LLSS arányok mindegyik vizsgált toxin esetében kisebbek, mint az ellentétes polaritáson (“ellentétes irány”) kapott értékek. A toxinok

rianodin receptorra gyakorolt hatását feszültséglépcsők alkalmazásával megvizsgálva megállapítottuk, hogy adott polaritáson 20-120 mV-os feszültség tartományban a toxinok hatása függ az alkalmazott membránfeszültségtől, mivel az LLSS relatív konduktanciáját a membránfeszültség emelése növelte.

4.4. A maurokalcin és mutánsai nem befolyásolják az SR Ca^{2+} -ATPáz aktivitását

A maurokalcin és mutánsainak SR Ca^{2+} -ATPáz hidrolitikus aktivitására gyakorolt hatását “kapcsolt enzim-assay” technikával vizsgáltuk. A toxinok (M Ca , [Ala⁸]M Ca , [Ala¹⁹]M Ca , [Ala²⁰]M Ca , [Ala²²]M Ca , [Ala²³]M Ca , [Ala²⁴]M Ca) egyik vizsgált koncentrációban (50 nM, 200 nM, 500 nM) sem módosították az SR kalcium pumpa hidrolitikus aktivitását. A maurokalcin erősen bázikus molekula (fiziológiás pH-n +7), a felszíni töltésmintázat alapján a molekula felszínén egy markáns bázikus mező jelenik meg, aminek kialakításában a Gly és a Lys aminosavak vesznek részt. A kapott eredmény arra utal, hogy az SR kalcium pumpa – ellentétben a RyR1-gyel – nem rendelkezik olyan régióval, mely képes lenne kapcsolódni a maurokalcinnal. Továbbá valószínűsíthető, hogy a maurokalcin kalcium homeosztázist módosító hatásában az SR kalcium pumpája nem vesz részt.

4.5. A gadolínium gátolja a RyR aktivitását

A mérések során a Gd^{3+} -t citoplazmatikus és a luminális oldalon is alkalmaztuk annak eldöntésére, hogy az ion hatását melyik oldalon fejtí ki. A “single channel” mérésekben a Gd^{3+} hasonlóan, koncentráció függő módon gátolta a csatorna aktivitását mindkét oldalon. A K_d ($\approx 5 \mu\text{M}$) és a Hill-koefficiens értékek (≈ 4) hasonlóak voltak a két oldalon, ami arra utal, hogy a működő funkcionális csatornán 4 hasonló affinitással bíró kötőhely van jelen a Gd^{3+} számára a citoplazmatikus és a luminális oldalon egyaránt. Korábbi eredmények alapján ismert, hogy a luminális Ca^{2+} -koncentráció befolyásolja a csatorna aktivitását, ám eddig nem sikerült kation kötőhely jelenlétét leírni a luminális oldalon. A Gd^{3+} hatásában feszültség-függést nem mutatott és a *transz* oldalon a gátlást akkor is kifejtette, amikor a *cisz* oldalon 100 μM EGTA-t alkalmaztunk, mely a Gd^{3+} -ot milliószor jobban köti mint a Ca^{2+} -t. Amikor az EGTA-t *transz* oldalon alkalmaztuk a csatorna aktivitása a gadolínium gátlásból igen hamar (≈ 10 másodperc)

visszatért, ami arra utal, hogy az EGTA a lumenális oldali kötőhelyről távolította el a Gd^{3+} -t. Megvizsgáltuk, hogy vajon van-e versengés a Ca^{2+} és a Gd^{3+} között a RyR1 alacsony és magas affinitású kalciumkötőhelyei között. A mérések során $4,5\ \mu M$ Gd^{3+} (*cisz*) jelenlétében a szabad kalcium koncentrációt $100\ \mu M$ -ról $1\ mM$ -ig emeltük, viszont a csatorna aktivitása szignifikánsan nem változott. Ezzel szemben $50\ \mu M$ EGTA (*cisz*) alkalmazása során a csatorna P_o -ja nőtt, mivel az EGTA a szabad Gd^{3+} koncentrációt gyakorlatilag nullára csökkentette, miközben a kalcium koncentráció csak néhány tíz mikromóllal csökkent. Amennyiben a Gd^{3+} és a Ca^{2+} között versengés lenne, akkor az $1\ mM$ -os (*cisz*) szabad kalciumnak le kellett volna szorítania a Gd^{3+} -t (*cisz*) a kötőhelyéről és a csatorna aktivitásának kontroll értékhez kellett volna közelítenie. Mivel a Gd^{3+} -gátolt csatorna aktivitása szignifikánsan nem változott a kalcium hozzáadásakor, megállapíthatjuk hogy a Gd^{3+} a gátlást nem a kalciumkötőhelyeken keresztül fejti ki.

Rapid filtrációval és rianodin kötéssel is ellenőriztük, hogy a gadolínium valóban befolyásolja-e a RyR1-en keresztül folyó kalcium felszabadulást. Rapidfiltrációnál a kontrollhoz képest $20\ \mu M$ gadolínium jelenlétében a kalcium felszabaduláshoz szükséges idő nőtt, miközben a maximálisan felszabadítható kalcium mennyisége nem változott. A kalcium felszabaduláshoz szükséges idő emelkedése arra utal, hogy a HSR vezikulában lévő kalcium csatornák aktivitását a Gd^{3+} gátolja.

A gadolínium ($5\ \mu M$) növelte a rianodin kötés disszociációs állandóját, miközben a B_{max} értéke szignifikánsan nem változott. Meghatároztuk a rianodin kötés gadolínium függését is, mely ugyancsak azt bizonyítja, hogy a gadolínium koncentráció függő módon gátolja a RyR1 működését. A kapott eredmények arra utalnak, hogy a RyR1 mind *cisz* mind *transz* oldalon képes gadolíniumot kötni. A gadolínium mindkét oldalon reverzibilisen és koncentrációfüggő módon gátolja a csatorna aktivitását, a meghatározott Hill-koefficiens és EC_{50} értékek hasonlóak. A gadolínium *cisz* oldali kötőhelye valószínűleg nem azonos a *cisz* oldalon található korábban leírt kalciumkötőhellyel.

5. Összefoglalás

A maurokalcin (MCA) egy 33 aminosavból álló peptid toxin, melyről kimutatták, hogy kötődik a vázizom típusú rianodin receptorhoz (RyR1), és megváltoztatja a kalcium csatorna kapuzását. Munkánk során a MCA és pontmutánsainak ([Ala⁸]MCA, [Ala¹⁹]MCA, [Ala²⁰]MCA, [Ala²²]MCA, [Ala²³]MCA és [Ala²⁴]MCA) hatását vizsgáltuk mesterséges lipid kettősrétegbe épített vázizom típusú rianodin receptoron (RyR1), valamint kapcsolt enzim assay technikával ellenőriztük a toxinok SR Ca²⁺-pumpára gyakorolt hatását. Megvizsgáltuk a lantanidák közé tartozó gadolínium hatását izolált csatornán és vezikuláris preparátumon „single channel” technikával, rapid filtrációval és rianodin kötéssel.

Megállapítottuk, hogy a maurokalcin és pontmutánsai által indukált szubkonduktancia állapotok (LLSS) hossza a másodperces tartományban mozog. Az események átlagos hossza valamint megjelenési gyakorisága (frekvenciája) különbözik a vizsgált mutánsok esetében annak megfelelően, hogy a mutáció hol helyezkedik el a kritikus 24-es pozíciójú aminosavhoz viszonyítva. Bizonyítottuk, hogy minél közelebb van a mutált aminosav a kritikus helyhez a LLSS állapotok hossza és frekvenciája és ennek eredményeképpen az LLSS állapotok aránya is annál kisebb. A hatás erősen függ az áram irányától (polaritásától). Ha az ion áram iránya megegyezik a kalcium felszabadulás irányával a toxin 8-10-szer hatástalanabb a fordított áramirányhoz viszonyítva. A toxin és mutánsainak hatása hasonló 50 μ M és 240 nM szabad kalcium koncentráció esetében is. Kimutattuk, hogy a toxinok hatásáért egy pozitív töltésű mező a felelős, melynek kialakításában a ²⁰Lys, ²²Lys, ²³Arg, ²⁴Arg, ⁸Lys aminosavak vesznek részt, míg a 19-es mutáns hatása gyakorlatilag a vad típus hatásával egyezik meg. Megállapítottuk, hogy a maurokalcin és mutánsai nem befolyásolják az SR Ca²⁺-pumpa hidrolitikus aktivitását.

A „single channel” mérések alapján kimutattuk, hogy a gadolínium koncentrációfüggő módon gátolja a kalcium csatorna aktivitását mind a citoszólikus, mind a lumenális oldalon, gátolja a kalcium felszabadulást SR vezikulákból, valamint a csatorna rianodin kötését. A csatorna gátlása nem mutatott feszültségfüggést. Eredményeink a RyR1 mindkét oldalán jelenlévő hasonló paraméterekkel (IC₅₀, Hill-koefficiens) bíró gátló kötőhely jelenlétét valószínűsítik.

AZ ÉRTEKEZÉST MEGALAPOZÓ KÖZLEMÉNYEK:

B. Lukács, M. Sztretye, J. Almássy, S. Sárközi, B. Dienes, K. Mabrouk, C. Simut, L. Szabó, P. Szentesi, M. De Waard, M. Ronjat, I. Jóna and L. Csernoch (2008): Charged surface area of maurocalcine determines its interaction with the skeletal ryanodine receptor. *Biophysical Journal* közlésre elfogadva. **IF: 4,757**

S. Sárközi, Cs. Szegedi, **B. Lukács**, M. Ronjat and I. Jóna (2005) Effect of gadolínium on the ryanodine receptor/sarcoplasmic reticulum calcium release channel on skeletal muscle. *FEBS Journal* 272. 464-471. **IF: 3,260* (3,033)**

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK:

S. Sárközi, J. Almássy, **B. Lukács**, N. Dobrosi, G. Nagy and I. Jóna (2007) Effect of natural phenol derivatives on skeletal type sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and ryanodine receptor. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 28(2-3). 167-174. **IF: 0,944**

ABSZTRAKTOK:

B. Lukács, G. Nagy, N. Dobrosi, I. Gherasim, I. Jóna, (2005): Effects of natural derivatives of phenol on calcium transport of sarcoplasmic reticulum. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 26: P61

B. Lukács, J. Almássy, E. Esteve, Cs. Szegedi, (2003): Effect of maurocalcine on calcium release channel-ryanodine receptor. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 24: P357

I. Jóna, J. Almássy, M. Ronjat, **B. Lukács**: Effect of Maurocalcine on RyR1 and RyR2 is Substantially Different. *Biophysical Journal* 2007 January, 87a

*A cikket 2004-ben az European Journal of Biochemistry közlésre elfogadta (2004, IF:3,260), de nyomtatásban a FEBS Journalban 2005-ben jelent meg (anélkül, hogy tudtuk volna, hogy az újság neve megváltozik). A névváltozás miatt nem tudok impakt faktort megadni 2005-ben, ezért zárójelben a 2006-os FEBS Journal impakt faktort adtam meg (IF: 3,033).

ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK:

Lukács Balázs: Timol és karvakrol hatása a szarkoplazmatikus retikulum iontranszportjára. Helyi TDK Konferencia, Debrecen, 2001 (előadás)

Lukács Balázs, Szegedi Csaba, Sárközi Sándor, Jóna István: Természetes fenolszármazékok hatása a szarkoplazmatikus retikulum iontranszportjára. Sümegi Membrán Transzport Konferencia, Sümeg 2001 (poszter)

Csaba Szegedi, **Balázs Lukács,** István Jóna: Effect of thymol and carvacrol on the sarcoplasmic reticulum ion transport. Channelopathies 2001 Conference, Sheffield, 2001 (poszter)

Lukács Balázs: Timol hatása a szarkoplazmatikus retikulum kalcium transzportjára. Helyi TDK Konferencia, Debrecen, 2002 (előadás)

Jóna István, Almássy János, **Lukács Balázs,** Szegedi Csaba, Sárközi Sándor: Harántcsíkolt izom kalcium csatornájának modulációja. Magyar Élettani Társaság LXVIII. Vándorgyűlése, Debrecen, 2004 (előadás)

Szegedi Csaba, Almássy János, **Lukács Balázs,** Jóna István: Maurokalcin hatása a vázizom típusú rianodin receptor működésére. Magyar Élettani Társaság LXVIII. Vándorgyűlése, Debrecen, 2004 (előadás)

Lukács Balázs: Skorpiótoxin (maurokalcin) hatása a vázizom kalcium csatornájára. Ph.D. és TDK tudományos diáktalálkozó, Debrecen, 2005. (előadás)

Lukács Balázs, Almássy János, Sárközi Sándor: Skorpiótoxin (maurokalcin) hatása a vázizom kalcium transzportjára. Magyar Élettani Társaság LXIX. Vándorgyűlése, Budapest, 2005 (előadás)

Almássy János, **Lukács Balázs**, Sárközi Sándor: Egy kalcium puffer - a TPEN – hatása a rianodin receptor működésére. Magyar Élettani Társaság LXIX. Vándorgyűlése, Budapest, 2005 (előadás)

Lukács Balázs: Skorpiótoxin (maurokalcin) hatása a rianodin receptor működésére. Ph.D. és TDK tudományos diáktalálkozó, Debrecen, 2006. (előadás)

Lukács Balázs, Sárközi Sándor, Jóna István: Skorpiótoxin (maurokalcin) hatása a vázizom kalcium csatornájára. Magyar Élettani Társaság LXX. Vándorgyűlése, Szeged, 2006. (poszter)

Lukács Balázs Almássy János, Jóna István: Skorpiótoxin (maurokalcin) és az A-peptid hatása a rianodin receptorra. Magyar Élettani Társaság LXXI. Vándorgyűlése, Pécs, 2007. (poszter)