

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

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

DEBRECEN, 2008

TARTALOMJEGYZÉK

Tartalomjegyzék.....	i
Köszönetnyilvánítás.....	iii
Rövidítésjegyzék.....	iv
1. Bevezetés.....	1
1.1. A rianodin-receptor	10
1.1.1. A rianodin receptor szabályozása.....	18
1.1.1.1. Az FK-506-kötő fehérje (FKBP) a RyR karmestere	22
1.1.1.2. A lumenális Ca^{2+} szabályozó szerepe és a kalszekvesztrin.....	24
1.1.1.3. Foszforiláció	25
1.1.1.4. Kalmodulin (CaM)	28
1.1.1.5. Farmakológiai befolyásolhatóság.....	29
1.1.1.5.1. Metilxantinok	30
1.1.2. A RyR mutációihoz kapcsolódó betegségek	30
1.2. Az SR Ca^{2+} pumpa (SERCA).....	34
1.3. Célkitűzések	37
2. Anyagok és módszerek.....	38
2.1. Single channel árammérések	38
2.1.1. A mesterséges sík kettősréteg (bilayer).....	38
2.1.2. A csatorna beépítése, és a single channel árammérés	39
2.1.3. A single channel rekordok kiértékelése.....	40
2.2. HSR és tisztított rianodin receptor prepalálás	43
2.2.1. HSR vezikula preparálása emlős vázizomból.....	43
2.2.2. A rianodin receptor izolálása.....	44
2.3. SERCA ATP-áz aktivitás mérés.....	46
2.4. Ca^{2+} -felszabadulás.....	47
2.5. A modellálat	48
2.6. Anyagok	48

2.7. Statisztika	48
3. Eredmények.....	49
3.1. A vázizom típusú RyR vizsgálata posztmiokardiális infarktusos állatmodellen	49
3.1.1. A RyR vezetőképessége	49
3.1.2. A RyR aktivitásának Ca^{2+} -függése.....	50
3.2. A K201 hatása a szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -transzportjára	52
3.2.1. A K201 hatása a RyR működésére.....	52
3.2.2. A K201 hatása az SR Ca^{2+} -pumpájára	58
3.3. A maurocalcine (MCA) hatása a szívizom típusú RyR-ra	59
4. Megbeszélés	61
4.1. A RyR1 funkcionális változásai PMI állatmodellen	61
4.1.1. A RyR1 funkcionális változásainak lehetséges okai, avagy mi történik a RyR-ral krónikus szívelégtelenségben?	63
4.2. A K201 hatása az SR Ca^{2+} -transzportjára	65
4.2.1. Gátlásnak, vagy részleges aktiválásnak értékelendő-e a K201 RyR-ra gyakorolt hatása?.....	65
4.3. A MCA RyR1-re és RyR2-re gyakorolt hatásának összehasonlítása.....	66
5. Összefoglalás.....	69
6. Irodalomjegyzék.....	71
7. Függelék	79

Tárgyszavak: rianodin receptor, vázizom, szívelégtelenség, szarkoplazmatikus retikulum, kalcium transzport, single channel, K201 (JTV519), maurocalcine

Keywords: ryanodine receptor, skeletal muscle, heart failure, sarcoplasmic reticulum, calcium transport, single channel, K201 (JTV519), maurocalcine

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálámat szeretném kifejezni témavezetőmnek, Jóna Istvánnak munkám során nyújtott segítségéért és támogatásáért.

Ezúton szeretném megköszönni Kovács Lászlónak és Csernoch Lászlónak, hogy munkámat az irányításuk alatt álló intézetben lehetővé tették.

Köszönettel tartozom közvetlen munkatársaimnak, Sárközi Sándornak, Szegedi Csabának, Lukács Balázsnak, Iuliana Gherasimnak, Sági Évának, az Élettani Intézet valamennyi dolgozójának, valamint Intézetén kívüli szerzőtársaimnak is.

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

APIII	antipirilazo III Ca^{2+} -indikátor
aa	aminosav
CaM	kalmodulin
CaMKII	kalmodulin-dependens protein kináz II
CCD	central core disease
CHAPS	[3-[(3-kolamidopropil)dimetilamino]-1-propánszulfonsav (micellaképző detergens
CICR	Ca^{2+} -indukált Ca^{2+} -felszabadulás
CPVT	katekolaminerg polimorf ventrikuláris tahikardia
CSQ	kalszekvesztrin
CRU	triád, (Ca^{2+} -release unit)
DAD	késői utódepolarizáció
DICR	depolarizáció-indukált Ca^{2+} -felszabadulás
DHPR	dihidropiridin receptor
EAD	korai utódepolarizáció
EGTA	etilén glikol-bis(β -aminoetil éter) N,N,N',N' -tetraecetsav (Ca^{2+} -kelátor)
FKBP	FK-506-kötő fehérje = calstabin
HEPES	4-(2-Hidroxietil)piperazin-1-etánszulfonsav
HSRV	nehéz (heavy) SR vezikula, a TC izolált változata, SERCA-t és RyR-t egyaránt tartalmaz
I_{CaL}	L-típusú Ca^{2+} -áram
IpTx_A	imperatoxin-A
LLSS	hosszantartó szubkonduktancia állapot, (Long Lasting Subconductance State)
LSRV	könnyű (light) SR vezikula, a longitudinális SR vezikulum-változata, csak SERCA-t (RyR-t nem) tartalmazó vezikulafrakció
MCa	maurocalcine
MH	malignus hyperthermia
PC	foszfatidil-kolin
PE	foszfatidil-etanolamin
PS	foszfatidil-szerin
PIPES	piperazin- N,N' -bis[2-etánszulfonsav]
PKA	cAMP-dependens protein kináz
P_o	nyitvatartási valószínűség
RyR	rianodin receptor
RyR1	vázizom típusú rianodin receptor izoforma
RyR2	szívizom típusú rianodin receptor
RyR3	„agy” típusú rianodin receptor
SERCA	szarkoplazmatikus retikulum kalcium pumpa
SR	szarkoplazmatikus retikulum
TC	terminális ciszterna
TT	transzverzális tubulus
TM	transzmembrán
ún.	úgynevezett
τ	átlagos nyitvatartási idő

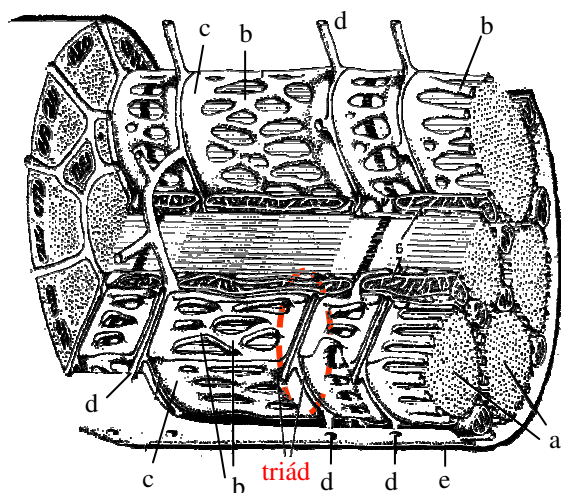
1. BEVEZETÉS

Az izomkutatás története Galvani 18. századi kísérletéig nyúlik vissza, amikor egy viharos nyári éjszakán egy kipreparált békálábhoz futó gerincvelői ideget egy hosszú, vékony dróttal hosszabbított meg, amit kivezetett a szabadba. Várakozásának megfelelően villámláskor a békáláb erősen összerándult.^{1,2} 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+} -koncentráció átmeneti megemelkedésén keresztül izomkontrakcióhoz vezet. Szorosabb értelemben véve tehát az akciós potenciál Ca^{2+} -jellé alakulásának folyamatát nevezzük elektromechanikai csatolásnak.

Az izom feszülését meghatározó intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció vázizomban és szívizomban egyaránt a felszíni membrán membránpotenciáljának kontrollja alatt áll, de míg a vázizom Ca^{2+} -mentes oldatban is képes összehúzódásra, a szívizom nem. Ez a különbség kétféle elektromechanikai kapcsolat működését feltételezi, melynek morfológiai feltételeit részben a szarkolemma és a szarkoplazmatikus retikulum (SR) eltérő kapcsolata teremti meg. A szarkoplazmatikus retikulum az endoplazmatikus retikulum Ca^{2+} raktározására és gyors

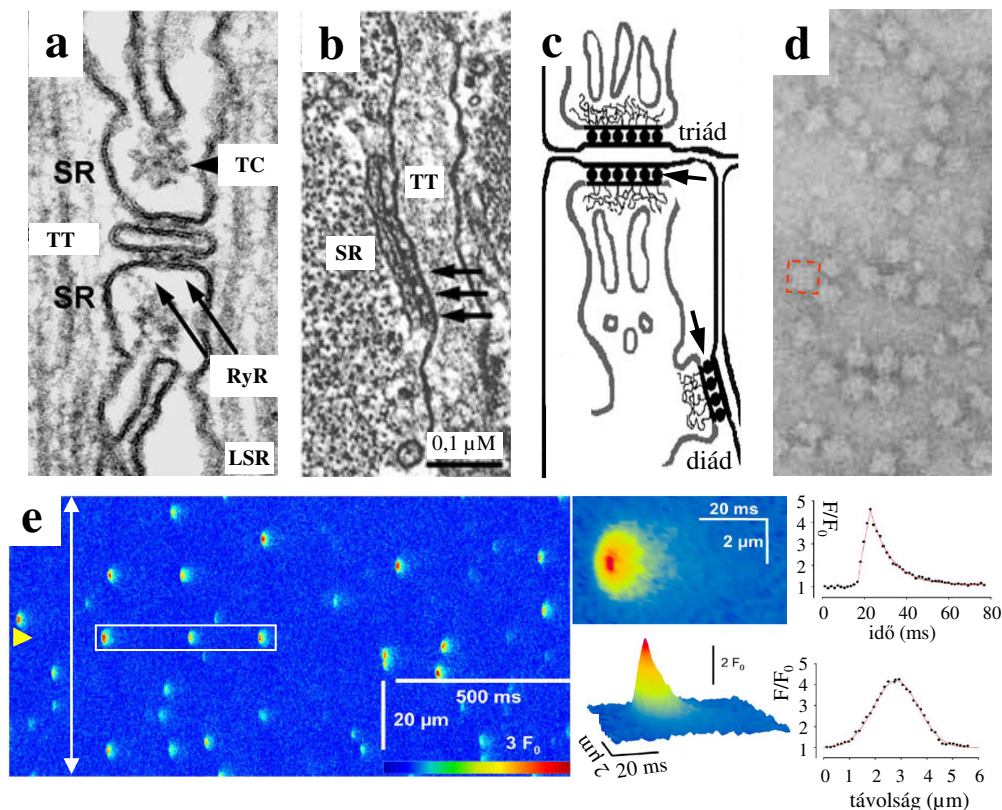
felszabadítására módosult változata, mely az izomrostban csövekből (longitudinális SR, LSR) és zsákokból (terminális ciszterna, TC) álló hálózatot képez. A terminális ciszternák az izomrost belsejébe nyúló csőszerű szarkolemma-betűródésekhez, a transzverzális tubulusokhoz (TT) illeszkednek anélkül, hogy a két membránrészlet összeérne. (1. ábra) Elektronmikroszkópos felvételeken ezek a képletek vázizomban mint hármas egységek, úgynevezett triádok, szívizomban mint diádok jelennek meg. A két membrán szoros térbeli viszonya a TT-membránban elhelyezkedő feszültségvezérelt elem



1. ábra A vázizomrost szerkezete

- a – miofibrillum
- b – longitudinális SR (LSR)
- c – terminális ciszterna (TC)
- d – transzverzális tubulus (TT)
- e – szarkolemma

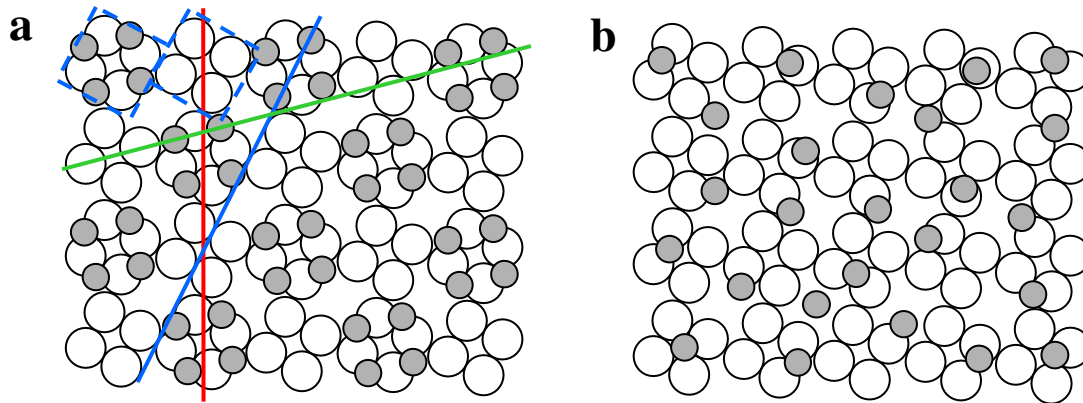
(dihidropiridin receptor, DHPR) és az SR kalcium csatorna (rianodin receptor, RyR) együttműködésére utal, ugyanis a Ca^{2+} a TT-membrán depolarizációjának következtében, az itt átadott információ hatására szabadul fel az SR terminális ciszternájából.³⁻⁸ Ezek alapján a transzverzális tubulus és a terminális ciszterna junkciójában egymással szemben csoportosan elhelyezkedő DHPR- és RyR komplexek funkcionális egységét tekintjük az elektromechanikai kapcsolat és a kalcium-felszabadulás szerkezeti alapegységének (calcium release unit, CRU).^{9, 10} A Ca^{2+} -felszabadulás CRU szintjén megvalósuló legkisebb működési egységeinek pedig a lokális, 10-30 RyR egyszerre történő megnyílásaként értelmezhető elemi Ca^{2+} -felszabadulási eseményeket, a sparkokat tartjuk, mivel ezek tér- és időbeli szummációjával jön létre az egész sejtre kiterjedő kalcium-felszabadulás (2/a-e ábra).^{11, 12}



2. ábra A CRU és a spark (szikra) A kalcium-felszabadulás szerkezeti egysége a CRU, működési egysége pedig a spark. A triád (a) és a diád (b) (vázizom- illetve szívizom típusú CRU) elektronmikroszkópos képe, és egy hipotetikus sejt sematikus rajza (c) a terminális ciszterna (TC) és a transzverzális tubulus (TT) szoros térbeli kapcsolatát ábrázolja.¹⁰ A nyilak a két membrán junkciójában elhelyezkedő elektrondenz „lábakra” (RyR) mutatnak.

A spark egyetlen CRU működését tükröző spontán, vagy a szarkolemma depolarizációjával kiváltott elemi esemény (e), melynek paraméterei – relatív amplitúdója (színskála), térbeli kiterjedése (y-tengely), és időbeli hossza (x-tengely) – kalcium-érzékeny fluorescens festék és konfokális mikroszkóp használatával line-scan felvételeken követhetők. A line-scan mérés egy kitüntetett vonal mentén felbukkanó sparkokat teszi láthatóvá az idő függvényében. A sárga háromszög alatt lévő CRU például a bekeretezett időszakban ~3 μm átmérőjű, ~25 ms-ig tartó sparkokat produkál ~4/s frekvenciával.¹¹

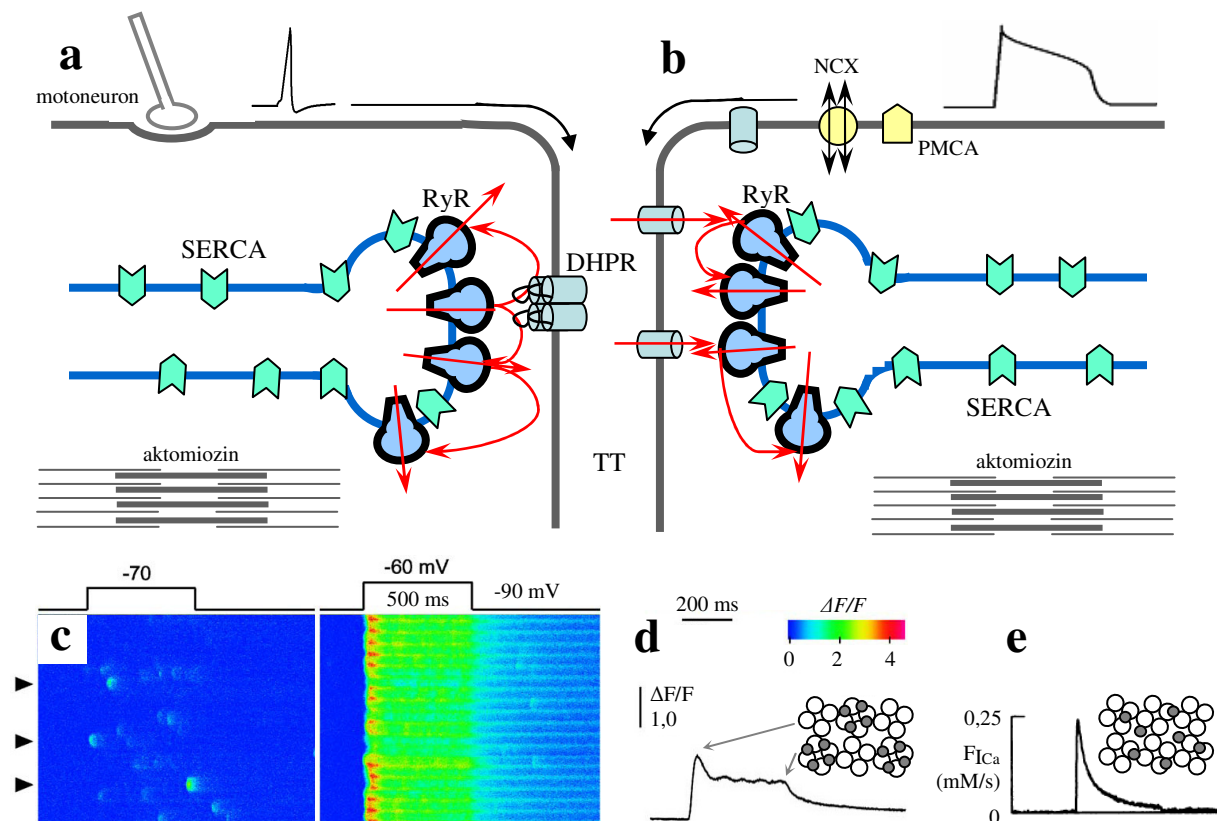
A CRU elsőként leírt alkatrészei, az SR kalcium csatorna komplexek elektronmikroszkópos képeken nagy, négyszög alakú struktúrákként azonosíthatóak, melyeket „foot”-nak (láb) neveztek el (2/d ábra).¹³ A lábak átérlik az SR és a TT közötti ~12 nm széles gátat és az SR membránjában szervezett módon, egymással érintkezve, párhuzamos sorokban helyezkednek el. Emlős vázizom esetén velük szemben a TT DHPR-ai szintén sorokba rendeződő négyes csoportokat, tetrádokat alkotnak úgy, hogy minden második RyR csatorna-kompleksszel szemben helyezkedik el DHPR-tetrád (3/a ábra).^{9, 10}



3. ábra A RyR- és a DHPR relatív viszonyának vázlatos felülnézeti rajza A RyR tetramerek (négy üres kör) úgy alkotnak sorokat az SR membránban, hogy élükkel részben átfedve érintkeznek egymással. A csatornák közepét összekötő egyeneshez, így a transzverzális tubulus tengelyéhez képest is ferdén helyezkednek el. Vázizom TT-ban a DHPR (szürke korong) tetrádokba szerveződik, melyek alternálva, minden második RyR-rel szemben foglalnak helyet. A tetrádok a TT tengelyével szintén szöget zárnak be (a). Szívizomban viszont a DHPR kisebb sűrűségben és véletlenszerű módon szétszórva van jelen (b).^{9, 10}

Ennek a kétféle térbeli viszonynak megfelelően a vázizom elektromechanikai kapcsolata is kétféleképpen valósul meg: direkt mechanikai csatolással, amit depolarizáció indukált kalcium-felszabadulásnak is nevezünk (DICR), valamint kalcium-indukált kalcium-felszabadulással (CICR). Direkt csatoláskor a tetrádokkal szemben lévő RyR-okat a DHPR és a RyR közvetlen kapcsolódása nyitja meg. A szarkolemma akciós potenciálja a T-tubuluson keresztül betérjed az izomrost belsejébe, ahol a TT membránjában elhelyezkedő feszültségfüggő dihidropiridin-receptorok konformáció-változását okozza, ami a rianodin receptorok megnyílásához vezet. Rajtuk keresztül a kalcium több mint tízezerszeres koncentráció-gradienstől hajtva áramlik ki az SR-ből. A szignáltranszdukció valószínűleg úgy történik, hogy a DHPR öt fehérjealegysége (α_1 , α_2 , β , γ , δ) közül az α_1 alegység második és harmadik szegmensét összekötő hurok a feszültség-szenzor elmozdulásakor közvetlen mechanikai kapcsolatot létesít a RyR megfelelő szakaszával (Leu-922-Asp1112). A DICR azonban önmagában nem hozna létre akkora intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációt, ami képes lenne a kontrakció kiváltására, de a DICR kalcium-indukált kalcium-felszabadulással egészül ki, ugyanis a direkt csatolás alkalmával felszabaduló kalcium aktiválja a környező, DHPR-ral

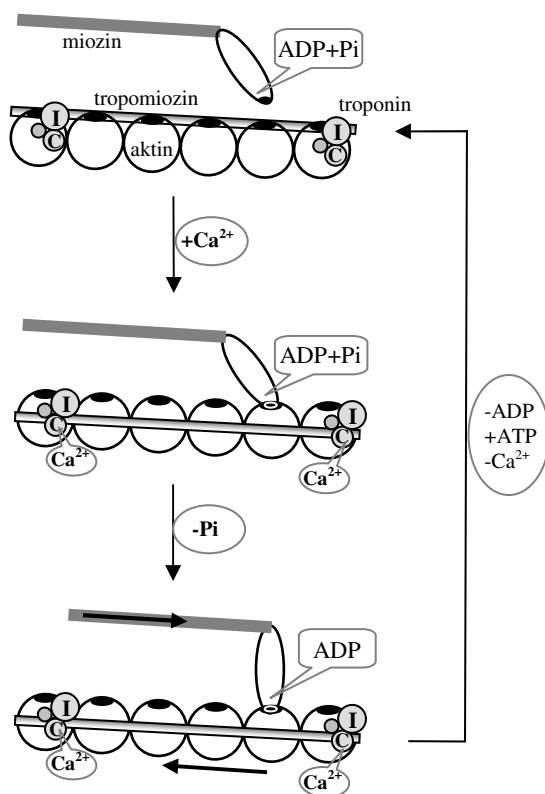
nem kapcsolt rianodin receptorokat. A folyamat a CRU-ra korlátozódik, tehát a globális Ca^{2+} -felszabadulás nem más, mint sparkok összege. A DHPR, vagy más néven L-típusú Ca^{2+} -csatorna – viszonylag hosszú aktivációs időállandója miatt – a vázizomrost ~ 4 ms-os akciós potenciálja alatt nem nyílik meg, tehát nem működik funkcionális csatornaként, csak feszültség-szenzorként szerepel. Konformáció-változásával az SR-membránra közvetíti az akciós potenciál által képviselt jelet, így a kontrakciót kiváltó Ca^{2+} teljes mennyisége az SR-ből származik (4/a ábra).⁴⁻⁷



4. ábra Az elektromechanikai kapcsolat A vázizom összehúzódását idegi ingerület váltja ki azáltal, hogy a szarkolemma akciós potenciálja a felszíni membrán tubuláris felszínén elhelyezkedő DHPR-ok konformáció-változását okozza. A konformáció-változást a DHPR α_1 alegységének II-es és III-as doménjét összekötő citoplazmatikus hurok közvetíti a rianodin receptorra, és annak megnyílását idézi elő. Az SR-ből felszabaduló Ca^{2+} megnyitja a DHPR-rel közvetlenül nem kapcsolódó rianodin receptorokat is (CICR) (a). Ez a folyamat a CRU-ra korlátozódik. A globális Ca^{2+} -felszabadulás tehát sparkok összege.¹² A depolarizáció időben szinkronizálja őket és növeli megjelenési gyakoriságukat (c). A d panel a mellette lévő, vázizomról származó line-scan felvétel átlagolt változata. Az 500 ms-ig tartó depolarizáló testimpulzusra adott fluoreszcencia-változás vázizomban kétfázisú: a kezdeti csúcs a DICR és a CICR összege, melynek CICR-komponense a RyR Ca^{2+} -függő inaktivációja miatt hamar lecseng. A fenntartott fázis alatt a DHPR tartja nyitva a RyR-t (DICR), ezért az csak a testimpulzus kikapcsolásakor ér véget. Ezek szerint fiziológiai körülmények között a sparknak a direkt kapcsolat megszűnése és a Ca^{2+} -függő inaktiváció együtt vet véget.¹⁷ Szívizom esetén a Ca^{2+} két forrásból származik: az extracelluláris térből és az SR-ből. A kalcium-felszabadulást a DHPR-en keresztül beáramló kalcium váltja ki CICR útján (b). A felszabadult Ca^{2+} -t a SERCA pumpálja vissza az SR-be. Az intracelluláris Ca^{2+} eltávolításában szívizom esetén a felszíni membrán Na^+ - Ca^{2+} -cseremechanizmusa (NCX) és kalcium ATP-áza (PMCA) is segít. Szívizomban a DHPR-RyR közvetlen kapcsolatának hiánya miatt a feszültség-szenzor helyzete a több száz ms-os testimpulzus alatt nem befolyásolja a kalcium-felszabadulás kinetikáját, ezért a Ca^{2+} -felszabadulás a Ca^{2+} -függő inaktiváció sebességével cseng le (e).¹⁸

A DHPR-t tetradokba szervezni csak a RyR vázizom típusú izoformája képes, a szívizom típusú nem, ezért a szívizom TT-membránban a DHPR random módon helyezkedik el (3/b ábra).^{9, 10} Ez még nem zárna ki a két fehérje direkt kölcsönhatását, de az alloszterikus kapcsolat létezését funkcionális mérések is cáfolják: Ca^{2+} -mentes oldatban, – bár a feszültség szenzor transzmembrán töltésmozgása megmarad – a membrán depolarizálása nem hoz létre Ca^{2+} -felszabadulást.

Szívizomban tehát az extracelluláris kalciumtól független elektromechanikai kapcsolat strukturális feltételei nem adóttak, viszont a DHPR a szívizomsejt hosszú akciós potenciálja alatt megnyílik (L-típusú Ca^{2+} -áram, I_{CaL}) és létrehozza a gyors típusú akciós potenciál platóját. Az extracelluláris térből beáramló kalcium CICR-t vált ki, ami a kalcium jelet többszörösi erőssé (4/b ábra).¹⁴⁻¹⁶

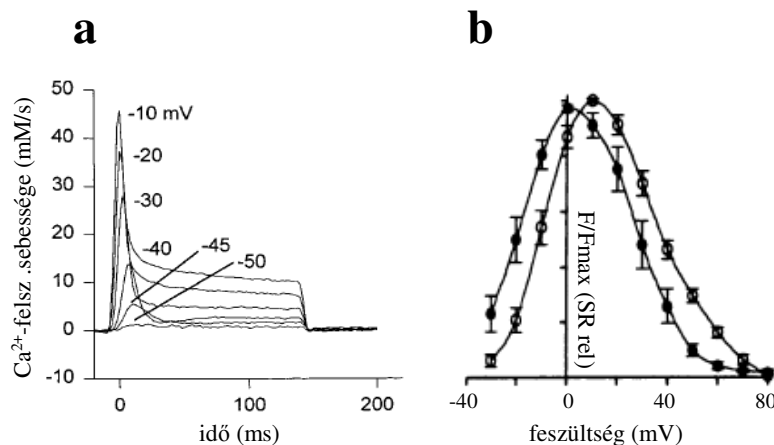


5. ábra A kontrakció molekuláris mechanizmusa Kalcium jelenlétében a miozin ATP bontása közben elcsúszik az aktinon, és a ciklus ismétlődésével az izom megrövidül.

A mioplazmatikus Ca^{2+} -koncentráció megemelkedésekor ($\sim 1 \mu\text{M}$) lehetővé válik a kontraktilis elemek összehúzódása: nyugvó izomban a troponin I erősen rögzül az aktinhoz, a tropomiozin pedig lefedi azokat a helyeket, ahol a miozinféjek az aktinhoz képesek kötődni. Így a troponin (C, I, T) - tropomiozin komplex mechanikailag gátolja az aktin és a miozin kapcsolódását. Amikor a Ca^{2+} a troponin C-hez kötődik, meggyengül a troponin I kötődése az aktinhoz, ezért a tropomiozin az aktinon oldalirányban elmozdul. Ekkor szabaddá válnak az aktin miozinféjre specifikus kötőhelyei, az aktin és a miozin között kereszthidak alakulhatnak ki, a két filamentum ATP bontása közben elcsúszik egymáson, és az izom megrövidül (5. ábra).³

A harántcsíkolt izom megfelelő válaszkészsége a gyors kontrakciós válasz mellett a hasonlóan gyors relaxációs képességet is megköveteli. Ennek érdekében a kalcium-felszabadulást hirtelen kell leállítani, és a kalciumot gyorsan vissza kell juttatni az SR-be. Vázizomban a kalcium-felszabadulás DICR komponense – a DHPR és a RyR direkt fizikai kapcsolata miatt – a szarkolemma

repolarizációjakor automatikusan kikapcsol, de mi állítja le a CICR-t, ami elméletileg egy regeneratív pozitív feedback-mechanizmus? ¹⁷ A kérdés szívizom esetén a következő ellentmondásban fogalmazódik meg: annak ellenére, hogy a DHPR és a RyR között nincs közvetlen kapcsolat, és a CICR egy öngerjesztő folyamat, a depolarizációval kiváltott Ca^{2+} -felszabadulás nem a minden vagy semmi törvényt követi, hanem vázizomhoz hasonlóan szívizomban is feszültségfüggő módon gradálható (6. ábra). ^{17, 18}



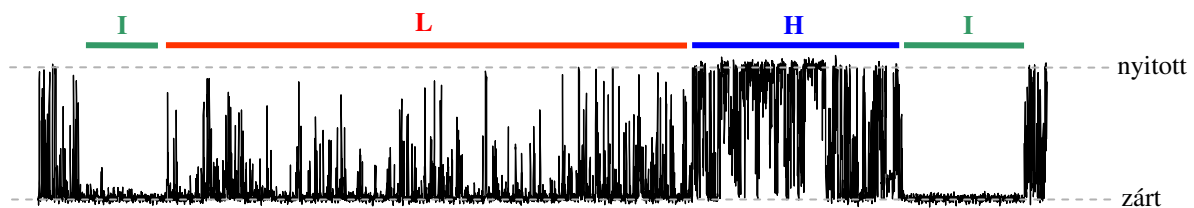
6. ábra A Ca^{2+} -felszabadulás feszültségfüggése váz- és szívizomban. A Ca^{2+} -felszabadulás gradálható (a, b, ●) és feszültségfüggése szívizomban is (b, ●) az I_{CaL} -indukált fluoreszcencia-változás (b, ○) feszültségfüggéséhez igazodik. ^{17, 18}

A sparkok felfedezése után igazolódott, hogy előfordulási valószínűségük az L-típusú Ca^{2+} -áram feszültségfüggését követi, ugyanakkor amplitúdójuk feszültségtől független és homogén. Ez csak úgy lehetséges, ha a CICR-nek működnek kikapcsoló mechanizmusai. A Ca^{2+} -felszabadulás szabályozásának ezen kettősségét a Ca^{2+} -felszabadulás paradoxonjaként említi a szakirodalom, melyre a lokális kontroll elmélet kínál megoldást.

A spark lokális jellege, azaz, hogy térben és időben lecseng, még mielőtt a közeli CRU-kat aktiválná, a spark intrinsic sajátága. A szomszédos CRU-k elszigetelését a TT- és az SR-membrán közötti szűk rés biztosítja, ahol a diffúzió korlátozott (restricted space), így az I_{CaL} és Ca^{2+} -felszabadulás során itt jóval magasabb Ca^{2+} -koncentráció is elérhető, mint a magas Ca^{2+} -kötő kapacitással rendelkező mioplazmában. Ez lehetőséget nyújt arra, hogy az I_{CaL} a lokális, minden vagy semmi törvényt követő elemi eseményeken keresztül szabályozza a globális Ca^{2+} -felszabadulást és megszabja annak amplitúdóját. A két membrán közötti térben az I_{CaL} akkora Ca^{2+} -koncentrációt hoz létre, mely a RyR aktiválásával kiváltja a sparkot (CICR), ami valószínűleg úgy maradhat lokális, hogy az elemi esemény RyR-t inaktíváló Ca^{2+} -koncentrációt hoz létre a részben (~0,4-1 mM). Tehát egy több tízezer digitális elemből felépülő finoman szabályozható analóg rendszerről van szó. Az elmélet helyességét igazolja, hogy a kalcium-felszabadulás felszálló szára a kalcium-gradiens megszüntetésével megszakítható. Ilyenkor a sparkok frekvenciája hirtelen a nyugalmi szintre csökken, azaz leáll

a kalcium-felszabadulás. Fiziológiai körülmények között a lokális kontroll garantálja, hogy a CICR mechanizmusa a CRU-ra korlátozódjon, és a CRU-k egymástól függetlenül működjenek. Ezt támasztja alá, hogy spontán tovaterjedő kalcium hullámok csak túltöltött SR-ű szívizomsejteken tapasztalhatók. Ekkor a spontán spark kibújik a lokális kontroll felügyelete alól, azaz megszökik a junkcionális részből és diádról diádra terjedve sorra aktiválja a CRU-kat.^{18-29, 130}

A Ca^{2+} -felszabadulás leállításáért és a sparkok helyben tartásáért nem kizárólag a DHPR inaktivációja, és a RyR Ca^{2+} -függő inaktivációja a felelős, hanem olyan mechanizmusok is szerepet játszhatnak, mint a RyR-ok szinkronizált kapuzása (coupled gating), és az SR deplációja. Matematikai modellek jóslata szerint a CRU működése során nagy a valószínűsége annak, hogy egyik- vagy másik RyR véletlenszerűen bezár, ami a RyR-ok kapcsolt működése esetén az egész CRU azonnali záródásával járna.^{11, 30} RyR-on végzett áramméréseink során (single channel mérés) is tapasztalunk hasonlót. A 7. ábra egyetlen RyR-on keresztül folyó áram kontroll körülmények között rögzített regisztrátuma. A RyR egyes megnyílásait a felfelé mutató áramtűskék reprezentálják. Az állandósult állapot (steady state) ellenére a csatorna nyitvatartási valószínűsége (P_o) nem állandó, hanem epizódyszerűen változó aktivitási mintázatot mutat, különböző kapuzási módokban működik (modal gating). H-módban a gyakori és hosszú megnyílások miatt a csatorna nyitvatartási valószínűsége (P_o) magas, L-módban a ritka és rövid megnyílások miatt alacsony, míg az I-mód a csatorna inaktivált állapota, tehát a csatorna nem kapuzik.^{31, 32}



7. ábra A RyR kapuzási módjai A csatorna H, L és I módban nyitott és zárt állapot között kapuzik.

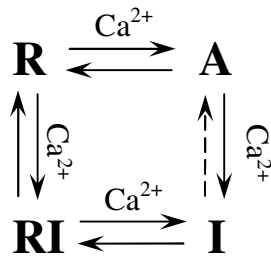
A RyR-t befolyásoló ágensek a nyitott- és zárt állapotok frekvenciájának és hosszának változtatásával úgy változtatják meg a RyR aktivitását, hogy módosítva az egyes kapuzási módok előfordulási valószínűségét, új dinamikus egyensúlyt alakítanak ki. Györke és Fill eredményei a Ca^{2+} -felszabadulás leállításának további lehetőségeként a RyR adaptációját veti fel. Kísérleteikben nitrophenol használtak, ami egy olyan gyors Ca^{2+} -kelátor, melyből a Ca^{2+} UV-fénnyel felszabadítható (flash fotolízis). Ezzel a Ca^{2+} -felszabadulás során tapasztalható

viszonyokat kívánták szimulálni a RyR közvetlen környezetében, miközben mérték a RyR áramát. A szabad Ca^{2+} -koncentráció a fotolízis során 200 nM-os végkoncentrációt ért el, ami állandósult körülmények között (steady state) nem okozna értékelhető P_o -növekedést. Ennek ellenére azt tapasztalták, hogy a hirtelen felszabadított Ca^{2+} hatására a RyR aktivitása egy rövid ideig rendkívül magas értéket ér el, majd néhány másodpercen belül a megszokott értékre csökken. A jelenséget a RyR adaptációs mechanizmusának tekintették, ugyanis a RyR egy következő impulzussal újra aktiválható. Feltételezésük szerint a RyR a magasabb Ca^{2+} -koncentrációhoz történő adaptációja során H-módról L-módra vált. ^{30, 33}

A kérdésről a szakirodalomban parázs vita bontakozott ki, mivel Laver és munkatársai cáfolták a RyR adaptációjának létezését. Méréseikre alapozott számításaik szerint ugyanis a nitrophen Ca^{2+} -kötésének kinetikai sajátosságai miatt a 200 nM-os Ca^{2+} -koncentrációt egy 0,2 ms-ig tartó, 50 μM -os átmeneti csúcs előzi meg, amivel Györkéék nem számolnak. Ez a rövid idő ilyen koncentráció mellett elég ahhoz, hogy a Ca^{2+} kötődhessen a csatornához, és aktiválja azt. ³⁴ De mi indokolja a csatorna Ca^{2+} -csúcs lecsengése utáni több 100 ms-ig tartó aktív állapotát? A RyR P_o -maximuma is ebbe a tartományba esik (50 μM [Ca^{2+}]), ahol gyakran kapuzik H-módban. A csatorna kapuzása során tapasztalt állapotok (H, L, I) közötti átmenet sztochasztikus folyamat, ami azt jelenti, hogy adott időpillanatra csak az állapot statisztikai jellemzőit tudjuk megadni, az adott állapot pontos értékét nem. A Ca^{2+} -csúcs nagy valószínűséggel H-módba kényszeríti a csatornát, aminek az időtartama a Ca^{2+} -koncentráció által meghatározott valószínűségi változó eloszlását követi. Így lehetséges, hogy a RyR a Ca^{2+} -csúcs lecsengése után is adott valószínűséggel H-módban kapuzik. Laver szerint tehát az adaptációnak leírt jelenség nem más, mint a RyR deaktivációja.

A fentiekkel szemben a RyR Ca^{2+} -függő inaktivációjára kétségtelen bizonyítékok állnak rendelkezésre. Schiefer és munkatársai a hasonló műtermékek kiküszöbölése érdekében olyan módszert használtak, mellyel a RyR közvetlen közelében lévő oldatrész milliszekundumokon belül kicserélhető, így a Ca^{2+} -koncentráció villámgyorsan változtatható. Fél másodperces koncentráció-lépcsőket alkalmazva többször egymás után a 10 nM – 1 μM – 10 nM Ca^{2+} tartalmú oldatok cseréjét hajtották végre, de a RyR aktivációs – deaktivációs ciklusain kívül más jelenséget nem tapasztaltak. Ha az 1 μM -os Ca^{2+} -oldat helyett 1 mM-osat (gátló koncentráció) használtak, a RyR gyors aktiváció után inaktiválódott. Az állapotot inaktívnak kell minősítenünk, ugyanis a RyR ekkor „refrakter stádiumban” van. ³⁵

Amennyiben elvetjük a RyR-adaptáció létezését, a lokális kontroll elmélet által támasztott feltételeknek a következő kapuzási modell felel meg: ^{8, 36-38}



8. ábra A RyR működését leíró séma.

Mivel egy adott jelenbeli állapot mellett a csatorna jövőbeni állapota nem függ a múltbeliektől, tehát a jelen leírása minden olyan információt hordoz, ami befolyásolhatja a csatorna jövőbeni helyzetét, a csatorna működése Markov-lánccal modellezhető. Single channel kísérleti eredmények aktiváció-függő inaktivációról is beszámolnak, tehát az inaktivációs lépés nem feltétlenül Ca^{2+} -függő. A szaggatott nyíllal jelzett folyamat valószínűsége nagyon alacsony (de léteznie kell), mivel az inaktív állapotban a csatorna „refrakter periódusban” van, azaz agonistákkal nem aktiválható.³⁶⁻³⁸

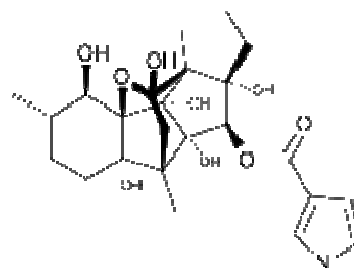
R – „nyugalmi”, nem konduktív állapot állapot, **A** – aktív állapot, amikor a RyR H-, vagy L módban kapuzik, **I** – inaktív állapot

A Ca^{2+} -felszabadulást követően (és közben) a kalciumot az SR lumenébe az SR kalcium pumpája (SERCA-ATPáz) juttatja vissza, ahol a Ca^{2+} jelentős része a kalszekvesztrin nevű kalcium-kötő fehérjéhez kötődik. Az mioplazmatikus Ca^{2+} -koncentráció csökkenése miatt a Ca^{2+} leválik a troponin C kötőhelyeiről, a miozin és az aktin közötti kapcsolat megszűnik, és az izom elernyed.³

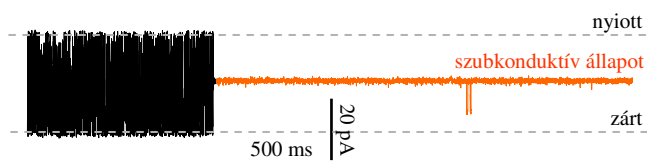
Munkám során a RyR működését vizsgáltam, ezért szerkezetére, szabályozására a továbbiakban részletesen kitérek.

1.1. A rianodin-receptor

A rianodin a *Ryania Speciosa* szárában és gyökerében található növényi alkaloid. Először rovarirtó szerként alkalmazták. Tudományos pályafutása azzal a nehezen magyarázható ellentmondással kezdődött, hogy a vázizom merev-, míg a szívizom „petyhüdt bénulását” okozza. Későbbi kísérletek kimutatták, hogy kalciumot szabadít fel a belső raktárakból, és a kétféle izomtípuson megismert eltérő hatás oka a felszíni membrán Ca^{2+} -eltávolító mechanizmusainak eltérő aktivitása. A szívizom szarkolemmájának Na^+ - Ca^{2+} -cseremechanizmusa az SR-ből kicsurgó Ca^{2+} -t gyorsan eltávolítja, ezért az SR rianodin jelenlétében hamar kiürül, és a szív – átmeneti pozitív inotróp válasz után – diasztolében megáll. Vázizomban a felszíni membrán Ca^{2+} -eltávolító mechanizmusainak aktivitása jelentéktelen, és a folyamatos rianodin-indukált Ca^{2+} -felszababulással az SR Ca^{2+} -pumpa önmagában nem képes lépést tartani, ezért a Ca^{2+} felhalmozódik a szarkoplazmában, ami tetanikus összehúzódást okoz.



9. ábra A rianodin szerkezeti képlete A rianodin az α -pyrrol-karbonsav és a ryanodol észtere



10. ábra A rianodin hatása a RyR működésére A rianodin kötődése előtt a csatorna nyitott és zárt állapot között kapuzik (fekete), míg rianodin kötődése után csökkent vezetőképességű állapotban folyamatosan nyitva van (piros).

A rianodin-kötő fehérjét egy 30 S szedimentációs koefficiensű fehérje-komplex formájában izolálták, és elektronmikroszkópos vizsgálatokkal igazolták, hogy azonos az SR „foot” struktúrájával. A rianodin hatásának titkát 1986-ban Meissner és munkatársai fejtették meg, akik

először végeztek single channel áramméréseket mesterséges lipid kettősrétegbe épített rianodin receptoron, és azt tapasztalták, hogy a rianodin félig nyitott szubkonduktív állapotban rögzíti a csatornát (10. ábra). Később a rianodin összetett dózisfüggő hatásaira is fény derült: alacsony koncentrációban (<10 nM) növeli a csatorna nyitvatartási valószínűségét (P_o), de a szubkonduktancia-állapot már 5-40 nM rianodinnál megjelenik, és 50 nM-nál magasabb rianodin koncentrációnál állandósul, és irreverzibilissé válik. Magas koncentrációban (~100 μM) a maximális konduktancia negyedének megfelelő hosszantartó nyitott állapotokat indukál, és ennél magasabb koncentrációnál teljesen bezárja a csatornát.^{7,8} A jelenség annyira jellegzetes és specifikus, hogy az a rianodint a RyR azonosításának leghitelesebb eszközévé teszi. A rianodin másik, metodikai szempontból hasznosítható

tulajdonsága, hogy csak a nyitott RyR-hoz képes kötődni (use-dependens hatás). Tehát egy RyR-t nagy mennyiségben tartalmazó minta által egységnyi idő alatt kötött rianodin mennyisége megbízhatóan jellemzi a csatornák átlagos nyitvatartási valószínűségét. A kötött rianodin mennyisége radioaktív izotóppal jelzett rianodinnal könnyen mérhető, ami egy radioligand kötődési teszt kidolgozását tette lehetővé ($[H]^3$ ryanodine-binding assay).

A funkcionális csatornakomplex homotetramer, az alegységek ~5400 aminosavból állnak és molekulatömegük egyenként 565 kDa. A RyR tetramer gomba formájú, melynek citoplazma felé néző $27 \times 27 \times 10$ nm méretű kalapját a négy alegység amino-terminálisának ~4000 aminosava építi fel. A membránban elhelyezkedő szár mérete $12 \times 12 \times 7$ nm, amit a négy monomer 4-4 transzmembrán (TM) szakaszt tartalmazó karboxi-terminálisa alakít ki.^{5, 6, 39, 40}

A RyR TM szegmenseinek pontos száma még ma is ismeretlen, mert a fehérjelánc mérete miatt az elsődleges szerkezetből nehezen jósolható. Annyi bizonyos, hogy a TM domének száma páros, mert a RyR karboxi- és az amino-terminálisa is a citoplazmában foglal helyet. Potenciális TM szekvenciákat az utolsó 1000 aminosav hordoz, melyben egyes munkacsoportok 4, vagy 6, mások 10-12 olyan szekvenciát feltételeznek, melyek alkalmasak lehetnek a membránt átérő helikális struktúrák kialakítására. Elektronmikroszkópos képek alapján végzett számítások szerint a monomer TM doménjának térfogata 1200 nm^3 , melyben legfeljebb 10 TM szegmens fér el. A 12 szekvenciából viszont csak 6 olyan van, mely az összes RyR izoformában konzervatívnak mondható, míg hirofobicitásukat tekintve ezek közül csak 4 esélyes jelölt marad. Az ionvezető pórus felépítésében szereplő struktúrák azonosításához jó tájékozódási pontot kínálnak az ilyen szempontból már részletesen feltérképezett K^+ -csatornadoménekkel homológ RyR-szekvenciák. Az ionvezető pórust például valószínűleg a harmadik és a negyedik TM régió közötti hurok hozza létre, mely bizonyos K^+ -csatornák szelektivitási filterével homológ szekvenciákat hordoz. Ezt támasztja alá az az eredmény, hogy a hurok mutációit hordozó RyR-ok vezetőképessége nagyon alacsony, de farmakológiai befolyásolhatósága megmarad.⁴⁰⁻⁴²

Egy ioncsatorna szelektivitását relatív konduktanciája, -permeabilitása és -affinitása jellemzi. A RyR ezen paramétereit Williams munkacsoportjának eredményei alapján az 1. táblázatban foglaltam össze, mely szerint a RyR egy nagy vezetőképességű, alacsony szelektivitású kationcsatorna. 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. 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 kalcium-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+} folyik.^{41, 43-48}

Ion	konduktancia (pS)		relatív permeabilitás		K_D (mM)	G max (pS)
	kétionos	szimmetrikus	pX^{+2+}/pK^+	pX^{+2+}/pBa^{2+}		
Ba^{2+}	202	199	5,8	1	0,406	185
Sr^{2+}	166	183	6,7	1,1	-	-
Ca^{2+}	135	-	6,5	1,1	-	-
Mg^{2+}	89	-	5,9	1,1	-	-
K^+	-	723	1	-	19,9	900
Na^+	-	446	1,15	-	17,8	516
Cs^+	-	460	0,61	-	34	588
Rb^+	-	621	0,87	-	-	-
Li^+	-	215	0,99	-	9,1	248
NH_4^+	-	623	1,32	-	-	-
$Tris^+$	-	17,4	0,22	-	-	-

1. táblázat A RyR konduktanciájára és permeabilitására vonatkozó adatok összefoglalása. A RyR feszültségfüggetlen módon, ohmikus ellenállásként viselkedik, és az áram amplitúdója független az áram irányától, tehát áramamplitúdójának feszültségfüggése lineáris. Vezetőkéességét szimmetrikus oldatban felvett (citoplazmatikus és luminális oldalon azonos ionösszetételű) áram-feszültség karakterisztika pontjaira illesztett egyenes meredekségéből határozzuk meg. A táblázat második oszlopjának adatait Williams munkacsoportja 210 mM ionkoncentrációjú szimmetrikus oldatban mérte. A Ca^{2+} és a Mg^{2+} ilyen koncentrációban a citoplazmatikus oldalon olyan mértékű gátló hatást fejt ki, hogy az áram maximális nagysága nem detektálható, ezért nem szerepel ott érték. Ilyen esetben a vezetőképesség kétionos kísérleti körülmények között határozható meg úgy, hogy a luminális oldalon K^+ van ugyanolyan koncentrációban, mint Mg^{2+} , vagy Ca^{2+} a másikon. Az ilyen körülmények között kapott eredmények Ba^{2+} és Sr^{2+} esetén megegyeznek a szimmetrikus oldatban mért értékekkel, ezért valószínűleg a Ca^{2+} és Mg^{2+} -ra kapott értékek is megbízhatóan tükrözik a valós vezetőképességet (1. oszlop).

Két ion relatív permeabilitása, ha mindkét ion egy- vagy kétértékű, és X ion csak a luminális oldalon, míg Y csak a citoplazmatikus oldalon van jelen, a reverzálpotenciál és a két ion koncentrációjának ismeretében a Goldman-Hodkin-Katz összefüggés segítségével számolható ki: $P_X P_Y = [Y^+]/[X^+] \exp(E_{rev}F/RT)$. Ha Y^+ mono-, és X^{2+} divalent, akkor a képlet bonyolultabb: $P_X P_Y = [Y^+]/4 [X^{2+}] \exp(E_{rev}F/RT) [\exp(E_{rev}F/RT)+1]$. (RT/F értéke 20°C-on 25,2 mV) Eredményeik alapján a RyR permeabilitása Ca^{2+} -ra ~6× akkora, mint a K^+ -ra.

A RyR vezetőképessége természetesen függ az ionkoncentrációtól, és az ionkoncentráció növelésével beáll egy maximális értékre. Az utolsó oszlopban ezeket a maximális vezetőképességeket adom meg, míg az utolsó előttiben a maximális vezetőképesség feléhez tartozó ionkoncentrációkat.^{41, 44, 45}

Az, hogy a töltéshordozó koncentrációjának növelésével maximális single channel áramamplitúdó érhető el, azaz a konduktancia telíthető, és a RyR vezetőképessége a hasonló relatív permeabilitás-értékek ellenére iononként nagyon eltérő, arra utal, hogy a pórus az Eyring-féle elméletet szellemében egy vagy több szaturálható ionkötő-helyet hordoz. A

kísérleti eredményeket az a modell írja le legpontosabban, mely szerint a pórusban az ionok három kötőhelyen ugrálnak át a membrán túloldalára. Miért pont három? A RyR áramfeszültség karakterisztikája szimmetrikus oldatban lineáris és szimmetrikus (nem egyenirányító), vagyis a pórus energiaprofiljának is annak kell lennie, és az ionkötőhelyeknek is szimmetrikusan kell elhelyezkedniük. Ugyanakkor egy csatorna ohmikus viselkedése esetén a modell csak kettőnél több kötőhelyet enged meg.^{41, 46} Nem permeábilis csatornablokkoló kationok (tetraalkilammonium-ionok (TAA^+): tetrametil- (TMA^+) és tetraetilammonium ion (TEA^+)) által kialakított gátlás feszültség- és dózisfüggésének kvalitatív vizsgálata alapján a blokk effektív vegyértéke ($z\delta$) (1. egyenlet) a TAA^+ méretétől függően ($\text{TMA}^+ < \text{TEA}^+$) 0,5 és 0,9.

$$P_{o \text{ rel}} = \left(1 + \frac{[\text{TAA}^+]}{K_{d0}} \cdot \exp(z\delta \cdot FV/RT) \right)^{-1} \quad \text{1. egyenlet}$$

$P_{o \text{ rel}}$ - relatív nyitvatartási valószínűség a tetraalkil ammónium ion jelenlétében
 $[\text{TAA}^+]$ - tetraalkil-ammonium koncentráció
 K_{d0} - disszociációs állandó, 0 mV-on
 $z\delta$ - a blokk effektív vegyértéke
 V - feszültség
 RT/F - 20 °C-on 25,2 mV

Ez az eredmény arra utal, hogy a TAA^+ -ok a pórus azon szakaszán akadnak el, ahol a feszültség az eredeti 90%, illetve 50%-ra esik, tehát itt kell keresni a kötőhelyeket.^{49, 50} A szimmetria azonban csak úgy maradhat sértetlen, ha a pórusra jutó feszültségesés 10%-hoz rendelünk egy harmadikat. A kétértékű kationoknak kedvező szelektivitás a központi, középső kötőhelynek köszönhető, mely nagyobb affinitással köti a divalens kationokat, mint a monovalenseket. Ennek következménye, hogy a legnagyobb affinitással kötődő ionra a legkisebb a konduktancia.^{41, 48}

A RyR pórusának alakjára és hosszára vonatkozó becsléseket annak ismeretében lehet tenni, hogy az ionvezető pórusba egyszerre több töltéshordozó is kötődhet -e (multi-ion channel), vagy a pórusban egyszerre csak egy ion lehet jelen (single-ion channel). A két típus eltérő elektrofiziológiai sajátosságait figyelembe véve minden érv a mellett szól, hogy a RyR egy single-ion csatorna:

- a konduktancia koncentráció-függése - a multi-ion típusú csatornákkal ellentétben - Michaelis-Menten-féle telítési kinetikát mutat,
- kétionos körülmények között, amikor a RyR lumenális oldalán Ca^{2+} van, a citoplazmatikuson pedig K^+ , a két ion relatív permeabilitása csak a két ion koncentrációjának

arányától függ, tehát a reverzálpotenciál az abszolút ionkoncentrációktól független és állandó. Hasonló kísérleti körülmények között egy multi-ion csatorna esetén a reverzálpotenciál az ionvezető pórusban egyszerre jelen lévő ionok kölcsönhatása miatt koncentráció-függő módon változik.

- egy szimmetrikus mérőoldat két kationjának koncentrációarányát az összkoncentráció változtatása nélkül módosítva a RyR konduktanciája a single-ion típusú csatornákra jellemző módon a két ion arányának függvényében lineárisan változik.

- egyértékű szerves kationok által létrehozott gátlás effektív vegyértéke ($z\delta$) mindig 1 alatti értéket ad. Z az ion vegyértékét jelöli (jelen esetben 1), δ pedig a kötőhely pórus bejáratától való távolságát adja meg a feszültséglejtőn. Ha például a három kötőhely közül az ion kettőt is elfoglalhatna egyszerre, akkor a z értéke 2-re nőne, tehát a két érték szorzata (amennyiben δ valóban 0,5 és 0,9) nem adhatna 1-nél alacsonyabb eredményt.⁴¹

Ha a RyR pórusát egyszerre tényleg csak egy töltéshordozó foglalhatja el, akkor a kötőhelyeket egyszerre elfoglaló ionok közötti taszítóerő nem segítheti az átkelést. A divalens kationok ráadásul nagy affinitással kötődnek a pórusba. De akkor milyen mechanizmus biztosítja a RyR, a nem szelektív porinokénál is magasabb konduktanciáját? A kérdés gyakorlatilag az összes ioncsatornánál felvetődő alapkérdés átfogalmazott változata: hogyan lehet egy csatorna egyszerre szelektív, és nagy vezetőképességű?

$$R_{\text{pórus}} = \rho \frac{l}{\pi a^2}$$

2. egyenlet

$R_{\text{pórus}}$ - a pórus ellenállása

ρ - az oldat fajlagos ellenállása

l - a pórus hossza

a - a pórus sugara

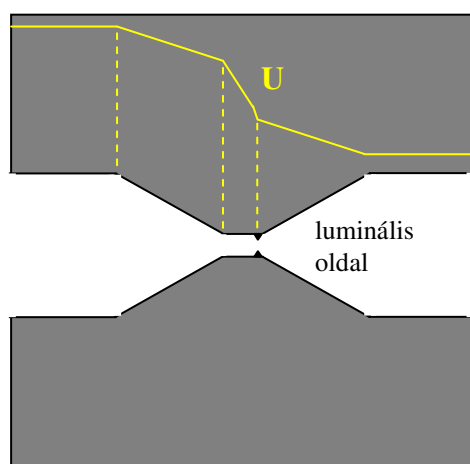
A csatorna vezetőképességét az ionvezető pórus hossza és sugara határozza meg. (2. egyenlet). Az RyR transzmembrán doménjának hosszával (6,5 nm), 100 Ωcm fajlagos ellenállással és az ioncsatornák prototípusának tekinthető KcsA szelektivitási filterének sugarával (1,5 Å) számolva a RyR vezetőképessége csak 11 pS lenne. A RyR átmérője azonban ennél nagyobb, ami miatt csökken ugyan a csatorna szelektivitása (a belépő ionnak a nagyobb térfogatban kisebb esélye van a kötődésre), de konduktanciája nő. A RyR nagyméretű szerves egyértékű kationokra vonatkozó relatív permeabilitásából a pórus legkisebb sugara kiszámítható (3. egyenlet), és ~3,4 Å-nek adódik. A gátlás effektív vegyértéke arra utal, hogy ez a keskeny szakasz 1 Å-nél nem lehet hosszabb, és méret alapján

szűri az ionokat, a töltés szerinti szelekciót inkább a kötőhelyek végzik. A pórus tehát egy nagy átmérőjű csatorna, rövid szűkülettel.

$$P_{X^+/K^+} = \frac{(R_C - R_{X^+})^2}{(R_C - R_{K^+})^2} \quad 3. \text{ egyenlet}$$

P_{X^+/K^+} - relatív permeabilitás
 R_{K^+}, R_{X^+} - a K^+ és a szerves kation átmérője
 R_C - a pórus legkeskenyebb átmérője

Hossza pedig jóval rövidebb, mint a transzmembrán szakasz teljes hossza, tehát a feszültség nem a teljes szakaszon esik. A pontos pórushossz molekuláris mérőszalaggal a következőképpen mérhető: ha két trimetilammoniumot, (melyről tudjuk, hogy a TEA^+ -hoz hasonlóan a feszültséglejtő 90%-nál kötődik) növekvő hosszúságú alkil láncsal kötünk össze, egy kétvegyértékű vegyületet kapunk, mely gátló hatásának effektív vegyértéke 1 felett van, mivel mindkét töltött fej belép a pórusba (bár egyszerre csak az egyik kötődhet). A lánc hosszának növelésével a mérőszalag rögzítetlen vége egyre kijebb csúszik a pórusból, és a blokk reverzálpotenciálja egyre csökken (*1. egyenlet*). Amikor az alkilánc olyan hosszú, hogy a töltött vége kiér a pórusból, a gátlás effektív vegyértéke 1 alá esik, és a két töltött csoport közötti távolság megadja a pórus hosszát, mely a RyR esetén 10,4 Å-nek adódik.

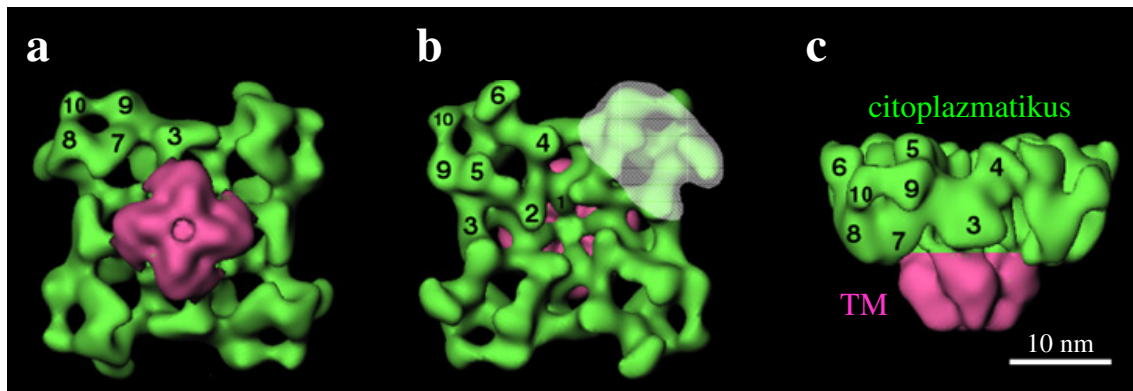


11. ábra A RyR pórusának szerkezete A RyR magas vezetőképességét a nagy átmérőjű, de rövid ionvezető pórus és a tágas előtér biztosítja. A pórus legkeskenyebb része a luminális oldal felé esik. ⁴¹ U – feszültség

A pórus bejárata előtt a diffúzió szabad, míg a pórus kezdetétől a keskeny átmérő miatt limitált, és itt már a feszültség a számottevő hajtóerő. Ennek ellenére a vezetőképesség tág feszültségtartományban lineáris, tehát a bejáratnál tapasztalható diffúziósebesség-csökkenés nem korlátozza az ionáramot. Latorre és Miller számításai szerint ez csak úgy lehetséges, ha a vezetőképességet nem csak a legkisebb pórusátmérő ellenállása határozza meg, hanem a csatorna teljes hosszának ellenállása számít. Ha a pórust egy nagy átmérőjű tölcsér köti össze a diffúzió számára szabad csatornarésszel, akkor a feszültségesés kiterjed az átmeneti szakaszra,

megvezeti a töltéshordozókat és a csökkenő diffúziósebességet kompenzálva a (*11. ábra*) szájadék átmérőjével arányosan növeli a konduktanciát. Az ionok terelgetésében a tölcsér

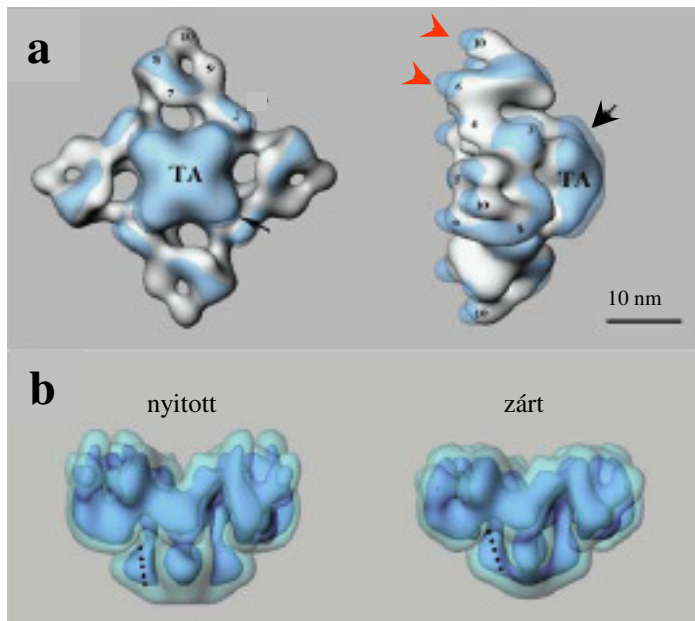
töltött aminosav-oldalláncai is segítenek. A nagy átmérőjű, rövid pórus széles előtérrel kiegészülve már lehetővé teszik a nagy konduktanciát.⁴¹ A RyR háromdimenziós, nagy felbontású rajza cryo-elektronmikroszkópos felvételek számítógépes feldolgozásával elkészíthető. A rekonstruált képek alapján Wagenknecht és munkatársai felvetették, hogy a RyR tetramer 4 pórussal rendelkezik, de a konduktancia növelésének ezen lehetséges eszközét molekuláris biológiai eszközökkel mások kizárták.⁴²



12. ábra A vázizom típusú RyR háromdimenziós, nagyfelbontású cryo-elektronmikroszkópos felvételei alapján, számítógépes képfeldolgozással készült szerkezeti rajza. Az ábra a csatornát az SR lumene felől (a), a citoplazmatikus oldal felől (b) és oldalnézetből (c) ábrázolja. A transzmembrán régió 12×7 nm nagyságú, kúp alakú struktúra (rózsaszín), míg a citoplazmatikus domén (zöld) 28×12 nm. A kijelölt terület (b) a zár („clamp”) struktúrájának felel meg.⁴⁰

Ugyanezek a nagyfelbontású képek a citoplazmatikus régió 12 nm magas és alegységenként 10 globuláris doménra különíthető el (12. ábra). Közülük a legnagyobbat kilincznek („handle”) nevezték el, és az ábrán a hármas sorszámot viseli. Az 5-10 számú domének a sarkok csúcsait építik fel, amit „záraknak” (clamps) hívunk. A citoplazmatikus régiót a transzmembrán régióval valószínűleg az 1-es számú domén köti össze, míg a zárok a citoplazmatikus rész többi részéhez úgy rögzülnek, hogy a zár 5-ös és 9-es doménja közvetlenül, míg a 6-os a 4-esen keresztül kapcsolódik egy-egy kilincshez (3). A 4 db 2-es domén közepén egy nagy üreget hoz létre, ami valószínűleg a csatorna citoplazmatikus oldali bejáratának felel meg, amihez a négy sarok (zár) az 5-ös és a 4-es domén közvetítésével csatlakozik. A RyR finomszerkezetének feltérképezése mellett a módszer lehetővé teszi a csatorna kapuzásához köthető morfológiai változások vizsgálatát és az egyes szabályozófehérjék kötőhelyeinek térképezését is. A RyR zárt, illetve nyitott állapotáról készült háromdimenziós képek tanúsága szerint a RyR megnyílásakor egyes zár-domének kiemelkednek a többi közül, gyengül a 9-es és a 10-es domén közötti kapcsolat, a TM régió

kicsit megnyúlik, oszlopszerű doménjai szétállnak, és néhány fokkal elfordulnak a citoplazmatikus részhez képest (13. ábra).⁴⁰



13. ábra A RyR nyitott és zárt állapotban A szürke színű zárt csatornára kékkkel vannak vetítve a nyitott és a zárt állapot közötti morfológiai különbségek. Nyitott állapotban a 6-os és a 10-es domén kiemelkedik a többi közül (a, piros nyíl), és gyengül a 9-es és a 10-es domén közötti kapcsolat. A TM régió ekkor hosszabb, mint zárt állapotban (a, fekete nyíl). A RyR nyílásakor a transzmembrán-régió tömegsűrűség-mintázata is elmozdul (b, szaggatott vonal).⁴⁰

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.^{5, 7, 8} A RyR3 mindkét harántcsíkolt-izomtípusban kimutatható, legnagyobb mennyiségben a rekeszizom tartalmazza, de aránya itt sem éri el az 5%-ot, míg gyors-típusú izomrostokban részaránya kevesebb, mint 0,2%. Működését és szabályozhatóságát tekintve alig tér el a többi izoformától.⁵³⁻⁵⁵ Izomműködésben betöltött szerepe nem tisztázott, de jelentőségét valószínűleg felértékeli, hogy a RyR1-el azonos triádokban, de a CRU szélén (parajunkcionálisan) helyezkedik el, és hogy a RyR1 jelentős része nem vesz részt a Ca^{2+} -felszabadulásban (szupresszált állapotban van). Így működésével valószínűleg a Ca^{2+} -indukált Ca^{2+} -felszabadulást segíti.^{51, 52}

Az izoformákat három különböző gén kódolja, és a fehérjék ~70%-os homológiát mutatnak. Az eltérések három fő régióba tömörülnek (D1, D2, D3 régió).^{40, 56, 57} Számos eredmény arra utal, hogy ezek a régiók hordozzák az izoforma-specifikus eltérésekért felelős szekvenciákat. Hármójuk közül a legtöbb információ a D2-es régióról áll rendelkezésre, mely az 1302. és az 1404. aminosav közötti fehérjerészletnek felel meg. Ez a szekvencia a RyR3-ból hiányzik,

RyR1-ben a 6-os domén felépítésében vesz részt és a RyR1-DHPR közötti közvetlen kapcsolat kialakításában játszik szerepet.⁴⁰

A RyR alternatív splicing variánsait is azonosították. Az „ASI” szekvencia splicingja például az egyedfejlődés során változást mutat: újszülött korban a szekvencia intronként kerül felismerésre, kivágódik az mRNS-ből, míg a felnőttkori variánsban ugyanez a szekvencia exonként szerepel, tehát a felnőttkori RyR tartalmazza ezt a fehérjeszakaszt. A miotóniás disztrófia (Steinert-betegség) egy izomgyengeséggel, izomtónus-növekedéssel és lassú relaxációs készséggel járó öröklődő izombetegség, melyben a RyR splicingjának zavara miatt az újszülöttkori splicing variáns felnőtt korban újra megjelenik. A tünetek egy része azzal magyarázható, hogy az újszülöttkori variáns kevésbé aktív.^{58, 59}

1.1.1. A rianodin receptor szabályozása

A RyR a T-tubulus membránpotenciáljának és a citoplazma–SR lumen szolubilis faktorainak kettős kontrollja alatt áll. Kapuzását a rá konvergáló szignálok eredője állítja be. A legfontosabb endogén modulátorai a Ca^{2+} , a Mg^{2+} , az ATP és a DHPR.^{4, 5, 59}

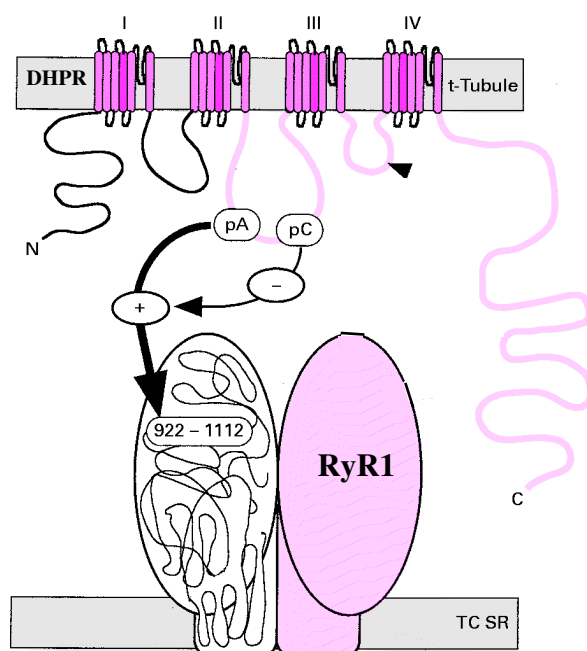
A Ca^{2+} hatása kétfázisú: nanomólos és millimólos koncentráció-tartományban a RyR nyitvatartási valószínűsége közel nulla, és $\sim 100 \mu\text{M}$ -nál maximális, a csatorna átlagos nyitvatartási idejéhez hasonlóan. A haranggörbe fel- és leszálló szárát Hill-egyenlettel illesztve mindkét görbe Hill-koefficiense 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+} -érzékenységet az ATP és a Mg^{2+} szabályozza.^{5, 7, 8, 60, 61}

Az ATP a RyR leghatékonyabb endogén aktivátora ($K_d = 350 \mu\text{M}$, $N_{\text{Hill}} = 2$). A hatékonyság sorrendjében a nukleotidok közül az ADP, az AMP és a cAMP követi. A CTP, GTP, ITP és az UTP hatástalan. Az ATP „ Ca^{2+} -mentes” oldatban is jelentősen növeli a RyR nyitvatartási valószínűségét, és a csatorna Ca^{2+} -nal maximálisan csak ATP jelenlétében aktiválható.^{5, 7, 8, 62}

Az ATP jelentőségét hangsúlyozza, hogy alacsony ($0,5 \text{ mM}$) ATP-koncentráció mellett, vagy ATP antagonistá adenzin jelenlétében a Ca^{2+} -felszabadulás lényegesen alacsonyabb, mint kontroll körülmények között. Tehát a DHPR önmagában nem elég a Ca^{2+} -felszabadulás kiváltásához, az agonista szolubilis faktorok is szükségesek. Az izomrost citoplazmatikus ATP koncentrációja (8 mM) mellett a RyR nyitvatartási valószínűsége nyugalmi Ca^{2+} -koncentrációnál (100 nM) is maximális.⁶¹ Akkor vajon mi tartja zárva nyugalomban a RyR-t? A Mg^{2+} és (vázizomban) maga a DHPR.

A Mg^{2+} millimólos koncentrációban gátolja a RyR működését, ami megakadályozza a nyugalmi Ca^{2+} -felszabadulást. Ezt támasztja alá az a megfigyelés, hogy az intracelluláris Mg^{2+} -koncentráció fiziológiás értékről (~1 mM) 200 μM -ra történő csökkentése Ca^{2+} -felszabadulást vált ki. A Mg^{2+} hatását a „kettős gátlás elmélete” azzal magyarázza, hogy a Mg^{2+} az aktivációs Ca^{2+} -kötőhely kompetitív antagonistájaként és a gátló Ca^{2+} -kötőhely agonistájaként a Ca^{2+} -nal verseng a kötőhelyekért ($K_d \approx 600 \mu M$).^{61, 62}

Lamb és munkatársai szerint a T-tubulus depolarizációjakor a RyR Mg^{2+} gátló hatásával szemben mutatott érzékenysége a tizedére csökken, azaz a RyR azért nyílik meg, mert felszabadul a gátlás alól.⁶¹



14. ábra A DHPR szerkezete és kapcsolata a RyR1-gyel A DHPR α_1 alegysége négyszer ismétlődő, egyenként hat transzmembrán szakaszból felépülő doménal rendelkezik. Mindegyik domén negyedik TM szakasza hordozza a feszültségszenzort (S4), melynek elmozdulását a II. és a III. domént összekötő hurok direkt kapcsolat útján közvetíti a RyR-re. (pA – „A-szakasz”, pC – „C szakasz”) A DHPR és a RyR azonban ennél jóval több szállal kapcsolódik egymáshoz. Feltételezhető még az α_1 alegység C-terminálisának és a III-IV. domén közötti huroknak a RyR-rel kialakított kapcsolata is.⁶³

Schneider és Chandler 1973-ban a T-tubulus membránján az ismert ionáramok gátlószerkeinek jelenlétében az izomkontrakcióhoz szorosan kapcsolódó töltésmozgást mért. Feltételezésük szerint a feszültségfüggő töltésmozgásért felelős molekula a hiányzó láncszem a T-tubulus depolarizációja és a Ca^{2+} -felszabadulás között. Gyanújuk akkor nyert megerősítést, amikor kiderült, hogy a dihidropiridinszármazékok gátolják a transzmembrán töltésmozgást és a Ca^{2+} -felszabadulást is.⁶⁴ A DHPR öt alegységből áll (α_1 , α_2 , β , γ , δ), melyek közül az α_1 alegység 1873 aminosava négy, egyenként hat transzmembrán szegmenst tartalmazó domént, ún. „repeat”-et alkot (14. ábra). Funkcionális DHPR α_1 alegységet nem expresszáló, úgynevezett diszgenikus egerek vázizomrostjain végzett mérésekből tudjuk, hogy az α_1 alegység alakítja ki a csatorna pórusát, és ez felelős a töltésmozgásért is.^{63, 64} Diszgenikus egerekből származó vázizomcsövekbe juttatott vázizom

típusú DHPR- gén helyreállítja a vázizom típusú elektromechanikai kapcsolatot. A szívizom típusú DHPR azonban a Ca^{2+} -tól független vázizom típusú elektromechanikai kapcsolatot és

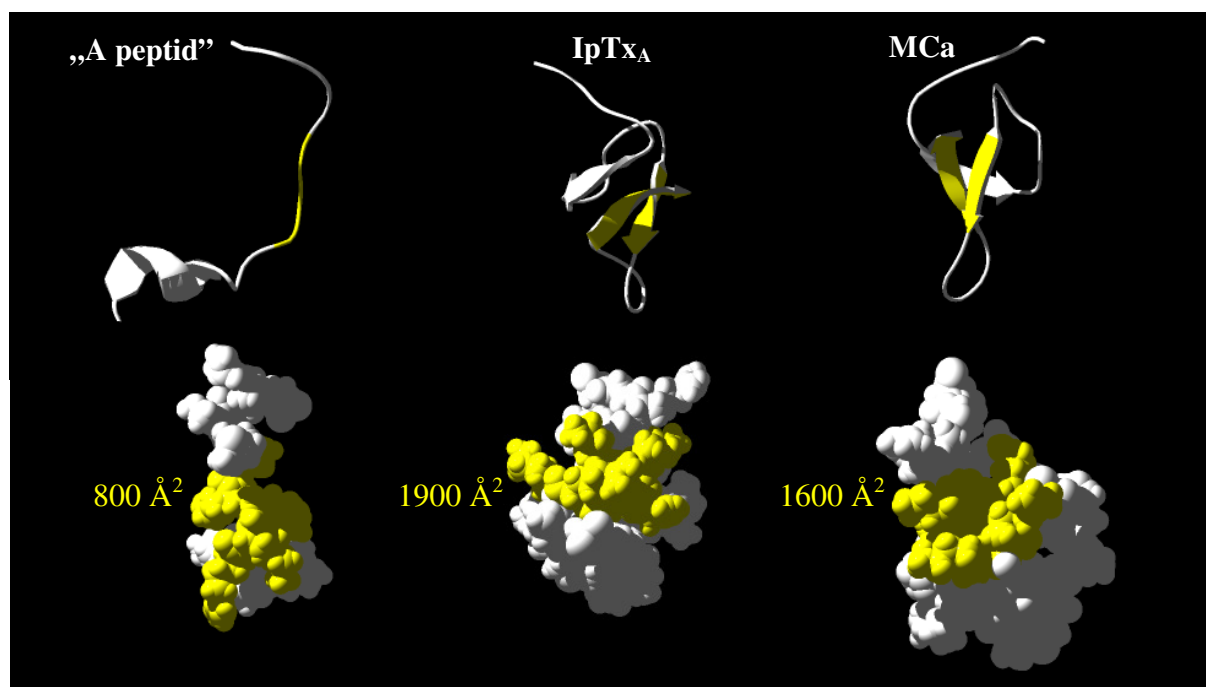
annak morfológiai feltételét, a DHPR-tetrádokat nem volt képes visszaállítani a sejteken, csak a Ca^{2+} -indukált Ca^{2+} -felszabadulást. A funkcionális különbségért és a DHPR-tetrádképzésért felelős szakasz szív-vázizom típusú kimérákkal történő azonosítása során kiderült, hogy az α_1 alegység II. és III. transzmembrán doménját összekötő intracelluláris hurok kulcsfontosságú a vázizom típusú elektromechanikai kapcsolat kialakulása szempontjából. Meglepő, hogy a szív típusú DHPR is képes a vázizom típusú elektromechanikai kapcsolat rekonstruálására, de csak abban az esetben, ha a II-III TM hurok a 725.-742. aminosavig terjedő szakaszon vázizom típusú szekvenciát hordoz. ⁶⁴⁻⁶⁶ Ugyanakkor a szívizom és a vázizom típusú hurok peptid formája egyaránt aktiválja a RyR1-et, míg RyR2-n mindkettő hatástalan. A kísérletek könnyebb értelmezhetősége kedvéért a hurkot funkcionális szempontból részekre osztották: a 724.-760. aminosavig terjedő szegmenst „C szakasz”-nak, peptidként szintetizált megfelelőjét „C peptid”-nek, míg a 667. és a 692. aminosav közötti részt „A szakasz”-nak, illetve „A peptid”-nek nevezték el. Ez utóbbi peptid alacsony koncentrációban aktiválja mindkét izoformát, míg a „C peptid” gátolja a csatornát, kivédi az „A peptid” hatását és a depolarizáció-indukált Ca^{2+} -felszabadulást. ^{64, 67-69} Ezen eredmények alapján az elektromechanikai kapcsolat a következőképpen képzelhető el: mindkét hurokszakasz közvetlen, nem izoformaspecifikus alloszterikus kapcsolatot teremt a rianodin receptorral, de a DHPR feszültség szenzorának elmozdulását csak a „C szakasz” képes közvetíteni a RyR-re. Ez utóbbi kapcsolat létesítésére azonban kizárólag a vázizom típusú „C peptid” alkalmas. Tehát a RyR valószínűleg folyamatosan a „C szakasz” gátlása alatt áll, amit csak a depolarizáció függeszt fel. Ekkor az „A szakasz” RyR-re gyakorolt hatása felszabadul a gátlás alól, és a RyR megnyílik (14. ábra). ⁶³

Az elektromechanikai kapcsolat modelljének szerkesztésekor számolni kell azzal a kísérletes eredménnyel is, miszerint az „A peptid” reverz áramirány esetén (amikor a töltéshordozó a fiziológiás Ca^{2+} -felszabadulással ellentétes irányba mozog) a csatorna feszültségfüggő gátlását hozza létre, mivel ez felveti annak a lehetőségét, hogy a feszültség szenzor elmozdulása egyszerűen kirántja az „A szakasz”-dugót a pórusból, utat engedve ezzel a Ca^{2+} -nak. ⁵

Az „A peptid” hatásának kritériuma egy bázikus (Arg, Lys) aminosavakat hordozó szakasz, melyhez hasonló oldallánc mintázat néhány toxin elsődleges szerkezetében is megtalálható. ⁷⁰⁻

⁷² A homológia miatt ezek a toxinok az elektromechanikai kapcsolat vizsgálatának jó eszközei. Ilyen például a *Pandius imperator* skorpió mérgéből izolálható imperatoxin A (IpTx_A), melynek harmadlagos szerkezetében a homológ motívum más bázikus oldalláncú aminosavakkal együtt egy nagy kiterjedésű pozitív töltésű felszínt hoz létre. ^{73, 74} Az IpTx_A

rianodin receptoron kifejtett hatása annyiban különbözik az „A peptid” hatásától, hogy az „A peptid” reverz áramirány esetén bezárja a RyR-t, míg az IpTx_A a maximális áramamplitúdó 25%-ának megfelelő hosszantartó szubkonduktancia-állapotokat (LLSS) indukál.^{75, 76} A mindössze 18%-ban megegyező aminosavsorrend és az alapvetően eltérő harmadlagos szerkezet ellenére kötőhelyük azonos, de a két peptid affinitása közötti eltérés ezerszeres. A kapcsolat kialakítása szempontjából valószínűleg a Lys¹⁹-Arg²⁴ (IpTx_A) és az Arg⁶⁸¹-Lys⁶⁸⁵ („A peptid”) aminosavak közötti szegmensnek van kulcsszerepe, és úgy tűnik, hogy a kötődéshez egy pozitív töltésű aminosavakból felépülő összefüggő felszín szükséges, míg a másodlagos szerkezet szinte lényegtelen. Az IpTx_A-ban a Lys²⁰-Arg²³ és a Lys³⁰-Arg³³ két, antiparalell lefutású β -redőt hoz létre, melyek a toxin felületén az őket összekötő Arg²⁴, Gly²⁵, Thr²⁶, Asn²⁷; és a His⁶, Lis⁸, Arg⁹, Lys¹¹, Lys¹⁹ aminosavakkal együtt egy 1900 Å² felületű bázikus felszínt alkotnak. Az „A peptid” homológ szekvenciája (Arg⁶⁸¹-Lys⁶⁸⁵) viszont az N-terminális végen rendezetlen szerkezetű, és felülete csupán 800 Å² (15. ábra). A töltésfelszínek területe közötti eltérés a disszociációs állandók közötti különbségben tükröződik.^{73, 74}



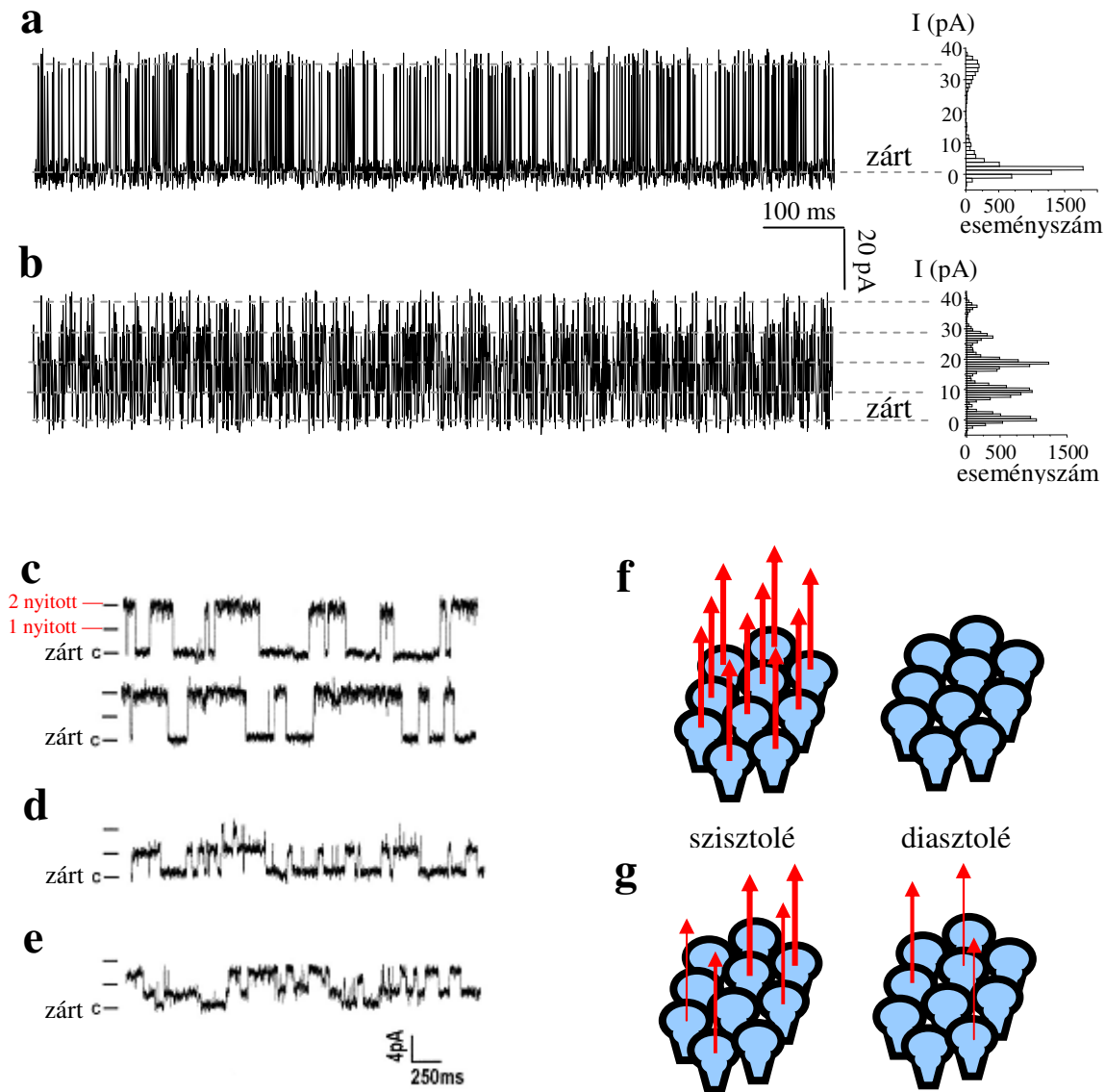
15. ábra Az „A peptid”, az imperatoxin és a maurocalcine szalagmodellje és felszínprofilja A RyR-hez való affinitás szempontjából a pozitív töltésű aminosav-oldalláncokból felépülő töltésfelszín számít. A bázikus oldalláncú aminosavakat sárga színnel jelölöm, az összes többi fehérrel. A rajzok az 1DU1 („A peptid”), az 1IE6 (IpTx_A) és az 1C6W (MCa) pdb (protein data base) fileok felhasználásával a GalaxoSmithKline Swiss Pdb-viewer nevű szoftverével készültek (<http://www.expasy.org/spdbv/>).

A *Scorpio maurus* mérgéből izolált toxin, a maurocalcine (MCA) szintén egy 33 aminosavból álló peptid, melynek aminosavszekvenciája az IpTx_A-val 82%-ban azonos.⁷³ Ennek megfelelően RyR-re gyakorolt hatása is nagyon hasonló: fiziológiás áramirány esetén néhány nanomólos koncentrációban alkalmazva (5 nM) növeli a RyR nyitvatartási valószínűségét (P_o), míg ezzel ellentétes áramiránynál 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 munkacsoportunk eredményei is igazolják, miszerint 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 így létrejött Arg24Ala szubsztituens-maurocalcine növeli ugyan a csatorna P_o -ját, de LLSS-t kiváltani képtelen.⁷⁷⁻⁷⁹

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

Az FKBP számos szövetben előforduló, a fehérjék harmadlagos szerkezetének kialakításában és stabilizálásában szerepet játszó, peptidylpropyl-cisz-transz izomeráz aktivitású enzim. Az FK506 immunosuppresszív hatása az izomeráz-aktivitás gátlásán alapszik, a RyR-re gyakorolt hatások függetlenek a fehérje enzimaktivitásától. A RyR tetramer monomerenként egy FKBP-t köt, izoformától függően különböző típust (RyR1–FKBP12 és RyR2–FKBP12.6), melyek makrolidek (FK506 (tacrolimus), rapamicin (sirolimus) és cyclosporin A (sandimmune)) hatására disszociálnak a csatornáról. Az FKBP-től megfosztott csatornák single channel áram-regisztrátumán csökkent vezetőképességű szubkonduktancia-állapotok jelennek meg, mintha a négy alegység egymástól függetlenül kapuzna (16/b. ábra). FKBP adásával a jellegzetes kapuzás megszüntethető. 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 konformációját, nyitott és zárt 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, 16/c-g. ábra).⁸⁰⁻⁸³ A coupled gating anatómiai feltételeit az teremti meg, hogy a RyR FKBP-kötőhelyei a tetramerek egymáshoz szorosan illeszkedő sarkain helyezkednek el.¹³⁵



16. ábra Az FKBP szerepe a RyR és az elektromechanikai kapcsolat működésében Az **a** és **b** ábrarészlet egyetlen RyR1 áramának regisztrátuma. Amikor az FKBP a RyR-hez asszociált formában van jelen, a csatorna nyitott és zárt állapot között kapuzik (**a**). Ha az FKBP disszociál róla, a négy alegység szinkronizálatlan működése miatt csökkent vezetőképességű, szubkonduktancia-állapotok jelennek meg (**b**). A reprezentatív rekordok mellett feltüntetett megnyílási hisztogram ok a csatornaműködés során tapasztalt áramamplitúdókhoz tartozó eseményszámokat ábrázolják. Az FKBP hiányában észlelhető szubkonduktív állapotok a hisztogram három középső csúcsának felelnek meg (**b**).⁸³

A csatorna-komplexek a CRU-ban érintkeznek egymással, ezért előfordul, hogy néhány egymáshoz ragadt RyR „multi-channel” áramát mérjük. A **c** jelű ábrarészleten például kettő darab szívizom típusú RyR összehangolt módon kapuzik. Rapamicin alkalmazása után ~25 perccel (**d**) a két RyR2 működésének összhangja megbomlik (egymástól függetlenül nyitnak-zárnak). Fél óra eltelte után (**e**) pedig megjelennek a csatornák **b** ábrarészletből megismert subkonduktancia-állapotai is. A kísérlet szerint tehát az FKBP nemcsak a monomerek csatorna-komplexen belüli koordinált működését biztosítja, hanem az egymás mellett lévő RyR-ok szinkronizált működését is. A rekordok részletes kiértékelése után kiderült, hogy a kapcsolt RyR-ok jóval nagyobb nyitvatartási valószínűséggel működnek, mint az egyediek.⁸¹

Az FKBP-nek köszönhetően tehát a CICR során a csatornák egyszerre nyílnak, és diasztolé alatt zárva maradnak (**f**). Kóros körülmények között az FKBP12.6 disszociációja miatt a csatornák kapuzása stochastikussá válik, az elektromechanikai kapcsolat hatékonysága és a Ca^{2+} -tranzien amplitúdója csökken, és az SR diasztolében is csurog (**g**). Emiatt a szív pumpafunkciója romlik és aritmogén hajlama nő.⁸¹

1.1.1.2. A lumenális Ca^{2+} szabályozó szerepe és a kalszekvesztrin

Az SR-ben a szabad (ionizált) Ca^{2+} -koncentráció ~ 1 mM. Az ennél magasabb Ca^{2+} -koncentráció nemcsak a transzmembrán Ca^{2+} -gradiens növekedése miatt növeli a Ca^{2+} -felszabadulás során kiáramló Ca^{2+} mennyiségét, hanem a RyR Ca^{2+} -érzékenységének fokozásával is.¹⁴ A jelenség izolált csatornákon végzett single channel mérések során is megfigyelhető: a RyR lumenális oldalán millimólos tartományban növelve a Ca^{2+} koncentrációját, a csatorna nyitott állapotának valószínűsége nő. Az SR túltöltése kóros körülmény, ami szívizomban súlyos következményekkel jár, mivel növeli a Ca^{2+} -felszabadulás amplitúdóját, de kisebb Ca^{2+} -felszabadulást akár diasztolében is indukálhat. A citoplazmatikus Ca^{2+} -többlet egyes K^{+} -csatornák Ca^{2+} -függő gátlásával nyújtja az akciós potenciál hosszát és felgyorsítja a Na^{+} - Ca^{2+} cseremechanizmust, melynek tevékenysége depolarizálja a membránt. A két tényező együttes következményeként késői utódepolarizáció (DAD), aritmia és extraszisztolé alakulhat ki.

A RyR Ca^{2+} -raktár felőli szabályozásának mechanizmusára ellentmondásos kísérleti eredményeken alapuló feltételezések születtek. Az egyik a RyR lumenális oldalán is feltételez regulatorikus Ca^{2+} -kötőhelyeket. Ezen kötőhelyek létezése azonban kérdéses, mivel a lumenális Ca^{2+} hatása feszültségfüggő, ami vagy azt jelenti, hogy a kötőhely mélyen a pórusban van, vagy azt, hogy a Ca^{2+} a póruson keresztül átjut a túloldalra, és ott az aktiváló Ca^{2+} -kötőhelyen fejt ki hatását (feedthrough-szabályozás).^{84, 85} Mások a lumenális hatásokért a kalszekvesztrint teszik felelőssé.

A kalszekvesztrin (CSQ) az SR terminális ciszternájának Ca^{2+} -kötő fehérjéje, mely nagy kapacitással (~ 40 db Ca^{2+} /CSQ), de kis affinitással ($K_d \sim 1$ mM) köti a kalciumot, így biztosítja a RyR közvetlen közelében a Ca^{2+} -koncentráció (így a Ca^{2+} -gradiens) állandóságát a Ca^{2+} -felszabadulás során. Szerepe nemcsak kalcium pufferként, hanem a RyR szabályozásában is jelentős.⁶³ A RyR-hoz a triadin és junctin nevű transzmembrán SR-fehérjéken keresztül kapcsolódik. Ez utóbbit bizonyítja az a kísérlet, melyben hatását csak triadin és junctin együttes jelenlétében képes kifejteni.⁸⁶ A Ca^{2+} -szenzor szerepére az teszi alkalmassá, hogy térszerkezete Ca^{2+} -függő módon változik: alacsony Ca^{2+} -koncentrációnál ($\ll 1$ mM) a CSQ monomer, az SR Ca^{2+} -koncentráció-viszonyai mellett pedig polimerformában fordul elő. A RyR működését a monomer nem befolyásolja, míg a polimer gátló hatást fejt ki, de csak ~ 1 -4 mM-os Ca^{2+} -koncentráció-tartományban. 1 mM Ca^{2+} fölött ugyanis a CSQ (bár polimer marad) újabb konformáció-változáson megy keresztül, mely meggyengíti a CSQ-triadin/junctin kapcsolatát, és a CSQ disszociációját okozza.⁸⁷⁻⁹² Tehát a RyR magas

intraluminális Ca^{2+} -koncentrációnál vagy azért aktiválódik, mert felszabadul a CSQ gátlása alól, vagy mert CSQ hiányában érvényre juthat a lumenális Ca^{2+} -kötőhelyek aktiváló hatása.

A Ca^{2+} -felszabadulás és -raktározás megfelelő működése bizonyára a RyR kalszekvesztrinnel, DHPR-ral és a többi citoplazmatikus- és SR-integráns membrán-fehérjével (kalmodulin, sorcin, triadin, junctin, junctate, stb...) alkotott bonyolult komplexének épségét igényli. A szabályozás bonyolultságát fokozza, hogy a RyR olyan kovalens módosításoknak is a célpontja, mint az oxidáció, a nitroziláció és a foszforiláció.

1.1.1.3. Foszforiláció

A szimpatikus idegrendszer az érátmérő és a szív perctérfogatának szabályozásával a szervezet pillanatnyi igényéhez igazítja az artériás középnyomást. A szimpatikus idegrendszer aktiválódásakor (például izommunka vagy vészreakció esetén) felszabaduló catekolaminok a szív β -adrenerg receptorainak közreműködésével G_s -fehérjéhez kapcsolt jelátviteli útvonalat hoznak működésbe, mely során az adenilát-cikláz aktivitása fokozódik, a sejt cAMP-szintje emelkedik, ami a cAMP-dependens protein kináz (PKA) aktiválódásához vezet. A PKA az izomrost Ca^{2+} -háztartását szabályozó fehérjék (DHPR, SERCA, RyR) foszforilálásával aktiválja azokat, így növekszik a Ca^{2+} -transziens amplitúdója és a szívizom kontrakciós ereje. A RyR defoszforilációjában a protein foszfatáz 1 és 2A szerepel.

A folyamatnak kórélettani jelentősége szívelégtelenségben van, ekkor ugyanis a szív pumpafunkciója elégtelen a szövetek igényének megfelelő perctérfogat biztosítására. Az alacsony artériás középnyomást a szervezet krónikusan magas szimpatikus aktivitással kompenzálja (baroreceptor reflex), ami segíthet ugyan megfelelő szinten tartani a vérnyomást, de hosszútávon hátrányos következményekkel jár (kamrai hipertrófia és/vagy dilatáció). A szív funkcióromlásának hátterében a miokardium sérülésének okától függetlenül (ischaemia, magas vérnyomás, kardiomiopátia...) az intracelluláris Ca^{2+} -homeosztázis- és az elektromechanikai kapcsolat zavara áll, ami a foszforilációs mechanizmus hibás működésére vezethető vissza. Szívelégtelenségben a Ca^{2+} -transziens amplitúdója alacsony, felszálló szára lassú és a SERCA pumpa alacsony aktivitása miatt lassan cseng le, azaz a relaxációs idő nyúlik. Ez az állapot magas szívfrekvenciánál különösen veszélyes, mert ilyenkor a diasztolé rövidege miatt az SR kevésbé tud újratöltődni, így a következő szisztolé alkalmával még kevesebb Ca^{2+} szabadul fel, ami a kontrakciós erő további csökkenéséhez vezet.⁹³⁻⁹⁶ Az irodalomban, az utóbbi időben az a nézet terjedt el, hogy a „remodeling” során tapasztalt változások oka a Ca^{2+} -transzport-fehérjék expressziós mintázatának megváltozása mellett bizonyos fehérjék – köztük a RyR2 – túlzott foszforilációja. A RyR hiperfoszforilációját

azonban nem fokozott kináz-aktivitás, hanem az alacsony foszfatázaktivitás (protein foszfatáz 1 és 2A) okozza, mert a szívizomrostok cAMP-szintje a β -adrenerg receptorok adaptációja miatt nem magas. A RyR2 hiperfoszforilációjáért a RyR fiziológiás szabályozását végző két kinázt, a PKA-t és a calmodulin-dependens protein kinázt (CAMKII) teszik felelőssé, de az eredmények ellentmondásosak.^{97, 98}

A PKA a RyR2 foszforilálását a 2809-es szerin aminosavon végzi. Marks és munkatársai szerint a 2809-es szerin foszforilálásakor az FKBP12.6 részlegesen és átmenetileg disszociál a csatornáról. Ennek megfelelően megjelennek a csatorna szubkonduktancia-állapotai, és a RyR Ca^{2+} -érzékenysége növekedése miatt a csatorna nyitvatartási valószínűsége is nő, mellyel a RyR2 fiziológiás körülmények között maga is hozzájárul a katekolaminok pozitív inotróp hatásának kialakításához. Eredményeik szerint szívelégtelenségben a krónikusan magas szimpatikus aktivitás miatt a RyR2 négy alegysége közül a 2809-es szerinen átlagosan három van foszforilálva (hiperfoszforilált RyR2), míg egészséges szívben, még vészreakció alkalmával is ennél kevesebb. Elméletük szerint a hiperfoszforilált RyR2 Ca^{2+} -függését leíró haranggörbe az FKBP12.6 depléciója miatt extrém módon kiszélesedik, ezért az SR diasztolében is csurog, míg egészséges körülmények között a foszforilált (de nem hiperfoszforilált) csatornán maradó FKBP12.6 mennyisége diasztolében elegendő a RyR2 zárva tartásához.⁹⁹⁻¹⁰⁴ Sitsapesan munkacsoportja azonban azt találta, hogy a RyR2 foszforilációjának bazális szintje 75%-os, és β -adrenerg stimuláció hatására a maximális foszforiláció egészséges körülmények között is bekövetkezik. Ez az állapot azonban csak a P_o - és a konduktancia enyhe növekedésével jár, szubkonduktív-állapotokkal nem. Sitsapesan azzal magyarázza a két munkacsoport eredményeinek ellentmondását, hogy a β -adrenerg stimuláció fiziológiás körülmények között csak átmeneti, szívelégtelenségben viszont hosszantartó, mely felveti egy nemrég azonosított foszforilációs hely (szerin-2030) kórfolyamatban betöltött szerepét, mivel egyelőre nem zárható ki, hogy a PKA krónikus aktiválódásakor ez is foszforilálódik.¹⁰⁵

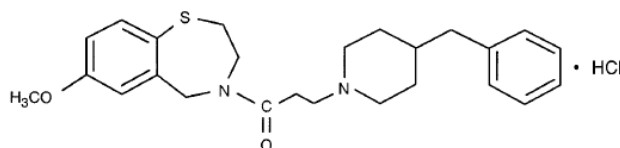
Bers munkacsoportjának eredményei viszont a PKA szerepét a RyR2 szabályozásában nem tudták megerősíteni. Álláspontjuk szerint a pozitív inotróp hatásért csupán az I_{CaL} PKA-függő növekedése felelős, mely fiziológiás körülmények között magasabb CICR-t indukál. Leírták, hogy szívelégtelenségben az I_{CaL} CICR kiváltásában mutatott hatékonysága csökken.⁹⁶ Marks ugyanezt a jelenséget, az elektromechanikai kapcsolat zavarát az FKBP12.6 disszociációjának kísérőjelenségeként értelmezi, mivel ekkor a RyR kapuzása szinkronizálatlanná válik, mely így csökkenti a Ca^{2+} -felszabadulás hatékonyságát (EC-uncoupling) és a kontrakciós erőt (*16/f, g ábra*).⁸¹ A Ca^{2+} -felszabadulás amplitúdójának csökkenéséhez emellett még az is hozzájárul,

hogy az SR diasztolés csurgása és az alacsony SERCA-aktivitás miatt az SR Ca^{2+} -tartalma is csökken.

Tehát az SR diasztolés csurgását az irodalom tényként kezeli, de többféle lehetséges okát jelöli meg (SERCA aktivitás-csökkenés, RyR2 hiperfoszforiláció). A RyR aktiválása jó megoldásnak tűnhet a pumpafunkció helyreállítására, de ez sajnos a CICR amplitúdójának csökkenésével és diasztolés Ca^{2+} -felszabadulással jár, ami a korábban ismertetett mechanizmussal (1.1.1.2.) késői utódepolarizációt válthat ki, aminek olyan súlyos következményei vannak, mint az aritmiák, ventrikuláris tahikardia, kamrafibrilláció és a hirtelen szívhalál.^{93-96, 99-105}

A szívelégtelenségben szenvedő betegek terhelhetőségük csökkenéséről, izomgyengeségről, fáradékonyságról és légszomjról számolnak be, de a tünetek súlyossága nincs összefüggésben a perctérfogat-csökkenés mértékével, és a perctérfogat növelésével, vagy az izom perfúziójának lokális emelésével sem enyhülnek. A csökkent terhelhetőség valószínűleg olyan krónikus hatásokra bekövetkező másodlagos anyagcsere-, génexpressziós-, morfológiai- és funkcionális változások eredménye, mint a krónikusan magas szimpatikus-aktivitás, reaktív nitrogén- és oxigén gyökök (nitroziláció, oxidáció) és gyulladásos mediátorok keletkezése, melyek mind a katabolikus folyamatoknak kedveznek és többek között az SR Ca^{2+} -háztartásának zavarát okozzák.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ Bár a cAMP-jelátviteli útvonal szerepe fiziológias körülmények között a vázizom szabályozásában nem bír nagy jelentőséggel, a szívelégtelenségben tapasztalt izomgyengeséget 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.¹¹⁰⁻¹¹¹

A szívelégtelenség terápiájában a β -blokkolókat, a digoxint és az angiotenzin-konvertáz enzim gátlókat alkalmazzák, jóllehet eredményességük esetleges és relatív. A fenti kutatási eredmények a RyR2 személyében új terápiás célpontot kínálnak. Az ilyen irányú tudományos érdeklődés középpontjába a közelmúltban egy antiaritmogén hatású, RyR-támadáspontú gyógyszerjelölt vegyület került, a K201 (JTV519) (17. ábra). Kardioprotektív hatását úgy fejtí ki, hogy növeli a RyR2 FKBP12.6 iránti affinitását, ezzel stabilizálja a RyR2 zárt állapotát, megakadályozza az SR diasztolés csurgását, de szisztolé alatt nem gátolja a Ca^{2+} -felszabadulást.¹²¹⁻¹²⁶



17. ábra A K201 (JTV519) szerkezeti képlete

1.1.1.4. Kalmodulin (CaM)

A RyR2 Ca^{2+} /CaM-dependens protein kináz II (CamKII) általi foszforilációja szintén a csatorna aktiválódásához vezet, de ez nem jár az FKBP disszociációjával. Annak ellenére, hogy a CamKII-aktivitása valószínűleg nem követi a szív ciklus Ca^{2+} -koncentráció változásait (mivel a CamKII nemcsak a klasszikus Ca^{2+} /CaM-függő módon, hanem autofoszforilációs mechanizmussal is aktiválódik, ami egy fenntartott, Ca^{2+} /CaM-független hatást kelt), a szív működés szabályozásában betöltött közvetlen, és a génexpressziót módosító hatásán keresztül gyakorolt közvetett szerepe is igazoltnak látszik. Erről árulkodik, hogy szívelégtelenségben aktivitása megnő, melynek köszönhetően egy „hipertrófiás” génexpressziós programot indít el, és növeli az SR Ca^{2+} -csurgását, ezért egyes szerzők a PKA szívelégtelenségben betöltött szerepe helyett inkább a CamKII jelentőségét hangsúlyozzák.¹⁴⁴

A CaM nem csak a CamKII aktiválásával befolyásolja a csatorna működését, hanem közvetlenül a RyR-on is hat. Hatása Ca^{2+} -függő és kettős: szubmikromólos Ca^{2+} -koncentrációnál (apoCaM) aktiválja a RyR-t, ennél magasabb ($>0,2 \mu\text{M}$) Ca^{2+} -koncentráció-tartományban gátolja. Az apoCaM és a Ca^{2+} -t kötő CaM-forma két különböző, egymással átfedő közeli kötőhelyhez kötődik a RyR-en, melyek között a Ca^{2+} -koncentráció ciklikus változásakor csúszkál.⁴⁰

1.1.1.5. Farmakológiai befolyásolhatóság

A RyR működését módosító legismertebb vegyületeket a 2. táblázatban foglaltam össze. ⁷

	Ca ²⁺ -f	Po	G	H ³ ry kötés	
				Kd	Bmax
Rianodin	↑↓ ^a	↑ ^a	^s ↓ ^a		
Koffein	↑	↑	—	↑	↑
Ruténiumvörös	↓ ^a	↓ ^a	—	↓ ^a	↓ ^a
Digoxin	↑ ^b	↑ ^b	—		
Digitoxin	↑ ^b	↑ ^b	—		
Ouabain	↑ ^b	↑ ^b	—		
Halothane	↑	↑	—	—	↑ ^b
Enflurane	↑	↑	—	—	↑ ^b
Isoflurane	↑	↑	—	—	↑ ^c
4-cmc	↑	↑	—	↑	—
Thymol	↑	↑	—	↑	—
Carvacrol	↑	↑	—	↑	—
Vanillin	—				
Anisaldehyde	—				
FK-506	↑	↑	^s ↓	—	↓
Rapamicin	↑	↑	^s ↓	—	↓
Tetracaine	↓	↓	—	—	↓
Procaine	↓	↓	—		↓
Lidocaine	↓			↑	—
Dantrolene	↓	↑/↓ ^d	—	↓	—
Laktát	↓	↓	—	—	↓
Suramin	↑	↑	—	↑	↑
Verapamil	↓	↓	—	—	—
Thimerosal	↑	↑/↓	—		
Sulmazole	↑	↑	—	↑	—
Doxorubicin	↑/↓ ^a	↑/↓ ^a	— ^a	↑	—/↓ ^a
Heparin	↑	↑	—	—	—
Neomicin	↓ ^a	↓ ^a	—	↓ ^a	↓ ^a
H ₂ O ₂	↑/↓ ^a	↑/↓ ^a	— ^a	↑	↑/↓ ^a

2. táblázat A RyR működését befolyásoló vegyületek hatásának összefoglaló táblázata ⁷

↑ - nő, ↓ - csökken, — - nem változik, Ca²⁺-f - Ca²⁺-felszabadulás, Po -nyitvatartási valószínűség, G - vezetőképesség, H³ ry kötés - H³ rianodin-kötés, Kd - disszociációs konstans, a - hosszantartó jelenléte a csatorna inaktivációjához vezet, b - RyR2 szelektív hatás, c - RyR1 szelektív hatás, d - ellentmondásos eredmények, lehet, hogy bifázisos hatás, s - szubkonduktív állapot

1.1.1.5.1. Metilxantinok

A koffein a kalcium raktárak vizsgálatára irányuló kísérletekben a leggyakrabban alkalmazott RyR agonista. A RyR1 és a RyR2 aktivációs Ca^{2+} -kötőhelyeinek érzékenységét fokozza, ezért kalcium-függő módon növeli a csatorna nyitvatartási valószínűségét, és kalcium-felszabadulást okoz. Intakt vázizomroston kontraktúrát vált ki.⁷ Gyenge oldhatósága, magas hatásos koncentrációja (5-10 mM), és a vele végzett kísérletek nehéz reprodukálhatósága korlátozza agonistaként való felhasználását. Munkacsoportunk az elektromechanikai kapcsolat vizsgálatára a koffein helyett a timolt javasolja, mely jó oldhatósága, a kísérletek ismételhetsége és viszonylag alacsony hatásos koncentrációja ($K_d=160 \mu\text{M}$) miatt eséllyel pályázik az ideális RyR agonista címre.^{112, 113}

A többi metilxantinnak a koffeinhez hasonló hatása van. Rousseau és munkatársai szerint a metilxantinok hatásossága csökkenő sorrendben a következő: 1,7 methylxanthin, theobromin, theophyllin, koffein, 3,9 dimethylxanthin.⁷

1.1.2. A RyR mutációihoz kapcsolódó betegségek

A RyR-t szabályozó hatások a csatorna kapuzásában résztvevő doméneken összegződnek, fókuszálódnak. A szignálokat a RyR alegységei közötti kölcsönhatások és a RyR interdomén kapcsolatai továbbítják az ionvezető pórus felé. Ezek az intramolekuláris szignáltranszdukcióban szereplő kapcsolatok a RyR mutációi miatt sérülhetnek, és a RyR kapuzása (és ezzel együtt a Ca^{2+} -felszabadulás) kóros irányba módosulhat.⁵⁹

A RyR mutációihoz több ritka, de kimenetelét tekintve súlyos öröklődő betegség társul, melyek sikeres kezeléséhez (ha ez egyáltalán lehetséges) a betegség genetikai hátterének ismerete feltétlenül szükséges. A RyR leggyakoribb mutációit a 3. táblázatban foglaltam össze (33. oldal).⁵⁵

A RyR1-et érintő betegségek közül klinikai szempontból egy farmakogenetikai betegség, a malignus hiperthermia (MH) a legjelentősebb, mivel a pontmutációkat homozigóta formában hordozó betegek rianodin receptora depolarizáló izomrelaxánsokkal és az altatószerként széles körben használt halotánnal szemben mutatott érzékenysége magas. Terápiás koncentrációban alkalmazott halotán is jelentősen aktiválja a mutáns RyR-t, mely olyan mértékű mioplazmatikus Ca^{2+} -koncentráció-növekedéshez vezet, ami kontraktúrát hoz létre. A teljes vázizomzatra kiterjedő feszülés-növekedés miatt metabolikus acidózis és hiperkalémia alakul ki, és az izom fokozott hőtermelése miatt gyorsan emelkedni kezd a testhőmérséklet. A test hűtése és a posztiszinaptikus izomrelaxáns dantrolén alkalmazása nélkül a folyamat végzetes kimenetelű.^{7, 114}

A műtéti kockázat csökkentése céljából a malignus hyperthermia-gyanús betegek *in vitro* szűrésére elterjedten használják a koffeint, mivel a mutáns receptorok koffeinnel szemben is nagyobb érzékenységet mutatnak. Az MH-mutációt hordozó csatornák alacsonyabb Ca^{2+} -koncentrációnál aktiválódnak, mint egészséges társaik, ugyanakkor a Ca^{2+} és Mg^{2+} gátló hatására kevésbé érzékenyek, ezért a CICR amplitúdója a megszokottnál magasabb és a csatorna nyugalomban is aktívabb. Az MH mutációk valószínűleg a SERCA pumpa kompenzáló hatása miatt mégsem okoznak olyan mértékű nyugalmi Ca^{2+} -csurgást, mely megemelné a vázizomrost nyugalmi Ca^{2+} -koncentrációját, vagy kiürítené az Ca^{2+} -raktárat, ezért a betegek teljesen tünetmentesek, mindennapi életükre a malignus hiperthermia nincs hatással.⁵⁹

Egy másik, a RyR1 mutációjához köthető másik öröklődő izombetegségben, a central core disease-ben (CCD) szenvedők azonban sajnos olyan komoly tünetekről számolnak be, mint az izomfájdalom, a lassú kontrakciós válasz, az alacsony vérnyomás, és az izomtömeg csökkenése. Nevét a betegség onnan kapta, hogy az izomrostok közepén egy NADH-festéssel nem festődő mag húzódik végig. Ezeken a területeken nincs oxidatív enzim-aktivitás, glikogén, és mitokondrium sem. CCD-mutációt hordozó RyR1-et expresszáló tenyésztett vázizomrostokban a DICR küszöbe és amplitúdója csökken, az SR Ca^{2+} -tartalma és a nyugalmi intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció normális, mivel az SR jelentős csurgása csak néhány mutáció esetén figyelhető meg. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy CCD-ben a DHPR-RyR1 közötti kapcsolat épsége sérül (electromechanical uncoupling).^{59, 114, 115}

A RyR1 mutációinak egy része fenotípusosan malignus hiperthermiában és central core disease-ben egyszerre jelentkezik. Ilyen RyR1-el transzfektált sejteket a DICR alacsony amplitúdója és alacsony kiválthatósági küszöbe mellett nagy nyugalmi Ca^{2+} -csurgás és magas nyugalmi Ca^{2+} -koncentráció jellemzi. Ilyen mértékű Ca^{2+} -csurgást a SERCA képtelen kompenzálni, ezért az SR depletálódik (dekompenzált Ca^{2+} -csurgás).¹¹⁵

A RyR több mint 80 mutációja okoz MH-t és/vagy CCD-t, melyek a RyR N-terminálisára, az MH1, MH2, és az MH3 régióknak elnevezett szakaszokra (ún. „sensitive domain”-ekre) koncentrálnak (3. táblázat).⁵⁵ Ha a mutációk a RyR kapuzási mechanizmusának zavarát okozzák, akkor logikus ezeken a „forró pontokon” feltételezni a RyR kapuzását irányító interdomén kapcsolatokat. A mutációk tehát ezen kölcsönhatásokban résztvevő doménekről árulkodnak. A kölcsönhatás nagyfokú specifitását kihasználva az interdomén kapcsolat doménpeptidek alkalmazásával felderíthető. A doménpeptidek a feltételezett interdomén kölcsönhatásban résztvevő szakasz részletének peptidváltozatai. A velük végzett kísérletek munkahipotézise szerint a doménpeptid kölcsönható partneréhez kötődik a RyR-en, ezzel

felszakítja a natív interdomén kapcsolatot, melynek hiánytünetei ekkor nyilvánvalóvá válnak. Az egyik leggyakrabban előforduló MH-mutációt hordozó RyR-részlet vad típusú doménpeptid változata például Ca^{2+} -felszabadulást vált ki, és csökkenti a RyR Ca^{2+} - és Mg^{2+} -gátlással szembeni érzékenységét, tehát szimulálja az MH mutáció hatását. A hipotézis helyességét – mely szerint MH-ban interdomén kapcsolatok sérülnek – bizonyítja, hogy a doménpeptidok MH-mutációt hordozó változatai hatástalanok.^{59, 116, 117}

A RyR2 mutációi a RyR1 mutációk forró pontjaival homológ szakaszokon fordulnak elő. Egy részük igazoltan katekolaminerg polimorf ventrikuláris tahikardiát (CPVT) okoz (3. táblázat).

¹¹⁸ Az ilyen mutációt hordozó betegek szíve strukturális elváltozást nem mutat, nyugalomban működését tekintve is ép, viszont aritmogén hajlama nagyfokú stressz vagy fizikai igénybevétel esetén magas, ezért az ilyen betegek általában nem érik meg a 40. életévüket.

Marks és munkatársai kimutatták, hogy bizonyos CPVT mutációkat hordozó csatornák működésüket tekintve kontroll körülmények között nem különböznek az egészségesektől, de PKA foszforiláció hatására jelentősebb mértékben aktiválódnak. Eredményeik szerint az FKBP12.6 affinitása a mutáns RyR-hez sokkal alacsonyabb, mint a vad típusúhoz, ami arra utal, hogy β -adrenerg stimuláció hatására az FKBP a beteg receptorokról fokozott mértékben disszociál, ami az SR diasztolés csurgását okozza. Tehát a RyR2 mutációjával járó CPVT-ben és szívelégtelenségben hasonló folyamatokat feltételeznek: az FKBP12.6 hiánya aritmiára és hirtelen szívhalálra hajlamosít. Elméletüket inaktivált FKBP12.6 gént homozigóta (-/-), vagy heterozigóta (+/-) formában hordozó egereken végzett kísérletekkel igazolták. A heterozigóta egérben az FKBP12.6 szintje ~60%-a a vad típusénak. Intenzív fizikai terheléskor mindkét egér – a vad típusúval ellentétben – polimorf ventrikuláris tachikardiát produkál, és kardiomiocitáikról β -agonista kezelés hatására késői utódepolarizációk vezethetők el. A RyR2 foszforilációs szintje mindhárom esetben (+/+, +/-, -/-) azonos. A foszforilált csatornáról az FKBP12.6 részben disszociál, a RyR2 P_o -ja nő, de a +/- és a -/- egérből származó RyR2 a vad típusú csatornához képest jóval nagyobb P_o -növekedést mutat (a homozigóta egér esetében például a különbség ~10×-es). Egy hetes K201 (JTV519) kezelés a heterozigóta (+/-) egéren a ventrikuláris tahikardiákat képes kivédeni, és a terhelés-indukált CPVT miatti ~90%-os halálozási arányt nullára csökkenteni. A vegyület a homozigóta egereken hatástalan, ami arra utal, hogy hatása valóban FKBP12.6-függő. Ezt *in vitro* kísérletek is bizonyítják: a K201-gyel kezelt heterozigóta egerekből izolált rianodin receptorok nyitvatartási valószínűsége alacsony, és K201 jelenlétében a csatorna több FKBP12.6-ot köt. A K201 tehát valószínűleg a RyR2 FKBP12.6 iránti affinitásának fokozásával akadályozza meg az SR diasztolés csurgását és az aritmiákat.¹¹⁹⁻¹²⁶

MH1 RyR1 mutáció				MH2 RyR1 mutáció				MH3 RyR1 mutáció			
C	35	R	MH	R	2117	L	MH	R	4136	S	MH
R	44	C	MH	D	2129	E	MH	R	4216	D	CCD
D	60	N	CCD	R	2163	C	MH	V	4234	L	MH
E	160	G	CCD	R	2163	H	MH/CCD	L	4568	P	CCD
R	163	C	MH/CCD	R	2163	P	MH	Y	4631	N	CCD
D	166	N	MH/CCD	V	2168	M	MH	E	4634	K	CCD
G	215	E	CCD	T	2206	M	MH	T	4637	A/I	CCD
G	248	R	MH	T	2206	R	MH/CCD	G	4638	D/S	CCD
R	328	W	MH	V	2214	I	MH	L	4650	P	CCD
G	341	R	MH	V	2280	I	MH	H	4651	P	CCD
R	401	C	MH/CCD	V	2346	M	CCD	L	4665	P	CCD
R	401	H	MH	E	2347	-	MH	P	4668	S	MH
I	403	M	MH/CCD	R	2355	C	MH	K	4724	Q	CCD
Q	474	H	CCD	A	2367	T	MH	R	4737	W	MH
Y	522	S	MH/CCD	R	2401	H	MH	L	4793	P	CCD
R	533	C	MH	A	2428	T	MH	Y	4796	C	CCD
R	552	W	MH	D	2431	N	MH	F	4808	N	CCD
R	614	C	MH/CCD	G	2434	R	MH	R	4825	C/P/I	CCD
R	614	L	MH	R	2435	H	MH/CCD	T	4826	I	MH
				R	2435	L	CCD	L	4838	V	MH
				R	2452	W	MH	N	4858	D	CCD
				I	2453	T	MH/CCD	P	4860	-	CCD
				R	2454	C	MH	R	4861	H/C	CCD
				R	2454	H	MH	Y	4864	C	CCD
				R	2458	C	MH	G	4891	R	CCD
				R	2458	H	MH	R	4893	W/Q	CCD
				R	2508	C/H	CCD	A	4894	Q/T/V	CCD
				E	2545	D	CCD	I	4898	T	CCD
				R	2676	W	MH	G	4899	E/R	CCD
				T	2787	S	MH	T	4920	N	CCD
				L	3606	P	CCD	R	4914	G/T/Q	CCD
				K	3367	R	CCD	F	4921	S/T	CCD
				I	3916	M	MH	V	4927	-	CCD
								A	4940	T	CCD
								P	4973	L	MH

CPVT1 szakasz "MH1" RyR2 mutáció				CPVT2 szakasz "MH2" RyR2 mutáció				CPVT3 szakasz "MH3" RyR2 mutáció			
R	176	Q	CPVT	S	2246	L	CPVT	L	3778	F	CPVT
R	414	L	CPVT	V	2306	I	CPVT	G	3946	S	CPVT
I	419	F	CPVT	R	2311	D	CPVT	N	4097	S	CPVT
R	420	W	CPVT	P	2328	S	CPVT	N	4104	K	CPVT
L	433	P	CPVT	N	2386	I	CPVT	E	4146	K	CPVT
				A	2387	P	CPVT	T	4158	P	CPVT
				Y	2392	C	CPVT	Q	4201	R	CPVT
				A	2403	T	CPVT	R	4497	C	CPVT
				R	2474	S	CPVT	F	4499	C	CPVT
				T	2504	M	CPVT	N	4504	I	CPVT
				L	2534	V	CPVT	A	4510	T	CPVT
								A	4608	P	CPVT
								V	4653	F	CPVT
								G	4671	R	CPVT
								V	4771	I	CPVT
								I	4848	V	CPVT
								A	4860	G	CPVT
								I	4867	M	CPVT
								V	4880	A	CPVT
								N	4895	D	CPVT
								P	4902	L	CPVT
								E	4950	K	CPVT
								R	4959	Q	CPVT

3. táblázat A RyR1 és a RyR2 mutációi ^{55, 118} A RyR1 mutációi három régióba tömörülnek (MH1, MH2, MH3), és MH, valamint CCD fenotípusban nyilvánulnak meg. A RyR2 CPVT-t okozó mutációi a RyR1 mutációk forró pontjaival homológ szakaszokon fordulnak elő. A mutációk a szekvenciában elfoglalt helyük alapján három (illetve 2x3) csoportba sorolhatók (MH1, MH2, MH3). Az első oszlop mindig a vad típusú RyR aminosavának egybetűs kódját, a második az elsődleges szerkezetben elfoglalt pozícióját tünteti fel, míg a harmadik oszlop a mutáns aminosav kódját tartalmazza. A negyedik oszlop a mutációhoz kapcsolódó betegség rövidítése.

1.2. Az SR Ca^{2+} pumpa (SERCA)

A SERCA egy ~104 kDa molekulatömegű, 998-1001 darab aminosavból álló fehérje, melynek számos izoformája ismert: a SERCA2a a lassú-, a SERCA1a és a SERCA1b a gyors típusú vázizomban, míg a SERCA2b a simaizomban fordul elő. A szívizom izoformája szintén a SERCA2a.

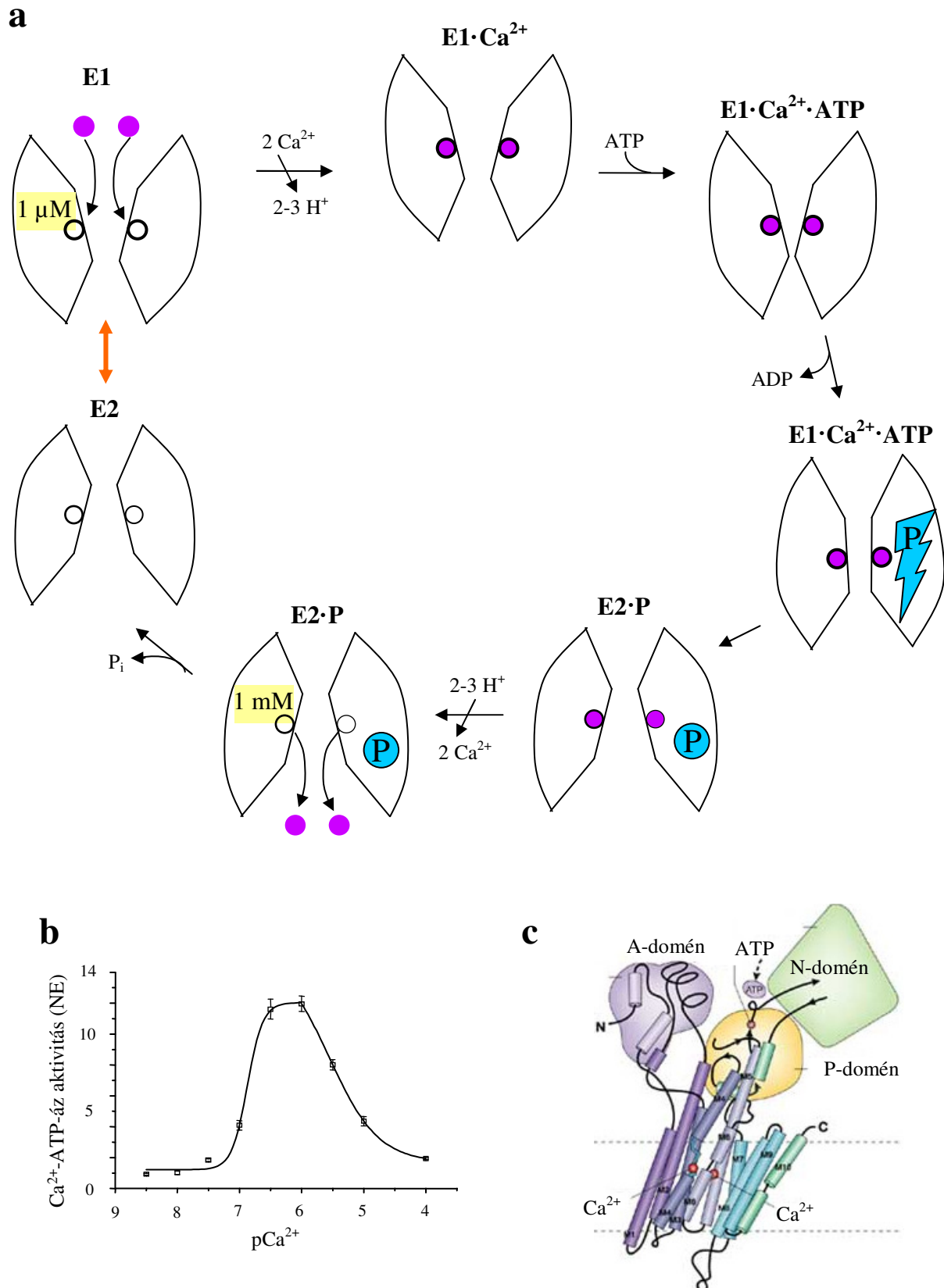
A Ca^{2+} visszavétele az SR-be a SERCA révén, aktív transzportmechanizmussal valósul meg. Működése során egy ATP hidrolízise árán két Ca^{2+} -t juttat az SR lumenébe. A citoszolikus oldali Ca^{2+} -kötőhelyek magas affinitása miatt a SERCA az intracelluláris nyugalmi Ca^{2+} -koncentrációt 100 nM alatt képes tartani. A reakció kulcslépése a többi P-típusú ATP-ázhoz hasonlóan az enzim átmeneti foszforilálása, ami a fehérje konformáció-változásához vezet. A fő konformációs állapotokat E1-gyel és E2-vel jelöljük. Ca^{2+} és ATP hiányában a pumpa E1 és E2 állapotok között oszcillál. A pumpa Ca^{2+} -affinitása E1 állapotban magas ($K_d \sim 1 \mu\text{M}$), E2-ben alacsony ($K_d \sim 1 \text{ mM}$), azaz az E1 állapotban előszeretettel köt Ca^{2+} -t. A Ca^{2+} -kötött forma (Mg^{2+} jelenlétében) ATP-t képes hidrolizálni, mely során a pumpa foszforilálódik, ez stabilizálja a pumpa E2-konformációs állapotát. E2 konformációs állapotban a Ca^{2+} kötőhely az SR-lumen felé nyitott, és affinitása is alacsony, ezért a Ca^{2+} a lumen felé disszociál a SERCA-ról. (18/a ábra, 36. oldal).^{127, 128} A pumpa aktivitása ennek megfelelően Ca^{2+} -függő folyamat, melynek Ca^{2+} -koncentráció-optimuma $2 \mu\text{M}$ körül van (18/b ábra). Szubmikromólos koncentráció-tartományban az aktivitás azért alacsony, mert a Ca^{2+} -kötődésének a valószínűsége alacsony, míg millimólos tartományban az E2·P állapotról nem disszociál le a Ca^{2+} , így a pumpa E2·P állapotban rögzül. A folyamat energetikai háttere a γ -helyzetű foszfor kötési energiája, mivel azonban a ciklus összes lépése reverzibilis, a pumpa *in vitro* (magas P_i -koncentráció, valamint alacsony intraluminális és magas citoplazmatikus Ca^{2+} -koncentráció mellett) ATP-szintézisre is bírható.

A SERCA1 legfontosabb fehérje természetű szabályozója, a szarkolipin tónusos gátlása alatt áll, amit csak a szarkolipin PKA-függő foszforilációja függeszthet fel. Ezen szabályozást szívizomban (SERCA2a) a szarkolipin helyett a foszfolambán végzi.

Az SR membránjában a pumpasűrűség olyan magas ($30000 \text{ db}/\mu\text{m}^2$), hogy a Ca^{2+} -felszabadulás után a nyugalmi intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció visszaállításához 1-2 pumpaciklus (50-100 ms) is elegendő. A transzportmechanizmus aktivitása az adott izomtípus relaxáció-sebességével arányos: gyors típusú vázizomban magasabb, mint lassú típusúban.^{127,}

A molekula szerkezeti modelljén három fő régió különíthető el (*18/c ábra*):^{127, 129}

- a citoplazmatikus feji rész (mely az ATP-kötő, a foszforilációs- és az ún. energia-transzdukciós domént hordozza),
- a 10 TM hélixből álló intramembrán régió (ami tartalmazza a Ca^{2+} -kötőhelyet, és az E1-E2 átmenet konformáció-változásának a színtere)
- valamint a pentahelikális szár (ami az előző két régiót köti össze, és a Ca^{2+} -kötőhelyeket tartalmazza)



18. ábra Az SR Ca^{2+} -ATP-áz működési- és szerkezeti modellje A SERCA ATP bontásához kötött reakcióciklusa során kalciumot juttat az SR lumenébe (a). A folyamat Ca^{2+} -koncentráció-optimuma $\sim 2 \mu\text{M}$ (b). A Ca^{2+} -t az intramembrán régió köti, amit egy pentahelikális szár kapcsol az ATP-kötő (N), foszforilációs (P) és az energia-transzdukciós doménből álló citoplazmatikus részhez (c).¹²⁹

1.3. Célkritizések

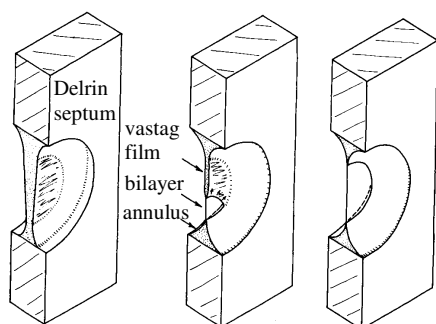
Szívinfarktust követő szívelégtelenségben a végtagizomzat tömege és kontrakciós ereje csökken, fáradékonysága nő, és a légzőizmok gyengesége miatt a légzés felszínessé válik. Az izomgyengeség mértékét a romló perfúzió és a hosszas ágynyugalommal járó csökkenő fizikai aktivitás nem indokolja, ezért a vázizomrost kalciumháztartás-szabályozásának molekuláris szintű megváltozása feltételezhető. Munkám során az SR kalcium csatornáját, a rianodin receptort vizsgáltam kontoll és posztmiokardiális infarktusos állatmodellen. Céloom 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 vázizomgyengeség kialakulását.¹²⁴

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 korábbi irodalmi adatokból ismert, hogy a szóban forgó DHPR-szakasz egy részének peptidként megszintetizált formája, az „A peptid” – annak ellenére, hogy a szívizom típusú RyR és a DHPR között direkt mechanikai kapcsolat nem mutatható ki – a RyR mindkét izoformáját képes aktiválni, felvetette a kérdést, hogy a MCa hatásmechanizmusa RyR2-n a RyR1-en tapasztalathoz hasonló –e, és ha nem, milyenek a MCa izoformaspecifikus hatásai.^{64, 78, 79} Az esetleges különbségekből a vázizom típusú elektromechanikai kapcsolatra vonatkozó következtetéseket reméltünk levonni.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. Single channel árammérések

Az SR intracelluláris elhelyezkedése miatt a RyR működésének direkt elektrofiziológiai módszerekkel történő vizsgálata csak izolált csatornákon lehetséges úgy, hogy a tisztított csatornákat mesterséges sík lipid kettősrétegbe építjük és feszültség-clamp körülmények között mérjük a rajtuk keresztül folyó áramot. A módszer előnye, hogy egyetlen rianodin receptor kapuzásának követését teszi lehetővé, miközben a citoplazmatikus, illetve az SR lumenének megfelelő folyadéktér összetétele egymástól függetlenül, szabadon változtatható.



19. ábra A bilayer spontán formálódása ¹³¹

2.1.1. A mesterséges sík kettősréteg (bilayer)

Stephen H. White az Ion Channel Reconstitution című könyv első fejezetének bevezetésében ezt írja: „A sík lipid kettősrétegek hihetetlenül bosszantóak tudnak lenni. Alkalomadtán mindannyiunkból tört már ki miattuk irracionális, de nagy kielégülést nyújtó düh. Idegesítő voltuk abból fakad, hogy tudatlanságunk miatt termodinamikailag valószínűtlen célt kergetünk. A

bilayerek fizikájáról szerzett ismereteim bővülésével a falhoz vágott főzőpoharak száma egyre csökkent...” A fejezetet Finkelstein szavaival zárja: „... a lipid kettősrétegek készítésének technikáját a szakirodalom és a szójhagyomány útján terjedő folklór lengi körül, majd hozzáteszi: amikor minden megfelelően működik, tetszés szerint készíthető korlátlanul stabil bilayer. Mint minden más módszernek, ennek is megvan a maga misztikuma.” ¹³¹ Munkánk eredményessége érdekében tehát ismerni kell a mesterséges lipid kettősrétegek viselkedését. A mesterséges membránt (bilayer) foszfatidil-etanolamin, foszfatidil-serin és L -foszfatidil-kolin 5:4:1 arányú keverékének 20 mg/ml koncentrációjú n -dekános oldatából hozzuk létre két, szimmetrikus folyadékteret elválasztó 250 μ m átmérőjű nyíláson. A lipidkoncentrációt a kritikus micellaképződési koncentráció fölött kell tartani, különben nem alakítható ki bilayer. Az elektrolitoldatba merülő lyuk peremére egy vékony műanyagpálca segítségével a lipidoldatból felviszünk egy keveset, mely nedvesíti az apoláris felszínt, aztán szétterítjük a nyíláson. Ekkor a lipidréteg vastagsága több μ m, de idővel magától kettősréteggé vékonyodik. A spontán vékonyodást a furat szélén lipidoldatból kialakuló gyűrű, az annuális fázis

görbülete indukálja (19. ábra). LaPlace törvénye szerint a görbült felszín alatt alacsonyabb a nyomás, mint sík rétegben, ezért onnan a foszfolipid az oldószerrel együtt az annuális fázis felé folyik. Az apoláros oldószerre (dekán) ható felhajtóerő miatt először alul kezd kialakulni a bilayer, az oldószer felúszik, és ezért az annuális fázis felül vastagabb. Amikor a lipidfilm eléri a néhány tíznanométernyi vastagságot, jelentőssé válik az elválasztott két vizes fázis közötti van der Waals kölcsönhatás, ami tovább vékonyítja a membránt, míg ki nem alakul a bilayer, és mechanikailag egyensúlyba nem kerül a rendszer.¹³¹ A bilayer kialakulását a transzmembrán feszültség azáltal segíti, hogy az elektromos térerő növeli az annuális fázis és a lipidfilm nyomását, de nem egyenlő mértékben: a vékony filmben a nyomás nagyságrendekkel nagyobb, mint az annuális fázisban, ezért az oldószer az annuális fázisba kerül, és a lipidfilm oldószertartalma csökken. A bilayer kondenzátorként viselkedik, melynek kapacitása arányos a területével, így egy háromszög-impulzust alkalmazva (-5 – +5 mV) a kapacitív áram nagyságából következtetni lehet a bilayer felszínére, és követni lehet a bilayer formálódását. A csatornafehérje beépülésének hatékonysága a lipid kettősréteg összetételén, területének nagyságán, és stabilitásán múlik.

2.1.2. A csatorna beépítése, és a single channel árammérés

A megfelelően nagy területű ($C > 100$ pF kapacitású) és stabil bilayer kialakítása után az egyik oldalra RyR-szuszpenziót adunk. Ezt az oldalt citoplazmatikus (*cisz*) oldalnak nevezzük, mert a csatorna általában úgy épül be, hogy erre néz a citoplazmatikus „foot” régiója. A másik oldal (*transz*) az SR lumenének felel meg, és ebbe merül a földelektród. A szolubilizálás során lipid-detergens „úszógumival” ellátott rianodin receptorok az annuális fázis lipidjébe ragadnak. A RyR az – annuális fázis-bilayer fázishatár meredek ármenete miatt – magától kis eséllyel úszna a bilayerbe, ezért intenzív keveréssel próbáljuk a két fázis határára sodortatni, majd a membrán stabilitásától függően -300 – +300 mv-os feszültséglépcsőket alkalmazunk. A festett lipid kettősréteg egy metastabil egyensúlyi rendszer, abszolút energiaminimuma a lehető legkisebb területű lipidcsepp lenne a lyuk peremén, ezért hajlamos a szakadásra, és a feszültséglépcsőket is nehezen viseli. A siker érdekében a bilayerszakadás és a csatornabeépülés határán kell egyensúlyozni. A hirtelen feszültségváltozáskor a membrán megrepeg, hirtelen változik az annuális-fázis-bilayer aránya, és a kettő határán lévő csatornák nagyobb eséllyel „ugranak” a bilayerbe. A RyR beépülését az áramjel nagy amplitúdójú ingadozása jelzi. A méréseket szimmetrikus pufferben (250 mM KCl, 150 μ M CaCl₂, 100 mM EGTA, 20 mM Pipes, pH=7,2), 50 μ M szabad (ionizált) kalcium jelenlétében, szobahőmérsékleten végezzük. A töltéshordozó nem Ca²⁺, hanem K⁺, hogy a Ca²⁺ szabályozó

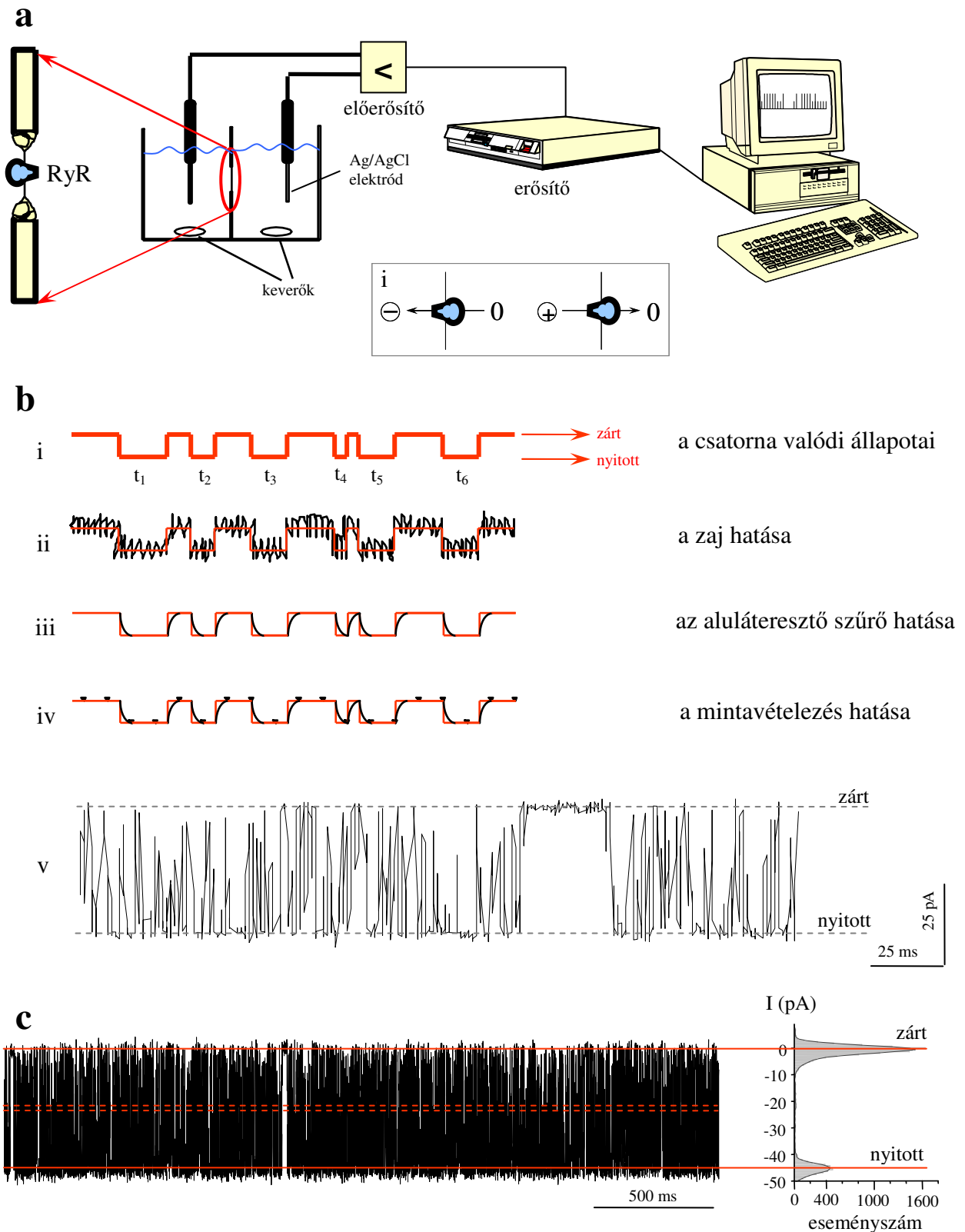
hatása ne zavarja a kísérletet. A bilayer két oldalán a mérőoldat ugyanolyan összetételű (szimmetrikus), ezért az ionáramot nem koncentráció-gradiens, hanem az Axopatch 200 erősítővel fenntartott membránpotenciál hajtja. A single channel-áramot feszültség-clamp üzemmódban regisztráljuk, 8 pólusú aluláteresztő Bessel szűrővel szűrjük, majd 3 vagy 10 kHz-es mintavételi frekvenciával digitalizáljuk és számítógépen tároljuk (20/a ábra).

A RyR orientációját a *cisz* oldal szabad Ca^{2+} -koncentrációjának csökkentésével, és a mérések végén rianodin alkalmazásával ellenőrizzük. A mérések közben ± 80 mV potenciálkülönbséget tartunk fenn, a kísérleti körülmények megváltoztatása után legalább 3, de jellemzően 5 percet várunk az állandósult (steady-state) állapot kialakulásáig, majd legalább újabb öt percre regisztráljuk a RyR működését, azaz a csatornán átfolyó áramot.

A szabad Ca^{2+} -koncentrációt a Fabiato által készített számítógépes programmal számoltuk, mely az egy- és kétértékű ionok, az ATP és az EGTA koncentrációjának ismeretében valamint az EGTA-ra vonatkozó disszociációs állandók alapján megadja az oldat szabad Ca^{2+} -koncentrációját. A RyR aktivitás Ca^{2+} -függésének mérésekor a mérőoldat ionizált Ca^{2+} -koncentrációját lépcsőzetesen, 100 mM-os EGTA és CaCl_2 törzsoldatok hozzáadásával módosítottuk.^{112, 133, 134}

2.1.3. A single channel rekordok kiértékelése

A rekordokat a pClamp 6.02, 10.0 és a Microcal Origin 7.0 programokkal analizáltuk. A RyR működését a csatornán átfolyó áram maximális amplitúdójával (vezetőképességgel), és a csatorna dinamikus paramétereivel jellemezzük. A konduktancia számolása néhány esetben a teljes áram-feszültség (I-V) karakterisztika egyenesének meredekségéből került meghatározásra (slope conductance), illetve egyetlen membránpotenciál értéknél mért áram nagyságából számolt közelítő érték. A csatorna nyitvatartási valószínűsége (a nyitott állapot valószínűsége, P_o) azt adja meg, hogy a csatorna a mérési idő hányad részében van nyitott állapotban. Értékét az elfogadott 50%-os kritérium és 2,5%-os holt zóna alapján számoljuk. Ez azt jelenti, hogy azokat az eseményeket fogadjuk el megnyílásnak, amelyek a maximális áramamplitúdó $50 \pm 2,5\%$ -os sávjába esnek, vagy ennél nagyobbak. Erre a feltételre azért van szükség, mert a mintavételezés technikai okokból feloldatlan megnyílásokat eredményez (20/b ábra). A csatorna alapvetően vagy konduktív (nyitott), vagy nem konduktív (zárt (nyugalmi) vagy inaktivált) állapotban van (20/b/i ábra). A termikus zaj és a mérőrendszer által felszedett elektronikus zaj megnehezítené a nyitott és zárt állapotok elkülönítését (20/b/ii ábra), ezért zajszűrésre van szükség, amit Faraday-kalitkával és aluláteresztő szűrővel oldunk meg.

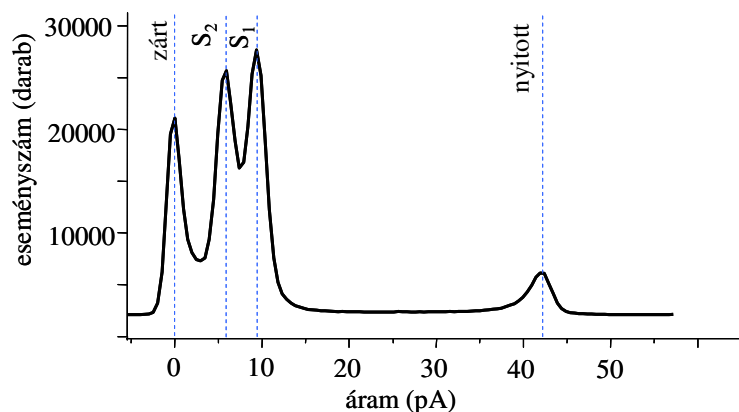


20. ábra A mérőrendszer és a single channel árammérés A mesterséges lipid kettősrétegbe épített RyR single channel-áramát Axopatch 200 erősítővel feszültség-clamp körülmények között mérjük. A bilayer egy Delrin anyagú, 3 ml térfogatú mérőedény falába fűrt 250 μm átmérőjű nyíláson alakítjuk ki PE, PS és PC megfelelő arányú dekános oldatából (a). A b panel szemlélteti a csatorna idealizált kapuzását (i), a zaj (ii), a zajszűrés (iii) és a mintavételezés (iv) jelre gyakorolt hatását, valamint az így kapott pontok összekötésével nyert áramregisztrátumot (v). A c ábrarészlet reprezentatív rekordja a P_o -számolásnál használt $50 \pm 2,5\%$ -os kritériumot mutatja, míg mellette egy áramamplitúdó hisztogramot tüntettem fel.

Az aluláteresztő szűrő alkalmazása azzal a hátránnyal jár, hogy a nyitott és a zárt állapotok közötti éles határ elmosódik, görbül, mivel a szűrő meghatározott számú mintavételi pont súlyozott átlagát használja a zajos görbe simításához (20/b/iii ábra). A mintavételezés során ezekből az átmeneti szakaszokból is veszünk mintát, ezért a regisztrátumokon „törtáramok” is megjelennek (20/b/iv és v ábra). A RyR egyes megnyílásai a membránpotenciál polaritásának megfelelően lefelé vagy felfelé mutató áramtűskéknek felelnek meg (20/c ábra). Ha a RyR beépülésének iránya a 20/a ábra kinagyított részletének megfelelő, akkor negatív membránpotenciáloknál a csatornán keresztül a Ca^{2+} -felszabadulás irányával azonos irányú („fiziológias irányú”) áram folyik. Pozitív membránpotenciáloknál pedig az áramirány ezzel ellentétes (reverz áramirány). Ha a csatorna orientációja fordított, azaz a földelt oldal felé néz a citoplazmatikus régiója, a membránpotenciált és az áramirányt illetően természetesen az imént leírtak ellenkezője teljesül (20/a/i ábra). Kísérleteink során mindkét eset előfordult, ezért negatív és pozitív áramgörbéket egyaránt mutatok. A RyR beépülési irányának ismerete nemcsak azért elengedhetetlen, mert a kísérlet során a RyR citoplazmatikus oldalán kell módosítanunk az oldatösszetételt, hanem a polaritásfüggő jelenségek értékeléséhez és értelmezéséhez is szükséges. A RyR beépülési irányának meghatározásakor azt használjuk ki, hogy a rianodin-kötőhely csak a citoplazmatikus oldalról érhető el, és a Ca^{2+} kötőhelyek is itt vannak, ezért a csatorna orientációjának ellenőrzéséhez minden kísérletben a Ca^{2+} -koncentráció változtatásával vagy 10 μM rianodin hozzáadásával ellenőrizzük a csatorna farmakológiai befolyásolhatóságát.

Az átlagos nyitvatartási idő (τ) a megnyílási hisztogram (a nyitott állapotok hosszának felhasználásával szerkesztett hisztogram) exponenciálissal illesztett egyenletének a τ -ja.

A RyR megnyílásainak számát az egyes megnyílásokhoz tartozó áram amplitúdójának függvényében ábrázolva amplitúdó-hisztogramokat kapunk (20/c ábra). 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 és az S2-nek elnevezett szubkonduktív állapotokhoz tartozó darabszámok csúcsértékeinek nyitott állapot eseményszámának csúcsértékére, vagy a csúcsértékek összegére (S1+S2+nyitott+zárt) normalizált aránya (NSx/NO és NSx/összes) az egyes állapotok koncentráció-függő változásait könnyen értelmezhető értékkel jellemzi (21. ábra).¹³⁴

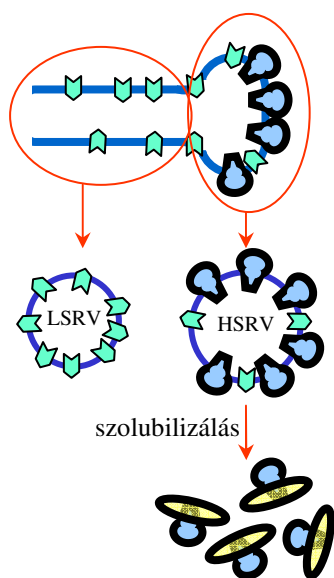


21. ábra A K201-indukált állapotok kvantitatív jellemzésére használt áramamplitúdó hisztogram Az áramrekordokból hisztogramokat szerkesztettünk, melyek alapján eseményszám-arányokat számoltunk. A kapott értékeket a K201-koncentráció függvényében ábrázoltuk.

A maurocalcine a rianodin hatásához hasonló hosszantartó szubkonduktancia-állapotokat indukál (34. ábra), melyeket átlagos hosszukkal (ms) és megjelenési gyakoriságukkal (db/perc) jellemeztünk.^{79, 143}

2.2. HSR és tisztított rianodin receptor prepalálás

Az SR- ből történő Ca^{2+} -felszabadulás vizsgálatához nehéz SR vezikulafrakciót (HSRV), míg a SERCA ATP-áz aktivitás-mérésekhez könnyű SR vezikulafrakciót (LSRV) használunk. A single channel kísérletekhez használt tisztított rianodin receptorokat patkány vázizomból, illetve kutya bal kamrából preparált HSRV-ből izoláljuk.¹¹²



22. ábra SR-vezikulatípusok

2.2.1. HSR vezikula preparálása emlős vázizomból

A patkányt éterrel történő altatás után dekapitáljuk, a fehér izmokat kimetsszük, apróra vágjuk, és 50 g izomra számított 480 ml Ca^{2+} -mentes pufferben (100 mM NaCl, 20 mM EGTA, 20 mM Na-Hepes, pH=7,5) késes homogenizátorral 6×25 másodpercig homogenizáljuk. A homogenizálás során az SR is darabokra törik és újra vezikulákká zárul: a TC- ből nehéz SR vezikula (HSRV), a longitudinális SR-ből könnyű SR vezikula (LSRV) keletkezik (22. ábra). A homogenizátumból centrifugálással (4500×g, 25 perc) eltávolítjuk az alakos elemeket, majd a felülúszó 30 percig tartó, 40000×g-s centrifugálásával nyert mikroszóma frakciót magas ionerősségű közegben (600 mM KCl, 10 mM K-Pipes,

250 mM szacharóz, 0,1 mM CaCl_2 , EGTA 0,09 mM, pH=7,0) egy órán keresztül inkubáljuk. A minta aktomiozin-szennyezettsége így csökkenthető, mivel ilyen körülmények között a

vezikula felszínére tapadó aktomiozin feloldódik, és a mikroszóma-frakció összegyűjtése után ($109000\times g$, 30 perc) a felülúszóban marad. Az üledéket 100 mM NaCl, 10 mM K-Pipes és 485 mM szacharózt tartalmazó oldatban (pH=7,0) reszuszpendáljuk, szorosan záró kézi homogenizátorral homogenizáljuk és lineáris (25-45%) szacharóz-grádiens tetejére rétegezzük. A minta 16 órás, $90000\times g$ -s centrifugálása során a gradiensben a nyers vezikulafrakció HSRV-re és LSRV-re válik szét. A HSRV a gradiens 36-38%-os rétegében világos gyűrűként jelenik meg, míg az LSRV homályos felhő formájában felette lebeg. Az LSRV csak SERCA-t tartalmaz, ezért ATP-áz aktivitásmérésekre használjuk, míg a HSRV-ben RyR és SERCA egyaránt található, ezért amellet, hogy a RyR izolálás alapanyaga, Ca^{2+} -felszabadulás mérésére is alkalmas.

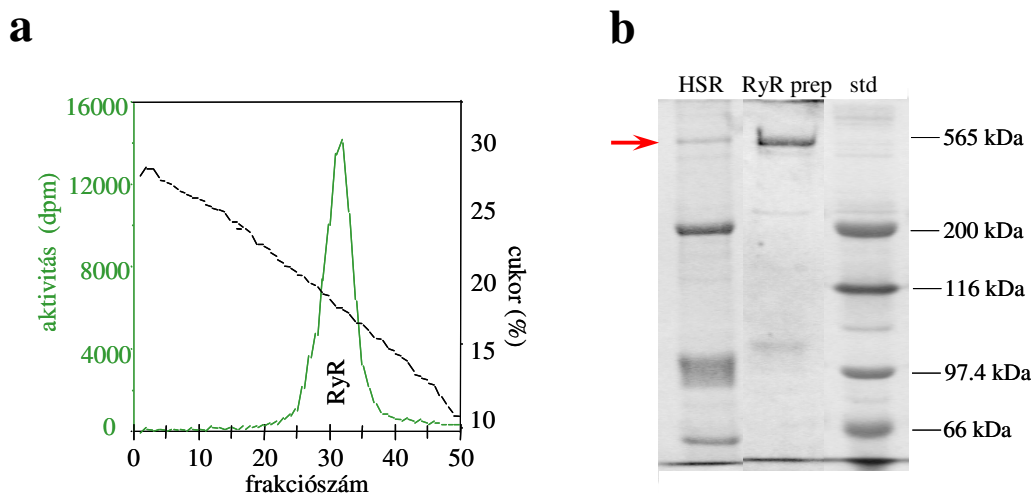
A mikroszóma-frakciókat összegyűjtjük, egy híg cukoroldat (475 mM szacharóz, 1 mM NaCl, 10 mM Pipes, pH=7,0) ~50 milliliterjével mossuk, majd újra lecentrifugáljuk ($124000\times g$, 60 perc). A pelletet izozmotikus (300 mM szacharóz, 10 mM K-Pipes, pH=7,0) pufferben reszuszpendáljuk és ~20-30 mg/ml végkoncentrációra hígítjuk. Ezután a mintát folyékony nitrogénben lefagyasztjuk, és a későbbi felhasználásig $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároljuk, vagy a rianodin receptor izolálásánál azonnal felhasználjuk.¹³² Szív-HSRV preparálásakor kutya bal kamrából indulunk ki, de ugyanezt a protokollt követjük.

A proteolízis elkerülése érdekében a preparálás összes lépését 4°C -on vagy jégen végezzük, és a puffereket proteáz-inhibitorokkal egészítjük ki (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).¹¹²

2.2.2. A rianodin receptor izolálása

A rianodin receptor komplexeket a membránból 3 ml, 27 mg fehérjét tartalmazó HSRV-oldat és 6 ml 1% detergenst és foszfolipidet tartalmazó oldat (0,02 mM EGTA, 0,03 mM $CaCl_2$, 0,45% PC, 1% CHAPS, 1×10^{-4} mM DTT, proteáz inhibitorok, 20 mM Na-pipes, pH= 7,2) elegyében szolubilizáljuk. A RyR későbbi azonosíthatósága érdekében a minta egyharmadát [H^3] rianodinnal jelöljük. A 2 órás szolubilizálás során a csatornakomplexek egy lipid-detergens úszógumit kapnak, és kioldódnak a membránból, de közvetlen lipidkörnyezetük valószínűleg nem cserélődik le. A nem szolubilizálódott vezikuláktól centrifugálással szabadulunk meg ($59000\times g$, 20 perc). A felülúszó a RyR mellett K^+ - és Cl^- -csatornákat is nagy mennyiségben tartalmaz, amitől a mintát lineáris (10-28%) szacharóz-gradiensben történő centrifugálással tisztítjuk meg ($90000\times g$, 16 óra). A nagy szedimentációs koefficiens miatt (30 S) a csatornakomplex a gradiensben gyorsan vándorol. A gradiensben úgy találjuk meg,

hogy a triciált minta gradienseből 15 cseppes frakciókat szedünk, folyadékszcintillációs módszerrel meghatározzuk az egyes frakciók radioaktivitását és megmérjük a hozzájuk tartozó cukor-koncentrációt is. A beütésszám-csúcs megmutatja, hogy melyik cukor-koncentrációjú frakcióban dúsult fel a $[H^3]$ -rianodin. A jelöletlen gradienseken is a hasonló törésmutatójú frakciókban várható a RyR, ezért a nem jelölt gradiensekből szedett frakciók törésmutatójának meghatározásával lehetővé válik a jelöletlen RyR helyének azonosítása. Az aktivitás-csúcsnak megfelelő frakciókat kisebb térfogatokra mérjük szét, cseppfolyós nitrogénben lefagyasztjuk és a későbbi felhasználásig -70°C -on tároljuk. A RyR jelenléte utólag 10%-os poliakrilamid gélelektroforézissel, Coomassie-blue festéssel is könnyen ellenőrizhető, mivel nagy móltömege miatt a gélen egyértelműen felismerhető. A festődés intenzitása szemikvantitatív információt ad a gélen lévő fehérje mennyiségéről és az esetleges szennyeződés mértékéről, így kísérleteinkben azokat a frakciókat használhatjuk, amelyek a legnagyobb mennyiségben tartalmazznak RyR-t (23. ábra).¹³²

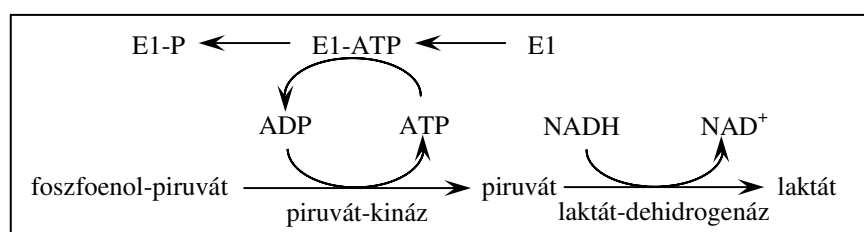


23. ábra A RyR detektálása a cukorgradiensben, és a RyR jelenlétének ellenőrzése SDS-poliakrilamid gélen. A RyR gradiensen történő tisztítása után a cukorgradiensekből 15 cseppes frakciókat szedünk, és a H^3 -rianodinnal jelzett csőből szedett frakciók radioaktivitását folyadékszcintillációs módszerrel megmérjük. Ezután a jelölt és jelöletlen gradiensekből származó gradiensek cukorkoncentrációjának ismeretében meghatározható, hogy a jelöletlen frakciók melyikében dúsult fel leginkább a RyR. Ehhez bízunk kell abban, hogy a jelöletlen RyR a centrifugálás során ugyanolyan cukorkoncentrációig jutott a gradienseben, mint a jelöletlen a sajátjában (a). Az aktivitás-csúcsnak megfelelő jelöletlen frakciókat ezután kisebb térfogatokra mérjük szét, majd 10%-os poliakrilamid gélen ellenőrizzük a RyR jelenlétét (b). A gélen a piros nyíllal jelölt sáv a RyR-nek felel meg. Szolubilizálást követően a RyR gradiensen történő tisztítása sikeres, mivel a RyR preparátumban a RyR relatív aránya a HSR-hez képest sokkal magasabb.

A szívizom típusú RyR csatorna-komplexet kutya bal pitvarból, a patkány vázizom típusú RyR-ral azonos módon izoláljuk.¹³²

2.3. SERCA ATP-áz aktivitás mérés

A pumpa működésének jellemzésére piruvát kináz kapcsolt enzim assay-t használunk. A mérés elve arra épül, hogy a pumpa működése során ATP-ből ADP keletkezik, amit az alkalmazott enzimlánc első tagja, a piruvát kináz szubsztrátként használ: az ADP-t újra ATP-vé alakítja, miközben foszfoenol-piruvátból piruvát keletkezik. A piruvátot a lánc következő tagja, a laktát dehidrogenáz laktáttá redukálja. Az utóbbi reakcióban a sárga színű NADH a hidrogéndonor, mely a folyamat során színtelen NAD^+ -dá alakul át. A NADH fogyás sebessége arányos a minta ATP-áz aktivitásával, mely a színintenzitás-változás mérésével, fotometriás módszerrel 340 nm-en követhető (24. ábra).



24. ábra Az SR Ca^{2+} -pumpa ATP-áz aktivitásának jellemzésére használt kapcsolt enzim-assay működési elve. A pumpa működése során keletkező ADP NADH-fogyáshoz vezet, mely az abszorbancia mérésével fotometriás úton követhető.

A mérőoldatban biztosítjuk a SERCA és az enzimszisztéma optimális működéséhez szükséges ionkörnyezetet, szubsztrátokat, (100 mM KCl, 0,5 mM MgCl_2 , 10 mM ATP, 7,5 U/ml piruvát-kináz, 18 U/ml laktát-dehidrogenáz, 0,42 mM foszfoenol-piruvát, 0,2 mM NADH,) pH-t (20 mM Tris-HCl, pH=7,5) és hőmérsékletet (37°C). Az oldat ionizált Ca^{2+} -koncentrációját úgy állítjuk be, hogy az lehetővé tegye a SERCA maximális aktivitását ($[\text{Ca}^{2+}]=2\text{ }\mu\text{M}$). a végtermékgátlás (Ca^{2+} -akkumuláció) elkerülése érdekében $2\text{ }\mu\text{M}$ calcimicint (A23187 Ca^{2+} ionofort) alkalmazunk. Az ionofor fokozza az LSRV Ca^{2+} -permeabilitását, így a mérés alatt a lumenbe pumpált Ca^{2+} kicsurog a vezikulából, ami folyamatosan maximális SERCA-aktivitást biztosít.

Méréseként 10 μg fehérjét tartalmazó LSRV-t használunk 2 ml térfogatú reakcióelegyben. A minta ATP-áz aktivitását a kapott görbe meredekségéből számoljuk (4. egyenlet), melyből kivonjuk a nonspecifikus aktivitásnak tekintett bazális, specifikus SERCA antagonistá thapsigargin jelenlétében kapott értéket. Az így kapott értékeket a kontroll százalékában adjuk meg. A teljes ATP-áz aktivitás általában ~90%-os gátlhatóságot mutat, vagyis az összaktivitás ilyen hányada tulajdonítható a SERCA működésének.¹¹²

$$s = \left[\frac{m \times V}{\epsilon \times l} \right] / c_{\text{LSR}}$$

4. egyenlet

- s - meredekség ($\mu\text{MPi} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg fehérje}^{-1}$)
 m - az abszorbancia-csökkenésre illesztett egyenes meredeksége
 V - térfogat
 ϵ - extinkciós koefficiens ($\text{NADH}_{340 \text{ nm}} = 0,618$)
 l - fényút
 c_{LSR} - fehérjekoncentráció (LSR) (mg/ml)

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 festékekkel történő követése RyR agonisták és -antagonisták kvalitatív- és kvantitatív farmakológiai vizsgálatát teszi lehetővé.

A mérőoldat összetétele a pumpaműködés ideális feltételeit és a RyR zárva tartását biztosítja a töltés ideje alatt (92,5 mM KCl, 0,5 mM MgCl_2 , 7,5 mM Na-pirofoszfát, 18,5 mM MOPS, pH=7,0). A Na-pirofoszfát a vezikulába jut, ahol a Ca^{2+} pufferelemével hozzájárul a kellő mennyiségű Ca^{2+} felvételéhez. A HSRV-t a Ca^{2+} kis adagjaival fokozatosan töltjük fel, ügyelve arra, hogy a küvetében a Ca^{2+} -koncentráció adott körülmények között ne haladja meg a CICR küszöbét. A töltés addig tart, míg a raktár a megfelelő intenzitású jel detektálásához elegendő Ca^{2+} -ot fel nem vesz, és az oldat ATP-tartalma el nem fogy, hogy a pumpaműködés ne ellensúlyozza a Ca^{2+} -felszabadulás által kiváltott fényintenzitás-változás meredekségét. A rendszer vezikula/ATP/ Ca^{2+} -aránya ennek megfelelően van beállítva. Mérésenként ~0,5 mg fehérjetartalmú HSR vezikulát töltünk fel több lépésben, összesen ~250 nmól Ca^{2+} -mal 0,5 mM ATP jelenlétében. Az oldat Ca^{2+} -koncentráció változását antipirilazo III Ca^{2+} -indikátorral kísérjük nyomon úgy, hogy spektrofotométerrel 710 nm-en folyamatosan mérjük az áteső fény intenzitását.

A HSRV feltöltése után a vizsgálandó vegyület hozzáadásával kiváltjuk a Ca^{2+} -felszabadulást. Antagonista hatása úgy vizsgálható, hogy egy ismert hatású agonista (pl.: timol) hatásosságát összehasonlítjuk az alkalmazott antagonista jelenlétében, illetve hiányában.

A kísérletek összehasonlíthatósága és a vizsgált vegyület hatásának kvantifikálhatósága érdekében minden kísérletben azonos mennyiségű vezikulát kell azonos mennyiségű Ca^{2+} -mal feltölteni, hogy a transzvezikuláris Ca^{2+} -gradiens kísérletenként azonos legyen. A hatás mértékét a Ca^{2+} -felszabadulás sebessége jellemzi, amit a kapott görbe meredekségéből számolunk.

Az izolált rendszereken végzett kísérletek eredményeiből a valós sejtszintű folyamatok nehezen rekonstruálhatók ugyan, de segítségével az összetettebb rendszerek bonyolult összefüggései – az eredmények jó egyezése miatt – sokkal könnyebben értelmezhetők.¹¹²

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.^{133, 134}

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. Az összes többi vegyszer Sigma, vagy Fluka termék.

2.7. Statisztika

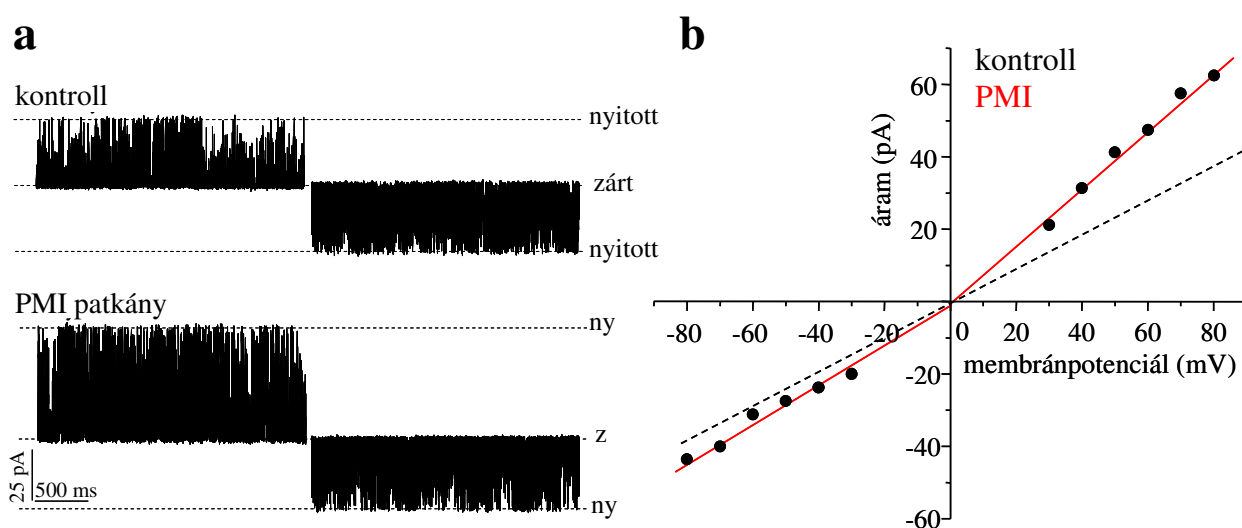
A megadott értékek általában legalább 5 független mérési eredmény átlagai $\pm$ SE. Az adatok statisztikai analízisére kétmintás t-próbát használtunk (Microsoft Excel), a dózishatás-görbéket pedig Microcal Origin 7.0 szoftver segítségével Hill-egyenlettel illesztettük meg, míg a konduktancia-eloszlási hisztogramokat Gauss-függvénnyel.

3. EREDMÉNYEK

3.1. A vázizom típusú RyR vizsgálata posztmiokardiális infarktusos (PMI) állatmodellen

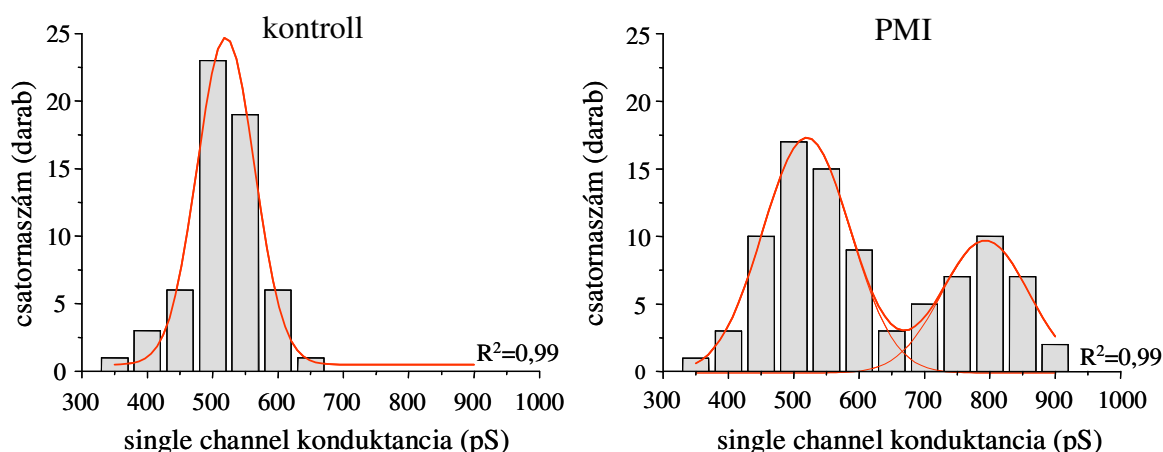
3.1.1. A RyR vezetőképessége

A szolubilizált csatornákat 50 μM szabad Ca^{2+} -koncentrációjú oldatban építettük be a lipid kettősrétegbe, ami adott körülmények között maximális nyitvatartási valószínűséget biztosít, így megkönnyíti a csatorna beépülésének észlelését. A RyR áram-feszültség összefüggését úgy határoztuk meg, hogy a csatornák áramát 250 mM szimmetrikus KCl-oldatban, lépcsőzetesen változó pozitív és negatív membránpotenciál alkalmazása mellett mértük. A csatorna vezetőképességét a kapott pontokra illesztett egyenes meredeksége adja. A kontroll és PMI patkányokból izolált RyR-ok áram-feszültség összefüggése 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 fizioiogiással ellentétes áramot gerjesztő) potenciáloknál mért konduktanciája soha nem tapasztalt 785 ± 28 pS-es átlagot ért el. Ezek a csatornák enyhe egyenirányító működést mutattak, hiszen negatív (a fizioiogiással 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 24. ábra egy kontroll és egy PMI patkányból származó RyR reprezentatív áramrekordját és áram-feszültség karakterisztikáját ábrázolja.¹³³



24. ábra A PMI RyR-ok egy részére jellemző magas amplitúdójú áramrekord (a) és a RyR áram-feszültség karakterisztikája (b) A PMI csatorna vezetőképessége 797 és 547 pS, a kontrollé pedig 544 pS.

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 (25. ábra). 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-ra pedig $573 \pm 4,3$ pS-es maximumot eredményezett.¹³³

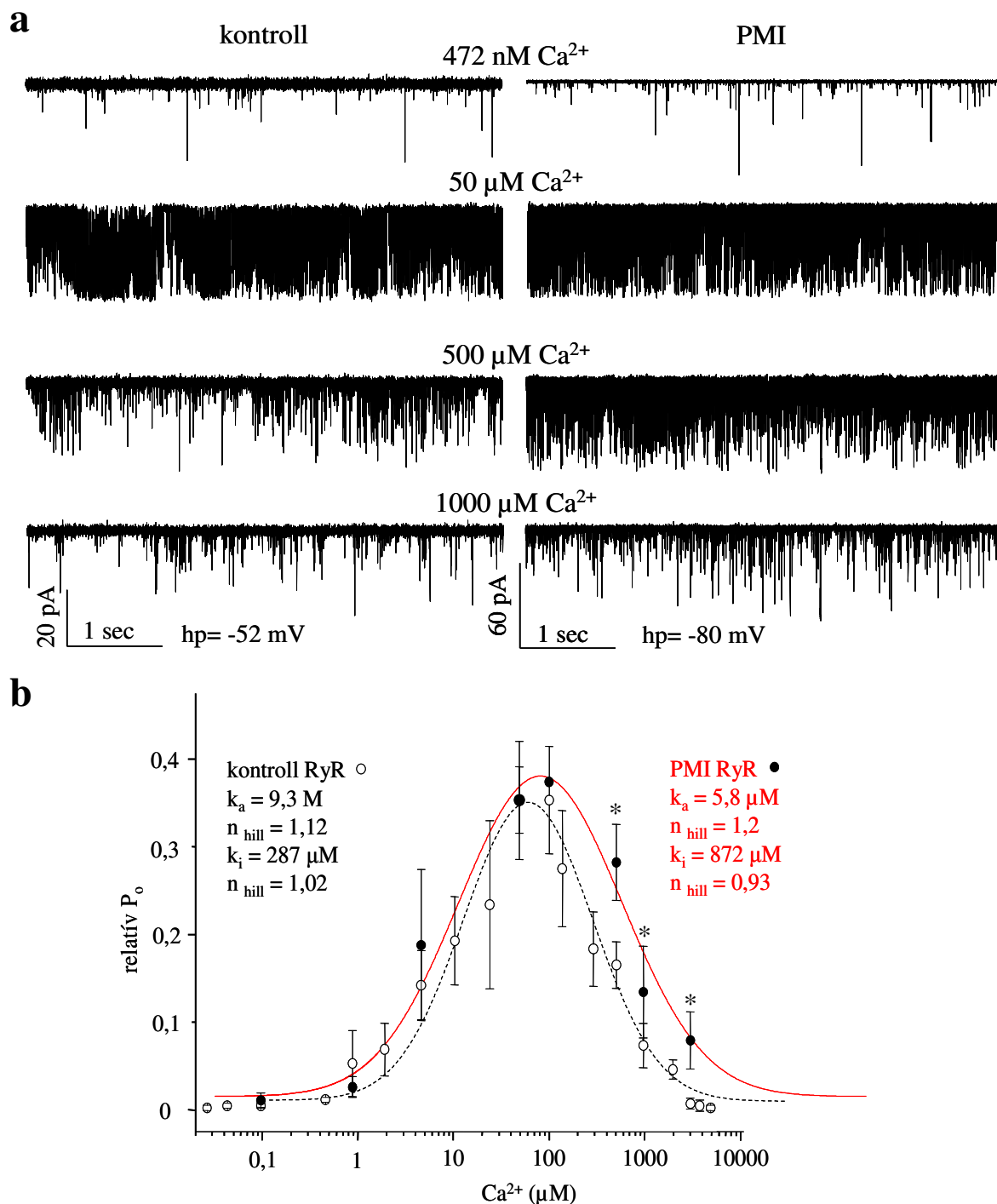


25. ábra A RyR-ok konduktancia-eloszlási hisztogramjai Kísérleteink során meghatároztuk a kontroll és PMI állatokból származó rianodin receptorok konduktanciáját, melyekből konduktancia-eloszlási hisztogramokat szerkesztettünk. A posztinfarktusos patkányokból származó csatornák egy részénél (88-ból 31-nél) a megszokott, ~520 pS körüli értéknél nagyobb, ~700 pS-es a vezetőképességet mértünk.

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

A csatorna-aktivitás Ca^{2+} -függésének meghatározásakor a csatorna citoplazmatikus oldalának megfelelő oldatrész szabad Ca^{2+} -koncentrációját EGTA és $CaCl_2$ törzsoldat hozzáadásával változtattuk. A csatorna nyitvatartási valószínűségét és átlagos nyitvatartási idejét az új állapot állandósulása utáni szakaszok elemzésével határoztuk meg. A RyR-ok szubmikromólos Ca^{2+} -koncentráció-tartományban zárva vannak, 50-100 μM Ca^{2+} -koncentrációnál a legaktívabbak, és ennél magasabb Ca^{2+} -koncentráció a csatorna inaktivációját okozza, ami a P_o csökkenésében nyilvánul meg. Ez a korábbról jól ismert eredmény ebben az esetben azért érdemel említést, mert a 100 μM feletti koncentráció-tartományban a kontroll és a PMI állatból származó RyR-ok nyitvatartási valószínűségének statisztikailag is jelentős különbségét tapasztaltuk ($p < 0,05$). A P_o -változás Hill-egyenlettel történő illesztésével a félaktiváló koncentráció (EC_{50}) értéke 9,3 (kontroll) és 5,8 μM -nak (PMI), a félgátló (IC_{50}) pedig 287 (kontroll) és 872 μM -nak (PMI) adódik, azaz a

haranggörbe a RyR-t inaktiváló Ca^{2+} -koncentrációk 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), a leszálló száron pedig 1,02 (kontroll) és 0,93 (PMI). Az 1 körüli értékek korábbi eredményeknek megfelelően egy aktiváló és egy gátló kötőhely létezésére utal.¹³³



26. ábra A RyR nyitvatartási valószínűségének Ca^{2+} függése Az a ábrarészleten különböző ionizált Ca^{2+} -koncentrációknál mért áramgörbék reprezentatív részletei láthatóak, a b pedig több csatorna nyitvatartási valószínűségének normalizált átlagait és a hozzájuk tartozó SE-t ábrázolja a citoplazmatikus Ca^{2+} -koncentráció függvényében. (* - $p < 0,05$)

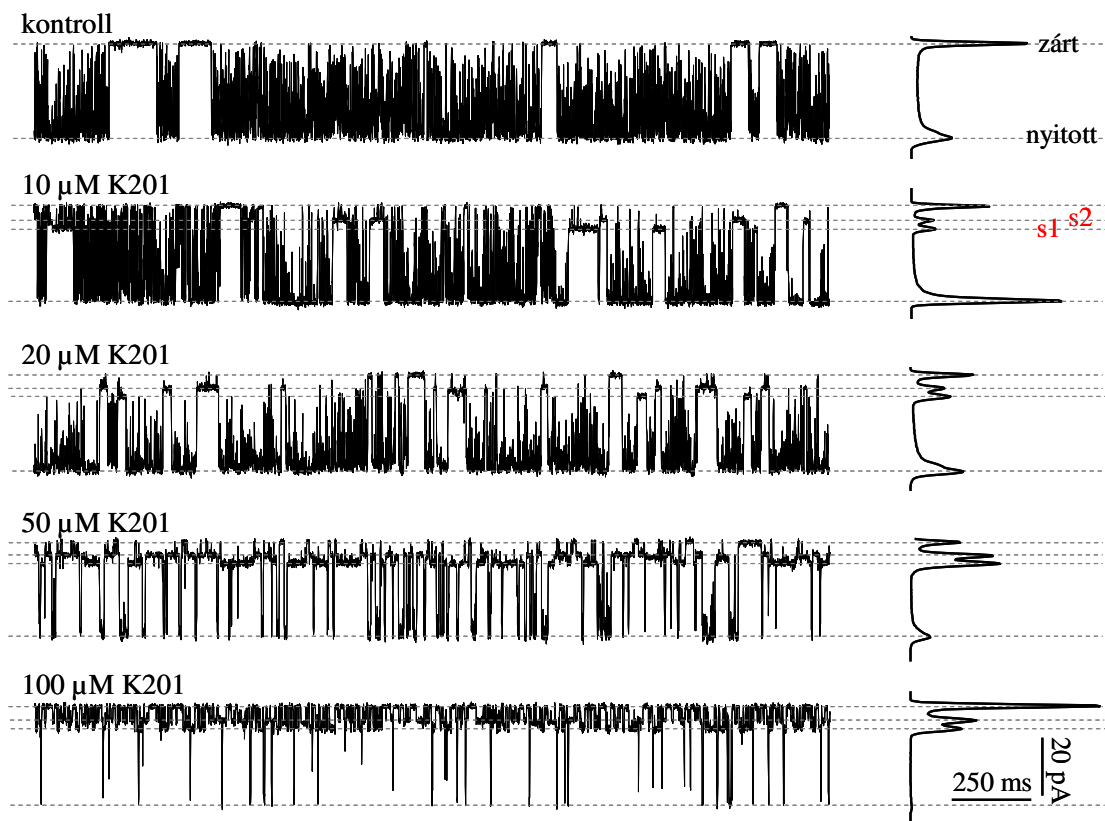
A csatorna átlagos nyitvatartási ideje $50 \mu\text{M Ca}^{2+}$ -nál $0,436 \pm 0,057$ (kontroll) és $0,473 \pm 0,041$ ms (PMI), és ettől jelentősen $0,472 \mu\text{M}-[\text{Ca}^{2+}]$ -nál sem tér el. (kontroll: $0,417 \pm 0,054$ és PMI: $0,431 \pm 0,041$ ms). A Ca^{2+} -koncentráció növelésével az átlagos nyitvatartási idő szignifikáns ($p > 0,02$) csökkenését tapasztaltuk, ami a kontroll és a PMI RyR esetében azonos mértékűnek bizonyult (kontroll: $0,247 \pm 0,032$ és PMI: $0,221 \pm 0,027$ ms). Ezek szerint a P_o markáns csökkenéséhez az átlagos nyitvatartási idő csökkenése hozzájárul ugyan, de fő oka a nyitott állapotok számának csökkenése.¹³³

3.2. A K201 hatása a szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -transzportjára

3.2.1. A K201 hatása a RyR működésére

Ezt követően RyR1-en végzett single channel kísérleteinkkel az utóbbi évek egyik népszerű gyógyszerjelölt vegyületének, 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, munkatűré-képességét, és csökkenti fáradékonyságát, de hatásmódját illetően ellentmondásos eredmények láttak napvilágot.¹²⁴

A 27. ábrán egyetlen rianodin receptoron keresztül folyó áram regisztrátuma látható kontroll körülmények között és K201 jelenlétében. A RyR egyes megnyílásait az áram irányának megfelelően lefelé mutató áramtűskék reprezentálják. A RyR megnyílásainak számát az egyes megnyílasokhoz tartozó áram amplitúdójának függvényében ábrázolva úgynevezett „all-point” hisztogramokat kapunk, melyeket az áramregisztrátum több perces szakaszaiból készítettünk. A reprezentatív rekordok és a mellettük feltüntetett hisztogramok alapján nyilvánvaló, hogy kontroll körülmények között a RyR nyitott és zárt állapotai dominálnak. $10 \mu\text{M}$ K201 hozzáadása után a RyR minőségileg új állapotai jelennek meg, amikor a csatorna nem a kontrollban megszokott módon kapuzik, hanem a maximális konduktancia $\sim 23\%$ és $\sim 13\%$ -ának megfelelő csökkent vezetőképességű (szubkonduktív) állapotot képviselő mértékig nyílik meg (ezeket S1 és S2-nek neveztük el). Az S1 és az S2 a hisztogramokon a nyitott és a zárt állapot közötti csúcsoknak felelnek meg. A K201 koncentrációját $50 \mu\text{M}$ -ig növelve a szubkonduktancia-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} $25,1 \pm 2,7 \mu\text{M}$, a Hill-koefficiens pedig $1,74 \pm 0,28$.¹³⁴



27. ábra A K201 hatása a kontroll állatokból izolált RyR1 működésére A K201 a nyitott RyR 13% és 24%-ának megfelelő szubkonduktív állapotokat indukál. Az ábra jobb oldalán legalább 1 perc hosszúságú áramrekord-szakaszokból készített úgynevezett all-point hisztogramok láthatók. Ezek úgy készülnek, hogy a RyR egyes eseményeihez tartozó áram értékét ábrázoljuk az adott áramamplitúdóhoz tartozó eseményszám függvényében. A fenti ábrán a hisztogramok a szemléletesség kedvéért 90°-kal el vannak forgatva.

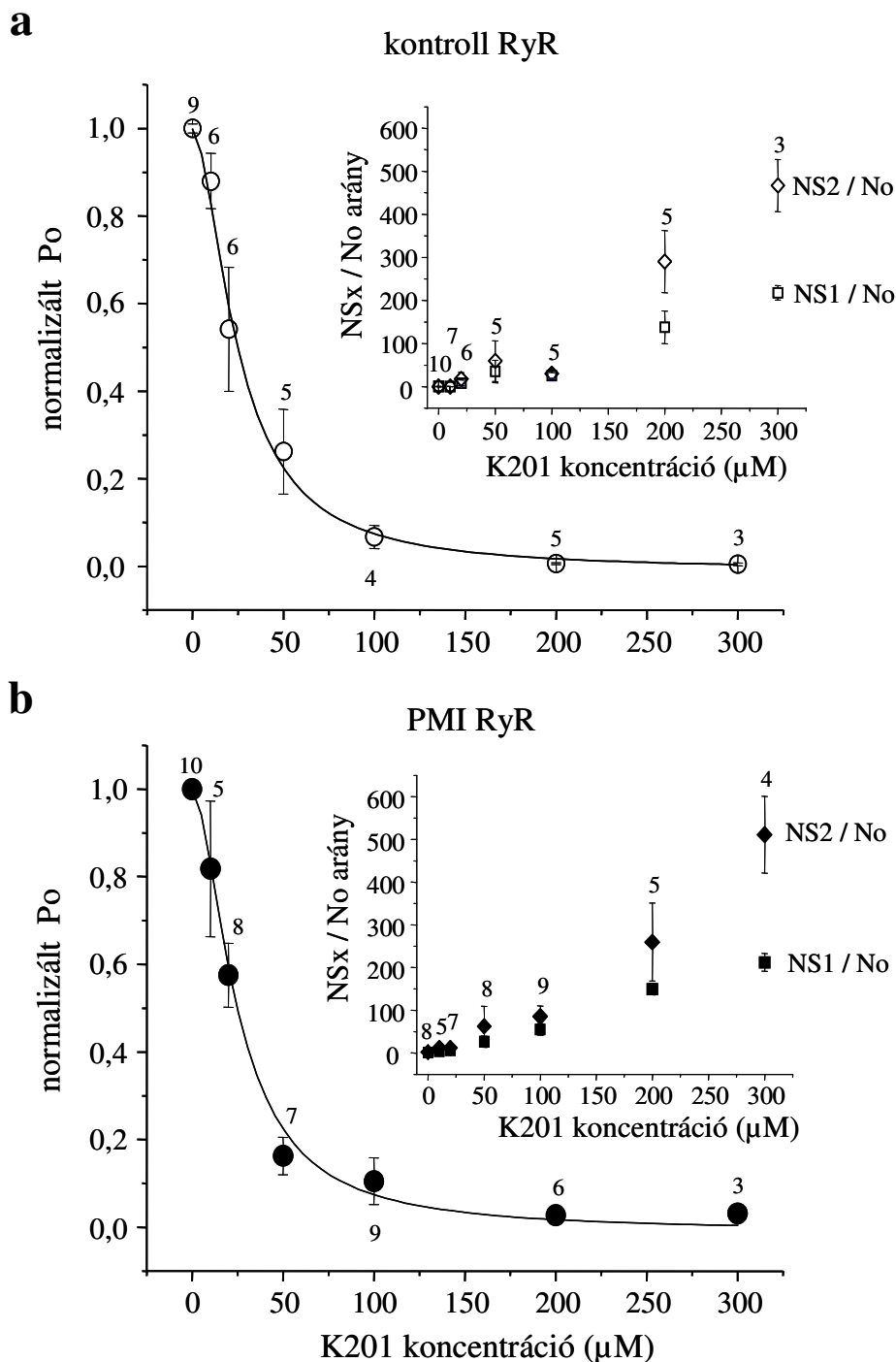
A szubkonduktancia-állapotokat csak a fizioiógiással ellentétes áramirányt biztosító membránpotenciál-értékeknél tudtuk kimutatni, de ekkor már terápiás (1 μM) K201-koncentrációnál is jelentkeztek (28. ábra).



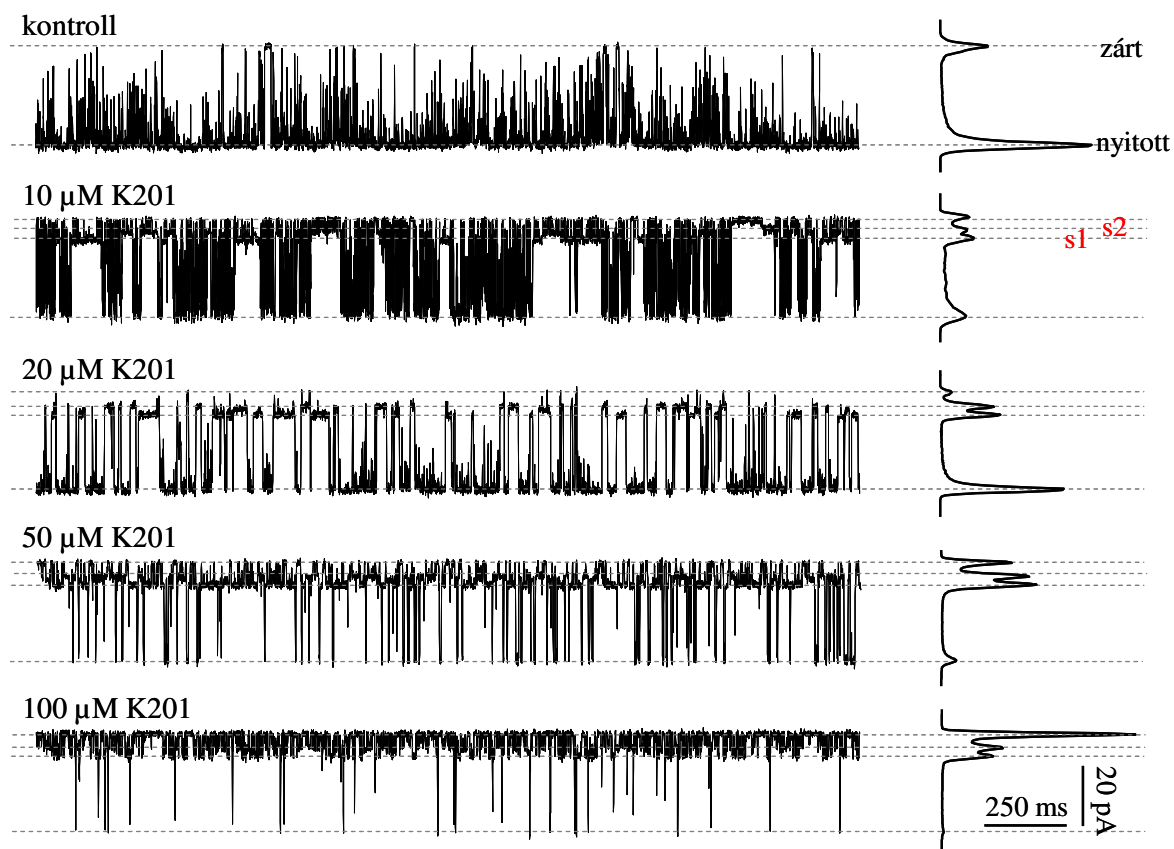
28. ábra Az S1 és S2 állapotok terápiás K201-koncentrációnál

A dózisfüggést az Anyagok és módszerek fejezetben ismertetett módon (2.1.3.), a 21. és a 27. ábrán bemutatottakhoz hasonló „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 (29/a insert ábra). 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.¹³⁴



29. ábra A K201 hatása a RyR működésére A K201 a szubkonduktancia-állapotok (S1, S2) megjelenésének köszönhetően dóziszfüggő módon csökkenti a csatorna nyitvatartási valószínűségét (**a, b**) ($IC_{50_{kontroll}}=25,1\pm2,7 \mu M$ és $IC_{50_{PMI}}=22,0\pm1,0 \mu M$). Az S1 és S2 állapotok arányának K201-függő változását az all-points hisztogramokból számolt paraméterek jellemzik (NSx/No). A hisztogramok alapján számolt eseményszám-arányokat a K201-koncentráció függvényében ábrázoltam (**a insert**). A két szubkonduktancia-állapot nyitott állapot eseményszámára normalizált értékei a kontroll és a PMI RyR-csoportok esetén azonos mértékben változik (**b insert**).

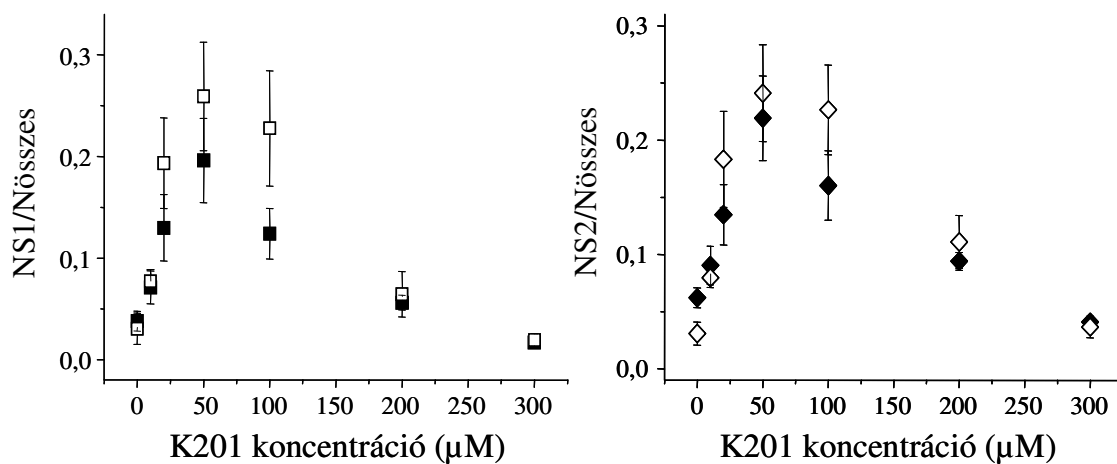


30. ábra A K201 hatása a PMI patkányok vázizmából izolált RyR működésére A vegyület hatását illetően a 27. ábrához képest lényeges különbség nem figyelhető meg, viszont ezen az ábrán is szembevetendő, hogy a PMI RyR aktivitása kontroll körülmények között magasabb, mint a kontrollé volt (27. ábra).

Ezt a P_o -változásra illesztett Hill-egyenlet Hill-koefficiense is megerősíti ($n_{\text{Hill kontroll}} = 1,74 \pm 0,28$; $n_{\text{Hill PMI}} = 1,98 \pm 0,17$). A K201 IC_{50} értéke ($IC_{50 \text{ kontroll}} = 25,1 \pm 2,7 \mu\text{M}$ és $IC_{50 \text{ PMI}} = 22,0 \pm 1,0 \mu\text{M}$), a szubkonduktancia-állapotok relatív amplitúdója ($S1_{\text{PMI}} = 22,3 \pm 0,27\%$ és $S2_{\text{PMI}} = 12,83 \pm 0,39\%$ $S1_{\text{kontroll}} = 23,84 \pm 0,77\%$ és $S2_{\text{kontroll}} = 14,47 \pm 0,59\%$) és a szubkonduktancia-állapotok relatív arányainak dóziszfüggése 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/Nösszes) például $50 \mu\text{M}$ K201 koncentrációig nő, és $0,259 \pm 0,053$ értéket ér el a kontroll csatorna és $0,196 \pm 0,041$ -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 $0,02 \pm 0,006$ -ra csökken, miközben a zárt állapotok relatív száma emelkedik, és a P_o tovább esik. Ez az eredmény arra utal, hogy a vegyület ebben a koncentráció-tartományban valószínűleg zárt állapotokat indukál. Az S2 valószínűségének

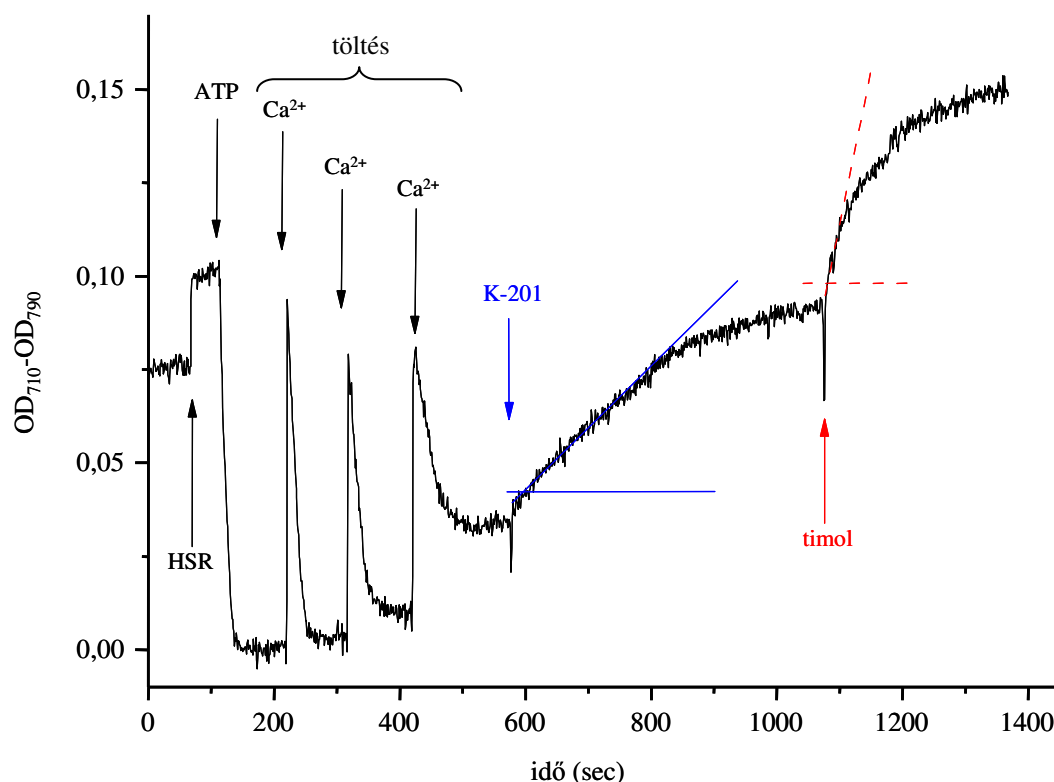
koncentráció-függése hasonló karakterisztikát követ, és a valószínűségek kontroll–PMI RyR vonatkozásban sem különböznek ($p>0,4$; 29. ábra).¹³⁴



31. ábra A K201 hatása az S1 és S2 állapotok előfordulási valószínűségére 50 µM K201 koncentrációig a szubkonduktív állapotok valószínűsége nő, majd csökken, mert 50 µM K201-koncentráció felett a zárt állapotok aránya az S állapotok rovására nő. Az üres szimbólumok a kontroll-, a teli szimbólumok a PMI-RyR adatait jelölik. Az egyes állapotok valószínűségeit ugyanazon áramregisztrátumok felhasználásával számoltuk, mint azt a 29. ábra értékeinél tettük.

Single channel eredményeinket HSR vezikulán végzett kísérleteink is megerősítették. A HSR vezikulák feltöltése ATP jelenlétében, az SR Ca^{2+} pumpa aktivitásának kihasználásával, Ca^{2+} törzsoldat több részletben történő adagolásával történt. Az extravezikuláris tér Ca^{2+} -koncentrációjának változásait APIII Ca^{2+} -indikátor segítségével követtük. A vezikula feltöltése után a Ca^{2+} -koncentráció stabil. A SERCA aktivitása az alacsony Ca^{2+} -koncentráció miatt csekély, de egyensúlyban van a RyR-en keresztüli minimális csurgással.

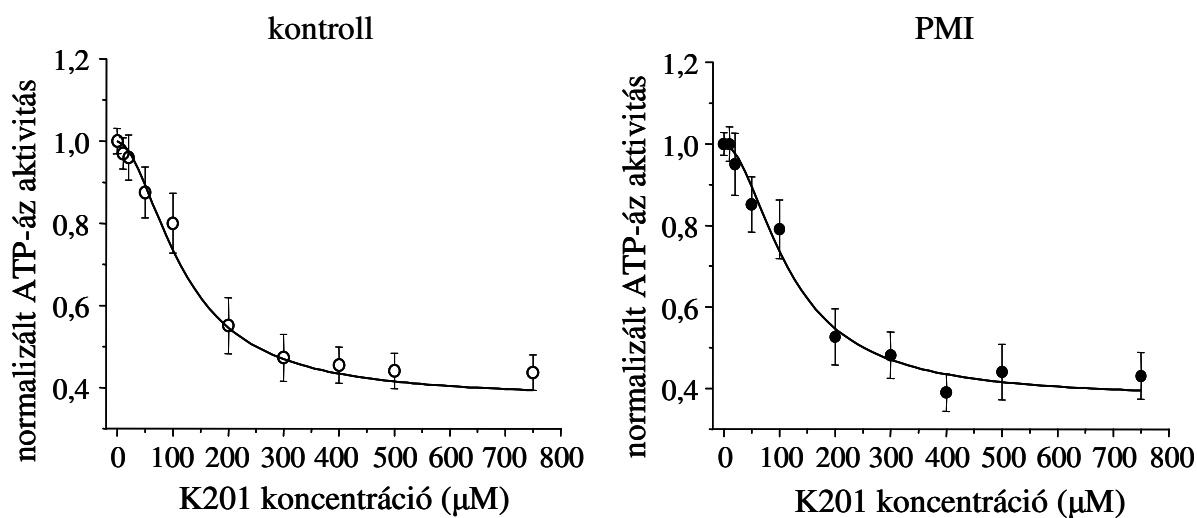
10 μM K201 hatására az extravezikuláris Ca^{2+} -koncentráció egyértelmű növekedését tapasztaltuk, ami bizonyára a RyR permeabilitás-fokozódásának eredménye, nem pedig a SERCA gátlásáé, mivel a vegyület ilyen koncentrációban nem gátolja a SERCA-t (3.2.2., 33. ábra), de szubkonduktancia-állapotokat már sikeresen vált ki. A Ca^{2+} -felszabadulás sebességét a görbe meredeksége jellemzi. Ennek könnyebb becslése érdekében a kísérlet végén 500 μM timollal maximális mértékű Ca^{2+} -felszabadulást váltottunk ki (32. ábra). Kísérleteink azt bizonyítják, hogy az S1 és az S2 a csatorna Ca^{2+} -permeabilis állapotai (a single channel mérésekben a töltéshordozó a K^+).¹³⁴



32. ábra A K201 hatása aktívan töltött HSR-vezikulákra Méréseink során az extravezikuláris Ca^{2+} -koncentrációt Ca^{2+} -indikátor segítségével követtük. A HSR vezikulákat ATP és Ca^{2+} jelenlétében, a SERCA segítségével töltöttük fel, majd a küvetába 10 μM K201-et mértünk. Ekkor a HSR-vezikulákból történő Ca^{2+} felszabadulás miatt az egyenes meredeksége nőtt. A kísérlet végén timollal további Ca^{2+} -felszabadulást váltottunk ki.

3.2.2. A K201 hatása az SR Ca^{2+} -pumpájára

A K201 SERCA-ra gyakorolt hatását kontroll és PMI-patkányokból preparált LSR vezikulákon kapcsolt enzim assay-vel végeztük az Anyagok és módszerek fejezetben kifejtett módon. Kísérleteink a K201 enyhe gátló hatását mutatták ki, de a kontroll és a beteg állatokból származó gátlás közötti különbség statisztikailag nem szignifikáns ($\text{IC}_{50_{\text{kontroll}}} = 118,5 \pm 20,9 \mu\text{M}$, $n_{\text{Hill}} = 1,84 \pm 0,48$ és $\text{IC}_{50_{\text{PMI}}} = 121,5 \pm 17,5 \mu\text{M}$, $n_{\text{Hill}} = 1,97 \pm 0,24$, $p > 0,4$).¹³⁴



33. ábra A K201 hatása a SERCA működésére

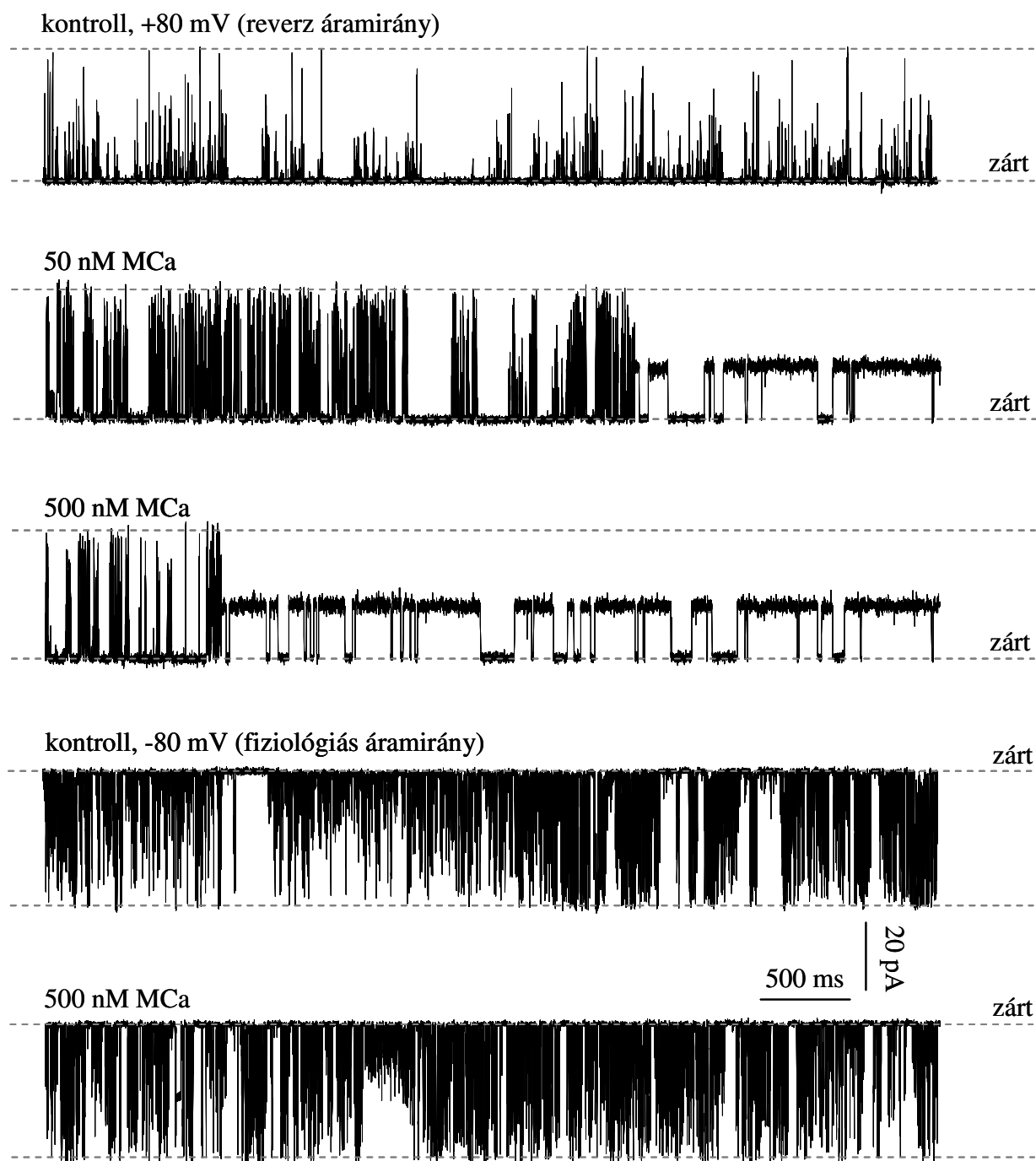
3.3. A maurocalcine (MCA) hatása a szívizom típusú RyR-ra

Munkám másik felében a maurokalcin (MCA) szívizom típusú rianodin receptorra gyakorolt hatását vizsgáltam. RyR1-en végzett kísérleteink mintájára RyR2-n végzett vizsgálatainkban is 50 nM 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 (20/a/i ábra). A peptid már nanomólos (5 nM feletti) koncentráció-tartományban módosítja a csatorna kapuzását: nő a RyR P_o -ja ($P_{o \text{ kontroll}}=0,034\pm0,014$ és $P_{o \text{ 500 nM MCA}}=0,068\pm0,023$), és megjelennek a csatorna már korábbról 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 jelentkezik, amit a 34. ábra reprezentatív áramregisztrátuma szemléltet.

Munkám során az LLSS kvantitatív elemzését is elvégeztem, melynek eredményét a 4. táblázatban foglaltam össze. A táblázatból kiderül, hogy 50 nM MCA-koncentrációnál az LLSS átlagos hossza $192,7\pm14,7$ ms és megjelenési gyakorisága $136,3\pm53,2$ db/perc.¹⁴³ A maurocalcine RyR1-re és RyR2-re gyakorolt hatásának részletes összehasonlítását a Megbeszélés fejezetben teszem meg.

P_o		
MCA koncentráció (nM)	Fiziológiás áramirány	reverz áramirány
0	$0,034\pm0,014$	$0,007\pm0,005$
50	$0,061\pm0,021$	$0,009\pm0,003$
500	$0,068\pm0,023$	$0,010\pm0,008$
LLSS szám/perc		
MCA koncentráció (nM)		
0	0	0
50	0	$136,3\pm53,2$
átlagos LLSS hossz (ms)		
MCA koncentráció (nM)		
0	nincs LLSS	nincs LLSS
50	nem mérhető	$192,7\pm14,7$
500	nem mérhető	$217,7\pm67,2$

4. táblázat A MCA hatásának kvantitatív analízise A MCA növeli a csatorna nyitvatartási valószínűségét és ~200 ms-os átlagos időtartamú LLSS-eket okoz ~136/perc frekvenciával.



34. ábra A MCa RyR2-re gyakorolt hatása A MCa pozitív membránpotenciálnál a RyR2 hosszantartó szubkonduktív állapotait (LLSS) indukálja, melyeket gyakran hosszú zárt állapotok szakítanak meg. Negatív membránpotenciálnál (az 500 nM MCa-koncentrációnál látható egészen rövid eseménytől eltekintve) LLSS nem fordul elő, ami egyértelműen elektrosztatikus kölcsönhatásra utal.

4. MEGBESZÉLÉS

4.1. A RyR1 funkcionális változásai PMI állatmodellen

Az elégtelen szív működés – és a legjellemzőbb tüneteként jelentkező vázizomgyengeség és fáradékonyság – háttérében álló okokként a legtöbb közlemény számos morfológiai- és metabolikus elváltozást jelöl meg. A krónikus szívelégtelenségben kialakuló vázizomgyengeség legkézenfekvőbb magyarázata 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 csúcscélt ér el (a plazma laktát-szintje összefüggésbe hozható a fáradással). Számos közlemény számol be arról, hogy az I-es típusú, oxidatív, kevésbé „fáradékony” izomrosttípus aránya a II-es típusú, glikolitikus, „fáradékony” rostokhoz képest krónikus szívelégtelenségben csökken. 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 enyhíti.¹⁰⁶⁻¹⁰⁹ Az ellentmondások miatt a szakirodalom az utóbbi időben az SR transzport-mechanizmusainak másodlagos károsodását, illetve az intracelluláris Ca^{2+} -háztartás egyensúlyának felborulását feltételezi, amit olyan *in vitro* funkcionális vizsgálatok is alátámasztanak, melyek a vázizom erőtlensége és fáradékonysága mellett azt is kimutatták, hogy az izom lassabban tetanizálható.¹³⁶

A vázizom elektromechanikai kapcsolatának vizsgálatára intézetünkben számos módszer áll rendelkezésre: intakt vázizomrostokon a DHP receptorok feszültségfüggő intramembrán töltésmozgásából származó áram (gating current), és a Ca^{2+} -tranziens mérése, valamint permeabilizált vázizomrostokon 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 posztmiokardiális infarktusos (PMI) állatmodellből származó vázizomrostokon végzett kísérleti eredményei szerint a DHPR intramembrán árama nem tér el

a kontroll állatokból származó rostokon mértéktől, 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.¹³³

A valódi ok az elemi események és a single RyR-channel mérések értékelésekor vált nyilvánvalóvá. A sparkok (szikrák) mellett a szakirodalom az embereket (parazsakat) tekinti elemi Ca^{2+} -felszabadulásról tanúskodó fluoreszcencia-változásoknak, melyek a sparkoktól jóval ritkábban előforduló alacsony amplitúdójú, hosszantartó események.¹¹ 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.¹³³ Az utóbbi adatok teljes összhangban vannak Ward és munkatársai eredményeivel, akik a sparkok fenti morfológiai változásait azzal magyarázzák, hogy krónikus szívelégtelenségben (mely egy fokozott szimpatikus idegrendszeri aktivitással járó állapot) a RyR1 a PKA foszforilációs helyén hiperfoszforilálva van (4-ből 1 helyett több mint 2 alegység foszforilált), és ennek köszönhetően ~45%-kal kevesebb FKBP12-t hordoz, mint az egészséges patkányokból származó csatornák.¹¹¹ Ugyanez a munkacsoport single channel kísérletekben kimutatta a RyR1 FKBP12-mentességére utaló kapuzását: a PMI csatornák P_o -ja a kontrollhoz képest magas, és szubkonduktív-állapotokat mutatnak.^{110, 124}

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+} a RyR egyik legfontosabb szolubilis szabályozó faktora, mely egy nagy affinitású aktiváló kötőhelyen 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 ($>100 \mu\text{M}$) Ca^{2+} -koncentrációk felé kiszélesedett.

Aktiváló ($<100 \mu\text{M}$) Ca^{2+} -koncentrációknál a kontroll és a PMI RyR P_0 -ja nem tér el jelentősen egymástól, azaz az aktiváló kötőhelyek affinitása hasonló. Tehát a PMI csatornák magas Ca^{2+} -koncentrációknál valószínűleg az alacsony affinitású, gátló kötőhely affinitáscsökkenése 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+} -koncentrációnál 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 FKBP12 hiányára utaló szubkonduktív állapotokat nem tapasztaltunk.¹³³

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 a hiperadrenerg állapotnak tekintett krónikus szívelégtelenségben a vázizom típusú RyR hiperfoszforilációja következtében az FKBP12 disszociál a RyR-ról. Az FKBP12-mentes csatornák a triádban szinkronizálatlanul 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.^{111,124,137}

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.¹⁰⁵ Ez utóbbi eredmények megerősítik munkacsoportunk eredményeit, amennyiben elfogadjuk, hogy a modellállatainkból 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 poszttranszlációs módosulásai is számítanak. A RyR működését ugyanis a foszforiláción kívül olyan kovalens poszttranszlációs módosulások is befolyásolják, mint az oxidáció és az *S*-nitroziláció, melyek szabályozó

szerepe hipoxiás körülmények között nyer jelentőséget, mivel a sejt reaktív oxigéngyök- és nitrogén monoxid-termelése ischaemia során emelkedik. Régóta ismert, hogy a RyR ciszteinoaldalláncainak 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 (és talán a kettő összefügg). 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.^{106, 136, 138-140} A magyarázatot ezen kívül az is nehezíti, hogy egyetlen csatorna szintjén nem ismert az FKBP sztchiometriája, 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 Ca^{2+} -koncentrációk (53 mM) csökkentik a RyR FKBP iránti affinitását.¹³⁵ Kísérleteinkben a lumenális Ca^{2+} -koncentráció 50 μM , míg Marks munkatársai 53 mM-t használnak.^{124, 133} Ha ilyen magas Ca^{2+} -koncentráció tényleg gyengíti a hiperfoszforilált RyR egyébként is gyenge FKBP-vel való kölcsönhatását, elképzelhető, hogy ez az ellentmondások forrása, és rianodin receptorainkon az alacsony lumenális Ca^{2+} -koncentráció 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 indukálja, melyek már terápiásnak tekinthető (1 μM) K201-koncentrációnál is megjelennek (5. táblázat). 10 μM feletti koncentrációban gátolja a csatorna P_o -ját, de HSR-vezikulákból Ca^{2+} -t szabadít fel. A K201 SERCA-ra gyakorolt gátló hatásának terápiás jelentősége a magas félgátló koncentráció ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$) miatt valószínűleg kizárható.

	Kontroll	PMI
S2	$14,47 \pm 0,59 \%$	$12,83 \pm 0,39 \%$
S1	$23,84 \pm 0,77 \%$	$22,3 \pm 0,27 \%$
IC 50	$25,1 \pm 2,7 \mu\text{M}$	$22,0 \pm 1,0 \mu\text{M}$
nHill	$1,74 \pm 0,28$	$1,98 \pm 0,17$

5. táblázat A K201 hatását jellemző paraméterek összefoglalása

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 (20/a/i ábra). 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.¹³⁴

A 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 rianodin receptoraihoz sparkmentes állapotban („nyugalomban”), azaz 0 mV transzmembrán potenciálnál nem kötődik a K201, tehát nem is indukál Ca^{2+} -felszabadulást (ennek megfelelően a spontán elemi események frekvenciája nem változik). Azonban a soron következő 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.¹¹ 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 részaránya nő, és az ember ~90 ms-os életideje alatt 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, 1.1.1.2.) 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.¹⁴¹

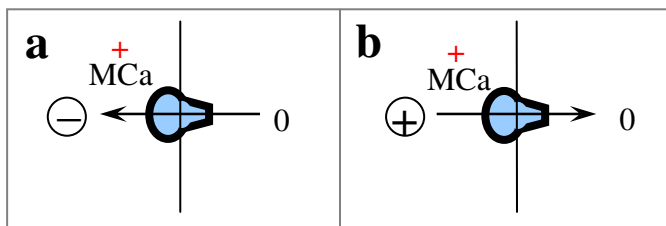
4.3. A M_{Ca} RyR1-re és RyR2-re gyakorolt hatásának összehasonlítása

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.⁹ Erre utal az is, hogy single channel kísérletekben az „A peptid” (1.1.1.) mindkét izoforma aktiválására képes. Ronjat és munkatársai korábban azt is kimutatták, hogy az „A peptid”- és a M_{Ca}-kötőhely a RyR1-en közös,¹⁴² 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.⁷⁸ A M_{Ca} felszínén bizonyos bázikus oldalláncú aminosavak egy kiterjedt töltésfelszín hoznak létre, melynek meghatározó szerepe van a RyR-M_{Ca} közötti

kapcsolat kialakulása szempontjából.⁷⁰⁻⁷⁴ A kapcsolat nagy valószínűséggel elektrosztatikus jellegű, mivel a M_{Ca} pozitív töltésmezőjét kialakító kulcsfontosságú aminosavak töltetlen alaninra történő cseréjével, azaz a töltött mező zsugorodásával a M_{Ca} hatásossága is csökken, az LLSS-ek átlagos hossza rövidül, mert azokat gyakrabban szakítják meg zárt, vagy a megszokott kapuzást mutató szakaszok.⁷⁹ A töltésmező központi aminosavának cseréjével nyert szubsztituens teljesen hatástalan, hiszen a RyR1-hez kötődni sem tud: a „vad” típusú M_{Ca}-t a receptorról leszorítani még nagy feleslegben alkalmazva is képtelen.

Szerzőtársainkkal a M_{Ca} RyR2-re gyakorolt hatását vizsgáltuk, és arra az eredményre jutottunk, hogy a M_{Ca} szívizomból preparált HSR-vezikulákból nem szabadít fel Ca²⁺-t, míg vázizom-HSRV-ből igen, és a M_{Ca} nem serkenti a RyR2 H³ rianodin-kötését, míg a RyR1-ét igen (1.1.). Single channel kísérleteink során azonban azt tapasztaltuk, hogy reverz áramirányt biztosító (a 34. ábrán pozitív) membránpotenciáloknál aktiválja a csatornát, és megjelennek a RyR2 hosszantartó szubkonduktív állapotai is, ami a M_{Ca} 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. (35. ábra.) Ez mind arra utal, hogy a M_{Ca} kötődik ugyan a RyR2-höz, de sokkal kisebb affinitással, mint a RyR1-hez.¹⁴³ Ennek egyik magyarázata az lehet, hogy a RyR2-ben a RyR1-gyel homológ szakaszok valószínűleg csak kisebb erejű elektrosztatikus kölcsönhatást tesznek lehetővé. Ha a M_{Ca} pozitív töltésfelületét mozaikosnak képzeljük el (a mozaik részleteit az egyes aminosav-oldalláncok adják) (15. ábra), a M_{Ca}-kötő zseb töltés és forma szempontjából ennek a mozaikos felületnek a negatívja. Bármelyik oldal aminosavának cseréje a kölcsönhatás gyengüléséhez vezethet, ami a zárt állapotok megjelenésében, és az LLSS-állapotok rövidülésében nyilvánul meg. Ronjat munkacsoportja a RyR-M_{Ca} interakcióját molekuláris biológiai módszerekkel bizonyította. A M_{Ca}-nal kölcsönható RyR1- és RyR2-szegmenseket azonosították, és a két izoforma homológ 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.¹⁴³



35. ábra A MCa hatásának polaritás-függése A MCa hatásának szempontjából egy pozitív töltésű aminosav-oldalláncokból felépülő peptidszakasznak van jelentősége. Az MCa kötődésének single channel kísérletekben tapasztalt extrém feszültségfüggése (illetve polaritásfüggése) is az elektrosztatikus kölcsönhatásnak köszönhető: a RyR1 LLSS állapotai a **b** ábrarészlet által modellezett esetben dominálnak, míg az **a** esetben az LLSS-ek hossza sokkal rövidebb és előfordulási gyakoriságuk alacsonyabb. Ezek alapján a RyR-MCa kapcsolat jellegét erősen elektrosztatikusnak gondoljuk, és a kötőhelyet – a hatás feszültségfüggése miatt – a pórusba képzeljük el. A RyR2-re gyakorolt hatás ettől annyiban különbözik, hogy a **b** ábrarészlet által modellezett esetben az LLSS-ek átlagos hossza rövidebb, mint a RyR1-nél, és fiziológias áramiránynál (**a**) a szukbonduktív állapotok szinte teljesen hiányoznak. A különbségek okai a két RyR-izoforma MCa iránti affinitásának különbségében rejlenek.

A MCa RyR1-re és RyR2-re gyakorolt hatásának kényelmesebb összehasonlíthatósága kedvéért a 4. táblázat 3. oszlopát az 5. táblázatban megismétlem, és kiegészítem a RyR1-en mért korábbi adatainkkal.

P_o		
MCa koncentráció (nM)	RyR2 reverz áramirány	RyR1 reverz áramirány
0	0,007±0,005	0,02±0,007
50	0,009±0,003	0,21±0,016
100	0,011±0,007	0,24±0,021
500	0,010±0,008	0,31±0,047
<i>LLSS szám/perc</i>		
MCa koncentráció (nM)		
0	0	0
50	136,3±53,2	19,7±9,3
<i>átlagos LLSS hossz (ms)</i>		
MCa koncentráció (nM)		
0	nincs LLSS	nincs LLSS
50	192,7±14,7	12037±875
100	186,2±33,5	10236±187
500	217,7±67,2	13371±245

5. táblázat A MCa RyR1-re és RyR2-re gyakorolt hatásának összehasonlítása reverz áramiránynál (35/b ábra)

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. A K201 hatásának jellege és dózisfüggése a beteg állatokból származó RyR-ok tekintetében különbséget nem mutatott.

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.

SUMMARY

In heart failure (HF) exercise intolerance characterized by skeletal muscle weakness and fatigue develops that could not be explained by the reduced muscle perfusion but rather by reduced Ca^{2+} content of the sarcoplasmic reticulum (SR) and the consequent reduction of calcium transients' amplitude, both indicating impaired calcium transport mechanisms. Our aim beside the identification of putative functional Ca^{2+} -release channel (RyR1) changes contributing to the symptoms was to elucidate the effect of a new drug K201 on channel gating. K201 has been suggested as a potential therapeutic agent in HF due to its antiarrhythmogenic action and ability to avoid muscle weakness in HF model animals. For these purpose single RyR1 channels from rats with HF were reconstituted into planar lipid bilayer and the gating behavior was studied under voltage-clamp conditions.

Significant portion of RyRs showed ~50% higher conductance compared to RyRs from control rats and the voltage dependence of the channel conductance was, showing still ohmic but rectifying, polarity dependent conductance. Altered Ca^{2+} -dependency of channel activity was also observed on RyRs from HF afflicted rats, such as reduced sensitivity to calcium dependent inactivation, which can lead to SR depletion.

K201 induced two subconductance states corresponding to approximately 24% (S1) and 13% (S2) of the maximum conductance. Dependence of event frequency and of time spent in S1 and S2 on the drug concentration was biphasic both in control and in PMI rats, with a maximum at 50 μM . At this concentration, the channel spends $26 \pm 4\%$ and $24 \pm 4\%$, respectively, of the total time in these subconductive states at positive potentials, while no subconductances are observed at negative potentials. Taken together K201 action on RyR1 can be interpreted as a definite inhibition.

I also investigated the effect of a 33 amino acid toxin maurocalcine (MCA) on the gating properties of RyR from canine heart. MCA is a suitable research tool of electromechanical coupling because it mimics a DHPR segment responsible for allosteric coupling between DHPR and RyR in skeletal muscle. Our aim was to describe the potential differences of our results obtained on skeletal (RyR1) and cardiac (RyR2) type RyR in the presence of MCA. MCA induced long lived subconductive states (LLSS) of RyR2 channel, just like it did in the case of RyR1 with a slight difference: the duration of LLSSs are shorter and the frequency of LLSSs are higher compared to RyR1, indicating weaker electrostatic forces. These results highlight a different role of the MCA-binding domains in the gating process of RyR1 and RyR2.

6. IRODALOMJEGYZÉK

1. Piccolino M. (1997) Luigi Galvani and animal Electricity: two centuries after the foundation of electrophysiology. *Trends Neurosci.* **20**, 443-448
2. Martonosi A. N. (2000) Animal electricity, Ca^{2+} and muscle contraction. A brief history of muscle research. *Acta. Biochim. Pol.* **47**, 493-516
3. Fonyó A. *Az orvosi élettan tankönyve, Medicina.* 176-193 (2004).
4. Schneider M. F. (1994) Control of calcium release in functioning skeletal muscle fibers. *Annu. Rev. Physiol.* **56**, 463-484
5. Meissner G. (1994) Ryanodine receptor Ca^{2+} release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annu. Rev. Physiol.* **56**, 485-508
6. Fleischer S. (2008) Personal recollections on the diccovery of the ryanodine receptors of muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **369**, 195-207
7. Zucchi R. & Ronca-Testoni, S. (1997) The sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacol. Rev.* **49**, 1-51
8. Fill M. & copello A. J. (2002) Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol. Rev.* **82**, 893-922
9. Franzini-Armstrong C. (2004) Functional implications of RyR-DHPR relationships in skeletal and cardiac muscles *Biol. Res.* **37**, 507-512
10. Protasi F. (2002) Structural interactions between RyRs and DHPRs in calcium release units of cardiac and skeletal muscle cells. *Front. Biosci.* **7**, 650-658
11. Csernoch L. (2007) Sparks and embers of skeletal muscle: the exciting events of contractile activation. *Pflugers. Arch.* **454**, 869-878
12. Klein M. G. & Schneider M. F. (2006) Ca^{2+} sparks in skeletal muscle. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **92**, 308-332
13. Wagenknecht T., Grassucci R., Frank J., Saito A., Inui M. & Fleischer S. (1989) Three-dimensional architecture of the calcium channel/foot structure of sarcoplasmic reticulum. *Nature.* **338**, 167-170
14. Bers D. M. (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* **415**, 198-205
15. Bers D. M. (2002) Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release in intact ventricular myocytes. *Front. Biosci.* **7**, 697-711
16. Cheng H, Wang SQ. (2002) Calcium signaling between sarcolemmal calcium channels and ryanodine receptors in heart cells. *Front. Biosci.* **7**, 867-878
17. Stern M. D., Pizarro G. & Ríos E. (1997) Local control model of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* **110**, 415-440
18. Wier W. G., Egan T. M., López-López J. R. & Balke C. W. (1994) Local control of excitation-contraction coupling in rat heart cells. *J. Physiol.* **474**, 463-471
19. Näbauer M., Callewaert G., Cleemann L. & Morad M. (1989) Regulation of calcium release is gated by calcium current, not gating charge, in cardiac myocytes. *Science.* **244**, 800-803
20. Cheng H., Lederer W. J. & Cannell M. B. (1993) Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science.* **262**, 740-744
21. López-López J. R., Shacklock P. S., Balke C. W. & Wier W. G. (1995) Local calcium transients triggered by single L-type calcium channel currents in cardiac cells. *Science.* **268**, 1042-1045
22. Sham J. S., Cleemann L. & Morad M. (1995) Functional coupling of Ca^{2+} channels and ryanodine receptors in cardiac myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 121-125
23. Niggli E. (1999) Ca^{2+} Sparks in Cardiac Muscle: Is There Life Without Them? *News. Physiol. Sci.* **14**, 129-134
24. Niggli E. & Lederer W. J. (1990) Voltage-independent calcium release in heart muscle. *Science.* **250**, 565-568
25. Isenberg G. & Han S. (1994) Gradation of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release by voltage-clamp pulse duration in potentiated guinea-pig ventricular myocytes. *J. Physiol.* **480**, 423-438

26. Cannell M. B. & Soeller C. (1999) Mechanisms underlying calcium sparks in cardiac muscle. *J. Gen. Physiol.* **113**, 373-376
27. Shorofsky S. R., Izu L., Wier W. G. & Balke C. W. (1998) Ca^{2+} sparks triggered by patch depolarization in rat heart cells. *Circ. Res.* **82**, 424-429
28. Katoh H., Schlotthauer K. & Bers D. M. (2000) Transmission of information from cardiac dihydropyridine receptor to ryanodine receptor: evidence from BayK 8644 effects on resting Ca^{2+} sparks. *Circ. Res.* **87**, 106-111
29. Sagawa T., Nishio M., Sagawa K., Kelly J. E., Lokuta A. J., Tsai J., Kan E. & Wasserstrom J. A. (2001) Activation of purified cardiac ryanodine receptors by dihydropyridine agonists. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **280**, 1201-1207
30. Fill M. (2003) Mechanisms that turn-off intracellular calcium release channels. *Front. Biosci.* **8**, 46-54
31. Zahradnikova A., Dura M. & Györke S. (1999) Modal gating transitions in cardiac ryanodine receptors during increases of Ca^{2+} concentration produced by photolysis of caged Ca^{2+} . *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **438**, 283-288
32. Zahradnikova A. & Zahradnik I. (1996) A minimal gating model for the cardiac calcium release channel. *Biophys. J.* **71**, 2996-3012
33. Györke S. & Fill M. (1993) Ryanodine receptor adaptation: control mechanism of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in heart. *Science* **260**, 807-809
34. Lamb G. D., Laver, D. R. & Stephenson, D. G. (2000) Questions about adaptation in ryanodine receptors. *J. Gen. Physiol.* **116**, 883-890
35. Schiefer A., Meissner G. & Isenberg, G. (1995) Ca^{2+} activation and Ca^{2+} inactivation of canine reconstituted cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -release channels. *J. Physiol.* **489**, 337-348
36. Stern M. D., Song L. S., Cheng H., Sham J. S. K., Tian Yang H., Boheler K. R. & Rios, E. (1999) Local control models of cardiac excitation-contraction coupling. *J. Gen. Physiol.* **113**, 469-489
37. Laver D. R. & Lamb G. D. (1998) Inactivation of Ca^{2+} release channels (ryanodine receptors RyR1 and RyR2) with rapid steps in $[\text{Ca}^{2+}]$ and voltage. *Biophys. J.* **74**, 2352-2364
38. Saftenku E., Williams A. J. & Sitsapasan R. (2001) Markovian models of low and high activity levels of cardiac ryanodine receptors. *Biophys. J.* **80**, 2727-2741
39. Melzer W., Herrmann-Frank A. & Lüttgau H. Ch. (1995) The role of Ca^{2+} ions in excitation-contraction coupling of skeletal muscle fibers. *Biochim. Biophys. Acta.* **1241**, 59-116
40. Wagenknecht T. & Samsó M. (2002) Three-dimensional reconstitution of ryanodine receptors. *Front. Biosci.* **7**, 1464-1474
41. Williams A. J., West D. J. & Sitsapasan R. (2001) Light at the end of the Ca^{2+} -release channel tunnel: structures and mechanisms involved in ion translocation in ryanodine receptor channels. *Quart. Rev. Biophys.* **34**, 61-104
42. Zhao, M., Li P., Li, X., Zhang, L., Winkfein, R. J. & Cheng, W. (1999) Molecular identification of the ryanodine receptor pore-forming segment. *J. Biol. Chem.* **274**, 25971-25974
43. Lindsay A. R. G. & Williams A. J. (1991) Functional characterisation of the ryanodine receptor purified from sheep cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta.* **1064**, 89-102
44. Lindsay A. R. G., Manning S. D. & Williams A. J. (1991) Monovalent cation conductance in ryanodine receptor-channel of sheep cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Physiol.* **439**, 463-480
45. Tinker A. & Williams A. J. (1992) Divalent cation conduction in the ryanodine receptor channel of sheep cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Gen. Physiol.* **100**, 479-493
46. Tinker A., Lindsay A. R. G. & Williams A. J. (1992) A model for ionic conduction in the ryanodine receptor channel of sheep cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Gen. Physiol.* **100**, 495-517
47. Smith J. S., Imagawa T., Ma J., Fill M., Campbell K. P. & Coronado R. (1988) Purified ryanodine receptor from rabbit skeletal muscle is the calcium-release channel of sarcoplasmic reticulum. *J. Gen. Physiol.* **92**, 1-26
48. Williams A. J. (2002) Ion conduction and selectivity in the ryanodine receptor channel (2002) *Front. Biosci.* **7**, 223-230

49. Tinker A. & Williams A. J. (1993) Charged local anesthetics block ionic conduction in the sheep cardiac sarcoplasmic reticulum calcium release channel. *Biophys. J.* **65**, 852-864
50. Mead F. & Williams A. J. (2002) Block of the ryanodine receptor channel by neomycin is relieved at high holding potentials. *Biophys. J.* **82**, 1953-1963
51. Murayama T. & Ogawa Y. (2002) Roles of two ryanodine receptor isoforms coexisting in skeletal muscle. *Trends Cardiovasc Med.* **12**, 305-311
52. Ríos E. & Zhou J. (2004) Control of dual isoforms of Ca^{2+} release channels in muscle. *Biol. Res.* **37**, 583-591
53. Murayama T. & Ogawa Y. (1996) Properties of Ryr3 ryanodine receptor isoform in mammalian brain. *J. Biol. Chem.* **271**, 5079-5084
54. Fessenden J. D., Wang Y., Moore R. A., Chen W. S. R., Allen P. D. & Pessah I. N. (2000) Divergent functional properties of ryanodine receptor types 1 and 3 expressed in a myogenic cell line. *Biophys. J.* **79**, 2509-2525
55. Hamilton S. L. (2005) Ryanodine receptors. *Cell Calcium* **38**, 253-260
56. Rossi D. & Sorrentino V. (2002) Molecular genetics of ryanodine receptors Ca^{2+} -release channels. *Cell Calcium* **32**, 307-319
57. Zhang J., Liu Z., Masumiya H., Wang R., Jiang D., Li F., Wagenknecht T. & Chen S. R. (2003) Three-dimensional localization of divergent region 3 of the ryanodine receptor to the clamp-shaped structures adjacent to the FKBP binding sites. *J. Biol. Chem.* **278**, 14211-14218
58. Kimura T., Pace S. M., Wei L., Beard N. A., Dirksen R. T. & Dulhunty A. F. (2007) A variably spliced region in the type 1 ryanodine receptor may participate in an inter-domain interaction. *Biochem J.* **401**, 317-324
59. Dulhunty A. F., Beard N. A., Pouliquin P. & Kimura T. (2006) Novel regulators of RyR Ca^{2+} release channels: insight into molecular changes in genetically-linked myopathies. *J. Muscle. Cell. Motil.* **27**, 351-365
60. Sárközi S., Szegedi C., Szentesi P., Csernoch L., Kovács L. & Jóna I. (2000) Regulation of the rat sarcoplasmic reticulum calcium release channel by calcium. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **21**, 131-138
61. Laver D. R. (2005) Coupled calcium release channels and their regulation by luminal and cytosolic ions. *Eur. Biophys. J.* **34**, 359-68
62. Jóna I., Szegedi C., Sárközi S., Szentesi P., Csernoch L. & Kovács L. (2001) Altered inhibition of the rat skeletal ryanodine receptor/calcium release channel by magnesium in the presence of ATP. *Pflugers Arch.* **441**, 729-738
63. Mackrill J. J. (1999) Protein- protein interactions in intracellular Ca^{2+} -release channel function. *Biochem. J.* **337**, 345-361
64. McPherson P. S. & Campbell K. P. (1993) The ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channel. *J. Biol. Chem.* **268**, 13765-13768
65. Tanabe T., Beam K. G., Adams B. A., Niidome T. & Numa S. (1990) Regions of the skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation-contraction coupling. *Nature.* **346**, 567-569
66. Takekura H., Paolini C., Franzini-Armstrong C., Kugler G., Grabner M. & Flucher B. E. (2004) Differential contribution of skeletal and cardiac II-III loop sequences to the assembly of dihydropyridine-receptor arrays in skeletal muscle. *Mol. Biol. Cell.* **15**, 5408-5419
67. Lu X., Xu L. & Meissner G. (1994) Activation of the skeletal muscle calcium release channel by a cytoplasmic loop of the dihydropyridine receptor. *J. Biol. Chem.* **269**, 6511-6516
68. Yamamoto T., Rodriguez J. & Ikemoto N. (2002) Ca^{2+} -dependent dual functions of peptide C. *J. Biol. Chem.* **277**, 993-1001
69. Stange M., Tripathy A. & Meissner G. (2001) Two domains in dihydropyridine receptor activate the skeletal muscle Ca^{2+} release channel. *Biophys. J.* **81**, 1419-1429
70. Bannister M. L., Williams A. J. & Sitsapesan R. (2004) Removal of clustered positive charge from dihydropyridine receptor II-III loop peptide augments activation of ryanodine receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **314**, 667-674

71. Casarotto M. G., Gibson F., Pace S. M., Curtis S. M., Mulcair M. & Dulhunty A. F. (2000) A structural requirement for activation of skeletal ryanodine receptors by peptides of the dihydropyridine receptor II-III loop. *J. Biol. Chem.* **275**, 11631-11637
72. Casarotto M. G., Green D., Pace S. M., Curtis S. M. & Dulhunty A. F. (2001) Structural determinants for activation or inhibition of ryanodine receptors by basic residues in the dihydropyridine receptor II-III loop. *Biophys. J.* **80**, 2715-2726
73. Lee C. W., Lee E. H., Takeuchi K., Takahashi H., Shimada I., Sato K., Shin S. Y., Kim D. H. & Kim J. (2004) Molecular basis of the high-affinity activation of type 1 ryanodine receptors by imperatoxin A. *Biochem. J.* **377**, 385-394
74. Green D., Pace S., Curtis S., M., Sakowska M., Lamb G. D., Dulhunty A. F. & Casarotto M. G. (2003) The three dimensional structural surface of two β -sheet scorpion toxins mimics that of an α -helical dihydropyridine receptor segment. *Biochem. J.* **370**, 517-527
75. Tripathy A., Resch W., Xu L., Valdivia H. H. & Meissner G. (1998) Imperatoxin A induces subconductance states in Ca^{2+} release channels (ryanodine receptors) of cardiac and skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* **111**, 679-90
76. Chen L., Estève E., Sabatier J. M., Waard M. D., Allen P. D. & Pessah I. N. (2003) Maurocalcine and peptide A stabilize distinct subconductance states of ryanodine receptor type 1, revealing a proportional gating mechanism. *J. Biol. Chem.* **278**, 16095-16106
77. Fajloun Z., Kharrat R., Chen L., Lecomte C., Di Luccio E., Bichet D., El Ayeb M., Rochat H., Allen P. D., Pessah I. N., Waard D. M. & Sabatier J. M. (2000) Chemical synthesis and characterisation of maurocalcine, a scorpion toxin that activates Ca^{2+} release channel/ryanodine receptors. *FEBS Letters* **469**, 179-185
78. Estève E., Smida-Rezgui S., Sarkozi S., Szegedi C., Regaya I., Chen L., Altafaj X., Rochat H., Allen P., Pessah I. N., Marty I., Sabatier J. M., Jona I., Waard D. M. & Ronjat M. (2003) Critical amino acid residues determine the binding affinity and the Ca^{2+} release efficacy of maurocalcine in skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 37822-37831
79. 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
80. Brillantes A. B., Ondrias K., Scott A., Kobrinsky E., Ondriasová E., Moschella M. C., Jayaraman T., Landers M., Ehrlich B. E. & Marks A. R. (1994) Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell.* **77**, 513-523
81. Marx S. O., Gaburjakova J., Gaburjakova M., Henrikson C., Ondrias K. & Marks A. R. (2001) Coupled gating between cardiac calcium release channels (ryanodine receptors). *Circ. Res.* **88**, 1151-1158
82. Chelu M. G., Danila C. I., Gilman C. P. & Hamilton S. L. (2004) Regulation of ryanodine receptors by FK506 binding proteins. *Trends. Cardiovasc. Med.* **14**, 227-234
83. O'Reilly F. M., Robert M., Jona I., Szegedi C., Albrieux M., Geib S., De Waard M., Villaz M. & Ronjat M. (2002) FKBP12 modulation of the binding of the skeletal ryanodine receptor onto the II-III loop of the dihydropyridine receptor. *Biophys. J.* **82**, 145-55
84. Ching L. L., Williams A. J. & Sitsapesan R. (2000) Evidence for Ca^{2+} activation and inactivation sites on the luminal side of the cardiac ryanodine receptor complex. *Circ. Res.* **87**, 201-206
85. Herrmann-Frank A. & Lehmann-Horn F. (1996) Regulation of the purified Ca^{2+} release channel/ryanodine receptor complex of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by luminal calcium. *Pflugers Arch.* **432**, 155-157
86. Györke I., Hester N., Jones L. R. & Györke S. (2004) The role of calsequestrin, triadin, and junctin in conferring cardiac ryanodine receptor responsiveness to luminal calcium. *Biophys. J.* **86**, 2121-2128
87. Beard N. A., Laver D. R. & Dulhunty A. F. (2004) Calsequestrin and the calcium release channel of skeletal and cardiac muscle. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **85**, 33-69
88. Beard N. A., Casarotto M. G., Wei L., Varsányi M., Laver D. R. & Dulhunty A. F. (2005) Regulation of ryanodine receptors by calsequestrin: effect of high luminal Ca^{2+} and phosphorylation. *Biophys. J.* **88**, 3444-3454
89. Wei L., Varsányi M., Dulhunty A.F. & Beard N.A. (2006) The conformation of calsequestrin determines its ability to regulate skeletal ryanodine receptors. *Biophys. J.* **91**, 1288-1301

90. Herzog A., Szegedi C., Jona I., Herberg F. W. & Varsanyi M. (2000) Surface plasmon resonance studies prove the interaction of skeletal muscle sarcoplasmic reticular Ca^{2+} release channel/ryanodine receptor with calsequestrin. *FEBS Lett.* **472**, 73-77
91. Szegedi C., Sárközi S., Herzog A., Jóna I. & Varsányi M. (1999) Calsequestrin: more than 'only' a luminal Ca^{2+} buffer inside the sarcoplasmic reticulum. *Biochem. J.* **337**, 19-22
92. Beard N. A., Wei L., Cheung S. N., Kimura T., Varsányi M. & Dulhunty A.F. (2008) Phosphorylation of skeletal muscle calsequestrin enhances its Ca^{2+} binding capacity and promotes its association with junctin. *Cell Calcium* **44**, 363-373
93. Scoote M. & Williams A. J. (2002) The cardiac ryanodine receptor (calcium release channel): emerging role in heart failure and arrhythmia pathogenesis. *Cardiovasc. Res.* **56**, 359-372
94. Dulhunty A. F., Beard N. A., Pouliquin P. & Casarotto M. G. (2007) Agonists and antagonists of the cardiac ryanodine receptor: potential therapeutic agents? *Pharmacol. Ther.* **113**, 247-263
95. Bénitah J. P., Kerfant B. G., Vassort G., Richard S. & Gómez A. M. (2002) Altered communication between L-type calcium channels and ryanodine receptors in heart failure. *Front. Biosci.* **7**, 263-275
96. Bers D. M. (2004) Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **37**, 417-429
97. Meissner G. (2002) Regulation of mammalian ryanodine receptors. *Front. Biosci.* **7**, 2072-2080
98. Guo T., Zhang T., Mestrlil R. & Bers D. M. (2006) Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation of ryanodine receptor does affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes. *Circ. Res.* **99**, 398-406
99. Marks A. R., Reiken S. & Marx S. O. (2002) Progression of heart failure: is protein kinase A hyperphosphorylation of the ryanodine receptor a contributing factor? *Circulation.* **105**, 272-275
100. Reiken S., Gaburjakova M., Guatimosim S., Gomez A. M., D'Armiento J., Burkhoff D., Wang J., Vassort G., Lederer W. J. & Marks A. R. (2003) Protein kinase A phosphorylation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) in normal and failing hearts. Role of phosphatases and response to isoproterenol. *J. Biol. Chem.* **278**, 444-453
101. Marx S. O., Reiken S., Hisamatsu Y., Jayaraman T., Burkhoff D., Rosemblyt N. & Marks A. R. (2000) PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell.* **101**, 365-376
102. Huang F., Shan J., Reiken S., Wehrens X. H. & Marks A. R. (2005) Analysis of calstabin2 (FKBP12.6)-ryanodine receptor interactions: rescue of heart failure by calstabin2 in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**, 3456-3461
103. Hasenfuss G. & Seidler T. (2003) Treatment of heart failure through stabilization of the cardiac ryanodine receptor. *Circulation.* **107**, 378-380
104. Bers D. M. (2002) Calcium and cardiac rhythms: physiological and pathophysiological. *Circ. Res.* **90**, 14-17
105. Carter S., Colyer J. & Sitsapesan R. (2006) Maximum phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor at serine-2809 by protein kinase a produces unique modifications to channel gating and conductance not observed at lower levels of phosphorylation. *Circ. Res.* **98**, 1506-1513
106. Bellinger A. M., Mongillo M. & Marks A.R. (2008) Stressed out: the skeletal muscle ryanodine receptor as a target of stress. *J. Clin. Invest.* **118**, 445-453
107. Witte K. K. & Clark A. L. (2007) Why does chronic heart failure cause breathlessness and fatigue? *Prog. Cardiovasc. Dis.* **49**, 366-384
108. Duscha B. D., Schulze P. C., Robbins J. L. & Forman D. E. (2008) Implications of chronic heart failure on peripheral vasculature and skeletal muscle before and after exercise training. *Heart Fail. Rev.* **13**, 21-37
109. Adams V., Doring C. & Schuler G. (2008) Impact of physical exercise on alterations in the skeletal muscle in patients with chronic heart failure. *Front. Biosci.* **13**, 302-311
110. Reiken S., Lacampagne A., Zhou H., Kherani A., Lehnart S. E., Ward C., Huang F., Gaburjakova M., Gaburjakova J., Rosemblyt N., Warren M. S., He K. L., Yi G. H., Wang J., Burkhoff D., Vassort G. & Marks A. R. (2003) PKA phosphorylation activates the calcium release channel (ryanodine receptor) in skeletal muscle: defective regulation in heart failure. *J. Cell. Biol.* **160**, 919-928
111. Ward C. W., Reiken S., Marks A. R., Marty I., Vassort G. & Lacampagne A. (2003) Defects in ryanodine receptor calcium release in skeletal muscle from post-myocardial infarct rats. *FASEB J.* **17**, 1517-1519

- 112.Sárközi S., Almássy J., Lukács B., Dobrosi N., Nagy G. & Jóna I. (2007) Effect of natural phenol derivatives on skeletal type sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and ryanodine receptor. *J. Muscle. Res. Cell. Motil.* **28**, 167-74
- 113.Szentandrassy N. (2003) Timol hatásának vizsgálata szívizmon és vázizmon. Egyetemi doktori értekezés. *Debreceni Egyetem, ÁOK, Élettani Intézet*
- 114.Treves S., Jungbluth H., Muntoni F. & Zorzato F. (2008) Congenital muscle disorders with cores: the ryanodine receptor calcium channel paradigm. *Curr. Opin. Pharmacol.* **8**, 319-326
- 115.Dirksen R. T. & Avila G. (2004) Distinct effects on Ca^{2+} handling caused by malignant hyperthermia and central core disease mutations in RyR1. *Biophys J.* **87**, 3193-31204
- 116.Yamamoto T., El-Hayek R. & Ikemoto N. (2000) Postulated role of interdomain interaction within the ryanodine receptor in Ca^{2+} channel regulation. *J. Biol. Chem.* **275**, 11618-11625
- 117.Ogawa Y. (2008) Distinct mechanisms for dysfunctions of mutated ryanodine receptor isoforms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **369**, 208-212
- 118.Yano M., Ikeda Y. & Matsuzaki M. (2005) Altered intracellular Ca^{2+} handling in heart failure. *J. Clin. Invest.* **115**, 556-564
- 119.Jóna I. & Nánási P. P. (2006) Cardiomyopathies and sudden cardiac death caused by RyR2 mutations: are the channels the beginning and the end? *Cardiovasc. Res.* **71**, 416-418
120. Chelu M. G. & Wehrens X. H. (2007) Sarcoplasmic reticulum calcium leak and cardiac arrhythmias. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 952-956
- 121.Wehrens X. H., Lehnart S. E., Huang F., Vest J. A., Reiken S. R., Mohler P.J., Sun J., Guatimosim S., Song L. S., Rosemblyt N., D'Armiento J. M., Napolitano C., Memmi M., Priori S. G., Lederer W. J. & Marks A. R. (2003) FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell.* **113**, 829-840
- 122.Wehrens X. H., Lehnart S. E., Reiken S. R., Deng S. X., Vest J. A., Cervantes D., Coromilas J., Landry D. W. & Marks A. R. (2004) Protection from cardiac arrhythmia through ryanodine receptor-stabilizing protein calstabin2. *Science.* **304**, 292-296.
- 123.Lehnart S. E., Terrenoire C., Reiken S., Wehrens X. H., Song L. S., Tillman E. J., Mancarella S., Coromilas J., Lederer W. J., Kass R. S. & Marks A.R. (2006) Stabilization of cardiac ryanodine receptor prevents intracellular calcium leak and arrhythmias. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 7906-7910
- 124.Wehrens X. H., Lehnart S. E., Reiken S., van der Nagel R., Morales R., Sun J., Cheng Z., Deng S. X., de Windt L. J., Landry D. W. & Marks A. R. (2005) Enhancing calstabin binding to ryanodine receptors improves cardiac and skeletal muscle function in heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 9607-9612
125. Yano M., Yamamoto T., Ikeda Y. & Matsuzaki M. (2005) Mechanisms of Disease: ryanodine receptor defects in heart failure and fatal arrhythmia. *Nature. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* **3**, 43-52
- 126.Yano M., Kobayashi S., Kohno M., Doi M., Tokuhisa T., Okuda S., Suetsugu M., Hisaoka T., Obayashi M., Ohkusa T., Kohno M. & Matsuzaki M. (2003) FKBP12.6-mediated stabilization of calcium-release channel (ryanodine receptor) as a novel therapeutic strategy against heart failure. *Circulation.* **107**, 477-484
- 127.Martonosi A. N. & Pikula S. (2003) The structure of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Acta Biochim. Pol.* **50**, 337-365
- 128.Martonosi A. N. & Pikula S. (2003) The network of calcium regulation in muscle. *Acta Biochim. Pol.* **50**, 1-30
- 129.Carafoli E. (2003) The calcium-signalling saga: tap water and protein crystals *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 326-332
- 130.Cannell M. B., Cheng H. & Lederer W. J. (1995) The control of calcium release in heart muscle. *Science.* **268**, 1045-1049
- 131.Miller C. (szerk.) (1986) Ion channel reconstitution. *Plenum press, New York*
- 132.Lai F. A., Erickson H. P., Rousseau E., Liu Q. Y. & Meissner G. (1988) Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature.* **331**, 315-319
- 133.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**, 541-453

134. Almassy J., Sztretye M., Lukacs B., Dienes B., Szabo L., Szentesi P., Vassort G., Csernoch L. & Jona I. (2008) Effects of K-201 on the calcium pump and calcium release channel of rat skeletal muscle. *Pflugers. Arch.* **457**, 171-183
135. Gaburjakova J. & Gaburjakova M. (2008) Effect of luminal Ca^{2+} on the stability of coupled gating between ryanodine receptors from the rat heart. *Acta Physiol. (Oxf.)* **193**, 219-227
136. Zissimopoulos S., Docrat N. & Lai F. A. (2007) Redox sensitivity of the ryanodine receptor interaction with FK506-binding protein. *J. Biol. Chem.* **282**, 6976-6983
137. Marx S. O., Ondrias K. & Marks A.R. (1998) Coupled gating between individual skeletal muscle Ca^{2+} release channels (ryanodine receptors). *Science*. **281**, 818-821
138. Meissner G. (2004) Molecular regulation of cardiac ryanodine receptor ion channel. *Cell Calcium*. **35**, 621-628
139. Xu L., Eu J. P., Meissner G. & Stamler J. S. (1998) Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science*. **279**, 234-237
140. Bellinger A. M., Reiken S., Dura M., Murphy P. W., Deng S. X., Landry D. W., Nieman D., Lehnart S. E., Samaru M., LaCampagne A. & Marks A. R. (2008) Remodeling of ryanodine receptor complex causes "leaky" channels: a molecular mechanism for decreased exercise capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **105**, 2198-2202
141. Hunt D. J., Jones P. P., Wang R., Chen W., Bolstad J., Chen K., Shimoni Y. & Chen S. R. (2007) *Biochem. J.* **404**, 431-438
142. Altafaj X., Cheng W., Estève E., Urbani J., Grunwald D., Sabatier J. M., Coronado R., De Waard M. & Ronjat M. (2005) Maurocalcine and domain A of the II-III loop of the dihydropyridine receptor Cav 1.1 subunit share common binding sites on the skeletal ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.* **280**, 4013-4016
143. 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
144. Zhang T. & Brown J. H. (2004) Role of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc. Res.* **63**, 476-486

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.

7. FÜGGELÉK

Az értekezést megalapozó közlemények gyűjteménye