

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

Lukács Balázs



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

DEBRECEN, 2008

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

Lukács Balázs

Témavezető:
Dr. Jóna István, tudományos tanácsadó



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

DEBRECEN, 2008

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	i
Rövidítések jegyzéke	iii
1. Bevezetés	1
2. Irodalmi áttekintés	2
2.1. A kontrakció-relaxáció ciklus	2
2.2. A kalcium csatorna (RyR)	6
2.2.1. RyR1	6
2.2.2. RyR2	8
2.2.3. RyR3	9
2.2.4. RyR α/β	10
2.3. A RyR vezérlése	10
2.3.1. DHPR szerepe	10
2.3.2. Az A-peptid hatása	13
2.3.3. Az IpTx _a hatása	14
2.3.4. A maurokalcin hatása	16
2.4. A kalcium csatorna endogén modulációja	19
2.4.1. Divalent ionok	19
2.4.2. Adenin nukleotidok	20
2.4.3. Kalszekvesztrin	21
2.4.4. FK-506 kötő fehérje	23
2.4.5. Triadin és junctin	24
2.4.6. Kalmodulin	24
2.4.7. Foszforiláció, defoszforiláció	25
2.5. A csatorna exogén modulációja	25
2.5.1. Rianodin	25
2.5.2. Metilxantinok	26
2.5.3. Fenolszármazékok	27
2.5.4. Egyéb modulátorok	27
2.5.5. Gadolínium	28
3. Módszerek	30

3.1. SR-vezikula preparálása vázizomból	30
3.2. A rianodin receptor izolálása	30
3.3. „Single-channel” mérés	32
3.4. Rapid filtráció	35
3.5. Rianodin kötés	36
3.6. A Ca^{2+} -pumpa aktivitása	37
4. Eredmények	39
4.1. A maurokalcin hatása	39
4.1.1. A csatorna kapuzásának változása	39
4.1.2. A mutáció hatása a kapuzásra	40
4.1.3. A hatás polaritásfüggése	42
4.1.4. A különböző mutánsok eltérő hatásúak	43
4.1.5. A kalcium koncentráció nem befolyásolja a toxin-csatorna kölcsönhatást	45
4.1.6. A maurokalcin és mutánsai nem befolyásolják az SR Ca^{2+} -pumpa aktivitását	45
4.2. A gadolínium hatása a RyR1-ra	46
4.2.1. A citoplazmatikus gátlás	46
4.2.2. A luminális gátlás	48
4.2.3. A gátlás vizsgálata vezikuláris rendszeren	51
5. Megbeszélés	54
5.1. A maurokalcin módosítja a csatorna működését	54
5.2. A különböző mutációk hatása eltérő	58
5.3. A maurokalcin hatása polaritásfüggő	59
5.4. A maurokalcin és mutánsai nem befolyásolják a Ca^{2+} -pumpa aktivitását	59
5.5. A gadolínium gátolja a RyR aktivitását	60
6. Összefoglalás	62
Summary	63
7. Irodalomjegyzék	64
8. Köszönetnyilvánítás	71
9. Függelék	72

Rövidítések jegyzéke

A disszertációban a szabad ionokat Ca^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} stb. módon jelöltük.

CaM: kalmodulin

CaMKII: kalmodulin-dependens protein kináz II

CHAPS: [3-[(3-kolamidopropil)dimetilamino]-1-propánszulfonsav: micellaképző detergens

cisz: citoszólikus oldal

CPPs: sejt-penetráló peptidek, (cell penetrating peptides)

CSQ: kalszekvesztrin

DHPR: dihidropiridin receptor

EC₅₀= félhatásos koncentráció

ECRE: elemi kalcium felszabadulási esemény (Elementary Ca^{2+} Release Event)

EGTA: etilén glikol-bis(β -aminoetil éter)N,N,N',N'-tetraecetsav

FKBP: FK-506-kötő fehérje

^3H : trícium izotóp

HEPES: 4-(2-Hidroxietil)piperazin-1-etánszulfonsav

IC₅₀: félgátló koncentráció

IpTx_A: imperatoxin-A

JFM: a terminális ciszterna t-tubulus felőli része, (Junctional Face Membrane)

K_d: disszociációs állandó

LLSS: hosszantartó szubkonduktancia állapot, (Long Lasting Subconductance State)

MCa: maurokalcin

MH: malignus hyperthermia

n_{Hill}: Hill-koefficiens

PIPES: piperazin-N,N'-bis[2-etánszulfonsav]

PKA: cAMP-dependens protein kináz

PKC: Ca^{2+} -dependens protein kináz

PKG: cGMP-dependens protein kináz

P_o: csatorna nyitvatartási valószínűsége

P_c: csatorna zárvatartási valószínűsége

Ria: rianodin

RyR: rianodin receptor, (SR kalcium csatorna)

RyR1: vázizom típusú rianodin receptor

RyR2: szívizom típusú rianodin receptor

RyR3: agy típusú rianodin receptor

SERCA ATPáz: Szarkoplazmatikus retikulum kalcium pumpa.

SR Ca²⁺-ATPáz: Szarkoplazmatikus retikulum kalcium pumpa.

SR: szarkoplazmatikus retikulum

HSR: nehéz (heavy) SR, kalcium pumpát és kalcium csatornát is tartalmazó frakció

LSR: könnyű (light) SR, csak kalcium pumpát tartalmazó frakció

τ_o : átlagos nyitvatartási idő

τ_c : átlagos zárvatartási idő

TC: terminális ciszterna

TT: transzverzális tubulus

transz: a szarkoplazmatikus retikulum lumenének megfelelő oldal

1. Bevezetés

A vázizomzat a magasabbrendű szervezetekben a mozgás aktív szerve. Legfontosabb feladata a test vázát alkotó elemek elmozdítása, ezáltal a test helyzetének stabilizálása, illetve helyének módosítása. A vázizomzat elemi egysége az izom, illetve az izomrost. Ezek alapvető működési formája az idegi utasításra bekövetkező összehúzódás (kontrakció). Az izom összehúzódása során az akciós potenciál a dihidropiridin receptorok (DHPR) konformáció változását követően megnyitja a szarkoplazmatikus retikulum (SR) kalcium csatornáit (rianodin receptor, RyR1), ami az intracelluláris kalcium szint emelkedését és a vázizom összehúzódását eredményezi. Elektromechanikai kapcsolatnak nevezzük a felszíni membrán depolarizációja és a kontrakció kialakulása közötti események összességét. Az elektromechanikai csatolás „színtere” a harántcsíkolt izom transzverzális tubulusa (TT) és az SR terminális ciszternájának érintkezési felülete által meghatározott térrész (ún. TTC junkció). A jelátviteli folyamatok konkrét megvalósulását számos környezeti paraméter és fehérje befolyásolja, modulálja, beleértve a lokális ionkoncentrációt és a különböző ún. asszociált proteinek is.

Munkacsoportunk a kalcium felszabadulásban és a kalcium SR-be történő visszavételében kulcsszerepet játszó kalcium csatorna (RyR) és kalcium pumpa (SR Ca^{2+} -ATPáz,) működését, modulációját tanulmányozza. A RyR intracelluláris modulációját a DHPR egy stratégiailag fontos szegmensét modellező peptiddel – maurokalcin nevű toxinnal – kívántuk tanulmányozni, vázizomból preparált nehéz (Ca^{2+} -ATPáz + RyR) és könnyű (Ca^{2+} -ATPáz) SR vezikulák valamint mesterséges lipid membránba épített egyedi kalcium csatornák felhasználásával.

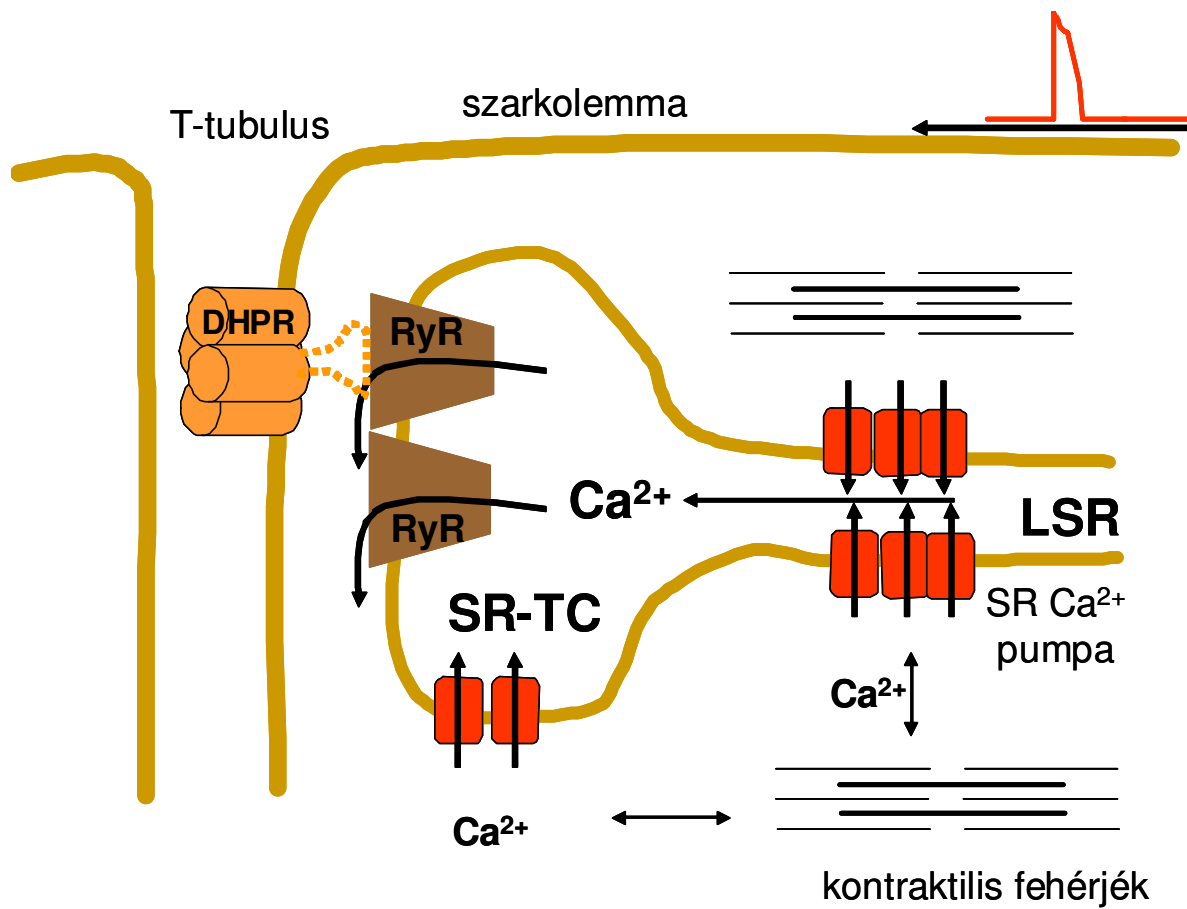
A vezikuláris technikák lehetővé teszik a különböző modulációs hatások (ionok, ATP, toxinok) kalcium fluxusokra kifejtett hatásának tanulmányozását. A mesterséges lipid-membrán technika pedig, a csatorna elektrofiziológiai paramétereinek vizsgálatát teszi lehetővé tetszőlegesen választott és változtatható kísérleti körülmények között. A vezikulákon illetve mesterséges lipid-membránon nyert adatokat összevetve átfogóbb és árnyaltabb képet kaphatunk az intracelluláris kalcium forgalomról. Ismert, hogy a szuperkalciumnak is nevezett lantanidák közé tartozó gadolínium gátolja a N-, T-, és L-típusú kalcium csatornát illetve az SR Ca^{2+} -ATPáz. „Single channel” mérésekkel kívántuk tisztázni, hogy a gátló hatás milyen mechanizmussal és milyen kötőhelyen keresztül valósul meg.

2. Irodalmi áttekintés

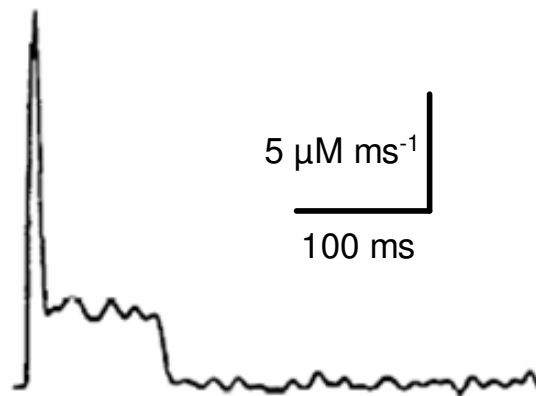
2.1. A kontrakció-relaxáció ciklus

A rianodin receptor az endoplazmatikus retikulumban (izomsejtek esetében szarkoplazmatikus retikulumban) elhelyezkedő kalcium csatorna, melyhez nagy affinitással kapcsolódik a rianodin nevű növényi alkaloida. Az elektomechanikai csatolás első lépéseként az akciós potenciál végigfut a vázizomrostok felszíni membránján és betérjed a T-tubulusok (a szarkolemma izom felszínre merőleges, kesztyűujjszerű betüremkedései az izomrost belsejébe) membránján az izomrost belsejébe, ahol a terminális ciszternákkal határos területeken feszültségérzékelő elemek (molekulák) találhatók. A feszültség szenzor a dihidropiridin származékokkal gátolható L-típusú Ca^{2+} -csatorna (DHP-receptor), mely – vázizomban – fizioiógias izomműködés esetén kizárólag feszültség szenzorként működik. Az akciós potenciál megváltoztatja a DHP-receptorok konformációját, ami a szarkoplazmatikus retikulum (SR) terminális ciszternáiban (TC) elhelyezkedő rianodin szenzitív Ca^{2+} -csatornák megnyílását eredményezi a DHPR II-III hurok és a RyR1 kapcsolat révén (1. ábra, 3. oldal).

Emlősökben az SR longitudinális tubulusainak kiszélesedett végzsákszerű képződményei, a terminális ciszternák membránjukban a rianodin receptorokkal és a T-tubulus membránjában a DHP-receptorokkal hármas egységet ún. triádot képeznek. A két rendszer között a kapcsolat szoros, ám membránjaik nem érnek össze, köztük egy 7-15 nm-es rés mutatható ki. A szarkoplazmatikus retikulum beleértve a terminális ciszternát is képezi az izom kalcium raktárát. Az SR-ben a kalcium részben szabadon, részben fehérjékhez (kalszekvesztrin, kalcineurin) kötve található. A kontrakcióhoz szükséges Ca^{2+} a felszíni membrán $\rightarrow$ T-tubulus $\rightarrow$ triád információs úton terjedő jel hatására szabadul fel az SR-ből a terminális ciszternák membránjában elhelyezkedő rianodin receptorokon keresztül. Figyelembe véve, hogy izomban a nyugalmi intracelluláris kalcium koncentráció 100 nM alatti, míg az SR intraluminális kalcium koncentrációja 1-2 mM-os, a kalcium kilépése a koncentráció grádiensnek megfelelő irányban történik, aminek eredményeként a mioplazmatikus Ca^{2+} -koncentráció megemelkedik. A kalcium felszabadulás az intracelluláris kalcium koncentráció megváltozásából kiszámítható.



1. ábra Az elektromechanikai kapcsolat.

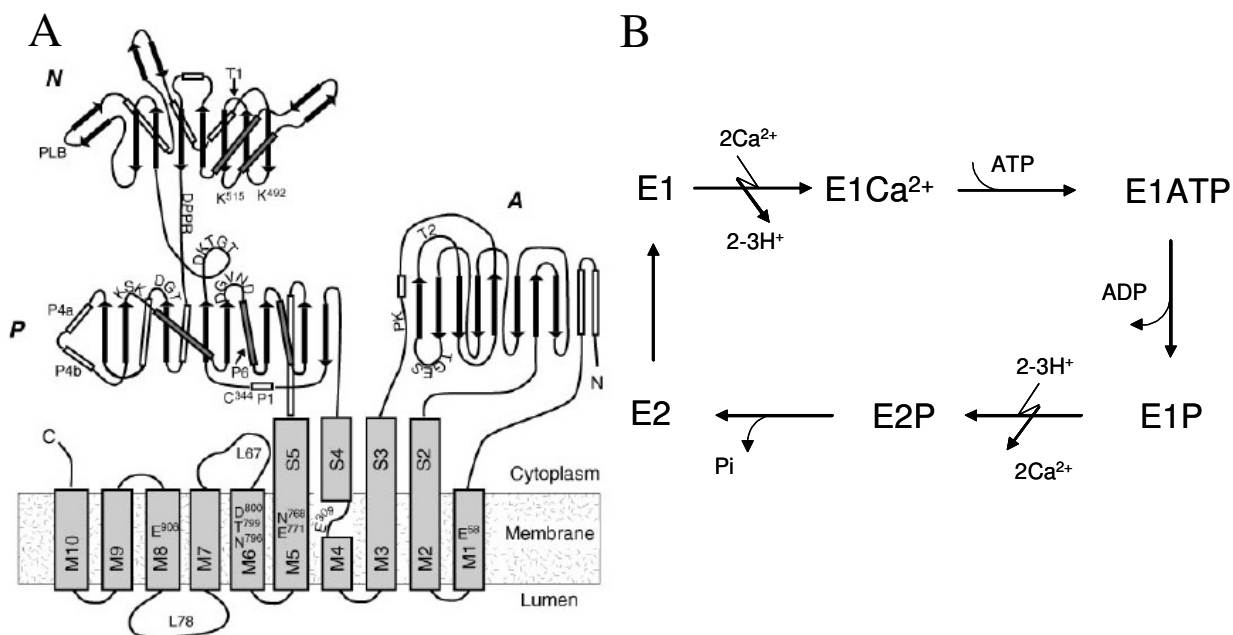


2. ábra Az SR Ca^{2+} -felszabadulás sebessége egy korai csúcs után gyorsan csökken, majd egy állandó értékre áll be (Szentesi és munkatársai, 1997).

Kételtűek vizsgálata során megállapították, hogy egy 100-200 ms hosszú depolarizáció alatt a kalcium felszabadulás sebessége egy korai csúcs elérését követően gyorsan csökken (inaktiválódó komponens), és egy közel állandó értékre áll be (steady komponens). A kalcium csatornák gyors inaktiválódásáért az intracelluláris kalcium szint megemelkedése felelős (2. ábra, 3. oldal). Az intracelluláris térbe jutott Ca^{2+} diffúzióval jut el a kötőhelyekhez, melyek közül a legjelentősebb a troponin C, mely a kontraktilis válasz kialakulásában játszik alapvető szerepet. A mioplazmába jutott kalcium lehetőséget teremt a vastag (miozin) és a vékony (aktin, troponin, tropomiozin) filamentumok közötti újfajta, nyugalmi helyzettől eltérő kölcsönhatás létrejöttére. A kalcium a troponin C-hez kötődik, ezzel meggyengül a troponin I kötődése az aktinhoz, és a tropomiozin oldal irányba mozdul el. Így az aktin miozinkötő helyei szabaddá válnak, az aktin és a miozin között kereszthidak alakulnak ki. A folyamat végeredményeképpen a vékony filamentumok elcsúsznak a vastag filamentumokon (sliding mehanizmus) és létrejön a kontrakció.

A mioplazmába kilépett Ca^{2+} visszavétele az SR-be aktív transzportfolyamat révén valósul meg (SR Ca^{2+} -pumpa). A „visszavett” Ca^{2+} nagy része kalszekvesztrinhez kapcsolódik a terminális ciszternában, ahova diffúzióval jut el, s ahol ismét rendelkezésre áll a következő kontrakcióhoz. A mioplazmatikus Ca^{2+} -koncentráció mindaddig emelt szinten marad, amíg a korábban felszabadult kalcium vissza nem jut az SR-be, elsődlegesen a longitudinális SR lumenébe, melyek membránja igen nagy denzitással tartalmazza a Ca^{2+} -pumpa molekulákat (3. ábra, 5. oldal). A P-típusú ionpumpák családjába tartozik az SR kalcium pumpa. Számos izoformája ismert a lassú (SERCA 2a) és gyors harántcsíkolt izom (SERCA 1a, SERCA 1b), a szív- (SERCA 2a) és a simaizom (SERCA 2b) SR-membránjában. A molekula terciér szerkezetére alkotott hipotetikus modell alapján három fő egység különíthető el:

- a, Citoplazmatikus „fejrész”, ami magában foglalja az ATP-kötő, a foszforilációs és az ún. energia-transzdukciós domént.
- b, Penta-helikális szár, ami tartalmazza a nagy affinitású kalciumkötő részt, valamint biztosítja a kapcsolatot a fejrész és az intramembrán domén között.
- c, Intramembrán régió, mely legalább 10 transzmembrán hélixből áll, feladata: a molekula kihorgonyozása a lipid kettősréteghez és a kalcium ionok membránon történő áthaladásának biztosítása.



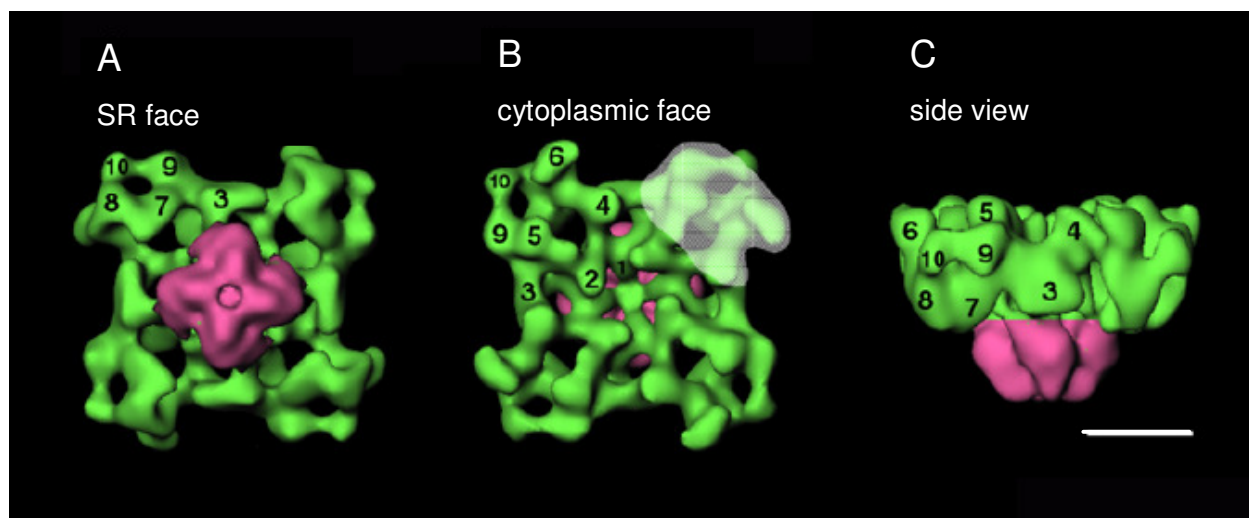
3. ábra „A” panel: Az SR Ca²⁺-ATPáz szerkezeti modellje. A citoplazmatikus „fejrész” magában foglalja az ATP-kötő (N), a foszforilációs (P) és az ún. energia-transzdukciós domént (A), valamint a proteolitikus hasítási helyeket (tripszin → T1, T2, proteináz K → PK). Az intramembrán régiót legalább 10 transzmembrán hélix (M1-10) alkotja (Stokes és Green, 2003). „B” panel: Az SR Ca²⁺-ATPáz ciklusos működése (Martonosi és Pikula, 2003).

A Ca²⁺-ATPáz molekulának két jól elkülöníthető konformációs állapota létezik: E1 és E2. Kalcium vagy lantanidák jelenlétében a pumpa az E1, míg kalciummentes közegben vanadát vagy magas koncentrációjú anorganikus foszfát jelenlétében az E2 konformációban kristályosítható. Az E1 és E2 állapot közötti konformációs átmenetek kevés változást eredményeznek a másodlagos fehérjeszerkezetben, inkább a domének forgó és csúszó mozgása figyelhető meg. Az aktív kalcium transzlokáció sztöchiometrikusan kötődik ATP hidrolíziséhez. A ciklus kezdetén az E1 konformációs állapotú fehérje két Ca²⁺-t köt meg az SR-membrán citoplazmatikus oldalán. Ezután a fehérje foszforilálódik egy aszpartilgyök béta-karboxil csoportján, ATP felhasználásával. Ennek eredményeképpen az enzim konformációs állapota megváltozik (E1-E2 átmenet), aminek következtében a két kalcium ion átjut a membránon majd az intraluminális oldalon ledisszociál. Végül a kalcium pumpa magnézium ion segítségével defoszforilálódik és újra felveszi az E1 konformációs állapotot (3. ábra). Az iontranszport iránya

- megfelelő körülmények között - megfordítható, ekkor két Ca^{2+} átvitele a szarkoplazmatikus retikulumból a citoplazmába 1 molekula ATP szintézisét eredményezi.

2.2. A kalcium csatorna (RyR)

A rianodin receptor egy nagy vezetőképességű (520-600 pS), kis szelektivitású kation csatorna. Maga a funkcionális csatorna egy négy polipeptid molekulából (4 x 560 kDa) álló homotetramer. Több izoformáját írták le: RyR1, RyR2, RyR3 (emlősök), RyR α/β (halak, kételtűek, madarak). Az izoformák közötti szekvencia homológia összességében 67-70 %-os, ám ez az arány a C-terminálisnál lévő 250 aminosavnyi részen magasabb, mint 90 %. A humán RyR1/2/3 homológia kb. 93 %-os. Eredetileg a RyR1-et (4. ábra) a vázizomban, a RyR2-t a szívizomban, a RyR3-at az agyban előforduló izoformaként írták le, de a RyR3 napjainkban már – bár kis mértékű és sokszor ismeretlen szereppel – univerzálisnak mondható.



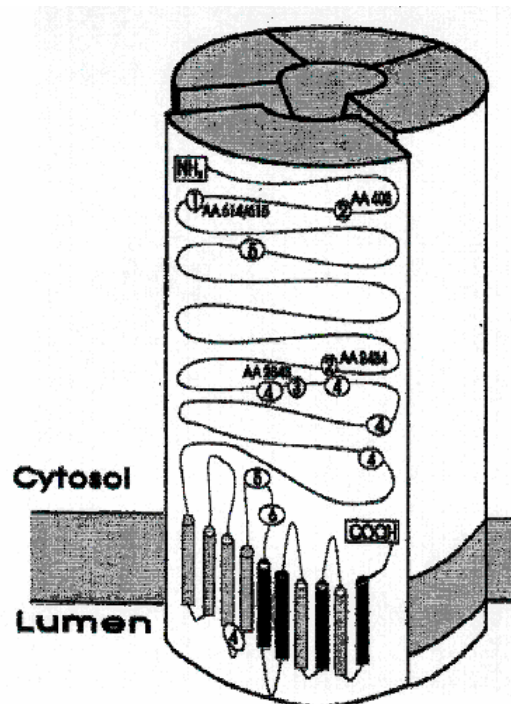
4. ábra A RyR1 háromdimenziós szerkezete. A: SR lumene felől, B: citoplazmatikus oldal felől, C: oldalnézet, kalibráció: 100 Å (Wagenknecht és Samsó, 2002).

2.2.1 RyR1

A RyR1 (vázizom típus) mindenfajta harántcsikolt izomban valamint az agy bizonyos részein (cerebellum Purkinje-sejtjei), és egyes simaizmokban található (Lai és munkatársai, 1988). A RyR1 gén a 19-es kromoszóma (19q13.1) hosszú karjában helyezkedik el (Fujii és munkatársai,

1991), és polipeptid lánc 5032–5037 aminosavat tartalmaz. A kb. 560 kDa-os láncok 2 fő tartományra oszthatók:

- a, Karboxi-terminális régió, mely változó számú (10-12) transzmembrán szegmensből áll.
- b, Nagy méretű extramembrán régió, mely egy citoplazmatikus “láb” (foot) struktúrát hoz létre. A szekvencia ismerete számos potenciális modulációs kötőhely (citoplazmatikus Ca^{2+} , nukleotid és kalmodulin kötőhely) azonosítását ill. megjósolását (5. ábra) teszi lehetővé (Hakamata és munkatársai, 1992; Nakai és munkatársai, 1990).



5. ábra A RyR1 négy polipeptidláncból álló homotetramer molekula, melyen már számos kötőhely, illetve klinikai szempontból fontos mutáció jelenlétét leírták. 1, MH-mutáció: 614 As (humán RyR1), 615 As (sertés RyR1). 2, CCD- (central core disease) mutáció (humán RyR1): 403 As, 2434 As. 3, Foszforilációs hely (nyúl RyR1): 2843 As. 4, Kalmodulin kötőhelyek: 3614-3637 As, 4295-4325 As (nyúl RyR1); 2807-2840 As, 2909-2930 As, 3031-3049 As (humán RyR1). 5, Nukleotid kötőhelyek: 4449-4454 As, 4452-4457 As (nyúl RyR1); 1194-1199 As, 4447-4452 As (humán RyR1). Nagy affinitású kalcium kötőhely: 4489-4499 As (nyúl RyR1).

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

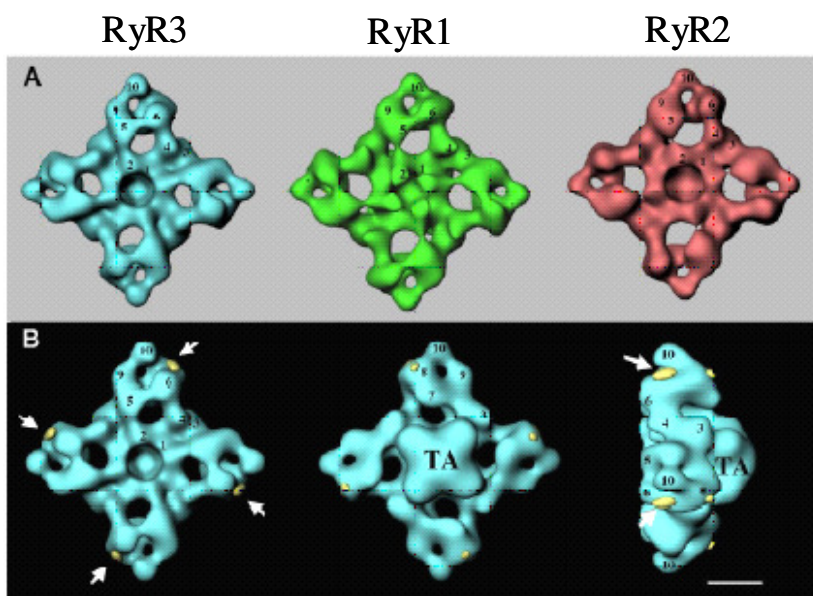
elektromechanikai kapcsolatban alapvető szerepet betöltő RyR1-et ($\approx 40\%$) és DHPR-t ($\approx 20\%$) érintik, míg $\approx 35\%$ -ában a betegség genetikus háttere jelenleg ismeretlen. Bizonyos mutációk eredményeképpen módosul a vázizomzat kalcium csatornáinak Ca^{2+} -indukált Ca^{2+} -felszabadulása, a koffeinnel (Nelson és munkatársai, 1992) és az altatószerként széles körben használt halotánnal (Valdivia és munkatársai, 1991) szemben mutatott érzékenysége. A halotán jelenlétében a mutációt hordozó betegekben az SR kalcium csatornái alacsonyabb kalcium koncentrációnál aktiválódnak, ez a mioplazmatikus kalcium szint emelkedéséhez vezet, ami kontrollálatlan feszültsnövekedést, sőt kontraktúrát okoz. A teljes vázizomzatra kiterjedő feszültsnövekedés miatt az egész szervezetben megnő a glikolitikus és az aerob metabolizmus mértéke, ami metabolikus és respiratórikus acidózist okoz, illetve hiperkalémia, majd aritmia lép fel és mindezek következtében gyorsan emelkedni kezd a testhőmérséklet is.

Gyors beavatkozás nélkül (a test hűtése és a jelátvitel blokkolása a poszt-szinaptikus izomrelaxáns dantrolénnel) a folyamat végzetes kimenetelű. A műtéti kockázat csökkentése céljából malignus hyperthermia gyanús betegek ex vivo (biopszia) tesztelésére általánosan elfogadott a koffein-kontraktúra teszt, mivel a mutáns RyR1 koffeinnel szembeni érzékenysége magasabb, mint a nem mutáns RyR1-é. (Az in vitro kontraktúra teszt Európai Unió protokoll.)

2.2.2. RyR2

A RyR2 (6. ábra, 9. oldal) döntően a szívizom működésében játszik alapvető szerepet, továbbá kimutatható az agyban és simaizomban (Anderson és munkatársai, 1989; Herrmann-Frank és munkatársai, 1991) is. A RyR2 polipeptid lánc 4968–4976 aminosavat tartalmaz. A szívizomnál az elektromechanikai csatolás a vázizomtól eltérő módon valósul meg, hiszen a szívizomban az akciós potenciál időtartama 200–300 ms (vázizomnál 3–5 ms), ami lehetővé teszi, hogy a lassan aktiválódó DHPR-ok megnyíljanak, és az extracelluláris kalcium bejusson a mioplazmába. Az elektromechanikai csatolás során a szívizomban a sejtfelszíni membránon végigfutó akciós potenciál áterjed a T-tubulusok membránjára és megnyitja az ott elhelyezkedő L-típusú feszültségvezérelt Ca^{2+} -csatornákat (DHPR). A – szívizomban – Ca^{2+} -csatornaként is működő DHPR-okon keresztül beáramló kalcium hatására megnyílnak a terminális ciszternák rianodín receptorai (Ca^{2+} -indukált Ca^{2+} -felszabadulás), ami a kontraktilis rendszer aktiválódásához vezet. Szívizomban az SR-ből kiáramló (kb. 65%) ill. az extracelluláris térből a DHP-receptorokon

keresztül beáramló (kb. 35%) kalcium együttesen váltja ki a szívizom összehúzódását. Az elektromechanikai kapcsolatban illetve a szerkezetben mutatkozó különbségek ellenére a RyR2 számos regulátorral szemben a RyR1-hez hasonlóan viselkedik. A mono- és divalens kationok (Mg^{2+} , Ba^{2+} , Li^{+}) általában gátolják a kalcium csatornát (RyR1, RyR2), ezzel szemben Meissner és munkatársai kimutatták, hogy cézium jelenlétében a RyR1-on a rianodin kötés nő (Meissner és munkatársai, 1997). A Sr^{2+} és a Cl^{-} viszont aktiválja mindkét izoformát. A kalcium aktiváló hatása kifejezettebb a RyR2 és a RyR3 esetében mint a RyR1-nél, mivel az előbbieknél a kalcium affinitása kisebb az inaktiváló kalcium kötőhelyhez. Továbbá kimutatták, hogy a kolin nanomólos kalcium koncentrációnál gyenge kalcium agonistaként működve aktiválja a RyR1-et, a szív típusú RyR-on ez a hatás viszont nem mutatható ki (Liu és munkatársai, 1998).



6. ábra A RyR izoformák háromdimenziós modellje. „A” panel: RyR3 (kék), RyR1 (zöld), RyR2 (piros) izoformák a citoplazmatikus oldal felől, a számok a konzervatív doméneket jelölik. „B” panel: A RyR3 szerkezetében jelentős különbségek (nyilakkal jelölve) figyelhetők meg a RyR1-hez képest (pl.: D2 régió hiánya). Wagenknecht és munkatársai, 2002.

2.2.3. RyR3

A humán RyR3 polipeptid lánc 4870 aminosavat tartalmaz, és az agyban (hippocampus, corpus striatum, diencephalon) fordul elő (Lai és munkatársai, 1992a), bár itt sem haladja meg a teljes RyR-készlet 2%-át. Szoros hasonlóságot mutat szekvenciájában és működésében a RyR β

izoformával. A RyR3 farmakológiája és vezetőképessége a többi (RyR1, RyR2) izoformához hasonló. A RyR3-at a kalcium mikromólos, az ATP millimólos koncentrációban aktiválja, a magnézium és a kalcium millimólos koncentrációban gátolja. Az izoformák közötti szekvencia homológia ellenére az izoformák több variábilis régiót is tartalmaznak, melyek meghatározóak lehetnek az izoformák közötti funkcionális különbségekben. A RyR3 szerkezetében jelentős különbség a RyR1-hez képest, hogy hiányzik belőle a D2 (1303-1406) régió.

2.2.4. RyR α/β

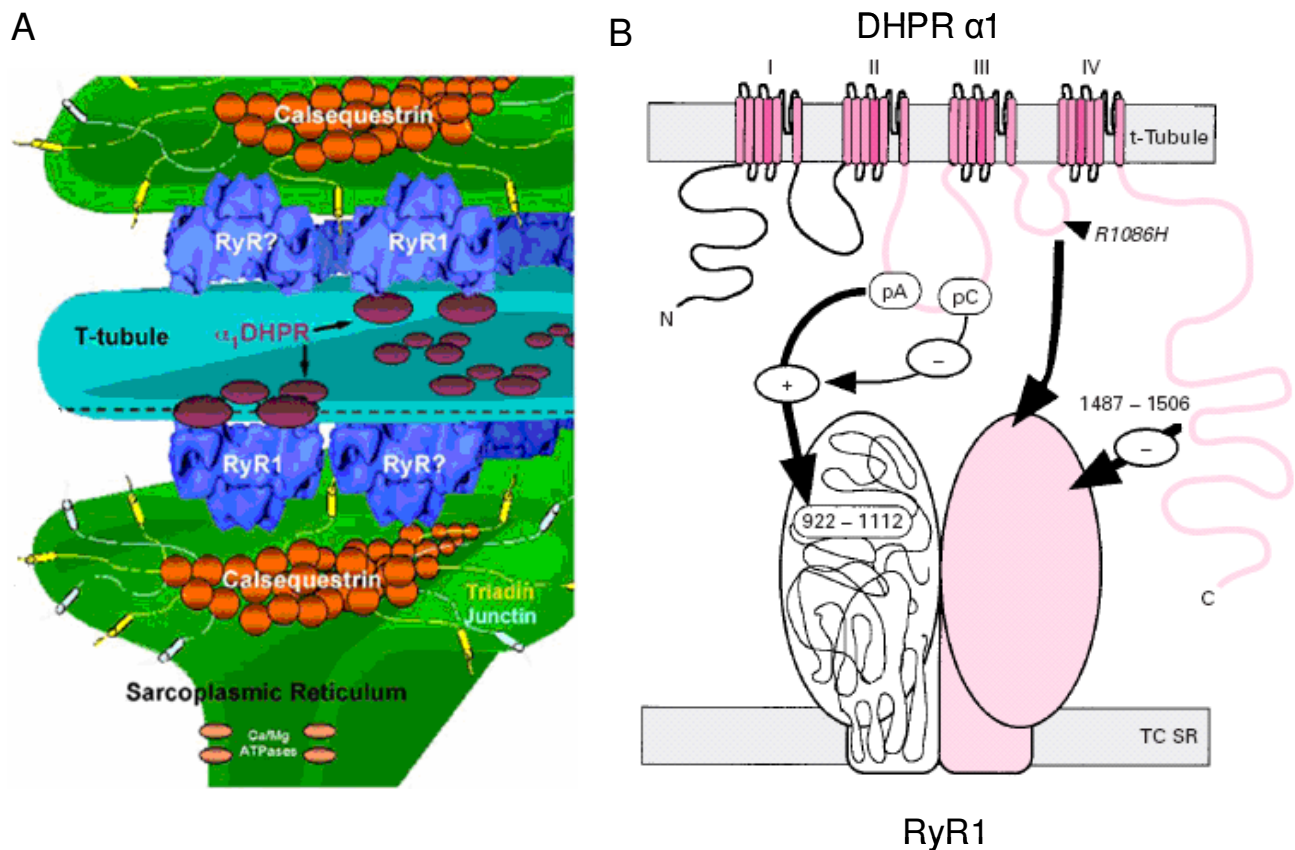
Az RyR α és RyR β a halakban, kételtűekben és madarakban fordul elő, és az emlősök RyR1 illetve RyR3 molekulájával mutat homológiát (Lai és munkatársai, 1992b; Olivares és munkatársai, 1991). Az azonosítás alapja az volt, hogy a béka vázizomból izolált α és β izoformák nátrium dodecyl-szulfát poliakrilamid gélen (SDS-PAGE) együtt futottak az emlős izomból származó izoformákkal. A homológiát sikerült alátámasztani immunoblot analízissel és funkcionális vizsgálatokkal is („single channel” áramok konduktanciája és farmakológiája hasonló az izoformák között). A kalcium felszabadulás folyamatának leírására kételtűekben Rios és Pizzaro dolgozott ki modellt (Rios és Pizzaro, 1988), figyelembe véve azt, hogy ezen osztályban két különböző típusú SR kalcium csatorna (RyR α és RyR β) van jelen. Ezen modell alapján a dihidropiridinnel szemközt elhelyezkedő kalcium csatornák a depolarizáció egész időtartama alatt fenntartott kalcium felszabadulásért felelősek, míg a többi csatorna a kalcium felszabadulás korai, gyorsan aktiválódó majd inaktiválódó részében játszanak szerepet. Utóbbiak megnyílásáért és bezáródásáért a DHP-receptorok által közvetlenül aktivált csatornákon át kilépő kalcium ionok a felelősek.

2.3. A RyR vezérlése

2.3.1. DHPR szerepe

A vázizomban a RyR legfontosabb fehérje természetű szabályozója a T-tubulus membránjában elhelyezkedő (7. ábra „A” panel, 11. oldal) öt alegységből (α_1 , α_2 , β , γ , δ) felépülő DHPR. A különböző DHPR izoformák számos sejttypusban megtalálhatók, de legnagyobb

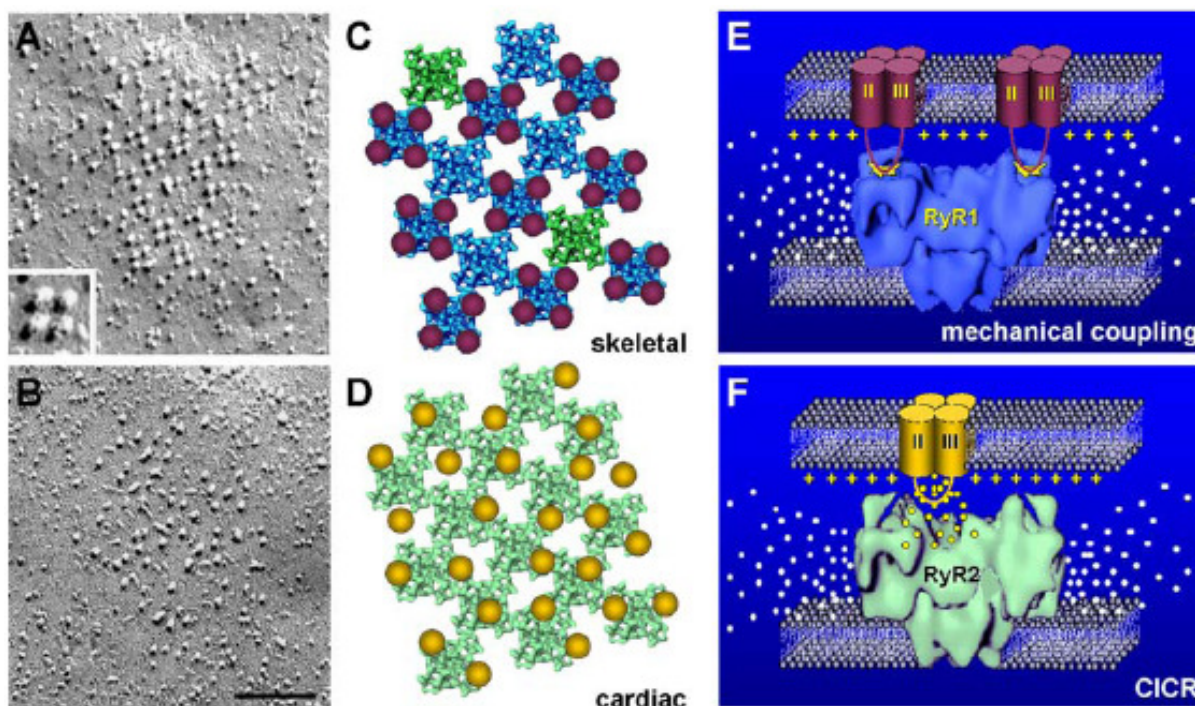
menyiségben a váz- és szívizom valamint az agy tartalmazza. Az α_1 alegység (7. ábra, „B” panel) 1873 aminosava négy ún. „repeat”-et tartalmaz, melyek, egyenként hat transzmembrán szegmenset tartalmazó domént alkotnak. A „repeat”-ek változó hosszúságú citoplazmatikus hurkokkal vannak összekötve (Tanabe és munkatársai, 1987). Az α_1 alegység formálja a kalciumvezető pórust, és rajta található a membrán potenciálváltozását érzékelő feszültség szenzor, mely depolarizáció hatására elmozdul és megnyitja az ionvezető pórust. A szívizomban a DHPR α_1 alegysége 66 %-os homológiát mutat a vázizom típusal, a fő különbség a C-terminális hosszában van (Mikami és munkatársai, 1989).



7. ábra „A” panel: A vázizomban a terminális ciszternák rajtuk a rianodin receptorokkal (RyR1) és a T-tubulus a DHP-receptorokkal (DHPR), hármas egységet triád képeznek (Protasi és munkatársai, 2002). „B” panel: A DHPR egyes szegmensei közvetlenül kölcsönhatnak a RyR1-al (MacKrell és munkatársai 1999).

A DHPR és RyR közötti kölcsönhatás (8. ábra, 12. oldal) vizsgálatában elterjedt a különböző mutáns (dysgenikus és dyspedikus) egértörzsek használata. A dysgenikus egértörzsrre jellemző, hogy hiányzik az egerekből a vázizom típusú DHPR α_1 , a dyspedikus egértörzsből pedig nincs jelen a RyR1. A dysgenikus és dyspedikus egerekben bár az elektomechanikai

kapcsolat nem működik, a DHPR $\alpha 1$ illetve a RyR1 transzfektálásával a kapcsolat visszaállítható, és az egyes elemek szelektíven vizsgálhatóak. Dysgenikus vázizom rostokba szív típusú DHPR $\alpha 1$ -et transzfektálva az EC-kapcsolat szív típusú lesz, azaz a kontrakció függ az extracelluláris kalcium beáramlásától is (Tanabe és munkatársai, 1990a). A dysgenikus rostokba váz- vagy szívizom típusú DHPR $\alpha 1$ kiméra transzfektálásával kiderült, hogy az $\alpha 1$ alegység II és III doménjét összekötő citoplazmatikus loop (A-peptid, C-peptid) meghatározó a vázizom jellegű elektromechanikai kapcsolat kialakításában (Tanabe és munkatársai, 1990b), ugyanakkor a DHPR $\alpha 1$ alegységének egyéb citoplazmatikus szakaszai is befolyásolhatják a RyR működését. A korábban már említett malignus hyperthermia egyik formájában az $\alpha 1$ alegység 1086-os pozíciójában lévő arginin mutációját írták le, ami arra utal, hogy ez a szakasz is szerepet játszik a RyR modulációjában (Monnier és munkatársai, 1997). Leírták, hogy a DHPR $\alpha 1$ C-terminálisán elhelyezkedő szakasz gátolja a rianodin kötést a RyR1-en és a RyR2-on és „single channel” mérésekben csökkenti a RyR1 nyitvatartási valószínűségét (Slavik és munkatársai, 1997).



8. ábra A DHPR-ok tetrádokat képeznek BC3H1 sejteken (A), csirke szívizomban viszont random módon jelennek meg (B). Mind a vázizomban a RyR1 (kék, C), mind a szívizomban a RyR2 (zöld, D) rendezett struktúrát képez. A DHPR-RyR kölcsönhatás a vázizomban (E) és a szívizomban (F) eltérő módon valósul meg (Protasi és munkatársai, 2002), [CICR=kalcium indukált kalcium felszabadulás].

A RyR szabályozásában részt vesz a DHPR $\alpha 1$ alegységének II-es és III-as doménjét összekötő citoplazmatikus loop egy másik szakasza is, melyet C-peptidnek (Glu724-Pro760) neveznek. A C-peptidet ekvimolárisan alkalmazva gátolja az A-peptid hatását a rianodin kötésnél és az SR kalcium felszabadulásnál (El-Hayek és munkatársai, 1995). Az A-peptid feltehetően a RyR1 zártból nyitott állapotba történő konformációváltozását indukálja, a C-peptid pedig ezt a konformációváltozást gátolva csökkenti a rianodin receptor aktivitását. Az újabb eredmények azt mutatták, hogy rianodin kötésnél és kalcium felszabadulásnál a C-peptid önmagában hatástalan vagy csak minimális hatással bír (Bannister és munkatársai, 2006). Ezzel szemben képes az A-peptid hatását befolyásolni, ám ez a hatás függ a kalcium koncentrációtól. A C-peptid gátolja az A-peptid hatását magas (μM -os) kalcium koncentrációnál, alacsony kalcium koncentrációnál ($<0,1\mu\text{M}$) viszont aktivál.

2.3.2. Az A-peptid hatása

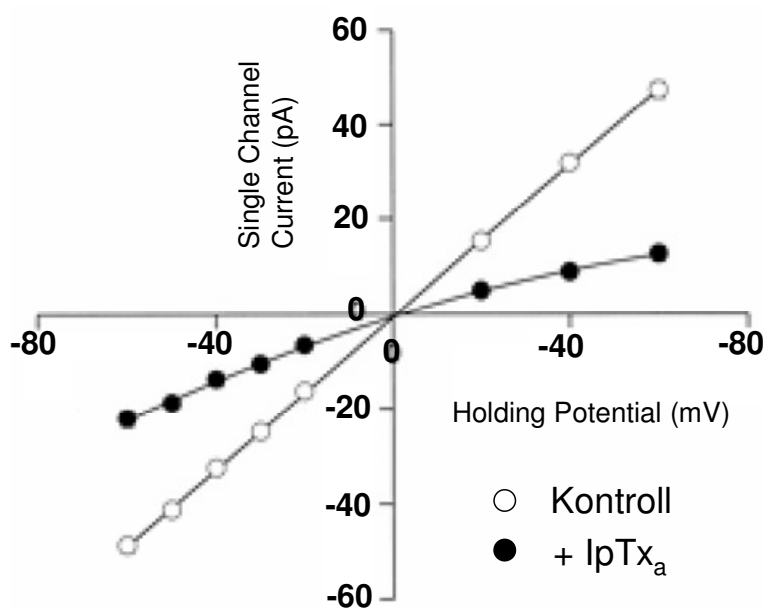
El-Hayek és munkatársai kimutatták, hogy a DHPR $\alpha 1$ alegységének II-es és III-as doménjét összekötő citoplazmatikus loop 671 (Thr) és 690 (Leu) aminosava között lévő fehérjeszakasz (A-peptid) önmagában is képes befolyásolni a RyR működését. A RyR és a peptid közötti kapcsolat kialakulásáért valószínűleg egy néhány bázikus aminosavból álló rövid peptidszakasz felelős (681 RKRRK 685). A RyR1-en lévő A-peptid kötőhely feltérképezése több próbálkozás is történt, melyek részben az alkalmazott technikák különbözősége miatt eltérő eredményre vezettek. Dyspedikus rostokkal végzett kísérletek azt mutatták, hogy a RyR1 úgynevezett D2 régiója (1303-1406) meghatározó a DHPR-RyR kölcsönhatás létrejöttében (Yamazawa és munkatársai, 1997). Kimutatták, hogy a RyR1 Leu922-Asp1112 szakasza is képes kapcsolódni a II-III loop-hoz, a RyR2 homológ szakasza viszont képtelen a kapcsolat kialakítására (Leong és MacLennan, 1998). Valószínűleg az ionos kölcsönhatások is szerepet játszanak, mivel a II-III-as loop két Lys molekulájának (677, 682) mutációja csökkenti a vázizom típusú kalcium csatorna iránti affinitást. Az előbbi eredmények nem utalnak arra, hogy bármiféle direkt, közvetlen fizikai kapcsolat lenne szívízomban a RyR és a DHPR $\alpha 1$ alegysége között.

Az A-peptid képes kötődni a RyR-hoz, mikromólos koncentráció tartományban fokozza a rianodin kötést, és SR vezikulákból kalcium felszabadulást indukál. „Single channel” mérések azt mutatták, hogy az A-peptid a RyR maximális vezetőképességének 65-85%-ának megfelelő rövid

ideig tartó szubkonduktancia állapotokat és hosszantartó zárt állapotokat hoz létre. Ha az A-peptidben a bázikus klaszterhez tartozó valamelyik aminosavat lecseréljük, akkor hatása drámaian csökken. A rianodin receptorhoz való kötődésében valószínűleg az Arg⁶⁸¹-Lys⁶⁸⁵ aminosavak közötti bázikus oldalláncú aminosavakból álló rövid szegmens által, a peptid N-terminális végén létrehozott α -hélixnek van kulcsszerepe.

2.3.3. Az IpTx_a hatása

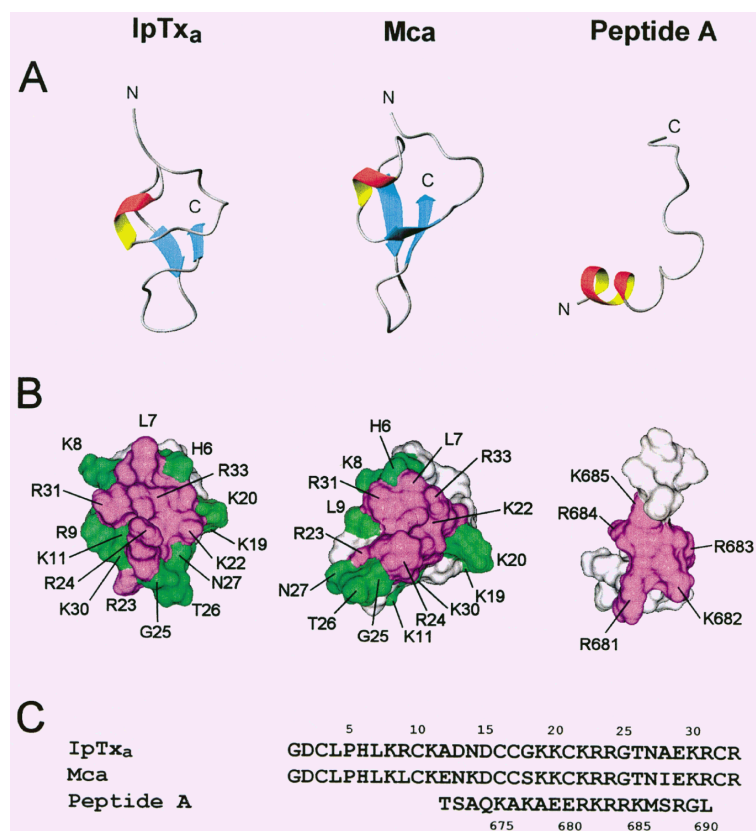
Az A-peptidhez hasonló motívum található a *Pandius imperator* skorpió mérgéből izolálható imperatoxin-A (IpTx_a) elsődleges szerkezetében is. A 33 aminosavból álló peptid toxin 3 diszulfid hidat tartalmaz, felületén bázikus oldalláncú aminosavak egy nagy kiterjedésű bázikus felszínt hoznak létre. Az IpTx_a az A-peptidhez hasonlóan képes kapcsolódni a RyR-hoz, fokozza a rianodin kötést, és SR vezikulákból kalcium felszabadulást indukál. Az IpTx_a rianodin receptoron kifejtett hatása különbözik az A-peptid hatásától. Az A-peptid a RyR maximális vezetőképességének 65-85%-ának megfelelő rövid ideig tartó szubkonduktancia állapotokat és hosszantartó zárt állapotokat hoz létre. Ezzel szemben az IpTx_a -40 mV-os tartófeszültségen a maximális áramamplitúdó $\approx 43\%$ -ának, míg +40 mV-on a maximális áramamplitúdó $\approx 28\%$ -ának megfelelő hosszantartó szubkonduktancia állapotokat (LLSS) okoz (9. ábra).



9. ábra Az IpTx_a szubkonduktancia állapotot indukál RyR1-en (Tripathy és Meissner, 1998.).

Az IpTx_a-indukált csökkent vezetőképességű állapotok megjelenési gyakorisága -60 mV-on igen alacsony, kevésbé negatív illetve pozitív (+40-60 mV) tartófeszültségen a szubkonduktancia állapotok megjelenési gyakorisága fokozatosan nő, ami arra utal, hogy az IpTx_a hatása feszültség- és polaritás-függő (Tripathy és munkatársai, 1998). Az A-peptid jelenlétében az IpTx_a indukált rianodin kötés mértéke dózisfüggő módon csökken, ami arra utal, hogy a két peptid verseng a kötőhelyekért (Gurrola és munkatársai, 1999). A RyR-on ugyanahhoz a kötőhelyhez kapcsolódnak, de különböző affinitással: az IpTx_a már nanomólos koncentrációtartományban aktiválja a RyR-t, míg az A-peptid csak mikromólos koncentrációban alkalmazva fejt ki hatását. A kompetíciós kísérlet arra utal, hogy a kötőhely azonos ez mégis meglepő, mert az A-peptid aminosav szekvenciája csak 18%-ban azonos az IpTx_a szekvenciájával, és harmadlagos szerkezetük is jelentősen különbözik. Ha az A-peptid vagy az IpTx_a bázikus klaszteréhez tartozó valamelyik aminosavat töltetlenre cseréljük le, akkor hatásuk jelentősen csökken. Az IpTx_a-nál a rianodin receptorhoz való kötődésében valószínűleg a Lys¹⁹-Arg²⁴ szegmensnek van kulcsszerepe. Azonban a helyes szekvencia önmagában nem elég, a kötődéshez és a hatás kialakításához megfelelő másodlagos szerkezet is szükséges (10. ábra, 16. oldal). Ennek kialakításában bírnak fontos szereppel a peptidben található diszulfid hidak.

Az IpTx_a másodlagos szerkezete jelentősen eltér az A-peptidétől a Lys²⁰-Arg²³ és a Lys³⁰-Arg³³ két, antiparalel 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 nagy felületű bázikus felszínt alkotnak. Ezt a térbeli szerkezetet három diszulfidhíd stabilizálja, melyek a Cys3-Cys17, Cys10-Cys21, Cys16-Cys32 oldalláncok között alakulnak ki. Az affinitásbeli különbséget – az IpTx_a nanomólos az A-peptid mikromólos tartományban hat – tehát szerkezeti eltérések indokolják. A szekvencia homológiájából kiindulva valószínű, hogy a két peptid a RyR-hoz több helyen kapcsolódik, amelyek átfedőek lehetnek. A RyR-on elhelyezkedő A-peptid kötőhely valószínűleg egy olyan területhez tartozik, amely az imperatoxin-A kötődéséért is felelős, így affinitásbeli és az aktiváció módja közötti különbséget eredményez (Lee és munkatársai, 2004).

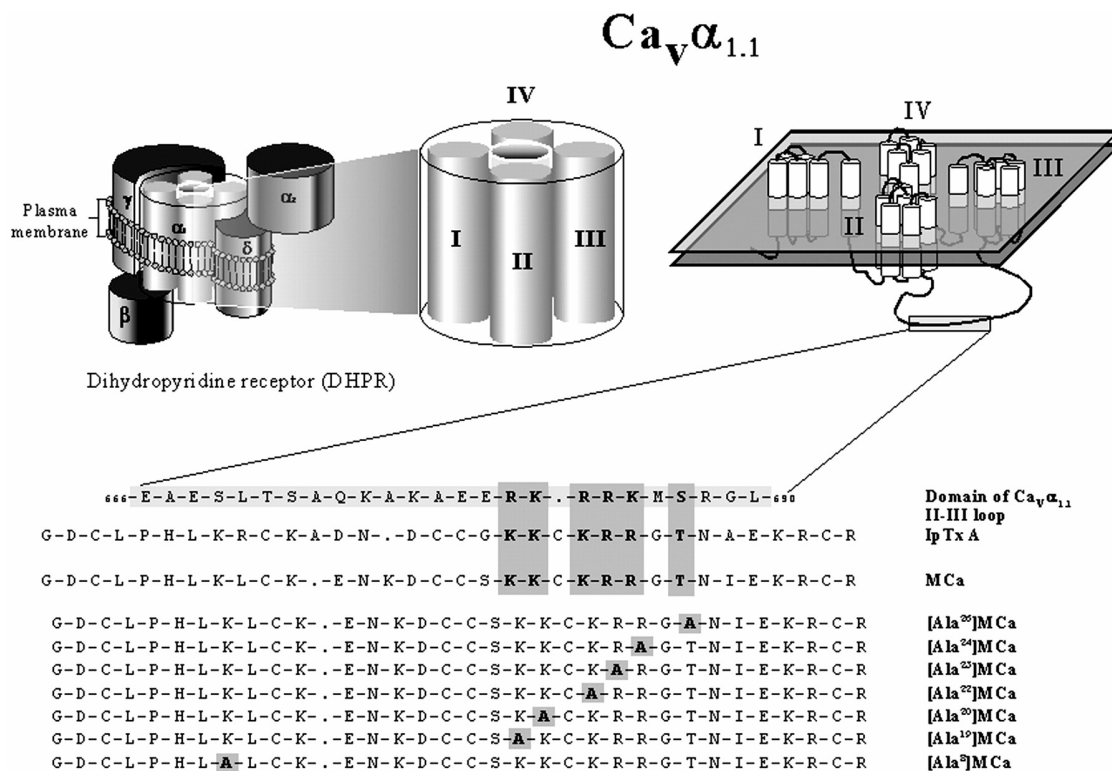


10. ábra Az A-peptid, a maurokalcin és az IpTx_a térbeli szerkezete és szekvenciája (Lee és munkatársai, 2004.)

2.3.4. A maurokalcin hatása

A maurokalcin (Mca) a *Scorpio maurus palmatus* mérgéből nemrég (Fajloun és munkatársai, 2000) izolált 33 aminosavból álló peptid (11. ábra, 17. oldal). A 3 diszulfid hidat (Cys3-Cys17, Cys10-Cys21, Cys16-Cys32) tartalmazó toxinban a 9-11, 20-23, 30-33 aminosavak β -lemez szerkezetet képeznek. A maurokalcin erősen bázikus (fiziológiás pH: +7): a 33 aminosavból 12 pozitívan töltött (terminális Gly, 7 db Lys, 4 db Arg). Az Mca tartalmaz még 4 db negatív aminosavat is, de a bázikus aminosavak túlsúlya miatt a nettótöltés így is pozitív. A felszíni töltésmintázat alapján a molekula felszínén egy markáns bázikus mező jelenik meg, aminek kialakításában a pozitív töltésű aminosavak vesznek részt. A molekula többi része hidrofób, ami azt jelenti, hogy a Mca erősen polarizált (Mosbah és munkatársai, 2000). Szekvenciáját tekintve 82%-ban megegyezik (10. ábra) a *Pandinus imperator*-ból izolált imperatoxin A-val (IpTx_a), és jelentős homológiát mutat a P-, illetve N-típusú kalciumcsatorna-

blokkoló ageleninnel (*Agelena opulenta*), Tx2-9 toxinnal (*Phoneutria nigriventer*) és ω -conotoxinnal (*Conus magus*). A struktúrát tekintve a legnagyobb különbség a M Ca és az IpTx $_{\alpha}$ között, az N-terminális közelében található, ahol a maurokalcin egy plusz felszíni β -lemezzel rendelkezik. A maurokalcin és az imperatoxin-A között nemcsak szerkezetükben, hanem hatásukban is átfedés mutatkozik, ugyanis mind a M Ca mind az IpTx $_{\alpha}$ már nanomólos koncentrációban aktiválják a rianodin receptort, tehát a strukturális különbségek ellenére az aktív működéshez szükséges aminosavak térbeli elrendeződése mégis lehetővé teszi ugyanazon receptorhoz való kötődésüket. Az M Ca bizonyos szekvencia homológiát mutat az A-peptiddel is, viszont a DHPR és a RyR közötti kapcsolat kialakításában meghatározó szerepet játszó domén szerkezete (N-terminális végén egy α -hélix) különbözik mind a maurokalcinétól, mind az imperatoxin A-tól. A maurokalcin, IpTx $_{\alpha}$ és A-peptid közötti szekvencia homológia mellett úgy tűnik, hogy a M Ca és az IpTx $_{\alpha}$ β -lemez szerkezete utánózni próbálja az A-peptid α -hélix szerkezetét. Az irodalmi adatok alapján valószínű, hogy a maurokalcin, IpTx $_{\alpha}$ és A-peptid hasonlóan módosítják a RyR működését.



11. ábra A maurokalcin vad típusa és mutáns változatai (Esteve és munkatársai, 2004)

Vázizom esetében, a maurokalcin fő támadáspontja az I-es típusú RyR. Chen és munkatársai kimutatták, hogy a maurokalcin koncentrációfüggő módon aktiválja a kalcium felszabadulást SR vezikulákból ($EC_{50}=17,5$ nM), a toxin hatását a rianodin ($500\text{ }\mu\text{M}$) és a ruténium vörös ($5\text{ }\mu\text{M}$) gátolta. Továbbá leírták, hogy a maurokalcin koncentrációfüggő módon aktiválja ($EC_{50}=1,2$ nM) a rianodin kötést (Chen és munkatársai, 2003). A maurokalcin és az A-peptid eltérő mechanizmusok útján aktiválják a RyR-t. A receptorhoz való kötődésük következtében az SR-ből történő Ca^{2+} -felszabadulást tekintve látszólag antagonistikus hatásúak. Az A-peptid gátolja a Ca^{2+} , a koffein és a maurokalcin által indukált Ca^{2+} felszabadulást az SR-ből (Chen és munkatársai, 2003), valamint az A-peptid a maurokalcin korábban már említett rianodin kötést aktiváló hatását koncentráció függő módon a B_{max} csökkentésével gátolja (Chen és munkatársai, 2003).

Korábban munkacsoportunk közreműködésével sikerült kimutatni, hogy a MCa izolált csatornán („single channel”) feszültség clamp körülmények között egy úgynevezett szubkonduktancia (csökkent vezetőképességű) állapotot hoz létre, melynek vezetőképessége a teljes konduktancia mintegy 60%-a (Chen és munkatársai, 2003; Esteve és munkatársai, 2004). A maurokalcin hatékonysága egy nélkülözhetetlen aminosavnak, az Arg^{24} -nek köszönhető, melynek hiányában a toxin kalcium csatornát aktiváló hatása elmarad (Esteve és munkatársai, 2004). Intézetünk másik munkacsoportja kimutatta, hogy a MCa myotubulus tenyészetben a rianodin receptoron keresztül kalcium felszabadulást okoz, de nem befolyásolja a depolarizáció által kiváltott kalcium tranzienseket. Viszont a MCa nem indukál kalcium felszabadulást illetve kalcium “release” eseményeket intakt felnőtt sejteken. Ezzel szemben a szaponin kezelt felnőtt izom sejteken a MCa-nak kettős hatása volt, először növelte a kalcium “release” események frekvenciáját majd növelte a hosszantartó emberek megjelenésének gyakoriságát (Szappanos és munkatársai, 2005).

A RyR1-ben két olyan szakaszt is találtak (F3: 1021-1631, F7: 3201-3661), melyhez a maurokalcin és az A-peptid is képes kötődni. A két peptidet nagyobb affinitással kötő F7 szakasz további vizsgálata során a kötődésért felelős szakaszt pontosabban is sikerült meghatározni (F7.2: 3351-3507). Az azonos kötőhely meglétét erősíti az az eredmény is, hogy az A-peptid kötődését az F7.2 fragmentumhoz a MCa gátolta. A DHPR-RyR közötti kapcsolat kialakításában az F3 és F7 valószínűleg mint funkcionális domén vesz részt, ezt a feltételezést a RyR1 háromdimenziós

modellezése során kapott adatok is alátámasztják, ami szerint a RyR1 tetramerben az F3 és F7 szegmentumok térben egymáshoz közel helyezkednek el (Altafaj és munkatársai, 2005).

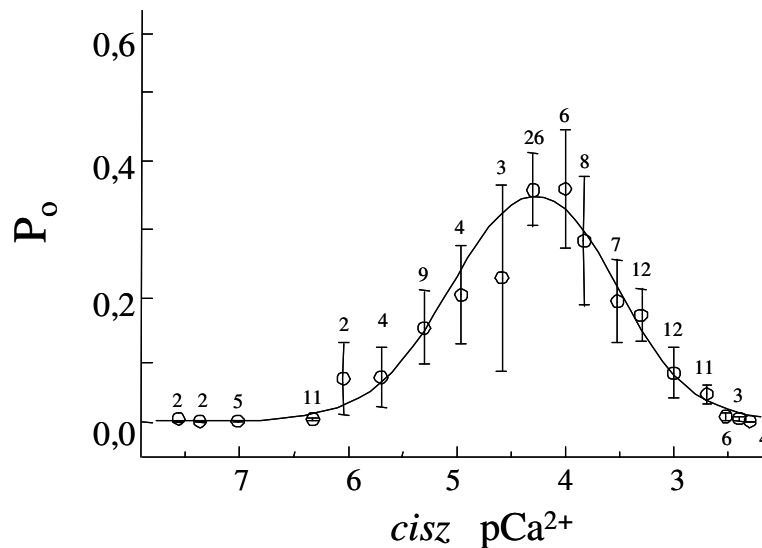
Kollaborációs partnereink (Esteve és munkatársai, 2005) kimutatták, hogy a MCa annak ellenére, hogy töltött peptidről van szó, az úgynevezett sejt-penetráló peptidekhez (CPP) hasonlóan képes passzív módon átjutni a biológiai membránokon és bejutni különböző típusú sejtekbe. Ezekre a peptidekre jellemző, hogy kis méretűek, erősen töltöttek, különféle típusú sejtbe képesek bejutni, a penetráció gyors és nem igényel energiát (valószínűleg nem endocitózisról van szó) és sejtfelszíni receptorokat a penetrációhoz nem igényelnek. A maurokalcin bejutásában valószínűleg alapvető szerepe van a természetes membránokban nagy mennyiségben előforduló negatív töltésű lipideknek a gangliozidoknak. Feltehetően a membrán külső felszínén megjelenő negatív töltésű lipid kapcsolódik a pozitív töltésű maurokalcinnal, elektromosan „semlegesíti” a toxint, és a membrán belső oldalára fordulva a maurokalcint az intracelluláris térbe juttatja (Boisseau és munkatársai, 2006). A maurokalcin belépése a sejtbe feszültségfüggő; az extracelluláris tér káliumkoncentrációjának emelésével (membrán-depolarizáció) egyre kevesebb maurokalcin lép be a sejtekbe. A rianodin receptorra gyakorolt hatása ellenére semmilyen toxikus hatást nem sikerült kimutatni HEK293 sejteken. A maurokalcin ezen kívül képes nagy méretű nem membránpermeábilis molekulákat is átjuttatni a membránon, ami felveti a maurokalcin illetve származékainak orvosi, diagnosztikai, gyógyszer-technológiai alkalmazásának lehetőségét.

2.4. A kalcium csatorna endogén modulációja

2.4.1. Divalens ionok

Az egyetlen csatornán („single channel”) végzett mérések alapján a *cisz* (SR citoplazmatikus oldala) Ca^{2+} koncentráció függő módon befolyásolja a csatorna aktivitását (12. ábra, 20. oldal): szubmikromoláris koncentrációban a csatornák nyitvatartási valószínűsége (P_o) közel nulla, mikromoláris koncentrációban aktiválja, millimoláris koncentrációban gátolja a kalcium felszabadulást (Smith és munkatársai, 1986; Ma és munkatársai, 1988). Ennek alapján feltételezik egy Ca^{2+} iránt nagy affinitással bíró aktivációs, és egy alacsonyabb affinitású, inaktivációs kalcium kötőhely jelenlétét. A lumenális kalcium szabályozó hatását valószínűleg a

citoplazmatikus oldalon fejti ki úgy, hogy a kalcium átjut a csatornán és kötődik az aktiváló illetve az inaktiváló kötőhelyhez. A Ca^{2+} mellett a Sr^{2+} is aktiválja, míg a Ba^{2+} és Mg^{2+} gátolja a csatornát (Jóna és munkatársai, 2001; Meissner és munkatársai, 1986). Utóbbi hatását összetett mechanizmus révén valósítja meg. Verseng a kalciummal a nagy affinitású (aktivációs) kalcium kötőhelyekért, és arról leszorítva a kalciumot gátolja a csatorna működését, vagy ugyancsak verseng a kalciummal az alacsony affinitású (inaktivációs) kalcium kötőhelyekért.

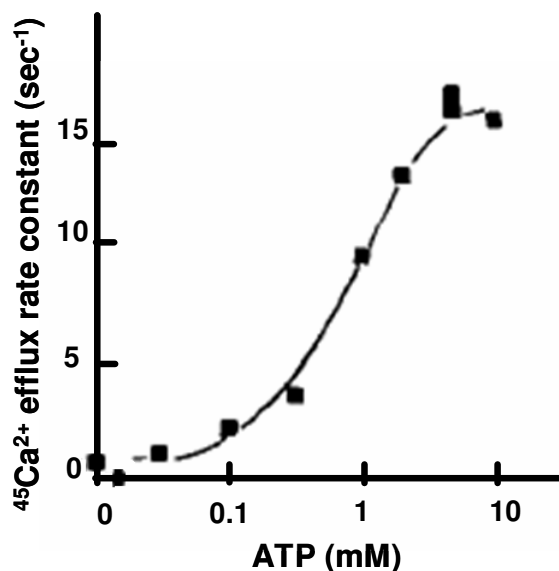


12. ábra A RyR1 kalciumfüggése. A szubmikromoláris koncentrációban a csatornák nyitvatartási valószínűsége (P_o) közel nulla, mikromoláris koncentrációban a kalcium aktiválja, millimoláris koncentrációban gátolja a RyR1-et (Sárközi és munkatársai, 2000).

2.4.2. Adenin nukleotidok

A legtöbb sejt citoszóljában az ATP (kötött és nem kötött) koncentrációja néhány mM. Izolált csatornán végzett mérések szerint az ATP növeli a kalcium csatorna nyitvatartási valószínűségét (P_o) és átlagos nyitvatartási idejét (τ_o) (Jóna és munkatársai 2001), valamint a kalcium felszabadulás sebességét (13. ábra, 21. oldal) is SR vezikulákból (Moutin és Dupont, 1988). A különböző izoformákat az ATP eltérő mértékben aktiválja, például ATP hatására a RyR1 jobban aktiválódik, mint a RyR2 vagy a RyR3. Mivel az adenin, adenosin és adenin nukleotidok (ATP, ADP, AMP) – bár eltérő mértékben, de – aktiválják a RyR-t, így képesek ellensúlyozni a Mg^{2+} -gátlást fiziológiás körülmények között. Maximális csatorna aktiváció tapasztalható μM -os kalcium és mM-os ATP jelenlétében (Moutin és munkatársai, 1988).

Lényeges hogy az ATP aktiváló hatása nem a csatorna foszforilációján alapszik, mivel egyéb adenin nukleotidok ADP, AMP, cAMP, adenzin, adenin is aktiválják, míg CTP, GTP, ITP, UTP nincs hatással a csatornára (Meissner és munkatársai, 1984). Valószínűleg a Mg-ATP jelentősebb fiziológiai regulátor mint a szabad ATP, hiszen a sejtekben előforduló nukleotidok döntő többsége Mg^{2+} -komplex formájában van jelen.

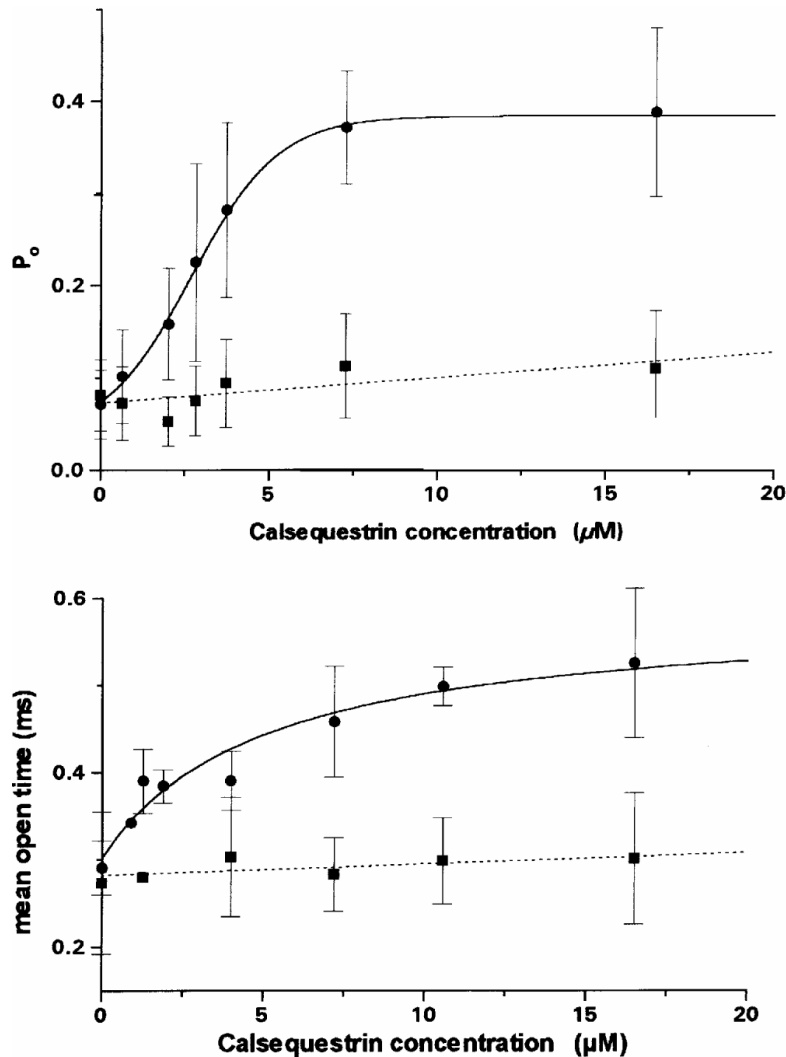


13. ábra Az ATP koncentrációfüggő módon növeli a kalcium felszabadulás sebességét SR vezikulákból (Moutin és munkatársai, 1988).

2.4.3. Kalszekvesztrin

A kalszekvesztrin (CSQ) egy 44-67 kDa molekulatömegű Ca^{2+} -kötő savas glikoprotein, mely az SR lumenében, a terminális ciszternában található. A kalszekvesztrin nagy kapacitással, de kis affinitással köti a Ca^{2+} -t. Egy kalszekvesztrin molekula mintegy 40-60 Ca^{2+} -t köt meg, a kötőhelyek affinitása 1 mM körüli K_d -vel jellemezhető. A fehérje kalcium pufferként gátolja meg a túl magas intraluminális kalcium koncentráció kialakulását; az adott K_d mellett ugyanakkor lehetőség van arra, hogy a kalcium felszabadulás megindulásakor a kötött kalcium könnyen disszociáljon és a továbbiakban rendelkezésre álljon. Így az egymást követő akciós potenciálok hatására mindig azonos mennyiségű Ca^{2+} szabadul fel a közel állandó luminális kalcium koncentráció miatt. A luminális Ca^{2+} -koncentráció emelkedésével a CSQ polimerizálódik (Wang és munkatársai 1992) és fiziológiás luminális Ca^{2+} -koncentrációnál (≈ 1 mM) is polimerizált formában van jelen. A CSQ konformációja a nagy mennyiségű Ca^{2+} -kötése és liberációja

következtében is változik, ami arra utal, hogy az EC-kuplung alatt kialakuló szignál eljut a fehérjéhez, illetve a CSQ részt vesz a kalcium felszabadulásban (14. ábra).



14. ábra A kalszekvesztrin defoszforilált (folytonos vonal) formája növeli a lipid kettősrétegbe épített RyR1 nyitvatartási valószínűségét (P_o , felső panel) és átlagos nyitvatartási idejét (mean open time, alsó panel). A foszforilált kalszekvesztrin (szaggatott vonal) nem módosítja szignifikánsan az említett paramétereket (Szegedi és munkatársai, 1999).

A CSQ vázizom SR vezikulán (RyR + asszociált fehérjék) valószínűleg az asszociált fehérjéken keresztül gátolja a RyR-t (Beard és munkatársai 2002). A Ca^{2+} -koncentráció emelésével viszont a CSQ ledisszociál a RyR-triadin-junctin komplexről, és a csatorna aktivitása nő. Annak ellenére, hogy a CSQ gátolja a natív RyR-t, az egyedi csatornán végzett kísérletek

(nincs jelen a triadin és a junctin) arra utalnak, hogy a CSQ direkt módon kötődik a RyR-hoz és aktiválja azt. A CSQ hatásában az asszociált proteinek jelenlétén kívül a fehérje foszforiláltsági állapota is meghatározó: csak a defoszforilált formája aktiválja a csatornát, míg a foszforilált formának nincs semmilyen hatása (Szegedi és munkatársai, 1999). A kalszekvesztrin-indukált RyR-aktivációnak – annak ellenére, hogy a kalszekvesztrin a sejtekben foszforilált állapotban van jelen – nagy fiziológiai jelentősége van, mert a fehérje 1%-ának defoszforilálása már érzékelhetően módosítja a csatorna kapuzási paramétereit (Herzog és munkatársai, 2000).

2.4.4. FK-506 kötő fehérje

Az FKBP számos szövetben előforduló, a fehérjék harmadlagos szerkezetének kialakításában és stabilizálásában szerepet játszó, peptidylpropyl-cisz-transz izomeráz aktivitású enzim. Két izoformája ismert: FKBP12 (vázizomban) és FKBP12.6 (szívizomban). Az FK506 immunosuppresszív hatása az FKBP és más fehérjék kapcsolatának módosításán és az FKBP izomeráz aktivitásának gátlásán alapszik. A RyR tetramer sztöchiometrikus arányban köti az FKBP molekulákat, tehát egy RyR-tetramerhez négy darab FKBP kapcsolódik, melyek immunofillinek (FK506, rapamicin és ciklosporin A) hatására disszociálnak le a csatornáról. Fiziológiai jelentőségét bizonyítja, hogy az FKBP hiánya az élettel összeegyeztethetetlen, hiszen az FKBP-hiányos állatok súlyos idegrendszeri rendellenességek miatt már embrionális korban elpusztulnak. Izomban betöltött szerepére utal, hogy az ilyen állatokból származó izomrostok kontraktilitása csökkent mértékű. Izolált, FKBP-mentesített csatornák áramregisztrátumán – a fiziológiásan megjelenő zárt és nyitott állapot mellett – több eltérő szubkonduktancia állapot jelenik meg (O'Reilly és munkatársai, 2002). FKBP adását követően viszont a csatornák visszanyerik megszokott kapuzási paramétereiket. Ezért azt feltételezik, hogy az FKBP „szinkronizálja” a RyR alegységeinek működését, azaz biztosítja azt, hogy a csatorna négy alegysége koordinált módon alakítsa ki a nyitott és zárt állapotot. Ugyanakkor valószínű, hogy az FKBP12 nem csak a RyR négy fehérjealegységét hangolja össze, hanem a szomszédos rianodin receptorok működését is, lehetővé téve ezzel egyidejű nyílásukat, záródásukat (Fill és Copello, 2002).

2.4.5. Triadin és junctin

A triadin az SR-membrán 95 kDa nagyságú integráns glikoproteinje. Négyféle, alternatív splicinggal keletkező változatát azonosították. Klónozásakor kiderült, hogy 706, többségében bázikus oldalláncú aminosavból áll, és egy transzmembrán doménnal rendelkezik. C-terminálisa kapcsolatot létesít a rianodin receptorral és a kalszekvesztrinnel, a citoplazmatikus oldala pedig valószínűleg a DHPR α_1 alegységével (MacKrell és munkatársai, 1999). A junctin egy 26 kDa tömegű, 210 aminosavból felépülő pozitív töltésű fehérje, mely nagyfokú szekvencia homológiát mutat a triadinnal. A triadinhoz hasonlóan a junctin is csak egy transzmembrán doménnal rendelkezik. A molekula citoplazmatikus végét rövid, 22 aminosavból álló N-terminálisa alkotja (MacKrell és munkatársai, 1999). A RyR, a junctin, a kalszekvesztrin és a triadin valószínűleg egy multi-protein komplex formájában van jelen, ahol a triadin és a junctin kapcsolódása poláros csoportjaik ionos kölcsönhatásával valósul meg (Carl és munkatársai, 1995). A Ca^{2+} -felszabadulás és -raktározás finoman szabályozott és összehangolt mechanizmusa bizonyára ennek a multi-protein komplexnek az épségét is igényli.

2.4.6. Kalmodulin

A kalmodulin hatása nagyon összetett, mert nem csak a kalmodulin-dependens protein kinázon keresztül, hanem közvetlenül a rianodin receptoron is hat. Hatása Ca^{2+} -függő, és kettős: alacsony Ca^{2+} -koncentrációnál ($<0,1 \mu\text{M}$) aktiválja a RyR1-t, ennél magasabb ($>0,2 \mu\text{M}$) Ca^{2+} -koncentrációnál gátolja. Ez a kettős hatás valószínűleg annak az eredménye, hogy a kalmodulin különböző Ca^{2+} -koncentrációnál más kötőhelyekhez kötődik. A kalmodulinnak a RyR1-en három kötőhelyét mutatták ki. Ezek a PM1-nek, PM2-nek és PM3-nak nevezett kötőhelyek a 2937-3225, 3610-3629, és 4534-4552 aminosavak közötti szakaszoknak felelnek meg, melyek a negyedleges szerkezetű csatorna periferiáján, a pórus szájától hozzávetőlegesen 10 nm-re helyezkednek el (Menegazzi és munkatársai, 1994). A PKA foszforilációs helyet tartalmazó PM1 kötőhely foszforilálása megakadályozza a CaM kötődését (MacKrell és munkatársai, 1999; Tanq és munkatársai, 2002; Meissner és munkatársai, 2004). A kalmodulin közvetett módon, a kalcineurin aktiválásával is hat a csatornára. A CaM közel $2 \mu\text{M}$ koncentrációban van jelen a citoplazmában, ezért fiziológiai jelentősége nem elhanyagolható.

2.4.7. Foszforiláció, defoszforiláció

Már a RyR elsődleges szerkezete is utal arra, hogy a csatorna foszforiláltsági állapota alapvetően meghatározza a csatorna működését. A RyR1 foszforilációs helyeinek foszforilálását a cAMP-dependens protein kináz (PKA), a Ca^{2+} -dependens protein kináz (PKC), a cGMP-dependens protein kináz (PKG) és a kalmodulin-dependens protein kináz II (CaMKII) végzi. A kinázok lehetséges támadáspontja a négy szerin és két treonin oldallánc. A PKA, PKC és a PKG a RyR 2842. szerinjének foszforilálásával növeli a csatorna nyitvatartási valószínűségét, míg a CaMKII gátolja a RyR1-t (MacKrell és munkatársai, 1999). A fehérjék foszforilációval történő hatékony szabályozása a protein kinázok mellett foszfatázok működését is megköveteli. A RyR szabályozásában résztvevő foszfatáz a calcineurin, vagy más néven protein foszfatáz 2B.

2.5. A csatorna exogén modulációja

2.5.1. Rianodin

A rianodin az α -pyrol-karbonsav és a ryanodol észtere, a *Ryania speciosa* szárában és gyökerében található növényi alkaloida, mely specifikusan kötődik a rianodin receptorhoz, feltételezések szerint annak nyitott állapotához (15. ábra).



15. ábra A rianodin kötődik a RyR-hoz és a kontroll („A” panel) maximális konduktanciájához képest félig nyitott állapotban tartja a csatornát („B” panel).

A rianodin már nanomoláris koncentrációban kötődik a csatornához, és a kontroll maximális konduktanciájához képest félig nyitott állapotban tartja a rianodin receptort. A rianodin-kötőhelyek valószínűleg a „foot” régió 4475-ik (Arg) aminosava és a karboxi terminális közötti fehérjeszakaszon található. A csatorna megfelelő kötőhelyeivel a rianodin pyrol- és izopropyl-csoportjai lépnek kapcsolatba. (Zucchi és Ronca-Testoni, 1997; Fill és munkatársai, 2002) Kimutatták, hogy az említett szubnormális hosszantartó nyitott állapot (szubkonduktancia állapotok) már 5-40 nM rianodin koncentrációnál megjelennek, míg az 50 nM-nál nagyobb koncentrációban alkalmazott rianodinnál ez az állapot állandósul, és irreverzibilissé válik. 70 μM és 200 μM rianodin a kontroll nyitott állapot 25%-ának megfelelő hosszantartó nyitott állapotokat okoz, majd 200 μM -nál nagyobb koncentrációban alkalmazva a rianodin teljesen bezárja a csatornát. Rianodinra a RyR Hill-koefficiense 2, tehát a RyR két rianodin-kötőhellyel rendelkezik: a rianodin a nagy affinitású kötőhelyhez kötődve szubkonduktancia állapotban blokkolja a Ca^{2+} -csatornát. Ilyenkor valószínűleg részlegesen eltömíti a RyR pórusát. Magasabb koncentrációnál a rianodin valószínűleg alacsony affinitású kötőhelyekhez kötődve a RyR konduktanciájának további csökkenését okozza, majd rövid átmeneti állapot után teljesen bezárja. A rianodin a fent leírt mechanizmusokkal a váz- és szívizom bénulását okozza. Ismert volt ugyan, hogy a rianodin a vázizomnál rigid paralízist, a szívizom esetén pedig flaccid paralízist idéz elő, de az eltérés okát sokáig nem tudták megmagyarázni. Később világossá vált, hogy a rianodin miatt az SR-ből felszabaduló Ca^{2+} -kat a szívizomsejt a felszíni membránjában elhelyezkedő $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ exchangerrel gyorsan eltávolítja az intracelluláris térből, ezért a belső Ca^{2+} -raktárak hamar kiürülnek, és a szívizom flaccid paralízise a Ca^{2+} -hiány miatt következik be. Ezzel szemben a vázizom szarkolemmájában nincsenek gyors Ca^{2+} -eltávolító elemek, és a folyamatos rianodin-indukált Ca^{2+} -felszabadulással az SR Ca^{2+} -pumpa önmagában nem képes lépést tartani, ezért a Ca^{2+} felhalmozódik a szarkoplazmában, ami a vázizom rigid (merev) bénulásához vezet. A szív felszíni Ca^{2+} -kicserélő mechanizmusaival magyarázható az is, hogy a szívizomra a rianodinnak (a rianodin-indukált Ca^{2+} -felszabadulás miatt) először pozitív, majd (a raktárak kiürülése és a citoplazma Ca^{2+} -koncentrációjának csökkenése miatt) negatív inotróp hatása van.

2.5.2. Metilxantinok

A koffein aktiválja a kalcium felszabadulást az SR-ből, valamint izolált csatornán növeli a RyR1 és RyR2 nyitvatartási valószínűségét, miközben nem módosítja a csatorna konduktanciáját.

Aktiváló hatását a magnézium és a ruténium vörös gátolja. A koffein P_o -növelő hatását a Ca^{2+} -aktivációs helyek érzékenységeinek fokozásával éri el. Erre utal az is, hogy a 0,5-2 mM koncentrációban alkalmazott koffein μM körüli Ca^{2+} -koncentrációnál váltja ki aktiváló hatását, míg 5-10 mM-os koncentrációban alkalmazva már szubmikromólos Ca^{2+} -koncentrációnál is folyamatosan nyitva tartja a rianodin receptort (Zucchi és munkatársai, 1997). A többi metilxantinnek a koffeinhez hasonló hatása van. A metilxantinok hatásossági sorrendje a következő: 1,7 methylxanthin > theobromin $\approx$ theophyllin > koffein $\approx$ 3,9 dimethylxanthin.

2.5.3. Fenolszármazékok

Korábban munkacsoportunk is vizsgálta számos természetes fenolszármazék Ca^{2+} -pumára és RyR-ra gyakorolt hatását vezikuláris rendszeren (HSR, LSR) és izolált RyR-on. Kimutattuk hogy a vizsgált vegyületek mindegyike – bár eltérő mértékben – gátolta a Ca^{2+} -pumpa aktivitását, míg a vizsgált anyagok közül csak a thymol és a karvakrol aktiválta az SR kalcium felszabadulást. Utóbbi két vegyület hatását megvizsgáltuk izolált RyR1-on („single channel” mérés) is, és kimutattuk, hogy a thymol és a karvakrol aktiválja a kalcium csatornát (Sárközi és munkatársai, 2007). Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a szintetikus fenolszármazékok közé tartozó 4-kloro-m-krezol aktiválja a 3H -rianodin kötést és a $^{45}Ca^{2+}$ -felszabadulást HSR vezikulákon, valamint növeli a mesterséges lipid kettősrétegbe épített RyR1 nyitvatartási valószínűségét (Herrmann-Frank és munkatársai, 1996).

2.5.4. Egyéb modulátorok

A ruténiumvörös a RyR jellegzetes hatású modulátora. Citoplazmatikus oldalon alkalmazva drasztikusan csökkenti a rianodin receptor nyitvatartási valószínűségét, és nagyobb koncentrációnál be is zárja, míg luminális oldalra adva a csatorna konduktanciáját csökkenti. *Helyi érzéstelenítők* közül a procaine és a tetracaine (Csernoch és munkatársai, 1999) a P_o csökkentésén keresztül gátolják a rianodin receptort, míg a lidokain és analógja, a QX314 a P_o módosítása nélkül, csökkent vezetőképességű állapotban blokkolják a csatornát.

2.5.5. Gadolínium

A lantanidák vagy ritkaföldfémek csoportjába a periódusos rendszer 58-71 rendszámú elemeit soroljuk, melyek szoros kémiai hasonlóságot mutatnak egymással. Ennek oka az elemek elektronkonfigurációja, ugyanis a külső elektronhéjak egyformák, azaz az 5d pályán egy elektron, a 6s pályán kettő elektron foglal helyet. A különbség a sorozat elemeiben a maximálisan tizennégy elektront tartalmazó 4f pálya betöltöttségében van. A 4f pálya viszont nem tartozik a külső pályák közé, így annak betöltésének mértéke – ami megkülönbözteti a sorozat elemeit egymástól – a kémiai tulajdonságokat csak kis mértékben módosítja. A sorozat tagjaira jellemző, hogy a rendszám emelkedésével az ionátmérő csökken (lantanida-kontrakció). A lantanidák 3+ pozitív töltésű kationok, méretük a kalciumhoz hasonló. Ebbe a csoportba tartozik a 64-es rendszámú gadolínium, ami a korábban leírt jellemzők mellett kiváló paramágneses tulajdonsággal is bír. A gadolínium bizonyos vegyületei meglepő módon ferromágneses tulajdonságot mutatnak, és egyes vegyületeik az erek falán is könnyen átjutnak ezért az orvostudományban (MR-vizsgálat) alkalmazásuk széleskörben elterjedt. Már a 70-es években leírták, hogy a lantanidák számos élettani folyamatot befolyásolnak, illetve ezek az ionok direkt módon hatnak kalciumot kötő és transzportáló membránfehérjékre. Chevallier és munkatársai már a hetvenes évek elején leírták, hogy vázizomban a gadolínium mikromoláris tartományban képes leszorítani a kalciumot a szarkoplazmatikus retikulum külső membránjáról (Chevallier és Butow, 1971). További vizsgálatok alapján Hambly és munkatársai kimutatták, hogy a lantanidák ionátmérőtől függő módon gátolják a vázizom kontrakcióját, a vizsgált lantanidák közül a legerősebb gátlást a gadolínium mutatta (Hambly és Dos Remedios, 1977). A gadolínium a vázizom kalcium homeosztázisát a szarkoplazmatikus retikulum kalcium pumpáján keresztül is képes módosítani. Jóna és Martonosi leírták, hogy a gadolínium a kalcium kötőhelyeken keresztül gátolja az SR Ca-ATPáz (Jóna és Martonosi, 1986). A gadolínium azon tulajdonságát, hogy képes direkt módon befolyásolni kalciumot kötő és transzportáló membránfehérjéket nemcsak vázizomban, hanem idegsejtekben is leírták. A gadolínium neuroblastoma-glioma hibrid sejteken (NG108-15) mikromoláris tartományban (0,5-20 μM) koncentrációfüggő módon részlegesen gátolja a feszültségfüggő Ca^{2+} -áramot (Docherty, 1988). A gátlás csak részleges volt, a gadolínium rezisztens kalcium áram további két komponenst (lassan és gyorsan aktiválódó) tartalmazott. A gadolínium csatorna-működést moduláló hatását Biagi és munkatársai vizsgálták

endokrin sejteken. Leírták, hogy a gadolínium (50nM-5 μ M tartományban) tobozmirigy sejteken (GH4C1 sejt vonal) gátolja a feszültségfüggő T- és L-típusú kalcium csatornákat (Biagi és Enyeart, 1990).

3. Módszerek

3.1. SR-vezikula preparálása vázizomból

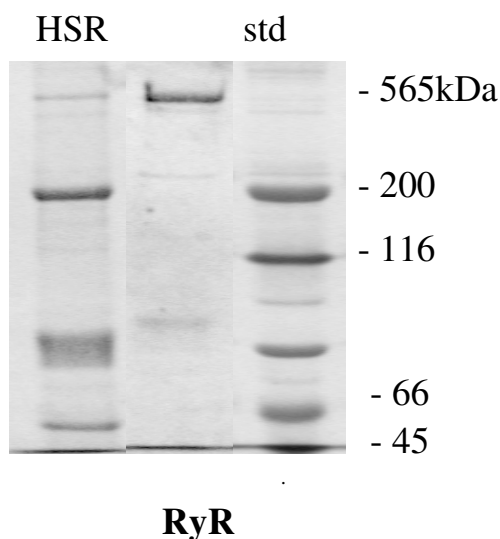
A 2,5-3 kg-os nyulakból származó *musculus longissimus dorsi* eltávolítását követően az izmot desztillált vízből készített jéggel hűtöttük, apróra vágtuk és a kiindulási izomtömegre számított tízszeres térfogatú pufferben (105 mM NaCl, 20 mM Na-HEPES, 0,5 mM EGTA, pH=7,5) késes Waring Blendor homogenizátorral 6x25 másodpercig homogenizáltuk 4°C-on. (A továbbiakban is minden műveletet 4°C-on végeztünk.) A preparálás során használt oldatokhoz a proteolízis elkerülése céljából az alábbi inhibitorokat adtuk: 200µM Pefabloc, 100nM Aprotinin, 1µM Leupeptin, 1µM Pepstatin A és 1 mM Benzamidin. A homogenizálást követően centrifugálással (4500g, 25 perc) távolítottuk el az alakos elemeket. A szupernatansból a mikroszómákat összegyűjtöttük (40000g, 30 perc). Az aktomiozint magas káliumtartalmú (600 mM KCl, 0,1 mM EGTA, 90 µM CaCl₂, 10 mM PIPES, 250 mM szaharóz, pH=7,0) pufferrel oldottuk ki. Az 1 órás inkubálás után a mikroszóma frakciót összegyűjtöttük (109000g, 30 perc). A pelletet 42 mM NaCl, 4 mM K-PIPES és 120 mM szaharózt tartalmazó oldatban reszuszpendáltuk, majd lineáris (20-45 %) szaharóz-gradiensre vittük fel. A centrifugálás (86000 g, 16 óra) után a gradiens 36-38 %-os régiójából gyűjtöttük össze a nehéz vezikulákat (HSR), ahol az jól látható éles frakciót képez. (A HSR vezikula fölött megjelenő diffúz régió a Ca²⁺-pumpát tartalmazó LSR vezikula frakció.) Az összegyűjtött vezikula frakcióhoz kétszerannyi térfogatú puffert (42 mM NaCl, 4 mM K-PIPES és 120 mM szaharóz) adtunk és újból lecentrifugáltuk (60 perc, 124000 g). Centrifugálás után a pelletet 300 mM szaharóz, 10 mM K-PIPES pH=7,00 pufferben reszuszpendáltuk és azonnal lefagyasztottuk cseppfolyós nitrogénben, majd -70°C-on tároltuk további felhasználásig.

3.2. A rianodin receptor izolálása

A szolubilizáció 9 ml térfogatban történt, amiben a fehérje koncentrációja ≈3 mg/ml. A rianodin receptor komplexet az SR membránjából 1 % (v/v) CHAPS detergens segítségével oldottuk ki. A szolubilizációs oldat (1M NaCl, 100 µM EGTA, 150 µM CaCl₂, 5 mM AMP, 5 mg/ml foszfatidil-kolin, 20 mM Na-PIPES, 1mM dithiothreitol, pH 7,2) a detergensen kívül a

HSR vezikula preparálása során alkalmazott proteáz inhibitorok mellett (200 μ M Pefabloc, 100nM Aprotinin, 1 μ M Leupeptin, 1 μ M Pepstatin A és 1 mM Benzamidin) még 1 μ M Calpain I és 1 μ M Calpain II inhibitort is tartalmazott. A szolubilizációs elegy (9 ml) összeállítása után, abból 3 ml-t kivettünk, és azt ^3H -rianodinnal jelöltük (3 nM). A minták (jelölt és nem jelölt) inkubálását (2h, 4°C) követően a nem szolubilizált fehérjéket centrifugálással eltávolítottuk (20 perc, 59000 g). A szupernatanst (3-3 ml) lineáris (10-28%) szacharóz gradiense (1 „hot” + 2 „cold”) vittük fel és kilendülő rotorban (Beckman SW-27) centrifugáltuk (16 óra, 90000 g). A centrifugálás után a gradiensekből 15 cseppek ($\approx$ 500 μ l) frakciókat szedtünk. Az egyes frakciók radioaktivitását folyadék-szcintillátorral meghatároztuk (^3H -rianodinnal jelölt minta) és megmértük a hozzá tartozó törésmutatót is. A beütésszám-csúcs alapján megállapítottuk, hogy milyen törésmutatójú frakcióban dúsult fel a [^3H]-rianodin. A nem jelzett gradiensekből szedett frakciók törésmutatóinak meghatározásával lehetővé válik, hogy a nem jelzett mintákból azokat a frakciókat használjuk a kísérleteinkben, amelyekben a RyR magas koncentrációban van jelen.

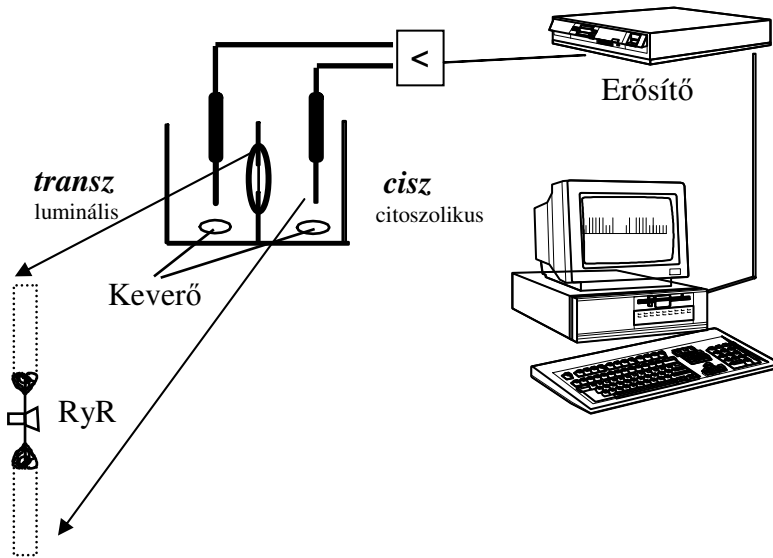
Az így azonosított frakciókból vett mintákat 10 %-os poliakrilamid gélen futtattuk és Coomassie-blue-val festettük (16. ábra). A festődés denzitása szemikvantitatív információt ad a gélen lévő fehérje mennyiségéről és az esetleges szennyeződés (főleg aktomiozin szennyeződés) mértékéről. A RyR-preparátumot a felhasználásig -70°C -on tároltuk (Lai és munkatársai, 1988).



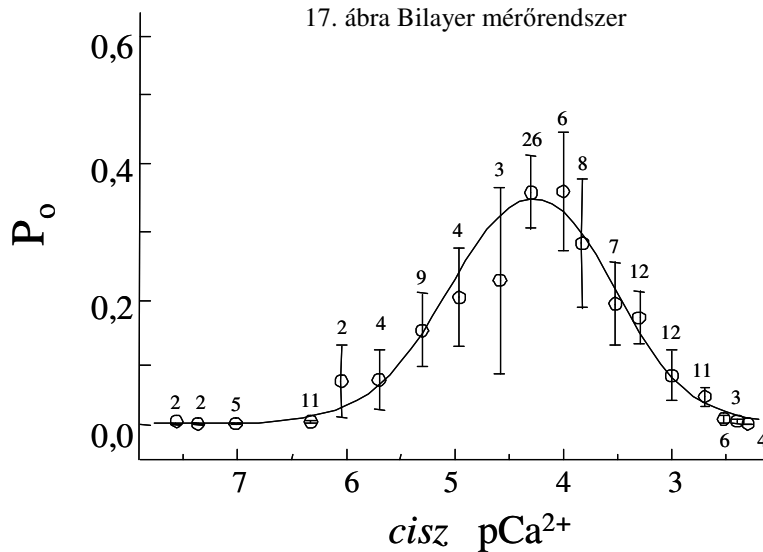
16. ábra A mintákat PAGE gélen megfuttatva ellenőriztük a RyR jelenlétét.

3.3. "Single-channel" mérés

Az izolált Ca^{2+} -csatorna vizsgálatát mesterséges lipid kettősrétegbe épített RyR1-en végeztük, feszültség-clamp körülmények között (17, 18 ábra). Ez a módszer ("single-channel" módszer) egyetlen izolált kalcium csatornán folyó áram mérését teszi lehetővé úgy, hogy közben a csatorna működése a natív környezetben lévő csatornához nagyon hasonló marad, illetve maradhat (19. ábra 33. oldal).



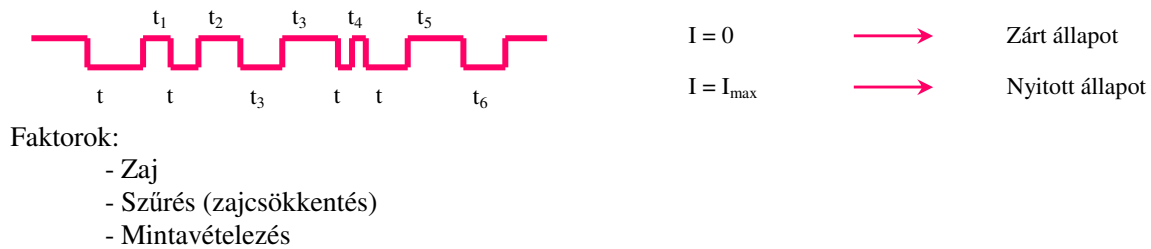
17. ábra Bilayer mérőrendszer



18. ábra A *cisz* Ca^{2+} -koncentráció befolyásolja a RyR nyitvatartási valószínűségét (P_o) (Sárközi és munkatársai, 2000).

A mesterséges membránt L- α -foszfatidiletanolamin, L- α -foszfatidilszerin és L- α -foszfatidilkolin 5:4:1 arányú keverékének 20 mg/ml koncentrációjú *n*-dekános oldatából hoztuk létre, két szimmetrikus folyadékteret elválasztó 250 μ m átmérőjű nyíláson. A lipid kettősréteg kialakulása után az egyik oldalra szolubilizált RyR1-preparátumot adtunk. Ezt az oldalt citoplazmatikus (*cisz*) oldalnak nevezzük, mert a csatorna általában úgy épül be, hogy erre néz a citoplazmatikus "foot" régiója, mely fiziológiai körülmények között közvetlen kapcsolatba lép a DHPR-ral. A másik oldal (*transz*) – amibe az elektromos föld elektróda merül – az SR lumenének felel meg. A RyR1-et a membránba szimmetrikus pufferben (250 mM KCl, 150 μ M CaCl₂, 100 mM EGTA, 20 mM PIPES, pH 7,2) 50 μ M szabad kalcium jelenlétében építettük be.

„Single channel” mérés



A zaj hatása:



A szűrés hatása:



A mintavételezés hatása:

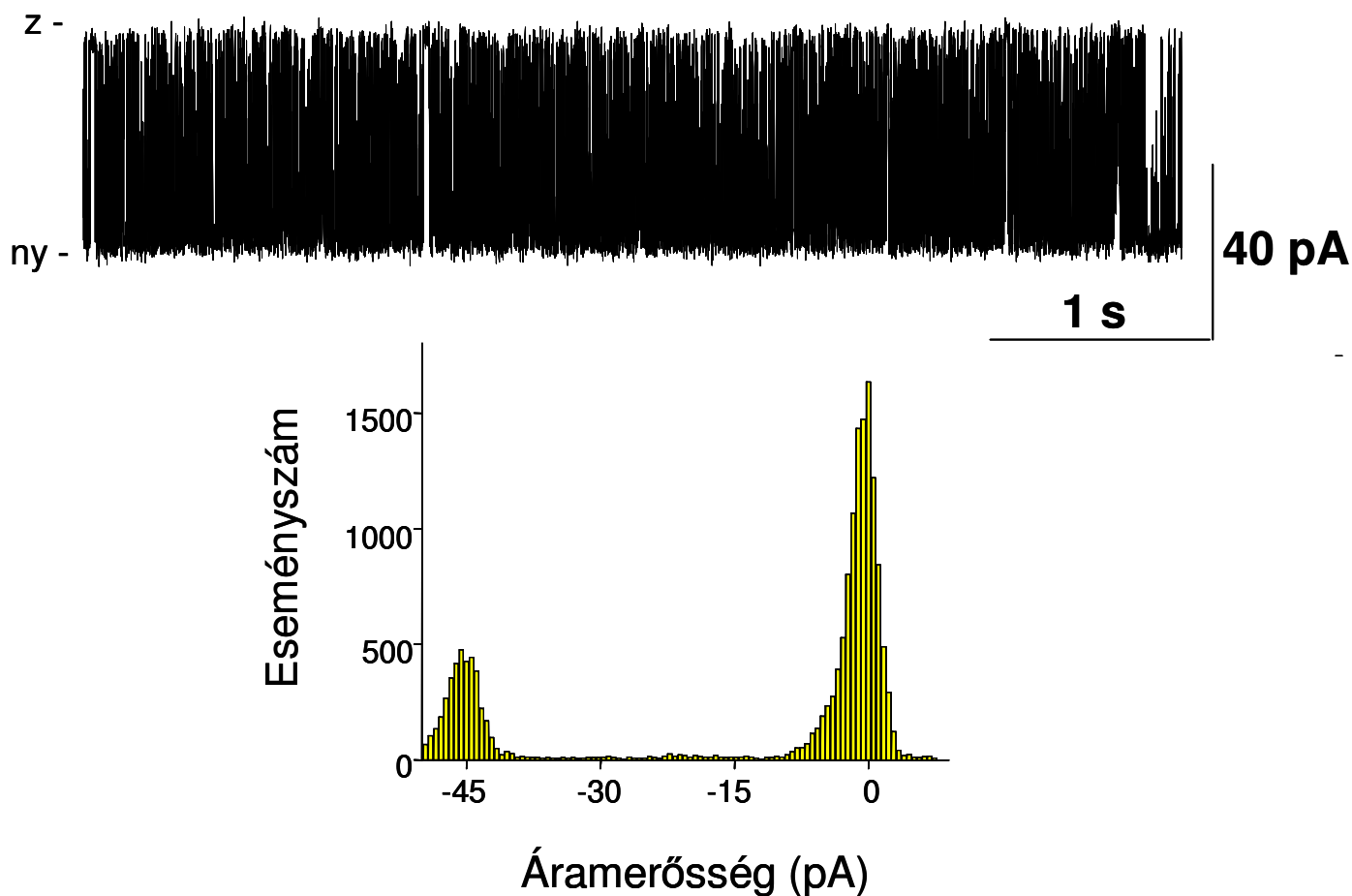


Paraméterek: τ = átlagos nyitva/zárva tartási idő
 P_o = nyitvatartási valószínűség

19. ábra „Single channel” mérést befolyásoló faktorok.

Fontos körülmény, hogy a RyR kalcium csatorna, azaz fiziológiásan Ca²⁺ áramlik át rajta, de ugyanakkor két modulációs kalcium kötőhellyel is rendelkezik. Ezért méréseinkben

töltéshordozóként Ca^{2+} helyett K^{+} iont alkalmaztunk, hogy a Ca^{2+} modulációs hatásai ne zavarják méréseinket. A két oldal között a csatorna aktivitásának mérése közben 40-80 mV potenciálkülönbséget tartottunk fenn. Annak érdekében, hogy a beépült RyR orientációját ellenőrizzük, vagy a *cisz* oldal szabad Ca^{2+} -koncentrációját csökkentettük EGTA-val 238 nM-ra, vagy a mérések végén a *cisz* oldalra rianodint adtunk (20. ábra).



20. ábra Felső panel: A mesterséges lipid kettősrétegbe épített RyR működése során adott tartófeszültségen a zárt (z) és a nyitott (ny) állapot között kapuzik. Alsó panel: A zárt és nyitott állapot arányát reprezentáló ún. “all point” hisztogram.

A membránon átfolyó áramot Axopatch 200 erősítővel mértük, majd 8 pólusú aluláteresztő Bessel szűrővel szűrtük ($f_{co}=1$ kHz). Az elektromos jeleket 3 kHz-es vagy 10 kHz-es mintavételi frekvenciával digitalizáltuk, és számítógépen tároltuk. A mérések során kapott rekordokat pClamp 6.02 programmal analizáltuk. A méréseknél minden egyes kísérleti körülmény regisztrálása 10-20 percig történt. A kísérleti körülmények megváltoztatása után legalább 5 percet vártunk az új egyensúly kialakulására. A „single-channel” méréseket 22 ± 1 °C-on végeztük. A

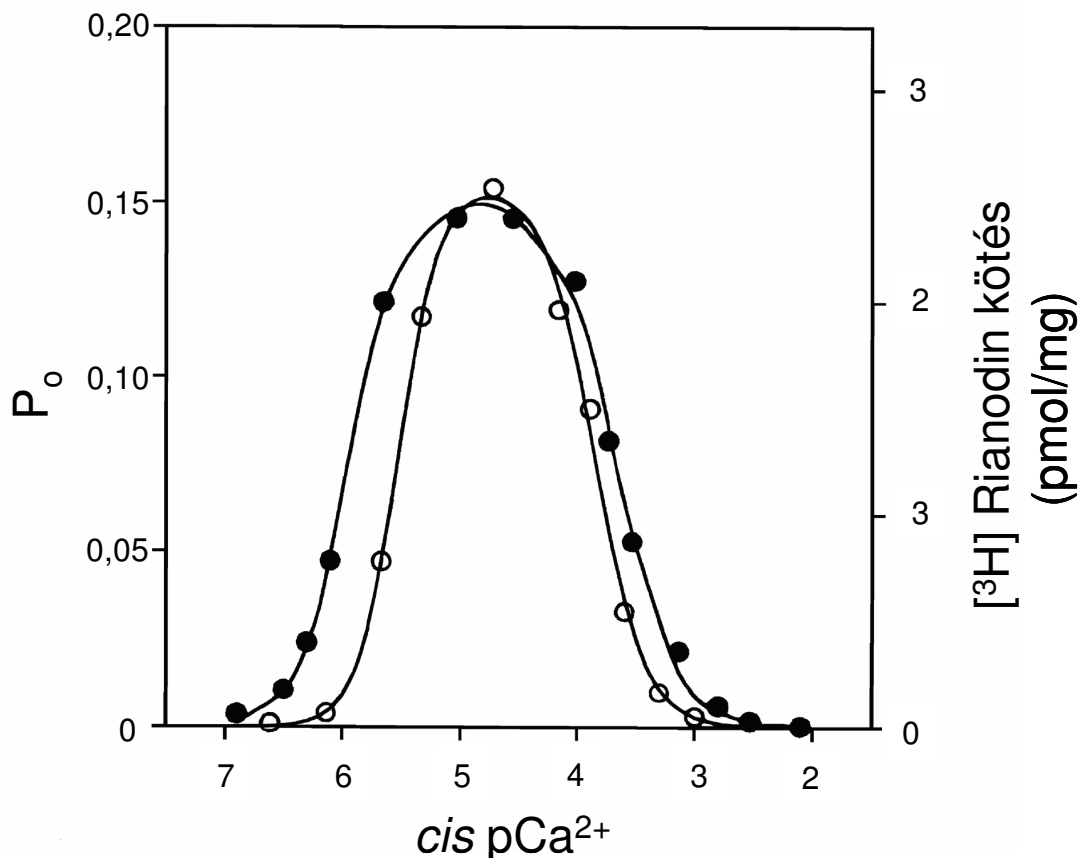
szabad Ca^{2+} koncentrációt a Fabiato által készített abszolút stabilitási állandók alapján az általa készített számítógépes program segítségével számoltuk ki. A nyitvatartási valószínűséget az elfogadott 50%-os kritérium és 5%-os középső holt zóna alapján számoltuk. Az áram-amplitúdó eloszlást Origin (Microcal Software, Northampton, MA) program segítségével vizsgáltuk. Az LLSS arányt az alapján számoltuk, hogy a csatorna idejének hány százalékát töltötte a félvezető állapotban a mérési idő alatt, a számoláshoz Axoscope 10 szoftvert használtunk.

3.4. Rapid filtráció

Ezzel a technikával a rianodin receptort tartalmazó nehéz SR vezikula lumenében lévő kalcium mennyiségére, így a kalcium felszabadulás mértékére tudunk következtetni a kiindulási intraluminális mennyiség ismeretében. A kísérletek során a vezikulákat passzívan (1 órán át, szobahőmérsékleten) töltöttük fel ^{45}Ca izotóppal, az inkubáló oldat 250 mM KCl-ot, 20 mM K/MOPS-ot (pH 7,2) és 5 mM CaCl_2 -ot tartalmazott. A mérés első lépésében a vezikulát tartalmazó oldatot szűrtük „át” a membránon (DA, pórusátmérő: 0,65 μm), ekkor a vezikulák a membrán felületén tapadnak meg, majd lemostuk a vezikula külső felületén adszorbeált ^{45}Ca -ot. A vizsgálandó anyagot tartalmazó oldat, az ún. mérő oldat szűrése előre beállított időtartamig történt (20-30-60-250-stb μs). A mérő oldat tartalmazott 250 mM KCl-ot, 20 mM K/MOPS-ot, 5 mM ADP-t és 5 mM koffeint, az oldat pH-ja 7,2 volt. A gadolínium hatásának vizsgálatokor a mérőoldat 20 μM Gd^{3+} -ot is tartalmazott. Az ADP és a koffein jelenlétére azért volt szükség, mert ilyen körülmények között a csatorna által létrejött kalcium fluxus mértéke lehetővé teszi, hogy valamely anyag aktiváló vagy gátló hatása mérhető legyen. A kontakt időket (Az az időtartam amíg a vizsgált anyagot tartalmazó oldat a vezikulákat tartalmazó membránnal érintkezik.) 25 és 250 ms közötti értékre állítottuk be. A mérést követően a membránon visszamaradt radioaktivitást folyadékszintillációs módszerrel (Packard TRI-Carb 2200CA folyadékszintillációs spektrofotométer) határoztuk meg, a kapott eredményeket a kontakt idők függvényében ábrázoltuk, majd a görbét egy exponenciálissal illesztettük. Az exponenciális függvényben az additív konstans az y_0 , erre azért volt szükség, mert nem lehet teljesen eltávolítani a radioaktív anyagot a filterről (pl.: nem specifikus kötődés). A kapott időállandó utal az adott anyag hatásosságára. Az ábrákon a hibajel a középérték közepes hibáját jelzi, és az időállandók hibája a paramétereknek az illesztőprogram által számított szórása.

3.5. Rianodin kötés

Általánosan elfogadott, hogy a Ca^{2+} - csatornához (RyR) a rianodin akkor kapcsolódik, ha a csatorna nyitva van, tehát a rianodin kötődésének mértéke arányos a csatorna nyitvatartási valószínűségével (21. ábra).



21. ábra A RyR1 nyitvatartási valószínűsége (○) és a rianodin kötés mértéke (●) hasonló módon függ a kalcium koncentrációtól (Balshaw és munkatársai, 1999).

A kötés mértékének meghatározásához radioaktívan jelölt (³H-rianodin) ligandot használtam. A vizsgálat során a mintákat (nyúl vázizom HSR vezikula) trícíált rianodin jelenlétében inkubáltam 2 órán keresztül, 37 °C-on (Inkubáló puffer: 1 M NaCl, 25 mM Na-PIPES pH =7,1, 100 μM CaCl₂, 1mM Pefabloc). A Gd³⁺ hatásának vizsgálatakor a Gd³⁺-ot 30 perccel a jelölt rianodin hozzáadása előtt adtam a mintához. A reakcióelegyek végtérfogata 50 μl, melyben 25 μg fehérje volt. A nem specifikus kötés meghatározásához a jelzett rianodin alkalmazása előtt az inkubáló oldathoz feleslegben adtam a nem jelzett („hideg”) rianodint (50-100 μM). Inkubálást követően (250 mM NaCl, 5 mM Na-PIPES pH=7,1, 100 μM CaCl₂) 1ml

mosó pufferrel mostam át vízlégszivattyú segítségével a Millipore 50 típusú membránt (pórusátmérő: 0,45 μm). Ezt követően a filtert mosó pufferrel újból átmostam. A mosás megismétlése és a membrán szárítását követően a membránból folyadék szcintillációval határoztam meg a vezikulákhoz kötődött trícíált rianodin mennyiségét.

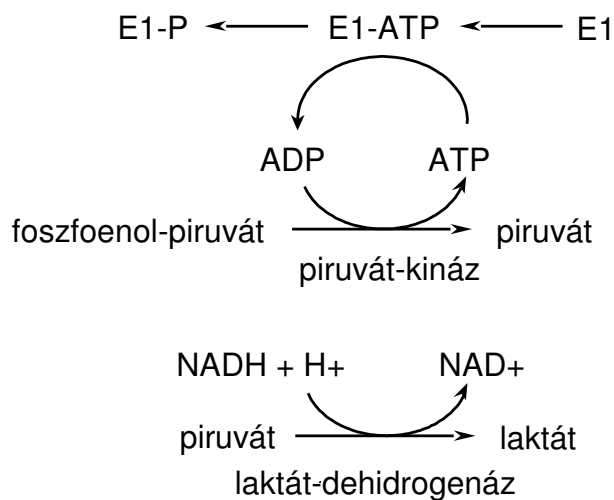
3.6. A Ca^{2+} -pumpa aktivitása

Kísérleteimben az SR Ca^{2+} -ATPáz nagy mennyiségben tartalmazó könnyű SR (LSR) vezikulákat használtam, melyet nyúl vázizmából izoláltunk. A pompa működésének jellemzésére piruvát-kináz "kapcsolt enzim-assay" technikát alkalmaztam, melyet 37°C-on végeztem. A rendszer elve (22. ábra, 38. oldal), hogy a pompa működése során ATP-t hasít, így ADP-t termel, ami foszfoenol-piruvátból piruvát-kináz enzimmel piruvátot képez, ami egy következő reakcióban laktát-dehidrogenáz révén laktátot képez, miközben NADH-ból NAD^+ keletkezik.

Fotométer segítségével a NADH-fogyást mértem a 340 nm-en bekövetkező abszorbancia változás alapján. A Ca^{2+} -pumpa aktivitását a kapott görbe meredekségéből számoltam ki. A kísérletekben kétféle törzsoldatot használtam (1-es és 2-es). Mindkettőben biztosítottam az optimális ionmiliőt (100 mM KCl, 0,5 mM MgCl_2) és pH-t (20 mM Tris HCl pH=7,5), a reakciókhoz pedig az enzimeket (7,5 U/ml piruvát-kináz, 18 U/ml laktát-dehidrogenáz) és a szubsztrátot (0,42mM foszfoenol-piruvát) valamint a NADH-t (0,2 mM). Az 1-es törzsoldat még tartalmazott 2 μM ionofórt (A23187), mivel az beépülve az SR-vezikula membránjába engedi „kifolyt” a Ca^{2+} -t a vezikulákból, így megakadályozza, hogy a magas lumenális Ca^{2+} -szint a végtermékgátlás útján csökkentse a pompa működésének sebességét. A 2-es törzsoldatban az ATP koncentrációja 10 mM volt. A szabad (ionizált) kalciumkoncentrációnak megfelelő mennyiségű CaCl_2 -ot csak az 1-es, míg 1 mM $\text{K}_2\text{H}_2\text{EGTA}$ -t csak a 2-es törzsoldatban alkalmaztam. A mérés során az 1-es törzsoldat 1 ml-ét az SR-vezikula szuszpenzióval (A -70°C-on tárolt LSR-vezikula frakciót ötvenszeresére hígítottam, majd ebből annyit mértem be, hogy a reakcióelegy 2 ml-ében kb. 10 μg fehérje legyen.) és a vizsgált anyag megfelelő mennyiségével mértem össze, majd ezt az elegyet 1 percre inkubáltam 37°C-on, végül 1ml 2-es oldat hozzáadásával indítottam a reakciót. A Ca^{2+} -függő aktivitást az 5 μM thapsigargin jelenlétében mért („bazális”) aktivitás és a teljes aktivitás különbsége adta meg. (A thapsigargin az SR Ca^{2+} -pumpájának széles körben elterjedt inhibitora.) A mérések során a Ca^{2+} és EGTA koncentrációt

úgy állítottam be, hogy a szabad Ca^{2+} -koncentráció ($\approx 2 \mu\text{M}$) a SERCA maximális aktivitását biztosítsa.

Kapcsolt enzim-assay



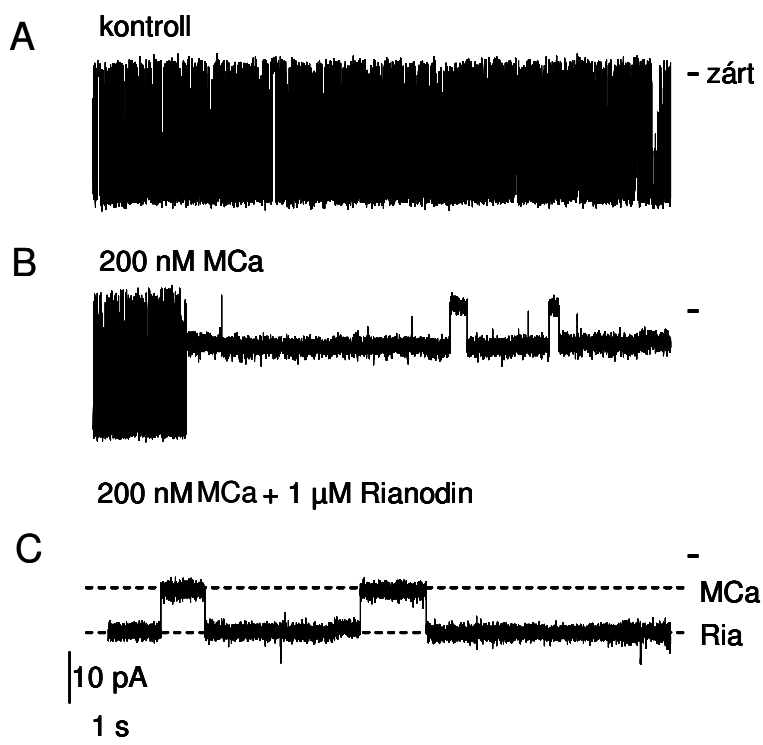
22. ábra Az SR Ca^{2+} -pumpa működésének jellemzésére használt piruvát-kináz „kapcsolt enzim-assay” technika elve. A pumpa működése során képződő ADP révén piruváton keresztül laktát képződik, miközben a NADH -ból NAD^+ keletkezik. A pumpa aktivitásának mérésekor a NADH -fogyást fotométerrel detektáljuk.

4. Eredmények

4.1. A maurokalcin hatása

4.1.1. A csatorna kapuzásának változása

A MCa-nak a kalcium csatorna működésére gyakorolt hatását mesterséges lipid kettősrétegbe épített RyR1-en és RyR2-ön vizsgáltuk 250 mM K^+ -t mint töltéshordozót alkalmazva (23. ábra).



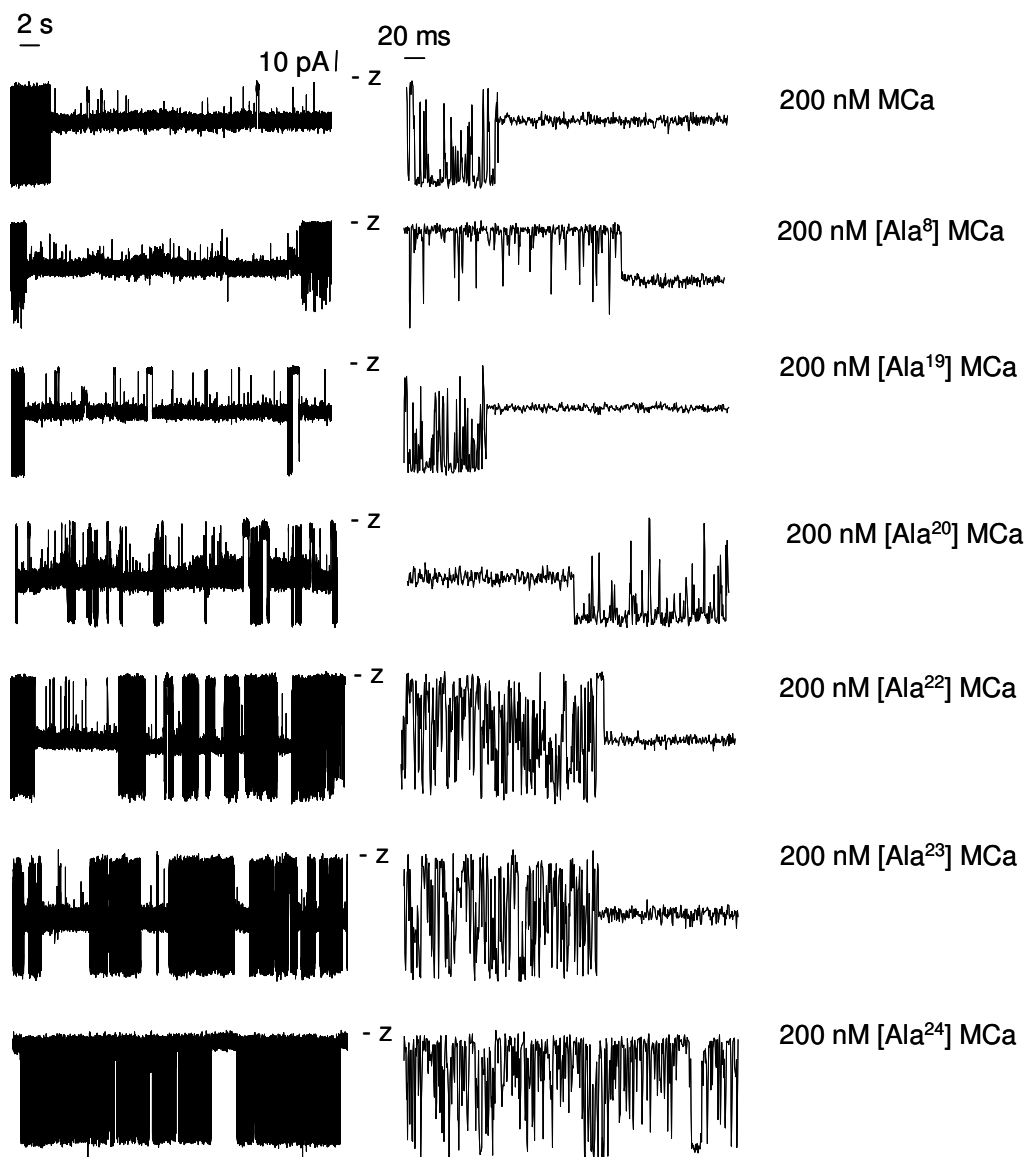
23. ábra A maurokalcin és a rianodin hatása a kalcium csatornára. Nyúlból származó szolubilizált rianodin receptort mesterséges lipid kettősrétegbe építettük, és feszültség-clamp körülmények között regisztráltuk a csatornán átfolyó áramot. A töltéshordozó 250 mM KCl, a lefelé irányuló áramtűskék a csatorna nyitott állapotának felel meg. A zárt állapotokat a rekordok jobb oldalán található szimbólum jelzi (—). “A” panel: kontroll. “B” panel: 200 nM MCa hosszantartó szubkonduktancia állapotokat indukál. “C” panel: 200 nM (MCa) és 1 μM rianodin (Ria) együttes jelenlétében kétféle szubkonduktancia állapot együttesen van jelen.

50 μM citoplazmatikus (*cisz*) MCa koncentrációnál a csatorna működése során hosszantartó szubkonduktancia állapotok jönnek létre (LLSS = Long Lasting Subconductance State), melyek a csatorna maximális konduktanciájának ~60%-ának megfelelő csökkent vezetőképességű, tartósan

nyitott állapotok (23. ábra “B” panel, 39. oldal). A vad típusú maurokalcin jelenlétében kialakuló LLSS-ok több ezerszer hosszabbak, mint a toxin adása előtti (azaz a kontroll) esetben mért átlagos nyitvatartási idő (τ_o = mean open time). Maurokalcin jelenlétében a LLSS-ok között a csatorna kapuzása normális jellegű, de aktivitása magasabb. A szubkonduktancia állapotok közötti (inter-LLSS) nyitvatartási valószínűség mintegy tízszeresére nőtt 200 nM (*cisz*) MCa jelenlétében ($P_{o,kontroll} = 0,02 \pm 0,007$; $P_{o,MCa} = 0,21 \pm 0,016$). Azért alkalmaztunk méréseinkben töltéshordozóként K^+ iont, hogy a Ca^{2+} modulációs hatásai ne zavarják méréseinket. Jelentős tapasztalat, hogy a maurokalcinnal kezelt csatorna megtartja rianodin érzékenységet és együttes alkalmazásuk során (1 μ M rianodin + 50 nM MCa) mindkét anyag hatása egymástól függetlenül megjelenik (23. ábra “C” panel, 39. oldal), ami arra enged következtetni, hogy a MCa és a rianodin a csatorna különböző szegmenseihez kötődnek. A rianodin és a maurokalcin együttes jelenléte során bár mindkét anyag kifejti hatását, mégis úgy tűnik, hogy a rianodin okozta szubkonduktancia állapot a meghatározó, ami a toxin jelenlétében némileg módosul.

4.1.2. A mutáció hatása a kapuzásra

Más ioncsatornákra ható peptid toxinokhoz (ω -conotoxin, imperatoxin-A) hasonlóan (Hidalgo és MacKinnon, 1995; Dudley és munkatársai, 1995; Gurrola és munkatársai, 1999), a MCa-RyR kapcsolat kialakulásában valószínűleg az elektrosztatikus erők is szerepet játszanak, ezért ha a MCa kötő doménjében mutációk következnek be, akkor azok módosíthatják az elektrosztatikus hatásokat és/vagy a szubkonduktancia állapotok karakterét. A 24. ábrán (41. oldal) látható, hogy a szintetikus maurokalcin származékok növelik a csatorna P_o -ját, és szubkonduktancia állapotot indukálnak hasonló módon – de különböző mértékben – mint a vad típusú toxin. A bázikus aminosavak által kialakított pozitív töltésű felszínen bekövetkező mutációk a toxin hatását jelentősen megváltoztatják. Ha a vad típusú MCa-ban a 24-es pozíciójú arginin aminosavat lecseréljük alaninra ([Ala²⁴]MCa mutáns) a szubkonduktancia állapotok gyakorlatilag megszűnnek (24. ábra alsó rekord, 41. oldal). A 20-as, 22-es, 23-as pozícióban mutált toxinok esetében az LLSS-ban eltöltött idők egyre kisebbek annak megfelelően, hogy a mutált aminosav térben milyen távolságra helyezkedik el a 24-es pozíciójú aminosavhoz képest.



24. ábra Az MCa és mutánsainak hatása nyúl RyR1-en. A reprezentatív rekordokon a MCa és mutánsainak hatása látható. A jobb és bal oldali oszlopban az időbeli felbontás különböző, annak érdekében, hogy a hatás még láthatóbb legyen. A két oszlop között a “z” a zárt állapotot jelöli. Megfigyelhető, hogy minél közelebb helyezkedik el a mutált aminosav a 24-es aminosavhoz képest a LLSS állapotok hossza és frekvenciája csökken, miközben a csatorna konduktanciája nem változik.

Ezzel szemben a Lys8 vagy a Lys19 lecserélése Ala-ra a vad típusnál kapott LLSS arányt jelentősen nem módosítja, ugyanis ezek az aminosavak az előbb említett bázikus mezőtől távol helyezkednek el. A különböző pozícióban lévő töltött aminosavak lecserélése töltetlen aminosavakra rámutat arra, hogy a bázikus aminosavak által kialakított pozitív töltésű mezőben a

mutációk okozta drámai hatás nem egyszerűen a peptid nettó töltésének megváltozásának köszönhető, hiszen a mutációk illetve annak elhelyezkedése a nettó töltést csak kis mértékben befolyásolja, 7+-ról 6+-ra változik a molekula töltése. Másrészt nem valószínű, hogy a toxin szerkezete megváltozna mutáció hatására, hiszen a peptid szerkezetét 3 diszulfid híd igen határozottan stabilizálja (Cys3-Cys17, Cys10-Cys21 és Cys16-Cys32).

4.1.3. A hatás polaritásfüggése

A maurokalcin és mutánsai által indukált szubkonduktancia állapotok paramétereit befolyásolja az alkalmazott membránfeszültség polaritása illetve a csatornán átfolyó áram iránya (1. táblázat).

Toxin	LLSS-arányok	
	„Ellentétes” irány	„Fiziológiás” irány
50 nM MCa	88,1 ± 10,5 %	9,8 ± 1,1 %
200 nM MCa	91,5 ± 11,2 %	43,8 ± 5,2 %
50 nM [Ala ⁸]MCa	52,5 ± 6,1 %	3,5 ± 0,74 %
200 nM [Ala ⁸]MCa	86,7 ± 9,1 %	5,4 ± 0,60 %
50 nM [Ala ²⁰]MCa	34,8 ± 6,4 %	3,1 ± 0,72 %
200 nM [Ala ²⁰]MCa	68,4 ± 8,2 %	3,9 ± 0,63 %
50 nM [Ala ²⁴]MCa	0,34 ± 0,18 %	n.m.*
200 nM [Ala ²⁴]MCa	0,62 ± 0,21 %	n.m.*

1. táblázat Az LLSS-arány függ a polaritástól. A maurokalcin és mutánsai által indukált szubkonduktancia állapotok paramétereit befolyásolja az alkalmazott membránfeszültség polaritása illetve a csatornán átfolyó áram iránya. A “fiziológiás irány” szerinti membránpotenciálnál az LLSS arányok mindegyik vizsgált toxin esetében kisebbek, mint az ellentétes polaritáson (“ellentétes irány”). *n.m.= LLSS-ok hiányában nem tudtuk mérni az LLSS arányt.

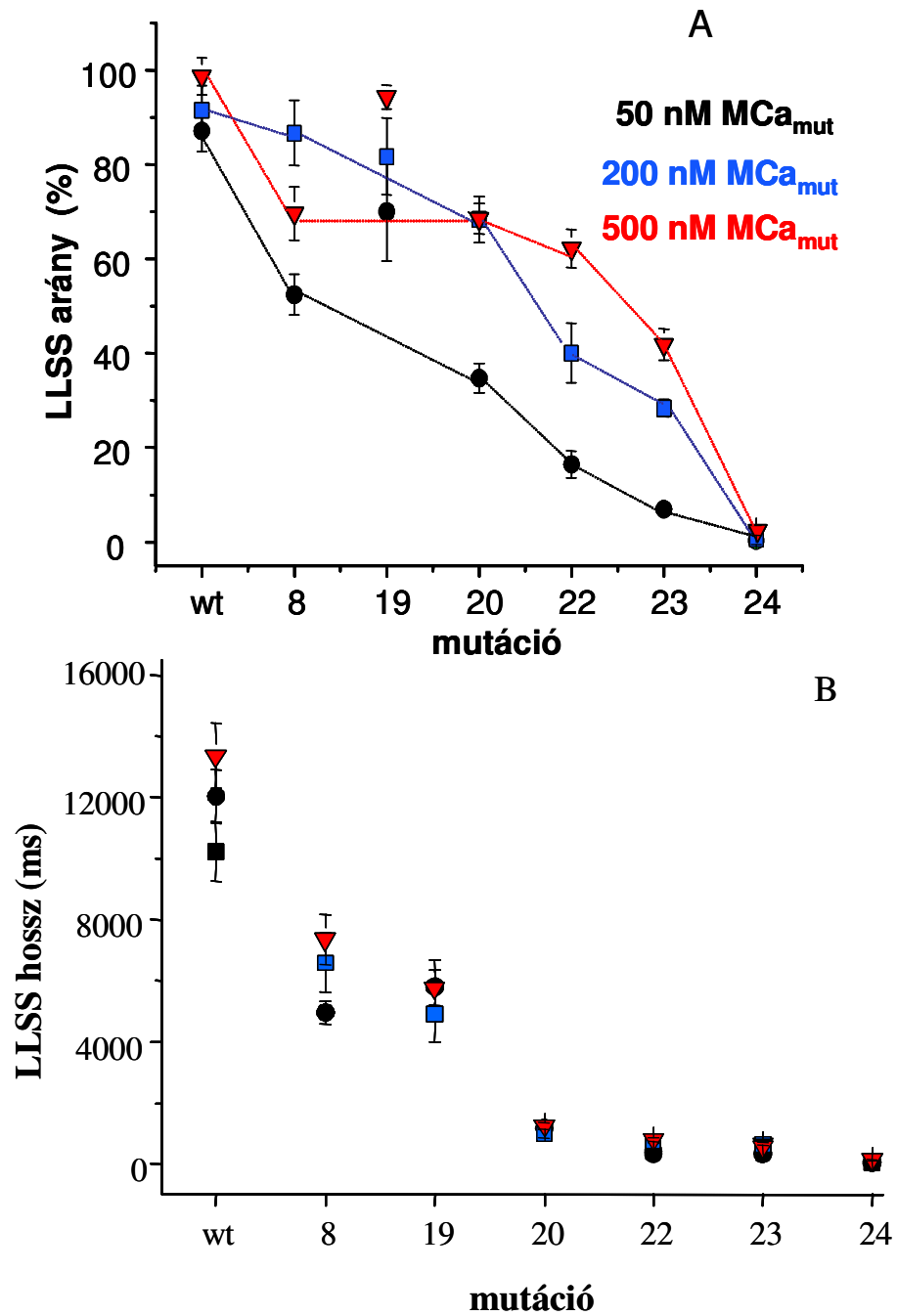
Mikor a töltés hordozó ion (méréseinkben K⁺, fiziológiásan Ca²⁺) a *transz* (luminális) oldal felől mozog a *cisz* (citoszólikus) oldal felé, akkor az áram iránya azonos a kalcium felszabaduláskor az SR-ből kiáramló kalcium ionok irányával (“fiziológiás irány”). A “fiziológiás irány”-nak megfelelő polaritású membrán potenciált alkalmazva az LLSS arányok mindegyik

vizsgált – vad és mutáns – toxin esetében jelentősen kisebbek, mint az ellentétes polaritáson (“ellentétes irány”) kapott értékek.

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

4.1.4. A különböző mutánsok eltérő hatásúak

A 25. ábra (44. oldal) mutatja a toxin hatását az LLSS arányra és az egyes események hosszára 50 μM szabad kalcium koncentrációnál. Mindegyik vizsgált koncentrációban (50 nM, 200 nM, 500 nM) a leghatásosabb a vad típus, míg a 24-es mutáns gyakorlatilag hatástalan. Minél közelebb van a mutáció helye a 24-es pozíciójú aminosavhoz, annál kisebb az LLSS arány (25. ábra „A” panel). Ha megvizsgáljuk az egyes LLSS-ok hosszát a különböző toxinok esetében, akkor azt láthatjuk, hogy a mutáció pozíciója az egyes LLSS-ok időtartamát is jelentősen befolyásolja. A LLSS-ok időtartama leghosszabb a vad típusnál, míg a legrövidebb a 24-es mutánsnál. Ráadásul a mutáció helye sokkal inkább hat az egyes események hosszára mint az LLSS arányra, mivel a toxinoknál – különösen a 8-as és 19-es mutánsnál – az LLSS-arány csökkenése nem olyan drámai mértékű, mint a LLSS-ok hosszában bekövetkező változás (25. ábra “B” panel), ami arra utal, hogy az LLSS-arány csökkenésének hátterében inkább az egyes LLSS-ok rövidülése és nem a LLSS-ok frekvenciájának (LLSS-ok megjelenési gyakorisága) csökkenése áll. Ezen kívül a két ábrán jól látható, hogy az LLSS-arányt az alkalmazott toxin koncentrációja dóziszfüggő módon növeli, ezzel szemben a LLSS-ok hosszát a toxin koncentrációja alapvetően nem befolyásolja.



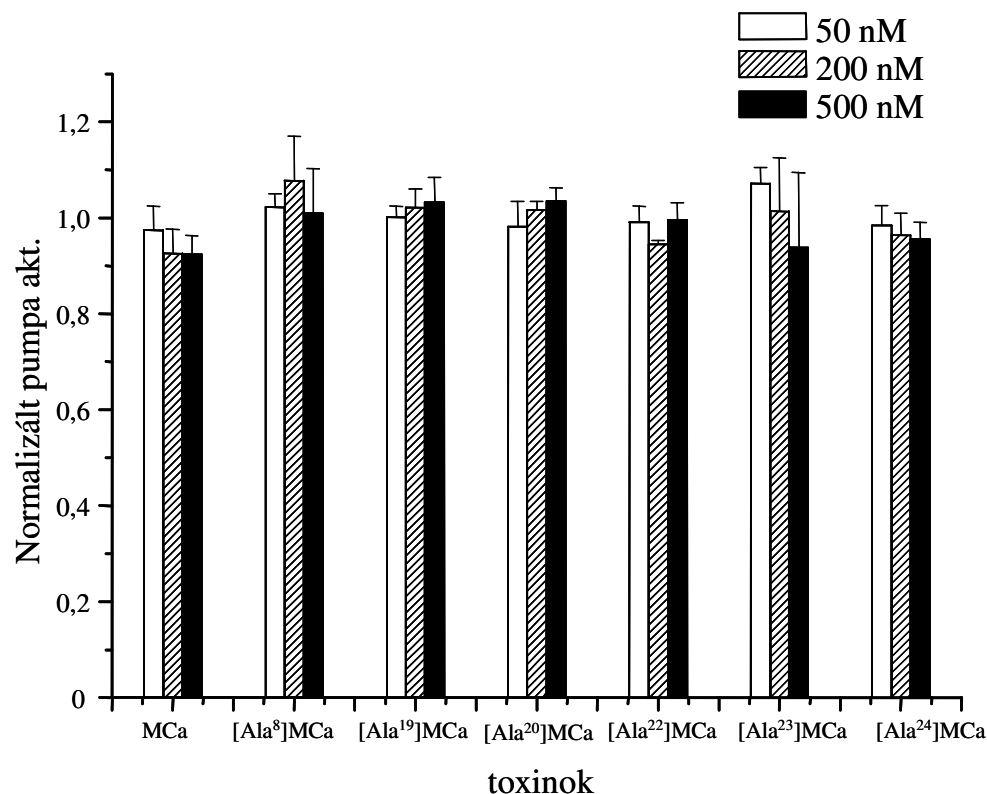
25. ábra Az LLSS jellemzői különbözőek az egyes toxinoknál. A „single channel” rekordok alapján kiszámított LLSS arány („A” panel) és az egyes LLSS események átlagos hossza („B” panel) látható a különböző mutánsoknál 50 nM (●), 200 nM (■) és 500 nM (▼) toxin koncentrációnál. Az LLSS arány megmutatja, hogy a csatorna életidejének hány százalékát tölti szubkonduktancia állapotban. Minél közelebb van a mutáció a 24-es pozícióhoz annál kisebb az LLSS arány. Minél közelebb van a mutáció a 24-es aminosavhoz a LLSS események ideje annál rövidebb.

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

A maurokalcin és pontmutánsainak hatását nemcsak magas (50 μM), hanem alacsony (240 nM) kalcium koncentrációnál is megvizsgáltuk. 240 nM kalcium jelenlétében a maurokalcin ugyancsak hosszantartó szubkonduktancia állapotokat indukált. Alacsony kalcium koncentrációnál is a leghatásosabb a vad típus volt (200 nM MCa: LLSS-arány = 97%), míg a 24-es mutáns gyakorlatilag hatástalannak bizonyult (200 nM [Ala²⁴]MCa: LLSS-arány = 0,05%). A többi mutánsnál a szubkonduktancia állapot aránya a vad típushoz képest — hasonlóan az 50 μM kalcium koncentrációnál számolt értékekhez — fokozatosan csökkent annak megfelelően, hogy a mutáció hol helyezkedik el a 24-es pozíciójú aminosavhoz képest. Az egyes LLSS-ok hossza ugyancsak a vad típus esetében volt a legnagyobb (200 nM MCa: 8530 ms, 200 nM [Ala²⁴] MCa: 18 ms). A toxinok polaritás-függő hatását 240 nM kalcium jelenlétében is sikerül kimutatni, azaz a “fiziológiás irány”-nak megfelelő polaritású membrán potenciált alkalmazva a szubkonduktancia állapotok aránya a vizsgált toxinok mindegyikénél kisebbek voltak, mint az ellentétes polaritáson mért értékek. A kapott eredmények alapján megállapítottuk, hogy a kalcium koncentráció a maurokalcin és mutánsainak kalcium csatornára gyakorolt hatását alapvetően nem befolyásolja, azaz a toxinok hatása független az alkalmazott kalcium koncentrációtól.

4.1.6. A maurokalcin és mutánsai nem befolyásolják az SR Ca²⁺-pumpa aktivitását

A maurokalcin és mutánsainak SR kalcium pumpa hidrolitikus aktivitására gyakorolt hatását “kapcsolt enzim-assay” technikával vizsgáltuk. A toxinok vizsgálatát három koncentrációnál (50 nM, 200 nM, 500 nM) végeztük. A maurokalcin és mutánsai jelenlétében mért aktivitást minden esetben normalizáltuk a kontroll (toxin hiányában) méréseknél kapott aktivitásra. A kapott adatokat ábrázolva (26. ábra, 46. oldal) megállapítottuk, hogy sem a vad típusú maurokalcin (MCa), sem pedig annak mutánsai ([Ala⁸]MCa, [Ala¹⁹]MCa, [Ala²⁰]MCa, [Ala²²]MCa, [Ala²³]MCa, [Ala²⁴]MCa) a vizsgált koncentráció tartományban az SR kalcium pumpa hidrolitikus aktivitását nem módosítják.

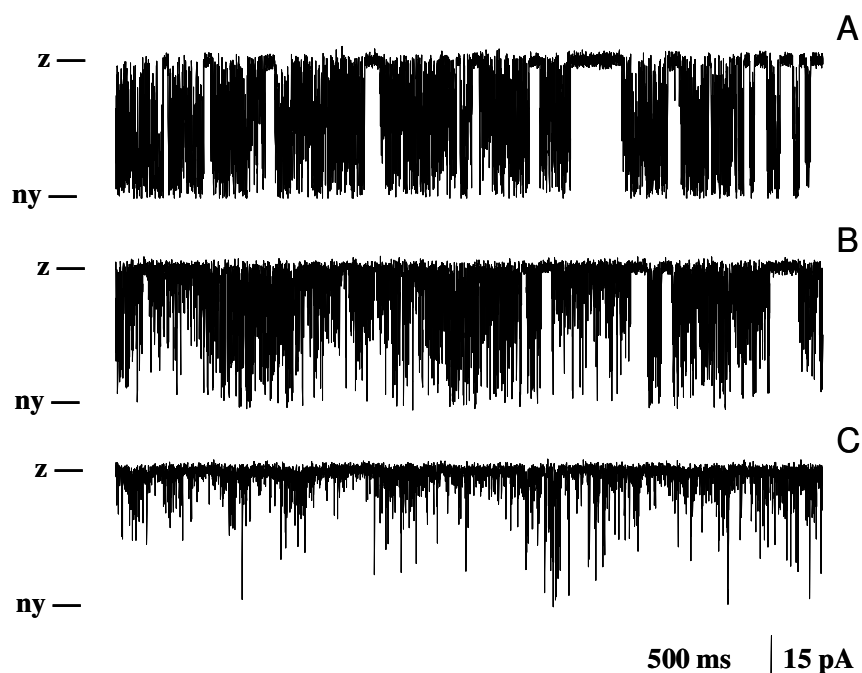


26. ábra A toxinok (MCa, [Ala⁸]MCa, [Ala¹⁹]MCa, [Ala²⁰]MCa, [Ala²²]MCa, [Ala²³]MCa, [Ala²⁴]MCa) a vizsgált (50-500 nM) koncentráció tartományban az SR kalcium pumpa hidrolitikus aktivitását nem módosítják. A kapott pontokat három mérés átlagából határoztam meg.

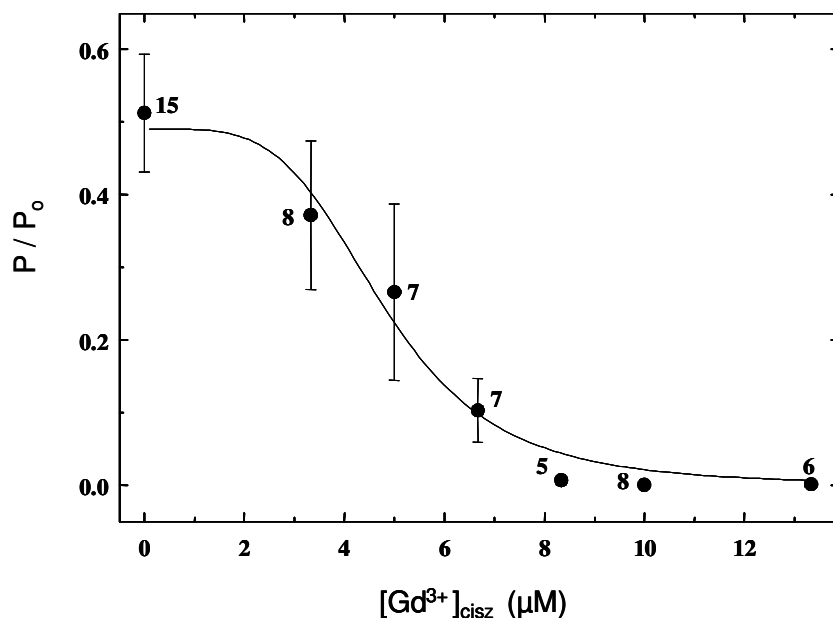
4.2. A gadolínium hatása a RyR1-ra

4.2.1. A citoplazmatikus gátlás

A citoplazmatikus (*cisz*) oldalon mikromólos koncentráció tartományban alkalmazott gadolínium csökkentette a csatorna nyitvatartási valószínűségét (P_o). A csatorna 13,3 μ M gadolínium jelenlétében gyakorlatilag teljesen bezáródott (27. ábra, 47. oldal). A gátlás reverzibilis volt, mivel a gadolíniummal ekvimoláris EGTA alkalmazása után a csatorna aktivitása a kontrollhoz hasonló értékre tért vissza. Mindegyik mérésnél meghatároztuk a RyR nyitvatartási valószínűségét kontroll esetben és Gd^{3+} jelenlétében. A kiszámolt P_o értékeket ábrázoltuk a *cis* Gd^{3+} koncentráció függvényében (28. ábra, 47. oldal), és a kapott pontokat Hill-egyenlettel illesztve meghatároztuk a félgátló koncentráció ($IC_{50}=5,65 \pm 0,3 \mu$ M) és a Hill-koefficiens értékét ($n_{Hill}=4,71 \pm 0,8$).



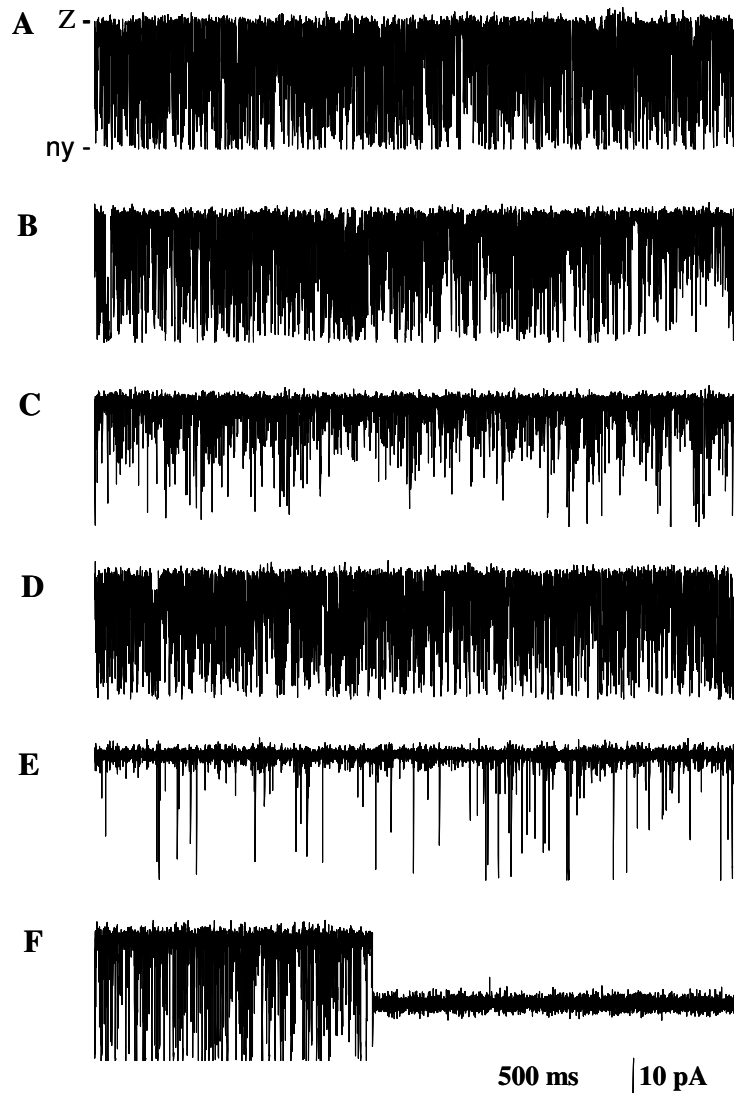
27. ábra A *cis* oldalon alkalmazott gadolínium hatása a rianodin receptorra. A méréseket -108 mV tartófeszültségen, szimmetrikus pufferösszetétel (250 mM KCl jelenlétében) alkalmazásával, 50 μM szabad kalcium koncentrációnál végeztük. A „A” panel a kontroll mérést mutatja (P_o=0,338). 5 μM *cis* Gd³⁺ jelenlétében („B” panel) a csatorna aktivitása csökkent (P_o=0,148), 8,3 μM Gd³⁺ jelenlétében („C” panel) a gátlás tovább fokozódott (P_o=0,019).



28. ábra A *cis* oldalon alkalmazott gadolínium gátló hatásának koncentráció függése. A RyR aktivitását különböző *cis* Gd³⁺-koncentráció mellett vizsgáltuk, ahol a csatorna nyitvatartási valószínűségét 30 sec-os szakaszok elemzésével határoztuk meg. A kapott pontokat Hill-egyenlettel megillesszve IC₅₀=5,65±0,3 μM, n_{Hill}=4,71±0,8. A mérési pontok melletti számok a kísérletek számát jelölik.

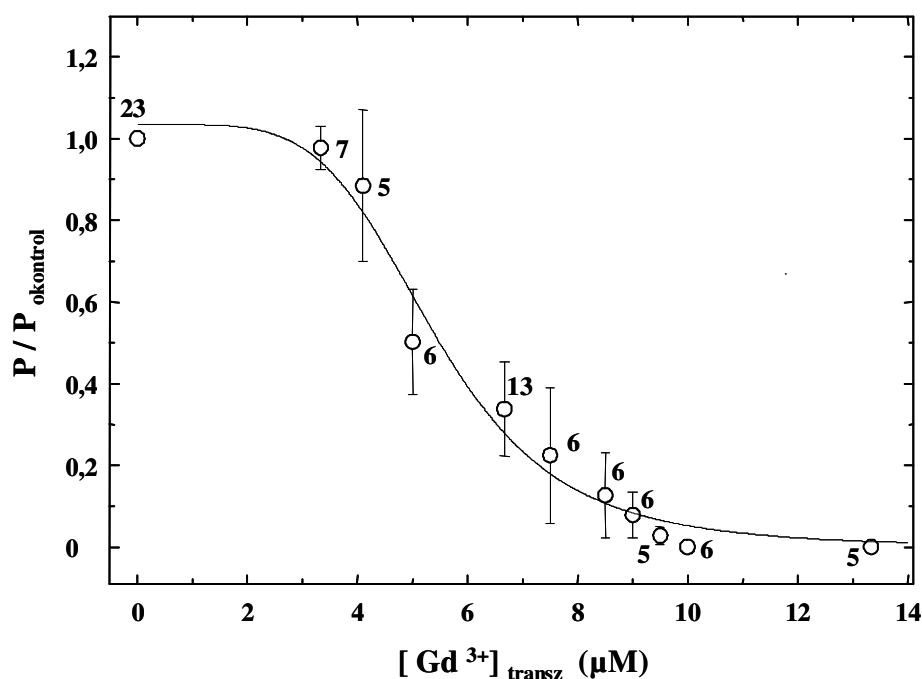
4.2.2. A luminális gátlás

Megvizsgáltuk a Gd^{3+} kalcium csatornára gyakorolt hatását a csatorna luminális (*transz*) oldala felől alkalmazott Gd^{3+} esetén is (29. ábra).



29. ábra A *transz* oldalon alkalmazott gadolínium hatása a rianodin receptorra. Az “A” panel a kontroll mérést mutatja ($P_{o, \text{kontroll}}=0,239$). A gadolínium jelenlétében mért aktivitást a “B” ($4,1 \mu M Gd^{3+}$, $P_o=0,147$) és “C” ($9 \mu M Gd^{3+}$, $P_o=0,032$) panel mutatja. “D”: Ekvimoláris EGTA ($9 \mu M$) megköti az előzőleg hozzáadott gadolíniumot és a csatorna aktivitása ($P_o=0,21$) visszatér a kontroll körüli értékre. “E”: EGTA alkalmazása *cisz* oldalon lecsökkenti a *cisz* Ca^{2+} koncentrációt ($0,9 \mu M$), ami a P_o csökkenéséhez vezet. “F”: A csatorna farmakológiai tulajdonságait megőrizte: 2 mM ATP növelte a csatorna nyitvatartási valószínűségét (“F” panel bal oldal), rianodin ($8 \mu M$) jelenlétében pedig szubkonduktancia állapot alakult ki (“F” panel jobb oldal). A mérések során -55 mV tartófeszültséget alkalmaztunk.

Annak érdekében, hogy a *transz* oldalon alkalmazott Gd^{3+} a csatorna pórusán átjutva *cisz* oldalon ne befolyásolja a RyR1 működését a *cisz* oldalon EGTA- Ca^{2+} puffert alkalmaztunk, mert méréseink azt mutatták, hogy a *transz* oldali Gd^{3+} ugyancsak koncentrációfüggő módon és reverzibilisen gátolja a csatorna működését. A *transz* oldali EGTA alkalmazása után a csatorna aktivitása néhány másodperc alatt visszatért, ami arra utal, hogy a gadolínium nem a csatornán átjutva, a *cisz* oldalra kerülve fejt ki hatását. Miután a csatorna aktivitása visszatért a kontroll értékre, különböző regulátorokkal ellenőriztük a csatorna integritását. A *cisz* Ca^{2+} koncentráció csökkentése a P_o -t csökkentette, ATP hozzáadása a P_o -t növelte, a mérés végén a rianodin alkalmazása szubkonduktancia állapotot indukált, azaz a Gd^{3+} -elvonást követően a csatorna farmakológiája megtartott. A normalizált P_o -t ábrázoltuk a *transz* Gd^{3+} függvényében (30. ábra), a kapott görbe alapján az $IC_{50}=5,47 \pm 0,2 \mu M$ és a Hill-koefficiens $4,31 \pm 0,6$.



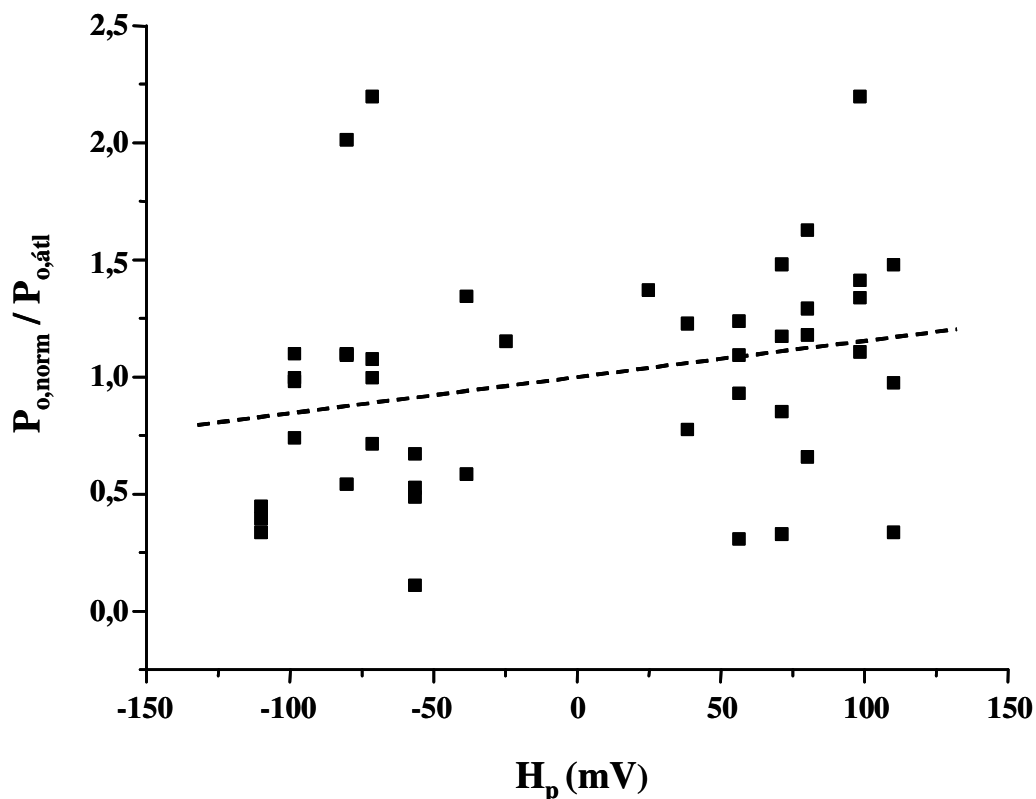
30. ábra A *transz* Gd^{3+} gátló hatásának koncentrációfüggése. A RyR aktivitását különböző *cisz* Gd^{3+} -koncentráció mellett vizsgáltuk, ahol a csatorna nyitvatartási valószínűségét 30 sec-os szakaszok elemzésével határoztuk meg. A hiba csökkentése érdekében a Gd^{3+} jelenlétében kapott P_o értékeket normalizáltuk a Gd^{3+} -ot nem tartalmazó (mérések eleje) szakaszok P_o értékére ($P_o/P_{o,kontrol}$). A kapott pontokat Hill-egyenlettel megillesszve $IC_{50}=5,47 \pm 0,2 \mu M$ és $n_{Hill}=4,31 \pm 0,6$. A mérési pontok melletti számok a kísérletek számát mutatják.

Azokat a rekordokat felhasználva, melyekből a P_o -t számoltam, “open time” (a megnyílasok száma a megnyílasok amplitúdójának függvényében) hisztogramot készítettünk. A hisztogramot egy komponensű exponenciális függvénnyel illesztve megkaptuk a τ_o -t (mean open time konstans, átlagos nyitvatartási idő). A gadolínium koncentrációfüggő módon csökkenti a rianodin receptor τ_o -ját mind *cisz*, mind *transz* oldal felől alkalmazva (2. táblázat).

Gd^{3+} <i>cisz</i> (μM)	$\tau_o(ms^{-1})$	n	Gd^{3+} <i>transz</i> (μM)	$\tau_o(ms^{-1})$	n
0	$0,99 \pm 0,19$	14	0	$1,06 \pm 0,24$	20
3,33	$0,81 \pm 0,13$	8	3,33	$0,92 \pm 0,44$	6
5	$0,57 \pm 0,2$	6	5	$0,55 \pm 0,10$	5
6,67	$0,48 \pm 0,05$	5	7,5	$0,34 \pm 0,09$	3

2. táblázat A RyR1-on a *cisz* és a *transz* oldali Gd^{3+} is csökkenti a τ_o -t (átlagos nyitvatartási idő $\pm$ SE, N: mérések száma).

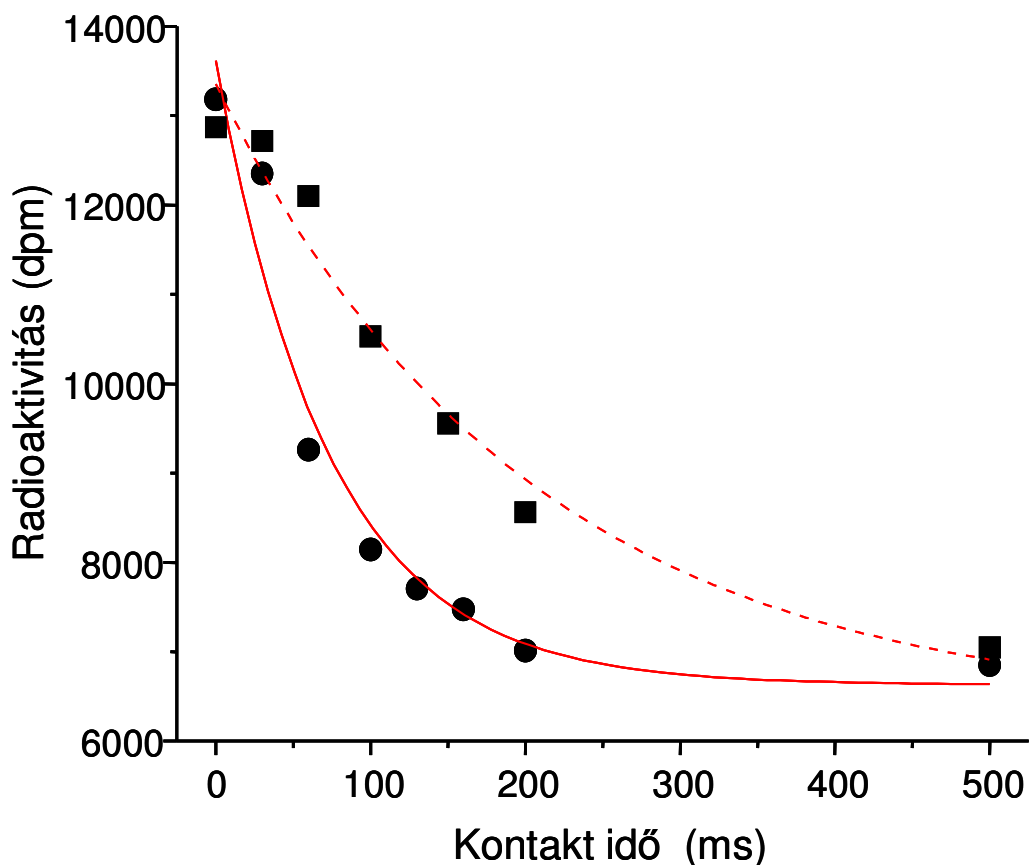
Négy mérés során különböző feszültség lépcsőket alkalmaztunk annak tisztázására, vajon a transzmembrán feszültségkülönbség hatással van-e a Gd^{3+} indukált gátlásra. A kísérletek során $2 \mu M$ Gd^{3+} (*transz*) jelenlétében lépcsőzetesen változtattuk a tartófeszültséget. Az adott tartófeszültségen mért P_o -kat normalizáltam a Gd^{3+} -ot nem tartalmazó szakasz P_o -jára (kontroll) ez a $P_{o,norm}$. Az egyedi csatornaműködésből (Gd^{3+} -gátlás) adódó különbségek csökkentése érdekében, a négy normalizált nyitvatartási valószínűség átlagát ($P_{o,átl}$) képeztük, mint viszonyítási alapot, és ezzel osztottuk ismételt a normalizált P_o -kat ($P_{o,norm}/P_{o,átl}$) és az így számolt értékeket ábrázoltam a tartófeszültség függvényében. A kapott pontokra egyenest illesztettem ($y=A+B \cdot X$), ahol $A=1,00 \pm 0,07$ és $B=0,0016 \pm 0,0009$. A lineáris regresszió során kapott meredekség (B) értéke 0,0016, ami arra utal, hogy a csatorna gátlását a tartófeszültség nem befolyásolja, ami arra utal, hogy a gadolínium gátló hatását a luminális oldalon fejti ki anélkül, hogy a citoplazmatikus oldalra diffundálna (31 ábra, 51. oldal).



31. ábra A *transz* oldalon alkalmazott Gd^{3+} nem mutat feszültség-függést. Az adott tartófeszültségen mért P_o -kat normalizáltam a kontroll szakaszra ($P_{o,norm}$). A négy normalizált nyitvatartási valószínűség átlagát ($P_{o,átl}$) képeztük, és ezzel osztottuk ismételtén a normalizált P_o -kat ($P_{o,norm}/P_{o,átl}$) és az így számolt értékeket ábrázoltam a tartófeszültség függvényében. A kapott pontokra egyenest illeszttem ($y=A+B \cdot X$), ahol $A=1,00 \pm 0,07$ és $B=0,0016 \pm 0,0009$. (H_p : tartó feszültség)

4.2.3. A gátlás vizsgálata vezikuláris rendszeren

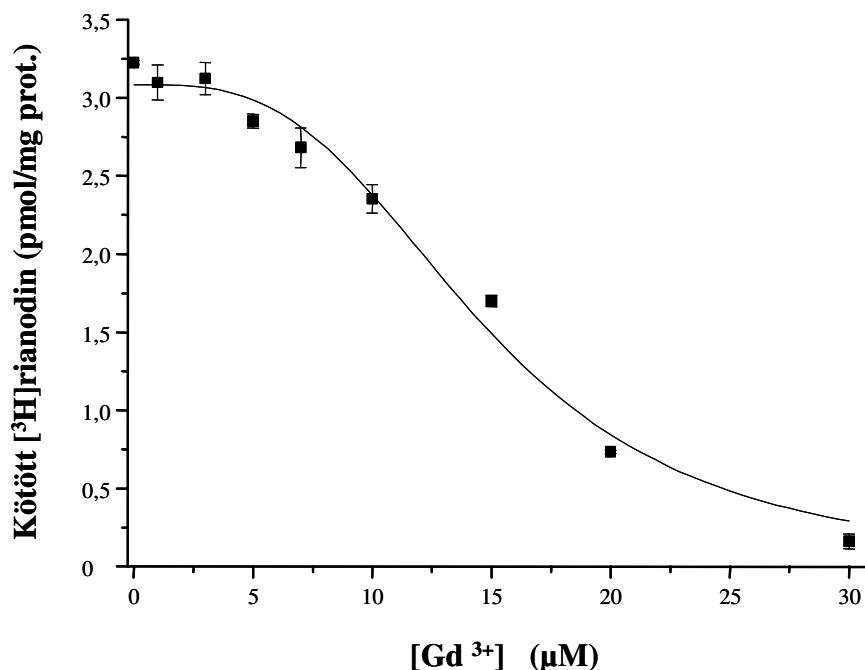
A “single-channel” mérések esetén alapvetően a szolubilizált Ca^{2+} -csatorna tulajdonságait mérjük. Ugyanakkor célszerű megvizsgálni, hogy a jukcionális membránban “in situ” jelenlévő ún. akcesszórius fehérjék befolyásolják-e, azaz módosítják-e a RyR- Gd^{3+} kölcsönhatást. Erre célszerűen HSR vezikulákon történő méréssel kerülhet sor. Rapid filtrációval ellenőriztük, hogy a gadolínium befolyásolja-e a kalcium felszabadulást HSR vezikulákból (32. ábra, 52. oldal).



32. ábra A gadolínium módosítja a HSR vezikulákon mérhető kalcium felszabadulást. A vezikulákat passzívan töltöttük fel ^{45}Ca jelenlétében. Az inkubáló oldatban a kalcium koncentráció 5 mM volt. A minták aktivitását ábrázoltuk a kontakt idő függvényében. A körök a Gd^{3+} hiányában, a négyzetek a 20 μM gadolínium jelenlétében bekövetkező kalcium felszabadulást reprezentálják. Mindkét esetben a pontokat egy exponenciálissal illesztettük. Kontroll: $A_{\max}=220,0 \text{ Bq}$, $\tau=73,5\pm16,5 \text{ ms}^{-1}$. 20 μM Gd^{3+} jelenlétében: $A_{\max}=215,8 \text{ Bq}$, $\tau=201,4\pm25,5 \text{ ms}^{-1}$.

A vezikulákat passzívan töltöttük fel radioaktív kalciummal ($^{45}\text{Ca}^{2+}$), majd megvizsgáltuk, vajon a Gd^{3+} módosítja-e az ATP + koffein hatására bekövetkező kalcium felszabadulás mértékét. A minták aktivitását ábrázoltuk az ún. kontakt idő függvényében kontroll körülmények között és 20 μM Gd^{3+} jelenlétében. A kapott pontokat egy komponensű exponenciális függvénnyel illesztettük. A kontrollhoz képest ($A_{\max}=220 \text{ Bq}$ és $\tau=73,5 \pm 16,5 \text{ ms}^{-1}$) 20 μM gadolínium jelenlétében az időállandó nőtt, azaz a kalcium felszabaduláshoz szükséges idő nőtt, miközben a maximálisan felszabadítható kalcium mennyisége nem változott ($A_{\max}=215,8 \text{ Bq}$ és $\tau=201,4 \pm 25,5 \text{ ms}^{-1}$). Az időállandó nagyobb értéke arra utal, hogy a Gd^{3+} csökkenti – “single channel” eredmények alapján – a RyR-on keresztül megvalósuló kalcium felszabadulás sebességét.

A gadolínium RyR1-t moduláló hatását megvizsgáltam HSR vezikulákon rianodin kötéssel is. Gadolínium jelenléte (5 μM) növelte a rianodin kötés disszociációs állandóját ($K_{d,\text{kontroll}}=33,8\pm3,2$ nM és $K_{d,\text{gadolínium}}=45,6\pm2,2$ nM), ami a RyR gátlására utal, miközben a B_{max} értéke (Kontroll: $B_{\text{max}}=10,06\pm0,69$, 5 μM Gd^{3+} : $B_{\text{max}}=11,53\pm3,58$) szignifikánsan nem változott ($p<0,05$).



33. ábra A RyR rianodin kötésének Gd^{3+} -függése. A rianodin kötést 18 nM [³H]rianodin jelenlétében határoztuk meg különböző Gd^{3+} koncentrációk mellett. A kapott pontokat Hill-egyenlettel megillesztve $B_{\text{max}}=3,1\pm0,1$ pmol·mg protein⁻¹, $K_d=14,7\pm0,7$ μM , a Hill-koefficiens $n_{\text{Hill}}=3,16\pm0,42$. Mindegyik pontot négy független mérés átlagából határoztuk meg.

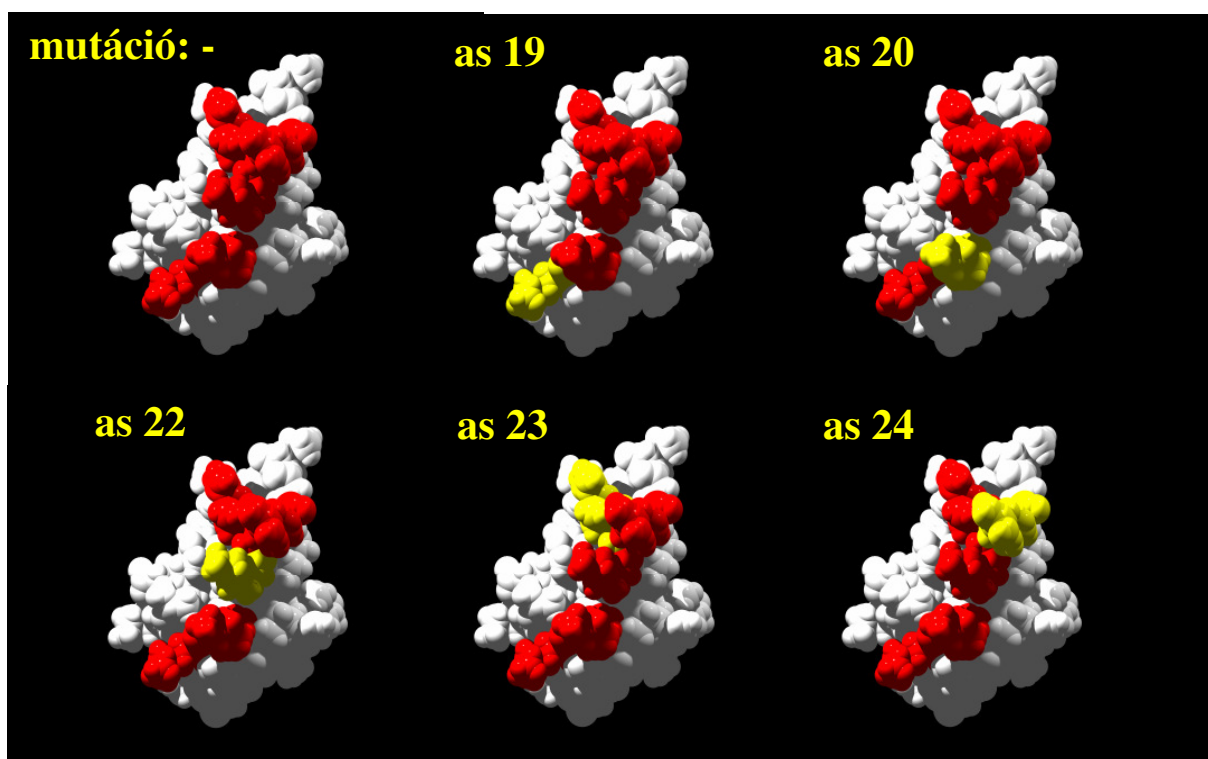
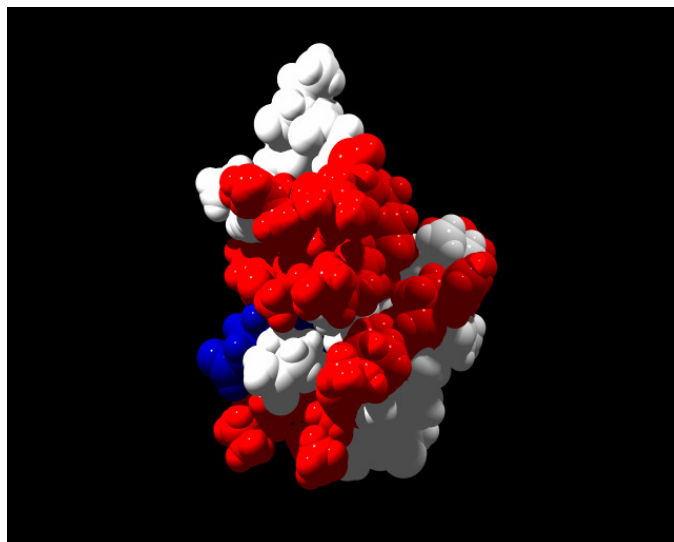
Meghatároztuk a rianodin kötés gadolínium függését (33. ábra), ahol állandó jelölt rianodin (18 nM) jelenlétében különböző gadolínium koncentrációkat alkalmaztunk. A kapott pontokat Hill-egyenlettel megillesztve a rianodin receptor gadolínium által történő gátlására a következő paramétereket kaptuk: $K_d=14,7\pm0,7$ nM, $n_{\text{Hill}}=3,16\pm0,42$.

5. Megbeszélés

5.1. A maurokalcin módosítja a csatorna működését

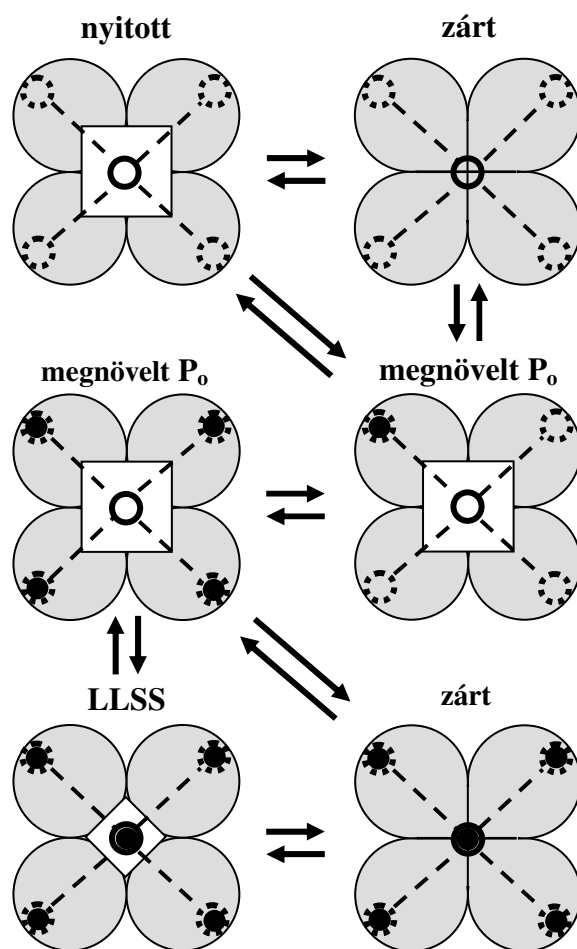
Chen és munkatársai (Chen és munkatársai, 2003) leírták, hogy a maurokalcin fokozza az SR vezikulák kalcium permeabilitását, mely hatás rianodinnal illetve ruténium vörössel gátolható. Ugyanakkor a maurokalcin mesterséges lipid kettősrétegbe épített rianodin receptoron szubkonduktancia állapotot indukál. Esteve és munkatársai (Esteve 2003) nemcsak a vad típusú toxint, hanem annak bizonyos mutánsait is tanulmányozták. A mutánsoknál az adott pozícióban lévő arginin illetve lizin aminosavakat (34. ábra, 56. oldal) töltetlen alanin helyettesítette (Ala/Lys8, Ala/Lys19, Ala/Lys20, Ala/Lys22, Ala/Arg23, Ala/Arg24). Munkájukban szilárdfázisú peptidszintézissel nyert maurokalcin és mutánsainak hatását tanulmányozták a kalcium csatorna rianodin kötéseire és az SR-ből történő kalcium felszabadulásra. Vizsgálataikat tisztított kalcium csatornán (RyR1), nehéz SR (HSR) vezikulákon valamint miotubulus tenyészetben végezték. Megállapították, hogy a maurokalcin RyR1-en hosszantartó szubkonduktancia állapotot indukál (LLSS), fokozza az SR vezikulákból történő kalcium felszabadulást, illetve a MCa miotubulus tenyészetben extracellulárisan alkalmazva mobilizálja a kalciumot a belső raktárakból. Továbbá kimutatták, hogy a vad típus mellett számos mutáns – bár eltérő mértékben – ugyancsak aktiválja a kalcium csatornát, míg a 24-es pozícióban mutált maurokalcin hatástalan. Saját “single channel” méréseinkben kimutattuk, hogy a vad típusú maurokalcin 50 μM -os citoplazmatikus (*cisz*) koncentrációnál a kalcium csatorna működését módosítva hosszantartó szubkonduktancia állapotokat okoz (LLSS), melyek a csatorna maximális konduktanciájának $\approx 60\%$ -ának megfelelő csökkent vezetőképességű, tartós fél-nyitott állapotok. Maurokalcin jelenlétében a LLSS-ok között a csatorna kapuzásában minőségi változás nem figyelhető meg, bár a csatorna aktivitása – a szubkonduktancia állapotok közötti normál kapuzású állapotban – alacsony *cisz* kalcium koncentráció esetén nőtt ($P_{o,\text{kontroll}} = 0,02 \pm 0,007$; $P_{o,\text{MCa}} = 0,21 \pm 0,016$). A vad típusú toxin jelenlétében kialakuló LLSS-ok igen hosszúak akár 10-20 másodperc is lehet az időtartamuk szemben a csatorna szokásos 300-600 μs -os átlagos nyitvatartási idejével. Mind a csatorna aktivitásának emelkedése (magas P_o), mind a LLSS-ban eltöltött hosszú idő (magas LLSS arány) eredményezi az SR vezikulákon korábban kimutatott

nagy mértékű kalcium felszabadulást. Chen és munkatársai is leírták, hogy a maurokalcin szubkonduktancia állapotot indukál, de náluk a csatorna maximális konduktanciájának $\approx 48\%$ -ának megfelelő csökkent vezetőképességű állapotok jelentek meg. A 60% -os és a 48% -os vezetőképességnek egyik magyarázata az lehet, hogy a mi rendszerünkben a töltéshordozó a kálium ion, míg Chen esetében cézium ion volt és a cézium ion önmagában is – kis mértékben – megváltoztatja a csatorna kapuzását (Meissner és munkatársai, 1997) Intézetünk másik munkacsoportja megvizsgálta a maurokalcin és mutánsainak elemi kalcium felszabadulási eseményeire (ECRE, Elementary Ca^{2+} Release Events) gyakorolt hatását patkány illetve béka harántcsikolt izmain. 50 nM MCa alkalmazása során viszonylag hamar ($2\text{--}10$ perc) az ECRE-k frekvenciája emelkedett. A toxin beadását követően az elemi események amplitúdója csökkent, a térbeli kiterjedést viszont a toxin nem befolyásolta. Az elemi események amplitúdójának csökkenése összhangban van a „single channel” méréseink során tapasztalt csökkent vezetőképességű állapotok megjelenésével. A maurokalcinnal kezelt csatorna megtartja rianodin érzékenységét is, maurokalcin és rianodin együttes alkalmazása során ($1\text{ }\mu\text{M}$ rianodin, 50 nM MCa) mindkét anyag hatása megjelenik. Tripathy és munkatársai (Tripathy és munkatársai, 1998) az imperatoxin-A (IpTx_a) hatását (A csatorna maximális konduktanciájának $28\text{--}43\%$ -ának megfelelő csökkent vezetőképességű állapotokat indukált RyR1- és RyR2-nél.) vizsgálták izolált csatornán (RyR1), ahol 100 nM IpTx_a és $5\text{ }\mu\text{M}$ rianodin együttes alkalmazása során a csatorna az IpTx_a és a rianodin által indukált szubkonduktancia állapotok között oszcillált. A maurokalcin esetén is (mely szoros hasonlóságot mutat szerkezetében, illetve hatásában az IpTx_a -val) sikerült hasonló hatást leírni. A mi méréseink esetében is a csatorna a maurokalcin illetve a rianodin által kiváltott szubkonduktancia állapotok között oszcillált. Mivel mindkét alkalmazott anyag kiváltotta „saját” hatását, egymástól és egymás hatásától függetlenül, arra következtettünk, hogy a MCa és a rianodin a csatorna különböző szegmenseihez kötődnek. A „single channel” rekordok vizsgálata során megállapítottuk, hogy a rianodin által kialakított szubkonduktancia állapotban a csatorna több időt tölt, így arra a következtetésre jutottunk, hogy a rianodin konformáló hatása erősebb a maurokalcin konformációt befolyásoló hatásánál.



34. ábra A vad típusú és a mutáns peptidek várható térbeli szerkezete és aminosavszekvenciája. A felső panel a maurokalcin NMR mérések alapján rekonstruált háromdimenziós szerkezetét ábrázolja. A bázikus aminosavak piros, a savas aminosavak kék, a többi aminosav fehér színnel van jelölve. Az alsó panel első képén a piros szín jelöli azokat a pozitív aminosavakat, melyek mutációját vizsgáltuk, az összes többi aminosav fehér színű. A további képeken a sárga szín az aktuálisan mutált aminosavat jelöli.

A maurokalcin hatásmechanizmusát a „single channel” méréseink alapján alkotott modell szerint képzeljük el (35. ábra). Öt kötőhely jelenlétét valószínűsítjük. Ebből négy (monomerenként egy), a csatorna pórusától távol helyezkedne el, és a csatorna P_o -jának módosításáért (növeléséért) felelős, míg az ötödik kötőhely, mely a LLSS-ok kialakulásában játszik szerepet, a csatorna pórusában, vagy annak közvetlen közelében helyezkedik el. Ezért az ide bekötődő maurokalcin hatása polaritásfüggő. Mivel LLSS-okat mindig megnövekedett aktivitású (P_o) szakasz előzi meg, ezért a kötőhelyek kooperációs viszonyát feltételezzük. Ha egyszer a maurokalcin elfoglalja a „középső” kötőhelyet, a csatorna a LLSS és zárt állapot között nem dóziszfüggő módon billeg (sem a LLSS-ok frekvenciája, sem pedig átlagos hossza nem dóziszfüggő). A csatorna néha magas aktivitású, normál kapuzású állapotba kerül.



35. ábra A maurokalcin kötőhelyek pozíciójára javasolt modell. A modell szerint mindegyik RyR1 monomer hordozna egy kötőhelyet, és a négy monomer közösen alakít ki egy további kötőhelyet a pórusban. Az üres körök a kötőhelyeket, a teli körök a MCa-t jelölik. A szaggatott vonal a kötőhelyek kooperatív jellegére utal. A középső fehér négyzet a csatorna pórusát jelöli, melynek területe arányos a konduktanciával.

5.2. A különböző mutációk hatása eltérő

Zhu és munkatársai a *Buthotus judaicus* nevű skorpió két toxinját (BjTx-1, BjTx-2) vizsgálták (Zhu és munkatársai, 2004). A 28 aminosavból álló két peptid toxin szekvenciája csak egy (a 16-os) pozícióban tér el egymástól. Mindkét toxin fokozza a kalcium csatornán a ^3H rianodin kötését, az SR kalcium felszabadulást, valamint lipid kettősrétegbe épített RyR1-en szubkonduktancia állapotokat indukálnak. A hatás kialakításában a szerzők szerint egy bázikus aminosavakból álló „mező” (^{11}Lys , ^{13}Lys , ^{16}Lys) a felelős. A 16-os pozíciójú bázikus aminosav lecserélése semleges aminosavra (izoleucinra) a toxin hatását jelentősen csökkentette. A bázikus aminosavak jelentőségét a toxinok és a RyR1 kölcsönhatásaiban az IpTx_a és az A-peptid esetében is leírták, előbbinél a ^{23}Arg lecserélése Glu-ra, utóbbinál ^{684}Arg módosítása Glu-ra az aktiváló hatás megszűnését eredményezte. Lee az IpTx_a-RyR közötti kölcsönhatás vizsgálata során azt feltételezte, hogy a kötődésben az IpTx_a felszínén megjelenő bázikus mező alakja, mintázata meghatározóbb, mint a toxin térbeli szerkezete (Lee és munkatársai, 2004). Intézetünk egyik munkacsoportja kimutatta, hogy a mutációk módosítják a kalcium felszabadulás elemi események jellemzőit is. A vad típushoz hasonlóan a 8-as és 19-es mutáns olyan hosszantartó kalcium felszabadulási eseményeket okozott, melyek kontroll körülmények között nem voltak megfigyelhetőek. Ezzel szemben a 22-es mutánsnál az elemi események szignifikánsan rövidebbek voltak, a 24-es mutáns pedig gyakorlatilag hatástalan volt. Az izolált csatornán végzett mérések során a 8-as és 19-es mutáns hatásában nem különbözött jelentősen a vad típustól, míg a 20-, 22-, 23-as mutánsok rianodin receptorra kifejtett hatása csökkent, a 24-es mutáns pedig gyakorlatilag hatástalan volt. Az elemi kalcium felszabadulási események vizsgálata során nyert adatok és „single channel” méréseink értelmezése egymást megerősíti. A kollaborációs partnereink és saját adataink alapján valószínűsíthető, hogy a maurokalcin esetében a 24-es pozíciójú aminosav az, amely kritikus a toxin hatásának kialakításában. Amennyiben a mutáció térben a kritikus helytől távolabb következik be, a toxin hatása kevésbé változik meg a vad típushoz képest. Ahogy a korábban említett BjTx-1, BjTx-2, IpTx_a, A-peptid esetében, úgy a MCa hatásában is a toxin felszínén megjelenő bázikus aminosavak felelősek a hatás kialakításáért (19 **KKCKRR** 24). A korábban említett toxinokhoz hasonlóan a MCa-RyR kapcsolat kialakulásában is az elektrosztatikus erők játszhatnak szerepet, ezért a MCa kötő doménjében bekövetkező mutációk módosíthatják az elektrosztatikus hatásokat és / vagy a szubkonduktancia állapotok karakterét. Felmerül, hogy a MCa-RyR kölcsönhatás megváltozása esetleg az aminosav

szubsztitúció következtében bekövetkező szerkezeti változás eredménye, ám ennek ellent mond a toxin szerkezetét stabilizáló három diszulfid híd megléte.

5.3. A maurokalcin hatása polaritásfüggő

Tripathy és munkatársai a korábban már említett munkájukban (Tripathy és munkatársai, 1998) kimutatták, hogy a maurokalcinnal szoros szerkezeti homológiát mutató IpTx_a hatása feszültség- és polaritásfüggést mutat. A toxin által okozott szubkonduktancia állapot aránya -60 mV-os tartófeszültségen 5% körül volt. Amennyiben a tartófeszültséget kevésbé negatív értékre állították be, ez az arány fokozatosan nőtt és +40-60 mV-nál értéke megközelítette a 100%-ot. Munkánk során mi is azt találtuk, hogy a maurokalcin és mutánsai által indukált szubkonduktancia állapotok paramétereit befolyásolja az alkalmazott membránfeszültség polaritása illetve a csatornán átfolyó áram iránya. Mikor a töltés hordozó ion (K^+ vagy Ca^{2+}) a *transz* (luminális) oldalról áramlik a *cisz* (citoszólikus) oldalra az áram iránya azonos a kalcium felszabaduláskor az SR-ből kiáramló kalcium ionok irányával (“fiziológias irány”). A “fiziológias irány” (a töltéshordozó kation [K^+ vagy Ca^{2+}] a *transz* oldalról áramlik a *cisz* oldalra) szerinti membrán potenciált alkalmazva az LLSS arányok mindegyik vizsgált toxin esetében kisebbek, mint az ellentétes polaritáson (“ellentétes irány”) kapott értékek (1. táblázat, 42 oldal).

A toxinok rianodin receptorra gyakorolt hatását feszültséglépcsők alkalmazásával megvizsgálva megállapítottuk, hogy adott polaritáson 20-120 mV-os feszültség tartományban a toxinok hatása függ az alkalmazott membránfeszültségtől, mivel az LLSS relatív konduktanciáját a membránfeszültség emelése növelte. Az IpTx_a-val szoros szerkezeti és funkcionális homológiát mutató maurokalcin és mutánsai esetében a polaritásfüggést kimutattuk.

5.4. A maurokalcin és mutánsai nem befolyásolják a Ca^{2+} -pumpa aktivitását

A toxinok (MCa, [Ala⁸]MCa, [Ala¹⁹]MCa, [Ala²⁰]MCa, [Ala²²]MCa, [Ala²³]MCa, [Ala²⁴]MCa) egyik vizsgált koncentrációban (50 nM, 200 nM, 500 nM) sem módosították az SR kalcium pumpa hidrolitikus aktivitását. A maurokalcin erősen bázikus molekula (fiziológias pH: +7). A felszíni töltésmintázat alapján a molekula felszínén egy markáns bázikus mező jelenik meg, aminek kialakításában a Gly és a Lys aminosavak vesznek részt. A kapott eredmény arra

utal, hogy az SR kalcium pumpa – ellentétben a RyR1-gyel – nem rendelkezik olyan régióval, mely képes lenne kapcsolódni a maurokalcinnal. Valószínűsíthető, hogy a maurokalcin kalcium homeosztázist módosító hatásában az SR kalcium pumpája nem vesz részt.

5.5. A gadolínium gátolja a RyR aktivitását

A gadolínium számos kalcium kötőhellyel rendelkező membránfehérjéhez (N-, T- és L-típusú kalcium csatornák, SRCa-ATPáz) képes kötődni, ezért különböző rendelkezésünkre álló technikákkal („single channel” mérés, rianodin kötés, rapid filtráció) tanulmányoztuk, hogy milyen hatást gyakorol a vázizom típusú rianodin receptorra. A mérések során a Gd^{3+} -t citoplazmatikus és a luminális oldalon is alkalmaztuk annak eldöntésére, hogy az ion hatását melyik oldalon fejti ki. A “single channel” mérésekben a Gd^{3+} mindkét oldalon hasonlóan, koncentráció függő módon gátolta a csatorna aktivitását. Nagyon meglepő volt, hogy a fél-gátló koncentrációk értékei ($\approx 5 \mu M$) és a Hill-koefficiens értékek (≈ 4) hasonlóak voltak mind a két oldalon, ami arra utal, hogy a működő funkcionális csatornán 4 hasonló affinitással bíró kötőhely van jelen a Gd^{3+} számra a citoplazmatikus és a luminális oldalon egyaránt. Korábbi (Tripathy és munkatársai, 1996; Herrmann-Frank és munkatársai, 1996) eredmények alapján ismert, hogy a luminális Ca^{2+} -koncentráció befolyásolja a csatorna aktivitását, ám eddig nem sikerült kation kötőhely jelenlétét leírni a luminális oldalon. Felmerül hogy a kalciumhoz hasonló módon a gadolínium is csupán az egyik oldalon (*cisz*) képes kötődni a csatornához és a *transz* oldalon alkalmazott Gd^{3+} tulajdonképpen az ionvezető póruson átjutva a citoplazmatikus oldalon kötődik a kalcium csatornához. A Gd^{3+} hatásában feszültség-függést nem mutatott és a *transz* oldalon a gátlást akkor is kifejtette, amikor a *cisz* oldalon $100 \mu M$ EGTA-t alkalmaztunk, mely a Gd^{3+} -ot milliószor jobban köti, mint a Ca^{2+} -t. Amikor az EGTA-t *transz* oldalon alkalmaztuk a csatorna aktivitása a gadolínium gátlásból igen hamar (≈ 10 másodperc) visszatért, ami arra utal, hogy az EGTA a luminális oldali kötőhelyről távolította el a Gd^{3+} -t. Megvizsgáltuk, hogy vajon van-e versengés a Ca^{2+} és a Gd^{3+} között a RyR1 alacsony és magas affinitású kalcium kötőhelyei között. A mérések során $4,5 \mu M$ Gd^{3+} (*cisz*) jelenlétében a szabad kalcium koncentrációt $100 \mu M$ -ról $1 mM$ -ig emeltük, viszont a csatorna aktivitása szignifikánsan nem változott ($100 \mu M$ Ca^{2+} : $P_o=0,011\pm0,006$, $1 mM$ Ca^{2+} : $P_o=0,005\pm0,002$). Ezzel szemben $50 \mu M$ EGTA (*cisz*) alkalmazása során a csatorna P_o -ja nőtt, mivel az EGTA a szabad Gd^{3+} koncentrációt

gyakorlatilag nullára csökkentette, miközben a kalcium koncentráció csak néhány tíz mikromóllal csökkent. Amennyiben a Gd^{3+} és a Ca^{2+} között versengés lenne, akkor az 1 mM-os szabad kalciumnak le kellett volna szorítania a Gd^{3+} -t a kötőhelyéről és a csatorna aktivitásának kontroll értékhez kellett volna közelítenie. Mivel a *cisz* oldalon gadolíniummal gátolt csatorna aktivitása szignifikánsan nem változott a kalcium hozzáadásakor, megállapíthatjuk hogy a Gd^{3+} a gátlást *cisz* oldalon nem a kalcium kötőhelyeken keresztül fejt ki.

Rapid filtrációval és rianodin kötéssel is ellenőriztük, hogy a gadolínium valóban befolyásolja-e a RyR1-en keresztül folyó kalcium felszabadulást. Ezeket a méréseket nem tisztított kalcium csatornákon, hanem HSR vezikulákon végeztük, mely lehetőséget nyújt ahhoz, hogy a Gd^{3+} hatását nagy számú kalcium csatornán együttesen vizsgáljuk. Rapid filtrációnál a kontrollhoz képest 20 μ M gadolínium jelenlétében a kalcium felszabaduláshoz szükséges idő nőtt, miközben a maximálisan felszabadítható kalcium mennyisége nem változott. A kalcium felszabaduláshoz szükséges idő emelkedése arra utal, hogy a HSR vezikulában lévő kalcium csatornák aktivitását a Gd^{3+} gátolja.

A gadolínium (5 μ M) úgy növelte a rianodin kötés disszociációs állandóját, hogy közben a B_{max} értéke szignifikánsan nem változott. A rianodin kötés gadolínium függése is arra utal, hogy a gadolínium koncentráció függő módon gátolja a RyR1 működését. A kapott eredmények arra utalnak, hogy a RyR1 mind *cisz* mind *transz* oldalon képes gadolíniumot kötni. A gadolínium mindkét oldalon reverzibilisen és koncentrációfüggő módon gátolja a csatorna aktivitását, a meghatározott Hill-koefficiens és EC_{50} értékek hasonlóak. A gadolínium *cisz* oldali kötőhelye valószínűleg nem azonos a *cisz* oldalon található korábban leírt kalcium kötőhellyel.

6. Összefoglalás

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

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

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

Summary

Maurocalcine (MCA), a 33 amino acid peptide toxin obtained from scorpion venom, has been shown to interact with the isolated skeletal-type ryanodine receptor (RyR1) and to strongly modify its gating. In this study, we explored the effects of MCA and its mutants (Lys8Ala, Lys19Ala, Lys20Ala, Lys22Ala, Lys23Ala and Lys24Ala) on single channel currents through RyR1 in artificial lipid bilayer and we studied the effects of toxins on SR Ca^{2+} -pump using coupled enzyme assay technique. The effect of gadolinium ions on purified calcium channel (RyR1) and heavy SR vesicles (HSR) were studied using single channel experiments, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ flux measurements and [^3H] ryanodine binding assay.

Individual LLSSs last even for several seconds and the average length of these events and the frequency of their occurrence are altered in different mutations, according the spatial distance of the mutated amino acid from the critical residue, ^{24}Arg . If the mutated residue is close to this critical residue, the length and the frequency of these LLSSs lessen resulting in lower LLSS ratio too. The effect is strongly dependent on the direction of the channel current (the polarity). If the direction of the cation current is the same as in case of calcium release, the toxin is about 8-10 fold less effective compared to the opposite current direction. The toxin and its mutants induce similar effect at 50 μM and at 240 nM free calcium concentration. Here we show, that effect of the toxin governed by the large single charged surface formed by the residues ^{20}Lys , ^{22}Lys , ^{23}Arg , ^{24}Arg , ^8Lys as shown by the effect of the 19 mutant, which exhibits almost identical effect with the wild type. Our results suggest that MCA and its mutants do not have any effect on activity of SR Ca^{2+} -pump

In single channel experiments the gadolinium inhibited the activity of calcium channel concentration dependent manner on both (*cis* and *trans*) side. It inhibited the calcium release from SR vesicles and [^3H] ryanodine binding. The inhibition of channel did not have any voltage-dependence. Our results suggest that there are sites on *cis* and *trans* side of the RyR1 that are able to bind Gd^{3+} causing inhibition of channel with similar parameters (Hill coefficient, IC_{50}).

7. Irodalomjegyzék

- Altaj X., Cheng W., Esteve 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 dihydropyridine receptor Cav 1.1 subunit share common binding sites on the skeletal ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.* 280. (6) 4013-4016.
- Anderson K., Lai F. A., Liu Q. Y., Rousseau E., Erickson H. P., Meissner G. (1989) Structural and functional characterization of the purified cardiac ryanodine receptor- Ca^{2+} channel complex. *J. Biol. Chem.* 264. 1329-35.
- Balshaw D., Gao L., Meissner G. (1999) Luminal loop of ryanodine receptor: A pore-forming segment? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96. 3345-3347.
- Beard N. A., Sakowska M. M., Dulhunty A. F. and Laver D. R. (2002) Calsequestrin is an inhibitor of skeletal muscle ryanodine receptor calcium release channels. *Biophys. J.* 82. 310-320.
- Biagi B. A., Enyeart J. J. (1990) Gadolinium blocks low- and high-threshold calcium currents in pituitary cells. *Am. J. Physiol.* 259. C515-C520.
- Boisseau S., Mabrouk K., Ram N., Garmy N., Collin V., Tadmouri A., Mikati M., Sabatier J. M., Ronjat M., Fantini J., De Waard M. (2006) Cell penetration properties of maurocalcine, a natural venom peptide active on the intracellular ryanodine receptor. *Biochim. Biophys. Acta* 1758. 308-319.
- Carl S. L., Felix K., Caswell A. H., Brandt N. R., Ball W. J. Jr, Vaghy P. L., Meissner G., Fergusson D. G. (1995) Immunocolocalization of sarcolemmal dihydropyridine receptor and sarcoplasmic reticular triadin and ryanodine receptor in rabbit ventricle and atrium. *J. Cell Biol.* 129. 672-682.
- Chen L., Estève E., Sabatier J. M., De Waard M., 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 *The Journal of Biological Chemistry* 16095-16106.
- Chevallier J., Butow R. A. (1971) Calcium binding to the sarcoplasmic reticulum of the rabbit skeletal muscle. *Biochemistry* 10. 2733-2737.

- Csernoch L., Szentesi P., Sárközi S., Szegedi Cs., Jóna I., Kovács L. (1999) Effects of tetracaine on sarcoplasmic calcium release in mammalian skeletal muscle fibers. *Journal of Physiology* 515.3, 843-857
- Docherty R. J., (1988) Gadolinium specifically blocks a component of voltage sensitive calcium current in neuroblastoma x glioma hybrid cells. *J. Physiol.* 381. 69P.
- Docherty R. J., (1988) Gadolinium selectively blocks a component of calcium current in rodent neuroblastoma x glioma hybrid (NG108-15) cells. *J. Physiol.* 398. 33-47.
- Dudley S. C Jr., Todt H., Lipkind G., Fozzard H. A. (1995) A mu-conotoxin-insensitive Na⁺ channel mutant: possible localization of a binding site at the outer vestibule. *Biophys. J.* 69. 1657-1665.
- Estève E., Smida-Rezgui S., Sarkozi S., Szegedi Cs., Regaya I., Chen L., Altafaj X., Rochat H., Allen P., Pessah I. N., Marty I., Sabatier J. M., Jona I., De Waard M., Ronjat M. (2003) Critical Amino Acid Residues Determine the Binding Affinity and the Ca²⁺ Release Efficacy of Maurocalcine in Skeletal Muscle Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 37822-37831.
- Estève E., Mabrouk K., Dupuis A., Smida-Rezgui S., Altafaj X., Grunwald D., Platel J. C., Andreotti N., Marty I., Sabatier J. M., Ronjat M., De Waard M. (2005) Transduction of the scorpion toxin maurocalcine into cells. Evidence that the toxin crosses the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 280 (13) 12833-9.
- El-Hayek R., Antoniu B., Wang J., Hamilton S. L., Ikemoto N. (1995) Identification of calcium release-triggering and blocking regions of the II–III loop of the skeletal muscle dihydropyridine receptor. *J. Biol. Chem.* 270. 22116–22118.
- Fajloun Z., Kharrat R., Chen L., Lecomte C., Di Luccio E., Bichet D., El Ayeb M., Rochat H., Allen P. D., Pessah I. N., De Waard M., Sabatier J. M. (2000) Chemical synthesis and characterisation of maurocalcine, a scorpion toxin that activates Ca²⁺ release channel/ryanodine receptors. *FEBS Letters* 469. 179-185.
- Fill M., Copello J. A. (2002) Ryanodine Receptor Calcium Release Channels. *Physiol. Rev.* 82. 893-922.
- Fujii J., Otsu K., Zorzato F., de Leon S., Khanna V. K. (1991) Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* 253. 448-451.

- Gurrola G. B., Arévalo C., Sreekumar R., Lokuta A. J., Walker J. W., Valdivia H. H. (1999) Activation of ryanodine receptors by imperatoxin A and a peptide segment of the II-III loop of dihydropyridine receptor. *J. Biol. Chem.* 274. 7879–7886.
- Hidalgo P., MacKinnon R. (1995) Revealing the architecture of a K⁺ channel pore through mutant cycles with a peptide inhibitor. *Science* 268. 307-310.
- Hakamata Y., Nakai J. Takeshima H., Imoto K. (1992) Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain. *FEBS. Lett.* 312. 229-35.
- Hambly B. D., Dos Remedios C. G. (1977) Responses of skeletal muscle fibres to lanthanide ions. Dependence of the twitch response on ionic radii. *Experientia* 33. 1042-1044.
- Herrmann-Frank A., Richter M., Sarközi S., Mohr U., Lehmann-Horn F. (1996) 4-chloro-*m*-cresol, a potent and specific activator of the skeletal muscle ryanodine receptor. *Biochimica et Biophysica Acta* 1289. 31-40.
- Herrmann-Frank A., Darling E., Meissner G. (1991) Functional characterization of the Ca²⁺-gated Ca²⁺ release channel of vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Pflügers Arch.* 418. 353-359.
- Herzog A., Szegedi Cs., Jóna I., Herberg F. W., Varsanyi M. (2000) Surface plasmon resonance studies prove the interaction of skeletal muscle sarcoplasmic reticular Ca²⁺ release channel/ryanodine receptor with calsequestrin. *FEBS Letters* 472. 73-77.
- Jóna I., Martonosi A. (1986) The effects of membrane potential and lanthanides on the conformation of the Ca²⁺-transport ATPase in sarcoplasmic reticulum. *Biochem. J.* 234. 363-371.
- Jóna I., Szegedi Cs., 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. *Pflügers Arch-Eur. J. Physiology* 441. 729-738.
- Lai F. A., Ericson 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.
- Lai F. A., Dent M., Wickenden C., Xu L., Kumari G. (1992.a) Expression of a cardiac Ca²⁺ release channel isoform in mammalian brain. *Biochem. J.* 288. 553-564.
- Lai, F. A., Liu, Q. Y., Xu L., El-Hashem, A., Kramarcy, N. R. (1992.b) Amphibian ryanodine receptor isoforms are related to those of mammalian skeletal muscle. *Am. J. Physiology* 263. C365-372.

- Lee C. W., Lee E. H., Takeuchi K., Takahashi H., Shimada I., Sato K., Shin S. Y., Kim D. H., Kim J. I. (2004) Molecular basis of the high-affinity activation of type 1 ryanodine receptors by imperatoxin A. *Biochem. J.* 377. 385-394.
- Leong P., MacLennan D. H., (1998) A 37-amino acid sequence in the skeletal muscle ryanodine receptor interacts with the cytoplasmic loop between domains II and III in the skeletal muscle dihydropyridine receptor. *J.Biol. Chem.* 273. 7791-7794.
- Liu W., Pasek D. A., Meissner G. (1998) Modulation of Ca^{2+} -gated cardiac muscle Ca^{2+} -release channel (ryanodine receptor) by mono- and divalent ions. *Am. J. Physiol.* 274. 120-128.
- Ma J., Fill M., Knudson C. M., Campbell K. P., Coronado, R., (1988) Ryanodine receptor of skeletal muscle is a gap junction-type channel. *Science* 242. 99-102.
- MacKrell JJ. (1999) Protein-protein interactions in intracellular Ca^{2+} -release channel function. *Biochem. J.* 337. 345-361.
- Martonosi A. N., Pikula S. (2003) The structure of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Acta Biochimica Polonica* 50. 337-365.
- Meissner G. (1984) Adenine nucleotide stimulation of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 159. 1365-74.
- Meissner G., Darling E., Eveleth J. (1986) Kinetics of rapid Ca^{2+} release by sarcoplasmic reticulum. Effects of Ca^{2+} , Mg^{2+} , and adenine nucleotides. *Biochemistry* 25. 236-44.
- Meissner G., Rios E., Tripathy A., Pasek D. A. (1997) Regulation of skeletal muscle Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) by Ca^{2+} and monovalent cations and anions. *J. Biol. Chem.* 272. 1628-1638.
- Meissner G. (2004) Molecular regulation of cardiac ryanodine receptor ion channel. *Cell Calcium* 35. 621-628.
- Menegazzi P., Larini F., Treves S., Guerrini R., Quadroni M., Zorzato F. (1994) Identification and characterization of three calmodulin binding sites of the skeletal muscle ryanodine receptor. *Biochemistry* 33. 9078-9084.
- Mikami A., Imoto K., Tanabe T., Niidome T., Mori Y., Takeshima H., Narumiya S., Numa S., (1989) Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature* 340. 230-233.

- Monnier N., Procaccio V., Stieglitz P., Lunardi J. (1997) Malignant hyperthermia susceptibility is associated with a mutation of the alpha 1-subunit of the human dihydropyridine-sensitive L-type voltage dependent calcium channel receptor in skeletal muscle. *Am. J. Hum. Genet.* 60. 1316-1325.
- Mosbah A., Kharrat R., Fajloun Z., Renisio JG., Blanc E., Sabatier JM., El Ayeb M., Darbon H. (2000) A new fold in the scorpion toxin family, associated with an activity on a ryanodine-sensitive calcium channel. *Proteins* 40. 436-442.
- Moutin M. J., Dupont Y. (1988) Rapid filtration of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release from skeletal sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 263. 4228-4235.
- Nakai J., Imagava T., Hakamata Y., Shigekawa M., Takeshima H., Numa S. (1990) Primary structure and functional expression from cDNA of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel. *FEBS. Lett.* 271. 169-177.
- Olivares E. B., Tanksley S. J., Airey J. A., Beck C. F., Ouyang Y. (1991) Nonmammalian vertebrate skeletal muscles express two triad junctional foot protein isoform. *Biophys. J.* 59. 1153-1163.
- O' Reilly F. M., Mylene R., Jona I., Szegedi Cs., 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. *J. Biophysical* 82. 145-155.
- Protasi F. (2002) Structural interaction between RyRs and DHPRs in calcium release units of cardiac and skeletal muscle cells. *Front. Biosci.* 7. d650-658.
- Rios, E. Pizzaro, G. (1988) Voltage sensors and calcium channels of excitation-contraction coupling. *News in Physiol. Scien.* 3. 223-228.
- 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. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* (2007), DOI 10.1007/s10974-007-9113-x
- Sárközi S., Szegedi Cs., Szentesi P., Csernoch L., Kovács L., Jóna István (2000) Regulation of the rat sarcoplasmic reticulum calcium release channel by calcium. *J. Muscle Research and Cell Motility* 21. 131-138.
- Smith, J. S., Coronado, R., Meissner, G., (1986) Single channel measurements of the calcium release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Activation by Ca^{2+} and ATP and modulation by Mg^{2+} . *J. General Physiology* 88. 573-588.

- Slavik K. J., Wang J. P., Aghdasi B., Zhang J. Z., Mandel F., Malouf N., Hamilton S. L., (1997) A carboxy-terminal peptide of the alpha 1-subunit of the dihydropyridine receptor Ca^{2+} -release channels. *Am. J. Physiol.* 272. 1475-1481.
- Stokes D. L., Green N. M. (2003) Structure and function of the calcium pump. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 32. 445-468.
- Szappanos H., Smida-Rezgui S., Cseri J., Simut C., Sabatier J. M., De Waard M., Kovács L., Csernoch L., Ronjat M. (2005) Differential effects of maurocalcine on Ca^{2+} release events and depolarization-induced Ca^{2+} release in rat skeletal muscle. *J. Physiol.* 565. 843-853.
- Szegedi Cs., Sárközi S., Herzog A., Jóna I., Varsányi M. (1999) Calsequestrin: more than only a luminal Ca^{2+} buffer inside the sarcoplasmic reticulum. *J. Biochemistry* 337. 19-22.
- Szentesi P., Jacquemond V., Kovács L., Csernoch L. (1997) Intramembrane charge movement and sarcoplasmic calcium release in enzymatically isolated mammalian skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* 505. 371-384.
- Tanabe T., Takeshima H., Mikami H., Flockerzi V., Takahashi H., Kangawa K., Kojima M., Matsuo H., Hirose T., Numa S., (1987) Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 328. 313-318.
- Tanabe T., Mikami A., Numa S., Beam K. G. (1990) Cardiac-type excitation-contraction coupling in dysgenic skeletal muscle injected with cardiac dihydropyridine receptor cDNA. *Nature* 344. 451-453.
- Tanabe T., Beam K. G., Adams B. A., Niidome T., Numa S. (1990) Regions of skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation-contraction coupling. *Nature* 346. 567-569.
- Tanq W., Sencer S., Hamilton S. L. (2002) Calmodulin modulation of proteins involved in excitation-contraction coupling. *Front. Biosci.* 7. d1583-1589.
- Tripathy A., Meissner G. (1996) Sarcoplasmic reticulum luminal Ca^{2+} has access to cytosolic activation and inactivation sites of skeletal muscle Ca^{2+} release channel. *Biophys. J.* 70. 2600-2615.
- 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. 679-690.
- Valdivia H. H., Hogan K., Coronado R. (1991) Altered binding site for Ca^{2+} in the ryanodine receptor of human malignant hyperthermia. *Am. J. Physiol.* 261. C237-245.

- Wagenknecht T., Samsó M. (2002) Three-dimensional reconstruction of ryanodine receptors. *Frontiers in Bioscience* 7. d1 1464-1474.
- Wang S., Trumble W. R., Liao H., Wesson C. R., Dunker A. K., Kang C. H. (1992) Crystal structure of calsequestrin from rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Nat. Struct. Biol.* 5. 476-483.
- Yamazawa T., Takeshima H., Shimuta M., Iino M., (1997) A region of ryanodine receptor critical for excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 272. 8161-8164.
- Zhu X., Zamudio F. Z., Olbinski B. A., Lourival D. P., Valdivia H. H. (2004) Activation of skeletal ryanodine receptors by two novel scorpion toxins from *Buthotus judaicus*. *J. Biological Chemistry* 279,25. 26588-26596.
- Zucchi R., Ronca-Testoni S. (1997) The Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} Channel/Ryanodine Receptor: Modulation by Endogenous Effectors, Drugs and Disease States. *Pharmacological Reviews* 49. 1-51.

8. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném hálámat kifejezni, a DE OEC Élettani Intézet korábbi és jelenlegi igazgatójának, Kovács László professzor úrnak és Csernoch László professzor úrnak, valamint az intézet valamennyi munkatársának, amiért támogattak és segítettek munkámban.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Jóna Istvánnak munkám során nyújtott útmutatásaikért és baráti támogatásáért.

Köszönettel tartozom közvetlen munkatársaimnak: Almássy Jánosnak, Sárközi Sándornak és Szegedi Csabának önzetlen segítségükért.

Köszönöm Sági Éva segítségét, amit a kísérletek előkészítésében nyújtott.

9. Függelék

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények, absztraktok, előadások és posztterek

Közlemény:

- B. Lukács**, M. Sztretye, J. Almássy, S. Sárközi, B. Dienes, K. Mabrouk, C. Simut, L. Szabó, P. Szentesi, M. De Waard, M. Ronjat, I. Jóna and L. Csernoch (2008): Charged surface area of maurocalcine determines its interaction with the skeletal ryanodine receptor. *Biophysical Journal* közlésre elfogadva. [IF: 4,757]
- S. Sárközi, Cs. Szegedi, **B. Lukács**, M. Ronjat and I. Jóna (2005) Effect of gadolínium on the ryanodine receptor/sarcoplasmic reticulum calcium release channel on skeletal muscle. *FEBS Journal* 272. 464-471. [IF: 3,260* (3,033)]

Absztraktok:

- B. Lukács**, J. Almássy, E. Esteve, Cs. Szegedi, (2003): Effect of maurocalcine on calcium release channel-ryanodine receptor. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 24: P357
- I. Jóna, J. Almássy, M. Ronjat, **B. Lukács**: Effect of Maurocalcine on RyR1 and RyR2 is Substantially Different. *Biophysical Journal* 2007 January, 87a

Előadások és posztterek:

- Szegedi Csaba, Almássy János, **Lukács Balázs**, Jóna István: Maurokalcin hatása a vázizom típusú rianodin receptor működésére. Magyar Élettani Társaság LXVIII. Vándorgyűlése, Debrecen, 2004 (előadás)
- Lukács Balázs**: Skorpiótoxin (maurokalcin) hatása a vázizom kalcium csatornájára. Ph.D. és TDK tudományos diáktalálkozó, Debrecen, 2005. (előadás)
- Lukács Balázs**, Almássy János, Sárközi Sándor: Skorpiótoxin (maurokalcin) hatása a vázizom kalcium transzportjára. Magyar Élettani Társaság LXIX. Vándorgyűlése, Budapest, 2005 (előadás)

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

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

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

Az értekezésben fel nem használt közlemények, absztraktok, előadások és posztterek

Közlemény:

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

Absztrakt

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

Előadások és posztterek:

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

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

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

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

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

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

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