

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

Sztretye Mónika Tünde

**A kalciumfelszabadulás elemi eseményeinek
szabályozása és módosulása
normál és pathológiás körülmények között**



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2009

„Ja Kalzium, das ist alles!”
(Yes, calcium, that’s everything!)
—O. Loewi (1936)

Tartalomjegyzék

I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
II.1. A vázizom morfológiai sajátosságai	7
II.1.1. A vázizom felépítése	7
II.1.2. A vázizom finomszerkezete	7
II.1.2.1. A kontraktilis fehérjék	8
II.1.3. Speciális membránrendszerek	10
II.1.3.1. Sarcolemma	10
II.1.3.2. T-tubulus és sarcoplasmaticus reticulum	10
II.1.3.3. A sarcoplasmaticus reticulum Ca ²⁺ -tartalma	12
II.2. A dihidropiridin receptor	12
II.3. A rianodinreceptor	14
II.3.1. Elektrofiziológiai sajátosságok	14
II.3.2. Molekuláris struktúra	15
II.3.2.1. Izoformák	15
II.3.2.1.1. RyR1	17
II.3.2.1.2. RyR2	17
II.3.2.1.3. RyR3	18
II.3.2.1.4. RyR α/β	18
II.3.3. Szabályozó fehérjék	18
II.3.4. A RyR fiziológias szabályozása	21
II.3.5. A RyR farmakológiai szabályozása	23
II.4. A sarco-(endo)plasmaticus Ca²⁺-ATPáz	24
II.5. Az excitációs-kontrakciós kapcsolat jellegzetességei	25
II.5.1. A kalciumfelszabadulás strukturális alapjai	26
II.5.1.1. A kalciumfelszabadító egység és a „couplon”	28
II.5.2. A kalciumfelszabadulás elemi eseményei	28
II.5.2.1. Kialakulás és előfordulás	28
II.5.2.2. Jellegzetes paraméterek	30
II.5.2.3. Elemi események: kételtű vs. emlős esetén	31
II.5.3. A kalciumfelszabadulás mechanizmusa	32
II.5.3.1. Mechanikai csatolás	33
II.5.3.2. Kalcium-indukált kalciumfelszabadulás	33
II.5.3.3. A kalciumfelszabadulás befejeződése	35
II.6. A krónikus szívelégtelenség és a vázizomgyengeség kapcsolata	35
II.7. TPEN	37
III. CÉLKITŰZÉSEK	38

IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	40
IV.1. Sejtek és sejtenyésztés	40
IV.1.1. C2C12 egér vázizom sejt vonal tenyésztése	40
IV.1.2. Egyedi vázizomrostok preparálása	41
IV.1.3. A postmyocardialis infarktusos patkány állatmodell	42
IV.2. $[Ca^{2+}]_i$ változásainak követéséhez kapcsolódó módszerek	42
IV.2.1. Egyedi sejten történő fluoreszcens $[Ca^{2+}]_i$ -mérés	42
IV.2.2. A Ca^{2+} -fluxus kiszámítása	45
IV.2.3. Vizsgálatok konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal	46
IV.3. A lipid kettősréteg technika	48
IV.3.1. SR-vezikula preparálása emlős vázizomból	50
IV.3.2. A rianodinreceptor izolálása	51
IV.3.3. A Ca^{2+} -pumpa aktivitásának mérése „kapcsolt enzim-assay” segítségével	52
IV.4. Statisztikai elemzés	53
IV.5. A használt vegyszerek és eszközök kereskedelmi forgalmazói	54
V. EREDMÉNYEK	55
V.1. TPEN hatásának tanulmányozása C2C12 egér myoblast sejt vonalon	55
V.1.1. Eltérő TPEN koncentrációk hatékonyságának vizsgálata	55
V.1.2. TPEN hatása a Ca^{2+} myoplasmából való eltávolítására	56
V.1.3. Koffein és KCl-depolarizáció hatásának vizsgálata TPEN jelenlétében	58
V.1.4. TPEN hatása a KCl-depolarizáció által kiváltott kalciumtranziensek amplitúdójának méretére fiziológias és alacsony extracelluláris Ca^{2+} jelenlétében	61
V.1.5. Alacsony extracelluláris Zn^{2+} -koncentráció hatása	62
V.2. TPEN hatásának tanulmányozása patkányból enzimatikusan izolált egyedi izomrostokon	63
V.3. TPEN hatásának tanulmányozása békából mechanikusan izolált izomrostokon	66
V.3.1. TPEN hatása alacsony $[Mg^{2+}]_i$ alkalmazva	66
V.3.2. TPEN hatása emelt $[Mg^{2+}]_i$ alkalmazva	69
V.4. TPEN hatásának vizsgálata izolált RyR-on	70
V.5. TPEN hatása az SR Ca^{2+}-pumpára	73
V.6. Az elemi kalciumfelszabadulás események funkcionális változásai PMI állatmodellen	73
VI. MEGBESZÉLÉS	79

VI.1. TPEN hatása a C2C12 sejtek Ca²⁺-homeosztázisára	79
VI.2. TPEN hatása egyedi permeabilizált izomrostokon	80
VI.3. TPEN hatása izolált RyR-on	82
VI.4. Kalciumfelszabadulási események PMI állatmodellen	83
VII. ÖSSZEFOGLALÁS	85
SUMMARY	86
VIII. IRODALOMJEGYZÉK	87
IX. ÁBRAJEGYZÉK	104
X. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	106
XI. KÖZLEMÉNYEK	107
XII. FÜGGELÉK	112

Rövidítések jegyzéke

A disszertációban a szabad ionokat Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} stb. módon jelöltem.

A: amplitúdó	cis: cytosolnak megfelelő oldal
Å: Angström	CLSM: konfokális lézer pásztázó mikroszkóp (confocal laser scanning microscope)
ADP: adenzin-difoszfát	cm: centiméter
AM: acetoxi-metilészter	4-cmc: 4-chloro-m-cresol
AMP: adenzin-monofoszfát	CO₂: széndioxid
AP: akciós potenciál	CPA: ciklopiazonsav
4-AP: 4-aminopiridin	CRU: kalcium felszabadító egység (calcium release unit)
ATP: adenzin-trifoszfát	Csq: calsequestrin
ATPáz: adenzin-trifoszfátáz	ctg: kotangens
⁴⁵Ca²⁺: radioaktív kalcium ion	CTP: citidin-trifoszfát
Ca_{fura}: fura-2-höz kötött Ca^{2+} -mennyiség	DICR: depolarizáció indukált kalciumfelszabadulás (depolarization induced calcium release)
Ca_{parv}: parvalbuminhoz kötött Ca^{2+} -mennyiség	DHP/R α_{1S}: dihidropiridin/receptor (α_1 vázizom típusú alegység)
Ca_{pumpa}: a pumpákhoz kötött Ca^{2+} -mennyiség	DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
Ca_{szabad}: a szabad cytoplasmaticus Ca^{2+} -mennyiség	DMSO: dimetil-szulfoxid
Ca_{tot}: teljes intracelluláris Ca^{2+} -mennyiség	EC: extracelluláris (tér)
Ca_{transzp}: a Ca^{2+} -eltávolító mechanizmusok által transzportált Ca^{2+} mennyisége	ECC: excitációs-kontrakciós kapcsolat
Ca_{tropC}: troponin C-hez kötött Ca^{2+} -mennyiség	E_{Ca}: kalcium egyensúlyi potenciál
[Ca²⁺]_e: extracelluláris Ca^{2+} -koncentráció	EC₅₀: félhatásos dózis (effective concentration in 50%)
[Ca²⁺]_i: intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció	EDC: extensor digitorum communis
[Ca²⁺]_{SR/ER}: sarco-(endo)plasmaticus reticulum Ca^{2+} -koncentráció	EDL: extensor digitorum longus
[Ca²⁺]_{SR/szabad}: szabad sarcoplasmaticus reticulum Ca^{2+} -koncentráció	EDPA: etylene-diamine-N-N'-diacetic-N-N'-di- β -propionic sav
Δ[Ca²⁺]_i: az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció változása	EGTA: etilén-glikol-bisz(2-aminoetil-éter)-N,N,N',N'-tetraecetsav
CaM: calmodulin	ECRE: elemi kalciumfelszabadulási esemény (elementary calcium release event)
CaMKII: kalcium-calmodulin dependens kináz II	Em: Emisszió (Emission)
cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát	en: angol terminológia (English)
Cav-3: caveolin-3	ER: endoplasmaticus reticulum
CCD: Central Core Disease	Ex: Excitáció (Excitation)
CDI: kalcium függő inaktiváció (calcium dependent inactivation)	F: fluorescencia
CHAPS: [3-[3kolamidopropil]dimetilamino]-1-propánszulfonsav: micellaképző detergens	F₀: alapfluorescencia
CHF: krónikus szívelégtelenség (chronic heart failure)	FBS: foetalis marhaszérum (foetal bovine serum)
CICR: kalcium-indukált kalciumfelszabadulás (calcium induced calcium release)	FCS: foetalis borjúsérum (foetal calf serum)

FKBP: FK506-kötő protein (FK506 binding protein)	ms: miliszekundum
FL: Ca ²⁺ -fluxus	mV: milivolt
FL_{csúcs}: a Ca ²⁺ -tranzien korai fázisa során mért fluxus	MW: molekula tömeg
FL_{plató}: a Ca ²⁺ -tranzien késői, fenntartott fázisa során mért fluxus	n_{Hill}: Hill együttható
FTHM: maximális amplitúdó feléhez tartozó időtartam (full time at half maximum)	nm: nanométer
FWHM: térbeli szélesség (full width at half maximum)	nM: nanomól
GTP: guanozin-trifoszfát	n.s.: nem szignifikáns
³H: trícium izotóp	N.A.: numerikus appertúra
HEPES: 4-(2-Hidroxietyl)piperazin-1-etánszulfonsav	NE: nemzetközi egység
HeLa: Henrietta Lacks cervix carcinomájából származó sejtvonal elnevezése	NO: nitrogén monoxid
HMM: nehéz meromyozin (heavy meromyosin)	Parv: parvalbumin
HS: lószérum (horse serum)	PIPES: piperazin-N,N'-bis[2-etánszulfonsav]
HSR: nehéz (heavy) SR, kalciumpumpát és kalciumcsatornát is tartalmazó frakció	Pc: zárt állapot valószínűsége
IC: intracelluláris (tér)	P_i: anorganikus foszfát
IC₅₀: félgátló koncentráció	PLC: foszfolipáz-C
ITP: iozintrifoszfát	PKA: protein-kináz-A
ISCC: belső raktár általi kalcium kontroll (intra store calcium control)	PKC: protein-kináz-C
JN: junctin	PKG: cGMP-függő protein kináz
jSR: junkcionális sarcoplasmaticus reticulum	PLC: foszfolipáz-C
kDa: kilodalton	PMCA: plazmamembrán kalcium ATPáz (plasma membrane calcium ATPase)
K_d: disszociációs állandó	PMI: postmyocardialis infarktus (postmyocardial infarction)
LLSS: subkonduktancia állapot (long lasting subconductance state)	P₀: nyitott állapot valószínűsége
LMM: könnyű meromyozin (light meromyosin)	pS: picoSiemens
LSR: könnyű (light) SR, csak kalciumpumpát tartalmazó frakció	PTI: Photon Technology International
µg: mikrogramm	PMT: fotomultiplikátor (photomultiplier)
µm: mikrométer	PV_{max}: a Ca ²⁺ -transzport maximális sebessége
µM: mikromól	RyR: rianodinreceptor
Mito: mitokondrium	RyR_{SL}: sarcolemmalis rianodinreceptor
MCa: maurokalcin skorpió toxin	SDS-PAGE: nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid gélelektroforézis [sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis]
Metab-Rec: metabotrop receptor	SEM: az átlag standard hibája (standard error of the mean)
MH: Malignant Hyperthermia	SERCA: sarco-endoplasmaticus reticulum kalcium ATP-áz (sarco-endoplasmatic reticulum calcium ATPase)
mM: milimól	SM(t): signal mass függvény
	SR: sarcoplasmaticus reticulum
	τ₀: átlagos nyitvatartási idő
	τ_c: átlagos zárvatartási idő
	TBQ: (2,5-di(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone)
	TC: terminális ciszterna

TG: tapszigargin

Tm: tropomiozin

Tn: troponin

Tn-C: troponin kalciumkötő alegység

Tn-I: troponin inhibitorikus alegység

Tn-T: troponint a tropomiozinhez kötő
alegység

TPEN: N,N,N,N –tetrakis-(2-
pyridylmethyl)-ethylenediamine

trans: a sarcoplasmaticus reticulum lumenének
megfelelő oldal

Tri: triadin

Trisk: vázizom típusú triadin

UTP: uridin-trifoszfát

II. Irodalmi áttekintés

II.1. A vázizom morfológiai sajátosságai

II.1.1. A vázizom felépítése

A makroszkóposan is látható vázizmot durva kötőszövetes tok, az epimysium határolja, melyen belül az izomrostok kötegei (fasciculusok) egy újabb kötőszövetes burokba, a perimysiumba zárva helyezkednek el. A számos prekursor sejt összeolvadásából létrejött többmagvú izomrostot a finom endomysium burkolja, mely vér- és nyirokereket, illetve idegeket tartalmaz (1./a ábra).

II.1.2. A vázizom finomszerkezete

Az egyes izomrostokat sejtmembrán veszi körül, melynek neve sarcolemma. A sejt cytoplasmájának, melyet vázizom esetében sarcoplasmanak vagy myoplasmanak is neveznek, jelentős tömegét alkotják a myofilamentumok, melyek kontraktilis fehérjékből épülnek fel. A vastag filamentum vázát a miozin-, a vékony filamentumokét pedig az aktin molekulák alkotják. A sarcoplasmában található az energetikai szükségletek biztosításához nélkülözhetetlen elemek (glikolitikus enzimek, mitokondriumok) és a sarcolemma alatt elhelyezkedő sejtmagok. A myofilamentumok myofibrillumokba tömörülnek, melyeket egy fejlett intracelluláris membránrendszer, a sarcoplasmaticus reticulum (SR¹) vesz körül (lásd később 2./a ábra).

Egy izomrost néhány száz myofibrillumot tartalmaz, amelyek mindegyike a Z-lemezek révén mintegy 2,5 µm hosszú szakaszokra, az ún. sarcomerákra oszlik (Gregorio és Antin, 2000). Egy myofibrillum sarcomeráiban mikroszkópos megfigyeléssel váltakozó világos és sötét csíkok és vonalak különíthetők el (innen a harántcsíkolt elnevezés), ami a vastag miozin (~15 nm átmérőjű, 1,6 µm hosszú), illetve a vékony aktin filamentumok (~6-8 nm átmérőjű, 1,0 µm hosszú) elrendeződésének köszönhető. A sarcomer azon része, ahol az aktin és a miozin filamentumok átfedik egymást, alkotják a sötétebb A- (anizotróp) vonalat, a csak aktint tartalmazó részek pedig a világosabb I- (izotróp) vonalat. Az előbbi közepén található a csak miozimból álló H-zóna (**H**ensen-zóna), amely középvonalban (a sarcomer centrumában) M-vonallá vastagodik. (1./b ábra) (Peachey és Franzini-Armstrong, 1983).

¹ A dolgozatban szereplő rövidítések jelentésének többségét – a szöveg jobb áttekinthetősége érdekében – a szövegtörzsben nem adtam meg, a dolgozat elején külön részben, *I. Rövidítések jegyzéke* cím alatt valamennyi megtalálható betűrendben felsorolva.

II.1.2.1. A kontraktilis fehérjék

Az elsőként izolált motorfehérje a vázizomból kivont **miozin** volt, ami az izomösszehúzódásért felelős. A miozinmolekulának van egy kettéágazó fejrésze (ún. S1 fragmentum), ami tartalmazza az ATPáz, és amely ízületi szerűen egy nyaki szakaszhoz (S2 fragmentum) kapcsolódik. A fej + nyaki rész alkotja a mintegy 200 kDa tömegű nehéz meromiozint (en. **Heavy MeroMyosin**, HMM). Az utóbbihoz csatlakozik ugyancsak ízületi szerűen a farki rész, a 15-30 kDa tömegű könnyű meromiozin (en. **Light MeroMyosin**, LMM) (*1./d ábra*). Körülbelül 200 darab miozinmolekula dimerizációját követően, a dimerek farki részükkel egy bipoláris „vastag” filamentummá kapcsolódnak össze (*1./c ábra*).

A vázizom vékony filamentumának fő alkotóeleme az **aktin**, melynek izolálása Straub F. Brúnó (1942) nevéhez fűződik. A fehérje két formában létezik: alacsony ionerősségű oldatban globuláris monomerként (G-aktin, 42 kDa-os molekulatömeg), fiziológiai sósoldatban pedig fibrilláris polimer alakjában (F-aktin, több száz polimer).

Az aktinnal szoros kapcsolatban találjuk szabályozó fehérjéit. A szintén fonalszerű tropomiozin (Tm) együtt csavarodik az aktin filamentummal oly módon, hogy egy Tm molekula hét aktin monomert (G-aktint) fed le. Ennek az elhelyezkedésnek szerepe lehet a kontraktilis aktiválás során bekövetkező molekuláris történések szervezésében.

Bizonyított, hogy a Tm lokalizációja lehetővé teszi a rost nyugalmi állapotában az aktin-miozin kölcsönhatás gátlását. Két alegysége ismert: a α -tropomiozin (MW=34 kDa) és a β -tropomiozin (MW=36 kDa) (*1./e ábra*).

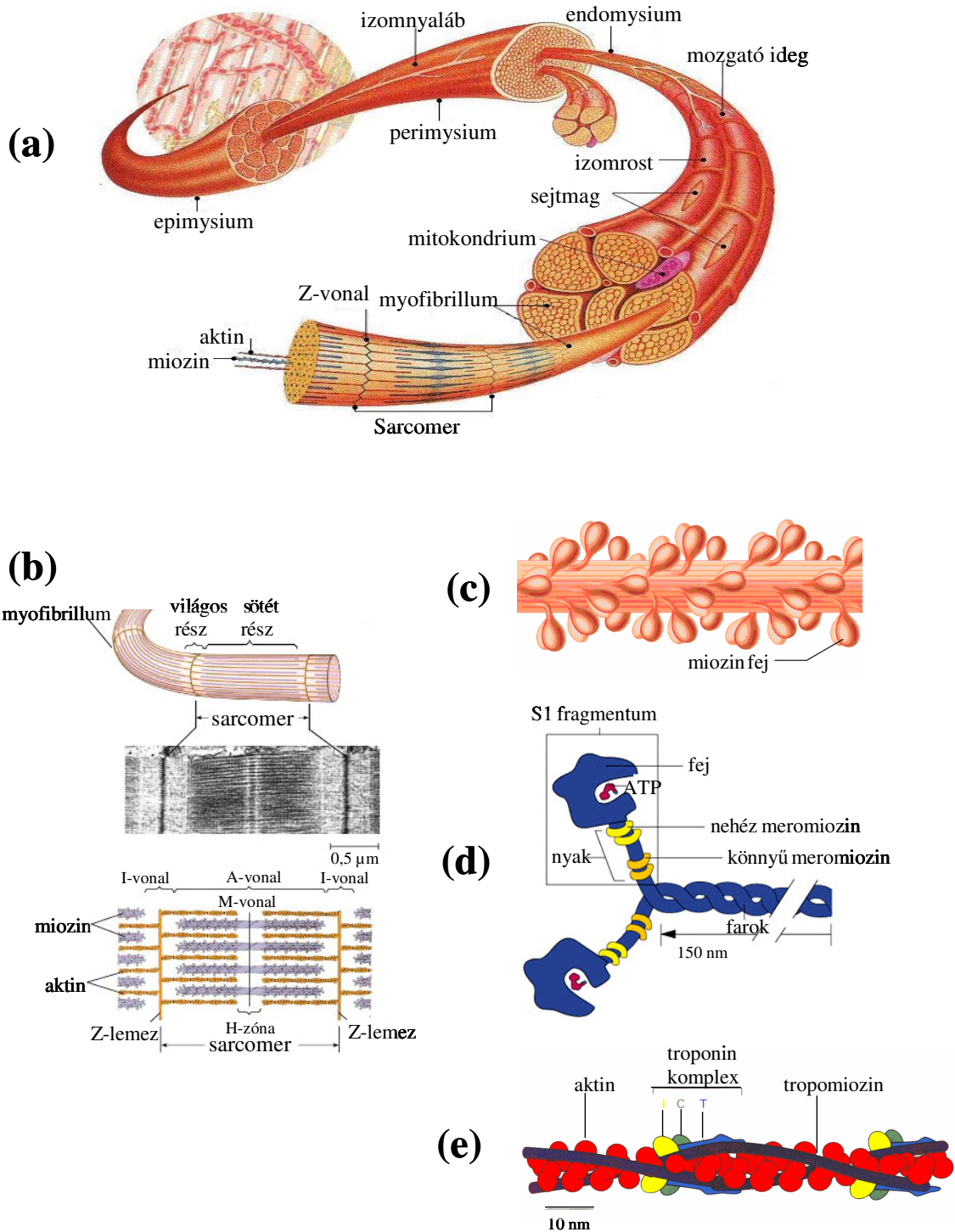
A kalciumjelet dekódoló egység a troponin (Tn), három alegységből áll:

a troponin-C (Tn-C, MW=18 kDa), amely a Ca^{2+} - kötésben játszik szerepet;

a troponin-T (Tn-T, MW=37 kDa), amely a Tn-t a Tm-hez köti;

a troponin-I (Tn-I, MW=24 kDa), amely nyugalomban megakadályozza az aktin és miozin közötti hídképződést. A Tn-I gátló hatása megszűnik, ha a Tn-C Ca^{2+} -mal telítődik (*1./e ábra*).

A Tn-C hordozza a négy Ca^{2+} -kötőhelyet. Ebből kettő Ca^{2+} -specifikus ($K_d=10^{-6}$ mol/l), melyek csak akkor kötnek Ca^{2+} -ot, amikor a myoplasma kalciumkoncentrációja ($[\text{Ca}^{2+}]$) az R-ből történt kalciumfelszabadulást követően megemelkedett. A másik két kötőhely nem specifikus, Ca^{2+} -ot ($K_d=10^{-8}$ mol/l) és Mg^{2+} -ot ($K_d=10^{-4}$ mol/l) egyaránt köthet.



1. ábra. A vázizom felépítése

(a) A vázizom felépítésének hierarchiája (<http://www.mkk.szie.hu> nyomán); (b) A sarcomer szerkezete (módosítva <http://fig.cox.miami.edu/> nyomán); (c) Vastag filamentum; (d) Egy miozinmolekula; (e) Vékony filamentum (<http://www.sci.u-szeged.hu> nyomán).

II.1.3. Speciális membránrendszerek

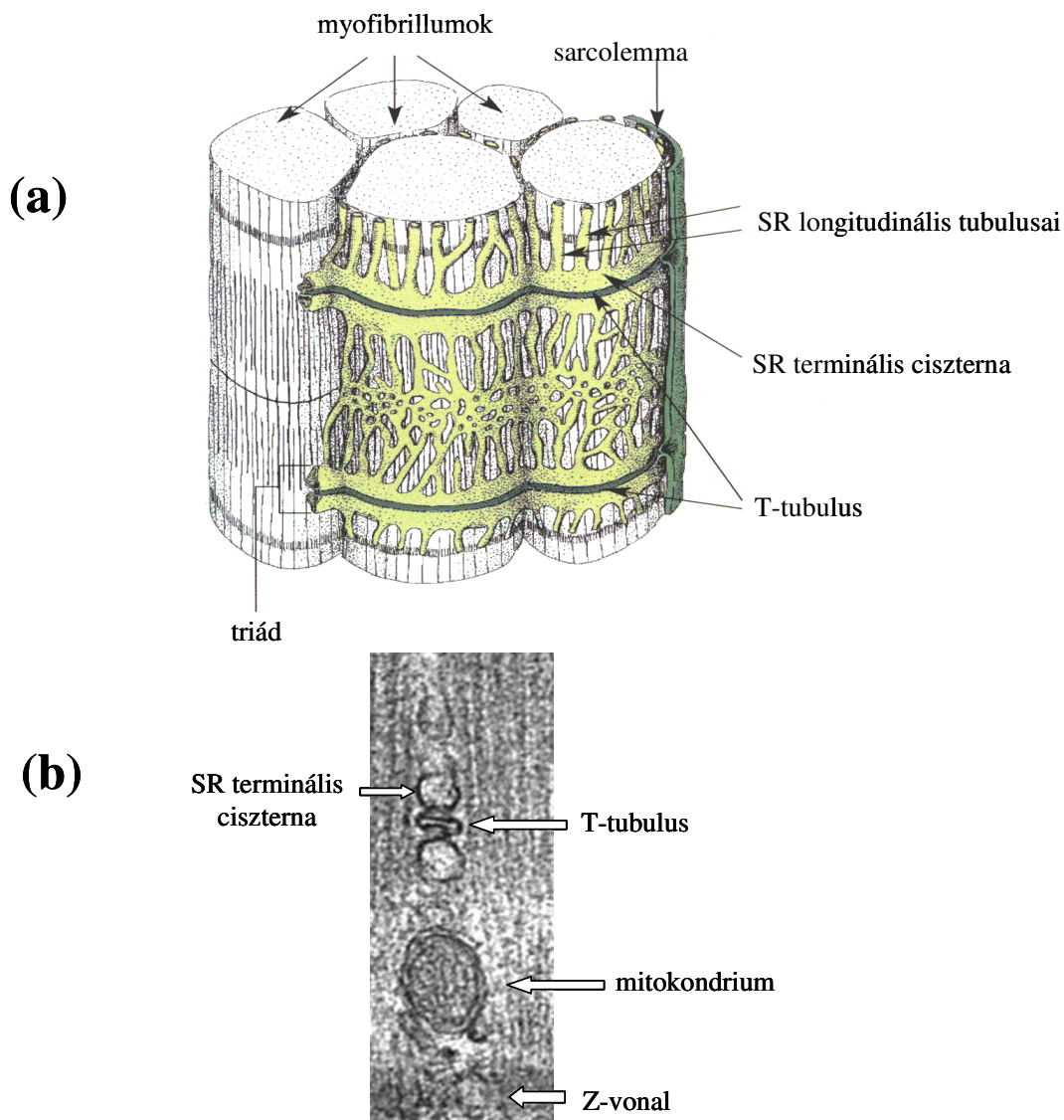
II.1.3.1. Sarcolemma

Elektronmikroszkópos vizsgálatok rávilágítottak arra, hogy az izomrost felszínén három struktúra figyelhető meg: az endomysium, a lamina basalis és a sarcolemma. Az endomysium többnyire kollagéncsontokból épül fel. A lamina basalis, avagy az alaphártya, molekuláris kapcsolatban van a sarcolemmával, ez utóbbi felszínén számos invagináció található. A sarcolemmanak igen figyelemre méltó jellegzetessége a caveolak jelenléte, melyek speciális lipid raftok (a membrán koleszterinben gazdag mikrodoménjei). Az izomban a caveolak izomspecifikus Cav-3-at tartalmaznak (Rahkila és mtsai., 2001).

A sarcolemma barriert képez két különböző kalciumkoncentrációjú térrész között: az extracelluláris tér ($[Ca^{2+}]_e=2,5$ mM) és a cytoplasma ($[Ca^{2+}]_i=100$ nM nyugalomban) (Perry, 1994). Következésképpen a két hely között igen erős elektrokémiai gradiens áll fenn. Fiziológias hőmérsékleten (37 °C), a Nernst-egyenlet alapján a Ca^{2+} egyensúlyi potenciálja $E_{Ca}=135$ mV. Egyébiránt a sarcolemma felépítése azonos más ingerlékeny membránéval: lipid kettős réteg, melyben integráns fehérjemolekulák találhatóak. Az izomrost működése szempontjából döntő a feszültségfüggő gyors Na^+ - és a késői típusú K^+ -csatornák jelenléte, melyek lehetővé teszik az akciós potenciál (AP) keletkezését és terjedését. A sarcolemmában Cl^- és Ca^{2+} -csatornák, valamint különféle receptormolekulák is találhatóak.

II.1.3.2. T-tubulus és sarcoplasmaticus reticulum

Sajátosan a kifejlett vázizomra jellemző, hogy a nagy tömegű kontraktilis rendszer a perifériára szorítja az izomrostoként akár több száz magot. A vázizom speciálisan módosult endoplasmaticus reticuluma a sarcoplasmaticus reticulum, amelynek a sarcomerákkal párhuzamos longitudinális (L) tubulusai terminális ciszternákká (TC) tágulnak a Z-lemezek fölött, ahol igen szoros fizikai közelségbe kerülnek a sarcolemmával folytonos, annak invaginációjával létrejövő transzverzális (T) tubulusokkal (2./a ábra). Emlős vázizomban a T-tubulusok lokalizációja pontosan meghatározott, nevezetesen az A és I vonalak mentén találhatóak (Franzini-Armstrong és mtsai., 1998). A T-tubulusokhoz mindkét oldalról csatlakozik az SR egy-egy kiszélesedő zsákja (TC), és a három cső együttesen alkotja a triádot (Franzini Armstrong, 1999), melynek – mint látni fogjuk – alapvető szerepe van az elektro-mechanikai kapcsolat folyamataiban (2./b ábra).



2. ábra. Az izomrost sarcotubularis rendszere (<http://www.sci.u-szeged.hu> nyomán) (a) és a triád szerkezete (Royer és Ríos, 2009 nyomán) (b)

Az SR longitudinális tubulusainak – amelyek hálószerűen körbefonják a myofibrillumot - jelentős szerepe van az izomrelaxációban, hiszen itt találhatóak az aktív transzportot végző sarco(endo)plasmaticus reticulum Ca^{2+} -pumpák (SERCA)(MacLennan és mtsai., 1997).

A T-tubulusok funkcionális jelentősége abban rejlik, hogy lehetővé teszik a vázizomrost teljes keresztmetszetének gyakorlatilag egyidejű aktiválódását.

Az SR jelentősége három szinten mutatkozik meg:

- 1.) ingerlés hatására történő kalciumfelszabadulás a koncentrációgrádiens irányában, a terminális ciszternák szintjén található Ca^{2+} -csatornákon, a rianodinreceptoron (RyR) keresztül;

- 2.) az izomrelaxáció bekövetkezése után a szabad Ca^{2+} visszajuttatása a raktárba igen jelentős koncentrációgrádienssel szemben, aktív transzport révén, a sarco-(endo)plasmaticus reticulum kalcium ATPáz segítségével;
- 3.) a kalcium tárolása, melyben igen fontos szerepe van a terminális ciszternák szintjén lokalizált kalciumkötő-fehérjének, a calsequestrinnek.

II.1.3.3. A sarcoplasmaticus reticulum Ca^{2+} -tartalma

Nyugalomban, az izomban található Ca^{2+} mintegy 60-70%-a az SR terminális ciszternáiban tárolódik, ahol a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 1 mM körül van, szemben a myoplasma 100 nM-os koncentrációjával (Meissner, 1994).

Fryer és Stephenson (1996) mechanikusan nyúzott patkány rostokon erőmérésekkel vizsgálta az SR Ca^{2+} -koncentrációt ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$). Méréseikben 70 nM-os myoplasma Ca^{2+} -koncentrációnál, gyors típusú izmok esetén 1,01 mM/rosttömeg liternek, lassú izmok esetén pedig 1,14 mM-nak adódott az SR kalciumtartalma. Salviati és mtsai. (1982) kémiaiilag nyúzott humán rostokat vizsgálva 0,87 mM-os $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ -ról számoltak be. Béka izomban ez az érték 0,9-1,2 mM Ca^{2+} /hozzáférhető myoplasma térfogat (Somlyó és mtsai., 1981), ami összhangban van Ford és Podolsky (1972) által leírt 0,9 mM-os Ca^{2+} -koncentrációval (nyúzott béka rostokon).

A fenti adatok a rosttömeg vagy hozzáférhető myoplasma térfogat függvényében vannak megadva. Megjegyzendő, hogy vázizomban az SR csupán egy kis hányadát képezi az össztérfogatnak. Példaként, béka izom esetén az SR térfogata csupán 9%-a az összesen hozzáférhető myoplasmatérfogatnak (Moblely és Eisenberg, 1975), míg emlősök esetén a gyors izmokban az SR mintegy 9,3%-ot, lassú izmokban pedig 5,5%-ot foglal el (Eisenberg, 1983). Fryer és Stephenson (1996) által leírt SR térfogatra vetített Ca^{2+} -tartalom mellett, az $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}} \sim 11$ mM gyors-; valamint 21 mM lassú-típusú patkány izmok esetén.

Az SR szabad $[\text{Ca}^{2+}]$ ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR/szabad}}$) becslések szerint 0,5 és 1,2 mM között van. Kísérleteikben Fryer és Stephenson (1996) $\sim 1,2$ mM-os $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR/szabad}}$ -ról számolt be. Launikonis és mtsai. (2005) béka rostokon egy rációmetrikus fluoreszcens festéket használva (mag-indo1) alacsonyabb értéket (0,51 mM) talált. Rudolf és mtsai. (2006) egy az SR-ben expresszáldó Ca^{2+} -bioszenzor segítségével, egér izmokban, 0,31 mM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR/szabad}}$ -t írt le.

II.2. A dihidropiridin-receptor

Harántcsíktolt izmokban az intracelluláris Ca^{2+} -felszabadulás feszültségfüggő folyamat. Váz- és szívizomban, bár különböző módon, az L-típusú csatornának van alapvető szerepe.

Nagyfokú szelektivitásuk és affinitásuk miatt a dihidropiridinek (DHP) a legjelentősebb L-típusú csatorna modulátorok (Kongsamut és mtsai., 1985), ezért DHP-receptoroknak (DHPR) is nevezik őket. Gátló hatásukat a csatorna nyitott és inaktivált állapotában is kifejtik (feszültségfüggő gátlás). Elhelyezkedését illetően mikroszkópos vizsgálatok alapján a DHPR a T-tubulusok jukcionális részén (jSR) helyezkedik el, bár nincs kizárva, hogy extrajukcionálisan is előfordul (Jorgensen és mtsai., 1989). Feladata, hogy membrán-feszültségváltozások hatására megnyílik, és befelé irányuló lassú, hosszan tartó Ca^{2+} -áramot hoz létre a T-tubulusoknál.

A DHPR lassú kinetikájú csatorna, azaz a depolarizációt követően az áramcsúcs eléréséhez szükséges idő igen hosszú (mintegy 100 és 250 ms), amely az irodalmi adatok alapján függ a depolarizációs pulzus nagyságától (Szentesi és mtsai., 2001; Collet és mtsai., 2003). E csatornák jellegzetessége a lassú aktiváció, amely nagymértékű depolarizáció hatására felgyorsul. A csatorna aktivációs küszöbe -10 mV körül van (110 mM Ba^{2+} jelenlétében, Dirksen és Beam, 1995). Ami a konduktanciát illeti, frissen izolált felnőtt izomban az érték 55 és 200 S/F között mozog, 2-2,5 mM Ca^{2+} jelenlétében (Szentesi és mtsai., 2001; Collet és mtsai., 2003).

A DHP-receptor (~440 kDa) öt különböző polipeptid-alegységből épül fel (Catterall, 1995). A működés szempontjából az α_1 -alegység (~185 kDa) alapvető fontosságú, ez tartalmazza magát a pórust a II-III hurok között, ez az alegység a helye a „kapuzó” mechanizmusnak, továbbá az organikus Ca^{2+} -antagonisták is ide kötődnek.

A vázizomtípusú α_1 -alegység (α_{1S}) felelős az L-típusú Ca^{2+} -csatorna harántcsíktolt izomban betöltött alapvető funkciójának, az elektro-mechanikai kapcsolás kulcslépésének végrehajtásáért is. A vázizom típusú kapcsolás közismert hipotézise szerint az α_1 -alegység egy cytoplasmaticus nyúlványa a membrán depolarizációja során konformációváltozáson megy keresztül, amely az SR kalciumcsatornáját, a rianodinreceptort közvetlenül aktiválja.

A csatorna további részei az erősen glikozilált α_2 -alegység, a transzmembrán γ -alegység és δ -alegység, illetve az intracellulárisan elhelyezkedő β -alegység. Utóbbi az α_1 -alegységgel együtt foszforilálódhat cAMP-függő kináz, Ca^{2+} -kalmódulin (CaM) és protein kináz-C (PKC) által (Hosey és mtsai., 1986), és az inaktivációs kinetika meghatározásában van kiemelkedő jelentősége (Qin és mtsai., 1996).

E csatornák legtipusosabb blokkolói az ún. organikus Ca^{2+} -csatornablokkolók, avagy hétköznapi nyelven Ca^{2+} -antagonisták. Ezek magukban foglalnak több vegyületcsoportot, így az 1,4-dihidropiridinet (DHP): pl. a nifedipin, nitrendipin, PN 200-110; a fenilalkilaminokat: pl. a verapamil; a benzotiazepinet: pl. a diltiazem; és a

difenilmetilpiperazinokat: pl. a flunarizin. Néhány DHP, mint például a (-)BayK 8644 és a (+)S-202-791 Ca^{2+} -agonistaként működik.

Az L-típusú csatornák inhibitorainak másik csoportjába polipeptid toxinok tartoznak. Ilyenek az agatoxinok, a konotoxinok és egyes kígyómérgek toxinjai, mint például a kalciszeptin (amely specifikusan blokkolja a kardiális és neuronális L-típusú csatornákat, de hatástalan a vázizom L-típusú csatornáira), vagy a munkacsoportunk által is részletesen tanulmányozott maurokalcin (MCA), illetve Imperatoxin-A (Lukács és mtsai., 2008).

A specifikus blokkolószerek mellet a különböző di- és trivalens kationok, mint a Cd^{2+} , Co^{2+} , La^{3+} vagy Ni^{2+} képesek nem specifikusan gátolni a csatorna működését (Jones és mtsai., 1998).

II.3. A rianodinreceptor

A RyR központi szerepet játszik az izomban lezajló elektro-mechanikai kapcsolat kialakításában, következésképpen az izomélettan egyik legtöbbet tanulmányozott fehérjéje, működéséről számos összefoglaló mű jelent meg (Meissner, 1994; 2002; Melzer és mtsai., 1995; Franzini-Armstrong és Protasi, 1997; Csernoch és mtsai., 1999; Ogawa és mtsai., 1999; Fill és Copello, 2002). A feladata nagy mennyiségű Ca^{2+} gyors felszabadítása az SR Ca^{2+} -raktáraiból. Nevét onnan kapta, hogy nagy affinitással és specificitással ($K_d < 50$ nM) köti a rianodin nevű növényi alkaloidát (*Ryana Speciosa*) (Lai és mtsai., 1988), amely mint a mesterséges lipid kettősrétegbe épített RyR-on végzett egyedi csatornás árammérések során kiderült, félig nyitott szubkonduktív állapotban rögzíti a csatornát. Nagy koncentrációban fordul elő harántcsíktolt izomban az SR jukcionális részén, ahol közvetlen kapcsolatban áll a T-tubulusok DHP-receptoraival. Kisebb koncentrációban ugyan, de megtalálható az SR egyéb részein is, ahol azonban nem mutatható ki a RyR DHP-receptorokhoz való egyértelmű hozzárendeltsége.

II.3.1. Elektrofiziológiai sajátosságok

A RyR alacsony szelektivitású kationcsatorna, amely nagy konduktanciával vezet egyértékű ionokat (pl. Na^+ -ot) (Meissner, 1994; Franzini-Armstrong és Protasi, 1997; Williams és mtsai., 1999). Lipid kettősréteg technika segítségével, emlősből izolált RyR-ok tanulmányozása során fény derült a receptor konduktáciájára. Abban az esetben, amikor Ca^{2+} volt a töltéshordozó (54 mM a *trans* oldalon), Smith és mtsai. (1988) 100 pS írtak le, míg ugyanakkor K^+ esetén (250 mM), (50 μM Ca^{2+} a *cis* és *trans* oldalon), Sárközi és mtsai. (2000) 529 pS találtak.

II.3.2. Molekuláris struktúra

A RyR szerkezetileg mintegy 5000 aminosavból álló homotetramer: négy identikus 560 kDa molekulásúlyú polipeptid-alegységből felépülő fehérje-komplex (3. ábra). Példaként, a nyúlból izolált RyR1 5037 aminosavat tartalmaz (Zorzato és mtsai., 1990).

Az aminosavláncok kisebb része ($1/5$) a TC membránjában helyezkedik el (ez az alegységek C-terminálisa, mely együttesen a csatornapórust képezi); a nagyobb rész ($4/5$) a myoplasmába, a triád centrumában lévő T-tubulus irányába nyúlik (ez az N-terminálisnak felel meg, amely az ún. cytoplasmaticus láb [„foot”-régió] révén kapcsolatot teremt a DHP-receptorokkal [Franzini-Armstrong és Protasi, 1997; Wagenknecht, 1997; Samsó és Wagenknecht, 1998] [5./b ábra]). Egyes feltételezések szerint a Ca^{2+} kilépése a myoplasmába a láb régión keresztül megy végbe. A „foot”-régióban (N-terminális) több mutációt azonosítottak, amelyek felelőssé tehetők olyan betegségekért, mint a Malignant Hypertermia (MH) vagy a Central Core Disease (CCD). Az MH-betegek többségében a mutációk az elektro-mechanikai kapcsolatban alapvető szerepet betöltő RyR1-et (~40%) és DHPR (~20%) érintik, míg a betegségek 35%-ában a genetikus háttér jelenleg is ismeretlen (Loke és MacLennan, 1998).

Cryomikroszkópia és 3D rekonstrukció segítségével megismerhettük a gomba alakú receptor harmadlagos struktúráját (lásd 3./a ábra).

II.3.2.1. Izoformák

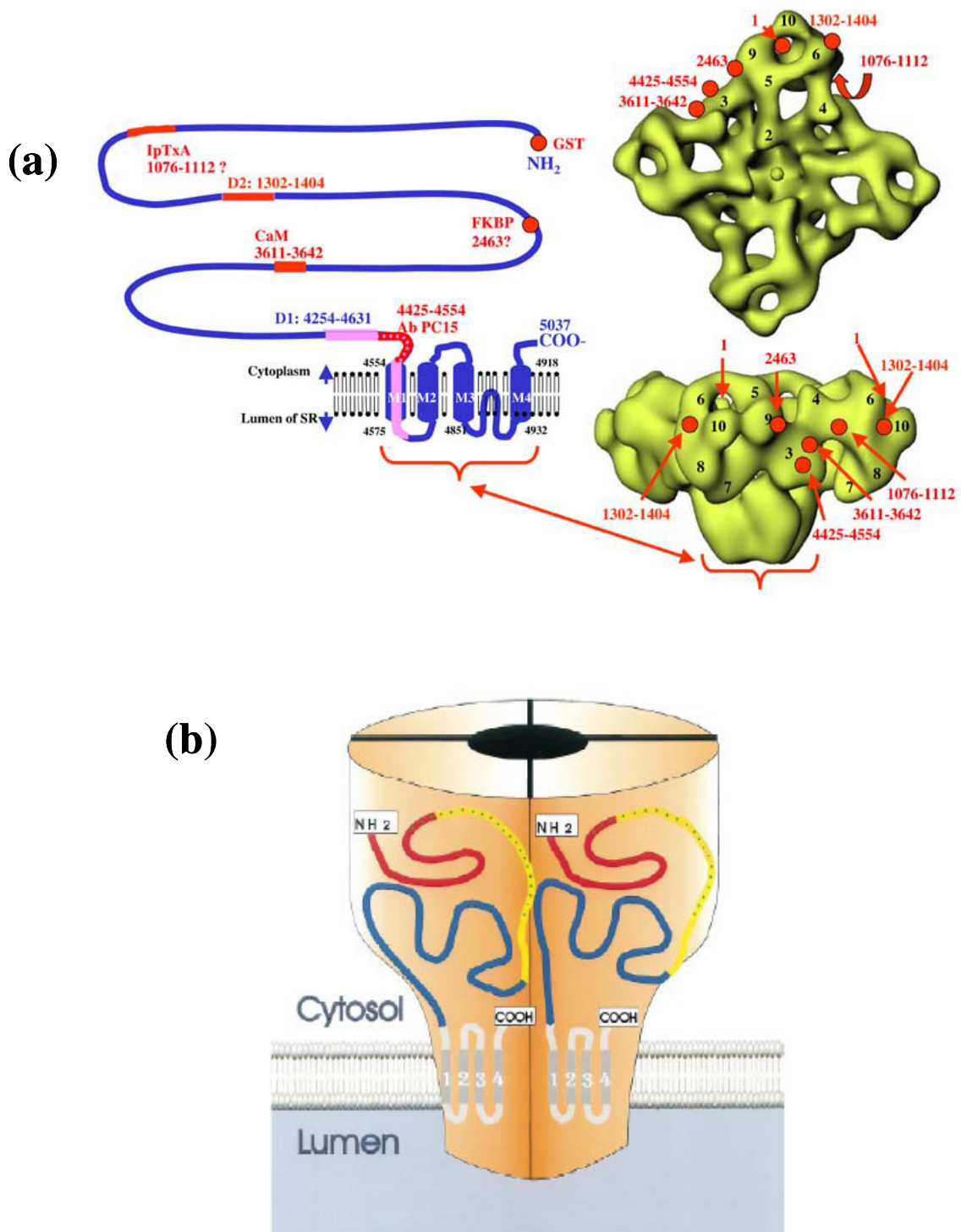
Emlősökben a RyR-nak három izoformáját különíthetjük el, amelyek nevüket az izolálásuk sorrendje alapján kapták (Franzini-Armstrong és Protasi, 1997; Ogawa és mtsai., 2000; Martosi és Picula, 2003):

RyR1 (vázizom-típusú)

RyR2 (szív-típusú)

RyR3 (agy-típusú)

Ezen felül a RyR1 és RyR3 emlős-típusokat nem emlősökben (pl. halakban, kételtűekben, madarakban) rendre α - és β -típusoknak nevezik (Franzini-Armstrong és Protasi, 1997).



3. ábra. A RyR struktúrája

(a) Bal oldalon a RyR1 szekvenciája látható. Négy transzmembrán domén és egy pórusformáló hurok az M3 és M4 transzmembrán régiók között. Pirossal jelölve az adott aminosavszekvenciának megfelelő ligandkötő helyek láthatók. Kérdőjelek a még nem teljesen tisztázott kötőhelyeket mutatják. Jobb oldalon a RyR1 3D szerkezeti rekonstrukciója, pirossal pedig a szekvensspecifikus markerek jelölése látható. Az ábra alján látható a transzmembrán régió (Wagenknecht, 2002 nyomán); **(b)** A homotetramer szerkezetű RyR sematikus ábrázolása (Wu és Hamilton, 1998 nyomán).

A RyR két alfajtája mutatható ki a harántcsíkkolt izomszövetben: a RyR1 a domináns forma, míg a RyR3 a postnatalis fejlődés után majdnem teljesen eltűnik, a későbbi stádiumokban már csak néhány izomrostban mutatható ki (például a lassú oxidatív típusúakban) (Bertocchini és mtsai., 1997; Sorrentino és Reggiani, 1999; Protasi és mtsai., 2000). Mindezen eltérések funkcionális következménye a rosttípusok tükrében még ismeretlen. Western blot technika segítségével kimutatták, hogy a RyR3 legjobban a patkány, valamint nyúl diaphragmában és soleusban expresszálódik, míg az általunk is tanulmányozott EDC-ben egyáltalán nem található (Flucher és mtsai., 1999).

A fent említetteken túl az egyes altípusokat más, nem ingerlékeny szövetekből is izolálták (például a RyR2-t HeLa tumorsejtekből; Bennett és mtsai., 1996); továbbá, egy sejttípuson belül is kimutatható többféle RyR jelenléte (például vascularis simaizomsejtek mindhárom altípust expresszálják; Neylon és mtsai., 1995). Az osteoclastok külső membránjában RyR2-t találtak, melyek szerepet játszhatnak a külső kalciumszint érzékelésében, és így a csontreszorpció szabályozásában (Zaidi és mtsai., 2004). Emellett simaizomsejteken (Zou és mtsai., 1999) és szívizomsejteken (Kondo és mtsai., 2000) is kimutattak cytoplasma membrán Ca^{2+} -csatornákat, melyek RyR-hez hasonló sajátosságokkal rendelkeztek. Ennek megfelelően az új alcsoportnak a sarcolemmaris RyR (RyR_{SL}) elnevezést javasolták.

Az izoformák közötti szekvenciahomológia 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.

II.3.2.1.1. RyR1

A RyR1 (vázizom típus) mindenfajta harántcsíkkolt izomban, valamint az agy bizonyos részein (cerebellum, Purkinje-sejtek) és egyes simaizomokban is megtalálható (Lai és mtsai., 1988). A RyR1 gén a 19-es kromoszóma (19q13.1) hosszú karján helyezkedik el (Fujii és mtsai., 1991), és polipeptid lánc 5032-5037 aminosavat tartalmaz.

II.2.3.2.2. RyR2

A RyR2 döntően a szívizom működésében játszik alapvető szerepet, továbbá kimutatható az agyban (Anderson és mtsai., 1989) és simaizomban is (Hermann-Frank és mtsai., 1991). A RyR2 polipeptid lánc 4968-4976 aminosavat tartalmaz. A szívizomnál az elektro-mechanikai kapcsolat a vázizomtól eltérő módon valósul meg, hiszen a szívizomban az AP időtartama 200-300 ms (vázizomnál 3-5 ms), ami lehetővé teszi, hogy a lassan aktiválódó DHPR-ok megnyíljanak (tehát Ca^{2+} -csatornaként is működnek), és az

extracelluláris kalcium bejusson a myoplasmába. A beáramló Ca-ionok hatására megnyílnak a terminális ciszternákban elhelyezkedő RyR-ok, és a Ca²⁺-indukált Ca²⁺-felszabadulás (CICR) mechanizmus révén megvalósul a kontraktilis rendszer aktiválódása. Szívizomban az R-ből kiáramló (kb. 65%), ill. az extracelluláris térből a DHP-receptorokon keresztül beáramló (kb. 35%) kalcium együttesen váltja ki a szívizom összehúzódását.

II.3.2.1.3. RyR3

A humán RyR3 polipeptid lánc 4870 aminosavat tartalmaz, és az agyban (hippocampus, corpus striatum, diencephalum) fordul elő (Lai és mtsai., 1992a), bár itt sem haladja meg a teljes RyR-készlet 2%-át. Vázizomban kis mennyiségben van jelen, példaként a diaphragma kevesebb mint 5% RyR3-at tartalmaz (Conti és mtsai., 1996). Szoros hasonlóságot mutat szekvenciájában és működésében a RyR β izoformával. Az izoformák közötti szekvenciahomológia ellenére az izoformák több variábilis régiót tartalmaznak, amelyek meghatározóak lehetnek az izoformák közötti funkcionális különbségekben. A RyR3 szerkezetében jelentős különbség a RyR1-hez képest, hogy hiányzik belőle a D2 (1303-1406) régió.

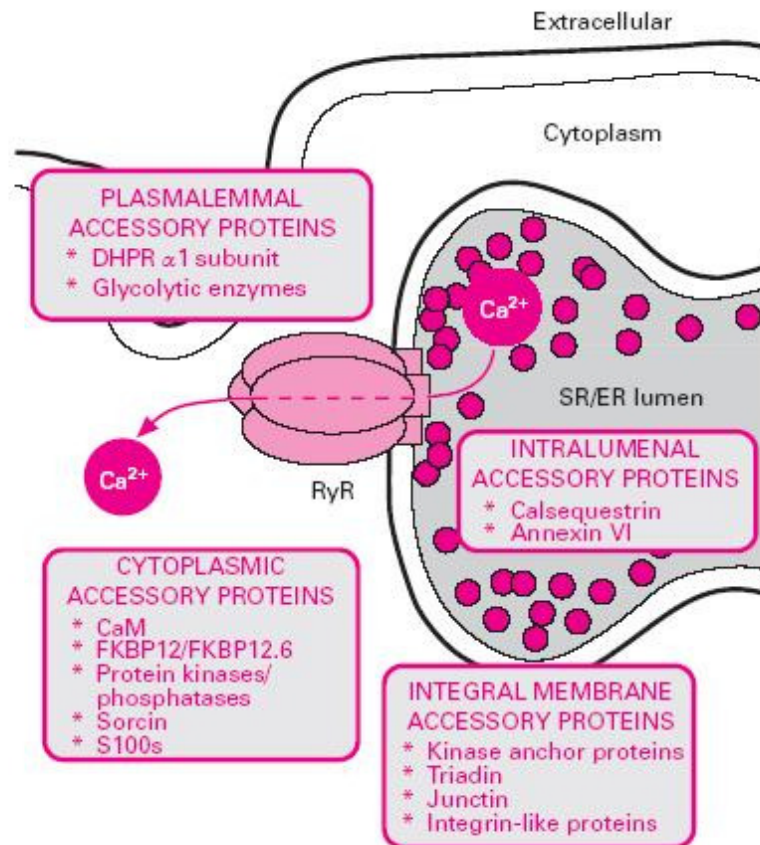
II.3.2.1.4. RyR α/β

Az RyR α és RyR β a halakban, kétélűekben és madarakban fordul elő, és az emlősök RyR1- illetve RyR3-molekulájával mutat homológiát (Lai és mtsai., 1992b). 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. A kalciumfelszabadulás folyamatának leírására kétélűekben Ríos és Pizarro dolgozott ki egy mára általánosan használt modellt (Ríos és Pizarro, 1988), figyelembe véve azt, hogy ezen osztályban két különböző típusú SR kalciumcsatorna (RyR α és RyR β) van jelen. Modelljük alapján a DHPR-ral szemben elhelyezkedő RyR-ok a depolarizáció egész időtartama alatt fenntartott kalciumfelszabadulásért felelősek, míg a többi csatorna a kalciumfelszabadulás korai, gyorsan aktiválódó, majd inaktiválódó részében játszanak szerepet. Utóbbiak megnyílásáért és bezáródásáért a DHPR-ok által közvetlenül aktivált csatornákon át kilépő Ca-ionok a felelősek.

II.3.3. Szabályozó fehérjék

In situ a receptor számtalan szabályozó proteinnel áll kapcsolatban, amelyek az SR lumene (pl. calsequestrin vagy annexin VI), az SR membránja (pl. triadin, junctin,

junctionophilin), a cytoplasma (pl. FKBP12, sorcín, calmodulin), vagy a sarcolemma (pl. DHPR α 1-alegysége) irányából kerülnek kapcsolatba a RyR-ral. Az SR kalciumcsatornája, amely az eddig ismert egyik legnagyobb receptormolekula, így bonyolult receptorkomplexet épít fel (lásd 4. ábra).



4. ábra. A RyR és szabályozó fehérjéi kapcsolata (módosítva MacKrell, 1999 nyomán)

A RyR elsőként felderített szabályozó fehérjéje a **calmodulin** (CaM) volt (Smith és mtsai., 1989). Ez a kis (16,7 kDa molekulatömegű) cytoplasmaticus fehérje közel 2 μ M-os koncentrációban van jelen a cytoplasmában, ezért fiziológiai jelentősége nem elhanyagolható.

Elhelyezkedésének köszönhetően a CaM [Ca²⁺] függő módon képes befolyásolni a csatorna működését. Tripathy és mtsai. (1995) megfigyelték, hogy RyR1 esetében a CaM 0,1 μ M-nál kisebb [Ca²⁺]-nál fokozta, míg 0,2 μ M-nál nagyobb [Ca²⁺]-nál gátolta a receptor aktivitását.

Az **FK506-kötő protein** (en. **FK506 Binding Protein**, FKBP) avagy calstabin, egy kis (12 kDa molekulatömegű) cytoplasmaticus fehérje, amely az immunofilinek családjához tartozik. A RyR tetramer, sztöchiometrikus arányban köti az FK506 nevű immunoszupresszor molekulát, izoformától függően különböző típust (RyR1–FKBP12, RyR2–FKBP12.6).

Fiziológiai jelentőségét bizonyítja, hogy az FKBP hiánya az étellel 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. Egyes tanulmányok szerint az FKBP „szinkronizálja” a RyR alegységeinek működését, azaz biztosítja azt, hogy a csatorna négy alegysége koordinált módon alakítsa ki a nyitott és zárt állapotot (Marx és mtsai., 1998). Ugyanakkor más tanulmányok szerint szerepe van a szomszédos RyR-ok egyszerre történő megnyílásában és záródásában („coupled gating”) (Fill és Copello, 2002).

FKBP12 hiányában a RyR nagyobb valószínűséggel és hosszabb ideig van nyitott állapotban, és koffeinhatásra különböző szubkonduktanciás vezetési állapotokat vesz fel. FKBP jelenlétében a szubkonduktanciás állapotok nem figyelhetőek meg: a csatornák vagy teljesen nyitottak, vagy teljesen zártak. Az FKBP12 ezen kívül a RyR-t egyenirányító csatornává teszi, mely az SR lumen – cytoplasma irányú áramokat részesíti előnyben, a fordított áramokat pedig blokkolja (Brillantes és mtsai., 1994; Franzini-Armstrong és Protasi, 1997).

A TC-ban koncentrálnak az SR domináns puffere a 45 kDa molekulasúllyal rendelkező **calsequestrin** (Csq) (Maier és mtsai., 1986; Damiani és mtsai., 1990). Az SR belsejében elnyújtott szerkezete elsősorban a junkcionális régióhoz közeli helyeken figyelhető meg, míg extrajunkcionálisan csak a hőtermelésre specializálódott izomrostokban mutatható ki. Kapcsolatban áll közvetlenül a RyR komplexszel, és indirekt módon egyéb kapcsolófehérjékkel (junctin és triadin) (Liu és Pessah, 1994).

A Csq-t kis Ca^{2+} -affinitása ($K_d \sim 1 \text{ mM}$) és nagy Ca^{2+} -kötő kapacitása (40-60 mól Ca^{2+} /mól fehérje) teszi dinamikus Ca^{2+} -raktározó fehérjévé. C-terminális végén savas szakaszok koncentrálnak, ezek felelősek a Ca^{2+} -kötésért. A Ca^{2+} -kötés során a fehérje hidrofóbítása fokozódik, kompaktabbá válik.

A **triadin** (Tri) az SR membránjában lokalizált integráns membránfehérje, amelyet Brandt és mtsai. fedeztek fel 1990-ben. Mára bizonyított, hogy a rövid cytosolikus N-terminális részével funkcionális kapcsolatot létesít a DHPR $\alpha 1$ -alegységével (MacKrell, 1999), míg a lumenálisan elhelyezkedő C-terminális részével a RyR-hoz és a Csq-hez kapcsolódik (Knudson és mtsai., 1993). A triadin a vázizom Ca^{2+} -homeosztázisában betöltött szerepe mai napig nem pontosan tisztázott, de feltételezhető közvetítő szerepe a RyR-on keresztül történő R-ből való Ca^{2+} -felszabadulás szabályozásában, és a triád mint funkcionális

struktúra szerkezetének biztosításában (Goonasekera és mtsai., 2007; Fodor és mtsai., 2008; Marty és mtsai., 2009).

A triadin egy multiprotein családot alkot, és több izoformája ismert, melyek ugyanazon gén alternatív splicing során keletkező fehérjetermékei, és a C-terminális hosszában különböznek. A vázizomban előforduló izoformák szokásos elnevezése a Trisk (en. **Triadin skeletal isoform**) 32, 49, 51, 95 nomenklatura alapján történik, ahol a számok a kDa-ban kifejezett molekulatömegeket jelentik (Marty és mtsai., 2000).

A **junctionin** (JN) nevű kis fehérjét (26 kDa) először a szívizomból izolálták (Mitchell és mtsai., 1988). Vázizomban elsősorban a juncionális régióhoz közeli helyeken koncentrálódik. A 210 aminosavból felépülő pozitív töltésű fehérje nagyfokú szekvenciahomológiát mutat a triadinnal.

A RyR, JN, Csq és triadin valószínűleg egy multiprotein komplex formájában van jelen, ahol a Tri és JN kapcsolódása poláros csoportjaik ionos kölcsönhatásával valósul meg (Jones és mtsai., 1995). A Ca^{2+} -felszabadulás és -raktározás finoman szabályozott és összehangolt mechanizmusa bizonyára ennek a multiprotein komplexnek az épségét is igényli (4. ábra).

II.3.4. A RyR fiziológiás szabályozása

A RyR aktivációját, áteresztő képességét több regulációs tényező is befolyásolja. Elsődleges fiziológiás szabályozója maga a **kalcium**. Mg^{2+} és ATP hiányában harangalakú Ca^{2+} -aktivációs görbe figyelhető meg: μM -os koncentrációban aktivátora, mM -os koncentrációban inhibitora a RyR-nak. Ez alapján feltételezhető, hogy a RyR rendelkezik egy nagy affinitású aktivátor ($EC_{50} \sim 2 \mu\text{M}$, $n_{\text{Hill}} \sim 2$), és egy alacsony affinitású inhibitor Ca^{2+} -kötőhellyel ($IC_{50} \sim 150 \mu\text{M}$, $n_{\text{Hill}} > 1$) (Meissner és mtsai., 1986). Mindhárom izoformára jellemző ez a kettősség, viszont eltérések vannak a Ca^{2+} iránti érzékenységet illetően. Példaként, nyúl vázizomban a RyR1 és RyR3 hasonló Ca^{2+} iránti érzékenységet mutat az inhibitor oldalon, míg az aktivátor oldalon a RyR3 mintegy 10-szer érzékenyebb, mint a RyR1 (Murayama és Ogawa, 1997).

A RyR-ra nemcsak a cytoplasmaticus $[\text{Ca}^{2+}]$ hat, hanem az SR luminális $[\text{Ca}^{2+}]$ is. Többben kimutatták, hogy a luminális $[\text{Ca}^{2+}]$ növekedése a RyR nyitvatartási valószínűségét fokozza (Tripathy és Meissner, 1996; Csernoch és mtsai., 1999). Ennek hatásmechanizmusa egyrészt a kiáramló Ca^{2+} a RyR cytoplasmaticus oldalán található Ca^{2+} -aktivátor helyeihez történő kötődésével magyarázható; másrészt, a luminális oldalon is kimutattak olyan Ca^{2+} -kötő helyeket a RyR komplexen, melyek a csatorna aktivitását fokozzák. A gyors lokális $[\text{Ca}^{2+}]$ -növekedés során létrejövő aktiválódását követően a RyR adaptációja figyelhető meg.

Ennek értelmében a RyR egy olyan állapotba tér vissza, amelyben csak magasabb $[Ca^{2+}]$ emelkedések aktiválják. Vannak olyan kísérletes adatok is, amelyek alapján ezt az állapotot inaktivált állapotnak is tekinthetjük: ezek szerint aktiváció után a RyR magasabb $[Ca^{2+}]$ növekedésekkel sem aktiválható. Bármelyik is igaz, mindkettőből az következik, hogy az aktiváció után csak bizonyos idővel áll vissza a RyR eredeti Ca^{2+} -érzékenysége (Györke és Fill, 1993).

Vázizomban fiziológiás körülmények között az intracelluláris **magnézium**koncentráció nagyobb, mint 1 mM. A szívizom típusú RyR kevésbé érzékeny Mg^{2+} -ra (Zucchi és Ronca-Testoni, 1997).

Meissner és mtsai. (1994) kimutatták, hogy a Ba^{2+} és a Mg^{2+} gátolja a RyR működését, csökkentve nyitott állapotának valószínűségét. Utóbbi hatását összetett mechanizmus révén valósítja meg, és ez a gátlás függ a *cis* oldali $[Ca^{2+}]$ -tól. A gátlás mechanizmusa a mai napig nem teljesen tisztázott. Két lehetséges mechanizmust írtak le:

1. a Mg^{2+} verseng a Ca^{2+} -al a nagy affinitású (aktivációs) oldalért (A –csík) (Jóna és mtsai., 2001);

2. a Mg^{2+} verseng a Ca^{2+} -al az alacsony affinitású (inaktivációs), nem szelektív, divalenskátion-gátló oldalhoz (I-csík), és bezárja a RyR-t (Zucchi és Ronca-Testoni, 1997; Shoshan-Barmatz és Ashley, 1998).

A legtöbb sejt cytosoljában az **ATP** (kötött és nem kötött) koncentrációja néhány mM. Az ATP egy igen erős RyR-aktivátor ($K_d=350 \mu M$, $n_{Hill}=2$), amely cytoplasmaticus kalcium hiányában is aktiválja a RyR-t, ill. Ca^{2+} -al konjugálva majdnem maximális aktivációt vált ki. Jelentősége abban áll, hogy a DHPR direkt aktiváló hatása önmagában nem elég a Ca^{2+} -felszabadulás kiváltásához, agonista szolúbilis faktorok is szükségesek hozzá.

Lényeges, hogy az ATP aktiváló hatása nem a csatorna foszforilációján alapszik, mivel egyéb adeninnukleotidok úgy, mint az ADP, AMP, cAMP, adenin vagy adenzin szintén képesek aktiválni a csatornát (Shoshan-Barmatz és Ashley, 1998), és így képesek ellensúlyozni a Mg^{2+} -gátlást fiziológiás körülmények között. Ezzel szemben a CTP, GTP, ITP vagy UTP kevésbé hatékonyak (Zarka és Shoshan-Barmatz, 1993).

A RyR aktivitását **foszforilációs** jelek is szabályozzák, mely hatás izoformafüggő. A RyR1 foszforilációs mechanizmusa nem teljesen tisztázott. Egyes tanulmányok szerint a RyR1-et az endogén proteín kinázok (PKA, PKG és CaMKII) képesek foszforilálni (Suko és mtsai., 1993), míg más munkákban ennek ellenkezőjét találták (Strand és mtsai., 1993).

A fehérjék foszforilációval történő hatékony szabályozása a protein kinázok mellett foszfatázok működését is megnöveli. A RyR szabályozásában résztvevő foszfatáz a calcineurin, vagy más néven protein foszfatáz 2B.

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

II.3.5. A RyR farmakológiai szabályozása

A RyR működését több ismert farmakológiai vegyület is befolyásolja (Coronado és mtsai., 1994; Franzini-Armstrong és Protasi, 1997), melyek a receptor tulajdonságainak kutatásában hasznos eszközzé váltak.

A **rianodin** egy növényi alkaloida (*Ryania speciosa*), amely specifikusan ($n_{\text{Hill}}=2$) kötődik a RyR-hoz, feltételezések szerint annak nyitott állapotához. Dózisfüggően befolyásolja a RyR működését. Alacsony koncentrációban (10 nM) növeli a csatorna nyitvatartási valószínűségét; közepes koncentrációban (1-10 μM) a nagy affinitású rianodin-kötőhelyhez kapcsolódva részlegesen nyitott állapotban tartja a csatornát és fokozza a Ca^{2+} -felszabadulást; végül magas koncentrációban (>200 μM) elfoglalja a RyR alacsony affinitású rianodin-kötőhelyeit is, és a Ca^{2+} -felszabadulás teljes gátlását eredményezi (McGrew és mtsai., 1989; Franzini-Armstrong és Protasi, 1997).

A csatorna egyik legismertebb aktivátora a metilxantinok csoportjába tartozó **koffein**, amely mM-os koncentrációban fokozza az SR-ből történő Ca^{2+} -felszabadulást, és kontraktúrát hoz létre az izomban (Csernoch és mtsai., 1999). Izolált csatornákon végzett mérésekben kiderült, hogy a szer növeli a RyR1 és RyR2 nyitvatartási valószínűségét, miközben nem módosítja a csatorna konduktanciáját. A koffeinhatás azonnali és könnyen visszafordítható. A koffein két módon hathat a RyR-ra. Viszonylag alacsony [Ca^{2+}]-nál (<2 mM) a koffein hatása Ca^{2+} jelenlététől függ: növeli a Ca^{2+} -aktivációs hely Ca^{2+} -szenzitivitását. Magasabb koffein-koncentrációnál (5-10 mM) a csatornák Ca^{2+} hiányában is nyitnak permeabilitási tulajdonságaikat megtartva, de módosult vezetési kinetikát mutatva (a nyitott állapot átlagos ideje megnyúlik) (Sitsapesan és Williams, 1990; Franzini-Armstrong és Protasi, 1997).

A **fenolszármazékok** gátolják a Ca^{2+} -csatorna, valamint pumpa működését. Kivételt képeznek a timol és a karvakol, amelyek aktiválják a csatornát (Sárközi és mtsai., 2007). Irodalmi adatok alapján ismert továbbá, hogy a szintetikus fenolszármazékok közé tartozó 4-

kloro-m-krezol (4-cmc) aktiválja a ^3H -rianodin kötését, és a $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulást HSR vezikulákon.

A **ruténiumvörös** RyR blokkolóként ismeretes (IC_{50} 20-tól 100 nM-ig). Cytoplasmaticus oldalon alkalmazva drasztikusan csökkenti a RyR nyitvatartási valószínűségét, és nagyobb koncentrációnál be is zárja, míg a luminális oldalon alkalmazva a csatorna konduktanciáját csökkenti. A CICR működését teljesen leállítja, hatása irreverzibilis (Ma, 1993; Franzini-Armstrong és Protasi, 1997).

A **nitrogén-monoxid** (NO) is befolyásolhatja a RyR működését a csatorna szulfhidril csoportjainak oxidációján keresztül. A NO RyR-ra gyakorolt hatását illetően az irodalmi adatok ellentmondásosak: a csatorna aktivációját és gátlását egyaránt leírták (Eu és mtsai., 1999, 2000; Reid, 2001).

II.4. A sarco-(endo)plasmaticus Ca^{2+} -ATPáz

A cytoplasmaticus Ca^{2+} gyors eltávolításáért a sarco-(endo)plasmaticus ATPáz (en. Sarco-(Endo)plasmatic Reticulum Ca^{2+} ATPase, SERCA) felelős, így működése meghatározza az izom relaxációját is. Jelenlétét gyakorlatilag minden sejtfeleségben kimutatták.

A 110 kDa mólsúlyú transzmembrán fehérje döntően az SR longitudinális szakaszán helyezkedik el, és lényegében az SR membránfehérjék mintegy 90%-át teszi ki (MacLennan, 1997). A plasmamembrán Ca^{2+} -ATPáz (PMCA)-hoz hasonlóan a SERCA is aktív pumpa (P-típusú ATPáz), amelynek hajtóereje az ATP energiája. Egy ATP hidrolízise két Ca^{2+} transzlokációját eredményezi.

A SERCA a szervezetben több izoformában fordul elő, ezeket három ismert gén kódolja. A SERCA1 gén terméke a gyors típusú vázizomrostokra jellemző izoforma. Két altípusa létezik: a SERCA1a és a SERCA1b. Utóbbi az újszülött szervezet gyors rostjaiban van túlnyomórészt jelen. A fejlődés során fokozatosan felváltja a SERCA1a. Felnőttkorban már ez a domináns forma (izotípus-váltás).

A SERCA2 izoformának is két variánsa van. A SERCA2a a domináns változat a szívizomsejtekben, valamint a lassú típusú vázizomrostokban; emellett nagy mennyiségben expresszálódik a neonatális gyors típusú izomrostokban is, de felnőttkorban itt alig mutatható ki. A SERCA2b gyakorlatilag minden sejtfeleségben kimutatható, jelentős mennyiségben a simaizomokban expresszálódik.

A SERCA3 génnek több terméke is ismeretes. Ezek a szervezetben széles körben, elsősorban nem-izom sejtekben fellelhető izoformák (Lytton és mtsai., 1992; Loukianov és

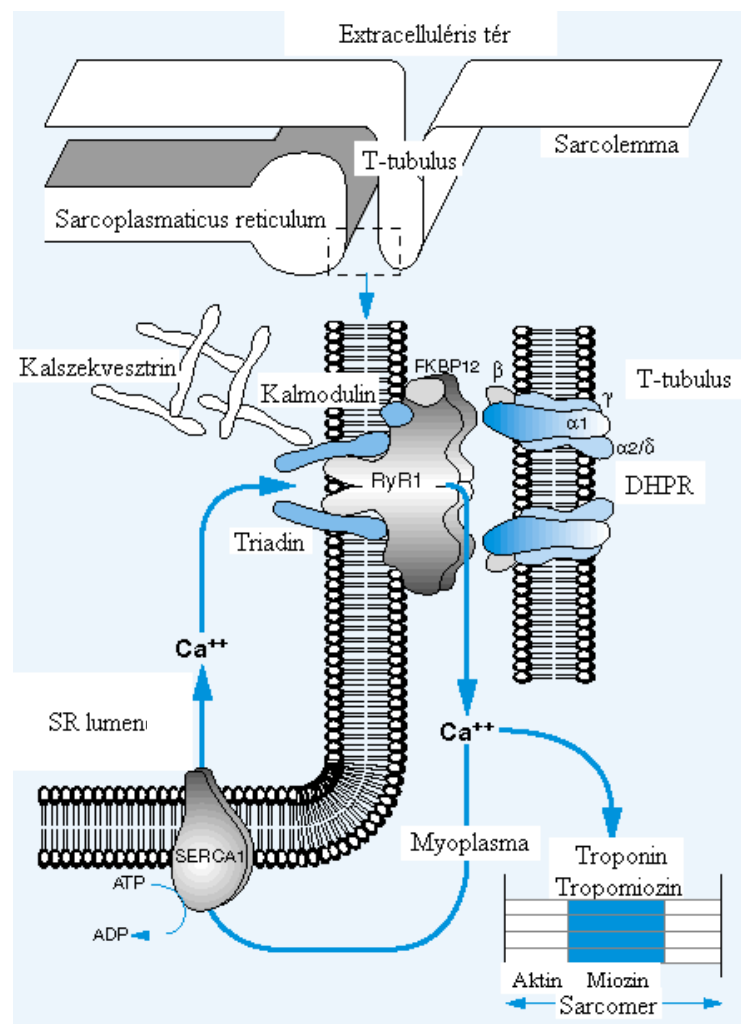
mtsai., 1998; Wuytack és mtsai., 2002).

A SERCA működésének megismerését nagyban segíti, hogy rendelkezésre állnak farmakológiai ágensek, amelyek gátolják működését. Inhibitora a tumor-promoter tapszigargin (TG), amely nagy specificitással és nagy affinitással irreverzibilisen kötődik az enzimhez (Thastrup és mtsai., 1990). Szintén specifikus blokkolója a ciklopiazonsav (CPA), mely az *Aspergillus* fajok által termelt egyik mikotoxin, hatása reverzibilis és affinitása kisebb a tapszigarginénál. A kutatásban használatosak még egyéb, kevésbé specifikus blokkolók is, mint a 4-aminopiridin (4-AP), a fluorid, a TBQ (2,5-di(tert-butil)-1,4-benzohidrokinon) (Inesi és Sagara, 1994), a vanadát, és a CrATP (Stokes és mtsai., 1998).

II.5. Az excitációs-kontrakciós kapcsolat jellegzetességei

Vázizomban excitációs-kontrakciós, elektro-mechanikai vagy elektro-kontrakciós kapcsolat (angol nevén alapuló általánosan használt rövidítése: ECC, Excitation-Contraction Coupling, amelyet először 1952-ben Sandow használt) alatt a sarcolemmán érkező elektromos jel (akciós potenciál, AP) kontrakciós válasszá történő átalakítását értjük. A két folyamat között a kapcsolatot az $[Ca^{2+}]_i$ ciklikus emelkedése, a Ca^{2+} -tranziens hozza létre (5. ábra).

5. ábra. A vázizom elektro-mechanikai kapcsolatában résztvevő legfontosabb szerkezeti elemek (Monnier és Lunardi, 2000 nyomán)



A kapcsolási mechanizmus feszültségérzékelője a T-tubulusok membránjában nagy számban található L-típusú Ca^{2+} -csatorna (a DHP-receptor) α_1 -alegysége (Ríos és Brum, 1987), mely megnyílásával egyrészt közvetlenül hozzájárul a Ca^{2+} -tranzien létrehozásához, másrészt a RyR aktiválódásához nélkülözhetetlen trigger Ca^{2+} -ot a sarcoplasmába vezeti. A folyamat végeredménye mindkét harántcsíkt-izomtípus esetében az intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ megemelkedése, és a kontraktilis rendszer Ca^{2+} -függő aktiválódása.

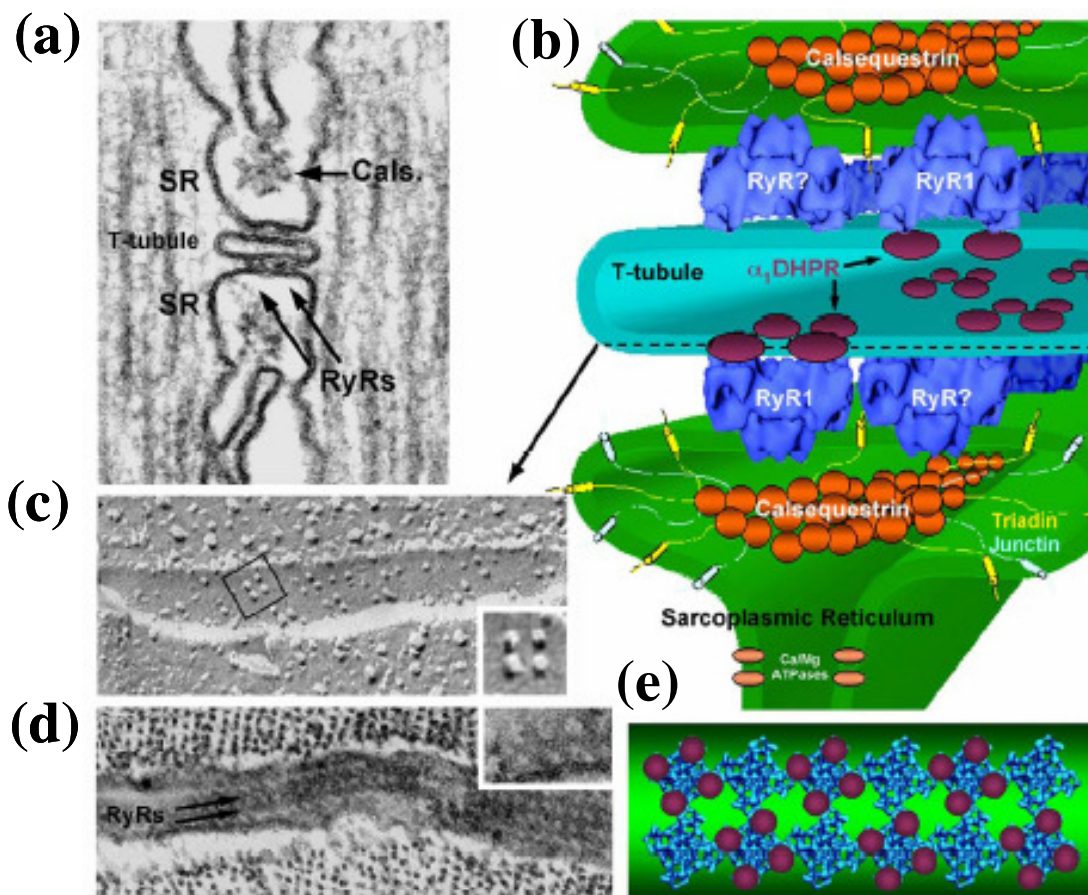
A kifejlett vázizmon az extracelluláris Ca^{2+} belépése a kontrakció létrehozásában nem játszik szerepet, a Ca^{2+} intracelluláris tárolóhelyekről szabadul fel, majd a kontrakció után az erőteljes pumpamechanizmus révén ide is kerül vissza (Ríos és Pizzaro, 1988; Melzer és mtsai., 1995). Az ECC kulcslépése a kalciumraktárként működő terminális ciszternákon található RyR-ok aktivációja (Franzini-Armstrong, 1970), hiszen a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kontrakcióhoz szükséges emelkedését döntőrészt az SR raktárakból kiáramló Ca^{2+} hozza létre. A myoplasmaticus térben megjelenő kalciumionok kötődnek a troponin molekula C-alegységéhez, és ezáltal aktiválják a kontraktilis rendszert. Az aktin és miozin kölcsönhatása, a vékony és vastag filamentumok egymás melletti elcsúszása hozza létre az izom összehúzódását, valamint az erő kifejtést. Amikor az izomrost membránja repolarizálódik, az SR kalciumcsatornái bezáródnak, és a SERCA pumpa a Ca^{2+} -t visszajuttatja az SR belsejébe. A $[\text{Ca}^{2+}]_i$ csökkenése a Ca^{2+} Tn-C-ről történő leválását, és így az izom elernyedését eredményezi.

Az elmúlt évtizedekben az ECC két speciális területe került az érdeklődés középpontjába. Az egyik kutatási irány az aktin és a miozin kölcsönhatásának leírását, míg a másik az SR-ből történő kalciumfelszabadulás mechanizmusának megértését tűzte ki célul. Az utóbbi probléma érdekességét egyrészt annak a biológiai szabályozásában betöltött szerepe, másrészt az a különlegesség adja, hogy a szabályozott folyamat – a kalciumfelszabadulás –, és a szabályozó jel – a depolarizáció – két különböző membránban következik be.

II.5.1. A kalciumfelszabadulás szabályozásának strukturális alapjai

A különleges strukturális elrendeződés miatt a kalciumfelszabadulás tanulmányozásában az első eredményeket morfológiai megfigyelések szolgáltatták. Vázizomban a jSR-ben található RyR-ok és a T-tubulus membránjában elhelyezkedő DHPR-ok alkotják a triádot (lásd 2./b, illetve 6./a ábrák), amit először Block és mtsai. 1988-ban írtak le. Megmutatták, hogy a RyR-ok a jSR membránjában két sorban helyezkednek el (középtől-középig mintegy 26-32 nm távolságra egymástól) (6./b, e ábra). Elektronmikroszkópos felvételek igazolták,

hogy a T-tubulusok és az SR terminális ciszternájának membránjait a triádok szintjén elektronenz struktúrák, angol szakkifejezéssel **feet-structures** („lábak”), kötik össze (Franzini-Armstrong, 1970; Franzini-Armstrong és Nunzi, 1983). Fény derült arra, hogy a „lábak” az SR terminális ciszternájának membránjában elhelyezkedő fehérjéknek a cytoplasmaticus térbe nyúló részei (Kawamoto és mtsai., 1986, 1988) (6./b ábra). Morfológiai vizsgálatok tisztázták azt is, hogy a „lábak”-kal szemben a T-tubulusok membránjában is fehérje komplexek, negyedleges szimmetriát mutató elrendeződésük miatt **tetrádok**knak nevezett struktúrák találhatók (Osame és mtsai., 1981; Franzini-Armstrong és Nunzi, 1983) (6./e ábra). A tetrádok elektronmikroszkópos vizsgálata alapján bebizonyosodott, hogy ezeket valójában a T-tubulusok membránjában található DHP-receptorok alkotják (Franzini-



Armstrong és mtsai., 1991).

6. ábra. A triád szerkezete harántcsíkolt vázizomrostokban (Protasi, 2002 nyomán)

(a) A triád szerkezete elektronmikroszkópos felvételen hal úszóhólyag izmából. Jól látható a RyR-ok „láb” régiója és a calsequestrin (Csq); (b) A triád 3-D rekonstrukciója, melyen láthatók a RyR, DHPR, calsequestrin, triadin, junctin, SERCA; (c) Vázizomban négy DHPR alkot egy tetrádot, és minden második RyR-hez kapcsolódik egy tetrád; (d) Az SR membránjában a RyR-ok függőlegesen

helyezkednek el; **(e)** A RyR-ok (kék) és a DHPR-ok (lila) sematikus elrendeződése; minden második RyR-hez párosul egy DHPR.

II.5.1.1. A kalciumfelszabadító egység és a „couplon”

A szakirodalomban igen elterjedt fogalom az ún. kalciumfelszabadító egység (en. **Calcium Release Unit, CRU**) (6./a ábra), amely két különálló, jól strukturált membránrendszer (a külső membrán – sarcolemma – és/vagy a T-tubulus, illetve a belső membrán – SR –) találkozásánál jön létre. Vázizomban a CRU-t többnyire a triádok képezik.

Egy másik általánosan használt fogalom a „couplon” (Ríos és Stern, 1997), amelyet a RyR, DHPR és a többi junkcionális fehérje alkot. Egy triád két, egymástól függetlenül működő (a T-tubulus két oldalán) „couplon”-t tartalmaz. Példaként, az általunk használt patkány EDC izomban (gyors izom) a „couplon” 38 „feet structures”, avagy „láb”-ból tevődik össze, míg a soleus (lassú izom) esetén 24-ből.

II.5.2. A kalciumfelszabadulás elemi jelenségei

Az excitációs-kontrakciós kapcsolat tanulmányozásában nagy áttörést jelentett a konfokális mikroszkóp bevezetése, amely egy viszonylag kis térben ($0,4 \times 0,4 \times 0,8 \mu\text{m}^3$) képes a fluoreszcencia változásait követni. Ily módon adódott lehetőség az elemi kalciumfelszabadulási események (en. **Elementary Calcium Release Events, ECRE**) (Niggli, 1999; Niggli és Shirokova, 2007; Cheng és Lederer, 2008) felderítésére, amelyek a RyR-ok spontán megnyílása révén jönnek létre, és az egész sejtre kiterjedő, tranziens $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -megemelkedés alapját képezik. Terjedelmi okok miatt itt csupán a RyR1-en keresztül létrejövő elemi eseményekről kívánok beszámolni.

II.5.2.1. Kialakulás és előfordulás

Korábbi megfigyelések alapján emlősök esetén az ECRE-nek két formája ismert. Egy nagyobb amplitúdával jellemezhető, rövid ideg tartó esemény a *spark*, valamint egy hosszabb ideig tartó, kisebb amplitúdójú esemény az *ember* (7. ábra).

A *spark*okat először kamrai szívizomsejteken konfokális fluoreszcens mikroszkópos technikával detektálták (Cheng és mtsai., 1993), majd 1995-ben béka harántcsíkolt vázizmon is kimutatták jelenlétüket (Tsugorka és mtsai., 1995; Klein és mtsai., 1996).

Egészséges intakt rostokon végzett kísérletek során kiderült, hogy kétéltűek vázizmában a spontán kialakult *spark*ok viszonylag nagy számban figyelhetők meg (Klein és mtsai., 1996). Ezzel szemben felnőtt emlős izomrostok esetén az ECRE-k jóval ritkábbnak bizonyulnak, és más morfológiai tulajdonságokkal rendelkeznek (Shirokova és mtsai., 1998).

Különböző módszerek kerültek ezért kidolgozásra a *sparkok* frekvenciájának növelése érdekében. Ilyen például az extracelluláris $[Ca^{2+}]$ növelése, illetve $[Mg^{2+}]$ csökkentése, a kémiai vagy mechanikai nyúzás (Kirsch és mtsai., 2001), az ozmotikus shock alkalmazása (Weisleder és mtsai., 2006), vagy a fő intracelluláris anion (glutamát) cseréje (szulfátra) (Zhou és mtsai., 2003). Bizonyos izombetegségek esetén, például izomdystrophyában, módosult Ca^{2+} -homeosztázisról számol be az irodalom, amely jelentősen megnöött *spark* frekvenciát von maga után, főleg mechanikai stressz alkalmazását követően.

Azon megfigyelés alapján, hogy az emlős izomrostokat megfosztva felszíni és T-tubuláris membránjuktól, e preparátumok rendre *sparkok*at produkálnak feltételezhető, hogy fiziológiás körülmények között a T-tubulus és SR membrán közti szerkezeti kapcsolat eredményezi a *sparkok* kialakulásának gátlását (Kirsch és mtsai., 2001; Zhou és mtsai., 2003). Ezen állítást erősíti az a megfigyelés is, miszerint vázizomtenyészetekben a *sparkok* a T-tubulustól megfosztott területekre korlátozódnak (Zhou és mtsai., 2006). A külső sejtmembrán eltávolításában a szaponin nevű detergens sikeresnek bizonyult, így ezeken a rostokon az elemi jelenségek detektálása rutinfeladattá vált (Szentesi és mtsai., 2004). Bár ezek gyakorisága még mindig túl alacsony volt, ezért a bemutatásra kerülő méréseink egy részét szulfátion jelenlétében végeztük, melynek eredményeképpen a frekvencia érezhetően növekedett anélkül, hogy az elemi események jellemző tulajdonságai változtak volna (Zhou és mtsai., 2003).

A *sparkok* kialakulásáért embrionális vázizomban a RyR1 és RyR3 altípusok felelősek. A felnőtt emlősök elveszítik a 3-as típusú rianodinreceptorait, és azt a képességüket is, hogy *sparkok*at produkáljanak. Felnőtt korban már csak a diaphragma tartalmaz RyR3-at. Friss kutatási eredmények szerint exogén RyR3-at expresszáló izomrostokban depolarizáció hatására ismét számos *spark* detektálható, míg a RyR1 overexpressziója esetén ez nem figyelhető meg (Pouvreau és mtsai., 2007). Az irodalomban jelenleg több elképzelés is létezik a *sparkok* kialakulásának magyarázatára (lásd 7. ábra).

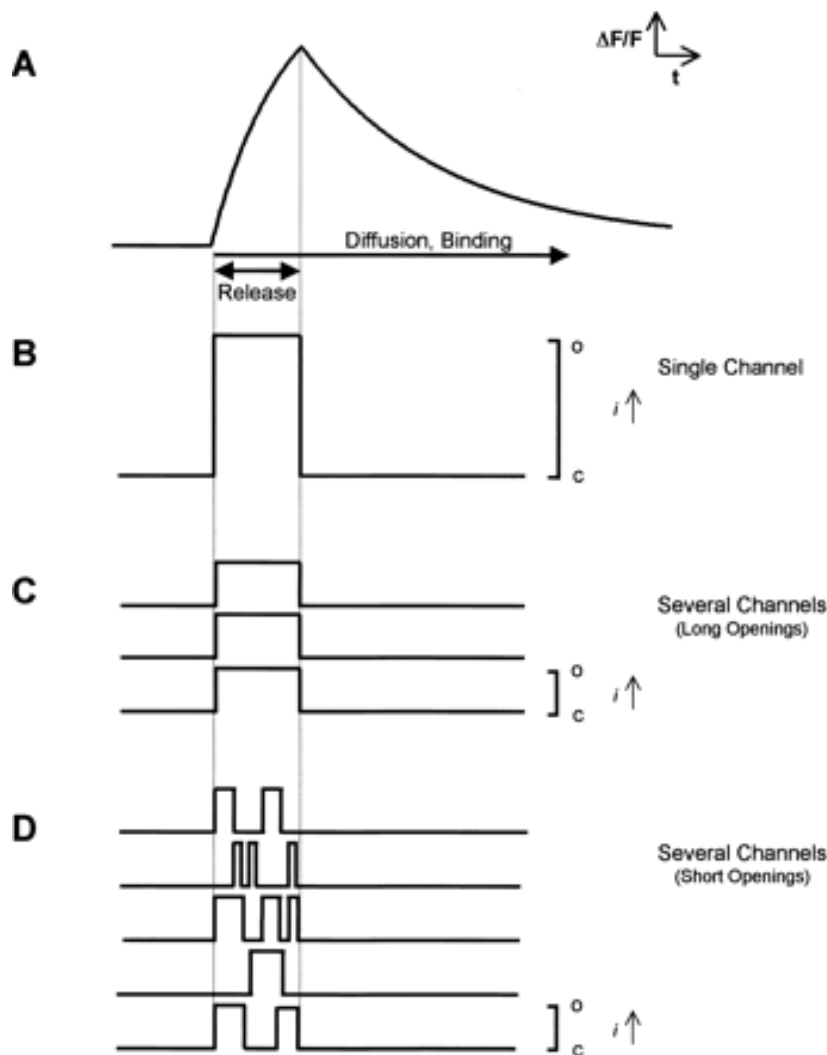
A *sparkok* kialakulása mellett azt a mai napig megválaszolatlan kérdést is élénk érdeklődés övezi, hogy vázizomban mi eredményezi a Ca^{2+} -felszabadulás megszűnését. Míg szívizomban bizonyított, hogy a Ca^{2+} -felszabadulás lecsengése a Ca^{2+} -raktárak kiürülése révén jön létre, harántcsíktolt izmok esetén ez a mechanizmus ismeretlen. Ríos és mtsai. (2006) kísérleteikben a calsequestrinnek és a hozzá asszociált fehérjéknek tulajdonítottak szerepet a Ca^{2+} -felszabadulásban.

Egy *spark* kialakításában résztvevő csatornák számát a *spark* átlagos amplitúdójából (A) és az FWHM értékéből lehet kiszámolni az alábbi egyenlőség alapján:

$$SM(t) = 1,206 \cdot A(t) \cdot FWHM(t)^3 \quad (1)$$

ahol $SM(t)$ a signal mass függvény (Chandler és mtsai., 2003).

Ezzel az egyenlettel számolva munkacsoportunk azt az eredményt kapta, hogy egy *spark* létrejöttéhez az *ember*hez képest tízszer több csatorna megnyílására van szükség. Vagyis ha az *ember*ök egyetlen egy csatorna megnyílását reprezentálják, akkor a *spark*ok létrejöttéhez legalább tíz csatorna egyidejű megnyílása szükséges. Másrészt, ha az *ember*ök több szinkron működő csatorna működése révén jönnek létre, akkor a *spark*ok esetében ez a szám könnyen elérheti a 100-at is (Stern és mtsai., 1997).



7. ábra. **Különböző hipotézisek a *spark*ok kialakulására béka vázizom esetén** (Schneider, 1999 nyomán)

(A) A fluoreszcenciaérték ($\Delta F/F_0$) relatív változása az idő függvényében egy tipikus *spark* alatt; (B-D) három hipotetikus alternatíva a Ca^{2+} -*spark* kialakulásának magyarázatára. Ezen alternatívák egy (A), három (B), vagy öt (C) csatorna megnyílásával magyarázzák az (A) panelben bemutatott *spark* időbeli lefolyását. Mindegyik rekord egyetlen csatornán átfolyó áram időbeliségét reprezentálja (o-nyitott állapot; c-zárt állapot).

II.5.2.2. Jellegetes paraméterek

Mára tisztázódott, hogy a *spark* a kapcsolt RyR-ok kapuzási mechanizmusát közvetíti, és így elsődleges információt nyújt a CRU viselkedéséről, illetve maga az SR-ből történő Ca^{2+}

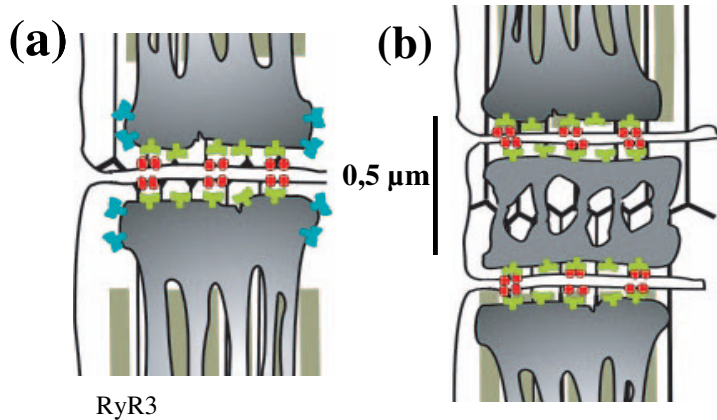
effluxról. Következésképpen, a *spark* morfológiája értékes információt hordoz a CRU kapuzását, illetve a Ca^{2+} -fluxus fiziológiás kialakulását tekintve.

A *spark*ok jellegzetes, általunk is vizsgált paraméterei, az amplitúdó (A), amely mint $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$ vagy normalizált fluoreszcencianövekedés ($\Delta F/F_0$) jellemezhető; az esemény időbeli hossza; a maximális amplitúdó feléhez tartozó időtartam (**F**ull **T**ime at **H**alf **M**aximal amplitude, FTHM); valamint a térbeli szélesség (**F**ull **W**idth at **H**alf **M**aximal amplitude, FWHM); továbbá a csúcs eléréséhez szükséges idő (rise time) és a fél-relaxációs idő (τ). Egyszerű esetben (amikor nincsenek csatorna-újrakezdések) a rise time az SR-ből történő kalciumfelszabadulás időtartamára enged következtetni, míg a „ Ca^{2+} signal mass” $SM(t)$ (részleteket lásd fentebb) a felszabadult Ca^{2+} mennyiségére utal. A kezdeti kísérletekben azt gondolták, hogy a Ca^{2+} -*spark*ok egyszerű események, de a későbbi eredmények rávilágítottak arra, hogy a fent említett paraméterek változhatnak a preparálás, a vizsgált RyR izoforma, a fő intracelluláris anion cseréje (általában glutamát cseréje szulfátra), illetve az SR/ER Ca^{2+} -tartalmának függvényében. Számos tanulmány az ECRE-k módosult paramétereiről számol be különböző izombetegségek esetén, illetve a RyR farmakológiai modulátorai jelenlétében (rianodin, FK506, imperatoxin, maurokalcin) (Shtifman és mtsai., 2000; Lukács és mtsai., 2008).

II.5.2.3. Elemi események: kétéltű vs emlős esetén

Jelenlegi ismereteink szerint a harántcsíkolt izmok felépítése és működése különbözik kétéltűek, valamint emlősök esetében. Ez a különbség egyrészt az SR morfológiai eltéréseivel (Franzini-Armstrong és Peachey, 1981), másrészt a kalciumfelszabadulásban résztvevő RyR szerkezetének különbségeivel magyarázható. Emlős vázizomban túlnyomóan a RyR1 expresszálódik. Ellentétben a felnőtt gyors izmokkal, ahol csakis kizárólag RyR1 található, a foetalis, a diaphragma és egyes lassú izmok a RyR3-at szintén expresszálják (Tarroni és mtsai., 1997). Az általunk is tanulmányozott béka vázizomban kétféle RyR izoforma fordul elő: a RyR1 (más néven α -izoforma) és RyR3 (β -izoforma), melyek jellegzetesen kettős sorokban helyezkednek el (lásd 8./a ábra).

Az egyik közvetlen kapcsolatban áll egy a felszíni membránban elhelyezkedő DHPR-ral (mechanikai kapcsolat), míg másik izoformája attól távolabb helyezkedik el (parajunkcionálisan), és az intracelluláris tér kalciumkoncentrációjának kismértékű megváltozására nyílik meg (CICR révén) (Murayama és Ogawa, 2002). Emlős vázizomban ez utóbbi izoforma nem fordul elő (Flucher és mtsai., 1999) (8./b ábra).



RyR3

esetén két T-tubulus figyelhető meg sarcomeránként (az I-csík végénél) oly módon, hogy két szomszédos sarcomer triádja fizikai közelségben helyezkedik el

Az elvégzett kísérletek során fény derült arra, hogy míg béka izomrostok esetén csak *sparkok*, addig patkány izomrostokban *sparkok* (mintegy 2/3-a az eseményeknek) és *emberők* is előfordultak. Ez utóbbiak vagy magányosan, vagy a *sparkok* előtt, illetve után következtek be. Glutamátban mért ECRE-eket összehasonlítva kiderült, hogy az emlős *sparkok* hosszabbak és valamivel szélesebbek a békán mért eseményekhez képest. Ugyanakkor a szulfátban elvégzett mérések alapján eltérés mutatkozott a *sparkok* jellemző paramétereiben is a két faj esetében. Az események amplitúdója a békák esetében volt nagyobb, míg a többi vizsgált paraméter a patkány rostokon mutatott magasabb értékeket, tehát az eloszlási hisztogramokon a görbék jobbra tolódnak. Ezek a megfigyelések valószínűleg abból adódnak, hogy emlősökön kisebb amplitúdójú, viszont hosszabb ideig tartó elemi események, és így RyR megnyílások figyelhetők meg (9. ábra). Az emlős izmokon tapasztalható események nemcsak megjelenésükben különböznek a kétéltű izmokon található eseményektől, úgy tűnik egyes szerek is pl.: koffein, eltérően hatnak rájuk, ami befolyásolja az ECC működését, és a kétéltűekben lejátszódó kalcium *sparkok*at (González és mtsai., 2000).

II.5.3. A kalciumfelszabadulás mechanizmusa

Annak ellenére, hogy mind a DHP-receptor, mind az SR kalciumcsatornájának aminosav összetétele és relatív elrendeződésük ismert, a két molekula közötti információátvitel pontos részletei a mai napig nem tisztázottak. Még az 1970-es évek elején felvetődött annak lehetősége, hogy az EC térből belépő Ca^{2+} indukálja az SR kalciumcsatornáinak megnyílását (Endo és mtsai., 1970). Ezt később két független megfigyelés is alátámasztani látszott. A T-tubulusokban található DHPR más szövetekben mint kalciumcsatorna funkcionál (Beam, 1984). Az izolált RyR-ról pedig bebizonyosodott, hogy a $[Ca^{2+}]$ megemelkedése a csatorna megnyílását eredményezi (Meissner és mtsai.,

8. ábra. A RyR-ok eloszlása béka és patkány vázizomban (módosítva Pouvreau és mtsai., 2007 nyomán)

(a) kétéltűek, madarak, halak és emlősembrió esetén a triád az I-csík közepén helyezkedik el. Minden második RyR1-hoz (piros) egy DHPR tetrád társul (zöld) a parajunkcionálisan elhelyezkedő nagy számú (kék) avagy β -izoforma mellett; (b) emlősök

1986). Bár napjainkra általánosan elfogadhatónak tekinthető, hogy ezek a lépések felelősek a szívizomsejtek $[Ca^{2+}]_i$ depolarizációval előidézett megemelkedéséért, harántcsíkolt izmokban más mechanizmus jelenlétét kell feltételeznünk.

II.5.3.1. Mechanikai csatolás

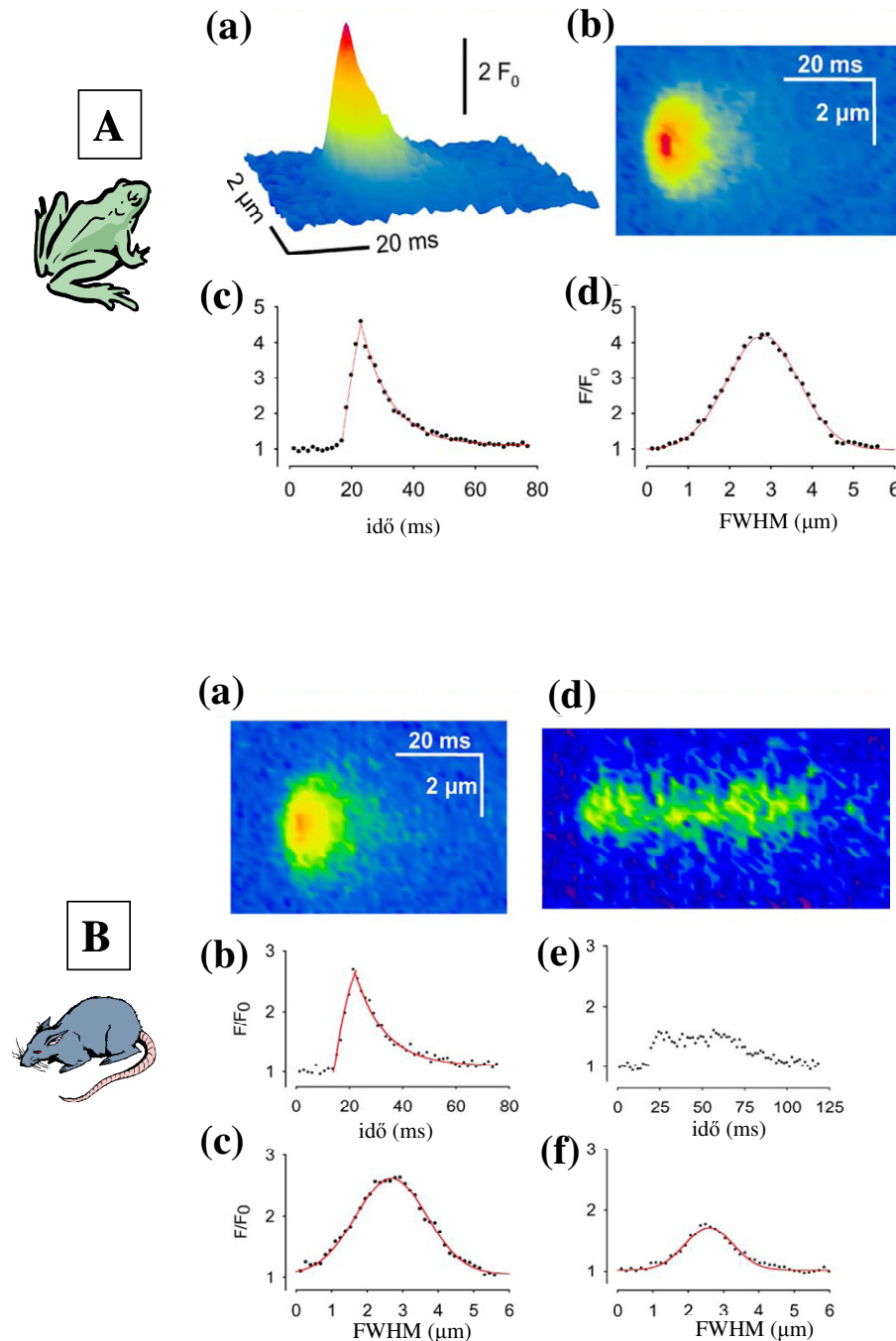
A membránon belüli töltésmozgás leírásával egy időben felvetődött egy mechanikai kölcsönhatáson alapuló modell (Schneider és Chandler, 1973). Ennek létjogosultságát azok az irodalmi adatok szolgáltatták, melyek szerint a harántcsíkolt izmok kalcium belépés nélkül képesek összehúzódní (Armstrong és mtsai., 1972). Az EC térből belépő Ca-ionok lehetséges szabályozó funkcióját a kalciumáram lassú kinetikája is kérdésessé tette. Vázizmokon a feszültségvezérelt kalciumcsatornák – DHPR-ok – megnyílása ugyanis nem elég gyors ahhoz, hogy előidézhesse a Ca^{2+} -nok néhány ezredmásodperc alatt bekövetkező felszabadulását (Sanchez és Stefani, 1983). A mechanikai modell strukturális alapját a DHPR α_1 -alegységének szív- és vázizom eredetű darabjaiból készített kimérésekkel végzett mérések teremtették meg.

II.5.3.2. Kalcium-indukált kalciumfelszabadulás

Vázizom esetén a DHPR az izom akciós potenciáljához képest hosszú aktivációs időállandója miatt nem nyílik meg, tehát nem működik funkcionális csatornaként, de közvetlen alloszterikus viszonyban áll az SR-ben vele szemben elhelyezkedő RyR-ok egy részével. A DHPR a sarcolemma depolarizációjakor olyan konformációváltozást szenved, amely a depolarizáció által képviselt jelet az SR rianodinreceptoraira közvetíti, és azok megnyílását okozza. A RyR-okon keresztül felszabaduló Ca^{2+} aktiválja a környező, DHPR által közvetlenül nem vezérelt RyR-okat is. Ez utóbbi folyamatot kalcium-indukált kalciumfelszabadulásnak nevezik (en. Calcium Induced Calcium Release, CICR, melyet már korábban leírtak: lásd Endo és mtsai., 1970; Ford és Podolsky, 1970; Fabiato és Fabiato, 1975).

A konfokális mikroszkóp segítségével rögzített *sparkok* alátámasztani látszanak a CICR elméletét. Vázizomban a *sparkok* a CICR megnyilvánulásainak tekinthetők, kiindulva abból, hogy hasonlóak a szívizomban megfigyelt *sparkok*hoz, ahol a fő aktiváló mechanizmus a CICR, amely tovább növeli az $[Ca^{2+}]_i$ -t (Klein és mtsai., 1996). Másik jel, ami alátámasztja azt, hogy a CICR a *sparkok* alapjául szolgál, az a gyors kinetikájuk, ahol a kalciumfelszabadulás kezdőcsúcsa megegyezik a CICR kezdőcsúcsával (Baylor és mtsai., 1983; Melzer és mtsai., 1984). Felvetődik a kérdés, hogy a feszültségfüggő csatornáknak van-e szerepe a *sparkok* létrejöttében a CICR-en kívül is, tisztázatlan maradt. Ennek érdekében

morfológiailag összehasonlították a kontroll körülmények között rögzített *spark*okat azokkal, amelyeket a CICR maximalizálása során (koffein, vagy alacsony $[Mg^{2+}]_i$ jelenlétében), illetve a CICR gátlása során (magas $[Mg^{2+}]_i$) regisztráltak.



9. ábra. Az elemi események típusai béka (A), illetve patkány (B) vázizomrostokon (módosítva Csernoch, 2007 nyomán)

A (a) tizennyolc nagy amplitúdójú, hasonló tér- és időbeli paraméterekkel rendelkező *spark* átlagolása után megrajzolt *spark* 3D valamint (b) 2D ábrázolása; (c) Az átlagolt *spark* időbeliségét ábrázoló görbe; a görbe felszálló (időállandó 9 s), illetve leszálló (időállandó 15 ms) szárára exponenciális függvény lett illesztve; (d) Az átlagolt *spark* térbeliségét ábrázoló görbe, Gauss-függvény illesztését követően (FWHM=2,1 μ m);

B (a) harminc *spark* átlagolása után megrajzolt *spark* 2D ábrázolása; (b) Az átlagolt *spark*

időbeliségét ábrázoló görbe; a görbe felszálló (időállandó 8 ms), illetve leszálló (időállandó 11 ms) szárára exponenciális függvény lett illesztve; (c) Az átlagolt *spark* térbeliségét ábrázoló görbe (FWHM=2,3 μ m); (d-f) Az ember jellemző paraméterei: (d) Egy ember 2D ábrázolása, melyen jól látható az (a)-hoz képest hosszabb időskála; (e) és (f) az ember időbeli és térbeli ábrázolása (FWHM=1,6 μ m).

A külső sejtmembránjától megfosztott vázizomrostban a koffein elősegíti a CICR-t. Ismeretes, hogy a magnézium a release-csatornák klasszikus gátlószere, hiszen nagy affinitással kötődik a csatorna kalciumkötőhelyeihez. Fiziológias koncentrációja közel 1 mM, depolarizált sejt esetében a *sparkok* spontán létrejöttéhez ennek az értéknek 0,5 mM alatt kell lennie (Lacampagne és mtsai., 1998). Béka vázizomban a spontán kialakuló *sparkok* e mechanizmus révén jönnek létre, frekvenciájuk jelentősen megnő cytoplasmaticus Ca^{2+} vagy koffein jelenlétében (Klein és mtsai., 1996), illetve csökkentett cytoplasmaticus Mg^{2+} hatására (Lacampagne és mtsai., 1998). A spontán kialakuló *sparkok* hiánya emlős vázizomban alátámasztani látszik azt, hogy a CICR kisebb jelentőséggel bír emlősökben (Shirokova és mtsai., 1998).

II.5.3.3. A kalciumfelszabadulás befejeződése

Fabiato és mtsai. bevezették, majd Stern és mtsai. (1992) továbbfejlesztették azt az elképzelést, mely szerint léteznie kell egy erőteljes kalciumfüggő inaktiválódásnak (en. **Calcium Dependent Inactivation**, CDI) a jelátvitel során; más szóval, a CICR és a CDI a szükséges „Ying és Yang” a Ca^{2+} -jelátvitelben. Ezen felül létezik egy harmadik mechanizmus (amit leginkább szívizomban írtak le), az ún. en. **Intra-Store Ca^{2+} -Control (ISCC)**, mely során a szívizomsejtek a csatornák bezáródásával igyekeznek megtartani az SR Ca^{2+} -tartalmát, amikor a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ szintje eléri a küszöbértéket a depléción során.

II.6. A krónikus szívelégtelenség és a vázizomgyengeség kapcsolata

A krónikus szívelégtelenség (en. **Chronic Heart Failure, CHF**), olyan pathophysiologiai állapot, amikor a kóros szív működés miatt a szív pumpafunkciója nem elégíti ki a szervezet metabolikus szükségleteit. A kialakuló CHF hátterében leggyakrabban a beszűkült koronáriák miatti myocardiumhipoxia, és a következményes bal kamrai kontrakciós erő csökkenése áll; a növekvő végdiasztolés reziduális vérmennyiség miatt a kitágult és meggyengült bal kamra képtelen továbbítani a vénás telődés során odajutott vérmennyiséget.

A szívelégtelenségben észlelt korai kompenzációs válasz fő tényezője a neurohormonális rendszer vazokonstriktor mechanizmusainak aktivációja (renin-angiotenzin II, noradrenalin, vazopresszin, endothelin), ami mind a perifériás érrendszer, mind a szívizomzat sejteinek átépüléséhez vezet. Súlyos CHF betegeknél a vázizom típusa és enzimprofilja is megváltozik. Megfigyelhető az izomrostmegoszlás változása (glikolitikus rostok az oxidatívok rovására), valamint a mitokondriumok számának csökkenése, melyek kisebbek lesznek, és a crisztáik felszíne csökken, aminek következménye a csökkent

metabolikus hatékonyság. Ezzel szemben a foszfo kreatin-készlet feltöltése (ami nem függ az izomtömegetől) CHF-ben lassú a munkavégzést követően, vagyis a vázizmok intrinsic módosulásáról lehet szó. A szívelégtelenségben szenvedő betegek terhelhetőségük csökkenéséről, izomgyengeségről, fáradékonyságról és légszomjról számolnak be, de a tünetek súlyossága nincs összefüggésben a perctérfogat-csökkenés mértékével. A csökkent terhelhetőség valószínűleg krónikus hatásokra bekövetkező másodlagos anyagcsere-, génexpressziós, morfológiai és funkcionális változások eredménye, melyek többek között az SR Ca^{2+} -háztartásának zavarát okozzák. A RyR krónikus szívelégtelenségben a fiziológias szinthez képest hiperfoszforilált, mely az FKBP12.6 disszociációját okozza. A RyR2 Ca^{2+} -függését leíró haranggörbe az FKBP12.6 depléciója miatt extrém módon kiszélesedik, ezért az SR diasztolában is csurog. A hiperfoszforilált, FKBP12-mentes RyR1 az SR nyugalmi Ca^{2+} -csurgását („leak”), azaz deplécióját okozza, és csökkenti a depolarizáció által indukált Ca^{2+} -felszabadulás (DICR) hatásfokát.

Az elégtelen szívműködés – és a legjellemzőbb tüneteként jelentkező vázizomgyengeség és fáradékonyság – háttérében álló okokként a legtöbb vizsgálat számos morfológiai és metabolikus elváltozást jelöl meg. Legkézenfekvőbb magyarázatuk az lenne, hogy a csökkenő perctérfogat miatt csökken a vázizom perfúziója, és csökken az egységnyi munkára jutó oxigén- és tápanyagmennyiség. Emiatt csökken a mitokondriumok oxidatív kapacitása, ami az aerob anyagcsere romlásához vezet. Ez azt jelentené, hogy a krónikus szívelégtelenségben szenvedő betegek ATP-termelése lassabb, mint az egészségeseké, és a vérplazma laktát-koncentrációja fizikai munkavégzés során gyorsabban nő, és magasabb csúcspontot ér el (a plazma laktátszintje összefüggésbe hozható a fáradással). A tünetek részben talán az anyagcsere-változásoknak köszönhetőek, de az okok listája még biztosan nem teljes, mivel a fenti eredmények külön-külön és együtt sem szolgálnak kielégítő magyarázattal a perifériás izomzat gyengeségének súlyosságát illetően. Az izomgyengeség mértéke ugyanis független a kardiális diszfunkció súlyosságától, és az izom perfúziójának lokális növelése, vagy a rendszeresen végzett könnyű torna a tüneteket csak részben enyhítik. Az ellentmondások miatt a szakirodalom az utóbbi időben az SR transzportmechanizmusainak másodlagos károsodását feltételezi (Szigeti és mtsai., 2007; Almássy és mtsai., 2008), aminek legalább három lehetséges oka képzelhető el:

- a DHPR-RyR szignáltranszdukció hatásfokának csökkenése miatt az elektro-mechanikai kapcsolat működése módosul;

a RyR permeabilitása és/vagy Ca^{2+} -érzékenysége változik meg posztinfarktusosállapotban;

az SR Ca^{2+} -tartalmának csökkenése miatt csökken a Ca^{2+} -gradiens.

II.7. TPEN

Az N,N,N',N'- tetrakis (2-piridilmetil) etiléndiamin (TPEN)-t először Andereg és Wenk (1967) említette a kémiai irodalomban, míg membránpermeábilis nehézfémkelátorként az első biológiai rendszeren végzett kísérletek Arslan és mtsai. (1985) nevéhez fűződnek.

A TPEN nagy affinitást mutat olyan nehézfémek iránt, mint a Mn^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} valamint alacsony affinitással rendelkezik az intracelluláris Ca^{2+} -homeosztázis vizsgálatában igen jelentős szerepet játszó ionok számára, mint a Mg^{2+} , illetve maga a Ca^{2+} (a disszociációs állandók $[K_d]$ rendre $10^{-10,3}$, $10^{-14,6}$, $10^{-15,6}$, $10^{-1,7}$, valamint $10^{-4,4}$ M, Arslan és mtsai., 1985 alapján). A tény, hogy a TPEN egy töltés nélküli membránpermeábilis puffer, lehetőséget ad az intracelluláris tér nehézfémjeinek, illetve az intraluminális Ca^{2+} gyors és reverzibilis megkötésére anélkül, hogy befolyásolná a cytosolicus szabad Ca^{2+} -koncentrációt.

Az első kísérletekben a TPEN-t fura-2 (Snitsarev és mtsai., 1996), valamint quin-2 (Arslan és mtsai., 1985) fluoreszcens festékekkel történő Ca^{2+} -mérésekben használták a technikai problémák megértése, valamint kiküszöbölése végett, amelyek a fluoreszcens festékek nehézfémekhez való kötődése miatt jelentkeztek, és ez által túlbecsülték a szabad $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Tovább bonyolítja a helyzetet a széles koncentrációtartomány, amelyben a szer hatásosnak bizonyult. Példaként, $10 \mu\text{M}$ -os koncentrációban a TPEN teljesen megköti az endogén nehézfémeket (Carropo és mtsai., 2003), $25 \mu\text{M}$ és 2mM között csökkenti az SR Ca^{2+} -tartalmát (Liu és Ambudkar, 2001), míg szívizmon alacsony koncentrációban alkalmazva ($20 \mu\text{M}$) a TPEN Ca^{2+} -hullámokat eredményezett (Jung és mtsai., 2007).

Annak ellenére, hogy a TPEN-t számos publikációban használták az intracelluláris raktárak Ca^{2+} -tartalmának csökkentésére (Liu és Ambudkar, 2001; Powis és Zerbos, 2002; Caroppo és mtsai., 2003) az eredmények pontos és helyes értékeléséhez elengedhetetlen a Ca^{2+} -homeosztázisban résztvevő fő molekulákat érintő direkt, illetve indirekt kölcsönhatások megismerése.

III. Célkitűzések

Ph.D. munkám keretében vizsgálni kívántam az elektro-mechanikai kapcsolat egyes lépéseit különböző intraluminális kalciumkoncentrációk esetén, illetve az elemi kalciumfelszabadulási események kinetikája és az SR kalciumcsatorna közötti összefüggést. Tekintettel arra, hogy az SR kalciumtartalmának egészséges, valamint patológiás vázizomban egyaránt fontos szerepe van a kalciumfelszabadulás szabályozásában, kísérleteinkben e mechanizmus részleteit kívántuk pontosabban megismerni.

A felvetett kérdés két irányból közelíthető meg: az SR kalciumtartalmának növelésével vagy csökkentésével. Jelen munkában az utóbbi esetet tanulmányoztuk, amely cél megvalósításához egy membránpermeábilis, alacsony kalciumaffinitással rendelkező nehézfém (Zn^{2+}) kelátort, a N,N,N,N –tetrakis-(2-piridilmetil)-etiléndiamin (TPEN)-t használtuk, tekintettel arra, hogy az intralumináris $[Ca^{2+}]$ -t gyorsan csökkenti, és kimosható szer.

Az SR kalciumtartalmának csökkentése természetes módon vezet a felszabaduló kalcium mennyiségének változásához, amely változás az elemi események szintjén jól követhető. Igazolni kívántuk, hogy az intralumináris $[Ca^{2+}]$ változása módosítja az elemi események létrehozásáért felelős, egyidejűleg aktiválódó csatornák számát. Rá kívántunk mutatni, hogy a RyR-ok közötti intermolekuláris kölcsönhatás, illetve az ezt befolyásoló intramolekuláris fehérjék állnak a jelenség hátterében.

Két modellrendszert használva szeretnénk volna körüljárni a témát:

1. egy immortalizált myoblast sejtvonalon, az egér eredetű C2C12 sejteken végzett fluoreszcens intracelluláris $[Ca^{2+}]$ mérések során, globális Ca^{2+} -tranzienseket rögzítettünk különböző TPEN koncentrációk jelenlétében.
2. enzimatikusan (patkány), illetve mechanikusan (béka) izolált, szaponinnal permeabilizált harántcsíktolt izomrostokon az elemi kalciumfelszabadulási események paramétereinek összehasonlító vizsgálatát végeztük.

Krónikus szívelégtelenségben a legjellemzőbb tünetekként jelentkező vázizomgyengeség és fáradékonyság mellett az elektro-mechanikai kapcsolat és a vázizomrost kalciumtranszport-mechanizmusainak molekuláris szintű sérülése feltételezhető. Mivel számos irodalmi adat számol be módosult elemi eseményekről patológiás körülmények között, kutatásaim másik részében egy posztmiokardiális patkány állatmodellt alkalmazva, a

rianodinreceptoron történő elemi kalciumfelszabadulási események összehasonlító vizsgálatát végeztem. Ehhez egészséges vázizomrostokról rögzített, fiziológiásnak tekinthető elemi kalciumfelszabadulási események paramétereit a miokardiális infarktuson átesett patkányok vázizomrostjain rögzített eseményekkel hasonlítottam össze.

IV. Anyagok és módszerek

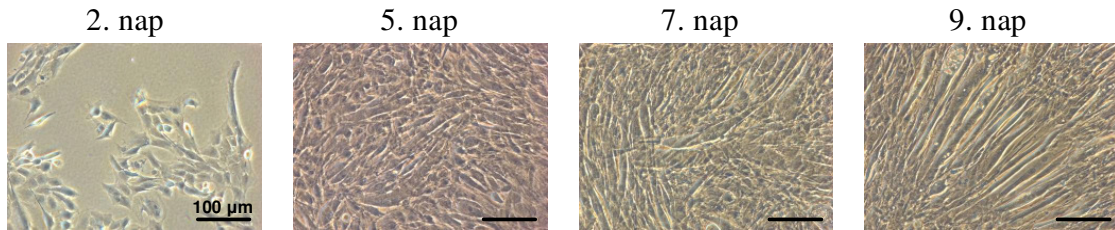
IV.1. Sejtek és sejtenyésztés

IV.1.1. C2C12 egér vázizom sejtvonal tenyésztése

A C2C12 sejtek Yaffe és mtsai. munkájának eredményeként 1977 óta állnak a kutatók rendelkezésére (Yaffe és Saxel, 1977). Ezek a sejtek felnőtt C3H egértörzs lábának harántcsíktolt izomzatából nyert immortalizált myoblastok. Mivel gyorsan differenciálódnak nagy, kontraktilis myotubulusokká, melyek jellegzetes izomfehérjéket termelnek, ezért kiválóan alkalmasak a sejtnövekedés és –differenciálódás vizsgálatára. Vizsgálatainkban az intracelluláris Ca^{2+} -szint változásait, és az annak háttérében rejlő sejt felszíni receptorok és ioncsatornák működését igyekeztünk feltárni.

A C2C12 sejtvonalat (Cell Line Data Base, 2006) myoblast stádiumban $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 15% FCS²-t és 10% DMSO-t tartalmazó DMEM tenyésztő médiumban tároltuk. Felolvasztás után a sejteket 75 cm^2 -es szövettenyésztő edényekbe osztottuk szét 1×10^5 sejt/ml sűrűségben, és 15%-os FCS-t, valamint antibiotikumokat és antimikotikumot (50 Ne/ml penicillint, 50 $\mu\text{g/ml}$ streptomocint és 1,25 $\mu\text{g/ml}$ Fungizone-t) tartalmazó DMEM tápoldatban 5% CO_2 -tartalom mellett, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra termosztált környezetben tenyésztettük őket. A tenyészetek passzálása 60-70%-os konfluencia elérésénél, 2-3 naponta történt. A különböző vizsgálatok igényeinek megfelelően a sejtek differenciálódását tárgylemezre, Petri-csészére kirakott tenyészetekben indukáltuk oly módon, hogy a fentivel megegyező körülmények között 5% FCS-t és 5% HS-t (valamint a fenti antibiotikumokat és antifungális szert) tartalmazó DMEM tápoldatra cseréltük a tenyésztő médiumukat. A vizsgálatokat 5-9 napos tenyészeteken végeztük, tapasztalataink szerint ugyanis az adott tenyésztési körülmények között – 2-3 naponkénti tápoldatcsere mellett – ilyen korú tenyészetekben jól elkülöníthetőek és vizsgálhatóak az egymagvú myoblastok (2. nap), a 2-5 magvú fiatal primer myotubulusok (5. nap), a 6-10 magvú szekunder myotubulusok (7. nap), illetve a több mint 10 magvú érett myotubulusok centrális elhelyezkedésű, valamint a fejlett izomrostok perifériára szorított magokkal (9. nap) (10. ábra).

² A dolgozatban használt vegyszerek és eszközök forgalmazójának neve és székhelye – a szöveg jobb áttekinthetősége érdekében – az **Anyagok és módszerek** rész külön fejezetében, IV.5. A használt vegyszerek és eszközök kereskedelmi forgalmazói cím alatt van felsorolva.



10. ábra. C2C12 egér myoblastok

A C2C12 egér myoblastok (2. nap) sokmagvú myotubulusokká/izomrostokká (9. nap) történő differenciálódásának morfológiai stádiumai.

IV.1.2. Egyedi vázizomrostok preparálása

Méréseinket gerincesek harántcsíktolt izmaiból preparált egyedi rostokon végeztük. Felhasználtuk kétéltűek (*Rana esculenta*) és emlősök (*Wistar* patkány) vázizmait, tekintettel a bennük előforduló eltérő rianodinreceptor izoformákra. Békák esetében a *m. semitendinosus*, míg emlősöknél a *m. extensor digitorum communis* (EDC) izmokat használtuk.

A patkányokat étterrel elaltattuk, majd eltörtük a nyakcsigolyájukat (a protokoll megegyezik az Európai Közösség irányelveivel és követi az Intézményes Európai Állatetikai Bizottság által megengedett protokollt). Ezt követően a mellső lábakból eltávolítottuk az EDC izmot, és enzimátikus úton különálló rostokat izoláltunk. Ehhez az izmot 1mg/ml kollagenáz enzimmel kezeltük (Sigma, I-típus) 1-1¹/₂ órán keresztül, 37 °C-on. Az emésztéshez kalciumot és magnéziumot nem tartalmazó fizioológias sóoldatot használtunk, amelyet hővel inaktivált borjúsavóval egészítettünk ki (Szentesi és mtsai., 2004). Az emésztés után a kollagenázt eltávolítottuk, és az izolált rostokat további felhasználásig kalciumot és magnéziumot fizioológias koncentrációban tartalmazó oldatban, alacsony hőmérsékleten (6-8 °C) tároltuk. Minden esetben a disszociáció után a rostok legalább 20 percig pihentek. A kiválasztott izomrostot áthelyeztük a fürdető kádba, és 2-3 percig 0,002%-os szaponint tartalmazó relaxáló oldattal (125 mM K-glutamát, 5 mM MgCl₂, 0,13 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 1 mM EGTA, 5 mM Na₂-ATP, 10 mM Na-foszfokreatin, 10 mM glükóz, 8% dextran, pH=7,2) töltöttük fel. A sejtmembrán permeabilizációjának ellenőrzése 50 μM fluo-3 hozzáadásával történt. Következő lépésben a relaxáló oldatot kálium-szulfát tartalmú belső oldattal (95 mM K₂SO₄, 5,5 mM MgCl₂, 0,26 mM CaCl₂, 5 mM Na₂-ATP, 10 mM glükóz, 10 mM HEPES, 1 mM EGTA, 8% dextran, 0,1 mM fluo-3, pH=7,2) cseréltük le, amelyben méréseinket végeztük.

Békák esetén az állatokat dekapitáltuk, majd a gerincvelő roncsolását követően az izomrostokat a *m. semitendinosus*-ból mechanikus úton, sztereómikroszkóp alatt izoláltuk. Az eltávolított izmot a mérőkádba rögzítettük, majd 0,004% szaponint tartalmazó, kálium-glutamát alapú relaxáló oldattal (140 mM K-glutamát, 5 mM MgCl₂, 0,13 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 1 mM EGTA, 5 mM Na₂-ATP, 10 mM Na-foszfokreatin, 10 mM glükóz, 8% dextran, 0,1 mM fluo-3, pH=7,0) 2-3 percig kezelve permeabilizáltuk a membránt. Mikor a sejtmembrán permeabilizálódott, amit a festéknek a sejt intracelluláris térben történő megjelenése jelzett, glutamát-alapú oldattal mostuk a preparátumot. Ezután az oldatot lecseréltük egy szintén kálium-glutamát alapú belső oldatra, amelyben méréseinket végeztük. A méréseink egy részében az elemi események frekvenciájának növelése érdekében a belső oldat csökkentett [Mg²⁺]-t (4 mM) tartalmazott.

IV.1.3. A *postmyocardialis infarktosus patkány állatmodell*

A kísérletesen előidézett myocardialis infarktuson átesett állatmodellt (en. **PostMyocardial Infarction**, PMI) francia kollaborációs partnerünk - Guy Vassort munkacsoportja - állította elő és bocsátotta rendelkezésünkre.

Hímnemű *Wistar* patkányokon (180-220 g) altatást követően (pentobarbital, 60 mg/kg) lélegeztetés mellett, baloldali thoracotomiát végeztek. Az infarktust az *a. coronaria sinistra* - arteria interventricularis anterior ágának proximális helyzetben, egy 7-0 selyemfonallal való elkötésével indukálták. Ugyanezt a műveletet elvégezték a majdani kontrollként szolgáló állatokon (altatás, közben lélegeztetés, feltárás, majd visszavarrás – sham operált patkányok). 24 héttel a műtét után, használtuk fel az állatokat (tetszőleges sorrendben), és a korábban leírt módon egyedi izomrostokat izoláltunk.

IV.2. [Ca²⁺]_i változásainak követéséhez kapcsolódó módszerek

IV.2.1. Egyedi sejten történő fluoreszcens [Ca²⁺]_i mérés

A mérés alapelve, hogy a Ca²⁺-ot kötött és nem kötött fura-2 fluoreszcens festék abszorpciós spektruma eltér. Ha tehát két megfelelő hullámhosszon váltakozva gerjesztjük a festéket tartalmazó mintát, a kétféle gerjesztést követően emittált fénysugarak intenzitásainak hányadosából a minta (a sejt) Ca²⁺ tartalma nM pontossággal kiszámolható, az arány időbeli változásának követéséből pedig az idő függvényében bekövetkező [Ca²⁺]_i-változás mérhető (Grynkiewicz és mtsai., 1985).

A sejtek festékekkel történő feltöltéséhez 15 µl 2 mM fura-2-AM-et (a festék acetoximetilészter formája), 10 µl 4%-os Pluronic® F-127-et (enyhe detergens a festék bejutásának megkönnyítésére) és 4 µl 150 nM-os neostigmin oldatot (Stigmosan; a nem-izom sejtek esetében esetleg, a vázizomsejtek esetében pedig nagy valószínűséggel jelen lévő extracelluláris acetilkolin-észteráz gátlásával a fura-2-AM extracelluláris hasítását előzi meg) használtunk, 2 ml tápoldatban. A töltést 37 °C-on, 5% CO₂ tartalmú atmoszférában, 90 percen át végeztük.

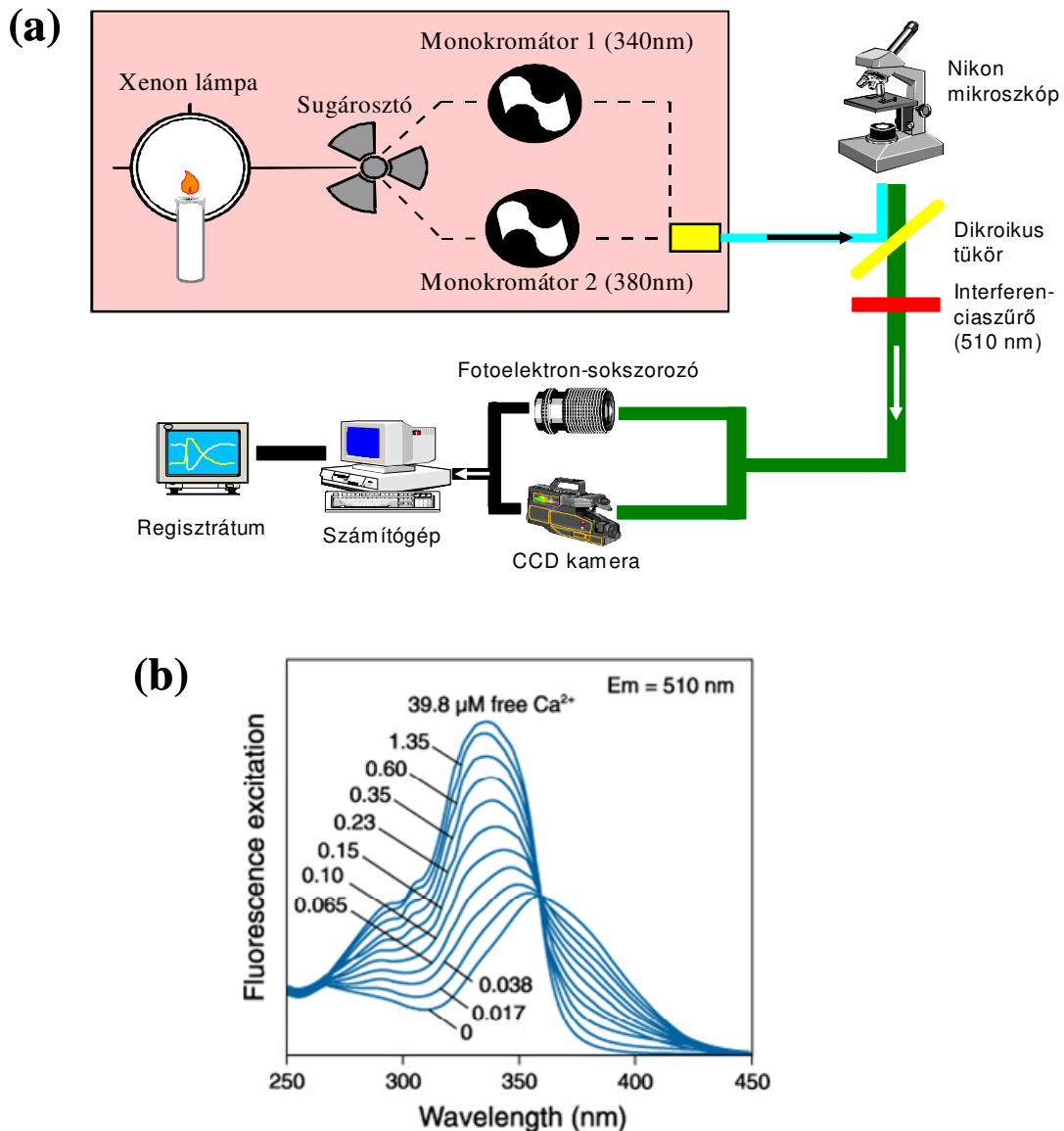
A sejtekbe juttatott festék 340 és 380 nm hullámhosszúságok között váltakozó gerjesztését a Photon Technology International (PTI) DeltaScan™ kettős monokromátoros berendezése biztosította (11./a ábra). Fényforrásként a rendszer xenonlámpája szolgál, melynek fényét egy forgótükrös sugárostó két nyalábra osztja. A keletkező sugarak külön-külön monokromátoron haladnak át, melynek eredménye a méréseinkhez szükséges 340, illetve 380 nm hullámhosszúságú fénynyaláb (11./b ábra). A monokromátorokból optikai szálak vezetik a fényt egy csatoló egységen, valamint egy dikroikus tükrön keresztül a mikroszkóp tárgyasztalán elhelyezett sejtekre. A fura-2 által kibocsátott fluoreszcens fényt 510 nm-en – interferenciaszűrő közbeiktatásával – egy fotonelektron-sokszorozó segítségével detektáltuk. A jeleket 10 Hz gyakorisággal regisztráltuk. A háttérfluoreszcenciát a tárgylemezek sejtmentes helyein mértük, ezt a program automatikusan levonta a mért fluoreszcenciaértékekből.

A két hullámhosszon történő gerjesztés során mért fluoreszcenciaértékek hányadosából ($R = F_{340}/F_{380}$) az irodalomból ismert egyenlet (Grynkiewicz és mtsai., 1985) alapján számítottuk ki az intracelluláris Ca²⁺-koncentrációkat:

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \cdot \beta \cdot (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R) \quad (2)$$

ahol K_d a festék disszociációs állandója, R_{\max} az a fluoreszcenciahányados ahol a festék Ca²⁺-mal telített, R_{\min} az a fluoreszcenciahányados ahol a festék egyáltalán nem köt Ca²⁺-ot, R a mért fluoreszcenciaértékek hányadosa, β a rendszerre jellemző állandó.

A mérőrendszer kalibrálása során nyert adatainkat felhasználva a $K_d=118$ nM, $R_{\min}=0,2045$, $R_{\max}=8,315$ és $\beta=10$ értékeket használtuk a számításokhoz. A tranziens $[Ca^{2+}]_i$ -változások paramétereit (amplitúdó, látencia, a tranziens kialakulásának maximális sebessége, a leszálló szár meredeksége, a csúcs eléréséhez szükséges idő, félértékszélesség) a munkacsoportunk által kifejlesztett számítógépes program (PTIana) segítségével határoztuk meg.



11. ábra. A PTI DeltaScanTM mérőrendszer felépítése **(a)** valamint a fura-2 excitációs spektruma **(b)** 0-39,8 μM szabad Ca^{2+} jelenlétében (www.invitrogen.com nyomán)

A mérés technikai kivitelezése: A festékkel feltöltődött sejteket tartalmazó tárgylemezt perfúziós kádban rögzítettük, a kádat normál HEPES-Tyrode-sóoldattal (137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,5 mM MgCl_2 , 1,8 mM CaCl_2 , 11,8 mM HEPES-NaOH, 1 g/l glükóz, pH=7,4) töltöttük fel, majd egy Nikon invertáló mikroszkóp tárgyasztalára helyeztük. A mérés során végig normál HEPES-Tyrode-t áramoltattunk át a kádon balról jobbra perisztaltikus pumpa segítségével (Econo-pumpTM System), jobb oldalon alkalmazva az elszívást („külső perfúzió”, 3 ml/min). Ezért egy adott tárgylemez sejtjeinek szisztematikus vizsgálatánál a mérést a jobb oldali sejteken kezdtük és balra haladtunk, így a korábbi mérésekkor alkalmazott agonistákat

és antagonistákat nem mostuk rá a később mérendő sejtekre. Egy 250 µm belső átmérőjű perfúziós kapillárist (Perfusion Pencil[®]) az éppen mért sejt közvetlen közelébe állítottunk, ezen adagoltuk a vizsgált oldatot („lokális perfúzió”, Valve BankTM 8 II System, 4 µl/sec), majd az adott mérés befejeztével lokálisan is normál HEPES-Tyrode-oldatot áramoltattunk a szer kimosására.

IV.2.2. A Ca^{2+} -fluxus kiszámítása

Kalciumfluxusként a myoplasmába a külső térből be- és az intracelluláris raktárakból kilépő összes Ca^{2+} fluxusát definiáltuk.

A fluxust (FL) az alábbi képlet szerint határoztuk meg:

$$FL = d(Ca_{tot} + Ca_{transzp}) / dt \quad (3)$$

ahol Ca_{tot} a myoplasmán belüli teljes kalciummennyiség, $Ca_{transzp}$ pedig a kalciumeltávolító mechanizmusok által transzportált Ca^{2+} -mennyiség. Ca_{tot} becsült értékét az előző alfejezetben ismertetett módon meghatározott szabad (Ca_{szabad}), valamint az intracelluláris kötőhelyekhez kötött Ca^{2+} mennyiségének összegeként kaptuk meg, és a modellben a Ca^{2+} -nak a festékhez (Ca_{fura}), a troponin C-hez (Ca_{tropC}), a parvalbuminhoz (Ca_{parv}) és a pumpához (Ca_{pumpa}) való kötődésével számoltunk, számításainkban az irodalomból (Schuhmeier és mtsai., 2003) ismert és konstansnak feltételezett értékeket felhasználva:

$$Ca_{tot} = Ca_{szabad} + (Ca_{fura} + Ca_{tropC} + Ca_{parv} + Ca_{pumpa}) \quad (4)$$

$Ca_{transzp}$ a pillanatnyilag a Ca^{2+} -eltávolító mechanizmusok (pumpák) által szállított kalciummennyiség, melyet arányosnak tekintettünk a pumpák relatív szaturációjával ($[Ca-pumpa]/[pumpa]$), ahol az arányossági tényező nyilvánvalóan a Ca^{2+} -eltávolítás maximális sebessége (PV_{max}):

$$Ca_{transzp} = PV_{max} \cdot ([Ca-pumpa] / [pumpa]) \quad (5)$$

A PV_{max} értékét minden vizsgált sejtre külön meghatároztuk a következő módon. KCl-depolarizációt követő Ca^{2+} -tranzienst lezáró szárára legalább 3 másodperccel a csúcstól való elmozdulást követően exponenciálisan illesztettünk, és mivel ekkor a feszültségfüggő csatornák bizonyosan zártak vagy inaktívak, a görbe ezen szakasza a Ca^{2+} -eltávolító mechanizmusok (pumpák) működését tükrözi. Az így meghatározott PV_{max} értéket használtuk az adott sejten regisztrált bármely későbbi időpillanatban az FL kiszámítására.

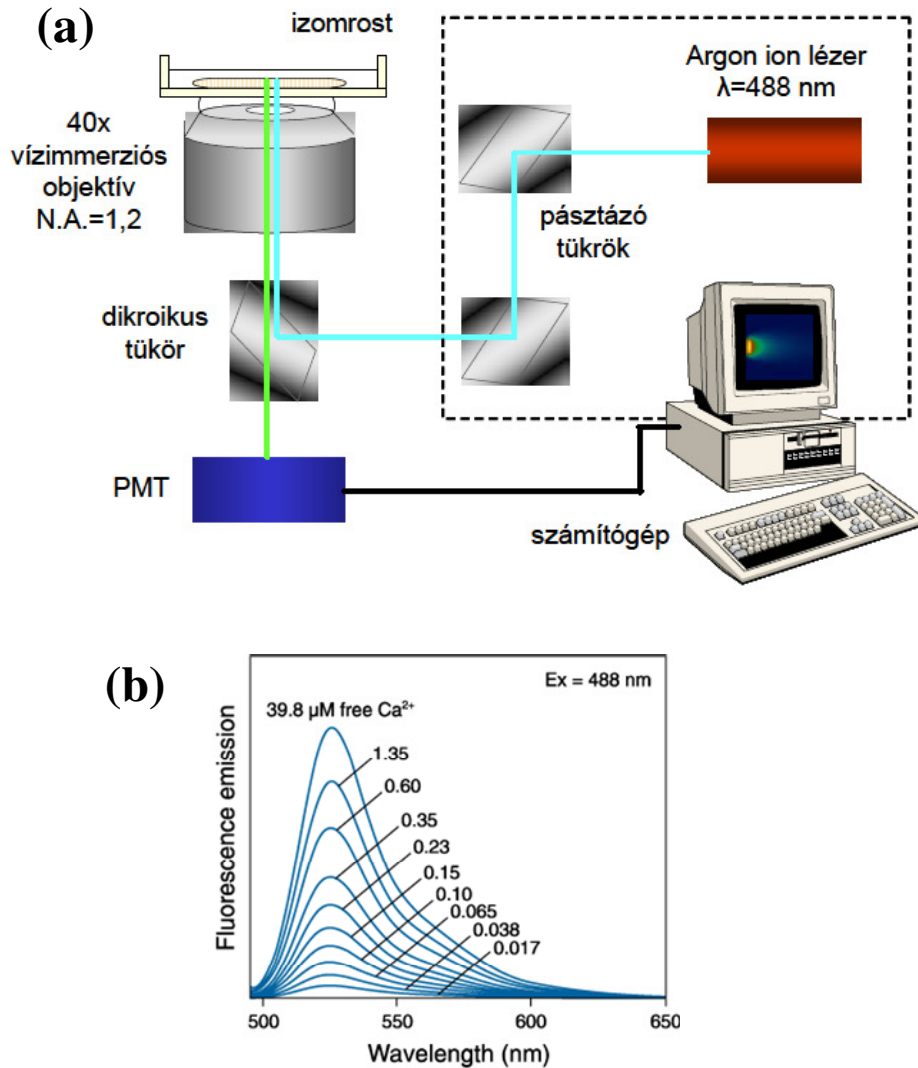
IV.2.3. Vizsgálatok konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal

A konfokális lézer pásztázó mikroszkóp (en. **Confocal Laser Scanning Microscope**, CLSM) olyan tulajdonképpen hagyományos optikai mikroszkópia, amely meg tudta oldani azt a problémát, amelyet az okoz, hogy vastagabb biológiai preparátumokban, szövetekben, sejtekben a különböző, egymáshoz közel lévő rétegek egyszerre, összefolyóan történő leképezése miatt a magasabban, illetve mélyebben fekvő rétegekből érkező információ csökkenti az előállított kép élességét.

A CLSM felépítése miatt csak egy adott keskeny rétegből származó sugarak jutnak a detektorra, és kerülnek leképezésre. Egy féligáteresztő tükrön áthaladó, a mintára fókuszált pásztázó lézersugár által gerjesztett fluoreszcens fény a tér minden irányába emittálódik. Ennek a fénynek a megfelelő irányba haladó részét az objektív lencse összegyűjti, és így az egy féligáteresztő tükör segítségével egy lencsére jut. A lencse fókuszában egy μm nagyságrendbe eső apertúra („pinhole”) van, mely kicsiny lyukon keresztüljutó fény jut a detektorra.

Lézerfény használatának jelentősége abból fakad, hogy a keskeny apertúrán áthaladó fény intenzitása legyengül, azonban a lézerfény intenzitása még ekkor is elegendő ahhoz, hogy elektronikusan észlelhető jelet kapjunk. A mintának a fókuszsíkon kívül eső rétegekből kiinduló fény ebben a rendszerben nem jut el a detektorig, ugyanis nem jut át az apertúrán. A leképezési réteg egyes pontjaiból jövő információ begyűjtését a CLSM pásztázó (scanning) rendszere teszi lehetővé (12. ábra).

Vizsgálatainkban a *Zeiss LSM 510 META* pásztázó lézer mikroszkópot használtuk a fluo-3 fluoreszcens festékkel feltöltött sejtek monitorozására. A Ca^{2+} -koncentráció változásakor és a Ca^{2+} megkötésekor a festék fluoreszcenciája fokozódik, így az, mint fényintenzitás-növekedés detektálható. A fluo-3 festéket egy argonion lézerrel gerjesztettük (488 nm-en, 5% lézerintenzitással) (12./b ábra), majd az emittált fényt szűrőkön keresztül összegyűjtöttük és 12 biten digitalizáltuk.



12. ábra. A CLSM felépítése (a) valamint a fluo-3 emissziós spektruma (b). Ca^{2+} -mentes oldatban a spektrum elkülöníthetetlen az alapfluoreszcenciától (www.invitrogen.com nyomán)

A normalizált fluoreszcenciaintenzitást vonalmenti pásztázás („line scan imaging”), illetve kétdimenziós (x,y) leképezéses módszerrel vizsgáltuk és jelenítettük meg.

A line scan imaging során a fluoreszcencia intenzitást $F(x,t)$ az eltelt idő (t) és a kiválasztott vizsgált vonal 0 kezdőpontjától való távolság (x) függvényeként ábrázoltuk. A mért értékeket normalizált $F(x,t)/F_0(x)$ fluoreszcencia intenzitásként jelenítettük meg, ahol $F_0(x)$ az alapfluoreszcencia intenzitás, melyet az $F(x,t_1-t_2)$ olyan időintervallumban végzett átlagolásával nyertünk, ahol a vizsgált t_1-t_2 időszak alatt nem volt semmilyen intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációt érintő esemény. Vizsgálórendszerünk a vizsgált vonal mentén lévő pontok fluoreszcenciaintenzitását 2 $\mu\text{sec}/\text{pixel}$ sebességgel pásztázza végig (a pásztázás időtartama a

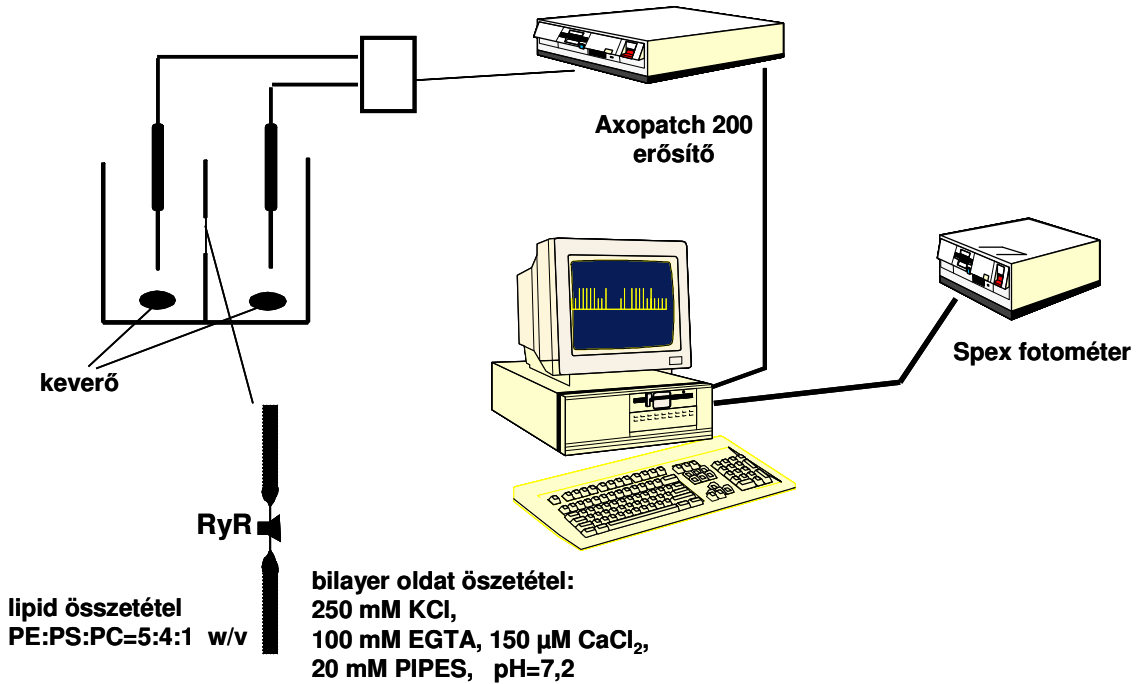
vonallal függ, 512 pixel/line, 0,142 μm pixel méret), majd a vonal újabb végigpásztázását 1,54 ms után kezdi újra el.

Kétdimenziós leképezés esetében a pásztázó rendszer végigpásztázza a sejtet reprezentáló pixeleket, és az egyes fluoreszcenciaintenzitásokat x-y koordináta-rendszerben ábrázolja, azaz a sejt fluoreszcenciaintenzitásának elvileg egy adott pillanatban (gyakorlatilag a „pillanat” a pásztázás időtartamával megegyező hosszúságú, az 512×512 pixel nagyságú képek esetén 500-600 ms) meglévő kétdimenziós képét kapjuk. A kép megjelenítését a számítógép különböző színintenzitással végzi, amely az adott pixelben mért Ca^{2+} -koncentrációval, és a festékmolekulák számával arányos.

A számítógépes program működése: A *sparkok* detektálását számítógépes program segítségével végezzük, amely automatikusan lokalizálja az eseményeket, és meghatározza az események nagyságát, minden emberi beavatkozás nélkül. Az alkalmazott algoritmus stratégiája, hogy kiszűri az alaplazaj meghaladó jeleket. Egyedülálló *spark* vizsgálatánál az alapfluoreszcenciától eltérő fluoreszcenciaérték adódik. Ezeket a területeket a program kivágja a felvett képből, és a megmaradt alaplazaj fluoreszcenciája újra statisztikai értékelés alá kerül. Végül a *sparkok* az alaplazajhoz viszonyított nagyságuk alapján osztályozzuk. Az alkalmazott algoritmus teljesen automatizált, az egyetlen paraméter, amelyet meg kell adnunk, az a küszöbérték, amely felett eseményről van szó (méréseinkben a *sparkok* esetén ez az érték 0,2 $\Delta F/F_0$ volt, míg *emberök* esetén 0,05 $\Delta F/F_0$). A következő lépésben a kép normalizálása következik, ami a felvett képek fluoreszcenciájának átlagolásával történik úgy, hogy a jelenlévő *sparkok* elfedjük, így az alap-fluoreszcenciaérték meghatározható. Az események detektálásánál a *sparkok* pixeleket lokalizáltak, és itt a normalizált fluoreszcenciaérték nagyobb a kritériumnál. A *sparkok* analízisa során meghatározandó az amplitúdó, FWHM (a fluoreszcencia emelkedés térbeli kiterjedése), az FDHM (a fluoreszcencia emelkedés időbeli kiterjedése), a csúcs eléréséhez szükséges idő.

IV.3. A lipidkettősréteg-technika

Méréseink egy részét mesterséges lipidkettősrétegbe („*lipid bilayer*”) épített RyR1-en végeztük, feszültség-clamp körülmények között. Ez a módszer („single-channel” módszer) egyetlen izolált RyR-on folyó áram mérését teszi lehetővé úgy, hogy közben a csatorna működése a natív környezetben lévő csatornához nagyon hasonló marad, illetve maradhat (13. ábra).



13. ábra. A lipid bilayer mérőrendszer

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 RyR1-szuszpenziót adtunk. Ezt az oldalt cytoplasmaticus (*cis*) oldalnak nevezzük, mert a csatorna általában úgy épül be, hogy erre néz a cytoplasmaticus „láb” régiója, amely fiziológiás körülmények között közvetlen kapcsolatba lép a DHPR-ral. A másik oldal (*trans*) – amibe a földelektrod 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. A RyR orientációjának megállapításához a *cis* oldal szabad Ca²⁺-koncentrációját EGTA-val 238 nM-ra csökkentettük. A mérések végén a *cis* oldalra rianodint adunk, hogy a beépülés orientációját még egyszer ellenőrizzük. Fontos körülmény, hogy a RyR kalciumcsatorna, azaz fiziológiásan Ca²⁺ áramlik át rajta, ugyanakkor két modulációs kalciumkötőhellyel is rendelkezik. Ezért méréseinkben töltéshordozóként Ca²⁺ helyett K⁺ iont alkalmaztunk, hogy a Ca²⁺ modulációs hatásai ne zavarják méréseinket. A csatorna aktivitásának mérése közben lipid bilayer két oldala között 40-80 mV potenciálkülönbséget tartottunk fenn. Annak érdekében, hogy a beépült RyR orientációját ellenőrizzük, vagy a *cis* oldal szabad Ca²⁺-

koncentrációját csökkentettük EGTA-val 238 nM-ra, vagy a mérések végén a *cis* oldalra rianodint adtunk.

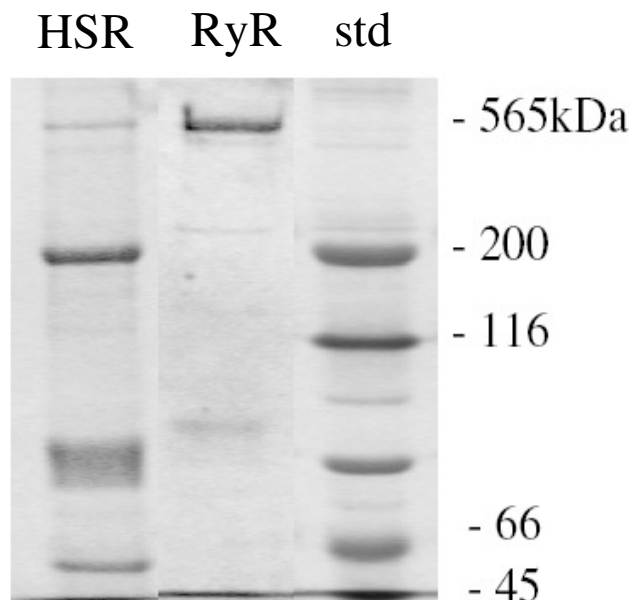
A membránon átfolyó áramot Axopatch 200 erősítővel mértük, majd 8 pólusú aluláteresztő Bessel szűrővel szűrtük ($f_{CO}=1$ kHz). Az elektromos jeleket 3 kHz-es mintavételi frekvenciával digitalizáltuk, és számítógépen tároltuk. A mérések során kapott rekordokat pCLAMP 6.02 programmal analizáltuk. Az izolált csatornás méréseket 22 ± 1 °C-on végeztük. A szabad Ca^{2+} -koncentrációt a Fabiato által készített abszolút 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 áramamplitúdó eloszlást Origin program segítségével vizsgáltuk.

IV.3.1. SR-vezikula preparálása emlős vázizomból

A 2,5-3 kg-os Új-zélandi fehér nyulakat intravénásan adott Nembutallal altattuk, majd dekapitáltuk. A *musculus longissimus dorsi*t kimetszettük, apróra vágtuk, és a kiindulási izomtömegre számított tízszeres térfogatú pufferben (105 mM NaCl, 0,5 mM EGTA, 20 mM Na-HEPES, pH=7,5) késes Waring-Blendor homogenizátorral 6x25 másodpercig 4 °C-on homogenizáltuk. A preparálás során használt oldatokhoz a proteolízis elkerülése céljából az alábbi inhibitorokat adtuk: 200 μ M Pefabloc, 100 nM Aprotinin, 1 μ M Leupeptin, 1 μ M Pepstatin A és 1 mM Benzamidin. A homogenizátumból centrifugálással (4500 g, 25 perc) eltávolítottuk az alakos elemeket, majd a felülúszó 30 percig tartó, 40000 g-s centrifugálásával nyert nyers mikroszómafrakcióból magas káliumtartalmú (600 mM KCl, 10 mM K-PIPES, 250 mM szacharóz, 0,1 mM EGTA, 90 μ M $CaCl_2$) pufferrel (pH=7,0) kioldottuk az akto-miozint. Egy óra inkubálás után 109000 g-s, 30 perces centrifugálással összegyűjtöttük a mikroszóma-frakciót (az oldott akto-miozin a felülúszóban maradt). Az üledéket 42 mM NaCl, 4 mM K-PIPES és 120 mM szacharózt tartalmazó oldatban (pH=7,0) reszuszpendáltuk, majd lineáris (25-45%) szacharóz-grádiensre vittük fel. A 16 órás, 86000 g-s centrifugálás után a gradiens 36-38%-os régiójában világos gyűrűként megjelenő nehéz-SR (en. **H**heavy **S**arcoplasmic **R**eticulum, HSR) vezikulákat összegyűjtöttük, és potterrel homogenizáltuk. (A HSR vezikula fölött megjelenő diffúz régió a Ca^{2+} -pumpát tartalmazó LSR vezikula frakció.) Az összegyűjtött vezikulafrakcióhoz kétszerannyi térfogatú puffert (42 mM NaCl, 4 mM K-PIPES és 120 mM szacharóz) adtunk, és újból lecentrifugáltuk (60 perc, 124000 g). A centrifugálás után a pelletet 300 mM szacharózt és 10 mM K-PIPES-t tartalmazó (pH=7,0) pufferben reszuszpendáltuk, és azonnal lefagyasztottuk cseppfolyós nitrogénben, majd -70 °C-on tároltuk további felhasználásig.

IV.3.2. A rianodinreceptor izolálása

A rianodinreceptor-komplexeket az SR membránjából 3 ml HSR vezikula-oldat és 6 ml 1% detergenst tartalmazó szolubilizáló oldat (1 M NaCl, 100 μ M EGTA, 150 μ M CaCl₂, 5 mM AMP, 5 mg/ml foszfatidil-kolin, 20 mM Na-PIPES, 1 mM dithiothreitol, pH= 7,2) felhasználásával oldottuk ki (2 óra, 4°C). A szolubilizációs oldat a detergensen kívül a HSR vezikula preparálása során alkalmazott proteáz inhibitorok mellett még 1 μ M Calpain I és 1 μ M Calpain II inhibitor is tartalmazott. A szolubilizációs elegy (9 ml) összeállítását követően a minta egy részét (3 ml-t) [³H] rianodinnal (3 nM) jelöltük. A minták (jelölt és nem jelölt) inkubálását (2 óra, 4°C) követően a nem szolubilizált fehérjéket centrifugálással eltávolítottuk (20 perc, 59000 g). A szupernatánst (3-3 ml) lineáris (10-28%) szacharóz gradiensre vittük fel és kilendülő rotorban (Beckman SW-27) centrifugáltuk. A 16 órás, 90000 g-n történő centrifugálás után a gradiensekből 15 cseppest (~500 μ l) frakciókat szedtünk. Az egyes frakciók radioaktivitását folyadék-szcintillátorral meghatároztuk ([³H]-rianodinnal jelölt minta) és megmértük a hozzájuk tartozó törésmutatót. A beütésszámcsúcs alapján megállapítottuk, hogy melyik 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 centrifugálás során a RyR feldúsult.



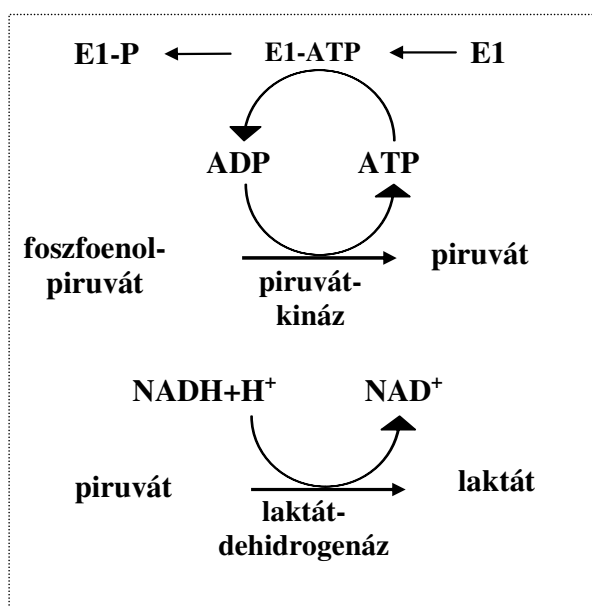
14. ábra. A RyR jelenlétének ellenőrzése PAGE gélen

Az így azonosított frakciókból vett mintákat 10%-os poliakrilamid gélen futtattuk és Comassie-blue-val festettük (14. ábra). A festődés denzitása szemikvantitatív információt ad a gélen lévő fehérje mennyiségéről (lásd az 565 kDa magasságában megjelenő RyR-nek megfelelő sávot), és az esetleges szennyeződés (főleg akto-miozin szennyeződés) mértékéről.

IV.3.3. A Ca^{2+} -pumpa aktivitásának mérése „kapcsolt enzim-assay” módszerrel

A nyúl vázizomból izolált könnyű SR vezikulák membránja döntően Ca^{2+} -ATPáz molekulákat tartalmaz (~80%). A pumpa aktivációját piruvát-kináz „kapcsolt enzim-assay” (Karon és mtsai., 1995) technikával mértük úgy, hogy 37 °C-on, 334 nm-es hullámhosszon követve a NADH fogyást meghatároztuk a Ca^{2+} -ATPáz aktivitását. A módszer elve, hogy a pumpa működése során ATP-t hasít, melyből ADP keletkezik. ADP jelenlétében a foszfoenol-piruvát piruváttá alakul piruvát-kináz enzim segítségével. Egy következő reakcióban a piruvátból laktát-dehidrogenáz révén laktát lesz, miközben NADH-ból NAD^+ keletkezik (lásd 15. ábra).

A NADH fogyásának detektálása fotométerrel történik a 334 nm-en bekövetkező abszorbancia változás alapján, mert a NADH és a NAD moláris extinkciós koefficiense között egy nagyságrend eltérés van, így az ATP-áz aktivitása a kapott görbe meredekségéből állapítható meg. Ha a térfogatot ml-ben mérjük, a fényút hossza 1 cm és a fehérje koncentráció 0,01 mg/ml, akkor az extinkciós koefficiens $6,18 \times 10^3$ l / mol•cm.



15. 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.

A kísérletek során két törzsoldatot alkalmaztunk (I-es és II-es), az összetételük a következő volt: 100 mM KCl, 0,5 mM MgCl - a megfelelő ionmilió megteremtése végett – 20 mM Tris-HCl - az állandó pH=7,5 értéket biztosítandó - 0,42 mM foszfoenol-piruvát, 0,2 mM NADH, 7,5 U/ml piruvát-kináz, 18 U/ml laktát-dehidrogenáz. Csak az I-es oldathoz adagoltunk 0,9 mM CaCl₂-t és 2 μM A23187 ionofort, mely utóbbi beépülve az SR-vezikula membránjában engedi „kifolyani” a Ca²⁺-t a vezikulákból, így megakadályozza, hogy a magas luminális Ca²⁺-szint a végtermékgátlás útján csökkentse a pumpa működésének sebességét. Csak a II-es oldat tartalmazott 1 mM K₂H₂ EGTA-t és 10 mM ATP-t.

A mérés során az I-es törzsoldat 1 ml-ét az SR-vezikula szuszpenzióval (a –70°C-on tárolt LSR-vezikula frakciót ötvenszeresére hígítottuk, majd ebből annyi adódott a 2 ml reakcióelegyhez, hogy a küvettában levő fehérje végkoncentrációja 10 μg legyen) és a vizsgált anyag megfelelő mennyiségével mértük össze. Ezt az elegyet 1 percre előinkubáltuk 37 °C-on, és végül 1 ml II-es oldat hozzáadásával indult a reakció. A Ca²⁺-függő aktivitást az 5 μM tapszigargin (a SERCA pumpa széles körben elterjedt gátlószere) jelenlétében mért („bazális”) aktivitás és a teljes aktivitás különbség adta meg. A TPEN-t az aktivitásmérés megkezdése előtt 5 perccel adtuk a vezikulához. A mérések során a Ca²⁺- és EGTA-koncentráció úgy volt beállítva, hogy a szabad Ca²⁺-koncentráció (~2 μM) a SERCA maximális aktivitását biztosítsa. A fenolszármazékokat dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottuk fel, amelynek koncentrációja nem haladta meg a 2%-ot. Az aktivitás értékeit standard nemzetközi egységben határoztuk meg, ami μmol P_i/mg protein×min. aktivitásegységet jelent.

A kapott pontokra Hill-függvényt illesztettünk:

$$\text{ATPáz aktivitás} / \text{ATPáz aktivitás}_{\max} = 1 - [\text{Ca}^{2+}]^n / ([\text{IC}_{50}]^n + [\text{Ca}^{2+}]^n), \quad (6)$$

ahol: az ATPáz-aktivitás a SERCA-aktivitásnak felel meg, az ATPáz aktivitás_{max} a maximális aktivitásnak, az IC₅₀ a félhatásos gátló dózis koncentrációja, n pedig a Hill-koefficiens.

IV.4. Statisztikai elemzés

A statisztikai analízis során átlagértékeket és azok standard hibáit határoztuk meg, a szövegben és az ábrákon ezek mindig átlag±S.E.M.-ként (en. Standard Error of the Mean, az átlag standard hibája) vannak feltüntetve. Kísérleti adatok csoportjainak összehasonlításához Student-féle T-próbát használtunk (SigmaPlot[®] 9.0), szignifikáns különbséget p<0,05 esetén állapítottunk meg.

IV.5. A használt vegyszerek és eszközök kereskedelmi forgalmazói

A23187	<i>AppliChem</i> ¹	Leupeptin	<i>Sigma</i> ¹⁶
ADP	<i>Sigma</i> ¹⁶	MgCl ₂	<i>Sigma</i> ¹⁶
Aprotinin	<i>Sigma</i> ¹⁶	MgSO ₄	<i>Sigma</i> ¹⁶
AMP	<i>Sigma</i> ¹⁶	Na-PIPES	<i>Sigma</i> ¹⁶
ATP	<i>Sigma</i> ¹⁶	Na-foszfokreatin	<i>Sigma</i> ¹⁶
Axopatch 200A erősítő	<i>Axon</i> ³	Na ₂ ATP	<i>Sigma</i> ¹⁶
Beckman SW27 centrifuga	<i>Beckman</i>	NaCl	<i>Sigma</i> ¹⁶
	<i>Coulter Inc.</i> ⁴	NaOH	<i>Sigma</i> ¹⁶
Benzamidin	<i>Sigma</i> ¹⁶	Na-PIPES	<i>Sigma</i> ¹⁶
CaCl ₂	<i>Sigma</i> ¹⁶	Nembutal	<i>Sanofi</i> ¹⁵
Calpain	<i>Sigma</i> ¹⁶	Nikon Eclipse E600	
CHAPS	<i>Sigma</i> ¹⁶	fluoreszcens mikroszkóp	<i>Nikon</i> ¹²
Commase Blue	<i>Invitrogen</i> ⁹	Origin szoftver	<i>Microcal Co. Software</i> ¹⁰
DeltaScan®	<i>PTI</i> ¹⁴	PC	<i>Sigma</i> ¹⁶
dextran	<i>Sigma</i> ¹⁶	pCLAMP 6.02 szoftver	<i>Axon</i> ³
DMEM	<i>Sigma</i> ¹⁶	Pefabloc	<i>Sigma</i> ¹⁶
DMSO	<i>Sigma</i> ¹⁶	penicillin	<i>Biogal</i> ⁵
Econo-pump	<i>Bio-Rad</i> ⁶	pentobarbitál	<i>Sigma</i> ¹⁶
EDPA	<i>Sigma</i> ¹⁶	pepstatin	<i>Sigma</i> ¹⁶
EGTA	<i>Sigma</i> ¹⁶	Perfusion Pencil®	<i>AutoMate</i> ²
Éter	<i>Sigma</i> ¹⁶	Pluronic® F-127	<i>Sigma</i> ¹⁶
FCS	<i>Sigma</i> ¹⁶	SigmaPlot® 9.0 szoftver	<i>Systat</i> ¹⁷
fluo-3 Mol.	<i>Probes</i> ¹¹	Stigmosan	<i>Pharma-Magist</i> ¹³
Fungizone	<i>Biogal</i> ⁵	streptomycin	<i>Biogal</i> ⁵
fura-2-A	<i>Mol. Probes</i> ¹¹	szacharóz	<i>Sigma</i> ¹⁶
glükóz	<i>Sigma</i> ¹⁶	szaponin	<i>Sigma</i> ¹⁶
HEPES	<i>Sigma</i> ¹⁶	tripszin	<i>Difco</i> ⁸
HS	<i>Sigma</i> ¹⁶	TPEN	<i>Sigma</i> ¹⁶
KCl	<i>Sigma</i> ¹⁶	Tris-HCl	<i>Sigma</i> ¹⁶
KH ₂ PO ₄	<i>Sigma</i> ¹⁶	Valve Bank™ 8 II System	<i>AutoMate</i> ²
K ₂ SO ₄	<i>Sigma</i> ¹⁶	Waring Blendor homogenizátor	<i>Cole-Parmer</i> ⁷
K-glutamát	<i>Sigma</i> ¹⁶	Zeiss LSM 510 META konfokális	
K-PIPES	<i>Sigma</i> ¹⁶	lézer pásztázó mikroszkóp	<i>Zeiss</i> ¹⁸
kollagenáz I	<i>Sigma</i> ¹⁶	ZnSO ₄	<i>Sigma</i> ¹⁶

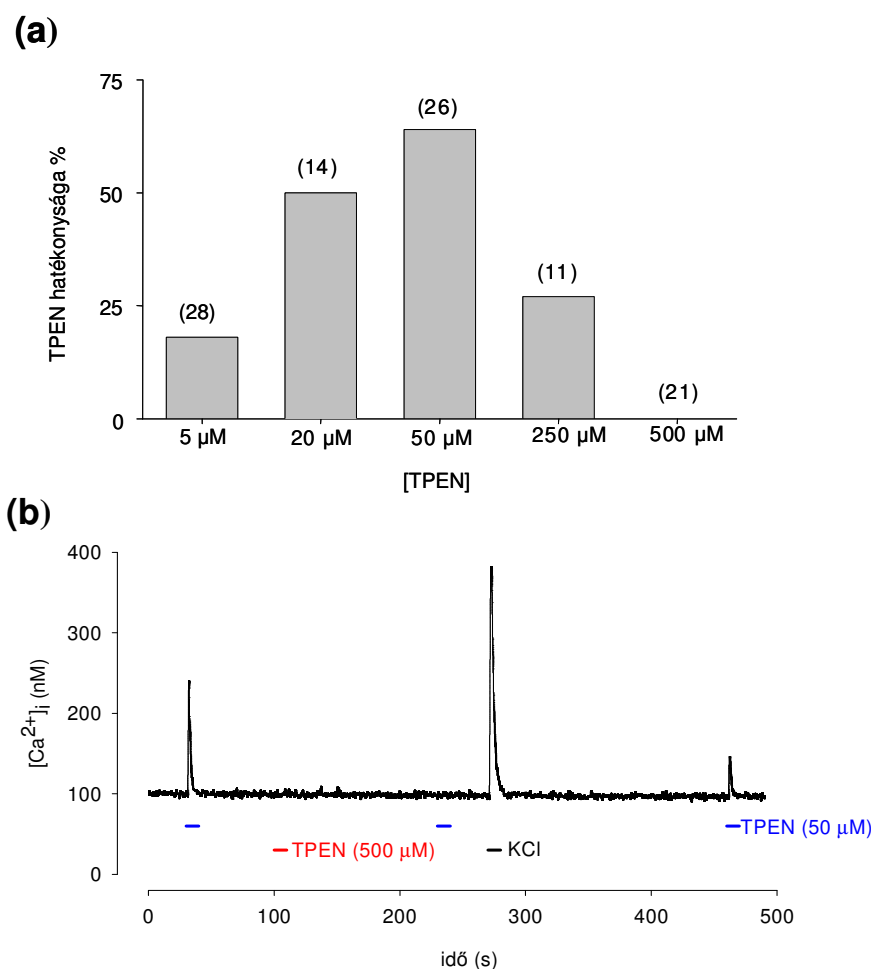
¹**AppliChem GMBH**, Darmstadt, Németország; ²**AutoMate Scientific**, San Francisco, CA, USA; ³**Axon Instruments**, Foster City, CA, USA; ⁴**Beckman Coulter Inc.**, Fullerton, California, USA; ⁵**Biogal-TEVA**, Debrecen, Magyarország; ⁶**Bio-Rad Laboratories**, Hercules, CA, USA; ⁷**Cole-Parmer Instrument Company**, Vernon Hills, IL, USA; ⁸**Difco**, Detroit, MI, USA; ⁹**Invitrogen**, Paisley, Nagy-Britannia; ¹⁰**Microcal Co. Software**, Northampton, MA, USA; ¹¹**Molecular Probes-Invitrogen**, Paisley, Nagy-Britannia; ¹²**Nikon**, Tokió, Japán; ¹³**Pharma-Magist**, Budapest, Magyarország; ¹⁴**Photon Technology International (PTI)**, Birmingham, NJ, USA; ¹⁵**Sanofi Phylaxia**, Budapest, Magyarország; ¹⁶**Sigma-Aldrich**, St. Louis, MO, USA; ¹⁷**Systat Software**, Point Richmond, CA, USA; ¹⁸**Zeiss AG**, Oberkochen, Németország.

V. Eredmények

V.1. A TPEN hatásának tanulmányozása C2C12 egér myoblast sejtvonalon

V.1.1. Eltérő TPEN-koncentrációk hatékonyságának vizsgálata

A C2C12 sejtvonal vizsgálatát 7-9 napos fejlett izomcsöveken (lásd 10. ábra) a TPEN hatékonyság-görbéjének meghatározásával kezdtük (16.a ábra), hogy megtudjuk, milyen TPEN-koncentráció vált ki maximális választ.



16. ábra. TPEN hatékonyságának vizsgálata C2C12 sejteken

(a) A zárójelben jelzett sejtek számának százaléka, amelyek a különböző TPEN-koncentrációk használatát követően, spontán kialakuló Ca^{2+} -tranzienst válaszoltak. **(b)** Egy reprezentatív görbe az alacsony (50 μM), illetve magas (500 μM) TPEN koncentráció hatásának illusztrálásaként. A görbe a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tranziens változásait mutatja 50, valamint 500 μM TPEN 10 s-ig és 100 mM KCl 10 s-ig történt extracelluláris alkalmazása során.

A sejtek válaszkészségét minden esetben a maximálisan hatékonynak talált 100 mM KCl-al végeztük.

5 μM -os koncentrációban alkalmazva a TPEN 28-ből 5 sejten (18%), míg 20 μM -os koncentrációban 14-ből 7 sejten (50%) okozott spontán tranziens $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -emelkedést. A 16.a ábrából jól látható, hogy növelve a TPEN-koncentrációt a kiváltott Ca^{2+} -tranziensek

amplitúdói párhuzamosan, monoton növekedést mutattak egy adott koncentrációig (~50 μM , amely a leghatásosabbnak bizonyult). Ezen koncentrációnál 14-ből 9 sejt (64%), illetve 26 kísérletből 15 alkalommal (58%) a TPEN adagolása tranziens $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -emelkedést eredményezett. Megjegyzendő, hogy a sejtek válaszkészsége változó volt. Bizonyos sejtek többször, egymást követően válaszoltak a szer adagolását követően, míg más esetekben a válasz teljesen elmaradt (16./b ábra). Ezen megfigyelések nem hozhatók összefüggésbe a nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]$ -val, amely a kísérletek elején minden esetben rögzítésre került, és 75-100 nM közötti értéknek adódott.

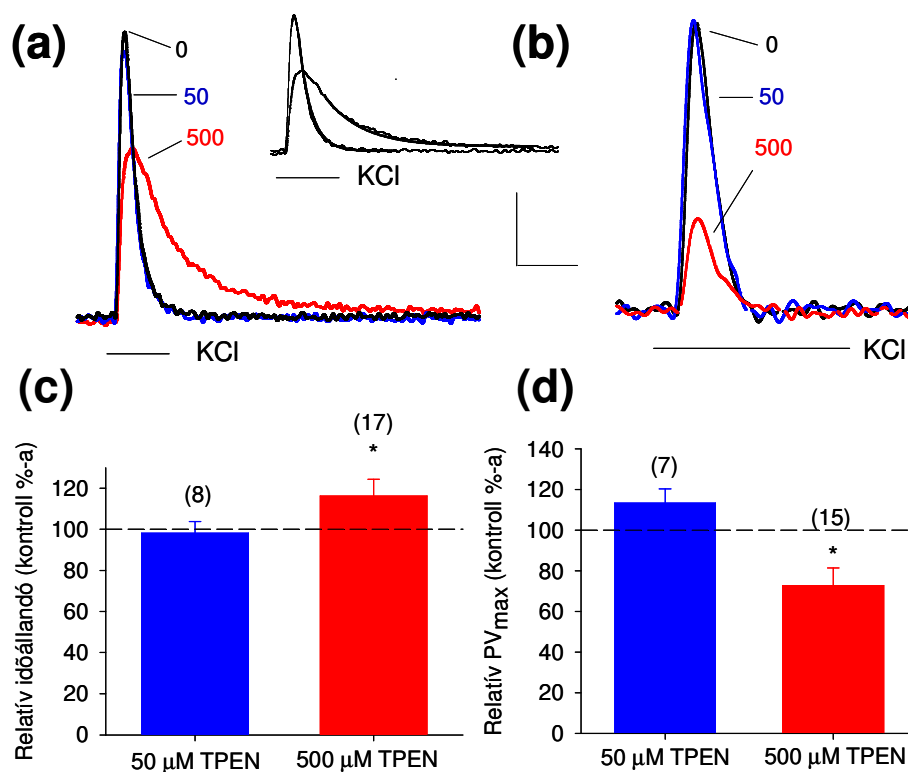
Egy nagyságrenddel nagyobb koncentrációban alkalmazva a szert (500 μM) a 13 vizsgált sejten mind a 21 próbálkozás hatástalannak bizonyult. Természetesen a hatás elmaradása önmagában nem feltétlenül jelenti azt, hogy 500 μM TPEN használata nem befolyásolja valamilyen módon a sejtek Ca^{2+} -homeosztázisát (részleteket lásd később).

A továbbiakban kiszámoltuk az 50 μM TPEN által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek kalciumfluxusát (FL), mely $58 \pm 11 \mu\text{Ms}^{-1}$ -nek adódott ($n=11$). Összehasonlításként, 100 mM KCl által kiváltott Ca^{2+} -fluxus ugyanazon a sejten szignifikánsan nagyobb volt ($210 \pm 45 \mu\text{Ms}^{-1}$).

V.1.2. TPEN hatása a Ca^{2+} myoplasmából való eltávolítására

Következő lépésként az SR Ca^{2+} -pumpa hatékonyságát a nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ helyreállításában kívántuk megvizsgálni. Ennek érdekében a Ca^{2+} -tranziensek leszálló szárának meredekségéből az időállandók meghatározásával kiszámoltuk a pumpa Ca^{2+} -transzport képességét. Mindezt a 17./a ábrán három reprezentatív, 0, 50 és 500 μM TPEN jelenlétében, depolarizáció által indukált (100 mM KCl) Ca^{2+} -tranziens ábrázolásával kívánjuk bemutatni. Amint az ábrán is jól látható, 500 μM TPEN jelenlétében két paraméter is változott: csökkent a tranziens amplitúdója, és lelassult a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ visszatérése a nyugalmi szintre. Minden bizonnyal ez utóbbiért az alacsonyabb fluxusérték a felelős.

A fluxus kiszámításához használt maximális Ca^{2+} -eltávolítási sebesség (PV_{max}) értékek rendre 585, 634 és 343 μMs^{-1} -nek adódtak. Mivel számszerűsíteni szeretnénk volna e változásokat, exponenciális függvényt illesztettünk a KCl-indukált tranziensek leszálló szárához és meghatároztuk az időállandókat (τ).



17. ábra. Módosult Ca²⁺-felszabadulás és eltávolítási mechanizmusok TPEN jelenlétében

(a) három reprezentatív, 10 s hosszan adagolt, 100 mM KCl alkalmazásával kiváltott depolarizáció hatására kialakult transziens, 0, 50, illetve 500 µM TPEN jelenlétében. A görbék egymásra lettek csúsztatva, hogy a nyugalmi Ca²⁺-szintek egy közös vonalon legyenek, az amplitúdó és az időállandók jobb összehasonlítása érdekében. Az *inzer*tben egyedi exponenciális függvények illesztése látható a Ca²⁺-transziensek leszállószárához 0, illetve 500 µM TPEN-ben. Az időállandók 2,27 és 4,99 s-nek adódtak. (b) Az ábra (a) részén bemutatott transzienseknek megfelelő Ca²⁺-fluxus. (c) Az időállandók és (d) a PV_{max} összesített adatai 50, illetve 500 µM TPEN jelenlétében. A vízszintes, szaggatott vonal mindkét esetben a TPEN adagolása előtt kapott kontroll transziens 100%-os értékét jelképezi. A zárójelekben az elvégzett kísérletek száma látható, míg a csillag (*) az adott paraméternek a kontroll 100%-tól való szignifikáns eltérését jelzi.

TPEN hiányában az időállandó $3,38 \pm 0,28$ -nak adódott (n=17), mely érték hasonló volt 50 µM TPEN jelenlétében. Magasabb TPEN-koncentráció használatát követően (500 µM) azt találtuk, hogy a relatív időállandó jelentősen megnőtt (17/c ábra). Az ábra d része az alacsony (50 µM), illetve magas (500 µM) TPEN-koncentráció hatását hivatott bemutatni a myoplasmából való Ca²⁺-eltávolítás mechanizmusára. Ennek érdekében a KCl-depolarizációt

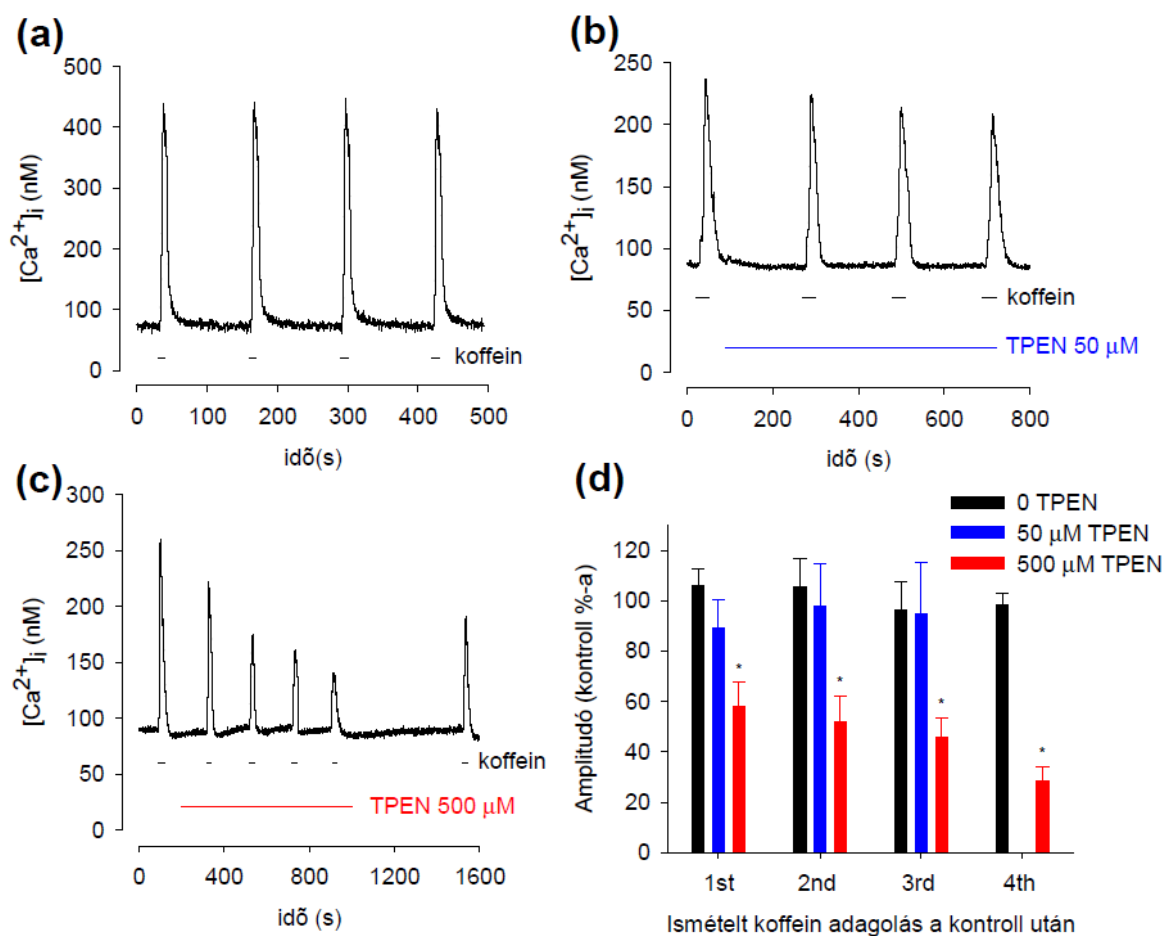
követő Ca^{2+} -tranzienst lezárási időszakra legalább 3 másodperccel a csúcst elérését követően exponenciálisan illesztettük. Az így meghatározott PV_{max} érték TPEN hiányában $444 \pm 83 \mu\text{Ms}^{-1}$ -nak adódott ($n=10$). A normalizált PV_{max} érték $50 \mu\text{M}$ TPEN adagolását követően enyhén emelkedett ($113,5 \pm 6,9\%$, $n=7$) a kontrollhoz képest, míg $500 \mu\text{M}$ szer jelenlétében erőteljes gátlás jelentkezett, és a relatív PV_{max} érték lecsökkent a kontroll $72,8 \pm 8,6\%$ -ra ($n=15$) (17./d ábra).

V.1.3. Koffein és KCl-depolarizáció hatásának vizsgálata TPEN jelenlétében

A fentiek alapján úgy tűnt, hogy a TPEN magas koncentrációban alkalmazva nemcsak a Ca^{2+} -eltávolítási mechanizmust módosítja, de a depolarizáció-indukált Ca^{2+} -tranzienst amplitúdóját és az annak megfelelő fluxust is (17./a és b ábra). Ezért ezt a tényezőt tovább kívántuk vizsgálni, és az agonista-, illetve a depolarizáció-indukált Ca^{2+} -tranzienst elemeltük TPEN jelenlétében (18. ábra és 19. ábra).

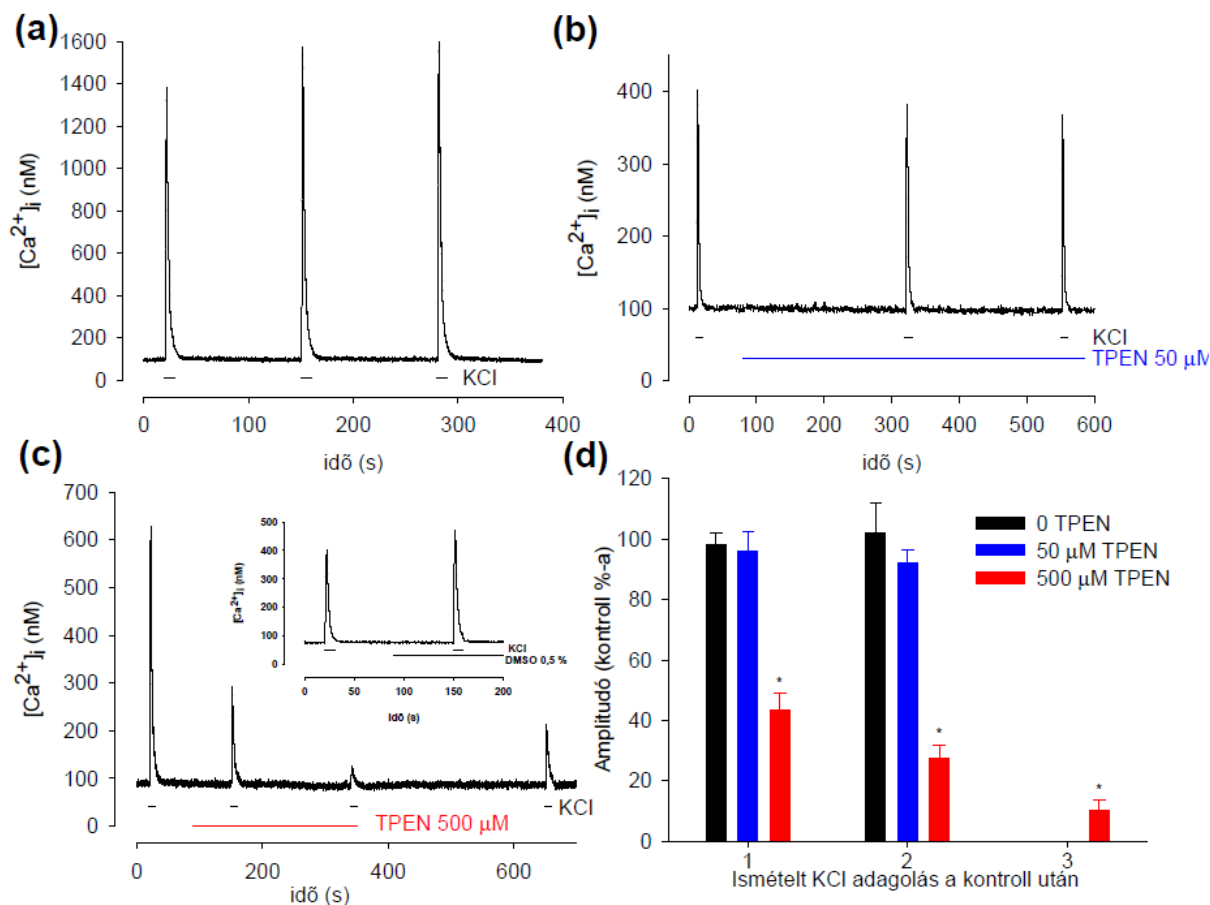
A 18./a és 19./a ábrákon jól látszik, hogy a C2C12 myotubulusokon az ismételt 15 mM koffein, illetve 100 mM KCl adagolása nem deszenzitizáló Ca^{2+} -tranzienst eredményezett. A 18./b, illetve 19./b ábrákból az is megállapítható továbbá, hogy $50 \mu\text{M}$ TPEN nem módosította az agonista, illetve a depolarizáció ágens hatását a RyR receptorkomplex működését tekintve.

Ugyanez viszont nem mondható el az egy nagyságrenddel nagyobb koncentrációban használt TPEN esetén, mivel $500 \mu\text{M}$ TPEN jelentősen lecsökkentette a belső raktárakból felszabaduló Ca^{2+} -mennyiségét (18./c és 19./c ábrák). Megemlítendő, hogy ez a hatás visszafordítható volt a TPEN kimosását követően. A 18./d és 19./d ábrák az összesített adatokat mutatják be több sejt átlagában. Minden esetben a TPEN jelenlétében rögzített amplitúdókat az első, TPEN hiányában rögzített amplitúdóhoz képest határoztuk meg (relatív amplitúdó).



18. ábra. Koffeinadagolás hatása a C2C12 sejtek Ca^{2+} -tranzienzeire TPEN jelenlétében

A reprezentatív görbék a $[Ca^{2+}]_i$ -ban bekövetkező tranziens változásokat mutatják 15 mM koffein 10 s-ig történt extracelluláris, ismételt alkalmazása után: **(a)** TPEN hiányában **(b)** 50 μ M TPEN, valamint **(c)** 500 μ M TPEN jelenlétében. **(d)** Az oszlopdiagramok a koffeinadagolás kiváltotta Ca^{2+} -tranziensek amplitúdóit mutatják be az adott sejten TPEN jelenlétében, az agonista által kiváltott (TPEN hiányában) amplitúdóhoz képest, több sejt (3-5) átlagában. 50 μ M TPEN esetén a 4. koffeinadagolás elmaradt. A csillag (*) a szignifikáns eltérést jelzi.



19. ábra. KCl-depolarizáció hatása a C2C12 izomsejtek Ca^{2+} -tranzienseire TPEN jelenlétében

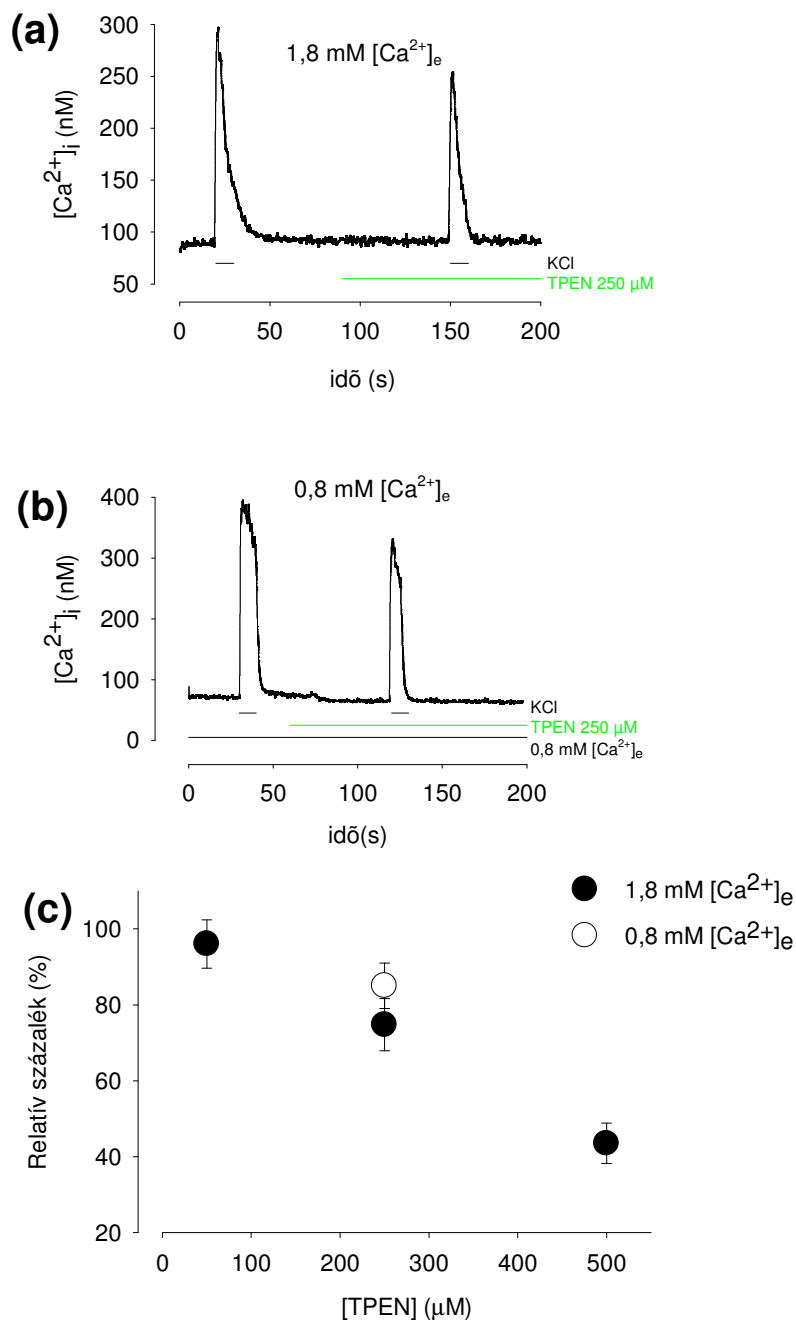
A reprezentatív görbék a $[Ca^{2+}]_i$ -ban bekövetkező tranziens változásokat mutatják 100 mM KCl 10 s-ig történt extracelluláris, ismételt alkalmazása után: **(a)** TPEN hiányában **(b)** 50 μ M TPEN, valamint **(c)** 500 μ M TPEN jelenlétében. Az ábra (c) részén található *inzerter* látható, hogy 0,5% DMSO önmagában nem csökkenti a KCl-indukált Ca^{2+} -tranziensek amplitúdóit. **(d)** Az oszlopdigramok az 1. és 2. KCl-adagolás kiváltotta Ca^{2+} -tranziensek amplitúdóit hasonlítják össze, az adott sejten TPEN hiányában regisztrált tranziensekhez képest, több sejt átlagában (3-10 sejt). A KCl adagolása csak kétszer lett megismételve, 0, illetve 50 μ M TPEN-ben, ugyanis a tranziensek amplitúdói nem mutattak szignifikáns különbséget. A 3. KCl adagolás csak 500 μ M TPEN jelenlétében lett elvégezve. A csillag (*) a szignifikáns eltérést jelzi TPEN hiányában kapott tranziensek esetén (1. és 2. adagolás), illetve a kontroll 100%-ához képest (3. adagolás).

Összegezve e kísérleteink eredményeit elmondhatjuk, hogy 50 μM TPEN nem befolyásolta az agonista-, illetve depolarizáció-indukált Ca^{2+} -tranziensek relatív amplitúdóját. Ezzel szemben 500 μM TPEN drasztikusan lecsökkentette azt (a kontroll 28,3 \pm 5,62%-ára koffein, valamint 10,3 \pm 3,2%-ára KCl esetén). Ez a hatás bizonyítottan nem az oldószer (DMSO) hatásának köszönhető (19./c ábra inzert), ami a kísérleteinkben használt legmagasabb koncentrációban (0,5%) sem okozott szignifikáns eltérést a kontrollhoz képest (1,13 \pm 0,1 vs 1,21 \pm 0,05).

V.1.4. TPEN hatása a KCl-depolarizáció által kiváltott kalciumtranziensek amplitúdójának méretére fiziológiás és alacsony extracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ jelenlétében

Tovább vizsgálva az összes, illetve szabad [TPEN] hatását a C2C12 izomsejteken kíváncsiak voltunk arra, hogy milyen összefüggés van a különböző TPEN-koncentrációk használata és a KCl-depolarizáció által kiváltott tranziensek méretére kifejtett gátló hatás között.

Ezért a következő kísérletsorozatban azt kívántuk megvizsgálni, milyen hatása van a mintegy felére csökkentett extracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]_e$ -nak (1,8 mM-ról 0,8 mM-ra) azonos [TPEN] használata mellett. A 20./a, illetve 20./b ábrán bemutatott kísérletekben az $[\text{Ca}^{2+}]_e$ -t úgy határoztuk meg, hogy az 1,8, valamint 0,8 mM legyen, majd ismételt, 10 s-ig adagolt 100 mM-os KCl-al váltottunk ki Ca^{2+} -tranzienseket. A 20./c ábrán az összesített adatok láthatók, több sejt átlagaként, amelyek azt bizonyítják, hogy 250 μM TPEN gátolta az ismételt KCl-depolarizáció indukált Ca^{2+} -tranziensek relatív amplitúdóját az első - TPEN hiányában regisztrált - tranzienshez képest (0,75 \pm 0,06, amikor $[\text{Ca}^{2+}]_e=1,8$ mM volt vs 0,86 \pm 0,05, amikor $[\text{Ca}^{2+}]_e=0,8$ mM-nak volt beállítva). Ezen adatok nem adódtak szignifikánsan különbözőnek ($p>0,06$). Szignifikánsan különbözőnek adódott viszont a fentebb említett, 250 μM TPEN jelenlétében regisztrált tranziensek relatív amplitúdója, az 500 μM TPEN ($[\text{Ca}^{2+}]_e=1,8$ mM) adagolása mellett rögzített tranziensek relatív amplitúdójához viszonyítva (0,44 \pm 0,05) ($p<0,0001$). Ezen adatok igen meglepőek voltak, hiszen a szabad [TPEN] a 250 μM -os oldatban ($[\text{Ca}^{2+}]_e=0,8$ mM) azonos az 500 μM -os oldatban lévő ($[\text{Ca}^{2+}]_e=1,8$ mM) szabad [TPEN]-val, számszerint 40 μM (ennek kiszámolására a Maxchelator számítógépes programot használtuk).



20. ábra. TPEN hatása fiziológias és módosított $[Ca^{2+}]_e$ mellett

A reprezentatív görbék a $[Ca^{2+}]_i$ -ban bekövetkező transziens változásokat mutatják 100 mM KCl 10 s-ig történt extracelluláris, ismételt alkalmazását követően, 250 μM TPEN jelenlétében **(a)** fiziológiasnak tekintett 1,8 mM $[Ca^{2+}]_e$ mellett, valamint **(b)** csökkentett, 0,8 mM $[Ca^{2+}]_e$ mellett; **(c)** dózis-hatás görbe, amelyet 50, 250, illetve 500 μM TPEN alkalmazását követően regisztráltunk.

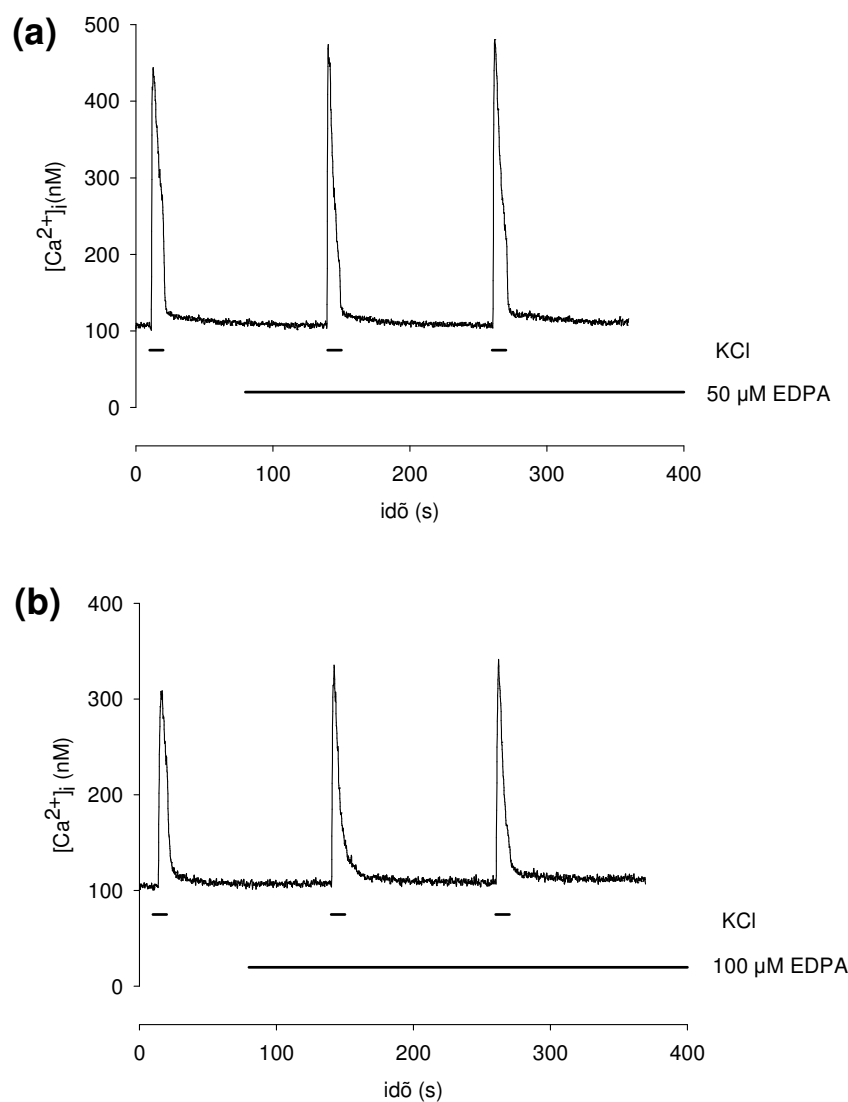
Ezen kísérletek végeredményeképpen elmondható, hogy az összes és nem a szabad [TPEN] az, amely a depolarizáció-indukált Ca^{2+} -transziensek esetén tapasztalt hatásokért felelős.

V.1.5. Alacsony extracelluláris Zn^{2+} -koncentráció hatása

Mivel a TPEN egy membránpermeábilis, nehézfémion-kelátor, mely igen nagy affinitással rendelkezik nehézfémek, például Mn^{2+} , Fe^{2+} és Zn^{2+} iránt ($K_d \sim 10^{-13,3}$, $10^{-14,6}$ valamint $10^{-15,6}$), szeretnénk volna ellenőrizni, hogy a tapasztalt hatások esetleg nem a szer Zn^{2+}

pufferelésén keresztül alakulnak-e ki. Ennek érdekében a következő kísérletsorozatot egy nem membránpermeábilis Zn^{2+} kelátor, az etilén-diamin-N-N'-diacetik-N-N'-di- β -propionsav, röviden EDPA jelenlétében végeztük.

Az elvégzett kísérletek alapján azt találtuk, hogy mind 50, mind 100 μ M-os koncentrációban alkalmazva az EDPA nem módosította a depolarizáció-indukált Ca^{2+} -tranziensek relatív amplitúdóját ($104 \pm 12\%$, valamint $110 \pm 13\%$) az első, a szer hiányában rögzített tranzienshez képest (21. ábra).



21. ábra. A Zn^{2+} kelátor – EDPA-hatásának vizsgálata

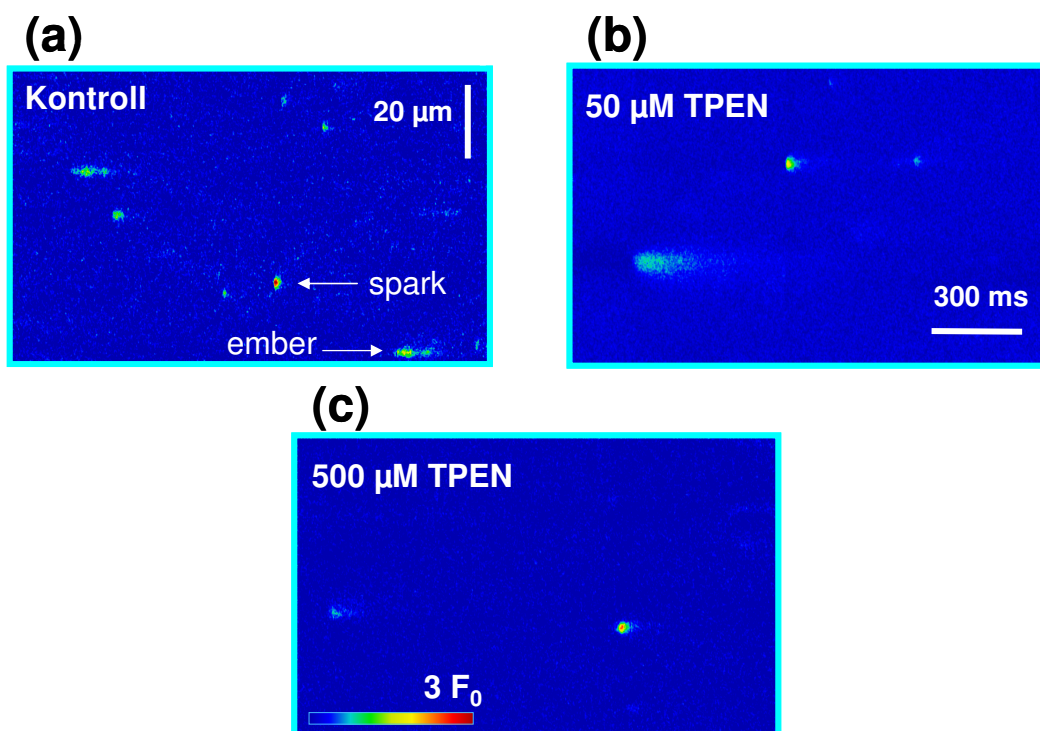
A reprezentatív görbék ismételt, 100 mM KCl 10 s-ig tartó extracelluláris alkalmazása által kiváltott Ca^{2+} -tranzienseket ábrázolják (a) 50, valamint (b) 100 μ M EDPA jelenlétében.

V.2. TPEN hatásának tanulmányozása patkányból enzimatikusan izolált egyedi izomrostokon

Kísérleteink megkezdése előtt, svájci kollaborációs partnerünk által szívizmon végzett vizsgálatok alapján (Jung és mtsai., 2007), továbbá az előzőekben leírt és munkacsoportunk

által publikált C2C12 sejteken kapott eredmények alapján (Sztretye és mtsai., 2008) ismert volt, hogy a TPEN alacsony koncentrációban (20-50 μM) képes aktiválni a RyR-on történő Ca^{2+} -felszabadulást. Célunk tehát az volt, hogy elemi eseményeket regisztrálva jobban megértsük és megismerjük a puffer intracelluláris Ca^{2+} -felszabadulásra kifejtett hatását egyedi izomrostok esetén; valamint, hogy *in situ* tanulmányozzuk a TPEN-RyR közötti kölcsönhatásokat.

Mivel intakt emlős izomrostokon az elemi események detektálása nagy technikai kihívás, ezért kísérleteinket szaponinnal (0,002%) permeabilizált patkány izomrostokon végeztük, szobahőmérsékleten (részletekért lásd a IV.1.2. fejezetet). Hogy fokozzuk az események számát, egy jól bevált módszert alkalmaztunk, mégpedig a permeabilizációt követően a glutamát alapú belső oldat cseréjét szulfátra, mely bizonyítottan fokozza az elemi események számát, anélkül hogy módosítaná az események morfológiáját (Zhou és mtsai., 2003). Amint az várható volt, kontroll körülmények között az emlős izomrostokon kétféle eseményt regisztráltunk: *spark*ot és *ember*et (22./a ábra).



22. ábra. TPEN hatása emlős harántcsíktolt izomrostokon, szulfát alapú belső oldatban

Line-scan üzemmódban rögzített képek egy (a) kontroll (b) 50, illetve (c) 500 μM TPEN jelenlétében, fakulásra történő korrekció és normalizálás után. Kontroll, valamint 50 μM TPEN jelenlétében elemi kalciumfelszabadulási eseményeket (*spark*okat és *ember*öket) regisztráltunk, amelyek száma jelentősen lecsökkent 500 μM TPEN használatát követően.

A szívizmon elvégzett kísérletekkel ellentétben, ahol 20 μM -os koncentrációban alkalmazva a TPEN spontán kialakuló SR kalciumfelszabadulást és tovaterjedő Ca^{2+} -hullámokat okozott, esetünkben, 50 μM -os koncentrációban alkalmazva a szer hatása elmaradt, és a spontán aktivitás enyhe gátlását figyeltük meg (22./b ábra).

Kontrollban 574, 50 μM TPEN jelenlétében 159, 500 μM TPEN jelenlétében pedig 197 *spark*ot detektáltunk és analizáltunk. Az eredmények összegzése a 1. táblázatban látható.

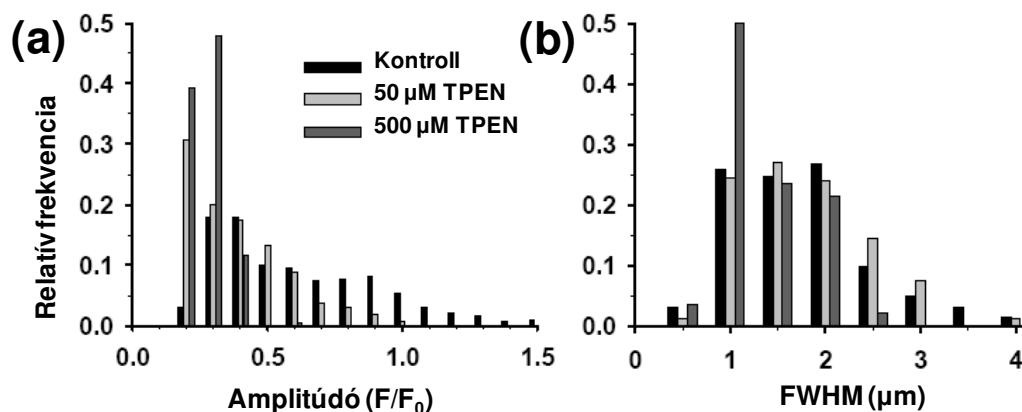
	n	Amplitúdó ($\Delta F/F_0$)	FWHM (μm)	Időtartam (ms)	Frekvencia ($\text{s}^{-1}\text{sarc}^{-1}$)
Kontroll	574	0,80 \pm 0,01	1,52 \pm 0,03	41,84 \pm 0,63	0,032 \pm 0,005
50 μM TPEN	159	0,43 \pm 0,01*	1,54 \pm 0,05	34,81 \pm 1,06*	0,031 \pm 0,014
500 μM TPEN	197	0,32 \pm 0,01*	1,09 \pm 0,03*	36,68 \pm 0,98*	0,021 \pm 0,026*

* szignifikáns eltérés a kontrollhoz képest ($p < 0,05$)

1. táblázat. Patkány izomrostokon regisztrált *spark*ok morfológiai jellemzőinek összehasonlítása (átlag \pm S.E.M.)

50 μM TPEN adagolását követően az *emberök* száma drasztikusan lecsökkent a kontroll 154-ről 6-ra, illetve 0-ra egy nagyságrenddel nagyobb (500 μM) TPEN-koncentráció használata esetén.

Amint az a táblázatban látható, kontroll körülmények között a *spark*ok frekvenciája 0,032 \pm 0,005 $\text{s}^{-1}\text{sarc}^{-1}$ volt, és a morfológiát jellemző paraméterek mindenben megegyeztek az irodalmi adatokkal (lásd Kirsch és mtsai., 2001; Zhou és mtsai., 2003; Szentesi és mtsai., 2004). Annak ellenére, hogy a *spark*ok frekvenciájában nem mutatkozott szignifikáns eltérés 50 μM TPEN használatát követően a kontrollhoz képest (0,031 \pm 0,014 $\text{s}^{-1}\text{sarc}^{-1}$, $p > 0,9$), ez az érték szignifikánsan lecsökkent amikor magas koncentrációban alkalmaztuk a szert (0,021 \pm 0,014 $\text{s}^{-1}\text{sarc}^{-1}$). A csökkent frekvencia mellett az események morfológiája is változott, mely igen erőteljes volt 500 μM TPEN alkalmazását követően a kontrollhoz viszonyítva. Mindezt a 23./a és b ábrán látható eloszláshisztogramok is jól illusztrálják.



23 ábra. A *spark*ok amplitúdóinak és félértékszélességeinek (FWHM) relatív eloszlása emlős izomrostokon

Megjegyzendő a kisebb értékek felé (balra történő) eltolódás a TPEN-koncentráció növelésével.

V.3. TPEN hatásának tanulmányozása békából mechanikusan izolált izomrostokon

Ismert, hogy az emlős vázizomhoz viszonyítva a szívizmon, kételtűek harántcsíktolt izmán, valamint tenyésztett vázizmokon a spontán kialakuló SR Ca²⁺-felszabadulásban jelentős szerepe van a kalcium-indukált kalciumfelszabadulás (CICR) folyamatának, amely a RyR3 jelenlétét feltételezi. Mivel béka harántcsíktolt izmokban a RyR3 jelentős számban van jelen (lásd a 9. ábrát), és a CICR kulcsszerepet játszik a szomszédos Ca²⁺-csatornák aktiválásában egy *spark* keletkezése alatt, kíváncsiak voltunk, hogyan befolyásolja a TPEN ezen eseményeket. Méréseinket mechanikus úton izolált (lásd IV.1.2 fejezetet) és szaponinnal permeabilizált egyedi izomrostokon végeztük. Kísérleteink egy részében a *spark* frekvencianövelése érdekében csökkentett [Mg²⁺]_i-t használtunk.

V.3.1. TPEN hatása alacsony [Mg²⁺]_i alkalmazva

Kontroll, 50, valamint 200 μM TPEN adagolását követően összesen 4365, 9885, illetve 286 *spark*ot regisztráltunk. Ezen események jellegzetes paramétereit a 2./a táblázat mutatja be.

(a)

	[Mg ²⁺] _i (mM)	n	Amplitúdó (ΔF/F ₀)	FWHM (μm)	Hossz (ms)	Frekvencia (s ⁻¹ sarc ⁻¹)
Kontroll	5,5	1561	0,84±0,01	2,16±0,02	34,8±0,3	0,19±0,02
50 μM TPEN	5,5	2101	0,95±0,01*	1,95±0,02*	29,1±0,1*	0,10±0,01**

(b)

Kontroll	4	4365	0,92±0,005	2,12±0,01	41,3±0,2	0,23±0,05
50 μM TPEN	4	9885	0,78±0,003*	2,41±0,01*	42,3±0,2*	0,33±0,02**
200 μM TPEN	4	286	0,65±0,03*	1,74±0,04*	30,3±0,8*	0,09±0,02**

* szignifikáns eltérés a kontrollhoz képest (p<0,001)

** szignifikáns eltérés a kontrollhoz képest (p<0,05)

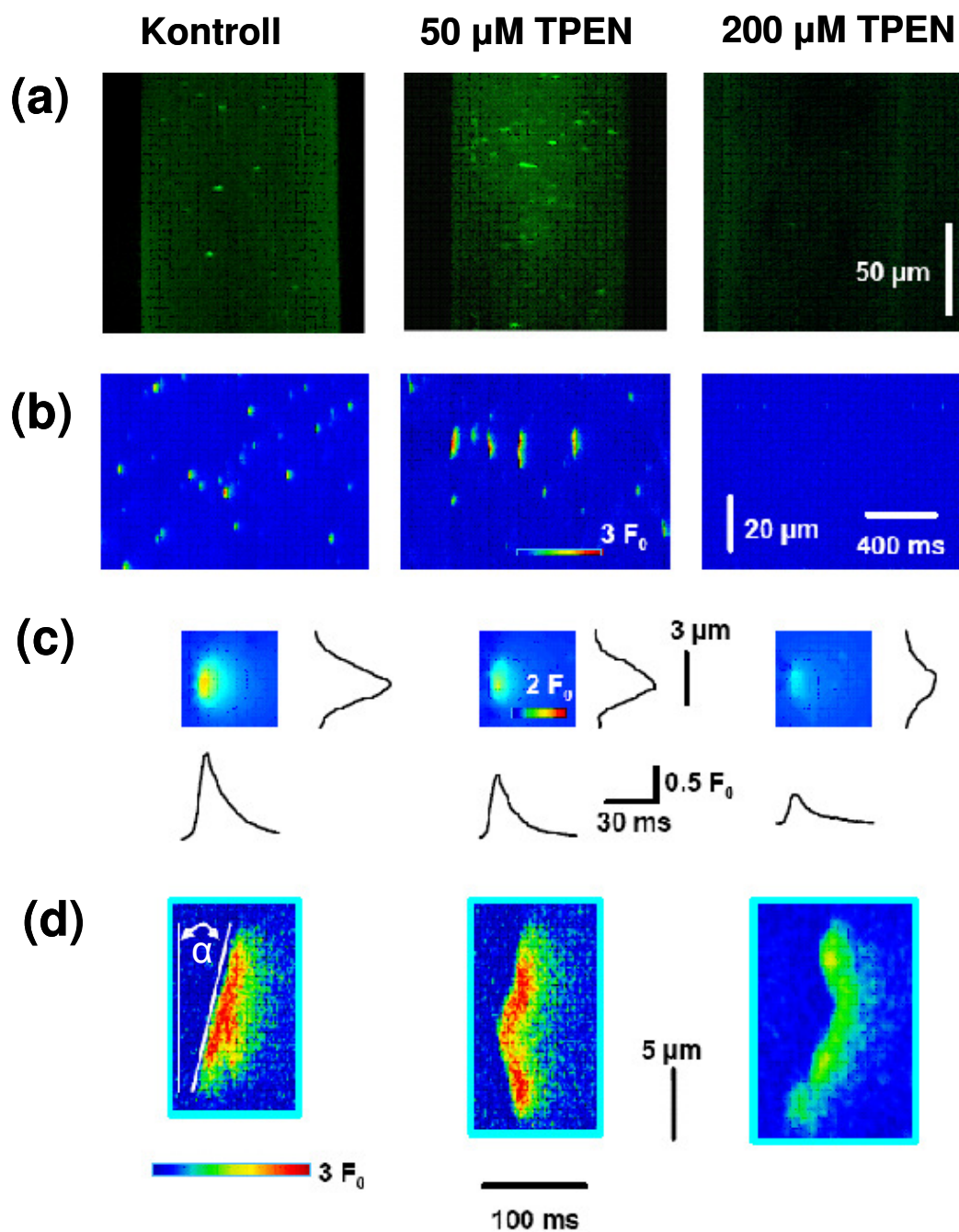
2. táblázat. Béka izomrostokon regisztrált sparkok morfológiai jellemzőinek összehasonlítása

(a) csökkentett (4 mM), valamint **(b)** enyhén megemelt (5,5 mM) [Mg²⁺]_i-t alkalmazva. Az adatok átlag±S.E.M.-ként vannak közölve.

Az adatok jól mutatják, hogy csökkentve az [Mg²⁺]_i-t, az ily módon bekövetkező RyR1 gátlásoldása révén nagyobb spark-frekvenciát rögzíthettünk (0,23±0,05 s⁻¹sarc⁻¹ vs. 0,19±0,02 s⁻¹sarc⁻¹).

Az első szembetűnő megfigyelés a TPEN adagolását követően a módosult eseményfrekvencia volt. 50 μM-os koncentrációban alkalmazva a szer serkentette az események kialakulását (0,33±0,02 s⁻¹sarc⁻¹), számszerint a kontroll mintegy 143%-ára növelve azt, míg 200 μM-os koncentrációban gátolta, a kontroll 39%-ára lecsökkentve a frekvenciát (0,09±0,02 s⁻¹sarc⁻¹).

Egy másik szembetűnő változás a sparkok morfológiáját érinti. A 24./a és b ábrákon jól látható, hogy a TPEN hatására tovaterjedő, ún. „makrosparkok” jelentek meg. Ezen események három példája látható kinagyítva a 24./d ábrán: egy pontból kiinduló, egy irányban tovaterjedő spark (baloldalon), egy pontból kiinduló, két irányban terjedő spark (középen), valamint két pontból kiinduló spark, amely egy közös pontba konvergál (jobb oldalon). Az események terjedési sebességét a hullámfront szögének kotangenséből számoltuk ki, és ez átlagosan 273±7 μm⁻¹-nek adódott (n=62), jól korrelálva az irodalmi adatokkal (lásd Zhou és mtsai., 2005).



24. ábra. Módosult elemi események béka harántcsíkolt izomrostokon TPEN jelenlétében

(a) x-y kétdimenziós kép, permeabilizált béka vázizomrostokat ábrázolva, alacsony (4 mM) $[Mg^{2+}]$ -jú belső oldatban. Megjegyzendő a nagy kiterjedésű *spark*ok jelenléte (*makrospark*ok) 50 μM TPEN-ben, valamint a lecsökkent eseményszám 200 μM TPEN alkalmazását követően. (b) A line-scan (x, t) képeken 50 μM TPEN adagolását követően jól láthatóak a tovaterjedő, ún. „travelling spark”-ok. (c) Reprezentatív Ca^{2+} -*spark*ok kontroll, valamint TPEN jelenlétében. Az események időbeli és térbeli profilját három szomszédos vonal átlagolásaként kaptuk. (d) Elemi események 50 μM TPEN jelenlétében. Az események terjedési sebességét a hullámfront szögének kotangenséből ($\text{ctg}(\alpha)$) számoltuk ki. A bemutatott *spark* esetén a terjedési sebesség $299 \mu\text{ms}^{-1}$ -nak adódott.

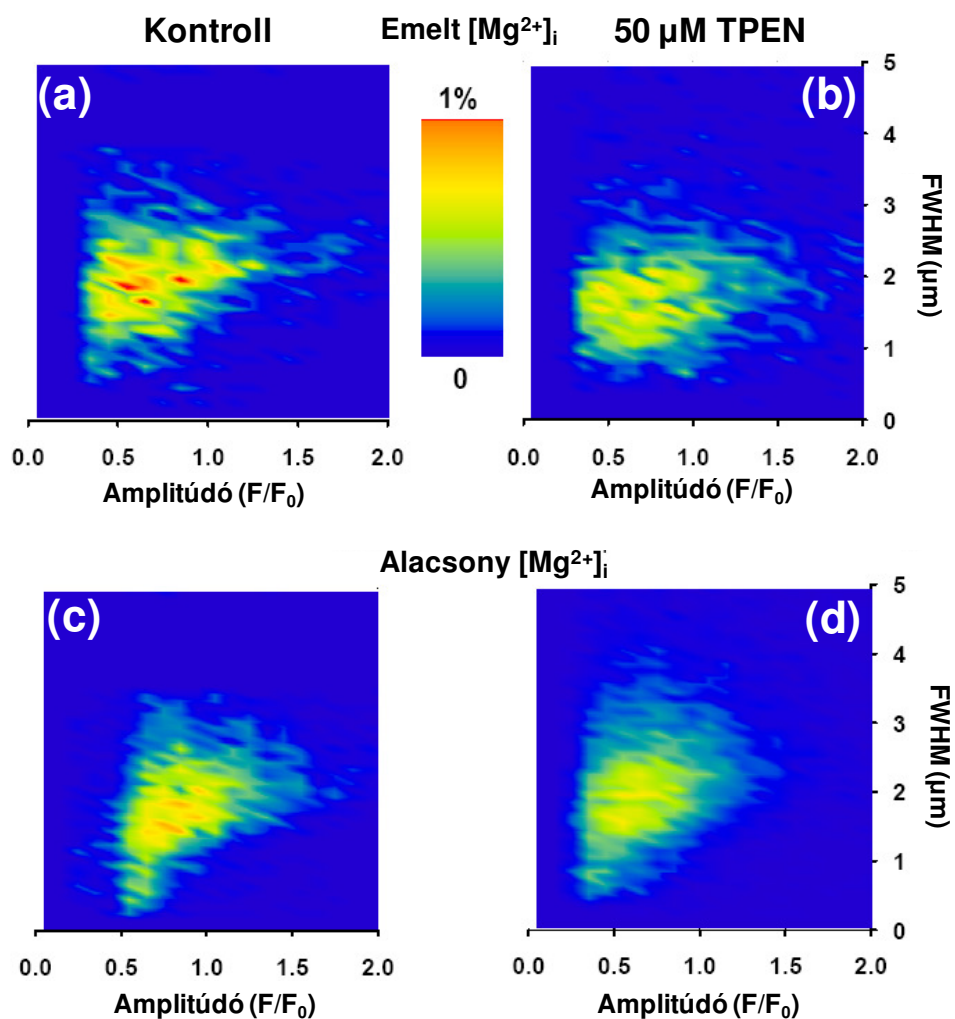
Továbbelemezve a szer elemi eseményekre kifejtett hatását, a bemutatott morfológiai változásokon felül szembetűnők a többi jellegzetes paramétert érintő változások. A kontroll körülmények között rögzített *sparkok* amplitúdója ($0,92 \pm 0,005$), térbeli szélesség ($2,12 \pm 0,01 \mu\text{m}$), valamint időbeli hossza ($41,3 \pm 70,2 \text{ ms}$) rendre ez értékek 84,7, 113,6, valamint 102,3%-ára módosultak $50 \mu\text{M}$ TPEN; illetve a kontroll 70,6, 82, és 73,4%-ára $200 \mu\text{M}$ TPEN alkalmazását követően (2. táblázat). Fontos megjegyezni, hogy a térbeli szélesség esetén tapasztalt növekedés $50 \mu\text{M}$ TPEN alkalmazása során egy sokkal hatékonyabb CICR-ra utal, hisz valószínűleg az egy időben megnyíló szomszédos Ca^{2+} -csatornák száma megnőtt a puffer hatására.

Végezetül egy értékes megállapítás a magasabb koncentrációban alkalmazott ($200 \mu\text{M}$) szer hatástalanságából adódik, amely egy esetben sem eredményezett tovaterjedő eseményeket. Ez arra utalhat, hogy két eltérő mechanizmus létezik, amelyek eltérő módon aktiválódnak alacsony, valamint magas [TPEN] alkalmazása esetén.

V.3.2. TPEN hatása emelt $[\text{Mg}^{2+}]_i$ -t alkalmazva

Mivel eredményeink arra utaltak, hogy a CICR-nek kulcsszerepe van az $50 \mu\text{M}$ TPEN által kifejtett hatásra, egy következő kísérletsorozatban enyhén megemeltük az $[\text{Mg}^{2+}]_i$ -t (5 mM -ról $5,5 \text{ mM}$ -ra), ami közismerten gátolja a CICR mechanizmust. Az enyhén megemelt $[\text{Mg}^{2+}]_i$ mellett az $50 \mu\text{M}$ TPEN hatása ellentétes volt az előzőekben leírt, alacsony $[\text{Mg}^{2+}]_i$ alkalmazásakor észlelt hatáshoz képest, hiszen szignifikáns csökkenés volt tapasztalható a frekvenciát illetően ($0,19 \pm 0,02$ -ről $0,10 \pm 0,01 \text{ s}^{-1} \text{ sarc}^{-1}$ -re), valamint a többi paraméter esetén is (2./a táblázat). E szignifikáns csökkenés alól kivétel volt az amplitúdó, amely enyhén megnőtt a szer alkalmazását követően.

A jobb szemléltetés érdekében a TPEN hatására bekövetkező morfológiai változások a 25. ábrán láthatók.

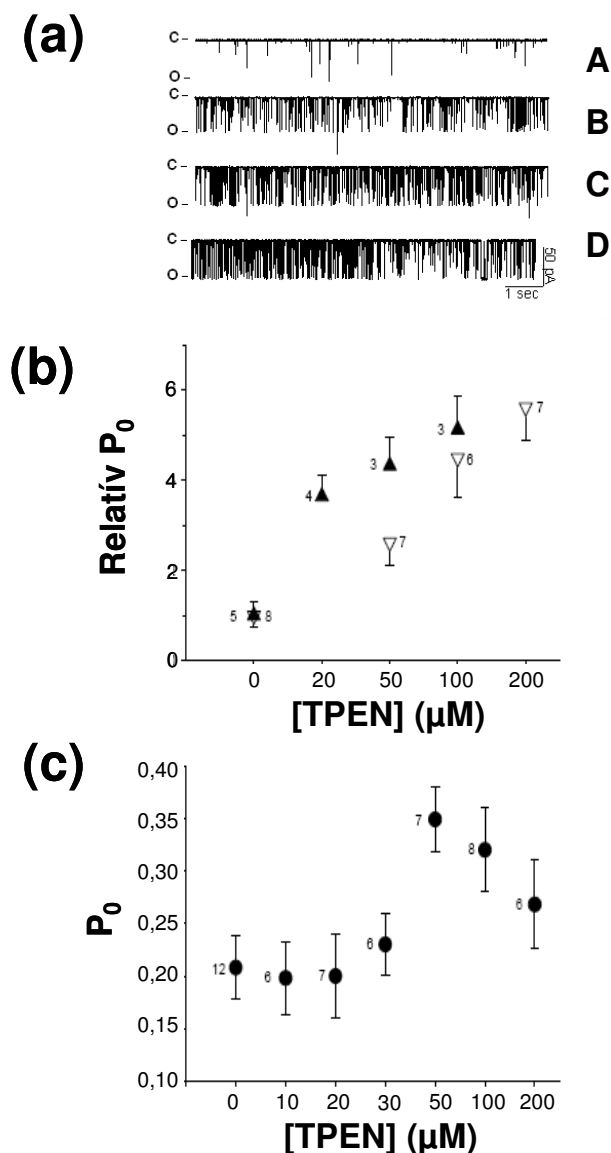


25. ábra. A sparkok amplitúdó- és félértékszélesség-eloszlása kontroll vs 50 µM TPEN jelenlétében, emelt, valamint alacsony [Mg²⁺]_i alkalmazásakor

V.4. TPEN hatásának vizsgálata izolált RyR-on

Mivel az elemi események tanulmányozása során nyert adataink arra utaltak, hogy a TPEN esetlegesen direkt módon befolyásolja a Ca²⁺-csatorna aktivitását, a vizsgálatainkat lipid kettősrétegbe ágyazott, izolált vázizom típusú RyR segítségével folytattuk. Ezen kísérletek TPEN jelenlétében, a csatorna kapuzási kinetikája tanulmányozására szolgáltak.

470 nM (ionizált) Ca²⁺-koncentrációnál a beágyazott RyR-ok viszonylag alacsony nyitvatartási valószínűséggel rendelkeztek ($P_0=0,0076\pm 0,0018$, 26./a ábra, A. görbe).



26. ábra. TPEN aktiváló hatása a RyR-ra, negatív potenciálokon

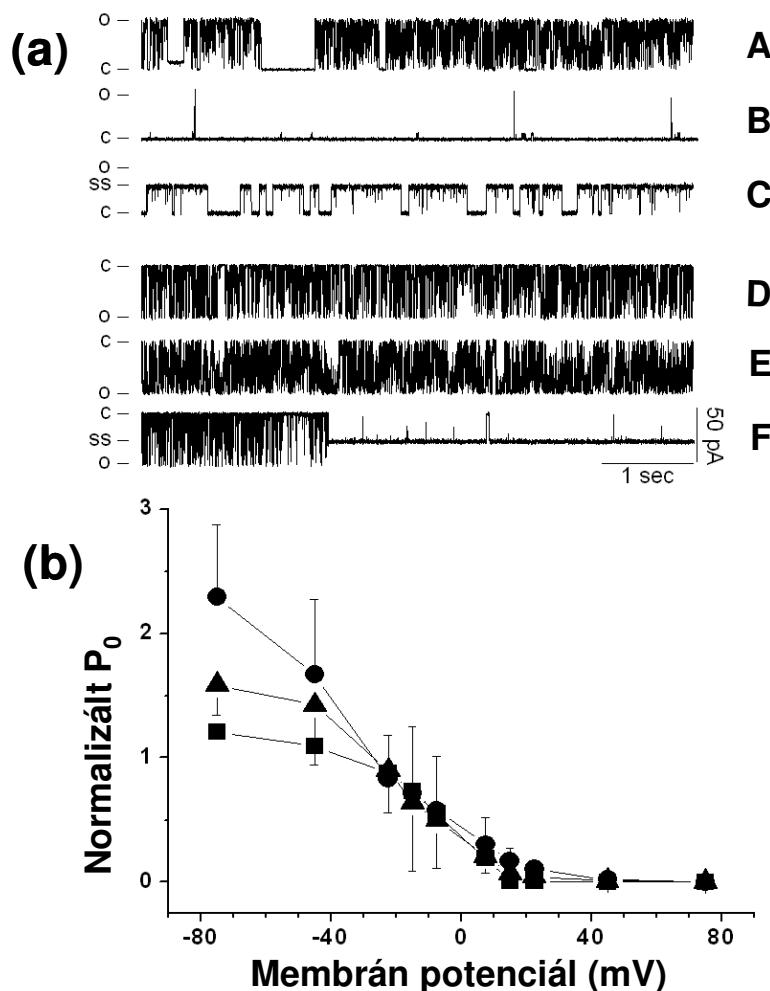
(a) Reprerentatív áramgörbék kontroll (A), illetve változó 50 (B), 100 (C), 200 μM TPEN (D) jelenlétében. A RyR-ok beágyazásánál szimmetrikus *cis* és *trans* $[\text{Ca}^{2+}]$ -t használtunk, amit a fokozatos *cis* $[\text{Ca}^{2+}]$ csökkentése (470 nM-ig) követett. A csatorna megnyílókat a lefelé irányuló tüskék jelzik. A *cis* TPEN hatékonysága a csatornaaktiváció koncentrációfüggésére alacsony (b), valamint magas $[\text{Ca}^{2+}]$ esetén (c). A csatorna nyitvatartási valószínűsége 60-120 s hosszú áram rekordokból lett meghatározva, majd a *cis* TPEN függvényeként került ábrázolásra. A kísérletekben a szabad $[\text{Ca}^{2+}]$ 50 μM volt a *trans* oldalon, valamint 470 nM (b), illetve 50 μM (c) a *cis* oldalon. A (b) panelben a kísérleteket Mg^{2+} hiányában (\blacktriangle), valamint jelenlétében (\triangle) is elvégeztük, és az eredményeket a TPEN hiányában regisztrált átlagos

értékekre normalizáltuk. A számok az ábrákon az átlagolt adatok számát jelzi. Minden esetben a tartófeszültség -85 mV volt, a töltéshordozó pedig 250 mM K^+ .

A TPEN adagolását követően 50, 100, valamint 200 μM -os koncentrációban a P_0 egyenesen arányosan nőtt, ami direkt módon bizonyítja a szer RyR-ra kifejtett aktiváló hatását, negatív membránpotenciálokon. Ez a hatás jelen volt 1 mM Mg^{2+} *cis* oldali jelenlétében, valamint 50 μM szabad Ca^{2+} -koncentráció esetén egyaránt; igaz módosult paraméterek mellett (lásd 26./b és c ábrákat).

Ezzel szemben pozitív membránpotenciálok esetén (+85 mV) ellenkező hatás volt megfigyelhető, hiszen 50 μM TPEN adagolása jelentősen lecsökkentette a nyitvatartási valószínűséget ($P_{0,\text{kontroll}}=0,208\pm 0,024$ -ról $P_{0,\text{TPEN}}=0,0014\pm 0,002$ -re) (27./a ábra A és B

görbék) a -85 mV alkalmazásakor tapasztalt aktivációhoz viszonyítva (27./a ábra D és E görbék).



A 27. ábra. TPEN feszültségfüggő hatása a RyR1 aktiválására
B (a) Reprezentatív áramgörbék
C +85 mV (A,B,C), valamint -85 mV (D,E,F) membránpotenciál esetén. A nyitott állapotot az o, a zárt állapotot a c, míg a rianodin által létrehozott szubkonduktancia állapotot az s, jelöli. Az A és D görbék a kontroll, a B és E az 50 μM cis TPEN, a C és F rekordok pedig 2 μM rianodin hozzáadását illusztrálják a TPEN által előzőleg aktivált csatornához. (b) Relatív nyitvatartási valószínűség: 50 (●), 100 (▲), valamint 200 μM (■) TPEN jelenlétében. A P₀ kiszámolásához, minden esetben 120 s hosszú rekordokat alkalmaztunk, változó

feszültségek mellett, amelyeket mint $\text{átlag} \pm \text{S.E.M.}$ -ként ábrázoltunk. 200 μM TPEN esetén az S.E.M-t nem ábrázoltuk az ábra jobb áttekinthetősége érdekében.

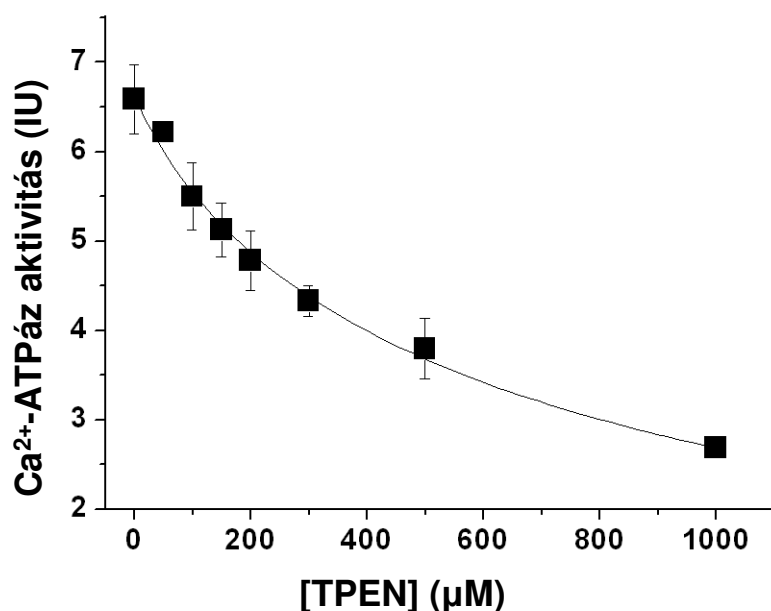
A 27./a ábra C görbéje a rianodin hatását illusztrálja, amely szubkonduktancia-állapotokat eredményezett. A TPEN jelenlétében a rianodin hatása változatlan, hiszen az F görbén változatlanul jelen vannak szubkonduktancia-állapotok.

Tovább vizsgálva a TPEN feszültségfüggő hatását a RyR1 működése szempontjából, a 27./b ábrán a relatív nyitvatartási valószínűség különböző [TPEN] (50, 100, 200 μM) jelenlétében ábrázoltuk, eltérő membránpotenciál-értékek mellett. Egyértelműen látszik a feszültségfüggés, jelentős gátlással pozitív potenciálok esetén, valamint enyhe koncentrációfüggő aktiválódással negatív potenciálértékeknél.

Fontos megállapítás e kísérletek eredményeképpen, hogy TPEN adagolása előtt és után a csatornán átfolyó egységes áram mérete ugyanakkora, (lásd 27./a ábra D és E görbéit), ami arra enged következtetni, hogy a TPEN nem befolyásolja a csatorna vezetőképességét.

V.5. TPEN hatása az SR Ca^{2+} -pumpára

A C2C12 sejteken kapott eredményeink (V.I. fejezet) arra utaltak, hogy a TPEN jelenléte befolyásolhatja a Ca^{2+} visszavételét az SR-ba, mivel jelentősen megnyúlt a KCl-depolarizáció indukált Ca^{2+} -tranziensek leszálló szára. Hogy megbizonyosodjunk e feltevés helyességéről, a TPEN hatását izolált SR vezikulák segítségével tanulmányoztuk, és rögzítettük a vezikula hidrolitikus aktivitását különböző [TPEN] alkalmazásakor. A mérési eredmények összegzése a 28. ábrán látható.



28. ábra. TPEN gátló hatása a SERCA pumpa hidrolitikus aktivitására

Az ATPáz aktivitást „kapcsolt enzim-assay” segítségével határozzuk meg. Az eredmények 5 különböző mérés átlagát jelképezik. A kapott pontokra Hill-függvényt illesztettünk, majd az így meghatározott félhatásos dózis $\text{IC}_{50}=692 \mu\text{M}$ -nak, a Hill-koefficiens pedig $n=0,88$ -nek adódott.

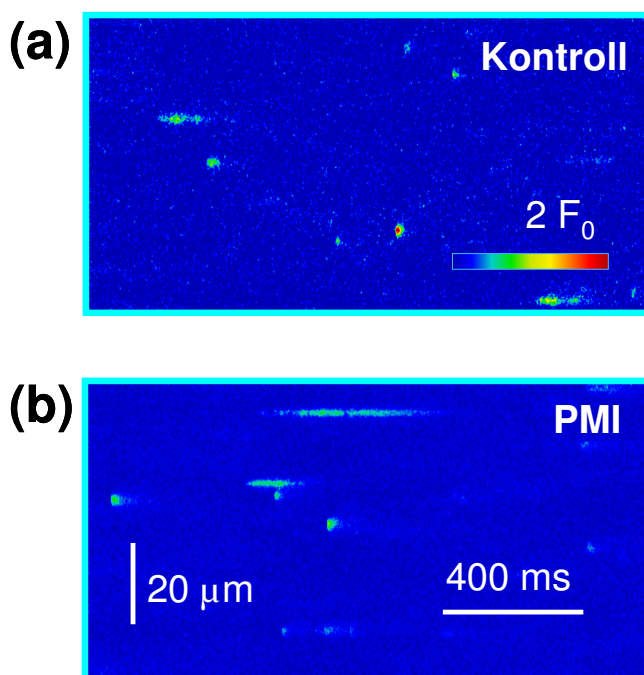
Amint azt a fenti ábra is mutatja, a TPEN dóziszfüggő módon gátolta az ATP-áz aktivitását. A méréseinkben legmagasabb koncentrációban alkalmazott TPEN ($500 \mu\text{M}$) a SERCA-pumpa aktivitását mintegy felére csökkentette.

V.6. Az elemi kalciumfelszabadulási események funkcionális változásai PMI állapotmodellen

A szívinfarktust követő elégtelen szív működés következtében a perifériás izomzat tömegének és kontrakciós erejének jelentős csökkenése figyelhető meg. Az izomgyengeség mértékét a romló perfúzió, és a hosszas ágynyugalommal járó csökkent fizikai aktivitás nem

indokolja, ezért az elektro-mechanikai kapcsolat és a vázizomrost Ca^{2+} -transzport mechanizmusainak molekuláris szintű sérülése feltételezhető.

Francia kollaborációs partnerünk - Guy Vassort és munkacsoportja - eredményei alapján ismert, hogy a PMI állatokból kipreparált izomsejtek módosult Ca^{2+} -homeosztázissal rendelkeznek (Ward és mtsai., 2003). Érdekesnek tűnt tehát megvizsgálni módosul-e, és ha igen hogyan, az elemi események morfológiája, valamint a jellegzetes paraméterek egyedi vázizomrostok tanulmányozása során. Kísérleteink első fázisában úgynevezett sham-operált, kontrollnak számító és posztmiokardiális infarktuson átesett (lásd a *IV.1.3 fejezetet*) (továbbiakban: PMI) patkányokból származó szaponinnal permeabilizált vázizomrostokon végeztük. A kontroll rostokon spontán kialakuló kalciumfelszabadulási eseményeket rögzítettünk (*29./a ábra*), amelyek frekvenciája $0,038 \pm 0,001 \text{ s}^{-1} \text{ sarc}^{-1}$, (733 felvétel, 10 roston), valamint morfológiai paraméterei mindenben megegyeztek az irodalmi adatokkal (Szentesi és mtsai., 2004). A PMI állatokból származó rostokon (*29./b ábra*) az események frekvenciájának enyhe növekedése volt tapasztalható ($0,041 \pm 0,001 \text{ s}^{-1} \text{ sarc}^{-1}$, 522 felvétel, 8 rost), amit nem találtunk szignifikánsan eltérőnek ($p > 0,8$) a kontroll csoporthoz képest.



29. ábra. Elemi kalciumfelszabadulási események kontroll és PMI patkány izomrostokon

(a) sham-operált, azaz kontroll, valamint (b) PMI patkányból kipreparált izomrostokon rögzített line-scan képek. Megjegyzendő a *sparkok* kisebb amplitúdója, valamint az *emberök* nagyobb frekvenciája a PMI patkány esetén.

Kontrollban az események megoszlása a következő képpen alakult: leggyakrabban *sparkok* fordultak elő (63,2%), kevésbé voltak gyakoriak a magányos *emberök* (22,4%), illetve a *spark+emberök* (14,4%). Ehhez képest a PMI rostokon rögzített események csupán

40,1%-a volt *spark*, 32,7%-a volt *ember*, és 27,7%-a volt *spark+ember*. Ezen adatokat értékelve érdekes megállapítás volt, hogy a PMI rostok esetén az *emberök sparkokhoz* viszonyított relatív aránya szignifikánsan nagyobb volt (0,44) a kontrollban rögzített események arányához képest (0,26).

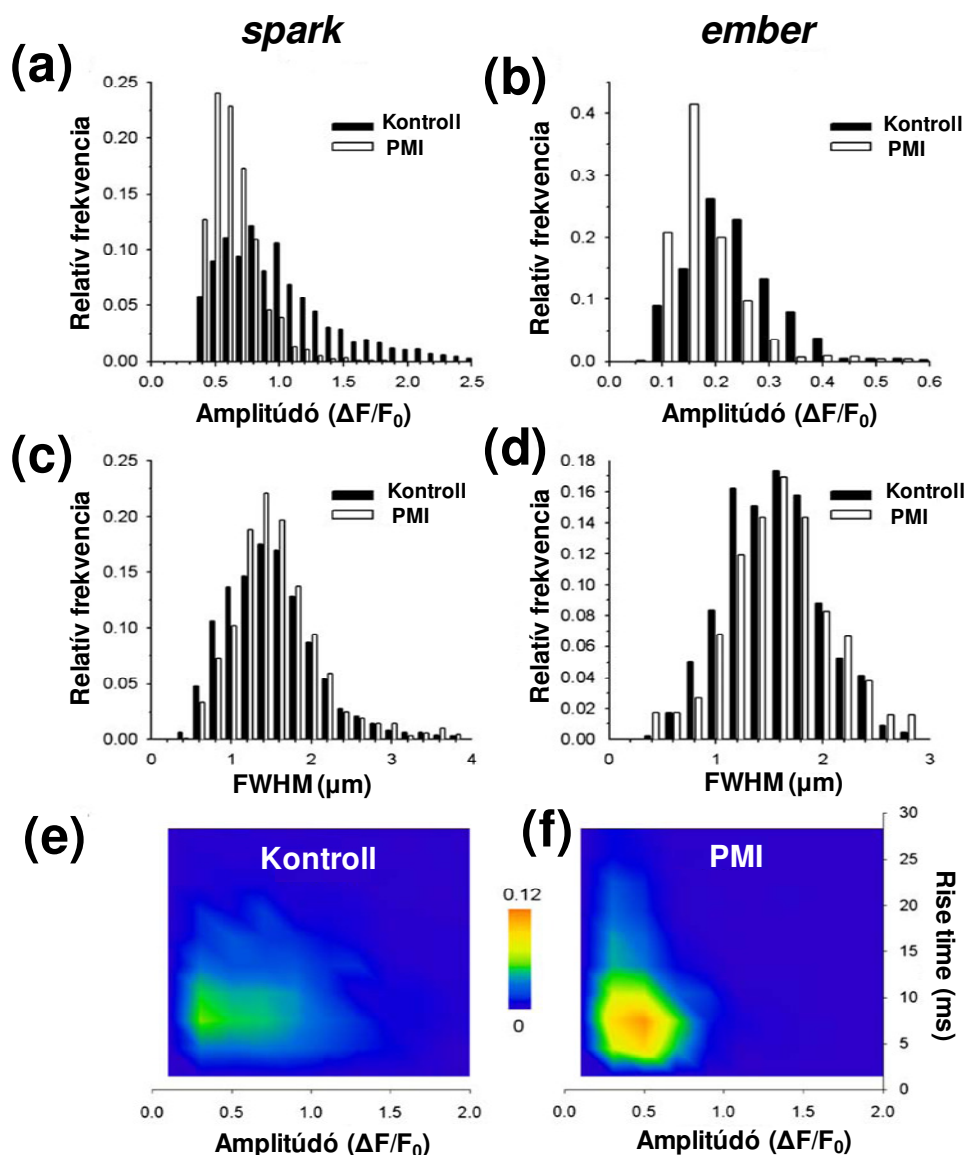
A kontroll csoport esetén összesen 6 állat felhasználását és 10 izomrost tanulmányozását követően 1284 *sparkot* és 454 *embert* rögzítettünk, míg a PMI csoport esetén 4 állat és 8 izomrost tanulmányozását követően 937 *sparkot*, valamint 765 *embert* detektáltunk. Ezen események jellegzetes paraméterei a 3. táblázatban láthatók összefoglalva.

	Spark		Ember	
	Kontroll n=1284	PMI n=937	Kontroll n=454	PMI n=765
Amplitúdó ($\Delta F/F_0$)	0,81 \pm 0,01	0,48 \pm 0,01*	0,21 \pm 0,004	0,17 \pm 0,003*
Rise time (ms)	12,4 \pm 0,2	14,6 \pm 0,3*	-	-
FWHM (μ m)	1,72 \pm 0,02	1,66 \pm 0,02*	1,78 \pm 0,02	1,81 \pm 0,02
Hossz (ms)	34,6 \pm 0,4	35,6 \pm 0,6	87,9 \pm 0,4	88,6 \pm 2,1

3. táblázat. Az elemi események morfológiai jellemzőinek összehasonlítása kontroll, valamint PMI patkányok esetén

Az adatok átlag \pm S.E.M.-ként vannak közölve.

A fenti táblázatból látható, hogy a PMI patkányokból származó vázizomrostokon rögzített *sparkok* amplitúdója mintegy 40%-kal csökkent, míg az *emberök* átlagos amplitúdója 20%-kal csökkent a kontrollhoz képest (30./a-b ábrák). E csökkenést mindkét esetben az eloszláshisztogramokon a balra (azaz kisebb értékek felé) tolódott amplitúdóértékek jelzik (lásd 30./a-b ábrák). A *sparkok* amplitúdójának drámai csökkenése valószínűleg a kevesebb nagy amplitúdójú *spark* kialakulásának köszönhető.



30. ábra. Az elemi események jellegzetes paramétereinek eloszlása kontroll, valamint PMI izomrostokon

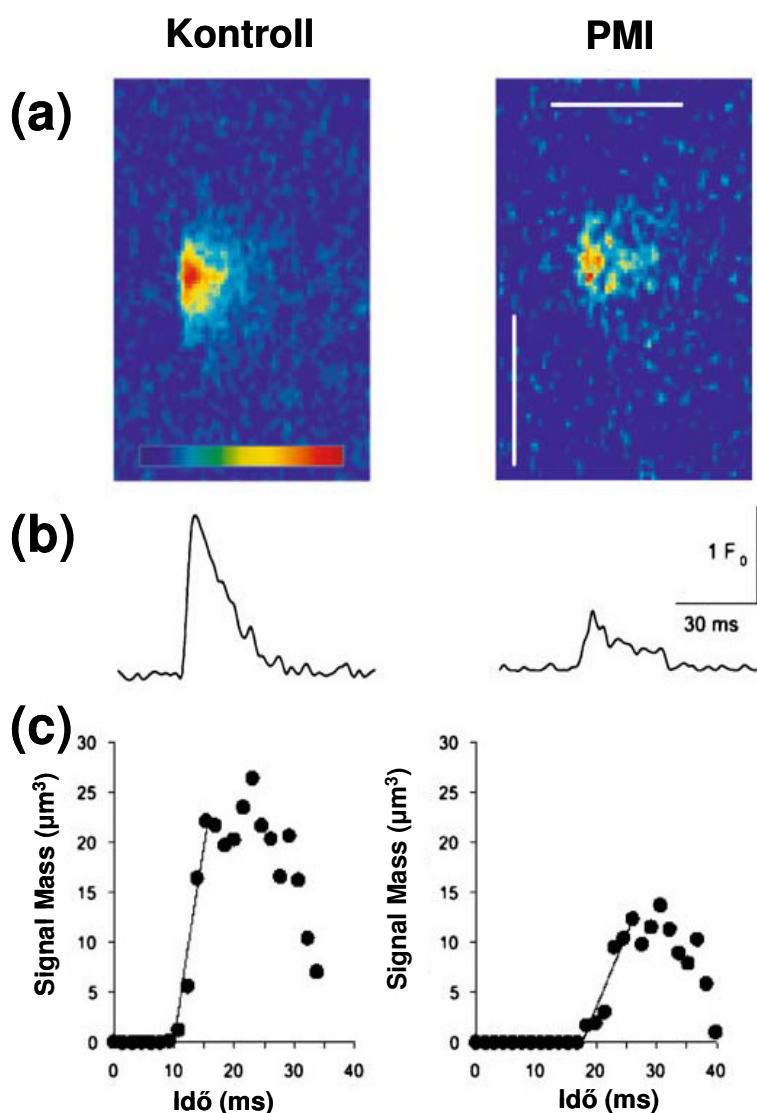
Az (a) amplitúdó, (b) átlagos amplitúdó (c) és (d) térbeli szélesség (FWHM) eloszláshistogramjai *spark*ok (bal oldalt), valamint *ember*ök (jobb oldal) esetén, kontroll, illetve PMI izomrostokon. A *spark*ok rise time-jának az amplitúdó függvényében kontroll (e) és PMI (f) rostok esetén kétdimenziós eloszláshistogram ábrázolása.

A PMI rostok esetén a *spark*ok térbeli kiterjedése enyhén csökkent (30./c ábra), ami miatt egy átlagos elemi esemény alatt felszabaduló Ca^{2+} becsült mennyisége is kevesebb, mint kontroll esetben. Az utóbbi adatok teljes összhangban vannak Ward és mtsai. (2003) eredményeivel, akik a *spark*ok fenti morfológiai változásait azzal magyarázzák, hogy krónikus szívelégtelenségben a RyR1 hiperfoszforilált (PKA által), és ennek köszönhetően

jóval kevesebb FKBP12-t hordoz, mint az egészséges patkányokból származó csatornák. Ugyanez a munkacsoport a single channel kísérletekben kimutatta a RyR1 FKBP-hiányára utaló jellegzetes kapuzását: a PMI csatornák P_{O_2} -ja a kontrollhoz képest magas, és jelen vannak a LLSS-ek.

A *spark*ok esetén tapasztalt morfológiai változások jobb szemléltetése érdekében, a 30./e, illetve 30./f ábrákon kívántuk bemutatni az amplitúdó, valamint rise time kétdimenziós eloszláshisztogramjait, amelyeken szintén jól látszik a PMI rostok esetén a kisebb amplitúdó, valamint nagyobb rise time értékek felé való eltolódás.

A 31./a ábrán két reprezentatív *spark* látható kontroll, valamint PMI patkányból származó izomroston a megfelelő térbeli ábrázolással együtt (31./b ábra).



31. ábra. Két reprezentatív *spark* signal mass értékének ábrázolása

(a) két nagy amplitúdójú *spark* kontroll (bal), illetve PMI (jobb) patkány esetén; (b) az ábra (a) paneljében illusztrált két *spark* térbeli profiljának ábrázolása. A kontroll *spark* amplitúdója $1,79 \Delta F/F_0$, míg a PMI állatból származó *spark* amplitúdója $0,70 \Delta F/F_0$; (c) A SM(t) értékek ábrázolása kontroll (bal), illetve PMI (jobb) *spark*ok esetén. Az egyenes vonal a SM(t) függvény felszálló szárának lineáris illesztése, amelynek meredeksége $3,80$, illetve $1,44 \mu\text{m}^3 \text{ms}^{-1}$ -nek adódott a kontroll, valamint a PMI *spark* esetén.

Az egyes események kalciumfluxusának meghatározását a signal mass (SM(t)) függvény segítségével végeztük. Gauss-görbéket illesztettünk a *sparkok* térbeli profiljának minden egyes időbeli pontjára, és az (1) *egyenlet* segítségével kiszámoltuk a SM(t) értéket (36./c *ábra*). Ezt az értéket az SM(t) függvény felszálló szárának egy egyenessel való illesztését követően az egyenes meredekségéből kaptuk meg. Ezt követően mindkét *sparkpopuláció* esetén (sham-operált, illetve PMI) kiválasztottunk tíz szemmel láthatóan nagy amplitúdójú eseményt, és átlagoltuk ezeknek az amplitúdóját. A kontroll *sparkok* SM(t) értéke szignifikánsan nagyobb volt a PMI patkányokon regisztrált *sparkokhoz* viszonyítva ($2,59 \pm 0,24$ vs $1,42 \pm 0,25 \mu\text{m}^3 \text{ms}^{-1}$, $p < 0,01$) (31./c *ábra*). Ez a megállapítás azt hivatott alátámasztani, hogy az elemi események alatt létrejövő kalciumfluxus szívelégtelenségben kisebb, ami a Ca^{2+} -homeosztázis zavarára vezethető vissza.

VI. Megbeszélés

VI.1. TPEN hatása a C2C12 sejtek Ca^{2+} -homeosztázisára

Amint azt a C2C12 egér vázizom sejteken végzett kísérleteink megmutatták, a TPEN módosította a sejtek Ca^{2+} -homeosztázisát, hiszen hatással volt az SR kalciumfelszabadulásra, és gátolta a cytoplasma Ca^{2+} -eltávolító mechanizmusát (SERCA-pumpát). A teljes sejt $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mérések során kiderült, hogy alacsony koncentrációban alkalmazva (20, 50 μM) a TPEN tranziens Ca^{2+} -felszabadulást eredményezett. Másrészt egy nagyságrenddel magasabb koncentrációban adagolva (500 μM) a szer alkalmazása nem csak hogy hatástalannak bizonyult, de úgy tűnik, hogy módosította a depolarizáció-, illetve agonista indukált Ca^{2+} -tranzienseket, valamint gátlást fejtett ki a cytoplasmaticus Ca^{2+} -eltávolító mechanizmusra.

Az első irodalmi adatok óta (Arslan és mtsai., 1985), ahol a TPEN-t mint nehézfém-kelátor használták, számos ellentétes megfigyelés látott napvilágot a szer nehézfémkötő, de leginkább Zn^{2+} -kötő hatékonyságát tekintve (Arslan és mtsai., 1985; Schumaker és mtsai., 1998; Chimienti és mtsai., 2001). Az általunk kapott kísérletes eredmények arra utalnak, hogy a TPEN által kifejtett hatások nagy valószínűséggel nem a nehézfém-pufferhatásának köszönhetők. Egy igen fontos bizonyíték, amely alátámasztja ezt az állítást, a szer nehézfémek iránti nagy affinitása (a K_d kisebb, mint 10^{-10} M, Arslan és mtsai., 1985), ami azt jelenti, hogy 50 μM TPEN már teljes egészében megköti az oldatban található összes nehézfémet; következésképpen az általunk leírt hatások függetlenek tekinthetők a nehézfémek pufferhatásától. A nehézfémek szerepének tisztázása érdekében további kísérleteket végeztünk, ahol az extracelluláris Zn^{2+} -et EDPA-val puffereltük. Az EDPA, melyet először az irodalomban Snitsarev és mtsai. 2001-ben említettek, nagy affinitással köti a Zn^{2+} -et, és igen alacsony affinitással rendelkezik kísérleteinkben fontos szerepet játszó Ca^{2+} , valamint Mg^{2+} iránt (Kay és mtsai., 2003). Az EDPA alkalmazását követően kapott eredményeink nem bizonyultak eltérőnek a kontrollhoz képest, vagyis a dolgozatban leírt, TPEN által kiváltott hatások, az alacsony extracelluláris $[\text{Zn}^{2+}]$ -tól függetlenek.

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy alacsony koncentrációban alkalmazva (~50 μM) a vizsgált sejtek többségében (14-ből 9 sejt, 26-ből 15 kísérletben) a TPEN képes volt az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tranziens emelkedését kiváltani. Növelve a szer koncentrációját azt tapasztaltuk, hogy egyre kevesebb sejt volt képes Ca^{2+} -tranzienssel válaszolni, oly annyira, hogy 500 μM -

os koncentrációban alkalmazva a szer teljesen hatástalannak bizonyult. Sajnos nem világos számunkra, hogy egyes sejtek miért, akár ismételten is, más sejtek pedig egyáltalán nem válaszoltak a TPEN adagolását követően. Egy lehetséges feltevés szerint a $[Ca^{2+}]$ az SR membrán két oldalán (cytoplasmaticus, illetve lumenáris) ún. előaktivált állapotba helyezi a RyR-okat, amelyek aztán a felszabadító impulzus hatására könnyebben nyílnak meg.

A TPEN hatásmechanizmusának megértése érdekében fontosnak tűnt tisztázni, hogy a szabad, avagy a Ca^{2+} -ot kötött puffer hatását tapasztaltuk méréseink során. Azon kísérleteink, amelyeket csökkentett $[Ca^{2+}]_e$ mellett végeztünk, arra engednek következtetni, hogy az összes és nem a szabad, vagy Ca^{2+} -ot kötött [TPEN] felelős a tapasztalt hatásokért. Másrésztől nem tudjuk pontosan, hogy a szer serkentő hatását követően (alacsony koncentrációban alkalmazva) miért és hogyan eredményezett gátlást, ha növeltük a teljes [TPEN]-t.

Annak ellenére, hogy eredményeink azt mutatják a TPEN alacsony koncentrációban alkalmazva serkentő, míg magasabb koncentrációban alkalmazva, gátló hatást fejt ki a C2C12 sejtekre, ismereteinket nem tartjuk elegendőnek annak a lehetőségnek a kizárására, hogy magas koncentrációban a szer esetleg az SR membránban akkumulálódik. Ez, mint egy membrán impermeabilis Ca^{2+} -TPEN elegy, lecsökkenti az intralumináris $[Ca^{2+}]_i$ -t, amely így a leírt hatásokat eredményezte. A csökkent SR Ca^{2+} -tartalom (párhuzamosan a gátolt pumpamechanizmussal) magyarázatot adhatnak eredményeinkre. Kétségtelen, vagy az SR-en belüli pufferhatás, vagy a RyR receptorkomplex direkt gátlása jelen van (vannak) a pumpamechanizmus gátlása mellett, hiszen önmagában a SERCA-pumpa gátlása az $[Ca^{2+}]_i$ emelkedését eredményezné. Korábbi megfigyelések alapján tudjuk, hogy ugyanez a hatás érhető el más pumpablokkoló, például a TG használatakor (Sárközi és mtsai., 2000).

A pontos hatásmechanizmus ismereteinek hiánya ellenére adataink egyértelműen azt bizonyítják, hogy az oldatban jelenlévő teljes TPEN-koncentráció, és nem a szabad vagy Ca^{2+} -kötött TPEN felelős a Ca^{2+} -tranziensekre kifejtett hatásokért.

VI.2. TPEN hatása egyedi permeabilizált izomrostokon

Az $[Ca^{2+}]_i$ változás építőelemeinek számító elemi események vizsgálata egy fontos eszköz a sejtek Ca^{2+} -homeosztázisának tanulmányozásában. Ezen események mind megjelenésükben, mind jellemző paramétereik tekintetében különböznek emlősök (Conklin és mtsai., 2000; Kirsch és mtsai., 2001; Zhou és mtsai., 2003), illetve kétélűek esetében (Tsigorka és mtsai., 1995; Klein és mtsai., 1996). Korábbi vizsgálatok alapján kiderült, hogy

ECRE-eket intakt, fluo-3-mal jelölt, illetve átvágott emlős izomrostokon nem lehet megfigyelni. Kirsch és mtsai. (2001) által leírt módszert követve kísérleteinket úgynevezett kémiaailag nyúzott rostokon végeztük. Az ily módon előkészített, majd membránpermeabilizált emlős izomrostokon az elemi események mindkét formája, tehát *sparkok*, és *emberök* is, megfigyelhetők voltak. Az események relatív frekvenciája békaizom esetében sokkal nagyobb (ahol csupán *sparkok* detektálhatók). Mérési adataink elemzéséhez térbeli és időbeli karakterisztikán alapuló elemi eseményeket detektáló módszert alkalmaztunk. Mindez lehetővé tette, hogy összehasonlítsuk a kontroll körülmények közt, valamint a TPEN jelenlétében rögzített eseményeket.

A permeabilizált rostokon kapott eredményeink azt mutatják, hogy a TPEN befolyásolta az izomrostok Ca^{2+} -homeosztázisát az által, hogy direkt hatást gyakorolt a kalciumfelszabadulási mechanizmus két kulcsszereplőjére: a RyR-ra és a SERCA-pumpára. Alacsony koncentrációban használva (50 μM TPEN) a béka vázizomrostokon rögzített *sparkok* frekvenciája megnőtt, és a CICR mechanizmus hatékonyabbnak bizonyult; míg magas koncentrációban alkalmazva (200, 500 μM TPEN) a szer gátolta a Ca^{2+} mozgását az SR membrán mindkét oldalán.

Béka vázizomrostokon 50 μM -os koncentrációban a TPEN képes volt spontán kialakuló kalciumfelszabadulási eseményeket létrehozni, és nem csak növelte az események frekvenciáját, de tovaterjedő *sparkok*at eredményezett. Megjegyzendő, hogy e hatások egyike sem volt megfigyelhető emlős izomrostokon, valamint emelt $[\text{Mg}^{2+}]_i$ körülmények között béka izomrostokon. Svájci kollaborációs partnerünk szívizomsejteken végzett kísérletei alapján ismert volt, hogy a TPEN képes Ca^{2+} -hullámokat eredményezni. Ezen adatok fényében úgy tűnt, hogy a TPEN elősegíti a CICR mechanizmust, amely aztán előidézzi a Ca^{2+} által létrehozott RyR aktivációt. E megfigyelésekkel párhuzamosan, hasonló koncentrációban (50 μM) a szernek jóval erőteljesebb hatása volt, izolált lipid bilayer-be ágyazott csatornákon, amikor a *cis* $[\text{Ca}^{2+}]$ 50 μM -os volt az alacsonyabb 470 nM-os koncentrációhoz képest.

Várakozásainkkal ellentétben, amikor növeltük a szer koncentrációját, az elemi események gátlását figyeltünk meg, a csökkentett $[\text{Mg}^{2+}]_i$ ellenére. E gátlás az események frekvenciájában, valamint a jellegzetes paraméterek értékeiben is megmutatkozott. Úgy gondoljuk, hogy e gátlásért legalább három különböző mechanizmus tehető felelőssé:

ha a megemelt TPEN-koncentráció tovább stimulálja a csatorna nyitva tartását, az a raktár kiürüléséhez vezethet.

a SERCA pumpa gátlása révén a TPEN gátolhatja a Ca^{2+} visszavételét az SR-be, ami szintén a raktár kiürüléséhez vezet.

magas koncentrációkban a szer direkt módon gátolhatja a RyR-t. Izolált receptorokon végzett kísérleteink mindhárom lehetőségre nyújtottak információt.

VI.3. TPEN hatása izolált RyR-on

Az izolált RyR-on végzett méréseink azt bizonyították, hogy negatív membránpotenciál értékek esetén, alacsony *cis* $[\text{Ca}^{2+}]$ fenntartása mellett a TPEN-koncentráció növelését követően jelentősen megnőtt a csatorna nyitvatartási valószínűsége (P_0). E körülmények között 50 μM -nál nagyobb [TPEN] használatát követően azt tapasztaltuk, hogy tovább nőtt a P_0 , melynek következtében, enyhén emelkedett $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -nak kellett volna jelentkeznie. Mivel a teljes sejtes Ca^{2+} -méréseink során az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedése 500 μM TPEN használata során egyszer sem volt megfigyelhető, valószínűtlennek tűnik, hogy a szer gátló hatása csupán a csatorna aktivációját követően a raktár deplécióját befolyásolja. Adataink világosan mutatják, hogy a TPEN gátolja a SR pumpa hidrolitikus aktivitását. Ez a gátlás a puffer viszonylag magas koncentrációjának használatakor jelentkezik (EC_{50} nagyobb, mint 600 μM). Feltételezve, hogy 500 μM TPEN jelenlétében a SERCA-pumpa gátlása mintegy 45%-os, mely gátlás elegendő az SR-újrátöltés megakadályozásához, logikus elvárásnak tűnt a korábban leírt pumpagátlók alkalmazása során (például TG, Sárközi és mtsai., 2000), vagy megnőtt SR elcsorgás („leak”) esetén a magasabb $[\text{Ca}^{2+}]_i$. E jelenségek hiánya miatt csupán a magas koncentrációban alkalmazott TPEN által történő RyR direkt gátlásával magyarázható a jelentősen lecsökkent SR kalciumfelszabadulás.

Összegzésként megállapítható, hogy a Ca^{2+} -release csatorna maximálisan aktiválható magas *cis* $[\text{Ca}^{2+}]$ esetén 50 μM TPEN által, míg pozitív membránpotenciál értékeknél magasabb [TPEN] alkalmazásakor egyértelmű gátlás jelentkezik. A lipid bilayer-eken kapott adataink rámutattak arra, hogy a TPEN aktiváló hatása a *cis* $[\text{Ca}^{2+}]$ függvénye, de a pontos hatásmechanizmus tisztázatlan maradt. Minden bizonnyal kizárható a Ca^{2+} pufferelemzése a kelátor által, hiszen a bilayer mérések során különös figyelmet szenteltünk a szabad $[\text{Ca}^{2+}]$ konstans értéken való tartására, valamennyi tesztelt [TPEN] esetén.

Adataink alapján a TPEN egy lehetséges hatásmechanizmusát a következőképpen írnanánk le: feltételezve, hogy a szer érzékenyíti a RyR-okat, a Ca^{2+} révén felváltva aktiválva és

inaktíválva azokat, a növelt TPEN-koncentráció egyre inkább balra tolódást eredményez a harang alakú aktivációs-inaktívációs görbén (Sárközi és mtsai., 2000). Alacsony $[Ca^{2+}]$ –nál növelve a pufferkoncentrációt, növekvő aktivációt figyelhetünk meg, amely a harang alakú görbe felszálló szárán jelentkezik. Magasabb $[Ca^{2+}]$ -nál a Ca^{2+} -aktivációs és -inaktívációs görbe leszálló száránál a magasabb [TPEN] esetén gátlás figyelhető meg.

VI.4. Kalciumfelszabadulási események PMI állatmodellen

A PMI állatok Ca^{2+} -homeosztázisát illetően az irodalmi adatok változatosak. Perreault és mtsai. (1993) csökkent SR Ca^{2+} -felszabadulásról, lelassult SR Ca^{2+} -visszavételről, és csökkent erő kifejtésről számolt be patkány EDL izmon, krónikus szívelégtelenség esetén. Ezzel ellentétben, Lunde és mtsai. (2006) változatlan rángási- és tetanusz-erőről számolt be patkány FDB rostokon, míg a lassú soleus izom módosult kontraktilis tulajdonságokkal rendelkezett.

Ward és mtsai. 2003-ban publikálták az első egyedi rostokon végzett kísérleteket, és tanulmányukban az elemi események módosult tér- és időbeli tulajdonságairól számoltak be. Munkájuk során kimutatták, hogy krónikus szívelégtelenségben a vázizom típusú RyR hiperfoszforilációja következtében az FKBP12 leválik a RyR-ről. Az FKBP-mentes csatornák szinkronizálatlanul működnek (sérül a „coupled-gating”), és a monomerek összehangolatlan működése miatt szubkonduktancia-állapotokat produkálnak. Ezek a változások a CRU szintjén a *spark* amplitúdójának csökkenéséhez, és az *ember*ök arányának növekedéséhez vezethetnek, ami megmagyarázza az izom kontrakciós erejének csökkenését is. Az eddig rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján számításba jön, hogy az ellentmondások oka a különböző kísérleti körülményekben rejlik. Egyes friss kutatási eredmények azt sugallják, hogy extrém magas luminális $[Ca^{2+}]$ -k (53 mM) csökkentik a RyR FKBP iránti affinitását (Laver és mtsai., 2004).

Munkacsoportunk által elvégzett töltésmozgás- és depolarizáció-indukált Ca^{2+} -tranzienk kísérletek során (Szigeti és mtsai., 2007) azt találtuk, hogy a töltésmozgás feszültségfüggése nem mutatott változást a kontroll csoporthoz képest, viszont az SR Ca^{2+} -felszabadulás jelentősen lecsökkent, a feszültségfüggése pedig balra tolódott, a pozitív feszültségértékek felé. A lecsökkent SR Ca^{2+} -felszabadulás háttérében álló történések megértése érdekében elemi eseményeket rögzítettünk permeabilizált izomrostokon. A myocardialis infarktuson átesett állatok esetén mindkét elemi esemény típus (*spark* és *ember*) megfigyelhető volt, azzal

a különbséggel, hogy az *emberök sparkokhoz* viszonyított relatív aránya szignifikánsan nagyobb volt a kontrollban rögzített események azonos arányához képest.

Az események amplitúdója lecsökkent (3. táblázat), és a Ca^{2+} -fluxus is kisebb volt a PMI rostokban ($1,42 \pm 0,25 \mu\text{m}^3\text{ms}^{-1}$ vs $2,59 \pm 0,24 \mu\text{m}^3\text{ms}^{-1}$). Konzekvens módon a megnövekedett csúcs eléréséhez szükséges idő (TTP) mellett, a *sparkok* rise time-ja is megnőtt (valószínűleg az alacsonyabb amplitúdó miatt). Ezen adatok alacsonyabb SR tartalomra utalnak, vagy a RyR-ok módosult működésével magyarázhatók. Annak ellenére, hogy nemrégiben a mitokondriumok szerepe is szóba került a *sparkok* tér- és időbeli profiljának jellemzésében (De Sousa és mtsai., 2000), a globális Ca^{2+} -tranziens kialakításában foglalt minimális szerepe valamint a myoplasma magas pufferkapacitása miatt úgy gondoljuk, hogy kísérleteinkben a mitokondriumok szerepe minimális.

Intézetünk másik munkacsoportja megvizsgálta a Ca^{2+} -release csatorna egyedi tulajdonságait lipid bilayer-be ágyazott receptorokon, feszültség-clamp körülmények között (Szigeti és mtsai., 2007). Azt találták, hogy a receptor konduktanciája nem változott negatív, viszont megnőtt pozitív membránpotenciál értékek esetén. A Ca^{2+} -szenzitivitást leíró harang alakú görbe szélesebbnek bizonyult a PMI állatok esetén.

Mivel a RyR-ok konduktanciája negatív membránpotenciál értékeknél változatlan, az SR Ca^{2+} -tartalom (Ward és mtsai., 2003 munkája alapján) szintén változatlan kontroll és PMI állatok esetén, a csökkent amplitúdó és az SM értékek, valamint a *spark-ember* arány megváltozása arra engednek következtetni, hogy egy *spark* alatt, az egyszerre megnyíló RyR-ok átlagos száma, a Ca^{2+} hajtóereje, vagy mindkettő lecsökken krónikus szívelégtelenség esetén. Ezen adatok talán megmagyarázhatják a krónikus szívelégtelenségben jelentkező csökkent vázizom-kontraktilitást.

VII. Összefoglalás

Kísérleteink célja a tenyésztett, valamint felnőtt emlős, illetve béka vázizomsejtek Ca^{2+} -homeosztázisa, globális és lokális kalciumfelszabadulási eseményeinek vizsgálata volt egy alacsony affinitású nehézfém-kelátor, a TPEN jelenlétében. Vizsgálni kívántuk még a kalciumfelszabadulás háttérében álló elemi eseményeket egy a krónikus szívelégtelenséget modellező állatmodell, a PMI patkányok esetén.

Kimutattuk, hogy tenyésztett C2C12 egér myoblastokban a sejtek válaszkészsége, és a Ca^{2+} -tranziensek amplitúdója fokozódik alacsony TPEN-koncentráció használatakor (20, 50 μM), míg egy nagyságrenddel magasabb koncentrációban (500 μM) a szer a depolarizáció-, illetve agonista-indukált Ca^{2+} -felszabadulás gátlását eredményezte.

További kísérleteinkben sikerült meghatározni az egész sejtre kiterjedő kalciumfelszabadulások háttérében álló elemi kalciumfelszabadulási események jellemző paramétereit emlős, valamint béka vázizomban. Kimutattuk, hogy béka izomrostok esetén csökkentett $[\text{Mg}^{2+}]_i$ mellett, alacsony koncentrációban a TPEN megváltoztatja ezeket a paramétereket, növeli az események előfordulási valószínűségét, valamint a térbeli kiterjedést, csökkenti az amplitúdót; de legérdekesebb megfigyelés az volt, hogy tovaterjedő eseményeket eredményez. A *makrosparkok* soha nem voltak megfigyelhetők enyhén megemelt $[\text{Mg}^{2+}]_i$ használatakor vagy emlős rostok esetén.

Patológias körülmények között, például krónikus szívelégtelenségben, a Ca^{2+} -homeosztázis zavara következik be, továbbá megváltozik az elemi események előfordulási aránya is. Az általunk vizsgált PMI patkányokban az *emberök* gyakrabban fordultak elő, mint kontroll körülmények között; továbbá az egyidejűleg megnyíló csatornák száma is szignifikánsan lecsökkent.

Úgy gondoljuk, hogy eredményeink hozzájárulhatnak a TPEN hatásmechanizmusának megértéséhez, amely így a vázizomsejtek Ca^{2+} -homeosztázisának jobb megismeréséhez vezet normál, valamint patológias körülmények között.

Summary

Our experiments aimed at the investigation of the calcium homeostasis of cultured skeletal muscle myotubes and adult mammalian and amphybian skeletal muscle fibers in the presence of a low affinity heavy metal chelator – TPEN. We were also interested in studying the properties of elementary calcium release events in a chronic heart failure rat animal model.

On C2C12 mouse myotubes in culture, we have shown that low concentrations (20, 50 μM) of TPEN increased the responsiveness and the amplitude of Ca^{2+} -transients. In contrast, when applying the drug in higher concentrations (500 μM), it seemed to suppress not only the removal of Ca^{2+} from the myoplasm but also the peak of the depolarization- and agonist-induced Ca^{2+} transients and the underlying Ca^{2+} -flux.

Further experiments carried out on mammalian and amphybian single skeletal muscle fibers were meant to investigate the properties of the building blocks of the global Ca^{2+} -release, namely the elementary calcium release events (ECRE). On amphybian skeletal muscle fibers we have shown that in the presence of lowered $[\text{Mg}^{2+}]_i$, low concentration of TPEN (50 μM) altered the characteristic parameters of ECRE, increasing the frequency and the FWHM, decreasing the amplitude, but most importantly, evoking travelling *sparks*. These travelling *sparks* (also called *macrosparks*) were never observed in case of mammals or when using slightly increased $[\text{Mg}^{2+}]_i$.

Several studies have reported that under pathological conditions, like chronic heart failure, characterized with altered Ca^{2+} -homeostasis properties, the ECREs are showing modified frequencies. In our hands, confocal microscopy experiments carried out on single skeletal muscle fibers obtained from a CHF animal model, confirmed these observations. The *spark-ember* ratio changed dramatically compared to the control group, along with the number of simultaneously opening channels, which were significantly decreased in the PMI rats.

Taken all this together, we think that our data can contribute to the better understanding of the putative effects of TPEN on the calcium release mechanism, and with this to elucidate certain aspects of Ca^{2+} -homeostasis in skeletal muscle cells under normal and pathological conditions.

VIII. Irodalomjegyzék

A

- Almássy J., Sztretye M., Lukács B., Dienes B., Szabó L., Szentesi P., Vassort G., Csernoch L., Jóna I. (2008):** Effects of K-201 on the calcium pump and calcium release channel of rat skeletal muscle. *Pflugers Arch.* 457(1):171-83.
- Anderregg G., Wenk F. (1967):** Pyridinderivatives als komplexbildner VIII die herstellung je eines neuen vier-und sechszahnigen liganden. *Helv. Chim. Acta.* 50: 2330-2332.
- Anderson K., Lai F.A., Liu Q.Y., Rousseau E., Erikson 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.
- Armstrong C.M., Bezanilla F.M., Horowicz P. (1972):** Twitches in the presence of ethylene glycol bis(-aminoethyl ether)-N,N'-tetracetic acid. *Biochim. Biophys. Acta.* 267(3):605-8.
- Arslan P., Di Virgilio F., Beltrame M., Tsien R.Y., Pozzan T. (1985):** Cytosolic Ca^{2+} homeostasis in Ehrlich and Yoshida carcinomas. A new, membrane-permeant chelator of heavy metals reveals that these ascites tumor cell lines have normal cytosolic free Ca^{2+} , *J. Biol. Chem.* 260.:2719-2727.

B

- Baylor S.M., Chandler W.K., Marshall M.W. (1983):** Sarcoplasmic reticulum calcium release in frog skeletal muscle fibres estimated from Arsenazo III calcium transients.
- Beam B.P. (1984):** Nitrendipine block of cardiac calcium channels: high-affinity binding to the inactivated state. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81(20):6388-92.
- Bennett D.L., Cheek T.R., Berridge M.J., De Smedt H., Parys J.B., Missiaen L., Bootman M.D. (1996):** Expression and function of ryanodine receptors in nonexcitable cells. *J. Biol. Chem.* 271(11):6356-62.
- Bertocchini F., Ovitt C.E., Conti A., Barone V., Scholer H.R., Bottinelli R., Reggiani C., Sorrentino V. (1997):** Requirement for the ryanodine receptor type 3 for efficient contraction in neonatal skeletal muscles. *EMBO J.* 16:6956-63.

- Block B.A., Imagawa T., Campbell K.P., Franzini-Armstrong C. (1988):** Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 107:2587-600.
- Brandt N.R., Caswell A.H., Wen S.R., Talvenheimo J.A. (1990):** Molecular interactions of the junctional foot protein and dihydropyridine receptor in skeletal muscle triads. *J. Membr. Biol.* 113(3):237-51.
- Brillantes A.B., Ondrias K., Scott A., Kobrinsky E., Odriasova E., Moschella M.C., Jayaraman T., Landers M., Ehrlich B.E., Marks A.R. (1994):** Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell.* 77: 513-523.

C

- Caroppo R., Colella M., Colasuonno A., DeLuisi A., Debellis L., Curci S., Hofer A.M. (2003):** A reassessment of the effects of luminal $[Ca^{2+}]$ on inositol 1,4,5-triphosphate-induced Ca^{2+} release from internal stores. *J. Biol. Chem.* 278: 39503-39508.
- Catterall W.A. (1995):** Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu. Rev. Biochem.* 64:493-531.
- Chandler W.K., Hollingworth S., Baylor S.M. (2003):** Simulation of calcium sparks in cut skeletal muscle fibers of the frog. *J. Gen. Physiol.* 121:311–324.
- Cheng H., Lederer W.J., Cannell M.B. (1993):** Calcium sparks: elementary events underlying excitation contraction coupling in heart muscle. *Science.* 262:740-744.
- Cheng H., Lederer W.J. (2008):** Calcium sparks. *Physiol Rev.* 88(4):1491-545.
- Chimienti F., Seve M., Richard S., Mathieu J., Favier A. (2001):** Role of cellular zinc in programmed cell death: temporal relationship between zinc depletion, activation of caspase, and cleavage of Sp family transcription factors., *Biochem. Pharmacol.* 62:51-62.
- Collet C., Csernoch L., Jacquemond V. (2003):** Intramembrane charge movement and L-type calcium current in skeletal muscle fibers isolated from control and mdx mice. *Biophys. J.* 84(1):251-65.
- Conklin M.W., Ahern C.A., Vallejo P., Sorrentino V., Takeshima H., Coronado R. (2000):** Comparison of Ca^{2+} sparks produced independently by two ryanodine receptor isoforms (type 1 or type 3). *Biophys. J.* 78:1777-1785.

- Conti A., Gorza L., Sorrentino V. (1996):** Differential distribution of ryanodine receptor type 3 (RyR3) gene product in mammalian skeletal muscles. *Biochem. J.* 316 (Pt 1), 19-23.
- Coronado R., Morrisette J., Sukhareva M., Vaughan D.M. (1994):** Structure and function of ryanodine receptors. *Am. J. Physiol.* 266:C1485-1504.
- Csernoch L. (1999):** Regulation of the ryanodine receptor calcium release channel of the sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle. *Acta Physiol. Hung.* 86(2):77-97.
- Csernoch L., Szentesi P., Kovács L. (1999):** Differential effects of caffeine and perchlorate on excitation-contraction coupling in mammalian skeletal muscle. *J. Physiol.* 520:1:217-30.
- Csernoch L. (2007):** Sparks and embers of skeletal muscle: the exciting events of contractile activation. *Pflugers Arch.* 454(6):869-78.

D

- Damiani E., Salvatori S., Margreth A. (1990):** Characterization of calsequestrin of avian skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 11:48-55.
- De Sousa E., Veksler V., Bigard X., Mateo P., Ventura-Clapier R. (2000):** Heart failure affects mitochondrial but not myofibrillar intrinsic properties of skeletal muscle. *Circulation.* 102:1847–1853
- Dirksen. R.T., Beam K.G. (1995):** Single calcium channel behaviour in native skeletal muscle. *J Gen Physiol.* 105 (2): 227-47.

E

- Eisenberg B.R. (1983):** Quantitative ultrastructure of mammalian skeletal muscle. In *Handbook of Physiology, section 10, Skeletal Muscle*, ed. Peachy LD, Adrian RH and Geiger SR. American Physiological Society, Bethesda, MD, USA.
- Endo M., Tanaka M., Ogawa Y. (1970):** Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. *Nature.* 228(5266):34-6.
- Eu J.P., Xu L., Stamler J.S., Meissner G. (1999):** Regulation of ryanodine receptors by reactive nitrogen species. *Biochem. Pharmacol.* 57:1079-1084.
- Eu J.P., Sun J., Xu L., Stamler J., Meissner G. (2000):** The Skeletal Muscle Calcium Release ChannelCoupled O₂ Sensor and NO Signaling Functions. *Cell*, 102:499-509

F

- Fabiato A. (1983):** Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol.* 245(1):C1-14. Review.
- Fabiato A., Fabiato F. (1975):** Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *J. Physiol.* 249: 469-495.
- Fill M., Copello J.A. (2002):** Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol. Rev.* 82(4):893-922.
- Flucher B.E., Conti A., Takeshima H., Sorrentino V. (1999):** Type 3 and type 1 ryanodine receptors are localized in triads of the same mammalian skeletal muscle fibers. *J. Cell Biol.* 146(3):621-30.
- Fodor J., Gönczi M., Sztretye M., Dienes B., Oláh T., Szabó L., Csoma E., Szentesi P., Szigeti G.P., Marty I., Csernoch L. (2008):** Altered expression of triadin 95 causes parallel changes in localized Ca^{2+} release events and global Ca^{2+} signals in skeletal muscle cells in culture. *J. Physiol.* 586(Pt 23):5803-18.
- Ford L.E., Podolsky R.J. (1970):** Regenerative calcium release within muscle cells. *Science.* 167, 58-59.
- Franzini-Armstrong C. (1970):** Natural variability in the length of thin and thick filaments in single fibres from a crab, *Portunus depurator*. *J. Cell Sci.* 6(2):559-92.
- Franzini-Armstrong C., Peachey L.D. (1981):** Striated muscle-contraction and control mechanisms. *J. Cell Biol.* 91(3 Pt 2):166s-186s.
- Franzini-Armstrong C., Nunzi G. (1983):** Junctional feet and particles in the triads of a fast-twitch muscle fibre. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 4(2):233-52.
- Franzini-Armstrong C., Pincon-Raymond M., Rieger F. (1991):** Muscle fibers from dysgenic mouse in vivo lack a surface component of peripheral couplings. *Dev. Biol.* 146(2):364-76.
- Franzini-Armstrong C., Protasi F. (1997):** Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions. *Physiol Rev.* 77(3):699-729.
- Franzini-Armstrong C., Protasi F., Ramesh V. (1998):** Comparative ultrastructure of Ca^{2+} release units in skeletal and cardiac muscle. *Ann. NY. Acad. Sci.* 853:20-30.
- Franzini-Armstrong C. (1999):** The sarcoplasmic reticulum and the control of muscle contraction. *FASEB J.* 13 Suppl 2, S266-70.

Fryer M.W., Stephenson D.G. (1996): Total and sarcoplasmic reticulum calcium contents of skinned fibres from rat skeletal muscle. *J. Physiol.* 493 (Pt 2), 357-370.

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.

G

González A., Kirsch W.G., Shirokova N., Pizarro G., Stern M.D., Ríos E. (2000): The spark and its ember: separately gated local components of Ca²⁺ release in skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 2115(2):139-58.

Goonasekera S., Beard N., Groom L., Kimura T., Lyfenko A., Rosenfeld A., Marty I., Dulhunty A., Dirksen R. (2007): Triadin binding to the C-terminal luminal loop of the ryanodine receptor is important for skeletal muscle excitation contraction coupling. *J. Gen. Physiol.* 130(4):365-78.

Gregorio C.C., Antin P.B. (2000): To the heart of myofibril assembly. *Trends Cell Biol.* 10(9):355-62.

Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. (1985): A new generation of calcium indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260: 3440-3450.

Györke S., Fill M. (1993): Ryanodine receptor adaptation: control mechanism of Ca²⁺-induced Ca²⁺- release in heart. *Science.* 260:807-809.

H

Hermann-Frank A., Darling E., Meissner G. (1991): Functional characterization of the Ca²⁺-gated calcium release channel of vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Pflügers Arch.* 418:353-359.

Hosey M.M., Borsotto M., Lazdunski M. (1986): Phosphorylation and dephosphorylation of dihydropyridine-sensitive voltage-dependent Ca²⁺ channel in skeletal muscle membranes by cAMP- and Ca²⁺-dependent processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:3733-3737.

I

Inesi G., Sagara Y. (1994): Specific inhibitors of intracellular Ca^{2+} transport ATPases. *J. Membr. Biol.* 141(1):1-6.

J

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.

Jones L.R., Zhang L., Sanborn K., Jorgensen A.O., Kelley J. (1995): Purification, primary structure, and immunological characterization of the 26-kDa calsequestrin binding protein (junctin) from cardiac junctional sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 270(51):30787-96.

Jones S.W. (1998): Overview of voltage-dependent calcium channels. *J. Bioenerg. Biomembr.* 30:299-312.

Jorgensen A.O., Shen A.C., Arnold W., Leung A.T., Campbell K.P. (1989): Subcellular distribution of the 1,4-dihydropyridine receptor in rabbit skeletal muscle in situ: An immunofluorescence and immunocolloidal gold-labeling study. *J. Cell. Biol.* 109:135-147.

Jung C., Zima A.V., Szentesi P., Jóna I., Blatter L.A., Niggli E. (2007): Ca^{2+} release from the Sarcoplasmic Reticulum activated by the low affinity Ca^{2+} chelator TPEN in ventricular myocytes. *Cell Calcium.* 41:187-194.

K

Karon B.S., Nissen E.R., Voss J., Thomas D.D. (1995): A continuous spectrophotometric assay for simultaneous measurement of calcium uptake and ATP hydrolysis in sarcoplasmic reticulum. *Anal Biochem.* 227(2):328-33.

Kawamoto R.M., Brunschwig J.P., Kim K.C., Caswell A.H. (1986): Isolation, characterization, and localization of the spanning protein from skeletal muscle triads. *J. Cell Biol.* 103(4):1405-14.

- Kawamoto R.M., Brunshwig J.P., Caswell A.H. (1988):** Localization by immunoelectron microscopy of spanning protein of triad junction in terminal cisternae/triad vesicles. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 9(4):334-43.
- Kay A.R. (2003):** Evidence of chelatable zinc in the extracellular space of the hippocampus, but little evidence for synaptic release of Zn. *J. Neuroscience.* 23:6847-6855.
- Kirsch W.G., Uttenweiler D., Fink R.H. (2001):** Spark- and ember-like elementary Ca^{2+} release events in skinned fibres of adult mammalian skeletal muscle. *J. Physiol.* 537(2):379-89.
- Klein M.G., Cheng H., Santana L.F., Jiang Y.H., Lederer W.J., Schneider M.F. (1996):** Two mechanisms of quantized calcium release in skeletal muscle. *Nature.* 379(6564):455-8.
- Knudson C.M., Stang K.K., Jorgensen A.O., Campbell K.P. (1993):** Biochemical characterization of ultrastructural localization of a major junctional sarcoplasmic reticulum glycoprotein (triadin). *J. Biol. Chem.* 268:12637-12645.
- Kondo R.P., Weiss J.N., Goldhaber J.I. (2000):** Putative ryanodine receptors in the sarcolemma of ventricular myocytes. *Pflügers Arch.* 440:125-131.
- Kongsamut S., Kamp T.J., Miller R.J. (1985):** Calcium channel agonist and antagonist effects of the stereoisomers of the dihydropyridine 202-791. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 130:141-148.

L

- Lacampagne A., Klein M.G., Schneider M.F. (1998):** Modulation of the frequency of spontaneous sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release events (Ca^{2+} sparks) by myoplasmic $[\text{Mg}^{2+}]$ in frog skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 111(2):207-24.
- Lai F.A., Erickson H.P., Rousseau E., Liu Q.Y., Meissner G. (1988):** Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature.* 33:315-319.
- Lai F.A., Dent M., Wichenden C., Xu L., Kumari G. (1992a):** Expression of a cardiac Ca^{2+} release channel isoform in mammalian brain. *Biochem J.* 288:553-564.
- Lai F.A., Liu Q., Xu L., El-Hashem A., Kramarcy N. R. (1992b):** Amphibian ryanodine receptor isoforms are related to those of mammalian skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 263:C365-372.

- Launikonis B.S., Zhou J., Royer L., Shannon T.R., Brum G., Ríos E. (2005):** Confocal imaging of $[Ca^{2+}]$ in cellular organelles by SEER, shifted excitation and emission ratioing of fluorescence. *J. Physiol.* 567:523-543.
- Laver D.R., O'Neill E.R., Lamb G.D. (2004):** Luminal Ca^{2+} -regulated Mg^{2+} Inhibition of Skeletal RyRs Reconstituted as Isolated Channels or Coupled Clusters. *J Gen Physiol.* 124:741-758.
- Liu G., Pessah IN. (1994):** Molecular interaction between ryanodine receptor and glycoprotein triadin involves redox cycling of functionally important hyperreactive sulfhydryls. *J.Biol. Chem.* 269(52):33028-34.
- Liu X., Ambudkar I.S. (2001):** Characteristics of a store-operated calcium-permeable channel: sarcoendoplasmic reticulum calcium pump function controls channel gating. *J. Biol.Chem.* 276:29891-29898.
- Loke J., MacLennan D. (1998):** Malignant hyperthermia and central core disease: Disorders of Ca^{2+} release channels. *The American Journal of Medicine.* vol.104, pp.470-486.
- Loukianov E., Ji Y., Baker D.L., Reed T., Babu J., Loukianova T., Greene A., Shull G., Periasamy M. (1998):** Sarco(endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase isoforms and their role in muscle physiology and pathology. *Annals NY. Acad. Sci.* 853:251-259.
- Lukács B., Sztretye M., Almássy J., Sárközi S., Dienes B., Mabrouk K., Simut C., Szabó L., Szentesi P., De Waard M., Ronjat M., Jóna I., Csernoch L. (2008):** Charged surface area of maurocalcine determines its interaction with the skeletal ryanodine receptor. *Biophys J.* 95(7):3497-509.
- Lunde P.K., Sejersted O.M., Thorud H.M., Tonnessen T., Henriksen U.L., Christensen G., Westerblad H., Bruton J. (2006):** Effects of congestive heart failure on Ca^{2+} handling in skeletal muscle during fatigue. *Circ. Res.* 98:1514-1519.
- Lytton J., Westlin M., Burk S.E., Shull G.E., MacLennan D.H. (1992):** Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *J. Biol. Chem.* 267:14483-14489.

M

- Ma J. (1993):** Block of ruthenium red of the ryanodine-activated calcium release channel of skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 102: 1031-1056.
- MacKrell J.J. (1999):** Protein-protein interactions in intracellular Ca^{2+} -release channel function. *Biochem. J.* 337(3):345-61.

- MacLennan D.H., Rice W.J., Green N.M. (1997):** The mechanism of Ca^{2+} transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases. *J. Biol. Chem.* 272:28815-28818.
- Maier A., Leberer E., Pette D. (1986):** Distribution of sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase and of calsequestrin in rabbit and rat skeletal muscle fibers. *Histochemistry.* 86:63-9.
- Marks A.R. (2000):** Cardiac intracellular calcium release channels. Role in heart failure. *Circ. Res.* 87:8-11.
- Martonosi A.N., Pikula S. (2003):** The network of calcium regulation in muscle. *Acta Biochim. Pol.* 50(1):1-30.
- Marty I., Thevenon D., Scotto C., Groh S., Sainnier S., Robert M., Grunwald D., Villaz M. (2000):** Cloning and characterization of a new isoform of skeletal muscle triadin. *J. Biol. Chem.* 275:8206-12.
- Marty I., Fauré J., Lieuvain A.F., Vassilopoulos S., Oddoux S., Brocard J. (2009):** Triadin: What possible function 20 years later? *J Physiol.* 587(Pt 13):3117-21. Review.
- Marx S.O., Ondrias K., Marks A.R. (1998):** Coupled gating between individual skeletal muscle Ca^{2+} release channels (ryanodine receptors). *Science.* 281(5378):818-21.
- Maylie J., Irving M., Sizto N.L., Chandler W.K. (1987):** Calcium signals recorded from cut frog twitch fibers containing antipyrylazo III. *J. Gen. Physiol.* 89:83-143.
- McGrew S.G., Wolleben C., Siegl P., Inui M., Flescher S. (1989):** Positive cooperativity of ryanodine binding to the calcium release channel of the sarcoplasmic reticulum from heart and skeletal muscle. *Biochemistry.* 28:1686-1691.
- 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(1):236-44.
- Meissner G. (1994):** Ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annu. Rev. Physiol.* 56:485-508.
- Meissner G. (2002):** Regulation of mammalian ryanodine receptors. *Front Biosci.* 7:d2072-80.
- Melzer W., Rios E., Schneider M.F. (1984):** Time course of calcium release and removal in skeletal muscle fibers. *Biophys. J.* 45(3):637-41.
- Melzer W., Herrmann-Frank A., Lüttgau H.C. (1995):** The role of Ca^{2+} ions in excitation-contraction coupling of skeletal muscle fibres. *Biochim. Biophys. Acta.* 1241(1):59-116.
- Mitchell R.D., Simmerman H.K., Jones L.R. (1988):** Ca^{2+} binding effects on protein conformation and protein interactions of canine cardiac calsequestrin. *J. Biol. Chem.* 263(3):1376-81.

- Mobley B.A., Eisenberg B.R. (1975):** Sizes of components in frog skeletal muscle measured by methods of stereology. *J. Gen. Physiol.* 66:31-45.
- Monnier N., Lunardi J. (2000):** Biology of malignant hyperthermia: a disease of the calcium channels of the skeletal muscle. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*.58(2):147-56.
- Murayama T., Ogawa Y. (1997):** Characterization of type 3 ryanodine receptor (RyR3) of sarcoplasmic reticulum from rabbit skeletal muscles. *J. Biol. Chem.* 272(38):24030-7.
- Murayama T., Ogawa Y. (2002):** Roles of two ryanodine receptor isoforms coexisting in skeletal muscle. *Trends. Cardiovasc. Med.* 12(7):305-11.

N

- Neylon C.B., Richards S.M., Larsen M.A., Agrotis A., Bobik A. (1995):** Multiple types of ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels are expressed in vascular smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215(3):814-21.
- Niggli E. (1999):** Localized intracellular calcium signaling in muscle: calcium sparks and calcium quarks. *Annu. Rev. Physiol.* 61:311-335.
- Niggli E., Shirokova N. (2007):** A guide to sparkology: the taxonomy of elementary cellular Ca²⁺ signaling events. *Cell Calcium.* 379-387.

O

- Ogawa Y., Kurebayashi N., Murayama T. (1999):** Ryanodine receptor isoforms in excitation-contraction coupling. *Adv. Biophys.* 36:27-64.
- Ogawa Y., Kurebayashi N., Murayama T. (2000):** Putative roles of type 3 ryanodine receptor isoforms (RyR3). *Trends Cardiovasc. Med.* 10(2):65-70.
- Osame M., Engel A.G., Rebouche C.J., Scott R.E. (1981):** Freeze-fracture electronmicroscopic analysis of plasma membranes of cultured muscle cells in Duchenne dystrophy. *Neurology.* 31(8):972-9.

P

- Peachey L.D., Franzini-Armstrong C. (1983):** Structure and function of membrane systems of skeletal muscle cells. In „*Handbook of Physiology*”, ed. by Peachey L.D., Adrian R.H. et Geiger S.R., American Physiological Society, Baltimore, Section 10 pp:23-71.

- Perreault C.L., Gonzalez-Serratos H., Litwin S.E., Sun X., Franzini-Armstrong C., Morgan J.P. (1993):** Alterations in contractility and intracellular Ca^{2+} transients in isolated bundles of skeletal muscle fibers from rats with chronic heart failure. *Circ. Res.* 73:405-412.
- Perry S.V. (1994):** Activation of the contractile mechanism by calcium. In „*Myology*”, ed. by Engel A.G. and Franzini-Armstrong C., McGraw-Hill, Inc., New York, St. Louis, San
- Pochet R., Lawson D.E.M, Heinzmann C.W. (1990):** Calcium-binding proteins in normal and transformed cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 269:1-223.
- Pouvreau S., Royer L., Yi J., Brum G., Meissner G., Ríos E., Zhou J. (2007):** Ca^{2+} sparks operated by membrane depolarization require isoform 3 ryanodine receptor channels in skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 104(12):5235-40.
- Powis D.A., Zerbies M. (2002):** In situ chelation of Ca^{2+} in intracellular stores induces capacitive Ca^{2+} entry in bovine adrenal chromaffin cells. *Ann. NY Acad. Sci.* 971:150-152.
- Protasi F., Takekura H., Wang Y., Chen S.R., Meissner G., Allen P.D., Franzini-Armstrong C. (2000):** RYR1 and RYR3 have different roles in the assembly of calcium release units of skeletal muscle. *Biophys. J.* 79:2494-508.
- Protasi F. (2002):** Structural interaction between RYRs and DHPRs in calcium release units of cardiac and skeletal muscle cells. *Front. Biosci.* 7:650-8.

Q

- Qin N., Olcese R., Zhou J., Cabello O.A., Birnbaumer L., Stefani E. (1996):** Identification of a second region of the beta-subunit involved in regulation of calcium channel inactivation. *Am. J. Physiol.* 271(5 Pt 1):C1539-45.

R

- Rahkila P., Takala T.E., Parton R.G., Metsikko K. (2001):** Protein targeting to the plasma membrane of adult skeletal muscle fiber: an organized mosaic of functional domains. *Exp. Cell Res.* 267(1):61-72.
- Reid M. (2001):** Redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol.* 90: 724-731.

- Ríos E., Brum G. (1987):** Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Nature*. 325:717-720
- Ríos E., Pizarro G. (1988):** Voltage sensors and calcium channels of excitation-contraction coupling. *News in Physiological Sciences* 3:717-720.
- Ríos E., Stern M.D. (1997):** Calcium in close quarters: Microdomains feedback in excitation–contraction coupling. *Physiol. Rev.* 71:849-908.
- Ríos E., Launikonis B.S., Royer L., Brum G., Zhou J. (2006):** The elusive role of store depletion in the control of intracellular calcium release. *J Muscle Res. Cell Motility*. 27:337-50.
- Royer L., Ríos E. (2009):** Deconstructing calsequestrin. Complex buffering in the calcium store of skeletal muscle. *J Physiol.* 587 (Pt 13):3101-11. Review.
- Rudolf R., Magalhaes P.J., Pozzan T. (2006):** Direct in vivo monitoring of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} and cytosolic cAMP dynamics in mouse skeletal muscle. *J. Cell. Biol.* 173:187-193.

S

- Salviati G., Sorenson M.M., Eastwood A.B. (1982):** Calcium accumulation by the sarcoplasmic reticulum in two populations of chemically skinned human muscle fibers. effects of calcium and cyclic AMP. *J. Gen. Physiol.* 79:603-632.
- Sánchez J.A., Stefani E. (1983):** Kinetic properties of calcium channels of twitch muscle fibres of the frog. *J. Physiol.* 337:1-17.
- Sandow A. (1952):** Excitation contraction coupling in muscular response. *Yale J. Biol. Med.* 25:176-201.
- Sasmó M., Wagenknecht T. (1998):** Contributions of electron microscopy and single particle techniques to the determination of ryanodine receptor three-dimensional structure. *J. Struct. Biol.* 121:172-180.
- Sárközi S., Szegedi C., Szentesi P., Csernoch L., Kovács L., Jóna I. (2000):** Regulation of the rat sarcoplasmic reticulum calcium release channel by calcium. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 21(2):131-8.
- Sárközi S., Almássy J., Lukács B., Dobrosi N., Nagy G., Jóna I. (2007):** Effect of natural phenol derivatives on skeletal type sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and ryanodine receptor. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 10.10007/s10974-007-9113-x.

- Schneider M.F., Chandler W.K. (1973):** Voltage dependent charge movement in skeletal muscle: a possible step in excitation-contraction coupling. *Nature*. 242:244-246.
- Schneider M.F. (1999):** Ca²⁺ sparks in frog skeletal muscle: generation by one, some, or many SR Ca²⁺ release channels? *J. Gen. Physiol.* 113(3):365-72.
- Schuhmeier R.P., Dietze B., Ursu D., Lehmann-Horn F., Melzer W. (2003):** Voltage-activated calcium signals in myotubes loaded with high concentrations of EGTA. *Biophys. J.* 84:1068-1078.
- Schumaker D.K., Vann L.R., Goldberg M.W., Alled T.D., Wilson K.L. (1998):** TPEN, a Zn²⁺/Fe²⁺ chelator with low affinity for Ca²⁺, inhibits lamin assembly, destabilizes nuclear architecture and may independently protect nuclei from apoptosis in vitro, *Cell Calcium*. 23:151-164.
- Shirokova N., García J., Ríos E. (1998):** Local calcium release in mammalian skeletal muscle. *J. Physiol.* 512 (Pt 2):377-84.
- Shoshan-Barmatz V., Ashley R.H. (1998):** The structure, function, and cellular regulation of ryanodine-sensitive Ca²⁺ release channels. *Int. Rev. Cytol.* 183:185-270.
- Sitsapesan R., Williams A.J. (1990):** Mechanisms of caffeine activation of single calcium-release channels of sheep cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Physiol.* 423, 425-439.
- Smith J.S., Imagawa T., Ma J., Fill M., Campbell K.P., Coronado R. (1988):** Purified ryanodine receptor from rabbit skeletal muscle is the calcium-release channel of sarcoplasmic reticulum. *J. Gen. Physiol.* 92(1):1-26.
- Smith J.S., Rousseau E., Meissner G. (1989):** Calmodulin modulation of single sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-release channels from cardiac and skeletal muscle. *Circ. Res.* 64:352-359.
- Snitsarev V.A., McNulty T.J., Taylor C.W. (1996):** Endogeneous heavy metal ions perturb fura-2 measurements of basal and hormone-evoked Ca²⁺ signals, *Biophys. J.* 71: 1048-1056.
- Snitsarev V.A., Budde T., Stricker T.P., Cox J.M., Krupa D., Geng L., Kay A.R. (2001):** Fluorescent detection of Zn²⁺-rich vesicles with Zinquin: mechanism of action in lipid environments. *Biophys. J.* 80:1538-1546.
- Somlyo A.V., Gonzalez-Serratos H.G., Shuman H., McClellan G., Somlyo A.P. (1981):** Calcium release and ionic changes in the sarcoplasmic reticulum of tetanized muscle: An electron-probe study. *J. Cell Biol.* 90:577-594.

- Sorrentino V., Reggiani C. (1999):** Expression of the ryanodine receptor type 3 in skeletal muscle. A new partner in excitation-contraction coupling? *Trends Cardiovasc. Med.* 9:54-61.
- Shtifman A., Ward C.W., Wang J., Valdivia H.H., Schneider M.F. (2000):** Effects of imperatoxin A on local sarcoplasmic reticulum Ca(2+) release in frog skeletal muscle. *Biophys. J.* 79(2):814-27.
- Stern M.D., Pizarro G., Ríos E. (1997):** Local control model of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 110(4):415-40.
- Stern M.D., Lakatta E.G. (2002):** Excitation-contraction coupling in the heart: the state of the question. *FASEB J.* 6(12):3092-100.
- Stokes D.L., Zhang P., Toyoshima C., Yonekura K., Ogawa H., Lewis M.R., Shi D. (1998):** Cryoelectron microscopy of the calcium pump from sarcoplasmic reticulum: two crystal forms reveal two different conformations. *Acta Physiol. Scand.* 163 (Suppl 643): 35-43.
- Strand M.A., Louis C.F., Mickelson J.R. (1993):** Phosphorylation of the porcine skeletal and cardiac muscle sarcoplasmic reticulum ryanodine receptor. *Biochim. Biophys. Acta* 1175:319-326.
- Suko J., Maurer-Fogy I., Plank B., Bertel O., Wyskovsky W., Hohenegger M, Hellmann G. (1993):** Phosphorylation of serine 2843 in ryanodine receptor-calcium release channel of skeletal muscle by cAMP-, cGMP- and CaM-dependent protein kinase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1175:193-206.
- Szentesi P., Collet C., Sárközi S., Szegedi C., Jona I., Jacquemond V., Kovács L., Csernoch L. (2001):** Effects of dantrolene on steps of excitation-contraction coupling in mammalian skeletal muscle fibers. *J. Gen. Physiol.* 118(4):355-75.
- Szentesi P., Szappanos H., Szegedi Cs., Gönczi M., Jóna I., Cseri J., Kovács L., Csernoch L. (2004):** Altered elementary calcium release events and enhanced calcium release by tyrol in rat skeletal muscle. *Biophys. J.*, 86:1436-1453.
- Szigeti Gy.P., Almássy J., Sztretye M., Dienes B., Szabó L., Szentesi P., Vassort G., Sárközi S., Csernoch L., Jóna I. (2007):** Alterations in the calcium homeostasis of skeletal muscle from postmyocardial infarcted rats. *Pflugers Arch.* 455(3):541-53.
- Sztretye M., Deli T., Szentesi P., Szigeti Gy.P., Csernoch L. (2008):** Effect of TPEN on the calcium release of cultures C2C12 mouse myotubes. *J. Muscle.Res. Cell. Motil.* 28(7-8):421-8.

T

- Tarroni P., Rossi D., Conti A., Sorrentino V. (1997):** Expression of the ryanodine receptor type 3 calcium release channel during development and differentiation of mammalian skeletal muscle cells. *J. Biol.Chem.* 272(32):19808-13.
- Thastrup O., Cullen P.J., Drøbak B.K., Hanley M.R., Dawson A.P. (1990):** Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87(7):2466-70.
- Tripathy A., Xu L., Mann G., Meissner G. (1995):** Calmodulin activation and inhibition of skeletal muscle Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor). *Biophys. J.* 69:106-119.
- Tripathy A., Meissner G. (1996):** Sarcoplasmic reticulum lumenal Ca^{2+} has access to cytosolic activation and inactivation sites of skeletal muscle Ca^{2+} release channel. *Biophys. J.* 70:2600-2615.
- Tsugorka A., Ríos E., Blatter L.A. (1995):** Imaging elementary events of calcium release in skeletal muscle cells. *Science.* 269(5231):1723-6.

W

- Wagenknecht T., Radermacher M., Grassucci R. (1997):** Locations of calmodulin and FK506-binding protein on the three-dimensional architecture of the skeletal muscle ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.* 272: 32463-32471.
- Wagenknecht T., Samsó M. (2002):** Three-dimensional reconstruction of ryanodine receptors. *Front. Biosci.* 7:d1464-74.
- Ward M., Reiken S., Marks A.R., Martz L., Vassort G., Lacampagne A. (2003):** Defects in ryanodine receptor calcium release in skeletal muscle from post-myocardial infarct rats. *FASEB J.* 17:1517 -1519
- Weisleder N., Ma J.J. (2006):** Ca^{2+} sparks as a plastic signal for skeletal muscle health, aging, and dystrophy. *Acta Pharmacol. Sin.* 27(7):791-8.
- Williams M.E., Washburn M.S., Hans M., Urrutia A., Brust P.F., Prodanovich P., Harpold M.M., Stauderman K.A. (1999):** Structure and functional characterization of a novel human low-voltage activated calcium channel. *J. Neurochem.* 72(2):791-9.
- Wu L., Hamilton S. L.(1998):** Functional interactions of cytoplasmic domains of the skeletal Ca^{2+} release channel. *Trends Cardiovasc. Med.* 8:312-319.

Wuytack F., Raeymaekers L. Missiaen L. (2002): Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium* .Vol. 32, Issues 5-6: 279-305.

Y

Yaffe, D. Saxel, O. (1977): Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*. 270: 725-727.

Z

Zaidi M., Moonga B.S., Huang C.L. (2004): Calcium sensing and cell signaling processes in the local regulation of osteoclastic bone resorption. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 79(1):79-100.

Zarka A., Shoshan-Barmatz V. (1993): Characterization and photoaffinity labeling of the ATP binding site of the ryanodine receptor from skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.* 213:147-154.

Zhou J., Brum G., Gonzalez A., Launikonis B.S., Stern M.D., Ríos E. (2003): Ca²⁺ sparks and embers of mammalian muscle. Properties of the sources. *J. Gen. Physiol.* 122(1):95-114.

Zhou J., Brum G., González A., Launikonis B.S., Stern M.D., Ríos E. (2005): Concerted vs. sequential. Two activation patterns of vast arrays of intracellular Ca²⁺ channels in muscle. *J. Gen. Physiol.* 126(4):301-9.

Zhou J., Yi J., Royer L., Launikonis B.S., Gonzalez A., Garcia J., Ríos E. (2006): A propable role of dihydropyridine receptors in repression of Ca²⁺ sparks demonstrated in cultured mammalian muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 290, C539-553.

Zorzato F., Fujii J., Otsu K., Phillips M., Green N.M., Lai F.A., Meissner G., MacLennan D.H. (1990): Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 265(4):2244-56.

Zou H., Lifshitz L.M., Tuft R.A., Fogarty K.E., Singer J.J. (1999): Imaging Ca²⁺ entering the cytoplasm through a single opening of a plasma membrane cation channel *J. Gen. Physiol.* 114:575-588.

Zucchi R., Ronca-Testoni S. (1997): The sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacol. Rev.* 49, 1-51.

Elektronikus referencia

<http://fig.cox.miami.edu/>

www.invitrogen.com

www.maxchelator.stanford.edu

www.medscape.com

www.mkk.szie.hu

www.scielo.br

www.sci.u-szeged.hu

IX. Ábrajegyzék

ÁBRÁK	
1. ábra. A vázizom felépítése	9
2. ábra. Az izomrost sarcotubularis rendszere és a triád szerkezete	11
3. ábra. A RyR struktúrája	16
4. ábra. A RyR és szabályozó fehérjéi kapcsolata	19
5. ábra. A vázizom elektro-mechanikai kapcsolásában résztvevő legfontosabb szerkezeti elemek	25
6. ábra. A triád szerkezete harántcsíktolt vázizomrostokban	27
7. ábra. Különböző hipotézisek a <i>sparkok</i> kialakulására béka vázizom esetén	30
8. ábra. A RyR-ok eloszlása béka és patkány vázizomban	31
9. ábra. Az elemi események típusai béka illetve patkány vázizomrostokon	34
10. ábra. C2C12 egér myoblastok	42
11. ábra. A PTI DeltaScan TM mérőrendszer felépítése valamint a fura-2 excitációs spektruma	45
12. ábra. A CLSM felépítése valamint a fluo-3 emissziós spektruma	48
13. ábra. A lipid bilayer mérőrendszer	50
14. ábra. A RyR jelenlétének ellenőrzése PAGE gélen	52
15. ábra. Az SR Ca ²⁺ -pumpa működésének jellemzésére használt piruvát-kináz kapcsolt enzim-assay technika elve	53
16. ábra. TPEN hatékonyságának vizsgálata C2C12 sejteken	56
17. ábra. Módosult Ca ²⁺ -felszabadulás és eltávolítási mechanizmusok TPEN jelenlétében	58
18. ábra. Koffein adagolás hatása a C2C12 sejtek Ca ²⁺ -tranzienseire TPEN jelenlétében	60
19. ábra. KCl-depolarizáció hatása a C2C12 izomsejtek Ca ²⁺ -tranzienseire TPEN jelenlétében	61
20. ábra. TPEN hatása fiziológias és módosított [Ca ²⁺] _e mellett	63
21. ábra. A Zn ²⁺ kelátor -EDPA- hatásának vizsgálata	64
22. ábra. TPEN hatása emlős harántcsíktolt izomrostokon, szulfát alapú belső oldatban	65
23. ábra. A <i>sparkok</i> amplitúdóinak és félértékszélességeinek (FWHM) relatív eloszlása emlős izomrostokon	67
24. ábra. Módosult elemi események béka harántcsíktolt izomrostokon TPEN jelenlétében	69
25. ábra. A <i>sparkok</i> amplitúdó és félértékszélesség eloszlása kontroll vs. 50 μM TPEN, emelt valamint alacsony [Mg ²⁺] _i alkalmazásakor	71

26. ábra. TPEN aktiváló hatása a RyR-ra, negatív potenciálokon	72
27 ábra. TPEN feszültségfüggő hatása a RyR1 aktiválódására	72
28. ábra. TPEN gátló hatása a SERCA pumpa hidrolitikus aktivitására	74
29 ábra. Elemi kalciumfelszabadulási események patkány izomrostokon	75
30. ábra. Az elemi események jellegzetes paramétereinek eloszlása kontroll valamint PMI izomrostokon	77
31 ábra. Két reprezentatív <i>spark</i> signal mass értékének ábrázolása	78
TÁBLÁZATOK	
1. táblázat. Patkány izomrostokon regisztrált <i>sparkok</i> morfológiai jellemzőinek összehasonlítása	66
2. táblázat. Béka izomrostokon regisztrált <i>sparkok</i> morfológiai jellemzőinek összehasonlítása	68
3. táblázat. Az elemi események morfológiai jellemzőinek összehasonlítása kontroll valamint PMI patkányok esetén	76

X. Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönettel tartozom témavezetőimnek Dr. Csernoch Lászlónak és Dr. Szentesi Péternek, akik munkámat megalapozták, szakmai előrehaladásomban mindvégig irányítottak, és támogattak doktori értekezésem elkészítésében. Külön szeretném megköszönni Dr. Kovács László és Dr. Csernoch László professzor uraknak, a DE OEC Élettani Intézet igazgatóinak, hogy munkám anyagi és eszközi feltételeit mindvégig biztosították.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Deli Tamásnak, hogy segített az alapos kísérletes munka elsajátításában, valamint közvetlen munkatársaimnak: Dr. Simut Cecilianak és Dr. Dienes Beatrixnak, akik sokat segítettek a kísérletek elvégzésében.

Külön köszönettel tartozom Őri Róza asszisztensnőnek, aki mindvégig biztatott, és a kísérletek előkészítésében önzetlenül segített.

Köszönöm továbbá, az Élettani Intézetben dolgozó összes embernek azt a jókedvű és baráti légkört, ami miatt mindig öröm volt bemenni az Intézetbe.

Köszönöm Dr. Bíró Tamásnak, Dr. Krasznai Zoltánnak és Dr. Rusznák Zoltánnak, hogy elolvasták dolgozatomat, és bírálataikkal segítettek végső formába rendezését.

Végül, de nem utolsó sorban, köszönöm szerető férjemnek, Zsoltnak, a türelmet, megértést, és az önzetlen áldozatokat, amelyek e dolgozat létrejöttét övezték.

XI. Közlemények

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények, előadások és poszterek.

KÖZLEMÉNYEK:

Sztretye M., Almássy J., Deli T., Szentesi P., Jung C., Dienes B., Simut C.A., Niggli E., Jóna I., Csernoch L. (2009): Altered sarcoplasmic reticulum calcium transport in the presence of the heavy metal chelator TPEN. *Cell Calcium*, doi:10.1016/j.ceca.2009.10.002 [IF:4,481]

Sztretye M., Deli T., Szentesi P., Szigeti Gy.P., Csernoch L. (2008): Effect of TPEN on the calcium release of cultured C2C12 mouse myotubes. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 28(7-8):421-8 [IF:1,731]

Szigeti Gy. P., Almássy J., **Sztretye M.**, Dienes B., Szabó L., Szentesi P., Sárközi S., Jóna I., Vassort G., Csernoch L. (2007): Alterations in the calcium homeostasis of skeletal muscle from postmyocardial infarcted rats. *Pflügers Arch.* 455(3):541-53. [IF: 3,842]

Magyar nyelvű ELŐADÁSOK:

Orvos- és Egészségtudományi Centrum Általános Orvostudományi Kar Ph.D. és TDK. Tudományos Diáktalálkozója:

Fehér M., Szentesi P., Csernoch L. (2007): A vázizom kalciumhomeosztázisának vizsgálata miokardális infarktuson átesett patkányokon.

Fehér M., Szentesi P., Csernoch L. (2006): Tovaterjedő elemi kalciumfelszabadulási események egy alacsony affinitású kalciumpuffer (TPEN) jelenlétében harántcsíktolt izmokon.

Angol nyelvű ELŐADÁSOK:

Sztretye M., Szentesi P., Csernoch L. (2008): Effect of the low affinity Ca^{2+} chelator TPEN on Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle. *Journal Club*, Rush University Medical Center, Department of Molecular Biophysics & Physiology, Section of Cellular Signalling, Chicago, USA.

Fehér M., Csernoch L. (2006): Effects of TPEN on Excitation-Contraction Coupling in mammalian and amphibian skeletal muscle fibers. *IHP Training Unit on Animal Welfare and Animal Models*, University of Siena, Olaszország.

POSZTEREK:

Szigeti Gy.P., **Fehér M.**, Szentesi P., Dienes B., Szabó L., Csernoch L. (2006): Changes in the calcium homeostasis of skeletal muscle from postmyocardial infarcted rats. *New frontiers in basic cardiovascular research conference*, Debrecen.

Fehér M., Dienes B., Szabó L., Szentesi P., Csernoch L. (2006): The study of skeletal muscle fibers calcium homeostasis in the presence of a low affinity calcium chelator. *Magyar Élettani Társaság LXX Vándorgyűlése*, Szeged.

Szentesi P., **Fehér M.**, Almássy J., Dienes B., Jóna I., Csernoch L. (2006): Altered sarcoplasmic reticulum calcium transport in the presence of the heavy metal chelator TPEN. *Gordon Conference*, Colby-Sawyer College New London, USA.

Az értekezésben fel nem használt közlemények, előadások és poszterek.

KÖZLEMÉNYEK:

Sztretye M., Manno C., Ríos E. (2009): Buffering by BAPTA promotes intracellular calcium release operated by membrane depolarization in mouse muscle. *J. Physiol.*(közlésre beküldve)

Bannwarth M., Corrêa Jr I. R., **Sztretye M.**, Pouvreau S., Fellay C., Aebischer A., Royer L., Ríos E., Johnsson K. (2009): Indo-1 derivatives for local calcium sensing. *ACS Chemical Biology*. 4(3):173-190. [IF: 4,741]

Fodor J., Gönczi M., **Sztretye M.**, Dienes B., Oláh T., Szabó L., Csoma E., Szentesi P., Szigeti Gy.P., Marty I., Csernoch L. (2008): Altered expression of triadin 95 causes parallel changes in localized Ca^{2+} release events and global Ca^{2+} signals in skeletal muscle cells in culture. *J. Physiol.* 586(Pt 23):5803-18. [IF: 4,580]

Lukács B., **Sztretye M.**, Almássy J., Sárközi S., Dienes B., Mabrouk K., Simut C.A., Szabó L., Szentesi P., De Waard M., Ronjat M., Jóna I., Csernoch L. (2008): Charged surface area of maurocalcine determines its interaction with the skeletal ryanodine receptor. *Biophys. J.* 95(7):3497-509. [IF: 4,627]

Almássy J., **Sztretye M.**, Lukács B., Dienes B., Szabó L., Szentesi P., Vassort G., Csernoch L., Jóna I. (2008): Effects of K-201 on the calcium pump and calcium release channel of rat skeletal muscle. *Pflügers Arch.* 457(1):171-83. [IF: 3,842]

Deli T., Varga N., Ádám A., Kenessey A., Rásó E., Puskás L. G., Tóvári J., Fodor J., **Fehér M.**, Szigeti Gy.P., Csernoch L., Tímár J. (2007): Functional genomics of calcium channels in human melanoma cells. *Int. J. Cancer.* 121(1):55-65. [IF: 4,555]

ELŐADÁS:

Fodor J., **Sztretye M.**, Dienes B., Gönczi M., Szentesi P., Csernoch L. (2007): Suppressed Trisk 95 expression modifies E-C coupling in rat primary myotubes. *Magyar Élettani Társaság LXXI Vándorgyűlése, Pécs.*

POSZTEREK:

Sztretye M., Yi J., Royer L., Zhou J., Knollmann B., Allen P.D., Protasi F., Ríos E. (2010): D4cpv-Casq1. A novel approach to targeting biosensors yields detailed dynamic imaging of calcium concentration inside the sarcoplasmic reticulum of living cells. *Biophysical Society 54rd Annual Meeting, San Francisco, California, USA.*

Sztretye M., Royer L., Manno C, Zhou J., Knollmann B., Allen P.D, Protasi F., Ríos E. (2010): Ca depletion and ablation of calsequestrin similarly increase the evacuability of the Ca store of skeletal muscle. *Biophysical Society 54rd Annual Meeting, San Francisco, California, USA.*

Manno C., **Sztretye M.**, Ríos E. (2010): Effects of high [BAPTA] inside mouse muscle fibers reveal a role of calcium in the termination of voltage-operated calcium release from the SR. *Biophysical Society 54rd Annual Meeting, San Francisco, California, USA.*

Sztretye M., Yi J., Royer L., Pouvreau S., Zhou J., Ríos E. (2009): Targeting biosensors for the monitoring of calcium inside the sarcoplasmic reticulum of adult murine skeletal muscle. *Gordon Conference*, Waterville Valley, New Hampshire, USA.

Sztretye M., Pouvreau S., Bannwarth M., Corrêa Jr I. R., Fellay C., Aebischer A., Royer L., Johnsson K., Ríos E. (2009): Indo-1 hybrid biosensors for calcium monitoring in cellular organelles. *Biophysical Society 53rd Annual Meeting*, Boston, Massachusetts, USA.

Szentesi P., **Sztretye M.**, Dienes B., Németh R., Jenes Á., Vincze J., Kertai P., Csernoch L. (2008): Effects of KOENZIM Q10 in fluvastatin therapy induced modified calcium homeostasis in rat skeletal muscle fibers. *Magyar Élettani Társaság LXXII Vándorgyűlése*, Debrecen.

Gönczi M., Fodor J., **Sztretye M.**, Dienes B., Szabó L., Szentesi P., Csernoch L. (2007): The role of triadin 95 on calcium homeostasis of skeletal muscle cells. *Joint meeting of The Slovak Physiological Society, The Physiological Society and The Federation of European Physiological Societies*, Bratislava, Slovakia. (Abstract: *Acta Physiologica* 2007. Vol.191, Supplement 658).

Dienes B., Fodor J., Bihari J., Oláh T., **Sztretye M.**, Gönczi M., Szentesi P., Csernoch L. (2007): Trisk 95 overexpression in rat primary myotubes suppresses E-C coupling mechanism. *Magyar Élettani Társaság LXXI Vándorgyűlése*, Pécs.

Csernoch L., Fodor J., **Fehér M.**, Dienes M., Deli T., Szentesi P., Szabó L., Marty I. (2007): Suppressed SR calcium release and modified elementary calcium release events in Triadin-overexpressing cultured myotubes, *Biophysical Society 51st Annual Meeting*, Baltimore, Maryland, USA (Abstract: *Biophys. J.*, 92 Suppl., 79a).

Szentesi P., Almássy J., **Fehér M.**, Dienes B., Simuț C.A., Jóna I., Ronjat M., Csernoch L. (2006): Mutations in the scorpion toxin maurocalcine alter its ability to modify the calcium release events in frog skeletal muscle, *XXXVth European Muscle Conference*, Heidelberg, Germany (Abstract: *J. Muscle Res. Cell Motil.* 27:516-517).

Szentesi P., Fodor J., **Fehér M.**, Dienes B., Szabó L., Csernoch L. (2006): Triadin modifies EC-coupling in C2C12 myotubes. *XXXVth European Muscle Conference*, Heidelberg, Germany.

Csernoch L., Lukács B., **Fehér M.**, Dienes B., Szentesi P., Jóna I. (2006): Mutations in the scorpion toxin maurocalcine alter its ability to modify the calcium release events in frog skeletal muscle. *Gordon Conference*, Colby-Sawyer College New London, USA.

XII. Függelék

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különnyomatai.

1. **Sztretye M.**, Almássy J., Deli T., Szentesi P., Jung C., Dienes B., Simut C.A., Niggli E., Jóna I., Csernoch L. (2009): Altered sarcoplasmic reticulum calcium transport in the presence of the heavy metal chelator TPEN. *Cell Calcium*, doi:10.1016/j.ceca.2009.10.002
2. **Sztretye M.**, Deli T., Szentesi P., Szigeti Gy.P., Csernoch L. (2008): Effect of TPEN on the calcium release of cultured C2C12 mouse myotubes. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 28(7-8):421-428.
3. Szigeti Gy. P., Almássy J., **Sztretye M.**, Dienes B., Szabó L., Szentesi P., Sárközi S., Jóna I., Vassort G., Csernoch L. (2007): Alterations in the calcium homeostasis of skeletal muscle from postmyocardial infarcted rats. *Pflügers Archive* 455(3):541-553.