

Doktori (PhD) értekezés tézisei

A vázizom rianodin receptorának Ca^{2+} -függő és gyógyszeres szabályozása

Magyar Zsuzsanna Édua

Témavezető: Dr. Almássy János



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2023.

A vázizom rianodin receptorának Ca^{2+} -függő és gyógyszeres szabályozása

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Magyar Zsuzsanna Édua
okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Élettan és neurobiológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Almássy János

Az értekezés bírálói:

Dr. Lontay Beáta, PhD
Dr. Szöllősi András, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tóth Attila, az MTA doktora
tagok: Dr. Lontay Beáta, PhD
Dr. Szöllősi András, PhD
Dr. Matta Csaba, PhD
Dr. Pallagi Petra, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem, ÁOK, Belgyógyászati Intézet "A" épület tanterme
2023. november 23, 13 óra

A DOKTORI ÉRTEKEZÉS ELŐZMÉNYEI

A megfelelő sejtműködés fenntartásához elengedhetetlen az intracelluláris kalcium ion koncentráció ($[Ca^{2+}]_{IC}$) precíz szabályozása. A szabályozás fontos eleme a szarkoplazmatikus retikulum (SR) Ca^{2+} csatornája, a rianodin receptor (RyR), ami számos sejttípus $[Ca^{2+}]_{IC}$ -nak a megemelésében szerepel. Fontosságát jól mutatja, hogy a RyR genetikai hiánya az élettel összeegyeztethetetlen, pontmutációi pedig olyan rendellenes csatornaműködést eredményeznek, amely szívritmuszavarokhoz, izomgyengeséghez, vagy éppen fokozott izomtónushoz, malignus hipertermia szindrómához (MHS) vezethetnek. Ezeket a kórképeket összefoglaló néven rianopátiáknak nevezzük.

Munkánk során azt próbáljuk megérteni, hogy a RyR működését érintő, molekuláris szintű elváltozások hogyan függenek össze a vázizmokat és a szívet érintő tünetekkel és hogy ezek a kóros folyamatok gyógyszeres terápiával hogyan fordíthatók vissza.

Vizsgálataim a vázizom típusú RyR (RyR1) pontmutációi miatt kialakuló leggyakoribb kórképre, a malignus hipertermia szindrómára (MHS) irányultak. Az MHS a mutáns RyR1-ek illékony altatógázokkal szembeni halálos kimenetelű túlérzékenységi reakciója. A legelterjedtebb nézet szerint a rianopátiák közös jellemzője a RyR SR $[Ca^{2+}]$ -ja iránti túlérzékenysége, de az ezzel kapcsolatos eredmények ellentmondásai miatt a hipotézis MHS esetén ellenőrzésre szorult. Az ellentmondások oka az SR lumen felé néző Ca^{2+} -kötőhelyek szelektív vizsgálatának nehézsége, ugyanis a Ca^{2+} a RyR pórusán keresztül a citoplazmatikus oldalra átjutva („feed-through”) az ott található Ca^{2+} -kötőhelyeken keresztül is befolyásolhatja a csatorna működését, ami megnehezíti a luminális kötőhelyek szerepének elkülönítését. A probléma áthidalása érdekében a RyR Ca^{2+} általi szabályozásának vizsgálatára a Ca^{2+} helyett egy másik specifikus, de impermeábilis ligandot, az Eu^{3+} -t vezettük be, ami a RyR Ca^{2+} -kötőhelyeinek oldalszelektív vizsgálatát tette lehetővé, így az MHS kórélettani folyamatának részleteit segített tisztázni.

Az egyetlen, MHS krízisben alkalmazható forgalomban lévő gyógyszer a nem-depolarizáló izomrelaxáns dantrolen, aminek a klinikai bevezetése az MHS miatti halálozások számát látványosan lecsökkentette. Bár a szert 1967 óta használják, pontos hatásmechanizmusa részleteiben máig tisztázatlan. A RyR1-hez való specifikus kötődését már régen igazolták, a hatásával kapcsolatos tudományos bizonytalanság oka az a régi megfigyelés, hogy míg intakt vázizomrostokban a

dantrolen RyR1-specifikus módon képes gátolni a Ca^{2+} -felszabadulást, a csatornafehérje tisztításával és mesterséges lipid membránba építésével a dantrolen iránti érzékenység látszólag elvész. Munkánk során feltártuk az érzéketlenség okát és megmutattuk, hogy a dantrolen általi gátláshoz Mg^{2+} és ATP együttes jelenléte szükséges.

PROBLÉMAFELVETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A RyR lumenális oldali Ca^{2+} -kötőhelyének szelektív vizsgálata

A RyR egy ligand függő Ca^{2+} csatorna, legfontosabb ligandja a Ca^{2+} . A RyR-t a Ca^{2+} a csatorna citoplazmatikus oldala és az SR lumen felől is szabályozza. Bár az irodalomban számos adat áll rendelkezésre a RyR lumenális oldali Ca^{2+} általi szabályozásáról, az eredmények értelmezését megnehezíti, hogy a lumenális kötőhelyek vizsgálatára használt kétértékű ionok a csatorna pórusán átjutva a citoplazmatikus Ca^{2+} -kötőhelyekhez kötődve is kifejthetik hatásukat. Ennek kizárására kísérleteinkben Eu^{3+} -t használtunk, ami nagy affinitással képes kötődni a Ca^{2+} -kötőhelyekhez, viszont a csatornán átjutni képtelen.

Szívizom típusú rianopátiákban Ca^{2+} -felszabadulás a mutáns RyR lumenális magas Ca^{2+} -érzékenysége miatt alakul ki, így az SR Ca^{2+} -töltöttségének adott fokán a RyR disztolében megnyílik. A felszabaduló Ca^{2+} és az NCX tevékenysége miatt a membrán depolarizálódik és extraszisztole alakul ki. MHS esetén is hasonló molekuláris kórfolyamatot feltételeznek, mint a szívizom esetén. A RyR nyugalomban itt is aktívabb, de jelenleg nem tisztázott, hogy ezért a kóros aktivitásért valóban a RyR1 SR felőli, lumenális oldali Ca^{2+} -kötőhelyeinek túlérzékenysége a felelős, vagy a citoplazmatikus oldali Ca^{2+} -kötőhelyeké, amit a Ca^{2+} a póruson átfolyva ér el, kötődik és ezzel aktiválja a csatornát.

1. Munkánk során célul tűztük ki annak megértését, hogy hogyan szabályozza a lumenális Ca^{2+} -kötőhely a RyR1 és RyR2 működését.
2. Kísérleteink második csoportjában arra a kérdésre kerestük a választ, hogy MHS-ben – a szívizom rianopátiákhoz hasonlóan – a raktár túltöltés által indukált Ca^{2+} -felszabadulás (SOICR, store overload-induced Ca^{2+} -release) mechanizmus áll-e a fokozott csatornaaktiváció mögött.
3. Funkcionális adataink és *in silico* analízis segítségével célunk volt azonosítani azokat a RyR szekvenciákat, amelyek tartalmazhatják a lumenális Ca^{2+} -kötőhelyet.

A dantrolen hatásmechanizmusának nyomában

A dantrolen közvetlen vagy közvetett módon képes gátolni a RyR1-on keresztül történő Ca^{2+} -felszabadulást. Szentesi és munkatársai kimutatták, hogy a gyógyszer gátolja Ca^{2+} -felszabadulást intakt vázizomrostokból, valamint SR vezikulákból, azonban single-channel kísérletekben a tisztított RyR1-eket képtelen gátolni. Ebből arra a következtetésre jutottak, hogy a dantrolen hatásának egy fontos tényezője elveszett a RyR tisztítási eljárás során. Így annak ellenére, hogy a dantrolen az egyetlen izomrelaxáns, amelyet MH epizódok kezelésére használnak, és kötőhelyét is azonosították a RyR fehérje primer szekvenciájában, pontos hatásmechanizmusa még mindig ismeretlen, ezért ennek tisztázásához azonosítani kell a RyR gátlásához szükséges hiányzó tényező(ke)t. A dantrolen az egyedüli szer a MHS kezelésre és a megfelelő alkalmazás ellenére az MHS esetek a 5%-a halállal végződik. Emiatt a terápiás hatékonyság javítása fontos kihívás, amely nem fejezhető be a gyógyszerhatás ideális feltételeinek meghatározása nélkül.

A disszertációm alapjául szolgáló témát egy közelmúltbeli tanulmány motiválta, amely célja ezen ismeretlen összetevők azonosítása volt. Ebben a munkában Choi és munkatársai arra figyeltek fel, hogy a korábbi single-channel kísérletekben a mérőoldatból hiányzott a Mg^{2+} , ezért feltételezték, hogy ez lehet a hatáshoz szükséges hiányzó faktor. Kimutatták, hogy 10 μM dantrolennek legalább 1 mM Mg^{2+} szükséges ahhoz, hogy a Ca^{2+} felszabadulást szignifikánsan permeabilizált izomrostokban gátolja. A szerzők azonban nem szolgáltatottak single-channel mérési adatokat az eredményeik megerősítésére, így a közvetlen bizonyíték arra, hogy a dantrolen hatását az Mg^{2+} közvetíti a RyR1-re továbbra sem nyert bizonyítást.

1. Ezért a jelen munka célja volt a tisztított (járvékos fehérjétől mentes) RyR1-ek vizsgálata annak kiderítésére, hogy a csatorna dantrolen-érzékenységéhez valóban a Mg^{2+} közvetlen kötése van-e szükség.
2. Célunk volt továbbá a gyógyszer hatásának ellenőrzése különböző $[\text{Mg}^{2+}]$ mellett SR vezikulákból történő Ca^{2+} -felszabadulásra.
3. Vizsgálni kívántuk az ATP szerepét a dantrolen hatásmechanizmusában a fent említett módszerek segítségével.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleti állatok

Minden kísérlet megfelelt a magyar állatjóléti törvénynek, az Európai Unió 2010/63/EU irányelvének, és a Debreceni Egyetem Állatjóléti Bizottságának jóváhagyásával (22/2012/DEMÁB). Kísérleteinkhez felnőtt nyulak fehér vázizmát ($n=4$), felnőtt beagle kutyák kamrai szívmizát ($n=5$), valamint kontroll és transzgenikus C57Bl/6 egerek vázizmát használtuk. A transzgenikus egerek a RyR1 gén Y524S mutációját hordozták ($n=20$), ami megfelel a humán Y524S mutációnak, kontrollként vad típusú alomtestvéreket választottunk ($n=18$).

Terminális ciszterna vezikula-frakció és tisztított rianodin receptor preparálás

Munkám során terminális ciszterna vezikulákból (TCV) Ca^{2+} felszabadulás kísérleteket, valamint tisztított rianodin receptorokon elemi (single-channel) áramméréseket végeztem. A TCV-ban megtalálható mind a SERCA, mind pedig a RyR1. A TCV-t differenciál centrifugálással állítottuk elő nyúlból/egérből kimetszett fehér izom vagy kutya kamrai szívmizom homogenizálását követően.

A rianodin receptorokat TCV-szuszpenzió, valamint 1% detergenst és 0,45% foszfolipidet tartalmazó oldat elegyében szolubilizáltuk. A mintát ezt követően lineáris (10-28%) szacharóz gradiensre rétegeztük fel és ultracentrifugálással tisztítottuk és a single channel árammérésekhez a RyR-t a legnagyobb mennyiségben tartalmazó frakciókat használtuk fel.

Ca^{2+} -felszabadulás mérés

A TCV-k a bennük található SERCA-pumpák segítségével Ca^{2+} -nal feltölthetők, majd pedig a RyR1 aktiválásával ismét felszabadítható belőlük a Ca^{2+} . Az extravezikuláris oldat Ca^{2+} -koncentrációját Ca^{2+} -érzékeny festék (antipirilazo III) segítségével, spektrofotometriás méréssel 710 nm-en követtük nyomon. A TCV feltöltése után a vizsgálni kívánt vegyületet hozzáadjuk a mérőoldathoz, majd a RyR-ek agonista általi aktivációját követően, mérjük a Ca^{2+} -felszabadulás dinamikáját. A dantrolen hatásának vizsgálatához a mintához a preinkubációs fázis során 10 μM dantrolent adtunk a pufferhez, majd a RyR agonista 4-klór-meta krezol (4CMC, 400 μM) segítségével Ca^{2+} -felszabadulást váltottunk ki és folyamat lefolyását a dantrolen kezelést nem kapott mintáéhoz hasonlítottuk.

Single-channel árammérés sík lipid bilayerbe épített RyR-on

A szolubilizált RyR1 molekulákat mesterséges lipid kettősrétegbe építettük és feszültség-clamp körülmények között mérjük a rajtuk keresztül folyó áramot. A lipid bilayert foszfatidil-etanolamin, foszfatidil-szerin és foszfatidil-kolin 5:4:1 tömegarányú keverékéből készítjük, majd n-dekánban 20 mg/ml lipidkoncentrációjúra oldjuk. A mesterséges membránt egy erre a célra tervezett küvetta 200 μm átmérőjű nyílásán hozzuk létre. A nyílás két azonos térfogatú folyadékteret választ el, amelyekbe azonos összetételű (250 mM KCl, 100 μM EGTA, 150 μM CaCl_2 , 10 mM HEPES, pH=7,2) oldatot teszünk. Az egyik oldalt *cisz* (citoplazmatikus), a másik oldalt *transz* (SR lumene felé néző) oldalnak nevezzük. A membrán elkészítése után a RyR beépülésének elősegítéséhez intenzív keverést, valamint a membrán stabilitásától függően -300 - +300 mV-os feszültséglépcsőket alkalmazunk. Mivel a bilayer mindkét oldalán azonos ionösszetételű volt az oldat, az elektrokémiai gradiens fenntartását az Axopatch 200 erősítővel fenntartott +/- 60 mV nagyságú feszültségkülönbség biztosította. Az áramjeleket 1 kHz-es frekvencián, 8 pólusú aluláteresztő szűrővel szűrtük, és 3 kHz-en, pClamp 6.02 szoftverrel analóg-digitális konverzió után rögzítettük.

Az adatok statisztikai elemzése

A RyR-ek nyitvatartási valószínűségét (P_o) a pClamp szoftvercsomag (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) segítségével határoztuk meg, 3-5 perc hosszú reprezentatív szakaszokból. Nyitott állapotnak az tekinthető, amelynél az áramamplitúdó nagyobb, vagy egyenlő a maximális áramamplitúdó 50%-ánál. A statisztikai elemzést Origin 7.0 (OriginLab, Northampton, MA) és Excel (Microsoft, Redmond, WA) programban végeztük. Az eredményeket átlag $\pm$ SE-ben fejeztük ki. A relatív P_o adatokat úgy számoltuk ki, hogy minden adatpontkészletet a saját kontrolljukhoz normalizáltunk. A különbségek statisztikai szignifikanciáját egyirányú ANOVA-val értékeltük. Posthoc tesztként Tukey hsd tesztet végeztünk. Egyes adatok összehasonlítására független kétmintás t-próbát alkalmaztunk. Szignifikáns eltérésnek a $p < 0,05$ értéket tekintettük.

EREDMÉNYEK

RyR szabályozása a luminális $[Ca^{2+}]$ által

A RyR2 SR felőli szabályozására vonatkozó ismeretek az irodalomban konzisztensek, ezért a RyR1-gyel végzett kísérleteink validálását arra alapoztuk, hogy a mi kísérleti elrendezésünkben sikerül-e reprodukálnunk a RyR2-re vonatkozó eredményeket. A luminális Ca^{2+} hatását elsőként az aktiváló Ca^{2+} -kötőhelyeket telítő citoplazmatikus $[Ca^{2+}]$ (50 μM - RyR1 és 5 μM - RyR2) mellett teszteltük. A luminális $[Ca^{2+}]$ növelésével a RyR1 erősen gátolt, míg az RyR2-n folyó áramot nem befolyásolta. Alacsony (100 nM) citoszolikus $[Ca^{2+}]$ esetén a luminális $[Ca^{2+}]$ növelése a várakozásoknak megfelelően aktiválta az RyR2-t, de továbbra is gátolta az RyR1-et. Az általunk kapott RyR2-re vonatkozó mérési eredmények megegyeznek a korábban publikált adatokkal, és a RyR1 adatok is összhangban vannak néhány korábban publikált eredménnyel. Ezek az eredmények felvetik a kérdést, hogy miért eltérőek a RyR1 és a RyR2 válaszai. Az egyik lehetséges ok az, hogy a luminálisan növelt Ca^{2+} grádiense mentén átjut a RyR1 pórusán, és kölcsönhatásba lép a citoszolikus, gátló Ca^{2+} -kötőhellyel (az aktiváló kötőhely nem áll rendelkezésre, mivel 50 μM citoplazmatikus Ca^{2+} -al telített). Ha ez igaz, akkor a RyR2 citoplazmatikus gátló kötőhelyének alacsonyabb affinitása lenne az, ami megakadályozta a RyR2 gátlását. Ezt a „feed-through gátlás” hipotézist alátámasztja az a tény, hogy a luminális Ca^{2+} gátló hatása a RyR1-re rendkívül feszültségfüggő volt, és a negatív membránpotenciálokat preferálta, amelyek a luminális kationokat a póruson keresztül kényszerítik. Ennek megfelelően a luminális $[Ca^{2+}]$ növelésének aktiválnia kellene a RyR1-et, ha a citoplazmatikus kötőhelyek telítetlenek („feed-through aktiváció”). Meglepő módon azonban a magas luminális $[Ca^{2+}]$ 100 nM citoplazmatikus Ca^{2+} mellett nem fokozta a RyR1 aktivitását semmilyen negatív membránpotenciálon. Ez az eredmény azt jelzi, hogy kísérleti körülményeink között a feed-through Ca^{2+} -áram nem volt elég jelentős ahhoz, hogy befolyásolja a citoplazmatikus Ca^{2+} -kötőhelyeket, legalábbis a RyR1-ben. Így ezek az adatok arra utalnak, hogy a luminális Ca^{2+} általi gátlás közvetlenül egy vagy több luminális Ca^{2+} -kötőhelyen keresztül valósul meg. Ebben az esetben a gátlás szélsőséges feszültségfüggése arra utal, hogy a kötőhely a csatorna pórusában található, ahol a feszültségés várható.

Egy új eszköz a luminális Ca^{2+} -kötőhelyek szelektív vizsgálatára

Annak a hipotézisnek a specifikus teszteléséhez, hogy a RyR1 valódi gátló Ca^{2+} -kötőhelyet hordoz a fehérje luminális oldalán, és hogy elkerüljük az „visszaáramlási” hatásokat, olyan kutatási eszközt kellett választanunk, amellyel szelektíven szondázhatjuk a feltételezett luminális kötőhelyet. Kutatócsoportunk korábban már kimutatta, hogy az Eu^{3+} specifikus és erős agonistája a RyR1 citoplazmatikus Ca^{2+} -kötőhelyeinek, valamint a póruson átjutni képtelen. Ezeket a tulajdonságokat kihasználva a következő kísérletekben megvizsgáltuk az Eu^{3+} hatását, hogy megállapítsuk, vajon az Eu^{3+} a luminális Ca^{2+} -kötőhely agonistája-e. Először a citoplazmatikus $[\text{Ca}^{2+}]$ -t $50\text{ }\mu\text{M}$ -ra állítottuk, és Eu^{3+} -t adtunk a RyR1 luminális oldalára. A luminális Eu^{3+} jelentősen gátolta a RyR1 aktivitását méghozzá koncentrációfüggő módon, $4,7\text{ }\mu\text{M}$ -os IC_{50} értékkel. Az Eu^{3+} -t a póruson belülről nyomó membránpotenciálok (fiziológiával ellentétes áramirány, pozitív membránpotenciál mellett) esetén a RyR1 minőségileg eltérő állapotát is megfigyeltük, különösen az ion magas koncentrációjánál, mivel az Eu^{3+} kezelés során hirtelen egy hosszan tartó zárt állapot jelent meg, ami arra utal, hogy az ion elzárta a csatorna pórusát. Ezt a hatást csak $\geq 5\text{ }\mu\text{M}$ Eu^{3+} esetén és negatív membránpotenciálokon tapasztaltuk. A blokkot az Eu^{3+} EGTA-val történő kelálása megszüntette, viszont olykor nem volt visszafordítható. Az EGTA hatásának hosszú (néhány másodperces) látenciája azt jelezte, hogy az Eu^{3+} erősen kötődött a RyR pórusán belül, tartós fizikai elzáródást okozva, ahogyan arról korábban az L-típusú Ca^{2+} -csatornák esetében is beszámoltak. Az RyR-ek vezetőképessége kontroll körülmények között $\sim 800\text{ pS}$ volt és nem változott Eu^{3+} hatására. Ezek az adatok arra utalnak, hogy az Eu^{3+} nem képes áthatolni a csatornán, és ezért képtelen elérni a citoszolikus kötőhelyeket. Ezen kívül az Eu^{3+} és a Ca^{2+} hatásai közötti analógia közvetett bizonyítékot szolgáltat arra, hogy az Eu^{3+} a luminális Ca^{2+} -kötőhelyek agonistája.

A következő kísérletsorozatban többet szeretnénk volna megtudni a RyR1 és RyR2 feltételezett luminális Ca^{2+} -kötőhelyeinek funkciójáról, ezért a luminális Eu^{3+} hatását alacsony (nem telítő) citoplazmatikus $[\text{Ca}^{2+}]$ mellett vizsgáltuk. Először a citoplazmatikus $[\text{Ca}^{2+}]$ -ot 100 nM -ra állítottuk be, és a csatorna luminális oldalára Eu^{3+} -t adtunk. A luminális Eu^{3+} ebben az esetben is gátolta a RyR1 aktivitást. Mivel egyes kutatók arról számoltak be, hogy a RyR csak akkor aktiválódik a luminális Ca^{2+} által, ha a csatornát koffeinnel előkezelik, 2 mM koffein jelenlétében is elvégeztünk néhány kísérletet, de az Eu^{3+} gátló hatása ebben az esetben csak még nyilvánvalóbb volt.

Összefoglalva tehát, a citoplazmatikus és lumenális Ca^{2+} és Eu^{3+} (és a koffein) semmilyen koncentrációja és kombinációja nem volt képes aktiválni a RyR1-et, és az Eu^{3+} még erősebben gátolta a csatornát 100 nM citoplazmatikus Ca^{2+} esetén, amikor a P_o jelentősen alacsonyabb volt, mint 50 μM Ca^{2+} esetén.

Hasonló körülmények között RyR2-vel is végeztünk kísérleteket, amelyek azt mutatták, hogy az Eu^{3+} hatása kétfázisú: szubmikromoláris koncentrációban aktiválta a RyR2-t, de magasabb koncentrációban gátolta. Ezek az eredmények egyértelműen azt mutatják, hogy mindkét csatorna Ca^{2+} és Eu^{3+} általi szabályozása minőségileg hasonló, ami arra utal, hogy mind a RyR1, mind a RyR2 valódi lumenális Ca^{2+} -kötőhelyeket hordoz, de ezek a helyek a két izoformában ellentétes módon működnek. Emellett az a tény, hogy az Eu^{3+} hatása analóg volt a Ca^{2+} hatásával mind a RyR1-ben, mind a RyR2-ben, bizonyítékot szolgáltat arra, hogy a Ca^{2+} és az Eu^{3+} minőségileg egyenértékű ligandumai a Ca^{2+} -kötőhelyeknek, és így ezek az eredmények validálják a kísérleti megközelítésünket.

A lumenális Ca^{2+} RyR1-re gyakorolt hatásának fent említett feszültségfüggése felveti a kérdést, hogy vajon az Eu^{3+} hatása is hasonlóan feszültségfüggő-e. Az Eu^{3+} gátló hatása erősen polarizált volt, a negatív feszültségeket preferálva, amelyek az Eu^{3+} -t a csatorna pórusába terelik. Pozitív membránpotenciálok esetén a hajtóerő csökkenése +20 és +120 mV között fokozatosan gyengülő gátlással járt együtt. Az Eu^{3+} hatása alacsony (100 nM) citoplazmatikus $[\text{Ca}^{2+}]$ esetén is feszültségfüggő maradt, mivel a gátlás -60 mV-nál lényegesen erősebb volt, mint +60 mV-nál. Az Eu^{3+} RyR2-re gyakorolt aktiváló hatásának feszültségfüggését is elemeztük 100 nM citoplazmatikus Ca^{2+} mellett, viszont a RyR2 Eu^{3+} általi aktiválása a membránpotenciáltól független volt. Mivel az RyR az Eu^{3+} számára impermeábilis, a RyR1 feszültségfüggő gátlása nem lehetett a csatornán keresztüli átáramlás (feed-through) következménye. Ezek az eredmények tehát arra utalnak, hogy a RyR1 és RyR2 lumenális oldali szabályozásért felelős Ca^{2+} -kötőhelyeknek a csatorna pórusában kell elhelyezkedniük, míg a RyR2 aktiváló kötőhelyének a csatorna pórusának elektromos mezején kívül kell lennie.

Az Y524S MHS-RyR1 szabályozása a lumenális oldal felől

Eddigi eredményeink, miszerint a Ca^{2+} és az Eu^{3+} gátolja a RyR1 működését, nem támasztják alá az MHS korábban javasolt molekuláris mechanizmusát, azaz, hogy a csökkent SOICR küszöbérték felelős a malignus hipertermia roham kialakulásáért. Hipotetikuson azonban a lumenális Ca^{2+} által kiváltott Ca^{2+} -felszabadulás az MHS

vázizomzatban is előfordulhat, ha a lumenális Ca^{2+} gátló potenciálja gyengébb az MHS-RyR1-ben. Ezt a lehetőséget egér Y524S MHS-RyR1-ekkel teszteltük. A kísérleti elrendezés ugyanaz volt, mint korábban: először a citoplazmatikus $[\text{Ca}^{2+}]$ -t 50 μM (telítő) vagy 100 nM (nem telítő) Ca^{2+} -ra állítottuk be, majd ezt követően módosítottuk a lumenális $[\text{Ca}^{2+}]$ -t. Kontroll körülmények között az MHS csatornák P_o értéke 100 nM citoplazmatikus Ca^{2+} esetén szignifikánsan magasabb volt, mint a vad típusú (wt) csatornák P_o értéke, ahogy az az MHS fenotípustól várható (P_o wt 100 nM = $0,0031 \pm 0,001$ (n=5), P_o MHS 100 nM = $0,02 \pm 0,007$ (n=13)). Az eredmények minőségileg összhangban voltak kontroll RyR1-ekkel kapottakkal; vagyis az Y524S MHS-RyR1-et a lumenális Ca^{2+} ugyanúgy gátolta, mint a vad típusét. Hangsúlyoznunk kell, hogy 100 nM citoplazmatikus Ca^{2+} esetén is erős gátlást figyeltünk meg a lumenális Ca^{2+} részéről, 5 mM Ca^{2+} felett pedig enyhe aktiválódás volt megfigyelhető, ami azt jelzi, hogy a Ca^{2+} fluxus általi önaktiválódás csak kis mértékben volt jelen kísérleteinkben (annak ellenére, hogy az MHS-RyR1 nagyobb érzékenységet mutat a citoplazmatikus Ca^{2+} -ra). Az MHS-RyR1 esetén az Eu^{3+} általi gátlás hasonló volt a vad típusú csatornákéhoz mindkét (50 μM és 100 nM) citoplazmatikus $[\text{Ca}^{2+}]$ -nál. Ezek az adatok a korábban publikált következtetések ellen szólnak, miszerint a SOICR iránti fokozott érzékenység releváns patomechanizmus lenne MHS-ben.

A dantrolen hatásmechanizmusának nyomában

A következő problémakör, amivel foglalkoztunk a dantrolen hatásának vizsgálata. Ezt az azonosítási folyamatot hátráltatja a dantrolen hatásmechanizmusára vonatkozó ismereteink hiánya, amely elsősorban az irodalomban fellelhető ellentmondásos adatokból eredt. Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy a gyógyszer gátolja a Ca^{2+} -felszabadulást az intakt vázizomrostokból és az SR vezikulákból, de nem gátolja az egyedi RyR1-csatornák áramát. Ezért arra a következtetésre jutottunk, hogy a dantrolen hatásának egy fontos tényezője elvész a RyR1 tisztítási eljárás során. A dantrolen hatásmechanizmusának feltárásához próbáltuk azonosítani a RyR1 gátlásához szükséges hiányzó tényező(ke)t.

A dantrolen és a magnézium Ca^{2+} -felszabadulásra gyakorolt hatása

Először Ca^{2+} -felszabadulási kísérleteket végeztünk SR terminális cisztterna vezikulákon. Az SR vezikulákat elsőként 1 mM Mg^{2+} és 0,5 mM ATP jelenlétében pufferben szuszpendáltuk, majd Ca^{2+} -nal töltöttük és miután a transzmittancia

konstans értéken maradt (a vezikulából történő spontán Ca^{2+} -szivárgás és a SERCA pumpa általi Ca^{2+} -felvétel egyensúlyban volt), RyR agonistával (4CMC) Ca^{2+} -felszabadulást váltottunk ki. A kísérletet 10 μM dantrolen jelenlétében is megismételtük és azt tapasztaltuk, hogy a Ca^{2+} -felszabadulás átlagosan 26 másodperc késéssel történt meg. A következőkben a puffer $[\text{Mg}^{2+}]$ -t 3 mM-ra emeltük, ami kontroll körülmények között önmagában is átlagosan 108 másodperc késést okozott. 10 μM dantrolennel való kezelés esetén azonban 3 mM Mg^{2+} mellett közel hétszer hosszabb késést (180 s) tapasztaltunk, mint 1 mM Mg^{2+} és 10 μM dantrolen esetén. Mindemellett a Ca^{2+} -felszabadulás sebessége 3 mM Mg^{2+} jelenlétében szignifikánsan alacsonyabb volt, mint 1 mM Mg^{2+} esetén ($2,04 \pm 0,08$ vs. $0,9 \pm 0,07$ nmol Ca^{2+} /s, $n=3-4$), míg a dantrolen csak kis mértékben csökkentette a felszabadulás sebességét ($2,04 \pm 0,08$ vs. $1,4 \pm 0,22$ nmol Ca^{2+} /s 1 mM Mg^{2+} mellett, és $0,9 \pm 0,07$ vs. $0,73 \pm 0,03$ nmol Ca^{2+} /s 3 mM Mg^{2+} esetén). A dantrolen által okozott 180 másodperces késés 3 mM Mg^{2+} jelenlétében azt jelzi, hogy a dantrolen és a Mg^{2+} RyR1-re gyakorolt szuppresszív hatásai potenciálják egymást.

A dantrolen hatáshoz ATP is szükséges

Az, hogy a dantrolen a Ca^{2+} -felszabadulás sebességét jelentősen nem csökkentette, hanem késleltette, arra utal, hogy a dantrolen mindaddig, ameddig ATP volt jelen a pufferben, képes volt a gátló hatását kifejteni. Úgy gondoljuk, hogy miután a SERCA a vezikulából történő Ca^{2+} -szivárgás kompenzálására felhasználta az összes ATP-t, a dantrolen elvesztette gátló hatását és megkezdődött a Ca^{2+} -felszabadulás. A hipotézis ellenőrzésére a dantrolen hatását különböző ATP koncentrációk mellett is teszteltük. Kontroll körülmények között 0,5 mM ATP-t és 1 mM Mg^{2+} -ot használtunk, és a 4CMC adása után azonnali Ca^{2+} -felszabadulást tapasztaltunk. A dantrolen jelentősen késleltette a 4CMC-vel kiváltott Ca^{2+} -felszabadulást. Ugyanezt a kísérletet megismételve magasabb ATP koncentráció mellett (1,5 mM) a dantrolen átlagosan 158 másodperccel hosszabb késést okozott. Az ATP koncentráció megemelése azonban önmagában nem okozott késést a Ca^{2+} -felszabadulásban.

Hasonló kísérleteket (0,5 mM ATP és 1 mM Mg^{2+} mellett) végeztünk kutya szívizomból izolált SR-vezikulákon, de nem sikerült reprodukálnunk a vázizom SR-vezikulákon kapott eredményeket, ami összhangban van azzal, hogy a dantrolen RyR1 szelektív gátlószer.

A dantrolen-hatás tesztelése Mg^{2+} - és ATP-tartalmú oldatban single-channel árammérésekkel

A dantrolen hatásmechanizmusa körüli bizonytalanság egyik fő oka az volt, hogy korábban hatástalannak bizonyult a mesterséges lipid kettősrétegbe épített rianodin receptorokon végzett single-channel árammérésekben. Ezért vizsgálatunk legfontosabb kérdése az volt, hogy vajon a Mg^{2+} -e a dantrolen hatáshoz szükséges hiányzó faktor ezekben a mérésekben, és képes-e a tisztított RyR-eket dantrolen-érzékenyvé tenni. A csatornákat $50\text{ }\mu\text{M}$ Ca^{2+} jelenlétében építettük be a lipid kettősrétegbe (kontroll), majd néhány perccel később 3 mM Mg^{2+} -t adtunk ugyanennek a csatornának a citoplazmatikus oldalára, ami jelentősen csökkentette a csatorna P_o -ját, hiszen a Mg^{2+} az aktiváló Ca^{2+} -kötőhely kompetitív antagonistája. Ezt követően 1 mM ATP-t tettünk a bilayer kamra ugyanazon rekeszébe, ami növelte a RyR aktivitását. A steady-state állapot elérése után 10 mM dantrolent adtunk szintén a RyR citoplazmatikus oldalának megfelelő térbe. Áramanalízisünk eredménye szerint a dantrolen $48\pm 5\%$ -kal csökkentette az $MgATP$ -vel kezelt csatornák P_o -ját ($P_o = 0,0177\pm 0,025$ vs. $0,0123\pm 0,021$, $n=12$). Méréseink során négy esetben az $[ATP]$ -t tovább emeltük 1 mM -ról 2 mM -ra a dantrolen kezelést követően. Ennek hatására, meglepő módon a P_o tovább csökkent - ahelyett, hogy az agonista ATP növelte volna a csatornák áramát - a kontroll $17\pm 8\%$ -ára ($0,0177\pm 0,025$ vs. $0,0018\pm 0,003$, $n=4$, hatás: $-0,71$), ami összhangban van a gyógyszer terápiás hatásával. Eredményeink szerint tehát az ATP fokozza a dantrolen hatását. Amikor azonban a Mg^{2+} -t kihagytuk a méréseinkből, a dantrolen 2 mM ATP jelenlétében hatástalan maradt (a kontroll $91\pm 3\%$ -a, $P_o=0,38\pm 0,35$ vs. $0,35\pm 0,33$, $n=10$, hatás%: $-0,08$), ami arra utal, hogy az ATP szükséges, de nem kizárólagos feltétele a dantrolen hatásnak.

MEGBESZÉLÉS

Ca²⁺-raktárak szerepe a szarkoplazmatikus retikulum Ca²⁺- csatornájának szabályozásában fiziológiás és kóros állapotban

Kutatócsoportunk az irodalomban először hasonlította össze a két RyR izoforma lumenális Ca²⁺ általi szabályozását ugyanazon vizsgálati körülmények között, melyek során a Ca²⁺ túloldalra való szivárgását a lumenális Ca²⁺-kötőhelyek specifikus agonistájának - az Eu³⁺-nak -, az alkalmazásával kerültük el. Kimutattuk, hogy (1) a RyR2-t aktiválja a lumenális Ca²⁺, míg a RyR1-et gátolja, (2) ezek az eredmények Eu³⁺ használatával reprodukálhatók voltak, (3) kísérleti körülményeink között a „feed-through” szabályozás hatása a kimutatási határ alatt van, (4) az Eu³⁺ gátló hatása a RyR1-re erősen feszültségfüggő, míg a RyR2-re gyakorolt aktiváló hatása feszültségfüggetlen, és (5) az Y524S MHS-RyR1 csatorna lumenális szabályozása nem különbözik a vad típusétól. Az a tény, hogy a membránpotenciál depolarizálása enyhíti a gátlást, és hogy a gátlás negatív feszültségeknél erősebb, azzal magyarázható, hogy az Eu³⁺ az elektromos mezőben mozog a kötőhelye felé vezető úton.

Rianopátiákban a Ca²⁺-felszabadulás szabályozásának a sérülése kontrollálatlan Ca²⁺-felszabadulást (SOICR) eredményez, amely szívritmuszavarhoz vezethet például szívelégtelenségben vagy CPVT-ben, illetve vázizomban MHS-t okozhat. Utóbbi kórállapotban a halotán egy erre érzékeny mutáns RyR aktiválásával malignus hipertermia krízist vált ki. Nemrégiben Chen csoportja egy alternatív patomechanizmust javasolt, amelyben a halotán a SOICR küszöbének csökkentésével váltja ki a Ca²⁺-felszabadulást MHS-ben. Sajnos, mivel a SOICR kiváltása vázizomrostokban nem lehetséges, minden intracelluláris [Ca²⁺] mérésben nyert adatokat heterológ expressziós rendszeren végzett mérésekből kapták. Chen és munkatársai 12 különböző MHS-RyR1-overexpresszáló HEK sejtből (köztük az Y523S-nyúl RyR1-gyel, amely azonos az egér Y524S-ével) tudtak SOICR-t kiváltani magas Ca²⁺-tartalmú extracelluláris oldatokban, de csak akkor, ha a sejteket 2 mM koffeinnel kezelték elő, amelyről ismert, hogy érzékenyíti az RyR-t a citoplazmatikus Ca²⁺-ra. Bár az előbb említett tanulmányból hiányoznak a bilayer-kísérletek, a szerzők korábban már kimutatták, hogy a sertés R615C-RyR1-t millimoláris lumenális [Ca²⁺] aktiválja lipid bilayer-kísérletekben. Ezzel szemben a disszertációmban szereplő

eredményeink azt mutatják, hogy mind a vad típusú, mind az Y524S MHS-RyR1-et mind a Ca^{2+} , mind az Eu^{3+} gátolja hasonló kísérleti körülmények között, ezzel cáfolva elképzelésüket. Ez az eltérés abból adódhat, hogy a mi RyR-jeinket heterozigóta egerekből állítottuk elő, így a preparátumunk olyan RyR-tetramereket tartalmaz, amelyekben vad típusú és Y524S MHS-RyR1 monomerek egyesülnek. A Chen és munkacsoportja által javasolt MHS patomechanizmus, azaz a fokozott SOICR hajlam ellen szól, hogy a mi kísérleti elrendezésünkben a RyR-eket gátolja a luminális Ca^{2+} , de a heterozigóta egerek mégis erős MHS fenotípust mutatnak. Chen és munkatársai eredményei az MHS-RyR-ek feed-through aktiválásával magyarázhatóak. Összességében arra a következtetésre jutottunk, hogy az alacsony SOICR-küszöb nem releváns mechanizmus az MHS-ben, így a CPVT és az MHS patomechanizmusa nem azonos. Az arra érzékeny egyénekben a halotán RyR agonistaként, direkt alloszterikus kötőhelyeken keresztül aktiválja a csatornát. A kórfolyamatot gyorsítja továbbá, hogy a mutáns RyR citoplazmatikus Ca^{2+} -kötőhelyei érzékenyebbek, a Mg^{2+} általi gátlás gyengébb, amik miatt a CICR erősebb lesz.

Az Eu^{3+} -kötőhelyének vizsgálata *in silico* módszerekkel

Röviden összefoglalva a szerkezeti elemzést és funkcionális adatainkat úgy gondoljuk, hogy a RyR2 két luminális Ca^{2+} -kötőhelyet hordoz: egy aktiváló helyet az elektromos erőterén kívül és egy gátló helyet, amely a pórusban található. RyR2-ben az aktiváló hely dominál a gátló hely funkciójával szemben, amely utóbbinak jelentősége elhanyagolható. RyR1 esetén az aktiváló kötőhely hiányzik, és a gátló hely affinitása elég nagy ahhoz, hogy segítsen jelentősen elnyomni az RyR1 aktivitását a nyugalmi izomban.

A dantrolen általi RyR1-gátláshoz ATP és Mg^{2+} szükséges

MHS során az egyetlen életmentő szer a dantrolen, ezért a gyógyszer terápiás hatékonyságának fokozása, az ideális gyógyszerhatás feltételeinek megteremtése fontos kihívás.

Ennek a témának a motivációját az adta, hogy szerettük volna feloldani dantrolen hatásmechanizmusával kapcsolatos ellentmondásokat, amelyek abból adódtak, hogy a dantrolen képes volt szupresszálni a Ca^{2+} -felszabadulást intakt vázizomrostokon, de hatását elvesztette mesterséges lipid kettősrétegbe épített rianodin receptorokon.

Munkánkat közvetlenül ösztönözte Choi és munkatársai publikációja, amelyben kimutatták, hogy a Mg^{2+} a dantrolen hatáshoz elengedhetetlen kofaktor vázizomrostokon

végzett $[Ca^{2+}]_i$ -mérések során. A munkacsoportunk által dantrolennel végzett korábbi vizsgálatok során valóban kerültük a Mg^{2+} használatát ugyanis a RyR1 oly mértékű gátlásához vezetett, amely a további gátlás kimutatását nem tette lehetővé.

Az ellentmondások tisztázása érdekében célul tűztük ki, hogy a fent említett tanulmányokhoz single-channel áramméréseket végzünk RyR-eken. A legfontosabb eredményünk az, hogy először sikerült egyedi csatorna szinten bizonyítanunk, hogy a dantrolen megköveteli a Mg^{2+} közvetlen kötődését a RyR-hez, a hatáshoz nincs szükség más járulékos fehérje jelenlétére. Továbbá kimutattuk, hogy a P_o tovább csökken az [ATP] növelésével, ami arra utal, hogy az ATP potenciózza a dantrolen hatását. Ezek a single-channel adatok szoros korrelációt mutattak a Ca^{2+} -felszabadulás mérések során kapott eredményeinkkel. Így összefoglalva elmondható, hogy a Mg^{2+} mellett ATP is szükséges a gyógyszerhatáshoz.

Funkcionális kísérleti adataink, valamint a molekula modellezésből származó adatok a dantrolen hatásának két lehetséges molekuláris mechanizmusára utalnak: 1) a dantrolen kötődése egy specifikus alloszterikusan módosított állapotot igényel, amelyet az Mg^{2+} és az ATP közvetít, vagy hogy, 2) a dantrolen kötődése alloszterikusan növeli a RyR1 affinitását a Mg^{2+} -hoz. Az *in silico* elemzésünk az utóbbi lehetőséget támogatja, mivel a relatív domének közötti távolságok hasonlóak koffein, ATP és Ca^{2+} jelenlétében (nyitott), illetve az EGTA által indukált (zárt) konformációs állapotban meghatározott struktúrákban. Ez a szerkezeti információ azt jelzi, hogy a dantrolen kötőhely nem esik szerkezeti átrendeződések alá a kapuzás során; ezért nagy valószínűséggel mindig hozzáférhető - függetlenül attól, hogy az Mg^{2+} elfoglalja-e a Ca^{2+} -kötőhelyeket -, ami arra utal, hogy a dantrolen valószínűleg úgy hat, hogy alloszterikusan növeli a Mg^{2+} RyR1-hez való affinitását.

Choi és munkatársai, valamint Cannon és munkatársai szintén azt javasolják, hogy dantrolen jelenlétében a RyR1 olyan konformációs állapotban stabilizálódik, amely miatt megnő az affinitása a Mg^{2+} iránt. Arra a következtetésre jutottak, hogy MH epizódok során a fokozott metabolizmus miatt hidrolizáló MgATP komplex, csökkenő [ATP] és ennek következtében emelkedő szabad $[Mg^{2+}]$ lehet a dantrolen gyógyszerhatás mögötti mechanizmus. Továbbá adataik azt is sugallják, hogy a dantrolen elveszti a hatékonyságát alacsony [ATP], és túlzottan magas $[Mg^{2+}]$ mellett. Ez azt jelenti, hogy az MH-krízisek során létezhet egy optimális időablak a gyógyszer alkalmazására, valamint rávilágít az azonnali kezelés fontosságára is.

ÖSSZEFOGLALÁS

A rianodin receptorok (RyR) a szarkoplazmás retikulum (SR) ligand-vezérelt ioncsatornái, melyek legfőbb ligandja a Ca^{2+} . A Ca^{2+} a csatorna citoszólikus és luminális oldala felől is szabályozza a működést. A RyR luminális oldal felőli aktivációja sokat kutatott kérdés, mivel a raktár túltöltődése által kiváltott Ca^{2+} -felszabadulást összefüggésbe hozták szívritmuszavarokkal és a malignus hipertermiával (MH) is. A RyR luminális oldali Ca^{2+} -szabályozásáról elérhető adatok értékelését megnehezíti, hogy a luminális Ca^{2+} -kötőhelyek vizsgálatára használt kétértékű ionok a csatorna pórusán átjutva a citoplazmatikus oldali kötőhelyekhez is kötődhetnek, emiatt a luminális Ca^{2+} -kötőhely szerepét nehéz megítélni [28][29][35][36][37][38]. Ezen probléma áthidalására kísérleteinkben Ca^{2+} helyett Eu^{3+} -t használtunk, amely a Ca^{2+} -kötőhelyek specifikus ligandja, azonban a csatornán nem jut át. A mechanizmus molekuláris szintű vizsgálatára elemi, „single-channel” áramméréseket végeztünk vázizom- és szívizom típusú RyR-eken (RyR1 és RyR2). A RyR2 luminális oldalán a $[\text{Ca}^{2+}]$ megnövelése fokozta a csatorna nyitvatartási valószínűségét (P_o), míg a RyR1-et gátolta. Ezek az eredmények Eu^{3+} -nal reprodukálhatók voltak. A malignus hipertermiára (MHS) hajlamosító mutációt (Y524S) hordozó RyR1 luminális szabályozása nem különbözött a vad típusétól. A RyR1 Eu^{3+} általi gátlása feszültségfüggő volt, míg a RyR2 aktiválás nem volt az. Ez arra utal, hogy a RyR1 gátló luminális Ca^{2+} -kötőhelye a membrán elektromos erőterében, azaz a csatorna pórusában van, míg a RyR2 Ca^{2+} aktiválásért felelős kötőhelye azon kívül esik. *In silico* szerkezeti elemzés és méréseink alapján úgy véljük, hogy a RyR2 két luminális Ca^{2+} -kötőhelyet hordoz: egy aktiváló helyet az S1-S2 hurokban és egy gátló helyet a pórusban. RyR2-ben az aktiváló kötőhely elnyomja a gátló hely működését, így annak jelentősége elhanyagolható. RyR1-ben azonban az aktiváló kötőhely hiányzik, és a gátló hely a nyugalomban lévő izom SR $[\text{Ca}^{2+}]$ mellett jelentősen gátolja a RyR1-et. Ca^{2+} -felszabadulás során, amikor az SR $[\text{Ca}^{2+}]$ csökken, a RyR1 fokozatosan felszabadul a gátlás alól, kompenzálva a csökkenő hajtóerőt és segítve ezzel a Ca^{2+} -felszabadulás sebességének fenntartását.

Disszertációm második felében a dantrolen hatásmechanizmusával foglalkoztam. A dantrolen egy RyR gátlószer, melyet az MHS terápiájában izomrelaxánsként használnak, pontos hatásmechanizmusa azonban bizonytalan. Ez főként arra vezethető vissza, hogy a dantrolen gátolja a vázizomrostok és SR vezikulák RyR-függő Ca^{2+} -felszabadulását, de nem képes gátolni az egyedi RyR-ek áramát. Ebből arra következtethetünk, hogy a dantrolen hatásának egy fontos tényezője elvész a RyR áramméréshez való előkészítése során. Egy közelmúltban publikált, izomrostokon végzett kísérletek tanulsága szerint Mg^{2+} szükséges a gyógyszerhatáshoz. Mivel a korábbi elemi áramméréseknél használt közeg nem tartalmazott Mg^{2+} -t, célunk az új eredmények ellenőrzése volt. 10 μM dantrolen 3 mM Mg^{2+} és 1 mM ATP jelenlétében jelentősen csökkentette a RyR P_o -ját, míg az [ATP] 2 mM-ra növelésével a P_o tovább csökkent, és elérte a kezeletlen RyR P_o -jának 20%-át. Eredményeink alátámasztják a dantrolen Mg^{2+} -függő hatásmechanizmusát, és emellett arra is utalnak, hogy a gyógyszerhatás Mg^{2+} mellett ATP-t is igényel.



Nyilvántartási szám: DEENK/372/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

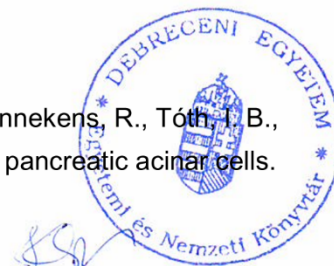
Jelölt: Magyar Zsuzsanna Édua
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10068101

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Magyar, Z. É.**, Bauer, J., Bauerová-Hlinková, V., Jóna, I., Gaburjakova, J., Gaburjakova, M., Almássy, J.: Eu3+ detects two functionally distinct luminal Ca2+ binding sites in ryanodine receptors.
Biophys. J. [Epub ahead of print], 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2023.07.029>
IF: 3.4 (2022)
2. Diszházi, G., * **Magyar, Z. É.***, Mótyán, J. A., Csernoch, L., Jóna, I., Nánási, P. P., Almássy, J.: Dantrolene Requires Mg2+ and ATP To Inhibit the Ryanodine Receptor.
Mol. Pharmacol. 96 (3), 401-407, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1124/mol.119.116475>
* These authors contributed equally this work.
IF: 3.664

További közlemények

3. Szentandrassy, N., **Magyar, Z. É.**, Gyöngyösiné Hevesi, J., Bányász, T., Nánási, P. P., Almássy, J.: Therapeutic Approaches of Ryanodine Receptor-Associated Heart Diseases.
Int. J. Mol. Sci. 23 (8), 4435, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23084435>
IF: 5.6
4. Diszházi, G., **Magyar, Z. É.**, Lisztes, E., Tóth-Molnár, E., Nánási, P. P., Vennekens, R., Tóth, I. B., Almássy, J.: TRPM4 links calcium signaling to membrane potential in pancreatic acinar cells.
J. Biol. Chem. 297 (3), 101015, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101015>
IF: 5.486





5. Skaliczki, M., Lukács, B., **Magyar, Z. É.**, Kovács, T., Bárdi, M., Novák, S., Diszházi, G., Sárközi, S., Márton, I., Péli-Szabó, J., Jóna, I., Nánási, P. P., Almássy, J.: 4-chloro-orto-cresol activates ryanodine receptor more selectively and potently than 4-chloro-meta-cresol. *Cell Calcium*. 88, 102213, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102213>
IF: 6.817
6. Sztretye, M., Szabó, L., Dobrosi, N., Fodor, J., Szentesi, P., Almássy, J., **Magyar, Z. É.**, Dienes, B., Csernoch, L.: From Mice to Humans: an Overview of the Potentials and Limitations of Current Transgenic Mouse Models of Major Muscular Dystrophies and Congenital Myopathies. *Int. J. Mol. Sci.* 21 (23), 8935, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21238935>
IF: 5.924
7. Almássy, J., Diszházi, G., Skaliczki, M., Márton, I., **Magyar, Z. É.**, Nánási, P. P., Yule, D. I.: Expression of BK channels and Na⁺-K⁺ pumps in the apical membrane of lacrimal acinar cells suggests a new molecular mechanism for primary tear-secretion. *Ocul. Surf.* 17 (2), 272-277, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtos.2019.01.007>
IF: 12.336
8. **Magyar, Z. É.**, Diszházi, G., Péli-Szabó, J., Szentesi, P., Collet, C., Csernoch, L., Nánási, P. P., Almássy, J.: The diamide insecticide chlorantraniliprole increases the single-channel current activity of the mammalian skeletal muscle ryanodine receptor. *Gen. Physiol. Biophys.* 38 (2), 183-186, 2019.
DOI: http://dx.doi.org/10.4149/gpb_2019007
IF: 1.07

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 44,297

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 7,064

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.



Debrecen, 2023.08.16.