

A 2002-2005 évekre tervezett munkánk fő célja az volt, hogy a szarkoplazmatikus retikulum (SR) kalcium csatornájának – RyR1/CRC-nak – működését részleteiben minél teljesebben derítsük fel, úgy, hogy a csatorna működését a környezeti paraméterek legszélesebb megváltozása illetve megváltoztatása esetén is jól le tudjuk írni. A kalcium-csatorna működésének, illetve a működés ezen részfolyamatainak megismerése elengedhetetlen az izomműködés molekuláris mechanizmusának feltárásához. Célunk az volt, hogy a kapott adatok segítségével jellemezni lehessen az egyes részfolyamatok valószínűségét valamint ezen részfolyamatok kapcsolatát.

A munkaterv három fő kérdés köré csoportosította a kutatási tervet, és beszámolómban is ennek megfelelő bontásban értékelem az elért eredményeket.

### 1.: Lantanidák hatása

Single channel mérőrendszer segítségével meghatározható a csatorna vezetőképessége különböző töltéshordozókra nézve különböző környezeti paraméterek esetén. Tekintettel arra, hogy a csatornán (CRC) fiziológiásan kalcium ionok mozognak, az alább ismertetendő méréseinkben lantanidákat kívánunk töltéshordozóként alkalmazni. A lantanidák alkalmazásának egy másik igen jelentős indoka az, hogy a SR CRC egy egészen sajátos tulajdonsággal is rendelkezik, nevezetesen miközben kalcium csatornaként kalcium ionfluxust generál, rendelkezik (két) regulátoros kalcium kötőhellyel is. A lantanidák - mint ismeretes - a kalciumhoz igen hasonló elektronhéj szerkezettel rendelkeznek, de a felületi töltéssűrűségük - az eggyel nagyobb vegyértékük és közel hasonló ionátmérőjük - miatt nagyobb, mint a kalcium ioné, így különböző lantanidákat töltéshordozóként alkalmazva a csatorna paraméterei [pl. nyitási valószínűség, átlagos nyitvatartási idő, specifikus vezetőképesség] az adott lantanidára nézve meghatározhatók. Az ion- illetve a hidratált ion-átmérőkkel korreláltatva a csatorna-paramétereket, meghatározható az effektív csatornaátmérő. Ismert, hogy az emlős vázizomból izolált SR kalcium csatornák feszültség-áram karakterisztikája ohmikus, feszültségfüggetlen, azaz a csatorna konformációja allosztérikusan szabályozott, így a különböző áramhordozó ionokra felvett áram-feszültség karakterisztikák elméletileg megegyeznek. Ennek megfelelően a csatorna átmérő a vezetőképességből a megfelelő paraméterek ismeretében meghatározható. Méréseinket először a gadolinium ionnal kezdtük.

Megállapítottuk, hogy a gadolinium ion mind a *cisz* mind a *transz* oldalról alkalmazva gátló hatást fejt ki a csatorna működésére. A *cisz* majd a *transz* oldali gadolinium koncentráció függvényében mértük a csatorna vezetőképességét és

kapuzási tulajdonságait. Meglepő módon a gadolinium a *cisz* és *transz*-oldali fél-gátló koncentrációja közel azonosnak adódott azaz a *cisz* és *transz*-oldalon mért  $K_i = (5,38 \pm 0,63) \mu\text{M}$  és  $K_i = (5,72 \pm 0,84) \mu\text{M}$  (az eltérés nem szignifikáns). Hasonlóan nem találtunk eltérést a gátláshoz tartozó Hill koefficiens értékeiben sem, amelyek  $N_{(\text{cis})} = (4,21 \pm 0,47)$  és  $N_{(\text{trans})} = (4,5 \pm 0,41)$  értékűnek adódtak. Ezen - meglepő - eredményeinknek egyik lehetséges magyarázata az, hogy a gadolinium kötőhely a csatorna vezető pórusának belsejében található, és elhelyezkedése illetve töltésviszonyai olyanok, hogy a két oldal felől egyformán közelíthető meg.

Kísérletes munkánk folytatásaként a csatornaparaméterek megváltozását vizsgáltuk (a fenti gadolíniumos mérésekkel azonos körülmények között)  $\text{Eu}^{3+}$  ionok hatására. Megállapítottuk, hogy az európium a gadolíniumhoz kvalitatíve hasonló módon gátolja a csatorna megnyílásait, amennyiben azt a *cis* oldalon alkalmazzuk. A *cis* oldali gátlás azonban sokkal intenzívebb mert a  $K_i = (107 \pm 17) \text{nM}$ , azaz az európium közel ötvenszer hatásosabban gátolja a csatornát. Ugyanakkor a *trans* oldalon az európium nem mutatott hatást kísérleteinkben. Ez egy igen meglepő megfigyelés, ami további vizsgálatra érdemes. Amennyiben a hatás elmaradásáért az  $\text{Eu}^{3+}$  kötődésének hiánya felelős, akkor trícíált rianodinos mérésekkel lehet a munkát folytatni. Ellenkező esetben más lantanidát kell választani, mely képes a kötő „zseb”-be bekötődni. Ebből a részfeladatból egy cikk és három idézhető absztrakt született, és egy további cikk összeállítása van folyamatban.

Sarközi S, Szegedi C, Lukacs B, Ronjat M, Jona I, (2005): Effect of gadolinium on the ryanodine receptor/sarcoplasmic reticulum calcium release channel of skeletal muscle. *FEBS J.* 272:464-71.

Abstr: Jung C, Szentesi P, Jona I, Niggli E, (2005): The low affinity  $\text{Ca}^{2+}$  chelator TPEN activates  $\text{Ca}^{2+}$  release from the sarcoplasmic reticulum in ventricular myocytes. *Biophysical Journal* 88 : 488A-488A Part 2 Suppl. S

Csernoch L, Simut C, Almasy J, Jung C, Niggli E, Jona I, (2005): The low affinity calcium buffer TPEN alters calcium release from the sarcoplasmic reticulum (SR) of mammalian skeletal muscle *Biophysical Journal* 88: 636A-636A Part 2 Suppl. S

Sarközi S, Almasy J, Szegedi C, Jona I, (2005): Effects of a calcium chelator TPEN on sarcoplasmic reticulum calcium release ryanodine receptor channel. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 26: P62

## 2.: A dantrolen hatásmechanizmusa

A dantrolén támadáspontjának feltérképezéséhez először meghatároztuk a dantrolén hatását a kalcium felszabadulásra intakt izomsejteken és nehéz SR vezikulákon kontroll körülmények között és a szer jelenlétében. A dózis hatás-görbék ismeretében analizáltuk a szernek a RyR kapuzására kifejtett hatásait. Így volt lehetséges, hogy az elektromechanikus kapcsolat egyre kevesebb komponensét tartalmazó preparátumokon hasonlítsuk össze a dantrolen hatásait. Az ionkörnyezet

változtatásával lehetőségünk nyílt arra is, hogy a dantrolen hatásának a környezeti paraméterektől (ionerősség) való függését tanulmányozzuk.

A timol egy alkaloida melyet a tartósítóiparban (beleértve gyógyszerek tartósítását is) antioxidáns hatása miatt széles körben alkalmaznak. Megvizsgáltuk, hogy a szer hogyan befolyásolja az SR kalcium pumpa és az SR kalcium csatorna működését. Megállapítottuk, hogy gátolja a kalcium pumpát ( $K_d = 253 \pm 4,7 \mu\text{M}$ , Hill együttható:  $1,62 \pm 0,05$ ) és ugyanakkor rapid kalcium felszabadulást okoz – előzőleg aktívan kalciummal feltöltött – vezikulákon. Kalcium felszabadulást indukáló hatás paraméterei:  $V_{\text{max}} = 0,47 \pm 0,04 \text{ nmol/s}$ ,  $EC_{50} = 258 \pm 21 \text{ nM}$  és a Hill koefficiens  $3,0 \pm 0,54$  értékűnek adódott. A timol ugyanakkor növelte a csatorna nyitvatartási valószínűségét mind RyR1 mind RyR2 azaz mind vázizom típusú mind pedig szívizom típusú csatorna esetében. Az aktiváció fél-hatásos koncentrációja kb 100-145  $\mu\text{M}$ -nak adódott. A „single channel” rendszerben nem határoztuk meg a dózis hatásgörbét, tekintettel annak igen munkaigényes voltára, valamint arra, hogy igen nehéz lett volna az adatokat korrektül elemezni. Ennek az az oka, hogy a timol az átlagos nyitvatartási időt három nagyságrenddel megnövelve ún. hosszú nyitott állapotokat indukált mind RyR1 mind RyR2 esetén. A csatorna vezetőképessége ugyanakkor nem változott. A timol hatása nem mutatott feszültségfüggést, valamint a timol nem befolyásolta a RyR1 rianodin kötését.

Az SR kalcium csatorna lumenális oldalról is modulált. Évek óta próbálkozunk azon intra-lumenális proteinek azonosításával, melyek szerepet játszanak ebben a modulációban. A kettős hibrid rendszerrel azonosítottunk egy TnI jellegű molekulát, mely a BIACORE mérések szerint kölcsönhatásba lépett a RyR-ral. Vázizomból izolált SR kalcium csatornát bilayerbe építve megmutattuk, hogy a kölcsönhatás nem pusztán fizikai, hanem a TnI megváltoztatja a csatorna kapuzási módusát, hosszú élettartamú zárt állapotok indukálása útján. Az a karakterisztikus hatás kizárólag negatív membránfeszültségek esetén tapasztalható. Pozitív membránfeszültség esetén a hatás revertálódik, és csak ismételten alkalmazott negatív tartófeszültség esetén manifesztálódik ismét. A hatás azonos mind izolált mind pedig expresszált vázizom típusú TnI alkalmazása esetén. Szívizom típusú TnI hatása lapvető jellegében megegyezik a vázizom típusúval, de sokkal rövidebbek - és spontán meg is szűnnek - a hosszú időtartamúak zárt állapotok. Eredményeink először mutattak rá, hogy a TnI szerepe nem korlátozódik a kontrakciós válasz mechanikai manifesztálódásában való részvételre, hanem a kontrakciót előidéző kalcium felszabadulásért felelős rianodin receptor szabályozásában is van szerepe.

A fenti részfeladat kidolgozása közben két *in extenso* közlemény és négy idézhető absztrakt született. Két közlemény van előkészítés alatt.

Szentesi P, Szappanos H, Szegedi C, Gonczi M, Jona I, Cseri J, Kovacs L, Csernoch L, (2004): Altered elementary calcium release events and enhanced calcium release by thymol in rat skeletal muscle. *Biophys J.* 86:1436-53

Szentandrassy N, Szigeti G, Szegedi C, Sarkozi S, Magyar J, Banyasz T, Csernoch L, Kovacs L, Nanasi PP, Jona I, (2004): Effect of thymol on calcium handling in mammalian ventricular myocardium. *Life Sci.* 74:909-21.

Abasztrakt: Szegedi C, Lehnert S, Vogel PD, Jona I, (2002): Effect of ATP and SL-ATP on the ryanodine receptor of mammalian skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 23: P30

Sarkozi S, Szegedi C, Jona I, (2002): The effect of dantrolene on skeletal muscle sarcoplasmic reticulum calcium release channel. *Biophysical Journal* 82: 3098 Part 2

Dias JM, Lehnert S, Jung MS, Szegedi C, Jona I, Vogel PD, (2003): Effect of ATP and SL-ATP on RyR 1 *Biophysical Journal* 84: 145A-145A Part 2 Suppl. S

Esteve E, Smida-Rezgui S, Marty I, Jona I, Sabatier JM, Rochat H, Chen L, Allen P, Pessah I, De Waard M, Sorrentino V, Ronjat M, (2003): Maurocalcine (Mca) modulates ryanodine receptor activity and Ca release in muscle cells. *Biophysical Journal* 84: 557A-557A Part 2 Suppl. S

### 3: Az elektromechanikai csatolás befolyásolása (FK506 és loop analógok)

Bár az FK506 hatásait izolált RyR-on többen vizsgálták, de az eredmények ellentmondóak, részben azért mert vezikuláris preparátumot építettek be, és ezért az eredmények interpretálása vitatható. Mérőrendszerünk továbbfejlesztésével és szolubilizált RyR preparátum felhasználásával tanulmányoztuk az FK506 hatását. Először - nehéz SR vezikulák kalcium felvételének vizsgálatával - tanulmányozzuk a szer SR kalcium pumpára kifejtett hatásait, majd feltérképezzük a kalcium-felszabadulásra kifejtett hatását. Az ionfluxusok gyors komponensének vizsgálatára stop-flow berendezés segítségével, optikai úton történt.

Az SR kalcium-csatorna egy homo-tetramer melynek alegységei - funkcionális működés esetén - szinkronizálva vannak. A szinkronizáció tanulmányozása céljából (azaz a DHP receptorról a Ryanodin receptorra történő jelátvitel hogyan történik) szintetizáltuk a DHP receptor II.-III. loop-ja adott szakaszának (az ún A peptidnek) egyes analógjait. Azokat melyek egy skorpiótoxinnal (a scorpio maurus palamtus toxinjának egyik komponensével) is analógok és megállapítottuk, hogy a toxin (maurocalcine = MCa) két módon is hat a RyR1 kapuzására. Egyrészt ún. „hosszú fél-nyitott” (LLSS) állapotokat indukál, amikor a csatorna a teljes vezetőképességének 42-55%-ánál és kapuzás nélküli konformációt vesz fel hosszú időre (akár 1-2 másodpercre is), másrészt ezen LLSS időszakok között megnöveli a csatorna nyitvatartási valószínűségét (Po-ját). Ugyanakkor ezen LLSS állapotok átlagos hossza a vad típusú toxin esetén 1200-1500 ms. Abból a célból, hogy a kritikus kötési szegmensét feltérképezzük a toxinnak különböző töltött aminosavakat (egyesével) töltetlenre (alaninra) mutáltunk, és a mutánsok hatását is megvizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a 31 aminosavból álló teljes szekvenciának a hatás

szempontjából legkritikusabb tagja a 24-es mert ezen mutáns gyakorlatilag hatástalan volt. A toxinmolekulát a 23, 22 20 és 8-as pozícióban alaninra mutálva a hatás erőssége attól függött, hogy a milyen messzire van a mutációs pont — a háromdimenziós térszerkezetet figyelembe véve — a kritikus 24-es pozíciótól. Megállapítottuk, hogy a M<sub>Ca</sub> hatása erősen polaritás függő (1 : 10 arány) és kismértékben potenciálfüggő. Az irányfüggés reverziós potenciálja kb 20 mV. Az eredeti munkatervben még szerepelt a fenti vizsgálatok kiterjesztés MH mutáns sertésekre is. Ezen kísérletes vizsgálatok jelenleg is folynak, a kutatások elhúzódásának oka az, hogy egyetemünkön a teszt-állat törzstenyészetete megszűnt, így a megfelelő teszt-anyag beszerzése késedelmet szenvedett.

Korábbi vizsgálatok megmutatták, hogy a kalcium transzportot a transzverzális tubulusok és az intracelluláris tér között a dantrolén nem befolyásolja. A fentiek arra utal(hat)nak, hogy a dantrolen megváltoztatja a csatorna kapuzását és egyes eredmények szerint ebben a RyR-on található dantrolen kötőhelyeknek van szerepe. Mivel a dantrolént terápiásan a MH kezelésére alkalmazzák, célszerű megvizsgálni az FK506-tal kezelt mintákon az FK506 és a dantrolén hatásait. Az általunk tervezett mérések az SR kalcium pumpára (SR vezikulák), illetve a RyR-ra (mesterséges membránba visszaépített RyR) kifejtett hatás vizsgálatára alkalmasak.

Az SR kalcium-csatorna egy homo-tetramer melynek alegységei - funkcionális működés esetén - szinkronizálva vannak. A szinkronizációban - irodalmi adatok alapján - alapvető szerepet játszik az FKBP (FK 506 kötő fehérje). Ugyanakkor az FKBP szerepe a vázizom elektromechanikus csatolásában nem tisztázott. Abból a célból, hogy a DHP receptorról a Rianodin receptorra történő jelátvitelt vizsgáljuk, szintetizáltuk a DHP receptor II.-III. loop-ja egyes szakaszainak megfelelő peptideket, és ezen peptidek felhasználásával "tapogattuk le" a DHP-RyR kölcsönhatásban szerepet játszó szegmenseket. Három peptidet szintetizáltunk, az ASK és az ACd peptideket, melyek a DHP receptor II-III hurokjának a Thr 671 -Lys 690 szakaszát illetve Thr 795 -Ala 812 szakaszát reprezentálják, valamint a kardiális DHP receptor Glu 724 -Pro 760 szakaszának. [Az ASK peptid: TSAQKAKAEERKRRKMSRGL; az ACd peptid: TSAQKEEEEEKERKKL-ARTA; Is a CSK peptid: EFESNVNEVKDPYPSADFPDDEEDEPEIPV szekvenciájú.] Megállapítottuk, hogy az ASK peptid a mesterséges membránba épített csatorna vezetőképességét és kapuzási jellegét nem változtatta meg akkor ha a csatorna tetramer tartalmazta az FKBP-t asszociálva. Ekkor a peptid hatására nőtt a nyitvatartási valószínűség miközben megmaradt a kontrollban is látható kétcsúcsú áram-hisztogram. A nyitvatartási valószínűség 26 μM peptid koncentráció esetén a kontrollban mérhető

Po = 0,179 ± 0.038 értékről Po = 0,496 ± 0.055 értékre változott. Amennyiben hasonló kísérletet olyan SR kalcium csatornával hajtunk végre, melyről előzőleg eltávolítottuk az FKBP kötő fehérjét, akkor a peptid hatástalan volt. A 26 µM peptid jelenlétében és a kontrolban mérhető áram-denzitás hisztogrammok gyakorlatilag azonosak, miközben természetesen mutatják a jellegzetes FKBP eltávolításra jellemző szub-konduktancia állapotokat.

Az elektromechanikai csatolás vizsgálatából 4 cikk és 6 idézhető absztrakt született.

O'Reilly FM, Robert M, Jona I, Szegedi C, Albriex M, Geib S, De Waard M, Villaz M, Ronjat M, (2002): FKBP12 modulation of the binding of the skeletal ryanodine receptor onto the II-III loop of the dihydropyridine receptor. *Biophys J.* 82:145-55.

Varsanyi M, Sarkozi S, Szegedi C, Herzog A, Jona I, (2002): Troponin I converts the skeletal muscle ryanodine receptor into a rectifying calcium release channel. *FEBS Lett.* 515:155-8

Esteve E, Smida-Rezgui S, Sarkozi S, Szegedi C, Regaya I, Chen L, Altafaj X, Rochat H, Allen P, Pessah IN, Marty I, Sabatier JM, Jona I, De Waard M, Ronjat M, (2003): Critical amino acid residues determine the binding affinity and the Ca<sup>2+</sup> release efficacy of maurocalcine in skeletal muscle cells. *J. Biol Chem.* 278:37822-31

Rocchetti M, Besana A, Mostacciolo G, Micheletti R, Ferrari P, Sarkozi S, Szegedi C, Jona I, Zaza A, (2005): Modulation of sarcoplasmic reticulum function by Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump inhibitors with different toxicity: digoxin and PST2744 [(E,Z)-3-((2-aminoethoxy)imino)androstane-6,17-dione hydrochloride]. *J. Pharmacol Exp Ther.* 313:207-15

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

Csernoch L, Ronjat M, Sabatier JM, Szegedi C, Jona I, (2004): Surface charge distribution commands the maurocalcine effect on the ryanodine receptor. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 25: P257

Szegedi C, Almassy J, Sabatier JM, Jona I. (2004): Effect of maurocalcine on the calcium release channel *Biophysical Journal* 86: 224A-224A Part 2 Suppl. S

Altafaj X, Esteve E, Cheng W, Urabani Brocard J, Coronado R, Jona I, Sabatier JM, De Waard M, Ronjat M, (2004): Identification of the maurocalcine and domain a of the II-III loop of DHPR Ca(v)1.1 alpha subunit binding sites on skeletal ryanodine receptor. *Biophysical Journal* 86: 429A-430A Part 2 Suppl. S

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

Altafaj X, Mabrouk K, Jona I, Csernoch L, De Waard M, Ronjat M, (2005): The scorpion toxin maurocalcine; a tool to study the excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 26: P59