

A rianodin receptor működését maurokalcin - egy 33 aminosavból álló 3 diszulfid hidat tartalmazó peptid - és pontmutánsainak segítségével vizsgáltuk. A peptid - melyet a Scorpio maurus palmatus-ból izoláltak - analógja az elektromechanikai csatolásban kulcsszerepet betöltő DHP receptor aktív szegmensének. Kísérletes megközelítésünk a mesterséges membránba épített SR kalciumcsatorna (RyR1) tanulmányozása volt. Méréseinkben szintetikus maurokalcint és mutánsait használtuk, utóbbiak esetében az adott pozícióban lévő (sMCA8, sMCA20, sMCA22, sMCA23, sMCA24) lizin illetve arginin aminosavat töltetlen alanin helyettesítette.

A toxin már nanomólos koncentrációban megváltoztatja a RyR1-működését, hosszantartó szubkonduktancia állapotok (LLSS) létrehozásával. Megállapítottuk, hogy a vad típusú toxinhoz hasonlóan a mutánsok is koncentrációfüggő módon növelik az LLSS állapotok gyakoriságát (%-os arányát). A leghatásosabb vad típus (200 nM sMCA 96%), míg az sMCA24 gyakorlatilag hatástalan (0,6%). Minél messzebb van a mutáció a 24-es pozíciótól, annál hosszabbak az LLSS állapotok (200 nM sMCA 10236 ms, 200 nM sMCA24 55 ms) mind alacsony mind pedig magas kalciumkoncentrációnál.

Megmutattuk, hogy az LLSS állapotok kialakításában alapvető szerepet tölt be a toxin háromdimenziós felszínén elhelyezkedő pozitív töltésű mező, melynek centrális eleme a 24-es pozíciójú pozitív töltésű aminosav (Arg24). A hasonló szekvencia illetve térbeli szerkezet alapján feltételezhető, hogy a DHP receptor $\alpha 1$ alegységének aktiváló szegmensében („A” peptid) az Arg683 hasonló kitüntetett szereppel bír a az elektro-mechanikai kapcsolat kialakításában.

Vizsgálatainkat a szívizom elektromechanikai csatolásának analízisére is kiterjesztettük, így tanulmányoztuk hogyan befolyásolja a maurokalcin a SR kalciumcsatornájának működését szívizomból izolált RyR2 esetében. Hasonlóan a - korábban általunk tapasztalt - RyR1-re kifejtett hatásához (2), a maurokalcin a citoplazmatikus oldal felől nanomólos koncentrációtartományban szubkonduktanciaállapotok megjelenését idézte elő, egy csatornán végzett mérések során. Különbséget találtunk viszont a szubkonduktancia állapotok hosszának és előfordulási gyakoriságának értéke között. A RyR2 esetében az előbbi csökkent, még az utóbbi nőtt a RyR1 esetében tapasztaltakhoz képest.

A lantanidák közül a gadolinium hatásának vizsgálatát a szarkoplazmatikus retikulum (SR) kalcium csatornájára (RyR1) 2005. évben fejeztük be: 3H-rianodin kötés assay-ben kimutattuk, hogy 45Ca^{2+} felszabadulás mérések során a Gd^{3+} gátolta a RyR1-t. Az egy csatornán történt mérések azt mutatták, hogy a Gd^{3+} a citoplazmatikus (cisz), és a luminális (transz) oldal felől is gátolta a csatornát. A fél gátló koncentrációk, illetve a számított Hill-együtthatók értékei $\text{IC}_{50} = 5,65 \mu\text{M}$ és $n = 4,71$ voltak a cisz, valamint $\text{IC}_{50} = 5,47 \mu\text{M}$ és $n = 4,31$ voltak a transz oldalon. Ugyanakkor a transz oldalon alkalmazott Gd^{3+} gátló hatása nem mutatott transzmembrán potenciál-függést, azaz a Gd^{3+} anélkül gátolta a csatornát, hogy a cisz oldalra át jutott volna. (Sándor Sárközi, Csaba Szegedi, Balázs Lukács, Michel Ronjat and István Jóna: Effect of gadolinium on the ryanodine receptor/sarcoplasmic reticulum calcium release channel of skeletal muscle, FEBS Journal 272 (2005) 464-471).

Tekintettel a lantanida kontrakció jelenségére, célunk volt, hogy más lantanidák hatását is megvizsgáljuk, a periódusos rendszerben a gadolinium előtt elhelyezkedő, nagyobb ionrádiusszal rendelkező eurórium hatását. Kimutattuk, a citoplazmatikus oldal felől alkalmazott Eu^{3+} nagyságrenddel kisebb koncentrációban gátolta az SR kalcium csatornát. Az IC_{50} érték 100,9 nM-nak adódott, még a Hill-együtthatóra $n = 1,2$ értéket kaptunk. Ugyancsak izolált, egy csatornán elvégzett kísérleteink arra utalnak, hogy szemben a gadoliniummal az eurórium nem gátolja a RyR1-t a transz oldal felől alkalmazva. A Gd^{3+} és az Eu^{3+} esetében a citoplazmatikus oldal felől kifejtett gátlás paraméterei közötti különbség, illetve az Eu^{3+} transz oldal felől megmutatkozó hatástalansága indokolja, hogy az Eu^{3+}

hatásának vizsgálatát 3H-rianodin kötés assay-ben, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ - felszabadulás mérésekben tovább vizsgáljuk.