

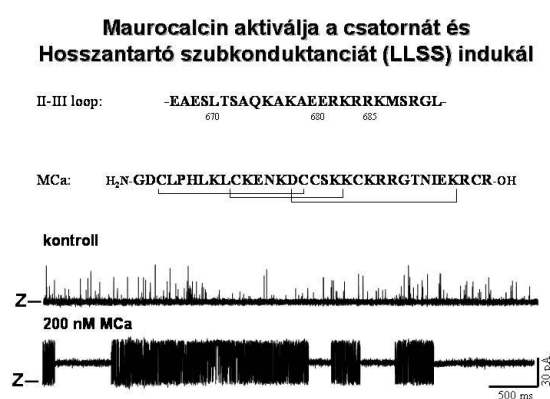
Zárójelentés

az OTKA K-61442 számú,

„A kalcium transzport szerepe a harántcsíkolt izom jelátvitelében”

című kutatásról

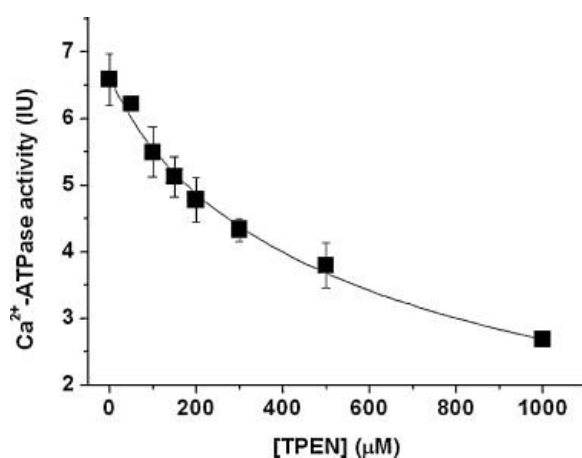
Az izom működésében centrális szerepet betöltő két molekula: a kalcium csatorna (CRC/RyR) és a kalcium pumpa (Ca^{2+} -ATPáz) tanulmányozását folytattuk, és a munkatervnek megfelelően vizsgáltuk a maurocalcin (MCA – egy toxin) és a TPEN (nehézfém kelátor) hatását az SR kalcium pumpa és az SR kalcium csatorna működésére.



Fiziológias körülmények között harántcsíkolt izomban a DHPR II-III hurka vezérli a RyR megnyílásait. E hurok egyik szegmese az ún. II-III hurok analógja a MCA. Vizsgáltuk a MCA hatását a vázizom (RyR1) és a szívizom (RyR2) típusú kalcium csatornára. Megállapítottuk, hogy a MCA a RyR2 kapuzását sokkal gyengébben befolyásolja mint a RyR1-ét, mert az LLSS-ek hossza kb. tizede, az LLSS arány pedig kb. 8%-os RyR2-n a RyR1-el összehasonlítva. A MCA és a kétféle csatorna-molekula kötődését ún. BIACORE

technikával is megvizsgáltuk, és kimutattuk, hogy a kötődés RyR2 esetén körülbelül tízszer gyengébb mint RyR1 esetén. A különböző MCA mutánsok segítségével feltérképeztük a MCA-RyR1 és MCA-RyR2 kölcsönhatás függését a peptid töltésszerkezetétől, és megállapítottuk, hogy a kölcsönhatásért a peptid 8, 22,23,24-es aminosavjai által alkotott pozitív töltésű „felület” felelős, és a kölcsönhatás meghatározó eleme a 24-es pozitívan töltött aminosav, hiszen annak töltetlen aminosavra történő cseréje a RyR – MCA kölcsönhatást megszünteti. (Biochemical Journal 406: 309-315.)

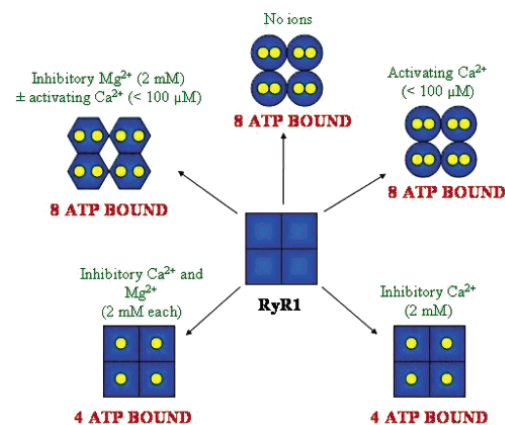
Az SR kalcium-tartalma alapvető szerepet játszik nem csak a kontrakció



létrehozásában, hanem a kontrakció-relaxációs ciklus szabályozásában is. Tekintettel arra, hogy a kalcium-háztartással kapcsolatos kísérletekben gyakran alkalmaznak TPEN-t, így megvizsgáltuk, hogy a TPEN egymagában hogyan befolyásolja az SR kalcium csatorna és a kalcium pumpa működését. Megállapítottuk, hogy a szer gátolja a pumpa működését ($K_d = 0,64 \pm 0,044$ mM) ugyanakkor a csatorna nyitvatartási valószínűségét mintegy kétszeresre növeli. Eredményeink értelmezése szerint ilyen módon a szer

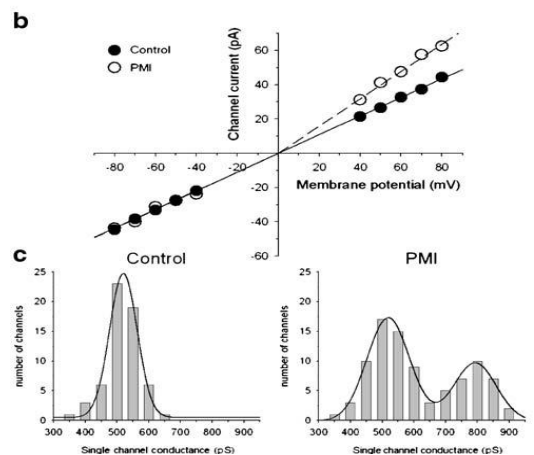
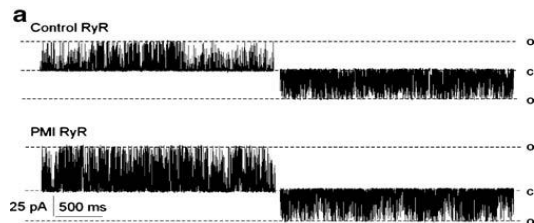
csökkenti az SR kalcium tartalmát és ezen hatás tehető felelőssé a szer kardioprotektív hatásáért. (Cell Calcium 41: 187-194.)

Az SR kalcium csatorna egyik unikális tulajdonsága, hogy nem csak egy kalcium csatorna, hanem kalciummal modulálható is, azaz a kalcium ionok áthaladását a RyR



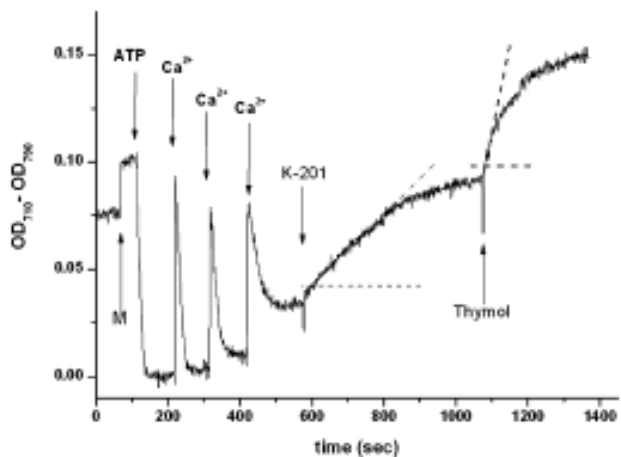
két kalcium kötőhelyén lévő kalcium egyidejűleg modulálja is. Izolált rendszerben lehetőség van a két funkció illetve hatás szétválasztására. Ezen célból spin jelölt ATP hatását tanulmányoztuk ESR spektroszkópiás módszerrel és bilayer módszerrel. Eredményeink szerint magas kalcium (2 mM – gátló) koncentráció esetén a RyR1 négy ATP-t köt tetramerenként, megerősítve korábbi eredményünket, ugyanakkor aktiváló (0,05-0,1 mM) kalcium koncentráció esetén 8 ATP per tetramer a kötött nukleotid aránya. Ez azt is jelenti, hogy a kalcium és a magnézium ionok ugyanazon kötőhelyért versengve, a molekula térszerkezetének modulálása útján, annak ATP kötését is befolyásolják. (Biochemistry, 45: 9408-9415)

Patkányokon előidézett miokardiális infarktust követően kialakuló izomgyengeségben



tanulmányoztuk az SR kalcium csatorna tulajdonságainak megváltozását (modellállatként patkányt használva). Megállapítottuk, hogy az infarktus után 24 héttel az SR kalcium csatornák mintegy 1/3-a a fiziológiával ellentétes áramirány esetén a szokásos 525 pS-el szemben mintegy 750 pS vezetőképességet mutat, míg ugyanezen csatornák a fiziológias áramiránynak megfelelő membránpotenciál esetén is a szokásos 525-550 pS vezetőképességgel rendelkeznek. Vizsgáltuk a gyógyszerjelölt K-201 (= JTV-519) molekula hatását a RyR1 csatorna vezetőképességére, és megállapítottuk, hogy az in situ (a kísérletben közvetlenül) alkalmazása nem okoz szignifikáns változást a csatorna paramétereiben annak ellenére, hogy az infarktussal egyszerre kezdett alkalmazása kivédi a vázizom-gyengeség kialakulását. (Pflüger's Archiv-European Journal of Physiology 455. 541-553.)

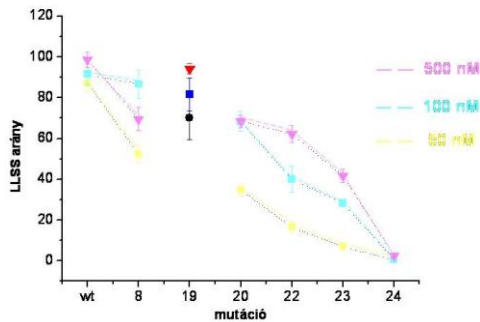
Eredményeink alapján valamilyen poszt-transzlációs változás, valamely regulátor-fehérje módosulása áll a kialakuló vázizom-gyengeség hátterében. HSR vezikulán végzett mérésekkel megállapítottuk, hogy a K-201 gátolja az SR kalcium pumpát mind a „sham” operált patkányokban ($IC_{50,contr} = 119 \pm 21 \mu M$ és $n_{Hill,contr} = 1.84 \pm 0.48$) mind pedig a PMI patkányokban



($IC_{50,PMI}=122 \pm 18 \mu M$ és $n_{Hill,PMI} = 1.97 \pm 0.24$) és közel azonos paraméterek mellett. (Pflüger's Archiv-European Journal of Physiology 457. 171-183.)

A maurokalcinnal végzett korábbi vizsgálatainkat továbbfejlesztve tanulmányoztuk a hatás szempontjából alapvető „pozitív töltésfelhő” alakjának szerepét a toxin olyan

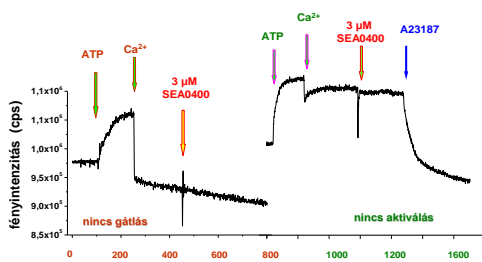
A hatás a 24-es pozíciótól mért távolság függvénye



mutánsainak felhasználásával, amikor is a töltésfelhő egy-egy pozitív arginin-ját semleges alaninná mutáltuk, a diszulfid hidak megtartása mellett. Ezen mutációk a 8-as, 19-es, a 20-as, a 22-es, a 23-as és a 24-es pozícióra vonatkoztak. A különböző mutánsok hatása a RyR1 kapuzására eltérő volt, a hosszú szubkonduktancia állapotok (LLSS) aránya és hosszúsága a 24-es aminosavtól számított térbeli távolsággal növekedett jelül a kölcsönhatás erősödésének. A MCa-RyR1 kölcsönhatásban az elektrosztatikus

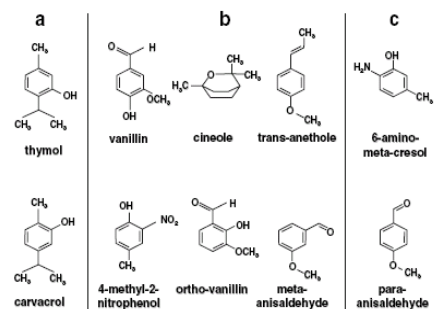
hatások és a membránpotenciál egyaránt fontos szerepet játszik, hiszen a LLSS-ek konduktanciája pozitív feszültségek esetén feszültség-független, míg negatív membránpotenciál esetén a feszültség abszolút értékével arányosan nő. A mutáció helye és a csatorna LLSS állapotban mért relatív konduktanciája között nem találtunk összefüggést. Az adatok alapján felállított modell és a mért adatok illesztése arra utal, hogy a RyR1-en összesen öt MCa kötőhely található. Minden RyR1 monomeren egy nagy affinitású MCa kötőhely van – ez feltehetően a vele fiziológiaszituációban szemben lévő DHPR II-III hurokja A peptid szakaszát kötő hely – és ezek betöltöttsége növeli a csatorna nyitvatartási valószínűségét, anélkül, hogy LLSS-t okozna. Az ötödik – a fentieknél alacsonyabb affinitású – kötőhely a pórus centrális részén helyezkedik el, és betöltöttsége esetén a csatorna maximális vezetőképessége cca. felére csökken. Ebben az esetben a csatorna ezen félvezető és a zárt állapot között kapuzik. (Biophysical Journal, 95. 3497-3509.)

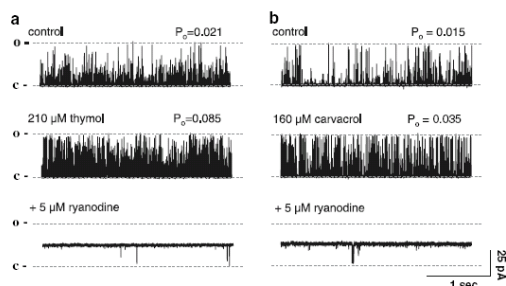
szív SR kalcium pumpa és csatorna vizsgálata
vezikuláris preparátum



Szív típusú SR kalcium csatornán (RyR2-n) vizsgáltuk a SAE0400 vegyület hatását. Vezikuláris rendszert alkalmazva megállapítottuk, hogy a szer nem hat a csatornán keresztül folyó kalcium transzportra. Bilayeres mérésekkel azt is kimutattuk, hogy a csatorna nyitvatartási valószínűsége és átlagos nyitvatartási ideje sem változott meg a szer hatására. (Cardiovascular Research 78. 476-484.)

Korábban megállapítottuk, hogy a timol (kakukkfű alkaloida, antioxidáns, baktericid hatása miatt az élelmiszeriparban alkalmazott tartósítószer, illetve a medicinában fertőtlenítőszer illetve anasztetikum stabilizátor) aktiválja a kalcium csatornát és gátolja az SR kalcium pumpát. Vizsgálatainkat kiterjesztettük a mindennapi életben széles körben alkalmazott timol analógokra is: karvakolra (szegfűszeg illóolaj), bis-anisolra (ánizs) és ezek izomerjeire.





Megállapítottuk, hogy ezen timol-analógok közül a karvakrol hasonló hatást mutat mint a timol, attól csak hatáserősségben és hatássosságban tér el, míg mások nincsenek hatással az izomsejtek kalcium háztartására. (J. Muscle Res. Cell Mot. 28: 167-174.)

A lantanidákkal – gadolíniummal – végzett bilayares méréseket kiterjesztettük, pontosabban megismételtük a periódusos rendszer szomszédos elemeire is, azaz a két szomszédos elemre: az európiumra és a szamáriumra. Bár a munkaterv szerint galliumot terveztünk használni (szamárium "helyett"), a legfrissebb irodalmi adatok arra utaltak, hogy a szamárium alkalmazása könnyebben értelmezhető eredményekre vezet.

	Ca²⁺		Sm³⁺		Eu³⁺		Gd³⁺	
	<i>cisz</i>	<i>cisz</i>	<i>cisz</i>	<i>transz</i>	<i>cisz</i>	<i>transz</i>	<i>cisz</i>	<i>transz</i>
IC50 (EC50)	(9,37 μM ± 1,3 μM)	287 μM ± 21 μM	64 μM ± 2 nM	6,2 μM ± 0,1 μM	167 nM	4,7 μM ± 0,1 μM	5,65 μM ± 0,33	5,47 μM ± 0,24 μM
N_{Hill}	1,18 ± 0,12	1,28 ± 0,11	2,3 ± 0,2	4,7 ± 0,5	2,0 ± 0,15	5,9 ± 0,9	4,7 ± 0,8	4,3 ± 0,6
Ion-sugár	0,99 Å		0,964 Å		0,947 Å		0,938 Å	

Méréseink szerint az európium – hasonlóan a gadolínium hatásához – gátolja a csatorna aktivitását, azaz csökkenti a csatorna nyitvatartási valószínűségét, de a cis és transz oldali hatás több nagyságrendű eltérést mutatott – ellentétben a gadolíniummal kapott eredményekkel, amikor is a cis és transz oldali gátlás paraméterei (EC50 és a Hill koefficiens) alapvetően hasonlóak voltak. Megállapítottuk, hogy az európium félgátló koncentrációja EC50 {cis} = 167 ± 5 nM a cis oldalról, míg EC50 {transz} = 4,7 ± 0,1 μM a transz oldal felől mérve. A megfelelő oldali Hill-koefficiensek n {Hill,cis} = 2,0 ± 0,1 és n {Hill, transz} = 5,9 ± 0,9-nak adódtak. Tríciált rianodin-kötés mérésének technikájával megállapítottuk, hogy az SR kalcium csatorna nyitvatartási valószínűségét az európium – a „single channel” mérésekkel lényegében összehangzóan – csökkenti, és bár a hatás nem potenciálfüggő, de függ az áthaladó töltéshordozó mozgási irányától, azaz polaritás-függést mutat. A szamáriummal jelenleg folyó mérések eredményei segíteni fognak az európiummal kapott eredmények értelmezéséhez is, illetve lényegesen közelebb visznek a pórusátmérő meghatározásához szükséges információk meghatározásához. (közlésre beküldve: Biophysical Journal)

Debrecen, 2010-03-23