

Formulár ZK - Záverečná karta projektu

Riešiteľ: Ing. Jozef Ševčík, DrSc.	Evidenčné číslo projektu: APVV-0139-06
Názov projektu: Vzťah medzi štruktúrou a funkciou domén ryanodinového receptora, zodpovedných za CPVT arytmie	

Na ktorých pracoviskách bol projekt riešený:	Ústav molekulárnej biológie SAV
	Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV
Ktoré zahraničné pracoviská spolupracovali pri riešení (názov, štát):	Department of Cardiology, Wales Heart Research Institute, Cardiff University School of Medicine, Cardiff CF14 4XN, UK
	Cardiff University School of Dentistry, Cardiff CF14 4XY, UK
	Max F. Perutz Laboratories, University Departments at the Vienna Biocenter, Department for Biomolecular Structural Chemistry, University of Vienna, Campus Vienna Biocenter 5, A-1030 Vienna, Austria
	Division of Cardiology, Medical University of Graz, Graz, Austria

Udelené patenty alebo podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory vychádzajúce z výsledkov projektu:	0
Publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu (uved'te i publikácie prijaté do tlače): Uvádzajte maximálne päť najvýznamnejších publikácií.	V. Bauerová-Hlinková, E. Hostinová, J. Gašperík, K. Beck, L.Borko, F. A. Lai, A. Zahradníková, J. Ševčík. Bioinformatic mapping and production of recombinant N-terminal domains of human cardiac ryanodine receptor 2 Protein Expr. Purif. (2010), doi:10.1016/j.pep.2009.12.014
	Zahradník I, Cocherová E, Zahradníková A. 2009. Mikrosystémový prístup k elektrickej a vápnikovej signalizácii v srdcových svalových bunkách. In Púčík J, Cocherová E (Ed.): <i>Trends in Biomedical Engineering</i> , Proceedings of the 8th Czech-Slovak Conference, Bratislava, September 16 – 18, 2009. Bratislava: Slovak University of Technology in Bratislava, STU Publishing House. ISBN 978–80–227–3105–8, p. 145 – 148.
	Janíček R, Zahradníková Jr. A, Zahradníková A, Zahradník I. 2009. Informačný obsah vápnikových signálov v srdcových svalových bunkách. In Púčík J, Cocherová E (Ed.): <i>Trends in Biomedical Engineering</i> , Proceedings of the 8th Czech-Slovak Conference, Bratislava, September 16 – 18, 2009. Bratislava: Slovak University of Technology in Bratislava, STU Publishing House. ISBN 978–80–227–3105–8, p. 110 – 112.
V čom vidíte uplatnenie výsledkov projektu:	Vzhľadom na aktuálnosť témy, ktorá sa zaoberá riešením a výskumom molekulárnych mechanizmov ochorení srdca, a získaných pozitívnych výsledkov v rámci APVV projektu 0139, nám boli udelené dva VEGA projekty a jeden APVV-LPP projekt, ktoré priamo nadväzujú na danú problematiku.

Charakteristika výsledkov

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu (max. 20 riadkov) - slovensky:

Pripravili sme N-terminálne rekombinantné RyR2 fragmenty 1-606, 1-247, 409-606, 391-606, fragmenty vo fúzii s tioredoxínom, Trx.RyR2(384-606) a Trx.RyR2(409-606) a s Nus-proteínom, Nus.RyR2(1-606) a Nus.RyR2(409-606). Gélovou filtráciou sa potvrdila prítomnosť vysokého podielu monomérnej bielkoviny u fragmentov 1-606, Trx.RyR2(384-606) a 409-606. CD-spektrá v UV-oblasti potvrdili prítomnosť elementov sekundárnych štruktúr v súlade s bioinformatickou predikciou, čo poukazuje na natívny folding N-terminálnych fragmentov. Trypsín a chymotrypsín pri riadenej proteolyze špecificky štiepili RyR2 (1-606) na dva (trypsín) a štyri (chymotrypsín) fragmenty. N-terminálne sekvenovanie trypsínových fragmentov ukázalo štiepne miesta, ktoré zodpovedajú doménam MIR a RIH (aa. 259-606) a RIH (aa. 384-606), predikované databázou PFAM. Za účelom štúdia interakcií medzi N-terminálnou a centrálnou oblasťou sme pripravili monomérny fragment z centrálnej oblasti RyR2 (aa. 2044-2225). Všetky monomérne fragmenty sú použité na ich charakterizáciu a kryštalizačné experimenty.

Elektrofyziológickými metódami sme sledovali vzťahy medzi účinkom ATP, cytozolického a lumenálneho vápnika, mechanizmus narušenia RyR2 pri srdcových ochoreniach vyvolávajúcich arytmie a účinok N-terminálneho doménového peptidu na aktivitu RyR2. Výsledky sme interpretovali pomocou modelu vrátkovania RyR zohľadňujúceho väzbu Ca^{2+} a Mg^{2+} iónov na RyR2 a ich alosterické ovplyvnenie otvárania kanála. Výsledky experimentov a simulácií poukazujú na nezastupiteľnú úlohu Mg^{2+} iónov v mechanizme aktivácie vápnikových zábleskov a lumenálneho vápnika pri zmenách vrátkovania RyR vyvolaných fyziologickou (ATP) alebo patologickou moduláciou RyR2 (CPVT mutácie, zlyhanie srdca). Účinok Mg^{2+} a lumenálneho Ca^{2+} je sprostredkovaný alosterickou interakciou medzi väzbou týchto iónov a otvorením kanála.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu (max. 20 riadkov) - anglicky:

We have prepared N-terminal recombinant RyR2 fragments 1-606, 1-247, 409-606, 391-606 as well as fragments in fusion with thioredoxin, Trx.RyR2(384-606) and Trx.RyR2(409-606), and with Nus-protein, Nus.RyR2(1-606) and Nus.RyR2(409-606). Gel filtration confirmed the presence of a large fraction of the monomeric form for fragments 1-606, Trx.RyR2(384-606) and 409-606. CD spectra in UV region confirmed the presence of secondary structure elements in accordance with the bioinformatics prediction, reflecting a native folding of N-terminal fragments. Trypsin and chymotrypsin in directed proteolysis cleaved RyR2 (1-606) specifically into two (trypsin) and four (chymotrypsin) fragments. N-terminal sequencing of the trypsin fragments has shown the cleavage sites which correspond to the MIR and RIH domains (aa. 259-606), and to the RIH domain (aa. 384-606), predicted by the PFAM database. To study interactions between the N-terminal and the central domain we prepared the RyR2 fragment 2044-2225 in monomeric form. All monomeric proteins have been used for their characterization and crystallization.

The synergy between ATP, cytosolic Ca^{2+} and luminal Ca^{2+} , the mechanisms of RyR2 dysfunction in the cardiac diseases evoking arrhythmias, and the effect of an N-terminal domain peptide on RyR2 activity were studied using electrophysiological methods. The results were interpreted using a RyR gating model that accounts for binding of Ca^{2+} and Mg^{2+} to the channel and their allosteric effect on channel opening. The results of experiments and simulations point to a unique role of Mg^{2+} ions in the mechanism of calcium spark activation and of luminal Ca^{2+} in the gating changes that accompany physiological (ATP) or pathological (CPVT, heart failure) modulation of RyR2. The effect of both, Mg^{2+} and luminal Ca^{2+} is mediated by allosteric interaction between binding of these ions and opening of the channel.

Podpisom záverečnej karty riešiteľ vyjadruje svoj súhlas so zverejnením údajov v nej uvedených.

Podpis zodp. riešiteľa:

Dátum:

Podpis štatutárneho zástupcu:

Pečiatka: