

Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-0628-1**

Štruktúrne a funkčné aspekty regulácie ľudského ryanodínového receptora a jej narušení mutáciami

Zodpovedný riešiteľ **Ing. Jozef Ševčík, DrSc**

Príjemca **Ústav molekulárnej biológie SAV**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

1. Ústav molekulárnej biológie SAV
- 2.
- 3.
- 4.
- 5.

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

1. Cardiff University School of Dentistry, Heath Park, Cardiff, CF14 4XY, United Kingdom
2. Wales Heart Research Institute, Cardiff University School of Medicine, Cardiff, CF14 4XN, United Kingdom
3. Department of Structural and Computational Biology, Max F. Perutz Laboratories, University of Vienna, Campus Vienna Biocenter 5, A-1030 Vienna, Austria

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

- 1.
- 2.
- 3.

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

1. Borko L, Bauerová-Hlinková V, Hostinová E, Gašperík J, Beck K, Lai FA, Zahradníková A, Ševčík J (2014): Structural insights into the human RyR2 N-terminal region involved in cardiac arrhythmias. Acta Cryst D 70: 2897–2912
2. Borko L, Košťan J, Zahradníková A, Pevala V, Gašperík J, Hostinová E, Urbániková L, Djinič-Carugo K, Bauerová-Hlinková V, Ševčík J (2013): Human cardiac ryanodine receptor: preparation, crystallization and preliminary X-ray analysis of the N-terminal region. Protein Pept Lett 20: 1211-1216

3. Faltínová A, Zahradníková A (2013): Modification of cardiac RYR2 gating by a peptide from the central domain of the RYR2. *Cent Eur J Biol* 8: 1164-1171
4. Zahradníková A, Zahradník I (2012): Construction of calcium release sites in cardiac myocytes. *Front Physiol.* 3: 322
5. Bauerová-Hlinková V, Bauer J, Hostinová E, Gašperík J, Beck K, Borko L, Faltínová A, Zahradníková A, Ševčík J. (2011): Bioinformatics Domain Structure Prediction and Homology Modeling of Human Ryanodine Receptor 2. In: *Bioinformatics - Trends and Methodologies*. Edited by. M.A. Mahdavi. Printed in Croatia. InTech, p. 325-352. ISBN: 978-953-307-282-1

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 0628, nám bol udelený VEGA projekt, ktorý priamo nadväzuje na danú problematiku.

CHARAKTERISTIKA VÝSLEDKOV

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Určili sme štruktúru N-terminálnej časti ľudského ryanodínového receptora. Štruktúra s nízkym rozlíšením bola určená metódou nízkouhlového rozptylu. Atómová štruktúra bola určená difrakciou RTG žiarenia s rozlíšením 2,39 Å a konečným kryštalografickým indexom 0,226. Model štruktúry obsahuje 606 aminokyselinových zvyškov, pozostáva z troch domén, ktoré navzájom interagujú prostredníctvom centrálnej skrutkovice polárnymi, nábojovými a hydrofóbnymi väzbami. Štruktúra jednoznačne dokázala, že na zabezpečenie jej integrity nie sú potrebné chloridové ióny, čím vyvrátila publikované tvrdenia iných autorov. Analýzou štruktúry bolo možné odhadnúť pravdepodobný vplyv viacerých mutácií na funkciu RyR2. Pripravili sme štyri z týchto mutácií a detailne sme charakterizovali ich účinok. Dokovaním hRyR2 do kryo-EM máp otvorenej a zatvorenej formy RyR1 sme zistili, že konformačné zmeny hRyR2 dosahujú približne 3 Å, čo má za následok pohyb lemu centrálnej dutiny.

Elektrofyziológickými metódami sme charakterizovali účinok peptidu z centrálnej oblasti RyR, implikovanej v etiopatológii CPVT arytmií, na pravdepodobnosť otvorenia RyR. Ukázali sme, že mechanizmus jeho účinku je založený na zvýšení stability H-módu RyR, charakteristického vysokou pravdepodobnosťou otvorenia.

Analýzou aktivity ryanodínových receptorov in situ na základe frekvencie vápnikových zábleskov v srdcových myocytoch a in vitro na základe pravdepodobnosti otvorenia RyR2 v planárnych lipidických membránach sme bližšie špecifikovali mechanizmus interakcie RyR2 s iónmi horčička na aktivačnom väzbovom mieste RyR2 a účinku väzby horečnatých iónov na otváranie RyR2.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)

We have determined the structure of the N-terminal region of the human ryanodine receptor. Low-resolution structure was determined by small angle X-ray scattering. Atomic structure was determined by X-ray crystallography with resolution 2.39 Å and final crystallographic R-factor of 0.226. The model of the structure contains 606 amino acid residues. It is composed of three domains that interact via the central helix by polar, charge and hydrophobic interactions. The structure clearly demonstrated that chloride ions are not necessary for its integrity, thus disproving published claims of other authors. Analysis of the structure allowed estimation of the likely effect of numerous mutations on RyR2 function. Four mutations were prepared and their effect was analyzed. By docking hRyR2 into cryo-EM maps of open and closed RyR1 we have found that conformational changes in hRyR2 reach approx. 3 Å, resulting in the movement of the central rim.

The effect of a central peptide, mutation-prone region implicated in CPVT arrhythmias, on RyR activity was analyzed. Mechanism of its effect was found to be based on stabilizing the

highly active H-mode of RyR gating.

In situ analysis of calcium spark frequency and in vitro analysis of RyR open probability allowed us to determine the mechanism of RyR2 interaction with magnesium ions and the effect of their binding on RyR2 opening.

Svojím podpisom potvrdzujem, že údaje uvedené v záverečnej karte sú pravdivé a úplné a súhlasím s ich zverejnením.

Zodpovedný riešiteľ

Ing. Jozef Ševčík, DrSc.

V Bratislave dd. mm. rrrr

Štatutárny zástupca príjemcu

RMDr. Ján Kormanec, DrSc.

V Bratislave dd. mm. rrrr

.....
podpis zodpovedného riešiteľa

.....
podpis štatutárneho zástupcu príjemcu