

Tittel: **KVANTIFISERING OG KARAKTERISERING AV RYANODINSENSITIV KALSIVKANAL I SKJELETTMUSKEL.**

Forfatter(e): **Per Kristian Bay Lunde.**

Prosjektansvarlig: **Ole M. Sejersted.**

Prosjektmedarbeidere:

Utgiver (seksjon): **Arbeidsfysiologisk seksjon**

Dato: **15.07.92**

Antall sider: **94**

ISSN: **0801-7794**

Serie: HD 1033/92 FOU

Sammendrag:

Kraftutvikling i muskel skyldes en øking i den intracellulære kalsiumkonsentrasjonen i muskelcellen som respons på en nerveimpuls. I hvilende muskel må imidlertid intracellulær kalsiumkonsentrasjon holdes lav for ikke å skade cellen. I cellen slippes kalsium ut fra sarkoplasmatiske retikulum (SR) gjennom en kalsiumkanal. Formålet med dette studiet var å optimalisere en metode for kvantifisering og karakterisering av kalsiumkanalene i SR som spesifikt kan binde ryanodin, et toksisk alkaloid. Bindingen av ryanodin vil også gi informasjon om betingelser som stimulerer kalsiumfrisetting.

Vesikler fra den terminale delen av SR ble isolert fra kaninmuskel ved sentrifugering på sukrosegradient. For måling av fri kalsiumkonsentrasjon ble det utviklet kalsiumselektive elektroder. Elektrodene er sensitive (ned til 1 nM), har god selektivitet og kort responstid.

Ryanodin binder seg til et høyaffinitetssete på ryanodinreseptoren med en K_D lik 7.5 nM. Ved hjelp av de kalsiumselektive elektrodene ble det funnet at ryanodinbindingen hemmes av høye ($IC_{50}=3.4$ mM) og lave (under 1 nM) frie kalsiumkonsentrasjoner, men påvirkes ikke av fysiologiske kalsiumkonsentrasjoner. Bindingen av ryanodin hemmes av magnesiumkonsentrasjoner over 10 μ M ($IC_{50}=0.51$ mM) og av ATP-konsentrasjoner over 5 mM, men stimuleres av pH rundt 8. Resultatene antyder at intracellulær magnesium er en viktig regulator av kalsiumfrisetting. Under de optimale betingelsene som er funnet, ble den maksimale tettheten av ryanodinreseptoren beregnet til 21.9 pmol·protein⁻¹.

Stikkord: **Ryanodin, skjelettmuskel, sarkoplasmatiske retikulum, kalsiumselektiv elektrode**

Key words: **Ryanodine, skeletal muscle sarcoplasmic reticulum, calciumselective electrode**

KVANTIFISERING OG KARAKTERISERING AV RYANODINSENSITIV KALSIUMKANAL I SKJELETTMUSKEL

Per Kristian Bay Lunde



HOVEDFAGSOPPGAVE
BIOKJEMISK INSTITUTT
UNIVERSITETET I OSLO

**KVANTIFISERING OG KARAKTERISERING AV
RYANODINSENSITIV KALSIUMKANAL I SKJELETTMUSKEL**

PER KRISTIAN BAY LUNDE

Hovedfagsoppgave

**Biokjemisk Institutt
UNIVERSITETET I OSLO**

Arbeidet er utført ved :

**Arbeidsfysiologisk seksjon
Statens Arbeidsmiljøinstitutt
(STAMI)**

Forord

Hovedfagsoppgaven, som ble påbegynt januar 1990, er utført ved Arbeidsfysiologisk seksjon ved Statens Arbeidsmiljøinstitutt (STAMI). Jeg er takknemlig for at jeg fikk anledning til å utføre oppgaven ved seksjonen, og jeg vil takke min veileder professor Ole M. Sejersted for all hjelp og gode råd ved gjennomføringen av oppgaven.

Jeg vil også takke alle de ansatte ved Arbeidsfysiologisk seksjon som har vært en god inspirasjonskilde, og gjort det mulig for meg å gjennomføre oppgaven. En spesiell takk til forsker Ole Grønnerød og forsker Jon I. Medbø for gode råd ved gjennomlesing av oppgaven.

Biblioteket ved STAMI har vært fantastiske til å finne fram til alle mulige og umulige referanser, og takkes for dette.

En spesiell takk til min kone, Gunnhild, for all hjelp og utrettelig oppmuntring som hun har gitt, og den tålmodighet hun har vist.

Ryanodin, isolert fra planten *Ryania speciosa* som vokser i regnskoger i Mellom-Amerika, har hatt en sentral plass i denne oppgaven, og er nok et argument for å verne om regnskogen og dens mangfold.

Oslo, august 1992

Per Kristian Bay Lunde



0. Innholdsfortegnelse

Forord	1
0. Innholdsfortegnelse	3
1. Sammendrag	5
2. Forkortelser	7
3. Innledning	9
3.1. Eksitasjon-kontraksjonskoblingen	9
3.2. T-rørsystemet og sarkoplasmatiske retikulum	11
3.2.1. T-rørene	11
3.2.2. Sarkoplasmatiske retikulum	11
3.2.3. Triaden	11
3.3. Dihydropyridinreseptoren	12
3.4. Kalsiumkanalen i SR (ryanodinreseptoren)	13
3.4.1. Elektronmikroskopi	13
3.4.2. cDNA, primær- og sekundær-struktur	13
3.5. Kalsium-transienter under muskelkontraksjon	15
3.6. Regulering av Ca ²⁺ -frisetting fra SR	17
3.6.1. Kalsiumindusert-kalsiumfrisetting (CICR)	17
3.6.2. Inositol trifosfat som stimulus for Ca ²⁺ -frisetting fra SR	18
3.6.3. DHP-reseptoren som spenningsensor	18
3.7. Malign hypertermi	19
3.8. Ryanodin	20
3.9. Kalsiumregulering i skjelettmuskel	22
3.9.1. Kalsiums virkning på metabolismen	23
4. Problemstilling	25
5. Materialer	27
6. Metoder	29
6.1. Isolering av mikrosomer fra SR	29
6.1.1. Muskelpreparering	29
6.1.2. Homogenisering	29
6.1.3. Sentrifugering	31
6.2. [³ H]ryanodinbinding	31
6.2.1. Inkuberingsmetode	32
6.2.2. Filtreringsmetode	32
6.2.3. Vaskeprosedyre	32
6.2.4. Quenching	33
6.2.5. Proteinanalyse	33
6.2.6. ATP-analyse	33
6.2.7. Proteasehemmere	34
6.2.8. [³ H]ryanodinbinding under varierende betingelser	34
6.2.8.1. Varierende proteinmengde ved filtrering	34
6.2.8.2. Varierende inkubasjonstid	34
6.2.8.3. Varierende pH	36
6.2.8.4. Varierende [Ca ²⁺]	37

6.2.8.5. Varierende magnesiumkonsentrasjon	37
6.2.8.6. Varierende ATP-konsentrasjon	38
6.2.8.7. Inkubering med forskjellige nukleotider	38
6.2.8.8. Varierende KCl-konsentrasjon	39
6.2.8.9. Varierende [³ H]ryanodinkonsentrasjon, Scatchard-plot	39
6.2.9. Nøyaktighet og presisjon	40
6.2.10. Gjenfunnsforsøk	40
6.3. Ca ²⁺ -Selektive elektroder	41
6.3.1. Konstruksjon	41
6.3.2. Kalibreringslinje	42
6.3.3. Ca ²⁺ -elektrodens selektivitet	44
6.3.4. Ca ²⁺ -elektrodens responstid	44
6.4. HPLC	44
6.4.1. Metodeoppsetting	45
6.4.2. Analyse	45
6.5. Statistikk og kurvetilpasning	45
6.5.1. Kurvetilpasning	46
6.5.2. Dose-respons-kurver	47
7. Resultater	49
7.1. Forsøksbetingelser	49
7.1.1. Ca ²⁺ -selektive elektroder	49
7.1.2. Renhet av ryanodin bestemt ved HPLC	52
7.1.3. Fibertyping av kanin skjelettmuskulatur	53
7.1.4. Væskescintillasjonsmålinger for korrigerering av "quenching"	54
7.2. Ryanodinbinding til SR-vesikler	54
7.2.1. Isolering av SR-vesikler	54
7.2.2. Nøyaktighet og presisjon	56
7.2.3. Betydningen av varierende inkubasjonstid	57
7.2.4. Betydningen av varierende pH	58
7.2.5. Betydningen av varierende [Ca ²⁺]	59
7.2.6. Betydningen av varierende magnesiumkonsentrasjon	60
7.2.7. Varierende [ATP] og andre nukleotider	61
7.2.8. Betydningen av varierende KCl-konsentrasjon	62
7.2.9. Betydningen av varierende ryanodinkonsentrasjon, Scatchard plot	63
8. Diskusjon	65
8.1. Ca ²⁺ -Elektroder	65
8.1.1. Uttesting av elektrodene	66
8.2. Renheten av ryanodin	67
8.3. Isolering av SR	68
8.4. Ryanodinbinding	71
9. Konklusjoner	79
10. Referanser	81
Vedlegg	91

1. Sammendrag

Den kjemiske prosessen som skaper kraft i muskel, skyldes en øking i den intracellulære kalsiumkonsentrasjonen i muskelcellen. Økingen i kalsiumkonsentrasjonen skyldes utslipp av kalsium fra sarkoplasmatiske retikulum (SR) gjennom en kalsiumkanal i SR-membranen. Kalsiumkanalene blir regulert av forandringen i det elektriske potensialet (aksjonspotensiale) over spesielle områder (T-rørsystemet) av plasmamembranen. Ryanodin, som er et nøytralt toksisk alkaloid, binder seg spesifikt til disse kalsiumkanalene (ryanodinreseptoren) i SR.

Vesikler fra den terminale delen av SR fra kanin skjelettmuskulatur er isolert ved sentrifugering på sukrosegradient. Binding av ryanodin til disse vesiklene er undersøkt under forskjellige forsøksbetingelser som er kjent for å inducere kalsiumfrisetting fra SR.

Resultatene viser at ryanodin binder seg til et høyaffinitetssete på ryanodinreseptoren med en K_D på 7.5 nM. Det er også vist at høye konsentrasjoner av ryanodin (> 50 nM) fører til et fall i ryanodinbindingen. Dette indikerer at det finnes et lavaffinitetssete som påvirker høyaffinitetssetet. Eksistensen av to seter med forskjellig affinitet for ryanodin kan stemme overens med de fysiologiske effektene som viser at ryanodin "låser" kalsiumkanalen i "åpen" stilling ved lave konsentrasjoner og i "lukket" stilling ved høye konsentrasjoner. Bindingen av ryanodin til reseptoren er en langsom prosess, med maksimal binding etter ca 60 min.

For å studere bindingen av ryanodin som funksjon av kalsium ble det konstruert kalsiumselektive elektroder. Elektrodene som ble utviklet viste god sensitivitet (nM), god selektivitet og kort responstid. Ved hjelp av de kalsiumselektive elektrodene ble det funnet at ryanodinbindingen hemmes av høye Ca^{2+} -konsentrasjoner ($IC_{50} = 3.4$ mM) og lave Ca^{2+} -konsentrasjoner (under 1 nM).

Magnesium viste en hemmende effekt på bindingen av ryanodin til reseptoren ved magnesiumkonsentrasjoner over 10 μ M ($IC_{50} = 0.51$ mM). Ryanodin viste maksimal binding til reseptoren rundt pH 8, og bindingen ble hemmet av ATP-konsentrasjoner over 5 mM. Betingelsene som er funnet å stimulere bindingen av ryanodin til SR-vesikler i denne oppgaven, er også rapportert å stimulere kalsiumfrisetting fra SR-vesikler. Dette indikerer at ryanodin binder seg til kalsiumkanalen i "åpen" konformasjon.

Inkubering med ADP og AMP i inkubasjonsmediet ga like høy ryanodinbinding som med ATP. Dette indikerer at det ikke kreves ATP-hydrolyse eller fosforylering av reseptoren for å binde ryanodin. Andre nukleotider (ITP, GTP, UTP og CTP) ga en reduksjon i maksimal binding av ryanodin med 40 - 55 %.

Tidligere publiserte data har vist at ryanodinbindingen er avhengig av høy ionestyrke (> 500 mM). Forøksbetingelsene som er benyttet i denne undersøkelsen viste maksimal binding av ryanodin fra 100 mM KCl og oppover. SR-membraner viste en aggregering ved høyere ionestyrke, og filtreringsteknikken er derfor viktig ved separering av bundet og ubundet ryanodin. Ved filtrering med for stor porestørrelse vil proteinbundet ryanodin gå igjennom filtret. Dette resultatet kan indikere at tidligere publiserte data av ryanodinbinding til SR-vesikler har vært for lave.

Med de optimale bindingsbetingelsene som er funnet i denne oppgaven, ble den maksimale tettheten av ryanodinreseptorer i SR-preparatet beregnet til 21.9 pmol·mg⁻¹ protein ved Scatchard analyse. Dette er noe høyere enn det som tidligere er publisert for SR-vesikler isolert ved sukrosegradient-sentrifugering.

2. Forkortelser

γ	Aktivitetskoeffisient
a	Sigmoid kurvetilpasning, respons ved dose = 0
A	1.ordens hastighetsprosess, respons ved tiden t
A_b	1.ordens hastighetsprosess, respons ved tiden $t = 0$
$a_{Ca^{2+}}$	Aktiviteten av kalsium
ADP	Adenosindifosfat
AMP	Adenosinmonofosfat
ATP	Adenosintrifosfat
A_∞	1.ordens hastighetsprosess, respons etter tiden $t = \infty$
b	Sigmoid kurvetilpasning, stigning på kurven i punkt c
BAPTA	1,2-bis(o-aminofenoxy)etan-N,N,N',N'-tetraeddiksyre
B_L	Bundet ligandkonsentrasjon (Her: bundet ryanodinkonsentrasjon)
B_{maks}	Scatchard plot, det maksimale antall binding seter
Bq	Becquerel, 1 Bq = $2.7 \cdot 10^{-11}$ Ci
c	Sigmoid kurvetilpasning, dosen som gir en respons halvveis mellom a og d
cDNA	Complementary DNA
CICR	Kalsiumindusert kalsiumfrisetting
CPM	Telling pr minutt
CTP	Cytidintrifosfat
d	Sigmoid kurvetilpasning, respons ved "uendelig" dose
d	Tetthet
Da	Dalton
DHP	Dihydropyridin
DPM	Desintegrasjoner pr minutt
EDTA	Etylenglycol-bis-(β -aminoetyl eter)N,N,N',N'-tetraeddik syre
F_L	Fri ligandkonsentrasjon (Her: Fri ryanodinkonsentrasjon)
Fura-2	Fluoreserende kalsiumindikator
GF/C	Whatman-filter, porediameter 1.2 μ m
g_{maks}	Maksimal sentrifugalkraft
GSWP	Millipore-filter, porediameter 0.22 μ m
GTP	Guanosintrifosfat
HPLC	High performance liquid chromatography
IC_{50}	Konsentrasjon som gir 50 % hemming
ICP	Induktivt koblet plasma
I_a	Ionestyrke
IP_3	Inositoltrifosfat
ITP	Inosintrifosfat
k	1. ordenshastighetsprosess, hastighetskonstant
k_{-1}	Dissosiasjonshastighetskonstant
$K_{0.5}$	Halvveis maksimal aktivering av et enzym
k_1	Assosiasjonshastighetskonstant
K_D	Scatchard plott, Dissosiasjonskonstant
K_M	Selektivitetskonstant
K_{obs}	Observerert assosiasjonshastighetskonstant
LR	Konsentrasjon av ligand-reseptor ved tiden t
LR_e	Konsentrasjonen av ligand-reseptor ved likevekt
ISR	SR-vesikler med lav tetthet
L_T	Total konsentrasjon av ligand (ryanodin)
MH	Malign hypertermi

MHS	Individer som er disponert for MH
M _v	Molekylmasse
n _H	Hill-koeffisient
OD	Optisk tetthet
Pa	Pascal
pCa	-log[Ca ²⁺]
PFK	Fosfofruktokinase
pK _a	pH hvor en syre er halvveis dissosiert (pK _a = -log[H ⁺]{A}/[HA])
pMg	-log[Mg ²⁺]
PMSF	fenylmetylsulfonylfluorid
PVC	Polyvinylklorid (høy molekyl vekt)
p[NH]ppA	5'-adenylyl imidodifosfat
rpm	Omdreiningar pr minutt
R _T	Total konsentrasjon av bindings seter.
SD	Standard avvik
SR	Sarkoplasmatiske retikulum
T-rør	Transverse tubuli
Tris	Tris(hydroksymetyl)aminometan
tSR	SR-vesikler med høy tetthet
UTP	Uridintrifosfat
X	Sigmoid kurvetilpasning, dose
Y	Sigmoid kurvetilpasning, respons
[³ H]	Tritium
[Ca] _i	Intracellulær kalsiumionekonsentrasjon

Som benevning for konsentrasjon er det brukt molar (M), og ikke SI-enheten mol·l⁻¹.

3. Innledning

Muskulaturen er det største organet i kroppen og har som hensikt å frambringe kraft og bevegelse. Ved å overføre kjemisk energi i form av ATP til mekanisk energi, vil muskelen kontrahere. Denne prosessen er i store trekk lik i skjelettmuskel, hjertemuskel og glatt muskel, men skjelettmuskel skiller seg fra de andre muskeltypene ved å være styrt av det somatiske nervesystemet. Dette gjør skjelettmuskulaturen ansvarlig for den viljestyrte kraftutviklingen, ved å overfører signaler fra hjernen til aktiv handling, ofte som del av et samspill med omgivelsene. Signalene ledes fra hjernen via de motoriske nervene til de motoriske endeplatene som er koblingspunktet mellom nervesystemet og muskelen. I muskelen ledes signalet langs plasmamembranen (sarkolemma), inn i det transverse tubulære systemet (T-rørsystemet). Fra T-rørsystemet overføres signalet til sarkoplasmatiske retikulum (SR) som frisetter kalsium til cytosol (myoplasma). Økingen i den intracellulære kalsiumkonsentrasjonen fører til muskelkontraksjon. Reguleringen av den intracellulære kalsiumkonsentrasjonen er derfor viktig for muskelens funksjon. Biokjemiske prosesser i forbindelse med utslipp av kalsium fra SR er studert nærmere i denne oppgaven.

Første del av innledningskapitlet (kap. 3.1 - 3.5) omhandler eksitasjonskontraksjonskoblingen og de membransystemer og proteiner som antagelig deltar i overføringen av det elektriske signalet (aksjonspotensialet) til et kjemisk signal (økt kalsiumkonsentrasjon). Andre del (kap. 3.6 - 3.9) omhandler muskellidelsen malign hypertermi som antagelig skyldes en feil i reguleringen av den intracellulære kalsiumkonsentrasjonen. Videre omhandler denne delen også alkaloidet ryanodin, som binder seg spesifikt til kalsiumkanalen i SR, og reguleringen av den intracellulære kalsiumkonsentrasjonen i skjelettmuskulatur under forskjellig påvirkning.

3.1. EKSITASJON-KONTRAKSJONSKOBLINGEN

Eksitasjons-kontraksjonskoblingen i muskel består av flere påfølgende prosesser, og den er tradisjonelt definert som de prosessene som kobler sammen den elektriske eksitasjonen av plasmamembranen med kraftutvikling i muskel. Eksitasjonen av muskelfiberen starter ved den neuromuskulære synapsen. Aksjonspotensialet som oppstår, ledes langs muskelcellen og inn i det indre av cellen gjennom T-rørsystemet. Fra T-rørmembranen overføres informasjonen på en foreløpig ukjent måte til et annet

membransystem, det sarkoplasmatiske retikulum, som slipper ut kalsium gjennom en kalsiumkanal til muskelcellens myoplasma (fig. 3.1). Dette arrangementet er effektivt og fører til at kalsium frisettes raskt og nesten samtidig i hele muskelfiberens indre.

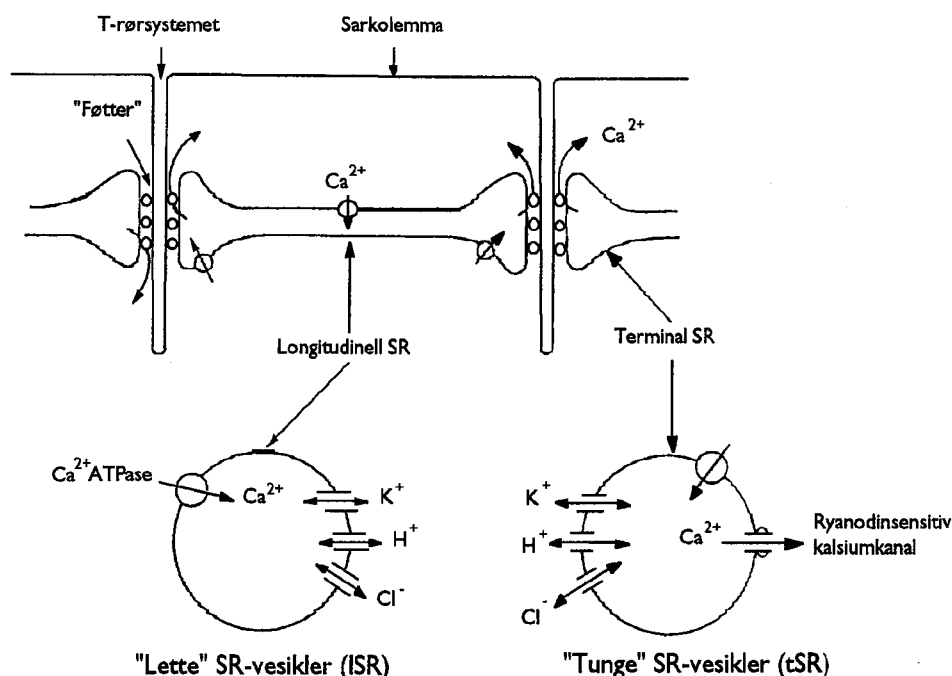


Fig. 3.1.: Skjematisert og forenklet oppbygging av T-rør og SR i skjelettmuskulatur. Figuren er modifisert etter Meissner *et al.* (1988).

I en hvilende muskelcelle er den frie kalsiumkonsentrasjonen ($[\text{Ca}]_i$) under mikromolarområdet. Under kontraksjon av muskelen kan $[\text{Ca}]_i$ stige til $10 \mu\text{M}$ (Stryer, 1988). Når det frisatte kalsiumet binder seg til troponin, endrer troponin/tropomyosin-komplekset konformasjon slik at bindingssetene for myosin på aktinfilamentet blir blottstilt. Dannelsen av aktin-myosinkomplekser fører til muskelkontraksjon. Ca^{2+} -ATPasen i SR, som pumper kalsium tilbake til SR, starter raskt etter at $[\text{Ca}]_i$ begynner å stige. Dette fører til at kalsiumet dissosierer fra troponin, og muskelen relaxeres igjen.

Flere av prosessene som er nevnt over, er fremdeles ikke vel forstått. Dette gjelder bl.a. hvordan "signalet" overføres fra T-rørsystemet til SR-membranen som igjen fører til frisetting av kalsium. "Signal"overføringen kan deles i tre prosesser: 1) Den spenningsfølende prosessen, 2) den kalsiumfrisettende prosessen og 3) koblingen mellom

disse prosessene. Denne oppgaven omhandler punkt 2: Den kalsiumfrisettende prosessen.

3.2. T-RØRSYSTEMET OG SARKOPLASMATISK RETIKULUM

3.2.1. T-rørene

T-rørsystemet består av tynne (21 - 24 nm) rør (Franzini-Armstrong, 1970) og innbuktninger i plasmamembranen som strekker seg inn mellom og rundt myofibrillene i muskelfibrene. Lumen i disse rørene er dermed i kontakt med ekstracellulærvæsken. Dette fører til at det er tilnærmet de samme konsentrasjonsforskjellene av forskjellige ioner over T-rørmembranen som over plasmamembranen. T-rørmembranen leder aksjonspotensialet. Ca 80% av T-rørmembranens intracellulære overflate vender mot sarkoplasmatiske retikulum (Franzini-Armstrong, 1970).

3.2.2. Sarkoplasmatiske retikulum

SR er et intracellulært spesialisert membransystem og har som hovedfunksjonen å ta opp og å lagre kalsium (kalsiumkonsentrasjon i mM-området). Membransystemet kan deles i to hovedområder med ulike funksjoner: den terminale delen (tSR) og den longitudinale delen (ISR). Den terminale delen skiller seg fra den longitudinale ved å ha (a) lavere lipid:protein forhold, (b) lavere aktivitet av Ca^{2+} -ATPase (Davies, 1990), (c) høyere innhold av proteinet calsequestrin (Saito *et al.*1984), som er et kalsiumbindende protein med en bindingskapasitet på ca $40 \text{ mol Ca}^{2+} \cdot \text{mol}^{-1}$ (Ikemoto *et al.*1989) og (d) evne til raskt å frisetts kalsium (ms) fra de indre kalsiumlagrene (Lai & Meissner, 1989). Ved homogenisering av muskel og deretter sentrifugering på sukrosegradient kan to fraksjoner med SR-vesikler skilles (Meissner, 1975; Meissner, 1984; Saito *et al.*1984). De tyngre SR-vesiklene består i hovedsak av membraner fra den terminale delen av SR, mens de lettere består av membraner fra resten av SR (fig. 3.1).

3.2.3. Triaden

T-rørmembranen står på spesielle steder i nær kontakt med den terminale delen av SR-membranen (Block *et al.*1988). Det vanlige arrangementet mellom T-rør og SR i muskelfibere fra vertebrater er en triadestruktur med et enkelt T-rør i midten med en

terminal sisterne av SR på hver side (Peachey & Franzini-Armstrong, 1983). Avstanden mellom de to membransystemene er målt til ca 10 - 13 nm (Lai & Meissner, 1989; Franzini-Armstrong, 1970). I rommet mellom de to membransystemene er det i elektronmikroskop observert tetragonale elektrontette strukturer som blir kalt fotstrukturer (Franzini-Armstrong, 1970). Disse "føttene" er en av de mest konserverte strukturene i muskel, og opptrer med samme oppbygning og avstand i alle typer av muskelfibere (Block *et al.*1988). Føttene dekker ca 30 % av T-rørmembranen og ca 3 % av den totale SR-membranen (Franzini-Armstrong, 1970).

Nyere undersøkelser har vist at føttene er identisk med kanalen som slipper kalsium ut fra SR under eksitasjon-kontraksjonskoblingen (Inui *et al.*1987a; Inui *et al.*1987b).

3.3. DIHYDROPYRIDINRESEPTOREN

Ved å depolarisere T-rørmembranen kan det utløses en langsom kalsiumstrøm (L-type) over membranen. Denne spenningsavhengige kalsiumstrømmen blir selektivt blokkert av dihydropyridiner (DHP), og kanalen som er ansvarlig for denne kalsiumstrømmen har derfor fått navnet DHP-reseptor. DHP-reseptoren er utbredt i de fleste typer vev og er spesielt vanlig i hjertemuskulatur og nervevev, men T-rørene i skjelettmuskel er det membransystem som har størst tetthet av DHP-reseptorer.

Den spenningsavhengige kalsiumkanalen (DHP-reseptoren) er et multisubenhetsprotein av ikke-kovalent assosierte subenheter med sammensetningen $\alpha_1\alpha_2\beta\gamma$ og den totale molekylmassen er ca 400 kDa. Videre er en liten (22-30 kDa) δ -enhet bundet til α_2 -enheten med en disulfidbinding (Pelzer *et al.*1989). DHP-bindingsstedet er lokalisert på α_1 -enheten. Denne subenheten er også substrat for proteinkinase A og C og en spesiell proteinkinase fra triader i skjelettmuskulatur. α_1 -subenheten har flere hydrofobe regioner som kan indikere at proteinet er integrert i membranen. cDNA-kloning har vist at α_1 -subenheten har store likheter med den spenningsavhengige natriumkanalen, både i aminosyresekvens og transmembran topologi (Tanabe *et al.*1987). Subenheten har fire interne repetisjoner som inneholder regulære sekvenser med positivt ladde aminosyrer. Dette er en oppbygning som er vanlig for spenningssensorer, og på grunn av likheten med natriumkanalen er det antatt man at dette er spenningssensoren i den spenningsavhengige kalsiumkanalen.

3.4. KALSIUMKANALEN I SR (RYANODINRESEPTOREN)

Fotstrukturen i mellomrommet mellom T-rørmembranen og SR membranen er identifisert som SR-kalsiumkanal eller ryanodinreseptoren (Inui *et al.*1987a; Inui *et al.*1987b). Ved homogenisering av muskel, vil fotstrukturen bli sittende på vesikler fra den terminale delen av SR og kan isoleres ved sentrifugering på tetthetsgradient (Saito *et al.*1984). Ryanodin binder seg med høy affinitet til fotstrukturen, noe som har vært viktig for isolering og identifisering av kalsiumkanalen i SR.

3.4.1. Elektronmikroskopi

Wagenknecht *et al.* beskrev i 1989 den tredimensjonale strukturen av ryanodinreseptoren ved hjelp av høyoppløselig elektronmikroskopi. Strukturen bestod av en firkantet boks med en størrelse på 27·27·14 nm, som gir et volum på 3800 nm³. Med en proteintetthet på 1.37 g·cm⁻³ gir dette en molekylmasse på ca 3.1 MDa. Dette er noe høyere enn verdien som er funnet ved SDS-PAGE ($M_v=360-450$ kDa/subenhet) (Lai *et al.*1988; Imagawa *et al.*1987; Inui *et al.*1987a), og hvis det antas at proteinet består av fire like subenheter. Forskjellen kan skyldes at strukturen har en annen tetthet enn antatt, eller at molekylet er større enn SDS-PAGE-resultatene tilsier (se kap. 3.4.2.). De to største sidene av boksen, som vender mot henholdsvis T-rørmembranen og SR-membranen, var helt tydelig forskjellige. Den ene siden består av en firkantet hydrofob plattform som *in situ* antagelig er intergrert i SR-membranen. Den andre siden som vender mot T-rørmembranen viser antydning til fire radiale kanaler. Wagenknecht *et al.* (1989) foreslår ut fra disse observasjonene følgende "pathway" for kalsiumet: I den hydrofobe plattformen er det en eller flere kanaler som slipper kalsium inn i en sentral kanal (som var tydelig på EDB-genererte snitt av proteinet), og videre ut i de fire radiale kanalene. Fra de fire radiale kanalene slippes kalsium ut i mellomrommet mellom SR- og T-rørmembranene som igjen står i kontakt med myoplasma.

3.4.2. cDNA, primær- og sekundær-struktur

Flere forskningsgrupper har arbeidet med kloning og sekvensering av ryanodinreseptoren fra ulike typer vev. Takeshima *et al.* (1989) var først ute med å kartlegge sekvensen til ryanodinreseptoren fra skjelettmuskulatur fra kanin. Zorzato *et al.* (1990) har senere beskrevet kloning og sekvensering av cDNA til ryanodinreseptor fra både human- og kanin-skjelettmuskel, og Otsu *et al.* (1990) har klonet og sekvensert ryanodinreseptoren

fra kanin hjertemuskelatur. Inntil 1991 var ryanodinreseptoren det største proteinet som var sekvensert ved hjelp av cDNA.

Det humane cDNA for ryanodinreseptoren koder for et protein med 5032 aminosyrer, med en molekylmasse på 563.584 Da (Zorzato *et al.*1990), mens kanin cDNA gir et protein på 5037 aminosyrer med molekylmasse på 565.223 Da (Takeshima *et al.*1989). Disse molekylmassene er betraktlig høyere enn molekylmasser bestemt ved SDS-PAGE, men det stemmer bedre med størrelsen som er funnet for fotstrukturen ved høyoppløselig elektronmikroskop (Wagenknecht *et al.*1989). Det er bare mindre forskjeller (6 aminosyrer) i de to publisert aminosyresekvensene for kanin skjelett ryanodinreseptor. Forskjellen mellom kanin og human ryanodinreseptor er imidlertid store. De største forskjellene ble funnet i et område med store mengder sure aminosyrer, hvor det ble funnet områder med både delelesjoner og innskytelser (Zorzato *et al.*1990). Det er også funnet store områder som har helt lik aminosyresekvens. Den første av disse konserverte områdene inneholder en mulig kalmodulinbindende sekvens, mens to andre konserverte områder inneholder mulige transmembrane sekvenser. Videre er det funnet 4 repeterte sekvenser på 114-120 aminosyrer (Zorzato *et al.*1990). Konsensus-sekvensen for disse områdene vil kunne gi en β - α - β - α struktur, og med to slike påfølgende enheter er det mulig å få et domene bestående av paralelle β -sheet (Zorzato *et al.*1990).

Ryanodinreseptoren moduleres av flere fysiologisk viktige ioner/molekyler, bl.a. Ca^{2+} , Mg^{2+} og ATP, og det har derfor vært av interesse å finne mulige bindingssteder for disse ionene/molekylene. Ca^{2+} bindes med høy affinitet til en proteinstruktur, bestående av to α -helikser og en "loop" mellom disse, som kalles EF-hånden, og Zorzato *et al.* (1990) har søkt etter en slik struktur. En slik struktur ble ikke funnet, men det ble funnet glutamatrike områder som er mulige lavaffinitets Ca^{2+} -bindingssteder. Områder som kan tilsvare konsensus-sekvens for binding av adenin nukleotider er heller ikke observert. Konsensus-sekvensen for Mg^{2+} er ennå ikke definert.

Ved hydroptiplot (plot av den frie energien som skal til for å overføre en heliks fra en membran til vann, mot posisjonen i proteinet) er det funnet henholdsvis 4 (Takeshima *et al.*1989) og 12 (Zorzato *et al.*1990) potensielle transmembrane områder. Ifølge Zorzato *et al.* (1990) har fire av de 12 sekvensene en høyere hydropti-indeks enn de resterende. Alle de fire sekvensene er lokalisert i den COOH-terminale delen av proteinet. I den COOH-terminale delen er det også funnet sterkt ladete områder. Dette kan være

områder som tar del i "gatingen" av Ca^{2+} på den luminal side av proteinet, eller områder som fungerer som en ioneselektiv sil.

På grunnlag av kjente data, kan følgende tertiær struktur gis av ryanodinreseptoren: (1) Et stort cytoplasmisk domene i den NH_2 -terminale delen av proteinet, (dette domenet sees som fotstrukturen ved elektronmikroskopianalyse), (2) et hengselområde som også inneholder modulator bindingssteder, (3) et hydrofobt område med potensielle transmembrane sekvenser, og (4) et lumbalt område (i SR) som muligens bidrar til selektivitet eller "gating" av Ca^{2+} (muligens via calsequestrin) (se fig 3.2).

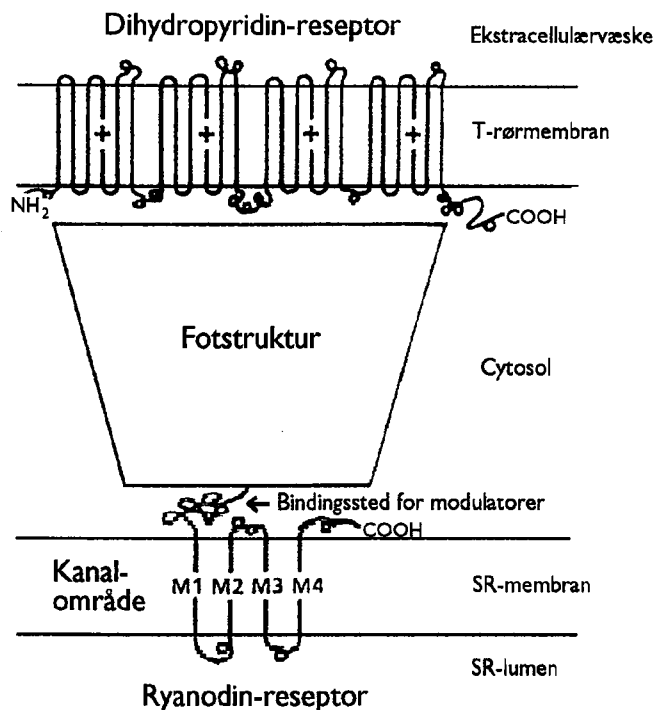


Fig. 3.2.: Foreslått topologi for DHP-reseptoren og ryanodinreseptoren i skjelettmuskel (Takeshima *et al.* (1989)). M1 - M4 står for 4 transmembrane regioner. Zorzato *et al.* (1990) har foreslått 12 potensielle transmembrane regioner.

3.5. KALSIMUM-TRANSIENTER UNDER MUSKELKONTRAKSJON

Den morfologiske sammenhengen mellom T-rør og SR, samt membranpotensialets rolle ble klarlagt på midten av 1960-tallet (Franzini-Armstrong, 1970). I den forbindelse ble det funnet at Ca^{2+} frisettes fra SR til myoplasma som respons på depolarisering av T-rørene. Den totale kalsiummengden i muskel er $0.87 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ våt muskel (Verburg *et al.* 1991). Selv om SR bare utgjør ca 5 % av skjelettmuskelens totale volum (Peachey

& Franzini-Armstrong, 1983), inneholder den 25 % av den totale kalsiummengden (Rega & Garrahan, 1986). Det meste av kalsiumet i SR er bundet til forskjellige kalsiumbindende proteiner, hvorav calsequestrin er det viktigste.

Deler av kalsiumet som blir frisatt fra SR ved muskelaktivering bindes til troponin C, parvalbumin og andre kalsiumbindende proteiner i cytosol. Likevel kan den frie kalsiumkonsentrasjonen i cytosol øke fra 10⁻⁸ M til 10⁻⁵ M under kontraksjon. Dersom alt kalsiumet i SR ble sluppet ut i cytosol, ville konsentrasjonen kunne nå opp i millimolarområdet. Ca²⁺-nivået er imidlertid nøye regulert av to prosesser: kalsiumfrisetting fra SR og fjerning av kalsium fra cytosol.

Normalt vil det meste av kalsiumet, som slippes fri fra SR ved et aksjonspotensiale, pumpes tilbake til SR. Ca²⁺-ATPasen i SR er halvt maksimalt aktivert (K_{0.5}) ved en cytosolkonsentrasjon av Ca²⁺ på 0.5 μM (Hasselbach & Oetliker, 1983) og starter derfor tilbakepumpingen av Ca²⁺ selv ved små økinger av [Ca²⁺] i cytosol. Ca²⁺-ATPasen i sarkolemma har en mye høyere K_{0.5} og bidrar trolig lite til fjerningen av kalsium fra cytosol (Carafoli, 1991). Mitokondrier er en annen organell som kan ta opp kalsium. Under helt spesielle former for muskelaktivering kan det skje en viss akkumulering av kalsium i mitokondrier (Duan *et al.* 1990), men dette er antagelig ikke vanlig.

Det har lenge vært vanskelig å studere frisettingen og tilbakepumpingen av Ca²⁺ som funksjon av tiden. Fram til slutten av 1970-tallet ble måling av kraftutvikling eller muskelforkortning brukt som et indirekte mål på Ca²⁺-frisetting og Ca²⁺-flukser. Ioneselektive elektroder har også vært brukt på forskjellige muskelpreparater (bl.a. "skinned fibers", d.v.s muskelfibere hvor sarcolemma er fjernet (Natori, 1954)), men ioneselektive elektroder reagerer antagelig for langsomt til å oppfatte de raske endringene i Ca²⁺-konsentrasjonen i cytosol. Metoden som er mest anvendt idag, er optiske Ca²⁺-indikatorer. Optiske Ca²⁺-indikatorer består enten av proteiner som ved binding av Ca²⁺ gir luminiscens (aquorin), eller absorberende (antipyrylazo III) eller fluorescerende (fura-2, Rhod-2, fluo-3) fargestoffer. Det er flere problemer med Ca²⁺-indikatorerne: Lavaffinitets indikatorerne (f.eks. antipyrylazo III) kan brukes til kinetiske studier, men på grunn av stor binding til strukturer i cellen kan de ikke brukes til absolutte mål av Ca²⁺. Høyaffinitets indikatorerne (f.eks. fura-2) bufrer de store Ca²⁺-transientene som er i skjelettmuskel, og på grunn av den lave "OFF"-hastigheten kan ikke de raske Ca²⁺-transientene følges (Rios & Pizarro, 1991). Til tross for metodeproblemene, er det publisert data på Ca²⁺-

transienter i skjelettmuskulatur. Fordi systemene er vanskelige å kalibrere, er Ca^{2+} -konsentrasjonene ofte gitt som relative verdier.

3.6. REGULERING AV Ca^{2+} -FRISSETTING FRA SR

Frisettingen av Ca^{2+} fra SR kan initieres på minst to ulike måter: (1) Ved "fjernkontroll" hvor en signalsubstans frigjøres fra T-rørene som respons på depolarisering (kap. 3.6.1. og 3.6.2.), eller (2) ved direkte signaloverføring der det er en direkte kobling fra strukturer i T-rør membranen til strukturer i SR-membranen (kap. 3.6.3.). Trolig er frisettingen av Ca^{2+} ikke bare regulert fra cytoplasmasiden. Ifølge Ikemoto *et al.* (1989) kan det Ca^{2+} -bindende proteinet calsequestrin binde seg til ryanodinreseptoren på den luminalen siden, og mengde og hastighet på frisatt Ca^{2+} er avhengig av mengden kalsium som er bundet til calsequestrin.

3.6.1. Kalsiumindusert-kalsiumfrisetting (CICR)

En hypotese for Ca^{2+} -indusert- Ca^{2+} -frisetting er som følger: DHP-reseptoren i T-rørene, som også fungerer som Ca^{2+} -kanal og spenningssensor, slipper ut en liten mengde Ca^{2+} som respons på depolarisering av T-rørmembranen. Konsentrasjonen av DHP-reseptorer i T-rørene, som er anslått til 20 - 200 pmol·mg⁻¹ protein (Caswell & Brandt, 1989; Fosset *et al.* 1983), vil trolig ikke slippe inn store nok mengder Ca^{2+} til å initiere kontraksjon. Ved å binde seg til høyaffinitetssteder på ryanodinreseptoren kan imidlertid Ca^{2+} stimulere åpning av Ca^{2+} -kanalene i SR som i sin tur slipper ut store nok mengder med Ca^{2+} fra SR til å initiere kontraksjon.

I følge flere forskningsgrupper (Caswell & Brandt, 1989; Ford & Podolsky, 1970; Meissner, 1984; Nelson & Nelson, 1990), kan en øking i Ca^{2+} -konsentrasjonen på noen få μM aktivere Ca^{2+} -frisetting fra SR i tilstrekkelig grad til å initiere muskelkontraksjon. En årsak til at denne muskelaktiverings-mekanismen ikke er allment akseptert er at skjelettmuskelen kan fortsette å kontrahere selv etter at ekstracellulær Ca^{2+} er fjernet med EGTA (Armstrong *et al.* 1972).

Ca^{2+} -indusert- Ca^{2+} -frisetting er imidlertid antatt å være den viktigste mekanismen for utløsning av kontraksjoner i hjertemuskulatur (Hess, 1988).

3.6.2. Inositol trifosfat som stimulus for Ca^{2+} -frisetting fra SR

Stimulus fra "second messengeren" inositol 1,4,5-trifosfat (IP_3) inngår i en annen modell for eksitasjons-kontraksjonskoblingen. Følgende mekanisme har vært foreslått: IP_3 frisettes fra T-rørmembranen og diffunderer over til SR-membranen og induserer en Ca^{2+} -frisetting ved å åpne Ca^{2+} -kanaler i SR (Vergara *et al.*1985; Volpe *et al.*1985). Resultater som støtter (Hidalgo *et al.*1986; Nosek *et al.*1986; Rojas *et al.*1986; Volpe *et al.*1985) og ikke støtter (Palade, 1987; Pape *et al.*1988; Mikos & Snow, 1987), hypotesen er rapportert. Resultater som støtter hypotesen viser at Ca^{2+} frisettes som respons på IP_3 (Valdivia *et al.*1990), og enzymene som er nødvendig i IP_3 -systemet (PI(4,5) P_2 -fosfolipase C og IP_3 -fosfatase) er til stede i T-rørmembranen (Hidalgo & Jaimovich, 1989). En viktig innvending mot IP_3 -hypotesen er at IP_3 -indusert Ca^{2+} -frisetting er langsom i forhold til kontraksjonshastigheten i skjelettmuskulatur (33 ms til kontraksjon ved mikroinjeksjon av IP_3 i cytosol (Vergara *et al.*1985)). Disse resultatene kan indikere at det finnes en IP_3 -sensitiv kalsiumkanal i skjelettmuskulatur som er forskjellig fra ryanodinreseptoren (Valdivia *et al.*1992). Ifølge Penner *et al.* (1989) har IP_3 ingen effekt på ryanodinsensitiv kalsiumkanal uttrykt i kinesiske hamster ovarieceller transformert med ryanodinreseptor cDNA. Dette indikerer at ryanodinreseptoren og IP_3 -reseptorer er forskjellige proteiner i skjelettmuskulatur. Selv om IP_3 ikke er noen direkte aktivator for muskelkontraksjon, kan den godt fungere som modulator i prosessen (Penner *et al.*1989).

3.6.3. DHP-reseptoren som spenningssensor

I en tredje modell skjer kommunikasjonen mellom T-rør og SR via en direkte kontakt mellom de to membransystemene. I motsetning til den transmitterbaserte modellen, er denne modellen ikke tids- eller konsentrasjonsbegrenset. Denne hypotesen, som først ble foreslått av Schneider og Chandler (1973), blir støttet av morfologien, det vil si fotstrukturene, som er funnet i mellomrommet mellom SR og T-rør. Videre har flere, bl.a. Meissner *et al.* (1986) vist at Ca^{2+} -frisetting skjer fra den terminale delen av SR, det vil si den delen som står i nær kontakt med T-rørene (se fig. 3.1). Opprinnelige besto modellen av en "plugg" i T-rørmembranen som på grunn av depolariseringen av membranen forandret konformasjon og dermed åpnet Ca^{2+} -kanalen i SR (Chandler *et al.*1976; Caswell & Brandt, 1989). Csernoch *et al.* (1991) har vist at det ved depolarisering av T-rørmembranen oppstår en "hump" i strømmen som går over membranen ("gating current") og antyder at denne "humpen" kan være et tegn på en forskyvning av DHP-reseptorens posisjon i membranen. En slik forskyvning vil muligens

kunne påvirke ryanodinreseptoren. Dette forutsetter imidlertid en DHP-reseptor for hver ryanodinreseptor. Block *et al.* (1988) har ved frysefraktur elektronmikroskopi vist at det bare er en DHP-reseptor for hver andre fotstruktur. Caswell og Brandt (1989) har brukt flere metoder (bl.a. affinitets kromatografi, "gel overlay" og kryssbinding) for å undersøke hvilke proteiner i T-rørene som bindes til fotstrukturen. De har funnet en assosiasjon mellom glykolytiske enzymer (glyceraldehyd 3-fosfat dehydrogenase og aldolase) og fotstrukturen, men ingen direkte assosiasjoner mellom DHP-reseptoren og fotstrukturen. Assosiasjonen mellom de glykolytiske enzymene og fotstrukturen er antagelig ikke spesifikk siden de glykolytiske enzymene bindes til flere ulike proteiner i T-rørene. Chadwick *et al.* (1988) har funnet assosiasjoner mellom fotstrukturen og et protein med molekylmasse 72.000 Da i T-rørene, men dette proteinet er ikke en del av DHP-komplekset.

I og med at kommunikasjonen mellom proteinene i de to membransystemene fremdeles ikke er klarlagt er dette en viktig begrensning ved direktekobling hypotesen.

3.7. MALIGN HYPERTERMI (MH)

Malign hypertermi (MH) er en arvelig muskellidelse, som hos menneske er potensielt dødelig med en sannsynlighet varierende fra 1 på 15 000 for barn til 1 på 100 000 for voksne (Fill *et al.* 1991). Lidelsen arter seg ved en kraftig øking i både det aerobe og det anaerobe stoffskiftet (Gronert, 1980), som fører til økt temperatur (Britt, 1979; Iazzo *et al.* 1989a) og en stor produksjon av CO₂ og melkesyre (Gronert, 1980). Temperaturøkningen kan være opptil 1 °C per 5 min, og det er ikke uvanlig med kroppstemperaturer på over 43 °C. pH i arterielt blod kan falle til under 7.00 (normalt 7.40), mens pCO₂ kan bli høyere enn 13 kPa (normalt 5 kPa). Den utløsende faktoren kan være inhalering av flere vanlige anestetika, bl.a. halotan, eller bruk av muskelavslappende midler (Iazzo *et al.* 1989a). Hos griser kan forskjellige former for stress (slåssing, frakting) være utløsende faktor (Gronert, 1980), og malign hypertermi er et stort problem innen veterinærmedisinen. I forsøk på intakte muskelfibere fra disponerte individer (MHS), er det observert økt intracellulær Ca²⁺-konsentrasjon etter behandling med halotan (Iazzo *et al.* 1989b). Kilden til kalsiumet er antagelig SR siden det er vist uregelmessig regulering av kalsiumkonsentrasjonen i SR-vesikler fra MHS-muskler (Endo *et al.* 1983; Ohnishi *et al.* 1983). Gallant (1989) har vist at avspenningshastigheten er langsommere for muskler fra griser med MH enn for normale

griser, og han mener dette kommer av svikt i reguleringen av enten Ca^{2+} -frisettingen eller den aktive transporten av Ca^{2+} fra cytoplasma til SR. Målinger på ryanodinreseptoren fra human MHS-muskel, som er inkorporert i lipid-dobbeltlagmembran, har vist Ca^{2+} -kanalegenskaper med unormal kaffeinsensitivitet (Fill *et al.* 1991). Koffein er kjent for å utløse kalsiumfrisetting fra SR. Ved målinger på enkeltkanaler har Fill *et al.* (1990) vist at ryanodinreseptoren fra MHS-griser har lengre åpningstid enn ryanodinreseptoren fra normale griser. MHS-kanalene synes ikke å inaktiveres ved fysiologiske Ca^{2+} -konsentrasjoner. Dette kommer trolig av et endret lavaffinitets Ca^{2+} -bindingssete på SR-kanalen. Denne endringen kan ha kommet fra en mutasjon i genet som koder for ryanodinreseptoren. McCarthy *et al.* (1990) har lokalisert genet for MHS hos menneske til kromosom 19, og MacLennan *et al.* (1990) har vist at polymorfe markører for ryanodinreseptor-genet feller sammen med MHS-genet. Et annet funn som kan indikere at MHS-muskler har feil i ryanodinreseptoren, er endret binding av ryanodin (se kap 3.8). Ervasti *et al.* (1991) fant forandringer i ryanodinbinding i både rask og langsom muskulatur hos MHS-griser sammenlignet med normale muskler. Dette gjaldt både Ca^{2+} -følsomhet og K_D , mens B_{maks} var uforandret (kap. 6.2.8.9). Funnene beskrevet over tyder på at ryanodinreseptor-genet er det samme som MHS-genet.

3.8. RYANODIN

Ryanodin (Ryanodol 3-(1H-pyrrole-2-carboxylate) (fig. 3.4.)) ($M_v = 493.5$) er et toksisk nøytralt alkaloid fra planten *Ryania speciosa*, som består av grå-hvite krystaller, er lite løselig i vann og løselig i etanol.

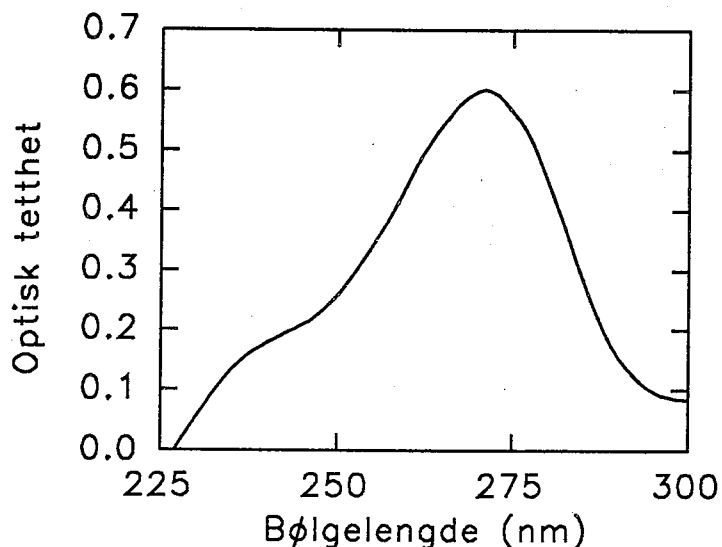
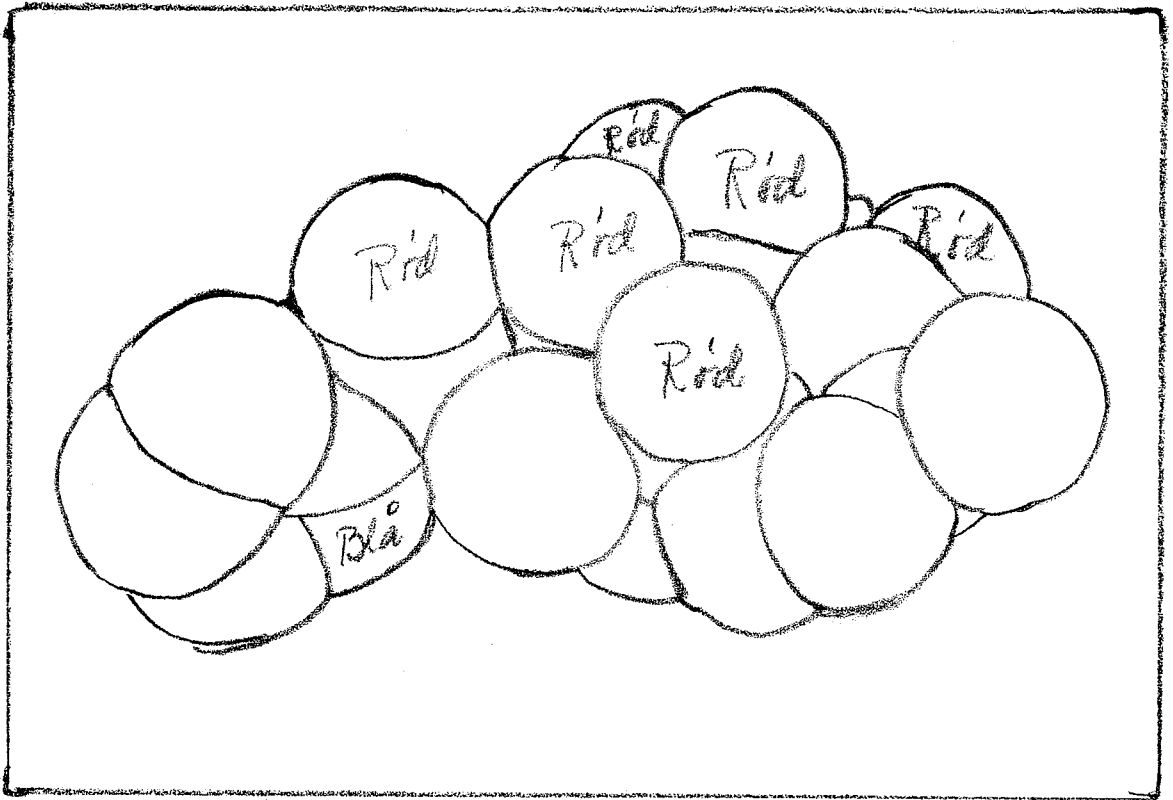


Fig. 3.3. Absorpsjonsspekteret av ryanodin.



De couleur et taille

Spekteret av ryanodin er gitt i fig. 3.3. Dette viser at ryanodin har et OD_{maks} ved 268.5nm. Absorpsjonen ved denne bølgelengden kommer av pyrrolringen som er bundet til resten av molekylet ved en karboksylatbru.

┌

L

Fig. 3.4. "Space-fill" modell av ryanodin. Hvite, røde og blå kuler markerer henholdsvis karbon-, oxygen- og nitrogen-atomer. Hydrogenatomer er utelatt for oversiktens skyld. Molekylet er konstruert ved hjelp av det PC-baserte programmet "Alchemy", på bakgrunn av data fra Jenden & Fairhurst, 1969, Waterhouse *et al.* 1984 og Lai & Meissner, 1989. Legg merke til orienteringen av de fleste oksygenatomene.

Ryania speciosa tilhører familien *Flacourtiaceae* som står nær fiolfamilien. Planten er et tre/buske opptil 13 m høyt. Stammen er hard og kan bli opptil 15 cm i diameter. *R. speciosa* vokser i den nordlige del av Syd-Amerika, sydlige del av Mellom-Amerika samt på øyene i det Karibiske hav. Alle deler av planten er toksisk, og en nær slektning av *R. speciosa*, *R. angustifolia*, har blitt brukt av indianere i Amazonasbassenget til forgiftning av alligatorer (Sleumer, 1980). Ryanodin er regnet som det mest aktive stoffet i pulveret som utvinnes fra stammen på *R. speciosa*. I tillegg finnes 9,21-didehydroryanodin i dette pulveret (Waterhouse *et al.* 1984). Pulveret som går under betegnelsen "Ryania powder", "Ryanex" eller "Ryanicide" har blant annet blitt brukt som insekticid mot så forskjellige insekter som maisborer (*Pyrausta nubilalis*), husflue (*Musca domestica*), liten kålsommerfugl (*Pieris rapae*), mygg (*Culex fatigans*) og tysk kakerlakk (*Blattella germanica*) (Crosby, 1971).

Hos vertebrater gir ryanodin en kraftig hemming av kraftutvikling i hjertemuskulatur, mens den gir en irreversibel kraftutvikling i skjelettmuskulatur.

3.9. KALSIMUMREGULERING I SKJELETTMUSKEL

Kraften en muskel kan utvikle, faller hvis aktiviteten i muskelen blir opprettholdt. Dette kalles trøtthet, og denne form for trøtthet kan ha sin årsak i det sentralnervøse system, i den neuromuskulære overføringen av signalet eller i selve muskelen.

Ved å stimulere **isolerte** muskelpreparater er det funnet tegn til trøtthet, noe som viser at prosesser i selve muskelen kan bidra sterkt til trøttheten (Bigland-Ritchie & Woods, 1984). Det har vært foreslått to hovedmekanismer for å forklare trøtthet i isolerte muskelpreparater: 1) Virkningen av metabolske produkter på de kontaktile proteiner, som fører til en reduksjon i evnen til å utvikle kraft (Fabiato & Fabiato, 1978; Cooke & Pate, 1985; Kentish, 1986; Godt & Nosek, 1989) og 2) svikt i reguleringen av den intracellulære kalsiumkonsentrasjonen, noe som fører til redusert aktivering av de kontraktile proteiner (Byrd *et al.* 1989; Westerblad *et al.* 1990; Gollnick *et al.* 1991; Duan *et al.* 1990).

Flere resultater viser at den siste mekanismen kan være en viktig årsak til redusert kraftutvikling i trøtt muskel. Westerblad *et al.* (1990) har ved hjelp av fura-2 vist at både i hvile og ved tetanisk stimulering av muskelen får muskelen et kalsiuminnhold som er jevnt fordelt i muskelfiberen. Hvis derimot en høyfrekvent tetanisk stimulering vedvarer, reduseres utslippet av kalsium og kalsiumet i muskelfiberen fordeles ujevnt, med høyere konsentrasjoner i de perifere delene av cellen. Denne konsentrasjonsforskjellen forsvinner raskt hvis stimuleringsfrekvensen senkes. Disse resultatene tyder på at Ca²⁺-frisettingen fra SR er utilstrekkelig, og at det reduserte Ca²⁺-utslippet enten skyldes svikt i ledningen av aksjonspotensialet i T-rørene, eller metabolske faktorer (Westerblad *et al.* 1990). Videre kan kaffein, som er kjent for å stimulere Ca²⁺-frisetting fra SR, øke kraften i en ellers utmattet muskel (Allen *et al.* 1989; Lännergren & Westerblad, 1989). Dette viser at hemmingen i kontraksjon ikke skyldes manglende evne til å danne kryssbruer mellom aktin og myosin. Byrd *et al.* (1989) har vist at SR-vesikler isolert fra bakbensmuskler på rotter som har løpt på tredemølle, har redusert maksimalkapasitet for kalsiumopptak og forandret Ca²⁺-ATPase-aktivitet. Forfatterene konkluderer med at Ca²⁺-ATPasen i noen av muskelfiberne (de dypere delene av muskelen) har blitt inaktivert på grunn av løpingen.

I følge Zorzato *et al.* (1989) har terminale cisterner isolert fra inaktivert kaninmuskel (denervert i 2 uker) høyere binding av ryanodin og høyere innhold av calsequestrin, men lavere Ca^{2+} -frisettings hastighet i forhold til kontrollgruppen. Forfatterne slutter av disse resultatene at de terminale delene av SR er overutviklet i forhold til de longitudinale delene.

Alle disse resultatene viser at kalsiumreguleringen i skjelettmuskulatur er følsom for forskjellige typer påvirkning. De viser både en langtidsregulering av syntesen av ryanodinreseptoren, og en nøye regulering av den intracellulære kalsiumkonsentrasjonen. Videre viser resultatene at kalsiumbalansen kan forstyrres under spesielle forhold. Resultatene gir ikke et entydig bilde av årsaken til denne ubalansen, men antyder at den kan ligge på flere steder: 1) Signaloverføringen fra T-rør til SR, 2) Ca^{2+} -utslippet fra SR og 3) Ca^{2+} -ATPasens pumping av kalsium tilbake til SR.

Som beskrevet kan en ubalanse i Ca^{2+} -homeostasen ha drastiske effekter på reguleringen av de kontraktile egenskapene til skjelettmuskulatur. I tillegg kan en ubalanse ha alvorlige konsekvenser for andre funksjoner i muskelcellen. Av disse kan blant annet nevnes opptak/akkumulering av kalsium i mitokondrier som fører til forstyrrelser i respirasjonen og ATP-produksjonen (Duan *et al.* 1990) (kap. 3.9.1); økt fosfolipase- A_2 -aktivitet som fører til produksjon av lysofosfolipider, leukotriener og prostaglandiner som kan gi degradering av cellulære strukturer (Jackson *et al.* 1984); aktivering av Ca^{2+} -aktiverte proteaser (McCully & Faulkner, 1986) og til sist stimulering av produksjonen av frie radikaler som kan gi peroksydering av lipider i membraner (Duan *et al.* 1990).

3.9.1. Kalsiums virkning på metabolismen

Under muskelkontraksjon brukes energien i muskelen vesentlig i tre prosesser: Na^+, K^+ -ATPasen i plasmamembranen, Ca^{2+} -ATPasen i sarkoplasmatiske retikulum og myosin-ATPasen. Energiforbruket varierer sterkt avhengig av hva slags arbeid muskelen utfører. Ved maksimalt kontraktilt arbeid eller i hvile vil Na^+, K^+ -ATPasen forbruke bare 4 - 10 % av det totale energiforbruket (Clausen *et al.* 1991). I hvile står Ca^{2+} -ATPasen for bare et par prosent av det totale energiforbruket i muskel, men ved kontraktill aktivitet vil Ca^{2+} -pumpingen svare for opptil 20 - 50 % av det totale energiforbruket (Clausen *et al.* 1991). Myosin-ATPasen står stort sett for resten av energiforbruket. Det ser imidlertid ikke ut til at ATP-mengden er begrensende for muskelkontraksjon i en utmattet muskel under alle typer arbeid. Under spesielle forhold faller ATP raskt til 70 - 80 % av hvileverdien

etter at arbeidet starter, men holder seg på dette nivået helt til muskelen er utmattet (Vøllestad & Sejersted, 1988; Fitts, 1992). Tilgangen til ATP for de energikrevende prosessene kan imidlertid være begrenset av kompartmentalisering av ATP i muskelen.

Ved forhøyet [Ca]_i, for eksempel ved tetanus eller malign hypertermi, vil mitokondriene ta opp kalsium og gjenspeile kalsiumkonsentrasjonen i cytosol. Om kalsiumkonsentrasjonen i mitokondriene øker, vil det stimulere tre dehydrogenaser: pyruvat dehydrogenase, isocitrat dehydrogenase og α-ketoglutarat dehydrogenase. Dette vil føre til økt fluks gjennom sitronsyresyklusen og dermed økt produksjon av NADH og ATP. Dette er en fornuftig reguleringsmekanisme som gir muskelen tilgang på større mengder energi når det er behov for det. For høye kalsiumkonsentrasjoner i mitokondriene vil derimot føre til at membranpotensialet over den indre mitokondriemembranen bryter sammen, og ATP-syntesen stopper opp.

To viktige kontrollpunkter for nedbrytingen av glykogen (i cytosol) er fosforylase og fosfofruktokinase (PFK). Økte Ca²⁺-verdier i cytosol fører til en aktivering av fosforylase kinase som fører til en overgang fra fosforylase *b* til fosforylase *a*. Dette fører igjen til økt nedbrytning av glykogen og dannelsen av glukose-1-fosfat. I tillegg har det vært foreslått en mekanisme for Ca²⁺-calmodulinstimulering av PFK som er det viktigste flukskontrollerende enzymet i glykolysen i muskel (Mayr, 1984).

4. Problemstilling

Kalsium er en meget viktig regulator av muskelkontraksjon. En nøye regulering, både i tid og konsentrasjon, av den intracellulære kalsiumkonsentrasjonen i muskelceller er derfor nødvendig. Kalsiumreguleringen består hovedsak av to prosesser: 1) binding av Ca^{2+} til kalsiumbindende proteiner og 2) forflytting av Ca^{2+} inn og ut av SR. To viktige proteiner inngår i forflyttingen av kalsium: 1) Ca^{2+} -ATPasen som opprettholder en lav (sub mikromolar) intracellulær kalsiumkonsentrasjon ved å pumpe Ca^{2+} fra cytosol til SR og 2) Ca^{2+} -kanalen (ryanodinreseptoren) som slipper ut Ca^{2+} fra SR som respons på et aksjonspotensiale. For å øke kunnskapen om reguleringen av den intracellulære kalsiumhomeostasen, var det ønskelig å kvantifisere Ca^{2+} -ATPasen og ryanodinreseptoren i muskelbiopsier. Everts *et al.* (1989) har allerede utviklet en metode for kvantifisering av Ca^{2+} -ATPasen i SR i muskelbiopsier.

Hensikten med denne oppgaven var derfor å bestemme de optimale betingelsene for bindingen av ryanodin til kalsiumkanalen i SR, for siden å utvikle en metode for kvantifisering av kalsiumkanalen i muskelbiopsier.

Arbeidsplanen var som følgende:

- 1) - Optimalisere en metode for isolering av vesikler fra de terminale delene av SR fra skjelettmuskel.
- 2) - Utvikle en sensitiv metode for måling av Ca^{2+} i sub- μM -området for å kunne studere ryanodinbindingens avhengighet av Ca^{2+} .
- 3) - Optimalisere bindingsbetingelsene for ryanodin til ryanodinreseptoren.

5. Materialer

Produkt	Produsent	Produkt nr.
2-nitrofenyl oktyl eter	Fluka Chemika	73732
AgCl	Mallinckrodt	2142
Aprotinin	Sigma	A-1153
ATP monitoring reagent	Bio Orbit	1243-200
BAPTA	Sigma	A-9801
Benzamidin	Aldrich-Chemie	B-200-4
CaCl ₂	Merck	2382
EDTA	Merck	8418
Etanol	AS Vinmonopolet	
Fenylmetylsulfonylfluorid	Sigma	P-7626
Imidazol	Sigma	I-0125
Kalium tetrakis(4-klorofenyl)borat	Fluka Chemika	60591
Kalsium ionofor II (ETH 129)	Fluka Chemika	21193
KCl	Sigma	P-4504
Leupeptin	Sigma	L-2884
Metanol	Merck	6007
MgATP	Sigma	A-0770
MgCl ₂	Sigma	M-0250
Na ₂ ATP	Sigma	A-2383
Na ₃ CTP	Sigma	C-1631
Na ₃ GTP	Sigma	G-8752
Na ₃ ITP	Sigma	I-0879
Na ₃ UTP	Sigma	U-6750
NaCl	Sigma	S-9625
Pepstatin	Sigma	P-4265
Polyvinylklorid (Høy molekylvekt)	Fluka Chemika	256294
Ryanodin	Wako Chemicals	181-00961
Ryanodin	Agri Systems	
Sukrose	Sigma	S-9378
Tetrahydrofuran	Sigma	T-5267
Tris(hydroksymetyl)aminometan	Sigma	T-1503
[³ H]ryanodin	NEN	NET-950

6. Metoder

Første del av metodekapitlet (kap. 6.1 og 6.2) omhandler prosedyren for isolering av SR-vesikler og metodene for optimalisering av betingelsene for binding av ryanodin til vesiklene. Den andre delen omhandler utviklingen av Ca²⁺-selektive elektroder, oppsetting av en HPLC-metode og statistiske metoder.

6.1. ISOLERING AV MIKROSOMER FRA SR

Metoden som er benyttet ved isoleringen av SR-vesikler, er en modifisert metode beskrevet av Saito *et al.* (1984). Metoden er illustrert i figur 6.1.

Reagenser:

- Homogeneringsbuffer (0.3 M sukrose, 5 mM imidazol-HCl, pH 7.4)
- Proteasehemmere (0.5 µg·ml⁻¹ aprotinin, 0.5 µg·ml⁻¹ pepstatin, 0.5 µg·ml⁻¹ leupeptin, 0.83 mM benzamidin, 0.23 mM PMSF).
- Sukrosløsninger til gradientsentrifugering bufret til pH 7.4 med 5 mM imidazol-HCl.

6.1.1. Muskelpreparering

Kaniner (New Zealand White) ble anestesert med Hypnorm Dormicum. Bakbeina ble blottlagt, og hvit muskel fra lår- og leggmuskulatur ble dissikert ut. Musklene ble øyeblikkelig overført til kald (4 °C) homogeneringsbuffer tilsatt proteasehemmere.

6.1.2. Homogenisering

Resten av mikrosomisoleringen foregikk på kjølerom (4 °C). Musklene ble dissikert fri for fett og bindevev og kappet opp i biter på 1 - 2 g. Deretter ble 50 g muskel homogenisert, i 250 ml homogeneringsbuffer med proteasehemmere, i en Sorvall homogenisator i 1 min ved maksimal hastighet. Homogenatet ble homogenisert en gang til i 1 min med en Ultra-Turrax ved 25.000 rpm. Forsøk viste at denne ekstra homogeniseringen ga høyere binding av [³H]ryanodin til mikrosomene.

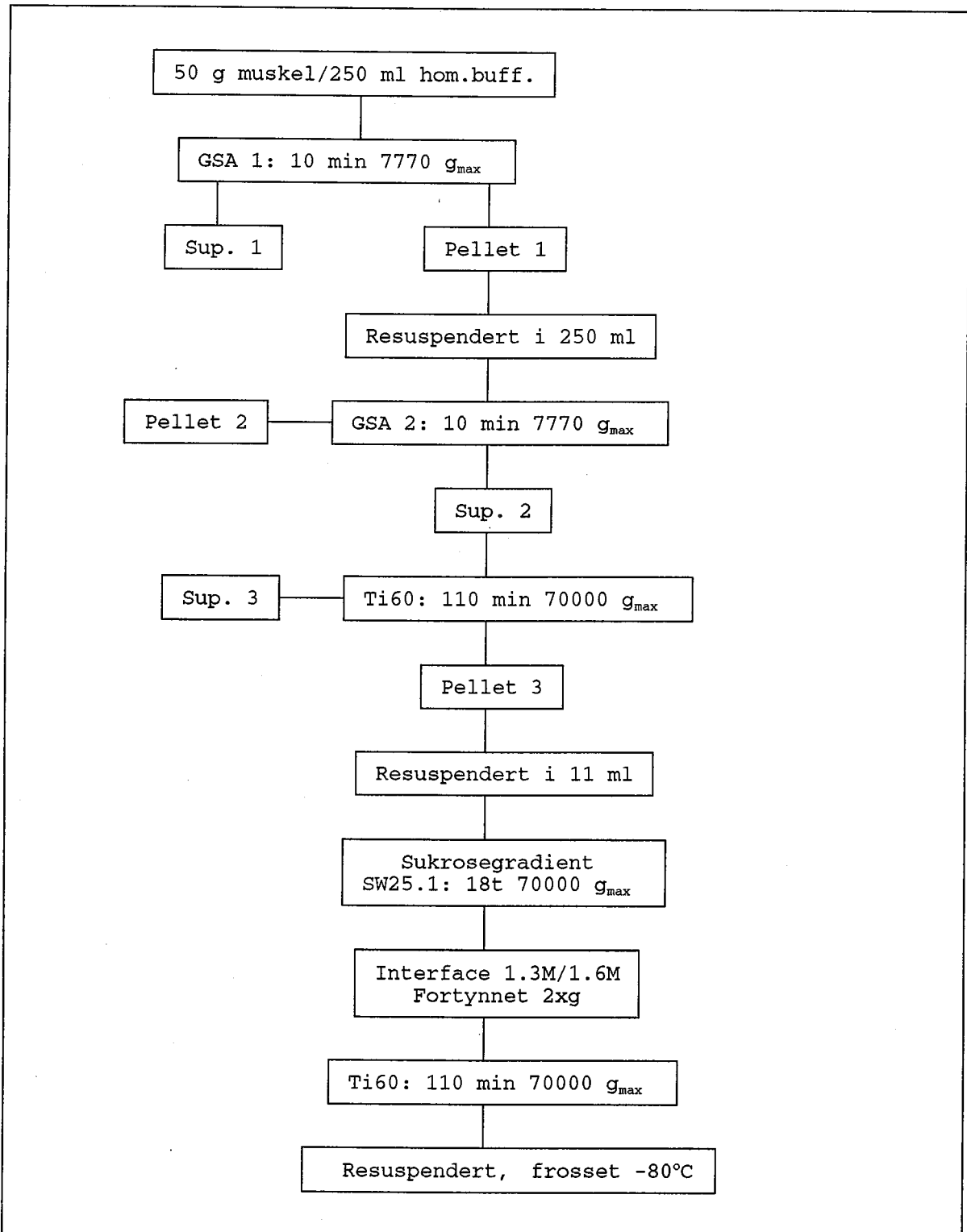


Fig. 6.1.: Prosedyre for isolering av SR-vesikler fra skjelettmuskulatur.

6.1.3. Sentrifugering

Homogenatet ble sentrifugert i 10 min i en GSA-rotor i en Sorvall RC-5 kjølesentrifuge. Hastigheten var 6900 rpm som gir en g_{maks} -verdi på 7770. Pelleten (P1) ble resuspendert i 250 ml homogeniseringsbuffer ved hjelp av en Sorvall-homogenisator. Den ble deretter sentrifugert en gang til ved 6900 rpm i GSA-rotoren. Supernatanten (S2) ble brukt til den videre isoleringen. S2 ble spunnet ved 29.000 rpm ($70.000 g_{maks}$) i 100 min i en Beckman L8-80 ultrasentrifuge utstyrt med en Ti60-rotor. Pelleten (P3) fra denne sentrifugeringen ble resuspendert i 11 ml homogeniseringsbuffer/50 g muskel og applisert på en diskontinuerlig sukrosegradient (2-50 g muskel/3 gradienter). Gradient-trinnene (5 ml i hver) besto av 45 % sukrose (1.6 M, $d=1.20 g\cdot cm^{-3}$), 38 % sukrose (1.3 M, $d=1.17 g\cdot cm^{-3}$), 33 % sukrose (1.1 M, $d=1.14 g\cdot cm^{-3}$), og 25 % sukrose (0.8 M, $d=1.10 g\cdot cm^{-3}$) alle bufret med 5 mM imidazole-HCl pH 7.4. Gradientene ble spunnet over natten (ca 18 timer) i en Beckman J-21C sentrifuge utstyrt med en SW25.1-rotor ved 22.000 rpm ($70.000 g_{maks}$). De forskjellige membranfraksjonene ble konsentrert i overgangen (interface) mellom de forskjellige gradienttrinnene. Det ble samlet 5-6 membranfraksjoner fra hver gradient.

Membranfraksjonene fra gradienten ble fortynnet 2 ganger med 5 mM imidazole-HCl pH 7.4. De ble deretter spunnet i 110 min ved 29.000 rpm ($70.000 g_{maks}$) i Ti60-rotoren. Pelletene fra denne sentrifugeringen ble resuspendert i et variabelt volum med homogeniseringsbuffer med proteasehemmere avhengig av proteinmengde. De isolerte membranfraksjonene ble frosset ned i flytende N_2 og oppbevart ved $-80\text{ }^\circ\text{C}$ inntil bruk. Fraksjonene som ikke er spesifisert videre i denne prosedyren, ble oppbevart for gjenfunnsanalyse av protein og ryanodinbinding (kap.7.2.1)

6.2. [^3H]RYANODINBINDING

Bindingen av ryanodin til ryanodinreseptoren påvirkes av flere forskjellige faktorer, og i denne delen av metodekapitlet er det beskrevet hvilke metoder som er benyttet for å framskaffe viten om sammenhengen mellom ryanodinbindingen og disse faktorene.

6.2.1. Inkuberingsmetode

Preparatet (mikrosomer eller homogenat) ble inkubert med [³H]ryanodin i en Tris/HCl-buffer. Bufferen var tilsatt en blanding av proteasehemmere og varierende mengder av andre stoffer som er nærmere angitt i metodebeskrivelsen nedenfor. Spesifikk binding av ryanodin er definert som differansen mellom total binding (inkubert med bare [³H]ryanodin) og uspesifikk binding (inkubert med [³H]ryanodin og umerket ryanodin i forholdet 1 til 500 - 1000 ganger).

6.2.2. Filtreringsmetode

Ubundet ryanodin ble separert fra bundet ved hjelp av en filtreringsteknikk. Det ble benyttet en filteroppsats med to filtre på hverandre: et Whatman GF/C-filter øverst som forfilter og et Millipore GSWP-filter under. Årsaken til at det ble brukt en kombinasjon av to filtre var at GSWP-filteret ble tett hvis det ble brukt alene, mens GF/C-filteret var for åpent og slapp gjennom proteinbundet ryanodin. Filtreringen skjedde med et undertrykk på 96 - 101 kPa (720 - 760 mmHg), og dette ga en filtreringshastighet på 10 - 15 ml·min⁻¹ avhengig av proteinmengde.

6.2.3. Vaskeprosedyre

50 - 300 mg protein i 100 - 500 µl inkubasjonsbuffer ble fortynnet med 5-10 ml vaskeløsning (10 % iskald etanol hvis ikke annet er nevnt) og denne løsningen ble så filtrert. Idet denne løsningen gikk igjennom filtrene ble filtrene vasket med mer (2 - 10 ml) iskald vaskeløsning, en eller flere ganger. Det var viktig å sette til mer vaskeløsning før luft ble sugd igjennom filteret. Etter filtreringen ble filtrene overført til hvert sitt telleglass og tilsatt 5 ml tellevæske (Packard Pico-Fluor-40). Radioaktiviteten ble målt med en Packard Tri Carb 2450 væskescintillasjonsteller. Målingene varte i minst 10 min eller til tellestatistikken ga en feil på mindre enn 3 % (± 1 standardavvik). Standarder ble målt på samme måte.

6.2.4. Quenching

Variierende mengder [³H]ryanodin (0 - 2.5 pmol, spesifikk aktivitet = 2220 GBq·mmol⁻¹), ble applisert på henholdsvis Whatman GF/C-fILTER og Millipore GSWP-fILTER. Filtrene ble tørket før de ble overført til telleglass, tilsatt 5 ml tellevæske og radioaktiviteten målt i samme teller som nevnt ovenfor. I tillegg ble prøvene målt i en Packard Tri-Carb 4530 som har muligheter for automatisk beregning av DPM (desintegrasjoner pr. minutt) på grunnlag av ekstern standard.

6.2.5. Proteinanalyse

Det ble benyttet to metoder til proteinanalyse. Mikrosomene ble analysert for protein etter en metode fra BIO-RAD. Metoden er basert på at absorpsjonsmaksimum i en sur løsning av Coomassie Brilliant Blue G-250 skifter fra 465 nm til 595 nm når det bindes til protein (Bradford, 1976). På råhomogenatene og i gjennfunnsforsøkene ble det benyttet Lowry's proteinmetode (1951), fordi BIO-RAD-metoden ga for ustabile resultater på såpass uhomogene prøver. Det ble benyttet Bovint Serum Albumin som standard i begge metodene.

6.2.6. ATP-analyse

Reagenser:

- ATP Monitoring Reagent (luciferin/luciferase)
- 10 µM ATP-standard
- 20 mM Tris/EDTA pH 7.75

ATP ble målt etter en metode av Lundin *et al.* (1976). Metoden er basert på at et rensset preparat av luciferase fra ildflue gir et konstant lysutbytte ved reaksjon med ATP. Metoden er lineær i området 10⁻¹¹ til 10⁻⁶ M.

Prøver med varierende konsentrasjon av ATP ble fortynnet med Tris/EDTA-buffer til et sluttvolum på 160 µl. Prøvene ble deretter satt i et LKB 1251 Luminometer, og ATP-Monitoring Reagens ble satt direkte til prøvene i målekammeret ved hjelp av en LKB 1291 Dispenser. Når lysutbyttet fra prøven hadde nådd maksimalt utslag, ble det tilsatt intern standard direkte i målekammeret med en annen 1291 Dispenser. Signalet fra luminometeret ble tatt ut på en Radiometer Servograph Rea 310. ATP-konsentrasjonen i prøven ble beregnet ut fra forholdet mellom lysutbyttet uten og med intern standard.

6.2.7. Proteasehemmere

Ryanodinreseptoren har vist seg å være meget ustabil med hensyn til proteaser. Under isoleringen av SR og inkuberingene har det derfor vært brukt en blanding av proteasehemmere, som hvis annet ikke er angitt besto av følgende: Aprotinin (0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), pepstatin (0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), leupeptin (0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), benzamidin (0.83 mM) og fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF) (0.23 mM).

6.2.8. [³H]ryanodinbinding under varierende betingelser

6.2.8.1. Varierende proteinmengde ved filtrering

Reagenser:

- Inkubasjonsbuffer:
 - 10 mM Tris/HCl pH 7.4
 - 150 mM KCl
 - 3 mM MgATP
 - Proteasehemmere
 - 20 nM [³H]ryanodin
 - 10 μM ryanodin
- Vaskeløsning:
 - 10 % etanol

Mikrosomer ble inkubert ved 37 °C i to serier:

a: *med* 10 μM umerket ryanodin (for bestemmelse av uspesifikk binding)

b: *uten* umerket ryanodin (for bestemmelse av total binding).

Inkuberingen ble startet ved tilsetning av [³H]ryanodin. Etter en inkuberingstid på 180 min ble det tatt ut variable volum (250 μl - 1000 μl) av inkubasjonsblandingen. Prøvene ble fortynnet med 5 ml iskald vaskeløsning, filtrert, og vasket med 10 ml vaskeløsning før radioaktiviteten ble målt som beskrevet i kap. 6.2.3.

6.2.8.2. Varierende inkubasjonstid

Binding av ryanodin som funksjon av tiden, ble studert under tre ulike betingelser:

Tidskurve 1:

- Reagenser:**
- Inkubasjonsbuffer:
 - 10 mM Tris/HCl pH 7.4
 - 150 mM KCl
 - 3 mM MgATP
 - 2 μ M CaCl₂
 - Proteasehemmere
 - 20 nM [³H]ryanodin
 - 10 μ M ryanodin
 - Vaskeløsning:
 - 10 % etanol

Mikrosomer ble inkubert ved 37 °C i to serier: Med og uten 10 μ M umerket ryanodin. Inkubasjonen ble startet med tilsetning av [³H]ryanodin (20 μ M). Etter varierende inkubasjonstid (10 - 260 min) ble 250 μ l av inkubasjonsløsningen fortynnet med 5 ml 10% etanol, filtrert og vasket med 5 ml 10 % etanol, og radioaktivitet målt som tidligere beskrevet.

Tidskurve 2:

- Reagenser:**
- Inkubasjonsbuffer:
 - 10 mM Tris/HCl pH 7.4
 - 150 mM KCl
 - 3 mM Na₂ATP
 - 2 μ M CaCl₂
 - Proteasehemmere
 - 20 nM [³H]ryanodin
 - 10 μ M ryanodin
 - Vaskeløsning:
 - 10 % etanol

MgATP ble erstattet med Na₂ATP, og det ble benyttet litt andre inkubasjonstider (0 - 315 min). Forøvrig var betingelsene de samme som under tidskurve 1.

Tidskurve 3:

- Reagenser:**
- Inkubasjonsbuffer:
 - 10 mM Tris/HCl pH 8.0
 - 150 mM KCl
 - 500 μ M Na₂ATP
 - 2.5 μ M CaCl₂
 - Proteasehemmere
 - 20 nM [³H]ryanodin
 - 10 μ M ryanodin
 - Vaskeløsning:
 - 10 % etanol

Betingelsene for denne tidskurven ble satt opp etter at forskjellige parametere var optimalisert. Til forskjell fra tidskurve 1 og 2 ble inkuberingen foretatt ved pH 8.0, og bufferen inneholdt 2.5 μM CaCl₂ og 500 μM Na₂ATP. Den uspesifikke bindingen ble bestemt ved tilsetning av 20 μM umerket ryanodin. Inkubasjonstiden var 0 - 200 min.

Beregning av assosiasjonskinetikk

Resultatene fra tidskurvestudiene ble benyttet til beregninger av assosiasjonskinetikk. Observert hastighetskonstant for assosiasjonen (K_{obs}) ble beregnet fra stigningen av kurven av førsteordens plott av dataene som beskrevet av Weiland og Molinoff (1981) (kap. 6.5.).

6.2.8.3. Varierende pH

Reagenser:

- Inkubasjonsbuffer:
 - 10 mM Tris
 - 150 mM KCl
 - 3 mM Na₂ATP
 - 2 μM CaCl₂
 - Proteasehemmere
 - 20 nM [³H]ryanodin
 - 10 μM ryanodin
- Vaskeløsning:
 - 10 % etanol

Mikrosomer (ca 100 μg protein·ml⁻¹) ble inkubert ved 37 °C. pH ble justert med 5 M HCl til ti forskjellige verdier i pH-området 3.5 til 8.1 før mikrosomer ble tilsatt. Ett sett med prøver ble inkubert med 10 μM umerket ryanodin for å bestemme uspesifikk binding. Inkubasjonen ble startet i alle prøvene ved tilsetning av 20 nM [³H]ryanodin, og avsluttet etter 180 min ved at 250 μl av inkubasjonsmediet ble fortynnet med 5 ml iskald 10 % etanol, filtrert og vasket med 5 ml iskald 10 % etanol som beskrevet. pH ble målt både før og etter inkubasjon med et Radiometer PHM62 pH-meter med en kombinasjonselektrode (Radiometer GK2321 C).

6.2.8.4. Varierende $[Ca^{2+}]$

Reagenser:

- Inkubasjonsbuffer:
 - 10 mM Tris/HCl pH 8.0
 - 150 mM KCl
 - 3 mM Na_2ATP
 - Proteasehemmere
 - 20 nM $[^3H]$ ryanodin
 - 10 μM ryanodin
- Vaskeløsning:
 - 10 % etanol

Mikrosomer (ca 100 μg protein·ml⁻¹) ble inkubert ved 37 °C i inkubasjonsbuffer hvor kalsiumkonsentrasjonen var justert fra 1 nM til 100 mM. Kalsiumkonsentrasjonen fra 10 μM til 100 mM ble justert med tilsetning av variable mengder med $CaCl_2$, mens kalsiumkonsentrasjonen fra 1 nM til 1 μM ble justert ved tilsetning av 1 mM BAPTA (1,2-bis(o-aminofenoxy)etan-N,N,N',N'-tetra-eddisyre, se kap. 6.3.2.) og titrert med $CaCl_2$ til ønsket konsentrasjon. I et parallelt sett med de samme kalsiumkonsentrasjonene ble det inkubert med 10 μM umerket ryanodin. Inkubasjonen ble startet ved tilsetning av 20 nM $[^3H]$ ryanodin, og avsluttet etter 60 min som tidligere beskrevet. Den frie kalsiumkonsentrasjonen i inkubasjonsblandingen ble målt både før og etter inkubering med Ca^{2+} -selektiv elektrode (kap. 6.3.).

6.2.8.5. Varierende magnesiumkonsentrasjon

Reagenser:

- Inkubasjonsbuffer:
 - 10 mM Tris/HCl pH 8.0
 - 150 mM KCl
 - 3 mM Na_2ATP
 - Proteasehemmere
 - 20 nM $[^3H]$ ryanodin
 - 10 μM ryanodin
- Vaskeløsning:
 - 10 % etanol

Mikrosomer (ca 100 μg protein·ml⁻¹) ble inkubert ved 37 °C i inkubasjonsbuffer hvor magnesiumkonsentrasjonen var justert ved tilsetning av variable mengder med $MgCl_2$ til området 1 nM til 100 mM (pMg = 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 og 1). I et parallelt sett ble det inkubert med 10 μM umerket ryanodin. Inkubasjonen ble startet ved tilsetning av 20 nM $[^3H]$ ryanodin, og avsluttet etter 180 min som beskrevet tidligere. Den frie magnesiumkonsentrasjonen i inkubasjonsblandingen ble ikke målt.

6.2.8.6. Varierende ATP-konsentrasjon

Reagenser: Inkubasjonsbuffer:
- 10 mM Tris/HCl pH 8.0
- 150 mM KCl
- 2.5 µM CaCl₂
- Proteasehemmere
- 20 nM [³H]ryanodin
- 10 µM ryanodin
Vaskeløsning:
- 10 % etanol

Mikrosomer (ca 300 µg protein·ml⁻¹) ble inkubert ved 37 °C. ATP-konsentrasjonen ble justert ved tilsetning av variable mengder med nøytralisert Na₂ATP slik at total-konsentrasjonen av ATP i inkubasjonsmediet var i fra 10 µM til 100 mM (pATP = 5, 4, 3.5, 3, 2.5, 2.3, 2, 1.5 og 1). I et parallelt sett ble det inkubert med 10 µM umerket ryanodin. Inkubasjonen ble startet ved tilsetning av 20 nM [³H]ryanodin, og avsluttet etter 60 min ved fortynning av 250 µl av inkubasjonsmediet med 10 ml iskald 10 % etanol. Deretter ble prøvene filtrert, vasket med 5 ml 10 % etanol og radioaktivitet målt som beskrevet tidligere. Den totale ATP-konsentrasjonen i inkubasjonsblandingen ble analysert som beskrevet i kap. 6.2.6.

6.2.8.7. Inkubering med forskjellige nukleotider

Reagenser: Inkubasjonsbuffer:
- 10 mM Tris/HCl pH 8.0
- 150 mM KCl
- 2.5 µM CaCl₂
- Proteasehemmere
- 20 nM [³H]ryanodin
- 10 µM ryanodin
Vaskeløsning:
- 10 % etanol

Mikrosomer ble inkubert ved 37 °C. Forskjellige nukleotider (ATP, ADP, AMP, UTP, CTP, GTP og ITP) ble satt til inkubasjonsbufferen i en konsentrasjon av 3 mM. pH på nukleotid-løsningene var på forhånd justert til 8.0. Uspesifikk binding ble bestemt ved at et parallelt sett med prøver ble inkubert med 10 µM umerket ryanodin. Inkubasjonen ble startet med tilsetning av 20 nM [³H]ryanodin, og avsluttet etter 60 min. Prøvene ble fortynnet, vasket og radioaktiviteten målt som beskrevet tidligere.

6.2.8.8. Varierende KCl-konsentrasjon

Reagenser: Inkubasjonsbuffer:
- 10 mM Tris/HCl pH 7.5
- 1 mM Na₂ATP
- Proteasehemmere
- 20 nM [³H]ryanodin
- 10 μM ryanodin
Vaskeløsning:
- 10 % etanol

Mikrosomer (ca 100 μg protein·ml⁻¹) ble inkubert ved 37 °C i inkubasjonsbufferen. KCl-konsentrasjonen i inkubasjonsmediet var i området 0 mM - 1250 mM ([KCl] = 0, 5, 50, 100, 150, 200, 400, 600, 800 og 1250 mM). For å bestemme uspesifikk binding ble et parallelt sett inkubert med 10 μM umerket ryanodin. Inkubasjonen startet med tilsetning av 20 nM [³H]ryanodin. Den ble avsluttet etter 180 min som beskrevet tidligere. Filtrene ble vasket og radioaktiviteten målt som beskrevet tidligere.

6.2.8.9. Varierende [³H]ryanodinkonsentrasjon, Scatchard-plot

Reagenser: Inkubasjonsbuffer:
- 10 mM Tris/HCl pH 8.0
- 150 mM KCl
- 3 mM Na₂ATP
- 2.5 μM CaCl₂
- Proteasehemmere
- [³H]ryanodin
- ryanodin
Vaskeløsning:
- 10 % etanol

Mikrosomer (ca 100 μg protein·ml⁻¹) ble inkubert ved 37 °C i inkubasjonsbufferen tilsatt varierende konsentrasjoner av [³H]ryanodin (0 - 150 nM). Inkuberingen ble startet ved tilsetning av mikrosomer, og den ble avsluttet etter 60 min ved at 250 μl ble tatt ut til fortykning, vasking og telling som beskrevet før.

Resultatene ble benyttet til beregning av K_D og B_{maks} som beskrevet av Scatchard (1949);

$$B_L/F_L = (B_{maks} - B_L)/K_D,$$

hvor B_L er bundet ryanodin, F_L er fritt ryanodin, B_{maks} er det maksimale antall reseptorer og K_D er dissosiasjonskonstanten for ryanodinreseptor komplekset. Et plott av B_L/F_L mot B_L, kjent som Scatchard plot, vil hvis det er et bindingssete for ryanodin på ryanodinreseptoren, gi en rett linje med stigning lik -1/K_D og skjæring med x-aksen lik

B_{maks} . Dersom ryanodin bindes til flere reseptorer med forskjellig affinitet, vil flere rette linjer kunne tilpasses til plottet. Utfra de ulike linjenes stigning og skjæring med x-aksen, kan de forskjellige reseptorenes K_D og B_{maks} beregnes.

6.2.9. Nøyaktighet og presisjon

Reagenser: Inkubasjonsbuffer:
- 10 mM Tris/HCl pH 8.0
- 150 mM KCl
- 3 mM Na₂ATP
- 2.5 μM CaCl₂
- Proteasehemmere
- 20 nM [³H]ryanodin
- 20 μM ryanodin
Vaskeløsning:
- 10 % etanol

Mikrosomer ble inkubert i inkubasjonsbufferen beskrevet over ved 37 °C i 60 min. Reaksjonen ble startet ved tilsetning av 20 nM [³H]ryanodin, og uspesifikk binding ble bestemt i en parallell serie hvor det var tilsatt 20 μM umerket ryanodin. Inkuberingen ble stoppet, filtrert, vasket og radioaktiviteten målt som beskrevet tidligere. Hele forsøket ble gjentatt flere ganger på forskjellige dager (4 - 8 paralleller). For hvert forsøk ble det beregnet middelværdi og standard avvik (SD) av ryanodinbindingen.

6.2.10. Gjenfunnsforsøk

Reagenser: Inkubasjonsbuffer:
- 10 mM Tris/HCl pH 8.0
- 150 mM KCl
- 3 mM Na₂ATP
- 2.5 μM CaCl₂
- Proteasehemmere
- 20 nM [³H]ryanodin
- 20 μM ryanodin
Vaskeløsning:
- 10 % etanol

De forskjellige fraksjonene fra mikrosomisoleringen ble inkubert i inkubasjonsbufferen beskrevet over i 60 min ved 37 °C. Det ble ikke gjort forsøk på optimalisere bindingsbetingelsene for de forskjellige fraksjonene. Uspesifikk binding ble bestemt ved inkubering av en serie med 20 μM umerket ryanodin. Prøvene ble filtrert, vasket og målt som tidligere beskrevet.

6.3. Ca²⁺-SELEKTIVE ELEKTRODER

Binding av ryanodin til den ryanodinsensitive kalsiumkanalen i sarkoplasmatiske retikulum er kalsiumavhengig. For å undersøke denne sammenhengen nøyere ble det konstruert en kalsiumselektiv elektrode. Elektrodene ble undersøkt for følsomhet, linearitet, selektivitet og responstid.

6.3.1. Konstruksjon

Reagenser:

- Membransammensetning:
 - 1.0 % Kalsium ionofor II (ETH 129)
 - 65.6 % 2-Nitrofenyl oktyl eter
 - 32.8 % Polyvinylklorid (høy molekylvekt)
 - 0.6 % Kalium tetrakis(4-klorofenyl)borat
 - Tetrahydrofuran
- Elektrolyttløsning til Ca-elektroden:
 - 10 mM CaCl₂ mettet med AgCl
- Elektrolyttløsning til referanseelektroden:
 - 140 mM NaCl

Kalsiumelektroden består av et 5 cm langt PVC-kateter, med en ytre diameter på ca 1 mm. I den ene enden er det støpt på en ioneselektiv membran. Membranløsningen ble laget ved å løse opp kalsiumionoforen, nitrofenyloktyleter, PVC og kaliumtetrakis(4-chlorofenyl)borat i konsentrasjoner gitt ovenfor i ca 5 gg tetrahydrofuran (vekt/volum) (Schefer *et al.*1986). I PVC-kateteret ble det plassert en rustfri ståltråd slik at enden av ståltråden dannet en jevn flate med enden av PVC-kateteret. Ståltråden med PVC-kateteret ble dyppet i membranløsningen tre til fire ganger og lagt til tørking i ca 10 min. Ståltråden ble deretter trukket litt tilbake og dyppingen i membranløsningen ble gjentatt. Ståltråden ble trukket ut, og katetrene ble lagt til tørk over natten eller inntil de skulle brukes (opptil flere uker etter støpingen) (Hallèn, 87). 10 mM CaCl₂ mettet med AgCl ble brukt som elektrolytt i elektroden. For å få ut luft og unngå luftbobler i katetret under fyllingen av elektrolytten, ble et stålør stukket inn i kateteret helt fram til membranen og elektrolytten fylt gjennom stålørret. Referanseelektroden var en avkuttet 1 ml Gilletesprøyte som var fylt med 140 mM NaCl. Som elektrokjemisk kontakt ble det brukt Ag/AgCl-elektroder i både den ioneselektive elektroden og referanseelektroden. Ag/AgCl-elektroden i referanseelektroden var ferdig kjøpt, mens Ag/AgCl-elektroden i den ioneselektive elektroden ble laget ved hjelp av et hjemmelaget elektrolyseapparat (Hallèn, 87). Signalet fra dette elektrodeparet er en elektrisk likespenning som er direkte proporsjonal med logaritmen til aktiviteten av Ca²⁺ i løsningen, gitt ved Nernst ligning:

$$E = E_1 + RT/nF \cdot \ln a_{Ca^{2+}} \quad \text{eller}$$

$$E = E_1 + RT/nF \cdot 2.303 \log_{10} a_{Ca^{2+}}.$$

der $RT/nF \cdot 2.303$ er Nernst-konstanten som ved 20 °C er 29.1 mV for et toverdig ion. I teorien skal derfor spenningen øke med 29.1 mV ved å øke $a_{Ca^{2+}}$ ti ganger (dekadespranget er 29.1 mV).

Aktiviteten av et spesifikt ion er definert som: $a = \gamma \cdot c$, der γ er aktivitetskoeffisienten og c er konsentrasjon. Aktivitetskoeffisienten er avhengig av ionestyrken på løsningen og går mot 1.0 når ionestyrken på løsningen går mot 0. For Ca²⁺-løsninger uten andre ioner til stede er sammenhengen mellom aktivitetskoeffisienten og konsentrasjonen en ikkelineær kurve. Dersom ionestyrken i løsningene derimot er konstant, men kalsiumkonsentrasjonen varierer, vil aktivitetskoeffisienten være tilnærmet konstant. Dette innebærer at man får et lineært forhold mellom konsentrasjon og spenning.

6.3.2. Kalibreringslinje

- Reagenser:**
- Kalibreringsløsninger med forskjellige fri kalsium konsentrasjoner (1 nM - 100 mM) i inkuberingsbuffer.
 - BAPTA (1,2-bis(o-aminofenoxy)etan-N,N,N',N'-tetra-eddiksyre)

Standardene i området 1 nM til 10 µM ble laget etter en metode av Marks og Maxfield (1991). BAPTA ble benyttet som kalsiumbuffer. BAPTA har to protonbindene nitrogenatomer som gir opphav til pK_a-verdier på henholdsvis 6.36 og 5.47 ved 22 °C. Dette fører til at BAPTA stort sett er uprotonert ved fysiologisk pH (de fire karboksylgruppene er også tilnærmet uprotonerte ved denne pH-verdien). BAPTA binder derfor kalsium raskere enn f eks EGTA som til stor grad er protonert ved denne pH-verdien (pK_a på henholdsvis 9.47 og 8.78).

For å beregne den frie kalsiumkonsentrasjonen i en kalsiumbuffer må assosiasjonskonstantene for kalsium-kalsiumbufferen være kjent. Assosiasjonskonstanter er ofte angitt ved en bestemt ionestyrke, temperatur og pH og de må derfor korrigeres for den aktuelle ionestyrke, temperatur og pH. De termodynamiske verdiene som ble funnet for BAPTA er gitt ved ionestyrke (I_0) = 0.1 M og T = 22 °C. Kalsiummålingene i denne oppgaven ble utført ved I_0 = 0.180 M og T = 22 °C. Korrigerings for ionestyrke ble gjort etter en metode av Harrison og Bers (1989), hvor korrigeringen er basert på Debye-Hückel's "limiting law" (se vedlegg).

pH ble korrigert for ved å uttrykke en "Overall Apparent Association Constant" (K') ved de absolutte assosiasjonskonstanter (K) som er gitt ved standard betingelser. Under visse forutsetninger (se vedlegg for utledning) får man følgende:

$$K' = \frac{K_{Ca/CaL}}{1 + K_{H/HL} \cdot [H] + K_{H/HL} K_{H/H_2L} \cdot [H]^2} + \frac{K_{Ca/CaHL}}{1 / (K_{H/HL} \cdot [H]) + 1 + K_{H/H_2L} \cdot [H]}$$

hvor L står for ligand (BAPTA). Det siste leddet i uttrykket, som beskriver kalsiums binding til den monoprotoneerte formen av BAPTA, er ubetydelig i pH-området 7 - 8.

Målinger ved andre temperaturer enn standardbetingelser korrigeres ved hjelp av van't Hoff's isochore:

$$\log K_e = \log K_f + \frac{\Delta H \cdot (1/T_f - 1/T_e)}{2.303 \cdot R}$$

hvor T er absolutte temperaturer, R er gasskonstanten ($8.314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$), ΔH er entalpien ($53.8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) for den totale reaksjonen og e og f står for henholdsvis etter og før korrigering. Etter disse beregningene ble det funnet en $K' = 4.55 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ for de betingelsene som er benyttet i oppgaven.

Ut fra ligningene:

$$\frac{[CaL]}{[Ca^{2+}]_{fri} \cdot [L]_{fri}} = K' \quad \text{og} \quad [L]_{total} = [CaL] + [L]_{fri}$$

kan følgende utledes:

$$[L]_{total} = K' \cdot [Ca^{2+}]_{fri} \cdot [L]_{fri} + [L]_{fri}$$

og

$$[Ca^{2+}]_{total} = K' \cdot [Ca^{2+}]_{fri} \cdot [L]_{fri} + [Ca^{2+}]_{fri}$$

Ut fra disse ligningene kan det beregnes hvor mye kalsium og hvor mye BAPTA som må settes til for å få bestemte mengder fritt kalsium og fritt BAPTA.

Det ble laget stamløsninger av CaCl_2 og BAPTA med konsentrasjoner på henholdsvis 500 mM og 100 mM. CaCl_2 -løsningen ble etter fortynning standardisert ved hjelp av Inductively Coupled Plasma Spectroscopy (ICPS) (Perkin Elmer ICP5500), mens stamløsningen med BAPTA ble standardisert ved titrering mot den standardiserte CaCl_2 -

stamløsningen. Omslaget for titreringen ble registrert ved hjelp av kalsiumselektiv elektrode.

6.3.3. Ca²⁺-elektrodens selektivitet

Reagenser:

- 100 mM CaCl₂
- 100 mM MgCl₂
- 100 mM NaCl
- 100 mM KCl

Selektiviteten ble bestemt ved å måle potensialet over den kalsiumselektive membranen i de rene elektrolyttløsninger som er nevnt over.

Selektivitetskonstanten (K_M) er definert som:

$$\log K_M = (E_M - E_{Ca}) / (2.303 \cdot RT/nF)$$

der M er K⁺, Na⁺ eller Mg²⁺. E_M og E_{Ca} er spenningen målt i henholdsvis 100 mM MCl₍₂₎ og 100 mM CaCl₂. Spenningen ble også målt i MCl₍₂₎ tilsatt 1 mM BAPTA for å binde eventuelle forurensinger av kalsium i elektrolyttløsningene.

6.3.4. Ca²⁺-elektrodens responstid

Responstiden er definert som tiden det tar før elektroden når 90 % av maksimalt utslag når elektroden flyttes fra en Ca²⁺-løsning til en annen med ulik Ca²⁺-konsentrasjon. Det ble også målt responstid ved tilsetning av BAPTA til en Ca²⁺-løsning. Det analoge signalet fra elektrodene ble digitalisert ved 1000 Hz i en Keithley 570 AD-omformer før de digitale dataene ble lagret på en UNISYS PC. Responstiden ble deretter beregnet ut fra de digitale dataene.

6.4. HPLC

Det umerkede ryanodinet som var tilgjengelig på markedet, var av ukjent renhet. HPLC-diagrammet som fulgte med produktet fra Agro Systems International viste to store topper og flere mindre. Renheten på ryanodinet ble derfor undersøkt ved hjelp av High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Det ble også gjort forsøk på å finne renheten på ryanodinet ved isotopfortynning. I isotopfortynningsforsøkene ble bindingen av [³H]ryanodin til ryanodinreseptoren studert ved å inkubere mikrosomer med [³H]ryanodin med varierende spesifikk aktivitet (Bq/mol, fortynnet med umerket ryanodin).

Ut fra sammenhengen mellom den spesifikke aktiviteten og mengden av bundet [³H]ryanodin kan renheten på den umerkede ryanodinen beregnes.

6.4.1. Metodeoppsetting

Reagenser:

- 100 % Metanol HPLC-grade
- 10 mM ryanodin

For bestemmelse av renhet av det umerkede ryanodinet ble det satt opp en HPLC-metode. Analysen ble kjørt på en Waters 625 LC-HPLC med en hjemmepakket Nucleosilkolonne (omvendt fase). Kolonnen var 7.5 cm lang, med en indre diameter på 4.6 mm. Volumet av injiseringsløyfen var 20 µl. Som mobilfase ble det prøvd ut forskjellige sammensetninger av metanol og vann. Elueringshastigheten ble variert fra 1 ml·min⁻¹ til 4 ml·min⁻¹. Varierende elueringshastighet og forskjellig sammensetning av mobilfasen førte til at trykket varierte fra 2000 psi (14 MPa) til 4000 psi (28 MPa) i de forskjellige forsøkene. Den optiske tettheten ved 260 nm (OD₂₆₀) ble målt i en Waters 484 Tunable Absorbance Detector som var tilkoblet en Cole-Parmer-skriver.

6.4.2. Analyse

Reagenser:

- 100 % Metanol HPLC-grade
- 10 mM ryanodin
- 0.2 pmol [³H]ryanodin

En blanding av merket og umerket ryanodin ble kromatografert under optimale betingelser (kap. 6.4.1.). En fraksjonssamler (LKB 2211 Superrac) plassert på utløpet av HPLC'en samlet fraksjoner hvert minutt, samtidig som OD₂₆₀ ble målt kontinuerlig. Radioaktiviteten ble målt i 0.5 ml av de oppsamlede fraksjonene ved hjelp av en Packard Tri Carb 2450 væskescintillasjonsteller (Energiområde: 0-18.6 keV). Ryanodintoppen i HPLC-kromatogrammet ble identifisert og kvantifisert ved å sammenligne OD₂₆₀-målingene med de radioaktive målingene. Renheten av det umerkede ryanodinet og [³H]ryanodinet ble beregnet på grunnlag av disse forsøkene.

6.5. STATISTIKK OG KURVETILPASNING

Til beregning av lineære sammenhenger ble det benyttet lineær regresjon, og for å sammenligne grupper ble det benyttet Student *t*-test. Der det er gjort flere målinger er resultatene presentert som middelveidi, eventuelt med standard avvik.

6.5.1. Kurvetilpasning

Det er benyttet ikkelineær kurvetilpasning ved beregning av hastighetskonstanter og ved beregning av aktivering og hemming (IC₅₀) av bindingen av ryanodin til reseptoren. Mulighetene for å forvrengte dataene (spesielt feilfordelingen) ved å rearrangere dem til en lineær sammenheng, unngås ved ikkelineær kurvetilpasning (Leatherbarrow, 1990a).

Det er beregnet tre hastighetskonstanter: Førsteordens hastighetskonstant, og fra pseudo-førsteordensligning er det beregnet hastighetskonstanter for assosiasjon og dissosiasjon. En førsteordens hastighetsprosess er beskrevet av ligningen:

$$A = A_{\infty}(1 - e^{-kt}) + A_b$$

hvor A er responsen ved tid t , A_{∞} er den maksimale responsen, A_b er bakgrunnen og k er hastighetskonstanten (Leatherbarrow, 1990b). Denne ligningen er benyttet til å beregne hastighetskonstanter for bindingen av [³H]ryanodin til reseptoren under varierende forhold.

Hastighetskonstantene for assosiasjon (k_1) og dissosiasjon (k_{-1}) kan beregnes fra pseudo førsteordens reaksjonsligninger (Weiland & Molinoff, 1981):

$$\ln[LR_t/(LR_0 - LR)] = k_1 t \cdot L_T \cdot R_T / LR_0,$$

hvor LR_0 er konsentrasjonen av ligand-reseptor ved likevekt, LR er ligand-reseptor konsentrasjon ved tiden t , L_T er total konsentrasjon av ligand og R_T er total konsentrasjon av bindingssteder. Ved plott av $LR_t/(LR_0 - LR)$ mot t oppnås det et lineært forhold hvor stigningen (k_{obs}) vil være lik $k_1 \cdot L_T \cdot R_T / LR_0$. Dissosiasjonskonstanten k_{-1} kan bestemmes ut fra ligningen $K_D = k_{-1} / k_1$. R_T (B_{maks}) og K_D bestemmes ved Scatchard plot. Beregningene av k_1 og k_{-1} inneholder derfor de samme usikkerheter som beregningene av B_{maks} og K_D .

6.5.2. Dose-respons-kurver

Dose-respons kurver viser ofte en sigmoide sammenheng. En sigmoid kurve kan beskrives av ligningen:

$$Y = \frac{a-d}{1 + \left(\frac{X}{c}\right)^b} + d$$

hvor Y er responsen, X er dosen, a er responsen ved dose = 0, d er responsen ved "uendelig" dose, c er dosen som gir en respons halvveis mellom a og d (IC_{50}), og b er stigningen på kurven i punktet c (De Lean *et al.* 1978). Denne ligningen er i flere tilfeller i oppgaven brukt til å beskrive hemming eller aktivering av [3H]ryanodinbinding til reseptoren. Parameteren b kan under forutsetning av at X er den frie og ikke den totale ligandkonsentrasjonen, sammenlignes med Hill koeffisienten (n_H). En b større enn 1 kan tyde på positiv kooperativitet.

De ikkelineære kurvetilpasningene (førsteordens kinetikk og sigmoide kurver) er gjort ved hjelp av det PC-baserte programmet "Sigma-plot" (Jandel Scientific). Programmet bruker "Marquardt-Levenberg"-algoritmen for å bestemme parameterene til en ligning som minimaliserer summen av kvadratene av differansen mellom den avhengige variabelen i ligningen, og observasjonene.

7. Resultater

Formålet med denne undersøkelsen var å sette opp en metode for å kvantifisere og karakterisere ryanodinsensitiv Ca^{2+} -kanal. Dette arbeidet krevde utvikling og utprøving av kalsiumselektive elektroder og oppsetting av en HPLC-metode for å bestemme renheten av ryanodin. Videre måtte fibertype-sammensetningen, for musklene som ble benyttet, bestemmes. Dette behandles i første delen av resultat kapitlet. I den andre delen presenteres resultater fra arbeidet med å optimalisere metoden for å bestemme den ryanodinsensitive Ca^{2+} -kanalen.

7.1. FORSØKSBETINGELSER

7.1.1. Ca^{2+} -selektive elektroder

Egne kalsiumelektroder ble utviklet for å øke sensitiviteten i forhold til kommersielt tilgjengelige elektroder og for å måle kalsium i små volum.

En Ag/AgCl-elektrode i 140 mM NaCl ble benyttet som referanseelektrode i elektrodeparet. I de første forsøkene besto referanseelektroden av en åpen konstruksjon, dvs at elektrolytten i elektroden sto i direkte kontakt med løsningen som skulle måles. NaCl-elektrolytten viste seg å være forurenset med Ca^{2+} , og dette ga problemer ved måling ved lave konsentrasjoner av Ca^{2+} . For å hemme vandringen av ioner fra referanseelektroden ut i måleløsningen ble det støpt på en agarmembran med NaCl som elektrolytt i tuppen av referanseelektroden.

Tykkelsen på kalsiumelektroden var ca 1 mm og lengden var fra 5 til 10 cm. Denne størrelsen på elektroden gjorde det mulig å måle Ca^{2+} i volum mindre enn 100 μl .

Ca^{2+} -standarder

En CaCl_2 -løsning ble kalibrert ved hjelp av Inductively Coupled Plasma Spectroscopy (ICPS, Perkin Elmer ICP5500) mot standard fra Teknolab, Drøbak. Fra denne CaCl_2 -løsningen ble det laget standarder i området fra 100 mM til 10 μM ved gjentatte

fortynninger. Standarder fra 1 nM til 1 μM ble bufret med BAPTA og ønskede konsentrasjoner av fritt Ca^{2+} ble beregnet ut fra pH, ionestyrke og temperatur (tabell 7.1.).

Tabell 7.1: Total konsentrasjon av kalsium og BAPTA som er nødvendig for å oppnå gitte konsentrasjoner med fritt kalsium og fri BAPTA. Beregningene er gjort for pH 7.8, $T = 22\text{ }^\circ\text{C}$ og ionestyrke (I_0) = 0.180 M, som gir en $K' = 4.55 \cdot 10^6\text{ M}^{-1}$ (kap. 6.3.2.).

$[\text{Ca}]_{\text{fri}}\text{ (M)}$	$1 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-6}$
$[\text{BAPTA}]_{\text{fri}}\text{ (M)}$	$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$
$[\text{Ca}]_{\text{total}}\text{ (M)}$	$4.6 \cdot 10^{-6}$	$4.6 \cdot 10^{-5}$	$4.6 \cdot 10^{-4}$	$4.6 \cdot 10^{-3}$
$[\text{BAPTA}]_{\text{total}}\text{ (M)}$	$1.01 \cdot 10^{-3}$	$1.05 \cdot 10^{-3}$	$1.46 \cdot 10^{-3}$	$5.55 \cdot 10^{-3}$

BAPTA ble standardisert ved titrering mot en standardisert kalsiumløsning. Fig 7.1 viser en typisk titeringskurve hvor omslaget er registrert ved hjelp av Ca^{2+} -selektive elektroder.

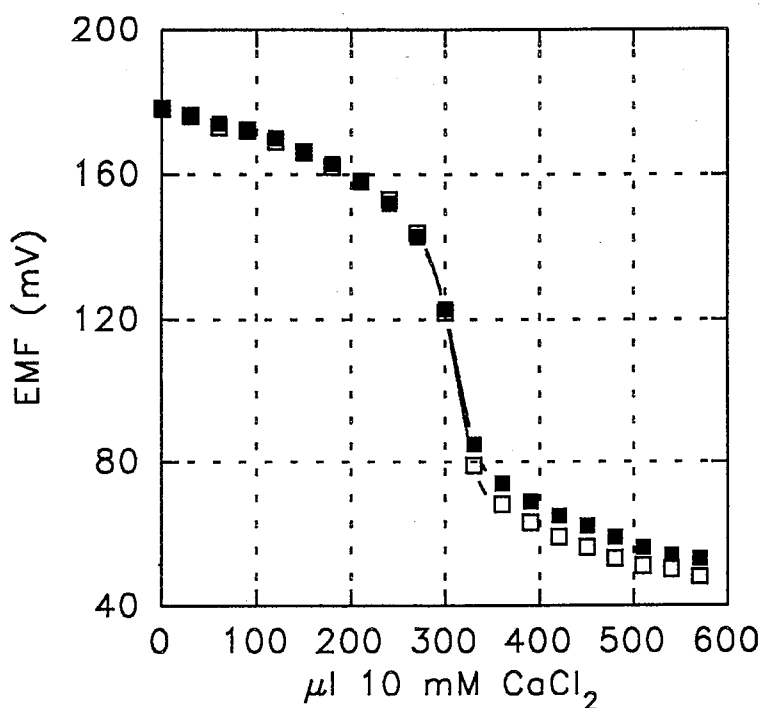


Fig. 7.1: Titreringskurve av en BAPTA-løsning titrert med CaCl_2 målt med 2 parallelle elektroder. En løsning med ca 1 mM BAPTA i 3000 μl buffer ble titrert med alikvoter av 30 μl 10.0 mM CaCl_2 . Omslaget av titreringen ble avlest til 308 μl for begge elektrodene. Dette ga en BAPTA-konsentrasjon på 103 mM.

Linearitet

Figur 7.2 viser to typiske kalibreringskurver for en Ca^{2+} -selektiv elektrode i henholdsvis vann og en Tris/HCl-buffer. Potensialet øker lineært med logaritmen til kalsiumkonsentrasjonen og er følgelig i overensstemmelse med Nernsts ligning.

Dekadespranget for elektroder målt i vann varierte fra ca 36 mV til 38 mV, mens det varierte fra ca 28 mV til 30 mV for elektroder målt i buffer.

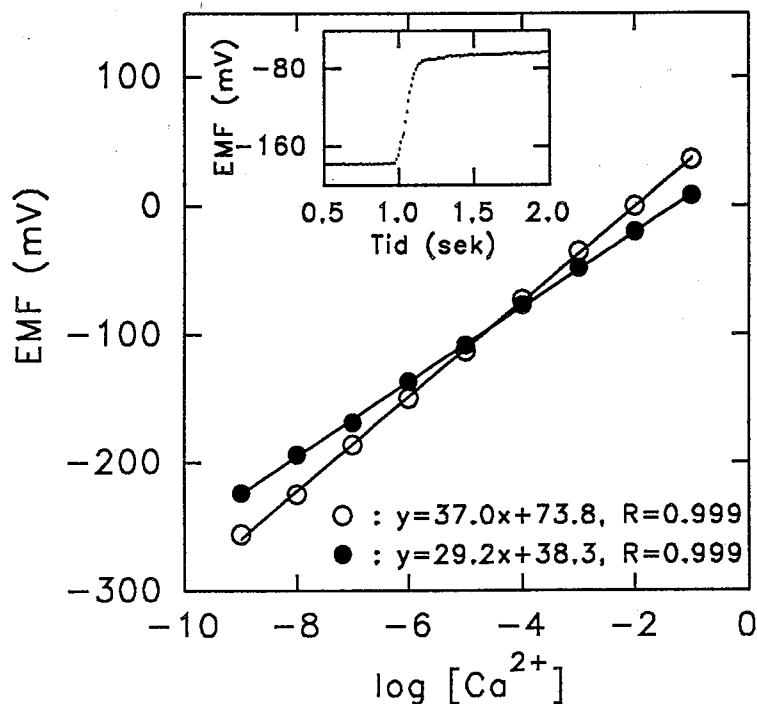


Fig. 7.2: Kalibreringskurver for Ca^{2+} -selektive elektroder. \circ : Ca^{2+} i H_2O , \bullet : Ca^{2+} i 10 mM Tris/HCl-buffer pH 7.8, tilsatt 150 mM KCl. Den innskutte figuren viser kalsiumelektrodens responstid ved tilsetning av 1 mM CaCl_2 -løsning til en 1 μM CaCl_2 -løsning.

Selektivitet

Selektiviteten til elektrodene ble bestemt ved separate løsnings metode. Det vil si at spenningen ble målt i løsninger med henholdsvis ren CaCl_2 og ren $\text{MCl}_{(2)}$ ($\text{M}^{n+} = \text{Mg}^{2+}$, K^+ , Na^+). Konsentrasjonen av både Ca^{2+} og M^{n+} var 100 mM. Elektrolyttløsningene som ble benyttet i selektivitetmålingene var forurenset med Ca^{2+} . Resultater fra ICP-målinger viste at NaCl, KCl og MgCl_2 inneholdt henholdsvis 0.008 %, 0.006 % og 0.44 % Ca^{2+} . Forurensningen av Ca^{2+} vil påvirke selektivitetmålingene. Det ble derfor satt til et overskudd av BAPTA for å binde kalsiumet før målingene ble utført. Selektivitetsresultatene er gitt i tabell 7.2.

Tabell 7.2: Selektivitetskonstanter for Ca²⁺-elektroden. Selektiviteten er målt ved 100 mM Ca²⁺ og 100 mM av det konkurrerende kationet Mⁿ⁺ ved 20 °C, og beregnet fra ligningen $\log K_M = (E_M - E_{Ca}) / (2.303 \cdot RT/nF)$.

M	K _M
Mg ²⁺	2.1-5.4·10 ⁻⁴
K ⁺	2.9-3.4·10 ⁻⁴
Na ⁺	1.4-1.7·10 ⁻⁴

Responstid og drift

Responstiden ble målt og beregnet til 0.13 s ved flytting av elektrodene fra en løsning med [Ca²⁺] = 1 μM til en løsning med [Ca²⁺] = 1 mM, og ca 1.4 s ved den motsatte forflytningen. Ved tilsetning av BAPTA til en 1 mM kalsiumløsning, var responstiden ca 1.1 s. Driften i av elektroden var mindre enn 1 mV·time⁻¹ (< 3 %) i μM-området, mens den i nM-området driftet mindre enn 3 mV·time⁻¹ (< 9 %).

7.1.2. Renhet av ryanodin bestemt ved HPLC

Renheten av både umerket ryanodin og [³H]ryanodin ble bestemt ved hjelp av HPLC. Mobilfase bestående av 25 % metanol i H₂O ga best separering av toppene i kromatogrammet (figur 7.3), men en mobilfase med opptil 35 % metanol ga tilfredsstillende separering. Det ble brukt resultater fra forsøk med ulike mobilfaser (25 - 35 % metanol) til beregning av renheten på ryanodin.

For det umerkede ryanodinet ga kromatogrammet to store topper: topp 1 etter henholdsvis 90 - 110 min. og topp 2 etter 140 - 180 min. I tillegg er det noen mindre topper i væskefronten. Ved bruk av 25 % metanol som mobilfase, viste målinger av absorbansen ved 260 nm ingen overlapp mellom de to store toppene. Arealet av de to toppene ble beregnet ved å klippe ut toppene, og så veie dem. Topp 1 og topp 2 utgjorde arealer på henholdsvis 62.5 ± 1.4 og 37.5 ± 1.4 % (n=5). For å identifisere ryanodintoppen og for å bestemme renheten på [³H]ryanodin, ble [³H]ryanodin applisert på kolonnen. [³H]-målingene viser en kraftig topp ved topp 2, og ellers små topper ved henholdsvis væskefronten, topp 1 og ved overgangen til 100 % metanol. Under forutsetning av at preparatet fra New England Nuclear er [³H]ryanodin, indikerer resultatene at topp 2 i kromatogrammet er ryanodin, og at det umerkede ryanodinet fra Agri Systems er 37.5 % ren. [³H]ryanodin ga, i de konsentrasjoner som ble benyttet, ingen OD₂₆₀ topp

når den ble applisert på kolonnen uten umerket ryanodin. På grunnlag av kumulative verdier av [^3H]-målingene ble renheten av [^3H]ryanodinet beregnet til 86 %. De presenterte ryanodinbindingsresultatene i oppgaven er korrigert for denne urenheten. Umerket ryanodin med 98% renhetsgrad ble kommersielt tilgjengelig i 1991 (Wako Chemicals (Japan)). Dette ryanodinet er benyttet i noen av forsøkene.

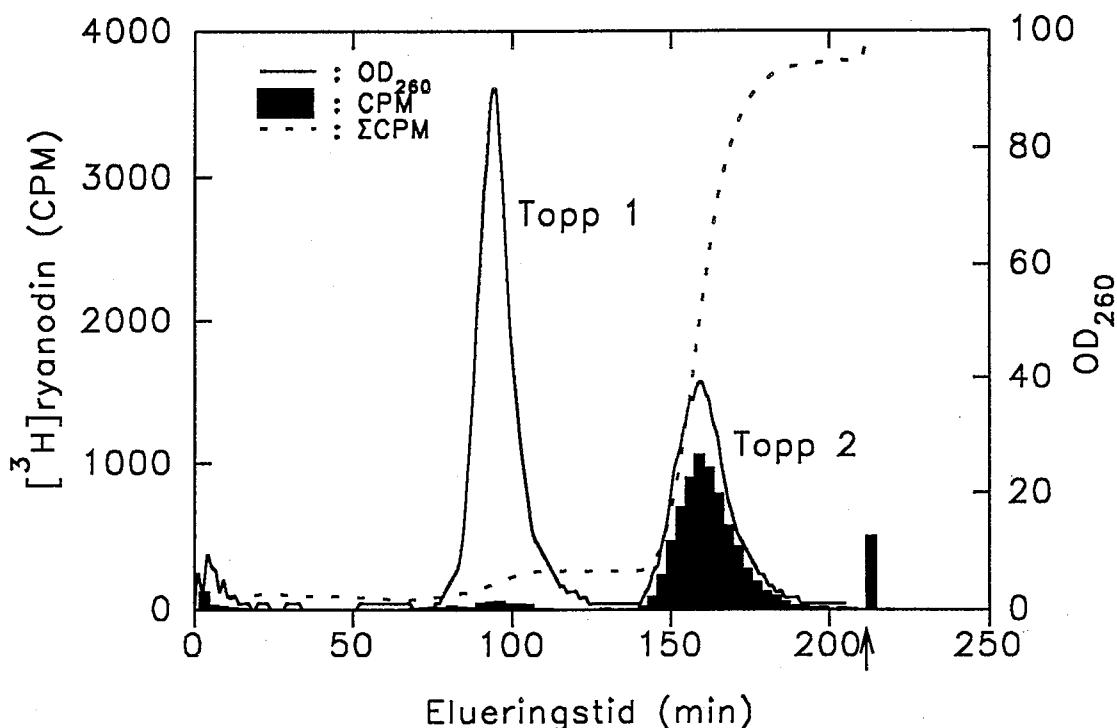


Fig. 7.3: HPLC-kromatogram av ryanodin (Agri Systems) målt fotometrisk ved 260 nm (heltrukket linje) og [^3H]ryanodin fra New England Nuclear (fylte søyler). Ryanodintoppen er identifisert på grunnlag av tritium-målinger. Den stiplete linjen viser kumulative verdier av radioaktivitetsmålinger (CPM) for beregning av renhet på [^3H]ryanodin. 25 % metanol ble benyttet som mobilfase. Pilen markerer overgang til 100 % metanol. Elueringshastighet: 1 ml·min $^{-1}$.

Det ble også gjort forsøk på å finne renheten av umerket ryanodin ved isotopfortynningsforsøk. Resultatene var imidlertid vanskelig å tolke, antagelig fordi preparatet var forurenset med et ryanodin-beslektet molekyl som også bandt seg til ryanodinreseptoren, men med en annen affinitet enn ryanodin.

7.1.3. Fibertyping av kanin skjelettmuskulatur

Fibertype for forskjellige deler av bakkensmuskulatur fra kanin ble bestemt. Muskelfiberne ble klassifisert etter Type I (Slow Twitch, rød muskulatur) og Type II (Fast Twitch, hvit muskulatur) (Vøllestad *et al.* 1984). Musklene som ble benyttet til isolering av sarkoplasmatiske retikulum inneholdt 89 - 100 % fibre av Type II. Type II-fibre

inneholder generelt mer sarkoplasmatisk retikulum enn Type I fibre (Peachey & Franzini-Armstrong, 1983).

7.1.4. Væskescintillasjonsmålinger for korrigering av "quenching"

Fig. 7.4a. viser en lineær sammenheng mellom mengde av ^3H ryanodin, applisert på henholdsvis GSWP- og GF/C-filter, og radioaktivitet målt som CPM. Glassfiberfilter (GF/C) med ^3H ryanodin ga ingen reduksjon i telletall i forhold til ^3H ryanodin talt uten filter. Cellulose-acetat/nitratfiltere (GSWP) ga derimot 10 % reduksjon i telletall, og dette økte til 13 % hvis filtrene ble stående i telleveske i 3 dager før de ble talt. Målinger av ^3H utført ved hjelp av væskescintillasjonsteller med ekstern standard, som gir mulighet for beregning av DPM, viste lineære sammenhenger mellom DPM og mengde ^3H ryanodin, men målingene viste ingen reduksjon i DPM for GSWP-filtrene (Fig. 7.4b.). En del av ^3H -målingene er foretatt på en væskescintillasjonsteller uten mulighet for beregning av DPM. I disse forsøkene er det benyttet CPM-verdier som er korrigert for "quenching" til beregning av resultatene. I resten av forsøkene er det benyttet DPM-verdier som er automatisk korrigert for telleeffektivitet og "quenching".

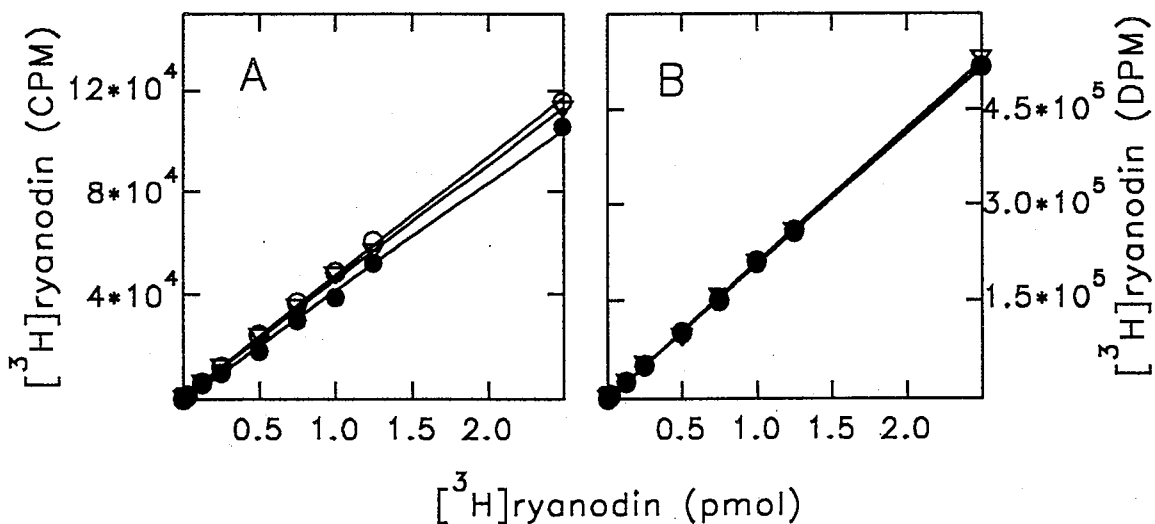


Fig. 7.4: Sammenheng mellom mengde ^3H ryanodin og radioaktivitet målt som henholdsvis CPM (a) og DPM (b). ●: med GSWP-filter, ○: med GF/C-filter, ▽: uten filter i tellerøret.

7.2. RYANODINBINDING TIL SR-VESIKLER

7.2.1. Isolering av SR-vesikler, gjenfunnsanalyse

Den isoleringsprosedyren som ga størst utbytte av SR er beskrevet i fig 6.1 i metodekapitlet. I første trinn i isoleringsprosedyren homogeniseres muskelen kraftig med

to forskjellige homogenisatorer. En ekstra homogenisering med en Ultra-Turrax homogenisator ga høyere utbytte av SR. I de to første sentrifugeringene ved lav hastighet fjernes cellekjerner og myofibriller. Det er viktig å få løst opp pelleten fra den første lavhastighets-sentrifugeringen for å få med så mye SR som mulig. Den tredje sentrifugeringen, som ble foretatt ved høy hastighet, pelleterte de forskjellige membranfragmentene. Sentrifugering på sukrosegradient skilte vesikler fra den terminale delen og den longitudinale delen av SR. Den siste sentrifugeringen pelleterte membranvesiklene som var isolert på sukrosegradienten. Resultater fra en typisk isolering er gitt i tabell 7.3.

Tabell 7.3.: Resultater fra SR-isolering 2/10-90. De to første kolonnene viser resultater for protein og de to siste kolonnene for bundet ryanodin. GSA: lavhastighets-sentrifugering, Ti60: Høyhastighets-sentrifugering, SW25: Sukrosegradient-sentrifugering.

Preparat	Protein (mg)	Gjennuttinn (%)	Ryanodin (pmol·mg ⁻¹ prot)	Ryanodin (pmol)
Homogenat	8000	100	0.008	64
GSA1 Sup. (S1)	3000	37.5	0.03	
GSA1 Pell. (P1)	5000	62.5	0.07	350
GSA2 Sup. (S2)	450	5.6	2.10	945
GSA2 Pell. (P2)	4700	58.8	0.10	
Ti60 Sup. (S3)	350	4.4	-	
Ti60 Pell. (P3)	150	1.9	6.42	963
SW25 Sup1	1.3	0.02	3.21	
SW25 Sup2	3.2	0.04	0.38	
SW25 Sup3	8.7	0.11	0.01	
SW25 Sup4	11.9	0.15	1.91	
SW25 Sup5	0.9	0.01	2.25	
SW25 Pell1	-	-	-	
SW25 Pell2	0.2	0	0.50	
SW25 Pell3	3.0	0.04	1.06	
SW25 Pell4	76.2	0.95	11.94	910
SW25 Pell5	16.6	0.21	2.63	

Proteinmengden ble redusert til omtrent 1 % fra det opprinnelige homogenatet til pelleten fra det 4. båndet på sukrosegradienten. Samtidig økte ryanodinbindingen fra 0.008 pmol·mg⁻¹ protein til 11.9 pmol·mg⁻¹ protein. Det totale antall ryanodinmolekyler som binder seg økte fra 64 pmol for homogenatet til i overkant av 900 pmol for de tre siste

trinnene i renseprosedyren. Proteinmengden som er funnet igjen i bånd 4 fra sukrosegradienten (Pell4) er omtrent halvert i forhold til P3 (pellet Ti60), og ryanodinbindingen er nesten fordoblet. Gjenfunnet av protein er omtrent 100 % i alle isoleringstrinnene, bortsett fra trinnet på sukrosegradienten hvor gjenfunnet er noe lavt. Det totale gjenfunnet av protein er 8170 mg noe som svarer til 102 % av utgangspunktet (homogenatet). Resultatene for oppkonsentrering av ryanodinreseptor er vist i figur 7.5.

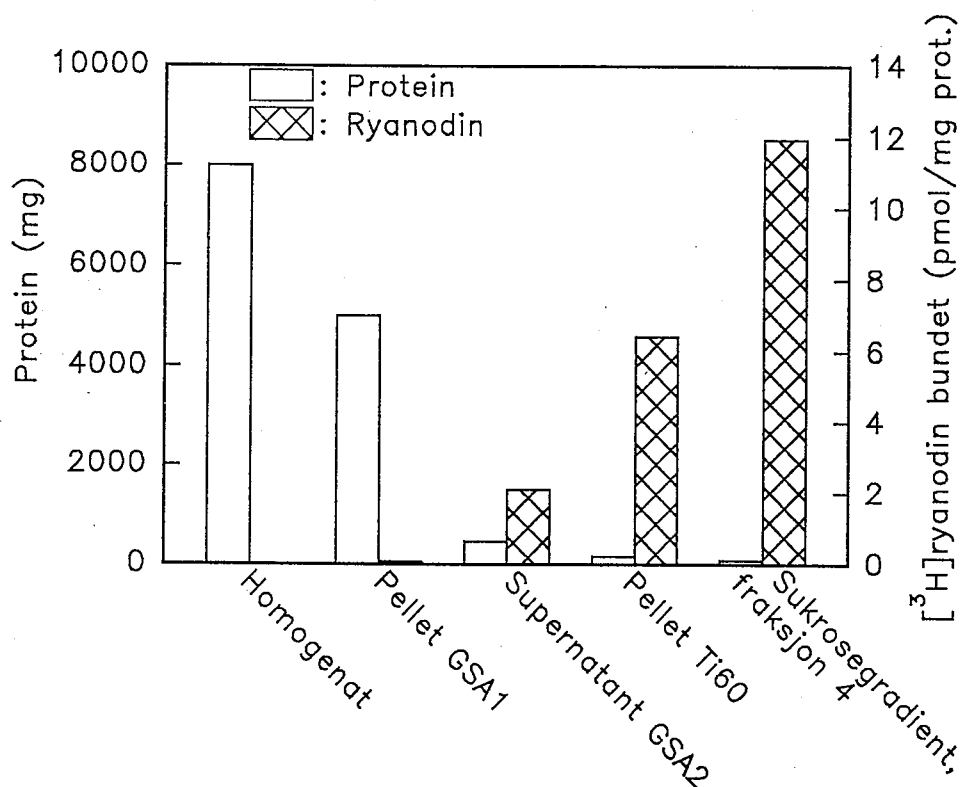


Fig. 7.5: Isolering av SR. Ryanodinbindingen øker, samtidig som proteinmengden faller i løpet av isoleringen.

7.2.2. Nøyaktighet og presisjon

Metoden som ble benyttet til å binde ryanodin til ryanodinreseptoren viste en spredning i nøyaktigheten på under 6 %. Målingene er foretatt på forskjellige dager med 4 - 8 paralleller ved hver måling. Spredningen i presisjonen (dag til dag variasjon) var 5 % ved fire påfølgende analyser på det samme SR-preparatet. Variasjonen var større når forskjellige SR-preparater ble sammenlignet.

Sammenhengen mellom mengde protein som ble filtrert og bindingen av [3 H]ryanodin var lineær i området 50 μ g - 400 μ g protein. Filtrering av større proteinmengder ga "klogging" av filterene, og derfor meget lange filtreringstider.

7.2.3. Betydningen av varierende inkubasjonstid

Binding av [3 H]ryanodin til SR-vesikler som funksjon av tiden ble studert under forskjellige betingelser. [3 H]ryanodin bandt seg raskere til SR-vesikler når inkubasjonsløsningen inneholdt Na_2ATP enn MgATP (Fig 7.6).

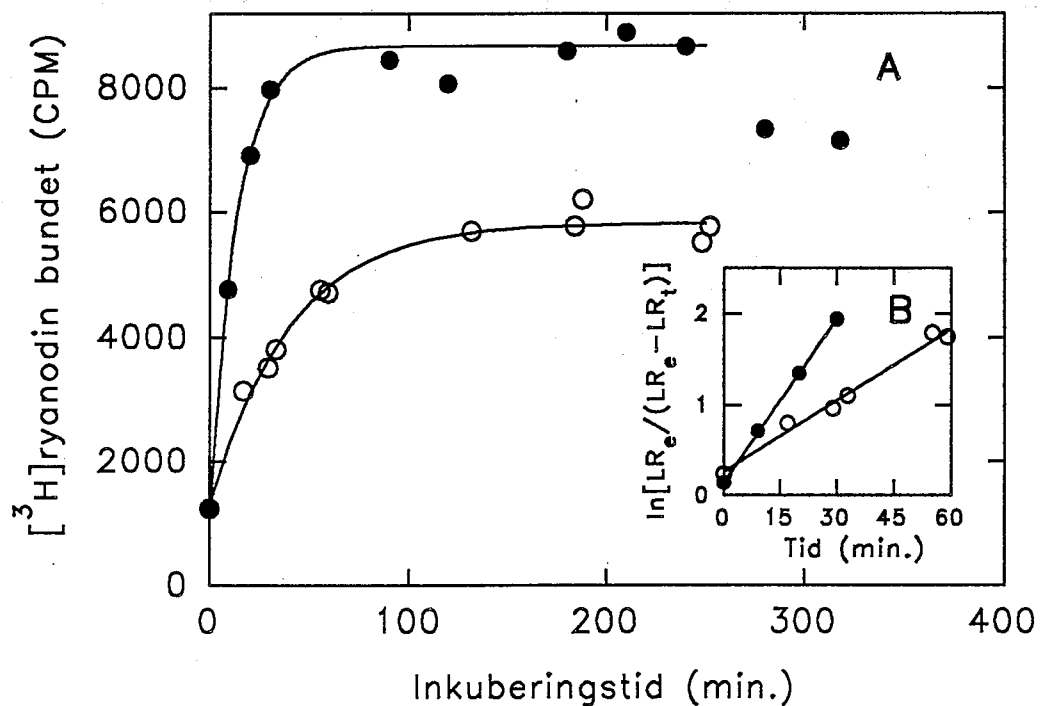


Fig. 7.6: A: Binding av [3 H]ryanodin til SR som funksjon av tiden ved bruk av henholdsvis Na_2ATP (●) og MgATP (○) i inkubasjonsløsningen. Kurvetilpasningen er gjort til ligningen: $A=A_{\infty}(1-e^{-kt})+A_b$. For Na_2ATP er $A_{\infty}=7467$ CPM, $A_b=1212$ CPM og $k=0.0732$ min^{-1} . For MgATP er $A_{\infty}=4526$ CPM, $A_b=1303$ CPM og $k=0.0254$ min^{-1} . B: Assosiasjonen av [3 H]ryanodin til SR tilpasset pseudo-1.-ordens plott. Na_2ATP (●) og MgATP (○) er benyttet i inkubasjonsløsningen.

Bindingen av [3 H]ryanodin nådde maksimalt nivå etter ca 35 minutter når Na_2ATP var tilstede. Dette reseptor-ligandkomplekset var stabilt i bortimot 4 timer. Deretter oppsto det et fall i proteinbundet [3 H]ryanodin. Maksimal bindingen av [3 H]ryanodin var 25 % lavere med MgATP tilstede i forhold til Na_2ATP , og den maksimale bindingen ble ikke oppnådd før etter ca 120 minutter.

Bindingen av [3 H]ryanodin til SR-vesikler fra skjelettmuskel steg eksponensielt med tiden i begynnelsen av inkuberingen, og det er beregnet hastighetskonstanter ut fra første-

ordens reaksjonsmekanismer. Tilpasning av dataene til første-ordens reaksjonskinetikk ga hastighetskonstanter på 0.0732 min⁻¹ og 0.0254 min⁻¹ med henholdsvis Na₂ATP og MgATP i inkubasjonsmediet.

Assosiasjonshastighetskonstanten (k_1), beregnet fra pseudo-første-ordens reaksjonskinetikk av de initielle bindingsverdiene (fig 7.6B), var 0.003 min⁻¹nM⁻¹ med Na₂ATP i inkubasjonsmediet og 0.0013 min⁻¹nM⁻¹ med MgATP. Korrelasjonen for plottene var 1.00 og 0.99 for henholdsvis Na₂ATP og MgATP, og K_{obs} henholdsvis 0.060 og 0.026. Med en K_D lik 7.46 nM (kap. 7.2.8.) ble det beregnet en dissosiasjonshastighetskonstant (k_{-1}) lik 0.0224 min⁻¹ når Na₂ATP var tilsatt inkubasjonsmediet.

7.2.4. Betydningen av varierende pH

Bindingen av [³H]ryanodin til SR-vesikler var sterkt avhengig av pH. For pH mindre enn 5 ble [³H]ryanodin ikke bundet til ryanodinreseptoren. Mellom pH 5.5 og pH 8 økte bindingen med pH (20.000 - 21.000 CPM/pH-enhet). Over pH 8 var det tendenser til fall i [³H]ryanodinbindingen med økende pH. Den uspesifikke bindingen var stabil i hele området opp til pH 8, med en antydning til stigning ved pH 8.2. Resultatene for SR-vesikler fra kaninmuskel er illustrert i figur 7.7.

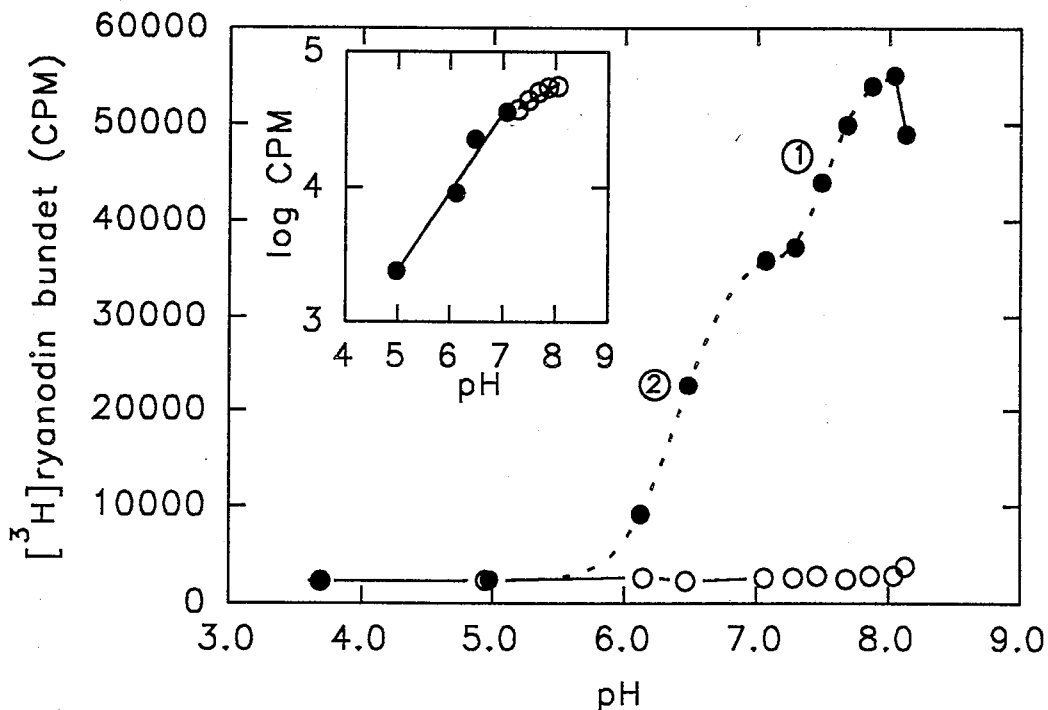


Fig. 7.7: Binding av [³H]ryanodin til SR som funksjon av pH. To sigmoide kurver, $Y=(a-d)/(1+(X/c)^b)+d$, vist med stiplede linjer, er tilpasset dataene for den totale bindingen i pH-områdene 7.07 - 8.04 (1) og 3.68 - 7.29 (2). Tilpasningen av dataene ga følgende resultater: (1) $a_1=35074\text{cpm}$, $b_1=56.87$, $c_1=pK_{a1}=7.54$, $d_1=55426\text{cpm}$; og (2) $a_2=2306\text{cpm}$, $b_2=29.94$, $c_2=pK_{a2}=6.41$ og $d_2=37887\text{cpm}$. ●: Total binding; ○: Uspesifikk binding.

Senere forsøk som ble gjort på SR-vesikler fra rottemuskel (*M. extensor digitorum lungus*, hvit muskulatur) viste også et pH-optimum i [^3H]ryanodinbinding ved pH 8. Forsøket bekreftet også at den uspesifikk bindingen av [^3H]ryanodin stiger ved pH-verdier over 8 (data ikke vist). I figur 7.7 er det spesielt interessant å legge merke til den kraftige stigningen og den lille avflatingen i området rundt fysiologisk pH; det vil si pH 7 - 8. Det er tilpasset to sigmoide kurver til dataene (kap. 6.5.), og fra disse kurvene er det beregnet pK_a -verdier på henholdsvis 7.54 og 6.41.

7.2.5. Betydningen av varierende [Ca^{2+}]

Kalsium er trolig en viktig modulator for ryanodinreseptorens funksjon, og det er vist at Ca^{2+} kan indusere Ca^{2+} -frisetting både i skjelett- og hjerte-muskulatur (kap. 3.6.1.). Bindingen av [^3H]ryanodin til ryanodinreseptoren som funksjon av [Ca^{2+}] ble derfor studert. [^3H]ryanodin bandt seg ikke til ryanodinreseptoren ved tilsetning av overskudd av BAPTA, det vil si ved minimale mengder med fritt Ca^{2+} i løsningen ($< 1 \text{ nM}$ fritt Ca^{2+}). Ved å øke [Ca^{2+}] til 1 nM , økte [^3H]ryanodinbindingen til sitt maksimale nivå, og det var bare mindre variasjoner ved en øking av den frie kalsiumkonsentrasjonen opptil $100 \mu\text{M}$. Ved høyere konsentrasjoner enn $100 \mu\text{M}$ falt [^3H]ryanodinbindingen og ved 10 mM fritt Ca^{2+} var bindingen redusert til ca 20 % av den maksimale verdien. Ved en kalsiumkonsentrasjon på 100 mM var bindingen ikke vesentlig over bakgrunnsnivå.

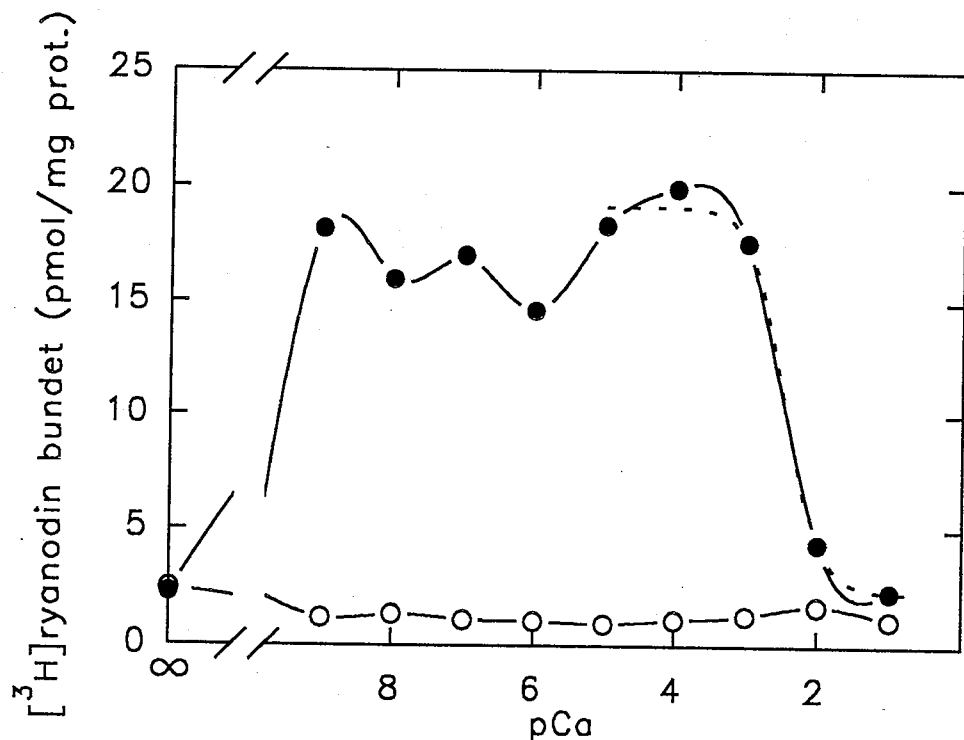


Fig. 7.8: Binding av [^3H]ryanodin til SR som funksjon av fritt Ca^{2+} . Stiplet linje er en sigmoid kurve tilpasset dataene med konsentrasjon høyere enn $10 \mu\text{M}$. ●: Total binding; ○: Uspesifikk binding.

Kalsiumkonsentrasjonen som ga 50 % hemming (IC_{50}) ble beregnet til 3.4 mM Ca^{2+} ved sigmoid kurvetilpasning (kap. 6.5). Beregningen er basert på forsøk med Ca^{2+} -konsentrasjoner høyere enn $10 \text{ }\mu\text{M}$. De andre parameterene ved kurvetilpasningen var: a, $19.1 \text{ pmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein; b, 31.9; c, $\text{pCa}=2.5$ og d, $2.3 \text{ pmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein. Den uspesifikke bindingen av $[\text{}^3\text{H}]$ ryanodin var tilnærmet konstant på ca 5 % av maksimal binding i hele området. Resultatene er illustrert i fig. 7.8.

7.2.6. Betydningen av varierende magnesiumkonsentrasjon

Magnesium, som er tilstede i muskelen i millimolar-området, hemmer Ca^{2+} -frisettingen fra SR i skjelettmuskel (Martonosi, 1984; Endo, 1985; Meissner *et al.* 1986). Det var derfor interessant å teste effekten av Mg^{2+} på $[\text{}^3\text{H}]$ ryanodinbinding til SR-vesikler. Resultatene viser at Mg^{2+} hemmet bindingen av $[\text{}^3\text{H}]$ ryanodin ved konsentrasjoner høyere enn $10 \text{ }\mu\text{M}$. Ved 10 mM var den totale bindingen av ryanodin redusert til tilnærmet samme nivå som den uspesifikke bindingen (fig. 7.9). En sigmoid kurve (kap. 6.5.) tilpasset dataene har følgende parametre: a, $18.1 \text{ pmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein; b, 11.77; c, $\text{pMg}=3.29$ og d, $1.44 \text{ pmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein. Dette gir en $\text{IC}_{50} = 0.51 \text{ mM}$. I området under $10 \text{ }\mu\text{M}$ viser resultatene små variasjoner i $[\text{}^3\text{H}]$ ryanodinbinding. Den uspesifikke bindingen var tilnærmet konstant lik 5 % av den totale bindingen i hele det undersøkte området.

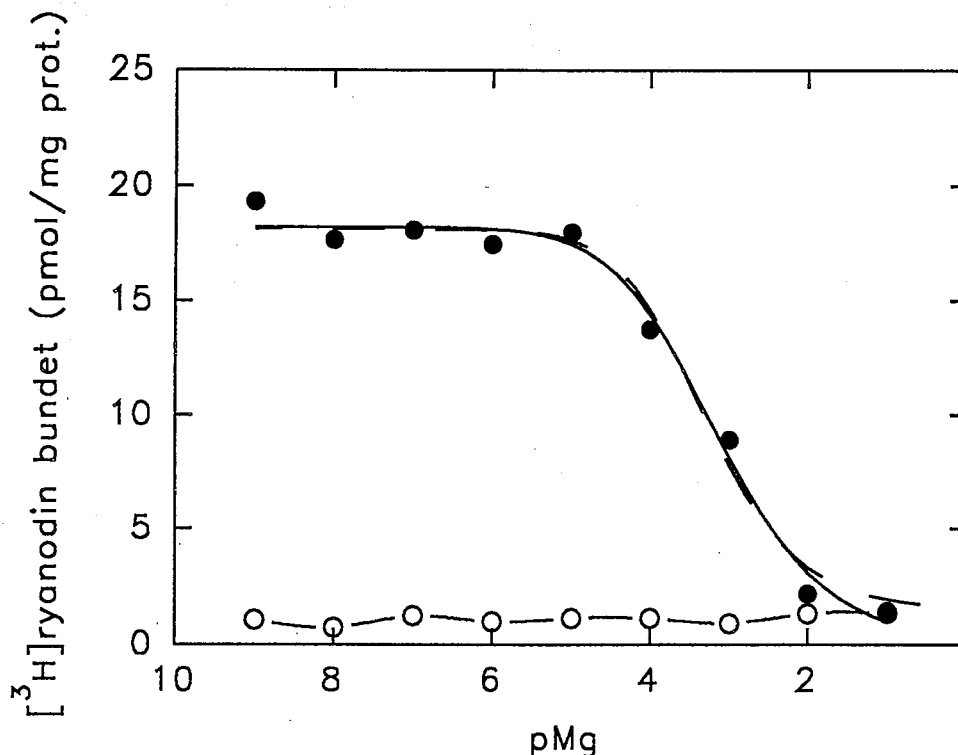


Fig. 7.9: Binding av $[\text{}^3\text{H}]$ ryanodin til SR som funksjon av den totale magnesiumkonsentrasjonen. Den stiplede linjen er en sigmoid kurve tilpasset dataene som beskrevet i kap. 6.5. ●: Total binding, ○: uspesifikk binding.

7.2.7. Varierende [ATP] og andre nukleotider

Adenin-nukleotider påvirker Ca^{2+} -frisetting fra SR-vesikler (Martonosi, 1984; Endo, 1985). Det var derfor viktig å undersøke hvordan ATP, ADP, AMP og andre nukleotider påvirker bindingen av [^3H]ryanodin til ryanodinreseptoren. ATP-konsentrasjonen i muskel kan variere avhengig av hvilket arbeid muskelen utfører, men er i en hvilende muskel 4 - 5 mM. Resultatene viste at økende konsentrasjoner av ATP ga en økende binding av [^3H]ryanodin opp til en ATP-konsentrasjon på 3 - 5 mM. Ved høyere ATP-konsentrasjoner hemmes [^3H]ryanodinbindingen kraftig, og ved 100 mM er bindingen redusert til ca 15 % av maksimal binding. Den uspesifikke bindingen av [^3H]ryanodin er lav og uavhengig av ATP-konsentrasjonen. Resultatene er illustrert i figur 7.10.

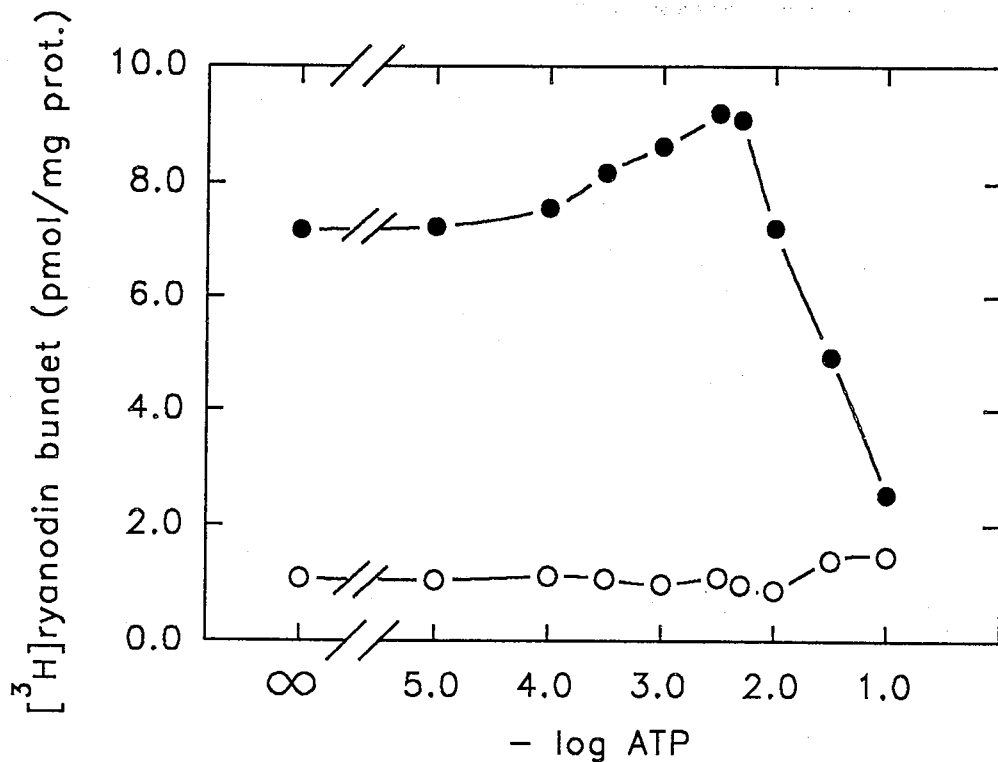


Fig. 7.10: [^3H]ryanodinbinding til SR som funksjon av ATP-konsentrasjon. ●: Total binding, ○: uspesifikk binding.

Det ble også gjort forsøk med andre nukleotider enn ATP. Disse forsøkene viste høyere binding av [^3H]ryanodin når AMP eller ADP var tilstede i inkubasjonsmediet sammenlignet med ATP. Økingen i [^3H]ryanodinbinding var på 25 %. Andre purin-nukleotider som ble undersøkt var ITP og GTP. ITP og GTP reduserte bindingen av [^3H]ryanodin med henholdsvis 45 % og 55 % i forhold til ATP. Effekten av to pyrimidin-nukleotider: UTP og CTP ble også undersøkt. UTP og CTP reduserte [^3H]ryanodinbindingen med

henholdsvis 40 % og 50 % i forhold til ATP. I alle tilfellene var nukleotid-konsentrasjonen 3 mM. Resultatene er vist i fig. 7.11.

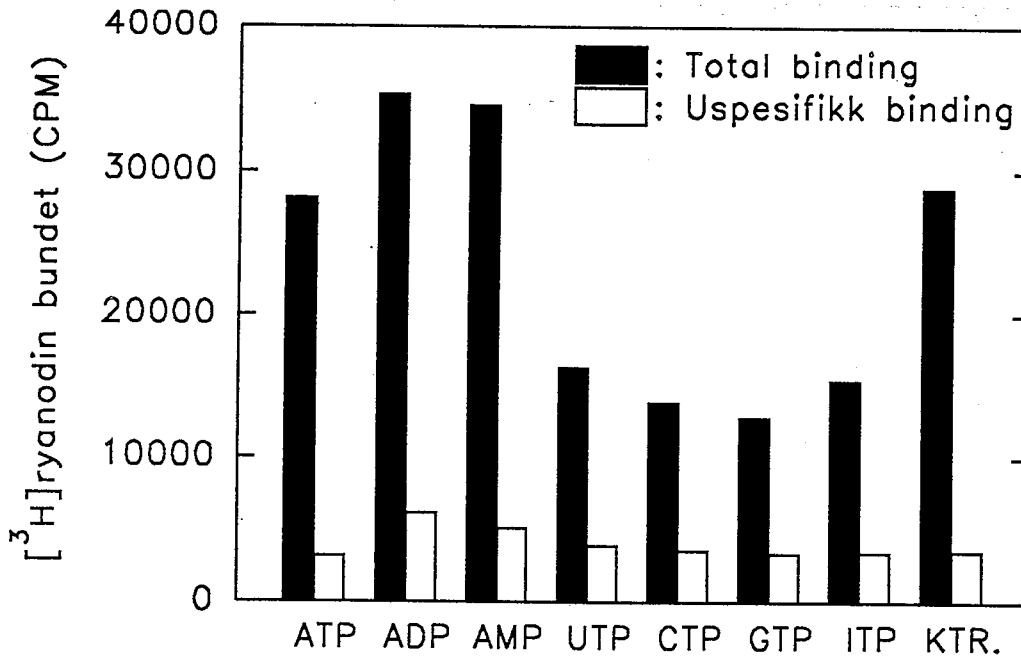


Fig. 7.11: [³H]ryanodinbinding til SR med forskjellige nukleotider i inkubasjonsmediet. Nukleotid-konsentrasjonen var 3 mM i alle forsøkene. Søylene markert med KTR er inkubert uten nukleotider.

7.2.8. Betydningen av varierende KCl-konsentrasjon

Flere forskningsgrupper har sett på sammenhengen mellom osmolaritet/ionestyrke og [³H]ryanodinbinding (Ogawa & Harafuji, 1990a; Bull *et al.* 1989; Imagawa *et al.* 1989). I denne oppgaven er det sett på sammenhengen mellom KCl-konsentrasjon og [³H]ryanodinbinding. SR-bundet [³H]ryanodin økte med konsentrasjonen av KCl opp til ca 100 mM KCl. Deretter var bindingen relativt stabil opp til ca 600 mM, for så å synke svakt ved høyere KCl-konsentrasjoner. GF/C- og GSWP-filtre viste ulik evne til å holde tilbake SR-bundet [³H]ryanodin med økende ionestyrke. Glassfiberfilteret (GF/C) holdt tilbake en økende mengde SR-bundet [³H]ryanodin med økende KCl-konsentrasjon opp til 600 mM. SR-bundet [³H]ryanodin som slapp igjennom glassfiberfilteret og ble stoppet av cellulosefilteret (GSWP) økte med økende KCl-konsentrasjon opp til 100 - 150 mM KCl. Ved 100 mM KCl stoppet glassfiberfilteret ca 50 % av SR-bundet [³H]ryanodin. En avtagende mengde av [³H]ryanodin ble stoppet av GSWP-filteret ved konsentrasjoner over 150 mM KCl, og over 400 mM ble over 90 % av det SR-bundete [³H]ryanodinet holdt tilbake av glassfiberfilteret. Resultatene er illustrert i figur 7.12.

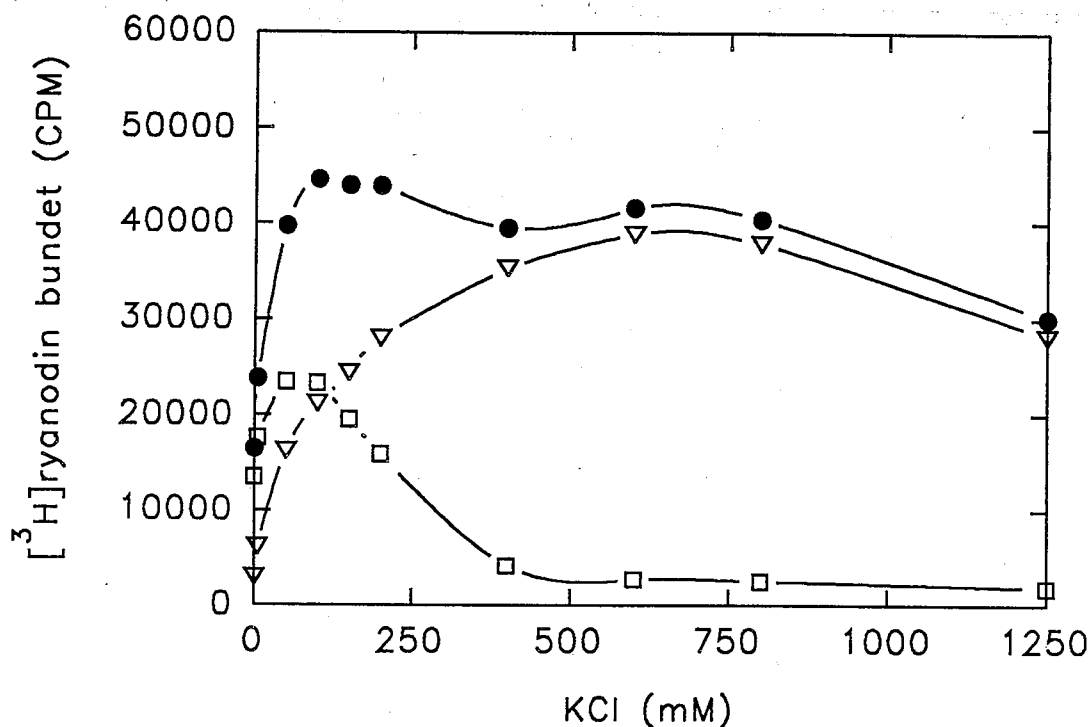


Fig. 7.12: [^3H]ryanodinbinding til SR ved forskjellige konsentrasjoner av KCl. \square og ∇ viser hvor mye proteinbundet [^3H]ryanodin som ble stoppet av henholdsvis GSWP-filteret og GF/C-filteret. \bullet viser summen av \square og ∇ .

Den uspesifikke bindingen var, ved alle de KCl-konsentrasjonene som ble undersøkt, under 10 % av den totale bindingen.

7.2.9. Betydningen av varierende ryanodinkonsentrasjon, Scatchard plot

Binding av [^3H]ryanodin til SR-vesiklene økte med økende ryanodinkonsentrasjon i inkubasjonsmediet opp til omtrent 33 nM. Deretter er det et fall i SR-bundet [^3H]ryanodin. Opp til 33 nM fri ryanodin viste resultatene en lineær sammenheng mellom bundet [^3H]ryanodin og bundet [^3H]ryanodin/fritt ryanodin (Scatchard plot). Ut fra denne sammenheng ble det beregnet en $K_D = 7.46$ nM, og en $B_{\text{maks}} = 21.9$ pmol \cdot mg $^{-1}$ protein. Resultatene er illustrert i fig. 7.13.

Det ble gjort forsøk for å undersøke om SR-vesiklene som var isolert var intakte og om de inneholdt funksjonelle ryanodinsensitive kalsiumkanaler. Dette ble gjort ved å inkubere vesiklene under forskjellige betingelser, samtidig som kalsium-konsentrasjonen i inkubasjonsmediet ble målt med kalsiumselektive elektroder. Figur 7.14 viser et slikt forsøk. Vesiklene inneholder antagelig noe Ca^{2+} -ATPase, som ved pil 1 pumper Ca^{2+} fra mediet og inn i vesiklene. Ryanodin, som ved lave konsentrasjoner induserer Ca^{2+} -frisetting (Meissner, 1986; Rousseau *et al.* 1987), ga ved pil 2 et lite utslipp av Ca^{2+} . Ved

dobling av ryanodinkonsentrasjonen ble det induisert et massivt utslipp av Ca^{2+} . Det er flere mulige årsaker til det store utslippet av Ca^{2+} . Ryanodinet kan ha låst Ca^{2+} -kanalen i åpen stilling, eller det kan ha blitt utløst Ca^{2+} -indusert- Ca^{2+} -frisetting (CICR) (kap. 3.6.1.). Ved pil 4 var antagelig alt kalsiumet fra vesiklene sluppet ut. Dette forsøket viser at vesiklene var intakte, og at de inneholder funksjonelle Ca^{2+} -kanaler og noe Ca^{2+} -ATPase.

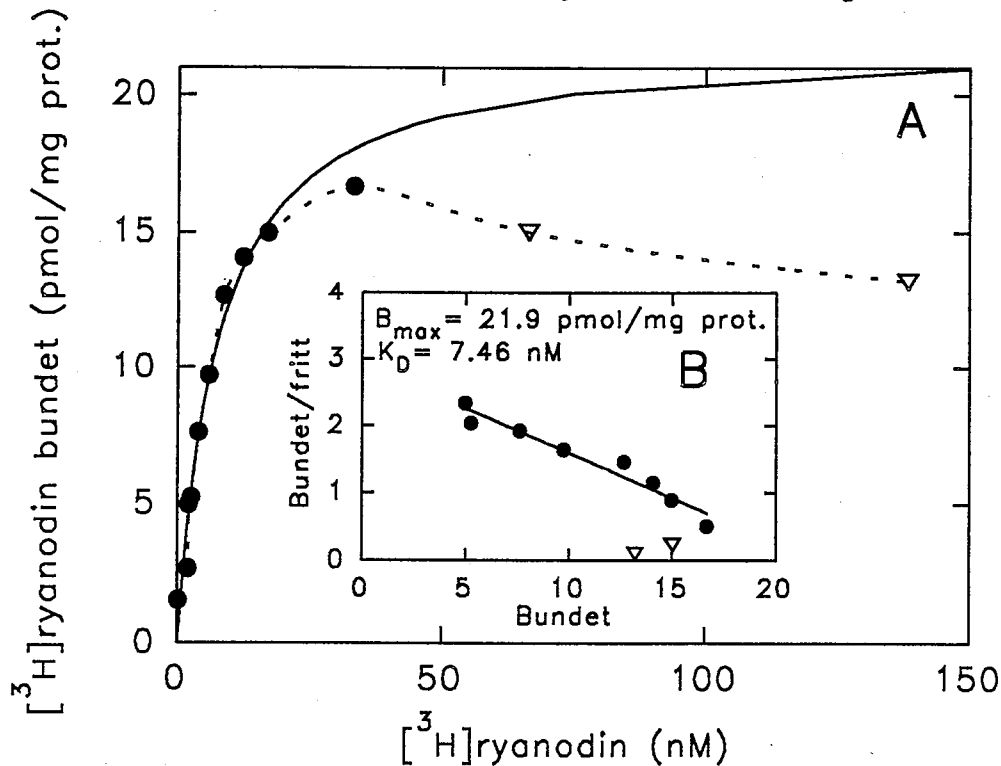


Fig. 7.13.: Spesifikk binding av $[\text{}^3\text{H}]\text{ryanodin}$ til SR-vesikler. Bindingsresultatene er markert med ● og ▽. Resultater som er markert med ▽ er ikke tatt med i beregningen av K_D og B_{maks} i Scatchard-plottet (B). Den heltrukne linjen i A er beregnet ut fra K_D og B_{maks} fra Scatchard-plottet. Det er trukket stiplede linje mellom målepunktene.

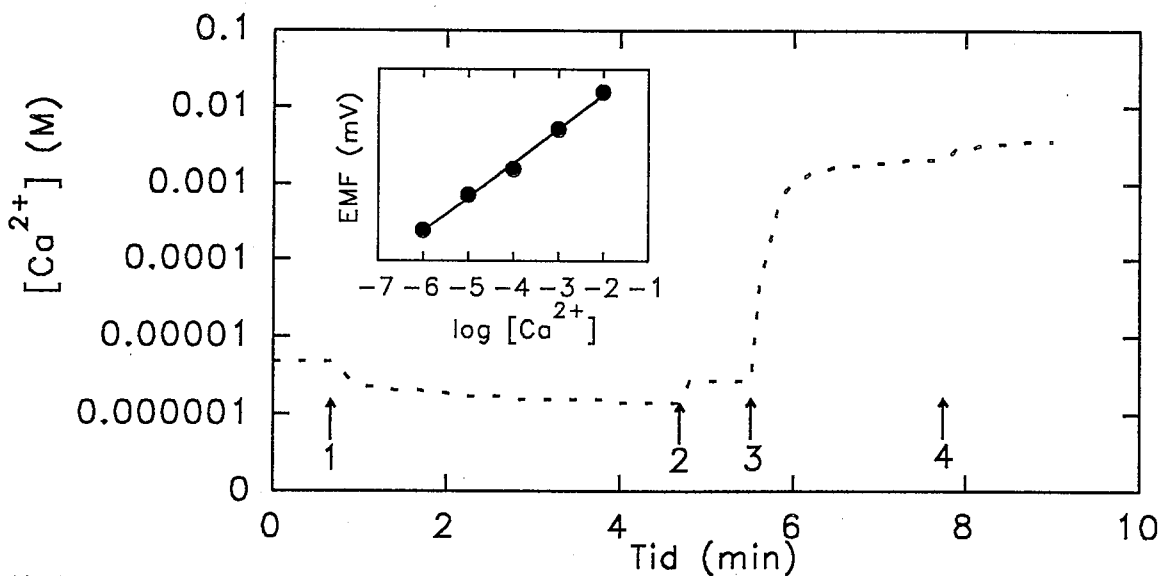


Fig. 7.14. Ryanodins virkning på SR-vesikler fra skjelettmuskulatur målt med Ca^{2+} -selektiv elektrode. Inkubasjonsbuffer (Tris/HCl pH 8.0, 150 mM KCl, 3 mM Na_2ATP , 5 μM CaCl_2) ble tilsatt SR vesikler ved pil 1. Ved pil 2, 3 og 4 ble det satt til ryanodin slik at konsentrasjonen i løsningen ble henholdsvis 100, 200 og 300 nM ryanodin. Den innskutte figuren viser kalibreringslinjen for elektroden

8. Diskusjon

Kapitlets første del diskuterer resultatene av metoder som var nødvendige for å utvikle en metode for å kvantifisere ryanodinsensitiv kalsiumkanal. Denne delen omhandler utvikling og testing av kalsiumselektive elektroder og en HPLC-metode som ble benyttet til å bestemme renheten av ryanodinet. Andre del diskuterer resultatene fra bindingen av ryanodin til ryanodinsensitiv kalsiumkanal under varierende betingelser. Disse resultatene er videre sammenlignet med fysiologiske konsekvenser for ulike preparater under sammelignbare betingelser.

8.1. Ca²⁺-ELEKTRODER

Bindingen av ryanodin til ryanodinreseptoren i SR er avhengig av Ca²⁺-konsentrasjonen i inkubasjonsmediet. SR-vesiklene, som er benyttet i disse forsøkene, inneholder trolig flere forskjellige molekyler som binder kalsium med forskjellige affiniteter. Den terminale delen av SR har blant annet høy konsentrasjon av calsequestrin og to kalsiumbindende proteiner med molekylmasse på henholdsvis 42 kDa og 45 kDa (Lau *et al.* 1977). Det er også sannsynlig at membraner binder en del kalsium. For å beregne mengden av fritt kalsium tilstede i inkubasjonsmediet må konsentrasjonene av molekylene som binder kalsium, og deres affinitet for kalsium være kjent (se fig. 7.14). Dette er ikke praktisk mulig og det var derfor ønskelig å måle kalsium med en ikke-destruktiv metode. Alternativene som ble vurdert var Ca²⁺-bindende fargestoffer og Ca²⁺-selektive elektroder. Ca²⁺-bindende fargestoffer (f.eks Quin, Fura-2, Aequorin) har deteksjonsgrense i området 10⁻⁶ - 10⁻⁷ M Ca²⁺, og de er meget raske. Imidlertid er de dyre, og ved lave Ca²⁺-konsentrasjoner kan noen konkurrere med andre molekyler om bindingen av kalsium (Rega & Garrahan, 1986). Ca²⁺-elektroder reagerer tregere enn fargestoffer, men er mer følsomme (deteksjonsgrense på 10⁻⁸ - 10⁻⁹ M), billigere og trenger lite tilleggsutstyr. Det ble derfor valgt å bruke Ca²⁺-selektive elektroder til å bestemme konsentrasjonen av fritt kalsium. De kommersielt tilgjengelige kalsiumelektrodene er lineære ned til 0.5 - 1 µM. Det var ønskelig å måle Ca²⁺-konsentrasjoner som var lavere enn dette. Videre var det også ønskelig å gjøre forsøkene i så små volum som mulig (< 500 µl) fordi reagensene for kvantifisering av ryanodinreseptoren er kostbare. De Ca²⁺-selektive elektrodene måtte derfor være små; den ioneselektive elektroden og referanseelektroden måtte samtidig kunne gå ned i rør med diameter mindre enn 7-8 mm. Ingen kommersielle elektrodepar tilfredstilte dette kravet.

Det ble derfor utviklet et eget elektrodeoppsett. Elektrodene som ble utviklet var billige (reagenser for ca 2000 kr holder til flere tusen elektroder) og lette å lage når den optimale sammensetningen på membranløsningen var bestemt. Membranløsningen er holdbar i minst 1 år. Elektrodeoppsettet kan måle kalsiumkonsentrasjoner i volum som er under 100 µl og i rør med en diameter på ca 5 mm.

8.1.1. Uttesting av elektrodene

Linearitet

Kalsiumkonsentrasjonen i dobbeltdestillert og ionebyttet (Milli-Q, Millipore) vann, som er benyttet i alle løsninger i denne oppgaven, er av størrelsesorden 0.1 - 1 µM. For å lage løsninger med lavere konsentrasjon av fritt kalsium, må det benyttes kalsiumbuffere. Det ble valgt å bruke BAPTA som kalsiumbuffer, fordi BAPTA er mer spesifikk for Ca²⁺ enn EGTA, og det binder Ca²⁺ raskere. Til kalibreringskurver ble det derfor laget kalsiumbuffere i konsentrasjonsområdet 1 nM til 1 µM, mens det for høyere kalsiumkonsentrasjoner ble benyttet ubufrete kalsiumløsninger.

Elektrodene viste en lineær sammenheng mellom logaritmen til konsentrasjonen av Ca²⁺ og spenningen som ble målt. Dette er i overensstemmelse med Nernsts ligning. Dekadespranget var rundt 30 mV ved kalibrering i buffer, og 36 - 38 mV ved kalibrering i H₂O. Det teoretiske dekadepanget er i følge Nernsts ligning 29.1 mV ved 20 °C. Årsaken til at dekadepanget ligger noe høyt ved kalibrering i H₂O er uklart. Kalibreringsverdiene for standardene tilsatt BAPTA falt på forlengelsen av linjen som for standardene uten BAPTA. Dette ble tatt som tegn på at BAPTA-standardene var riktige.

Sensitiviteten (definert som nederste standard i det lineære området) kunne variere noe fra elektrode til elektrode, men alle elektrodene som ble benyttet var lineære ned til 10⁻⁸-10⁻⁹ M Ca²⁺. Dette er opptil en femtusendel av verdier rapportert for kommersielt tilgjengelig elektroder (Radiometer: 5·10⁻⁶ M, Orion: 5·10⁻⁷ M, Metrohm: 5·10⁻⁷ M, Ingold: 1·10⁻⁶ M). Den ioneselektive elektroden ble alltid kalibrert både før og etter målingene. Dette ga ingen vesentlige forskjeller i kalibreringslinjen.

Selektivitet

Måling av Ca^{2+} i løsninger hvor andre ioner enn Ca^{2+} er tilstede, krever at den ioneselektive elektroden er lite følsom for andre ioner. Selektivitetskonstantene som ble målt, var i størrelsesorden 10^{-4} for alle aktuelle interfererende ioner (Mg^{2+} , K^+ , Na^+). Det interfererende ionet vil følgelig gi en spenning som tilsvarer 1/10.000 av det Ca^{2+} vil gi ved samme konsentrasjon. Interferenser fra andre ioner kan derfor i de fleste tilfeller utelukkes. Ved måling av ekstremt lave kalsiumkonsentrasjoner kan imidlertid interfererende ioner gi opphav til forstyrrelser, men forurensning av kalsium i kjemikalier er antagelig et større problem enn interfererende ioner. Selektivitetskonstantene som er målt, er av samme størrelsesorden som Schefer *et al.* (1986) og Fluka (1988) har målt for den samme ionoforen (Fluka ETH-129).

Responstid

Ved en konsentrasjonsforandring på 1000 ganger, fra lav til høy konsentrasjon, ble elektrodernes responstid målt til 130 ms. Dette er betraktlig raskere enn det som er nødvendige for å måle Ca^{2+} i SR-suspensjoner. Responstiden vil være betraktlig kortere enn 130 ms ved mindre konsentrasjonsforandringer, og elektrodene vil antagelig være egnet til kinetikkstudier av Ca^{2+} -frisetting fra SR. Ved høye Ca^{2+} -konsentrasjoner vil antagelig en del Ca^{2+} assosiere seg til den ioneselektive membranen, og noe Ca^{2+} vil diffundere inn i den åpne referanse-elektroden. Responsen til elektroden var betraktlig langsommere ved forandring av konsentrasjonen fra høy til lav. Dette kan henge sammen med at dissosieringen av Ca^{2+} fra den ioneselektive membranen er en langsom prosess, og at det foregår en langsom diffusjon av Ca^{2+} -ioner ut fra den åpne referanse-elektroden.

Drift

Driften i elektrodespenningen, det vil si endringen i forholdet konsentrasjon/spenning over tid, var liten, og uten praktisk betydning for de målingene som ble utført i oppgaven.

8.2. RENHETEN AV RYANODIN

Uspesifikk binding av ryanodin til SR er bestemt ved å sette til stort overskudd (500 - 1000 ganger) av umerket ryanodin i forhold til [^3H]ryanodin. Renheten av umerket

ryanodin er i dette tilfelle ikke av avgjørende karakter, bare det er nok ryanodin til stede til å mette alle ryanodinreseptorene.

For å bestemme den totale bindingen av ryanodin til SR ble det inkubert med [³H]ryanodin med en kjent spesifikk aktivitet (mol·Bq⁻¹). Av økonomiske grunner var det ønskelig å senke den spesifikke aktiviteten på det innkjøpte ryanodinet. Dette gjøres ved å sette til umerket ryanodin, og renheten på det umerkede ryanodinet er da av avgjørende betydning. Ryanodinet ble derfor analysert på HPLC. Kromatogrammet av ryanodinet fra Agri Systems viste to store toppe, som var godt separert, og uten antydning til krysskontaminering. Toppene var symmetriske, uten tegn til "tailing". Dette indikerer at kolonnen ikke var overbelastet med prøve (Willard *et al.* 1988). Ryanodintoppen ble identifisert ved å sette [³H]ryanodin på kolonnen sammen med ryanodin. Den andre toppen ble ikke identifisert, men det er tidligere identifisert to aktive stoffer i ekstrakt fra *Ryania Speciosa*: ryanodin og 9,21-didehydroryanodin i forholdet 3:1 (Waterhouse *et al.* 1984). Dette kan indikere at forurensningen i preparatet fra Agri Systems er 9,21-didehydroryanodin. Isotopfortynningsforsøk som ble gjort med ryanodinet fra Agri Systems (ikke vist) antydnet at forurensningen som var tilstede, ikke hadde samme affinitet for ryanodinreseptoren som ryanodin.

På grunn av det urene ryanodinet, ble den spesifikke aktiviteten på [³H]ryanodin ikke redusert. Dette førte til at det ble brukt [³H]ryanodin for ca 20 kr i hver måling, og den høye kostnaden er årsaken til at det i de fleste forsøkene bare er utført enkeltmålinger.

Renheten på [³H]ryanodinet ble bestemt ved HPLC kombinert med væskescintillasjonstilling (fig. 7.3.). Renheten ble bestemt til 86 %. Det var betraktlig lavere enn det New England Nuclear (NEN) oppga ved kjøp (97 %) og noe lavere enn beregnet ut fra dekomponeringsdata fra NEN (2 % pr. 4 mnd.). Årsaken til dette er uklar, men prøven som ble analysert på HPLC, var tint og frosset flere ganger, noe som kan ha økt hastigheten på dekomponeringen.

8.3. ISOLERING AV SR

Hensikten med dette metodestudiet var å bestemme antall ryanodinreseptorer i skjelettmuskulatur fra menneske og rotte. Det er imidlertid vanskelig å skaffe til veie tilstrekkelige mengder av human- og rotte-muskulatur som et slikt metodestudie krever (ca 1 kg ren muskel). Dette er en av årsakene til at metodeutviklingen er gjort på

kaninmuskel. I tillegg inneholder bakbeina (lår) på kanin store muskelgrupper med mye muskelfibere av type II. Type II-fibere inneholder opptil 3 ganger mer SR enn muskelfibere av type I, og de terminale delene av SR er mer utviklet (Eisenberg, 1983). Det er derfor sansynligvis at type II-fibere også inneholder flere ryanodinreseptor.

Fibertypedata fra musklene som ble benyttet til isolering av SR viste stor overvekt av type II. Den muskelen som utgjorde størsteparten av muskelprøven (*m. gluteus*), besto av 95 - 100 % fibere av type II. Dette er et godt utgangspunkt for å isolere så mye SR som mulig.

Isoleringen av SR er en forholdsvis tidkrevende prosedyre (24 - 26 timer) med mange trinn. Den lange isoleringstiden øker muligheten for proteolyse av ryanodinreseptoren. For å unngå dette ble hele isoleringen foretatt på kjølerom (4 °C) eller på is. Videre ble alle løsninger som ble benyttet tilsatt proteasehemmere.

Isoleringen av SR fra 2/10-90 er brukt som eksempel på en typisk isolering. I denne isoleringen var gjenfunnet av protein gjennom hele prosedyren 102 %. Isoleringen starter med to sentrifugeringer ved lav hastighet. Dette fjerner det meste av myofibrillene, cellekjernene og andre cellefragmenter. I løpet av disse to trinnene fjernes om lag 95 % av proteinet. Det neste trinnet består av sentrifugering på sukrosegradient, som separerer SR-vesikler med forskjellig tetthet (longitudinell og terminal SR). Fraksjonene fra sukrosegradienten ble så pelletert ved sentrifugering ved høy hastighet. På gradienten ble det applisert 150 mg protein, og ca 50 % av proteinet ble funnet igjen i fraksjon 4 (P4, overgangen 1.17/1.20 g·cm⁻³). Vesikler fra terminal SR er rapportert å sedimentere ved tilsvarende tetthet (Lai *et al.*1988; Meissner, 1975; Saito *et al.*1984). Proteinmengden som ble isolert i P4, tilsvarer ca 1 % av det opprinnelige proteinet i homogenatet. En del av proteinet som ble applisert på gradienten (til sammen 17 %), ble funnet igjen i supernatantene etter sentrifugering av fraksjonene fra gradienten ved 70.000 g_{maks}. Dette proteinet kan enten bestå av membranfragmenter med meget lav tetthet, løselige proteiner, eller kontaminering fra pelleten ved avpipettering. Noe protein (11 %) ble også funnet i pelleten fra den tyngste fraksjonen (P5). Dette kan være kontaminering fra nabobåndet, eller det kan være tunge cellefragmenter eller organeller.

Proteinet som ble applisert på gradienten, bandt totalt 963 pmol ryanodin, og 94 % av dette ble funnet igjen i fraksjon P4. På grunn av reduksjonen i proteinmengden med ca 50 %, fører dette til en dobling i konsentrasjonen av ryanodinreseptorer ved sentrifugering

på sukrosegradienten. Denne oppkonsentreringen av er oppnådd uten vesentlig tap av ryanodinreseptorer. Saito *et al.* (1984) har også funnet terminalt SR i fraksjonen som tilsvarer P3 (1.14/1.17 g·cm⁻³). I dette metodestudiet er det ikke observert ryanodinbinding i fraksjon P3. Noe ryanodin bandt seg imidlertid i P5 (4 %), det vil si ved høyere tetthet enn det som er rapportert av Saito *et al.*(1984). Dette tyder på at isoleringsprosedyren som er benyttet (modifisert etter Saito *et al.*(1984)), gir vesikler som er forskjøvet mot noe høyere tetthet, men med hovedtyngden av vesikler i samme tetthetsområde som er rapportert tidligere (Saito *et al.*1984).

Forutsatt at kalsiumkanalen består av en tetramer med molekylmasse på ca 560 kDa per monomer (Takeshima *et al.*1989; Zorzato *et al.*1990), og med en ryanodinreseptor per tetramer blir den maksimale tettheten av ryanodinreseptoren på et rent preparat 446 pmol·mg⁻¹ protein. Dette stemmer godt overens med B_{maks} ≈ 500 pmol·mg⁻¹ protein som er målt på rent preparat (Inui *et al.*1987a; Lai *et al.*1988; Smith *et al.*1988). Mengden av ryanodinreseptor i de isolerte vesiklene er ut fra dette ca 5 %. Lai *et al.* (1988) har funnet en renhet på 3.4 % på et tilsvarende preparat.

Resten av ryanodinreseptorene ble funnet i supernatanten fra pelleteringen av bånd 4 (2 %). Dette kan skyldes kontaminering ved avpipettering av sentrifugerørene fra pelleteringen av båndene fra gradienten.

Resultatene fra første og siste del av SR-isoleringen er vanskelig å sammenligne. Før isoleringen viste homogenatet en ryanodinbinding på totalt 64 pmol. Dette svarer til 7 % av ryanodinbindingen som ble målt i fraksjon P4 fra sukrosegradienten. Årsaken til den lave ryanodinbindingen kan være flere: 1) For å få målbare resultater ble det brukt store mengder protein ved filtreringen, noe som førte til "klogging" av filtere og unøyaktige resultater, 2) Magnesium er til stede, og dette kan hemme hastigheten og mengden av ryanodin som bindes (se kap. 7.2.6.), eller 3) Andre kjemiske forhold i inkubasjonsløsningen kan ha ført til at ryanodin hadde lavere affinitet for reseptoren. Ved å forlenge inkubasjonstiden fra 1 til 6 timer økte bindingen av ryanodin til homogenatet 4 ganger, og etter 6 timer var ennå ikke maksimal binding oppnådd (resultater ikke vist). I det neste trinnet i isoleringen er det funnet noe høyere ryanodinbinding. Dette kan ha sammenheng med at det er fjernet en del magnesium. Bindingen er imidlertid fremdeles hemmet i forhold til de siste trinnene i isoleringen. Årsaken til den lave ryanodinbinding er trolig de samme som for homogenatet.

Graden av nedbryting, og størrelsen på gjenfunnet av ryanodinreseptoren i de første trinnene av isoleringen, er vanskelig å bestemme. Det totale gjenfunnet av ryanodinreseptoren i de tre siste trinnene i isoleringen var imidlertid ca 100 %. Dette viser at det har vært liten eller ingen nedbrytning av ryanodinreseptoren som influerer på ryanodinbindingen i løpet av disse siste trinnene. Disse trinnene utgjør i tid ca 90 % av prosedyren. Det var derfor sannsynlig at proteinnedbrytningen i de første trinnene også har vært liten, og at SR-vesiklene som er isolert er representative for SR fra de terminale cisterner. Forsøkene viste (fig. 7.14.) at vesiklene som var isolert, var tette for kalsium, men at de ved et gitt stimuli (ryanodin) slapp ut store mengder kalsium. Dette stemmer overens med tidligere publiserte resultater med hensyn til ryanodins virkning på Ca^{2+} -kanalen i SR (Meissner, 1986; Rousseau *et al.* 1987), og tyder på at det virkelig er SR-vesikler med funksjonelle ryanodinsensitive kalsiumkanaler som er isolert.

8.4. RYANODINBINDING

Ryanodin har en komplisert og til dels uoversiktlig virkning på muskel. I skjelettmuskulatur vil lave doser av ryanodin (nM) åpne Ca^{2+} -kanalen, mens høye doser (μ M) blokkerer Ca^{2+} -frisettingen. I tillegg vil forskjellige modulatorer, som Ca^{2+} , Mg^{2+} , temperatur og muskeltype, påvirke ryanodinets virkning. Publiserte data tyder på at ryanodin binder seg til en åpen kanal, men at bindingen av ryanodin påvirker Ca^{2+} -fluksen gjennom kanalen (Carroll *et al.* 1991). Optimalisering av bindingsbetingelsene for ryanodin kan derfor gi en indikasjon på hvilken tilstand Ca^{2+} -kanalen er i. I diskusjonen av de forskjellige parametrene betydning for ryanodinbindingen er først resultatene sammenlignet med lignende publiserte metoder, og videre er resultatene sammenlignet med observasjoner fra mer fysiologisk relaterte metoder som f eks kalsiumfrisetting og muskelforkortelse.

Metoden for binding av ryanodin som er utviklet her har god nøyaktigheten og presisjonen, under forutsetning av at SR-preparatet og bindingsbetingelsene er konstante. Isoleringsprosedyren var under kontinuerlig utvikling for å oppnå så rent SR-preparat som mulig. Dette har antagelig økt variasjonen i ryanodinbindingen fra SR-preparat til SR-preparat.

Den målte ryanodinbindingen ($\text{pmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein) var i området 50 μ g - 400 μ g protein uavhengig av hvor mye protein som ble applisert på filteret.

Inkubasjonstidens betydning

Resultatene viser at bindingen av ryanodin til reseptoren er en langsom prosess, og at hastigheten er sterkt avhengig av betingelsene under inkubasjonen. Ved optimale betingelser oppnås maksimal binding etter ca 60 min. Dette er i samme størrelsesorden som andre har funnet (60 - 120 min.) under sammenlignbare betingelser (Michalak *et al.*1988; Pessah *et al.*1985). Hastighetskonstantene for assosiering (k_1) og dissosiering (k_{-1}) som er beregnet til henholdsvis $0.0030 \text{ min}^{-1}\text{nM}^{-1}$ og 0.0224 min^{-1} , er også i samme størrelsesorden som det andre har beregnet (McGrew *et al.*1989).

Bindingen av ryanodin under ikke-optimale betingelser (f eks med magnesium i inkubasjonsbufferen) resulterte i lengre inkubasjonstid for å nå maksimal binding (120 min, $k_1 = 0.0013 \text{ min}^{-1}\text{nM}^{-1}$), og lavere maksimal binding. Dette stemmer godt overens med resultater som har vist at Mg²⁺ hemmer Ca²⁺-frisetting fra SR (Meissner *et al.*1986).

Ryanodinreseptorens evne til å binde ryanodin reduseres ved lange inkubasjonstider. Denne tendensen er i overensstemmelse med hva andre har funnet (Carroll *et al.*1991; McGrew *et al.*1989). Carroll *et al.* (1991) har vist at denne effekten avtar og at den maksimale bindingen øker ved lavere temperaturer. Dette kan indikere at det skjer en nedbrytning av reseptoren over tid. Resultater fra denne oppgaven viste imidlertid en stabil fase fra 35 min til 240 min, noe som indikerer en lavere proteinnedbrytning enn funnet av Carroll *et al.* (1991). Carroll *et al.* benyttet inkubasjonsbetingelser som ikke gir maksimal binding før etter 180 min.

Den lange inkuberingstiden som må til for å mette ryanodinreseptoren stemmer godt overens med fysiologiske data som viser en maksimal effekt på isolerte muskelpreparater etter 30 - 60 min (Jenden & Fairhurst, 1969).

Betydningen av varierende pH

Bindingen av ryanodin til SR-vesikler fra skjelettmuskulatur var pH-avhengig med et tilnærmet klokkeformet forløp (fig. 7.7.). Under forutsetning av at det ikke foregår denaturering av reseptoren i det gitte pH-intervallet, tyder kurvens forløp på at det skjer minst to forandringer i protoneringen, en under og en over pH 8. Senere forsøk på

rottemuskel har imidlertid vist en kraftig øking i uspesifikk binding ved pH over 8.5. Dette kan tyde på en denaturering av proteinet ved pH-verdier høyere enn 8.5.

Videre viser bindingen av ryanodin til ryanodinreseptoren en avflating ved pH 7.0 - 7.2. Dette kan være et resultat av forsøksbetingelsene, men siden hele kurven over pH 7 er forskjøvet, og en logaritmisk framstilling av dataene gir et knekkpunkt over pH 7.0, kan dette også være reelle verdier. Dette resultatet antyder at det skjer to deprotoneringer mellom pH 5 og pH 8, som fører til forandringer i affiniteten mellom ryanodin og reseptoren. pK_a for de to deprotoneringene som eventuelt skjer mellom pH 5 og pH 8 er beregnet til henholdsvis 6.4 og 7.5 ved sigmoid kurvetilpasning.

Både ryanodin og ryanodinreseptoren kan protoneres og deprotoneres. Ryanodin inneholder en aminogruppe og seks hydroksylgrupper (se fig. 3.4) som potensielt kan protoneres og deprotoneres. De fleste av disse gruppene (fem stk) er lokalisert på den ene siden av molekylet, og kan inngå i hydrogenbindinger mellom ryanodin og reseptoren. En protonering/deprotonering av en av disse gruppene kan forandre ryanodins affinitet for reseptoren. En pH-titreringskurve av ryanodin ga imidlertid ingen holdepunkter for at det skjer noen protoneringer/deprotoneringer av ryanodin (ikke vist).

Ryanodinreseptoren består av en tetramer med over 5000 aminosyrer per monomer. Dataene som er presentert her, kan umulig gi noen informasjon om hvilke aminosyre-residier som eventuelt protoneres eller deprotoneres. Aktuelle aminosyrer med en pK_a i nærheten av 6.5 og 7.5 er histidin-residiet som har pK_a lik 6.0 som fri aminosyre, og cystein, som har en pK_a på 8.3 som fri aminosyre. Lokale forhold på proteinet kan imidlertid forandre disse pK_a -verdiene drastisk. Videre kan en pH-forandring også forandre på forholdene i inkubasjonsløsningen, for eksempel konsentrasjonen av fritt kalsium, og dette kan forandre ryanodins affinitet for reseptoren.

De fysiologiske konsekvensene av resultatene som er funnet, er uklare, men det er vist at en øking i pH kan utløse Ca^{2+} -frisetting fra SR (Endo, 1977), eller kontraksjon hos "skinned fibers" (Shoshan *et al.* 1981). Duggan og Martonosi (1970) har videre vist Ca^{2+} -frisetting fra SR-vesikler ved pH-øking.

Betydningen av varierende $[\text{Ca}^{2+}]$

Ca^{2+} er en viktig modulator ved Ca^{2+} -frisettingen fra SR. Undersøkelsen viste at ved Ca^{2+} -konsentrasjoner i området nM - μM stimuleres bindingen av ryanodin til SR. Ved høye (mM) og lave (sub-nM) konsentrasjoner hemmer derimot Ca^{2+} bindingen av ryanodin til SR. Michalak *et al.* (1988) har rapportert om et tilsvarende bindingsmønster. Imidlertid rapporterer de om en hemming av bindingen allerede ved $5 \mu\text{M}$ Ca^{2+} , mens det her er vist binding helt ned til 1 nM Ca^{2+} . Michalak *et al.* har benyttet Ca^{2+} -EGTA-buffere i sine forsøk og konsentrasjonen i inkubasjonsløsningen er beregnet ut fra assosiasjonskonstanter for EGTA og Ca^{2+} . I denne oppgaven er det imidlertid vist at det oppstår et fall i den frie Ca^{2+} -konsentrasjonen ved tilsetning av SR-vesikler, et fall som får størst utslag ved lave Ca^{2+} -konsentrasjoner (fig 7.14.). Dette fører til at resultatene ikke direkte kan sammenlignes. Michalak *et al.* viser til beregnede Ca^{2+} -verdier, mens det i denne oppgaven er vist til målte verdier, og dette kan være årsaken til uoverensstemmelsen i resultatene.

Pessah *et al.* (1985) har også observert at bindingen av ryanodin som funksjon av Ca^{2+} viser en klokkeform, med hemming av bindingen under $50 \mu\text{M}$ Ca^{2+} . Også dette kan forklares med at Ca^{2+} -konsentrasjonen i løsningene er beregnet og ikke målt. I tillegg er det oppgitt en lav maksimal binding (under $1 \text{ pmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein), noe som tyder på at forsøken ikke er utført under optimale bindingsbetingelser.

Ved høye Ca^{2+} -konsentrasjoner hemmes bindingen av ryanodin til SR. I følge en sigmoid kurve tilpasset dataene hemmes bindingen 50 % (IC_{50}) ved 3.4 mM Ca^{2+} . Dette stemmer godt med data presentert av Michalak *et al.* (1988) og Pessah *et al.* (1985). Svingningene som er observert i ryanodinbindingen med økende Ca^{2+} -konsentrasjon, er større enn forventet ut fra nøyaktigheten til metoden. Det er uklart hva som er årsaken.

Data som er publisert for Ca^{2+} -frisetting fra SR, viser også en klokkeformet avhengighet av Ca^{2+} -konsentrasjonen (Meissner *et al.* 1986), med en maksimal frisettingshastighet rundt $10 \mu\text{M}$ Ca^{2+} , og med et fall ned til null ved henholdsvis 1 mM og 10 nM Ca^{2+} . Ved høye Ca^{2+} -konsentrasjoner ($> 50 \mu\text{M}$) samsvarer dette med egne resultater for ryanodinbinding, og bygger opp under hypotesen om en sammenheng mellom ryanodinbinding og Ca^{2+} -kanalens tilstand (åpen/lukket). Ifølge egne observasjoner var imidlertid bindingen av ryanodin konstant helt ned til 1 nM Ca^{2+} . Dette er forskjellig fra funn av Meissner *et al.* (1986), og dette kan igjen komme av at forsøkene refererer til

forskjellige Ca^{2+} -konsentrasjoner, siden også Meissner *et al.* har benyttet Ca^{2+} -EGTA-buffer med beregnede Ca^{2+} -konsentrasjoner.

Betydningen av varierende magnesiumkonsentrasjon

Magnesium er en modulator av Ca^{2+} -frisettingen fra SR (Meissner *et al.* 1986; Endo, 1985; Meissner *et al.* 1988). Ved konsentrasjoner over millimolarområdet hemmes frisettingen, men hemmingen kan til en viss grad oppheves ved å øke Ca^{2+} -konsentrasjonen. Dette tyder på at det her dreier seg om en kompetitiv hemming, men da hemmingen ikke oppheves fullstendig ved høye konsentrasjoner av magnesium, kan den være en funksjon av flere faktorer (Endo, 1985).

Det er i denne oppgaven vist at når magnesium var tilstede i inkubasjonsmediet, tok det lenger tid å oppnå maksimalbinding, og maksimalbindingen var lavere enn når det ble inkubert uten magnesium (fig. 7.6). Dette kan indikere at hemmingen er ikke-kompetitiv, dvs at magnesium binder til et eget sete på proteinet. Flere forsøk er nødvendig for å avgjøre dette. Sammenhengen mellom binding av ryanodin og magnesium (fig. 7.9) stemmer godt overens med andre publiserte arbeider (Michalak *et al.* 1988; Ogawa & Harafuji, 1990b). Den hemmende effekten av magnesium var doseavhengig og samsvarer godt med resultater som har vist avtagende hastighet av Ca^{2+} -frisetting fra SR med økende magnesiumkonsentrasjon (Meissner *et al.* 1986). På X-aksen i fig. 7.9 er det den totale, og ikke den frie magnesiumkonsentrasjonen som er brukt. Ut fra sigmoid kurvetilpasning av dataene (kap. 6.5.) er det beregnet 50 % hemming (IC_{50}) ved $\text{pMg} = 3.29$, d.v.s 0.51 mM magnesium.

Den frie intracellulære magnesiumkonsentrasjonen i muskel er 1 - 1.2 mM (Sejersted, 1992). Ut fra data presentert her vil denne konsentrasjonen hemme ryanodinbindingen med omtrent 60 - 70 %. Fysiologisk sett vil dette, under forutsetning av at ryanodin binder seg til åpen Ca^{2+} -kanal, gi store muligheter for regulering av Ca^{2+} -kanalen med små forandringer i magnesiumkonsentrasjonen.

Betydningen av varierende konsentrasjon av ATP, og andre nukleotider

Flere forskningsgrupper har vist at konsentrasjon av adenin-nukleotider i millimolarområdet stimulerer kalsiumfrisettingen fra SR (Meissner, 1986; Meissner *et al.* 1986; Rubtsov *et al.* 1988; Meissner *et al.* 1988). Få undersøkelser er imidlertid gjort med

hensyn på binding av ryanodin til SR som funksjon av ATP-konsentrasjon. Michalak *et al.* (1988) har undersøkt sammenhengen mellom ryanodinbinding og konsentrasjonen av den ikke-hydrolyserbare ATP-analogen 5'-adenylyl imidodifosfat (p[NH]ppA). Ved å øke konsentrasjonen av p[NH]ppA fra 0 til 0.2 mM økte ryanodinbindingen til SR-vesikler med 70 %. Denne økingen er betraktlig større enn det egne observasjoner viste med hensyn til bindingen av ryanodin til SR-vesikler som funksjon av ATP-konsentrasjon (30 % øking fra 0 til 3 mM ATP, fig. 7.10.). Årsaken til ulike resultater er uklar, men kan komme av forskjellige inkubasjonsbetingelser. Resultater fra forsøkene som er gjort med ADP og AMP (fig. 7.11.), og forsøk gjort med ATP-analogen p[NH]ppA (Michalak *et al.* 1988; Meissner *et al.* 1986), tyder på at den økte ryanodinbindingen ikke henger sammen med ATP-hydrolyse eller protein-fosforylering.

Andre nukleotider enn adenin-nukleotider ga hemming av ryanodinbindingen. Reduksjonen i ryanodinbindingen var større med enn uten nukleotider tilstede i inkubasjonsløsningen. Dette kan indikere at de undersøkte nukleotidene (UTP, CTP, GTP, ITP) forandrer konformasjonen på reseptoren og dermed hemmer ryanodinbindingen. Rubtsov *et al.* (1988) har vist at det bare er adenin-nukleotider som kan indusere kalsiumfrisetting fra SR. Under forutsetning av at ryanodin bare binder seg når kalsiumkanalen er i åpen konformasjon, stemmer resultatene fra denne oppgaven godt overens med disse dataene.

Betydningen av varierende KCl-konsentrasjon

Flere grupper (Ogawa & Harafuji, 1990a; Bull *et al.* 1989; Imagawa *et al.* 1989) har vist at ryanodins affinitet til reseptoren øker med ionestyrken eller osmolariteten. Dette stemmer ikke overens med resultatene i denne oppgaven. De viser full binding allerede ved 100 mM KCl, mens andre har funnet bindingsoptimum først ved 500 mM KCl (Bull *et al.* 1989) og 1 M NaCl (Ogawa & Harafuji, 1990a). Ved konsentrasjoner under 500 mM KCl viser egne data at mye membranbundet ryanodin går gjennom GF/C-filteret (porestørrelse 1.2 µm), men stoppes av GSWP-filteret (porestørrelse 0.22 µm). De andre gruppene som er referert, har brukt filtre med større porer, henholdsvis 0.45 µm (Ogawa & Harafuji, 1990a) og 1.6 µm (Bull *et al.* 1989). Resultatene fra denne oppgaven, hvor det er benyttet et system med to filtre, kan gi indikasjoner om at disse gruppene har brukt for grove filtre til å fange opp reseptorbundet ryanodin ved lave ionestyrker. GF/C-filteret fanget opp mest reseptorbundet ryanodin i området 500 - 1000 mM KCl, som stemmer godt med arbeidene nevnt over. Resultatene tyder på at det oppstår en

aggregering av proteiner ved høyere ionestyrke. Dette stemmer overens med teorien om at ladde partikler, f.eks. proteiner, omgir seg med et lag av motsatt ladde ioner (Gouy lag) som fører til at partiklene frastøtes. Når ionestyrken øker, vil dette laget komprimeres, og de elektrostatiske frastøtende kreftene vil ikke lenger være kraftige nok til å overvinne van der Waals tiltrekkende krefter, og det oppstår aggregering. For en KCl-konsentrasjon under 125 mM passerte mer enn 50 % av det reseptorbundete ryanodinet gjennom GF/C-filteret, men det ble stoppet av GSWP-filteret. Resultatene tyder på at ryanodin er bundet til mindre partikler ved lave ionestyrker, og at partiklene aggregerer ved høyere ionestyrker.

Betydningen av varierende ryanodinkonsentrasjon, Scatchard plot

Dataene viser at SR-vesikler isolert fra skjelettmuskel fra kanin antagelig har en klasse ryanodinbindingssteder med K_D på 7.46 nM og B_{maks} på 21.9 pmol·mg⁻¹ protein. Dette er i store trekk i overensstemmelse med de fleste publiserte resultater for ryanodinbinding til skjelettmuskulatur fra pattedyr (Pessah *et al.*1986; Inui *et al.*1987b; Lai *et al.*1988). Det er imidlertid rapportert to klasser med bindingssteder i hjertemuskulatur (Inui *et al.*1987a) og skjelettmuskulatur fra frosk (Bull *et al.*1989). Ved hjelp av kinetikkstudier har McGrew *et al.* (1989) funnet to typer ryanodinbindingssteder i skjelettmuskulatur, med K_D -verdier i henholdsvis nM- og μ M-området. De to forskjellige affinitetene kan gjenspeile de to responsene som er observert ved enkeltkanal studier: Åpning av kanalen ved ryanodinkonsentrasjoner i nM-området og lukking av kanalen i μ M-området. De mener også at lavaffinitetsbindingen påvirker høyaffinitetsbindingen.

Scatchard-plottet mellom bundet (X) og bundet/fritt ryanodin (Y) viste en lineær sammenheng opp til en konsentrasjon av fri ryanodin på 33 nM (fig. 7.13). For høyere ryanodinkonsentrasjon viste bindingen et fall i bundet ryanodin, men disse dataene gir ingen sammenheng i Scatchard-plottet. Fallet i ryanodinbindingen kan indikere at høye konsentrasjoner av ryanodin kan påvirke bindingen av ryanodin til reseptoren, noe som antagelig involverer et lavaffinitetssete for ryanodin. En mulig mekanisme er at bindingen til et lavaffinitetssete fører til lukking av Ca²⁺-kanalen, noe som igjen fører til lavere affinitet for ryanodin i høyaffinitetssetet. Denne mekanismen stemmer overens med fysiologiske data som har vist en åpen kanal ved lave ryanodinkonsentrasjoner og en lukket kanal ved høye konsentrasjoner (Bull *et al.*1989). Dette må imidlertid undersøkes videre, blant annet ved å foreta bindingsstudier ved høyere ryanodinkonsentrasjoner enn det som er gjort her. På grunn av problemer med uren umerket ryanodin, som også er

rapportert som problem av andre (Ogawa & Harafuji, 1990b), ble det ikke foretatt bindingsstudier ved høye (μM -området) ryanodinkonsentrasjoner.

I figur 7.14. er det vist at en ryanodinkonsentrasjon på 200 - 300 nM vil åpne Ca^{2+} -kanalen. Dette vil øke affiniteten av ryanodinreseptoren for ryanodin. Den samme figuren viser imidlertid at det ble sluppet ut så store mengder med kalsium at det vil kunne påvirke bindingen av ryanodin til reseptoren (se fig. 7.8.). Dette kan også være årsaken til at det er påvist en hemming av ryanodinbindingen ved høye ryanodinkonsentrasjoner, og for å få avklart dette må sammenhengen mellom kalsiuminnholdet i SR-vesiklene og ryanodinbinding undersøkes.

9. Konklusjoner

- 1) Det er utviklet et elektrodeoppsett med lav responstid og høy selektivitet for måling av kalsiumkonsentrasjoner i området 1 nM til 100 mM.
- 2) Det er optimalisert en metode for isolering av vesikler fra den terminale delen av SR fra skjelettmuskulatur fra kanin. Vesiklene inneholder funksjonelle ryanodinsensitive kalsiumkanaler.
- 3) De optimale betingelsene for binding av ryanodin til SR-vesikler fra skjelettmuskulatur fra kanin er bestemt.

De optimale betingelsene for binding av ryanodin til SR-vesikler er:

Inkubasjonstid	: > 35 min.
pH	: 7.9 - 8.0
[Ca ²⁺]	: nM > [Ca ²⁺] > mM
Magnesium	: < 10 μM
[ATP]	: 3 - 5 mM
[KCl]	: > 100 mM

Disse betingelsene gir en $K_D = 7.46$ nM og $B_{maks} = 21.9$ pmol·mg⁻¹ protein for bindingen av ryanodin til ryanodinreseptoren som er isolert.

- 4) Bindingen av ryanodin til SR-vesikler påvirkes av magnesium, ATP og pH innenfor fysiologisk område, slik at hvis dette reflekterer kanalens åpningskinetikk er dette en mulig regulering av kanalene *in vivo*.
- 5) Variasjoner i Ca²⁺-konsentrasjonen i det fysiologiske området ga ingen effekt på ryanodinbindingen.

10. Referanser

- ALLEN, D. G., LEE, J. A. & WESTERBLAD, H. (1989). Intracellular calcium and tension during fatigue in isolated single muscle fibres from *Xenopus laevis*. *Journal of Physiology (Cambridge)* **415**, 433-458.
- ARMSTRONG, C. M., BEZANILLA, F. M. & HOROWICZ, P. (1972). Twitches in the presence of ethylene glycol bis(β -aminoethyl ether)-N,N'-tetraacetic acid. *Biochimica et Biophysica Acta (Amsterdam)* **267**, 605-608.
- BIGLAND-RITCHIE, B. & WOODS, J. J. (1984). Changes in muscle contractile properties and neural control during human muscular fatigue. *Muscle and Nerve (New York)* **6**, 691-699.
- BLOCK, B. A., IMAGAWA, T., CAMPBELL, K. P. & FRANZINI-ARMSTRONG, C. (1988). Structural Evidence for Direct Interaction between the Molecular Components of the Transverse Tubule/Sarcoplasmic Reticulum Junction in Skeletal Muscle. *Journal of Cell Biology (New York)* **107**, 2587-2600.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Analytical Biochemistry (New York)* **72**, 248-254.
- BRITT, B. A. (1979). Etiology and pathophysiology of malignant hyperthermia. *Federation Proceedings (Bethesda MD)* **39**, 44-48.
- BULL, R., MARENGO, J. J., SUAREZ-ISLA, B. A., DONOSO, P., SUTKO, J. L. & HIDALGO, C. (1989). Activation of calcium channels in sarcoplasmic reticulum from frog muscle by nanomolar concentrations of ryanodine. *Biophysical Journal (New York)* **56**, 749-756.
- BYRD, S. K., BODE, A. K. & KLUG, G. A. (1989). Effects of Exercise of Varying Duration on Sarcoplasmic Reticulum Function. *Journal of Applied Physiology* **66**(3), 1383-1389.
- CARAFOLI, E. (1991). Calcium pump of the plasma membrane. *Physiological Reviews (Bethesda MD)* **71**, 129-153.
- CARROLL, S., SKARMETA, J. G., YU, X., COLLINS, K. D. & INESI, G. (1991). Interdependence of ryanodine binding, oligomeric receptor interactions, and Ca^{2+} release regulation in junctional sarcoplasmic reticulum. *Archives of Biochemistry and Biophysics (New York)* **290**(1), 239-247.
- CASWELL, A. H. & BRANDT, N. R. (1989). Does muscle activation occur by direct mechanical coupling of transverse tubules to sarcoplasmic reticulum. *Trends in Biochemical Sciences* **14**, 161-165.
- CHADWICK, C. C., INUI, M. & FLEISCHER, S. (1988). Identification and Purification of a Transverse Tubule Coupling Protein Which Binds to the Ryanodine Receptor of Terminal Cisternae at the Triad Junction in Skeletal Muscle. *Journal of Biological Chemistry (Baltimore)* **263**, 10872-10877.

- CHANDLER, W. K., RAKOWSKI, R. F. & SCHNEIDER, M. F. (1976). Effects of glycerol treatment and maintained depolarization on charge movement in skeletal muscle. *Journal of Physiology (Cambridge)* **254**, 285-316.
- CLAUSEN, T., VAN HARDEVELD, C. & EVERTS, M. E. (1991). Significance of cation transport in control of energy metabolism and thermogenesis. *Physiological Reviews (Bethesda MD)* **71**, 733-774.
- COOKE, R. & PATE, E. (1985). The effects of ADP and phosphate on the contraction of muscle fibers. *Biophysical Journal (New York)* **48**, 789-798.
- CROSBY, D. G. (1971). Ryania. In *Naturally occurring insecticides*, eds. JACOBSON, M. & CROSBY, D. G. , pp. 198-205. New York: Marcel Dekker Inc.
- CSERNOCH, L., PIZARRO, G., URIBE, I., RODRIGUEZ, M. & RIOS, E. (1991). Interfering with calcium release suppresses I_t, the "hump" component of intramembranous charge movement in skeletal muscle. *Journal of General Physiology* **97**, 845-884.
- DAVIES, N. W. (1990). Modulation of ATP-sensitive K⁺ channels in skeletal muscle by intracellular protons. *Nature (London)* **343**, 375-376.
- DE LEAN, A., MUNSON, P. J. & RODBARD, D. (1978). Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves. *American Journal of Physiology (Bethesda MD)* **4(2)**, E97-E102.
- DUAN, C., DELP, M. D., HAYES, D. A., DELP, P. D. & ARMSTRONG, R. B. (1990). Rat skeletal muscle mitochondrial [Ca²⁺] and injury from downhill walking. *Journal of Applied Physiology* **68**, 1241-1251.
- DUGGAN, P. F. & MARTONOSI, A. (1970). The permeability of sarcoplasmic reticulum membranes. *Journal of General Physiology* **56**, 147-167.
- EISENBERG, B. R. (1983). Quantitative ultrastructure of mammalian skeletal muscle. In *Handbook of physiology, Section 10: Skeletal muscle*, eds. PEACHEY, L. D., ADRIAN, R. H. & GEIGER, S. R. , pp. 73-112. Bethesda: American Physiological Society.
- ENDO, M. (1977). Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Physiological Reviews (Bethesda MD)* **57(1)**, 71-108.
- ENDO, M. (1985). Calcium release from sarcoplasmic reticulum. In *Regulation of calcium transport across muscle membranes*, eds. BRONNER, F. & SHAMOO, A. E. , pp. 181-230. London: Academic Press.
- ENDO, M., YAGI, S., ISHIZUKA, T., HORIUTI, K., KOGA, Y. & AMAHA, K. (1983). Changes in the Ca-induced Ca release mechanism in the sarcoplasmic reticulum of the muscle from a patient with malignant hyperthermia. *Biomedical Research* **4(1)**, 83-92.
- ERVASTI, J. M., STRAND, M. A., HANSON, T. P., MICKELSON, J. R. & LOUIS, C. F. (1991). Ryanodine receptor in different malignant hyperthermia-susceptible porcine muscles. *American Journal of Physiology (Bethesda MD)* **260**, C58-C66.
- EVERTS, M. E., ANDERSEN, J. P., CLAUSEN, T. & HANSEN, O. (1989). Quantitative determination of Ca²⁺-dependent Mg²⁺-ATPase from sarcoplasmic reticulum in muscle biopsies. *Biochemical Journal (London)* **260**, 443-448.

- FABIATO, A. & FABIATO, F. (1978). Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscles. *Journal of Physiology (Cambridge)* **276**, 233-255.
- FILL, M., CORONADO, R., MICKELSON, J. R., VILVEN, J., MA, J., JACOBSON, B. A. & LOUIS, C. F. (1990). Abnormal ryanodine receptor channels in malignant hyperthermia. *Biophysical Journal (New York)* **57**, 471-475.
- FILL, M., STEFANI, E. & NELSON, T. E. (1991). Abnormal human sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release channels in malignant hyperthermic skeletal muscle. *Biophysical Journal (New York)* **59**, 1085-1090.
- FITTS, R. H. (1992). Exercise effects on regulation of energy metabolism by substrate supply during brief, high-power exercise. In *Energy Metabolism in Exercise and Sport (Perspectives in Exercise Science and Sports Medicine, Vol. 5)*, eds. LAMB, D. R., GISOLFI, C. V. & SALTIN, B., pp. (In press). Carmel, IN: Brown & Benchmark.
- FLUKA. (1988). Selectophore, Ionophores for ion-selective elektrodes. Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland
- FORD, L. E. & PODOLSKY, R. J. (1970). Regenerative calcium release within muscle cells. *Science (Washington)* **167**, 58-59.
- FOSSET, M., JAIMOVICH, E., DELPONT, E. & LAZDUNSKI, M. (1983). [³H]Nitredipine receptors in skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry (Baltimore)* **258(10)**, 6086-6092.
- FRANZINI-ARMSTRONG, C. (1970). Studies of the triad. *Journal of Cell Biology (New York)* **47**, 488-499.
- GALLANT, E. M. & GOETTL, V. M. (1989). Porcine malignant hyperthermia: halothane effects on force generation in skeletal muscle. *Muscle and Nerve (New York)* **12**, 56-63.
- GODT, R. E. & NOSEK, T. M. (1989). Changes of intracellular milieu with fatigue or hypoxia depress contraction of skinned rabbit skeletal and cardiac muscle. *Journal of Physiology (Cambridge)* **412**, 155-180.
- GOLLNICK, P. D., KORGE, P., KARPAKKA, J. & SALTIN, B. (1991). Elongation of skeletal muscle relaxation during exercise is linked to reduced calcium uptake by the sarcoplasmic reticulum in man. *Acta Physiologica Scandinavica* **142**, 135-136.
- GRONERT, G. A. (1980). Malignant hyperthermia. *Anesthesiology (Philadelphia)* **53**, 395-423.
- HALLÉN, J. (1987). Endringer i venøs kaliumkonsentrasjon under arbeid, målt med intravasale elektroder. *Hovudfagsoppgåve*, Universitetet i Oslo.
- HARRISON, S. M. & BERS, D. M. (1989). Correction of proton and Ca association constants of EGTA for temperature and ionic strength. *American Journal of Physiology (Bethesda MD)* **256**, c1250-c1256.

HASSELBACH, W. & OETLIKER, H. (1983). Energetics and electrogenicity of the sarcoplasmic reticulum calcium pump. *Annual Review of Physiology (Palo Alto CA)* **45**, 325-339.

HESS, P. (1988). Elementary properties of cardiac calcium channels: a brief review. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology (Ottawa)* **66**, 1218-1223.

HIDALGO, C., CARRASCO, M. A., MAGENDZO, K. & JAIMOVICH, E. (1986). Phosphorylation of phosphatidylinositol by transverse tubule vesicles and its possible role in excitation-contraction coupling. *FEBS Letters (Amsterdam)* **202**, 69-73.

HIDALGO, C. & JAIMOVICH, E. (1989). Inositol trisphosphate and excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes (New York)* **21(2)**, 267-281.

IAIZZO, P. A., LEHMANN-HORN, F., TAYLOR, S. R. & GALLANT, E. M. (1989a). Malignant hyperthermia: effects of halothane on the surface membrane. *Muscle and Nerve (New York)* **12**, 178-183.

IAIZZO, P. A., SEEWALD, M., OAKES, S. G. & LEHMANN-HORN, F. (1989b). The use of Fura-2 to estimate myoplasmic [Ca²⁺] in human skeletal muscle. *Cell Calcium (Edinburgh)* **10**, 151-158.

IKEMOTO, N., RONJAT, M., MÉSZAROS, L. G. & KOSHITA, M. (1989). Postulated role of calsequestrin in the regulation of calcium release from sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry (Washington)* **28**, 6764-6771.

IMAGAWA, T., SMITH, J. S., CORONADO, R. & CAMPBELL, K. P. (1987). Purified Ryanodine Receptor from Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum Is the Ca²⁺-permeable Pore of The Calcium Release Channel. *Journal of Biological Chemistry (Baltimore)* **262**, 16636-16643.

IMAGAWA, T., TAKASAGO, T. & SHIGEKAWA, M. (1989). Cardiac ryanodine receptor is absent in type I slow skeletal muscle fibers: Immunochemical and ryanodine binding studies. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* **106**, 342-348.

INUI, M., SAITO, A. & FLEISCHER, S. (1987a). Isolation of the ryanodine receptor from cardiac sarcoplasmic reticulum and identity with the feet structures. *Journal of Biological Chemistry (Baltimore)* **262(32)**, 15637-15642.

INUI, M., SAITO, A. & FLEISCHER, S. (1987b). Purification of the ryanodine receptor and identity with feet structures of junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum from fast skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry (Baltimore)* **262**, 1740-1747.

JACKSON, M. J., JONES, D. A. & EDWARDS, R. H. T. (1984). Experimental skeletal muscle damage: the nature of the calcium-activated degenerative processes. *European Journal of Clinical Investigation (Oxford)* **14**, 369-374.

JENDEN, D. J. & FAIRHURST, A. S. (1969). The pharmacology of ryanodine. *Pharmacological Reviews (Baltimore)* **21 (1)**, 1-25.

KENTISH, J. (1986). The effects of inorganic phosphate and creatine phosphate on force production in skinned muscles from rat ventricle. *Journal of Physiology (Cambridge)* **370**, 585-604.

- LAI, F. A., ERICKSON, H. P., ROUSSEAU, E., LIU, Q-Y. & MEISSNER, G. (1988). Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature (London)* **331**, 315-319.
- LAI, F. A. & MEISSNER, G. (1989). The muscle ryanodine receptor and its intrinsic Ca^{2+} channel activity. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes (New York)* **21(2)**, 227-246.
- LAU, Y. H., CASWELL, A. H. & BRUNSCHWIG, J. -P. (1977). Isolation of transverse tubules by fractionation of triad junctions of skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry (Baltimore)* **252**, 5565-5574.
- LÄNNERGRÉN, J. & WESTERBLAD, H. (1989). Maximum tension and force-velocity properties of fatigued, single *Xenopus* muscle fibres studied by caffeine and high K^+ . *Journal of Physiology (Cambridge)* **409**, 473-490.
- LEATHERBARROW, R. J. (1990a). Using linear and non-linear regression to fit biochemical data. *Trends in Biochemical Sciences* **15**, 455-458.
- LEATHERBARROW, R. J. (1990b). Use of nonlinear regression to analyze enzyme kinetic data: Application to situations of substrate contamination and background subtraction. *Analytical Biochemistry (New York)* **184**, 274-278.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry (Baltimore)* **193**, 265-275.
- LUNDIN, A., RICKARDSSON, A. & THORE, A. (1976). Continuous monitoring of ATP converting reactions by purified firefly luciferase. *Analytical Biochemistry (New York)* **75**, 611-620.
- MACLENNAN, D. H., DUFF, C., ZORZATO, F., FUJII, J., PHILLIPS, M., KORNELUK, R. G., FRODIS, W., BRITT, B. A. & WORTON, R. G. (1990). Ryanodine receptor gene is a candidate for predisposition to malignant hyperthermia. *Nature (London)* **343**, 559-561.
- MARKS, P. W. & MAXFIELD, F.R. (1991). Preparation of solutions with free calcium concentration in the nanomolar range using 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid. *Analytical Biochemistry (New York)* **193**, 61-71.
- MARTONOSI, A. N. (1984). Mechanisms of Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Physiological Reviews (Bethesda MD)* **64**, 1240-1320.
- MAYR, G. W. (1984). Interaction of calmodulin with muscle phosphofructokinase. Interplay with metabolic effectors of the enzyme under physiological conditions. *European Journal of Biochemistry (Berlin)* **143**, 521-529.
- MCCARTHY, T. V., HEALY, J. M., HEFFRON, J. J. A., LEHANE, M., DEUFEL, T., LEHMANN-HORN, F., FARRALL, M. & JOHNSON, K. (1990). Localization of the malignant hyperthermia susceptibility locus to human chromosome 19q12-13.2. *Nature (London)* **343**, 562-564.

- MCCULLY, K. K. & FAULKNER, J. A. (1986). Characteristics of lengthening contractions associated with injury to skeletal muscle fibers. *Journal of Applied Physiology* **61**, 293-299.
- MCGREW, S. G., WOLLEBEN, C., SIEGL, P., INUI, M. & FLEISCHER, S. (1989). Positive cooperativity of ryanodine binding to the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from heart and skeletal muscle. *Biochemistry (Washington)* **28**, 1686-1691.
- MEISSNER, G. (1975). Isolation and characterisation of two types of sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (Amsterdam)* **389**, 51-68.
- MEISSNER, G. (1984). Adenine nucleotide stimulation of Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry (Baltimore)* **259**, 2365-2374.
- MEISSNER, G. (1986). Ryanodine activation and inhibition of the Ca⁺⁺ release channel of sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry (Baltimore)* **261**, 6300-6306.
- MEISSNER, G., DARLING, E. & EVELETH, J. (1986). Kinetics of rapid Ca²⁺ release by sarcoplasmic reticulum. Effects of Ca²⁺, Mg²⁺, and adenine nucleotides. *Biochemistry (Washington)* **25**, 236-243.
- MEISSNER, G., ROUSSEAU, E., LAI, F. A., LIU, Q. & ANDERSON, K. (1988). Biochemical characterization of the Ca²⁺ release channel of skeletal and cardiac sarcoplasmic reticulum. *Molecular and Cellular Biochemistry (The Hague)* **82**, 59-65.
- MICHALAK, M., DUPRAZ, P. & SHOSHAN-BARMATZ, V. (1988). Ryanodine binding to sarcoplasmic reticulum membrane; comparison between cardiac and skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta (Amsterdam)* **939**, 587-594.
- MIKOS, G. J. & SNOW, T. R. (1987). Failure of inositol 1,4,5-trisphosphate to elicit or potentiate Ca²⁺ release from isolated skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta (Amsterdam)* **927**, 256-260.
- NATORI, R. (1954). The property and contraction process of isolated myofibrils. *Jikeikai medical journal* **1**, 119-126.
- NELSON, T. E. & NELSON, K. E. (1990). Intra- and extraluminal sarcoplasmic reticulum membrane regulatory sites for Ca²⁺-induced Ca²⁺ release. *FEBS Letters (Amsterdam)* **263**, 292-294.
- NOSEK, T. M., WILLIAMS, M. F., ZEIGLER, S. T. & GODT, R. E. (1986). Inositol trisphosphate enhances calcium release in skinned cardiac and skeletal muscle. *American Journal of Physiology (Bethesda MD)* **250(19)**, C807-C811.
- OGAWA, Y. & HARAFUJI, H. (1990a). Osmolarity-dependent characteristics of [³H]ryanodine binding to sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* **107**, 894-898.
- OGAWA, Y. & HARAFUJI, H. (1990b). Effect of temperature on [³H]ryanodine binding to sarcoplasmic reticulum from bullfrog skeletal muscle. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* **107**, 887-893.

- OHNISHI, S. T., TAYLOR, S. & GRONERT, G. A. (1983). Calcium-induced Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum of pigs susceptible to malignant hyperthermia. *FEBS Letters (Amsterdam)* **161(1)**, 103-107.
- OTSU, K., WILLARD, H. F., KHANNA, V. K., ZORZATO, F., GREEN, N. M. & MACLENNAN, D. H. (1990). Molecular cloning of cDNA encoding the Ca^{2+} release channel (Ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry (Baltimore)* **265**, 13472-13483.
- PALADE, P. (1987). Drug-induced Ca^{2+} release from isolated sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry (Baltimore)* **262**, 6149-6154.
- PAPE, P. C., KONISHI, M., BAYLOR, S. M. & SOMLYO, A. P. (1988). Excitation-contraction coupling in skeletal muscle fibers injected with the InsP₃ blocker, heparin. *FEBS Letters (Amsterdam)* **235**, 57-62.
- PEACHEY, L. D. & FRANZINI-ARMSTRONG, C. (1983). Structure and function of membrane systems of skeletal muscle cells. In *Handbook of physiology: Section 10: Skeletal muscle*, eds. PEACHEY, L. D., ADRIAN, R. H. & GEIGER, S. R. , pp. 23-71. Bethesda, Maryland: American Physiological Society.
- PELZER, D., GRANT, A. O., CAVALIÉ, A., PELZER, S., SIEBER, M., HOFMANN, F. & TRAUTWEIN, W. (1989). Calcium channels reconstituted from the skeletal muscle dihydropyridine receptor protein complex and its α_1 peptide subunit in lipid bilayers. *Annals of the New York Academy of Sciences (New York)* **560**, 138-154.
- PENNER, R., NEHER, E., TAKESHIMA, H., NISHIMURA, S. & NUMA, S. (1989). Functional expression of the calcium release channel from skeletal muscle ryanodine receptor cDNA. *FEBS Letters (Amsterdam)* **259**, 217-221.
- PESSAH, I. N., FRANCINI, A. O., SCALES, D. J., WATERHOUSE, A. L. & CASIDA, J. E. (1986). Calcium-ryanodine receptor complex. *Journal of Biological Chemistry (Baltimore)* **261**, 8643-8648.
- PESSAH, I. N., WATERHOUSE, A. L. & CASIDA, J. E. (1985). The calcium-ryanodine receptor complex of skeletal and cardiac muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications (New York)* **128**, 449-456.
- REGA, A. F. & GARRAHAN, P. J. (1986). The cellular calcium. In *The Ca^{2+} pump of plasma membranes*, ed. REGA, A. F., pp. 1-11. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc..
- RÍOS, E. & PIZARRO, G. (1991). Voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Physiological Reviews (Bethesda MD)* **71**, 849-908.
- ROJAS, E., NASSAR-GENTINA, V., LUXORO, M., POLLARD, M. E. & CARRASCO, M. A. (1986). Inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum and contraction in crustacean muscle. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology (Ottawa)* **65**, 672-680.
- ROUSSEAU, E., SMITH, J. S. & MEISSNER, G. (1987). Ryanodine modifies conductance and gating behavior of single Ca^{2+} release channel. *American Journal of Physiology (Bethesda MD)* **253**, c364-c368.

of rabbit skeletal muscle - Evidence for 2 types of Ca^{2+} release channels. *Biophysical Journal (New York)* **61(5)**, 1184-1193.

VERBURG, E., LUNDE, P. K., SEJERSTED, O. M. & VØLLESTAD, N. K. (1991). Electrolyte content of human muscle during fatigue from repeated submaximal contractions. *Journal of Muscle Research and Cell Motility (London)* (Abstract)

VERGARA, J., TSIEN, R. Y. & DELAY, M. (1985). Inositol 1,4,5-trisphosphate: a possible chemical link in excitation-contraction coupling in muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (Washington)* **82**, 6352-6356.

VOLPE, P., SALVIATI, G., DI VIRGILIO, F. & POZZAN, T. (1985). Inositol 1,4,5-trisphosphate induces calcium release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Nature (London)* **316**, 347-349.

VØLLESTAD, N. K., VAAGE, O. & HERMANSEN, L. (1984). Muscle glycogen depletion patterns in type I and subgroups of type II fibres during prolonged severe exercise in man. *Acta Physiologica Scandinavica* **122**, 433-441.

VØLLESTAD, N. K. & SEJERSTED, O. M. (1988). Biochemical correlates of fatigue. A brief review. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology (Berlin)* **57**, 336-347.

WAGENKNECHT, T., GRASSUCCI, R., FRANK, J., SAITO, A., INUI, M. & FLEISCHER, S. (1989). Three-dimensional architecture of the calcium channel/foot structure of sarcoplasmic reticulum. *Nature (London)* **338**, 167-170.

WATERHOUSE, A. L., HOLDEN, I. & CASIDA, J. E. (1984). 9,21-didehydroryanodine: a new principal constituent of the botanical insecticide *Ryania*. *J.Chem.Soc.Chem.Commun.* 1265-1266.

WEILAND, G. A. & MOLINOFF, P. B. (1981). Quantitative analysis of drug-receptor interactions: I. Determination of kinetic and equilibrium properties. *Life Sciences (Oxford)* **29**, 313-330.

WESTERBLAD, H., LEE, J. A., LAMB, A. G., BOLSOVER, S. R. & ALLEN, D. G. (1990). Spatial gradients of intracellular calcium in skeletal muscle during fatigue. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology (Berlin)* **415**, 734-740.

WILLARD, H.H., MERRITT, L.L., DEAN, J.A. & SETTLE, F.A. (1988). Chromatography; General principles. In *Instrumental methods of analysis*, pp. 518-525. Belmont, California: Wadsworth publishing company.

ZORZATO, F., FUJII, J., OTSU, K., PHILLIPS, M., GREEN, N. M., LAI, F. A., MEISSNER, G. & MACLENNAN, D. H. (1990). Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of the Ca^{2+} release channel (Ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry (Baltimore)* **265**, 2244-2256.

ZORZATO, F., VOLPE, P., DAMIANI, E., QUAGLINO, D.,JR. & MARGRETH, F. (1989). Terminal cisternae of denervated rabbit skeletal muscle: alterations of functional properties of Ca^{2+} release channels. *American Journal of Physiology (Bethesda MD)* **257**, c504-c511.