



2000 6

·
,
,
,
·
가
·
,
·

차 례

국문요약	1
I. 서 론	2
II. 재료 및 방법	4
1. 재료	4
2. 방법	5
가. Whole homogenate 준비	5
나. 원발성 및 속발성 하사근 기능항진에서 ryanodine 수용체의 특성	5
다. 근소포체의 oxalate-supported Ca^{2+} 재흡수	5
라. Calsequestrin의 western blot	6
마. Sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 1 (SERCA1)의 western blot	6
3. 통계학적 분석	6
III. 결 과	7
1. Ryanodine 결합력 측정	7
2. Ca^{2+} 의 근소포체 내로 재흡수	8
3. Calsequestrin의 western blot	9
4. SERCA1의 western blot	11
IV. 고 찰	11
V. 결 론	14
참고문헌	14
영문요약	18

그림 차례

그림 1. 하사근 기능항진 유형에 따른 근육 내 ryanodine 수용체 결합력의 변화	8
그림 2. Oxalate-supported Ca^{2+} 재흡수율 변화	10
그림 3. 기능이 항진된 하사근에서 calsequestrin 발현	10
그림 4. 기능이 항진된 하사근에서 SERCA1 발현	10

표 차례

표 1. 하사근 기능항진 환자들의 임상적 특징에 따른 유형 분류	4
표 2. 하사근 근소포체에서 ryanodine과 결합한 수용체의 방사능치	7
표 3. 하사근 근소포체의 ryanodine 수용체의 농도	7
표 4. 하사근 근소포체의 Ca^{2+} 흡수량	8
표 5. 하사근 근소포체의 Ca^{2+} 흡수율	9

국문요약

하사근 기능항진 환자에서 하사근 근소포체를 통한 Ca^{2+} 의 이동

하사근 기능항진은 안구가 내전할 때 과도한 상전이 일어나는 질환으로 원발성 하사근 기능항진과 속발성 하사근 기능항진으로 구분한다. 원발성 하사근 기능항진은 그 원인이 밝혀져 있지 않으며 속발성 하사근 기능항진은 동측의 상사근이나 반대편 상직근 마비로 인해 생긴다. 원발성 하사근 기능항진의 원인을 연구하기 위하여 해부학적, 조직학적 실험 결과와 신경 분포 및 생화학적 특징에 관한 연구 결과들이 발표되고 있지만 현재까지 그 기전을 설명할 수 있는 보고는 없는 실정이다. 이에 본 연구에서는 근육의 수축을 결정하는 가장 큰 인자인 Ca^{2+} 조절 기전의 변화가 하사근 기능항진의 유발 원인이 되는지를 관찰하기 위해 하사근 세포의 Ca^{2+} 이동을 근소포체를 중심으로 관찰하여 원발성 하사근 기능항진과 속발성 하사근 기능항진을 비교하고 또한 이들을 정상 대조군과 비교하였다.

본 연구에서는 원발성 및 속발성 하사근 기능항진 환자에서 치료 목적으로 하사근 절제술을 시행하여 얻은 근육을 실험군으로 하였고 안구 위축으로 안구 제거술을 받은 환자의 하사근을 절제하여 정상 대조군으로 하여 다음과 같은 실험을 하였다. 첫째, 근소포체의 Ca^{2+} 방출 통로인 ryanodine 수용체의 결합력을 측정하여 근세포 내 Ca^{2+} 농도의 증가 여부를 관찰하였고, 둘째, 근소포체 내로 Ca^{2+} 재흡수가 일어나는 속도를 측정하여 근세포 내 수축에 관여했던 Ca^{2+} 이 근소포체로 재흡수가 잘 이루어지는지 살펴보았으며, 셋째, ryanodine 수용체와 연관된 조절 단백질의 하나이며 근소포체 내 Ca^{2+} 저장과 관련된 calsequestrin을 western blot하여 정량하였으며, 넷째, Ca^{2+} 재흡수에 중심적 역할을 하며 안구 근육에 주로 존재하는 속근의 근소포체 Ca^{2+} -ATPase를 western blot으로 정량분석 하였다. 그 결과 ryanodine 수용체의 결합력은 원발성 하사근 기능항진에서 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 감소하였으며 속발성 하사근 기능항진의 경우 대조군과 의미 있는 차이가 없었다. 세포내 Ca^{2+} 이 근소포체로 재흡수 되는 속도는 원발성 하사근 기능항진에서 가장 느리게 관찰되었고 다음이 속발성 하사근 기능항진, 대조군의 순으로 세 군의 속도는 통계학적으로 각각 유의한 차이를 보였다. Calsequestrin과 근소포체 Ca^{2+} -ATPase의 western blot 분석은 세 군간에 유의한 차이를 보이지 않았다.

이상의 결과로 근소포체를 통한 Ca^{2+} 의 이동이 하사근 기능항진에서 정상과 다르게 일어남을 알 수 있었고, 원발성 하사근 기능항진에서 근소포체로 Ca^{2+} 의 재흡수가 느리게 나타남으로 인한 고농도의 근세포 내 Ca^{2+} 이 과도한 수축에 영향을 줄 것으로 생각된다.

핵심되는말: 하사근 기능항진, 근소포체, ryanodine 수용체, Ca^{2+} 흡수 속도, calsequestrin, Ca^{2+} -ATPase

하사근 기능항진 환자에서 하사근 근소포체를 통한 Ca^{2+} 의 이동

<지도 이 종 복 교수>

연세대학교 대학원 의학과

김 희 선

I. 서 론

하사근 기능항진은 안구 운동질환으로 비교적 흔하게 관찰되는 질환이다.¹ 이는 안구가 내전할 때 상전되는 현상이며 특히 하사근의 작용 방향으로 안구가 움직일 때 반대편 안구에 비해 더 많은 상전이 나타나는 질환이다. 하사근 기능항진은 임상적으로 원발성 하사근 기능항진과 속발성 하사근 기능항진으로 분류한다. 원발성 하사근 기능항진은 그 원인이 밝혀져 있지 않으며, 임상적 특징으로는 주로 양안에 나타나는데 우측을 볼 때 좌안이, 좌측을 볼 때 우안이 상전 된다. 내사시 혹은 외사시와 동반되어 나타나며² 제1안위에서는 상사시가 조금 있거나 혹은 거의 나타나지 않는다. 반면 속발성 하사근 기능항진은 주로 한쪽 눈에 나타나며, 동측 제4뇌신경 마비로 인한 상사근 마비나 반대쪽 눈의 상직근 마비로 인해 생긴다. 역시 안구가 내전할 때 상전이 나타나지만 제1안위에서 수직사시의 편위가 크고 회전사시도 동반되는 것이 원발성 하사근 기능항진과 다르다. 또한 마비사시인 속발성 하사근 기능항진은 Bielschowsky 두경사 검사법에서 양성으로 나타난다.^{3,5}

이와 같은 임상적 차이로 두 유형의 구분이 가능하게 되는데 속발성 하사근 기능항진의 원인이 상사근의 마비로 인한 것으로 알려졌으나 원발성 하사근 기능항진의 원인은 아직 밝혀지지 않았으며 하사근의 근막 구조가 선천성으로 이상이 있거나(Bielschowsky),⁶ 내직근이 비스듬하게 안구에 종지함으로 인해 내직근의 작용 방향인 내전 시 안구가 상전 된다고 보고된 바 있다(Cord).⁷ 또한 하사근 기능항진에서 뇌신경으로부터의 신경 자극이 동측 내직근과 하사근에 동시에 전달되어 생긴다는 보고도 있다(Guibor).⁸ 한편 원발성 하사근 기능항진이 동반된 외사시 환자들과 외사시만 있는 환자들을 대상으로 하사근 종지부의 위치를 각막연과의 거리 관계를 통하여 관찰하기도 하였으나 두 군간에 의미 있는 차이는 없었다(김과 이).⁹ 하사근의 전자현미경적 미세 구조가 원발성 및 속발성 하사근 기능항진에서 차이가 없었으며, 이로써 원발성 하사근 기능항진은 양쪽 상사근의 불완전 마비

에 의할 것이라고 보고하였다(Spencer 및 McNeer, Meyer).^{10,11} 최근에는 상사근 활차의 해부학적 변이를 자기공명 영상을 이용하여 고찰한 결과 활차의 위치 변이가 하사근의 기능항진과 함께 상사근의 기능저하를 가져올 수 있다는 보고가 있었다.¹² 또한 생화학적 분석으로 어린이들과 어른들의 하사근 기능항진 환자의 하사근에서 lactate dehydrogenase의 동종효소(isoform)의 분포를 관찰한 결과 하사근 기능항진이 있었던 어린이들의 동종효소 분포가 대조군의 분포와 다르게 관찰되었고 H subunit이 M subunit보다 더 많이 관찰되는 소견으로 보고하였으나¹³ 역시 정상과의 비교만 이루어졌을 뿐 원발성 하사근 기능항진과 속발성 하사근 기능항진간의 비교는 이루어지지 않았다. 즉 원발성 하사근 기능항진의 원인에 대한 만족할 만한 설명은 아직 보고되지 않은 상태이다.

한편 근육의 수축에는 Ca^{2+} 이 유발 인자로 작용한다. 신경의 흥분 자극이 근육으로 전달되면 근세포막의 dihydropyridine 수용체 즉 voltage operated calcium channel (VOCC)이 이를 감지하게 되고 이것의 구조적 변화를 가져오게 된다. 이러한 구조적 변화는 근세포체의 막에 존재하는 Ca^{2+} 통로인 ryanodine 수용체가 인지하게 되어 Ca^{2+} 이 근세포 내로 방출되게 된다.¹⁴⁻¹⁹ 세포 외액으로부터 근세포 내로 들어오는 Ca^{2+} 의 양은 골격근의 경우 큰 비중을 차지하지 않으며 상대적으로 다량의 Ca^{2+} 이 근세포체로부터 방출되면서 근육의 수축에 관한 일련의 과정이 시작된다. 즉, Ca^{2+} 저장소인 근세포체로부터의 Ca^{2+} 방출이 근육세포 내 Ca^{2+} 농도의 결정에 중요한 역할을 한다. 이후 Ca^{2+} 은 근육 수축에 관여하는 단백질에 결합하여 근육 수축을 유발하고 이후 근세포체의 Ca^{2+} -ATPase를 통해 근세포체 내로 재흡수 된다.

근육 내 Ca^{2+} 의 농도에 주된 역할을 하는 근세포체에는 여러 가지 조절 단백질들이 존재하는데 ryanodine 수용체와^{20,21} Ca^{2+} 재흡수에 펌프 역할을 하는 Ca^{2+} -ATPase,²² Ca^{2+} 과 결합하는 calsequestrin²³ 등이 중요한 역할을 하며 그밖에 triadin,²⁴ calmodulin,²⁵ junctin²⁶ 등의 단백질들도 근세포체와 관계되어 Ca^{2+} 이동에 관계하고 나아가서 근육의 수축과 관계된다. Ca^{2+} 을 방출하는 주된 통로인 ryanodine 수용체(RyR)는 ryanodine이라는 식물성 alkaloid에 대해 친화성을 갖는 수용체로서 근세포체의 terminal cisternae와 t-tubule이 만나는 곳에 위치하고 있다.^{27,28} RyR에 관한 연구는 수용체 결합력과 친화력을 봄으로써 수용체를 통한 Ca^{2+} 통로로서의 기능을 가늠할 수 있는 방법이 있다. RyR의 기능을 통한 질병에 관한 연구로는 주로 심장의 허혈, 재관류, 심비후, 심부전 등에서 이루어져 있으며,²⁹⁻³³ 골격근에 관한 연구로는 악성고열,³⁴⁻³⁶ 중증근무력증,³⁷ 근이영양증^{37,38} 등에서 있으나 안구 근육에 관한 연구는 아직 보고된 바 없다. 또한 근육의 이완은 근세포체의 Ca^{2+} 재흡수가 일어나면서 가능하게 되는데 이의 기능에는 Ca^{2+} -ATPase 즉 Ca^{2+} pump가 중요한 역할을 한다. Ca^{2+} -ATPase에 의한 근세포체 내로의 Ca^{2+} 재흡수는 근세포 내 Ca^{2+} 농도를 감소시키며 이로 인해 근육의 이완이 일어난다.

이와 같이 근세포체의 Ca^{2+} 재흡수는 근세포체로부터의 Ca^{2+} 방출과 함께 근세포 내

Ca^{2+}
 가 , 가 가
 . calsequestrin
 (lumen) Ca^{2+} Ca^{2+}
 Ca^{2+} 가 .
 Ca^{2+} Ca^{2+} , , .

II.

1.

1999 4 1999 12

가 3 (4)

가 9 (10)

가 4 (4)

1+ ~

4+

3+

가

3 71

가 10 가 6

16

12

(homogenation)

(1).

(-4°C)

1.

	()	(/)	()
1	22	0	-
2	21	0	-
3	6	0	-
4	4	3+ / 3+	21
5	4	3+ / 4+	36
6	3.5	3+ / 3+	14
7	6	0 / 3+	15
8	2.5	3+ / 0	22

9	4	3+ / 0	24
10	5	0 / 4+	62
11	3.5	3+ / 0	33
12	3	0 / 3+	13

2.

가. Whole homogenate

0.9%

Homogenate buffer (20 mM MOPS, 1 M KCl, 1 μ M leupeptin, 1 μ M pepstatin, 1 μ M aprotinin, 0.1 mM PMSE, 10 μ M/ml trypsin inhibitor, 0.3 mM sucrose) 50mg tissue/ml

30 3 polytron PT probe (Brinkmann Instruments Co, Westburg, NY, U.S.A.) eppendorff tube
-70°C Bradford ³⁹

ryanodine

Ryanodine [1 M KCl, 20 mM MOPS (pH7.4), 20 nM [³H]ryanodine (54.7 Ci/mmol, New England Nuclear Co, MA, U.S.A.), 1 mM EGTA]

whole homogenate 2.5 mg 37°C 2 (; total binding value). ryanodine radioactivity

(non-specific binding) 100 non-

labeled ryanodine 가 whole homogenate

ryanodine

(; non-specific binding value).

100 μ l PEG solution [30% PEG, 1mM EDTA Tris (pH 7.4)] 가 5 15 14000 rpm eppendorff

가 0.4 ml ryanodine binding

100 μ l Soluen 350 가

70°C 15 scintillation vial 4ml picofluor 가

radioactivity

oxalate-supported Ca^{2+}
 Ca^{2+} loading whole homogenate 300 μg
[100 mM KCl, 20 mM MOPS (pH6.8), 10 mM NaN₃] 37°C 4
MgATP 5 mM, potassium oxalate 10 mM, $^{45}\text{CaCl}_2$ 0.2 mM (104 cpm/nmol;
Amersham, Arlington height, IL, U.S.A.) 가 2, 4, 7 Minipore filter
(0.45 μm pore size) scintillation vial 4ml picofluor
가 15 radioactivity

Calsequestrin western blot
Bio-Rad assay Bradford 50 μg
sample buffer 95°C 5 . 8% polyacrylamide gel
nitrocellulose
. 5% bovine serum albumin 0.1% Tween 20 phosphate buffered saline
(PBS) blocking solution 가 1
calsequestrin 1 (mouse monoclonal anti-human antibody;
) 3 . 0.1% Tween20 PBS
3 (Alkaline phosphatase conjugated goat anti
mouse IgG; Santa Cruz, CA, U.S.A.) 1 30
Signal enhanced chemiluminescence (Amersham Life Science, Little Chalfont,
England, U.K.) 가

Sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 1 (SERCA1) western blot
Bio-Rad assay Bradford 50 μg
sample buffer 95°C 5 . 5% polyacrylamide gel
nitrocellulose
. 5% bovine serum albumin 0.1% Tween 20 phosphate buffered saline
(PBS) blocking solution 가 1
SERCA1 1 (mouse monoclonal anti human antibody; Transduction
Laboratories, Lexington, KY, U.S.A.) 3 . 0.1% Tween20

PBS 3 (Alkaline phosphatase
 conjugated goat anti mouse IgG; Santa Cruz, CA, U.S.A.) 1 30
 . Signal enhanced chemiluminescence (Amersham Life science,
 Little, Chalfont, England, U.K.) 가 .

3.

± , Kruscal-
 Wallis test , Wilcoxon rank sum test P
 0.05 .

III.

1. Ryanodine

whole homogenate ryanodine
 $[^3\text{H}]$ ryanodine (166nM) whole homogenate ryanodine
 receptor radioactivity
 (total binding value) ryanodine
 ryanodine 25 μM
 radioactivity (non-specific binding value) $[^3\text{H}]$ ryanodine
 ryanodine (specific binding value) (2).
 radioactivity cpm (standard curve)
 ($y=ax+b$; y cpm , x ryanodine) ryanodine (;fmole) mg $[^3\text{H}]$ ryanodine
 group (3).
 ryanodine 가 가
 ryanodine ryanodine
 ryanodine 가

2. ryanodine (radioactivity) *

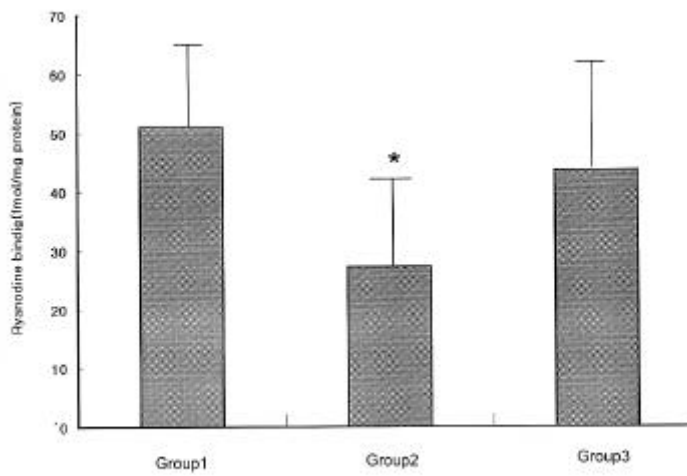
	Total binding	Nonspecific binding	Specific binding
3	1693±223	814±71	879±161
6	1428±284	838±107	590±188 §
6	1616±157	956±195	660±224

* cpm ± 가 (p<0.05).
 §

3. ryanodine

		[³ H] Ryanodine binding*
	3	51.11 ± 13.34
	6	27.29 ± 15.58 [†]
	6	43.65 ± 18.48

* fmole/mg protein ± (p<0.05).
[†] 가



1. ryanodine . Group1, 2, 3

(p<0.05).

(p>0.05).

2. Ca²⁺

Ca²⁺

whole homogenate

MgATP

⁴⁵CaCl₂

2

, 4 , 7

⁴⁵Ca²⁺

cpm

standard curve

⁴⁵Ca²⁺

$^{45}\text{Ca}^{2+}$ (4), (5). 2, 4, 7 가 가
 가 가
 Kruscal-Wallis 가
 ($p < 0.05$). 가 Ca^{2+} 가 ,
 가 Ca^{2+} 가 Ca^{2+}
 가

4. Ca^{2+}

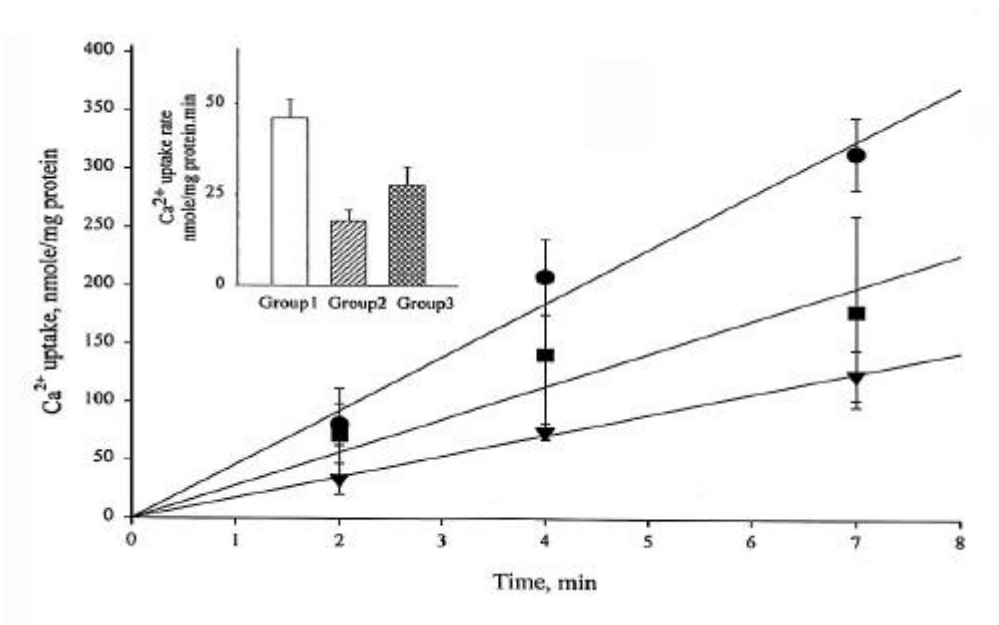
	Oxalate-supported $^{45}\text{Ca}^{2+}$ *		
	2	4	7
3	80.8±17.8	208.0±32.5	313.7±30.9
6	33.8±13.2	74.4±7.4	123.5±21.5
6	68.9±24.4	136.9±37.0	175±21.7 [§]

* nmol/mg protein ±
 § 가 ($p < 0.05$) .

5. Ca^{2+}

	$^{45}\text{Ca}^{2+}$ *
3	46.23 ± 5.07
6	17.83 ± 2.87 [†]
6	27.72 ± 4.85 [§]

* nmole/mg protein/min ±
 † § 가 ,
 가 ($p < 0.05$).



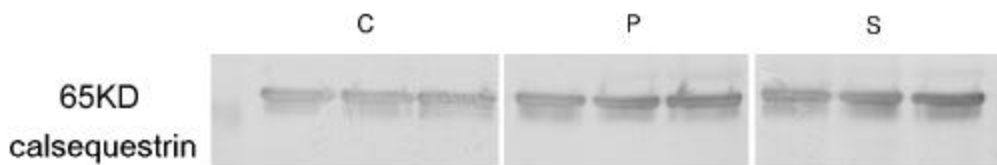
2. Oxalate-supported Ca²⁺

Group 1, 2, 3

, τ , v , λ , Ca²⁺ (p<0.05), >

3. Calsequestrin western blot.

Ca²⁺ calsequestrin
Ca²⁺ 가
Calsequestrin 65KD 가 western blot
(3).



3. calsequestrin . C, P, S ,

calsequestrin

4. SERCA1 western blot

Ca²⁺ 가 Ca²⁺ pump (sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase; SERCA)

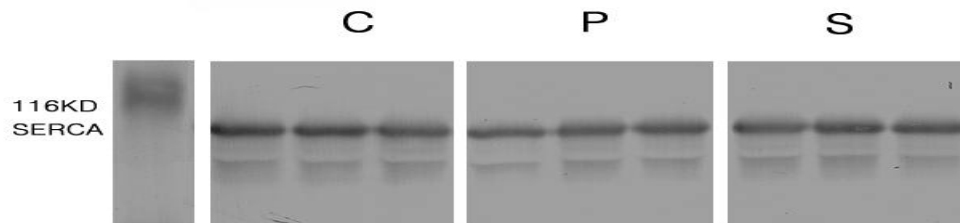
SERCA1

western blot

120KD

가

(4).



4.

SERCA1

. C, P, S

SERCA

가

IV.

가 .

Ca²⁺ 가 .

Ca²⁺ (sequestration)

Ca²⁺ pump Ca²⁺-ATPase 가

Ca²⁺ 가

ryanodine 가 14-20, 40

Ryanodine alkaloid ryanodine

3 isoform RyR1

560KD 가

1~2nm 가 가

4° channel Ca²⁺

27-28, 41 Ryanodine - 가

가 direct coupling model dihydropyridine

receptor (DHPR)가 ryanodine

Ca²⁺

DHPR Ca²⁺

ryanodine ryanodine

channel 가 Ca²⁺

Ca²⁺ (Ca²⁺ induced Ca²⁺ release; CICR) 37,42

Ryanodine 가

ryanodine [3H]

ryanodine [3H]ryanodine

Ca²⁺ 가

가 B_{max} K_D
 가 B_{max} K_D 가 ryanodine
 ryanodine
 (40mm,
 10mm) 8~10mm
 가 20g 가 B_{max}
 K_D 가 $[^3H]$ ryanodine 가 가
 ryanodine 가
 Ca^{2+} 가 Ca^{2+} ryanodine
 Ca^{2+} 가 Ca^{2+} ryanodine
 Ca^{2+} -ATPase Ca^{2+}
 가 Ca^{2+} ryanodine
 Ca^{2+} -ATPase 가 Ca^{2+} 가 가
 ryanodine 가 , mRNA
 down regulation
 .⁴³⁻⁴⁴
 Oxalate Ca^{2+} Ca^{2+}
 ryanodine 가
 ryanodine 가 ryanodine Ca^{2+}
 Ca^{2+} ryanodine Ca^{2+}
 ryanodine
 ryanodine Ca^{2+}
 가
 가
 Ca^{2+} 가 가 Ca^{2+}

(sequestration) Ca^{2+}

Ca^{2+} 가 Ca^{2+} pump 가 Ca^{2+}

pump Ca^{2+} pump ATP Brody 가

Ca^{2+} pump Ca^{2+} pump 가 Ca^{2+} 가

가 Ca^{2+} pump (slow muscle) (sarco-

endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, slow isoform SERCA2)가

(fast muscle) Ca^{2+} -ATPase fast twitch isoform SERCA1

western blot Ca^{2+} 가 Ca^{2+} pump SERCA1

SERCA phospholamban

ATP phosphorylation 가

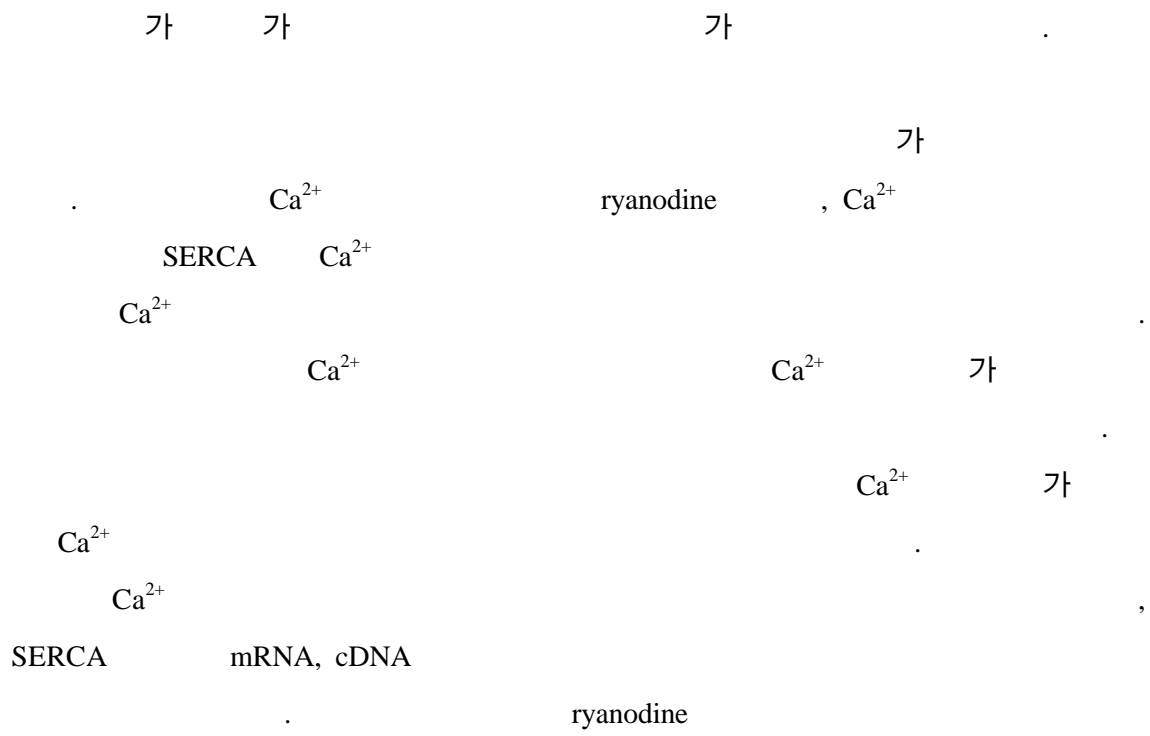
Calsequestrin Ca^{2+} (junctional

Ca^{2+} 가 sarcoplasmic reticulum) ryanodine

triadin ryanodine

49,50 junctin Ca^{2+} -ATPase 가 calsequestrin

western blot Ca^{2+} calsequestrin Ca^{2+}



V.

- Ca²⁺ Ca²⁺ Ca²⁺
1. Ca²⁺ 가 ,
2. Ca²⁺ , ,
 가 , >
 >
 가 .
3. Ca²⁺ calsequestrin 가 .
4. Ca²⁺ SERCA1
- Ca²⁺
- Ca²⁺ 가
- Ca²⁺ ryanodine 가 (down regulation) Ca²⁺ 가

1. Parks MM. The overacting inferior oblique muscle. *Am J Ophthalmol* 1974; 77:787-97.
2. Wilson ME, Parks MM. Primary inferior oblique overaction in congenital esotropia, accommodative esotropia, and intermittent exotropia. *Ophthalmology* 1989; 96:950-7.
3. Parks MM. Isolated cyclovertical muscle palsy. *Arch Ophthalmol* 1985; 60:1027-30.
4. Khawam E, Scott AB, Jampolsky A. Acquired superior oblique palsy. *Arch Ophthalmol* 1967; 77:761-7.
5. Parks MM, Mitchell PR. Oblique muscle dysfunction. In: Duane TD, editor. *Clinical Ophthalmology*. 11th ed. Philadelphia: Harper and Row Publisher; 1987. p.1-8.
6. Bielschowsky A. Ber angeborene und erworbene Blickfelderweiterungen. *Ber Dtsch Ophthalmol* 1 37: 192, 1911 cited from von Noorden: *Binocular vision and ocular motility*, 4th ed. St. Louis: CV Mosby publisher; 1990.
7. Cords R. Strabismus surso-adductorius. *Ber.Dtsch Ophthalmol Ges* 43: 158, 1922 cited from von Noorden: *Binocular vision and ocular motility*, 4th ed. St. Louis: CV Mosby; 1990. P. 346-54.
8. Guiber GP. Synkinetic overaction of the inferior oblique muscle. *Am J Ophthalmol* 1949; 32 : 100-6.
9. ,
1992; 33: 649-52.
10. Spencer RF, McNeer KW. Structural alterations in overacting inferior oblique muscles. *Arch Ophthalmol* 1980; 98: 128-33.
11. Meyer E, Ludatscher RM, Zonis S. Primary and secondary overacting inferior oblique muscles, an ultrastructural study. *Br J Ophthalmol* 1984; 68: 416-20.
12. Clark RA, Miller JM, Rosenbaum AL, Demer JL. Heterotropic muscle pulleus or oblique muscle dysfunction? *J AAPOS* 1998; 2:17-25.
13. Aihara T, Miyata M, Ishikawa S. The lactate dehydrogenase isoenzyme pattern in the overacting inferior oblique muscle. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 1978; 15:43-7.
14. Bock BA, Imagawa T, Campbell KP, Franzini-Amstrong C. Structural evidence for a direct interaction between molecular component of transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *J Cell Biol* 1988; 107: 2587-600.
15. Dulhunty AF, Gage PW. Effect of extracellular calcium concentration and dihydropyridines on contraction in mammalian skeletal muscle. *J Physiol* 1988; 399:63-80.

16. Brandt NR, Caswell AH, Wen R, Talvenheimo JA. Molecular interaction of the junctional foot protein and dihydropyridine receptor in skeletal muscle triads. *J Membr Biol* 1990; 113:237-51.
17. Anderson K, Meissner G. T-tubule depolarization induced SR Ca²⁺ release is controlled by dihydropyridine receptor and Ca²⁺ dependant mechanisms in cell homogenates from rabbit skeletal muscle. *J Gen Physiol* 1995; 104: 363-83.
18. Catterall WA. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 493-531.
19. Dulhunty AF, Junankar PR, Kahern GP, Laver CR. Ion channels in the sarcoplasmic reticulum of striated muscle. *Acta Physiol Scand* 1996; 156: 375-85.
20. Meissner G. Ryanodine activation and inhibition of the Ca²⁺ release channel of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1986; 261: 6300-6.
21. Pessah IN, Waterhouse A, Casida JE. The calcium ryanodine complex of skeletal and cardiac muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 1985, 128: 449-56.
22. Mintz E, Guillian F. Ca²⁺ transport by the sarcoplasmic reticulum ATPase. *Biochem Biophys* 1997; 1318: 52-70.
23. Damiani E, Margreth A. Specific protein-protein interaction of calsequestrin with junctional sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 172: 1253-9.
24. Knudson CM, Stang CK, Moomaw CR, Slaughter C, Campbell KP. Primary structure and topological analysis of a skeletal muscle specific junctional sarcoplasmic reticulum glycoprotein(triadin). *J Biol Chem* 1993; 268: 12646-54.
25. Cheung WY. Calmodulin. *Sci Am* 1982, 246: 62-70.
26. Jones LR, Zhang L, Sanborn K, Jorgensen O, Kelley J. Purification, primary structure, and immunological characterization of the 26-kDa calsequestrin binding protein (junctin) from cardiac junctional sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1995; 270: 30787-96.
27. Jenden DJ, Fairhurst AS. The pharmacology of ryanodine. *Pharmacol rev* 1969;21:1-25.
28. Coronado R, Morrissette J, Sukhareva M, Vaughn DV. Structure and function of ryanodine receptors. *Am J Physiol* 1994; 266: C1485 –504.
29. Fabiato A. Calcium -induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* 1983; 245: C1-C14.
30. Gwathmey JK, Copelas L, MacKinnon R, Schoen FJ, Feldmann MD, Grossman W, et al. Abnormal intracellular calcium handling in myocardium from patients with end-stage heart failure. *Circ Res* 1987; 61: 70-6.
31. Brillantes AM, Allen P, Takahashi T, Izumo S, Marks AR. Differences in cardiac calcium

- release channel(ryanodine receptor) expression in myocardium from patients with end-stage heart failure caused by ischemic versus dilated cardiomyopathy. *Circ Res* 1992; 71: 18-26.
32. Go LO, Moschella MC, Watras J, Handa KK, Fyfe BS, Mraks AR. Differential regulation of two types of intracellular calcium release channels during end-stage heart failure. *J Clin Invest* 1995; 95: 888-94.
 33. Schillinger W, Meyer M, Kuwajima G, Mikoshiba K, Just H, Hasenfuss G. Unaltered ryanodine receptor protein levels in ischemic cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem* 1996; 160-161: 297-302.
 34. Ball SP, Dorkins HR, Ellis FR, Hall JL, Halshall PJ, Hopkins PM, et al. Genetic linkage analysis of chromosome 19 markers in malignant hyperthermia. *Br J Anesth* 1993;70:70-5.
 35. Ball SP, Johnson KJ. The genetics of malignant hyperthermia. *J Med Genet* 1993; 30: 89-93.
 36. Hogan K. The anesthetic myopathies and malignant hyperthermias. *Curr Opin Neurol* 1998; 11:469-76.
 37. Riccardo Z, Simonetta RT. The sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} channel/ryanodine receptor: Modulation by endogenous factors, drugs and disease states. *Pharmacol Rev* 1997; 49: 1-43.
 38. Airey JA, Deerinck TJ, Ellisman MH, Houenou LJ, Ivanenko A, Kenyon JL, et al. Crooked neck dwarf mutant chicken skeletal muscle cells in low density primary cultures fail to express normal alpha ryanodine receptor and exhibit a partial mutant phenotype. *Dev Dyn* 1993; 197: 189-202.
 39. Daniel MB, Michael DR, Stuart JE. *Protein methods*. 2nd ed. New York: Wiley-Liss publishers;1996.
 40. Martonosi AN, Beeler TJ. *Handbook of physiology*. In: Peachey LD, Adrian RH, Geiger SR, editors. *Skeletal muscle*. 2nd ed. Bethesda, MD: American physiological society Press; 1983.p. 417-85.
 41. Orlova E, Serysheva I, van Heel M, Hamilton SL, Chiu W. Two structural configurations of the skeletal muscle calcium release channel. *Nat Struct Biol* 1996; 3: 547-52.
 42. Anderson K, Lai FA, Liu QY, Rousseau E, Erickson HP, Meissner G. Structural and functional characterization of the purified cardiac ryanodine receptor Ca^{2+} release channel complex. *J Biol Chem* 1989; 264: 1329-35.
 43. Arai M, Alpert NR, MacLennan DH, Barton P, Periasamy M. Alteration in sarcoplasmic reticulum gene expression in human heart failure. *Circ Res* 1993; 72: 463-9.
 44. Arai M, Suzuki T, Nagai R. Sarcoplasmic reticulum genes are upregulated in mild cardiac hypertrophy but down regulated in severe hypertrophy induced by pressure overload. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28: 1583-90.
 45. Benders AAGM, Veerkamp JH, Oosterhof A, Jongen PJH, Bindels RJM, Smit LME et al.

- Ca²⁺ homeostasis in Brody's disease: a study in skeletal muscle and cultured muscle cells and the effect of dantrolene and verapamil. *J Clin Invest* 1994; 94: 741-8.
46. Jacobs AEM, Benders AAGM, Oosterhof A, Veerkamp JH, Van Mier P, Wevers RA et al. The calcium homeostasis and the membrane potential of cultured muscle cells from patients with myotonic dystrophy. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1096: 14-9.
47. Ahuja RP, Borchman D, Dean WL, Paterson CA, Zeng J, Zhang Z et al. Effect of oxidation on Ca²⁺-ATPase activity and membrane lipids in lens epithelial microsomes. *Free Radic Bio Med* 1999; 27: 177-85.
48. Porter JD, Karathanasis P. The development of extraocular muscle calcium homeostasis parallels visuomotor system maturation. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257: 678-83.
49. Caswell AH, Brandt NR, Brunschwig JP, Purkerson S. Localization and partial characterization of oligomeric disulfide-linked molecular weight 95000 protein(triadin)which bind ryanodine and dihydropyridine receptors in skeletal muscle triadic vesicles. *Biochemistry* 1991; 30: 7507-13.
50. Costello BC, Chadwick A, Saito A, Chu A, Maurer A, Fleischer S. Characterization of the junctional face membrane from terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 1986; 103: 741-53.

Abstract

Calcium uptake and release in the sarcoplasmic reticulum of overacting inferior oblique muscle

Hee Seon Kim

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Jong Bok Lee)

Overaction of the inferior oblique muscle is manifested by elevation of the adducted eye. From the clinical point of view, there are two types of overaction of inferior oblique muscles. The primary type is of unknown cause, whereas the secondary type is usually related to the palsy of the ipsilateral superior oblique or contralateral superior rectus.

The sarcoplasmic reticulum in muscle is specialized intracellular membrane system which rapidly sequesters and releases calcium. Release of calcium from sarcoplasmic reticulum is through ryanodine receptor, a Ca^{2+} release channel. Sequestration of the released Ca^{2+} into the sarcoplasmic reticulum is mediated by SERCA or Ca^{2+} pump in the sarcoplasmic reticulum.

This study was undertaken to determine and compare the characteristics of Ca^{2+} movements through sarcoplasmic reticulum of inferior oblique muscles in the various conditions including primary, secondary inferior oblique overaction and control groups. Among the 15 samples gathered through inferior oblique myectomy, 6 were from primary inferior oblique muscle overaction, 6 from secondary inferior oblique muscle overaction, and the remaining 3 were from the enucleated eyes as controls. Ryanodine binding assays were performed to determine the function of calcium release channel and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} uptake rates were measured to evaluate the calcium sequestration. Calcium storage sites in sarcoplasmic reticulum, calsequestrins and sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases were quantified using western blotting.

The results were as follows:

1. Ryanodine bindings were further decreased in primary inferior oblique overaction group compared to control group with statistical significance ($p < 0.05$).
2. Sarcoplasmic reticulum calcium uptake rates of primary inferior oblique overaction group

were significantly slower than secondary overaction and control groups. The orders of the uptake rates were control > secondary overaction > primary overaction.

3. In western blot analysis for quantification of calsequestrins and SERCA, no significant difference was found among the 3 groups.

These findings demonstrate that the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} uptake is reduced in primary inferior oblique overaction compared with secondary inferior oblique overaction and control. This suggests that increased intracellular Ca^{2+} concentration by reduced sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} uptake may be a pathogenesis of primary inferior oblique overaction.

Key Words: inferior oblique overaction, sarcoplasmic reticulum, ryanodine receptor, Ca^{2+} uptake rate, calsequestrin, sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase