

Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Szemészeti Klinikájának (igazgató: Berta András egyetemi tanár) közleménye

Ca²⁺-anyagcsere vizsgálatok humán extraocularis szemizmokban

FACSKÓ ANDREA, NAGY ANNAMÁRIA

Célkitűzés: A foszfolamban (PLB) és a szarkoplazmatikus retikulum (SR) Ca²⁺-ATP-áz a Ca²⁺-anyagcsere fontos szabályozó fehérjéi mind a szív-, váz- és a simaizomban. Normál állapotban a PLB erőteljes gátló hatást fejt ki az SR Ca²⁺-pumpára és lassítja a Ca²⁺-felvételt.

Kevés adat ismert a humán extraocularis izmok Ca²⁺-anyagcseréjében szerepet játszó fehérjék (PLB, SR Ca²⁺-ATP-áz) szöveti mennyiségéről normál körülmények között, illetve strabismus kapcsán. Ebben a tanulmányban a szerzők megvizsgálták a két protein jelenlétét és arányát a strabismusműtétekből származó rectusizmokban (lateralis, medialis), illetve enucleatio során nyert normál izomban.

Módszer: A PLB és a SR Ca²⁺-ATP-áz szöveti szintjének meghatározását a proteinek elektroforetikus szétválasztását követően kvantitatív western-blot segítségével végezték.

Eredmények: A membránfrakció Ca²⁺-ciklus fehérjéinek szignifikáns ($p < 0,05$) csökkenését találtuk mind a PLB, mind az SR Ca²⁺-ATP-áz esetén a strabismusellenes műtétekből származó, elongált egyenes izmok mintáiban a normál kontrollhoz képest (PLB: 133 ± 18 vs. 94 ± 12 ; SR Ca²⁺-ATP-áz: 244 ± 21 vs. 113 ± 17 pixel/mg protein $\times 10^{-3}$). A két protein szöveti mennyiségének aránya (PLB/SR Ca²⁺-ATP-áz) a strabismusos mintában szignifikáns emelkedést ($0,83 \pm 0,15$) mutatott, a kontrollhoz képest ($0,55 \pm 0,12$), ami a gátló tulajdonságú PLB mennyiségének relatív felszaporodását jelenti.

Következtetés: A strabismusból származó extraocularis izomban a Ca²⁺-anyagcserében részt vevő fehérjék szöveti szintjének csökkenése és a PLB/SR Ca²⁺-ATP-áz arányának emelkedése bizonyítja a celluláris funkció károsodását.

Kulcsszavak: SR Ca²⁺-ATP-áz, foszfolamban (PLB), strabismus

EXAMINATION OF CA²⁺ CYCLING PROTEINS IN EXTRAOCULAR HUMAN MUSCLES

Purpose: Phospholamban (PLB) and sarcoplasmic reticular (SR) Ca²⁺-ATPase are important regulators of the Ca²⁺ metabolism in the slow skeletal muscles, smooth muscles, and cardiac muscles. Under basal conditions PLB is an inhibitor of SR Ca²⁺-ATPase, by decreasing its affinity to Ca²⁺.

Little data is available on the relative tissue amounts of Ca²⁺ cycling proteins (PLB and SR Ca²⁺-ATPase) in the extraocular muscles either under normal conditions or in strabismus. The authors discuss the presence, and ratio of, these two proteins found in lateral and medial rectus human muscle tissue samples removed during enucleation or strabismus surgery.

Methods: Membrane vesicles were isolated, electrophoresed, and assessed using the quantitative blot-test to examine the relative tissue amounts of PLB and SR Ca²⁺-ATPase in the tissue samples.

Results: Measurement of the relative tissue amounts of Ca²⁺ cycling proteins in the membrane fraction revealed significant decreases ($p < 0,05$) for both PLB and SR Ca²⁺-ATPase in the samples prepared from the elongated rectus muscle compared with the values for control samples (PLB: 94 ± 12 vs. 133 ± 18 ; SR Ca²⁺-ATPase: 113 ± 17 vs. 244 ± 21 pixel/mg protein $\times 10^{-3}$). Moreover, the ratio of the two proteins (PLB/ SR Ca²⁺-ATPase) was significantly increased in the elongated rectus muscles with strabismus ($0,83 \pm 0,15$), compared with the ratio for control samples ($0,55 \pm 0,12$), showing the increased preponderance of the inhibitory regulator PLB.

Conclusion: The decrease in the tissue amount of the Ca²⁺ cycling proteins and the increase in the PLB/SR Ca²⁺-ATPase ratio are indicators of the functional impairment of the extraocular muscle tissue in strabismus.

Keywords: SR Ca²⁺-ATPase, phospholamban (PLB), strabismus

Bevezetés

Az emlős izomzatban az intracelluláris Ca²⁺-szintet a szarkoplazmatikus retikulum (SR) hálózat szabályozza, amely a relaxáció során Ca²⁺-raktárként, a kontrakciók során pedig Ca²⁺-ionokat biztosító forrásként szolgál. Az

izomban a Ca²⁺-felvételt egy SR-membránban található enzim, a Ca²⁺-ATP-áz katalizálja. A lassú, oxidatív (slow-twitch) vázizomban, a myocardiumban és a simaizomban az SR Ca²⁺-ATP-áz működését egy kis molekulású fehérje szabályozza, amelyet foszfolambannak neveztek el. A foszfolamban molekulatömege 6080 dalton; a natív membránokban pentamerként viselkedik. Aminosavszekvenciája ismert és igen konzervatívan megőrzött a törzsféjlődés során. Alapállapotban (defoszforilált állapotban) a foszfolamban

Zajác Magdolna professzornő 70. születésnapja tiszteletére

erőteljes gátló hatást fejt ki az SR Ca^{2+} -pumpára és lassítja a Ca^{2+} -felvételt.^{4,5} A foszfolambant különböző proteinkinázok (cAMP-függő, Ca^{2+} /kalmodulinfüggő) jól foszforilálják és a beépült foszfátcsoport felfüggeszti az SR Ca^{2+} -ATP-áz enzimre gyakorolt gátló hatást. A foszforiláció a foszfolamban hidrofíl citoplazmatikus domain részén történik, a cAMP-függő proteinkináz a Ser-16 aminosavat, a Ca^{2+} /kalmodulinfüggő proteinkináz a Thr-17 aminosavat foszforilálja.⁴ A foszfolamban által mediált gátlás felfüggesztése drámai módon fokozza az SR Ca^{2+} -felvételt, ami együtt jár a myocardium, a simaizom, illetve a lassú, oxidatív vázizmok relaxáció sebességének gyorsulásával. A fokozódó Ca^{2+} -felvétel miatt növekszik az izmok kontraktilis funkciója is. Patológias körülmények között (hyperthyreosis, hypothyreosis, cardialis dekompenzáció bizonyos formái, simaizom elfajulással járó kórképek) módosul az SR Ca^{2+} -ATP-áz aktivitása és/vagy szöveti mennyisége, valamint módosulhat a foszfolamban mennyisége is.⁴ A pajzsmirigyhormonok direkt módon megváltoztatják a foszfolamban és az SR Ca^{2+} -ATP-áz szöveti expresszióját és részben ezen fehérjék (SR Ca^{2+} -ATP-áz és foszfolamban) arányának módosulásával magyarázzák a hypo- és hyperthyreosisban kialakuló markáns eltéréseket az izmok kontraktilis és relaxációs funkciójában.⁹

Kevés adat áll rendelkezésre a humán extraocularis szemizmok Ca^{2+} -anyagcseréjéről (normál vagy patológias körülmények között), jóllehet ezen izmok speciális szerepet töltenek be, és funkció szempontjából típusosan lassú, oxidatív rostoknak tekinthetőek. A jelen közleményben megvizsgáltuk:

1. normál extraocularis humán szemizomban az SR Ca^{2+} -ATP-áz és foszfolamban szöveti mennyiségét,
2. patológias körülmények között (strabismus okozta atrophias állapot) ugyanezen fehérjék szöveti jelenlétét.

Mind ezek a vizsgálatok adatokat szolgáltathatnak az extraocularis szemizmok Ca^{2+} -anyagcseréjéről, illetve a Ca^{2+} -anyagcsere szabályozásában bekövetkező patológias eltérésekről strabismusban.

Anyag és módszer

A vizsgálatokhoz szükséges szövetmintákat egyéb szemészeti indikáció miatt elvégzett bulbustávoltítás során nyertük. A strabismus korrekciójából származó minták az elongált (atrófiás) rectus medialis vagy rectus lateralis műtéti resectiójából származtak. Az izomszövetből való mintavétel minden esetben a beteg írásbeli hozzájárulásával történt.

A vizsgált specifikus fehérjék szétválasztását – teljes szövethomogenizátumból (kvantitatív western-blot segítségével) – immuno-blot technikával végeztük.⁹ Primer ellenanyagként konvencionális antitesteket használtunk (PHL-Ab, SRCA-Ab, Upstate Biotechnology Inc., Lake Placid, USA). Az egyes fehérjék szétválasztására 10–20%-os SDS gradiens poliakrilamid gélt alkalmaztunk. A PHL-Ab ellenanyagot 1:1000 hígításban, a SRCA-Ab ellenanyagot 1:500 hígításban alkalmaztuk. Az előhívás (vizualizálás) alkalikus foszfatázzal konjugált egér-ellenes másodlagos antitestekkel (Amersham, Arlington Heights, USA), a kiértékelés Phosphorimager (ImageQuant program) segítségével történt.

A foszfolamban mennyiségének meghatározásához az in vitro utófoszforilációs technikát is alkalmaztuk.⁶ Ennek lényege, hogy cAMP-függő proteinkináz katalitikus alegységgel, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ jelenlétében a foszfolambant teljes mértékben foszforiláltuk (proteinfoszfatáz-gátló NaF jelenlétében). A beépült foszfát radioaktivitása arányos a foszfoprotein szöveti mennyiségével. A fehérjéket 10–20%-os SDS gradiens poliakrilamid gélen választottuk szét. A radioaktív jelöltség meghatározásához konvencionális autoradiográfiát és folyadék-szcintillációt használtunk. Az eredményeket pmol $[\text{}^{32}\text{P}]/\text{mg}$ protein, illetve pixel érték/mg protein egységekben fejeztük ki. A fehérjemeghatározáshoz Peterson¹¹ módszerét használtuk.

A statisztikai elemzéshez kiszámítottuk az átlagot és a szórást (S.D.). A kiértékelést a t-próba segítségével végeztük, szignifikánsnak a $p < 0,05$ eltérést tekintettük.

Eredmények

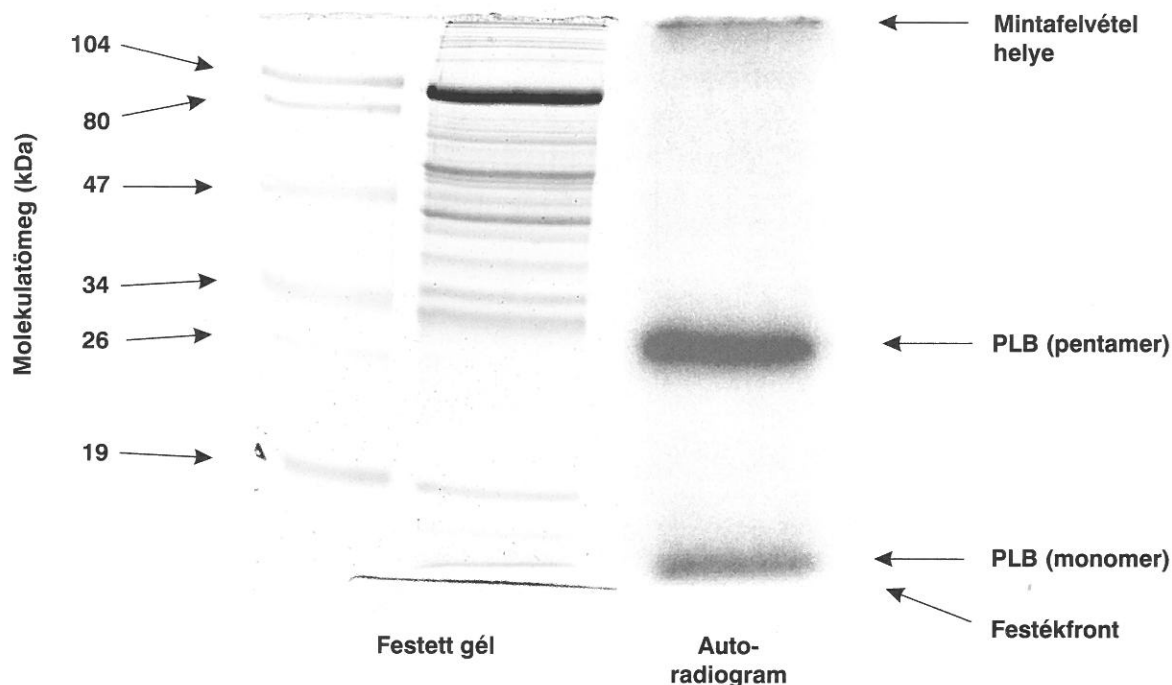
Az utófoszforilációs és western-blot vizsgálatok egyértelműen azonosították a foszfolambant az extraocularis szemizmok membránfrakciójában (1., 2. ábra). A foszfolambannak megfelelő 26 kDa sáv (pentamer) az SDS gélelektroforetikus mintapufferben végzett forralás hatására disszociálódott alacsonyabb molekulásúlyú fragmentumokra (10 kDa). Ez a jelenség: a disszociáció majd a lehűlést követő reaszociáció, egyértelműen azonosítja a polipeptidláncot (csak a foszfolambanra jellemző). Mind az utófoszforiláció, mind a kvantitatív western-blot adatai alapján a foszfolamban mennyisége szignifikánsan csökkent a strabismus műtete során eltávolított rectus lateralis és medialis mintákban a kontroll normál izomszövet értékeihez képest (1. táblázat).

Az SR Ca^{2+} -ATP-áz elleni antitest egyértelműen csak a SERCA2 fehérjére volt specifikus, ezért adataink ennek az izoenzim típusnak a jelenlétét igazolták. A SERCA1 izoen-

1. táblázat. A strabismus hatása a foszfolamban és az SR Ca^{2+} -ATP-áz szöveti szintjére

	Utófoszforiláció (pmol $[\text{}^{32}\text{P}]/\text{mg}$ protein) PLB	Western-blot (pixel/mg protein) PLB	SR Ca^{2+} -ATP-áz	Foszfolamban/ SR Ca^{2+} -ATP-áz hányados
Kontroll	23,4±3,0	133±18	244±21	0,55±0,12
Strabismus	15,8±2,8*	94±12*	113±17*	0,83±0,15*

* $p < 0,05$



1. ábra. Az extraocularis izom membránfrakciójának elektroforetikus képe (Coomasie kékkel festett gél) és autoradiogramja. Az ábra bal oldalán a nyilak a molekulatömeg-standardok helyzetét jelölik. Az autoradiogramon jól azonosítható a foszfolamban (PLB) monomer és pentamer formájának megfelelő sáv

zim szöveti jelenlétét nem néztük. A western-blot vizsgálat eredménye, hasonlóan a foszfolambanhoz, egyértelműen csökkenő tendenciát mutatott az SR Ca^{2+} -ATP-áz szöveti szintekben strabismus kapcsán (1. táblázat). Ugyanakkor megállapítható volt, hogy az SR Ca^{2+} -ATP-áz szöveti mennyiségének csökkenése arányaiban lényegesen meghaladta a foszfolamban szöveti szintjének csökkenését. Ezért a foszfolamban/SR Ca^{2+} -ATP-áz hányados szignifikánsan növekedett strabismusműtétnél eltávolított izmokban (1. táblázat).

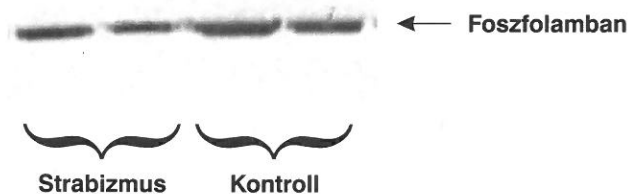
Megbeszélés

Eredményeink alapján egyértelműen igazoltuk, hogy a humán extraocularis izmokban kimutatható mind a foszfolamban, mind az SR Ca^{2+} -ATP-áz (SERCA2). Igazoltuk továbbá, hogy strabismus esetében:

1. csökken a foszfolamban szöveti mennyisége,
2. csökken az SR Ca^{2+} -ATP-áz szöveti szintje és
3. egyértelműen növekszik a foszfolamban/SR Ca^{2+} -ATP-áz hányados.

Mindezen eltérések a szemizmok Ca^{2+} -anyagcserejének (a Ca^{2+} -tranziensnek) kóros állapotát (lelassulását), a szöveti degeneráció kialakulását jelzik. Ezen adatok tendenciájukban megegyeznek a humán és egyéb emlős szívizom patológiás eltéréseivel, amelyeket a szívelégtelenség kialakulása kapcsán észleltek (a kiváltó okoktól függetlenül).^{4,5}

A különböző humán izmok működésének sejtszintű szabályozása, kontraktilitásának vezérlése nem minden fajta myocita esetében tekinthető tisztázottnak. A skeletális és a sima izmok működésének szabályozásával kapcsolatban kevés adat áll rendelkezésre.¹³ A szemizmok Ca^{2+} -anyag-



2. ábra. Az extraocularis izom membránfrakciójának western-blot képe. A sávok a pentamer foszfolamban-formának felelnek meg. Bal oldalon a strabismus műtét során nyert minta, jobb oldalon a normál kontroll látható

cseréjére vonatkozó vizsgálatokról az irodalomban csak az utóbbi időben olvashatunk.^{2,10} Ezek az adatok a reguláció pontos mechanizmusát csak normálállapotban vizsgálják, döntően alsóbb rendű speciesek esetében. A szemizmok különböző patológiás változásait korábban elsősorban mitokondriális szintű eltérésekkel magyarázták.^{1,7} A humán strabismus cellularis mechanizmusának tisztázásával foglalkozó irodalmi adatokat azonban nem találtunk. A kísérő strabismus kialakulásában a szemorvosok elsősorban szenzoros hibát feltételeztek, a motoros eltérést másodlagosnak ítélték. Az etiológiai tényezők pontos feltárására azonban még a mai napig nem került sor.⁸

A külső szemizmok pontos molekuláris működése, biokémiai alapjainak egzakt mechanizmusa tehát még nem teljesen feltárt terület. A szemizmok motoros zavarain alapuló kórképek igen nagy részét teszik ki a szembetegségeknek, megoldásuk mind a mai napig csak részben tekinthető

megoldottnak. A teljes korrekciót alapvetően csak a műtéti megoldások teszik lehetővé. Az operatív beavatkozások eredménye azonban nagymértékben függ a szemizmok eredeti funkcionális állapotától. A reoperációk az előző opus után a motoros működés újonnan kialakult egyensúlyának ismételt megbomlásából származó zavar miatt indikáltak. Az izom normális működésének megismerésével a patológiai állapotokban létrejött mechanizmusok is feltárhatóak lesznek. Az extraocularis szemizmok Ca^{2+} -anyagcseréjének pontos megismeréséhez vizsgálatainkkal közelebb jutotunk. Ez pedig hosszú távon lehetőséget adhat új gyógyszeres beavatkozásokra a strabismus kezelésében, illetve befolyásolhatja a posztoperatív konzervatív gyógykezelést. Ez az igény már korábban is megfogalmazódott *Breinin és munkatársai*³ által végzett állatkísérletek adatai alapján. A Ca^{2+} -csatorna gátlásával (kadmium segítségével) befolyásolták mind in vitro, mind in vivo körülmények között az extraocularis szemizmok működését (a strabismus nem sebészeti, gyógyszeres kezelésének esetleges lehetőségét proponálták).

Felmérések szerint a populáció 2%-ban manifeszt kancsalság észlelhető, másik 4%-nak nincs detektálható sztereó látása, a primer binokuláris visus elsődleges hibája miatt.¹² Ezen adatok ismeretében a szemizom működésének molekuláris, celluláris alapú vizsgálata és új ismeretek megszerzése a szemészek számára is lényeges. A Ca^{2+} -anyagcsere paramétereinek további feltérképezése, a vizsgált szemizmok morfológiai eltéréseinek kiértékelése a jövőben is fontos kísérletes feladatnak tekinthető.

Irodalom

1. Aasly J., Lindal S., Torbergsen T., Borund O., Mellgren S.L.: Early mitochondrial changes in chronic progressive ocular myopathy. *Eur Neurol* 30(6), 314-318, (1990).
2. Block B. A., O'Brien J., Meissner G.: Characterisation of sarcoplasmic reticulum proteins in the thermogenic muscles of fish. *Journal Cell Biol* 127(5), 1275-1287, (1994).
3. Breinin G. M., Sadovnikoff N., Pfeffer R., Davidowitz J., Chiarandini D.J.: Cadmium reduces extraocular muscle contractility in vitro and in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26, 1639-1642, (1985).
4. Edes I., Kranias E.G.: Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} transport. In: Sperelakis, N., Kurachi Y., Terzic A., Cohen M.V. (eds): *Heart physiology and pathophysiology* (4th Edition). Academic Press, New York, USA, pp. 447-460, (2000).
5. Edes I., Kranias E.G.: Ca^{2+} -ATPases. In: Sperelakis, N. (ed.): *Cell Physiology, Source Book*. Academic Press, New York, USA, 3rd new edition, pp. 271-281, (2001).
6. Jakab G., Kiss E., Kranias E.G., Edes I.: Effect of thyroid status on basal phosphorylation of cardiac myofibrillar phosphoproteins in rats. *Cardioscience* 5, 19-24, (1994).
7. Kamieniecka Z., Sjo O.: Mitochondrial myopathy as a cause of ptosis and ophthalmoplegia in elderly females. *Acta Ophthalmol* 62(3), 401-412, (1984).
8. Kanski J.J.: *Clinical Ophthalmology*, 2nd ed., Butterworth-Heinemann Ltd, Oxford, Vol 14, 411-437, (1992).
9. Kiss E., Jakab G., Kranias E.G., Edes I.: Thyroid hormone induced alterations in phospholamban protein expression: regulatory effects on sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} transport and myocardial relaxation. *Circ Res* 75, 245-251, (1994).
10. Londraville P.L., Cramer T.D., Frack J.P., Tullis A., Block B.A.: Cloning of a neonatal calcium atpase isoform (SERCA 1B) from extracellular muscle of adult blue marlin (*Makaira nigricans*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 127(2), 223-233, (2000).
11. Peterson G.L.: A simplification of the protein assay method of Lowry et al., which is more generally applicable. *Anal Biochem* 81, 346-356, (1977).
12. Spalton D.J., Hitchings R.A., Hunter P.A.: *Atlas of Clinical Ophthalmology*. J.B. Lippincott Company, Philadelphia, Vol 18.2-18.24, (1988).
13. Voss J.C., Mahaney J.E., Thomas D.D.: Mechanism of Ca-ATPase inhibition by mellitin in skeletal sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry* 34(4), 930-939, (1995).

A szerző levelezési címe: Dr. Facskó Andrea
DE OEC ÁOK Szemészeti Klinika
4012 Debrecen, Nagyterdei krt. 98.