

## 特约综述



细胞内钙相关蛋白的功能几乎遍布了整个生命科学以及医学生物学领域,从生命开始的胚胎时期到成熟个体的形成,直至生命的死亡都与它们有着不可分割的密切关系。无论是在生命的最小单位——细胞内作为信使行使功能的胞内钙相关蛋白,还是发挥构建细胞成组织及器官作用的细胞外微环境中的基质蛋白,钙相关蛋白的功能都不可小觑。本实验室利用基因修饰模式动物,从细胞周期到细胞死亡、从胚胎早期发生到组织器官构建形成,对细胞内外钙相关蛋白的功能进行探索,在探讨细胞生物学基础问题为农业、畜牧业等相关学科提供理论基础的同时,也期望为揭示人类相关疾病的分子遗传机制提供新的思路,为最终攻克威胁人类生命健康的重大疾病提供有价值的线索。

[http://lifesci.snnu.edu.cn/Duiwu\\_jianshe.asp](http://lifesci.snnu.edu.cn/Duiwu_jianshe.asp)

## Ryanodine受体的功能结构和调节因子

范娟<sup>1</sup> 杨瑾<sup>1</sup> 周鑫<sup>1</sup> 董治龙<sup>2</sup> 王李阳<sup>1</sup> MengMeng Xu<sup>3</sup> 牟玉莲<sup>4</sup> Miyuki Nishi<sup>5</sup>  
Williams Issacs<sup>6</sup> 安书成<sup>1</sup> Hiroshi Takeshima<sup>5</sup> Jianjie Ma<sup>7</sup> 徐学红<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>陕西师范大学生命科学院细胞遗传及发育生物学实验室, 西安 710062; <sup>2</sup>兰州大学第二医院, 兰州 730030;

<sup>3</sup>Medical Scientist Training Program, Duke University Medical Center, Durham, NC 27705, USA;

<sup>4</sup>中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100093; <sup>5</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8501, Japan; <sup>6</sup>School of Medicine, Johns Hopkins University, Baltimore, MD 21287, USA;

<sup>7</sup>School of Medicine, Ohio State University, Columbia, OH 43210, USA)

**摘要** Ryanodine受体(ryanodine receptor, RyR)是位于细胞内内质网/肌浆网膜上的钙离子释放通道蛋白。RyR是由四个足状结构的亚单位组成的同源四聚体,每个亚单位大于550 kDa,四聚体的总分子量超过2 MDa,是迄今发现的内质网/肌浆网膜上最大的离子通道。哺乳动物有三种类型的RyR,其中RyR1主要分布在骨骼肌中,RyR2首先发现于心肌,RyR3主要在脑中有较多分布。RyR钙离子释放通道在肌肉收缩、突触传递、激素分泌、蛋白折叠和程控性凋亡以及坏死等一系列以细胞功能为基础的生理过程中起着极其重要的作用,因而近些年在医学生物学和药学应用上都有极大的进展。该文就RyR在机体中的分布、功能结构和调节因子等进行了介绍,其蛋白调节因子二氢吡啶受体(dihydropyridine receptor, DHPR)、钙调蛋白(Calmodulin)、隐钙素(calsequestrin)、FKBP(FK506-binding protein)家族蛋白和小分子调节因子咖啡因、离子等都是RyR复合体行使细胞生理功能必不可少的因素。

**关键词** RyR; 功能结构; 调节因子

国家重大科学研究计划项目(批准号: 2015CB943100)、国家自然科学基金面上项目(批准号: 31371256)、教育部中央高校团队项目(批准号: GK20130100)、教育部外事局“海外名师”项目(批准号: MS2014SXS038)和秦巴山区持续发展中心项目(批准号: CIC-QBRSD)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 029-85310632, E-mail: xhx0708@snnu.edu.cn

This work was supported by the Ministry of Science and Technology of China (Grant No.2015CB943100), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31371256), the National Department of Education Central Universities Research Fund (Grant No.GK20130100), the Foreign Distinguished Scientist Program (Grant No.MS2014SXS038) and Qinba Mountain Developing Center (Grant No.CIC-QBRSD)

\*Corresponding author. Tel: +86-29-85310632, E-mail: xhx0708@snnu.edu.cn

网络出版时间: 2015-01-06 14:28

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150106.1428.001.html>

# Ryanodine Receptors: Functional Structure and Their Regulatory Factors

Fan Juan<sup>1</sup>, Yang Jin<sup>1</sup>, Zhou Xin<sup>1</sup>, Dong Zhilong<sup>2</sup>, Wang Liyang<sup>1</sup>, MengMeng Xu<sup>3</sup>, Mu Yulian<sup>4</sup>, Miyuki Nishi<sup>5</sup>, Williams Isaacs<sup>6</sup>, An Shucheng<sup>1</sup>, Hiroshi Takeshima<sup>5</sup>, Jianjie Ma<sup>7</sup>, Xu Xuehong<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China; <sup>2</sup>2<sup>nd</sup> Hospital, Lanzhou University, Lanzhou 730030, China; <sup>3</sup>Medical Scientist Training Program, Duke University Medical Center, Durham, NC 27705, USA; <sup>4</sup>Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China; <sup>5</sup>School of Pharmacology, Kyoto University, Kyoto 606-8501, Japan; <sup>6</sup>School of Medicine, Johns Hopkins University, Baltimore, MD 21287, USA; <sup>7</sup>School of Medicine, Ohio State University, Columbus, OH 43210, USA)

**Abstract** Ryanodine receptor (RyR), located on the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum membrane, is known as one of the few Calcium channels in charge of Calcium release within the cell. The functional RyR is a homotetramer with a total molecular mass in excess of 2 MDa and each subunit is larger than 550 kDa. There are three known mammalian isoforms of RyR each distributed in different areas of the body, RyR1 in skeletal muscle, RyR2 in cardiac muscles, and RyR3 in brain. RyR plays vital roles in many physiological functions as gated calcium channels guarding the wealth of intracellular calcium in sarcoplasmic reticulum. RyR is responsible for myocyte contractility, synaptic transmission, hormone secretion, protein folding, and programmed apoptotic/necrotic death. The fundamental role and structure of RyR were discussed in this review. Their regulatory networks through DHPR, calmodulin, calsequestrin, FKBP and small molecular regulators, including ions ryanodine and caffeine, were discussed. The current importance of RyR in medical and pharmaceutical development was also summarized in this review.

**Keywords** ryanodine receptor; functional structure; regulatory factor

细胞内钙离子(Ca<sup>2+</sup>)是重要的第二信使,在肌肉收缩、突触传递、激素分泌、基因转录、蛋白折叠和程控性凋亡以及坏死等一系列以细胞功能为基础的生理过程中起到极其重要的作用<sup>[1]</sup>。钙离子通过两个蛋白家族的介导从内质网(endoplasmic reticulum, ER)/肌浆网(sarcoplasmic reticulum, SR)释放进入胞浆,它们分别是RyR(ryanodine receptor)和1,4,5-三羟甲基氨基甲烷磷酸肌醇酯受体(inositol 1,4,5-triphosphate receptors, IP<sub>3</sub>Rs)。RyR是由于其与ryanodine呈高亲和性结合并受其调节而命名的。正常生理状态下,细胞受到微环境变化刺激时,胞内Ca<sup>2+</sup>浓度维持在大约0.1 mmol/L的较低水平上,但当细胞受到刺激时,细胞内特定区域Ca<sup>2+</sup>浓度会上升,并将信号传导到整个细胞,从而导致整个细胞发生效应。例如,在肌肉细胞的ER膜和细胞膜形成的T-管结构区域中,主要由RyR导致的Ca<sup>2+</sup>变化形成“钙火花(calcium sparks)”乃至“钙波(calcium waves)”,最终导致整个肌细胞的收缩<sup>[2]</sup>。RyR在许多细胞活动中发挥重要的作用,除肌组织的兴奋收缩耦联外,在神经细胞的信号传导、免疫系统中的激素分泌以及发育分化中的细胞增殖和死亡等生物过程中必不可

少。本文就RyR基因在不同动物中表达、RyR亚型蛋白的功能结构以及它们的调节因子对RyR功能的作用进行讨论。

## 1 RyR基因和蛋白亚型在动物组织器官中的分布

Ryanodine是一种具有毒性的植物碱,主要存在于热带南美洲和加勒比海地区大枫子科植物*Ryania speciosa* Vahl(Flacourtiaceae)中,这种植物碱在动物组织中的受体即为RyR。

### 1.1 RyR蛋白类型及其在各类动物组织器官中的分布

在包括人类在内的哺乳动物中,RyR有三种亚型,即RyR1、RyR2和RyR3,许多疾病与该家族蛋白相关<sup>[3-4]</sup>。RyR1主要分布在骨骼肌中,同时在心肌、大动脉平滑肌、胃、肾脏、胸腺、小脑、浦肯野氏细胞、肾上腺、卵巢和睾丸中也有少量表达。最近有研究报道,RyR1在B淋巴细胞中也表现出蛋白活性<sup>[3]</sup>。在心肌中主要存在的RyR亚型是RyR2,但它也在小脑和大脑皮层的浦肯野氏细胞中高表达,并且该亚型在胃、肾脏、肾上腺、卵巢、胸腺和肺等

组织中也保持一定的低水平表达。RyR3亚型主要在小鼠的海马神经元、丘脑、浦肯野氏细胞、纹状体、骨骼肌、冠状动脉血管平滑肌细胞、肺、肾脏、回肠、空肠、脾和胃中表达,同时也发现在兔的主动脉、子宫、输尿管、膀胱和食道中有分布。

鸟类和鱼类等非哺乳类脊椎动物的RyR存在其他的亚型,即RyR $\alpha$ 和RyR $\beta$ <sup>[5]</sup>。RyR $\alpha$ 在骨骼肌中的含量很高,而在脑中的表达量较低。RyR $\beta$ 在多种组织中表达,包括骨骼肌、心肌、小脑、肺和胃<sup>[6]</sup>。秀丽隐杆线虫中,RyR在体壁、阴户、肛门和咽部的肌肉中均有表达<sup>[7]</sup>。黑腹果蝇中,RyR的一种亚型在消化管和神经系统中表达<sup>[9]</sup>。鸟类和鱼类的RyR $\alpha$ 对应于哺乳动物的RyR1,RyR $\beta$ 则对应于哺乳动物的RyR2或RyR3,到目前为止尚无其他RyR亚型的报道。

## 1.2 RyR基因及其各个亚型缺失的表型分析

研究表明,人类编码RyR1的基因定位在19q13.2染色体上,包含104个外显子;编码RyR2的基因定位在1q43染色体上,有102个外显子;编码RyR3的基因定位在15q13.3-14染色体上,有103个外显子<sup>[3]</sup>。小鼠的RyR1、RyR2和RyR3基因定位在7A3、13A2和2E4染色体上<sup>[9]</sup>。非哺乳类脊椎动物的RyR $\alpha$ 和RyR $\beta$ 及三种哺乳动物的RyR是高度同源的。在小鼠模式动物中,基因敲除研究显示,三种RyR基因均在机体发育和正常生理机能中发挥重要作用<sup>[10]</sup>。

RyR1敲除的小鼠在围产期就会死亡,虽然T管结构区域中钙诱导的钙释放现象(calcium induced calcium channel, CICR)依然存在,但电子显微镜揭示肌肉组织趋于解体(muscular degeneration)。也就是说,作为敏感元件(calcium sensor)的RyR1的缺失,导致了肌肉细胞超微结构triad的重大缺陷<sup>[11-12]</sup>。RyR2基因缺失的小鼠在胚胎发育期即显示心脏发育成熟缺陷,是致死性表征,胚胎死于心脏开始跳动时期,胚胎心肌细胞显示大量的液泡结构,细胞发育不成熟,充分表明了该基因在保持心脏功能方面的重要性<sup>[13]</sup>。然而在RyR2表达减少的RyR2基因敲除杂合子小鼠中,却揭示了该基因与心脏肥大疾病之间的相关性。研究者已发现,虽然RyR2基因敲除杂合子小鼠心脏没有可见的形态学缺陷,而且分离心肌细胞SR的钙释放没有损伤,但是经过横向主动脉缩窄(constriction of transverse aorta)造型三周后,发现心肌细胞瞬时钙释放显著降低、心缩期心肌细胞胞内钙浓度无CICR响应;同时,模式小鼠显示心脏肥大、

纤维化,并直接导致其调节蛋白如钙调蛋白、Akt和胞外信号调节蛋白激酶等功能的激活;而且,RyR2基因敲除杂合子小鼠在膀胱平滑肌表现出明显的兴奋收缩耦联缺陷<sup>[4-16]</sup>。虽然缺乏RyR3基因的小鼠没有发现任何结构性异常,即没有在大脑结构、心肌、平滑肌和其他可能的组织结构上发现任何异常,但是其社会行为明显改变,活动性明显失常,活动期是对照小鼠的两倍以上<sup>[16]</sup>。

虽然哺乳动物的RyR1、RyR2和RyR3在氨基酸水平上存在65%的同源性<sup>[17]</sup>,但这些亚型上存在三个多样性区域(divergent regions,即D1、D2和D3),这可能是模式动物基因敲除后出现不同表型的原因。D1在骨骼肌位于4254和4631氨基酸之间,在心肌位于4210和4562氨基酸之间。D2在骨骼肌位于1342和1403氨基酸之间,在心肌位于1353和1397氨基酸之间。D3在骨骼肌位于1872和1923氨基酸之间,在心肌位于1852和1890氨基酸之间。D2在RyR1和CaV1.1(钙通道 $\alpha$ 1亚基)的机械耦联中发挥重要作用。D1是调节RyR1受体对Ca<sup>2+</sup>和咖啡因敏感性的位点<sup>[18]</sup>。D3可能包含Ca<sup>2+</sup>依赖的失活位点。除了这些多样性区域,胞质结构域区存在大量和通道活性调节因子相互作用的位点以及构成RyR离子通道的许多突变位点。我们推测,多样性区域可能是基因敲除后不同表型的根源所在。

## 2 RyR蛋白的功能结构

RyR是同源四聚体,它的总分子量超过2 MDa,每个亚单位大于550 kDa。RyR直接或间接地受二氢吡啶受体(dihydropyridine receptor, DHPR)和一些离子、小分子和蛋白的调节,如:Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)、FK506结合蛋白(FKBP12和FKBP12.6)、钙调蛋白(calmodulin, CaM)、Ca<sup>2+</sup>/CaM依赖蛋白激酶II(Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II, CaMKII)、肌集钙蛋白(calsequestrin, CSQ)、triadin和junctin等。RyR与肌质网上的内在蛋白triadin和junctin形成的复合物是一种高容量的可以固定肌集钙蛋白的结合蛋白。在2.4 nm解析分辨率及约10 Å的解析分辨率下,冰冻电镜均揭示了兔骨骼肌RyR1关闭状态时的结构<sup>[19]</sup>。虽然大部分冰冻电镜的研究对象都是RyR1,但也有一些是对RyR2和RyR3进行重构的,尽管分辨率要低一些。这些研究结果表明,RyR的三种亚型在结构上是非常相似的<sup>[3]</sup>。

三维重组图像显示, RyR由两个部分组成: 胞质结构域区(cytoplasmic domains)和跨膜结构域区(transmembrane domains), 该两种区域又被称为胞质组装(cytoplasmic assembly, CA)和跨膜组装(transmembrane assembly, TA)<sup>[20-21]</sup>。胞质结构域区为一个较大的疏松多孔的胞内复合体, 它大约占总质量的80%, 是四重对称的四个大的多肽亚单位组成的四方棱柱状结构; 跨膜结构域区为一个较小的更为紧凑的跨膜复合体, 它大约占总质量的20%。跨膜结构域区与胞质结构域区肌浆网面的中心部分紧密相联。胞质结构域区的大小约为270 Å×270 Å×100 Å, 而跨膜结构域区的大小为120 Å×120 Å×60 Å。RyR中央有门控通道, 可呈现开放或关闭等不同状态, 控制Ca<sup>2+</sup>离子的通过; 随着其调节因子的作用, 也会出现亚开放状态<sup>[22]</sup>。

RyR每个亚单位的胞质结构域区球状部分由多肽直链相互连接而成, 这些球状部分又被称为结构域1~10, 它们包括位于通道外围的夹钳状结构域(clamp-shaped domains)和与之相连的环绕中央孔道的手柄结构域(handle domains)<sup>[23]</sup>。夹钳结构在骨骼肌兴奋收缩耦联的信号转导中起重要作用, 而手柄结构域是与多种调节因子结合的部位, 在通道的调控方面起重要作用。结构域1连接胞质结构域和跨膜结构域成Y字型, Y字型上面的两臂分别结合结构域2、3。研究表明, RyR在开放和关闭状态之间的变动也就是胞质结构域区和跨膜结构域区的构象改变, 这种构象上的改变最终导致了离子孔道的扩张和收缩; RyR孔道的宽度大约3 Å, 深度大约10.4 Å<sup>[24-25]</sup>。

跨膜结构域在横切面上呈四方形, 与胞质结构域连接部位的周长为12 nm; 沿四重对称轴方向呈圆锥状, 长度为7 nm, 足以跨越脂双层。跨膜结构域由四个柱形密度区组成, 与胞质结构域的结构域1相连。这四个柱形结构围成一直径为2~3 nm的中心孔道, 这可能就是Ca<sup>2+</sup>从肌浆网释放的通道。胞质结构域上有调节其活性的球形密度区——通道栓, 直径3.0~3.5 nm, 由四个通往跨膜结构域的小洞围住。通道栓靠近结构域1或很可能与之直接相连。由于受体与配体的结合, 导致受体结构的变化, 结构域1构象变化, 造成通道栓的开启或关闭, 调控通道开放<sup>[26]</sup>。

RyR1和RyR2分别在骨骼肌和心肌的兴奋收缩耦联中发挥着关键作用<sup>[27]</sup>。在骨骼肌细胞中, DHPR与RyR1在结构上形成缝隙连接, 不依赖细胞外Ca<sup>2+</sup>

即可激活RyR1, Ca<sup>2+</sup>释放通道开放, 肌浆网Ca<sup>2+</sup>大量释放, 从而使骨骼肌细胞收缩, 骨骼肌联动骨骼以完成人体机械运动。在心肌细胞中, 去极化激活DHPR, 细胞外Ca<sup>2+</sup>内流, 内流的Ca<sup>2+</sup>通过激活RyR2使Ca<sup>2+</sup>释放通道开放, 肌浆网Ca<sup>2+</sup>大量动员, 在心肌细胞的每个T-管区域的胞质内Ca<sup>2+</sup>浓度同时升高(表现出钙火花), 这些区域Ca<sup>2+</sup>浓度升高后直接引起肌肉细胞的收缩, 全过程表现出钙波(Ca<sup>2+</sup> waves)。收缩完成后, 通过SR上的ATPase(SERCA)将胞浆中的Ca<sup>2+</sup>泵回到SR中, 引起肌肉的舒张。RyR也在神经系统的信号传导中发挥重要作用, 参与递质分泌、突触可塑性和脑实质血管紧张性等过程<sup>[28]</sup>, 作用的详尽机理有待科技工作者的进一步探讨。

### 3 RyR的功能调节因子

RyR行使其功能的调控机理相当复杂, 许多因素都对其起着调节作用, 如: 生理因子(如Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>和ATP等)、药理试剂(如ryanodine和咖啡因等)、RyR关联蛋白和某些细胞事件(如磷酸化、氧化作用等等)。RyR复杂的功能都将以其复合体的形式来完成, 它的许多调节蛋白都是其复合体的组成成分。其中, PKA、FK506结合蛋白、CaM、CaMKII、triadin、junction、CSQ和RyR组成大分子复合物的核心部分, 它们共同完成SR的Ca<sup>2+</sup>释放和调节, 这些复合体的组成蛋白和亚型在正常生理状态和病理情况下的不同变化及其遗传基因突变在相关细胞功能上的改变, 都会引起生理缺陷。尽管RyR亚型有65%的序列具有同源性, 但不同亚型对于某些调节因子的反应是不同的, 而且, 大部分RyR调节因子都是与通道胞质结构域区相作用的。

#### 3.1 RyR功能的小分子调节因子

细胞内小分子是RyR同源四聚体在内质网/肌浆网膜行使其功能的基本保障, 它们对Ca<sup>2+</sup>释放的敏感性和强度有重要的影响, 使Ca<sup>2+</sup>释放蛋白RyR的开放和关闭状态受到调节。离子通道开放时间和频率的增加、减少乃至抑制与不同小分子和它们的浓度密切相关。

3.1.1 Ryanodine对RyR功能的调节为剂量依赖性  
Ryanodine对RyR功能的调节是双向性的, 它既可以激活其钙离子的释放, 又可以关闭离子通道, 停止钙离子的释放。该双向性取决于Ryanodine的量, 呈剂量依赖性。当Ryanodine以较低微摩尔级浓度作用

于RyR时,可激活RyR钙离子通道活性;但当较高微摩尔级浓度作用于RyR时,则使RyR的膜内通道呈亚完全开放状态;而当RyR存在于毫摩尔级浓度的Ryanodine时,RyR钙离子通道则会完全关闭,离子的运输将会停止<sup>[29]</sup>。

**3.1.2  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 和ATP为RyR功能的小分子调节因子**  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 和ATP是重要的RyR小分子调节因子。 $\text{Mg}^{2+}$ 和ATP从胞浆调节RyR,  $\text{Ca}^{2+}$ 从胞浆和肌浆网内腔调节RyR。这些调节分子对心肌和骨骼肌的RyR调节作用不尽相同,这可能与两种不同类型RyR的兴奋收缩耦联特性不同有关<sup>[30-31]</sup>。 $\text{Ca}^{2+}$ 既可以直接作用于RyR,也可作用于CaM和CaMKII从而调节RyR。胞浆 $\text{Ca}^{2+}$ 对于RyR的活性调节作用具有双向性,低浓度 $\text{Ca}^{2+}$ (mmol/L级)能够结合到高亲和力位点而激活RyR,而高浓度 $\text{Ca}^{2+}$ (约1 mmol/L)则结合到低亲和力位点抑制RyR<sup>[25]</sup>。不同类型的RyR对 $\text{Ca}^{2+}$ 的敏感性不同:在抑制作用上,RyR1对 $\text{Ca}^{2+}$ 的敏感性最高,RyR2和RyR3次之;而在激活作用上,RyR2对 $\text{Ca}^{2+}$ 最为敏感。管腔内的 $\text{Ca}^{2+}$ 也会刺激骨骼肌和心肌的 $\text{Ca}^{2+}$ 释放。ATP和咖啡因作为RyR的胞内激动剂,增加了钙库 $\text{Ca}^{2+}$ 释放的敏感性。

$\text{Mg}^{2+}$ 对RyR起到抑制作用,通常认为该作用通过以下两种机制实现:一是通过竞争性和高亲和性 $\text{Ca}^{2+}$ 激活位点结合,减少RyR开放几率;二是通过结合到低亲和性 $\text{Ca}^{2+}$ 位点而抑制 $\text{Ca}^{2+}$ 释放。值得注意的是, $\text{Mg}^{2+}$ 对于RyR1、RyR2和RyR3的抑制作用机理可能是不同的。 $\text{Ca}^{2+}$ 对RyR2和RyR3的激活作用比对RyR1强,并且需要更高的胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度才能失活。因此,在胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度升高的情况下, $\text{Mg}^{2+}$ 对于RyR1的抑制作用比对RyR2和RyR3更强<sup>[32-33]</sup>。

正常生理状态时,胞浆中大约有300 mmol/L的自由ATP,这些ATP是RyR的有效激动剂。其他的腺嘌呤核苷酸如ADP、AMP、cAMP、腺苷和腺嘌呤也引起SR的 $\text{Ca}^{2+}$ 释放,但是其效能低于ATP<sup>[34]</sup>。离体实验显示,ATP能够在缺乏 $\text{Ca}^{2+}$ 的情况下激活骨骼肌RyR1,但是其最大激活作用的产生需要 $\text{Ca}^{2+}$ 的存在<sup>[31]</sup>。而心肌RyR2在缺乏 $\text{Ca}^{2+}$ 的情况下则不能被ATP激活。ATP增强了 $\text{Ca}^{2+}$ 诱导的RyR2激活,但是不如对RyR1作用明显<sup>[35]</sup>。在细胞中,大部分ATP和 $\text{Mg}^{2+}$ 形成复合物。因此,在生理条件下,更可能的是 $\text{Mg}^{2+}$ -ATP复合物而不是游离的 $\text{Mg}^{2+}$ 调节 $\text{Ca}^{2+}$ 释放。由于胞内高浓度游离 $\text{Mg}^{2+}$ 的存在和 $\text{Mg}^{2+}$ 对RyR的抑制作用,

使区分ATP和 $\text{Mg}^{2+}$ -ATP的不同效应愈加困难。

**3.1.3 黄嘌呤生物碱化合物咖啡因** 咖啡因(caffeine)是一种黄嘌呤生物碱化合物,在兴奋收缩耦联研究中多作为RyR的激动剂。咖啡因在毫摩尔级浓度水平时能激活RyR。当咖啡因浓度较低时,它可通过提高RyR对DHPR和 $\text{Ca}^{2+}$ 的敏感性而起作用,使RyR更易激活<sup>[36-37]</sup>。当而咖啡因浓度较高时,即使在无钙的条件下,它也能激活RyR并维持其开放状态<sup>[38]</sup>。膜片钳和脂双层膜RyR重建的研究表明,咖啡因在胞质内作用于RyR从而调控钙离子释放,它对RyR的影响是通过同时作用于RyR的开放几率和延长钙通道开放时间来完成的<sup>[23,39]</sup>。小鼠的心室肌细胞膜片钳数据确证了咖啡因通过增加RyR的开放几率和开放时间影响RyR的门控规律,并且咖啡因激活可以保持长效功能,达到分钟级<sup>[40]</sup>。

## 3.2 RyR功能的蛋白调节因子

随着心血管生物学研究工作的深入,越来越多的蛋白被发现与内质网/肌浆网膜上 $\text{Ca}^{2+}$ 的释放密切相关,调节CICR的生理过程。作为骨骼肌、心脏和大脑中的重要 $\text{Ca}^{2+}$ 释放蛋白,这些调节蛋白中的一部分其直接作用对象即为RyR(图1)。

**3.2.1 DHPR与兴奋收缩耦联** DHPR又叫做L-型 $\text{Ca}^{2+}$ 通道,是一种电压依赖的 $\text{Ca}^{2+}$ 通道,它位于T管的细胞膜上,目前尚无证据表明它能直接参与RyR复合物,然而它与RyR在兴奋收缩耦联中的相互作用却不能忽略。DHPR有两种亚型,即CaV1.1和CaV1.2。DHPR包含多个亚单位:CaV1.1的 $\alpha 1$ 亚基、 $\alpha 2/\delta\beta$  M亚基和 $X\alpha 1.2 \alpha 1\alpha 2/\delta$  M亚基。 $\alpha 1$ 亚单位是电压敏感性的,为形成孔道的亚单位。DHPR和RyR位于肌细胞的缝隙连接的两侧,分别位于细胞膜和SR膜上,它们之间形成一个相对独立的空间。DHPR介入的骨骼肌和心肌的兴奋收缩耦联分子机制不尽相同,大多在钙诱导的钙释放(calcium induced calcium release, CICR)调节机制之下<sup>[30]</sup>。在心肌细胞中,去极化激活CaV1.2,细胞外 $\text{Ca}^{2+}$ 内流,内流的 $\text{Ca}^{2+}$ 激活RyR2。然后,肌浆网 $\text{Ca}^{2+}$ 大量释放,引起细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的升高,使心肌细胞完成一次收缩,该过程称为CICR<sup>[41]</sup>,即心肌的兴奋收缩耦联依赖于细胞外 $\text{Ca}^{2+}$ 以及CaV1.2和RyR2的功能耦联。在骨骼肌中存在两种机制,一是与心肌细胞相同,通过RyR1和DHPR的直接耦联,实现CICR机制下的兴奋收缩耦联;二是通过电压诱导机制进行兴奋收缩耦

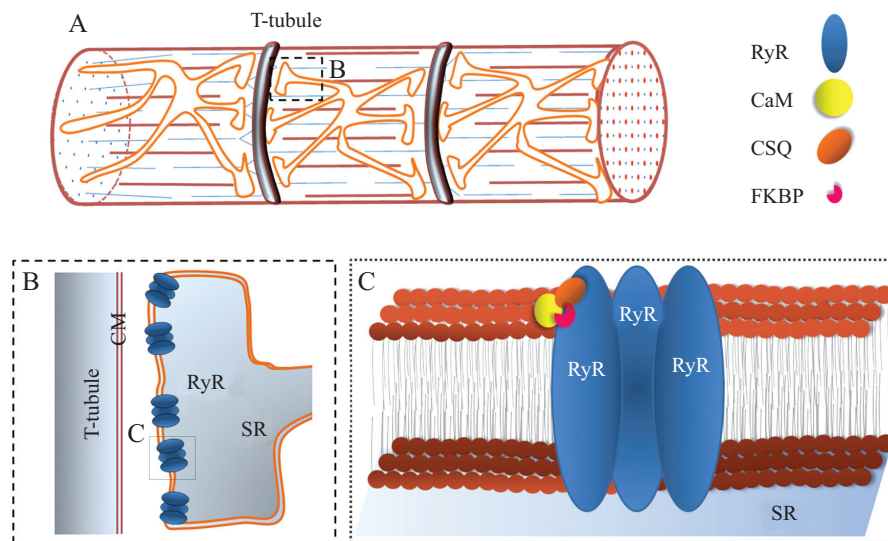
联。由于骨骼肌中有约一半或一半以上的RyR1没有直接跟DHPR耦联,在这种情况下, CaV1.1与RyR1在结构上的特性为产生门控电压和肌浆网Ca<sup>2+</sup>大量释放所必需,这个过程被称为电压诱导的Ca<sup>2+</sup>释放。

**3.2.2 钙调蛋白对RyR活性的调节方式** 钙调蛋白(CaM)是生物体内各类组织中表达的分子量为17 kDa的一个Ca<sup>2+</sup>结合蛋白。在肌肉组织中,钙调蛋白的调节方式至少有两种:一是通过直接和RyR结合调节其活性;二是通过结合到CaV1.1和CaV1.2上从而间接调节RyR的功能<sup>[42-44]</sup>。CaM含有4个EF-hand Ca<sup>2+</sup>结合结构域(EF-hand calcium-binding),可与钙离子结合,2个位于蛋白的羧基端,2个位于蛋白的氨基端。另外, CaM上有与RyR四聚体的每个亚单位结合的位点。早期用<sup>125</sup>I和荧光标记骨骼肌CaM的研究显示, RyR1每个亚单位包含4~6个无钙型CaM(apoCaM)结合位点和1个钙结合型CaM(Ca<sup>2+</sup>CaM)结合位点<sup>[45-46]</sup>。而近年来以<sup>35</sup>S标记的研究表明,骨骼肌和心肌CaM在RyR每个亚单位中各有1个apoCaM结合位点和1个Ca<sup>2+</sup>CaM结合位点,并且结合位点均位于氨基酸残基3630和3679之间。三种RyR亚型均与CaM相结合,并且受到apoCaM或Ca<sup>2+</sup>CaM的调节。apoCaM浓度增加,激活RyR1通道,但不激活RyR2通道; Ca<sup>2+</sup>CaM浓度增加,抑制RyR1和RyR2通道。研究表明, apoCaM激活

RyR1通道是通过CICR的机理实现的<sup>[47-49]</sup>。

**3.2.3 隐钙素作用于RyR的异同性** 隐钙素(calsequestrin, CSQ)单体的分子量为41~46 kDa,是肌浆网上主要的Ca<sup>2+</sup>结合蛋白<sup>[50]</sup>。CSQ1主要在骨骼肌表达,而CSQ2主要表达于心肌。骨骼肌中每摩尔CSQ能与40~50摩尔Ca<sup>2+</sup>结合,心肌中每摩尔CSQ能与18~40摩尔Ca<sup>2+</sup>结合。除了与Ca<sup>2+</sup>结合,改变胞浆中Ca<sup>2+</sup>浓度从而参与CICR的调节外,CSQ还通过triadin和junctin与RyR相互作用,调节SR的钙释放,这三个蛋白可结合在一起,共同调节RyR的活性。SR管腔中游离Ca<sup>2+</sup>浓度增加会引起CSQ本身的结构发生变化,从而决定它是否与其他两个蛋白结合:Ca<sup>2+</sup>浓度超过10 μmol/L时,CSQ单体会发生聚合;而在Ca<sup>2+</sup>浓度大约1 mmol/L时,CSQ多聚体状态稳定并通过与triadin和junctin结合锚定在SR膜上。研究表明, RyR受刺激后,SR中Ca<sup>2+</sup>从CSQ-Ca<sup>2+</sup>复合物中被释放出来。CSQ可以激活或抑制RyR1的活性,而CSQ只能抑制RyR2的活性,并且这种相互作用现象的选择性其分子机制尚未阐明<sup>[50]</sup>。

CSQ1和CSQ2在骨骼肌和心肌有特定的亚型特异性。CSQ1降低RyR1的活性,而CSQ2增加了RyR1和RyR2开放的机率。动作电位变化期间,CSQ1介导的钙释放通过改变刺激频率调节RyR1的活性,而且以此维持钙的重复释放。在心肌收缩期,CSQ2通



A: 肌原纤维以及由横管、纵管组成的肌管系统; B: 心肌细胞的Triad区域,肌质网(SR)末端膨大与T-管肌膜接触部分而形成。CM: T-管的细胞膜; C: 肌质网上钙离子释放通道RyR复合体。(未按实际大小比例绘制)

A: myofibril and sarco-tubular system; B: the area in panel A. Triad junction composed of sarcoplasmic reticulum and the sarcolemma (CM: cell membrane) in T-tubule; C: the area in panel B. The complex of the calcium release channel RyR in sarcoplasmic reticulum (SR). (Not to scale)

图1 RyR及其部分调节因子在心肌细胞T-管中的结构

Fig.1 RyR and some of its regulators in transverse tubule (T-tubule)

过RyR2促进Ca<sup>2+</sup>高速流出,从而导致收缩的快速激活<sup>[51]</sup>。

近年来的研究数据表明,CSQ2基因的突变被认为和运动诱导的儿茶酚胺敏感性室性心动过速(catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, CPVT)引起的心源性死亡有关,尽管在正常生理条件下,CSQ2缺乏的小鼠心肌收缩功能在非运动情况下显示正常<sup>[52]</sup>。Knollmann和他的同事们证明,在基础条件下,Casq2-null小鼠显示正常的SR Ca<sup>2+</sup>释放和收缩功能,但是,当该小鼠肌细胞暴露于儿茶酚胺时,引起舒张期SR Ca<sup>2+</sup>漏出增加,导致自发的SR Ca<sup>2+</sup>提前释放,从而触发心脏收缩,最终触发儿茶酚胺敏感性室性心律不齐的病症<sup>[53]</sup>。

**3.2.4 FKBP12、FKBP12.6与RyR1、RyR2** FK506结合蛋白(FK506-binding protein, FKBP)是免疫抑制药物他克莫司(FK506)和雷帕霉素(Rapamycin)的细胞内受体,在大部分组织中都有表达,参与了许多生化过程,如蛋白折叠、受体信号、蛋白转运和转录,其分子量为12~135 kDa。FKBP家族包括超过20个成员,其中至少8个存在于哺乳动物中<sup>[54-55]</sup>。FKBP是RyR和IP3受体Ca<sup>2+</sup>通道的调节蛋白。两种最主要的调节Ca<sup>2+</sup>通道的FK506结合蛋白是FKBP12和FKBP12.6,它们是根据相对分子质量的不同而命名的,其分子量分别为12 kDa和12.6 kDa。尽管FKBP12和FKBP12.6与RyR三种亚型(RyR1、RyR2和RyR3)都可以结合,但是由于其在不同组织的表达水平不同以及与RyR各个亚型亲和力不同<sup>[56]</sup>,两个蛋白在不同组织中所处的地位也不同。FKBP12/12.6与RyR按1:1的比例结合,即RyR四聚体的每个亚基结合一分子FKBP12/12.6。通常认为,FKBP12和骨骼肌SR的RyR1之间存在相互作用;而FKBP12.6则和心肌细胞SR的RyR2之间相互作用。

FKBP与RyR之间的结合位点目前还存在很大争议,钙通道的脯氨酰二肽区域可能对于FKBP与RyR的结合特别重要。例如,研究认为,FKBP12与RyR1结合的位点在缬氨酸2461<sup>[57]</sup>,FKBP12.6与RyR2的氨基端和羧基端均相结合<sup>[58-59]</sup>。三维空间结构重建显示,FKBP12/12.6位于RyR的3区、5区和9区之间<sup>[60]</sup>。RyR3的缬氨酸-脯氨酸2322和2323之间的氨基酸残基也被认为是FKBP12的结合位点,起到调节通道活性的作用<sup>[61]</sup>。在缺乏免疫抑制剂的生理条件下,FKBP与RyR高亲和性结合,并且起到稳定通

道关闭状态的作用。通过免疫抑制剂阻止FKBP和RyR的结合或者敲除FKBP基因,导致钙通道的开放几率增大、平均开放时间延长和Ca<sup>2+</sup>释放量增加<sup>[62]</sup>。当然,FKBP12和FKBP12.6的缺失会导致心肌细胞功能的缺损,敲除小鼠死亡,并且在不同小鼠株间表型截然不同<sup>[63-67]</sup>。

**3.2.5 PKA和CaMKII磷酸化RyR与心脏功能** RyR的胞质结构域存在几个潜在的磷酸化位点,虽然科技工作者经过长期的努力仍未确认所有位点,但PKA和CaMKII磷酸化可增强RyR1通道活性是领域内公认的事实<sup>[68]</sup>。磷酸化在肌浆网Ca<sup>2+</sup>释放中的重要性是在心脏中首先被发现的<sup>[69]</sup>。在心肌SR中,RyR2能够被PKA、PKG和CaMKII磷酸化。 $\beta$ -肾上腺素刺激引起细胞内cAMP浓度升高,从而导致心肌细胞PKA活性增加。 $\beta$ -肾上腺素刺激心肌细胞时,PKA磷酸化激活RyR2的Ca<sup>2+</sup>通道,引起心肌细胞的正性肌力作用。PKA磷酸化激活RyR2时,可使FKBP12.6从RyR2上分离,从而增加了通道的开放几率。科技工作者基本确定RyR2的磷酸化位点是丝氨酸2809。在骨骼肌SR中,RyR1也可被PKA、PKG和CaMKII磷酸化,从而使Ca<sup>2+</sup>通道的活性得到激活,RyR1的磷酸化位点是丝氨酸2843<sup>[69-70]</sup>。

急性应激反应(the “fight or flight” response)时,交感神经激活引起更大、更快的钙瞬变(Ca<sup>2+</sup> transients),从而导致更强、更快的肌肉收缩<sup>[41]</sup>。交感神经激活引起肌肉 $\beta$ -肾上腺素能受体激活,然后通过细胞内信号转导引起PKA的激活。PKA在使RyR磷酸化从而导致门控特性发生改变的同时,也磷酸化一些参与Ca<sup>2+</sup>调节的关键蛋白,如troponin I和phospholamban<sup>[71]</sup>。哥伦比亚大学的Marks研究小组提出了发生在心衰或包括运动在内的极端应激状态下的“超肾上腺素状态(hyper-adrenergic state)”的概念,这种状态会导致RyR丝氨酸残基的过度磷酸化(在RyR2位于Ser2030和Ser2809,在RyR1位于Ser2843),而过度磷酸化的RyR会使FKBP更容易从RyR复合体上解离出来,造成心脏肌浆网钙离子渗漏。过度磷酸化的RyR通道更倾向于在舒张期完全开放。当然,最终结果是增加了心衰时发生心律失常的风险,并且由于长期钙离子渗漏造成肌浆网钙储备下降,引起肌肉收缩力量下降,因而导致心衰<sup>[71]</sup>。PKA致RyR2过度磷酸化而致心衰的推测是一个假说,而其他一些实验室的研究认为,CaMKII引起的RyR2过

度磷酸化,也会导致心衰时心脏肌浆网钙离子渗漏增加和肌浆网钙储备下降,从而引起心律失常和肌肉收缩功能降低<sup>[72-74]</sup>。当然,也有研究小组的实验结果与此相悖。有研究数据表明,并未在心衰的心脏中发现PKA依赖的过度磷酸化<sup>[75]</sup>。

CaMKII对于骨骼肌RyR1和钙相关蛋白有更为广泛的磷酸化现象,它除了磷酸化和PKA相同的位点外,还磷酸化一些包括troponin I、sarcolemmal Ca<sup>2+</sup> channels和phospholamban等蛋白。RyR2的Ser2808位点可以被CaMKII、PKA和PKC磷酸化,而Ser2814仅被CaMKII磷酸化,Ser2030仅被PKA磷酸化。除此之外,CaMKII受细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)变化的调节,但是动态波动的[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>对于CaMKII激活的数量关系目前还不清楚,CaMKII的功能变化在心律失常等心脏疾病的发生上起到推波助澜的重要作用<sup>[76-77]</sup>。

## 4 展望

综上所述,RyR为结构复杂的大分子通道蛋白复合体的核心组分,由于它在第二信使Ca<sup>2+</sup>运输调节中的关键作用,自该蛋白被发现且其基因被克隆以来,有关它的深入研究不断被报道。随着近年来冷冻电镜技术和荧光共振能量转移等新技术的出现,各类RyR亚型结构的细节也不断清晰。同时,随着RyR在生物体各个体系中的复杂功能的揭示,研究者发现的有关该类蛋白调节分子的种类也在不断增加。RyR在其调节因子的共同作用下,控制细胞内ER钙库的钙释放,T-小管膜的去极化引起肌肉细胞Ca<sup>2+</sup>释放进而启动肌肉细胞收缩。细胞内的许多因子包括Ca<sup>2+</sup>、咖啡因、ryanodine、钙调蛋白、隐钙素FKBP12/12.6、PKA和CaMKII等都对RyR的功能具有极其重要的调控作用。

RyR在骨骼肌和心肌兴奋收缩耦联中的作用和功能日趋清晰,但对其调节因子在骨骼肌和心肌疾病治疗中的作用等许多功能仍有待研究。RyR基因的突变直接导致心血管疾病的产生,这已从人类遗传学分析和哺乳动物模式大/小鼠等大量实验数据中得到证实;利用RyR突变模式小鼠而进行的心血管药物筛选的研究工作证实,调节心肌细胞RyR、抑制钙泄漏可有效地防止心衰的进一步恶化。因而,研究人员相信,围绕RyR功能和功能调节因子形成的复合结构的深入工作,对揭示心血管疾病分子机理和研发相关治疗药物意义重大。RyR导致的钙

火花现象最早发现于卵子发育阶段,它在心肌细胞中的巨大作用促使发育生物学工作者思考RyR复合体在卵子成熟过程中的作用,显然该方向的工作将对揭示动物胚胎早期发育具有十分重要的意义。另外,作为一个进化相对保守的分子,RyR从低等动物秀丽线虫到高等昆虫果蝇以及哺乳动物和鸟类中特异性的变化是否能为分子进化学提供更加坚实的依据,也是生物学家关注的问题。当然,进化过程中各物种形成的RyR的特异结构是否能为研发畜牧业特异性应用药物提供思路和线索也是吸引科技工作者的重要原因。

## 参考文献 (References)

- 1 Kushnir A, Marks AR. The ryanodine receptor in cardiac physiology and disease. *Adv Pharmacol* 2010; 59: 1-30.
- 2 Endo M. Calcium-induced calcium release in skeletal muscle. *Physiol Rev* 2009; 89(4): 1153-76.
- 3 Lanner JT, Georgiou DK, Joshi AD, Hamilton SL. Ryanodine receptors: Structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2(11): 1-21.
- 4 Coronado R, Morrisette J, Sukhareva M, Vaughan DM. Structure and function of ryanodine receptors. *Am J Physiol* 1994; 266(6 Pt 1): C1485-504.
- 5 O'Brien J, Meissner G, Block BA. The fastest contracting muscles of nonmammalian vertebrates express only one isoform of the ryanodine receptor. *Biophys J* 1993; 65(6): 2418-27.
- 6 Oyamada H, Murayama T, Takagi T, Iino M, Iwabe N, Miyata T, et al. Primary structure and distribution of ryanodine-binding protein isoforms of the bullfrog skeletal muscle. *J Biol Chem* 1994; 269(25): 17206-14.
- 7 Hamada T, Sakube Y, Ahnn J, Kim DH, Kagawa H. Molecular dissection, tissue localization and Ca<sup>2+</sup> binding of the ryanodine receptor of *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol* 2002; 324(1): 123-35.
- 8 Vázquez-Martínez O, Cañedo-Merino R, Díaz-Muñoz M, Riesgo-Escovar JR. Biochemical characterization, distribution and phylogenetic analysis of *Drosophila melanogaster* ryanodine and IP3 receptors, and thapsigargin-sensitive Ca<sup>2+</sup> ATPase. *J Cell Sci* 2003; 116(Pt 12): 2483-94.
- 9 Mattei MG, Giannini G, Moscatelli F, Sorrentino V. Chromosomal localization of murine ryanodine receptor genes RYR1, RYR2, and RYR3 by in situ hybridization. *Genomics* 1994; 22(1): 202-4.
- 10 Amador FJ, Stathopoulos PB, Enomoto M, Ikura M. Ryanodine receptor calcium release channels: Lessons from structure-function studies. *FEBS J* 2013; 280(21): 5456-70.
- 11 Takeshima H, Iino M, Takekura H, Nishi M, Kuno J, Minowa O, et al. Excitation-contraction uncoupling and muscular degeneration in mice lacking functional skeletal muscle ryanodine-receptor gene. *Nature* 1994; 369(6481): 556-9.
- 12 Takeshima H, Yamazawa T, Ikemoto T, Takekura H, Nishi M, Noda T, et al. Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in myocytes from dyspedic mice lacking the type-I ryanodine receptor. *EMBO J* 1995;



- 14(13): 2999-3006.
- 13 Takeshima H. Intracellular Ca<sup>2+</sup> store in embryonic cardiac myocytes. *Front Biosci* 2002; 7: d1642-52.
  - 14 Zou Y, Liang Y, Gong H, Zhou N, Ma H, Guan A, *et al.* Ryanodine receptor type 2 is required for the development of pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Hypertension* 2011; 58(6): 1099-110.
  - 15 Hotta S, Morimura K, Ohya S, Muraki K, Takeshima H, Imaizumi Y. Ryanodine receptor type 2 deficiency changes excitation-contraction coupling and membrane potential in urinary bladder smooth muscle. *J Physiol* 2007; 582(Pt 2): 489-506.
  - 16 Takeshima H, Ikemoto T, Nishi M, Nishiyama N, Shimuta M, Sugitani Y, *et al.* Generation and characterization of mutant mice lacking ryanodine receptor type 3. *J Biol Chem* 1996; 271(33): 19649-52.
  - 17 Hakamata Y, Nakai J, Takeshima H, Imoto K. Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain. *FEBS Lett* 1992; 312(2/3): 229-35.
  - 18 Du GG, Khanna VK, MacLennan DH. Mutation of divergent region 1 alters caffeine and Ca<sup>2+</sup> sensitivity of the skeletal muscle Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor). *J Biol Chem* 2000; 275(16): 11778-83.
  - 19 Stathopoulos PB, Seo MD, Enomoto M, Amador FJ, Ishiyama N, Ikura M. Themes and variations in ER/SR calcium release channels: Structure and function. *Physiology (Bethesda)* 2012; 27(6): 331-42.
  - 20 van Petegem F. Ryanodine receptors: Structure and function. *J Biol Chem* 2012; 287(38): 31624-32.
  - 21 Wagenknecht T, Samsó M. Three-dimensional reconstruction of ryanodine receptors. *Front Biosci* 2002; 7: d1464-74.
  - 22 Xu X, Bhat MB, Nishi M, Takeshima H, Ma J. Molecular cloning of cDNA encoding a drosophila ryanodine receptor and functional studies of the carboxyl-terminal calcium release channel. *Biophys J* 2000; 78(3): 1270-81.
  - 23 Serysheva II, Ludtke SJ, Baker ML, Cong Y, Topf M, Eramian D, *et al.* Subnanometer-resolution electron cryomicroscopy-based domain models for the cytoplasmic region of skeletal muscle RyR channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(28): 9610-5.
  - 24 Schatz M, van Heel M, Chiu W, Hamilton SL. Structure of the skeletal muscle calcium release channel activated with Ca<sup>2+</sup> and AMP-PCP. *Biophys J* 1999; 77(4): 1936-44.
  - 25 Fill M, Copello JA. Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev* 2002; 82(4): 893-922.
  - 26 Haarmann CS, Green D, Casarotto MG, Laver DR, Dullhanty AF. The random-coil C fragment of the DHPR II-III loop can activate or inhibit native skeletal RyR. *BioChem J* 2003; 372(Pt 2): 305-16.
  - 27 Marx SO, Marks AR. Dysfunctional ryanodine receptors in the heart: New insights into complex cardiovascular diseases. *J Mol Cell Cardiol* 2013; 58: 225-31.
  - 28 Baker KD, Edwards TM, Rickard NS. The role of intracellular calcium stores in synaptic plasticity and memory consolidation. *Neurosci Biobehav Rev* 2013; 37(7): 1211-39.
  - 29 Mackrill JJ. Ryanodine receptor calcium channels and their partners as drug targets. *Biochem Pharmacol* 2010; 79(11): 1535-43.
  - 30 Lamb GD. Excitation & Contraction Coupling In Skeletal Muscle: Comparisons with Cardiac Muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000; 27(3): 216-24.
  - 31 Laver DR, Lenz GK, Lamb GD. Regulation of the calcium release channel from rabbit skeletal muscle by the nucleotides ATP, AMP, IMP and adenosine. *J Physiol* 2001; 537(Pt 3): 763-778.
  - 32 Meissner G. Regulation of mammalian ryanodine receptors. *Front Biosci* 2002; 7: d2072-80.
  - 33 Laver DR, Baynes TM, Dullhanty AF. Magnesium inhibition of ryanodine-receptor calcium channels: Evidence for two independent mechanisms. *J Memb Biol* 1997; 156(3): 213-29.
  - 34 Meissner G. Adenine nucleotide stimulation of Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1984; 259(4): 2365-74.
  - 35 Kermode H, Williams AJ, Sitsapesan R. The interactions of ATP, ADP, and inorganic phosphate with the sheep cardiac ryanodine receptor. *Biophys J* 1998; 74(3): 1296-304.
  - 36 Pessah IN, Stambuk RA, Casida JE. Ca<sup>2+</sup>-activated ryanodine binding: Mechanisms of sensitivity and intensity modulation by Mg<sup>2+</sup>, caffeine, and adenine nucleotides. *Mol Pharmacol* 1987; 31(3): 232-8.
  - 37 Shirokova N, Ríos E. Caffeine enhances intramembranous charge movement in frog skeletal muscle by increasing cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> concentration. *J Physiol* 1996; 493(Pt 2): 341-56.
  - 38 Herrmann-Frank A, Luttgau HC, Stephenson DG. Caffeine and excitation-contraction coupling in skeletal muscle: A stimulating story. *J Muscle Res Cell Motil* 1999; 20(2): 223-37.
  - 39 Rousseau E, Ladine J, Liu QY, Meissner G. Activation of the Ca<sup>2+</sup> release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by caffeine and related compounds. *Arch Biochem Biophys* 1988; 267(1): 75-86.
  - 40 Ritter M, Su Z, S pitzer KW, Ishida H, Barry WH. Caffeine-induced Ca<sup>2+</sup> sparks in mouse ventricular myocytes. *Am J Physiol* 2000; 278(2): 666-9.
  - 41 Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 2002; 415(6868): 198-205.
  - 42 Tang W, Sencer S, Hamilton SL. Calmodulin modulation of proteins involved in excitation-contraction coupling. *Front Biosci* 2002; 7: d1583-9.
  - 43 Ohrtman J, Ritter B, Polster A, Beam KG, Papadopoulos S. Sequence differences in the IQ motifs of CaV1.1 and CaV1.2 strongly impact calmodulin binding and calcium-dependent inactivation. *J Biol Chem* 2008; 283(43): 29301-11.
  - 44 Halling DB, Georgiou DK, Black DJ, Yang G, Fallon JL, Quiocho FA, *et al.* Determinants in CaV1 channels that regulate the Ca<sup>2+</sup> sensitivity of bound calmodulin. *J Biol Chem* 2009; 284(30): 20041-51.
  - 45 Tripathy A, Xu L, Mann G, Meissner G. Calmodulin activation and inhibition of skeletal muscle Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor). *Biophys J* 1995; 69(1): 106-19.
  - 46 Yang HC, Reedy MM, Burke CL, Strasburg GM. Calmodulin interaction with the skeletal muscle sarcoplasmic reticulum calcium channel protein. *Biochemistry* 1994; 33(2): 518-25.
  - 47 Fruen BR, Bardy JM, Byrem TM, Strasburg GM, Louis CF. Differential Ca<sup>2+</sup> sensitivity of skeletal and cardiac muscle ryanodine receptors in the presence of calmodulin. *Am J Physiol* 2000; 279(3): C724-33.
  - 48 Moore CP, Rodney G, Zhang JZ, Santacruz-Toloza L, Strasburg G, Hamilton SL. Apocalmodulin and Ca<sup>2+</sup> calmodulin bind to the same region on the skeletal muscle Ca<sup>2+</sup> release channel. *Biochemistry* 1999; 38(26): 8532-7.

- 49 Balshaw DM, Xu L, Yamaguchi N, Pasek DA, Meissner G. Calmodulin binding and inhibition of cardiac muscle calcium release channel (ryanodine receptor). *J Biol Chem* 2001; 276(23): 20144-53.
- 50 Ozawa T. Modulation of ryanodine receptor  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Mol Med Rep* 2010; 3(2): 199-204.
- 51 Wei L, Hanna AD, Beard NA, Dulhunty AF. Unique isoform-specific properties of calsequestrin in the heart and skeletal muscle. *Cell Calcium* 2009; 45(5): 474-84.
- 52 Postma AV, Denjoy I, Hoorntje TM, Lupoglazoff JM, Da Costa A, Sebillon P, *et al.* Absence of calsequestrin 2 causes severe forms of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ Res* 2002; 91(8): 21-6.
- 53 Knollmann BC, Chopra N, Hlaing T, Akin B, Yang T, Etensohn K, *et al.* Casq2 deletion causes sarcoplasmic reticulum volume increase, premature  $\text{Ca}^{2+}$  release, and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Clin Invest* 2006; 116(9): 2510-20.
- 54 MacMillan D. FK506 binding proteins: Cellular regulators of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signalling. *Eur J Pharmacol* 2013; 700(1/2/3): 181-93.
- 55 Kang, CB, Hong Y, Dhe-Paganon S, Yoon HS. FKBP family proteins: Immunophilins with versatile biological functions. *Neurosignals* 2008; 16(4): 318-25.
- 56 Chelu MG, Danila CI, Gilman CP, Hamilton SL. Regulation of Ryanodine receptors by FK506 binding proteins. *Trends Cardiovasc Med* 2004; 14(6): 227-34.
- 57 Gaburjakova M, Gaburjakova J, Reiken S, Huang F, Marx SO, Rosemlit N, Marks AR. FKBP12 binding modulates ryanodine receptor channel gating. *J Biol Chem* 2001; 276(20): 16931-5.
- 58 Zissimopoulos S, Lai FA. Interaction of FKBP12.6 with the cardiac ryanodine receptor C-terminal domain. *J Biol Chem* 2005; 280(7): 5475-85.
- 59 Masumiya H, Wang R, Zhang J, Xiao B, Chen SRW. Localization of the 12.6-kDa FK506-binding protein (FKBP12.6) binding site to the NH2-terminal domain of the cardiac  $\text{Ca}^{2+}$  release channel (ryanodine receptor). *J Biol Chem* 2003; 278(6): 3786-92.
- 60 Sharma MR, Jeyakumar LH, Fleischer S, Wagenknecht T. Three-dimensional visualization of FKBP12.6 binding to an open conformation of cardiac ryanodine receptor. *Biophys J* 2006; 90(1): 164-72.
- 61 van Acker K, Bultynck G, Rossi D, Sorrentino V, Boens N, Misaen L, *et al.* The 12 kDa FK506-binding protein, FKBP12, modulates the  $\text{Ca}^{2+}$ -flux properties of the type-3 ryanodine receptor. *J Cell Sci* 2004; 117(Pt 7): 1129-37.
- 62 Lanner JT, Georgiou DK, Joshi AD, Hamilton SL. Ryanodine receptors: Structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2(11): 1-21.
- 63 Shou W, Aghdasi B, Armstrong DL, Guo Q, Bao S, Charng MJ, *et al.* Cardiac defects and altered ryanodine receptor function in mice lacking FKBP12. *Nature* 1998; 391(6666): 489-92.
- 64 Xin HB, Senbonmatsu T, Cheng DS, Wang YX, Copello JA, Ji GJ, *et al.* Oestrogen protects FKBP12.6 null mice from cardiac hypertrophy. *Nature* 2002; 416(6878): 334-8.
- 65 Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemlit N, *et al.* PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): Defective regulation in failing hearts. *Cell* 2000; 101(4): 365-76.
- 66 Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken SR, Deng SX, Vest JA, Cervantes D, *et al.* Protection from cardiac arrhythmia through ryanodine receptor-stabilizing protein calstabin2. *Science* 2004; 304(5668): 292-6.
- 67 Wehrens XH, Lehnart SE, Huang F, Vest JA, Reiken SR, Mohler PJ, *et al.* FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell* 2003; 113(7): 829-40.
- 68 Danila CI, Hamilton SL. Phosphorylation of ryanodine receptors. *Biol Res* 2004; 37(4): 521-5.
- 69 Chu A, Sumbilla C, Inesi G, Jay SD, Campbell KP. Specific association of calmodulin-dependent protein kinase and related substrates with the junctional sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Biochemistry* 1990; 29(25): 5899-905.
- 70 Varsányi M, Meyer HE. Sarcoplasmic reticular  $\text{Ca}^{2+}$  release channel is phosphorylated at serine 2843 in intact rabbit skeletal muscle. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995; 376(1): 45-9.
- 71 Reiken S, Lacampagne A, Zhou H, Kherani A, Lehnart SE, Ward C, *et al.* PKA phosphorylation activates the calcium release channel (ryanodine receptor) in skeletal muscle: Defective regulation in heart failure. *J Cell Biol* 2003; 160(6): 919-28.
- 72 Chelu MG, Sarma S, Sood S, Wang S, van Oort RJ, Skapura DG, *et al.* Calmodulin kinase II-mediated sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  leak promotes atrial fibrillation in mice. *J Clin Invest* 2009; 119(7): 1940-51.
- 73 Curran J, Brown KH, Santiago DJ, Pogwizd S, Bers DM, Shannon TR. Spontaneous Ca waves in ventricular myocytes from failing hearts depend on  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin-dependent protein kinase II. *J Mol Cell Cardiol* 2010; 49(1): 25-32.
- 74 Neef S, Dybkova N, Sossalla S, Ort KR, Fluschnik N, Neumann K, *et al.* CaMKII-dependent diastolic SR  $\text{Ca}^{2+}$  leak and elevated diastolic  $\text{Ca}^{2+}$  levels in right atrial myocardium of patients with atrial fibrillation. *Circ Res* 2010; 106(6): 1134-44.
- 75 Xiao B, Jiang MT, Zhao M, Yang D, Sutherland C, Lai FA, *et al.* Characterization of a novel PKA phosphorylation site, Serine-2030, reveals no PKA hyperphosphorylation of the cardiac ryanodine receptor in canine heart failure. *Circ Res* 2005; 96(8): 847-55.
- 76 Vincent KP, McCulloch AD, Edwards AG. Toward a hierarchy of mechanisms in CaMKII mediated arrhythmia. *Front Pharmacol* 2014; 5: 110.
- 77 Heijman J, Voigt N, Wehrens XH, Dobrev D. Calcium dysregulation in atrial fibrillation: the role of CaMKII. *Front Pharmacol* 2014; 5: 30.