

Sarkoplazmik-Endoplazmik Retikulum Ca^{+2} ATPaz İnhibisyonunun Tavşan Merkezi Kulak Arter Kasılmalarındaki İşlevi

Role of Sarcoplasmic-Endoplasmic Reticulum Ca^{+2} ATPase Inhibition on Contractions of Central Ear Artery of Rabbit

Yasemin ERAÇ¹, Metiner TOSUN¹

¹ Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, İzmir

Özet

Amaç: Bu çalışmada depo-kontrollü (kapasitatif) Ca^{+2} girişinin periferik bir damar olan tavşan merkezi kulak arterinde kasılmaya kenetlenip kenetlenmediğinin araştırılması amaçlandı.

Yöntem: Tavşanlar (erkek, 2.5-3 kg, n=5) intrakardiyak sodyum pentobarbital enjeksiyonu ile öldürüldüler. Endotel hücreleri uzaklaştırılmış merkezi kulak arter halkaları (3 mm) izole edildi ve gazlandırılan (%95 O_2 +%5 CO_2) fizyolojik tuz çözeltisi (Krebs, 37°C) içeren organ banyolarına alındı. Stabilizasyon sonrası dokular 60 mM potasyum klorür ile uyarıldı. Her bir ajana bağlı kasılabilir yanıtın plato fazında selektif sarkoplazmik-endoplazmik retikulum- Ca^{+2} ATPaz inhibitörü siklopiazonik asit uygulandı.

Bulgular: Hücre içi Ca^{+2} depolarını tamamen boşalttığı gösterilen derişimde (10 μM) siklopiazonik asit herhangi bir kasılmaya neden olmadı. Potasyum klorür (30 mM) ve noradrenalinin (100 nM) neden olduğu kasılmalar siklopiazonik asit ile artmazken siklopiazonik asit varlığında serotonin (300 nM) kasılmaları belirgin düzeyde potansiyelize oldu ($p<0.01$).

Sonuç: Bulgular, depo-kontrollü Ca^{+2} girişi sonucu artan hücre içi Ca^{+2} derişiminin periferik damarlarda da kasılabilir aparat içermeyen sitozolik kompartmanlarda "hapsedilebileceğini" ve serotonin reseptör etkinleşmesi ile kasılmaya kenetlenebileceğini düşündürmektedir. Sonuç olarak bulgularımız, noradrenalin reseptöründen farklı olarak, serotonin reseptörlerinin de endotelin ve prostaglandin reseptörleri için önerilene benzer şekilde sıkı olarak sınırlanmış özelleşmiş kompartmanların plazma membranları üzerinde yerleşmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Sözcükler: siklopiazonik asit, depo-kontrollü Ca^{+2} girişi, sarkoplazmik-endoplazmik retikulum Ca^{+2} ATPaz inhibisyonu, tavşan kulak arteri, serotonin

Abstract

Objective: This study investigated whether the store-operated (capacitative) Ca^{+2} entry is coupled to contraction in a peripheral blood vessel, central ear artery of the rabbit.

Method: Rabbits (male, 2.5-3 kg, n=5) were sacrificed via intracardiac sodium pentobarbital injection. Endothelium-denuded central ear artery rings (3 mm) were isolated and placed in organ baths containing physiological salt solution (Krebs, 37°C) gassed with (95% O_2 +5% CO_2). Following the stabilization period, tissues were stimulated with 60 mM potassium chloride. A selective sarcoplasmic reticulum- Ca^{+2} ATPase inhibitor, cyclopiazonic acid was applied during the steady-state contraction of each agents.

Results: Cyclopiazonic acid at concentration (10 μM) which shown to deplete intracellular Ca^{+2} stores did not elicit any contraction. Potassium chloride- (30 mM) and norepinephrine- (100 nM) induced contractions were not enhanced by cyclopiazonic acid whereas serotonin contractions were significantly potentiated in the presence of cyclopiazonic acid ($p<0.01$).

Conclusion: The data suggest that increased intracellular Ca^{+2} concentration resulting from store-operated Ca^{+2} entry may also be restricted in non-contractile intracellular compartments in peripheral artery smooth muscle cells and coupled to contraction via serotonin receptor activation. In conclusion, unlike adrenoceptors, the data suggest that serotonin receptors could also be located in the plasma membrane over these subsarcolemmal compartments similar to that suggested for endothelin and prostaglandin receptors.

Key Words: cyclopiazonic acid, store-operated Ca^{+2} entry, sarcoplasmic-endoplasmic reticulum Ca^{+2} ATPase inhibition, rabbit central ear artery, serotonin

Mersin Univ Sağlık Bilim Derg, 2008;1(3):36-41

Geliş Tarihi : 02.12.2008

Kabul Tarihi : 23.12.2008

Yazışma Adresi:

Dr. Metiner TOSUN,

Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,

Farmakoloji Anabilim Dalı, 35100 Bornova- İzmir

Tel : 0-232-3885266

Faks : 0-232-3884687

E-posta : metiner.tosun@ege.edu.tr

Giriş ve Amaç

Hücre içi kalsiyum iyon derişimindeki ($[Ca^{+2}]_i$) yer ve zamana bağılı değişiklikler, birçok farklı hücreyel olayı düzenlemektedir (1). Hücre içi Ca^{+2} derişimindeki artış; 1) hücre içi depolardan Ca^{+2} salıveriliş ile, 2) hücre membranındaki kalsiyum iyonuna geçirgen katyon kanallarından Ca^{+2} girişi ile ya da 3) her iki yolak ile gerçekleşebilmektedir (2). Hücre içine Ca^{+2} girişi voltajduyarlı (*voltage-operated Ca^{+2} channels*, VOCC) ve -duyarsız Ca^{+2} kanalları ile gerçekleşmektedir. Voltajduyarlı olmayan Ca^{+2} kanalları arasında reseptör-kontrollü Ca^{+2} (*receptor-operated calcium channels*; ROCC) ve depokontrollü Ca^{+2} kanalları (*store-operated Ca^{+2} channels*; SOCC) bulunmaktadır (3). SOC ya da kapasitatif kalsiyum girişi etkinleşmesine; 1) hücre içi Ca^{+2} depolarının inositol 1,4,5-trifosfat (IP_3) ile boşalması ya da 2) siklopiazonik asid (CPA) (4), tapsigarjin (5) gibi ajanlar ile SR içine Ca^{+2} alımını sağlayan sarkoplazmik-endoplazmik retikulum (SR) Ca^{+2} ATPaz (*Sarcoplasmic-Endoplasmic Reticulum Ca^{+2} ATPase*, SERCA) pompasının selektif inhibisyonu sonucunda pasif olarak hücre içi depoların boşaltılmasının neden olduğu bilinmektedir (6). SOC girişi ile hücre içerisine giren Ca^{+2} hücre membranı ile SR arasındaki kompartmanda hapsedilerek kasılma oluşturmazken (7,8) yine bu kompartmanda bulunan protein kinaz C (PKC) etkinleşmesi ile kasılmaya neden olduğu önerilmiştir (9,10).

Dokulara giden kan akımının yerel gereksinimler doğrultusunda kontrollü devamlılığının sağlanmasının vücut için yaşamsal önemi vardır. İstenmeyen periferik vazospastik olguların dolaşım sisteminin bütünlüğünü olumsuz açıdan etkilemesi nedeniyle periferdeki damar düz kas hücrelerinde bulunan mekanizmaların tam olarak açıklığa kavuşması önemlidir. Bu çalışmanın amacını daha önceden önerdiğimiz SOC girişinin sıçan torasik aortunda 1) kasılabilir olmayan bir kompartmanda sınırlandırıldığı, 2) membran depolarizasyonu ile değişmediği ve 3) PKC etkinleşmesi ile kasılmaya kenetlendiği hipotezimizi (9) serotonin (5-HT) ve noradrenalin (NA) kullanarak periferik bir arter modelinde test etmek oluşturmaktadır. Bu amaçla tavşan merkezi kulak arteri kullanılmıştır.

Yöntem

Tüm hayvanlara Amerikan Ulusal Bilim Akademisi tarafından hazırlanan ve Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Etik Kurulu tarafından da benimsenen "Laboratuvar Hayvanlarının Bakım ve Kullanım Rehberi" kriterlerine göre muamele edilmiştir. Özetle, anestezi altında intrakardiyak sodyum pentobarbital (100 mg/kg, 5 ml hacim içerisinde) enjeksiyonu ile öldürülen (11) tavşanların (erkek, 2.5-3 kg, n=5) kulaklarından alınan merkezi kulak arteri, soğutulmuş ve gazlandırılmış Krebs çözeltisi (mM olarak içeriği: 118 NaCl, 4.7 KCl, 2.5 $CaCl_2$, 1.17 $MgSO_4$, 1.2 KH_2PO_4 , 11.1 Glukoz ve 25 $NaHCO_3$, endojen prostanoid sentezini elimine etmek amacıyla 10 μM indometazin

eklenmiştir) içine alınmış ve etrafındaki yağ dokusu temizlenmiştir (12). Her bir merkezi kulak arteri 3 mm'lik halkalar halinde kesilmiştir. Damar halkaları lümeninden geçirilen iki paslanmaz çelik tel aracılığı ile sıcaklığı 37 °C'de sabit tutulan ve karbojen gaz karışımı (%95 O_2 ve %5 CO_2) ile gazlandırılan 25 ml Krebs çözeltisi içeren cam organ banyolarına takılmıştır. Üstteki çelik tel doğrudan bir izometrik kuvvetölçere (Force-displacement transducer, FDT 10-A Commat, Ankara) bağlanmıştır. Merkezi kulak arter preparatı 15 dakika dengelenmesi için öngerimsiz bırakıldıktan sonra her bir doku kademeli olarak tavşan kulak merkezi arteri için daha önceden belirlenen optimum dinlenim gerilimi olan 0.75 g'ye gerilmiştir. Öngerim sonrası, damarlar 1 saatlik stabilizasyon süresince 15 dakikalık aralarla Krebs çözeltisi ile yıkanmıştır. Stabilizasyon sonrası dokular 60 mM potasyum klorür (KCl) ile stimüle edilmişlerdir. KCl (10 mM-120 mM), 5-HT (10^{-9} - 3×10^{-5} M) ve NA (10^{-9} - 3×10^{-5} M) kümülatif doz yanıt eğrileri alınarak her bir ajanın maksimal doza göre yaklaşık %30'luk kasılma yapan derişimleri belirlenmiştir. Kasılmaya neden olan ajanın yanıtları üzerine CPA'nın olası eklenici etkisini görebilmek amacıyla her bir ajanın maksimum yanıtın %30'unu oluşturan derişimleri kullanılmıştır. Sırasıyla KCl (30 mM) ve NA (100 nM), 5-HT (300 nM) ile kastrılan dokularda gözlenen kasılma yanıtı plato düzeyinde iken CPA (10 μM) uygulanmıştır. CPA yanıtları plato düzeyine ulaştığında verapamil (1 μM) uygulanmıştır. Tüm organ banyosu ölçümleri dijital veri kazanım sistemi (Biopac System Inc., ABD) ile izlenerek kaydedilmiştir.

İstatistiksel Yöntem

Tüm veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. "n" deneyde kullanılan denek sayısını göstermektedir. Ortalamalar arasındaki farkın anlamlılığı Student's t-testi ile analiz edilmiştir. $p < 0.05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular

SERCA'nın selektif bir inhibitörü olan 10 μM CPA'nın Ca^{+2} depolarını boşaltarak Ca^{+2} derişimini artırdığı bilinmekle birlikte izole merkezi kulak arter preparatında kasılmaya neden olmamıştır.

CPA'nın KCl Yanıtları Üzerine Etkisi

KCl hücre membranını depolarize ederek VOCC aracılıklı Ca^{+2} girişine neden olmaktadır. 10 μM CPA kullanımına bağılı olarak artan hücre içi Ca^{+2} derişiminin, VOCC ile Ca^{+2} girişine neden olan KCl kasılmaları üzerine eklenici bir etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Önce kontrol amaçlı olarak 30 mM KCl yanıtı plato düzeyinde iken L-tipi Ca^{+2} kanal blokörü verapamilin (1 μM) etkinliği test edilmiştir (Şekil 1). KCl (30 mM) ile

kasılma yanıtı alındıktan sonra plato düzeyinde iken 10 μM CPA uygulandığında anlamlı bir değişiklik gözlenmezken kasılmaları 1 μM verapamil tamamen inhibe etmiştir (Şekil 2).

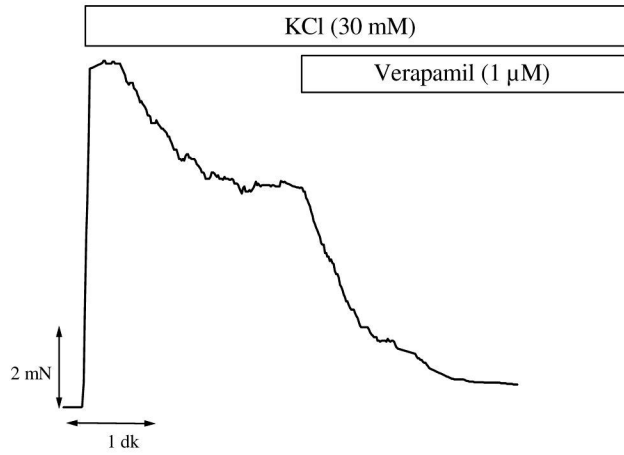
CPA'nın NA Yanıtları Üzerine Etkisi

Reseptör- aracılıklı kasılma oluşturan bir agonist olan NA'nın 10 μM CPA'nın neden olduğu hücre içi Ca^{+2} derişimindeki artışı kasılmaya kenetleyip kenetleyemeyeceği araştırılmıştır. NA (100 nM) ile oluşan plato kasılma yanıtı üzerinde CPA artış oluşturmamıştır ($p=0.3259$). Oluşan yanıtın Ca^{+2} duyarlılığını test etmek amacıyla deney protokolünün sonunda verapamil (1 μM) uygulanmıştır. Agonist kontraksiyonlarında verapamil ile %100 gevşeme

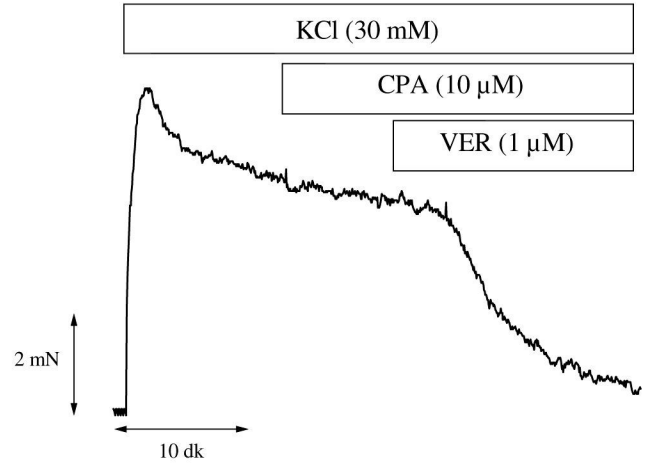
beklenmezken CPA sonrası uygulanan verapamil yanıtlarında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir ($p=0.6524$)(Şekil 3).

CPA'nın 5-HT Yanıtları Üzerine Etkisi

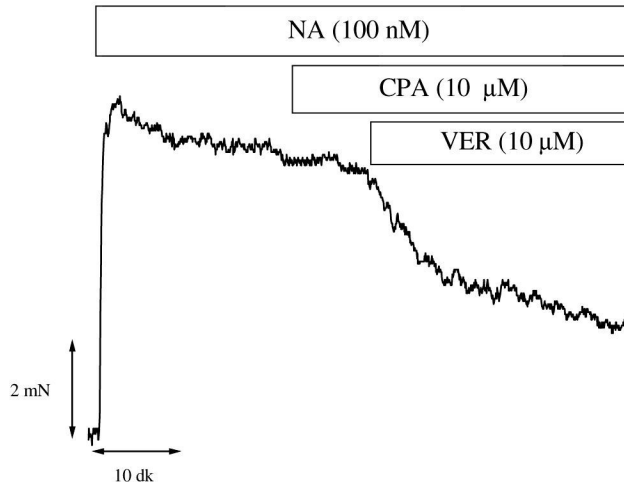
KCl ve NA ile yapılan deneylerden farklı olarak CPA, 5-HT'nin (300 nM) neden olduğu kasılma yanıtlarını anlamlı olarak artırmıştır ($p<0.01$, eşleştirilmiş Student's t testi, $n=5$) (Şekil 4, Tablo 1). Tablo 1'de bütün yanıtlar % agonist plato yanıtına normalize edilmiştir ve kontrol koşullarında agonist yanıtları gevşeme eğiliminde olduğu için 15 dk sonraki değerleri dikkate alınarak gevşeme yanıtları % olarak hesaplanmıştır.



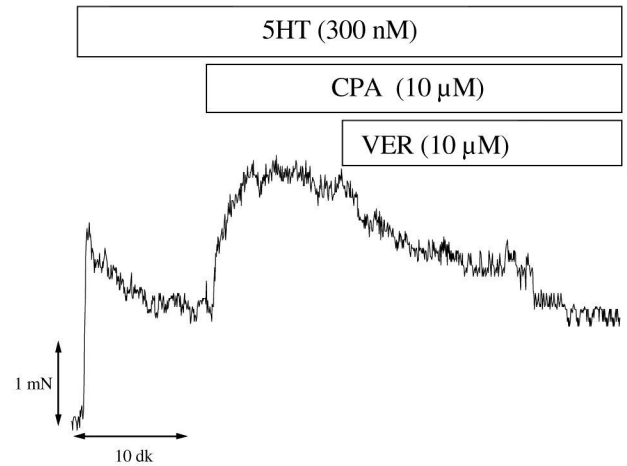
Şekil 1. Potasyum klorür (KCl) kasılması üzerine verapamilin etkisi.



Şekil 2. Potasyum klorür (KCl) kasılması üzerine siklopiazonik asidin (CPA) ve verapamilin (VER) etkileri.



Şekil 3. Noradrenalin (NA) kasılması üzerine siklopiazonik asidin (CPA) ve verapamilin (VER) etkileri.



Şekil 4. Serotonin (5-HT) kasılması üzerine siklopiazonik asidin (CPA) ve verapamilin (VER) etkileri.

Tablo 1. Potasyum klorür (KCl, 30 mM), noradrealin (NA, 100 nM) ve serotonin (5-HT, 300 nM) maksimum plato kasılma yanıtları üzerine siklopiazonik asidin (CPA) etkisi.

	KCl (%)	NA (%)	5-HT (%)
Kontrol	-13 ± 4	-26 ± 5	-9 ± 3
+ CPA	-12 ± 2	-34 ± 9	53 ± 6 **

** $p < 0.01$, 5-HT yanıtlarının CPA varlığında ve yokluğunda karşılaştırması, eşleştirilmiş Student's t testi, n=5).

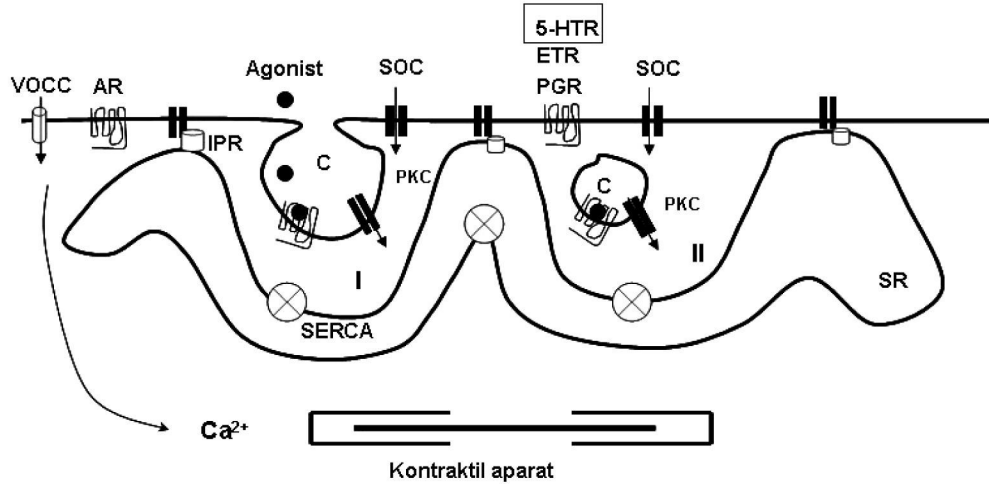
Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada sıçan mezenterik arterinde agoniste duyarlı yüzeyel SR'leri selektif olarak boşalttığı gösterilen (13) serotoninin ilk defa noradrenalinden farklı olarak tavşan merkezi kulak arterinde SOC'yi kasılmaya kenetlediği gösterilmiştir. Bulgularımız SOC girişinin, periferik damarlarda da kasılabilir aparat içermeyen yüzeyel SR'ler tarafından sınırlandırılmış, hücre içi kompartmanlarda "hapsedilebileceğini" düşündürmektedir. Ayrıca bu kompartmanda derişimi artan kalsiyum 5-HT reseptör etkinleşmesi ile kasılmaya kenetlenilebilir (Şekil 5).

Hipotezimiz 1) 10 μ M CPA'nın vasküler dokularda hücre içi Ca^{+2} derişimini artırdığı gösterilmiş olmasına

rağmen (3) herhangi bir kasılmaya neden olmaması, 2) KCl ve NA kasılmalarının CPA'dan etkilenmemesi ve 3) CPA varlığında 5-HT kasılmalarının anlamlı düzeyde potansiyelize olması gözlemleri ile desteklenmektedir (Tablo 1).

CPA'nın hücre içi Ca^{+2} depolarının tamamen boşalmasına neden olan derişimde (10 μ M) (4) hücre içi serbest Ca^{+2} derişimini artırdığı halde önemli düzeyde kasılmaya neden olmadığı bildirilmiştir (9). Çalışmalarımız sonucunda membran potansiyelindeki değişimlere duyarlı VOCC'lerin açılmasına neden olarak hücre içi Ca^{+2} derişimini artıran ve kasılmaya neden olan KCl yanıtları üzerinde yine $[Ca^{+2}]_i$ artışına neden olan CPA'nın herhangi bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Sıçan torasik aortunda $[Ca^{+2}]_i$ artışı ve kasılmayı eşzamanlı olarak izlediğimiz önceki bir çalışmamızda, aynı derişimdeki KCl ile benzer düzeyde $[Ca^{+2}]_i$ artışına neden olan 1 μ M CPA'nın KCl kasılmalarını potansiyelize etmemesi CPA'nın kasılabilir aparat içermeyen bir hücre içi kompartmanda $[Ca^{+2}]_i$ artışına neden olabileceğini düşündürmüştü (9). Gelincik portal veninde yapılan bir çalışmada SOC artışlarının KCl kasılmalarını etkilememesi nedeniyle de aynı yorumda bulunulmuştur (14). Tavşan femoral arteri ile yapılan



Şekil 5. Vasküler düz kas hücresinde reseptör-efektör sistemlerinin sitozolik kompartmanlarla olan ilişkisini öneren model. Prostaglandin ve endotelin reseptörlerinin (sırası ile PGR ve ETR) yanı sıra serotonin (5-HT) reseptörünün (5-HTR) de özelleşmiş subsarkolemmal alanlara yakınlığı biri tarafımızdan önceden ileri sürülen iki modelin (9,16) bileşkesi üzerinde gösterilmektedir. Şekilde aynı yüzeyel sarkoplazmik retikulum (SR) ile sınırlandırılmış komşu iki kompartmanda (I ve II) gerçekleşen ardışık süreçler gösterilmektedir. Oklar Ca^{+2} girişini göstermektedir. VOCC ile hücreye giren Ca^{+2} , engellenmeden kasılabilir aparata ulaşır. Adrenerjik reseptörlerin (AR) ise kompartman dışında olduğu düşünülmektedir. 5-HT uygulaması ve CPA- aracılıklı SERCA inhibisyonu (⊗) sonrasında, depo-kontrollü Ca^{+2} kanalları (store-operated Ca^{+2} channels, SOCC) ile kompartmanlarda artan Ca^{+2} kaveola (C) üzerinde bulunan reseptörün internalizasyonunu kolaylaştırır. Deponun boşalmasının IP_3 reseptörleri (IPR) ve SOC kanalları ile membrana iletilmesi ve ekstraselüler kalsiyumun doğrudan SR içine alındığı düşünülmektedir (21). Kaveola ile kompartmana internalize olan reseptörler (II) membrandan geçemeyen antagonistlerinden etkilenmez. SOC kompartmanda protein kinaz C (PKC) tarafından kasılmaya kenetlenir (9).

diğer bir çalışmada da SERCA'yı inhibe eden doğal kaynaklı bir madde olan tapsigarjinin artırdığı hücre içi Ca^{+2} derişiminin kasılmaya yol açmadığı gösterilmiştir (15). Söz konusu üç çalışmada kullanılan damarlardan periferik bir damar olması nedeniyle farklılık gösteren tavşan izole merkezi kulak arter preparatı ile yaptığımız çalışmalar kasılabilir aparat içermeyen kompartmanın küçük çaplı damarlarda da işlevsel olabileceğini düşündürmektedir.

Bazı reseptörlerin özellikle söz konusu subsarkolemmal kompartmanları çevreleyen plazma membranlarında yerleşmiş olabileceği ve bu reseptörlerin efektör/ikinci ulak sistemlerinin de bu özelleşmiş kompartmanlar içinde tetiklendiği ET_A reseptör/ IP_3 ve $PGF_{2\alpha}/IP_3$ sistemleri için ileri sürülmüştür (16). Özellikle düz kas, endotel hücreleri ve fibroblastlarda daha yoğun olarak bulunan kolesterol ve proteinden zengin özelleşmiş membran bölgelerinin oluşturduğu 60-80 nm çapında kaveola olarak tanımlanan kap benzeri girintilerin endositoz, transitoz, kalsiyum sinyali ve diğer birçok sinyal iletim yolağında rol oynadığı bilinmektedir (17). Kaveolanın temel proteini olan kaveolin-1 (Cav-1) geni taşımayan transgenik farede kaveolar yapı oluşmaması kodlanan proteinin işlevsel olduğunu göstermektedir (18). SOC girişinden sorumlu olduğu öne sürülen (19) "Transient receptor potential canonical" (TRPC) proteinlerinden TRPC1 (20), TRPC3 (21), TRPC4 (22) ve endotelin reseptörünün (23) kaveolada Cav-1 ile birlikte buldukları gösterilmiştir. TRPC3'ün Cav-1 ve diğer proteinlerle (IP_3 reseptörü, SERCA, $G_{\alpha q/11}$, fosfolipaz C β) oluşturduğu kompleksin internalizasyonunun TRPC3 kanal etkinliğinin kaybolmasına neden olduğu gösterilmiştir (21). Sıçan torasik aortunda ise ET_A reseptör blokörü BQ123 $ET-1$ yanıtlarını tamamen bloke ederken SERCA inhibisyonu varlığında $ET-1$ kasılmalarını kısmen bloke edebilmiştir (24). Bu durum SOC girişinin ETR internalizasyonunu artırarak vazokonstriksiyonun uzamasına neden olacağını düşündürmüştür (Şekil 5) (24). Ayrıca Cav-1'in eNOS ile negatif yönde etkileştiği ve asetilkolinin neden olduğu endotelyuma bağımlı gevşeme yanıtlarını azalttığı gösterilmiştir (25,26).

RNA-interferans yöntemi ile Cav-1 ekspresyonunun baskılandığı bir çalışmada Cav-1'in 5-HT reseptör sinyal yolağının yeni bir modülatörü olduğunun gösterilmesi (27) ve 5-HT reseptörünün kaveolar yerleşiminin (28) bildirilmesi fonksiyonel çalışmalarımızdan elde ettiğimiz bulgulara dayanılarak önerilen 5-HT reseptörünün özel kompartmanlardaki yerleşimini desteklemektedir.

Tüm bu bilgiler doğrultusunda SERCA inhibisyonu sonucu artan $[Ca^{+2}]_i$, vasküler ve endotelial Ca^{+2} sinyal yolaklarında görev alan kaveolada yerleşmiş bu proteinlerin Cav-1 proteini ile etkileşmesine neden olarak sinyal iletiminin baskılanmasına ya da stimülasyonuna neden olmaktadır. Klinik yönden bakıldığında kaveolada yerleşmiş bu proteinlerin rol aldığı fizyolojik ya da patolojik olayların bu açıdan da değerlendirilmesi önemlidir. Cav-1 ile ilgili gerçekleştirilen son çalışmalar bu proteinin özellikle kardiyak, pulmoner ve vasküler işlevler açısından

vazgeçilmez bir protein olduğunu göstermiştir. Bu anlamda Cav-1 ile etkileştiği ya da kaveolar yerleşimi önerilen 5-HT, ET, PG reseptörleri ve eNOS gibi enzimler ile ilgili sinyal yolaklarının aydınlatılması özellikle kalp ve damar hastalıkları açısından tedavide yeni yaklaşımlar sağlayabilecektir.

Kaynaklar

1. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4(7):517-29.
2. Carafoli E. Calcium--a universal carrier of biological signals. Delivered on 3 July 2003 at the Special FEBS Meeting in Brussels. *Febs J* 2005;272(5):1073-89.
3. McFadzean I, Gibson A. The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. *Br J Pharmacol* 2002;135(1):1-13.
4. Seidler NW, Jona I, Vegh M, Martonosi A. Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1989;264(30):17816-23.
5. Thastrup O. Role of Ca^{2+} -ATPases in regulation of cellular Ca^{2+} signalling, as studied with the selective microsomal Ca^{2+} -ATPase inhibitor, thapsigargin. *Agents Actions* 1990;29(1-2):8-15.
6. Targos B, Baranowska J, Pomorski P. Store-operated calcium entry in physiology and pathology of mammalian cells. *Acta Biochim Pol* 2005;52(2):379-409.
7. Blaustein MP, Golovina VA. Structural complexity and functional diversity of endoplasmic reticulum Ca^{2+} stores. *Trends Neurosci* 2001;24(10):602-8.
8. Papp S, Dziak E, Michalak M, Opas M. Is all of the endoplasmic reticulum created equal? The effects of the heterogeneous distribution of endoplasmic reticulum Ca^{2+} -handling proteins. *J Cell Biol* 2003;160(4):475-9.
9. Tosun M, Paul RJ, Rapoport RM. Coupling of store-operated Ca^{++} entry to contraction in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;285(2):759-66.
10. Abe F, Mitsui M, Karaki H, Endoh M. Calcium compartments in vascular smooth muscle cells as detected by aequorin signal. *Br J Pharmacol* 1995;116(7):3000-4.
11. Amir A, Kadar T, Chapman S, Turetz J, Levy A, Babin M, Ricketts K, Brozetti J, Logan T, Ross M. The Distribution Kinetics of Topical 14C-Sulfur Mustard in Rabbit Ocular Tissues and the Effect of Acetylcysteine. *J Toxicol Cutaneous Ocul Toxicol* 2003;22(4):201-214.

12. Rapoport RM. Effects of norepinephrine on contraction and hydrolysis of phosphatidylinositols in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 1987;242(1):188-94.
13. Golovina VA, Blaustein MP. Spatially and functionally distinct Ca^{2+} stores in sarcoplasmic and endoplasmic reticulum. *Science* 1997;275(5306):1643-8.
14. Abe F, Karaki H, Endoh M. Effects of cyclopiazonic acid and ryanodine on cytosolic calcium and contraction in vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1996;118(7):1711-6.
15. Ushio-Fukai M, Yamamoto H, Nishimura J, Hirano K, Kanaide H. The mechanism of the decrease in cytosolic Ca^{2+} concentrations induced by angiotensin II in the high $\text{K}^{(+)}$ -depolarized rabbit femoral artery. *Br J Pharmacol* 2000;129(3):437-47.
16. Karaki H, Ozaki H, Hori M, Mitsui-Saito M, Amano K, Harada K, Miyamoto S, Nakazawa H, Won KJ, Sato K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol Rev* 1997;49(2):157-230.
17. Parton RG, Simons K. The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8(3):185-94.
18. Razani B, Lisanti MP. Caveolin-deficient mice: insights into caveolar function human disease. *J Clin Invest* 2001;108(11):1553-61.
19. Ambudkar IS, Ong HL, Liu X, Bandyopadhyay B, Cheng KT. TRPC1: the link between functionally distinct store-operated calcium channels. *Cell Calcium* 2007;42(2):213-23.
20. Lockwich TP, Liu X, Singh BB, Jadowiec J, Weiland S, Ambudkar IS. Assembly of Trp1 in a signaling complex associated with caveolin-scaffolding lipid raft domains. *J Biol Chem* 2000;275(16):11934-42.
21. Lockwich T, Singh BB, Liu X, Ambudkar IS. Stabilization of cortical actin induces internalization of transient receptor potential 3 (Trp3)-associated caveolar Ca^{2+} signaling complex and loss of Ca^{2+} influx without disruption of Trp3-inositol trisphosphate receptor association. *J Biol Chem* 2001;276(45):42401-8.
22. Torihashi S, Fujimoto T, Trost C, Nakayama S. Calcium oscillation linked to pacemaking of interstitial cells of Cajal: requirement of calcium influx and localization of TRP4 in caveolae. *J Biol Chem* 2002;277(21):19191-7.
23. Bergdahl A, Gomez MF, Dreja K, Xu SZ, Adner M, Beech DJ, Broman J, Hellstrand P, Sward K. Cholesterol depletion impairs vascular reactivity to endothelin-1 by reducing store-operated Ca^{2+} entry dependent on TRPC1. *Circ Res* 2003;93(9):839-47.
24. Tosun M, Erac Y, Selli C, Karakaya N. Sarcoplasmic-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase inhibition prevents endothelin A receptor antagonism in rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292(4):H1961-6.
25. Bucci M, Gratton JP, Rudic RD, Acevedo L, Roviezzo F, Cirino G, Sessa WC. In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. *Nat Med* 2000;6(12):1362-7.
26. Garcia-Cardena G, Martasek P, Masters BS, Skidd PM, Couet J, Li S, Lisanti MP, Sessa WC. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J Biol Chem* 1997;272(41):25437-40.
27. Bhatnagar A, Sheffler DJ, Kroeze WK, Compton-Toth B, Roth BL. Caveolin-1 interacts with 5-HT_{2A} serotonin receptors and profoundly modulates the signaling of selected G α q-coupled protein receptors. *J Biol Chem* 2004;279(33):34614-23.
28. Dreja K, Voldstedlund M, Vinten J, Tranum-Jensen J, Hellstrand P, Sward K. Cholesterol depletion disrupts caveolae and differentially impairs agonist-induced arterial contraction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22(8):1267-72.