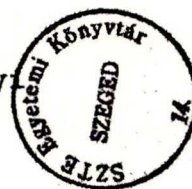


AZ AKTOMIOZIN SZUPERPRECIPITÁCIÓJA

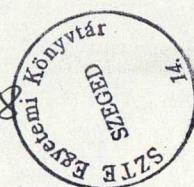
Komárné, Jakab György



Orvosi- biológiai doktori disszertáció
SZEGED, 1973.



B 5048



E 1.123

I.

TARTALONJEGYZÉK

A. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

BEVEZETÉS	1	oldal
I. AZ IZOM STRUKTURFEHÉRJEK	7	"
I.1. Az izomrost felépítése	9	"
I.2. A miofibrillum szerkezete	9	"
I.3. A miozin sajátosságai	13	"
I.4. Az aktin sajátosságai	18	"
I.5. Az aktomiozin sajátosságai	20	"
II. A SZUPERPRECIPITÁCIÓ, MINT AZ IZOMKONTRAKCIÓ		
MODELLJE	25	oldal
II.1. A szuperprecipitáció létrehozása	26	"
II.2. A szuperprecipitáló aktomiozin komplex		
fiziko-kémiai változása	27	"
II.3. Az aktomiozin clearing és szuperprecipitáci- ójának kapcsolata az izom relaxáció és kontrakció fázisaival	32	"

II.

II.4. A clearinget, a szuperprecipitációt és az

ATP-áz aktivitást befolyásoló faktorerok	34 oldal
a./ a szubsztrát specifitás	34 "
b./ a kétértékű ionok hatása	36 "
c./ a relaxáló ágensek hatása	38 "

B. KISÉRLETES RÉSZ

II.1. A szuperprecipitáció létrehozása 40 oldal

II.2. Szuperprecipitáló aktomiozin rendszerek

folyamatának követése	60 "
a./ Szabad szemmel való megfigyelés	61 "
b./ Turbidimetriás módszer	61 "
c./ Sorozat ATP-áz mérés	64 "
d./ Viskozitás mérés	68 "

II.3. Különböző arányu aktomiozin rendszerek szuperprecipitációja 69 "

II.4. A szuperprecipitátum elkülönítése és

tulajdonságainak vizsgálata	71 "
-----------------------------------	------

III. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK 78 "

ÖSSZEFOGLALÁS	104 "
---------------------	-------

A KISÉRLETBEN HASZNÁLT MÓDSZEREK ÉS

KÖRÜLMÉNYEK	108 "
-------------------	-------

IRODALOM	113 "
----------------	-------

BEVEZETÉS

Az izomban lejátszódó kontrakciós folyamat pontos biokémiai mechanizmusának felderítése régóta vizsgált kérdés.

Az ATP kémiai energiáját mechanikai munkává alakító rendszer, az izom strukturfehérjék kutatása sok új adatot tárt fel. A vázizom kontraktilis fehérjeire vonatkozó ismereteink fejlődését áttekintve azt látjuk, hogy izolálásukra, tisztításukra, analízisükre használt módszerek tökéletesedése következtében miofibrilláris fehérjék keveréke helyett már az egyedi kontraktilis proteinek vizsgálata került előtérbe.

1864-ben Kühne vázizomból ^{nagy} magas ionerősségű sóoldattal egy viszkozus fehérjét vont ki, amelyet miozinnak nevezett. Évtizedekig ezekről a miozin preparátumokról azt tartották, hogy egyetlen fehérjéből állnak. 1941-ben Banga I. és Szent-Györgyi /Banga I. és Szent-Györgyi, 1941/ közölték megfigyelésüket, hogy darált izomból neutrális sóoldattal történő hosszantartó extrakcióval nyert miozin /miozin- B-nek nevezték el/ a rövid extrakcióval nyert miozin A preparátumtól eltérő tulajdonságokat mutatott. Összetételük részletes vizsgálata a két alapvető strukturfehérje, az aktin és miozin felfedezéséhez vezetett. /Straub, 1942, 1943, Guba, 1943/. A rövid ideig tartó extrakció során keletkezett miozin A igen kevés aktint tartalmazott, míg

a hosszantartó extrakcióval nyert miozin B lényegében két protein komplex: aktin + miozin az egyenlő az aktomiozinnal.

Több szerző / Perry és Corsi, 1958; Drabikowski és Gergely, 1962; Laki és mtsai, 1962; Martonis, 1962 / leírta az aktin preparátumokban újabb strukturféherje a tropomiozin jelenlétét, melyet korábban Bailey izolált /Bailey, 1948/ már izomból. Sze-repe az aktin és miozin kölcsönhatás regulálásában van /Katz, 1964/.

Röviddel azután, hogy az aktin tropomiozin szennyezését felismerték Katz /Katz, 1965, 1966/ azt találta, hogy a tropomiozin tartalmu aktin preparátum egy másik féherjét is tartalmaz. Ez a féherje a troponin mely a tropomiozinnal együtt érzékennyé teszi az aktomiozint, hogy képes legyen a Ca^{++} közvetítésére az ingerületi-kontrakciós /excitation-contraction/ folyamat összekapcsolásában. A troponin regulátor szereppel bír. A troponin Ca^{++} távollétében gátolja az aktin-miozin összekapcsolódását, így a miofibrillumok relaxált állapotban maradnak. A troponin jelentős Ca^{++} affinitásu. Ha a Ca^{++} van a rendszerben olyan komplex jön létre, mely az aktin és miozin kapcsolódását már nem gátolja, így létrejöhet a kontrakció. A troponint először Ebashi és Kodoma /Ebashi és Kodoma, 1965/ izolálta teljes izomból.

Legújabban Hartshorne és mtsai /Hartshorne, 1969/ olyan bizonyítékokról számoltak be, hogy a troponin is két féherjéből áll, melyek közül az egyik a troponin A a miozin és aktin közötti kapcsolatot gátolja, a másik a troponin B pedig a kontraktilis

apparátus Ca^{++} receptoraként működik.

Igy a régi, csak miozinnak tartott preparátumról bebizonyosodott, hogy legalább négy különböző fehérjét /miozin, aktin, tropomiozin, troponin/, de lehet hogy még több strukturfé debateszt is tartalmaz. Azóta már más regulátor fehérjék jelenlétét is igazolták /pl. α -aktin, β - aktinin, mero-miozin /Naylor W.G. 1970/.

Guba és mtsai /Guba, 1963/a; 1963/b/ megfigyelték, hogy a miozin, aktin és tropomiozin eltávolítása után a miofibrillum filamentozus szerkezete megtartott, azonban a fibrillin nevű új strukturfé debateszt kivonása után megszűnik. Ugy tűnik, hogy ez a struktúrális fehérje adja a miofibrillum filamentozus alapszerkezetét. /Guba és mtsai, 1964, Guba, 1968/.

Bár az izomműködésben szerepet játszó egyes alkotórészek morfológiai és funkcionális sajátosságairól sokat tudunk már, a kontrakció és relaxáció pontos biokémiai mechanizmusa még vitatott. Nehezíti a kérdést az, hogy a szubcelluláris /molekuláris/ szinten kapott eredményeket kell összekapcsolni egy lényegesen magasabb szervezetségi fokon álló szövet működésének eredményével a mozgással.

A különböző szinten nyert ismereteket a kémiai, biokémiai, élettani vizsgáló módszerekkel nyert eredményeket úgy kell szintézisben hozni, hogy azok a működő izom egésze és vizsgált részei közötti dialektikus egységet tükrözzék.

A részeredmények helyes értékelésének fontosságát hangsúlyozza Szent-Györgyi /Szent-Györgyi, 1956/, alábbi idézete:

" Sok bonyodalom tulajdonítható annak, hogy a miozin az enzim definícióját kimeríti, mivel ATP-ből ADP-t és P_i -t hoz létre, anélkül, hogy maga felhasználná. Lényegét tekintve azonban a miozin nem enzim, funkciója nem az ATP hasítása, hanem az, hogy mozgást produkál. " / Much confusion.... is due to the fact that, in some ways, myosin conforms to the definition of an enzyme since it makes ADP phosphate out of ATP without self being used up. But, in other ways, myosin is not an enzyme at all, for its function is not to split ATP, but to produce motion. Szent-Györgyi General views on the chemistry of muscle contraction. /Fortschr. Kardiol. 1. 6-51, 1956, Szent-Györgyi/.

A modell-kísérletek, ha szemelőtt tartjuk érvényességük határait, jó megközelítést jelenthetik az izomműködés bonyolult folyamatának, mivel egyszerűsítik és biokémiai vizsgálatok számára hozzáférhetőbbé teszik a kémiai energia mechanikai munkává alakításának sokrétű folyamatát.

Nem célom az izom modellek részletes ismertetése, ezért csak röviden utalnék az ezen modellekkel kapcsolatos legfontosabb megfigyelésekre.

A natív izom szerkezetéhez legközelebb álló modell a glicerinnel extrahált izomrost /Szent-Györgyi, 1949/ megfelelő

körülmények között nemcsak kvalitatív, hanem kvantitatív is megközelíti az élő izom működési sajátosságait /Weber és Portzehl, 1952/. Ezen a modellen bizonyították be, hogy az aktomiozin és ATP közötti reakció képezi a fiziológiai izomkontrakció fizikai-kémiai alapját /Weber, 1951/.

A miofibrillum szuszpenzió /Perry, 1951, 1958/ az izom működés elemi egységeit izoláltan tartalmazza. Fáziskontraszt-mikroszkóppal jól látható az egyes miofibrillumok harántcsíkolata, valamint ATP hatására megfelelő körülmények között bekövetkező kontrakciójuk.

A glicerinnel extrahált izomrost és a miofibrillum-szuszenzió az izom mikroszkópos szerkezetét megtartó modellrendszerek.

A strukturfelhórjából izolálásuk után létrehozott modellrendszerek: az aktomiozin szál és az aktomiozin rendszer jellegzetes kolloidális változása a szuperprecipitáció.

Engelhardt és Szent-Györgyi egymástól függetlenül észlelték 1940-ben, hogy ^{K_{in}} az ~~az~~ alacsony ionerősségű /0,1 M KCl/ oldatba fújt aktomiozin szál fizikai sajátosságai ATP hatására megváltoznak. Engelhardt az aktomiozin szálak nyújthatóságának növekedését írta le. Szent-Györgyi pedig kontrakciójukat. Az aktomiozin szálak kontrakciója nagyon hasonlít az izomrostok működésére /Weber, 1951, Weber és Portzehl, 1952/, lényeges különbség azonban, hogy míg az izomrost működésekor rövidül

és vastagszik, az aktomiozin szál minden irányban rövidül.

Szent-Györgyi ezt a különbséget azzal magyarázta, hogy a szálban a fehérje micellák orientálatlanok, szemben az izommal /Szent-Györgyi, 1951/.

Szent-Györgyi /Szent-Györgyi, 1941-1942/ írta le először, hogy ATP hatására az aktomiozin szuszpenzió sajátos körülmények között különös kolloid jelenség játszódik le, az u.n. szuperprecipitáció. A jelenség lényege a fehérje-rendszerben ATP hatására létrejövő szerkezeti változás, látható jele az AM /aktomiozin/ flokkulusok aggregálódása, dehidratálódása és zsugorodása. *Nagyobb*
~~Kegazabb~~ ATP koncentráció hatására azonban a szuperprecipitáció fázisát u.n. clearing fázis előzi meg, mely az aktomiozin oldat feltisztulásában nyilvánul meg.

A clearing és szuperprecipitáció körülményei között olyan molekuláris rendezettségbeli változás jön létre az aktomiozin rendszerben, mely analógiába állítható az izomműködés során bekövetkező változásokkal.

Disszertációmban a szuperprecipitáló aktomiozin rendszer molekuláris rendezettség változásaira, a miozin és aktin molekulák közötti arány és kölcsönhatás természetére vonatkozó vizsgálataimról számolok be.

I. AZ IZOM STRUKTURFEHÉRJÉK.

I. 1. Az izomrost felépítése.

A vázizom a gyors, akaratlagos mozgások végzésére differenciálódott szövet. Rostos felépítésű. A rostokon mikroszkóppal jól látható harántcsíkolt az izom strukturfelhérjéinek egyenlőtlen eloszlásából következő fénytörési különbségekből adódik.

Az izomrostot szarkolemma határolja, mely típusos "unit membrán" szerkezetű plazmamembránból és azt kívülről borító basális membránból áll. Funkciója egyrészt anyagok és ionok aktiv transzportja, másrészt az ingerület elektromos jelenségei játszódhatnak le rajta.

A szarkoplazma, vagy izom- cytoplazma különböző sejt-organellumokat és a miofibrillumokat tartalmazó homogén intracelluláris anyag. Az u.n. hialoplazma matrix a vizoldékony miogén fehérje frakciókat tartalmazza, melyben a glikolízis enzimjei találhatóak.

A sejtmagok többnyire a határhártya közelében helyezkednek el, anyaguk olyan retikuláris szerkezetű, mely a rost kontrakciója és relaxációja során változhat.

A mitokondriumok a miofibrillumok közvetlen szomszédságában találhatóak, az energiaháztartásban rendkívül fontosak, belső

membránjuk redőzött felszínén az u.n. krisztákon helyezkednek el a terminális oxidáció és oxidatív foszforilálás enzimrendszerei. A mitokondriumok száma a vörösiszomban több, mint a fehérizomban, és a számuk és az izom aktivitása között határozott összefüggés van. Sok és erősen strukturált mitokondrium az izom aktív anyagcseréjét tükrözi, közvetlen közelségük a miofibrillumokhoz pedig az izom-kontrakció nagy ATP igényére utal.

Az izom működése szempontjából igen fontos membránrendszer az egész citoplazmát behálózó csőrendszer, melyet összefoglalóan szarko - tubuláris rendszernek neveznek. Két komponense van: a szarkoplazmatikus retikulum és a transzverz tubulusok rendszere, az u.n. T-rendszer.

A szarkoplazmatikus retikulum a miofibrillumokkal párhuzamosan haladó, azokat körülvevő, egymással összefüggő csatornák és ciszternák rendszere. Legjellemzőbb tulajdonsága, hogy Ca^{++} -t képes felszabadítani és visszakötni koncentráció gradiens ellenében is. A T-rendszer a felszíni szarkolemmális membrán mély betüremkedéseiből jön létre, tulajdonképpen az extracelluláris tér meghosszabbításainak tekinthetők. Funkciójuk a sejt depolarizációját követő impulzus gyors vezetése a sejt belsejébe.

A szarkoplazmatikus retikulum csatornái a miofibrillumok Z vonalai szintjében a T-rendszer tubulusaival igen szoros

kapcsolatba kerülnek triádjaik, pentádjaik révén.

A szarkotubuláris rendszer igen fontos szerepet játszik az ingerület - kontrakció - relaxáció folyamatának létrehozásában. A membrán ingerületet követően Ca^{++} szabadul fel a szarkoplazmatikus retikulumból, ez aktiválja kontrakcióra a miofibrillumokat, azután a szarkoplazmatikus retikulum Ca-pumpa mechanizmusa révén a Ca^{++} -t visszaszívja, és ezzel az izom relaxációnak megfelelő intracelluláris Ca^{++} szintet hoz létre. Ezért a szarkoplazmatikus retikulumot relaxáló-faktornak is nevezik.

Az izom-citoplazma, mint említettem a sejtorganellek mellett a miofibrillumokat tartalmazza. A miofibrillum az izomműködés legkisebb morfológiai és funkcionális egysége.

I. 2. A miofibrillum szerkezete.

A miofibrillumok a szarkoplazmában elosztva, vagy igen sokszor keresztmetszetben poligonális alaku csoportokban /Conheim-féle mezők/ rendeződnek el.

A miofibrillumokat izoláltan vizsgálva megállapították, hogy a harántcsíkolt szerkezeti fehérjéik egyenletlen eloszlásából ered /Huxley, 1960/.

Csak röviden szeretnék foglalkozni a miofibrillumok filamentáris szerkezetével, valamint az izomműködéssel kapcsolatos

teóriákkal, mivel ezek részletes elemzése meghaladná a disszertáció kereteit.

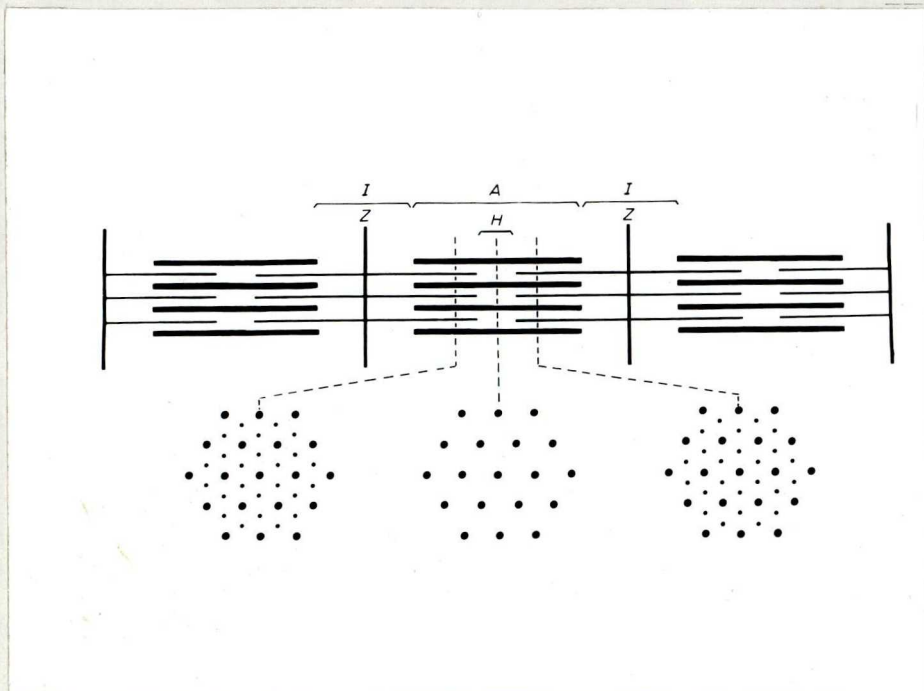
Az elektronmikroszkópos vizsgálatok segítségével láthatóvá vált, hogy a harántesikolt izom miofibrillumai további filamentáris felépítésűek /Richards, Anderson, Haace, 1942; Guba, 1954, Vajda, Guba, Harsányi, 1965, 1966/. Az is megállapítást nyert, hogy a miofibrillum filamentáris felépítése nem egységes. /Huxley, 1957/. Kétféle, vékony és vastag diszkontinuus fonalrendszer építi fel a miofibrillumokat. Strukturfehérjéi két egymástól elkülönült szupramolekuláris rendszerben helyezkednek el.

A két filamentáris rendszer, anélkül, hogy rajtuk külön-külön bármiféle rövidülés, fölszavarodás, stb. lejátszódná, működés során egymásba tolódnak.

Huxley ezen elmélete az u.n. "sliding elmélet".

Huxley elmélete szerint, tehát az izomban kétféle filamentáris rendszer van, a vastag vagy primér fonalak és a vékony vagy szekundér fonalak.

A következő ábrán a miofibrillum felépítését szemléltetem Huxley szerint. / 1.sz. ábra. /



1. sz. ábra.

A miofibrillumok filamentáris felépítése Huxley nyomán.

A miofibrillum ismétlődő egysége a szarkomér, melyet két Z vonal határol. A szarkomér közepén sötét A csík látható, mely erősen kettőstörő /anizotróp/ szélein a két fél I csík világosabb, kevésbé kettőstörő /izotróp/ polarizált fényben.

A vastag fonalak, a primér fonalak, melyek a szarkomér közepén helyezkednek el az M membránon áthaladnak és az I szegmentum határán vakon végződnek.

Ezen fonalak adatai: kb. 100 Å vastagok, 1,5 μ hosszúak. 400 Å távolságra oldalágakat tartalmaznak. Ezek a szekunder fonalak felé mutatnak, és feltehetőleg összeköttetést biztosítanak azokkal.

A primer fonalak elektronmikroszkópos képeken hexagonális kristályrácsban vannak és miozinból épülnek fel.

A vékony fonalak a Z membránhoz rögződnek, az I szegmentum fonalrendszerét adják. Az A szegmentumba benyulnak egészen a H szegmentumig. Az A szegmentumnak ez a szakasza az u.n. overlap - zóna, ahol a primer és szekunder fonalak egyaránt megtalálhatók.

A szekunder fonalak átmérője $50 \text{ \AA}$, a hosszuk 2μ . A szekunder fonalak aktinból épülnek fel.

Huxley felfedezése a kétféle fonalrendszer létezéséről elfogadott, de a fonalak kontinuitása és diszkontinuitása még problematikus.

A filamentáris rendszer tüzetesebb vizsgálatánál Guba megállapította, / Guba, 1966 /, hogy az ismert strukturfehérjék eltávolítása után még egy strukturfehérje izolálható a miofibrillumokból. Ezt a strukturfehérjét Guba fibrillinek nevezi. Elektronmikroszkópos képek alapján azt a következtetést vonta le, hogy a fibrillin a miofibrillumokban egy, a teljes szarkoméron végigfutó alapfilamentáris szerkezetű strukturfehérje.

A primer, szekunder fonalrendszereknek és a fibrillinnek a kapcsolata azonban még nem tisztázott. A tisztázása közelebb visz nyilvánvalóan a kontinuitás és diszkontinuitáshoz.

Az izomfehérjéket két csoportra osztják:

1./ a vizoldékony és

2./ a strukturfehérjékre.

A disszertációmban a vizoldékony fehérjékkel nem foglalkozom, csak a strukturális fehérjékkel.

A strukturfehérjék kinyerése csak megfelelő körülmények között lehetséges. Az extrahálásukat befolyásolja a pH, ionerősség, stb. A vizoldékony fehérjék eltávolítása után az izom alapvető sajátságai megmaradnak.

Részletesen csak a miozinnal, aktinnal és a két fehérje komplexéből kialakuló aktomiozinnal kívánok foglalkozni.

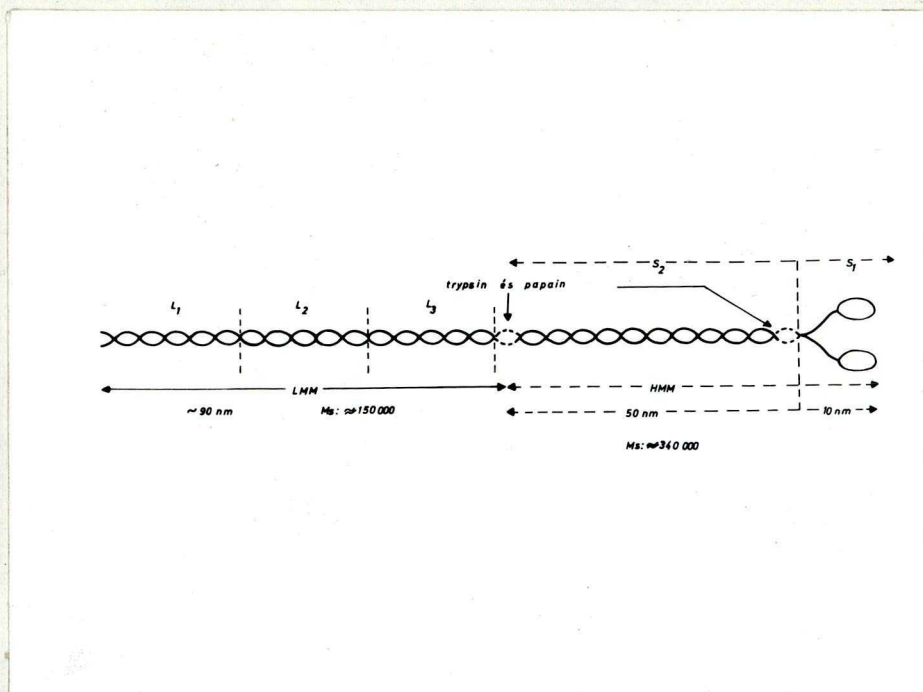
I. 3. A miozin sajátságai.

Relaxált állapotú izomból 0,3 ionerősségű sóoldattal könnyen kioldható a miozin. A miofibrillum fehérjéinek mintegy felét adja. /Hanson, Huxley, 1957, Harsányi, Guba, 1963/a./ Mivel a miozin makromolekula, felvetődik, hogy nem több fizikai-kémiai jól definiálható fehérje komplexek - e?

A miozin molsúlya még jelenleg sem tisztázott, annak ellenére, hogy a vizsgálatok ez irányba igen sokrétűek. A miozin molekula egy hosszú pálca részből, kb. 150 nm és ehhez kapcsolódó globuláris részből, kb. 10 nm tevődik össze. A két rész

együtt adja az erősen elongált, pálcikaszerű molekulát, amelyben a kétfonatos rész egy szakasza, kb. 90 nm az L-meromiozin /LMM/ és a pálcikaszerű rész kb. 50 nm /S₂/ része és a globuláris rész /S₁/ együttesen a H-meromiozin /HMM/. Elnevezésük molekulasúlyuk alapján történt, a ≈ 150.000 molekulasúlyu rész, "light-meromyosin" /LMM/, a ≈ 340.000 molekulasúlyu a "heavy-meromyosin" /HMM/. A miozin molekula sajátosságaiért ez a két komponens a felelős. Az LMM az oldékonyságért, a HMM pedig az aktin-kötő képességért és az ATP-áz aktivitásért.

A 2.sz. ábra világosan szemlélteti a miozin molekula sematikus képét Lowey és mtsai /Lowey, 1969/ szerint.



2. sz. ábra.

A miozin molekula sematikus képe Lowey és mtsai nyomán.

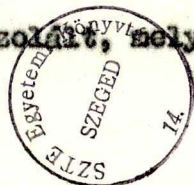
Az ábrán jól látható a molekula azon két pontja, melyek nagyon érzékenyek a proteolitikus enzimhatására.

Az LMM aggregálódásra hajlamos fiziologias körülmények között. Ezen tulajdonság valószínűleg igen nagy szerepet játszik a miozin molekulák filamentumba való beilleszkedésekor. Igen érdekes, hogy a pálca következő része $/S_2/$, mely a két érzékeny pont között van nem aggregálódik sem önmagával, sem az LMM-nal. Fiziologias körülmények között teljesen oldatban van. Az ábrából kitűnik az is, hogy a HMM része az S_2 és S_1 szubfragmentumból tevődik össze.

Biróék feltételezése szerint /Bálint, 1971/ az LMM rész is három részből áll L_1 , L_2 , L_3 -ból.

Ujabb vizsgálatok a miozin molekula peptid láncainak felderítésére irányulnak.

Perrie és Perry /Perrie és Perry, 1970/ a miozint 8 M ureával kezelte, majd keményítő gélben futtatva azt tapasztalta, hogy a preparátum egy része nem hatolt be a gélbe /u.n. H lánc./ a gélbe bejutott rész három kis molekulasúlyu komponenst adott. A H-lánc molekulasúlyának meghatározása céljából a kutatók arra törekedtek, hogy olyan eljárást alkalmazzanak, amely lehetővé teszi a nagy molekulasúlyu komponensek bejutását a gélbe. Sarkar és mtsai /Sarkar, 1970/ Na-dodecilszulfátos gélelektroforézissel a H láncot 200.000 molekulasúlyúnak találta és ezenkívül három "könnyű" peptid láncot izolált, melyeknek molekulasúlya 25.000, 17.000 és 15.000 volt.



A miozin jellegzetes sajátságai közé tartozik a különböző ionokkal szemben tanúsított viselkedése. Különböző kationokat nagy affinitással köti /Szent-Györgyi, 1945, Mihályi, 1950, Erdős, 1948, Weber, 1959, Ebasi, 1963/. Vizsgálataik szerint a miozin vízoldékony fehérje, mely ^{his} ~~alacsony~~ ionerősségen /0,025 M KCl/ gél állapotba megy át, a gél víztartalma 95%. /Szent-Györgyi, 1945/. Ilyen körülmények között a K^+ a fehérje izoelektromospontját megváltoztatja 5,4-ről 6,9-re. Ezért van az, hogy neutrális pH-nél ^{his} ~~alacsony~~ sókoncentráció esetén a fehérje kicsapódik. ^{Nagyobb} ~~Nagyobb~~ KCl koncentráció visszaállítja az eredeti pH = 5,4 izoelektromos pontot, de Mg^{++} , Ca^{++} , és K^+ jelenlétében ismét 6,9 pH felé változik. A Ca^{++} és Mg^{++} kompetícióban vannak a miozin kötőhelyeiért, és a Ca^{++} erősebben kötődik, mint a Mg^{++} /Maruyama, Watanaba, 1962/.

Polianionok pl. ATP nem kötődnek a miozin molekulához csak abban az esetben, ha már van kötött kation a molekulán. Ca^{++} és Mg^{++} ionok, valamint egyvegyértékű kationok jelenléte tehát elősegíti az ATP kötődését a molekulához. ^{his} ~~Alacsony~~ ionerősségen lévő miozin oldódását az ATP elősegíti, de a kötött K^+ nem válnak le a miozin molekuláról. /Szent-Györgyi, 1945/. A megkötődő ATP a molekulának negatív töltést ad, eltolja az izoelektromos pontot és neutrális pH-n oldatba megy a miozin. Az ionkötést nagymértékben befolyásolják a miozin molekula szulfhidril csoportjai. Feltételezések szerint a fehérje több kation kötőhellyel is rendelkezik, melyek kationokkal

szembeni affinitása nem azonos. /Mühlrad, Biró, Vértes, 1962/. A miozin ionkötőképességét azonban igen nagymértékben befolyásolja a másik strukturfehérjének az aktinnak a jelenléte.

A miozin enzim sajátása közül legjelentősebb az ATP-áz aktivitása. A miozin ATP-áz aktivitásánál egy nagymolekulájú fehérje és a viszonylag kismolekulájú ATP kölcsönhatása szerepel. In vitro feltehetőleg az ATP hidrolitikus bontásáról van szó, de a szubsztrát megkötése az enzimfehérjére is módosító hatással van. Szeretném megemlíteni, hogy a miozin nem csupán ATP-re ható enzim. A különböző nukleotid trifoszfátok különböző aktivitással kötődnek a miozin aktiv centrumához. ^{Mivel} ~~Mivel~~ a legkisebb Michaelis konstansa a miozin ATP-nek van, így a miozin ATP-vel mutatja a legnagyobb affinitást.

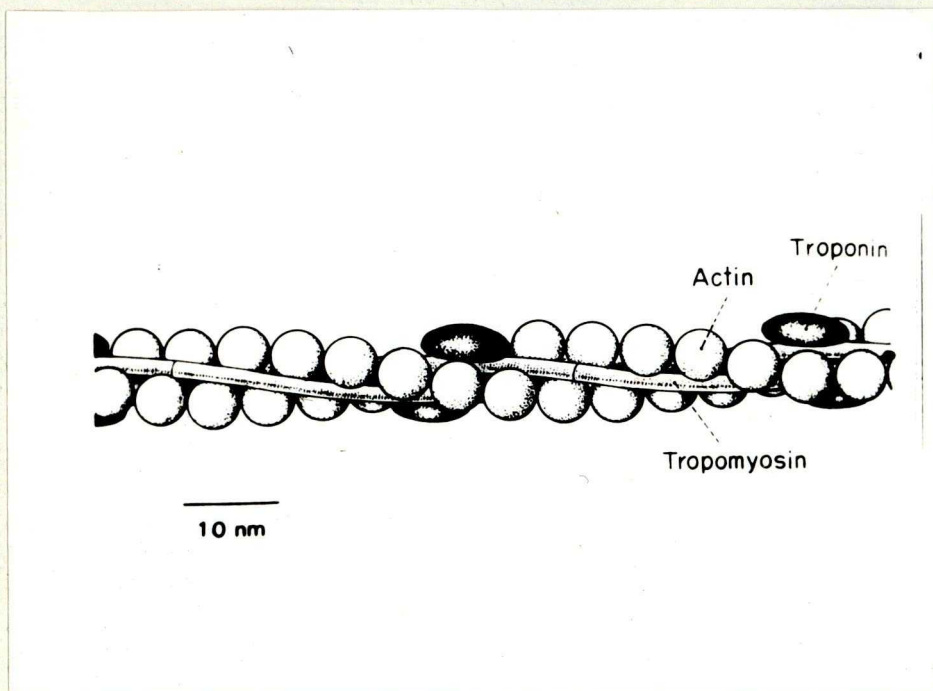
Az ATP-áz folyamatát vizsgálva megállapították /Weber, 1955, Hasselbach, 1957/, hogy a miozin ATP-áz aktivitása nagy sebességgel indul, ezt nevezik iniciális aktivitásnak, majd csökken. Ennek alapján Weber a miozin foszforilációját feltételezi az ATP-áz működés alatt /Gergely, Maruyama, 1960/. Az enzimműködésre, mint ismeretes hatást gyakorol a pH és a hőmérséklet. Az ionok közül a Mg^{++} , Ca^{++} , és a K^+ . Itt említeném meg röviden, hogy ismerünk módosító anyagokat, melyek megváltoztatják a fehérje térszerkezetét, ezáltal a Mg^{++} és Ca^{++} -kal szembeni érzékenység is nagyobb lesz, és az aktivitás fokozódáshoz vezet. Az izomfehérjék közül ilyen módosító szerepe van az aktinnak.

I. 4. Az aktin sajátosságai.

Straub 1942-ben fedezte fel az aktint. /Straub, 1942/. Megállapította, hogy az aktinnak két formája ismeretes: globuláris G-aktin és fibrilláris F-aktin /Straub, 1943/. A G formát monomernek, az F-formát polimérnek tekintik. A miofibrillumban kb. 15-20% aktin van. Előállítás a miozin vagy aktomiozin részleges eltávolítása után acetonos szárazizom-porból történhet /Straub, 1942/. A szárazizomporból előállított aktin G formában van jelen és más fehérjékkel erősen szennyezett, főként tropomiozinnal, troponinnal és aktininnel. A G-aktin szennyezettsége csökkenthető, ha az aktint a szárazporból alacsony hőmérsékleten nyerik ki. Az aktin tisztítása történhet ultracentrifugálással /Spudich, 1971/ ultracentrifugálással és gélszűréssel /Reesy-Young, 1967/. A tisztított G-aktin monomerek polimerizáló sóoldat /0,1 M KCl 1mM $MgCl_2$ / hatására felpolimerizálhatók F-aktinná, és ez a polimerizáció a Mg^{++} koncentráció függvénye.

Az aktin általánosan elfogadott molekulásúlya 60.000.

A következő ábrán / 3.sz.ábra / az aktin filamentum szerkezeti modellje látható Ebashi szerint /Ebashi, 1972/.



3. sz. ábra.

Az aktin filamentum szerkezeti modellje Ebashi nyomán.

Az ábra az aktin monomerekből felépült F-aktin láncot és a regulátor fehérjék elhelyezkedését mutatja. A troponin molekula $400 \text{ \AA}$ távolságban az aktin molekulák között éppen a tropomyozin rost kapcsolódásánál található.

A G-aktin jellemző tulajdonsága, hogy kötött ATP-t tartalmaz. Az ATP a G-aktinra stabilizáló effektust gyakorol. A G-aktin jellegzetes tulajdonsága, hogy só hatására polimerizálódni képes, és ekkor F- formává alakul át. E folyamat együtt jár az adenozin-5'-foszfát defoszforilációjával.

Vizsgálatokat végeztek a nukleotidok és fehérje közötti kölcsönhatásokkal kapcsolatban. Ismert tény, hogy a G-aktinban jelenlévő ATP-t könnyen defoszforilálhatják a különböző enzimek, /pl. hexokináz, apiráz/. A kísérletekből kitűnt, hogy egyensúly van a G-aktinban levő szabad és kötött ATP között. Izotópos vizsgálatokat végeztek és azt találták, hogy a G-aktinhoz kötött ATP könnyen kicserélhető a rendszerben szabad állapotban lévő ATP-vel. Az F-aktinhoz kötött ADP kicserélődésnek hiánya arra utal, hogy ez esetben sokkal erősebb nukleotid-fehérje kapcsolatról van szó.

Annak kimutatása, hogy a G-formájú aktinban a nukleotidok kicserélődése megtörténik, míg az F-aktinban ez hiányzik, lehetővé tette annak tanulmányozását, hogy a G-F-G transzformáció az izom kontrakcióban milyen szerepet játszik.

1. 5. Az aktomiozin sajátosságai.

A fehérjék nagyfokú rendezettségben vannak egymás mellett az izom szerkezetében. Extrahálásukkor egymással képezett komplexeik formájában vannak jelen. Így komplexet képez az aktin és miozin, melyet aktomiozinnak neveznek.

Az aktomiozin a miofibrilláris fehérjéknek 70-80%-át adja. Az izomműködésre vonatkozó elméletek kivétel nélkül az izomműködés középpontjába az aktomiozint állítják.

A mód azonban, ahogy az aktomiozin résztvesz a kontrakció és relaxáció ciklusában még nem teljesen tisztázott.

A disszertációmban az aktomiozin rendszer tulajdonságait abból a szempontból szeretném ismertetni, amely az izom körülményeinek megfelelő.

Az aktomiozint az izomra vonatkozó biokémiai vizsgálatok kezdetén egységes fehérjének tekintették. Kühne által izomból kivont szerkezeti fehérje a "miozin" valójában aktomiozin volt.

Az aktomiozinról, hogy komplex vegyület először Szent-Györgyi mutatta ki. /Banga, Szent-Györgyi, 1941/. Egyik komponensét az aktint Straub, majd a másik komponensét a miozint Guba és Straub mutatták ki. /Straub, 1942, Guba, Straub, 1943, Szent-Györgyi, 1943/.

Ezután már könnyebb volt párhuzamba állítani az izomból közvetlenül kivont B-miozint /természetes aktomiozint/ és a miozinból és aktinból létrehozott mesterséges aktomiozint.

Mint ismeretes, az aktomiozint az izomból Weber-Edsall oldattal történő extrahálással nyerik. /Banga, Szent-Györgyi, 1941, 1942/. Az oldat viszkozitása igen ^{nagy} magas. Tisztítása az aktomiozinnek többszöri átcsapással történhet. Az átcsapás úgy történik, hogy az oldat ionerősségét 0,1 körüli értékre csökkentik, majd ismét 0,5 ionerősségre visszaoldják /Szent-Györgyi, 1945/.

^{Nagy}
~~Magas~~ viszkozitásu aktomiozint nyernek abban az esetben is, ha tisztított miozinból és tisztított F-aktinból állítják elő a mesterséges aktomiozint.

A természetes és mesterséges aktomiozin között ezideig alapvető különbséget nem találtak. Elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján nem találtak differenciát, ultracentrifugás vizsgálatok azonban azt mutatták, hogy az aktinon és a miozinon kívül más komponensek is szerepelnek a természetes aktomiozin komplexben /Guba, Vajda, Szőke, Harsányi, Kovács, 1966/.

A mesterséges aktomiozinban 3 komponenst és a természetes aktomiozinban 5 komponenst találtak.

Guba és mtsai elektronmikroszkópos vizsgálatai eredményeként Huxleyvel egyezően "fenyőág" képződményeket írtak le. /Huxley, 1963, Guba, 1966/.

Ahhoz, hogy a későbbiek során a szuperprecipitáció mechanizmusát érdemben tárgyalhassam, itt szeretnék kitérni a miozin és aktin közötti kapcsolat természetére, valamint az aktin módosító hatására is. Ha tisztított miozin és F-aktin oldatot összekevernek ^{Nagy}~~magas~~ ionerősségen, akkor egy viszkozus anyagot kapnak. Az új fehérje oldat viszkozitása lényegesen ^{magasabb}~~magasabb~~, mint a két kiindulási komponens viszkozitásának összege. Ez arra utal, hogy itt komplex képződés lép fel. A fehérjék összekapcsolódnak. Guba vizsgálatai azt mutatták, hogy a sókoncentráció emelésével a két fehérje közötti kötés megszüntethető /Guba, 1943/ viszkozitása a miozin és aktin viszkozitásának összegére visszaesik. Az akto-

miozin komplex ATP hatására is hasonlóan viselkedik. Pontosabban, ha a komplexhez ATP-t adtak, akkor ez az aktomiozin rendszer kisebb egységekre való bontásához vezetett. Ez a felbomlás azonban csak pillanatszerű. A disszociációt viszkozitás csökkenés jelzi.

Ezt a viszkozitás csökkenéssel járó bomlást nevezik az aktomiozin ATP érzékenységének. Az ATP hatására bekövetkező viszkozitás csökkenés bizonyos intervallumon belül az aktinkoncentrációval is arányos.

A komplex kialakításában jelentős szereppel bírnak a fehérjék reaktív csoportjai. Az aktomiozin komplex létrejöttéhez szükséges a miozin SH csoportjának intaktsága. /Bailey, Perry, 1947/. Az aktinnak a szabad NH_2 csoportja nélkülözhetetlen a komplex kialakításához. A szabad NH_2 a lizintől származik. Ha azonban az aktin szabad SH csoportja vagy a miozin szabad NH_2 csoportja blokkolt akkor még az aktomiozin komplex kialakul.

Az elektronmikroszkópos megfigyelések szerint /Guba, 1966/ ha különböző aktin: miozin arányu aktomiozin komplexeket vizsgáltak azt találták, hogy minden esetben más komplex jön létre. Ez arra enged következtetni, hogy a miozin és az aktin összekapcsolódásakor az aggregálódás más és más lehet, az aránytól függően. Feltételezik, hogy amikor a miozin az F-aktinnal összekapcsolódik a dimér aktinból monomer aktin lesz. Ha a rendszerben ATP is van, akkor ez a folyamat azonnal bekövetkezik és kialakulnak az aktin dimerek. Az ATP elbomlása után az aktin monomer állapotban van. A vizsgálati eredményekből úgy tűnik, hogy az aktomiozin kialakulásakor nem egy egyszerű aktin-miozin rendszer kiala-

kulásáról van szó, hanem egy specifikus elrendeződésről.

Az elektronmikroszkópos vizsgálatok, viszkozitás adatok azt mutatják, hogy az aktin és miozin egyesülésekor keletkező aktomiozin új tulajdonságú anyag, melynek sajátosságai nem additive tevéődnek össze.

Az aktomiozin komplex jellegzetes sajátságokat mutat egy és kétértékű ionok és polianionok jelenlétében. Nevezetesen K^+ , Mg^{++} , Ca^{++} ionok jelenléte, valamint ATP relatív mennyisége a komplex disszociációjához ill. dehidratálódásához vezethet.

A kísérletek azt mutatják, hogy az aktin módosítja a miozin tulajdonságait. Ugy tűnik, hogy különösen a polianionok specifikus kötését és hatását befolyásolja. Az aktin molekula a miozin molekulának igen speciális részeivel kapcsolódik, és így válik a miozin érzékenyebbé ATP-vel szemben.

A miozin ATP-áz aktivitását is az aktin megváltoztatja. Ezt a változást igazolja az a tény, hogy a miozin ATP-áz aktivitását a Ca^{++} jelenléte fokozza, míg a Mg^{++} jelenléte gátolja.

Feltételezik, hogy az ATP és az aktin a miozin molekula ugyanazon helyéhez kötődik. Feltehetőleg az ionok minőségének és mennyiségének igen nagy szerepe lehet abban, hogy a miozin képes legyen aktin és ATP egyidejű megkötésére.

II. A SZUPERPRECIPITÁCIÓ, MINT AZ IZOMKONTRAKCIÓ MODELLJE.

Az előző fejezetben röviden ismertettem az ATP-nek az aktomiozinra gyakorolt hatását. Az ATP másik, régóta ismert és sokat vizsgált hatása az aktomiozinra, a szuperprecipitációnak nevezett szerkezeti átalakulás és ezt az izomkontrakció modelljének tekintik.

Kis
~~Alacsony~~ ionerősségen, mint ismeretes az aktomiozin gélformában van jelen. A legtöbb tanulmányt aktomiozin gélen végezték. A géllal nehezebb dolgozni, de mivel az élő izomban sincs az aktomiozin oldatban, ezért választották összehasonlítási alapnak. A miofibrillumokban azonban a kontraktilis fehérjék szorosabban helyezkednek el és sokkal rendezettebbek, mint az extrahált fehérjékből preparált aktomiozinban.

Mint ismeretes, a miozin specifikus kolloid sajátsággal rendelkező fehérje. Ezen sajátságát befolyásolja a környezetben lévő ionok koncentrációja. A fehérje szől - gél reverzibilis átalakulásra képes. Ezt az átalakulást még speciálisabbá teszi a másik strukturfehérje, az aktin jelenléte.

Az aktomiozin rendszer disszociált - komplex - szől, komplex - szől, hidratált - komplex gél, dehidratált - komplex - gél,

disszociált komplex - gél /miozin-gél/ reversibilis átalakulásra képes.

Itt szeretném ismertetni a szuperprecipitáció létrehozásának körülményeit, valamint a fiziko- kémiai változásokat az aktomiozin komplexben clearing és a szuperprecipitáció során.

II. 1. A szuperprecipitáció létrehozása.

Mint ismeretes, ha az aktomiozinhoz ^{magas} ~~magas~~ ionerősségen /0,5-0,6 M KCl/ ATP-t adnak, akkor erős viszkozitás csökkenés lép fel. Ezt a jelenséget úgy magyarázzák, hogy az aktomiozin disszociál miozinra és F-aktinra. /Gergely, 1959, Johnson P, és Landolt, 1950, Martonosi, Gouvea és Gergely, 1960/.

Mint az előző fejezetben már említettem a miozin és az aktomiozin enzimaktivitását a jelenlévő egy és többértékű ionok erősen befolyásolják. Azonban nemcsak ezen tulajdonságát hanem a komplex kolloid átalakulását is.

Ha az ionerősséget az aktomiozin rendszerben az izomban lévő körülményeknek megfelelően alakítják ki, nevezetesen a $\text{pH} = 7$, az ionerősség kb. $0,13 - 0,15$ és az oldat tartalmaz 10^{-4} M Mg^{++} és 10^{-6} M Ca^{++} is, akkor a fehérje gél formában van jelen. Ha az aktomiozin gélhez ^{magas} ~~magas~~ koncentrációban ATP-t adtak / 10^{-3} M / az ismertetett viszonyok mellett akkor egy

gyors turbiditás csökkenést észleltek, / ez hasonló jelenség, mint a ^{nagy} ~~magas~~ ionerősségnél a viszkozitás csökkenés / és itt is feltételezik, hogy az aktomiozin disszociált állapotban van.

Ezt a szakaszt nevezik clearing fázisnak.

Ha az aktomiozin gél rendszerhez ^{Kis} ~~alacsony~~ koncentrációban adtak ATP-t, akkor ~~egy~~ azonnali turbiditás növekedést észleltek, és a gél összezsugorodott és vizet veszített. Ez a folyamat a szinerézis. A szinerézis a gél térfogat csökkenését eredményezte. Az üledék térfogata kisebb volt, mint az ATP hozzáadása előtt. Ha a folyamat tehát clearing nélkül ^{Kis} ~~alacsony~~ ATP koncentráció mellett megy végbe akkor szinerézisről beszélünk. / Katz, 1970 /.

Ha a rendszerhez 10^{-3} M-nál nagyobb koncentrációban ATP-t adnak a komplex szől állapotba megy át és valószínűleg vagy F-aktinra és miozinra vagy kisebb egységekre bomlik. Ezt a gél - szől átalakulást, mint említettem már clearing fázisnak nevezik. A keletkező miozin lassan bontja az ATP-t és közben a rendszer gélesedik és ezen túlmenően dehidratálódik. Ezt a jelenséget szuperprecipitációnak nevezik.

II. 2. A szuperprecipitáló aktomiozin komplex fiziko-kémiai változása.

Mint az előzőekben említettem feltételezik, hogy a clearing fázisban az aktomiozin komplex miozinra és F-aktinra disszociál.

A téma gazdag irodalma ellenére sem tisztázott, hogy ez a disszociáció valóban teljes mértékben megtörténik-e?

Tisztázatlan kérdés még, hogy a miozin és aktin viszonya milyen ebben a fázisban.

Ha az aktomiozin rendszer Mg^{++} indukálta ATP-áz aktivitását követték, megállapították, hogy a kezdeti fázisban ez kisebb volt, mint a szuperprecipitációs fázisban és ebből következtettek a disszociációra.

Megjegyezték, hogy az ATP-áz aktivitás mértéke a szuperprecipitáció alatt 15x nő a clearing fázis első perceihez viszonyítva. /Gergely, 1960/.

A clearingben lévő aktomiozin ATP-áz aktivitása nagyon ~~alacsony~~ ^{Kis mennyiség} és csaknem ugyanakkora, mint a mioziné. Magasabb fehérje koncentrációnál a clearing fázisban az ATP-áz aktivitás valamivel ~~magasabb~~ ^{magasabb}. Magasabb fehérje koncentrációnál a szuperprecipitáció is gyorsabban megy végbe. Gergely és mtsai /Gergely, 1960/ ultracentrifugás eredményekkel támasztja alá elképzeléseit. Alacsony ionerősségen clearinget hoztak létre. Kísérleteiket alacsony hőfokon végezték így a clearinget megnyújtották. Ekkor az ULCE felvételekről megállapították, hogy a clearing fázisban lévő aktomiozinnak csak egy peakja volt és ez kb. 70 S szedimentációs állandóju volt. Ez az érték a miozinnak felel meg. Nem találtak az aktinnak megfelelő 50 S szedimentációs állandóju peaket, feltételezik, hogy azért nem, mert az aktin koncentrációja igen alacsony volt és ilyen körülmények között az F-aktin nem képes

látható határvonalat képezni.

Számos kutató végzett vizsgálatokat az aktin és miozin kölcsönhatására vonatkozóan.

Különböző F-aktin: miozin arányok mellett vizsgálták az ATP-áz aktivitást a clearing fázisban és a szuperprecipitáció fázisában. Állandóan növelték az F-aktin mennyiségét és ez a növelés az iniciális ATP-áz aktivitás értékét befolyásolta, sőt a szuperprecipitáció idején is megnövekedett ATP-áz aktivitás értéket észleltek. Ez az aktivitás emelkedés arányos volt az aktin mennyiségének növelésével. Volt egy optimális F-aktin: miozin arány, mely a legmagasabb ATP-áz aktivitást eredményezte és ez az optimális szuperprecipitációs arálynak is megfelelt /Spicer, 1951/. Spicer az optimális aktin - miozin arányt 1:4-nek találta. Elképzelése szerint az aktin-miozin kapcsolódás erős kötéssel történik és a sztöchiometrikus ponton sem szabad aktin, sem szabad miozin nincs a rendszerben. Ha a sztöchiometrikus aránynál több aktin vagy miozin van jelen, ~~egy~~ lazább kapcsolat jön létre közöttük. Ez a disszociálabilis aktomiozin képzéshez vezet.

Felfogásának sematikus ábrázolása:



Lehetségesnek tartja, hogy a clearing fázis alatt kis aktomiozin alegységek vannak jelen és ezek hálózatot képeznek a clearing fázis végén /Spicer, 1952/.

Eisenberg és mtsai /Eisenberg, 1967/ a miozin és aktin közötti kapcsolat tisztázására a HMM és aktin kapcsolatának vizsgálatát választották. Eisenberg és mtsai a clearing fázisból a szuperprecipitációba való átmenet során a miozin és aktin közötti hálózat kialakulásnak fontosságát hangsúlyozza, mely az aktomiozin oldat viszkozitás emelkedését eredményezi. Ha a kísérletek során csak HMM és aktin kapcsolatát vizsgálta, ahol a hálózat kialakulása nem jöhet létre mivel a HMM molekulák monomérként vannak jelen, akkor viszkozitás emelkedést nem észlelt. A miozin és HMM ATP-áz aktivitását az aktin stimulálta, ^{ami} mely bizonyítja, hogy az aktin a fehérjének két azonos helyéhez kötődik. A szerzők arra következtettek, hogy alacsony ionerősségen az aktomiozin rendszer clearing fázisból a szuperprecipitációba való átmenete nem az aktin és miozin közötti kötések számától, hanem a hálózat képződés hatásosságától függ.

Az eredmények nagy száma bizonyítja, hogy az aktomiozin gél disszociációja nem minden - vagy semmi jelenség és magyarázható ¹ ² ³ ~~egy~~ enzimatis és fiziko-kémiai jelenséggel /Katz, 1970/. Katz fényszóródás méréssel követte a szuperprecipitáció folyamatát /Katz, 1964/ és azt tapasztalta, hogy mérsékelten magas ionerősségnél az aktomiozin Mg^{++} aktiválta ATP-áz aktivitás értéke a clearing fázis folyamán magasabb volt, mint csak miozin jelenlétében észlelt aktivitás.

Ez a tény arra utal, hogy a szuperprecipitációval együttjáró erős fiziko-kémiai változást megelőzi a miozin enzimatisz aktivitásának aktiválódása.

Hasonlóan Perry /Perry, 1966/, Eisenberg és Moos /Eisenberg és Moos, 1967/ azt találták, hogy a HMM Mg^{++} indukálta ATP-áz aktivitását előbb aktiválja az aktin, mielőtt a szuperprecipitáció bekövetkezne, ^{amire} melyre a viszkozitás és fényszóródás növekedés adatai utalnak.

Kísérleteket végeztek az ATP hidrolízis és szuperprecipitáció közötti kapcsolatra vonatkozóan.

Megállapították, hogy a gyors ATP hidrolízis szoros kapcsolatban van a szuperprecipitációval. A hidrolízis a szuperprecipitáció során következik be és nem jellemző a teljesen szuperprecipitált aktomiozinra /a szuperprecipitáció után nincs hidrolízis/, /Katz, 1971/.

Gordon /Gordon A.M. 1966/ és Endo /Endo, 1964/ megállapították, hogy a szuperprecipitáció után az ATP hidrolízis mértéke csökken, ^{ami} mely annak tulajdonítható, hogy a kontrahált gélbe az ATP diffúziója rossz.

Levy és Fleisher /Levy, 1965/ a szuperprecipitáció után az aktomiozin hidrolitikus helyének jellegzetes változását nem észlelte.

II. 3. Az aktomiozin clearing és szuperprecipitációjának kapcsolata az izom relaxáció és kontrakció fázisaival.

Tekintve, hogy az izolált aktomiozinon észlelt clearing és szuperprecipitáció jelenség, valamint a relaxáció - kontrakció kolloidális változása és ionviszonyai igen hasonlóak, elképzelés született, amely a clearing fázist a relaxált állapottal, a a szuperprecipitációt a kontrakcióval igyekszik összhangba hozni. A fenti megállapítás miatt röviden a kontrahált és relaxált állapotban lévő kolloidális és ionviszonyokat ismertetném.

Nyugalmi állapotú izomban kimutatták, hogy a miozin K^+ , ill. Mg^{++} - miozin komplexként van jelen a primér fonalakban és hozzá ATP kötődik egyértékű kationok jelenlétében. A pH és az ionerősség hatására a miozin az oldódás határán van. Erősen hidratált, duzzadt gél szerkezetű.

Bizonyított, hogy a miozin az oldódás határán van a relaxált izomban, mert a miofibrillumokból könnyen kioldható megfelelő ionerősségű sóoldattal, és triptikus emészthetőségének nincs akadálya /Biró, Bálint, Gráf, 1965/. Elképzelhető lenne, hogy az ATP szint ~~megemlékedése~~ a miozin egyrészének oldódását eredményezné a clearing analógiájára. Ezen fázisban történik meg a miozin molekulák egyrészének specifikus elrendeződése is.

Az aktiv állapot lényege tehát új makromolekuláris rendszer kialakulása.

A relaxált izomban a 85 - 95% víztartalmu miozin - gél szerkezete olyan, hogy a rendelkezésre álló teret teljesen kitölti. Az aktin a fenti viszonyok mellett fonalas. Az aktiválás során a hidratált gélben rendezett fehérje komplex alakul ki, mely adott sémillióben, bizonyos ATP koncentráció mellett átmegy a stabilis dehidratált állapotba. A rendezett fehérje komplex kialakulását Guba úgy képzei el / Guba, 1966 /, hogy a szekunder fonalak F-aktinjai az oldott miozin molekulák irányított asszociációját és aktomiozin komplex képződését eredményezik. A kontrakciót bevezető fázisban $F\text{-aktomiozin} - ADP \longrightarrow G\text{-aktomiozin} - ATP$ átalakulást is elképzelhetőnek tart. Ezt az elképzelést Tsao /Tsao, 1953/ fluoresztencia depolarizációs és Rowe ultracentrifugás eredményei is igazolják. A kontrakciót foszfát felszabadulás kíséri. Az egyik reakció a hidrolitikus bontás a másik a $G\text{-aktin} - ATP \longrightarrow F\text{-aktin} - ADP$ átalakulás.

Feltételezik, hogy a kontrakció ez utóbbi függvénye. A kontrakció bekövetkezése után a Ca^{++} eltűnnek a rendszerből az ATP koncentráció valószínűleg a kreatinfoszfáton keresztül a relaxált izom szintjére emelkedik. A miozin feltöltődik ATP-vel és hidratálódik. Az izom újra relaxált állapotba kerül.

II. 4. A clearinget, a szuperprecipitációt és az ATP-az
aktivitást befolyásoló faktorkok.

Jelen részben szeretném összefoglalni azokat a faktorokat, melyek az alacsony ionerősségen lévő aktomiozin komplex tulajdonságait befolyásolják:

Röviden ismertetném:

- a./ A szubsztrát specifitást
- b./ A kétértékű ionok hatását.
- c./ A relaxáló ágensek hatását.

a./ A szubsztrát specifitás.

A különböző foszfát vegyületeknek az aktomiozin clearingjére gyakorolt hatását 0,15 M KCl és 1 mM $MgCl_2$ jelenlétében vizsgálták. Megállapították, hogy az ITP, CTP, UTP, és GTP közvetlenül szuperprecipitációt idézett elő, míg az ADP, AMP, IDP, IMP, PP, anorganikus trifoszfát nem okoztak változást. A különböző trifoszfátok alkalmazása azt mutatta, hogy a leghatásosabb az ATP, majd a CTP, legkevésbé a GTP volt hatásos. /Maruyama és Gergely, 1962/.

Harvey M és mtsai szerint /Harvey M, Levy, 1965/ a z ITP is okoz szuperprecipitációt, de lassabban és kb. 10x nagyobb koncentrációban kell alkalmazni az ATP-hez viszonyítva. Ezt az okozza, hogy az ITP gyengébben kötődik a miozin katalitikus részéhez.

A fentiekből kitűnik, hogy a szuperprecipitáló aktomiozin rendszer létrehozásához leghatásosabb az ATP használata. Az ATP koncentrációja jelentősen befolyásolja az alacsony ionerősségen lévő aktomiozin rendszert.

Ha az ATP koncentráció magas / 10mM /, akkor a clearing jól megfigyelhető és nyújtott, ha csökkentjük az ATP koncentrációt / 0,1 mM / akkor azonnali szuperprecipitáció van. Maruyama és mtsai /Maruyama, Gergely, 1962/ megállapították, hogy ha magas kezdeti ATP koncentráció, akkor a szuperprecipitáció idején a rendszerben megmaradó ATP koncentráció is magas. ^{miután} ~~miután~~ az aktomiozin rendszer az ATP-t állandóan hidrolizálja ezért a koncentráció függés tanulmányozásához szükség volt egy ATP-t regeneráló rendszerre. Megfigyelték, hogy ha ATP-t termelő rendszer jelen van, akkor van clearing és a folyamat nyújtottabb, mint ATP újra termelés nélkül. Ez adta az indítékot, hogy megfigyeljék az ADP-nek és P_i a szuperprecipitációra gyakorolt hatását.

Ha a clearingbe ⁿ lévő aktomiozinhoz ADP-t és P_i -t adtak azonnali szuperprecipitációt idézett elő. Ezt alátámasztotta az a megfigyelés is, hogy ha a rendszerben kezdetben több ATP volt jelen, akkor az ATP hidrolízis termékei elősegítették a szuperprecipitációt.

A fentiekből megállapították, hogy az ATP koncentráció a clearing fázist befolyásolja, míg a rendszerben nagy mennyiségben felhalmozódó ADP jelenléte a szuperprecipitáció megindulását segíti elő.

b./ A kétértékű ionok hatása.

Annak ellenére, hogy az irodalomnak nagy része foglalkozik a kétértékű ionok hatásával, a szuperprecipitációval kapcsolatban egyértelmű választ a kísérletek még sem adtak. Megfigyelték, hogy a Mn^{++} , Ca^{++} , Co^{++} , Ba^{++} a szuperprecipitáció gyorsításában nem vesznek részt.

Ionok egy másik csoportja nevezetesen a Cd^{++} , Zn^{++} , Fe^{++} , Cu^{++} úgy fejtik ki hatásukat, hogy a clearing fázist megnyújtják, így gátolják a szuperprecipitáció létrejöttét.

Megjegyezték, hogy Mn^{++} , Ni^{++} , Co^{++} , ha jelen van a rendszerben és ugyanakkor Mg^{++} ionok is vannak, akkor ez utóbbi ionok clearing-beli hatását legyőzik és azonnali szuperprecipitációt hoznak létre.

Kísérletek sora foglalkozott a Mg^{++} szerepével.

Felmerült az a kérdés, hogy a clearing fázis Mg^{++} ion szükséglete vajon specifikus-e? /Maruyama, 1962/.

Megállapították, hogy a különböző kétértékű ionok közül a Mg^{++} birt azon hatással / 10^{-3} M /, hogy jelenlétével késleltette a clearing fázisban a magas ATP-áz aktivitás bekövetkezését.

Leavy mtsai / Leavy, 1966 / szerint a Mg^{++} koncentráció befolyásolja a szuperprecipitációt, azáltal, hogy az ATP hidrolízis mértékét elősegíti. ^{mivel} ~~Miután~~ a Mg^{++} a hidrolitikus helyhez szorosabban kötődnek, az ATP hidrolíziséhez ugyanis szükséges Mg^{++} jelenléte is. Ha kicsi a Mg^{++} ion koncentráció akkor csak a hidrolitikus helyhez tud kötődni, és a nem hidrolitikus helyhez már nem.

Ebből a megállapításból is következtek - a már említett - a miozin két funkcionális és térbelileg specializált helyére.

Katz szerint / Katz, 1970 / azok a faktorok, melyek a miozin ATP-áz aktivitását gátolják a clearing fázist is elnyújtják. Szerinte az optimális Mg-ion koncentráció 0,01 mM /Watanabe, 1965/ és az ATP-áz aktivitás gátol 0,1 mM koncentráció jelenlétében.

Ujabb vizsgálatok is ezen tényt támasztják alá. Tetsuo Furukawa szerint, / Tetsuo Furukawa, 1972 /, ha a Mg^{++} koncentrációját 10^{-5} M-nál alacsonyabbra csökkentették, akkor azonnali turbiditás növekedést lehetett látni, tehát azonnali szuperprecipitáció volt. Párhuzamosan vizsgálták az ATP-áz aktivitás változását is és megállapították, hogy amikor a Mg^{++} koncentráció magas volt akkor az ATP-áz aktivitás igen alacsony volt, és alacsony Mg^{++} jelenlétében magas ATP-áz aktivitást mértek.

A fiziologusok már igen régen foglalkoztak a Ca⁺⁺ szerepével az élő izomban.

Heilbrunn kimutatta, / Heilbrunn, 1947/, hogy a Ca^{++} az egyetlen fiziológiás eredetű anyag, amelyet a sejt belsőjébe juttatva kontrakciót hoz létre.

Shanes megállapította, / Shanes, 1958/, hogy az izomkontrakció kezdetén a Ca^{++} a beindító anyag.

Lowey szerint is / Lowey, 1967 / a kontrakciót és az ATP hidrolizist a Ca^{++} jelenléte nagymértékben befolyásolja.



Ebashi vizsgálta a Ca^{++} hatását az aktomiozin rendszer szuperprecipitációjára / Ebashi, 1961 /. Megállapította, hogy a Ca^{++} pillanatnyi felszabadulása fontos az aktomiozin szuperprecipitációjához. A Ca^{++} hatását különböző koncentrációknál vizsgálta. Megállapította, hogy a Ca^{++} koncentrációja 10^{-6} M volt, akkor a szinérézis meggyorsult. Ha csökkentette a Ca^{++} koncentrációt a rendszerben akkor olyan preparátumot nyert, amely ATP hatására nehezebben szuperprecipitált. Ha a Ca^{++} EDTA-val lekötötte, akkor ATP hatására az így kezelt anyag nem húzódott össze.

Ha a Ca^{++} koncentráció 10^{-6} és $5 \cdot 10^{-7}$ M között volt, akkor az aktomiozin összehúzódó képessége visszaállt.

Weberék /Weber, 1963/ megállapították, hogy a Ca^{++} eltávolítása a fehérjéből nagyfokú szubsztrát gátlást idéz elő. Feltételezik, hogy amikor a Ca^{++} kötődnek a fehérjéhez, módosítják a már említett Mg-ATP komplex hatását. Ugyanis nagymennyiségű Mg-ATP komplex jelenléte gátolja a kontrakciót még optimális Ca^{++} koncentráció jelenlétében is. A Ca^{++} módosítják a Mg-ATP komplex és a természetes aktomiozin közötti kölcsönhatást. Ca^{++} jelenléte nélkül, ha az ATP koncentráció alacsony P-P igen erős hatással van a clea-
ringre.

c./ A relaxáló ágensek hatása.

Ebashi volt az első /Ebashi, 1961/ aki megállapította, hogy néhány kolátképző anyag relaxációs aktivitása jól definiált

összefüggésben van a Ca kötő képességgel. Feltételezte, hogy az EDTA, EGTA és más kelátképző anyagok relaxációra gyakorolt hatása azon alapszik, hogy a kontraktilis fehérjéből Ca^{++} -kat távolítanak el.

Alacsony ionerősségen lévő aktomiozin komplex, ha tartalmazott ilyen kelátképző anyagokat később szuperprecipitált, mintha nem tartalmazta az EDTA vagy EGTA-t. A szuperprecipitációt azonban minden esetben clearing előzte meg.

A kelátképző anyagok, tehát csak a szuperprecipitációt gátolják.

B. KISÉRLETES RÉSZ.

II. 1. A szuperprecipitáció létrehozása.

A szuperprecipitáció létrehozásához egyrészt természetes aktomiozint / B-miozint / másrészt, Finck szerint előállított miozinból és Feuer és Spudich szerint kivont aktinból mesterségesen összeállított aktomiozint használtunk.

A felsorolt strukturfelhérjéket nyul izomból nyertük. Az aktomiozint Szent-Györgyi módszerével, a következőképpen preparáltuk. Dekapitáltuk az állatot, majd igen gyorsan megnyuztuk. Majd jéges-víz között hűtöttük 20 percig az izmot. Ezután lefejtettük a hátizmát és a psoást, valamint a hátsó comb izomzatát. Megtisztítottuk a kötőszövetről és a zsírtól. Ezután előre hűtött darálón daráltuk az izmot. Majd megmértük a súlyát és a súlyára számított 3 vol W-E / Weber-Eissal / oldattal végeztük az extrahálást 20 percig. Közben a hőmérséklet $3-4^{\circ}\text{C}$ volt. A kivonást kevertetéssel segítettük elő. Ezután 24^{h} -ig állni hagytuk az anyagot, hidegen az extrahálás elősegítése miatt. Másnap hígítottuk újabb 3 vol W-E oldattal és centrifugáltuk az aktomiozin oldatot. A centrifugálás után az üledéket eldobtuk /szárazport készítettünk belőle, lásd később a részletes leírást/ és a felülúszó ionerősségét csökkentettük hideg desztillált víz hozzáadásával, melyet állandó keverés mellett végeztünk.

Kb. 10 tf. desztillált víz hozzáadása után a felülúszóból finom pelyhes

csapadék vált ki. Ezt hagytuk ülepedni, majd centrifugálással gyűjtöttük össze az üledéket. A centrifugálás után az üledéket 2-3 x 0,025 M KCl-al mostuk az ionerősség emelése miatt. Majd minden mosást centrifugálás követett. A mosások után az üledéket KCl-ban oldottuk, úgy hogy a végkoncentráció 0,5 M legyen. A nem oldódott részeket üveggyapoton való szűréssel távolítottuk el a rendszerből. Az aktomiozin oldat ionerősségét ismét csökkentettük desztillált víz segítségével, kicsaptuk az aktomiozint és ismét mostuk és visszaoldottuk. Ezt a műveletet többször megismételtük. Célja az aktomiozin tisztítás volt. Amikor nem használtuk fel az aktomiozint teljesen a preparálás után, akkor 50%-os glicerinben - 15°C-on tároltuk az anyagot.

A miozint Finck szerint állítottuk elő a következőképpen:

Szintén nyulizomból indultunk ki. Az izom előkészítése az aktomiozinnál ismertetett módon történt. A megtisztított izmot 5 mm-es darálón ledaráltuk. A kivonást 3 vol jéghideg kivonó oldattal végeztük, / az oldat pontos összetételét lásd később/. Az ionerősség 0,57 és a pH 6,5 volt. Az extrahálást 20 percig végeztük. Majd 1 vol hideg desztillált vízzel hígítottuk az oldatot és szűrtük gézen. A szűrés után az eredeti vol 12x -re hígítottuk az oldatot enyhe keverés mellett jéghideg desztillált vízzel. Ekkor az oldatból fehér csapadék formájában kivált a miozin. Hagytuk a rendszert ülepedni 2-3 órát, majd az üledéket centrifugálással összegyűjtöttük. Oldottuk a szediment újraoldóban /részletes összetételét lásd a "használt oldatok" című alatti. Ionerőssége 1,15 volt és a pH 6,5/ az üledéket. Ezután az aktomiozin mentesítés következett. Az oldat ionerősségét csökkentettük 0,3-ra. Ekkor az oldatból kicsapódik

az aktomiozin. Pár órás állás után az üledéket centrifugálással eltávolítottuk majd az oldat ionerősségét csökkentettük 0,04-re, a miozin kicsapás miatt. Több órát ülepitettük, majd centrifugálással összegyűjtöttük az üledéket, a már említett szediment újraoldóban visszaoldottuk. Az aktomiozin mentesítéstől a műveletet többször megismételtük a miozin tisztítása végett.

A szárazport Feuer szerint állítottuk elő. Az izmot előkészítettük a kivonáshoz, vagy az aktomiozint vontuk ki, vagy a miozint, a célunk az üledék kinyerése volt. Centrifugáltuk az izomszuszpenziót és az üledéket használtuk fel. Az üledéket mostuk 3-4 vol hideg desztillált vízzel az oldószer eltávolítása miatt. Ezután az üledék súlyát megmértük és a súlyára számított 5 vol 0,04%-os NaHCO_3 oldatot tettünk. 30 percig kevertettük a rendszert szobahőfokon, ennek a NaHCO_3 kezelésnek a célja az üledék fellazítása volt. Majd centrifugáltuk a keveréket és a centrifugálás után mértük az üledék súlyát. A súlyára számított 10 tf. hideg desztillált vízzel mostuk ki a rendszerből a NaHCO_3 . A kimosást pH papírral ellenőriztük. Ezután centrifugáltuk az anyagot. Ismét megmértük a súlyát és a súlyára számított 3 vol acetonnal kivontuk az üledékből a vizet. A kivonást 10 percig végeztük.

Az üledékről az acetont szűrőssel távolítottuk el. Majd 1 vol acetonnal megismételtük a vizelvonást. Ezután szobahőfokon szárítottuk a kapott üledéket. A szárítás után az izomport 0°C -on tároltuk.

A szárazporból a G-aktint következőképpen vontuk ki:

Megmértük az izompor súlyát, majd a súlyára számított 15 vol. hideg desztillált vizet öntöttünk rá. Kivonás alatt is hűtöttük a rendszert. A desztillált víz helyett kivonó oldatnak lehet használni aszkorbinsavas ATP-t is / pH 7,4 - 7,5 /, mely előnye, hogy a szárazpor az aktint nemcsak G-formában hanem esetleg F-formában is tartalmazza, akkor a desztillált vízzel nem tudjuk extrahálni az F-aktint. Az aszkorbinsavas - ATP segítségével azonban az F-aktint depolimerizáljuk G-aktinná és így a szárazporból könnyen kivonható. Az extrahálást 10 percig végeztük. Ezután vizlégszivattyú segítségével elválasztottuk a felüluszt az üledéktől. Az üledéket oldottuk és a felüluszt tartalmazta a G-aktint. Ezután a G-aktin térfogatát megmértük és a térfogatának 1/10 adtuk hozzá polimerizáló sóból. /A polimerizáló só oldat összetételét lásd "a használt oldószerek" c. alatt/. A polimerizálást szobahőfokon végeztük 30 percig. Ekkor az alacsony viszkozitású G-aktinból magas viszkozitású F-aktint nyertünk. A kivonás során azonban a G-aktint igen sok kísérő anyaggal lehet csak extrahálni. Ezért elkerülhetetlen a G-aktin illetve az F-aktin tisztítása.

A tisztítást kétféleképpen végeztük:

1./ A polimerizálás során nyert F-aktint ultracentrifugáltuk 100 000 g-vel, 1 órát. Majd a centrifugálás után az üledéket, mely igen nehezen oldódik fokozatosan 2-3 csepp aszkorbinsavas - ATP segítségével / pH = 8 / szuszpendáltuk. A szuszpendált F-aktint dializáltuk aszkorbinsavas-ATP-vel kb. 10x térfogattal szemben többszöri cserével, hidegszobában. A dializálás során az F-aktin

depolimerizálódott. A kapott G-aktint ezután ismét polimerizáltuk, majd ultracentrifugálással tisztítottuk ismét. A centrifugálás során a szennyező fehérjék a felüluszóban maradnak.

2./ Spudich szerinti tisztítás.

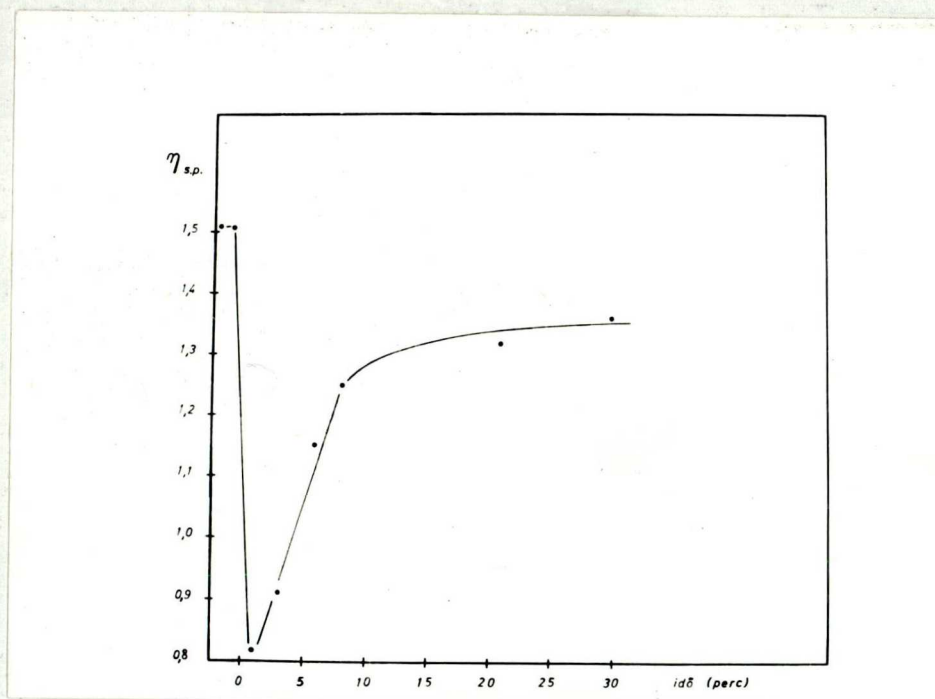
Az acetonos izompor súlyára számított 20 vol "A" pufferrel végeztük. / 2 mM Tris-HCl 0,2 mM ATP 0,5 mM merkaptotanol 0,02 mM CaCl_2 pH 8 / a kivonást szobahőfokon 30 percig. Majd durva szűrőn szűrtük a szuszpenziót. Az üledéket mostuk 10 vol "A" pufferral, majd a két felüluszt egyesítettük. Ezt egy órás centrifugálás követte 10 000 g-vel. A centrifugálás után polimerizáltuk a G-aktint. A polimerizálást 2 órán át végeztük szobahőfokon. Majd ezután a KCl koncentrációját 0,6 M végkoncentrációra állítottuk be és kevertük a rendszert $1 \cdot 10^3$ -ig igen erőlyesen. Ezután centrifugáltuk 3 órát 80 000 g-vel. A centrifugálás után az üledéket szuszpendáltuk kis mennyiségű "A" pufferral és erőlyes keverés mellett többszöri cserével dializáltuk. A dialízis után a G-aktint centrifugáltuk 80 000 g-vel 3 órán át, majd ezt a polimerizálás követte. A tisztítási folyamatot még kétszer megismételtük, és az így nyert F-aktint használtuk kísérleteinkhez. A tisztított fehérje komponenseket minden esetben ellenőriztük, hogy aktív fehérjék-e?

A miozin tisztaságát az ATP érzékenység méréssel követtük.

A következőképpen: a magas ionerősségen lévő 1 mg/ml miozin oldatból 2,5 ml-t módosított Oswald-féle viszkoziméterbe tettük, termosztáltuk kb. 5-10 percig 0°C -on, majd 10^{-3} M végkoncentrációban ATP-t

adtunk a rendszerhez. A miozin viszkozitása amennyiben nem tartalmazott aktomiozint ATP hatására nem változott.

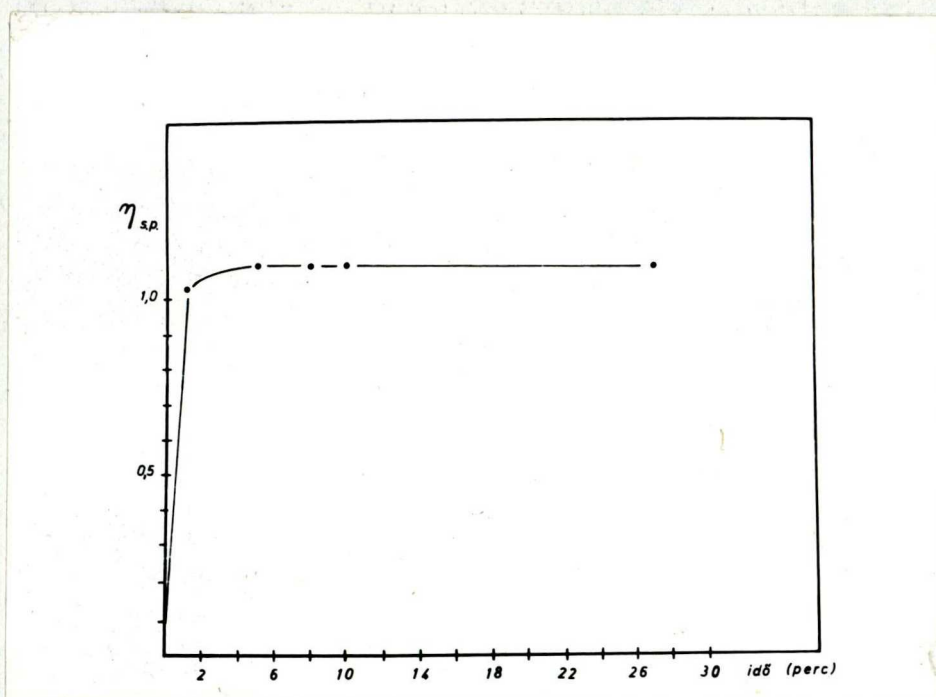
A természetes és mesterséges aktomiozin is megnéztük az ATP érzékenységét. A miozinnál ismertetett körülmények között vizsgáltuk a viszkozitás változást. Mint ismeretes az aktomiozin magas ionerősségen a viszkozitása magas majd ATP hatására csökken, addig amíg ATP van a rendszerben, majd az ATP elbontása után a viszkozitás megközelíti az eredeti értéket. Az eredményeket specifikus viszkozításban adtuk meg. A specifikus viszkozitás értékeit ábrázoltuk az idő függvényében, mint ezt az 1. sz. ábra szemlélteti.



1.sz. ábra.

Az ábra a magas ionerősségű mesterséges aktomiozin viszkozitás görbáját szemlélteti. A fehérje koncentráció 1 mg/ml volt. A hőfok 25°C. A használt ATP végkoncentrációja 10^{-3} M.

A G-aktint az említett módon nyertük szárazporból. Ezután a koncentrációját 1 mg/ml-re állítottuk be, majd viszkoziméterben 25°C-on az ismert polimerizáló só segítségével F-aktinná alakítottuk. Ebben az esetben is a specifikus viszkozitás értékeit ábrázoltuk az idő függvényében, mint ezt a 2.sz. ábra mutatja.



2. sz. ábra.

Az ábra a G-aktin polimerizálását szemlélteti. A fehérje koncentráció 1 mg/ml volt. A polimerizáló só a térfogat 1/10. A polimerizáló só tartalmazott 0,1 M KCl, 10^{-3} M $MgCl_2$ -t végkoncentrációban.

A miozinak, a mesterséges és természetes aktomiozinak minden esetben megnéztük az ATP-áz aktivitását is alacsony ionerősség mellett. / Mommaerts, Green, 1954/.

Az alacsony ionerősség biztosítására a fehérjét 0,01 M pH=7 KCl-al szemben dializáltuk, többszöri cserével és kb. 10x térfogattal. Az enzim ATP bontó-képességét 2 mM Ca ion jelenlétében vizsgáltuk, 5 mM ATP mellett. Az enzim hasítást 7 percig végeztük, majd a folyamatot 10 %-os hideg TCA-nak azonos térfogatával leállítottuk. A felülúszóból Fiske-Subbarow szerint foszfor meghatározást végeztünk.

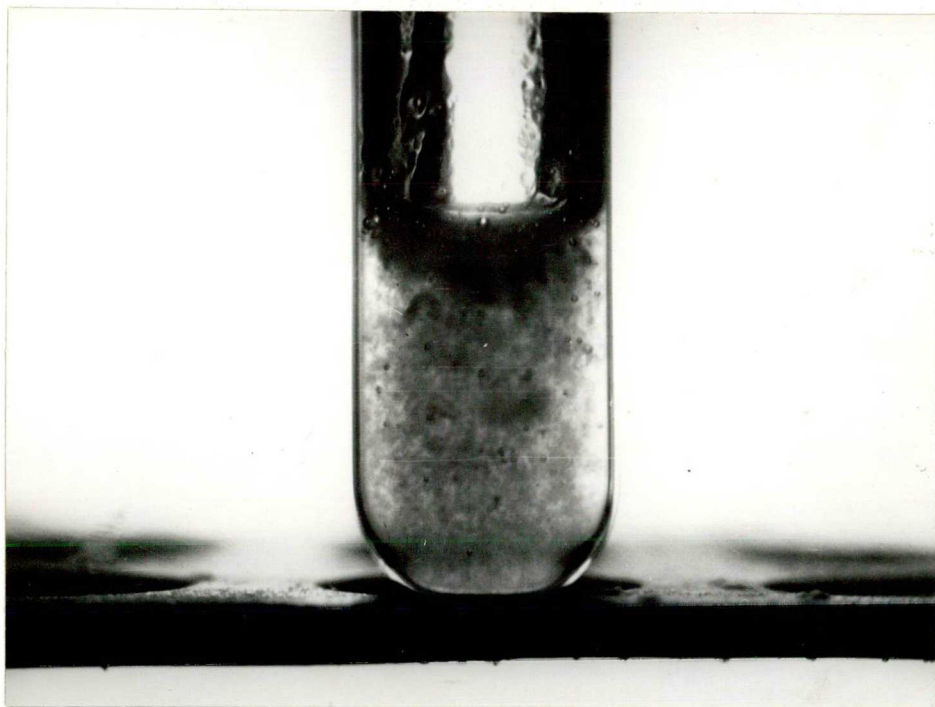
Kivitelezés: az enzim reakciót miután TCA-val leállítottuk a denaturált fehérjét szűrőssel távolítottuk el a rendszerből. A szűrletből 1 ml-t kivettünk, majd 2,8 ml desztillált vizet tettünk hozzá. Ezután 1 ml 2,5%-os kénsavas ammonium-molibdátot adtunk hozzá. A keveréket inkubáltuk 37 °C-on 5 percig, majd 0,2 ml redukáló szert adtunk hozzá / eikonogén /. 5 percig ismét inkubáltuk 37 °C-on. Majd a felszabadult anorganikus foszfort mértük Spektromon 202 680 nm-nél.

A felszabadult anorganikus P_1 mennyiségéből a Mg^{++} és Ca^{++} aktiválta ATP-áz specifikus aktivitási értékeit számítottuk. A specifikus ATP-áz aktivitások értékei egyezőséget mutattak az irodalmi adatokkal.

Ezután a tisztított és ellenőrzött fehérje-komponenseket előkészítettük a szuperprecipitációhoz. Az aktomiozin rendszert

/természetes, mesterséges, 0,13 tris pufferral szemben dializáltuk az in vivo ionmilliónek megfelelő körülmények biztosítására. Az dializáló oldat tartalmazott $5 \cdot 10^{-2}$ M tris puffert, $8 \cdot 10^{-2}$ M KCl, $5 \cdot 10^{-2}$ M HCl, 10^{-4} M merkaptotetanolt és $4 \cdot 10^{-3}$ ill. 10^{-4} M HgCl_2 -t. Ezen dializáló oldatot nagy feleslegben és többszöri cserével használtuk. / kb. 20 térfogat 3-4 x csere és 2-3 °C-on/.

A 3.sz. ábrán látható, hogy a dialízis során az anyag precipitál, kicsapódik. Megjegyzem, hogy a kontraktilis rendszerben in vivo körülmények között is hasonló állapot van.



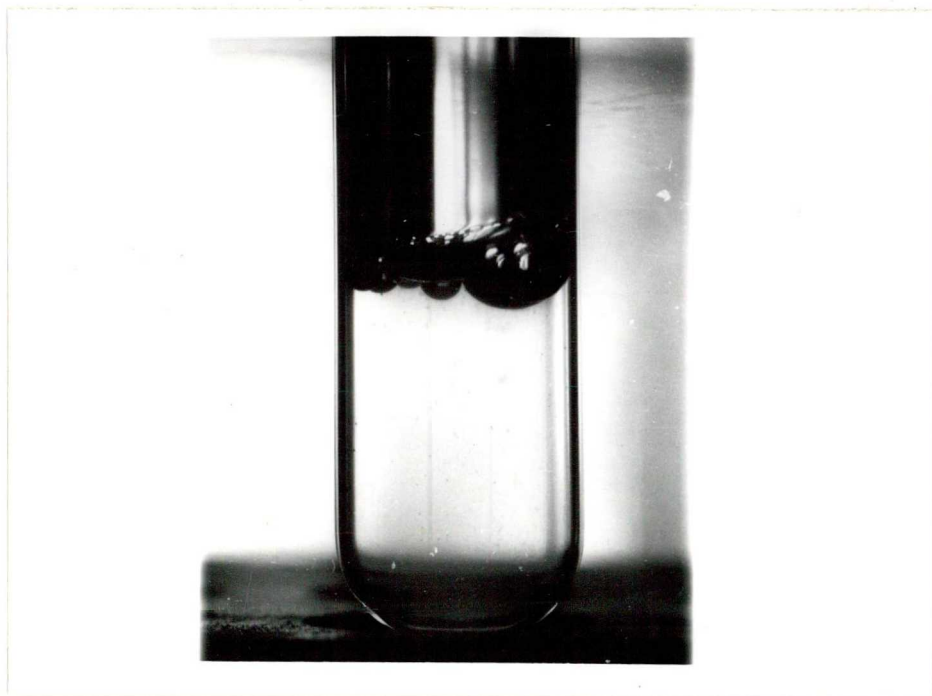
3.sz. ábra.

Az ábra az alacsony ionerősségen lévő / $I = 0,13$ / aktinonin képét mutatja. Fehérje koncentráció 4 mg/ml volt. Az ábra jól szemlélteti a precipitált anyagot.



A dializált és kicsapódott aktomiozinhoz 10^{-2} M végkoncentrációban ATP-t adtunk és ekkor a fehérje feloldódott.

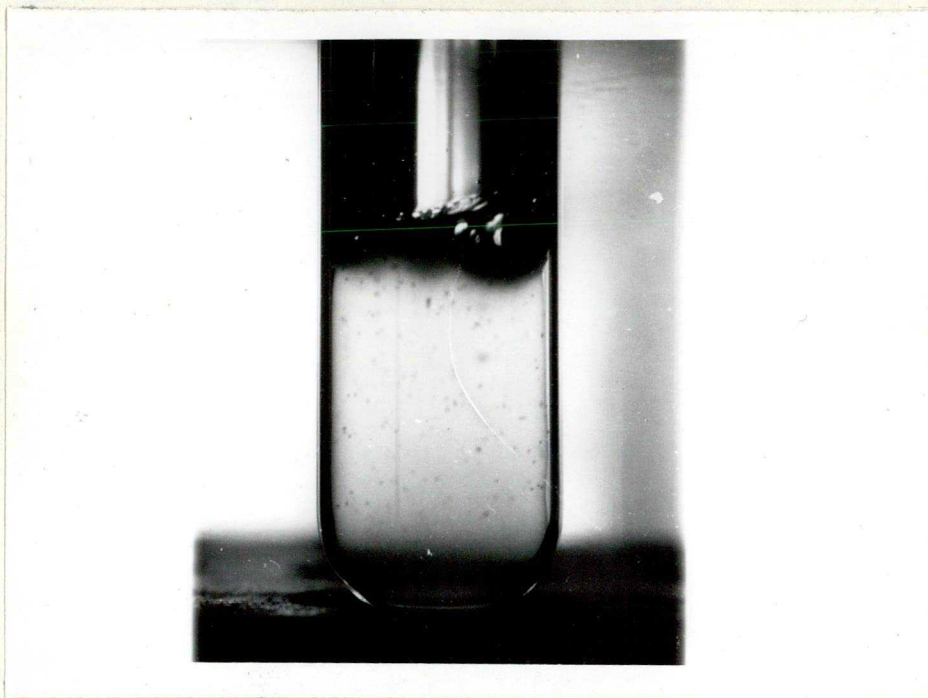
A 4. sz. ábrán jól látható a precipitált anyag feltisztulása.



4. sz. ábra.

Az ábra az ATP hatására feltisztult aktomiozin képét mutatja. A fehérje koncentráció 4 mg/ml és az ATP végkoncentrációja 10^{-2} M volt. Ezen körülmények között clearing fázisról beszélünk.

Ezt a feltisztulással járó folyamatot nevezzük a clearing fázisnak. Egy bizonyos idő után, mely időt a jelenlévő ionok, valamint a hőmérséklet erősen befolyásolja az oldat zavarosodni kezd, először kis pelyhek jelennek meg, melyet az 5. sz. ábra demonstrál.



5.sz. ábra.

Az ábra az oldat zavarosodásának kezdetét szemlélteti.

A zavarosodást a kis pelyhek megjelenése okozza.

Majd ezek a pelyhek aggregátumokat képeznek. Ezt demonstrálja a 6.sz. ábra.



6.sz. ábra.

Az ábra az aggregátum képződést szemlélteti

Ezután az aktomiozin kicsapódik, majd vizet veszít és zsugorodik. A következő ábrák jól mutatják a víz-vesztés folyamatát. Ezt a víz-vesztéssel és összezsugorodással járó jelenséget nevezzük a szuperprecipitációnak.



7. sz. ábra.

Az ábra a kicsapódott aktomiozint mutatja, itt már jól látható a fehérje víz-vesztése is.



8. sz. ábra.

Az ábra a további víz-vesztést mutatja, mely már a fehérje zsugorodását vonja maga után.



9. sz. ábra.

Az ábra zsugorodott aktomiozin képét mutatja.



10. sz. ábra.

Az ábra a szuperprecipitált aktomiozin képét mutatja.

Mint az ábrákból is kitűnik, ez a kicsapódás, mely a 10. sz. ábrán látható erősen különbözik a kiinduláskor észlelt kicsapódástól.

Röviden szeretném ismertetni a saját kísérleteink során használt ion koncentrációkat, valamint a hőmérsékletet és a fehérje koncentráció meghatározást.

A dialízis során kicsapódott fehérje koncentrációját az általunk módosított biuret módszerrel határoztuk meg. A tris puffer jelenléte zavarta a fehérje koncentráció meghatározását. Ezért úgy készítettük a kalibrációs görbét, hogy minden esetben 0,5 ml

tris-el szemben dializált fehérje oldatot mértünk be és a kontrollba is bemértünk a tris-dializáló oldatból 0,5 ml-t és a reagenseket. Így kiküszöböltük a tris zavaró hatását.

Mint az irodalomból ismeretes, a hőmérséklet erősen befolyásolja a szuperprecipitáció bekövetkezésének idejét. Így célszerű volt különböző hőmérsékleteken dolgozni. Amikor a szuperprecipitáció egész folyamatát követtük akkor 17 ill. 26 °C-on dolgoztunk. Amikor a szuperprecipitátum nyerése volt a célunk akkor 37 °C-on végeztünk kísérleteinket.

Ismeretes, hogy az enzimreakciót erősen befolyásolja, hogy az enzim a szubsztráttal milyen mértékben érintkezik, így lényeges volt, hogy a szuperprecipitáló rendszert folyamatosan kevertessük. Ezt motorikus illetve mágneses keverővel oldottuk meg. Amikor a szuperprecipitátum nyerése volt a célunk akkor úgy választottuk meg a hőmérsékletet, hogy a szuperprecipitáció maximum 3 perc alatt létrejöjjön és ez utóbbi esetben nem kevertettük a rendszert.

Általában magas fehérjekoncentráció mellett dolgoztunk, 2 mg/ml - 7 mg/ml-ig. A magas fehérjekoncentrációt azért választottuk, mert mint későbbi kísérletekből kitűnik a szuperprecipitátum vizsgálatára törekedtünk. Megállapítottuk, hogy a fehérje-oldatnak nem teljes mennyisége precipitál, így magasabb fehérjekoncentráció mellett több üledéket kaptunk.

Az irodalomból ismeretes, hogy a miozin és aktomiozin komplex kolloid tulajdonságait /enzimaktivitását is/ a kationok és polianionok

jelenléte erősen befolyásolja.

Miután az izomkontrakció modeljének tekintik a szuperprecipitáló aktomiozin rendszert, így kísérleteink során az izomban lévő ion-erősséget próbáltuk megközelíteni.

Az irodalmi összefoglalóban már részletesen ismertettem az egyes szerzők állásfoglalását az ionmillióval kapcsolatban, itt saját körülményeinket szeretném összefoglalni.

Vizsgálatainkat mesterséges aktomiozinnal végeztük. Különböző fehérjekoncentrációjú 1:4 arányu aktomiozin rendszert dializáltunk többszöri cserével tris pufferrel szemben, mely puffer a már leírt ionokat tartalmazta és a Mg^{++} koncentráció $4 \cdot 10^{-3}$ M volt. Itt szeretném megjegyezni, hogy a $MgCl_2$ bomlásokat minden esetben telített oldatból végeztük. A fehérjék dialízisét hidegszobában, rázatással végeztük. A dialízis után 1,8 ml fehérje oldathoz $0^\circ C$ -on állandó keverés mellett 0,2 ml 10^{-1} M ATP-t tettünk. Majd a keveréket $26^\circ C$ -os vízfürdőbe tettük. A viztisza oldatnál figyeltük az opálosodás megjelenését. Ezt vettük a szuperprecipitáció kezdeti pontjának. Majd megvártuk még az oldat tovább zavarosodik a fehérje aggregálódik és vizet veszít. A szuperprecipitáció végét a fehérje zsugorodása jelezte. A fenti körülmények között a szuperprecipitáció teljes folyamata követhető volt. A folyamat azonban nyújtott volt.

Miután az irodalomban ismertetett és használt Mg^{++} koncentrációk jóval alacsonyabbak, így csökkentettük a Mg^{++} koncentrációját

10^{-4} M-ra / Katz, 1970 /.

Kísérletet ugyanúgy végeztünk, mint a $4 \cdot 10^{-3}$ M MgCl_2 jelenlétében. Megállapítottuk, hogy ezen ionkoncentráció megrövidítette a clearing fázist és a szuperprecipitáció teljes idejét. A clearing fázis azonban még jól követhető volt.

Megvizsgáltuk, hogy a szuperprecipitáció létrejöttéhez kell-e Mg ionok jelenléte. A fehérje oldatokat Mg^{++} mentes oldattal szemben dializáltuk. A Mg^{++} blokkolására EGTA-t használtunk. A dialízis után szuperprecipitáltattuk a rendszert és megállapítottuk, hogy a szuperprecipitáció létrejön akkor is, ha a rendszer csak nyomokban tartalmaz Mg^{++} -t. Ebben az esetben a clearing ideje másodpercekig tart és a szuperprecipitáció is 12 perc alatt végbemegy anélkül, hogy a hőmérsékletet emeltük volna.

A rendszer azonban minden esetben tartalmazott Mg^{++} nyomokban miután a forgalomban lévő ATP is tartalmaz Mg ionokat. Az ATP-ben lévő Mg^{++} nem kötöttük meg illetve legtöbbször csak komplex formájában van jelen, így csak ioncserés úton távolíthattuk el. Egyértelműen nem lehet tehát azt állítani, hogy a szuperprecipitáció létrejöttéhez nem kell Mg ion jelenléte.

A szuperprecipitáció létrejöttéhez Ca^{++} -ra is szükség van. Rendszerünk EDTA-t nem tartalmazott, így minden esetben közel konstansnak vehető a Ca ion koncentráció.

Az irodalmi részben részletesen kifejtettem, hogy az ATP koncentráció nagymértékben befolyásolja a szuperprecipitáló

aktomiozin rendszert.

Kísérleteink során összefüggést kerestünk a fehérje koncentráció, az ATP koncentráció és a szuperprecipitáció ideje között. Kísérleteinket változó fehérje koncentrációjú természetes aktomiozin rendszerrel végeztük. A fehérje koncentrációkat 1 mg/ml-től 10 mg/ml-ig változtattuk. Az ATP koncentrációja ebben az esetben konstans volt. Kísérleteinket a következőképpen végeztük: bemértünk az előkészített /dializált/ fehérjéből 1,8 ml-t. A dialízist a már ismertetett tris-pufferral végeztük. A fehérjét ezután jegesvizfürdőben inkubáltuk kb. 5 percig, majd 0,2 ml 0,1 M pH 7 ATP-t adtunk a rendszerhez. Az ATP hatására állandó keverés mellett a kicsapódott fehérjét oldatba vittük pontosabban létrehoztuk a clearinget. A feltisztult fehérje oldatot ezután 26 °C-os vízfürdőbe helyeztük. Figyeltük a folyamatot. Néztük a szuperprecipitáció kezdetét és végét. A folyamat végét mint ábrán is bemutattam a fehérje zsugorodása jelezte. Ezután 10%-os hideg TCA-val állítottuk le az enzim folyamatot. A kicsapott, denaturált fehérjét szűrővel távolítottuk el. Majd a szűrletből 1 ml kivettünk és Fiske-Subbarow módszerrel meghatároztuk a felszabadult anorganikus foszfor mennyiségét. Kísérleteink során úgy tűnt, hogy minél alacsonyabb a fehérje koncentráció, annál több ATP-re volt szükség a szuperprecipitáció létrejöttéhez.

A felszabadult anorganikus foszfor mennyiségéből következtettünk a rendszerben el nem bomlott és elbomlott ATP mennyiségére.

Ezután kísérleti körülményeinket úgy választottuk meg, hogy a fehérje koncentráció konstans volt, a hőmérséklet a pH és az ionerősség ugyanaz volt, mint fent, csak az ATP koncentrációt változtattuk.

Kísérleteinket a következőképpen végeztük: Állandó 7,4 mg/ml fehérje koncentrációju 1,8 ml dializált fehérjéhez először 0,2 ml 0,1 M ATP-t adtunk a már ismertetett módon. Clearinget hoztunk létre, majd szuperprecipitáltattuk a rendszert. A szuperprecipitáció végén az enzimreakciót TCA-val állítottuk le. Majd a felszabadult anorganikus foszfor mennyiségét meghatároztuk.

Ezután változtattuk az ATP mennyiségét $5 \cdot 10^{-2}$, $2,5 \cdot 10^{-2}$, $1,25 \cdot 10^{-2}$, $5 \cdot 10^{-3}$ M között. A clearinget minden esetben 0°C -on hoztuk létre, majd szuperprecipitáltattuk a rendszert 26°C -on. A szuperprecipitáció végét a fehérje zsugorodása jelezte. Az ATP koncentráció további csökkentésének a clearing hiánya szabott határt. $2,5 \cdot 10^{-3}$ M ATP hozzáadására a fehérje oldat már nem tisztult fel, nem volt tökéletes clearing és csak pillanatokig tartott és azonnali szuperprecipitáció következett. Így az ATP legalacsonyabb kezdeti koncentrációja $5 \cdot 10^{-4}$ M volt végkoncentrációra vonatkoztatva.

Vizsgálatokat végeztünk, állandó fehérje koncentrációju de változó aktin-miozin összetételű aktomiozin rendszerekkel. Ebben az esetben a kísérleti körülményeink a következők voltak: Preparáltunk tisztított miozint és aktint. A két strukturfőfehérjéből előállítottunk 1:16, 1:8, 1:4, 1:2, 1:1, 2:1 aktin- miozin súlyarányu aktomiozin

rendszereket. A kívánt arányok létrehozása után a fehérje keverékeket szobahőfokon termosztáltuk 30 percig, hogy a miozin és aktin kapcsolódását aktomiozinná elősegítsük. Az aktomiozin létrejöttét viszkozitás méréssel is ellenőriztük. Bemértük az aktomiozint a viszkoziméterbe és megmérjük a viszkozitását, majd ATP-t adtunk a rendszerhez 10^{-2} M végkoncentrációban és ha az aktomiozin rendszer kialakult akkor a fehérje oldat viszkozitása esett.

Az aktomiozin rendszerek létrehozásakor a fehérje komponensek / aktin - miozin / magas ionerősségen voltak. Alacsony ionerősségen a fehérjék kapcsolódása csak részlegesen és nem a kívánt arálynak megfelelően történik.

Ezután az alacsony ionerősség létrehozása miatt dializáltuk a különböző arányu aktomiozinokat a már ismertetett összetételű tris-pufferben. A dialízis után a különböző arányu aktomiozin oldatok koncentrációját az összehasonlíthatóság miatt azonosra állítottuk, majd bemértünk 1,8 ml fehérje oldatot 0,2 ml 0,1 M ATP-t 0°C -on létrehoztuk a clearinget majd 27°C -on a szuperprecipitációt. Ezt minden arány esetében azonos körülmények között végeztük. Minden esetben az enzim reakciót TCA-val állítottuk le, majd szűrőssel távolítottuk el a denaturált fehérjét a rendszerből. A szűrletből meghatároztuk a felszabadult anorganikus foszfor mennyiségét. Ez utóbbiból következtettünk a rendszerben elbomlott és el nem bomlott ATP mennyiségére.

Kísérleteink során általában az ATP végkoncentrációja 10^{-2} M volt. A magas fehérje koncentráció használata is indokolta a

magas ATP koncentráció használatát. Kísérleteink során megállapítottuk, hogy ATP hatására a fehérjének nem a teljes mennyisége ment oldatba. A fehérjék oldódása a magas ATP koncentráció mellett veszteségmentesnek bizonyult.

II. 2. Szuperprecipitáló aktomiozin rendszerek folyamatának követése.

Kísérleteink során nemcsak az 1:4 arányu F-aktin-miozin rendszerekkel foglalkoztunk, hanem mint fent említettem különböző arányok mellett követtük a szuperprecipitáció folyamatát.

A különböző arányu rendszereket, vagy természetesen aktomiozinból állítottuk elő, úgy hogy a rendszerhez miozint és F-aktint adtunk, vagy már ismertetett módon miozinból és F-aktinból hoztuk létre a kívánt arányokat.

Ennek megfelelően 1:16, 1:8, 1:4, 1:2, 2:1 F-aktin-miozin arányu aktomiozin rendszerek viselkedését vizsgáltuk.

A szuperprecipitáció teljes folyamatát a következő módszerekkel követtük:

- a./ szabad szemmel való megfigyelés /magas fehérje koncentrációk esetén/
- b./ turbidimetriás módszer /alacsony fehérje koncentrációk esetén/

c./ sorozat ATP-áz mérés

d./ viszkozitás mérés.

a./ Magas fehérje koncentrációk esetén a folyamat szabad szemmel jól látható. A fehérje oldatokat a szuperprecipitációhoz dializissel készítettük elő. A dializist az ismertetett módon és oldattal végeztük. A dialízis után a kicsapódott fehérjéből 1,8 - 1,8 ml-t mértünk ki. Majd 0°C-on állandó keverés mellett 0,2 ml ATP-t adtunk a rendszerhez. Az ATP végkoncentrációja 10^{-2} M volt. Majd a feltisztult oldatot 17, 26, vagy 37°C-os vízfürdőbe helyeztük. Ekkor a feltisztult oldat opálosodni kezdett. A fehérjék aggregálódtak, melyet szabad szemmel jól lehetett követni. A teljes opálosodást az oldatban erős levegőbuborékok képződése kísérte. Majd az edény felső részénél kezdetét vette a két fázis kialakulása. Ezt a pillanatot vettük a szuperprecipitáció kezdetének. A szuperprecipitáció végét a teljes dehidratáció jelezte, mely a fehérje zsugorodását vonta maga után.

Ezt a módszert segédeszközként használtuk, annak eldöntésére, hogy kísérleteinkhez előkészített anyagaink szuperprecipitálnak-e.

b./ A kutatók nagyrésze a szuperprecipitáció folyamatának követésére turbiditás változást használja. /Harvey M Levy, 1965, Tsutomu Yasui, 1964, Katz, 1966, Ebashi, 1961/.

Katz megállapította / Katz, 1966/, hogy a fényelnyelés mértéke a használt mérőműszer adataitól függ. Olyan fotóméterek esetében, mint a Beckmann DU, ahol a beeső fény nagyrésze szétszóródik, a szuperprecipitációt turbiditás növekedés kíséri. Azon spektrofotométereknél ahol a szórt fény minimális, ott a szuperprecipitációt turbiditás csökkenés jelzi. / Briskej, 1967/. A turbidiméterek /nefelometriás mérés/ amelyek 90° -nál a szórt fényt mérik, nem használhatók a szuperprecipitáció követésére. Ennek oka: nagy aggregátumok /mint az aktomiozin gél is/ által szórt fény nem követi a Rayleigh-féle szóródási törvényt. 90° -nál szórt fény rendszerint csökken, annak ellenére, hogy a teljes szórt fény emelkedik. A fenti okok miatt a turbidimetriás módszerrel kísért szuperprecipitációs adatok nem értékelhetők teljes biztonsággal.

Kísérleteink során választ szerettünk volna kapni nemcsak a szuperprecipitáció során felszabadult anorganikus foszfor mennyiségére, vagy a rendszerben el nem bomlott ATP koncentrációjára, hanem a szuperprecipitáció során bekövetkező konformációs változásokra is. Így a folyamatot elektronmikroszkópos kísérletekkel követtük. Mivel az elektronmikroszkópos kísérletekhez igen alacsony fehérjekoncentrációjú aktomiozin rendszerekre volt szükségünk és alacsony koncentráció mellett a szuperprecipitáció folyamatát nem tudtuk szemmel követni, ezért turbidimetriás módszert választottunk a célból.

Kísérleteink a következők voltak: a tisztított miozinból és tisztított aktinból a kívánt aránynak megfelelően előállítottuk az ismert módon a mesterséges aktomiozin rendszereket, valamint

kísérleteinkhez, természetes aktomiozint is használtunk. A fehérjék koncentrációját hígítással kb. 0,5 mg/ml-re állítottuk be dialízis előtt. Ezután az alacsony ionerősség létrehozása miatt a szokásos tris-pufferral dializáltuk a fehérjéket. A dialízis után az általunk módosított biuret módszerrel megmértük a fehérjék koncentrációját és ezután további hígítással 0,2 mg/ml koncentrációkat hoztunk létre. Ezután a fehérje oldatokból kivettünk 0,9 ml-t és hűtött küvettába helyeztük. A küvettákat továbbra is jeges-vízben tartottuk és így hoztuk létre a clearinget állandó keverés mellett $5 \cdot 10^{-3}$ M végkoncentrációju ATP segítségével. Ezután a küvettákat Spektromon 201 készülékbe helyeztük és 540 nm-nél vizsgáltuk a transzmisszió változást. A tiszta oldatnál amikor a rendszer clearingbe volt, akkor a transzmisszió alacsony volt, később megindult a zavarosodás, az aggregátumok képződése és ez a transzmisszió emelkedését vonta maga után. A szuperprecipitáció kiteljesedésére a transzmisszió gyors emelkedéséből következtettünk. A szuperprecipitáció pillanatában a transzmisszió maximuma volt és ezután rohamosan csökkent.

Ez érthető volt, miután ezután kezdődött a víz veszteség és dehidratálódás és kialakult a két fázis. Ebben a tartományban már nem követtük a folyamatot.

Ezen mérések alapján már pontosan tudtuk, hogy mikor kezdődik a clearing és meddig tart, valamint a szuperprecipitáció kiteljesedésére is választ kaptunk. Ennek alapján végeztük az elektronmikroszkópos kísérleteinket.

Röviden itt szeretném ismertetni, hogy elektronmikroszkópos kísérleteinket, hogy végeztük. A turbidimetriás méréshez előkészített anyagunkat használtuk a kísérleteinkhez. Egy petri-csészében paraffint öntöttünk ki, majd a paraffin megszilárdulása előtt 1-2 cm átmérőjű lyukakat fúrtunk. Ezekben a lyukakban öntöttük a clearingbe lévő anyagokat. Az első minta vételt a 0°C-on lévő anyagból vettük. Majd a szuperprecipitációs folyamat teljes időtartama alatt kb. 15 másodpercenként vettünk mintát az aktomiozin rendszerekből. Egész röviden csak az érthetőség kedvéért ismertetném, az elektronmikroszkópos preparálás további menetét. A kivett mintákat tárgytartó rácsokra helyeztük és 1-2 percig fixáltuk azokat / glutáraldehid segítségével / majd ezután leszivattuk az anyagokat és a tárgytartó rácsokat desztillált vízzel mostuk a megtapadt sók eltávolítása miatt. Ezután a festés, a kontrasztosítás következett, melyet uranilacetát segítségével végeztük. Az ugynevezett negatív festési technikával előkészített preparátumokat vizsgáltuk azután az elektronmikroszkópban.

- c./ Majd sorozat ATP-áz mérést végeztünk a clearing és szuperprecipitáció fázisában az AM rendszer enzimatiszus aktivitásváltozásának követésére. Különböző arányu aktomiozin rendszereket hoztunk létre az aktin - miozin szuperprecipitációra gyakorolt hatása, valamint az ATP bontás miatt. Az arányokat az ismert módon hoztuk létre. Dializáltuk az aktomiozin rendszereket az alacsony ionerősség kialakítása miatt. Ezután minden

arány esetében a következő kísérleteket végeztük, /az előfordult arányok 1:16, 1:8, 1:4, 1:2, 1:1, 2:1 F - aktin - miozin /. Bemértünk 10-15 db kémcsőbe 1,8 ml fehérje oldatot. Termosztáltuk 0°C-on kb. 5 percig ezután folyamatos keverés mellett bemértünk 0,2 ml 0,1 M ATP-t a rendszerbe. Anyagaink ekkor clearingbe voltak. Két kémcsőhöz 2 ml hideg TCA-t adtunk az enzimreakció leállítása miatt. A denaturált fehérjét szűrővel távolítottuk el, majd a szűrletet hidegen tároltuk. Ezután a többi kémcsövet 27 °C-os vízfürdőbe helyeztük és állandóan kevertettük a rendszereket. Adott időközönként az enzimreakciót TCA hozzáadásával leállítottuk. A kicsapási időket a szuperprecipitáció teljes ideje határozta meg. Ezen idők megállapításához nagy segítséget nyújtottak az a./ pont alatt leírt megfigyeléseink. A denaturált fehérjét minden esetben szűrővel távolítottuk el. A szűrletekből Fiske-Subbarow módszerrel meghatároztuk az anorganikus foszfor mennyiségét. A különböző arányu aktomiozin rendszerek szuperprecipitációs ideje különböző volt, és ezen időket nagymértékben befolyásolta az aktin mennyisége. A különböző arányu aktomiozin rendszerek fehérje koncentrációja azonos volt.

Mint említettem a szuperprecipitációt nagymértékben befolyásolja az aktin jelenléte, ezért kísérletet végeztünk az aktin hatásának tanulmányozására.

Az alacsony ionerősségen lévő miozin oldatból, mely koncentrációja 7,2 mg/ml volt bemértünk 1,8 ml kémcsővekbe

és hidegen termosztáltuk, majd hozzátettünk 0,2 ml 0,1 M ATP inkubáltuk a miozint az ATP-vel 0°C-on, majd a rendszert 26°C-os vízfürdőbe helyeztük. 6 percig inkubáltuk és közben 2-4-6 percnél leállítottuk az enzimreakciót a szokásos módon és a szűrletet eltettük. A többi kémcsövet tovább inkubáltuk, de most már úgy, hogy 1:4, és 1:8 aktin-miozin aránynak megfelelően aktint tettünk a rendszerhez állandó keverés mellett és ismét két percenként leállítottuk az enzimreakciót. A felszabadult anorganikus foszfor mennyiségéből következtettünk az aktin-miozin hatásra.

Az eddigi kísérleteink azt mutatták, hogy a felszabadult anorganikus foszfor mennyisége a szuperprecipitáció folyamán változik, illetve a clearing során alacsony a foszfor felszabadulás és a szuperprecipitáció megindulásának pillanatában ez rohamosan megemelkedik. Így ezen folyamatok tisztázására végeztük a következő kísérletet.

A dializált természetes /1:4/ aktomiozinból bemértünk 10-15 db kémcsőbe 1,8 ml-t clearinget hoztunk létre az ismert módon és állandó keverés mellett szuperprecipitációt, majd meghatározott időközönként leállítottuk a folyamatot és a felszabadult anorganikus foszfor mennyiségét megértük. Ez utóbbiból az ATP-az aktivitásra következtettünk. Ezután módosítottuk a kísérletet.

Bemértük a dializált fehérjét a kémcsővekbe, de úgy hogy a fehérje oldat tartalmazott 10^{-3} M végkoncentrációban

EDTA-t is a Ca ionok blokkolása miatt.-Ebben az esetben is megnéztük a szuperprecipitációs folyamat ATP-áz aktivitását. Majd újabb kísérletet végeztünk, úgy hogy a rendszerhez Ca ionokat adtunk 10^{-2} M végkoncentrációban és a felszabadult anorganikus foszfor mennyiségét ilyen körülmények között mértük.

Ezen kísérletekkel a clearing fázisba lejátszódó folyamatokra tudtunk következtetni. Eredményeinket a későbbiek során foglalom össze.

A sorozat ATP-áz méréseket ezután módosítottuk, a körülmények konstansabbá tétele céljából, a kis térfogatu rendszerek szórási hibájának kiküszöbölése végett. / 1,8 ml térfogat 10-15 db kémcső/. A kísérleteinkhez szükséges aktomiozin rendszereket nagy térfogatban dializáltuk alacsony ionerősség elérése miatt. Ezután kimértünk kb. 40 ml fehérje oldatot és 0°C -on inkubáltuk. Majd 2 ml kivettünk a mintából és hűtött - jéghideg TCA-val kicsaptuk. Ezután a maradék fehérje oldatot 17°C -os vízfürdőbe helyeztük és mágneses keverővel állandóan kevertettük. Időről-időre mintákat vettünk ki a rendszerből és TCA-val denaturáltuk. Az így kivett minták pontosabban tükrözték a rendszer pillanatnyi állapotát. A kísérletet 1:4 és 1:2 arányu F-aktomiozin arányu aktomiozin rendszerrel végeztük. Kísérleteink során a fehérje koncentrációt változtattuk, de különben kísérleti körülményeink azonosak voltak. A használt ATP végkoncentrációja 10^{-2} M volt. A TCA-val kicsapott oldatokat szűrtük és a szűrle-



tekből a felszabadult anorganikus foszfor mennyiségét határoztuk meg.

- d./ Viskozitásméréseket végeztünk az aktomiozin komplex, illetve az aktin és miozin disszociációjának vizsgálatára a clearing és szuperprecipitáció folyamán.

Kísérleteinket 1:16, 1:4, 1:1 arányu aktomiozin rendszerekkel végeztük. A kívánt arányokat mesterségesen hoztuk létre, tisztított miozinból és F-aktinból. A fehérjék ionerősségét dialízissel állítottuk be a szokásos módon. Kísérleteinket a következőképpen végeztük: a viszkozitást módosított Oswald-féle viszkoziméterbe mértük. Minden esetben 2,5 ml volt a végtérfogatunk. Az ATP végkoncentrációja 10^{-2} M volt. A hőmérséklet 17°C . Az aktomiozin rendszerek viszkozitását kétféle módon követtük:

- 1./ Az 1:4 arányu aktomiozint dializáltuk, meghatároztuk a fehérje koncentrációt a módosított biuret módszerrel és a fehérje koncentrációt 2,9 mg/ml-re állítottuk be. Ezután ki-mértük a kívánt térfogatot 0°C -on clearinget hoztunk létre ATP segítségével, majd a rendszert 17°C -os vízfürdőbe helyeztük. Néztük az anyag viszkozitását. A clearing fázisban lévő aktomiozin viszkozitása viszonylag alacsony volt és minél inkább kiteljesedett a szuperprecipitáció annál magasabb

viszkozitása volt az anyagnak. A szuperprecipitáció végét a viszkozitás maximuma jelezte. Ezután a kicsapódott anyag viszkozitása már mérhetetlen volt.

2./ A fehérje komponenseket a kísérlethez külön-külön dializáltuk.

Majd az 1:4 arálynak megfelelően beállítottuk a fehérjekoncentrációkat. Ezután külön-külön az aktinhoz és miozinhoz ATP-t tettünk 0°C -on 10^{-2} M végkoncentrációban majd az 1:4 arálynak megfelelően bemértük a komponenseket a viszkoziméterbe, 17°C -on inkubálva. Ezután viszkozitás méréssel követtük a szuperprecipitáció folyamatát. A mérést csak a szuperprecipitáció időpillanatáig végeztük, mert ezután a viszkozitás mérhetetlen az anyag kicsapódás miatt.

Méréseink során megnéztük a miozin és aktin viszkozitását is. Ebben az esetben a fehérjekoncentrációk az 1:4, illetve a 1:16 és 1:1 arálynak megfelelőek voltak.

Kísérleteink során nem abszolút viszkozitást, hanem minden esetben tris-pufferre vonatkoztatott relatív viszkozitást mértünk.

II. 3. Különböző arányu aktomiozin rendszerek szuperprecipitációja.

Kísérleteket végeztünk, annak a tisztázására, hogy a különböző arányu aktomiozin rendszerek szuperprecipitációja között van-e különbség.

Kísérleteinkhez 1:16, 1:8, 1:4, 1:2, 1:1, 2:1 arányu mesterséges aktomiozinokat hoztunk létre tisztított miozinból és aktinból. A fehérje oldatokat dializáltuk a kívánt ionerősségnek megfelelően. A dialízis után a fehérje oldatból kivettünk meghatározott térfogatokat és 6 paralellal meghatároztuk a koncentrációkat a módosított biurett módszerrel. Ezután a fehérje oldatból ismét kivettünk ismert térfogatot és 0°C -on 10^{-2} M végkoncentrációju ATP segítségével clearinget hoztunk létre. A 0°C -on lévő anyagból kivettünk ismert térfogatot és 6 párhuzamos méréssel megnéztük a fehérje koncentrációt. Ezután a clearingbe lévő anyagot 37°C -os vízfürdőbe helyeztük és szuperprecipitáltattuk a rendszert. A szuperprecipitáció végén, amikor az anyag zsugorodása bekövetkezett, azonnal elválasztottuk a két fázist. Megnértük a térfogatát és ezután párhuzamos mérésekkel megállapítottuk a fehérje koncentrációt. Az ismert térfogatok és fehérje koncentrációk segítségével a szuperprecipitátum koncentrációját meghatároztuk. A módszert pontatlanná tette a precipitátum térfogatának elhanyagolása.

Ezért módosítottuk a kísérletet úgy, hogy csak a clearingbe lévő anyag koncentrációját néztük meg, majd szuperprecipitáltattuk az anyagot és a felüluszót ismét elválasztottuk az üledéktől. A felüluszó koncentrációját is megnértük. Majd a szuperprecipitátumot ismert térfogatban visszaoldottuk. Meghatároztuk ismét a fehérje koncentrációt. Ezen fehérje koncentrációk ismeretében következtettünk a szuperprecipitált hányadra. Kísérleteink során megállapítottuk, hogy 1:16,-tól 1:4 F-aktin-miozin

arányig a szuperprecipitált anyag elválasztása és a clearing és a szuperprecipitáció folyamata élesen elkülöníthető, míg magasabb aktin jelenléte esetén az elválaszthatóság nem olyan éles.

II. 4. A szuperprecipitátum elkülönítése és tulajdonságainak vizsgálata.

Dolgozatomban már több helyen említettem a szuperprecipitátum elnevezést. Itt szeretném ismertetni kinyerésének körülményeit. Tisztított miozinból és tisztított aktinból különböző arányu mesterséges aktomiozin rendszereket hoztunk létre. Fehérje oldataink ekkor magas ionerősségen voltak. Mint ismeretes, a szuperprecipitáció létrejöttéhez alacsony ionerősségen lévő fehérje oldatok szükségesek. Ezért a már többször említett és ismertetett tris-pufferral szemben dializáltuk a fehérjéket többszöri cserével. A dialízis után meghatároztuk a fehérje koncentrációkat a már ismertetett módosított biuret módszer segítségével. Ezután a különböző arányu aktomiozin oldatokból kivettünk 5-5 ml kb. 6-7 alkalommal /attól függően, hogy mennyi szuperprecipitátumra volt szükségünk/. 0°C -on clearinget hoztunk létre állandó keverés mellett ATP segítségével. Az ATP végkoncentrációja 10^{-2} M volt. A clearing után az anyagokat 37°C -os vízfürdőbe helyeztük és teljes szuperprecipitációt hoztunk létre. Megvártuk míg az anyag dehidratálódik, illetve összezsugorodik. Ezután gyorsan

szűrőssel eltávolítottuk a felüluszt és az üledéket összegyűjtöttük és hidegen tároltuk a visszaoldásig.

Az elválasztást nehezítette, hogy a szuperprecipitáció folyamata két lépcsős. Az első lépcsőben a fehérjék kb. 60-80% szuperprecipitál. A szuperprecipitátum mennyiségét, mint már az előző részben ismertettem nagymértékben befolyásolja a jelenlévő aktin mennyisége. Az első szuperprecipitátum elkülönítése után a felüluszt tovább inkubálva 37°C-on újabb opálosodást figyelhattunk meg. Ez az opálosodás később enyhe aggregálódáshoz vezet. Ez a második lépcső nem tökéletes szuperprecipitáció inkább csak precipitáció.

Jelen munkámban nem foglalkozom a második precipitátum tulajdonságaival, mivel célom csak az első szuperprecipitátum vizsgálata volt. / Figyelemre méltó, hogy a másodszer precipitált anyagnak is van enzimaktivitása, amely távolabbi problémákat vet fel./

A másodszer precipitált anyag miatt azonnal szét kellett választanunk az első szuperprecipitált üledéket a felülusztól. A következőkben csak az első szuperprecipitált üledékkel foglalkoznék.

A nyert szuperprecipitátumot ezután feloldottuk. Ugy kezeltük, mint aktomiozin üledéket. Ezért 3 M KCl oldat segítségével 0,5 M KCl végkoncentrációig oldottuk vissza. Kísérleteinket mint említettem különböző arányu aktomiozin rendszerekkel végeztük.

Igy összehasonlíthatjuk a különböző F-aktin-miozin arányu aktomiozin rendszerek szuperprecipitált üledékének oldhatóságát.

Arányaink a már ismertetett arányok voltak. Ezen arányok közül a legkönnyebben az 1:16 aktomiozin oldódott. Az aktin aránya minél inkább növekedett annál nehezebb volt a szuperprecipitált üledék visszaoldása.

A visszaoldott üledékek koncentrációját biuret módszerrel határoztuk meg, és azonos koncentrációra állítottuk be.

Ezután a szuperprecipitátumok viszkozitását, ATP-áz aktivitását és a szuperprecipitáció utáni aktin-miozin arányát vizsgáltuk.

A viszkozitás mérések alapján az ATP érzékenységre kaptunk választ. Mint már ismertettem az aktomiozin rendszerek magas ionerősségen igen magas specifikus viszkozitást mutatnak. Ha ezen körülmények között ATP-t adunk a rendszerhez a viszkozitásuk hirtelen lecsökken. Majd az ATP elbomlása után az eredeti viszkozitás visszaáll. Viszkozitás mérési eredményeink azt mutatták, hogy minden arány esetében a szuperprecipitált üledékek a visszaoldás után is, mint aktomiozin rendszerek viselkednek. Ezen vizsgálat nagy segítséget jelentett a továbbiakban az ATP-áz aktivitás méréseknél.

Ezután a visszaoldott aktomiozin rendszereknek az ATP-áz aktivitását vizsgáltuk. Ezért a magas ionerősségen lévő fehérje oldatokat dializáltuk többszöri cserével és nagy térfogattal

0°C-on állandó rázatás mellett 0,01 M KCl oldattal szemben, pH 7,2. A KCl oldat tartalmazott 10^{-4} M végkoncentrációban B-merkaptotetanolt is az SH csoportok megvédése miatt. A dialízis után vizsgáltuk a kicsapódott fehérjeoldat Ca^{++} és Mg^{++} indukálta ATP-áz aktivitását.

Kísérleteinket a következőképpen végeztük:

Ca^{++} aktiválta ATP-áz aktivitás mérés: a fent leírt módon dializált fehérjéből mely fehérje koncentrációja általában 4 mg/ml volt bemértünk 1 ml-t majd 1,8 ml Ca keveréket mértünk, mely tartalmazott 0,5 M KCl, $4 \cdot 10^{-3}$ M CaCl_2 , $5 \cdot 10^{-2}$ M tris-puffert. 1 ml desztillált vizet a rendszert inkubáltuk 20°C-o 5 percig, majd bemértünk 0,2 ml 0,1 M ATP-t pH 7. Erős kevertetés mellett inkubáltuk a rendszert 7 percig majd ezután 10%-os TCA-val, mely hideg volt leállítottuk az enzimreakciót. A denaturált fehérjét szűrőssel távolítottuk el a rendszerből. A szűrletet jeges-vízben tároltuk.

Mg ionok által aktivált ATP-áz aktivitás mérés.

A kiinduláshoz a már előbb ismertetett módon dializáltuk az anyagokat, majd bemértünk a dializált fehérjéből 1 ml-t mely koncentrációja 4 mg/ml körüli volt. Ezután bemértünk 0,8 ml Mg keveréket, mely tartalmazott $4 \cdot 10^{-3}$ M MgCl_2 , $5 \cdot 10^{-2}$ M tris-puffert, a rendszert inkubáltuk 5 percig 20°C-on majd bemértünk 0,2 ml 0,1 M ATP-t pH 7 ezután 7 percig inkubáltuk az enzimet a szubszt-
ráttal. Az enzim reakciót ebben az esetben is TCA-val állítottuk

le. A denaturált fehérjét szűrővel távolítottuk el.

Mind a Ca^{++} mind a Mg^{++} aktiválta ATP-az meghatározások esetében a szűrletből a már ismertetett módon Fiske Subbarow módszerrel határoztuk meg az anorganikus foszfor mennyiségét. Mérési adatainkból specifikus aktivitást számoltunk. Összehasonlítási alapként a szuperprecipitáció előtti aktomiozin rendszerek enzimatis aktivitás értékeit vettük.

A szuperprecipitátum összetételének megismerése céljából gélelektroforetikus vizsgálatokat végeztünk.

Kísérleteinket a következőképpen végeztük. Az anyagok előkészítése úgy történt, hogy a magas ionerősségen oldatban lévő szuperprecipitátumok aktomiozin komplexeit dializáltuk tris-glicin pH 8,3 pufferral szemben 24 órán át. Ugyanakkor dializáltuk az összehasonlítási alapként használt szuperprecipitáció előtti aktomiozin rendszereket is. Az aktin miozin arányok a már fentebb ismertetett arányok voltak. A dialízis befejezése után meghatároztuk a fehérje koncentrációkat, majd ureával kezeltük az anyagokat. Az urea kezelés célja, hogy kisebb polipeptidekre bontsuk az aktomiozint, mert ellenkező esetben nem tud behatolni a gélbe. Így az alacsony molekulásúlyú vegyületek maradéktalanul a gélbe vándorolnak. A fehérje koncentráció ismeretében az oldathoz szilárd ureát adtunk olyan mennyiségben, hogy végkoncentrációja 8 M legyen. Ezzel egyidőben 0,1 M β -merkaptotetanolt is adtunk a rendszerhez az SH csoportok megvédése miatt. A fehérje oldatokat

4°C-on egy órán át intenzíven kevertettük, tökéletes oldódás elérésére. Majd 24^h jégszekrényben tároltuk az ureás fehérje oldatokat. Ezután az anyag gélre való felvitelre alkalmas volt.

Kísérleteink során az anyagokat 7,5%-os akrilamid gélre vittük fel. A futtatást tris-glicin pufferban végeztük. A felvitt anyag mennyisége 100 γ volt. Mint ismeretes a gélelektroforetikus módszer előnye, hogy igen kis anyag mennyiség szükséges és alacsony fehérje koncentrációja anyag a kísérletekhez. Miután ha alacsony a fehérje koncentráció mód van a bekonzentrálásra. A gélre felvitt anyagokat futtató kádba helyeztük és bekapcsoltuk a készüléket és 100 V-on 10 percig végeztük a bekonzentrálást, ha ez szükséges volt. Ezután történt az anyag futtatása, melyet 250 V-nál végeztünk. A futtatási idő 2,5 óra volt.

Ezután a gélek fixálása következett, melyet 12,5% TCA-ban 10 órán át végeztünk. A fixálás után a gélek festése következett. A gélek festésére azért van szükség, hogy a gélbe vándorolt anyagokat előhívjuk, láthatóvá tegyük. A festést 1%-os Comassie-kék-festékkel végeztük. Időtartama 2 óra volt. Ezután a géleket 10%-os TCA-ban mostuk. Ezt az tette szükségessé, hogy a festés során az egész gél színe kék is így nem láthatók az anyagot tartalmazó csíkok. A mosást addig végeztük, míg egymástól élesen elhatárolt csíkokat nyertünk. A gélek tárolása a kimosás után a kiszáradás megakadályozása miatt 7%-os ecetsavban történt.

Kísérleteink pontosabbá tétele miatt módosítottuk a leírt metodikát. Miután a 8 M ureás kezelés hatására a fehérjék

kisebbségi komponensekre válnak szét és ezek már a gélben képesek behatolni, de a felvitt fehérjék nagyrésze még most is a start vonalon marad. Ezért a fehérjéket a későbbi kísérleteinkben nemcsak ureával kezeltük, hanem a 7,5% akrilamid gélhez, mely tartalmazott 6 M ureát még 0,1%-os SDS-t /nátriumdodecilszulfátot/ is tettünk. A fehérjék előkészítésénél a fehérjéket tris.-ecetsav pufferral szemben dializáltuk. A puffer pH-ja 8,2 volt. A dialízis után 8 M ureával a már leírt módon kezeltük az anyagokat. Majd az SDS-t és ureát tartalmazó gélre felvittük. A futtatás ugyanúgy történt mint fent leírtam.

Az így végzett futtatásnál a felvitt fehérje teljes mennyisége behatol a gélbe.

Összehasonlítási alapként a szuperprecipitáció előtti aktomiozin rendszerek a miozin, valamint az aktin gél-elektroforetikus vizsgálatai szolgálnak.

A gélek értékelése Kipp-Zonen mikrodensitométerrel történt.

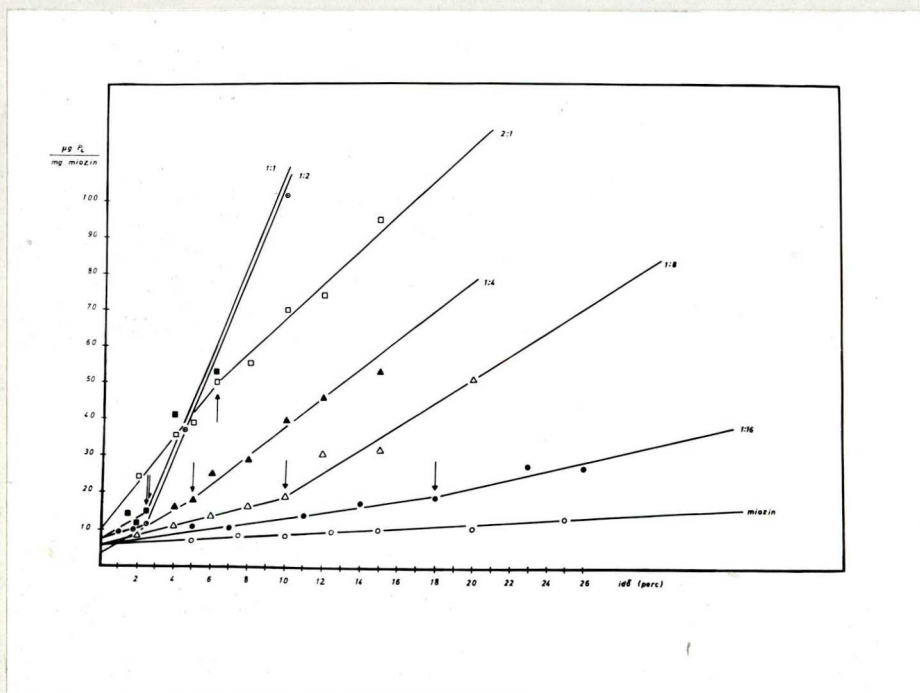
III. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELESÜK.

Az izom kontrakció szuperprecipitációs modellje leegyszerűsíti az izomban végbemenő bonyolult folyamatokat és így lehetőséget ad arra, hogy a miozin, aktin és ATP kölcsönhatását vizsgáljuk.

Munkám első részében a szuperprecipitáló aktomiozin rendszert befolyásoló tényezőkre az ATP, a miozin és F-aktin relatív mennyiségeire igyekeztem adatokat gyűjteni. A szuperprecipitáció kezdőpontjának ismerete elengedhetetlen volt. A közvetlen szemmel történő megfigyelés, sőt a turbidimetria módszer /alacsony fehérje koncentrációknál/ bizonytalansági faktorokat rejt magában, ezért megpróbáltuk a rendszer enzimatiszus aktivitás változását a clearing és szuperprecipitáció folyamán kapcsolatban hozni a fehérjék kolloidális változásaival.

Azt találtuk, hogy nemcsak a természetes aktomiozin, hanem a mesterségesen létrehozott különböző aktin-miozin sulyarányu / 1:16, 1:8, 1:4, 1:2, 1:1, 2:1 / aktomiozin rendszerekben a clearing fázisból a szuperprecipitáció fázisába való átmenetnél az ATP-és aktivitás megváltozása figyelhető

meg, mely egybeesik a szuperprecipitáció kezdőpontjával. A 11. sz. ábrán a különböző arányú aktomiozin rendszerek által felszabadított anorganikus P_i $\mu\text{g}/\text{mg}$ miozint ábrázoltam az idő függvényében.



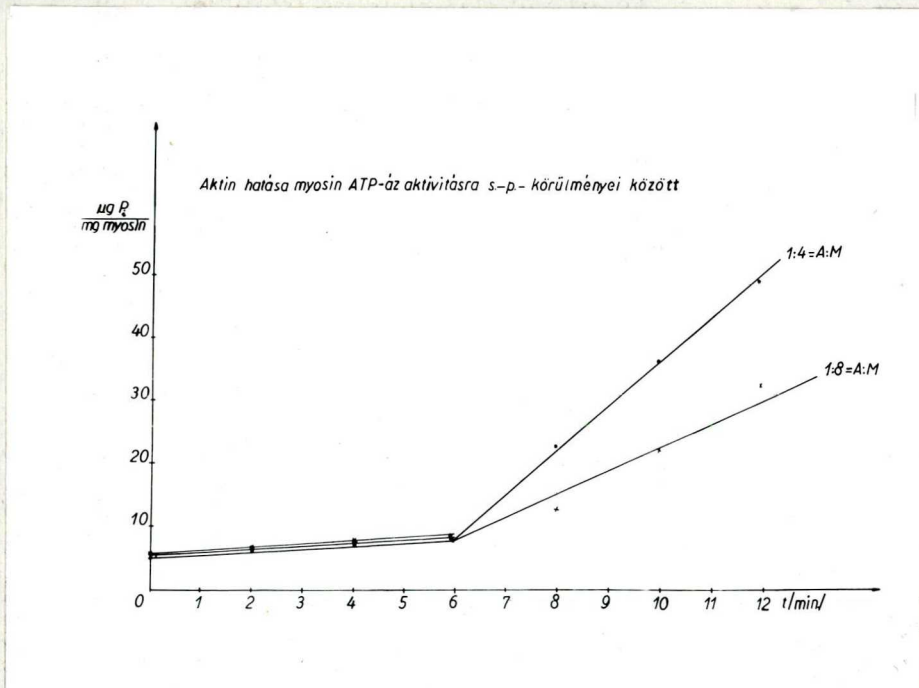
11. sz. ábra.

Az ábra a különböző összetételű aktomiozin rendszerek ATP-áz aktivitásának változását mutatja a szuperprecipitáció folyamán. A fehérje koncentráció azonos volt 7,4 mg/ml. Az ionerősség 0,13 volt / tris-dializálóval állítottuk be az ionerősséget/. pH 7. A clearinget 10^{-2} M végkoncentrációjú ATP-vel hoztuk létre; 0°C-on és a szuperprecipitációt 26°C A nyíllal jelölt pont a szuperprecipitáció megindulásának időpillanata.

Az ábra világosan mutatja az egyes görbék iránytangenseinek változását a clearing és a szuperprecipitáció fázisában és a görbék töréspontja a szuperprecipitáció kezdetével egybeesik.

A fenti ábrán / 11.sz. ábra / az is jól látható, hogy az aktin arány emelkedése már a clearing fázisban is stimulálja a miozin ATP-áz aktivitását, ugyanis az anorganikus P_i felszabadulás magasabb, mint hasonló körülmények között az aktin jelenléte nélkül.

Az aktin arány emelkedése valóban már a clearing fázisban is stimulálja a miozin ATP-áz aktivitását ezt a 12.sz. ábra is demonstrálja



12. sz. ábra.

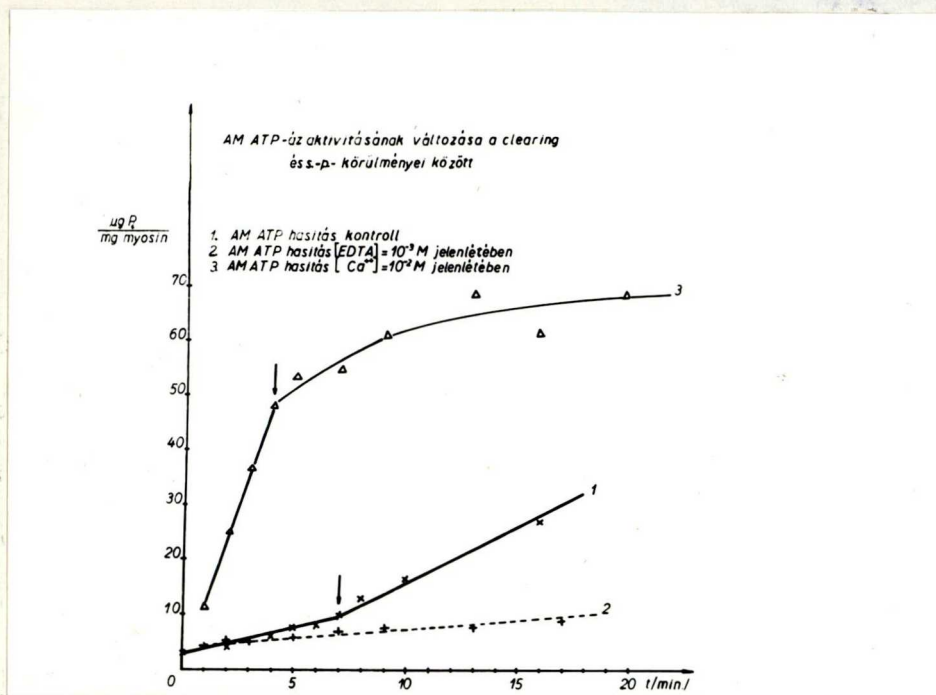
Az ábra az aktin hatását mutatja a miozin ATP-áz aktivitására a szuperprecipitáció körülményei között.

A 12.sz. ábra kísérleti körülményei, a fehérje koncentráció 7,2 mg/ml volt. Az ionerősség 0,13. Az ATP végkoncentrációja 10^{-2} M volt, a pH 7. Az aktin-miozin arány 1:4, illetve 1:8 volt. A kontroll 7,2 mg/ml koncentrációjú miozin volt.

Az ábrán látható, hogy a miozin azonos koncentráció mellett állandó ATP-áz aktivitást mutat, 6 perc után a rendszerhez különböző aránynak megfelelően aktint adtunk és az ábra világosan mutatja, hogy ez aktivitás emelkedéshez vezetett. Az aktin anélkül, hogy a szuperprecipitáció bekövetkezett volna fokozta az ATP-áz aktivitást.

Az irodalomban szinte egységesen elfogadott az a nézet, hogy az aktomiozin rendszer ATP-hatására a clearing fázisban miozinra és aktinra bomlik, míg a szuperprecipitáció fázisában helyreáll az aktomiozin komplex. Ezért megvizsgáltuk a Ca^{++} hatását a clearing fázisra. Ismeretes, hogy a Ca^{++} a miozin ATP-áz aktivitását erősen fokozza.

A 13.sz. ábra a felszabaduló $\mu\text{gP}_i/\text{mg}$ miozin értékét az idő függvényében ábrázolja.



13. sz. ábra

Az ábra az aktomiozin ATP-áz aktivitásának változását mutatja a szuperprecipitáció folyamán Ca^{++} és EDTA jelenlétében.

A fehérje koncentráció $7,0 \text{ mg/ml}$ az ionerősség $0,13$ volt.

Az aktin miozin arány $1:4$ és a pH 7 .

Az 1.sz. görbe $4 \cdot 10^{-3} M$ Mg^{++} jelenlétében mutatja az ATP-áz aktivitását.

A 2.sz. görbe $10^{-3} M$ EDTA hatását mutatja a Ca^{++} teljes megkötésével a clearingre.

A 3.sz. görbe $10^{-2} M$ Ca^{++} erősen aktiváló hatását mutatja a clearing folyamán.

A nyíllal jelölt pont a szuperprecipitáció megindulásának pillanata.

Az első görbe $4 \cdot 10^{-3} M$ végkoncentrációju Mg^{++} jelenlétében mutatja a természetes aktomiozin szuperprecipitációját. A



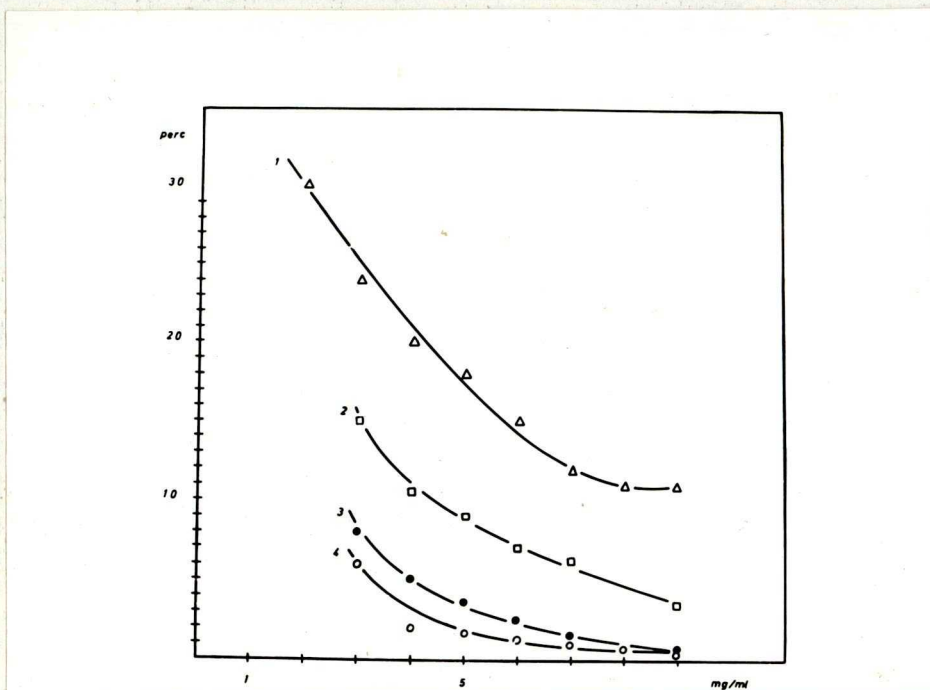
töréspont alapján a clearing és a szuperprecipitáció fázisa elkülöníthető.

A harmadik görbe 10^{-2} M Ca^{++} erősen aktiváló hatását mutatja a fehérjerendszer ATP bontó képességére a clearing fázisban. Látható, hogy a szuperprecipitáció előbb indul meg, mint a kontroll / első görbe / aktomiozin rendszer esetén, de további aktivitás fokozódás nem jött létre.

A második görbe 10^{-3} M EDTA hatását mutatja a Ca^{++} teljes megkötésével, mely a clearing és a szuperprecipitáció gátlásához vezetett.

Az ATP, fehérje, és ionok közötti kapcsolat tanulmányozása során különböző Mg^{++} koncentráció hatását is vizsgáltuk az aktomiozin szuperprecipitációjára. Megállapítottuk, hogy $4 \cdot 10^{-3}$ M-ről 10^{-4} M-re csökkentve a Mg^{++} koncentrációt a szuperprecipitáció előbb jött létre és ez a hatás az alacsonyabb fehérje koncentráció tartományában kifejezettebb. Mivel a szuperprecipitáció idő folyamatát a Mg^{++} koncentráció kevésbé befolyásolja, úgy tűnt, hogy a Mg^{++} gátló hatása elsősorban a clearing fázisra irányul. Ezt demonstrálja a 14. sz. ábra.

Az ábra a különböző fehérje koncentrációk esetében a Mg^{++} koncentráció hatását szemlélteti, az idő függvényében.



14. sz. ábra.

A Mg^{++} koncentráció hatását szemlélteti az ábra a clearing fázis folyamán.

1. sz. görbe $4 \cdot 10^{-3}$ M Mg^{++} koncentráció mellett mutatja a szuperprecipitáció kezdetét.

2. sz. görbe 10^{-4} M Mg^{++} koncentráció mellett mutatja a szuperprecipitáció kezdetét.

3. sz. görbe $4 \cdot 10^{-3}$ M Mg^{++} koncentráció mellett mutatja a szuperprecipitáció kezdete és vége közötti időt.

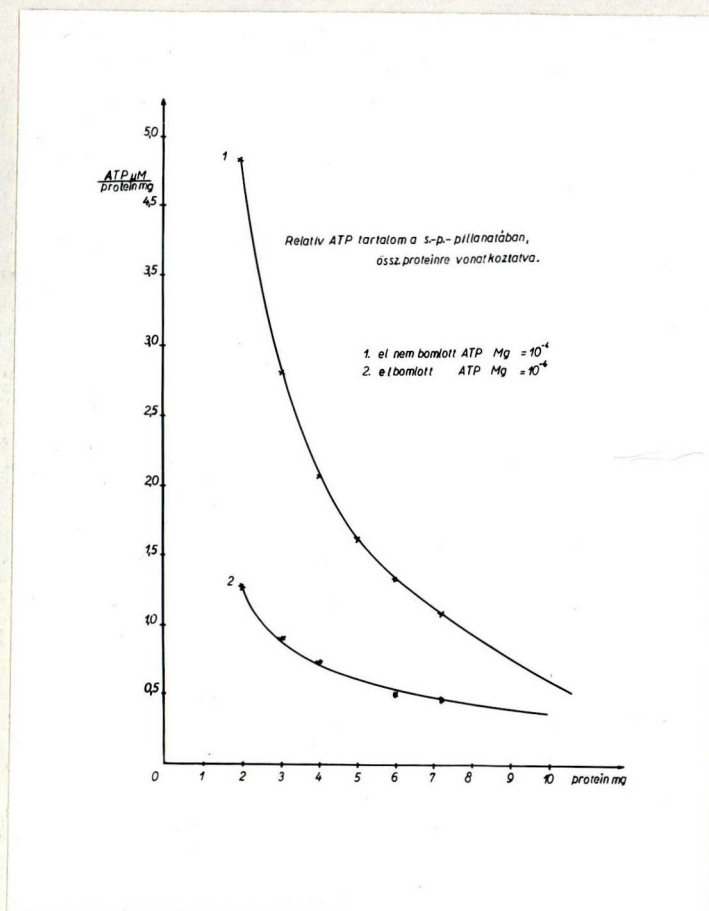
4. sz. görbe 10^{-4} M Mg^{++} koncentráció mellett mutatja a szuperprecipitáció kezdete és vége közötti időt.

A fehérje koncentráció minden esetben 7 mg/ml volt. Az ionerősség 0,13. A pH 7.

Az eddig demonstrált 11. 12. 13. sz. ábrákról is jól látható, hogy a szuperprecipitáció nem a bevitt ATP teljes lebomlásakor következik be. Megállapításunkat alátámasztja az a kísérlet sorozat, melynél a szuperprecipitáció pillanatában leállított rendszerben visszamaradó ATP-vel újabb és újabb rendszereket tudtunk szuperprecipitációba vinni.

Érdekesnek tűnt vizsgálatokat végezni a különböző fehérje koncentrációju aktomiozin rendszerek szuperprecipitációjának és aktuális ATP koncentrációjának összefüggéséről.

A 15.sz. ábrán a különböző fehérje koncentrációk függvényében ábrázoltuk a szuperprecipitáció pillanatában felszabadult, illetve visszamaradt μM ATP / mg fehérje mennyiségét. Látható, hogy gyorsabban csökkenő görbét ad a szuperprecipitációkor a rendszerben visszamaradó ATP mennyisége, mint az elbomlott ATP mennyisége. A görbéből az is kitűnik, hogy minél alacsonyabb volt a fehérje koncentrációja, annál több ATP bomlott el fehérje mg-ként.

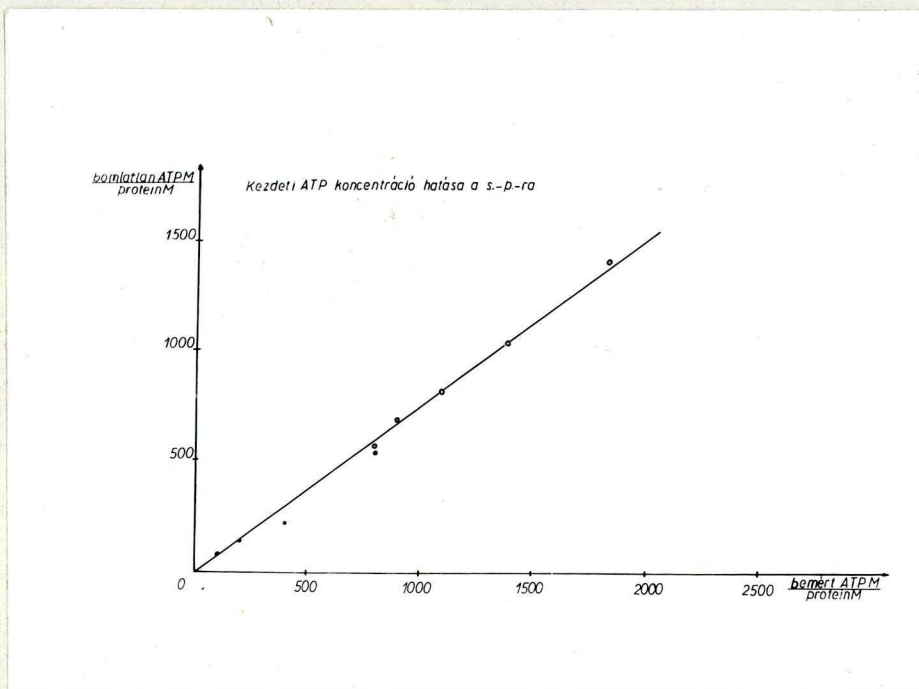


15. sz. ábra.

Az ábra a relatív ATP tartalmat mutatja a szuperprecipitáció pillanatában össz. fehérje vonatkoztatva. A $Mg^{++} = 10^{-4} M$. A fehérje koncentrációk 1 - 10 mg/ml változtak. Az ATP koncentráció $10^{-2} M$ volt. A hőfok $26^{\circ}C$.

Összefüggést kerestünk a benért ATP mol/ fehérje M, valamint a rendszerben szuperprecipitációkor visszamaradt ATP relatív mennyisége között. Adatainkat változó ATP koncentráció és konstans fehérje koncentráció, illetve változó fehérje és konstans ATP koncentráció mellett végzett kísérletekből nyertük.

16.sz. ábra a szuperprecipitáció pillanatában mutatja, hogy lineáris összefüggés van a miozin molekulára számított ATP és a rendszerben szuperprecipitációkor visszamaradó relatív ATP tartalmak között



16. sz. ábra.

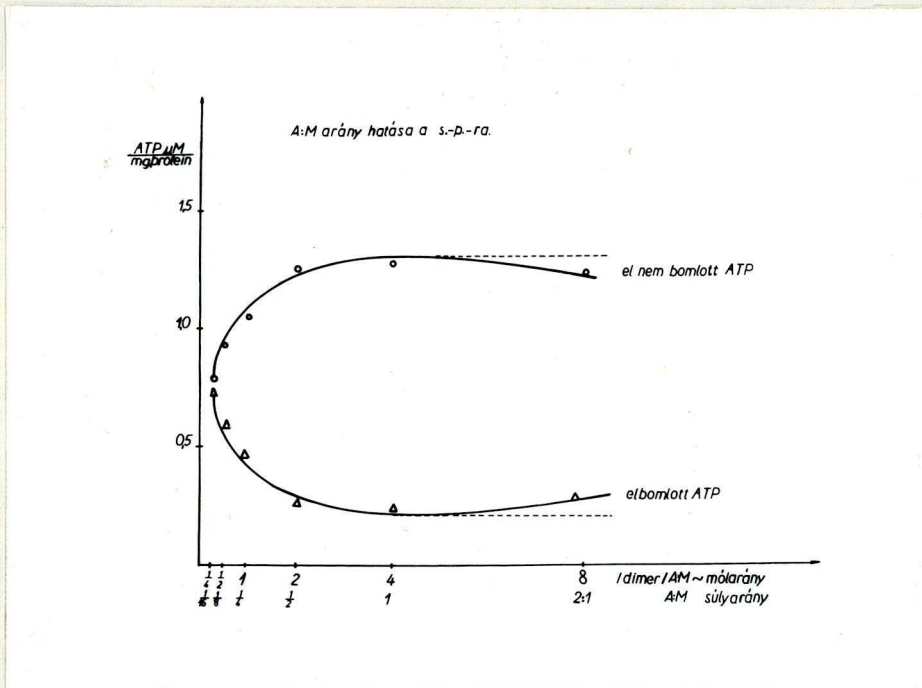
Az ábra a kezdeti ATP koncentráció hatását demonstrálja a szuperprecipitációra.

A tömött pontok a változó ATP koncentráció eredményei.

Az üres karikák a változó fehérje koncentráció mellett végzett kísérlet eredményei. Az ábrán jól látható a linearitás.

Hasonlóan megvizsgáltuk a szuperprecipitáció pillanatában a rendszerben visszamaradó és elbomlott relatív ATP arányokat különböző aktin, miozin arányok mellett azonos össz-fehérje koncentrációban.

17. sz. ábra a kísérleti adatokat demonstrálja, az abcisszán az aktin-miozin mol illetve súlyarány, az ordinátán pedig az ATP $\mu\text{M}/\text{mg}$ fehérje értékei vannak felvéve. Ugy tűnik, hogy létezik egy olyan aktin-miozin arány, melynél az elbomlott illetve a rendszerben visszamaradó ATP relatív mennyisége állandóvá válik.



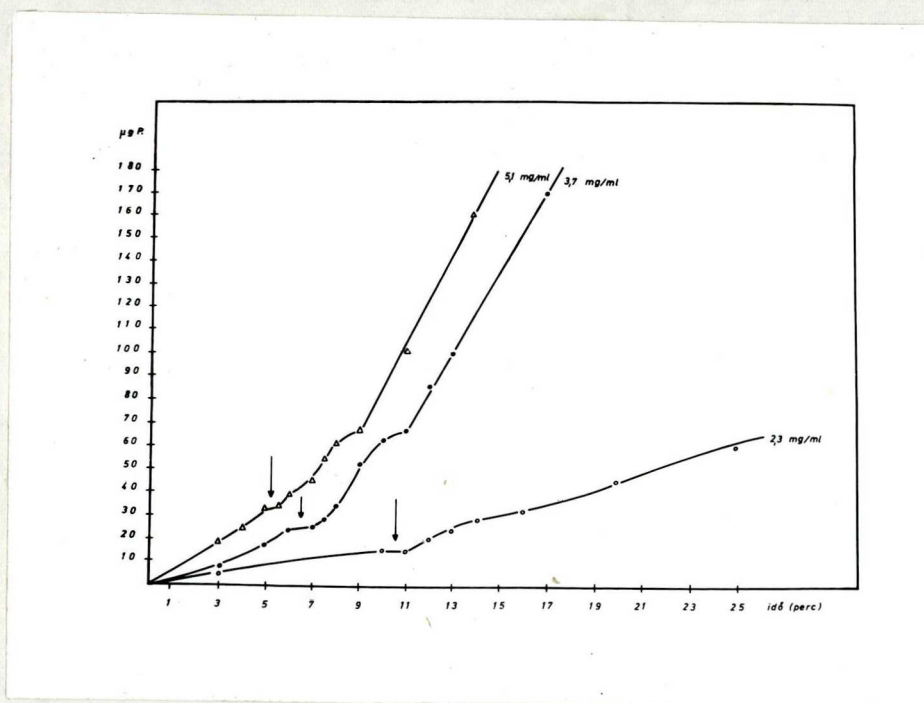
17. sz. ábra.

Az ábra az F-aktin-miozin arány hatását mutatja a szuperprecipitációra. A fehérje koncentrációk minden arány esetében $7,4 \text{ mg/ml}$ volt. A Mg^{++} 10^{-4} M volt. Az ionerősség $0,13$ és a pH 7 . A szuperprecipitációt 26°C -on végeztük. Az arányok: $1:16$, $1:8$, $1:4$, $1:2$, $1:1$, $2:1$ volt.

Az aktomiozin rendszer szől-gél-dehidratált gél átalakulásának mélyebbre ható megismeréséhez külön vizsgáltuk a szuperprecipitáció kezdő és végpontjai közötti intervallumot. Ebben a szakaszban történik meg a fázisátmenet, mely végül is a dehidratált gél zsugorodásában nyilvánul meg.

Mint a kísérleti részben leírtam, nagy mennyiségű fehérjét hoztunk clearingbe 0°C -on 10^{-2} M ATP-vel és állandó keverés mellett 17°C -on inkubáltuk a rendszert. Meghatározott időközönként azonos térfogatu mintákat vettünk ki a rendszerből, és az ATP-és aktivitásra a felszabadult anorganikus foszfor mennyiségéből következtettünk.

A 18. sz. ábra a természetes aktomiozin különböző fehérje koncentráció mellett mutatja a sorozat ATP-áz vizsgálat eredményeit.



18. sz. ábra.

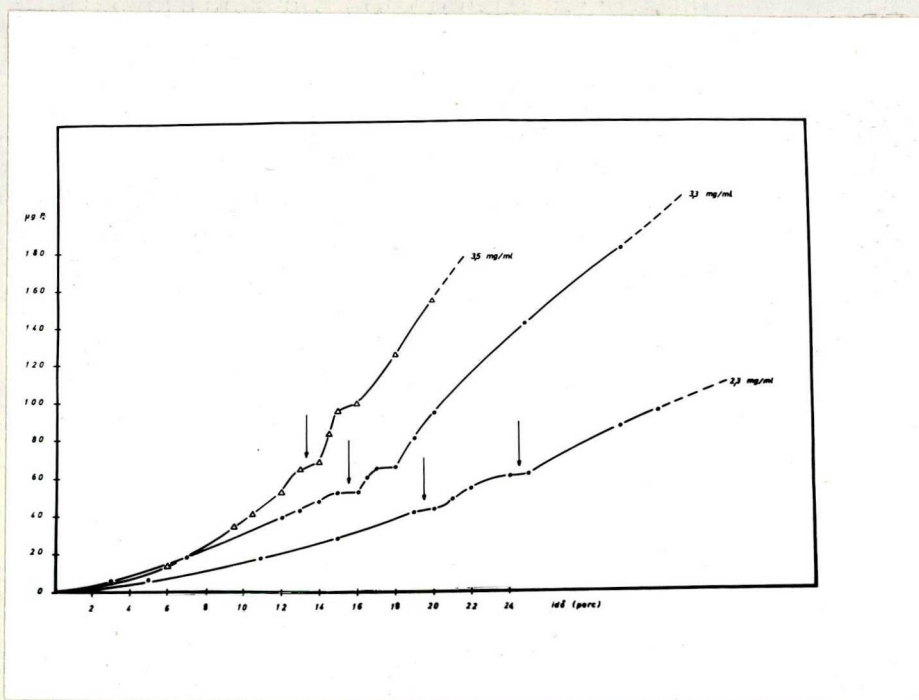
Az ábra az alacsony ionerősségen lévő /0,13/ természetes aktomiozin rendszer ATP-áz aktivitását mutatja, a felszabadult P_i alapján. A fehérje koncentrációk: 5,1, 3,7, 2,3 mg/ml.

Az ábrából látható, hogy a teljes folyamat három szakaszból áll. Az első szakasz az ún. clearing fázis, melyet az ábrán lévő nyíl is jelez. Itt a rendszerben lévő ATP-nek kb. 5% bomlott le. A clearing fázis szakaszát egy szigmoid alakú szakasz követi, ennek első részén foszfor felszabadulás nem mérhető. Ez a szakasz megegyezik a szuperprecipitáció kezdetével. Ezt a stagnálást követi egy gyorsabb foszfor felszabadulás, mely a szuperprecipitáció befejeződésével egybeeső lassu szakasszal zárul. Ekkor a rendszerben lévő ATP-nek kb. 10% bomlik le.

A harmadik szakasz a szuperprecipitációt követő gyors ATP hidrolízis, mely rendszerünkben az új aktomiozin komplex ATP-áz aktivitásának következménye. Ezen szakasz specifikus ATP-áz aktivitási értéke 10-15x-e a hasonló nem szuperprecipitált aktomiozin aktivitásának.

A 19. sz. ábra is a fenti megállapításunkat támasztja alá. Az ábrán az 1:2 arányú F-aktin-miozin rendszer ATP-áz aktivitása látható a szuperprecipitáció folyamán, különböző koncentrációknál. Itt is világosan elkülöníthető a már említett három szakasz, valamint az is kitűnik, hogy a szuperprecipitáció akkor következik be, amikor az ATP még olyan magas koncentrációban van jelen a rendszerben, hogy más aktomiozin rendszereket képes szuperprecipitációba vinni.

A szuperprecipitáció tehát nem lehet az alacsony ATP koncentráció következménye.



19. sz. ábra.

Az ábra 1:2 arányú aktomiozin rendszer ATP-áz aktivitás változását szemlélteti a szuperprecipitáció során. A kísérlet során az ionerősség 0,13 volt. A Mg^{++} koncentráció 10^{-4} M a pH 7. A fehérje koncentráció 3,5, 3,3, 2,3 mg/ml.

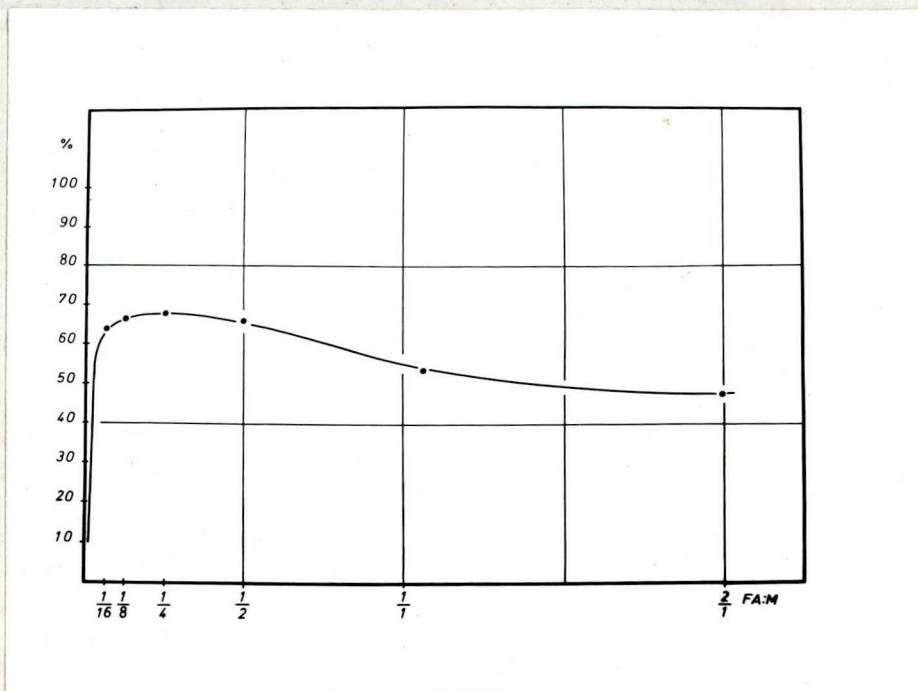
A 17.-18.sz. ábrán feltüntetett kísérleti adatokból kiszámítható a B-miozin és a mesterségesen létrehozott 1:2 arányú F-aktin:miozin rendszer szuperprecipitációjának időpillanatában

felszabadult foszfor molja és a bemért miozin mólok közötti összefüggés.

Megállapítottuk, hogy a különböző fehérje koncentrációknál ez az arány állandó, B-miozinnál $0,28 \text{ MP}_1/\text{M}$ miozin, míg az 1:2 aránynál az előbbi érték 4x azaz $1,02 \text{ MP}_1/\text{M}$ miozin a foszfor felszabadulás.

További összefoglalóban a szuperprecipitáció folyamatának végtermékéről a szuperprecipitátum enzimatisus, fiziko-kémiai és ultrastrukturális sajátosságaira vonatkozó vizsgálatainkról számolok be.

A kísérletes részben részletesen ismertettem, hogy a szuperprecipitátum kinyeréséhez mesterségesen hoztuk létre az 1:16, 1:8, 1:4, 1:2, 1:1,2:1 súlyarányú F-aktin-miozin keverékeket, melyek fehérjekoncentrációja azonos volt. A rendszereket 10^{-2}M ATP-vel szuperprecipitáltattuk, majd a keletkezett üledéket 0,5 M KCl-ban visszaoldottuk. Ezen eredményeinket a 20.sz. ábra demonstrálja. Az abcisszán az F-aktin-miozin arány az ordinátán a szuperprecipitátum mennyisége a clearing összfehérje %-ában van feltüntetve.



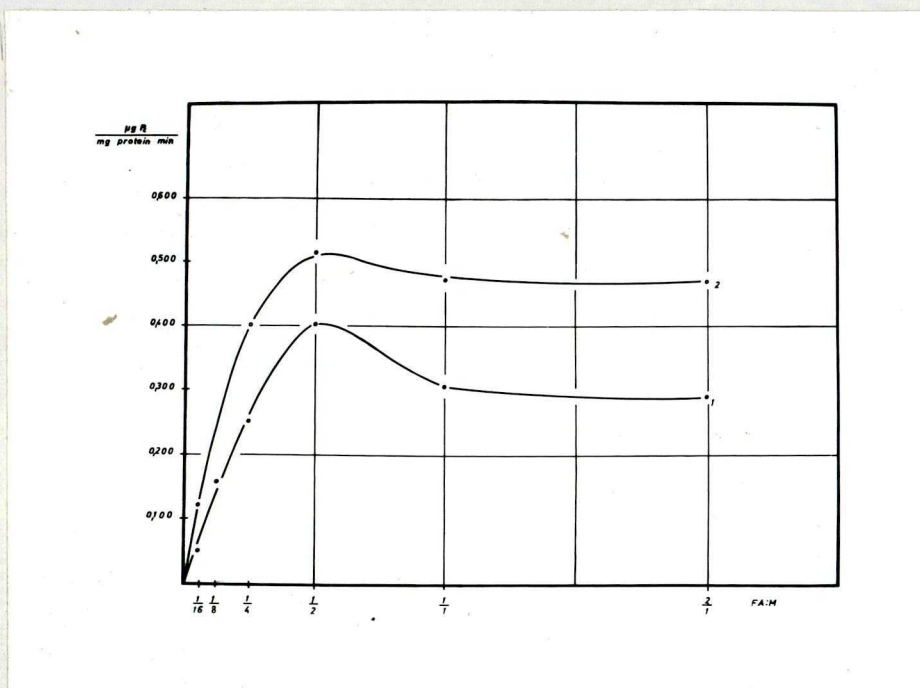
20. sz. ábra.

Az ábra a szuperprecipitum alakulását mutatja a clearing %-ában kifejezve. A különböző arányoknál azonos volt a fehérje koncentráció 7 mg/ml. Az ionicitás 0,13 a pH 7. Az arányok: 1:16, 1:8, 1:4, 1:2, 1:1, 2:1.

Látható, hogy az azonos kiindulási fehérjekoncentrációk ellenére az üledék mennyisége a különböző F-aktin-miozin arányoknál eltérő, azaz 1:16-tól 1:2 arányig a szuperprecipitált hányad növekszik, az aktin ennél nagyobb arányu jelenléte esetén csökken.

Ezek az adatok arra utalnak, hogy az üledék összetétele egy optimális F-aktin-miozin arány kialakulása felé tendál.

A szuperprecipitátum enzimatis aktivitásának követésekor a következő eredményeket kaptuk. A 21. sz. ábra abcisszája az F-aktin-miozin arányt, az ordináta a Mg^{++} indukálta ATP-áz specifikus aktivitási értékeit jelzi.



21. sz. ábra.

Az ábra a Mg^{++} indukálta különböző F-aktin-miozin arányu aktomiozin rendszerek specifikus aktivitását demonstrálja.

1. sz. görbe a szuperprecipitáció előtti specifikus,

2. sz. görbe a szuperprecipitáció utáni specifikus aktivitást

mutatja. Az ionerősség 0,1 volt és a pH 7. Az enzimhasítás $20^{\circ}C$ -on történt 7 percig. Mg ion koncentráció 2 mM az ATP koncentrációja 5 mM volt.

Az ábrából világosan kitűnik, hogy a kiindulásiértékhez képest melyet az 1. sz.görbe mutat a szuperprecipitált üledék

aktivitása valamennyi esetben /ahogy azt a 2.sz. görbe mutatja/
magasabb értékeket eredményez.

Közelebbről vizsgálva mindkét görbén az aktivitás 1:16-tól
1:2 arányig emelkedik az 1:2 és 2:1 arány között megközelítőleg
azonos aktivitási eredményeket mutat.

A szuperprecipitált üledék összetételének pontosabb vizsgálá-
tára gélelektroforetikus vizsgálatokat végeztünk, melyek
adatait az 1.sz. táblázat mutatja.

Változást tapasztaltunk a kezdeti F-aktin-miozin arányhoz
képest a szuperprecipitált üledék összetételében. Ugy tűnik,
hogy ez a változás egy optimális F-aktin-miozin arány kialaku-
lása felé mutat. A táblázat adataiból az optimális arány
3:1 F-aktin-miozin mol-nak adódik.

Aktin és miozin relatív mennyisége.			
kezdeti	szuperprecipitáció után		szuperprecipitáció után
aktin-miozin arány	aktin %	miozin	aktin-miozin arány
1:16	863	91,37	1:10
1: 8	11,35	88,65	1: 8
1: 4	16,29	83,71	1: 5
1: 2	23,45	76,55	1: 3
1: 1	25,43	74,57	~ 1: 3
2: 1	28,39	71,61	~ 1: 3

1.sz. táblázat.

Az optimális arány 3:1 F-aktin-miozin mol-nak adódik.
A sulyarány 1:3 F-aktin-miozinnek.

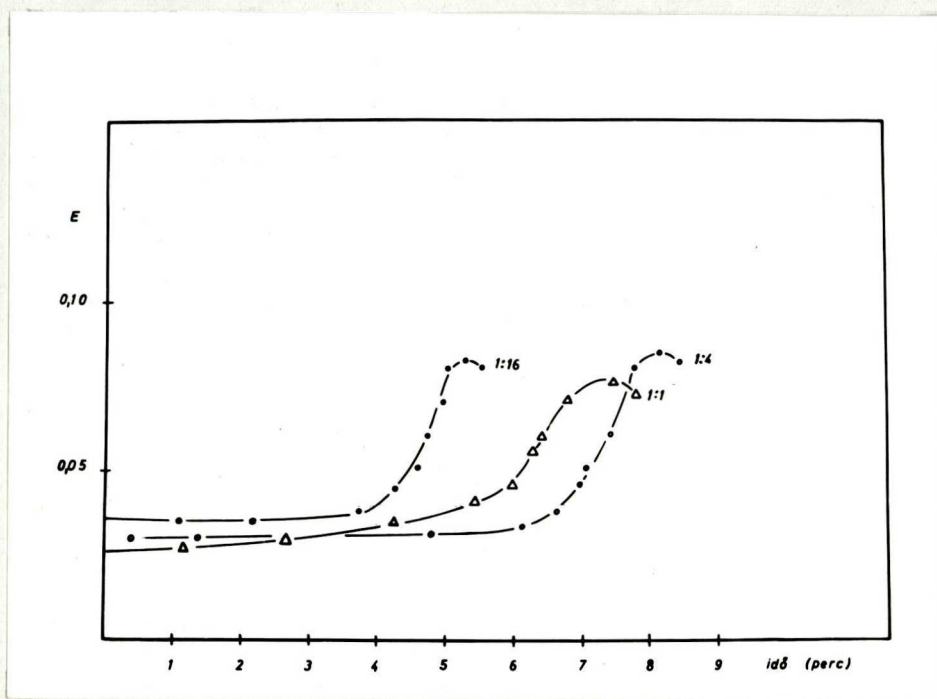


Ez az aránybeli változás párhuzamba állítható az ATP-áz aktivitás fent említett növekedésével.

Ezen eredmények irányították figyelmünket arra a lehetőségre, hogy az optimális sztöhiometrikus arány kialakulása mellett a fehérje molekulák rendezettség fokozódása hozzájárulhat a megnövekedett ATP-áz aktivitás kialakulásához.

Ezért a komplexek molekuláris asszociációját vizsgáltuk a clearing és a szuperprecipitáció fázisában elektronmikroszkópos technika alkalmazásával. A szuperprecipitációt alacsony fehérje koncentrációnál turbiditás méréssel követtük.

A 22.sz. ábrán látható a különböző arányu aktomiozin rendszerek szuperprecipitációjának turbiditás változása az idő függvényében.



22. sz. ábra.

Az ábra az alacsony fehérje koncentrációju /0,2 mg/ml/ 1:16, 1:4, 1:1 F-aktin-miozin arányu rendszerek turbiditás változása. Az ionerősség 0,13 a pH 7 volt. A turbiditás mérés 25°C-on történt. Az ATP.végkoncentrációja $5 \cdot 10^{-3}$ M volt. A mérés 540 nm történt.

Ahol a görbe maximuma látható, az a szuperprecipitáció pillanata.

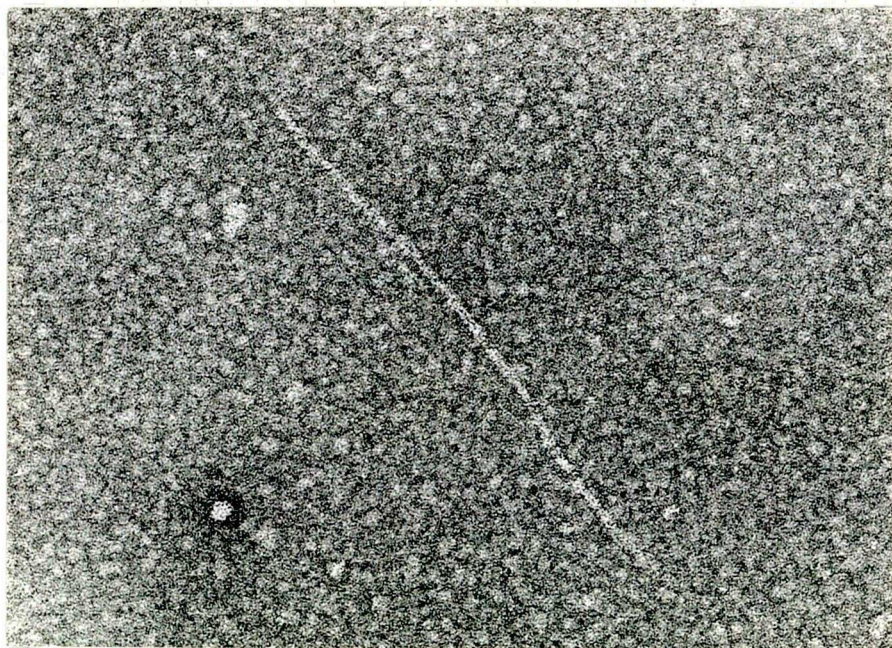
Ezen vizsgáló módszerrel követve a clearinget és a szuperprecipitációt sorozat elektronmikroszkópos preparátumot készítettünk.

A következő felvételeken a miozin, aktin és aktomiozin negatív festési technikával készült felvételei láthatóak.



1.sz.felvétel.

2
A felvétel magas ionerősségű glutáraldehiddal fixált miozin elektronmikroszkópos képét mutatja. A festés UO_2 történt. Az ábra jól szemlélteti a miozin szálakat.
Nagyítás: 150 000 x.

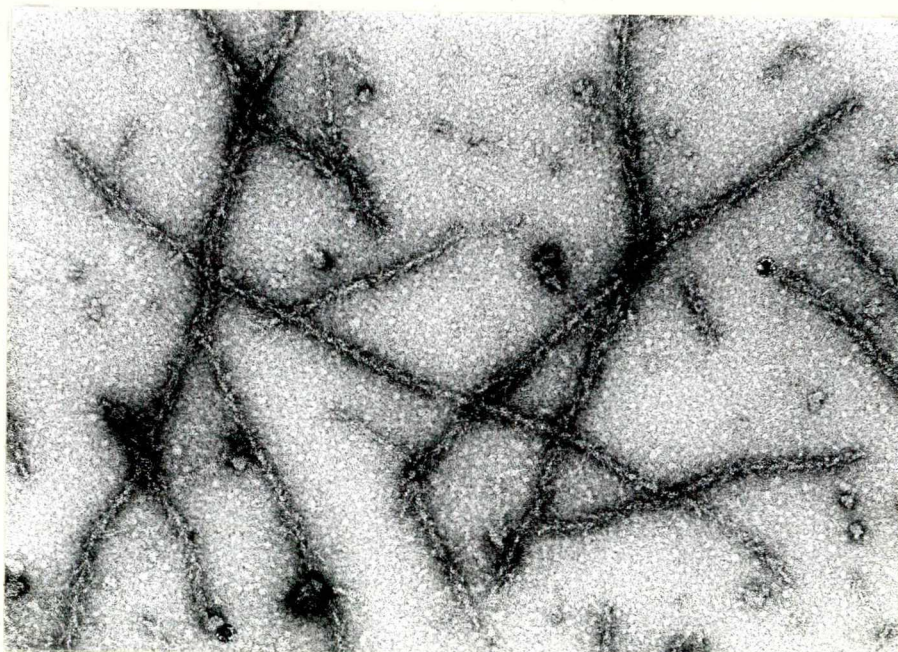


2. sz. felvétel

A felvétel a Spudich módszer szerint preparált F-aktin képét mutatja. Negatív festés technikával preparált anyag koncentrációja 0,2 mg/ml volt.

A festés UO_2 -vel történt.

Nagyítás: 150 000 x



3. sz. felvétel

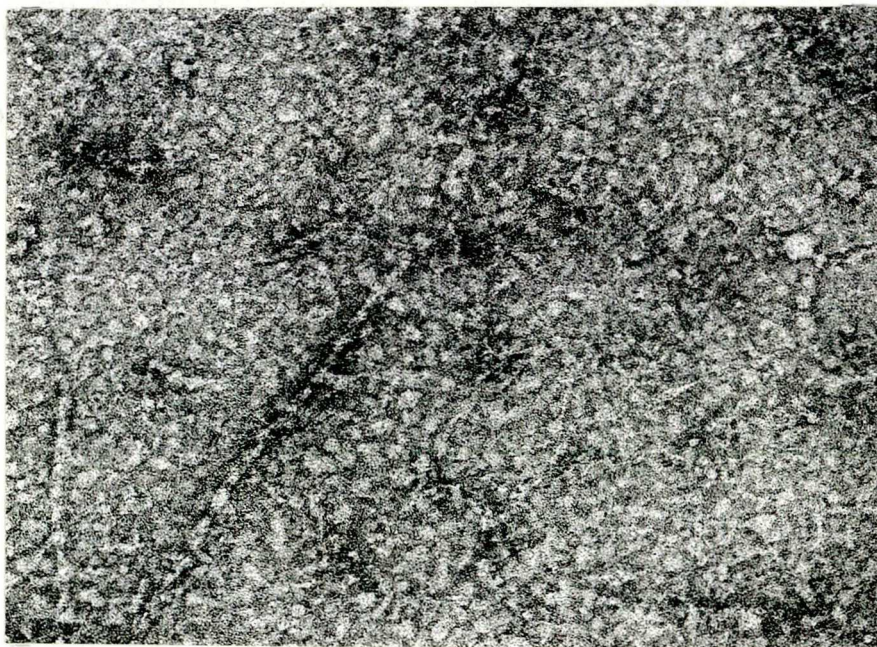
A felvétel az aktomiozin jellegzetes "fenyőág" képét szemlélteti. A fehérje koncentráció 0,2 mg/ml volt.

A negatív festés technikával történt a preparálás.

A festés UO_2 -vel.

Nagyítás: 150 000 x

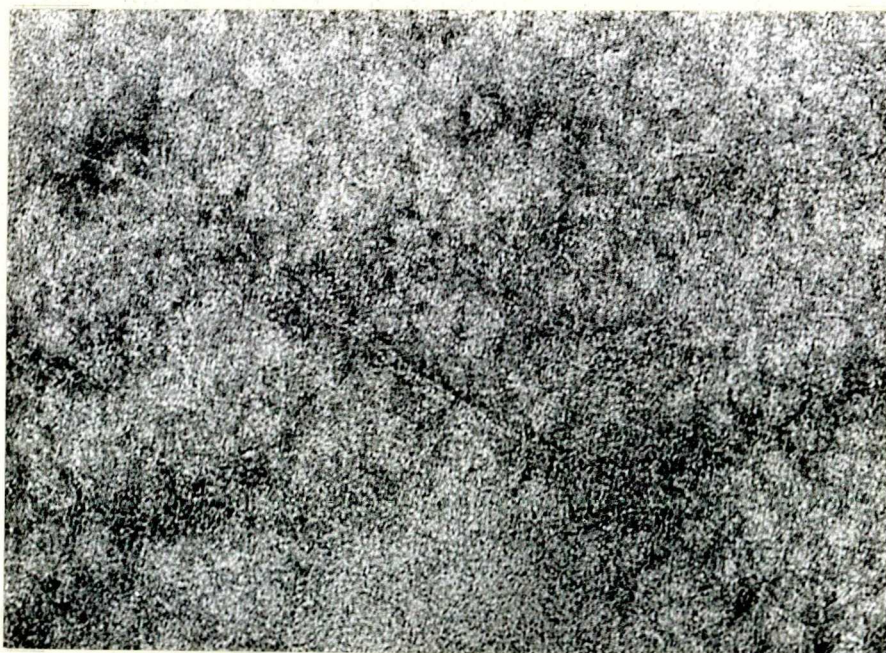
A clearing fázis folyamán készült felvételeinket ezekkel összehasonlítva azt láttuk, hogy a clearing fázisba többnyire különálló F-aktin és miozin filamentumok láthatók, de már a molekulák egymásmellé rendeződése is megkezdődik.



4. sz. felvétel

A felvétel a clearing fázis folyamatát szemlélteti. A fehérje koncentráció 0,2 mg/ml volt. Az ionerősség 0,13. A pH 7. Az ATP végkoncentrációja $5 \cdot 10^{-3}$ M volt. Különálló F-aktin és miozin filamentumok láthatók, de az egymásmellé rendeződést is mutatja a felvétel. Negatív festés technikával történt a preparálás. / UO_2 /. Nagyítás: 150 000 x.

A következő felvételen az aktomiozin szuperprecipitáció utáni képét láthatjuk. A felvételen jól látszik az aktomiozinra jellemző un. fenyőág elrendeződés /arrowhead/.

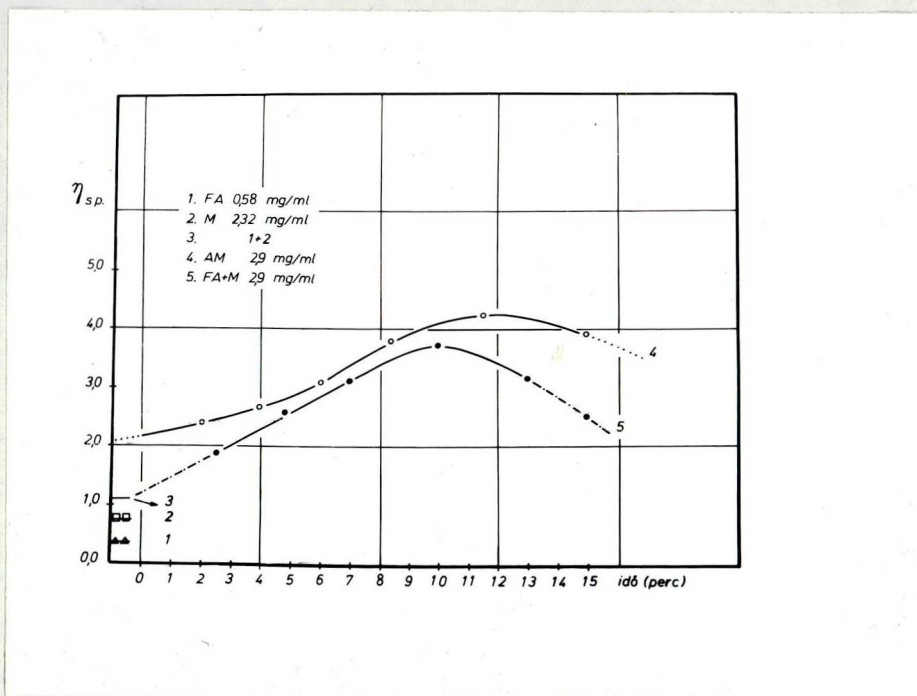


5.sz. felvétel.

A felvétel a szuperprecipitáció utáni aktomiozin képét mutatja. A fehérje koncentráció 0,2 mg/ml az ionicitás 0,13 a pH 7 volt. Az ATP végkoncentrációja $5 \cdot 10^{-3}$ M volt. A preparálás negatív festés technikával készült. / UO_2 /. A felvételen jól látható a jellegzetes fenyőág /arrowhead/ szerkezet és az egymásmellé rendeződés.

Nagyítás: 240 000 x.

A szuperprecipitáció folyamán létrejött molekuláris rendezettség változást viszkozitás mérési adatok is alátámasztják. A 23. sz. ábra ezen adatokat foglalja össze. Az ábra abcisszájára az időt az ordinátára a specifikus viszkozitás értékeit tüntettük fel.



23. sz. ábra.

Az ábra a szuperprecipitáló aktomiozin /1:4 F-aktin-miozin arány/ rendszer viszkozitás változását szemlélteti.

1. sz. görbe 0,58 mg/ml koncentrációju F-aktin specifikus viszkozitását mutatja.

2. sz. görbe 2,32 mg/ml miozin specifikus viszkozitását

3. sz. görbe 1-2.sz. görbék addíciójából tevődik össze.
4. sz. görbe 2,9 mg/ml aktomiozin / 1:4 arány / specifikus viszkozitását mutatja. Ionerősség 0,13 a pH 7. Az ATP végkoncentrációja 10^{-2} M volt. A hőfok 25° C volt.
5. sz. görbe 0,58 mg/ml F-aktin alacsony ionerősségen + 2,32 mg/ml miozin alacsony ionerősségen. Mindkét strukturfelhéjéhez 10^{-2} M végkoncentrációban hidegen ATP-t tettünk. Majd az aktint és a miozint elegyítettük a viszkoziméterbe az 1:4 F-aktin-miozin aránynak megfelelően. A hőfok 25° C volt. A pH 7.

A fenti ábrán a kétféle módon létrehozott aktomiozin rendszer viszkozitás változása látható. A 4.-5. sz. görbe 2,9 mg/ml 1:4 F-aktin-miozin arányu aktomiozin viszkozitás változását, az 1.sz. görbe az előző aktomiozin koncentrációnak megfelelő F-aktin és a 2.sz. görbe pedig megfelelő miozin viszkozitás változását mutatja. A 3.sz. görbe az F-aktin és miozin viszkozítások addíciójából adódik. A 4.sz. görbével jelölt anyagunk, aktomiozinként került a clearing fázisba, míg az 5-ös görbével jelzett esetben ugyanezt az arányt közvetlenül viszkozimetráláskor hoztuk létre. Látható, hogy mindkét aktomiozin viszkozitása a clearing fázisban felulmulja a számított aktomiozin viszkozitását. Mint az 5.sz. görbe mutatja az aktin és miozin molekulák kapcsolata azonnal megtörténik és elrendeződésük a szuperprecipitáció kezdetével válik teljessé. A 4. sz. görbéből az is kitűnik, hogy az aktomiozin ATP hatására sem disszociál teljes mértékben F-aktinra és miozinra.

ÖSSZEFoglalás.

Kísérleti eredményeimet a következő pontokban szeretném összefoglalni.

- 1./ A természetes és mesterséges aktomiozin rendszerekben a clearing fázisból a szuperprecipitáció fázisába való átmenetnél az ATP-áz aktivitás megváltozása figyelhető meg.
- 2./ Kísérleteink szerint, egyhangzóan az irodalmi adatokkal megállapítható, hogy az aktin és a miozin a clearing fázisban is kapcsolatban van egymással. Az aktin stimulálja a miozin ATP-áz aktivitását.
- 3./ A szuperprecipitáció megindulásának ideje egybeesik a rendszer ATP hasítás sebessége megváltozásának idejével. Az ATP hasítás sebességének mérése a szuperprecipitáció követésének jó indikátora.
- 4./ A szuperprecipitáció kiterjedésekor a rendszerben található ATP kb. 10% bomlik le. Ez azt a tényt bizonyítja hogy a szuperprecipitáció nem az alacsony ATP koncentráció következménye.

- 5./ A rendszerbe bevitt, elbomlott és megmaradt ATP/miozin moláris arányok a szuperprecipitáció megindulásának pillanatában jellegzetes összefüggést mutatnak.
- 6./ A szuperprecipitáló aktomiozin rendszerben három szakasz követi egymást: a clearing - a szuperprecipitáció és a szuperprecipitáció utáni szakasz.
- 7./ A szuperprecipitáció kezdetét és végét az ATP bontás stagnálása jelzi, ami feltehetően az aktomiozin rendszer foszforilálódásával kapcsolatos.
- 8./ A különböző F-aktin-miozin arányu azonos fehérje koncentrációju aktomiozin rendszereknél azt találtuk, hogy a rendszerből szuperprecipitáló aktomiozin mennyisége a különböző arányoknál tendenciózusan változik.
- 9./ Gőlelektroforetikus vizsgálatok segítségével változást tapasztaltunk a kezdeti F-aktin-miozin arányhoz képest a szuperprecipitált üledék összetételében. A kialakult optimális mol arány 3:1 F-aktin-miozin mol-nak adódik.
- 10./ ATP-áz aktivitás vizsgálataink azt mutatták, hogy a szuperprecipitátum Mg^{++} indukálta ATP-áz aktivitása nemcsak relative, de abszolút mértékben is megnövekedett.

11./ A komplexek molekuláris asszociációjának vizsgálata
melyet elektromikroszkópos, viszkozitás mérési vizsgál-
latokkal követtünk, azt mutatták, hogy fent említett
aktivitás növekedés, nemcsak a sztöchiometrikus arányok
változásának, hanem az F-aktin-miozin molekulák speciális
elrendeződésének is a következménye.

Ezúton szeretném megköszönni Dr. GUBA FERENC egyetemi tanárnak, a Szegedi Orvostudományi Egyetem Biokémiai Intézet igazgatójának, hogy lehetővé tette számomra, hogy Intézetében az orvosi-biológiai doktori cím elnyeréséhez disszertációmát elkészíthessem.

További köszönetem szeretném kifejezni a téma adásért, a hasznos és értékes szakmai tanácsokért, valamint az anyagi és eszköz-ellátásban nyújtott segítségért.

Ezúton szeretném megköszönni Dr. BOROS ISTVÁNNAK és Dr. NÉMETH ILONÁNAK az izomfehérjék preparálásában nyújtott segítségét, MÉSZÁROS MAGDÁNAK az elektronmikroszkópos vizsgálatok elvégzését és a felvételek kiértékelésében nyújtott segítségét.

Végezetül köszönetet szeretnék mondani CSBRÉP RÓZSÁNAK igen szorgalmas, lelkiismeretes és pontos technikai munkájáért és ZSEBIK PÁLNAK a fotómunkák kivitelezéséért.

A KISÉRLETBEN HASZNÁLT MÓDSZEREK ÉS KÖRÜLMÉNYEK.

M e t o d i k á k

1. Fehérjék előállítása

Miozin

Irodalomban leírt módszer alapján: Finck /1965/

Aktin

Szárazizompor készítése Feuer és munkatársai alapján

/Feuer, Molnár, Pettko, Straub, 1948/. A száraz izomporból G-aktin kivonása hideg deszt.vízzel Drabikowski és Gergely szerint /Drabikowski, Gergely, 1962, Spudich, 1971/.

Az így nyert G-aktint $0,1 \text{ M KCl}$, 10^{-3} M MgCl_2 végkoncentrációjú oldatban F-aktinná alakítva használtuk.

B - miozin

Előállítása Szent-Györgyi leírása szerint /Szent-Györgyi, 1945/

Mesterséges aktomiozin

Finck szerinti miozinból és polimerizált F-aktinból állítottuk elő. A két fehérje oldatot 30 percig szobahőfokon tartottuk az aktomiozin rendszer kialakulása miatt.

2. Elektrommikroszkopos preparálás

Negatív festés technikával: fixálva a festés előtt 2,5% glutáraldehiddel, majd 2%-os UO_2 -acetát oldattal festve.

3. Analitikai meghatározások

Fehérje - tartalom meghatározása:

Fotometriás meghatározások.

a./ Biurett módszer /Gorral, Bardawill, David, 1949/

b./ Módosított biurett módszer.

Az említett biurett módszert módosítottuk, miután fehérje-oldataink ionerősségét trises dializissel állítottuk be.

A tris zavarta a biurett módszert és így új kalibrációs görbét készítettünk azzal a módosítással, hogy mindig 0,5 ml mértünk be a dializált fehérje oldatból és ezután adtuk hozzá a szükséges reagenseket és a kontrolba is bemértünk minden esetben 0,5 ml trises dializáló oldatot. Így vettük fel a kalibrációs görbét albuminra és természetes aktomiozinra.

c./ Mikrobiurett módszer / Goa, 1953 /

Kjeldahl N- meghatározása

Fehérjetartalom számítása 6,00 v 6,25 - s faktorrall.

d./ Foszfor meghatározás

Fotometrián / Fiske, Subbarow, 1929 /

Fotometrián / H.Eibl, W.E.M. Lands, 1969 /

e./ ATP-áz aktivitás mérés enzimhasítása Mommaerts
/ Green / szerint

4. Készülékek, eszközök

Spektrofotométer:	Spektromom 201
pH mérő:	Radelkis vér pH mérő
Termosztátok:	házikészítésű és Varburg készülék
Preparatív centrifuga:	Janetzki K 24, Zuglói centrifuga, mindkettő hűthető, ULCE /Janetzki/
Elektronmikroszkóp:	JEOL
Viszkozitásméréshez:	Módosított Oswald féle viszkoziméter átf. idő tris - ATP - re 17°C-on 26,5
Házigymányu gélelektroforetikus készülék.	

Használt oldatok

Finck miozinhoz kivonó oldat:

0,3 M KCl, 0,095 M KH_2PO_4 0,075 M
 K_2HPO_4 1 mM EDTA pH 6,5 I = 0,57

Finck miozinhoz szediment újraoldó:

0,81 M KCl, 0,11 M KH_2PO_4 , 0,1 K_2HPO_4
1 mM EDTA pH 6,5 I = 1,15

- Weber - Edsall oldat: $0,6 \text{ M KCl}$, $4 \cdot 10^{-2} \text{ M NaHCO}_3$,
 $10^{-2} \text{ M Na}_2\text{CO}_3$ pH = 9.
- Aktin polimerizáló oldat: $0,1 \text{ M KCl}$, 10^{-3} M MgCl_2 pH = 7
- Miozin ATP-áz meghatározásnál használt oldat:
- Dializishez: 10^{-2} M KCl , $2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ merkaptotanol
pH 7 - 7,2
- Enzim aktivitás meghatározáshoz: $0,5 \text{ M KCl}$, $4 \cdot 10^{-3} \text{ M CaCl}_2$, $5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$
tris - puffer, $4-8 \cdot 10^{-3} \text{ M ATP}$ pH 7
- Aktoniozin ATP-áz meghatározáshoz használt oldat:
- Dializishez: 10^{-2} M KCl , $2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ merkaptotanol
pH 7 - 7,2
- Enzim aktivitás meghatározáshoz: $4 \cdot 10^{-3} \text{ M MgCl}_2$, $5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ tris puffer,
 $4-8 \cdot 10^{-3} \text{ M ATP}$ pH = 7
- Tris pufferes dializáló oldat a szuperprecipitációhoz:
- $5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ Tris puffer, $8 \cdot 10^{-2} \text{ M KCl}$
 $5 \cdot 10^{-2} \text{ M HCl}$ 10^{-4} M merkaptotanol
 $4 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ illetve 10^{-4} M MgCl_2
- 100%-os glicerines oldat fehérjeoldat tárolásához:
- KH_2PO_4 $1/15 \text{ M}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ $1/15 \text{ M}$
 10^{-4} M EDTA , $10^{-3} \text{ M Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 96%-os
glicerin
- Foszformeghatározáshoz: Eikonogén $0,2 \text{ g} + 11,7 \text{ g Na}_2\text{HS}_2\text{O}_5$
 $1/2 \text{ H}_2\text{O}$
80 ml-re av-el.

1% Triton X - 100, 2,5% ammonium-
molibdát 6 n H_2SO_4 -ben oldva.

Gélelektroforézishez:

Elektrodpufter 5×10^{-3} M Tris, $3,8 \cdot 10^{-2}$ M glycín pH = 8,3

"A" oldat Tris 36,6 g cc HCl 4,8 ml víz ad. 100 ml
8 M urea

"B" oldat Acrylamid 28,8 g N,N' - Metilén - bis-
acrylamid, 8 M urea

"C" oldat 10% ammoniumperszulfát

"D" oldat 8 M urea

7,5%-os gélkészítés: 1 rész A oldat
2 rész B oldat
5 rész D oldat összekeverés után
0,1 m C oldat és 0,1 ml 3-dimetil-
aminopropionitril /DMPN/

Commassie-kék gélfesték 1%-os commassie-kék dv. oldata

1:20 arányba hígítva 12,5%-os TCA-val

Az oldatok készítéséhez 2x desztillált vizet használtunk / Bi d.v./

A kísérletekhez analitikai tisztaságú vegyszereket használtunk.

I R O D A L O M.

Bailey K., Perry /1947/

Biochim, Biophys. Acta 1 506

Bailey K. /1948/

Tropomyosin. Biochem. J. 43 271-279

Banga I., Szent-Györgyi A. /1941-1942/

J. Biol. 1 5

Banga I., Szent-Györgyi A. /1941/

Inst. Med. Chem. Univ. Szeged 1 5-16

M. Bálint., A.Schaefer., L.Mencel., N.A. Biró /1970/

Physiol. Chemistry and Physics in the press

Biró N.A., Bálint M., Gráf L. /1965/

IEG. No. 4. Sci 47

Drabikowski W., J. Gergely. /1962/

The effect of the temperature of extraction on the
tropomyosin content in actin.

J. Biol. Chem. 237 3412-3417.

Ebashi S. /1961/

Calcium binding activity of vesicular relaxing factor

J. Biochem. /Tokyo/ 500 236-244.

Ebashi S. /1963/

Nature 200 1010

Ebashi S., A. Kodama. /1965/

A new protein factor promoting aggregation of troponin.

J. Biochem /Tokyo/ 58 107-108

Ebashi S. /1972/

Nature 240 217

Eisenberg E., C. Moos. /1967/

The interaction of actin with myosin and heavy meromyosin
solution at low ionic strength

J. Biol. Chem. 242 2945-2951

Endo M. /1964/

The superprecipitation of actomyosin and its ATP-ase
activity in low concentration of ATP

J. Biochem. /Tokyo/ 55 614-622

Erdős J., Snellmann O. /1948/

Biochim. Biophys. Acta 2 642 1948

Gergely J. /1960/

Fed. Proc. 9 518

Gergely J. /1959/

Muscle proteins and energy utilization

Ann. N.Y. Acad. Sci. 72 538-544

Gergely J., Maruyama K. /1960/

J. Biol. Chem. 235 3174

Gordon A.M., A.P. Huxley, F.J. Julian. /1966/

J. Physiol. /London/ 184 170-192

Guba F. /1943/

Studies Inst. Med. Chem. Univ. Szeged, 3 40

Guba F. /1954/

Kandidátusi értekezés

"Az izom elektronmikroszkópos vizsgálata"

Guba F. /1963 a/

California Inst. of Technology Biology 40

Guba F., Fessler I. /1963 b/

California Inst. of Technology Biology 40

Guba F. /1966/

Doktori disszertáció.

"A harántcsikolt izom szerkezete és működése, különös tekintettel a szerkezeti fehérjékre".

Guba F. /1966 b./

Morfológia és Igazságügyi Szemle

Guba F. /1966 a./

Magyar Biol.Társ.Vándorgyűlése. Pécs.

"A szerkezeti fehérjék néhány sajátága és a harántcsikolt izom funkcionális strukturája". /előadás/

Guba F., Harsányi V. /1964/

Kis. Orvostud. 16 28

F. Guba, V.Harsányi, E.Vajda /1968/

Acta Biochim et. Biophys Acad. Sci. Hung.

Vol. 3. /4/ pp. 441-448

Guba F., Straub F.B. /1943/

Studies Inst. Med. Chem. Szeged III. 46.

Guba F., Vajda E., Szőke M., Harsányi V., Kovács P. /1966/

Abstr. FEBS III. Meeting Varsó

Acad. Press. New York 245.

Hanson J., Huxley H. /1957/

Biochim. Biophys Acta 23 250

Harsányi V., Guba F. /1963 a/

Biokémiai Vándorgyűlés, Siófok III. 393

Hartshorne D.J., M. Theiner., H. Mueller /1969/

Studies on troponin. Biochim. Biophys Acta 175 320-330

Hasselbach W. /1957/

Biochim. Biophys Acta 20 355

Heilbrunn L.V. /1947/

J. Cell. Comp. Physiol. 29 15

Huxley /1957/

J. Biophys Biochem. Cytol. 2 63

Huxley, H.E. /1960/

New York: Academic. vol. IV p. 365-481

Huxley H.E. /1963/

Elektron microscope studies on the structure of
natural and synthetic protein filaments from
striated muscle. J. Mol. Biol. 7 281-308

Johnson P., R. Landol. /1950/

Muscle proteins and their interaction with adenosine
triphosphate.

Nature 165 430-432

Katz A.M. /1964/

J. Biol. Chem. 239 3304-3311

Katz A.M. /1965/

Purification of a relaxing protein factor from actin
extracted at room temperature.

Federation Proc. 24 208

Katz A.M. /1966/

J. Biol. Chem. 241 1522-1529

Katz A.M. /1970/

Physiological Reviews vol. 50 No 1 Jan. Printed in U.S.A.

Kühne W. /1964/

Untersuchungen über das Protoplasma und die
Kontraktilität.

Laki K.K., Maruyama., Komins D. /1962/

Arch. Biochem. Biophys 98 323-330

Levy H.M., M. Fleisher /1965/

Biochim.Biophys.Acta 100 491 - 502

Lowey S., Slayter H.S., Weeds A.G. /1969/

J. Molec. Biol. 42 1

Martonosi A.M., A.Gouvea, J.Gergely /1960/

Studies on actin.

J.Biol.Chem. 235 3169-3173

Martonosi A.M. /1962 /

J. Biol. Chem. 237 2795-2803

Maruyama K., J.Gergely /1962/

Interaction of actomyosin with adenosine triphosphate at low ionic strength. II. Factors influencing clearing and superprecipitation; adenosine triphosphatase and birefringence of low studies.

J.Biol.Chem. 237 1100-1106

Maruyama K., J.Gergely /1962/

Interaction of actomyosin with adenosine triphosphate at low ionic strength. I. Dissociation of actomyosin during the clear phase.

J.Biol. Chem. 237 1095-1099

Maruyama K., S.Watanabe /1962/

The role of magnesium in the superprecipitation of myosin B. J. Biol. Chem. 237 3437 - 3442

Mihály E. /1950/

Enzymologia 14 224

Hayler W., G. Postgr. /1970/

Med. I. Nov. Suppl.

Perry S.V., J. Cotterill, D. Hayter /1966/

The adenosinetriphosphatase activity of dissociated
actin - heavy meromyosin

Biochem. J. 100 289-294

Perris, S.V. Perry /1970/

Biochem. J.

Perry S.V. /1951/

Biochem. J. 48 257-265

Perry S.V., A. Corni /1958/

Biochem. J. 68 9-12

Richards A.C., Anderson I., J. Hance. /1942/

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 51 148 /1942/

S. Sarkar, pH Cooke /1970/

Biochem and Biophys Res. Comm. 41 918-925

Spicer S.S. /1952/

J. Biol. Chem. 199 289-300

Spicer S.S. /1951/

J. Biol. Chem. 190 257-267

Spudich J.A. /1971/

J. Biol. Chem. 246 /15 4866

Straub F.B. /1942/

Studies Inst. Med. Chem. Univ. Szeged. 2 33

Straub F.B. /1942/

Actin, Studies Inst. Med. Chem. Univ. Szeged. 2 3-16

Straub F.B. /1943/

Actin II. Studies Inst. Med. Chem. Univ. Szeged. 2 23-37

Szent-Györgyi A. /1943/

Studies Inst. Med. Chem. Univ. Szeged. 3 76

Szent-Györgyi A. /1945/

A Studies on Muscle Szegedi Városi Nyomda és Könyvkiadó R-T.

Szent-Györgyi A. /1949/

Biol. Bull. 96 140

Szent-Györgyi A. /1951/

Chemistry of Muscular Contraction 2nd Acad. Press
New York.

Szent-Györgyi A. /1956/

General views on the chemistry of muscle contraction.
Fortschr. Kardiol. 1. 6 - 51

Szent-Györgyi A. /1968/

Role of actin-myosin in contraction In: Aspects of Cell
Motility. London Cambridge Univ. Press. 1968/p. 17-48

Tetsuo Furukawa /1972/

Experimental Neurology 36 35-40.

Teao T.C. /1953 a/

Biochim. Biophys. Acta 11 368

Vajda E., Guba P., Harsányi V. /1966/

IV. Magyar Élm. Konf. Balatonszéplak.

"Vizoldékony fehérjék szerepe a harántcsikolt izom
strukturájának kialakításában." /előadás/

Vajda E., Guba P., Harsányi V. /1965/

IEG No. 4. Sci 56

Watanabe S., T. Yasui. /1965/

J. Biol. Chem. 240 105-111

Weber A., Weber H.H. /1951/

Biochim. Biophys. Acta I 339-348

Weber H.H., Portschl H. /1952/

Advances Protein Chem. I 161

Weber H.H. /1955/

Harvey Lectures 42 37-56

Weber A. /1959/

On the role of calcium in the activity of adenosine
5' - triphosphate hydrolysis by actomyosin

J. Biol. Chem. 234 2764-2769

