

A SZARKOPLAZMATIKUS RETIKULUM Ca^{2+} -ATPáz IZOLÁLT
DIMÉREK SZERKEZETÉNEK VIZSGÁLATA FOTO SZUPERPOZÍCIÓS
ÉS SZÁMÍTÓGÉPES ÁTLAGOLÁSI ELJÁRÁSSAL

Kocsis Éva

Egyetemi doktori értekezés



Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem

SZEGED

1988

B 5114



E 3086

TARTALOM

1.	Bevezetés, irodalmi áttekintés	1
2.	Módszerek	10
2.1.	A szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATPáz kristályosítása, az izolált dimér láncok előállítása	10
2.2.	Az elektronmikroszkópos negatív szuperpozí- ciós nagyítása	10
2.2.1.	A pozitív képek előhívási körülményeinek meg- választása	10
2.2.2.	A szuperpozíciós nagyítás	11
2.3.	A digitalizált kép számítógépes kiértékelése	11
2.3.1.	A digitalizált kép előállítása, a számítógé- pes rendszer leírása	11
2.3.2.	A digitalizált kép lineáris interpolációs na- gyítása	13
2.3.3.	A digitalizált kép átlagolása	15
2.3.4.	Konvolúciós zajszűrés	16
2.3.5.	Medián zajszűrés	17
2.3.6.	A távolságok mérése	18
3.	Eredmények	19
3.1.	A hipozmotikus közegben felszakadt kétdimen- ziós Ca^{2+} -ATPáz dimer kristályok jellemzése	19
3.2.	A dimérek jellemzésére használt adatok	19
3.3.	A szuperpozíciós nagyítással kapott szerke- zet kiértékelése	21

3.4.	A számítógépes vizsgálat eredményei	27
3.4.1.	A lineáris interpolációs nagyítással kapott képek	27
3.4.2.	A számítógépes átlagolással kapott szerkezet kiértékelése	34
4.	Megbeszélés	52
4.1.	Az elektronmikroszkópos felvételek készítése	52
4.2.	A pozitív képek készítése	53
4.3.	A pozitív képek kiértékelése	54
4.3.1.	A fotó szuperpozíciós nagyítással történő szerkezetvizsgálat	54
4.3.2.	A számítógépes átlagolással történő szerkezetvizsgálat	55
4.4.	A Ca^{2+} -ATPáz izolált dimérek szerkezeti tulajdonságai	61
5.	Összefoglalás	67
6.	Irodalomjegyzék	70
7.	Köszönetnyilvánítások	75

Melléklet

Programok: Nagyító

Konvol

Mérés

Markham

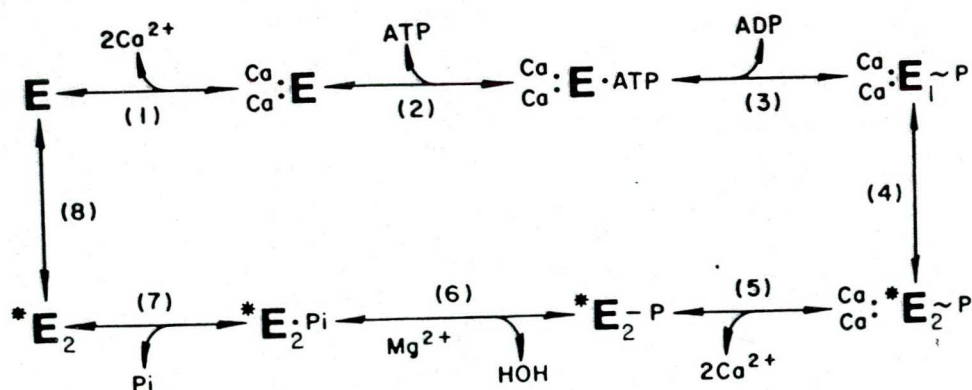
Modulok: Ablak

Terjel

BEVEZETÉS

A vázizomzatban, az összehúzódnási-elernyedési ciklusok során nagy mennyiségű calcium gyors mozgására van szükség. Ezt a folyamatot a szarkoplazmatikus retikulum szabályozza, a részét képező Ca^{2+} csatornák és Ca^{2+} -ATPáz enzime révén. Az ingerület hatására létrejövő depolarizáció következtében Ca^{2+} ionok szabadulnak fel a szarkoplazmatikus retikulumban és a megnyíló Ca^{2+} csatornákon keresztül a citoplazmába áramlanak át. Ez a folyamat a kontraktilis apparátus aktiválódásához vezet. Az izomösszehúzódás végén a citoplazmatikus Ca^{2+} szint csökkentését a szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATPáz enzim valósítja meg.

Az enzim működésének lényege, két Ca atom átjuttatása a membránon egy ATP molekula hidrolízisének felhasználásával. A folyamat részleteire vonatkozó gyors kinetikus és steady-state mérési eredmények felhasználásával deMeis és Vianna a következő sémát szerkesztették /DeMeis és Vianna 1979/:



Az enzim két Ca atomot köt a nagy affinitású kötőhelyein /1/. Ezt követően megköti a további transzportfolyamatban résztvevő ATP molekulát /2/. Az enzim- Ca^{2+} komplex hidrolizálja a Mg^{2+} ATP molekulát és ADP leválásával egy kovalens kötésű acilfoszfát intermediert alakít ki /3/. A foszforilált /ADP szenzitív/ intermediér alak konformáció változást szenved és kialakul az ún. ADP inszenzitív foszforilált intermediér forma /4/. Energetikailag az $\text{E} \sim \text{P}$ forma makroerg intermediérnek tekinthető, míg az $\text{E}_2\text{-P}$ már nem. Az ADP inszenzitív forma Ca^{2+} affinitása nagyságrendekkel alacsonyabb, mint az ADP szenzitív formáé, így a vezikula belsejében a Ca^{2+} ledisszociálhat. Ezt követően az enzim Mg^{2+} jelenlétében defoszforilálódik és konformációváltozással visszaalakul $\text{E}/\text{E}_1/$ konformációvá /5,6,7,8/.

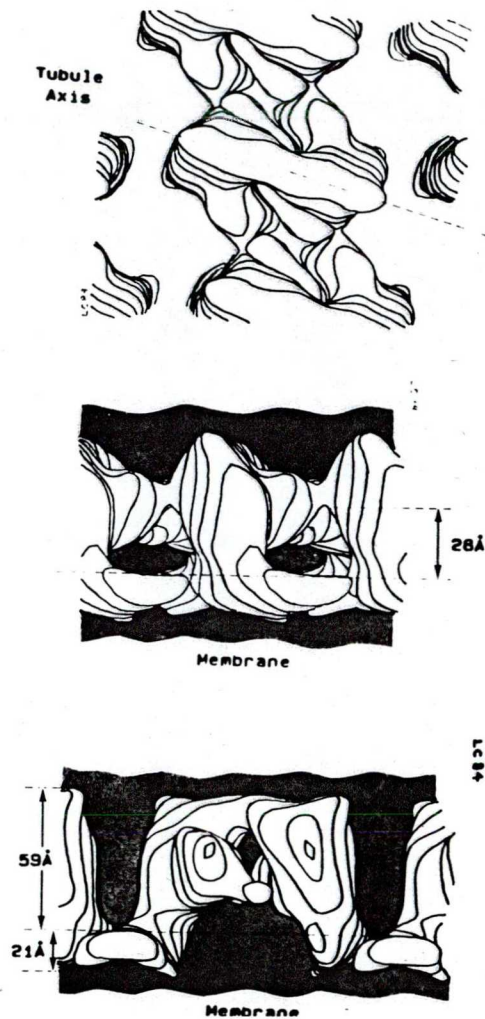
A legnagyobb felbontású molekuláris szintű struktúrális adatokat a szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATPáz enzimről, röntgensugár diffrakció alapján nyerhetnénk. Röntgen diffrakciós vizsgálatokra azonban csak megfelelő méretű és rendezettségű háromdimenziós enzimkristályok alkalmasak /Henderson 1980/. Kristályosítatlan enzimmolekulákon nyert rtg-diffrakciós adatok csak kis felbontású, általános tájékozódásra szolgáló adatokat nyújtanak /Blasie és mtsai 1985/. A membránfehérjék háromdimenziós kristályosításának megoldatlansága az elektromikroszkópos módszereket tette egyedül alkalmassá a közvetlen struktúrális információk nyerésére /Unwin és Henderson 1975/.

A szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATPáz enzim kétdimenziós kristályosítása lehetővé tette az enzim szerkezetének, membránon belüli elhelyezkedésének nagyfelbontású vizsgálatát /Dux és Martonosi 1983. a,b,c,d, Dux és mtsai 1985/.

A kristályosított enzim molekulaszervezetéről nyert struktúrális adatok arra utalnak, hogy az enzim kb. 2/3-ad része nyúlik a membránból a citoplazmába. Ezt az enzimrészletet egy keskenyebb ún. nyél /stalk/ régió kapcsolja a membránhoz /Taylor és mtsai 1984, Taylor és mtsai 1986. a,b/ /1. ábra a, c/. A membránsíkjából kb. 70 Å-el emelkedik ki.

A Ca^{2+} -ATPáz enzim molekulák vanadáttal indukált E_2 típusú két-dimenziós kristályban diméreket alkotnak. Keskenyebb részük antiparalell helyezkedik el. E_1 típusú kristályban a molekulák azonos orientációjúak /Taylor és mtsai 1984, Dux és mtsai 1985/ /2., 3. ábra/. A dimért alkotó enzim molekulák a membrán síkja felett 40 Å magasságban egy hídszerű kapcsolatot alkotnak /Taylor és mtsai 1986/ /1. ábra b./. A dimér láncban egymás után következő enzim molekulákat egy rövid nyúlvány kapcsolja össze, szintén a membrán külső felszíne felett /1. ábra c./. Ez utóbbi kötés a két érintett enzim molekulák heterogén régióit, míg az előző valószínűleg azonos régióit köti össze. A dimér láncok között oldal irányú kapcsolat a membrán foszfolipid rétegében jön létre /Taylor és mtsai 1986. a,b/. A dimért alkotó két enzim molekulák intramembrán része távolodik egymástól és a kétoldali szomszédos dimérek feléjük eső tagjaival alkot fehérje-fehérje kölcsönhatást /Taylor és mtsai 1986/.

Az enzimkristályokról nyert struktúrális adatok, valamint a szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATPáz enzim elsődleges szerkezete alapján MacLennan, Green és Brandl létrehozták az enzim háromdimenziós szerkezetének egy lehetséges modelljét /MacLennan és mtsai 1985, Green és mtsai 1986, Brandl és mtsai 1986/ /4. ábra/. Azt, hogy az enzim valóban ilyen felépítésű, még

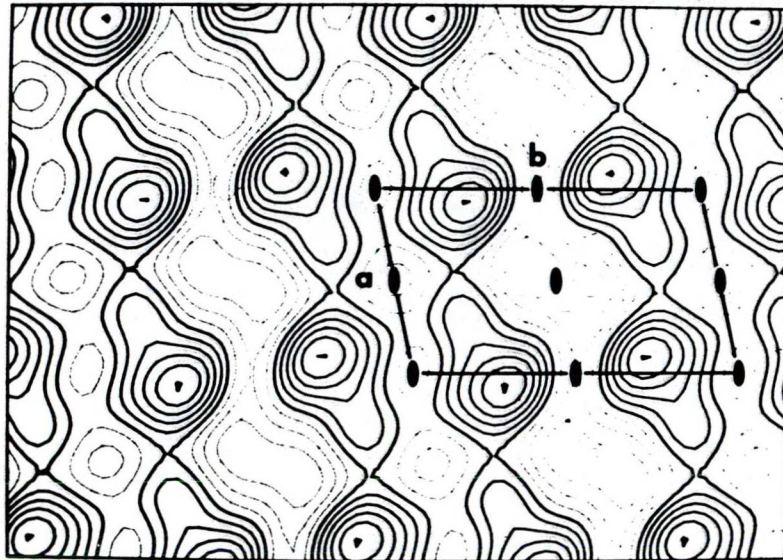


1. ábra Szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATPáz E_2 típusú két-dimenziós kristályának háromdimenziós rekonstruált képe.

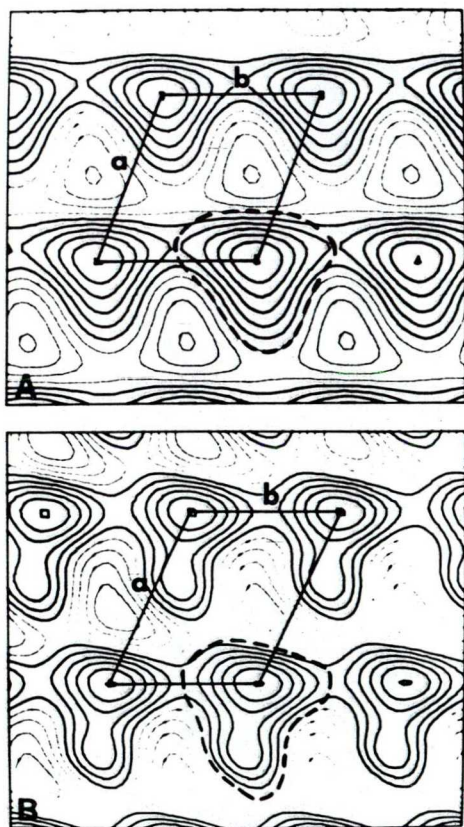
Felső rész: a membrán kristály felülnézeti képe;

Középső rész: a membrán kristály membránsíkkal párhuzamos képe, a vezikula henger hossz tengelyével párhuzamos nézet; Alsó rész: a vezikula henger átmérőjével párhuzamos nézet.

/Taylor és mtsai 1986./



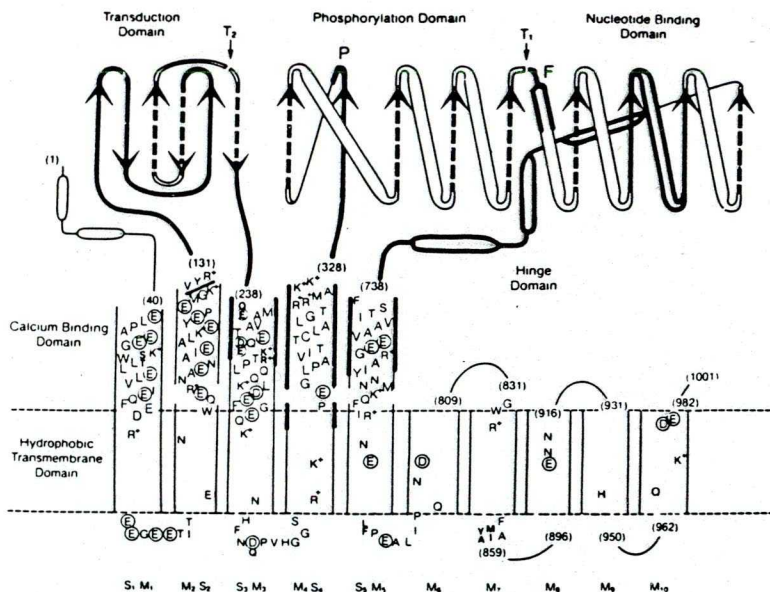
2. ábra Vanadáttal indukált E_2 típusú szarkoplazmatikus
retikulum Ca^{2+} -ATPáz kétdimenziós kristály kifelbontású
elektronrendzítás térképe a: 61.9 Å , b: 114.2 Å ,
 γ : 74,4°, a kristály alapegysége az enzim-dimér, a tér-
képen 0.414 mm = 1 Å
/Taylor és mtsai 1984./



3. ábra E_1 típusú két-
dimenziós Ca^{2+} -ATPáz
kristályok elektron-
denzitás térképe: A: ga-
doliniummal indukált, B:
praseodimiummal indukált
kristály, rácsállandók:
 $a: 66,8 \text{ \AA}$, $b: 50,4 \text{ \AA}$,
 $\gamma: 114^\circ$, a denzitás tér-
képen $1 \text{ \AA} = 0,38 \text{ mm}$
/Dux és mtsai 1985./

nem sikerült kísérletileg igazolni /Wallace 1987/. Az esetleges hibákat az is okozhatja, hogy számításaikat szolubilisfehérjék adatbázisa alapján végezték, mivel ilyen ismeretek membránfehérjéről még hiányoznak.

Vizsgálataik alapján úgy tűnik, hogy a szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATPáz enzim összesen 10 transzmembrán alfa-hélixet alkot. Közülük az első öt az ún. nyél /stalk/ régióban folytatódik, a membrán citoplazmatikus felszínén. A másik öt transzmembrán szegment rövidebb hurkok révén visszafordul a membrán belsejébe.



4. ábra A szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATPáz
MacLennan, Green és Brandl által javasolt molekula-
szerkezete /Brandl és mtsai 1986/.

A membrán citoplazmatikus felszínén az enzim három fő régióját különböztethetjük meg. 1., A Ca^{2+} kötésért felelős nyaki /stalk/ rész felett elhelyezkedő transzdukciós domén. Valószínűleg a Ca^{2+} nagy affinitású kötőhelyéről való leszakításban vesz részt, miközben a molekula ADP szenzitív formából ADP inszenzitív formába alakul át /Green és mtsai 1986/. 2., A foszforilálódó domén, melyet az előző doméntől a 3. és 4. transzmembrán hélix választ el. Itt található a vanadát kötődési helye is. 3., A nukleotida kötő domén, mely az előző régióhoz egy extramembrán hélixen keresztül kapcsolódik. E hélix, mint csukló /hinge/ körül az előző két egység elé fordulhat, létrehozván ezzel az enzimkristályok szerkezetvizsgálatából jól ismert háromszög alakzatot /MacLennan és mtsai 1985, Brandl és mtsai 1986/.

A nyaki részt alkotó hélixek térben egymás mellé helyeződve olyan hidrofil nyílást alkothatnak, mely lehetővé teszi a Ca^{2+} ionok membránon való átjutását /Brandl és mtsai 1986, Green és mtsai 1986/.

A csatorna kapuzó működése az alfa-helikális nyél és/vagy a transzmembrán hélixek kismértékű csuklószerű /hinge/ elmozdulása révén valósulhat meg /Tanford és mtsai 1987/.

Tapasztalat szerint az E_2 konformációban a molekula tömegének mintegy 8 %-ával süllyed mélyebbre a membránban az E_1 konformációhoz képest /Blasie és mtsai 1985, Highsmith és Scales 1984, Perrachia és mtsai 1984, Hasselbach és mtsai 1983/. Az E_1 konformációban egyes hidrofób csoportok vizes közegbe kerülnek, ami a hélixek rotációjával a hidrofób felszínek befelé fordulását eredményezheti, s ez a csatornanyílás záródásához

vezethet /Green és mtsai 1986, Brandl és mtsai 1986/. Ez a jelenség, vagy a nyélrégió merőleges mélyebbre süllyedésével, vagy a molekulának a membrán síkjához viszonyított megdőlésével magyarázható /Brandl és mtsai 1986/. Az utóbbira utal az E_2 hidratált állapotában fagyasztott kristályain észlelt intramembrán fehérje-fehérje mintázat /Taylor és mtsai 1986 a,b/.

Hipozmotikus közegben a vezikula felreped, az E_2 típusú kristály elveszti összefüggő kontúrját. A kétdimenziós kristályszerkezet oldalirányú rendezettsége megbomlik, míg a Ca^{2+} -ATPáz enzim molekulák hosszanti, láncszerű elrendeződése megmarad és bennük az enzim molekulák orientációja megegyezik. Az így létrejött izolált partikulák, illetve partikula sorok kémiai szempontból változatlan konformációban maradnak. Nem bizonyított azonban, hogy molekulaszervezetük mennyiben őrzi meg az intakt kristályban felvett alakzatot. A görbült felszínből kiszabadult szerkezet valószínűleg elveszít néhány olyan torzító hatást, mely az intakt kristályban érvényesült. Ezért az izolált Ca^{2+} -ATPáz dimér láncok szerkezeti vizsgálata további adatokat adhat az enzimstruktúráról.

Munkám célja a szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATPáz izolált dimérek szerkezetének minél pontosabb meghatározása, jellemzése volt. A kapott adatok összevetése az intakt kristály értékeivel, s az így szerzett újabb információk beépítése az enzim molekuláról eddig kialakult képbe.

MÓDSZEREK

2.1. A szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATPáz kristályosítása, izolált dimér láncok előállítása

Nyúl gyors vázizmaiból /m. longissimus dorsi/ Nakamura és mtsai módszerével szarkoplazmatikus retikulum frakciót állítottunk elő /Nakamura és mtsai 1976/. A Ca^{2+} -ATPáz enzim E_2 típusú kétdimenziós kristályait 0.1 M KCL, 10 mM Imidazol pH 7.4, 5.0 mM Na_3VO_4 , 0.5 mM EGTA, 5.0 mM MgCl_2 médiumban állítottuk elő /Dux és Martonosi 1983 a/. 16 órás 2°C -on történő inkubálás után negatív festéses elektronmikroszkópos vizsgálattal ellenőriztük a kristályok kifejlődését, majd a mintát Beckman L-50 ultracentrifugában 55.000 g-vel 60 percig centrifugáltuk. Az üledék, kristályos szarkoplazmatikus retikulum vezikula szuszpenziót 10 mM Imidazol pH 7.4, 5.0 mM Na_3VO_4 , 0.5 mM EGTA, 5.0 mM MgCl_2 tartalmú elegyben szuszpendáltuk fel, üveg-teflon homogenizálóval /Dux és Martonosi 1983 c,d/. A hipozmotikus közeg hatására rupturált vezikulákat, illetve az ezekből kialakuló szabad dimér láncokat 1 % uranyl acetáttal végzett negatív festést követően elektronmikroszkópban vizsgáltuk.

2.2. Az elektronmikroszkópos negatív szuperpozíciós nagyítása

2.2.1. A pozitív képek előhívási körülményeinek megválasztása

Egy állandó /8x/ nagyításon, különböző expozíciós időkkel hívtuk elő az elektronmikroszkópos negatívot, különböző minőségű papírokon: lágy, normál, kemény, extrakemény. Ezek közül a kemény /BHO típusú/papíron kaptunk a legjobb minőségű képet. Ezt követően 7x-10,5x nagyítási sorozatot készítettünk

Agfa Varioscop 60 típusú nagyítógépen melyekből a 8x és 10 x nagyításokat választottuk a további munka elvégzéséhez. A blendenyírást és az expozíciós időt negatívonként és nagyításonként állítottuk be. Az 5,6 blendenyírást bizonyult a legmegfelelőbbnek. Mindig friss keményhívó oldattal dolgoztunk.

2.2.2. A szuperpozíciós nagyítás

Ez a módszer a pozitív képek előhívása során alkalmazható. /Markham és mtsai 1963/. Azt a tényt használtuk fel, hogy az izolált Ca^{2+} -ATPáz dimér láncok hossziránya mentén a molekulák periodikus ismétlődése megmaradt. Ha a pozitív kép előhívásához szükséges expozíciós idő t , a dimér láncban k db molekula követi egymást periodikusan, akkor az első expozíciót t/k ideig végezzük, majd $k-1$ -szer eltoljuk a fotópapírt a dimér láncok hossziránya mentén l periódushosszal miközben t/k időtartamú expozíciókat végzünk. Egy-egy láncon 4-5 periódikusan ismétlődő molekulát találtunk / $k=4,5$ /.

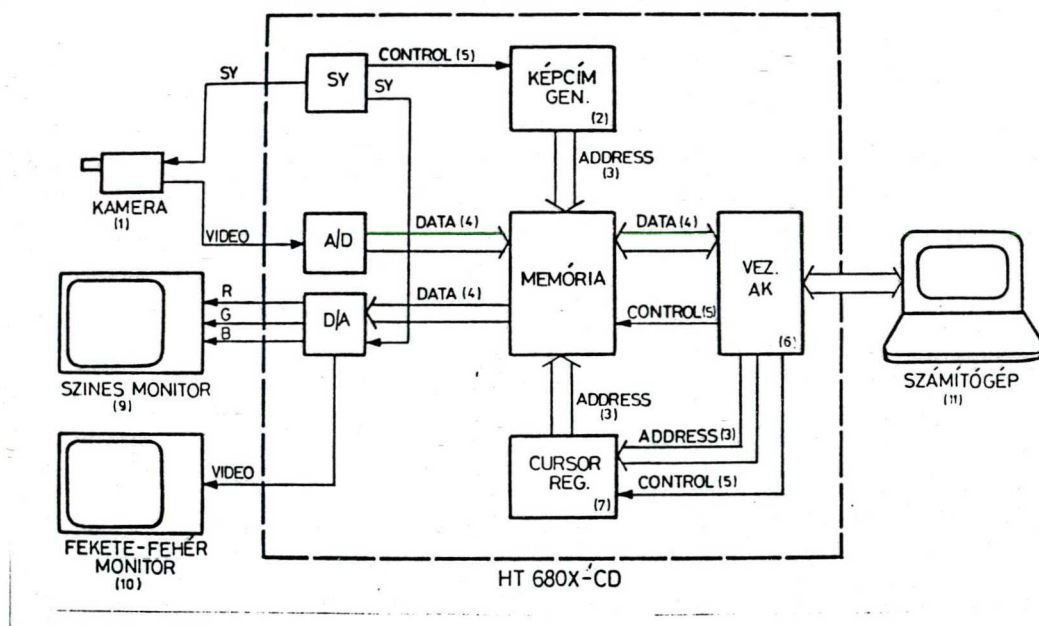
Felhasználva a diméreken belüli 180° -os szimmetriát, megkíséreltük a finom részletek felerősítését rotációs szuperpozícióval is, azaz a szimmetriaközpont körül 180° -kal forgattuk el a fotópapírt / $k=2$ /.

2.3. A digitalizált kép számítógépes kiértékelése

2.3.1. A digitalizált kép előállítása, a számítógépes rendszer leírása

Az elektronmikroszkópos felvételekről 8x, 10x-és nagyítású pozitív képeket készítettünk, így az össznagyítás 832952x, 1041190x volt. A képeket egy HT Minilux super CCTV

kamera segítségével a HT 680X-CD rendszeren keresztül juttatuk a 64 kbyte memóriájú, Z80 mikroprocesszorú M08X számítógépbe:



A HT 680-CD rendszer tömbvázlata



A HT 680-CD rendszer 625 soros OIRT és CCIR TV rendszerekhez illeszthető. AD egysége, fekete-fehér videojelet digitalizál, míg a DA fekete-fehér és RGB jeleket is előállít a tárolt jelekből. A készülék magvát képezi az a max. 0,5 Mbyte-os memória, mely az AD egység és a számítógép felől is hozzáférhető, miközben folyamatos olvasásával a DA előállítja a szabványos fekete-fehér és RGB videojeleket.

A geometriai felbontás 384×288 képpont, míg a gradációs felbontás 64 féle fényesség képpontonként / 6 bit / képpont/.

A számítógéphez egy dupla hajlékony mágneslemezes tároló tartozik, amelybe 8 inches egy oldalas, dupla sűrű lemezek illeszthetők. A mágneslemezek kapacitása 482 kbyte. Egy kép 82 kbyte-on tárolható, így egy lemezre 5 kép fér.

A képfelvétel, illetve a lemezről való beolvasás az SZKI által fejlesztett software segítségével történt.

A vizsgálat során a kép kiértékelendő részeit mátrix formájában tároljuk a számítógép memóriájában, ahol a mátrix elemei az egyes képpontok szürkeségi szintjének felelnek meg. Azaz n sorból és m oszlopból álló terület egy $n \times m$ -es mátrixnak felel meg.

2.3.2. A digitalizált kép lineáris interpolációs nagyítása

/A "nagyító" program hajtja végre/

A vizsgálandó területet négyszeresére nagyíthatjuk ezzel az eljárással. A nagyított képet úgy kapjuk meg, hogy minden második sorába és oszlopába olvassuk be az eredeti terület egymást követő sorait és oszlopait. A kimaradó sorokba és oszlopokba

pedig az előtte illetve utána lévő sor /oszlop/ elemeinek szám-
tani közepét írjuk.

Formulákkal:

a vizsgálandó terület: A $(n+1) \times (m+1)$ -es mátrix

elemei: a_{ij} , ahol $i=0,1,\dots,n$
 $j=0,1,\dots,m$

a nagyított terület: B $(2n+1) \times (2m+1)$ -es mátrix

elemei: b_{pq} , ahol $p=0,1,\dots,2n+1$
 $q=0,1,\dots,2m+1$

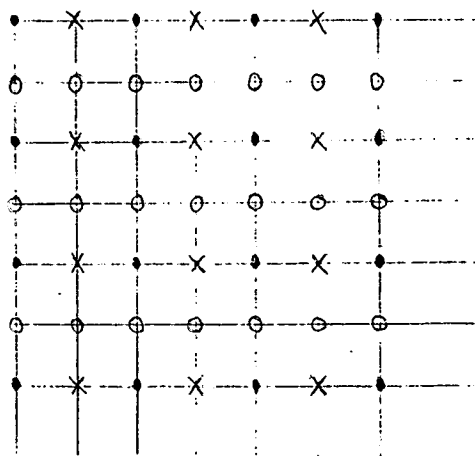
$$b(2i, 2j) = a(i, j) \quad i=0,1,\dots,n \quad j=0,1,\dots,m \quad \textcircled{\bullet}$$

$$b(2i, 2j+1) = \frac{1}{2}(b(2i, 2j) + b(2i, 2j+2))$$

$$i=0,1,\dots,n \quad j=0,1,\dots,m-1 \quad \textcircled{\times}$$

$$b(2i+1, j) = \frac{1}{2}(b(2i, j) + b(2i+2, j))$$

$$i=0,1,\dots,n-1 \quad j=0,1,\dots,2m \quad \textcircled{\circ}$$

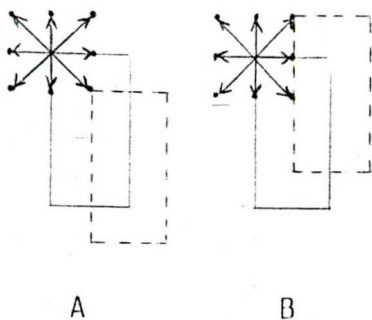


Első lépésben minden vizsgálandó dimérláncot felnagyítottunk
a fent leírt eljárással.

2.3.3. A digitalizált kép átlagolása

/A "Markham" program hajtja végre/

A vizsgálandó képen kiválasztottunk egy akkora ablakot, hogy a dimér teljes egészében benne legyen, de a szomszédos molekulába ne nyúljon bele. Ez az ablakméret a továbbiakban rögzítve volt. Majd a második dimérre is ráillesztettük az ablakot úgy, hogy az így kijelölt területeket egymással fedésbe hozva a megfelelő részek egybeessenek. Abból a célból, hogy ez minél pontosabban teljesüljön, a program segítségével eltoltuk az ablakokat külön-külön az összes szomszédos helyzetbe /81 eset/ és képeztük a két mátrix eltérésnégyzetösszegét / $\sqrt{\quad}$ ábra/. Ahol ez a legkisebb érték volt, ott rögzítettük a két ablakot.



A,B: nxm-es mátrixok /ablakok/

C: eltérésnégyzetösszeg

$$C = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (a(i,j) - b(i,j))^2$$

A két mátrix megfelelő elemeinek vettük a számtani közepét. E számtani közepeket írtuk a második ablak helyére. Ezt követően kiválasztottuk a következő dimért, s ráillesztettük az ablakot a fentiek szerint.

Az új ablak mozgatásával ismét megkerestük a legkisebb eltérésnégyzetösszeget adó helyzetet, melyet rögzítettünk, képeztük az eddigi /3/ mátrixok számtani közepét, s az értékeket az utolsóként kijelölt ablak helyére írtuk vissza. Ezt az eljárást ismételtük annyiszor, ahány azonos állású dimér volt a képen. A legutolsó átlagolt mátrix elemei:

$$a_s = \frac{1}{k} \sum_{p=1}^k a_p(i,j), \text{ ahol } k: \text{ az átlagolások száma}$$

2.3.4. Konvolúciós zajszűrés

/A "konvol" program hajtja végre/

A pontszerű zajok kiszűrésére alkalmas, lineáris eljárás /Pratt 1978/. A vizsgálandó terület minden pontjának a helyére a pont és szomszédai konvolúciós függvénnyel súlyozott átlagát helyettesíti:

Az $a(i,j)$ pont helyére az $a'(i,j)$ pont kerül, ahol

$$a'(i,j) = \frac{1}{\sum_{k=1}^3 \sum_{p=1}^3} \sum_{k=0}^2 \sum_{p=0}^2 a(i-k-1, j-p-1) h(k,p)$$

$h(k,p)$: a konvolúciós függvény

A vizsgálatainkban a következő három konvolúciós függvénnyel szűrtünk:

1	2	1
2	4	2
1	2	1

h_1

1	1	1
1	2	1
1	1	1

h_2

1	1	1
1	1	1
1	1	1

h_3

2.3.5. Medián zajszűrés

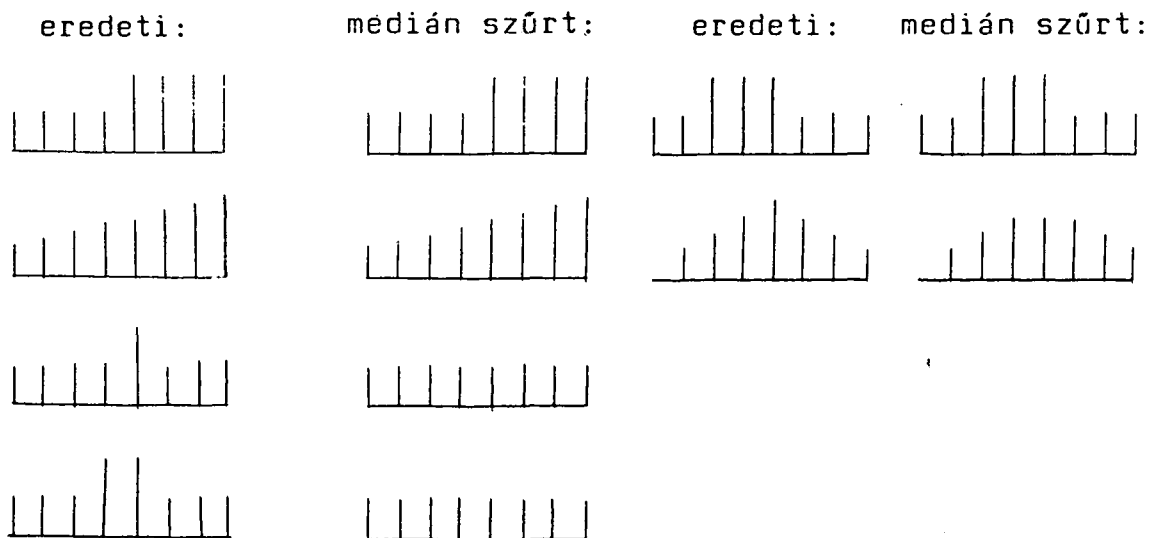
/Az SZKI által fejlesztett software/

Szintén pontszerű zajok kiszűrésére alkalmas, nem lineáris eljárás /Tukey 1971/.

Vizsgálataink során egydimenziós szűrő függvényt alkalmaztunk:

A szűrendő terület bal felső sarkába helyezünk egy páratlan számú képpontot letakaró ablakot. Az ablak által lefedett középső képpontot a képpontok mediánjával helyettesítjük, azaz az ablakban lévő értékeket nagyság szerinti sorrendbe rakjuk, s a középső elem lesz a medián: $a_1, a_2, \dots, a_n$ elemek mediánja a_i , ha $(n-1)/2$ db elem kisebb, vagy egyenlő mint a_i és $(n-1)/2$ db elem nagyobb, vagy egyenlő mint a_i . Pl.: a következő értékek vannak az ablakban: 10,15,63,50,52, ekkor a 63 helyébe 50-et írunk. Majd az ablakot eggyel jobbra csúsztatva megismételjük az eljárást mindaddig, míg az egész területet be nem jártuk.

A medián szűrés hatását a következő egyszerű ábra mutatja / az ablak 5 képpontot takar/:



Az ábráról is jól látszik, hogy azokat a jeleket, melyeknek periódusa kisebb, vagy egyenlő a fél ablak szélességgel, változatlanul hagyja.

A medián szűrésre fennáll, hogy két sorozat mediánjának összege nem egyenlő a két sorozat összegének a mediánjával:

$$\text{med} \{f(i) + g(i)\} \neq \text{med} \{f(i)\} + \text{med} \{g(i)\}$$

Tehát nem ugyanazt a képet kapjuk, ha átlagolás előtt végezzük el a medián szűrést, vagy átlagolás után.

2.3.6. A távolságok mérése

/a "mérés" program hajtja végre/

A mérendő szakasz végpontjait egy-egy ponttal jelöljük meg, a program segítségével. A két pont távolságát a szokásos képlettel számítjuk ki: $d = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2}$, ahol d a két pont távolsága, (x_1, y_1) az egyik, (x_2, y_2) a másik pont koordinátája. A képeken feltüntetett szakasz $1 \text{ cm} = 10^8 \text{ Å}$, ennek hossza az előző módszerrel s . A méréseket az eredeti terület kétszer nagyítottján végezzük, ahol a távolságok négyszer akkorák, mint az eredeti területen. Ha a műszeres nagyítást N -el jelöljük /832952x, 1041190x/, akkor a következő képlettel kapjuk meg a d távolságot Å-ben $/t/$: $t = \frac{d}{s} \frac{10^8}{4N} \left[\frac{\text{Å}}{\text{Å}} \right]$

EREDMÉNYEK

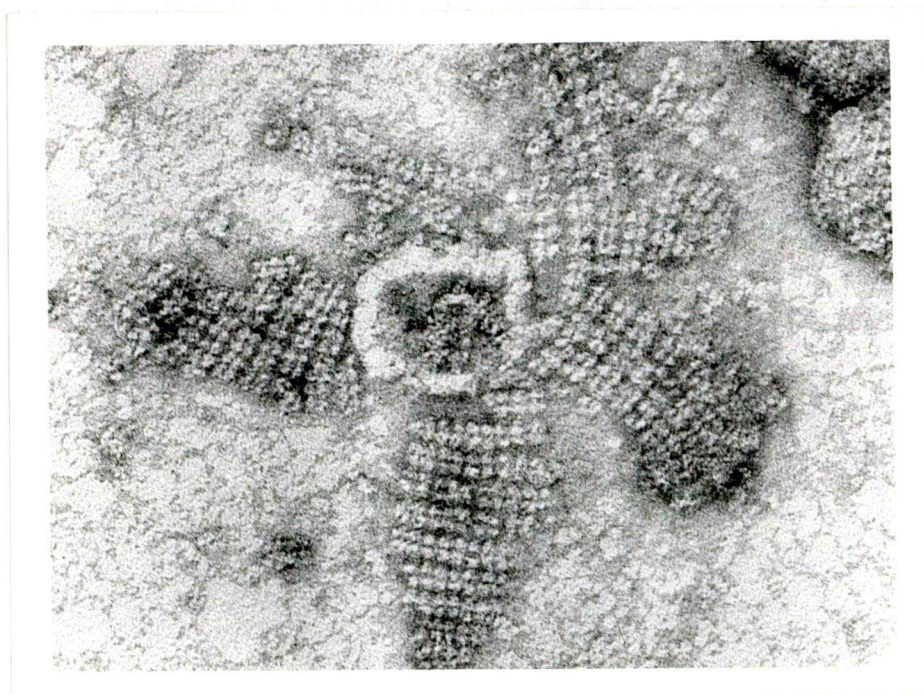
3.1. A hipozmotikus közegben felszakadt kétdimenziós Ca^{2+} -ATPáz dimér kristályok jellemzése

Az előzetesen kristályosított szarkoplazmatikus retikulum vezikulák hipozmotikus közegben felszakadnak, elveszítik összefüggő kontúrukat. A kétdimenziós kristályszerkezet oldalirányú rendezettsége megbomlik, míg a Ca^{2+} -ATPáz molekulák hosszanti, láncszerű elrendeződése megmarad. Az alapegység a két egymással antiparalell elhelyezkedő monomerből álló dimér. A láncok e dimérek hosszirányú ismétlődéséből állnak.

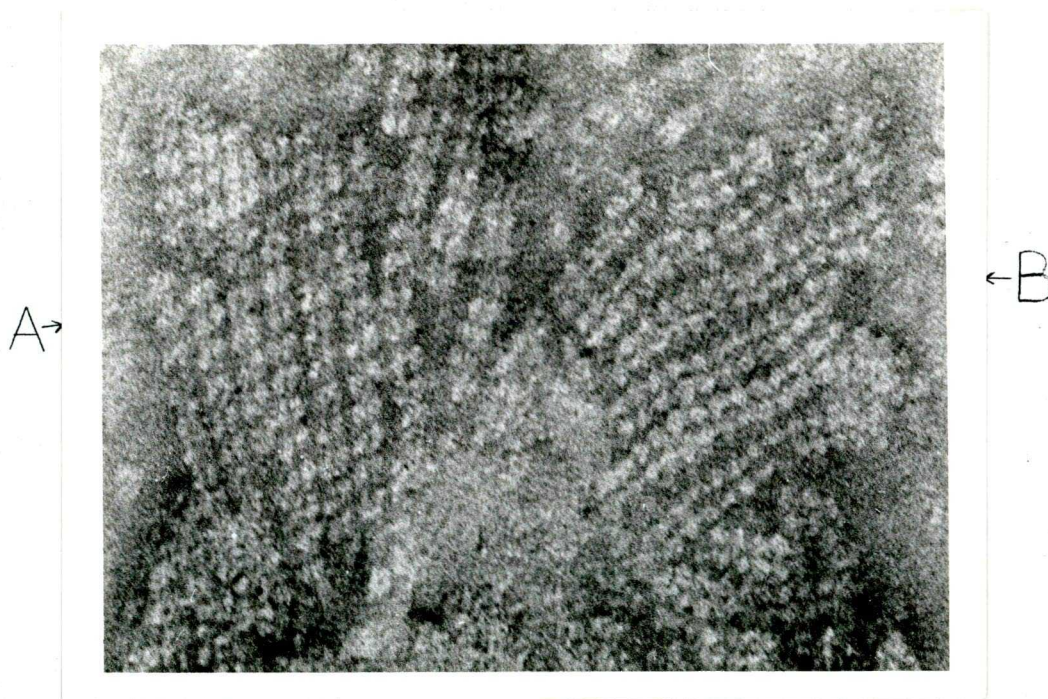
Vizsgálatainkban két szétrobbantott kristály elektronmikroszkópos felvételeit használtuk. Ezek a 6554/I.kép/ és 6560/II.kép/ számú negatívok, melyek SIEMENS ELMISCOP I. típusú elektronmikroszkópban, 60 kV feszültséggel 125 000 x-szeres nagyítással készültek /5.,6. ábra/. E képeken is jól látható, hogy a széthullás során az egyes láncok egészen különböző irányba dőlhetnek ki. Ezért az egyes szuperponálásokat csak a saját és a vele párhuzamos láncokon belül hajtottuk végre. A II. képen a külön vizsgált területeket A-val és B-vel jelöltük.

3.2. A dimérek jellemzésére használt adatok

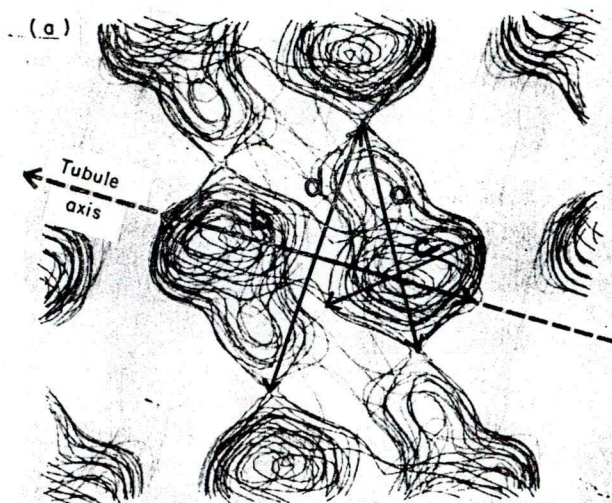
A szuperponálással a közös szerkezeti sajátságok felerősödnek, így az eredményül kapott dimérek pontosabban tükrözik a valóságot. Jellemzésükre a következő távolságokat mértük le: a monomerek hosszát /a/, szélességét /c/, a monomereket dimérekké összekötő híd hosszát /b/, s a monomerek antiparalell elhelyezkedő rövid nyúlványainak a távolságát /d/ /7. ábra/.



5. ábra A vizsgálatra használt E_2 típusú Ca^{2+} -ATPáz izolált dimér láncok /I. kép/. 1 % uranilacetát negatív festés, elektronmikroszkópos nagyítás: 125000x



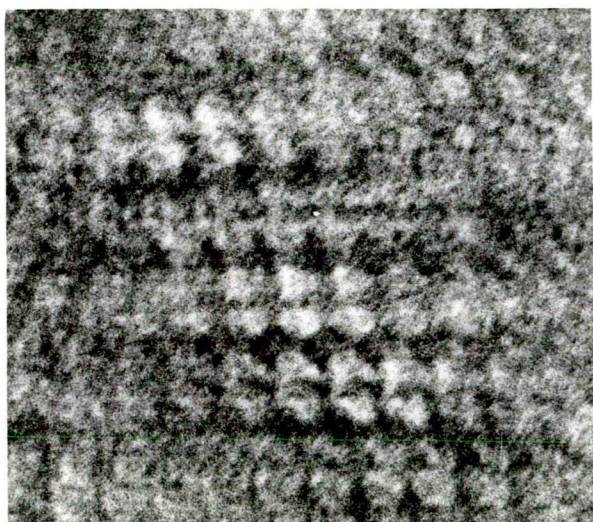
6. ábra A vizsgálatra használt E_2 típusú Ca^{2+} -ATPáz izolált dimér láncok, /II. kép/. 1 % uranilacetát negatív festés, elektronmikroszkópos nagyítás: 125000 x



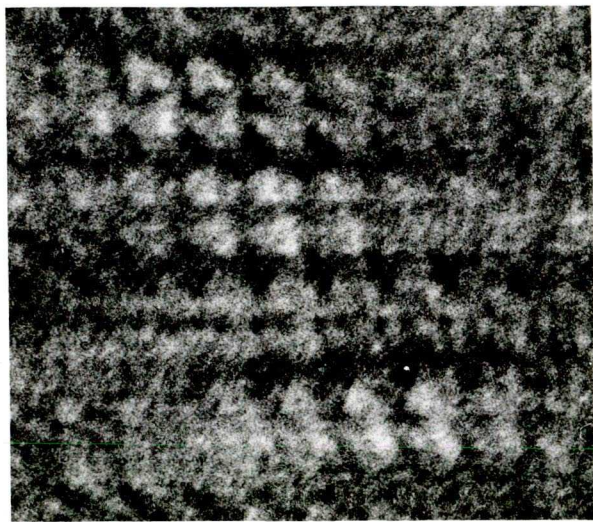
7. ábra Intakt E₂ típusú Ca²⁺-ATPáz kristály elektronden-
zitás térképe a,b,c,d-vel jelölve a dimért, il-
letve monomereket jellemző paramétereket

3.3. A szuperpozíciós nagyítással kapott szerkezet kiértékelése

Az I. kép transzlációs szuperponálásának eredményeit mutat-
ja a 8. és 9. ábra. Ezzel a módszerrel csak láncokon belüli át-
lagolást tudtunk elvégezni. A legélesebb kontúrú dimér, a lánc-
on belüli középső, hiszen itt jelenik meg a $\bar{k}$ számú dimér átlaga
/ $\bar{k}$ számú eltolás esetén/. Látható, hogy a két eredményül kapott
dimér valóban csak a nagyításban különbözik egymástól. Mindkét
esetben a 7. ábrának megfelelő "körte" alakzatot kaptuk.



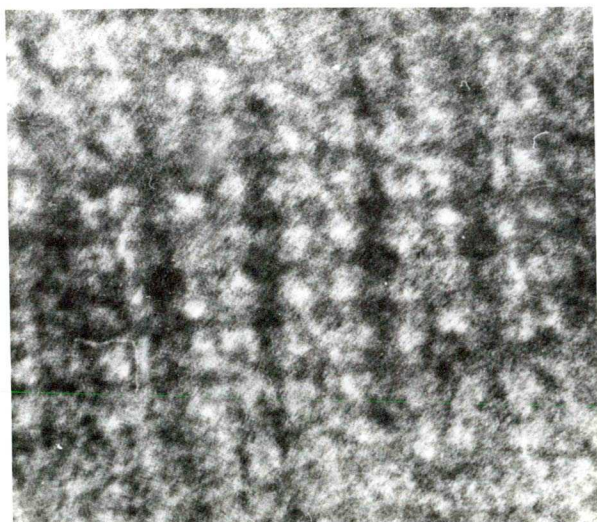
8. ábra Az I. kép translációs szuperpozícióval átlagolt dimérjei, $k=4$, nagyítás: 832952 x



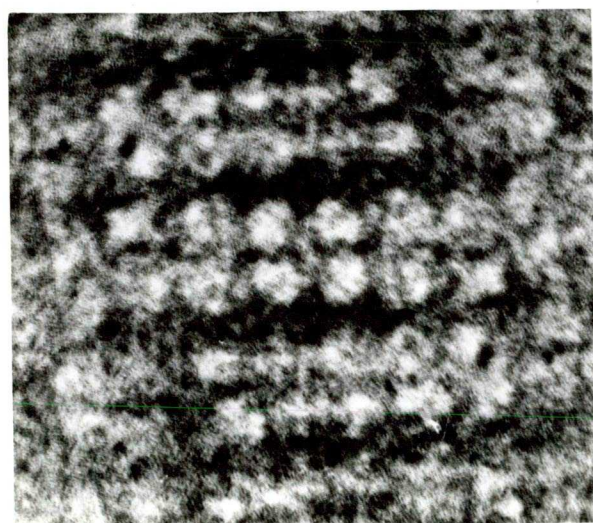
9. ábra Az I. kép translációs szuperpozícióval átlagolt dimérjei $k=4$, nagyítás: 1041190 x

Az irodalomból ismert, s a képeken is felfedezhető, hogy a dimérek 180^0 -os szimmetriával rendelkeznek. Ezt a tényt felhasználva, rotációs szuperponálást is végeztünk. Egy diméren belül a felvétel zajossága és a kis méretek miatt azonban igen nehéz pontosan meghatározni a szimmetria középpontot. Ezért két egymást követő dimér forgási centrumát jelöltük ki, s e körül hajtottuk végre a rotációt.

Ennek az eljárásnak az eredményét mutatja a 10. és 11. ábra. Összevetve a translációs szuperponálással kapott alakzattal, különbségeket tapasztalunk /I. táblázat/. A rotációs szuperponálással felerősített dimér képe kevésbé hasonlít a 7. ábrán látható "körte" alakhoz.

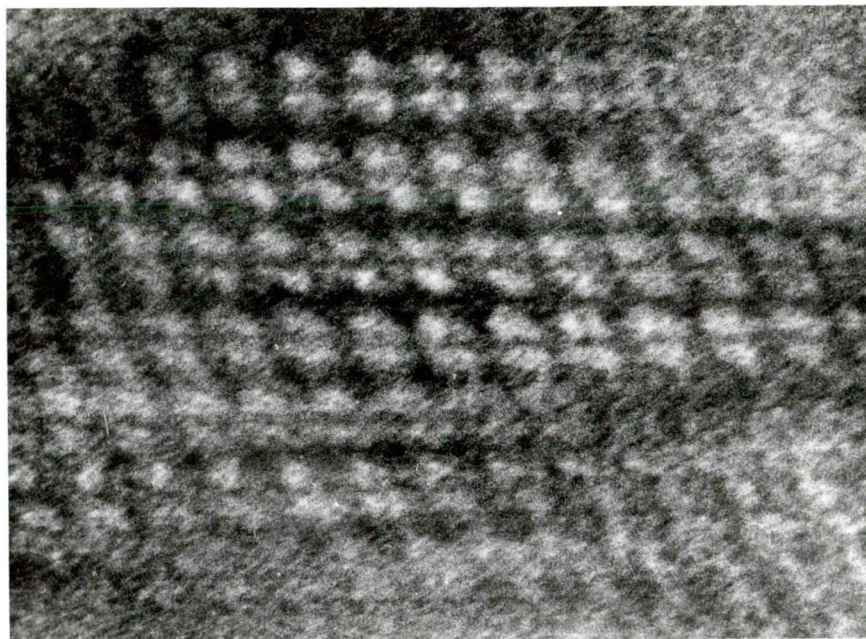


10. ábra Az I. kép rotációs szuperpozícióval átlagolt dimérjei, $k=2$, nagyítás: 832952 x

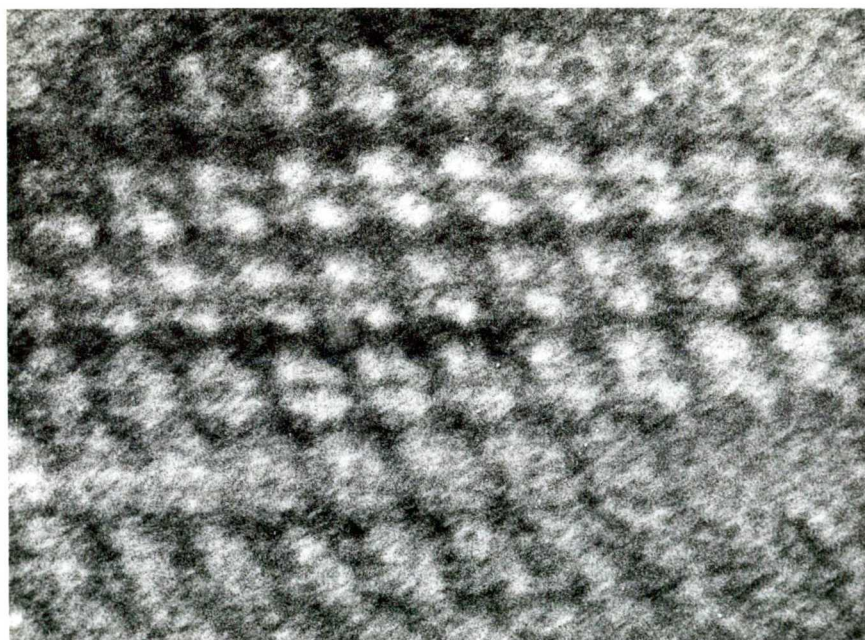


11. ábra Az I. kép rotációs szuperpozícióval átlagolt dimérjei, $k=2$, nagyítás: 1041190 x

A II/A. láncokon elvégzett translációs szuperponálások szintén "körte" alakú monomereket adtak eredményül /12., 13. ábra/. Összehasonlítva azonban a 8. és 9. ábrán látható dimérek méreteivel, jelentős eltérések mutatkoznak, monomerjeik hosszabbak és az egymástól való távolságuk is megnőtt /I. táblázat/

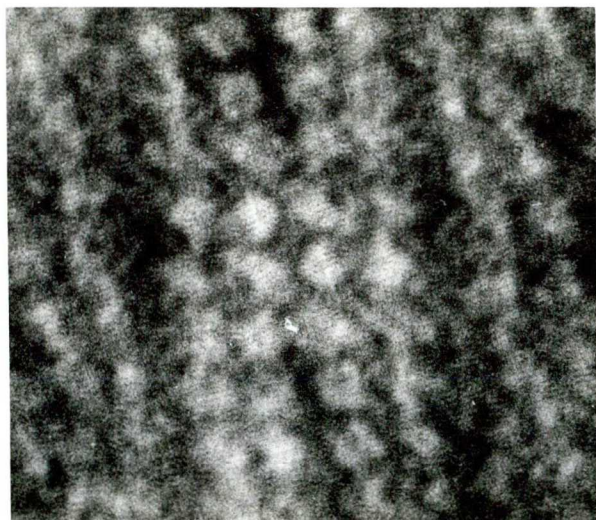


12. ábra A II/A. kép transzlációs szuperponálással átlagolt
dimérjei, $k=5$, nagyítás: 832952 x

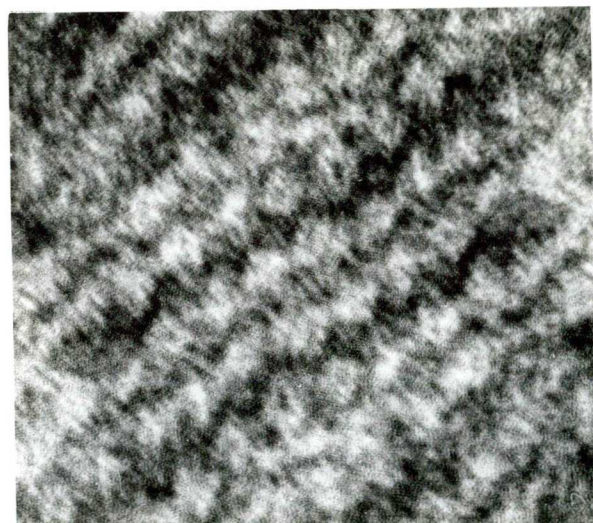


13. ábra A II/A. kép transzlációs szuperponálással átlagolt
dimérjei, $k=5$, nagyítás: 1041190 x

A II/B. dimér láncok rendezetlenségük miatt fotó eljárással történő transzlációs szuperponálásra nem alkalmasak. Ezért ezen a területen rotációs szuperponálást hajtottunk végre. Az I. képhez hasonlóan itt is két egymást követő dimér szimmetria középpontját határoztuk meg, s e körül végeztük el a forgatást /14., 15. ábra/. Monomerjeik alakját tekintve a 14., illetve a 15. ábra a 10., illetve a 11. ábrán láthatókéhoz hasonlítanak, azonban méreteikben jelentős különbségek mutatkoznak. A 14., illetve a 15. ábrán a monomerek jóval nagyobbak, mint a 10., illetve a 11. ábrán lévők, másrészt a diméreket alkotó párok távolsága is igen megnőtt /I. táblázat/.



14. ábra a II/B. kép rotációs szuperponálással átlagolt dimérjei, $k=2$, nagyítás: 832952 x



15. ábra A II/B. kép rotációs szuperponálással átlagolt dimérjei, $k=2$, nagyítás: 1041190 x

I. T Á B L Á Z A T

	a	b	c	d	$\begin{bmatrix} o \\ A \end{bmatrix}$
I. kép					
N=832952x transzl.szup.	57	44	95	72	
rotációs szup.	45	35	91	54	
N=1041190x					
transzl.szup.	57	45	98	67	
rotációs szup.	49	46	96	-	
II/A. kép					
N=832952x transzl.szup.	88	48	120	84	
N=1041190x					
transzl.szup.	89	44	119	91	
II/B. kép					
N=832952x rotációs szup.	68	50	135	96	
N=1041190x					
rotációs szup.	70	61	144	105	
Az E ₂ típusú intakt kristályban:	62	46	88	72	

Az I. képen meghatározott transzlációs és rotációs szuperponálások értékeit összevetve, megállapítható, hogy az elforgatással nyert alakzat valószínűleg kevésbé tükrözi a valóságot, mint a transzlációval kapott. A 6., 9. ábrán látható kerek monomerek is erre utalnak. Az eltolásos szuperponálás eredménye szerint a monomerek hossza kb. 5 Å -el csökken, szélességük megmarad, az őket összekötő híd hossza kb. 8 Å -el megnő, a rövid nyulványok távolsága pedig kb. 2 Å -el csökken az irodalomból ismert intakt kristályra vonatkozó értékekhez viszonyítva /I. táblázat/.

A II/A. kép monomerjeinek értékei már jóval nagyobb mértékben térnek el az intakt kristályban mértékétől. A monomerek és az őket összekötő híd hossza kb. 1,4-szerese az irodalmi értéknek /I. táblázat/. Ennek alapján feltételezhető, hogy nem a 7. ábrán feltüntetett irányból látszanak ezek a dimérek.

A II/B. kép megerősíti a rotációs szuperponálásról az I. képnél elmondottakat. Az így keletkező monomerek inkább kör alakúak, mint hosszúkásak. A túlságosan nagy értékek miatt ezekről a partikulákról is feltételezhető, hogy a 7. ábrán feltüntetettől eltérő irányú vetületét mutatnak az elektronmikroszkópos felvételen.

3.4. A számítógépes vizsgálat eredményei

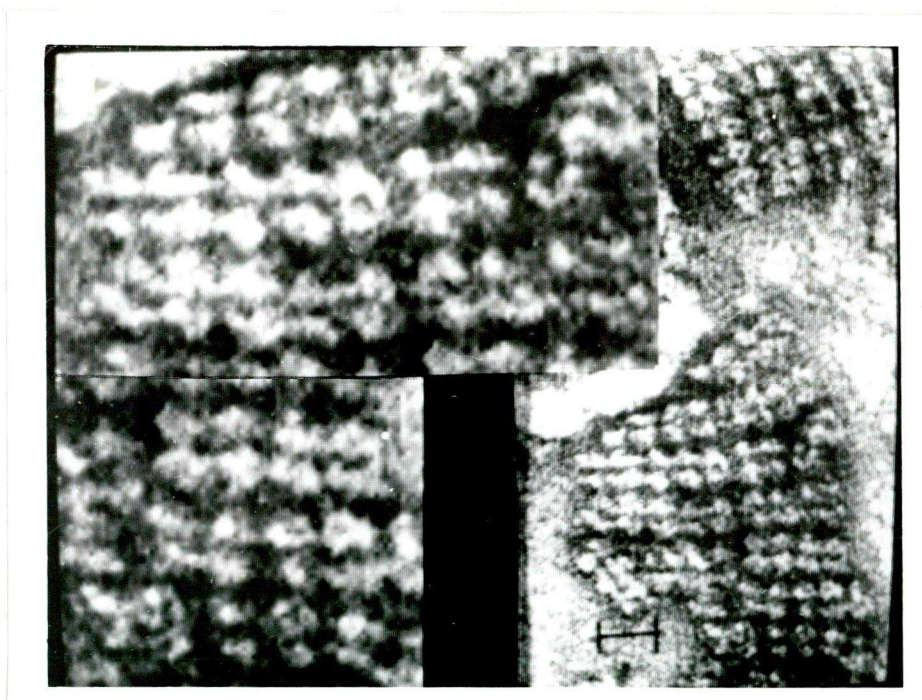
3.4.1. A lineáris interpolációs nagyítással kapott képek

A felnagyított diméreken pontosabban lehet az átlagolást elvégezni, ezért a digitalizált képek vizsgálandó területeit négy-szeresükre /oldalait kétszeresre/ növeltük. A lineáris interpoláció alkalmazásával egy "elő" simítást is végeztünk a képeken: emiatt egy zajpontból nem lesz négy zajpont, mint az egyszerű egy képpontot négy képponton megjelenítő eljárás esetén, hiszen a szomszédos pontok értékei módosítják a zajpontét.

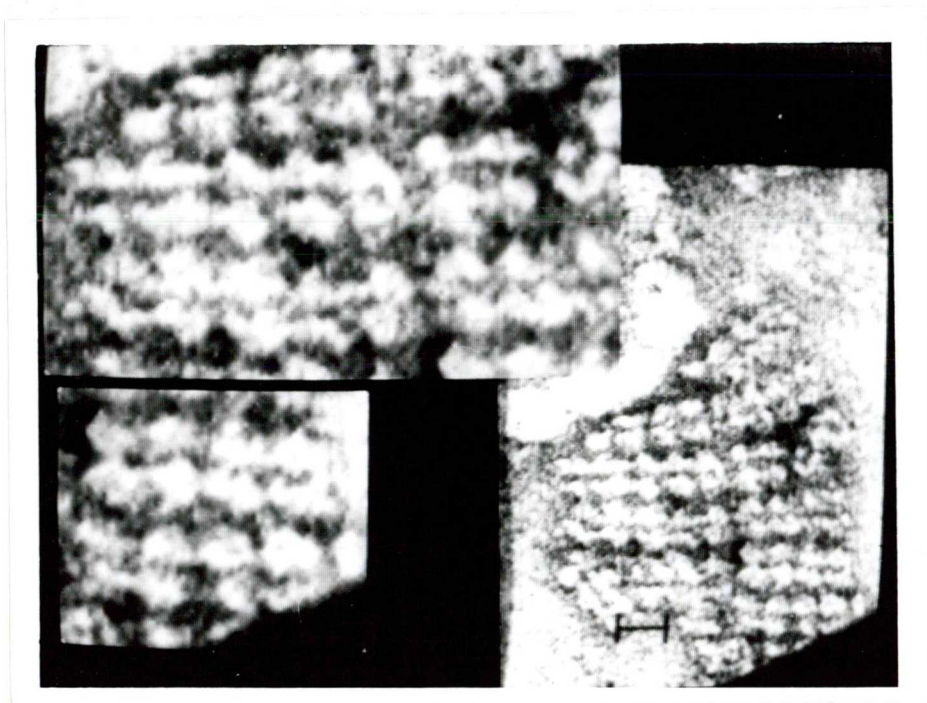
Az I. képen, a partikulák, partikula sorok irányát figyelembe véve négy egységet különböztettünk meg. Ezeken az egységeken belül a nem túlságosan zajos, egymással azonos állású diméreket, dimér láncokat nagyítottuk fel a további feldolgozás céljából. Az eredeti felvétel az ábrák jobb oldalán, ill. alól, a nagyított képek a bal oldalán, illetve felül láthatók.

Az I/1. rész a szétesett kristály bal szélső "karja" /16., 17. ábra/. A számozásban az óramutató járásával ellentétes irányban haladtunk, tehát az I/2. az előző kristályrészlet-től jobbra eső "kar" /18., 19. ábra/, stb. Az I/3. rész nagyított, digitalizált képét a 20. és 21., az I/4.-ét a 22. és 23. ábrák mutatják. A nagyított területeken jól látszik, hogy a kisebb felbontású, még egységesnek tekinthető dimérek között is vannak eltérések. Ezeket figyelembe véve, egy-egy irányban átlagban 9 db dimért lehetett szuperponálni.

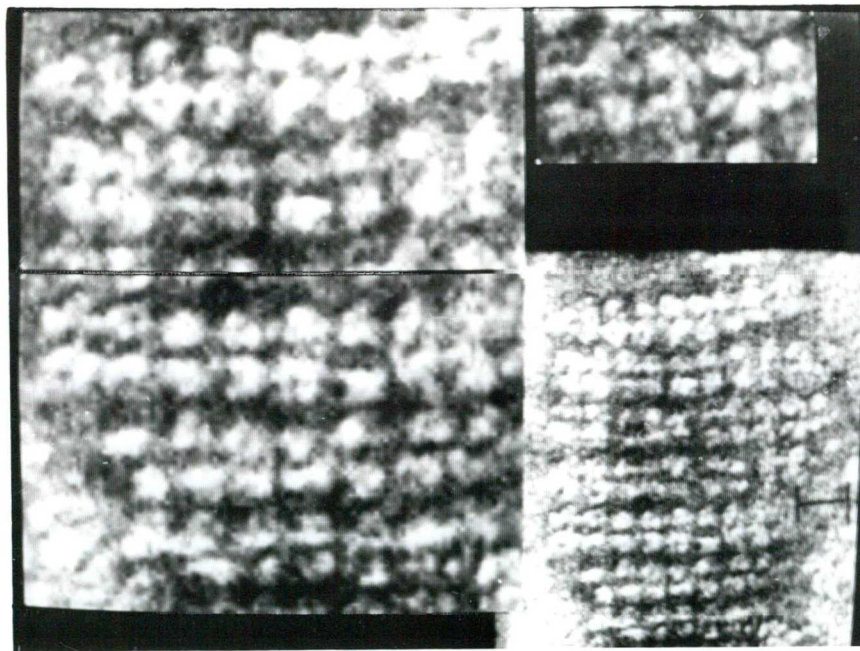
A II. képet a fotó szuperpozíciós nagyításhoz hasonlóan A és B részre osztottuk. A II/A. digitalizált, nagyított felvételeit mutatják a 24., 25. ábrák, a II/B. részét pedig a 26. és 27. ábrák.



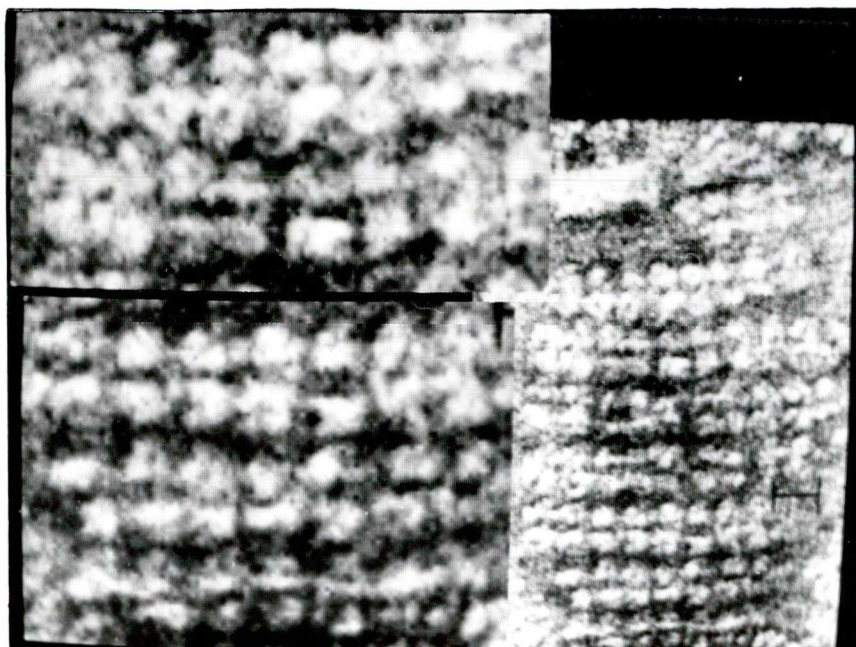
16. ábra Az I. kép bal szélső egységének /I/1. rész/ digitalizált felvétele, nagyítás: 832952 x: jobb oldalon; a jobb oldali terület lineáris interpolációval nagyított képe, nagyítás: 1665904 x: bal oldalon



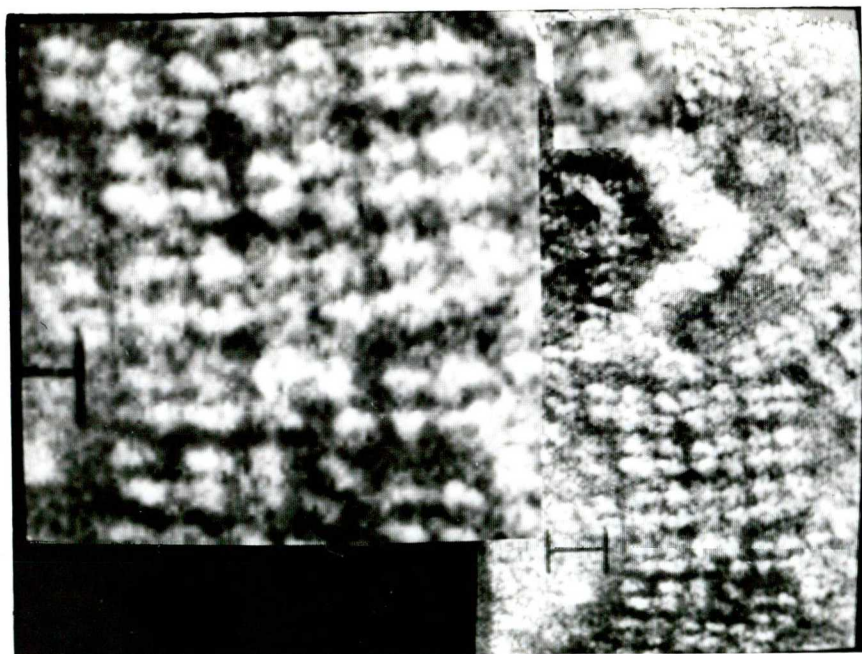
17. ábra Az I. kép bal szélső egységének /I/1. rész/ digitalizált felvétele, nagyítás: 1041190 x: jobb oldalon; a jobb oldali terület lineáris interpolációval nagyított képe, nagyítás: 2082380 x: bal oldalon



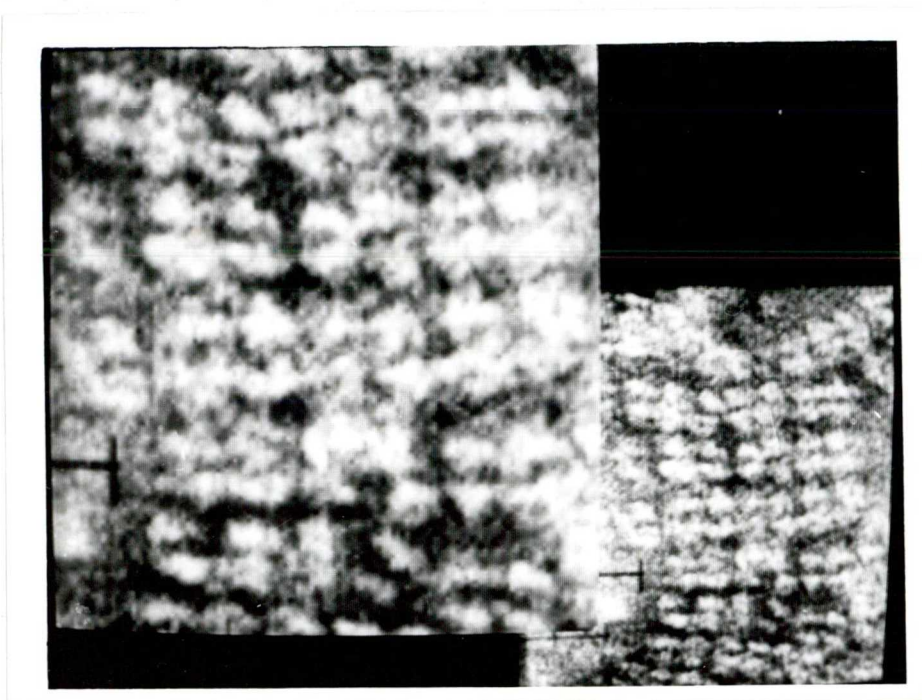
18. ábra Az I. kép 2. egységének /I/2.rész/ digitalizált felvétele, nagyítás: 832952 x: jobb oldalon; a jobb oldali terület lineáris interpolációval nagyított képe, nagyítás: 1665904 x: bal oldalon



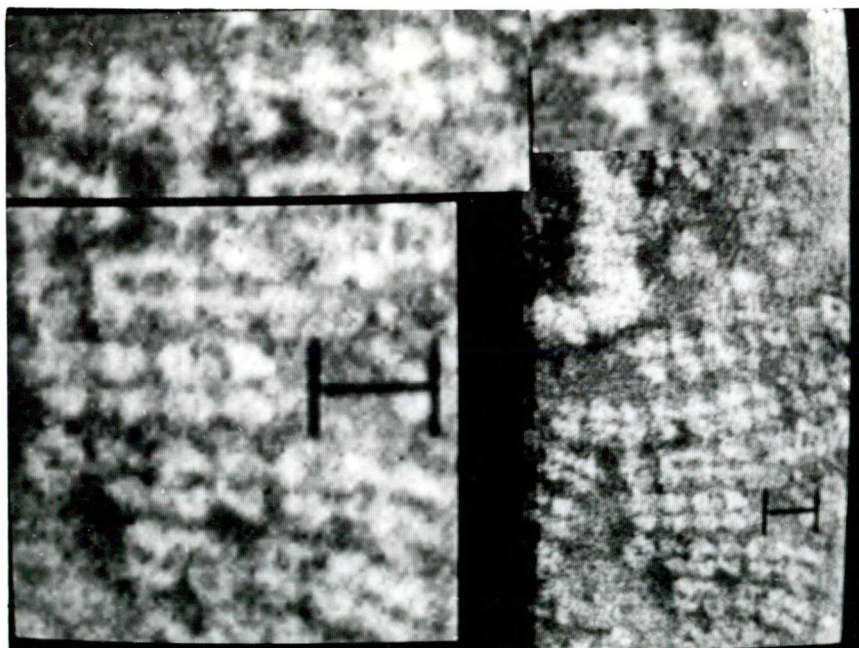
19. ábra az I. kép 2. egységének /I/2, rész/ digitalizált felvétele, nagyítás: 1041190 x: jobb oldalon; a jobb oldali terület lineáris interpolációval nagyított képe, nagyítás: 2082380 x: bal oldalon



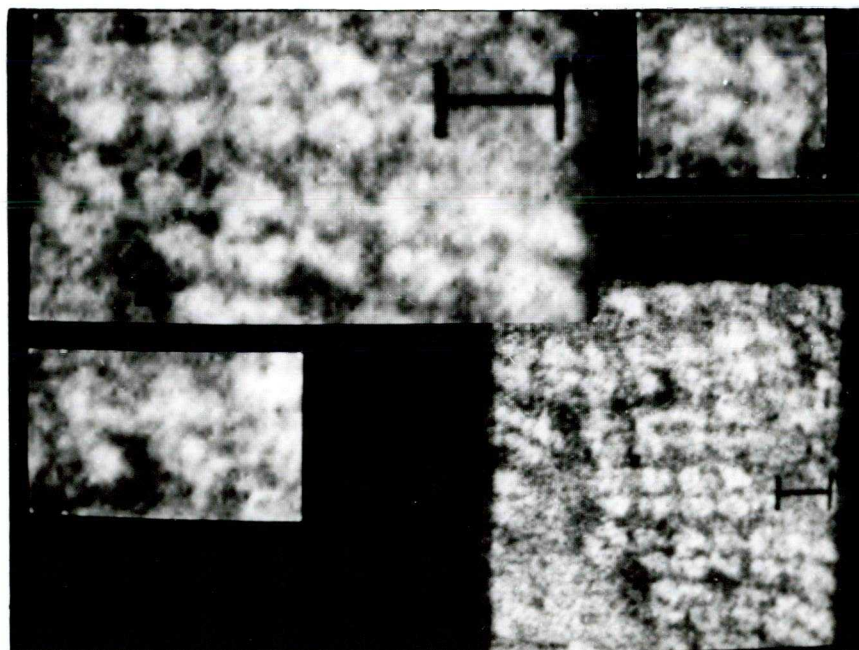
20. ábra Az I. kép 3. egységének /I/3. rész/ digitalizált felvétele, nagyítás: 832952 x: jobb oldalon; a jobb oldali terület lineáris interpolációval nagyított képe, nagyítás: 1665904 x: bal oldalon



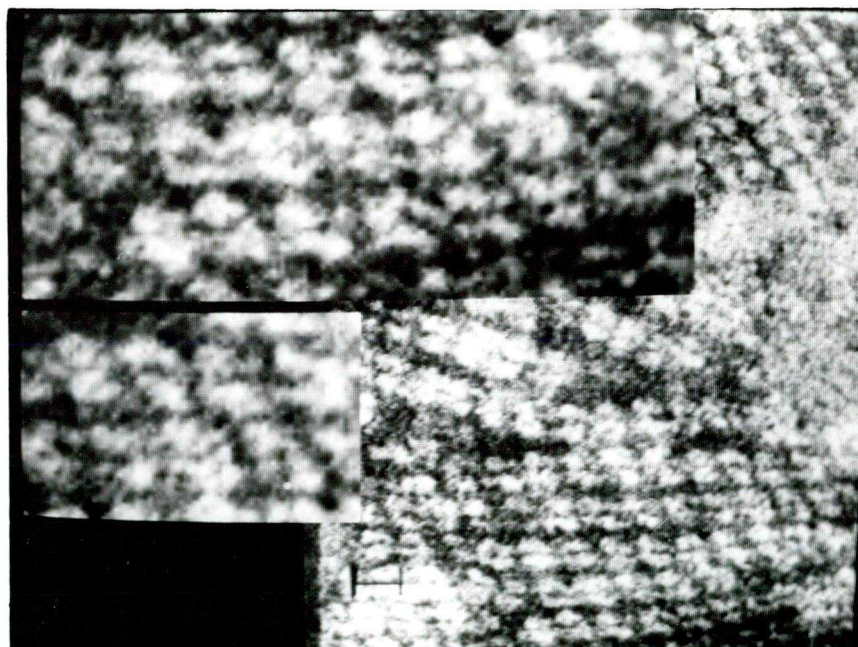
21. ábra Az I. kép 3. egységének /I/3. rész/ digitalizált felvétele, nagyítás: 1041190 x: jobb oldalon; a jobb oldali terület lineáris interpolációval nagyított képe, nagyítás: 2082380 x: bal oldalon



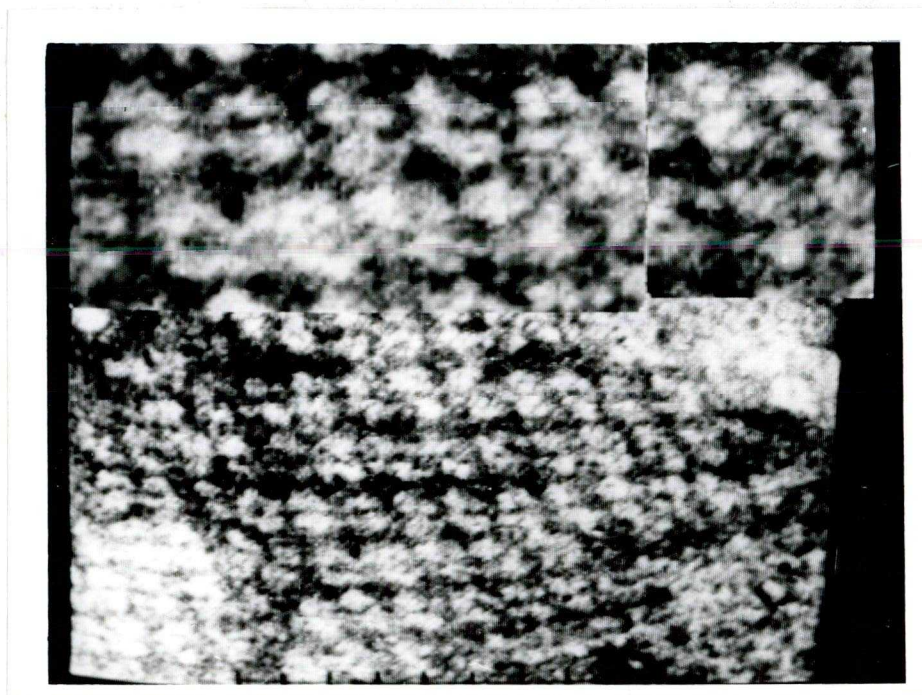
22. ábra Az I. kép 4. egységének /I/4. rész/ digitalizált felvétele, nagyítás: 832952 x: jobb oldalon; a jobb oldali terület lineáris interpolációval nagyított képe, nagyítás: 1665904 x: bal oldalon



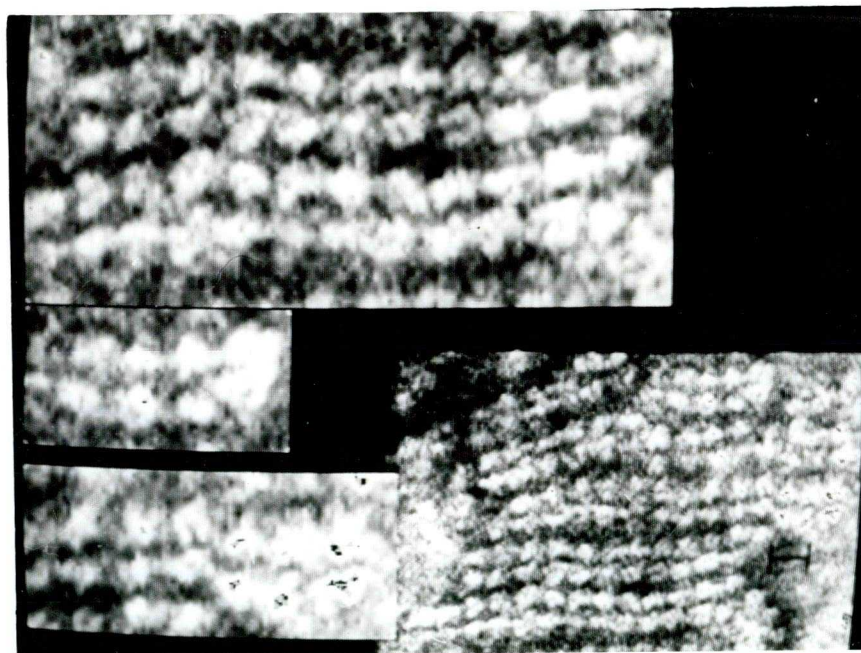
23. Ábra Az I. kép 4. egységének /I/4. rész/ digitalizált felvétele, nagyítás: 1041190 x: jobb oldalon; a jobb oldali terület lineáris interpolációval nagyított képe, nagyítás: 2082380 x: bal oldalon



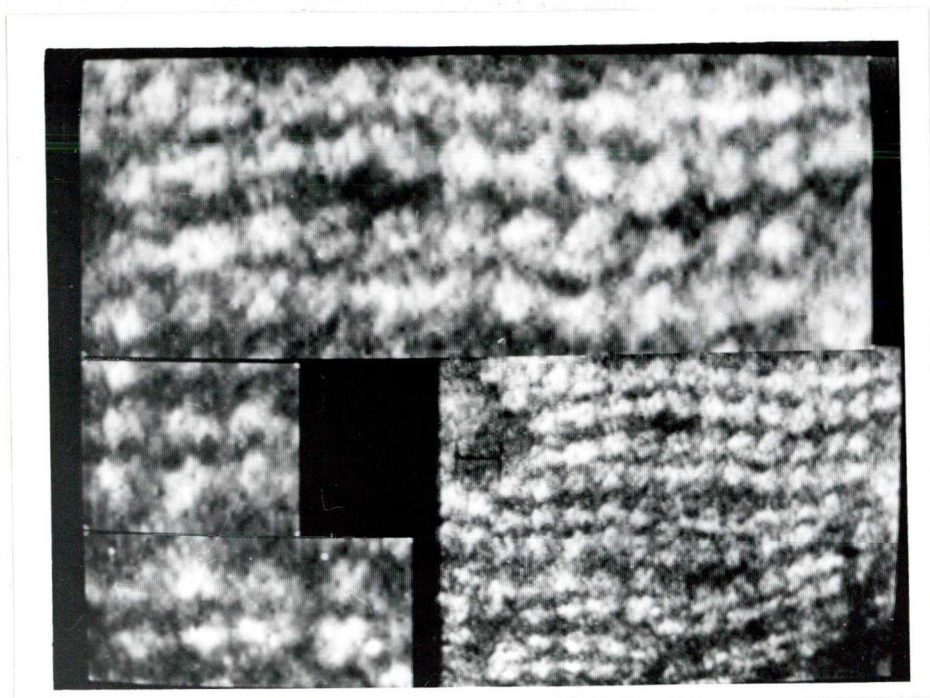
24. ábra A II/A. kép digitalizált felvétele, nagyítás: 832952 x: alsó rész; az alsó terület lineáris interpolációval nagyított képe, nagyítás: 1665904 x: felső rész



25. ábra A II/A. kép digitalizált felvétele, nagyítás: 1041190 x: alsó rész; az alsó terület lineáris interpolációval nagyított képe, nagyítás: 2082380 x: felső rész



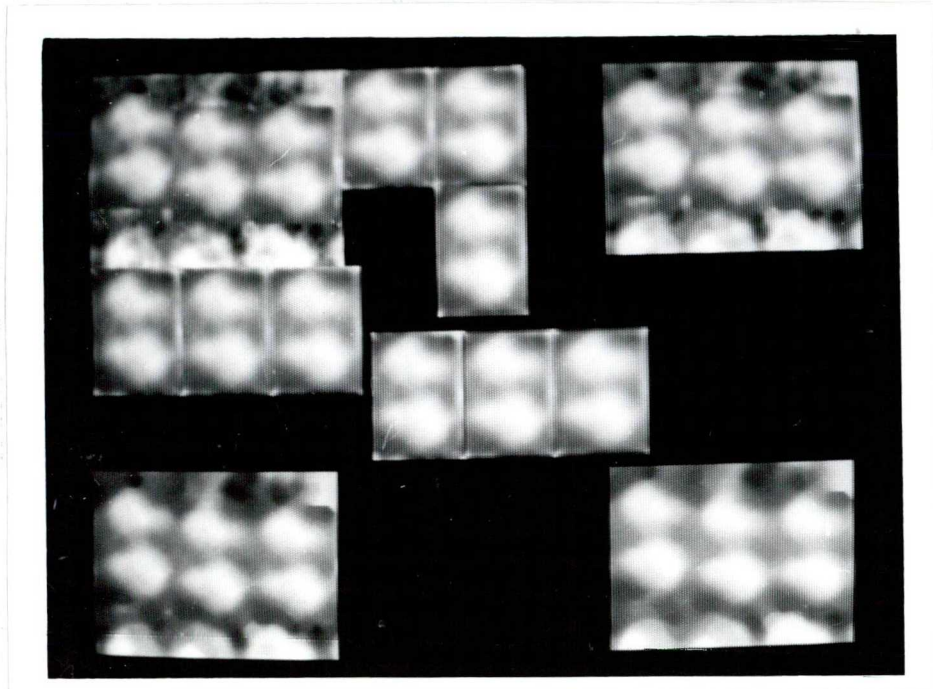
26. ábra A II/B. kép digitalizált felvétele, nagyítás: 832952 x: jobb alsó rész; a jobb oldali terület lineáris interpolációval nagyított képe, nagyítás: 1665904 x: jobb oldali és felső rész



27. ábra A II/B. kép digitalizált felvétele, nagyítás: 1041190 x: jobb alsó rész; a jobb oldali terület lineáris interpolációval nagyított képe, nagyítás: 2082380 x: jobb oldali és felső rész

3.4.2. A számítógépes átlagolással kapott szerkezet kiértékelése

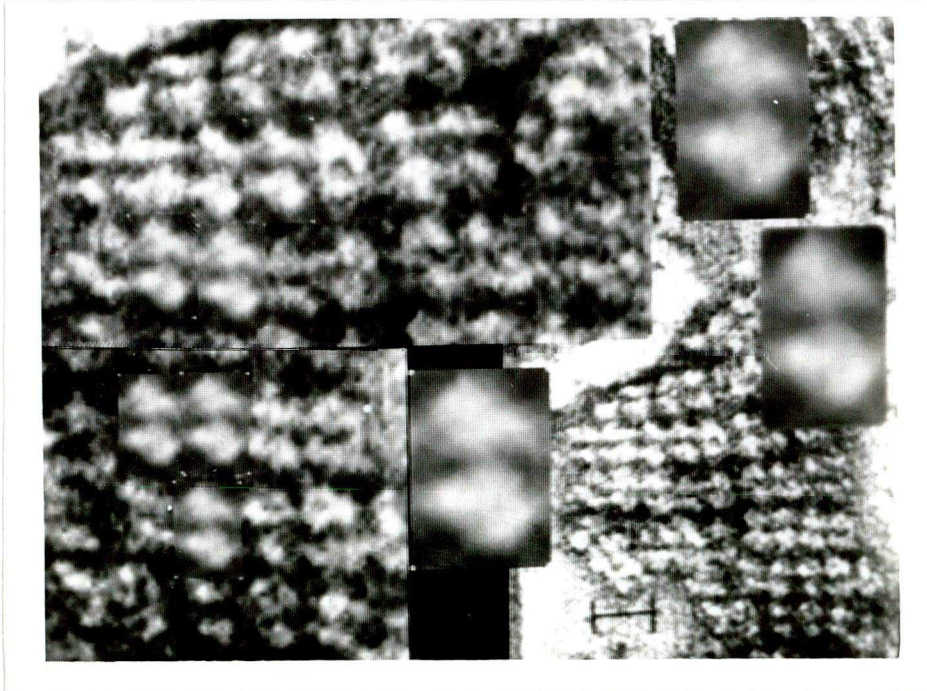
A kétszeresre nagyított diméren hajtottuk végre az átlagolásokat. A láncok párhuzamos elhelyezkedése miatt ezt a műveletet nem csak az egyes sorokon belül, hanem az egész területen végezhattük. Az utolsóként kapott, felerősített partikulát a kiértékelés megkönnyítésére még egyszer felnagyítottuk a kétszeresére. Az esetleg megmaradó pontszerű zajok további kiszűrésére, az alakzat lesímítására használtuk a felnagyított diméren a konvolúciós, illetve a medián szűrést. Annak eldöntésére, hogy a kétféle símitó eljárás közül melyiket alkalmazzuk, az egyik kiátlagolt diméren kipróbáltuk az összes lehetséges szűrőfüggvényt.



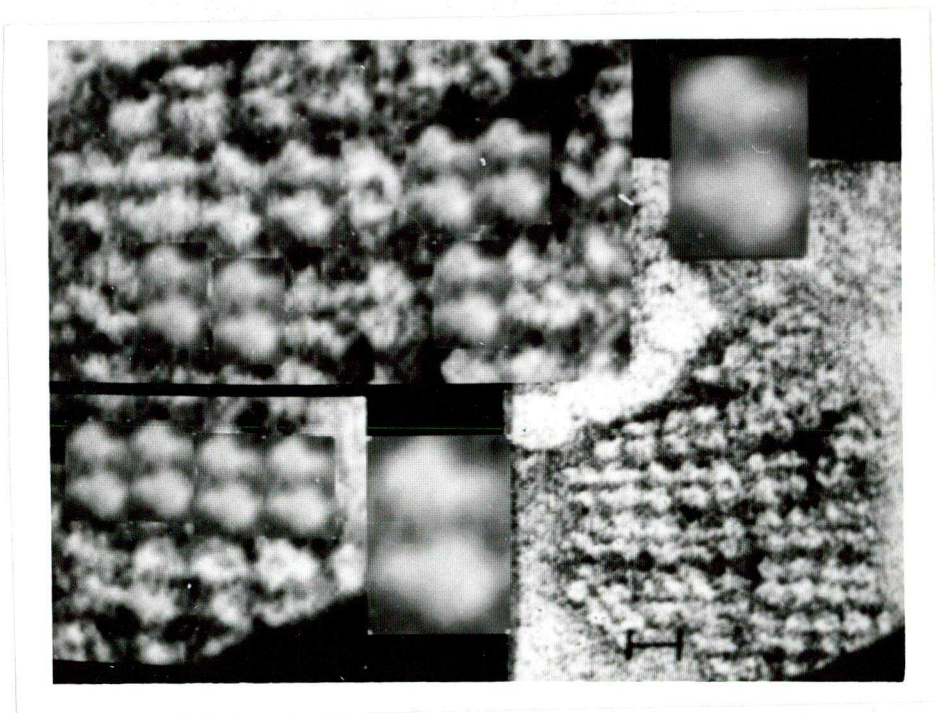
28. ábra Konvolúciós és medián szűrés hatása a számítógépes átlagolással kapott diméren. Bal felső sarok: az átlagolással nyert dimér /3 db/, a mellette lévő 3 dimér a h_1 , az alatta lévő 3 dimér a h_2 , a kép közepén lévő 3 dimér a h_3 függvényekkel történő egyszeri, kétszeri és háromszori konvolúciós szűrés után; jobb felső sarok: a kiátlagolt 3 dimér a három ablakos medián szűrés után; bal alsó sarok: az öt ablakos medián szűrés után; jobb alsó sarok: a hét ablakos medián szűrés után

Az így kapott dimérek mutatja a 28. ábra bal felső negyede a következő sorrendben: a bal felső sarokban látható eredeti /nem símított/ dimértől jobbra lévő három alakzat a h_1 /ld. módszerek/, az alatta lévő három a h_2 és a tőle 45° -os szögben lefelé eső három partikula a h_3 függvények egyszeri, kétszeri és háromszori alkalmazása után. A jobb felső negyedben a három ablakos, a bal alsó negyedben az öt ablakos és a jobb alsó negyedben a 7 ablakos medián szűrés /ld. módszerek/ eredménye látható /28. ábra/. Megállapítható, hogy már a három ablakos medián szűréssel is túlságosan elhomályosodik a dimérek körvonala, s az öt, illetve a hét ablakossal ez csak fokozódik. Az egyszer alkalmazott konvolúciós szűrőfüggvények hatása nem érvényesült. A kétszeres szűrés hatása is csak a h_3 függvény esetében mutatkozott, amin már a háromszoros szűrés nem módosított számottevően. Ennek alapján a h_3 függvénnyel történő kétszeres konvolúciós szűrést alkalmaztuk a kiátlagolt, négyszeresre nagyított dimérekre. A símított diméreket az eredeti mellé, vagy alá helyeztük el.

Az I/1 területről a 832952 x-szeres nagyításban készült pozitívon 7 db, az 1041190 x-szeresen 11 db dimért átlagoltunk ki /29., 30. ábra/. Megállapíthatjuk, hogy a monomerek alakja a 7. ábrán megrajzoltaknak megfelelő. A kétféle nagyításban készült pozitívok kiátlagolt dimérjeinek méretei között nincs jelentős eltérés /II. táblázat/.



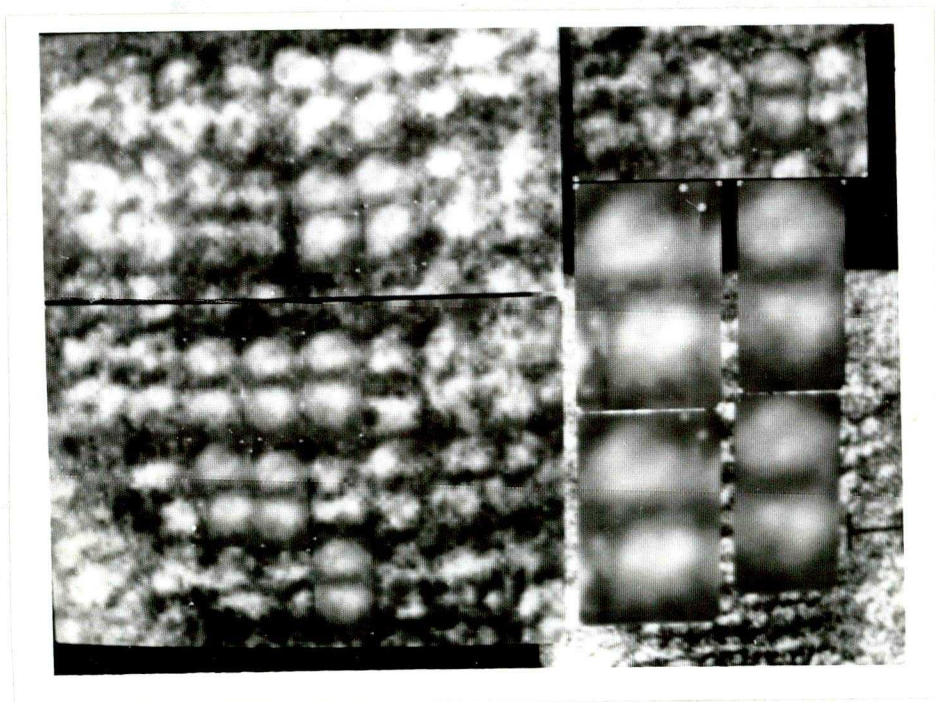
29. ábra Az I/1. kép digitalizált, nagyított területének átlagolt dimérjei, $k=7$. Nagyítás: 1665904 x. Jobb felső rész: az eredményül kapott dimér kétszeres, lineáris interpolációs nagyítás után; alatta: az átlagolt, nagyított dimér h_1 konvolúciós függvényvel kétszer simított képe; középen: 6 db átlagolás utáni dimér kétszeresre nagyított képe. Nagyítás: 3331808 x.



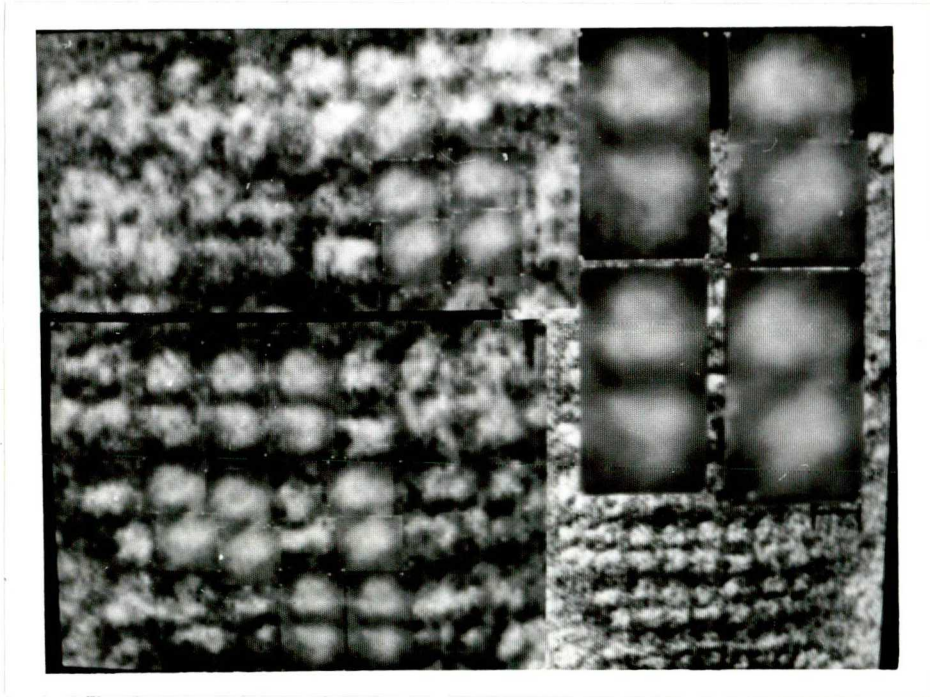
30. ábra Az I/1. kép digitalizált, nagyított területének átlagolt dimérjei, $k=11$. Nagyítás: 2082380 x. Középen: az eredményül kapott dimér kétszeres, lineáris interpolációs nagyítás után; jobb felső rész: az átlagolt, nagyított dimér h_1 konvolúciós függvényvel kétszer simított képe. Nagyítás: 4164760 x.

Az I/2. részről a 832952 x-szeres nagyításban készült pozitívon 7 db dimér, az 1041190 x-szeresen 5 db dimér átlagát vettük /31., ábra 2. dimér, 32. ábra 1. dimér/. A kapott monomerek alakjából hiányzik a keskeny nyúlványnak megfelelő rész, hosszirányú rövidülés tapasztalható mindkét ábrán /II. táblázat/. A felső két láncban egyes monomerek egy kicsit elcsúsztak egymás felett, s egy-egy dimér nem fért el egy ablakban, illetve a következő dimér egy darabja is bele került az ablakba. Ezért ezeket a diméreket alkotó monomereket külön /a felsőt és az alsót/ átlagoltuk. Így csak a monomerek alakjáról nyerünk felvilágosítást, az egymáshoz viszonyított helyzetükről nem. A 832952 x-szeres nagyításban készült pozitívon 4 db, az 1041190 x-szeresen 7 db /alsó és felső/ monomert adtunk össze /31. ábra 1. dimér, 32. ábra 2. dimér/. A felső monomereknél felismerhető a "körte" forma, míg az alsók valamilyen elfordult helyzetben látszanak. Ezek méreteit nem tartalmazza a táblázat.

Az I/3. területen is két csoportba soroltuk a diméreket, s ennek megfelelően külön átlagoltuk őket. A 832952 x-szeres nagyítású pozitívon az egyik csoportban 5 db, a másikban 7 db dimért adtunk össze /33. ábra/. A két csoportban kapott alakzatok adatai azonban a rövid nyúlványok távolságát /d/ kivéve, megegyeznek /II. táblázat/. Az 1041190 x-szeres nagyítású pozitívon 3 db, illetve 6 db dimért átlagoltunk ki, azonban a 3 db átlagolás nem erősítette fel a közös szerkezeti sajátságokat, így ennek kiértékelését /s már nagyítását is/ mellőztük /34. ábra legalsó sor/. Az 5. és 6. átlagolás után kapott diméreket nagyítottuk fel, majd simítottuk /34. ábra/.

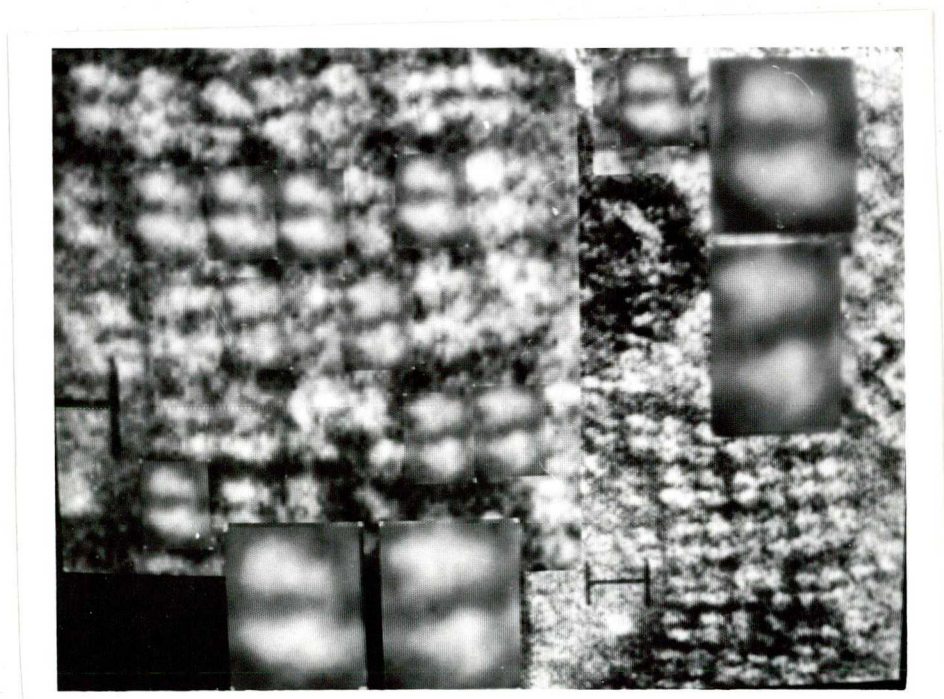


31. ábra Az I/2. kép digitalizált, nagyított területének átlagolt dimérjei, $k_1=7$, $k_2=4$. Nagyítás: 1665904 x. Jobb felső rész: 1. dimér a 4 db, 2. dimér a 7 db átlagolással kapott dimér, kétszeres, lineáris interpolációs nagyítás után; alattuk: az átlagolt, nagyított dimérek h_1 konvolúciós függvényvel kétszer simított képe. Nagyítás: 3331808 x.

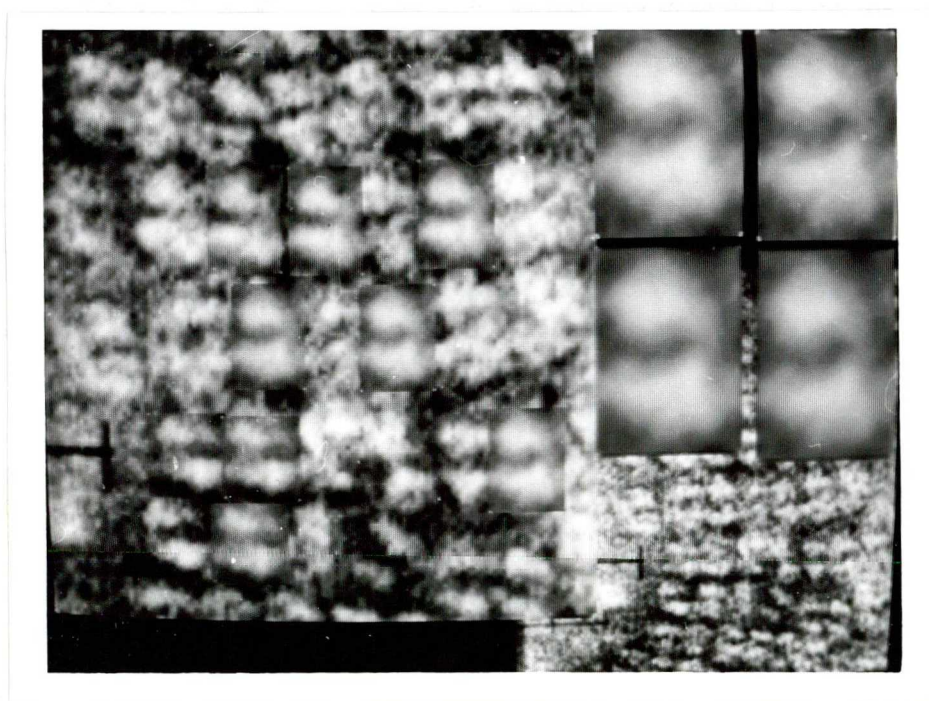


32. ábra Az I/2. kép digitalizált, nagyított területének átlagolt dimérjei, $k_1=5$, $k_2=7$. Nagyítás: 2082380 x. Jobb felső rész: 1. dimér az 5 db, 2. dimér a 7 db átlagolás eredményeként kapott dimér, kétszeres, lineáris interpolációs nagyítás után; alattuk: az átlagolt, nagyított dimérek h_1 konvolúciós függvénnnyel kétszer simított képe. Nagyítás: 416460 x.

Alakjukról megállapíthatjuk, hogy az irodalomból ismert "körte" formájúak. A kétféle nagyítású pozitívon látható kiátlagolt dimérek adatai megegyeznek /II. táblázat/.

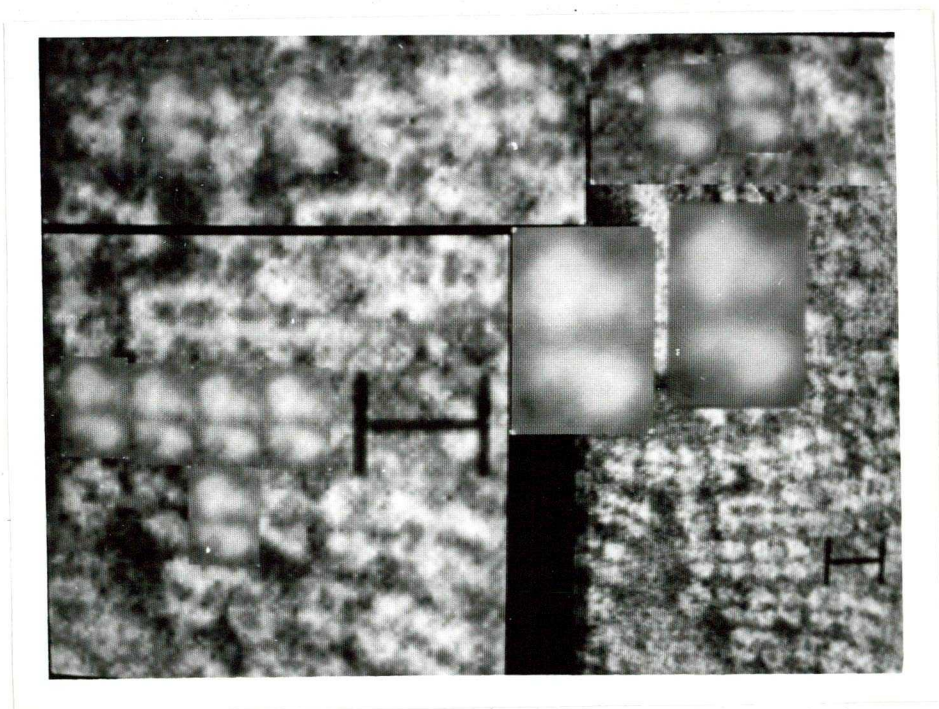


33. ábra Az I/3. kép digitalizált, nagyított területének átlagolt dimérjei, $k_1=5$, $k_2=7$. Nagyítás: 1665904 x. Jobb felső rész: a 7 db átlagolás eredményeként kapott dimér kétszeres, lineáris interpolációs nagyítás után; alatta: az átlagolt, nagyított dimér h_1 konvolúciós függvénynel kétszer simított képe; alsó rész: 1 dimér az 5 db átlagolással kapott dimér kétszeres, nagyított képe; mellette: az átlagolt, nagyított dimér h_1 konvolúciós függvénynel kétszer simított képe. Nagyítás: 3331808 x

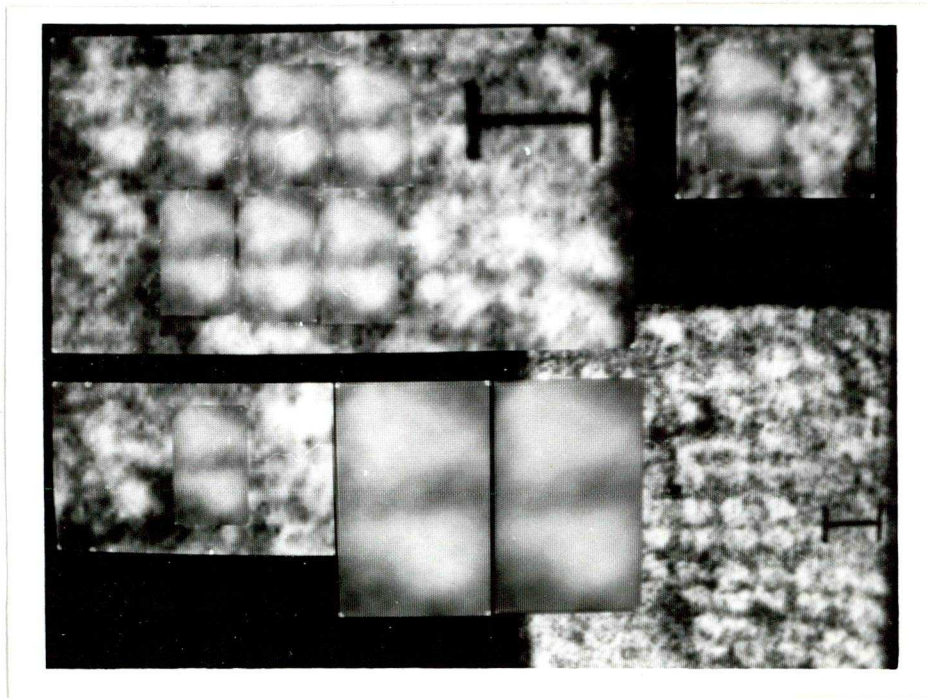


34. ábra Az I/3. kép digitalizált, nagyított területének átlagolt dimérjei $k_1=6$, $k_2=3$ /legalsó sor/. Nagyítás: 2082380 x. Jobb felső rész: 6 db /1. dimér/, ill. 5 db /2. dimér/ átlagolás eredményeként kapott dimérek, kétszeres, interpolációs nagyítás után; alattuk: az átlagolt, nagyított dimérek h_1 konvolúciós függvénnnyel kétszer simított képe. Nagyítás: 4164760 x.

Az I/4. területről készült 832952 x-szeres nagyítású pozitívon 10 db, az 1041190 x-szeresen 8 db dimértadtunk össze /35., 36. ábra/. A kétféle nagyítású pozitív kiátlagolt dimérjei között nincs jelentős különbség, alakjuk megfelel a 7. ábrán megrajzoltakénak.

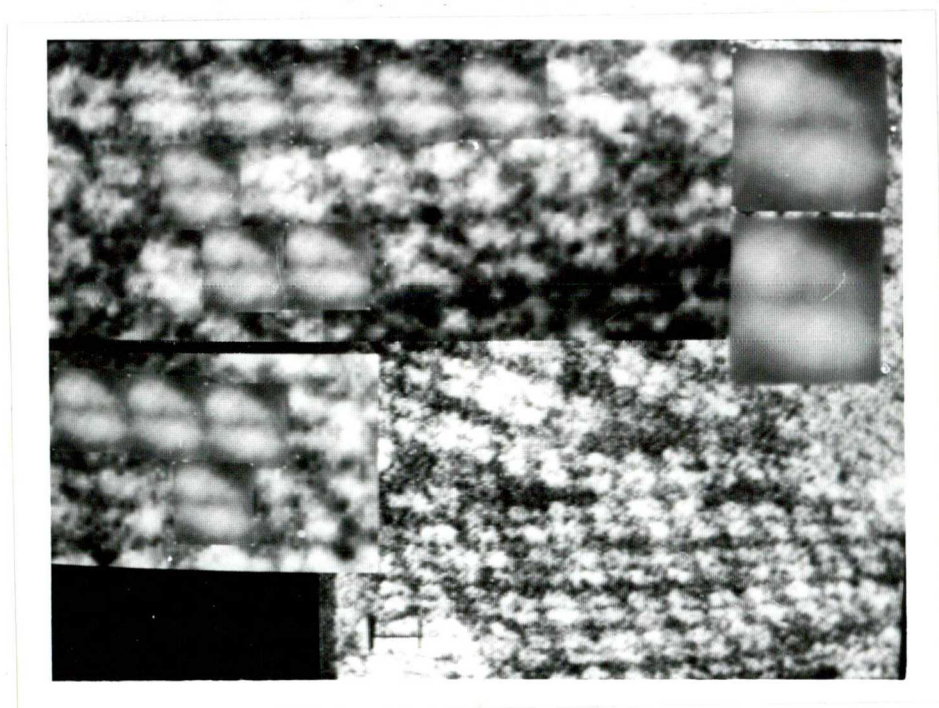


35. ábra Az I/4. kép digitalizált, nagyított területének átlagolt dimérjei $k=10$. Nagyítás: 1665904 x. Középen: az eredményül kapott dimér kétszeres, lineáris interpolációs nagyítás után; mellette: az átlagolt, nagyított dimér h_1 konvolúciós függvény-nyel kétszer simított képe. Nagyítás: 3331808 x.

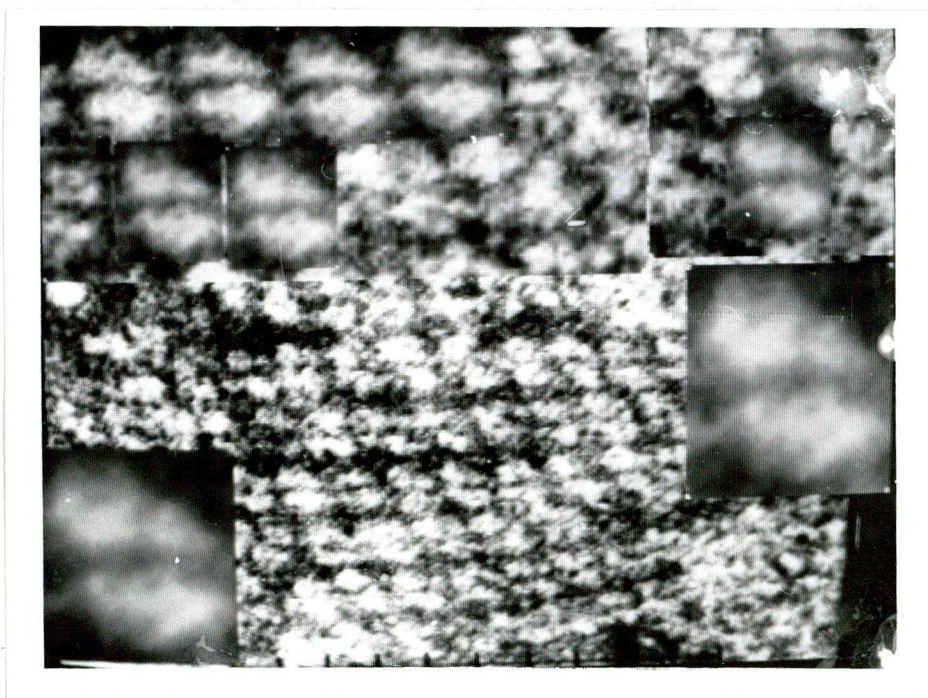


36. ábra Az I/4. kép digitalizált, nagyított területének átlagolt dimérjei $k=8$. Nagyítás: 2082380 x. Középen: az eredményül kapott dimér kétszeres, lineáris interpolációs nagyítás után; mellette: az átlagolt, nagyított dimér h_1 konvolúciós függvény-nyel kétszer simított képe. Nagyítás: 4164760 x.

A II/A. területről 832952 x-szeres nagyításban készült pozitívon 12 db, az 1041190 x-szeresen pedig 8 db dimért átlagoltunk ki /37., 38. ábra/. A két ábrán látható dimérek méretei azonosnak tekinthetők. Eredményül a "körte" alakot kaptuk meg, csak a monomerek hosszúkásabbak és a dimért alkotó monomereket összekötő híd is hosszabb, mint a 7. ábrán feltüntetett irányból látott dimérek megfelelő méretei /II. táblázat/.

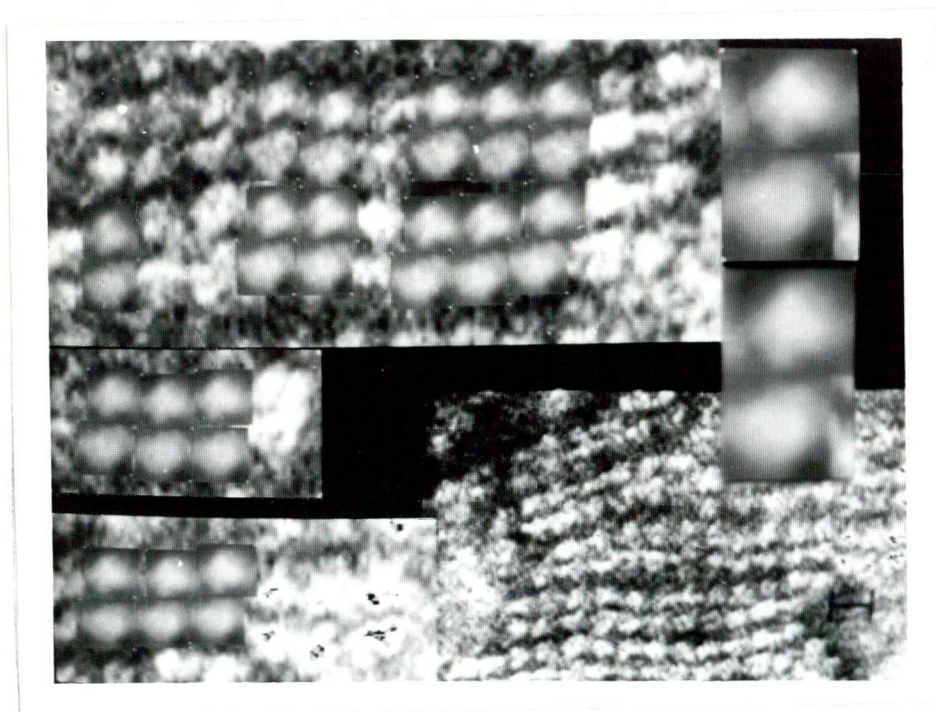


37. ábra A II/A. kép digitalizált, nagyított területének átlagolt dimérjei $k=12$. Nagyítás: 1665904 x. Jobb felső sarok: az eredményül kapott dimér kétszeres, lineáris interpolációs nagyítás után; alatta: az átlagolt, nagyított dimér h_1 konvolúciós függvényvel kétszer simított képe: Nagyítás: 3331808 x.

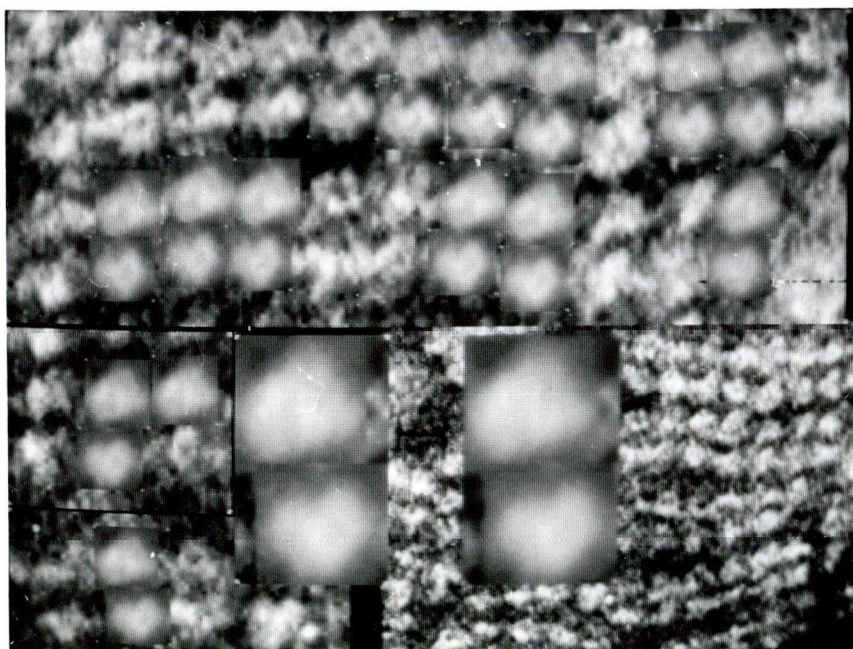


38. ábra A II/A. kép digitalizált, nagyított területének átlagolt dimérjei $k=8$, Nagyítás: 2082380 x. Jobb oldalon: az eredményül kapott dimér kétszeres, lineáris interpolációs nagyítás után; bal felső sarok: az átlagolt, nagyított dimér h_1 konvolúciós függvénynel kétszer simított képe: Nagyítás: 4164760 x.

A II/B. rész dimérjei is jóval nagyobbak, mint az irodalmi értékek. A 832952 x-szeres nagyítású pozitívon 18 db, az 1041190 x-szeresen 16 db dimért tudtunk kiátlagolni /39., 40. ábra/. Itt is előállt az a helyzet, amit már az I/2. képen is tapasztaltunk, miszerint a dimért alkotó monomereket csak külön-külön lehetett összeadogatni. Azokba az ablakokba ugyanis, melyekbe a dimérek belefértek, a szomszédos dimér egy része is bele került. Ezért a monomerek egymáshoz való viszonyáról nem mondhatunk semmit. A monomerekről azonban megállapítható, hogy alakjuk az I/2. ábrán látható teljes dimérékéhez hasonló.



39. ábra A.II/B. kép digitalizált, nagyított területének átlagolt dimérjei $k=18$. Nagyítás: 1665904 x. Jobb felső rész: az eredményül kapott dimér kétszeres, lineáris interpolációs nagyítás után; alatta: az átlagolt, nagyított dimér h_1 konvolúciós függvényvel kétszer simított képe. Nagyítás: 3331808 x.



40. ábra A II/B. kép digitalizált, nagyított területének átlagolt dimérjei $k=16$. Nagyítás: 2082380 x. Középen: az eredményül kapott dimér kétszeres, lineáris interpolációs nagyítás után; mellette: az átlagolt, nagyított dimér h_1 konvolúciós függvény-nyel kétszer simított képe. Nagyítás: 4164760 x.

II T Á B L Á Z A T

Kép	Nagyítás	a	b	c	d $\begin{bmatrix} 0 \\ A \end{bmatrix}$	az átlagolások száma /db/
I/1.	832952x	60		42		
			84		71	7
		66		45		
	1041190x	60		41		
			86		68	11
		62		45		
I/2.	832952x	58		43		
			84		64	7
		53		46		
	1041190x	55		45		
			90		59	5
		52		44		
I/3.	832952	60		41		
			85		63	5
		64		42		
		62		41		
			86		70	7
		61		47		
	1041190x	60		44		
			86		67	6
		65		48		
I/4.	832952x	54		49		
			91		65	10
		62		44		
	1041190x	62		46		
			95		68	8
		62		43		

Az I/1., I/3. és I/4. képek átlaga:

	a	b	c	d	
	$62 \pm 1,95$	$88 \pm 3,95$	$44 \pm 2,65$	$67 \pm 2,76$	54
S.E.:	0,52	1,49	0,71	1,04	

Kép	Nagyítás	a	b	c	d	$\begin{bmatrix} a \\ A \end{bmatrix}$	az átlagolások száma db
II/A.	832952x	81		42			
			98		76		12
		83		42			
	1041190x	83		43			
			104		69		8
		80		46			
II/B.	832952x	72		57			18
		72	—	57	—		
	1041190x	71		60			
		69	—	55	—		16

Az E_2 típusú intakt kris tályban:

62 88 46 72

A II. táblázatban a és c paramétereknél feltüntetett két érték a felső és az alsó monomerekre vonatkozik.

A II. táblázatból kiolvasható, hogy az I/1., I/3., és I/4., területeken fekvő dimérek méretei között elhanyagolható a különbség, ezért ezeket azonos irányból látszóknak tekintjük, s átlagukat képezhetjük. Ez az átlag 54 db dimér összeadásából adódott. Monomerjeik hossza, szélessége, s a két egymással antiparalell elhelyezkedő monomert dimérré összekötő híd hossza megegyezik az intakt kristályban mért értékkel. A diméren belüli keskeny nyúlványok távolsága /d/ viszont kb. 5 Å -el csökkent.

Az I/2. és II/B. kép dimérjei formájukat tekintve hasonlóak, inkább kereknek, mint hosszúkásnak mondhatók. Az I/2. területen lévő dimérek azonban csak hosszukban különböznek /lerövidülnek/ az I. kép többi részén fekvő dimérektől, míg a II/B. monomerjei minden irányban nagyobbak.

A II/A. területen lévő dimérek szélessége ugyanakkora, mint az I. képen láthatóké, de az összes többi mérete nagyobb.

MEGBESZÉLÉS

4.1. Az elektronmikroszkópos felvételek készítése

Az elektronmikroszkópban a kép az elektronok mintán való akadálytalan átjutásából, valamint kétféle szóródásból /elasztikus és inelasztikus/ keletkezik /Sjöstrand 1967 /. Elasztikus szóródás akkor jön létre, ha az elektronok atommaggal ütköznek. Ilyenkor útjukból oly mértékben kitérnek, hogy az oszlopfalra kerülve a végső képalkotásban már nem vesznek részt. Elasztikus szóródás hozza létre az amplitúdó, vagy intenzitás kontrasztot, melynek mértéke a blendenyílás szűkítésével növelhető /Misell 1978/. Azok az elektronok, melyek a minta elektronburkainak ütköznek, inelasztikus szóródást szenvednek, útjukból általában csak kisebb mértékben térülnek ki, inkább az akadálytalanul áthaladó elektronokhoz képest lefékeződnek, fáziskésébe kerülnek /Sjöstrand 1967/. Ez az ütközési típus okozza a fáziskontraszt keletkezését az elektronmikroszkópban. A fáziskésést a mikroszkóp defókuszálásával lehet fokozni, mely a fáziskontraszt intenzitását növeli /Misell 1975/.

Biológiai mintákon az alkotó elemek alacsony rendszáma miatt az amplitúdó kontraszt igen csekély. A kontraszt jelenségek fokozásának legegyszerűbb és a molekuláris elektronmikroszkópiában legelterjedtebb módja a minták negatív festése. A nagyobb rendszámú elemet tartalmazó festék /esetünkben uranilacetát / ilyenkor a vizsgálni kívánt molekulákat körülveszi, s így a keletkező elasztikus szóródás miatt a molekula környezete az elektronmikroszkópos képen sötét marad, míg a molekula maga világos /Misell 1978/. Az így készült felvételek vizuálisan is ér-

tékelhetőek.

A kapott eredmény valóságértékét azonban számos tényező jelentősen befolyásolja. Az egyik lényeges struktúra módosító tényező a minták elektronsugárkárosodása. A másik, a festék egyenetlen rétegvastagsága, a minta egyes területein előforduló pozitív festődés és a festék elektronsugárzás hatására bekövetkező zsugorodása, vándorlása /Unwin 1974./. Nem hagyhatjuk figyelmen kívül azt sem, hogy a struktúra képének rögzítésére használt fotolemez ezüst haloid szemcsés bevonatú, mely szemcsék nem szükségszerűen azonos méretűek és eloszlásuk sem egyenletes /Frank 1973/. Mindezek nehezen kontrollálható paramétereket jelentenek.

Negatív festéses eljárások alkalmasak mind izolált molekulák, mind rendezett kétdimenziós struktúrák vizsgálatára/Frank és mtsai 1986, Dratz és mtsai 1985, Unwin és Zampighi 1980, Corless és mtsai 1982, Zingsheim és mtsai 1980, Henderson és mtsai-1977, Taylor és mtsai 1986/. Általában azonban a molekulák konturja, rendezett struktúrák esetén a kristályrács jellegzetességein /szimmetria típus, rácsparaméterek/ túlmenően finomabb szerkezeti adatokat nem tudnak nyújtani /Aebi és mtsai 1976/.

4.2. A pozitív képek készítése

Vizsgálatainkat arra az elvre alapoztuk, hogy a negatívon megjelenő optikai denzitás mértéke lineárisan követi a minta elektrondenzitás változásait. Ez megfelelő vékonyságú minták vizsgálata során biztosítotttnak vehető /Misell 1978/. A felvételek kiértékeléséhez, mikrodenzitóméter hiányában, pozitív képek ké-

szítése szükséges. A nagyítógép lencsehibái és az előhívás körülményeinek nem megfelelő megválasztása újabb torzításokat idézhetnek elő. Ezért fokozott jelentőségű a nagyítás és előhívás standard körülményeinek biztosítása.

A felvételek kiértékelhetőségének biztosítására igen nagy elektronmikroszkópos /125000x/ és nagyítógépes /8x, ill. 10x/ nagyítást kellett választanunk.

4.3. A pozitív képek kiértékelése

Az enzim molekulák alakjának feltáráshoz a fent említett torzulások korrigálására, és az un. zajok kiszűrésére van szükség. Ha nincs számítógépes vizsgálatra lehetőség, akkor a felvételen a jel-zaj arány javításának egyik módja, a közvetlen fotó szuperpozíciós eljárás alkalmazása /Markham és mtsai 1963/.

A jel-zaj arány pontosabb és hatásosabb javítását érhetjük el a felvétel digitalizálását követő számítógépes átlagolással /Misell 1978, Frank 1984, Frank és mtsai 1981/.

A szuperponálásos, átlagolásos eljárás a jel-zaj arányt oly módon javítja, hogy a struktúra, esetünkben a dimérek közös szerkezeti sajátosságait erősíti fel. K db dimér összeadásával a jel denzitása K -szorosára, míg a zaj denzitása csak $\sqrt{K}$ -szorosára növekszik, így arányuk $K / \sqrt{K} = \sqrt{K}$ -szor nő /Misell 1978/.

4.3.1. A fotó szuperpozíciós nagyítással történő szerkezetvizsgálat

Transzlációs szuperponálásos eljárással 4, illetve 5 db dimért tudtunk kiátlagolni, ennek megfelelően 2, illetve $\sqrt{5}$ -szorosára javult a jel-zaj arány. Ezért a kapott dimérek alakja, mérete több információt nyújthat a molekulákról, mint az eredetiek.

A dimérek 180^0 -os szimmetriája miatt rotációs szuperponálás is alkalmazható. Két egymást követő dimér átlagát szimmetria centrumuk körüli egyszeri $/180^0$ -os/ elforgatással képezve, a jel-zaj arány $\sqrt{2}$ -szeresére javul. További forgatás esetén a zaj ugyanolyan mértékben erősödik, mint a jel, hiszen a dimérek önmagukkal adódnak össze. A rotáció többszöri ismétlése ezért nem javít a struktúra képén, sőt a forgatási centrum esetleg pontatlan kijelölésével ronthatja is azt. Az elérhető legjobb javítás így a $\sqrt{2}$, ami magyarázhatja az eljárás alacsony hatékonyságát, hisz igen közel van 1-hez.

A rotációs szuperponálás magasabb forgási szimmetriájú alakzatoknál $/60^0$, 30^0 / vezet jelentős struktúra felerősödéshez, hisz akkor többszöri elforgatásra $/6$ -, ill. 12 -szeres/ van mód /Markham és mtsai 1963/.

E módszerek lényege, hogy a periódushosszal eltolva, vagy a szimmetria centrum körül elforgatva a foto papírt, az egyik dimért a másikkra exponáljuk. Ehhez ki kell pontosan jelölni az eltolás irányát és a periódus hosszát, illetve a forgási középpontot és a középponton átmenő önmagára leképezendő egyenest, majd a műveletet nagy pontossággal kell végrehajtani. A hiba gyakori forrása az irány, periódus, stb. szubjektív meghatározása. Az eltolás, forgatás végrehajtásában általában nem lehet kiküszöbölni az emberi tényezőt. Ezért sokkal megbízhatóbb eredményt kapunk, ha mindezt számítógéppel végezzük el, ahol ezek a hibaforrások megszűnnek.

4.3.2. A számítógépes átlagolással történő szerkezetvizsgálat

A számítógépes szerkezetvizsgálathoz digitalizált formában

előállított képekre van szükség. A digitalizálás lényege, hogy a digitalizáló egység felbontásának megfelelő szakaszok folytonos optikai denzitás értékeinek egy adott intervallumon belüli számot feleltet meg, amely a matematikai műveleteket, átalakításokat lehetővé teszi. A folytonos jeleknek diszkrét értékekre történő leképzése az eredmény valóságáértékét csökkentheti. A struktúra részletei elvesznek, ha az azt leíró függvény változása gyorsabb, mint a mintavétel. Minél nagyobb a felbontás, s minél szélesebb a gradációs intervallum, annál jobb a megfeleltetés az analóg és digitalizált kép között /Pratt 1978/. Esetünkben minden felvételt 384 x 288 képpontra, 64 féle gradációs szintre lehetett konvertálni.

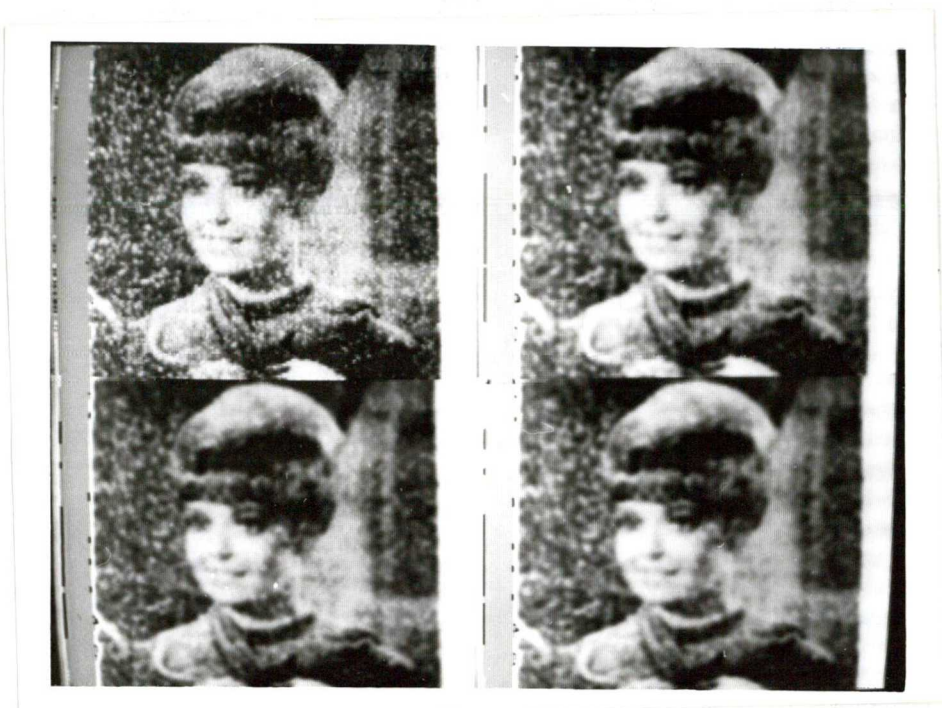
Az optikai denzitás értékek kamerán keresztül jutnak a digitalizáló egységbe. A kamera két részből áll: a detektorból, amely a fényerősségnek megfelelő elektromos impulzusokat állítja elő, s az ezeket a jeleket feldolgozó elektronikából. A készülék üzemelése közben a jelfeldolgozó elektronika előállít egy ún. termikus zajt, ami ráakódik a jelre. A másik zavaró tényező a detektorban létrejövő ún. becsapódási zaj. A detektor által előállított impulzusok ugyanis nem állandóak akkor sem, ha a beeső fény konstans optikai denzitású. Ez a jelenség a fény korpuszkula természetéből fakad, ugyanis mindig van egy bizonyos háttérsugárzás, amely részecskék becsapódnak a detektor fényérzékelő lemezére, s így random jellegű impulzusokat hoznak létre /Pratt 1978/.

A termikus és becsapódási zajok pontszerű zajokként jelennek meg a digitalizált képeken, kiszűrésükre igen sokféle módszert dolgoztak ki.

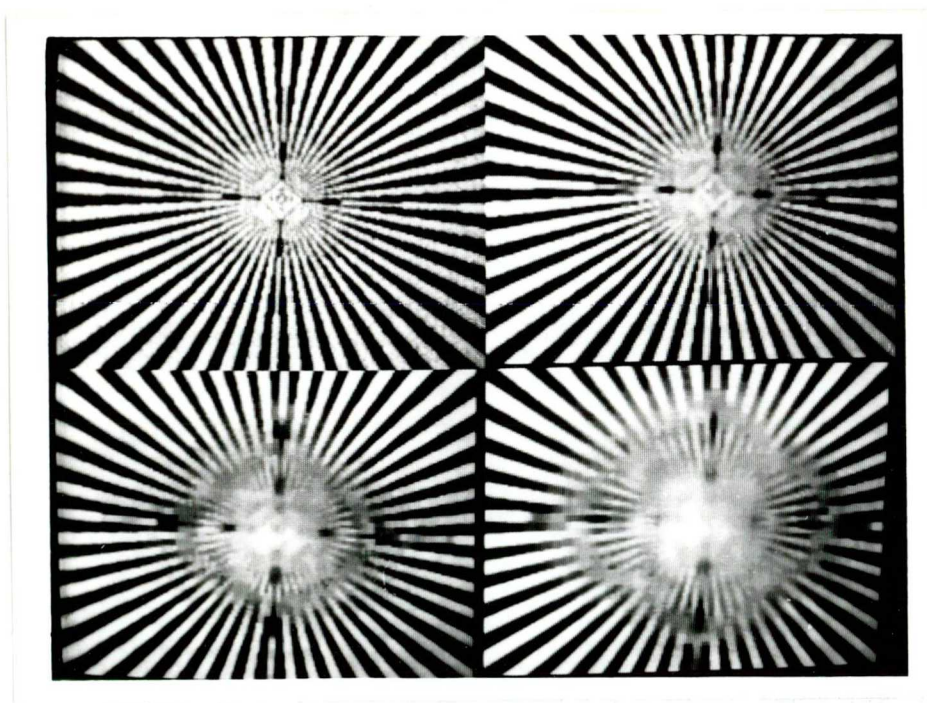
Mi a medián és konvolúciós szűrési eljárásokat alkalmaztuk. Ezek hatását mutatja a 41. és 42. ábra, ahol a bal felső /a/, az eredeti, zajos kép. A 41. ábrán a 3, 5 és 7 ablakos /b, c, d/ medián szűréssel, a 42. ábrán a h_1 , h_2 , h_3 , konvolúciós függvényekkel simított képek láthatók. Megállapítható, hogy a medián szűrés /főként az 5 és 7 ablakos/ a pontszerű zajokat belesimítja ugyan a képbe, de jelentős torzításokat, a kép elhomályosítását is okozza. A konvolúciós függvények, bár nagyobb torzítást nem hoznak létre, de a pontszerű zajok kiszűrése sem olyan erőteljes, mint a mediánszűrésé. A homályosodás mértéke függ a mintázat változásának sűrűségétől is, melyre jó példa a 43. és 44. ábrán látható, sugarasan haladó vonalas minta. A kép szélétől a középpont felé haladva a szűrő eljárások után egyre inkább egybeolvadnak a vonalak.



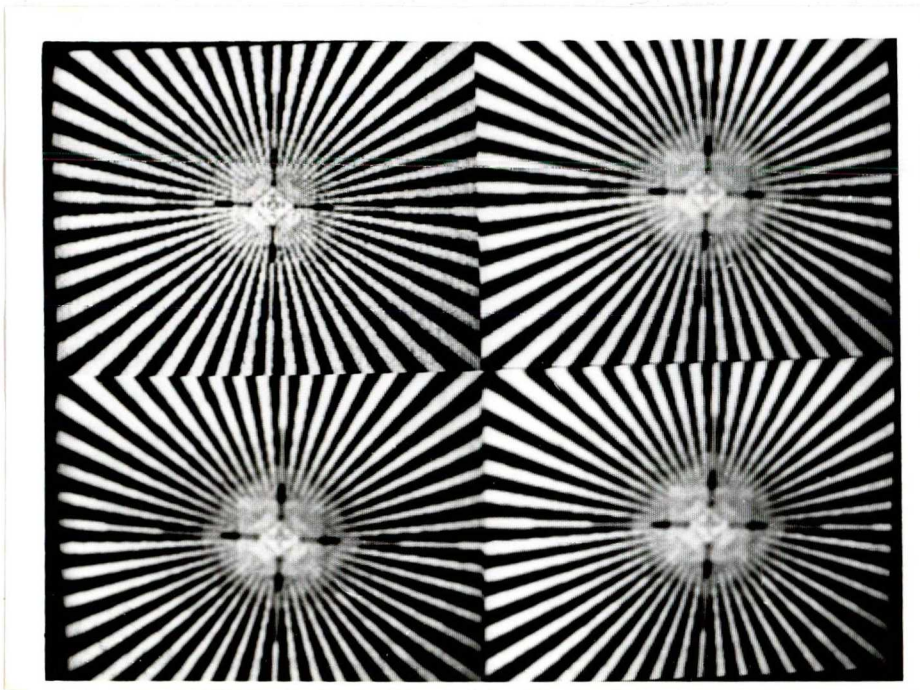
41. ábra Az egydimenziós medián szűrés hatása a pontszerű zajokra: a, a zajos kép b, a három ablakos medián szűrés után c, az öt ablakos medián szűrés után d, a hét ablakos medián szűrés után



42. ábra A konvolúciós szűrés hatása a pontszerű zajokra: a, a zajos kép b, h_1 függvényvel végzett konvolúciós szűrés után c, h_2 függvényvel végzett konvolúciós szűrés után d, h_3 függvényvel végzett konvolúciós szűrés után



43. ábra Példa a medián szűrés torzító hatására a, eredeti kép b, a három ablakos medián szűrés hatása c, az öt ablakos medián szűrés hatása d, a hét ablakos medián szűrés hatása

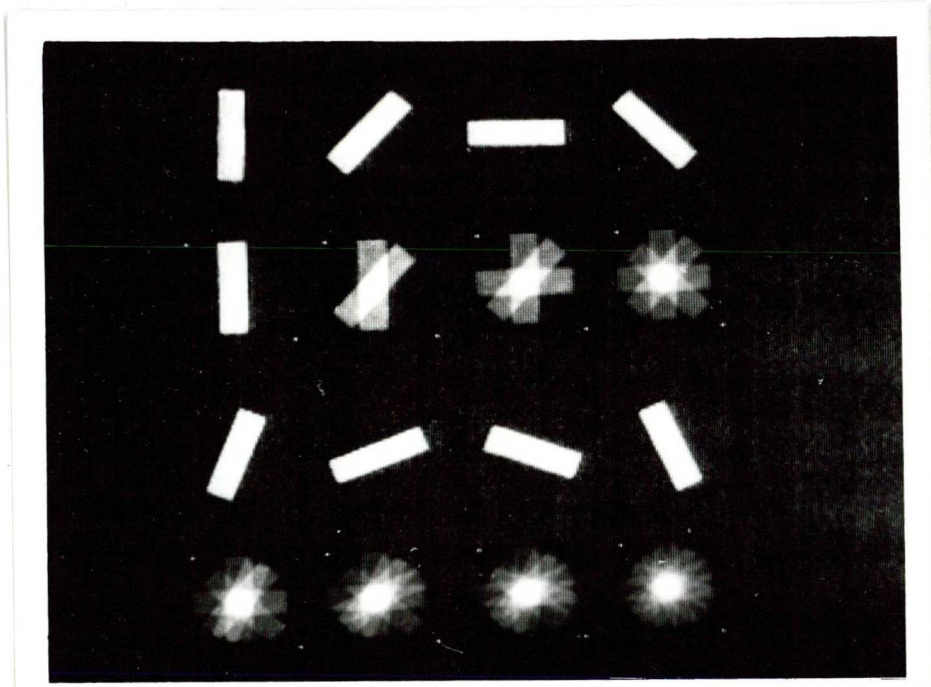


44. ábra Példa a konvolúciós szűrés torzító hatására: a, eredeti kép b, a h_1 függvénnnyel végzett konvolúciós szűrés hatása c, a h_2 függvénnnyel végzett konvolúciós szűrés hatása d, a h_3 függvénnnyel végzett konvolúciós szűrés hatása

Az átlagolás maga is betölt egy ilyen típusú szűrőfüggvény funkciót, tehát főként a mediánszűréssel előidézett esetleges szisztematikus torzítások miatt az átlagolás előtt nem célszerű ezeket a simításokat elvégezni.

Az átlagolási módszer lényege, hogy két vizsgálandó alakzatot ugyanakkora ablakba foglalunk, s az ablakok, mint mátrixok megfelelő értékeinek számtani közepét képezzük. Az ablakoknak a struktúrára történő pontos illesztése nagyon fontos, hiszen ha

egymáshoz képest eltolt, vagy elfordult helyzetben vannak az átlagolandó objektumok, akkor egészen hamis eredményhez jutunk /45. ábra/. A 45. ábrán megfigyelhető, hogy ha téglalap alakú tárgyak átlagát képezzük, s azok 45° -os szöggel elforgultak egymáshoz képest, akkor csillag, 22.5° -os szögelfordulás esetén kör alakú átlagképet kapunk.



45. ábra Példa az átlagolás torzító hatására, nem pontos illesztés esetén egymáshoz képest 45° -os szöggel elfordult hosszúkás alakzatok átlagképe csillag alakú, 22.5° -os szöggel elfordultaké kör alakú lesz

Az ilyen típusú hibák elkerülésére szokás kereszt-korreláció számításokat végezni a két átlagolandó alakzat között. Ennek lényege, hogy ha a két tárgyat f és g függvények írják le, akkor az fg szorzat integrálja /diszkrét esetben pontonkénti szorzatuk összege/ ott maximális, ahol a két alakzat leginkább fedésben van egymással. A feladat tehát az $\int fg$ maximumát megkeresni a vizsgálandó tárgyak egymáshoz viszonyított különböző pozícióiban /Frank 1984, Frank és mtsai 1981/. Ezzel ekvivalens vizsgálati módszer az általunk alkalmazott eltérésnégyzetösszeg számítás. Igaz ugyanis, hogy a kereszt-korreláció függvény ott maximális, ahol az eltérésnégyzetösszeg minimális. Az eltérésnégyzetösszeget $\int (f-g)^2$ alakban írva, a következő összefüggés teljesül: $\int (f-g)^2 = \int f^2 + \int g^2 - 2 \int fg$, ami igazolja az állításunkat.

Az így módon kiválasztott pozíciókban lévő dimérek átlagait képezve jutottunk el a közös szerkezeti sajátságokat már jól tükröző alakzathoz. A még megmaradó pontszerű zajokat a h_1 konvolúciós függvény kétszeri alkalmazásával simítottuk le. Így kaptuk meg a Ca^{2+} -ATPáz izolált dimérek jól kiértékelhető alakját.

4.4. A Ca^{2+} -ATPáz izolált dimérek szerkezeti tulajdonságai

A fotoszuperpozíciós eljárással az I. képen a monomerek hosszirányú rövidülését $5 \overset{\circ}{\text{Å}}$ /, s a monomereket dimérekre összekötő hidak hosszának mintegy $8 \overset{\circ}{\text{Å}}$ növekedését tapasztaltuk. Az antiparalell elhelyezkedő rövid nyúlványok távolsága $2-3 \overset{\circ}{\text{Å}}$ -el csökkent. A monomerek szélességében mutatkozó $1-2 \overset{\circ}{\text{Å}}$ rövidülés nem számottevő. Ezeket az adatokat összehasonlítva a számítógépes átlagolással kapottakkal, eltéréseket tapasztalunk, amely a fotoszuperpozíciós eljárás szubjektív elemeiből adódhat.

A számítógépes vizsgálat nagyobb megbízhatósága miatt az izolált dimérek szerkezetéről a számítógéppel nyert adatok alapján alakítottuk ki képünket.

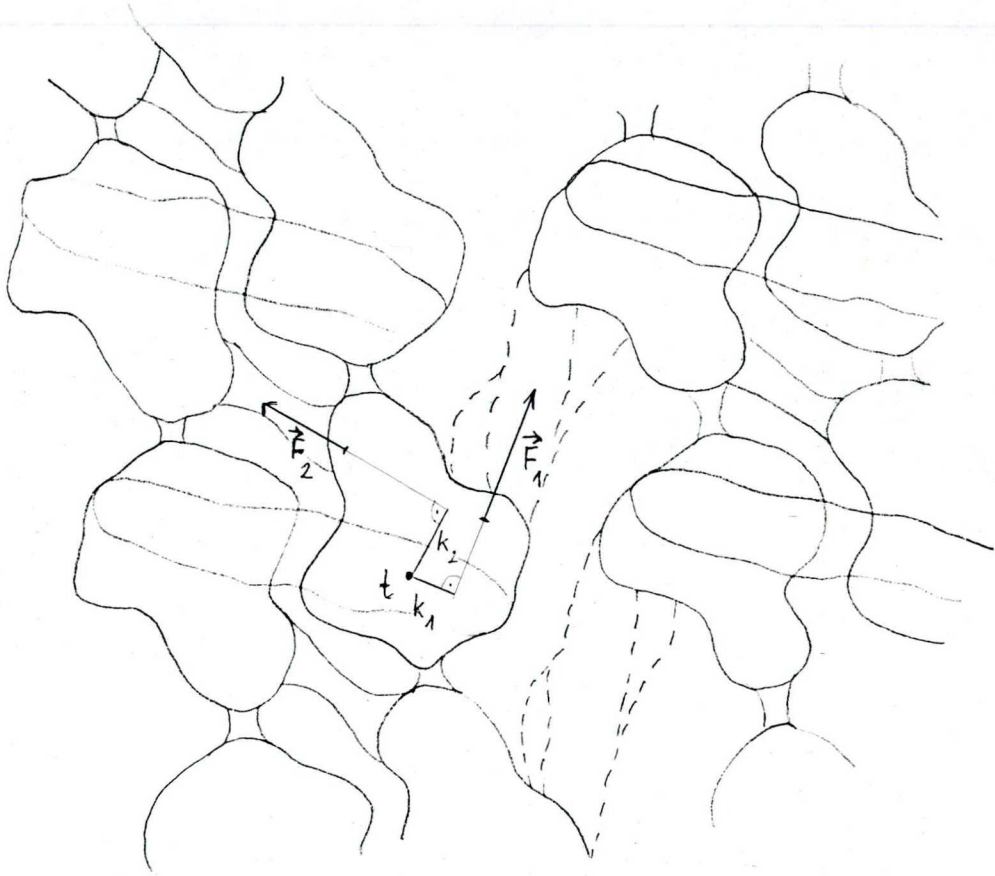
Az I. képen az 1., 3. és 4. irányban fekvő dimérek adatait összehasonlítva az intakt enzimkristályokéval azt kaptuk, hogy a monomerek hossza $62 \text{ \AA}$, szélessége $46 \text{ \AA}$, s az azokat dimérek-ké összekötő híd hossza $88 \text{ \AA}$, nem változik a kristály rupturálódásával. Viszont a diméren belüli antiparalell elhelyezkedő rövid nyúlványok egymástól való távolsága mintegy $5 \text{ \AA}$ -el csökken /intakt kristályban $72 \text{ \AA}$, izolált dimérekben $67 \text{ \AA}$ /.

Tekintsük az enzimmonomert merev testnek, mely a membrán felletti részének tömegközéppontjába, a membrán síkjára merőlegesen állított tengely körül elfordulhat. Ekkor ez a változás úgy képzelhető el, hogy a membrán láncok oldal irányú kapcsolatának csökkenésével, esetleg megszűnésével, a testre ható erőpár egyik tagja csökken, illetve megszűnik, ami olyan irányú forgást idéz elő, hogy a tengelyre ható forgatónyomatékok összege zérus maradjon /46. ábra/.

Ez a mechanizmus összeegyeztethető azzal az elképzeléssel, hogy az enzim az aktivitási ciklusa során a membrán síkjára merőleges tengely körül rotációt végez /Hidalgo és mtsai 1978/.

Az I. képen a 2. irányban fekvő diméreknél hosszirányú rövidülést $55 \text{ \AA}$ tapasztaltunk, mely arra enged következtetni, hogy a molekulák az előző három iránytól eltérően, kis elfordulással lapultak a gridre.

A II. képen mindkét módszerrel tapasztalható nagy méretek a molekulák elfordulásaival nem magyarázhatóak.



46. ábra A Ca^{2+} -ATPáz izolált dimérek tengely körüli elfordulása
t: a monomer tömeg középpontjába, a membrán síkjára merőlegesen
állított tengely. $F_1 k_1 = F_2 k_2$, az $\vec{F}_1$ erő csökkenése $\vec{F}_2$ irányú
forgatást idéz elő.

Ha ugyanis feltesszük, hogy az előbbiekhöz hasonlóan a membrán felszínre merőleges irányból látjuk a molekulákat, akkor az A esetben 20 Å , a B esetben 10 Å növekedést kapunk, ami nem következhet be. Más irányokból sem látható 80 Å , sőt 100 Å hosszúnak az enzimmonomer. Feltételezhető tehát, hogy az elektronmikroszkópos leképezés során történtek ilyen torzulások.

A szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATPáz izolált dimérek háromdimenziós rekonstrukciójával további információt kaphatunk az enzim szerkezetéről. Az elektronmikroszkópos felvételek lehetőséget nyújtanak erre, hiszen a felvételek valójában a molekula síkbeli vetületének foghatók fel, ahol az egyes részletek denzitása lineáris a minta harmadik dimenzióbeli kiterjedésével /Unwin és Henderson 1975/.

A háromdimenziós rekonstrukcióhoz a molekula különböző irányú vetületeinek a képe szükséges, melyet úgy kaphatunk, hogy a mintát goniométerrel ellátott elektronmikroszkópban az elektronsugár irányához képest különböző szögekben elforgatva újabb és újabb felvételeket készítünk /Crowther és Tsai 1970/. A szükséges szögelforgatások száma N , d felbontás esetén: $d = \pi D/N$, ahol a D a vizsgált partikula átmérője /Misell 1978/. A minta összes lehetséges nézetének rögzítéséhez $\pm 90^\circ$ -al való elforgatásra lenne szükség. Ez a gyakorlatban $\pm 60^\circ$ határig végezhető el. A hiányzó elforgatási kúp a minta térbeli rekonstrukciójának pontatlanságát okozza. Az el nem forgatott mintát tekintve, az elektronsugárral párhuzamos síkokban a felbontás kisebb /Misell 1978/. Ha a vizsgálni kívánt struktúra jól felismerhető belső szimmetriával rendelkezik, a maximális elforgatási szög lecsökkenthető.

Ez az eljárás általában szabályos geometriai alakzatok, pl. egyes vírusok illetve helikális struktúrák analízisében alkalmazható /DeRosier és Klug 1968/.

A kétdimenziós vanadát indukált Ca^{2+} -ATPáz kristályszerkezet leggyakrabban 60-70 nm átmérőjű membrán tubulusok felszínén alakul ki. A dimér láncok helikálisan tekerednek fel a membrán hengerre, kb. 45° -os menetemelkedéssel /Dux és Martonosi 1983 a/. Általában a vizsgálni kívánt struktúrák ily módon való ismétlődése lehetőséget nyújt pontos szerkezetük háromdimenziós rekonstrukciójára /Unwin és Henderson 1975/. Ennek alapján az intakt kristály diméreinak szerkezete $25 \text{ \AA}$ felbontási szintig vált ismertté /Taylor és mtsai 1986/. A dimér láncok szoros egymásmellettiisége és a görbült felszín azonban torzításokat okozhat a molekulák szerkezetében. Hipozmotikus közegben a görbült felszínből kiszabadult dimér láncokon végzett vizsgálataink arra utalnak, hogy az izolált dimérek szerkezete kissé eltér az intakt kristályban lévőkéitől. Ezért igen fontos az izolált partikulák struktúrájának még alaposabb megismerése. További célunk a szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATPáz izolált dimérjeinek háromdimenziós rekonstrukciója.

Az elektronmikroszkópos vizsgálati módszerekkel kapott molekulaszerkezeti eredmények megbízhatóságát számos tényező befolyásolja. Ezért ezek a szerkezetvizsgálati módszerek önmagukban nem elegendők az enzim struktúrájának teljes megismeréséhez. Az így nyert adatokat más módszerekkel /spektroszkópiai mérések, molekuláris genetikai vizsgálatok, limitált proteolízis stb./ is alá

kell támasztani ahhoz, hogy valósághű, pontos képet alkothassunk egy enzim, esetünkben a szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATPáz enzim szerkezetéről.

ÖSSZEFOGLALÁS

A vizsgálatok célja a hipozmotikus közegben szétesett szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATPáz izolált dimér láncok szerkezetének elektronmikroszkópos felvételek alapján történő, minél pontosabb jellemzése volt.

Az elektronmikroszkópos felvételeken a keresett struktúra finom részleteit számos háttérzaj elfedi /hordozó film, sugárkárosítás, egyenetlen festődés, stb./. A szerkezet pontos feltárásához a jel és a zaj arányának javítása szükséges. Ezt kétféle módon valósítottuk meg:

1. az elektronmikroszkópos negatív szuperpozíciós nagyítása
2. a digitalizált kép számítógépes átlagolása.

Mindkét esetben az elektronmikroszkópos felvételekről készült pozitív képeken végeztük el vizsgálatainkat. A további torzítások elkerülésére gondosan beállítottuk az előhívás optimális körülményeit.

E módszerek a jel-zaj arányt oly módon javítják, hogy a struktúra közös szerkezeti sajátosságait erősítik fel. K db dimér összeadásával a jel denzitása k -szorosára, míg a zaj denzitása $\sqrt{k}$ -szorosára növekszik, így arányuk $k / \sqrt{k} = \sqrt{k}$ -szor nő. Az 1. eljárással ezt úgy valósítottuk meg, hogy a dimérek láncmenti szabályos ismétlődése miatt, a dimér láncok hossziránya mentén a periódushosszal eltolva a fotopapírt, ismételt expozíciót végeztünk /transzlációs szuperpozíció, $k=4,5$ /. A dimérek 180° -os szimetriáját kihasználva, rotációs szuperponálásokat is végeztünk / $k=2$ /, azonban ennek hatékonysága nem volt számottevő.

A 2. eljáráshoz az elektronmikroszkópos képek digitalizálása szükséges. Videokamera segítségével egy AD-DA konverteren keresztül kerültek a felvételek az M08X számítógépbe. A digitalizált képek 288 x 384 pontból állnak és 64 gradációs szint különböztethető meg. A digitalizálás során újabb pontszerű zajok keletkeztek a képeken, melyek intenzitása a dimérek átlagolásával sokat csökkent, de a teljes kiszűrésükre megvizsgáltuk a konvolúciós és medián szűrések hatását is.

Az átlagolás előtt kétszeres interpolációs nagyítást végeztünk a vizsgálandó dimérek területén, mely a későbbi illesztéseket tette pontosabbá. Az átlagolást a nagyított területen hajtottuk végre ablakolási /window/ technikával. Az ablakok legjobb illesztését a két ablak értékeiből képzett különbségek négyzetösszegének minimalizálásával értük el. Az átlagolások eredményeként kapott diméren újra elvégeztük a kétszeres interpolációs nagyítást, majd az $\begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \end{pmatrix}$ típusú konvolúciós függvény kétszeri alkalmazásával szűrtük ki az esetleg megmaradó pontszerű zajokat.

Megállapítottuk, hogy a számítógépes átlagolással kapott struktúra sokkal inkább megfelel a valóságnak, mint a fotó szuperpozíciós nagyítással nyert, hiszen a számítógépes eljárás kiküszöböli a szubjektív tényezőkből /pl. a vizsgálatot végző személy pontossága/ adódó hibákat.

A számítógépes vizsgálatok eredményeként azt kaptuk, hogy a monomerek alakja és mérete a rupturálódás után is változatlan marad, a diméret alkotó monomerek antiparalell elhelyezkedő nyulványai azonban néhány /4-5/ Å-el közelebb helyezkednek el egymáshoz. Ez magyarázható azzal, hogy a görbült felszínből kiszabadulva a dimérek elvesztenek néhány torzító hatást: merev



testnek tekintve a monomereket, a dimér láncok között ható erők csökkenésével a monomerek, tömegközéppontjukba a membrán síkjára merőlegesen állított tengely körül elfordulhatnak, hogy a rájuk ható forgatónyomatékok összege 0 maradjon. Ez az elképzelés összeegyeztethető Hidalgo és mtsai azon feltevésével, hogy az enzim aktivitási ciklusa során a membrán síkjára merőleges tengely körül rotációt végez.

A Ca^{2+} -ATPáz izolált dimérek szerkezetéről további információt a háromdimenziós rekonstrukciójával kaphatunk, melyre az elektronmikroszkópos felvételek lehetőséget nyújtanak, hiszen a felvételek a molekula síkbeli vetületének foghatók fel. További célunk a szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATPáz izolált dimérjeinek háromdimenziós rekonstrukciója.

E szerkezetvizsgálati módszerek megbízhatóságát számos tényező befolyásolja, ezért ezek önmagukban nem elegendőek az enzim strukturájának teljes megismeréséhez. Az így nyert adatokat más módszerekkel is alá kell támasztani ahhoz, hogy valóságos, pontos képet alkothassunk a szarkoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATPáz enzim szerkezetéről.

IRODALOMJEGYZÉK

- Aebi, U.R., Bijlenga, K.L., TenHeggler, B., Kistler, J., Steven, A.C. Smith, P.R. (1976) A comparison of the structural and chemical composition of giant T-even phage heads J. Supramol. Struct. 5. 475-495.
- Blasie, J.K., Herbette, L.G., Pacsolini, D., Skita, D., Pierce, D., Scarpa, D.H. (1985) A time resolved x-ray diffraction study of the SR membrane during active transport Biophys. J. 48. 9-18.
- Brandl, Ch. J., Green, N. M., Korczak, B., MacLennan, D. H. (1986), Two Ca^{++} ATPase genes: homologies and mechanistic implications of deduced amino acid sequences Cell 44. 597-607.
- Corless, J. M., McCaslin, D. R., Scott, B. L. (1982), Two-dimensional rhodopsin crystals from disk membranes of frog retinal rod outer segment Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79. 116-1120.
- Crowther, R. A., DeRosier, D. J., Klug, A. (1970), The reconstruction of a three-dimensional structure from projections and its applications to electron microscopy Proc. Roy. Soc. Lond. A 317. 319-340.
- DeMeis, L., Vianna, A. L. (1979), Energy interconversion by the Ca^{++} dependent ATPase of the sarcoplasmic reiculum Annu. Rev. Biochem. 48. 275-292.
- DeRosier, D. J., Klug, A. (1968), Reconstruction of three-dimensional structures from electron micrographs Nature 217. 130-134
- Dratz, E. A., Van Bremen, J.F.L., Kamps, K.M.P., Keegstra, W., Van Bruggen, E. F. J. (1985) Two-dimensional cystallization of bovine rhodopsin Biochim. Biophys. Acta 832. 337-342.

- Dux,L.,Martonosi,A.N. (1983a), Two-dimensional arrays of proteins in sarcoplasmic reticulum and purified Ca^{++} ATPase vesicles treated with vanadate J.Biol.Chem. 258. 2599-2603.
- Dux,L., Martonosi,A. N. (1983b), Ca^{++} ATPase membrane crystals in sarcoplasmic reticulum,the effect of trypsin digestion J. Biol.Chem. 258. 10111-10115.
- Dux,L., Martonosi,A. N. (1983c), The regulation of ATPase-ATPase interactions in sarcoplasmic reticulum membrane I. The effect of Ca^{++} ,ATP and inorganic phosphate J.Biol.Chem. 258. 11896-11902.
- Dux,L., Martonosi,A.N. (1983d), The regulation of ATPase-ATPase interactions in sarcoplasmic reticulum membrane II. The influence of membrane potential J.Biol.Chem. 258. 11903-11907.
- Dux,L., Taylor,K.A., Ting-Beall,H.P., Martonosi,A.N. (1985a), Crystallization of the Ca^{++} ATPase of sarcoplasmic reticulum by calcium and lanthanide ions J.Biol.Chem. 260. 11730-11743.
- Frank, J., Verschoor,A.,Boublik,M. (1981), Computer averaging of electron micrographs of 40S ribosomal subunits Science 214. 1353-1355.
- Frank, J. (1984), Recent advanced of image processing in the structural analysis of biological macromolecules, Eight European Congress on Electron Microscopy, 1307-1316.
- Frank,J. (1973), Computer processing of electron micrographs In: Advanced techniques in biological electron microscopy,Koehler, J.K. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Frank, J., Radermacher,M.,Wagenknecht,T.,Verschoor,A. (1986), A new method for three-dimensional reconstruction of single macromolecules using low dose electron micrographs Ann.NY. Acad.Sci. 483. 77-87.

- Green, N.M., Brandl, Ch., Taylor, W.R., Korczak, B., MacLennan, D.H. (1986) Structural and mechanistic implications of the amino acid sequence of calcium transporting ATPases in Calcium and the Cell CIBA Found.Symp. 122. 93-119.
- Hasselbach, W., Medda, P., Migala, A., Agostini, B. (1983), A conformational transition of the SR Ca^{++} ATPase induced by vanadate Z.Naturforsch. 38C 1015-1022.
- Henderson, R., Capaldi, R. A., Leigh, J.. (1977), Arrangement of Cytochrome oxidase molecules in two-dimensional vesicle crystals J.Mol.Biol. 112. 631-648.
- Henderson, W. D. (1980), Crystallizing membrane proteins Nature 287. 489.
- Hidalgo, C., Thomas, D.D., Ikemoto, N. (1978), Effect of the lipid environment on the protein motion and enzymatic activity of the sarcoplasmic reticulum Ca^{++} ATPase J.Biol.Chem. 253. 6879-6886.
- Highsmith, R., Scales D. (1984), Electron microscopic evidence for the transmembrane displacement of Ca^{++} ATPase Z. Naturforsch. 39C 177-179.
- MacLennan, D. H., Brandl, C. J., Korczak, B., Green, N. M. (1985), The amino acid sequence of a Ca^{++} + Mg^{++} dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence Nature 316. 696-700.
- Markham, R., Frey, S., Hills, G. J. (1963), Methods for the enhancement of image detail and accentuation of structure in electron microscopy Virology 20. 88-97.

- Misell, D. L. (1975), The resolution and contrast in biological sections determined by elastic and inelastic scattering in: Physical aspects of Electron Microscopy eds B.M.Siegel,D.R. Beaman John Wiley & Sons New York 63-79.
- Misell, D. L. (1978), Image analysis,enhancement and interpretation in Practical Methods in Electron Microscopy Vol 7. ed Glauert,A.M. North Holland Publ Comp. Amsterdam,New York, Oxford
- Nakamura,H.,Jilka,R. L.,Roland,R.,Martonosi,A. (1976), Mechanism of ATP hydrolysis by sarcoplasmic reticulum and the role of phospholipids, J. Biol. Chem. 251. 5414-5423.
- Peracchia, C.,Dux,L.,Martonosi,A. N. (1984), Crystallization of intramembrane particles in rabbit sarcoplasmic reticulum vesicles by vanadate J.Muscle Res.Cell Motility 5. 205-220.
- Pratt, W. K. (1978), Digital image processing, A Wiley-Interscience Publication, John Wiley and sons, New York,Chichester, Brisbane, Toronto
- Sjöstrand,F. S. (1967), Electron microscopy of cells and tissues Vol I. Acad.Press New York,London
- Tanford,C.,Reynolds,J.A.,Johnson,E.A. (1987), Sarcoplasmic reticulum calcium pump: a model for Ca^{++} binding and Ca^{++} -coupled phosphorylation Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84. 7094-7098.
- Taylor,K. A.,Dux,L. Martonosi,A.N. (1984), Structure of the vanadate induced crystals of sarcoplasmic reticulum Ca^{++} ATPase J.Mol.Biol. 174. 193-204.
- Taylor,K. A.,Dux. L.,Martonosi,A. N. (1986a), Three dimensional reconstruction of negatively stained crystals of the Ca^{++} ATPase from muscle sarcoplasmic reticulum J.Mol.Biol. 187. 417-427.

Taylor, K. A., Ho, M. H., Martonosi, A. N. (1986b), Image analysis of the Ca^{++} ATPase from sarcoplasmic reticulum Ann.NY Acad.Sci. 483. 31-43.

Tukey, J.W. (1971), Exploratory data analysis, Addison-Wesley, Reading, Mass.

Unwin, P. N. T. (1974), Electron microscopy of the stacked disc aggregate of tobacco mosaic virus protein II. The influence of electron irradiation on the stain distribution, J.Mol.Biol. 87 657-670.

Unwin, P. N. T., Henderson, R. (1975), Molecular structure determination by electron microscopy of unstained crystalline specimen J.Mol.Biol. 94. 425-440.

Unwin, P. N.T., Zampighi G. (1980), Structure of the junction between communicating cells Nature 283. 545-549.

Wallace, B (1987), Membrane protein folding motifs and predictions Ion Pump Workshop Moshav-Shresh Izrael

Zingsheim, H.P., Neugebauer, D.Ch, Barrantes, F.J., Frank, J. (1980), Structural details of membrane bound acetylcholine receptor from *Torpedo marmorata* Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77. 952-956.

Köszönetet mondok Dr. Guba Ferenc professzor úrnak, amiért disszertációm elkészítését lehetővé tette és tanácsaival segítette.

Köszönetet mondok Dr. Dux László kandidátusnak, amiért munkámat irányította, tanácsaival és kritikájával segítette, s vizsgálataimhoz az elektronmikroszkópos felvételeit rendelkezésemre bocsájtotta.

Köszönetet mondok Dr. Kuba Attila tudományos főmunkatársnak, amiért munkámat együttműködésével és szakmai tanácsaival segítette.

Köszönetet mondok Balásházy Istvánnénak, a fotó technikai eljárásokban nyújtott hasznos tanácsaiért és technikai segítségéért.

M E L L É K L E T

```
program    nagyito(input,output);
type vektor=array[1..2] of integer;
var xr,yr,xn,yn:vektor;
    xv,yv,xu,yu,o,s,j:integer;
    a,b,c,p:byte;
external procedure init;
external procedure koord(xt,yt:integer);
external procedure pontoz;
external procedure raktaroz(var    z:byte);
external procedure beolvas(z:byte);
external procedure ellenoriz(l:integer;
                           var by:byte;
                           var x,y:vektor);

procedure sor;
var i:integer;
begin
    koord(xv,yv);
    raktaroz(a);
    koord(xv+1,yv);
    raktaroz(c);
    b:=(a+c) div 2;
    koord(xu,yu);
    beolvas(a);
    koord(xu+1,yu);
    beolvas(b);
    koord(xu+2,yu);
    beolvas(c);
    a:=c;
    xv:=xv+2;
    xu:=xu+3;
    for i:=3 to o+1 do
        begin
            koord(xv,yv);
            raktaroz(c);
            b:=(a+c) div 2;
            koord(xu,yu);
            beolvas(b);
            koord(xu+1,yu);
            beolvas(c);
            a:=c;
            xv:=xv+1;
            xu:=xu+2;
        end;
    end;
procedure oszlop;
var i:integer;
begin
    koord(xu,yu);
    raktaroz(a);
    koord(xu,yu+2);
    raktaroz(c);
    b:=(a+c) div 2;
    koord(xu,yu+1);
    beolvas(b);
    a:=c;
    yu:=yu+4;
    for i:=2 to s    do
        begin
            koord(xu,yu);
            raktaroz(c);
```



```
        b:=(a+c) div 2;
        koord(xu,yu-1);
        beolvas(b);
        a:=c;
        yu:=yu+2;
    end;
end;
procedure terület(var x,y:vektor);
var v:integer;
    e:byte;
begin
    writeln('A bal felső sarok koordinatai, x[1]=');
    readln(x[1]);
    writeln('y[1]=');
    readln(y[1]);
    koord(x[1],y[1]);
    raktároz(e);
    pontoz;
    ellenoriz(1,e,x,y);
    writeln('A jobb felső sarok koordinatai, x[2]=');
    readln(x[2]);
    y[2]:=y[1];
    writeln('y[2]=',y[2]);
    koord(x[2],y[2]);
    raktároz(e);
    pontoz;
    ellenoriz(2,e,x,y);
    v:=x[2];
    writeln('A bal alsó sarok koordinatai, x[3]=',x[1]);
    x[2]:=x[1];
    writeln('y[3]=');
    readln(y[2]);
    koord(x[2],y[2]);
    raktároz(e);
    pontoz;
    ellenoriz(2,e,x,y);
    x[2]:=v;
    writeln('A jobb alsó sarok koordinatai:');
    writeln(x[2],y[2]:4);
    koord(x[2],y[2]);
    pontoz;
end;
begin
    init;
    writeln('A nagyitando terület:');
    writeln('Ha valamelyik koordinata adott, akkor az ellenorzesnel is azt
kell beírni!');
    terület(xr,yr);
    o:=xr[2]-xr[1];
    s:=yr[2]-yr[1];
    writeln('A nagyított terület:');
    writeln('A bal felső sarok koordinatai, x[1]=');
    readln(xn[1]);
    writeln('y[1]=');
    readln(yn[1]);
    koord(xn[1],yn[1]);
    raktároz(p);
    pontoz;
    ellenoriz(1,p,xn,yn);
    xn[2]:=xn[1]+2*o;
```



```
writeln(xn[2],yn[1]:4);
koord(xn[2],yn[1]);
pontoz;
yn[2]:=yn[1]+2*s;
writeln(xn[1],yn[2]:4);
koord(xn[1],yn[2]);
pontoz;
writeln(xn[2],yn[2]:4);
koord(xn[2],yn[2]);
pontoz;
xv:=xr[1];
xu:=xn[1];
for j:=0 to s do
  begin
    yv:=yr[1]+j;
    yu:=yn[1]+2*j;
    sor;
    xv:=xr[1];
    xu:=xn[1];
  end;
yu:=yn[1];
for j:=0 to 2*o do
  begin
    xu:=xn[1]+j;
    oszlop;
    yu:=yn[1];
  end;
end.
```

```
program      konvol(input,output);
type tomb=array  [1..3,1..3] of byte;
   vektor=array [1..2] of integer;
var h:tomb;
   xt,yt,xs,ys:vektor;
   s,o,i,j,a,xr,yr,xu,yu,ossz,mt:integer;
   ht,e,c:byte;
   tc:char;
external procedure init;
external procedure koord(xt,yt:integer);
external procedure beolvas(z:byte);
external procedure raktaroz(var      z:byte);
external procedure terület(var x,y:vektor);
external procedure ellenoriz(l:integer;
                           var by:byte;
                           var x,y:vektor);
external procedure pontoz;
procedure eljaras(var ossz:integer);
var k,l,x,y:integer;
begin
  for k:=0 to 2  do
    begin
      for l:=0 to 2 do
        begin
          x:=xr+k-1;
          y:=yr+l-1;
          koord(x,y);
          raktaroz(e);
          ossz:=ossz+e*h[k+1,l+1];
        end;
      end;
    end;
end;
begin
  init;
  repeat
    terület(xt,yt);
    s:=yt[2]-yt[1]+1;
    o:=xt[2]-xt[1]+1;
    writeln('Hol legyen a szurt kep bal felső sarka? xs=');
    readln(xs[1]);
    writeln('ys=');
    readln(ys[1]);
    koord(xs[1],ys[1]);
    raktaroz(e);
    pontoz;
    ellenoriz(l,e,xs,ys);
    c:=0;
    writeln('Mik legyenek a szuro fuggvény elemei?:');
    for i:=1 to 3 do
      begin
        for j:=1 to 3 do
          begin
            writeln('h[' ,i ,',' ,j ,']=');
            readln(a);
            h[i,j]:=a;
            c:=c+h[i,j];
          end;
        end;
      end;
    yr:=yt[1];
    xr:=xt[1];
```

```
yu:=ys[1];
xu:=xs[1];
ossz:=0;
for i:=1 to s do
begin
xr:=xt[1];
xu:=xs[1];
for j:=1 to o do
begin
eljaras(ossz);
ht:=ossz div c;
mt:=ossz mod c;
if mt>(c div 2) then ht:=ht+1;
koord(xu,yu);
beolvas(ht);
xu:=xu+1;
xr:=xr+1;
ossz:=0;
end;
yu:=yu+1;
yr:=yr+1;
end;
writeln('Akarsz uj szurest? (I/N)');
readln(tc);
until (tc<>'i');
end.
```

```
program      meres(input,output);
type vektor=array[1..2] of integer;
      bvektor=array[1..2] of byte;
var j:integer;
      d:real;
      t:char;
      x,y:vektor;
      z:bvektor;
external procedure cdpnek(byt:byte);
external procedure cdpnbl(honnan,hanyat:integer);
external procedure cdptol(var byt:byte);
external procedure lut(egybyt:byte);
external procedure koord(xt,yt:integer);
procedure init;
var i:byte;
begin
  cdpnek(128);
  lutinit;
end;
procedure lutinit;
var i:integer;
begin
  lut(127);
  lut(128);
  for i:=1 to 63 do
  begin
    lut(i);
    lut(i+192);
  end;
end;
procedure raktaroz(l:integer;
                  var z:bvektor);
begin
  cdpnek(64);
  cdptol(z[1]);
end;
procedure pontoz;
var gr,cm:integer;
begin
  cdpnek(80);
  writeln('Milyen szinu legyen a pont? (0-63)');
  readln(gr);
  cm:=addr(gr);
  cdpnbl(cm,1);
end;
procedure javitas(l:integer;
                  v1,v2:vektor;
                  z:bvektor);
var cim:integer;
begin
  koord(v1[1],v2[1]);
  cim:=addr(z[1]);
  beolvas(cim);
end;
procedure beolvas(cim:integer);
begin
  cdpnek(88);
  cdpnek(157);
  cdpnbl(cim,1);
end;
```

```
procedure ellenoriz(l:integer);
begin
  writeln('Jo lesz ez a pont? (I/N)');
  readln(t);
  if t='n' then
    begin
      javitas(l,x,y,z);
      writeln('Mik legyenek az uj pont koordinatai? x=');
      readln(x[1]);
      writeln('y=');
      readln(y[1]);
      koord(x[1],y[1]);
      raktaroz(l,z);
      pontoz;
      ellenoriz(l);
    end
  else if t<>'i' then ellenoriz(l);
end;
begin
  t:='i';
  while t='i' do
    begin
      j:=1;
      writeln('A bal vegpont koordinatai?: x[1]=');
      readln(x[1]);
      writeln('y[1]=');
      readln(y[1]);
      koord(x[1],y[1]);
      raktaroz(j,z);
      pontoz;
      ellenoriz(j);
      j:=2;
      writeln('A jobb vegpont koordinatai? x[2]=');
      readln(x[2]);
      writeln('y[2]=');
      readln(y[2]);
      koord(x[2],y[2]);
      raktaroz(j,z);
      pontoz;
      ellenoriz(j);
      d:=SQRT((x[2]-x[1])*(x[2]-x[1])+(y[2]-y[1])*(y[2]-y[1]));
      writeln(d);
      writeln(x[1],y[1]:4,x[2]:4,y[2]:4);
      repeat
        writeln('Akarsz meg merni? (I/N)');
        readln(t);
      until ((t='i') or (t='n'));
    end;
  end.
end.
```



```
program      markham(input,output);
label 1000,
      2000;
type tomb=array[1..60,1..60] of      byte;
      matr=array[1..60,1..60] of      integer;
      vektor=array[1..4] of integer;
      bvektor=array[1..4] of byte;
      vktr=array[1..2] of integer;
var i,j,k,s,o,m,cim:integer;
    ch,ca:char;
    x,y:vektor;
    z:bvektor;
    xv,xm,yv,ym,kl,mr:vktr;
    a,b,c:tomb;
    d:matr;
external procedure cdpnek(byt:byte);
external procedure cimat(cim:integer);
external procedure cdpnbl(honnan,hanyat:integer);
external procedure cdptol(var byt:byte);
external procedure cdptbl(ind,hanyat:integer);
external procedure lut(egybyt:byte);
external procedure koord(xt,yt:integer);
procedure init;
var i:byte;
begin
    cdpnek(128);
    lutinit;
end;
procedure lutinit;
var i:integer;
begin
    lut(127);
    lut(128);
    for i:=1 to 63 do
    begin
        lut(i);
        lut(i+192);
    end;
end;
procedure raktaroz(l:integer;
                  var z:bvektor);
begin
    cdpnek(64);
    cdptol(z[1]);
end;
procedure pontoz;
var gr,cm:integer;
begin
    cdpnek(80);
    writeln('Milyen szinnel jeloljem az ablak sarkat? (0-63)');
    readln (gr);
    cm:=addr(gr);
    cdpnbl(cm,1);
end;
```

```
procedure akival(l:integer;
                var x,y:vektor);
begin
    readln(x[1]);
    writeln('yt=');
    readln(y[1]);
    koord(x[1],y[1]);
    raktaroz(1,z);
    pontoz;
    if y[2]<>0 then
        begin
            s:=y[2]-y[1];
            o:=x[2]-x[1];
        end;
end;
procedure bkival(var x,y:vektor);
var i:integer;
begin
    readln(x[3]);
    writeln('yt=');
    readln(y[3]);
    koord(x[3],y[3]);
    i:=3;
    raktaroz(i,z);
    pontoz;
    x[4]:=x[3]+o;
    y[4]:=y[3]+s;
    koord(x[4],y[4]);
    i:=4;
    raktaroz(i,z);
    pontoz;
end;
procedure javitas(l:integer;
                v1,v2:vektor;
                z:bvektor);
var cim,os:integer;
begin
    koord(v1[1],v2[1]);
    cim:=addr(z[1]);
    os:=1;
    beolvas(cim,os);
end;
procedure beolvas(cim,oz:integer);
begin
    cdpnek(88);
    cdpnek(157);
    cdpnbl(cim,oz);
end;
procedure atdolg(var vx,vy:integer;
                var v1,v2:vektor;
                i:integer;
                var z:bvektor);
var xt,yt:integer;
begin
```

```
writeln('Mi legyen az uj koordinata? xt=');
readln(xt);
vx:=xt-v1[i];
writeln('yt=');
readln(yt);
vy:=yt-v2[i];
v1[i]:=xt;
v2[i]:=yt;
koord(v1[i],v2[i]);
raktaroz(i,z);
pontoz;
if ((i=1) or (i=3)) then
  begin
    s:=v2[i+1]-v2[i];
    o:=v1[i+1]-v1[i];
  end
else
  begin
    s:=v2[i]-v2[i-1];
    o:=v1[i]-v1[i-1];
  end;
end;
procedure modosit(var rx,ry:integer;
                  var v1,v2:vektor;
                  var z:bvektor;
                  ch:char);
var bt:char;
    i:integer;
begin
  writeln('A masik ablak melyik sarkat modositsam? (B/J/M)');
  readln(bt);
  if bt= 'b' then
    begin
      if ch='l' then i:=3
      else i:=1;
      javitas(i,v1,v2,z);
      catdolg(v1,v2,rx,ry,i);
    end
  else if bt='j' then
    begin
      if ch='l' then i:=4
      else i:=2;
      javitas(i,v1,v2,z);
      rx:=-rx;
      ry:=-ry;
      catdolg(v1,v2,rx,ry,i);
    end
  else if bt='m' then
    begin
      if ch='l' then i:=3
      else i:=1;
      javitas(i,v1,v2,z);
      i:=i+1;
      javitas(i,v1,v2,z);
    end
  end;
```



```
        i:=i-1;
        batdolg(v1,v2,i);
    end;
end;
procedure catdolg(var v1,v2:vektor;
    rx,ry,l:integer);
begin
    v1[1]:=v1[1]+rx;
    v2[1]:=v2[1]+ry;
    koord(v1[1],v2[1]);
    raktaroz(l,z);
    pontoz;
end;
procedure batdolg(var v1,v2:vektor;
    l:integer);
begin
    writeln('Mi legyen az uj bal felso koordinata? xt=');
    readln(v1[1]);
    writeln('yt=');
    readln(v2[1]);
    v1[1+1]:=v1[1]+o;
    v2[1+1]:=v2[1]+s;
    koord(v1[1],v2[1]);
    raktaroz(l,z);
    pontoz;
    l:=l+1;
    koord(v1[1],v2[1]);
    raktaroz(l,z);
    pontoz;
end;
procedure ellenorz(var v1,v2:vektor;
    var z:bvektor);
var ch,cr:char;
    vx,vy,wx,wy,tx,ty,k,i:integer;
    mut:byte;
begin
    writeln('Megfeleloek-e ezek az ablakok? (I/N)');
    readln(ch);
    if ch='n' then
        begin
            writeln('Melyik ablak nem jo? (1/2/M)');
            readln(ch);
            mut:=0;
            case ch of
                '1':k:=1;
                '2':k:=2;
                'm':begin
                    ch:='1';
                    k:=1;
                    mut:=1;
                end;
            end;
        end;
    writeln(k,'. ablak melyik sarka rossz? (B/J/M)');
    readln(cr);
```

```
case cr of
  'b':begin
    if ch='l' then i:=1
      else i:=3;
    javitas(i,v1,v2,z);
    atdolg(vx,vy,v1,v2,i,z);
    modosit(vx,vy,v1,v2,z,ch);
  end;
  'j':begin
    if ch='l' then i:=2
      else i:=4;
    javitas(i,v1,v2,z);
    atdolg(vx,vy,v1,v2,i,z);
    vx:=-vx;
    vy:=-vy;
    modosit(vx,vy,v1,v2,z,ch);
  end;
  'm':begin
    if ch='l' then i:=1
      else i:=3;
    javitas(i,v1,v2,z);
    if mut=1 then
      begin
        writeln('1. ablak bal felso sarok:');
        atdolg(vx,vy,v1,v2,i,z);
        i:=2;
        javitas(i,v1,v2,z);
        writeln('1.ablak jobb also sarok:');
        atdolg(vx,vy,v1,v2,i,z);
        modosit(vx,vy,v1,v2,z,ch);
      end
    else
      begin
        i:=i+1;
        javitas(i,v1,v2,z);
        i:=i-1;
        batdolg(v1,v2,i);
      end;
    end;
  end;
  end;
  ellenorz(v1,v2,z);
end
else if ch<>'i' then ellenorz(x,y,z);
end;
procedure kiolvas(cim:integer);
begin
  cdpnek(65);
  cdpnek(141);
  cimat(cim);
  cdptbl(0,o);
end;
procedure osszead(var b:tomb);
var i,j:integer;
begin
```



```
for i:=1 to s do
begin
  for j:=1 to o do
    d[i,j]:=d[i,j]+b[i,j];
  end;
end;
procedure atlagol(var c:tomb;
                  var m:integer);
var i,j:integer;
begin
  for i:=1 to s do
    begin
      for j:=1 to o do
        c[i,j]:=(d[i,j] div m);
      end;
      m:=m+1;
    end;
  procedure listazo(var w:tomb);
  var t:text;
      result,i,j,k,l:integer;
  begin
    if s<=64 then k:=s
      else k:=64;
    if o<=24 then l:=o
      else l:=24;
    assign(t,'LST:');
    rewrite(t);
    for i:=1 to k do
      begin
        for j:=1 to l do
          write (t,w[i,j]:3);
          writeln(t);
        end;
      close(t,result);
    end;
  procedure amatrix(x,y:vektor;
                  var a:tomb);
  var j:integer;
  begin
    for j:=1 to s do
      begin
        cim:=addr(a[j,1]);
        koord(x[1],y[1]);
        kiolvas(cim);
        y[1]:=y[1]+1;
      end;
      y[1]:=y[1]-s;
    end;
  procedure bmatrix(x,y:vektor;
                  var b:tomb);
  var j:integer;
  begin
    for j:=1 to s do
      begin
```

```
        cim:=addr(b[j,1]);
        koord(x[3],y[3]);
        kiolvas(cim);
        y[3]:=y[3]+1;
    end;
    y[3]:=y[3]-s;
end;
procedure kul(l:integer;
              var c,b:tomb;
              var kl,mr:vktr);
var j,k,valt:integer;
    ch:char;
begin
    kl[2]:=0;
    mr[2]:=0;
    j:=1;
    repeat
        begin
            for k:=1 to o do
                begin
                    valt:=c[j,k]-b[j,k];
                    valt:=valt*valt;
                    kl[1]:=kl[1]+valt;
                    if kl[1]<0 then
                        begin
                            mr[1]:=mr[1]+1;
                            kl[1]:=(kl[1]+32767)+1;
                        end;
                end;
            end;
            j:=j+1;
        end;
    until ((mr[2]>mr[1]) or ((mr[2]=mr[1]) and (kl[2]>kl[1])) or
    (j=s+1));
end;
procedure hasonlit(i:integer;
                  x,y:vektor;
                  var b:tomb;
                  var kl,mr:vktr);
begin
    bmatrix(x,y,b);
    kul(i,c,b,kl,mr);
    writeln(kl[2],mr[2]:6);
    if mr[1]>mr[2] then
        begin
            mr[1]:=mr[2];
            kl[1]:=kl[2];
            xm[1]:=x[1];
            ym[1]:=y[1];
            xm[2]:=x[3];
            ym[2]:=y[3];
        end
    else if ((mr[1]=mr[2]) and (kl[1]>kl[2])) then
        begin
            kl[1]:=kl[2];
```

```
    xm[1]:=x[1];
    ym[1]:=y[1];
    xm[2]:=x[3];
    ym[2]:=y[3];
end;
writeln(kl[1],mr[1]:6);
writeln(xm[1],ym[1]:4,xm[2]:4,ym[2]:4);
writeln(xv[1],yv[1]:4,xv[2]:4,yv[2]:4);
end;
procedure bhasonlit(i:integer;
                    var c,b:tomb;
                    var x,y:vektor;
                    var kl,mr:vktr);
begin
    x[3]:=x[3]-1;
    y[3]:=y[3]-1;
    hasonlit(i,x,y,b,kl,mr);
    x[3]:=x[3]+1;
    hasonlit(i,x,y,b,kl,mr);
    x[3]:=x[3]+1;
    hasonlit(i,x,y,b,kl,mr);
    y[3]:=y[3]+1;
    hasonlit(i,x,y,b,kl,mr);
    y[3]:=y[3]+1;
    hasonlit(i,x,y,b,kl,mr);
    x[3]:=x[3]-1;
    hasonlit(i,x,y,b,kl,mr);
    x[3]:=x[3]-1;
    hasonlit(i,x,y,b,kl,mr);
    y[3]:=y[3]-1;
    hasonlit(i,x,y,b,kl,mr);
    x[3]:=x[3]+1;
end;
procedure tulnagy(i,k:integer;
                  xm,ym,xv,yv:vktr;
                  var x,y:vektor;
                  z:bvektor);
var ch:char;
begin
    if ((xv[i]<>xm[i]) or (yv[i]<>ym[i])) then
        begin
            x[k]:=xv[i];
            y[k]:=yv[i];
            javitas(k,x,y,z);
            x[k]:=xm[i];
            y[k]:=ym[i];
            koord(x[k],y[k]);
            raktaroz(k,z);
            pontoz;
            k:=k+1;
            javitas(k,x,y,z);
            x[k]:=x[k]+xm[i]-xv[i];
            y[k]:=y[k]+ym[i]-yv[i];
            koord(x[k],y[k]);
```

```
    raktaroz(k,z);
    pontoz;
end;
writeln('Nyomj le egy billentyut!');
readln(ch);
end;
procedure nagy(i:integer;
               var c,b:tomb;
               var x,y:vektor;
               var kl,mr:vktr);
begin
    bhasonlit(i,c,b,x,y,kl,mr);
    x[1]:=x[1]-1;
    y[1]:=y[1]-1;
    amatrix(x,y,c);
    hasonlit(i,x,y,b,kl,mr);
    bhasonlit(i,c,b,x,y,kl,mr);
    x[1]:=x[1]+1;
    amatrix(x,y,c);
    hasonlit(i,x,y,b,kl,mr);
    bhasonlit(i,c,b,x,y,kl,mr);
    x[1]:=x[1]+1;
    amatrix(x,y,c);
    hasonlit(i,x,y,b,kl,mr);
    bhasonlit(i,c,b,x,y,kl,mr);
    y[1]:=y[1]+1;
    amatrix(x,y,c);
    hasonlit(i,x,y,b,kl,mr);
    bhasonlit(i,c,b,x,y,kl,mr);
    y[1]:=y[1]+1;
    amatrix(x,y,c);
    hasonlit(i,x,y,b,kl,mr);
    bhasonlit(i,c,b,x,y,kl,mr);
    x[1]:=x[1]-1;
    amatrix(x,y,c);
    hasonlit(i,x,y,b,kl,mr);
    bhasonlit(i,c,b,x,y,kl,mr);
    x[1]:=x[1]-1;
    amatrix(x,y,c);
    hasonlit(i,x,y,b,kl,mr);
    bhasonlit(i,c,b,x,y,kl,mr);
    y[1]:=y[1]-1;
    amatrix(x,y,c);
    hasonlit(i,x,y,b,kl,mr);
    bhasonlit(i,c,b,x,y,kl,mr);
    x[1]:=x[1]+1;
end;
procedure tnagy(var c,b:tomb;
                var kl,mr:vktr;
                var x,y:vektor);
var j:integer;
begin
    j:=1;
    kul(j,c,b,kl,mr);
```

```
    ertekado;
    j:=2;
    bhasonlit(j,c,b,x,y,kl,mr);
end;
procedure jvt(x,y:vektor;
              z:bvektor);
var j:integer;
begin
    j:=3;
    javitas(j,x,y,z);
    j:=4;
    javitas(j,x,y,z);
end;
procedure jelek(var x,y:vektor);
begin
    koord(x[3],y[3]);
    pontoz;
    koord(x[4],y[4]);
    pontoz;
    x[1]:=x[3];
    y[1]:=y[3];
    x[2]:=x[4];
    y[2]:=y[4];
    s:=s-1;
    o:=o-1;
end;
procedure csokken(var m:integer;
                  var b,a,c:tomb;
                  x,y:vektor);
var j,cim:integer;
    ch:char;
begin
    writeln('Akarsz listat? (I/N)');
    readln(ch);
    if ch='i' then
        begin
            listazo(a);
            listazo(b);
        end;
    osszead(b);
    if ch='i' then listazo(a);
    atlagol(c,m);
    if ch='i' then listazo(c);
    for j:=1 to s do
        begin
            cim:=addr(c[j,1]);
            koord(x[3],y[3]);
            beolvas(cim,o);
            y[3]:=y[3]+1;
        end;
    y[3]:=y[3]-s;
end;
procedure ertekado;
var k,l:integer;
```



```
begin
  l:=0;
  for k:=1 to 2 do
    begin
      xv[k]:=x[2*l+1];
      yv[k]:=y[2*l+1];
      xm[k]:=x[2*l+1];
      ym[k]:=y[2*l+1];
      l:=1;
    end;
  end;
begin
  init;
1000:m:=2;
  writeln('Az 1.ablak bal felső koordinatai: xt=');
  i:=1;
  akival(i,x,y);
  writeln('Az 1.ablak jobb alsó koordinatai: xt=');
  i:=2;
  akival(i,x,y);
  writeln('A 2.ablak bal felső koordinatai: xt=');
  bkival(x,y);
  ellenorz(x,y,z);
  o:=o+1;
  s:=s+1;
  amatrix(x,y,c);
  bmatrix(x,y,b);
  kl[1]:=0;
  mr[1]:=0;
  i:=1;
  kul(i,c,b,kl,mr);
  ertekado;
  i:=2;
  nagy(i,c,b,x,y,kl,mr);
  i:=1;
  k:=1;
  tulnagy(i,k,xm,ym,xv,yv,x,y,z);
  javitas(i,x,y,z);
  i:=2;
  javitas(i,x,y,z);
  amatrix(x,y,a);
  for i:=1 to s do
    begin
      for j:=1 to o do
        d[i,j]:=a[i,j];
      end;
2000:i:=2;
      k:=3;
      tulnagy(i,k,xm,ym,xv,yv,x,y,z);
      jvt(x,y,z);
      bmatrix(x,y,b);
      writeln(x[1],y[1]:4,x[2]:6,y[1]:4,x[3]:6,y[3]:4,x[4]:6,y[3]:4);
      writeln(x[1],y[2]:4,x[2]:6,y[2]:4,x[3]:6,y[4]:4,x[4]:6,y[4]:4);
      csokken(m,b,a,c,x,y);
```

```
repeat
  writeln('Szuperponalsz meg? (I/N)');
  readln(ch)
until ((ch='i') or (ch='n'));
if ch='i' then
  begin
    repeat
      writeln('1:Az elobb kapott kephez adok uj elemet');
      writeln('2:Ket uj elemet atlagolok (1/2)');
      readln(ca)
    until ((ca='1') or (ca='2'));
    if ca='1' then
      begin
        jelek(x,y);
        repeat
          writeln('Az uj ablak bal felso koordinatai: xt=');
          bkival(x,y);
          repeat
            writeln('Megfeleloek az uj koordinatak? (I/N)');
            readln(ch)
          until ((ch='i') or (ch='n'));
          if ch='n' then
            jvt(x,y,z)
          until (ch='i');
          s:=s+1;
          o:=o+1;
          tnagy(c,b,kl,mr,x,y);
          goto 2000;
        end
      else
        goto 1000;
      end;
    end;
  end.
```

```
module ablak;
type vektor=array[1..2] of integer;
var t:char;
external procedure cdpnek(byt:byte);
external procedure cdpnbl(honnan,hanyat:integer);
external procedure cdptol(var byt:byte);
external procedure lut(egybyt:byte);
external procedure koord(xt,yt:integer);
procedure init;
var i:byte;
begin
    cdpnek(128);
    lutinit;
end;
procedure lutinit;
var i:integer;
begin
    lut(127);
    lut(128);
    for i:=1 to 63 do
        begin
            lut(i);
            lut(i+192);
        end;
    end;
procedure raktaroz(var z:byte);
begin
    cdpnek(64);
    cdptol(z);
end;
procedure pontoz;
var gr:integer;
begin
    cdpnek(80);
    writeln('Milyen szinu legyen a pont? (0-63)');
    readln(gr);
    cdpnek(gr);
end;
procedure beolvas(z:byte);
var cim:integer;
begin
    cim:=addr(z);
    cdpnek(88);
    cdpnek(157);
    cdpnbl(cim,1);
end;
procedure ellenoriz(l:integer;
                    var    by:byte;
                    var    x,y:vektor);
begin
    writeln('Jo lesz ez a pont? (I/N)');
    readln(t);
    if t='n' then
        begin
            koord(x[1],y[1]);
            beolvas(by);
            writeln('Mik legyenek az uj pont koordinatai? x=');
            readln(x[1]);
            writeln('y=');
            readln(y[1]);
```

```
    koord(x[1],y[1]);  
    raktaroz(by);  
    pontoz;  
    ellenoriz(1,by,x,y);  
    end  
    else if t<>'i' then ellenoriz(1,by,x,y);  
end;  
modend.
```

```
module terjel;
type vektor=array[1..2] of integer;
external procedure koord(xt,yt:integer);
external procedure pontoz;
external procedure raktaroz(var      z:byte);
external procedure ellenoriz(l:integer;
                             var by:byte;
                             var x,y:vektor);
procedure terulet(var x,y:vektor);
var v:integer;
    e:byte;
begin
  writeln('A bal felso sarok koordinatai, x[1]=');
  readln(x[1]);
  writeln('y[1]=');
  readln(y[1]);
  koord(x[1],y[1]);
  raktaroz(e);
  pontoz;
  ellenoriz(1,e,x,y);
  writeln('A jobb felso sarok koordinatai, x[2]=');
  readln(x[2]);
  y[2]:=y[1];
  writeln ('y[2]=',y[2]);
  koord(x[2],y[2]);
  raktaroz(e);
  pontoz;
  ellenoriz(2,e,x,y);
  v:=x[2];
  writeln('A bal also sarok koordinatai, x[3]=',x[1]);
  x[2]:=x[1];
  writeln('y[3]=');
  readln(y[2]);
  koord(x[2],y[2]);
  raktaroz(e);
  pontoz;
  ellenoriz(2,e,x,y);
  x[2]:=v;
  writeln('A jobb also sarok koordinatai:');
  writeln(x[2],y[2]:4);
  koord(x[2],y[2]);
  pontoz;
end;
modend.
```

