

# AZ INTRACELLULÁRIS $\text{Ca}^{2+}$ -KONCENTRÁCIÓ SZABÁLYOZÁSA VÁZIZMOKBAN

KÖVÉR ANDRÁS és SZABOLCS MÁRTON

Debreceni Orvostudományi Egyetem Központi Kutató Laboratóriuma, Debrecen

Régóta ismert az a jelenség, hogy a vázizmok, vagy a belőlük izolált rostok indirekt (idegek közvetítésével) vagy direkt alkalmazott elektromos ingerek hatására összehúzódnak. Ismeretes továbbá, hogy a fázisosan, tetanikusan működő izmok esetében az izom összehúződését a szarkolemmán tovaterjedő elektromos potenciálváltozás, az izom akcióspotenciálja vezeti be. A tovaterjedő akcióspotenciál azonban csak mintegy beindítója, ill. összegezője azon, a rostokban végbemenő történéseknek, részfolyamatoknak, melyek végső fokon az egyes rostoknak s maguknak az izmoknak összehúződéséhez vezetnek.

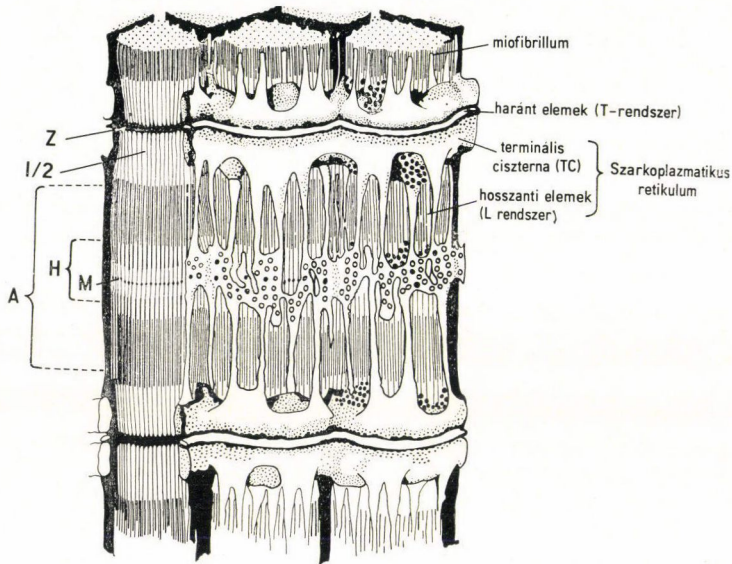
Az egyes 80–100  $\mu$  átmérőjű izomrostokban nagyszámú, kb. 1  $\mu$  átmérőjű rostocska, miofibrillum található — a miofibrillumban lokalizálódnak a kontraktilis, 50–150 Å átmérőjű aktin, ill. miozin filamentumok (6, 7, 30–32, 39–42) —, melyek szinkronizált összehúződása csak az ún. belső ingervezető rendszer segítségével valósulhat meg (13–15, 43–45, 75). E belső ingervezető rendszer képezi tehát azt a transzmissziós szíjat, mely a rostmembránról elvezethető elektromos jelet és a kontraktilis rendszert közvetlenül aktiváló mechanizmust összekapcsolja. Mivel a kontraktilis rendszer aktiválódásának az alapját az intracelluláris szabad Ca ion koncentráció  $10^{-6}$  M fölé emelkedése képezi (10, 12, 77, 99–104), úgy is mondhatjuk, hogy az elektromos jel a belső ingervezető rendszer közreműködésével valósítja meg az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció jelentős fokozódását. Ugyanezen rendszer működése biztosítja továbbá a kontrakciós ciklus második fázisát, az ionizált Ca koncentrációjának  $10^{-7}$  M alá történő csökkenését, következésképpen az izom elernyedését, ill. relaxációját is.

## *Belső ingervezető rendszer*

A belső ingervezető rendszer kettős csőrendszer (3, 5, 22, 24, 26–28, 82, 96–98), melynek egyik komponense a transzverz vagy harántelem-rendszer (T-rendszer), a másik, a hosszanti vagy longitudinális elemrendszer (L-rendszer) (1. ábra). Az utóbbinak fontos komponense a terminális ciszterna. A hosszanti elemrendszer a terminális ciszternával együtt tekinthető a tulajdon-



képpen szarkoplazmatikus retikulumnak. A harántelem-rendszer legegyszerűbben úgy képzelhető el, mint a háziasszonyok által régebben előszeretettel használt liszt-szita, melynek rácozatát jelen esetben egymással közlekedő kb. 100–150 Å átmérőjű csövek rendszere alkotja. A tartókeret mentén elhelyezkedő kis rácelemek a tartókeret külső felszínére rögzítettek, a harántelem-rendszer esetében a csövecskék az izomrostok felszínére szabadon nyílnak. Az utóbbi okokból e rendszer úgy is elképzelhető, mint a felszíni membrán



1. ábra. A belső ingervezető rendszer és a szarkoplazmatikus retikulum vázlatos rajza. PEACHEY (78)

ujjszerűen betüremkedő, elágazódó, egymással kommunikáló nyúlványainak rendszere (3, 22, 26–27). A csőháló egyes lyukaiban mutathatók ki, ill. lokalizálódnak a miofibrillumok. A fentiek alapján a T-rendszer belső tere közvetlen kapcsolatban van a rostok közötti extracelluláris térrel, s a csövecskékben levő folyadék összetétele is hasonló az extracelluláris folyadékéhoz. Harántcsíkolt vázizmokban általában minden szarkomérának (Z–Z) megfelelően a Z-csíkok szintjén (26, 27, 78, 82), vagy az A–I-csík határán (3, 24, 82, 84–86) kimutatható egy ilyen harántelem-rendszer. Minthogy fővonásokban a T-rendszer membránjának elektromos sajátságai megegyeznek a felszíni membránéval, a rostfelszínen végighaladó ingerület, elektromos jel, ráterjedhet e csőrendszerre is, s így betérjedhet az izomrostok belseje felé. Azt, hogy e rendszernek nagyon fontos szerepe van a jeltovábbításban, számos kísérletben igazolták (8, 14, 15, 19, 43–45, 79, 81, 87). Egyik fontos bizonyítéka ennek továbbá, hogy 300 mM-os glicerines kezelést követően a harántelem-rendszernek a fel-



színi membránnal fiziológiásan meglévő kapcsolata megszakad s ilyenkor — bár maga a tovavezetődő elektromos jel az izomrostról elvezethető —, a kapcsolat megszakadása miatt a jeltovábbítás nem történhet meg, s az izom összehúzódása is elmarad (29).

Az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -szint közvetlen szabályozásában a döntő szerepet azonban nem e rendszer, hanem a hosszanti elemrendszer, a tulajdonképpen szarkoplazmatikus retikulum (SR) tölti be (7, 24, 26—27, 78, 82—86). A hosszanti elemek rendszere úgy rendeződik külön-külön, minden egyes miofibrillumot körülvéve a két T-elem közötti szakaszon, ill. az egyes szarkoméráknak megfelelően, hogy a T-rendszerrel érintkező végüknél az egyes hosszanti elemek a miofibrillumot körülölelő terminális ciszternába folynak össze. E hosszanti elemrendszerben tárolódik nyugalomban az izom aktiválódása során gyorsan mobilizálódó  $\text{Ca}^{2+}$ , s az elernyedés során oda kerül vissza energiát elhasználó anyagcserefolyamat, aktív  $\text{Ca}^{2+}$ -transzport révén (11, 21, 33, 47, 72, 80, 116). Az elmondottakból következik, hogy a T-rendszer jeltovábbító funkcióján kívül nagyon fontos szerepe van annak a mechanizmusnak, mely a T-rendszer elektromos jelét a mintegy 100—200 Å nagyságú résen keresztül (T—SR junkció) a hosszanti elemek (L) rendszerére, azaz a tulajdonképpeni szarkoplazmatikus retikulumra továbbítja.

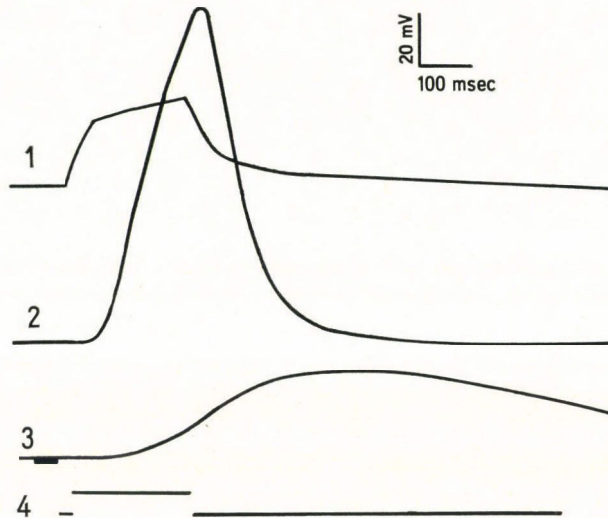
#### *A szarkoplazmatikus retikulum és a kontraktilis rendszer kapcsolata*

A továbbiakban elsősorban az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció közvetlen szabályozásában döntő szerepet betöltő szarkoplazmatikus retikulum, ill. biokémiai módszerekkel izolált, fragmentált szarkoplazmatikus retikulum (FSR) sajátágaival kívánunk foglalkozni, előre megjegyezve, hogy mind az izomrostok átmérője, mind a rostmembrán permeabilitása, valamint a T-rendszer, ill. SR fejlettsége vagy szervezettsége specieszenként, sőt adott speciesznél izomszövetenként is különböző lehet, azaz funkciója és jelentősége is változhat (94). Az ismertetendő adatok és elképzelések elsősorban a tetanikus, harántcsíkolt vázizomból izolált FSR-re vonatkoznak.

Az SR és a kontraktilis rendszer funkcionális kapcsolatát előljáróban Ashley és Ridgway aequorin technikával nyert adataival szeretnénk szemléltetni (2. ábra) (1, 2). Az ionizált Ca-mal, annak koncentrációjával nagyjából arányos fluoreszcenciát adó aequorint (*Aequorea aequorea* — meduza festékanyaga) mikroinjekció formájában juttatták a rost belsejébe. Megfigyelhető, hogy az ingerjel (négysegőgimpulzus) hatására a membránpotenciál csökken, s fluoreszcencia fokozódás jelenik meg. Amint az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció (fluoreszcencia intenzitása jelzi) elér egy küszöbértéket, a kontraktilis rendszer aktiválódik. A Ca-ionok ugyanis a kontraktilis rendszer fehérjéihez kötődve (pl. a troponinhoz) aktiváló hatást fejtenek ki. A fluoreszcenciafokozódás azonban hamarabb szűnik meg, mint az összehúzódás. Ez arra utal,



hogy még a kontrakció alatt lecsökken a szabad  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációja — feltehetően a szarkoplazmatikus retikulum  $\text{Ca}^{2+}$  akkumuláló képességének a fokozódása miatt. A kontrakció megszűnése, azaz a relaxáció a kötött  $\text{Ca}^{2+}$  eltávolításának függvénye. Ez nem jár az intracelluláris ionizált Ca-koncentráció növekedésével. A 3. ábrán látható, hogy frekvens ingerléskor minden egyes elektromos jelnek megfelelően észlelhető fluoreszcencia fokozódás.



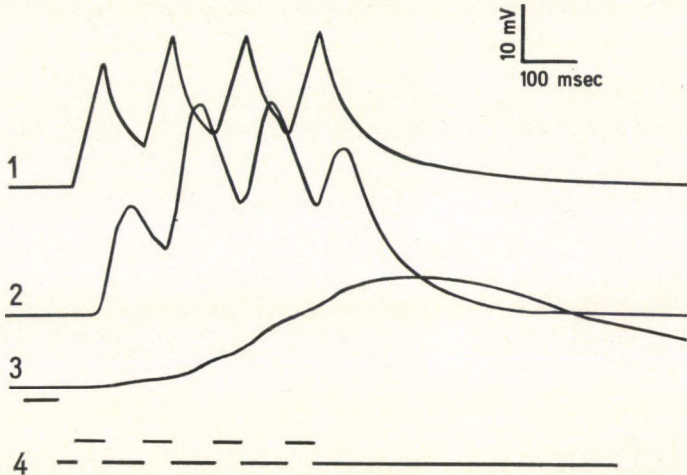
2. ábra. Depolarizáló inger hatása izomroston. 1. membránpotenciál változás, 2. fluoreszcencia (szabad  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció változása), 3. izometriás kontrakció, 4. ingerimpulzus ASHLEY és mtsai (1)

Az SR-izomból biokémiai módszerekkel történő izolálása alapvetően és véglegesen megváltoztatja azt az összerendezettséget, mely az izom egyes membránrendszerei, ill. a kontraktilis rendszer között *in situ* fennáll. Így a fragmentált szarkoplazmatikus retikulummal jó esetben is csak az SR egyes funkcionális sajátságaira következtethetünk. Az izolálási technika alkalmazása megváltoztatja az SR közvetlen környezetét jelentő közeg, sőt a fragmentumok belső terének összetételét is. Egyszerűen belátható, hogy a kb. 0,1 M-os KCl oldatban izolált vagy inkubált FSR membránja nem rendelkezhet pl. azon elektromos sajátságokkal, amik jellemzők az SR-re rostban.

*In vivo* az SR közvetlen környezetét biztosító intracelluláris tér elsősorban K-ionokat s nem penetráló anionokat (pl. fehérje) tartalmaz, míg az SR-ben nyugalomban dominánsan  $\text{Ca}^{2+}$  s valamilyen penetráló anion van. Tekintetbe véve az SR-membrán viszonylag alacsony  $\text{Ca}^{2+}$  permeabilitását (nyugalomban kb.  $10^{-13} \text{ M cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ ), az előbb említett egyenlőtlen ionmegoszlás következtében az SR-membrán generált elektromos potenciálja feltehetően  $\text{K}^+$ -potenciál. E potenciál jelentősen hozzájárulhat a membrán metastabil



funkcionális állapotának biztosításához, s egyben előfeltétele lehet a  $\text{Ca}^{2+}$  mobilizációnak. KCl-os külső közegben az FSR-membrán nem rendelkezhet ilyen elektromos sajátosságokkal. E felvetéssel két fontos szempontra szeretnénk a figyelmet ráirányítani. Az egyik az, hogy a biokémiai jellegű vizsgálatokban is törekedni kell a fiziológiai viszonyok megközelítésére (különben a kísérleti eredmények nem tükrözhetik a valóságos összefüggéseket); a másik szempont, hogy negatív eredményekhez juthatunk pusztán amiatt, hogy a kölcsönhatások nem a membránokra *in vivo* jellemző metastabil állapotban vizsgáljuk.



3. ábra. Tetanizáló ingerlés hatása izomroston. Jelölések mint a 2. ábrán. ASHLEY és mtsai (1)

Az SR két alapvető funkciója a  $\text{Ca}^{2+}$  akkumulálása (relaxációkor) s az akkumulált  $\text{Ca}^{2+}$  mozgósítása (kontrakciókor). A  $\text{Ca}^{2+}$  akkumulációja, azaz a  $\text{Ca}^{2+}$ -nak membránon át végbemenő aktív transzportja (intracelluláris térből az SR belsejébe) ATP elhasználáshoz s a  $\text{Ca-Mg}$  dependens ATPáz — mit másképp újabban  $\text{Ca}$ -pumpa fehérjének is hívnak — működéséhez kötött folyamat. A mobilizáció elvileg a  $\text{Ca}$ -pumpa megfordított működéseként is értelmezhető, de a kísérleti adatok sokkal inkább arra utalnak, hogy az a membránpermeabilitás fokozódásának s a meglévő  $\text{Ca}^{2+}$ -gradiens érvényre jutásának következménye. Így a két tulajdonságot, bár meglátjuk milyen szoros a kapcsolat közöttük, vizsgálataink céljából szétválaszthatjuk. Az aktív  $\text{Ca}^{2+}$ -transzport vagy  $\text{Ca}^{2+}$ -transzlokáció, mint említettem ATP energiájának rovására valósul meg. Mikor legnagyobb a hatásfoka e folyamatnak? Nyilvánvalóan akkor, ha passzív elcsorgás (leakage) nincs, vagy minimális a membránon keresztül, vagyis az a  $\text{Ca}^{2+}$ , mely ATP elhasználáshoz kötötten befelé transzlokálódik, bent is marad a kísérleti körülmények között. Minél nagyobb az SR-membrán  $\text{Ca}^{2+}$  permeabilitása, s az SR-ből a  $\text{Ca}^{2+}$  elcsorgása, annál alacsonyabb a mérhető felvett  $\text{Ca}^{2+}$ /elhasznált ATP hányados. Számos kísérlet



arra utal, hogy az optimális érték 2. Ez az érték tört részére is csökkenhet a kísérleti körülményektől függően [pl. éter (25, 49), detergens (6, 9, 46, 60) kezelés, foszfolipáz c-vel (68, 92), tripszinnel (47, 57, 58, 67, 75) végzett emésztés hatása, membrán-kötött  $\text{Ca}^{2+}$  eltávolítása (17, 59)]. A mért arány eltérhet a különböző típusú izmok, ill. specieszek esetében is. Természetesen ez csak a „pumpa” hatáskörére vonatkozik, nem magára a reakció-mechanizmus rész-jelenségére ( $2 \text{Ca}^{2+} + 1 \text{ATP}$ -ért).

### *Fragmentált szarkoplazmatikus retikulum (FSR) előállítása*

A FSR előállításánál a mitokondrium, kontraktilis fehérje s más membrán fragmentumokból adódó szennyeződés elkerüléséről, ill. a preparátumok azoktól való megtisztításáról kell gondoskodni. A nyers preparátum tisztítására (az aktomiozin „szennyeződés” eltávolítására) 0,6 M KCl-dal végzett extrakciót (66, 67, 95), ill. density-gradiens centrifugálást alkalmaznak (9, 38, 90, 91, 115). A transzport ATPáz előállításához ( $\text{Ca}^{2+}$  felvételt követő aktív fragmentumok izolálására) más lehetőséget nyújt az a körülmény, hogy oxalát, ATP,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{+}$  jelenlétében végzett  $\text{Ca}^{2+}$  felvétel során az akkumulált Ca (Ca-oxalát csapadék) megváltoztatja a fragmentumok ülepedhetőségét (74). A FSR fragmentumai a nehéz mikroszóma frakciót képezik (KCl-os közegben 25 000 g-nél 90 perc alatt kiülepedhető). A FSR a transzport ATPáz működésének tanulmányozására különösen alkalmas, mert egyidejűleg nemesak az ATPáz tulajdonságai, hanem a kapcsolt aktív transzport is tanulmányozható.

### *A Ca-dependens ATPáz reakció mechanizmusa*

EBASHI (18) valamint HASSELBACH és MAKINOSE (36) közölték először, hogy a vázizomból előállított FSR jelentős mennyiségű  $\text{Ca}^{2+}$ -ot vesz fel ATP és Mg jelenlétében. Később utóbbiak (37) azt is kimutatták, hogy az FSR 1000–3000-szeres  $\text{Ca}^{2+}$ -gradiens képzésére is képes. Megfigyelték továbbá, hogy az FSR  $\text{Ca}^{2+}$  felvételekor az ATP bontás jelentősen megnő (extra ATP hasítás), ATP—ADP kicserélődés megy végbe, s hogy e folyamatok között szerves kapcsolat van (18, 34, 38, 52, 64). Ugyancsak e szerzők, valamint WEBER és mtsai (105), YAMADA és mtsai (108) mutatták ki azt is, hogy 1 M ATP hidrolízise során 2 M  $\text{Ca}^{2+}$  transzportálódik az SR-be a külső médiumból.

A FSR  $\text{Ca}^{2+}$  felvétele jelentősen növelhető 3–5 mM oxalát alkalmazásával az inkubációs eleyben (36–38, 64). Ilyenkor a  $\text{Ca}^{2+}$  felvétel mértéke arányos az ún. extra ATP hasítással. Ha az akkumuláció befejeződik, az extra ATP hasítás is megszűnik. 3 mM oxalát a kontroll FSR ATPáz aktivitását (alap-ATPáz) csökkenti, feltehetően a szennyeződésként jelenlevő  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció csökkentése miatt (52). Az extra  $\text{Ca}^{2+}$  hatására az ATP hasítás mértéke jelentősen fokozódik, majd a  $\text{Ca}^{2+}$  felvétel befejezésekor a görbe



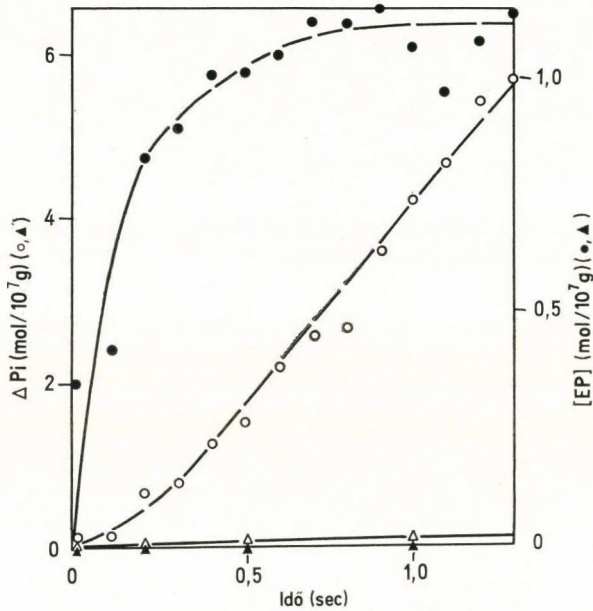
lefutása az oxalátos kontroll FSR aktivitásának görbéjével párhuzamossá válik. Oxalátmentes közegben e törés nem észlelhető. Ez a tény önmagában arra utal, hogy az ATP jelentős hidrolízisétől, ill. a  $\text{Ca}^{2+}$  transzportjától függetlenül a közeg  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációja e kísérleti körülmények között jelentősen nem változhat, a befelé transzportált  $\text{Ca}^{2+}$  feltehetően az SR-membrán áteresztése miatt (leakage) a fragmentumokból kifolyik. A membrán barrier szerepét, ill. annak tökéletlenségét támasztja alá az is, hogy  $0,1 \mu\text{l}$  Triton/mg fehérje hatására még oxalátos közegben sem észlelhető az ATPáz aktivitás görbe megtörése (természetesen  $\text{Ca}^{2+}$ -felvétel sem mérhető). Az elmondottakból két gondolat következik: 1. a membrán permeabilitás viszonyai nagymértékben befolyásolják a  $\text{Ca}^{2+}$ -felvétel mértékét, ill. az ATPáz aktivitási görbe lefutását. Ez egyben azt is jelenti — ha az enzim nem károsodik —, hogy az SR-membrán bármilyen módon bekövetkező permeabilitás fokozódása az extra ATP hasítás és a mérhető  $\text{Ca}^{2+}$ -felvétel szétkapcsolódásához vezet ( $\text{Ca}^{2+}/\text{ATP} \ll 2$ ). 2. Fiziológiai viszonyok között nem lehet egy oxaláthoz hasonló precipitáló agens a  $\text{Ca}^{2+}$  akkumuláció és az ATP hasítás összhangját biztosító szabályozó tényező, mert ez gyakorlatilag a  $\text{Ca}^{2+}$  gyors mozgósítását lehetetlenné tenné. (Feltehetően *in situ* a membrán nyugalmi potenciálja az, ami biztosítja mind a nyugalmi permeabilitási viszonyokat, mind a  $\text{Ca}^{2+}$ -akkumuláció megfelelő mértékét.)

Már az 1960-as évek elején feltételezték, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$  felvételéért felelős  $\text{Ca}^{2+}$  dependens ATPáz reakcióban közti termékként egy foszforilált intermedier, foszforilált enzim ( $\text{E} \sim \text{P}$ , a továbbiakban EP) is részt vesz (34, 37, 38, 105). Ezt később ismételten megerősítették (50, 52, 61, 70, 92, 108, 112, 114). A transzport mechanizmus alapvető részfolyamata az EP-képződés, mely a specifikus  $\text{Ca}^{2+}$ -receptor képességét s a  $\text{Ca}^{2+}$  transzlokációját biztosítja, és az EP lebomlása, mely most már az SR-en belül a  $\text{Ca}^{2+}$ -nak a komplex-kötéséből való felszabadulását, s ezt követően a teljes folyamat állandó ismétlését és ezzel együtt a  $\text{Ca}^{2+}$  akkumulációját teszi lehetővé. Már az eddigiek alapján belátható, hogy az oxalát az SR fragmentumok belső terébe jutó Ca-ionokat precipitálja s ily módon mintegy egyenirányítja az egész folyamatot. A limitáló tényező ez utóbbi esetben csak az ionizálódó Ca mennyisége, azaz az EP lebomlása lehet. Az elmondottakból az is következik továbbá, hogy az SR  $\text{Ca}^{2+}$  felvétele, s az SR Ca-kötése nem szükségszerűen azonos fogalmak. Az utóbbi alatt ui. elsősorban a membránhoz kötött, és pedig EP kötésbe jutó Ca mennyiségét értjük. A két folyamatra reakciókinetika szempontjából szükségképpen más paraméterek lehetnek jellemzők.

Az utóbbi években a gyors reakciók mérését lehetővé tevő keverő berendezés (3, 5) segítségével KANAZAWA és mtsai (54, 55), valamint más szerzők az SR Ca-Mg dependens ATPáz reakciójának egyes lépéseit tisztázták (91, 106, 107, 109, 110, 114). Ha az enzimreakció kezdeti fázisában tanulmányozzuk az EP képződését és a reakció végén jelentkező anorganikus P felszabadulás időbeli lefolyását s olyan kísérleti feltételeket választunk (extrém alacsony



ATP-koncentráció,  $0,3 \mu\text{M}$ ), melyek között az EP fajlagos átalakulása ( $v/\text{EP}$ ) állandó —  $4,3 \text{ sec}^{-1}$  — a mérés rövid periódusa alatt, akkor azt tapasztalhatjuk, hogy az EP képződés késés nélkül indul, kb. 1 sec-on belül szaturációs szintet ér el. Ugyanekkor az anorganikus P felszabadulás mértéke ( $\Delta\text{P}_i$ ) állandósul (4. ábra). Ez azt jelenti, hogy az anorganikus P felszabadulásának sebessége a szaturációs szintnél éri el adott körülmények között az optimumot.



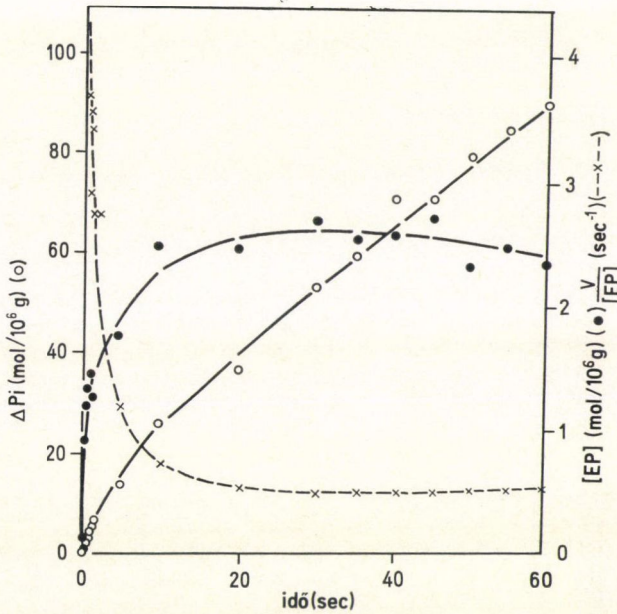
4. ábra. EP képződés és  $\text{P}_i$ -felszabadulás az enzimreakció kezdeti szakaszában. ○, △  $\text{P}_i$ ; ●, ▲ EP mennyisége.  $\text{CaCl}_2$  koncentráció: ●, △, 0,47; △, ▲, 0 mmol. Az üres körökön keresztül húzott vonal az EP képződés megfigyelt időbeli változásából (teli körökön áthúzott vonal) [számított  $\text{P}_i$  felszabadulás mértékét mutatja. KANAZAWA és mtsai (55)

E kísérletben a mért s az állandó fajlagos átalakulási sebesség feltételezése mellett az EP-értékekből számított  $\text{P}_i$ -értékek jól megegyeznek. Az EP-koncentráció közvetlenül mérhető, mivel e reakció-termék triklórecetsav (TCA) vagy perklorosav (PCA) hatására a kicsapást követően nem hidrolizálódik.

Közepes ATP-koncentrációknál azonban a fajlagos átalakulási sebesség jelentősen csökken (5. ábra). Az EP kb. 10 sec-on belül éri el a szaturációs szintet, az  $\text{P}_i$ -felszabadulás ugyanakkor lelassul, jelezvén, hogy a  $v/\text{EP}$  hányados megváltozott,  $4,3 \text{ sec}^{-1}$ -ről  $0,51 \text{ sec}^{-1}$ -re csökkent. E változásról közvetlen mérések alapján bebizonyosodott, hogy a jelenség az EP-lebomlás elsődrendű sebességi koefficiensének ( $k_d$ ) csökkenésével magyarázható. A nagyobb [EP] tehát kedvezőtlenül befolyásolja az EP lebomlását, azaz a  $\text{Ca}^{2+}$ -transzlokációt követően az SR belső terében bekövetkező Ca-ionizációt. Mind az EP képződés,



mind a  $\text{Ca}^{2+}$  transzlokációja  $\text{Mg}^{2+}$  függést mutat, ami valószínűsíti, hogy az igazi enzimszubsztrát a  $\text{Mg}-\text{ATP}$  komplex. Az EP-képződés kezdeti sebességének Lineweaver—Burk ábrázolása az ATP-koncentráció függésében, ill. különböző  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációk jelenlétében az ordinátát az origótól távolabb metsző egyenest ad, mely arra utal, hogy az EP enzimszubsztrát komplex közbejöttével keletkezik (6. ábra). Az EP-képződés Michaelis konstansa független



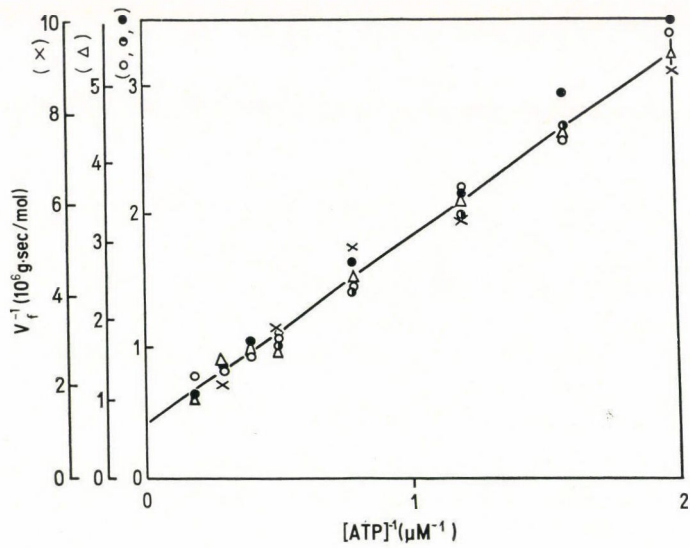
5. ábra.  $v/EP$  átmenet a reakció kezdeti szakában.  $\circ$ , a felszabaduló  $Pi$  mennyisége,  $\bullet$ ,  $EP$  mennyisége;  $\times$ ,  $Pi$  felszabadulás sebességének és az  $[EP]$  mennyiségének hányadosa ( $v/[EP]$ ) KANAZAWA és mtsai (55).

a közeg  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációjától ( $K_f = 4,6 \mu\text{M}$ ), de a maximális kezdeti sebesség ( $V_f$ ) értéke a  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció növelésével fokozódik, s  $3,25 \text{ mol EP}/10^6 \text{ g SR}$  fehérje  $x \text{ sec}$  értéknél állandósul (7. ábra). (A  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció EGTA alkalmazásával állítható be.)

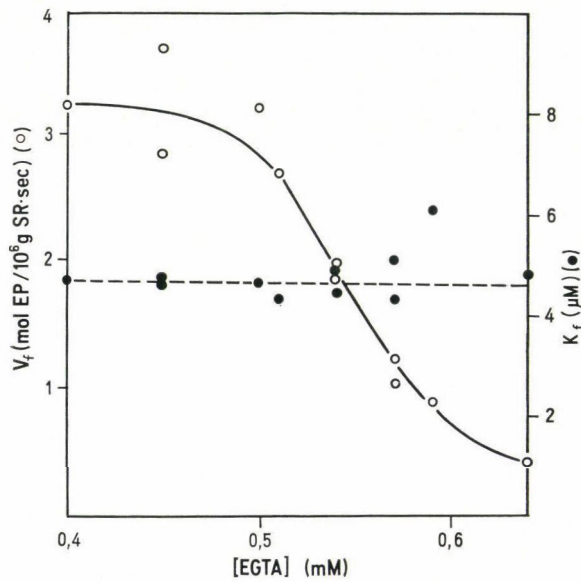
Ha a maximális kezdeti sebesség értékek reciprokait a szabad  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációk négyzeteinek reciprokaival szemben ábrázoljuk, az origón áthaladó egyeneseket kapunk. A  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációkat a  $\text{Ca-EGTA}$  komplex látszólagos disszociációs konstansa alapján számították ki (8. ábra). Az enzim- $\text{Ca}$ -ion komplex disszociációs konstansát ( $K_{Ca}$ ) a  $V_f = \frac{V_f^{\text{Ca} \rightarrow \infty}}{1 + \left(\frac{K_{Ca}}{\text{Ca}^{2+}}\right)^2}$  alapján

kiszámítva az  $0,93$ ;  $4,25$  és  $16,7 \mu\text{M}$ -nak adódott,  $0,1$ ;  $0,5$ , ill.  $2 \mu\text{M}$   $K_{CaEGTA}$  értékeket feltételezve.





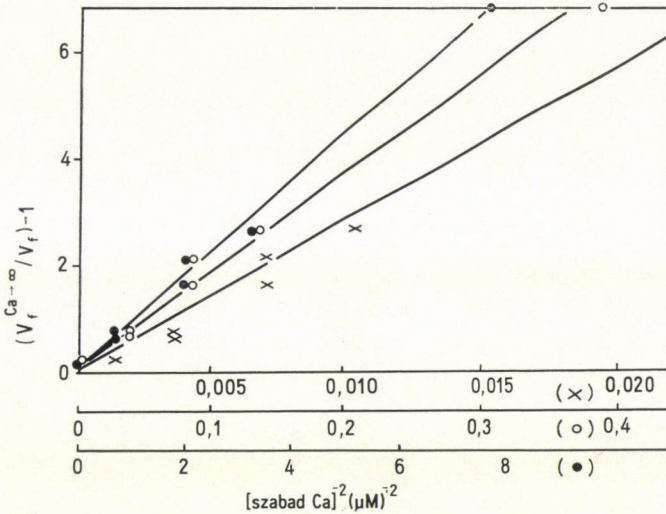
6. ábra. Az EP-képződés kezdeti sebességének Lineweaver – Burk ábrázolása különböző  $Ca^{2+}$ -koncentrációknál (EGTA-val beállítva). EGTA-koncentrációk: ●, 0,40; ○, 0,45; ▲, 0,51; △, 0,54; x, 0,57 mM KANAZAWA. és mtsai (55)



7. ábra. Az EP-képződés maximális kezdeti sebességének ( $V_f$ ) és Michaelis konstansának ( $K_f$ )  $Ca^{2+}$ -koncentráció (EGTA-val beállítva) függése.  $V_f$  (○);  $K_f$  (●) értékek az előző ábrából számíthatók. KANAZAWA és mtsai (55)



Az enzim-szubsztrát- $\text{Ca}^{2+}$  komplex kialakulása megítélhető, ha az inkubációs elegy  $\text{AT}^{32}\text{P}$ -t tartalmaz, s a különböző időpontokban egyrészt Millipor filteren végzett szűrést követően a szűrlet  $^{32}\text{P}$  koncentrációját, másrészt párhuzamos mintában az EP-képződés TCA-val történő leállítása után a képződött  $\text{E}^{32}\text{P}$  koncentrációját meghatározzuk. A szűrlet  $^{32}\text{P}$  tartalmának csökkenése s az  $\text{E}^{32}\text{P}$  fokozódása általában arányos, de ha az  $\text{E}^{32}\text{P}$  lebomlását, ill. az  $\text{E}^{32}\text{P}$  képződését lelassítjuk ADP-nek az inkubációs elegyhez történő adásával, akkor jelentős különbség mérhető a  $^{32}\text{P}$  mennyiségének szűrletben



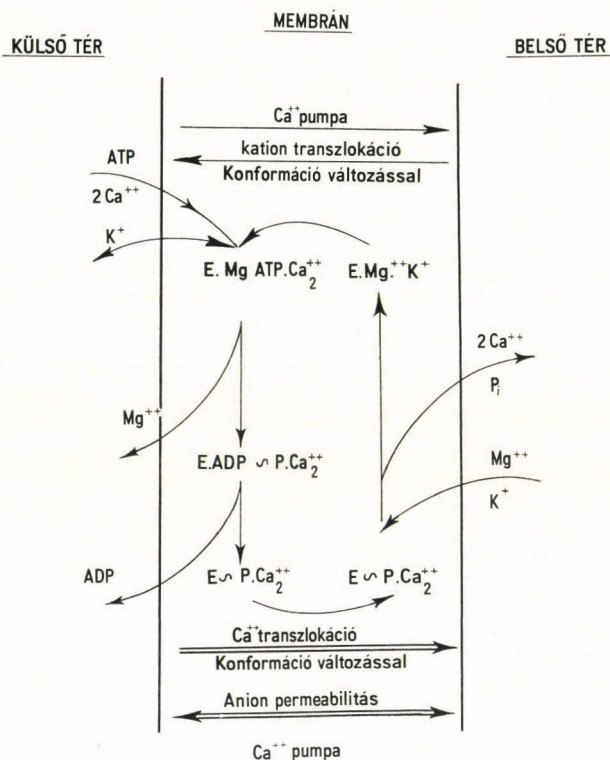
8. ábra. Az EP-képződés maximális kezdeti sebességének kettős reciprok ábrázolása a szabad  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációk négyzeteinek függvényében.  $V_f/\text{Ca} \rightarrow \infty/V_f - 1$ , ahol  $V_f/\text{Ca} \rightarrow \infty$  a végtelen  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációnál mért  $V_f$ , a 7. ábra adataiból újra ábrázolva a szabad  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció (amit a  $\text{Ca}$ —EGTA látszólagos disszociációs konstansa — 0,1 (●); 0,5 (○) vagy 2,0 (×)  $\mu\text{M}$  — alapján számítottak) négyzeteinek reciprokával szemben. KANAZAWA és mtsai (55)

fellépő csökkenése s a keletkező  $\text{E}^{32}\text{P}$  mennyisége között. Ez arra vezethető vissza, hogy a szűrletből hiányzó  $^{32}\text{P}$  egy része nem  $\text{E}^{32}\text{P}$ , hanem enzim-szubsztrát- $\text{Ca}$  komplex formájában van jelen az SR-ben s az utóbbi TCA hatására az SR csapadékról leválik, azaz veszteségként jelentkezik. Az enzim-szubsztrát komplex koncentrációnak és az EP-koncentrációnak a hányadosa jelentősen nő az alkalmazott ADP-koncentráció növelésére.

Amint arra már utaltunk, alacsony ATP-koncentrációnál az EP-képződés késés nélkül indul. Ha az EP-képződést jelzett  $\text{AT}^{32}\text{P}$ -vel tanulmányozzuk,  $\text{E}^{32}\text{P}$  keletkezik, de ha egy adott időpontban a közeghez jeletlen ATP-t adunk (az  $\text{AT}^{32}\text{P}$  hígítása céljából), ezt követően gyakorlatilag azonnal leáll az  $\text{E}^{32}\text{P}$  képződése és késés nélkül indul az  $\text{E}^{32}\text{P}$  lebomlása. Ezen adatok arra utalnak, hogy az enzim-szubsztrát komplex kialakulása közvetlenül megelőzi



az EP képződését a reakció szekvenciában, valamint, hogy az enzim-szubsztrát komplex képződés megfordított reakciója oly gyorsan megy végbe, hogy mondhatjuk kvázi equilibrium van a reagáló anyagok (enzim, Mg, ATP és a külső közegben levő Ca) és a reakció szekvenciában éppen az EP előtt levő komplex között. Az magától értetődő, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$  eszenciális az EP képződéséhez,



9. ábra. Ca-pumpa működésének vázlata.

mivel az EP-képződés teljesen gátolható a külső közegben alkalmazott EGTA-val.

A  $\text{Ca}^{2+}$  transzlokációjával,  $\text{Ca}^{2+}$  felvétellel kísért ATPáz reakciósor egyes lépéseit tünteti fel a 9. ábra.

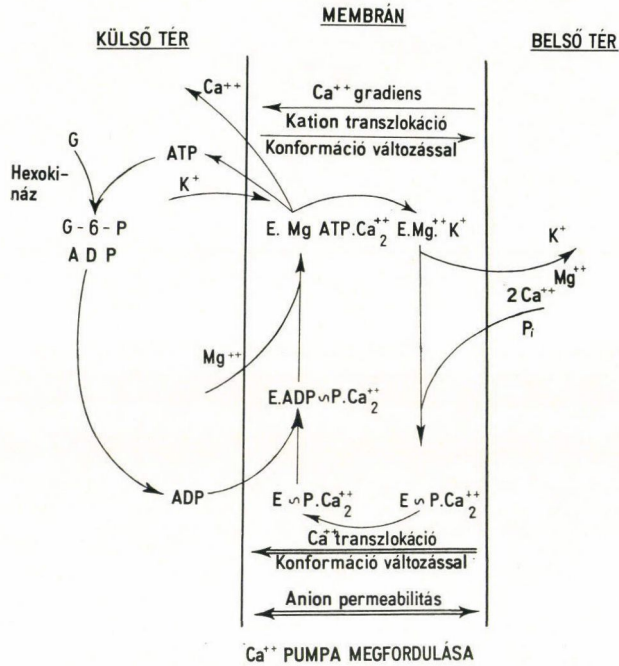
Láthatjuk, hogy az EP-képződésnek elengedhetetlen előfeltétele az enzim-szubsztrát  $\text{Ca}_2^{2+}$  komplex kialakulása. A szubsztrát jelen esetben a  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP. Mg-ionok jelenléte nélkül éppen úgy keletkezhet  $\text{Ca}_2^{2+}$ -ATP enzim komplex, mint  $\text{Ca}^{2+}$  távollétében  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP-enzim komplex, de az EP képződéséhez minden esetben  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP-enzim- $\text{Ca}_2^{2+}$  komplex kialakulása szükséges. A  $\text{Mg}^{2+}$ , ill. a  $\text{Ca}^{2+}$  kötődése random szekvenciában történhet. Az a tény, hogy linearitás jellemző az EP-képződés maximális kezdeti sebessége ( $V_f$ ) recip-



rokainak s a külső közeg szabad  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció négyzetei reciprokainak összefüggésére, arra enged következtetni, hogy a komplex kialakulása során 2  $\text{Ca}^{2+}$ -ion kötődik egy enzim-szubsztrát molekulához. Ez egybevág azzal a megfigyeléssel, hogy 2 : 1 stöchiometriai arány van a transzportált  $\text{Ca}^{2+}$  és a hidrolizált ATP között. Az EP képződése során ADP jelenik meg a külső közegben. E folyamat megfordítható, és EP-ből és ADP-ből ATP keletkezhet. Az ATP képződéséhez nincs szükség  $\text{Mg}^{2+}$  jelenlétére, bár az, amint láttuk, esszenciális az EP képződésénél. Ezek alapján az tételezhető fel, hogy az EP képződése az enzim- $\text{Mg}^{2+}$  -  $\text{ATPCa}^{2+}$  komplexből kétlépéses reakcióban megy végbe. Az első lépésben a  $\text{Mg}^{2+}$  a komplexből felszabadul, s így enzim-ATP- $\text{Ca}^{2+}$  komplex keletkezik, s a második lépésben történik meg az utóbbi komplex most már  $\text{Mg}^{2+}$  független átalakulása EP-vé ADP egyidejű felszabadulása mellett. Az EP képződése során a membránban iontranszlokációs folyamat lép fel, vagyis a külső közegből felvett  $\text{Ca}^{2+}$  az SR membrán belső felszínére kerül. Az EP átalakulása elvileg kétirányú lehet, vagy visszaalakítható a külső közeg összetételének megváltoztatásával (külső közeg Ca-ionjainak eltávolítása útján EGTA-val, ADP alkalmazásával) ATP-vé, vagy a transzlokációs folyamat befejező lépéseként az EP-Ca hidrolizál, s enzim,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{P}_i$  keletkezik. Az előző eset megvalósulásához  $\text{Mg}^{2+}$ -ra vagy külső  $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétére nincs szükség. Szükség van azonban a belső tér  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációjára. Ha ugyanis az SR-membrán  $\text{Ca}^{2+}$  permeabilitását növeljük a membránkötött Ca eltávolítása révén (17, 59) vagy Triton X-100 kezeléssel (112), a külső közegben alkalmazott EGTA a belső tér  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációját is lecsökkenti, s ilyenkor az ATP képződésének lehetősége EP-ből + ADP-ből megszűnik. Fokozott  $\text{Ca}^{2+}$  permeabilitás mellett tehát a reakció útja még *in vitro* kísérleti feltételek között is csak a másik út, vagyis az EP lebomlása lehet enzimmé és  $\text{P}_i$ -vé. E folyamat nem függ a belső vagy külső  $\text{Ca}^{2+}$  jelenlététől s a külső  $\text{Mg}^{2+}$  koncentrációtól, de nagymértékben függ a belső tér  $\text{Mg}^{2+}$  koncentrációjától. Az EP lebomlását 1 M  $\text{Mg}^{2+}$  + 1 M EP-hez kötődése aktiválja (50, 70). Tekintetbe kell venni azt a tény, hogy az SR fiziológiai körülmények között permeabilis a nem fehérje természetű anionokra. Ez azt jelenti, hogy a reakciótermékként felszabaduló anorg. P a külső közegbe, más anionok a külső közegből a belső térbe penetrálhatnak, s biztosíthatják az elektroneutralitást. Az EP hidrolízise során szabaddá váló enzim a belső térből Mg-iont s K-ionokat köt meg, és közben eredeti konformációs állapotába jut, az ionokat a belső térből a külső térbe juttatja. Ezt követően a transzlokációs folyamat kezdődhet előlről. Ily módon a FSR ATP elhasználása mellett  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció gradienst generálhat. Amennyiben a belső térben a szabad  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációt 0,1 mM alatt tartjuk, pl. oly módon, hogy a külső közeghez 3—5 mM oxalátot adunk, s az oxalát penetrálva az SR membránon az ott akkumulálódó Ca-ionok nagy részét komplexbe viszi, a  $\text{Ca}^{2+}$ -felvétel perceken át változatlan sebességgel megy végbe és annak mértéke arányos a  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációval. Az akkumuláció



mértéke 5—6  $\mu\text{M}/\text{mg}$  FSR/perc értéket is elérhet (71). Az oxaláthoz hasonló hatást fejtenek ki a foszfát, pirofoszfát stb. anionok. Az oxalát és más penetráló komplex képzők említett hatása is azonban csak az SR-membrán viszonylag alacsony  $\text{Ca}^{2+}$  permeabilitása mellett érvényesülhet. Ha a membrán  $\text{Ca}^{2+}$  permeabilitását pl. detergensekkel vagy a membránkötött Ca eltávolításával növeljük, az ATPáz Ca dependens aktivitása, vagyis az ún. extra ATP hasítás



10. ábra. A Ca-pumpa megfordított működésének vázlata

fokozódik, a  $\text{Ca}^{2+}$  transzport mechanizmus aktiválódik, de a mérhető  $\text{Ca}^{2+}$ -felvétel ( $\mu\text{M}$  Ca/mg FSR) értéke akár 0-ra csökkenhet, minthogy a transzlokáció során felvett  $\text{Ca}^{2+}$  azonnal kifolyhat a permeabilissá vált membránon. Így  $\text{Ca}^{2+}$  gradiens sem generálódhat.

Az utóbbi években az is bizonyítást nyert, hogy nemcsak az  $\text{ATP} \rightarrow \text{EP} + \text{ADP}$  reakciólépés reverzibilis, hanem a transzportmechanizmus utolsó lépése is, azaz a  $\text{Ca}^{2+}$  gradiens által reprezentált kémiai potenciál rovására a külső közegben levő ADP-ből s anorg. P-ből EP komplex kialakulásán keresztül ATP szintetizálódhat. Magát a folyamatot a 10. ábrán foglaltuk össze. Annak az elkerülésére, hogy a keletkező ATP a reakciót limitálja, az inkubációs közegben glukózt és hexokinázt alkalmazhatunk, s így, <sup>32</sup>P-vel jelzett anorg. foszfátot használva, a keletkező ATP mennyiségére a glukóz-6-<sup>32</sup>P mérése alapján következtethetünk. A kísérletek eredményei igazolták, hogy a FSR



Ca „pumpa” aktivitása teljesen megfordítható, azaz ozmotikus kémiai energia átalakulása során a  $\text{Ca}^{2+}$  gradiens energiájának rovására anorg. P-ből és ADP-ből ATP szintetizálódik (4, 16, 28, 62, 63, 65, 106, 111). A kifelé transzportált  $\text{Ca}^{2+}$  és szintetizálódó ATP aránya 2, tehát ugyanaz, mint a transzportmechanizmus fiziológias működése során. A Ca „pumpa” fordított működésének előfeltétele az SR-membrán viszonylagos  $\text{Ca}^{2+}$  impermeabilitása, ui. ha a membrán  $\text{Ca}^{2+}$  permeabilitását fokozzuk pl. detergens vagy Ca-ionoforok (88, 89) alkalmazásával a  $\text{Ca}^{2+}$  gradiens gyorsan lecsökken ATP képződése nélkül. Ez azt jelenti, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$  gradiens csak karrier — enzim működésén keresztül, azaz EP-képződéssel egybekötve képes ATP-szintézist megvalósítani.

A szarkoplazmatikus retikulum funkciójának megismerése szempontjából fontos annak a kérdésnek a tisztázása, hogy az SR által felvett Ca szabad Ca-ionként halmozódik fel az SR belső terében, vagy jelentős része egyszerűen csak az SR-membránhoz kötődik (48, 51, 100). Ez a probléma szorosan kapcsolódik ahhoz a kérdéshez, hogy az izom aktiválódása során az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció gyors fokozódása elsősorban az ATP jelenlétében kötött  $\text{Ca}^{2+}$  deszorpciójának, vagy a  $\text{Ca}^{2+}$  gradiens mentén, és a membrán permeabilitás fokozódása miatt fellépő mobilizációnak következménye-e. Ca-ionoforok, pl. x-537A használata lehetővé tették a felvetett kérdés megválaszolását (23, 88, 89). Kimutatták, hogy az előzetesen ATP jelenlétében akkumulált  $\text{Ca}^{2+}$  gyors felszabadulása következik be Ca-ionofór hatására. A  $\text{Ca}^{2+}$  mozgósítása nem a transzport ATPáz esetleges gátlása miatt lép fel, sőt ilyenkor a transzport ATPáz aktivitása jelentősen fokozódik, jelölül annak, hogy az ionofórok segítségével folyamatosan a külső közegbe jutó  $\text{Ca}^{2+}$  a transzport ATPáz aktivitását tartósan emelt szinten tartja. A gyors mobilizáció az iongradiens létezése mellett szól. Ugyanezt tanúsítja SCARPA és mtsainak (89) azon kísérleti eredménye is, mely a  $\text{La}^{3+}$  hatását demonstrálja FSR ATPáz aktivitására és  $\text{Ca}^{2+}$  felvételére. 1 mM  $\text{La}^{3+}$  nem váltott ki  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulást, azaz a Ca-nak legalábbis nagy része nem volt hozzáférhető a  $\text{La}^{3+}$ -nal történő lecserélés számára. Ez arra utal, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$  elsősorban a belső térben, s nem pedig az SR felszíni kötőhelyein tárolódik.

#### *Ca-mobilizáció kérdése*

$\text{Ca}^{2+}$ -mobilizáció szempontjából összefoglalva az eddigiekben elmondottakat, megállapíthatjuk, hogy

1. az SR membránon keresztül Ca-Mg dependens ATPáz közreműködésével több nagyságrendű  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció gradiens generálódhat;
2. a membránra jellemző a viszonylag alacsony permeabilitás;
3. a  $\text{Ca}^{2+}$  permeabilitás növelése pl. detergensekkel, vagy a gradiens mentén fokozott passzív transzport megvalósítása révén ionofórokkal (x-537A), ATPáz egyidejű fokozódása ellenére a gradiens gyors csökkenéséhez vezet;



4. a  $\text{Ca}^{2+}$  nagy része nem felszíni kötőhelyeken tárolódik, mert akkor  $\text{La}$  ionnal felszabadítható lenne;
5. az ionofórok vagy detergenssek hatására azonnal fellépő  $\text{Ca}^{2+}$  mobilizáció arra utal, hogy a  $\text{Ca}$  az SR-ben gyorsan mobilizálható, azaz ionos formában van jelen (vagy nagyon könnyen disszociálható);
6. az aktív transzport vagy passzív elcsorgás (leakage) során az elektro-neutralitás törvényének érvényesnek kell maradni;
7. a  $\text{Ca}^{2+}$  akkumulációja során egyenlőtlen ionmegoszlás alakul ki az SR belső tere, ill. az intracelluláris tér között.

A Ca-pumpa megfordulása — mire fiziológias körülmények között nincs lehetőség — nem eredményezhet az *in vivo* viszonyokra jellemző gyors  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizációt. MARTONOSI (7) számítása szerint míg a pumpa megfordulása maximálisan 5–6  $\mu\text{M}/\text{mg}$  fehérje/perc  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulást tenne lehetővé, *in vivo* a  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulás sebessége kb. 3000  $\mu\text{M}/\text{mg}$  fehérje/perc. Az ellentmondások feloldására csak egy lehetőség kínálkozik, annak a feltételezése, hogy az ingerületi folyamat során az SR-membrán Ca-permeabilitása nő meg igen jelentősen, a membrán komponensek konformációváltozásának következtében, s ez eredményezi a több nagyságrendű  $\text{Ca}^{2+}$ -gradiens mentén a  $\text{Ca}^{2+}$  gyors mobilizációját.

Az egyenlőtlen ionmegoszlás, az SR-membrán  $\text{K}^+$  s anionpermeabilitása, a viszonylag alacsony Ca-permeabilitás és az intracelluláris tér magas, nem penetráló aniontartalma (főként fehérje) alapján jogosnak tűnik annak feltételezése, hogy az SR-membránnak nyugalmi potenciálja van, mely a felszínmembránéhoz hasonlóan  $\text{K}^+$  potenciál. Mindkét membránnak az intracelluláris tér felé eső felszíne elektro-negatív viselkedik a másik felszínrel szemben. Minthogy a  $\text{Cl}^-$  gradiens a káliuméval ellentétes irányú, és töltése is ellentétes, a gradiens azonos polaritást biztosít. A  $\text{Cl}^-$  permeabilitás miatt a  $\text{Cl}^-$  gradiens, ill.  $\text{Cl}^-$  potenciál a  $\text{K}^+$  potenciál értékre áll be. Az SR membránpotenciálja feltehetően hozzájárul a membrán metastabil állapotának, ill. az egyes komponensek nyugalmi konformációjának fenntartásához. Nyugalomban a viszonylagosan alacsony Ca-permeabilitás miatt a Ca-gradiens lényegesen nem módosítja a membránpotenciál értékét. Abban az esetben viszont, ha a Ca-permeabilitás fokozódik — az ingerületi folyamat alatt —, ez a  $\text{Ca}^{2+}$ -potenciál manifestálódását, ill. akár a membránpotenciál polaritásának megfordulását is eredményezheti. A  $\text{Ca}^{2+}$ -potenciál nagyságát a  $\text{Ca}^{2+}$ -gradiens gyors csökkenése limitálhatja. A membránpotenciál csökkenése — hipopolarizációja — konformációváltozást, permeabilitásnövekedést,  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizációt eredményez, ami a potenciál további csökkenését, a permeabilitás további növekedését stb. okozza.

Hangsúlyozni szeretném, hogy a permeabilitás-fokozódásra vezető hipopolarizáció elvileg többféleképpen valósulhat meg: az SR-membrán  $\text{K}^+$



permeabilitásának (konduktancia,  $g_K$ ) csökkenése, vagy átmenetileg az intracelluláris (T-SR junkcióban) klorid koncentráció fokozódás, ill. mindkettő következtében.

KASAI és MYAMOTO (56) kísérleti eredményei pl. azt bizonyítják, hogy a külső közeg nem penetráló anionjainak (metilszulfát) lecserélése klorid ionokra  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizációt eredményez. Ez nem zárja ki azonban annak lehetőségét, — ismerve a T-rendszer  $\text{Ca}^{2+}$ -jának „trigger” szerepére utaló adatokat (8), hogy a fiziológiás körülmények között a T-rendszer intracelluláris felszínéről felszabaduló, vagy a membránon az ingerület alatt a tubuláris folyadékból a junkcionális térbe jutó  $\text{Ca}^{2+}$  a junkcionális SR-membrán felszínéhez kötődve a  $\text{K}^+$  permeabilitás csökkentése révén váltja ki az SR-membrán  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizációt lehetővé tevő hipopolarizációját, ill. Ca-permeabilitásának fokozódását. E kérdés eldöntése s a mechanizmus tisztázása a jövő feladata. A probléma megközelítését *in vitro* körülmények között a rendelkezésre álló különböző módszerek olyan körülmények között való alkalmazása teheti lehetővé, melyek megközelítik az *in vivo* viszonyokat.

Saját kísérleti eredményeink amellet szólnak, hogy a reverzibilis permeabilitás változás lehetőségét a membránkötött Ca és a membrán komponensek által képzett komplex térszerkezet változása, azaz a komponensek kölcsönhatásának módosulása teremti meg.

#### IRODALOM

1. ASHLEY, C. C. és RIDGWAY, E. B.: Aequorin-calcium luminescence and its application to muscle physiology. in "Calcium and cellular function" (Ed.: A. W. Cuthbert) Macmillan and Co., London p. 42 (1970).
2. ASHLEY, C. C. és RIDGWAY, E. B.: On the relationships between membrane potential, calcium transient and tension in simple barnacle muscle fibers. *J. Physiol.* **209**, 105 (1970).
3. ANDERSSON-CEDERGREN, E.: Ultrastructure of motor end-plate and sarcoplasmic components of mouse muscle fiber as revealed by three dimensional reconstructions from serial sections. *J. Ultrastructure Res. Suppl.* **1**, 1 (1959).
4. BARLOGIE, B., HASSELBACH, W. és MAKINOSE, M.: Activation of calcium efflux by ADP and inorganic phosphate. *FEBS Letters* **12**, 267 (1971).
5. BENNETT, H. S.: Modern concepts of structure of striated muscle. *Am. J. Phys. Med.* **34**, 46. (1955).
6. BENNETT, H. S.: The structure of striated muscle as seen by the electron microscope. in "The Structure and Function of Muscle" (Ed: G. Bourne) Vol. **1**, p. 137 Academic Press New York (1960).
7. BENNETT, H. S. és PORTER, K. R.: An electron microscope study of sectioned brast muscle of the domestic fowl. *Am. J. Anat.* **93**, 61 (1953).
8. BIANCHI, C. P.: Pharmacological actions on excitation-contraction coupling in striated muscle. *Fed. Proc.* **27**, 126 (1968).
9. BOLAND, R., MARTONOSI, A.: Developmental changes in composition and function of SR. *J. Biol. Chem.* **249**, 612 (1974).
10. CALDWELL, P. C.: Calcium and the contraction of Maia muscle fibers. *Proc. Roy. Soc. London, Ser. B.* **160**, 512 (1964).
11. CONSTANTIN, L. L., FRANZINI-ARMSTRONG, C., PODOLSKY, R. J.: Localization of calcium accumulating structures in striated muscle fibers. *Science* **147**, 158 (1965).
12. CONSTANTIN, L. L. és PODOLSKY, R. J.: Calcium inactivation and relaxation of isolated myofibrils. *Fed. Proc.* **23**, 420 (1964).



13. CONSTANTIN, L. L. és PODOLSKY, R. J.: Calcium localization and the activation of striated muscle fibers. *Fed. Proc.* **24**, 1145 (1965).
14. CONSTANTIN, L. L. és PODOLSKY, R. J.: Evidence for depolarization of the internal membrane system in activation of frog semitendinosus muscle. *Nature* **210**, 483 (1966).
15. CONSTANTIN, L. L. és PODOLSKY, R. J.: Depolarization of the internal membrane system in the activation of frog skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* **50**, 1101 (1967).
16. DEAMER, D. V., BASKIN, R. J.: ATP synthesis in sarcoplasmic reticulum. *Acta Biophys. Biochem.* **153**, 47 (1972).
17. DUGGAN, P. F. és MARTONOSI, A.: Sarcoplasmic reticulum IX. The permeability of sarcoplasmic reticulum membranes. *J. Gen. Physiol.* **56**, 147 (1970).
18. EBASHI, S.: Calcium binding activity of vesicular relaxing factor. *J. Biochem. (Tokyo)* **50**, 236 (1961).
19. EBASHI, S.: The sarcoplasmic reticulum and excitation contraction coupling. in "Molecular Biology of Muscle Contraction" (Ed: S. Ebashi, F. Oosawa, T. Sekine és Y. Tonomura) Vol. **9**, p. 197 Elsevier, Amsterdam
20. EBASHI, S. és LIPMAN, F.: Adenosine-triphosphatase-linked concentration of calcium ions in a particulate fraction of rabbit muscle. *J. Cell Biol.* **14**, 389 (1962).
21. ELISON, C., FAIRHURST, A. S., HOWELL, J. N., JENDEN, D. J.: Calcium uptake in glycerol extracted rabbit psoas muscle fibers I. Biochemical properties and conditions for uptake. *J. Cell. Comp. Physiol.* **65**, 133 (1965).
22. ENDO, M.: Entry of dye into sarcotubular system of muscle. *Nature* **202**, 1115 (1964).
23. ENTMANN, M. L., ALLEN, J. C., BORNET, E. P., GILLETTE, P. C., WALLICK, E. T., SCHWARTZ A.: Mechanisms of calcium accumulation and transport in cardiac relaxing system (sarcoplasmic reticulum membranes); effects of verapamil, D-600, X-537A and A23187. *J. Mol. Cell. Cardiology* **4**, 681 (1972).
24. FAWCETT, D. W. és REVEL, J. P.: The sarcoplasmic reticulum of a fast acting fish muscle. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **10**, Suppl. 89 (1961).
25. FIEN, W., HASSELBACH, W.: The effect of diethylether upon the function of the vesicles of sarcoplasmic reticulum. *Europ. J. Biochem.* **9**, 574 (1969).
26. FRANZINI-ARMSTRONG, C. és PORTER, K. R.: Sarcolemmal invaginations and T-system in fish muscle fibers. *Nature* **202**, 355 (1964).
27. FRANZINI-ARMSTRONG, C. és PORTER, K. R.: Sarcolemmal invaginations constituting the T-system in fish muscle fibers. *J. Cell Biol.* **22**, 675 (1964).
28. FRIEDMAN, Z. és MAKINOSE, M.: Phosphorylation of skeletal muscle microsomes by acetyl phosphate. *FEBS Letters* **11**, 69 (1970).
29. GAGE, P. W. és EISENBERG, R. S.: Action potentials without contractions in frog skeletal muscle fibers with disrupted transverse tubules. *Science* **158**, 1702 (1967).
30. HANSON, J. és HUXLEY, H. E.: Structural basis of the cross-striations in muscle. *Nature* **172**, 530 (1953).
31. HANSON, J. és HUXLEY, H. E.: The structural basis of contraction in striated muscle. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **9**, 228 (1955).
32. HANSON, J. és LOWY, J.: Comparative studies on the structure of contractile systems. *Circulation Res.* **15**, (Suppl. 2.) 4. (1964).
33. HASSELBACH, W.: Relaxation and the sarcotubular calcium pump. *Fed. Proc.* **23**, 909 (1964).
34. HASSELBACH, W.: ATP-driven active transport of calcium in the membranes of the sarcoplasmic reticulum. *Proc. Roy. Soc. London Ser. B.* **160**, 501 (1964).
35. HASSELBACH, W.: Relaxing factor and the relaxation of muscle. *Progr. Biophys. Biophys. Chem.* **14**, 167 (1964).
36. HASSELBACH, W. és MAKINOSE, M.: Die Calciumpumpe der „Erschlaffungsgrana“ des Muskels und ihre Abhängigkeit von der ATP-Spaltung. *Biochem. Z.* **333**, 518 (1961).
37. HASSELBACH, W. és MAKINOSE, M.: ATP and active transport. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **7**, 132 (1962).
38. HASSELBACH, W. és MAKINOSE, M.: Über der Mechanismus des Calciumtransportes durch die Membranen des Sarkoplasmatischen Reticulums. *Biochem. Z.* **339**, 94 (1963).
39. HUXLEY, H. E.: The double array of filaments in cross striated muscle. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **3**, 631 (1957).
40. HUXLEY, A. F.: Muscle structure and theories of contraction. *Progr. Biophys. Biophys. Chem.* **7**, 257 (1957).
41. HUXLEY, H. E.: The mechanism of muscular contraction. *Science* **164**, 1356 (1969).
42. HUXLEY, H. E.: Electron microscopic studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle. *J. Mol. Biol.* **7**, 281 (1963).



43. HUXLEY, A. F. és PEACHEY, L. D.: Local activation of crab muscle. *J. Cell Biol.* **23**, 107A (1964).
44. HUXLEY, A. F. és STRAUB, R. W.: Local activation and interfibrillar structures in striated muscle. *J. Physiol.* **143**, 40P (1958).
45. HUXLEY, A. F. és TAYLOR, R. E.: Local activation of striated muscle fibers. *J. Physiol.* **144**, 426 (1958).
46. IKEMOTO, N., BHATNAGAR, G. M., GERGELY, J.: Fractionation of solubilized sarcoplasmic reticulum. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **44**, 1510 (1971).
47. IKEMOTO, N., SRETER, F. A., NAKAMURA, A. és GERGELY, J.: Tryptic digestion and localization of calcium uptake and ATPase activating in fragments of sarcoplasmic reticulum. *J. Ultrastructure Res.* **23**, 216 (1968).
48. INESI, G.: Active transport of calcium ion in sarcoplasmic membranes. *Annual Rev. Biophys. Bioengineering* **1**, 191 (1972).
49. INESI, G., GOODMAN, J., WATANABE, S.: Effect of diethylether on the adenosine triphosphatase activity and the calcium uptake of fragmented sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **242**, 4637 (1967).
50. INESI, G., MARING, E., MURPHY, A. J. és MCFARLAND, B. H.: A study of the phosphorylated intermediate of sarcoplasmic reticulum ATPase. *Arch. Biochem. Biophys.* **133**, 285 (1970).
51. INESI, G. és SCARPA, A.: Fast kinetics of adenosine triphosphate dependent  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by fragmented sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry* **11**, 356 (1972).
52. INESI, G. és ALMENDARES, J.: Interaction of fragmented sarcoplasmic reticulum with  $^{14}\text{C}$ -ADP,  $^{14}\text{C}$ -ATP and  $^{32}\text{P}$ -ATP. Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ . *Arch. Biochem. Biophys.* **126**, 733 (1968).
53. KANAZAWA, T., SAITO, M., TONOMURA, Y.: Formation and decomposition of a phosphorylated intermediate in the reaction of  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -dependent ATPase. *J. Biochem. (Tokyo)* **67**, 693 (1970).
54. KANAZAWA, T., YAMAMOTO, S. és TONOMURA, Y.: ATP formation from ADP and a phosphorylated intermediate of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent ATPase in fragmented sarcoplasmic reticulum. *J. Biochem. (Tokyo)* **68**, 593 (1970).
55. KANAZAWA, T., YAMADA, S., YAMAMOTO, T. és TONOMURA, Y.: Reaction mechanism of the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle V. Vectorial requirements for calcium and magnesium ions of three partial reactions of ATPase; Formation and decomposition of phosphorylated intermediate and ATP formation from ADP and the intermediate. *J. Biochem. (Tokyo)* **70**, 95 (1971).
56. KASAI, M. és MIYAMOTO, H.: Depolarization induced calcium release from sarcoplasmic reticulum membrane fragments by changing ionic environment. *FEBS Letters* **34**, 299 (1973).
57. KÖVÉR A.: Hozzászólás. *Symp. Biol. Hung.* **8**, 61 (1968).
58. KÖVÉR A., SZABOLCS M., CSABAI A. és OLÁH É.: The effect of trypsin on the calcium uptake and enzymochemical properties of sarcoplasmic reticular fraction. *Acta Biochem. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **9**, 339 (1970).
59. KÖVÉR A., SZABOLCS M., CSABAI A., NAGY Z.: The role of membrane-bound  $\text{Ca}^{2+}$  in the regulation of the function of sarcoplasmic reticulum. *Acta Biochem. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **9**, 349 (1974).
60. KÖVÉR A., SZABOLCS M., CSABAI A., KÓNIA L.: Effect of detergents of the cholinesterase activity of sarcoplasmic reticulum of fish (*Amiurus nebulosus*) muscle. In: *Biochem. Intracell. Structures* (Ed: L. Wojteczak, W. Drabikowski, H. Strzelecka-Gołaszewska; PWN Warszawa) p. 167 (1969).
61. MAKINOSE, M.: The phosphorylation of the membranal protein of sarcoplasmic vesicles during active calcium transport. *Europ. J. Biochem.* **10**, 74 (1969).
62. MAKINOSE, M.: Calcium efflux dependent formation of ATP from ADP and orthophosphate by the membranes of the sarcoplasmic vesicles. *FEBS Letters* **12**, 269 (1971).
63. MAKINOSE, M.: Phosphoprotein formation during osmo-chemical energy conversion in the membrane of the sarcoplasmic reticulum. *FEBS Letters* **25**, 113 (1972).
64. MAKINOSE, M., HASSELBACH, W.: Der Einfluss von Oxalat auf den Calcium-Transport isolierter Vesikel des sarcoplasmatischen Reticulums. *Biochem. Z.* **343**, 360 (1965).
65. MAKINOSE, M. és HASSELBACH, W.: ATP synthesis by the reverse of the sarcoplasmic calcium pump. *FEBS Letters* **12**, 271 (1971).
66. MARTONOSI, A.: Role of phospholipids in ATPase activity and  $\text{Ca}^{2+}$  transport of fragmented sarcoplasmic reticulum. *Fed. Proc.* **23**, 913 (1964).
67. MARTONOSI, A.: Sarcoplasmic reticulum IV. Solubilization of microsomal ATPase. *J. Biol. Chem.* **243**, 71 (1968).



68. MARTONOSI, A.: Effect of phospholipase C on surviving muscle preparations. *Biochem. Biophys. Acta* **150**, 309 (1968).
69. MARTONOSI, A.: Stereoid effects on the  $\text{Ca}^{2+}$  ion transport of rabbit skeletal muscle microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **125**, 295 (1968).
70. MARTONOSI, A.: Sarcoplasmic reticulum. VII. Properties of a phosphoprotein intermediate implicated in calcium transport. *J. Biol. Chem.* **244**, 613 (1969).
71. MARTONOSI, A.: The structure and function of sarcoplasmic reticulum membranes. In: *Biomembranes*, (Ed: L. A. Manson) Vol. **1**, 191 Plenum Press, New York (1971).
72. MCCALLISTER, L. P. és HADEK, R.: The localization of calcium in skeletal muscle: Its distribution in muscles in which the caffeine-induced contracture was arrested. *J. Ultrastructure Res.* **45**, 59 (1973).
73. MEISSNER, G.: ATPase and  $\text{Ca}^{2+}$ -binding by the  $\text{Ca}^{2+}$  pump protein of sarcoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* **298**, 906 (1973).
74. MEISSNER, G., FLEISCHER, S.: The role of phospholipids in  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulated ATPase activity of sarcoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* **255**, 19 (1972).
75. MIGALA, A., AGOSTINI, B., HASSELBACH, W.: Tryptic fragmentation of calcium transport system in the sarcoplasmic reticulum. *Z. Naturforschung* **28c**, 1178 (1973).
76. NATORI, R.: Effect of Na and Ca ions on the excitability of isolated myofibrils. in: "Molecular Biology of Muscle Contraction". (Ed: S. Ebashi, F. Oosawa, T. Sekine and Y. Tonomura) Vol. **9**, p. 190 Elsevier Publ. Co., Amsterdam
77. NIEDERGERKE, R.: Local muscular shortening by intracellularly applied calcium. *J. Physiol. (London)* **128**, 12P (1955).
78. PEACHEY, L. D.: The sarcoplasmic reticulum and transverse tubules of the frog's sartorius. *J. Cell Biol.* **25**, 209 (1965).
79. PEACHY, L. D.: The role of transverse tubules in excitation-contraction coupling in striated muscle. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **137**, 1025 (1966).
80. PEASE, D. C., JENDEN, D. J. és HOWELL, J. N.: Calcium uptake in glycerol-extracted rabbit psoas muscle fibers II. Electron microscopic localization of uptake sites. *J. Cell. Comp. Physiol.* **65**, 141 (1965).
81. PODOLSKY, R. J. és CONSTANTIN, L. L.: The internal membrane system and muscle activation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **137**, 1038 (1966).
82. PORTER, K. R.: The sarcoplasmic reticulum. Its recent history and present status. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **10**, Suppl. 219 (1961).
83. PORTER, K. R. és PALADE, G. E.: Studies on the endoplasmic reticulum. III. Its form and distribution in striated muscle cells. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **3**, 269 (1957).
84. REGER, J. F.: The fine structure of neuromuscular junction and the sarcoplasmic reticulum of extrinsic eye muscles of *Fundulus heteroclitus*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **10**, Suppl. 111 (1961).
85. REVEL, J. P.: The sarcoplasmic reticulum of the bat cricothyroid muscle. *J. Cell Biol.* **12**, 571 (1962).
86. ROBERTSON, J. D.: Some features of the ultrastructure of reptilian skeletal muscle. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2**, 369 (1956).
87. SANDOW, A.: Excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Pharmacol. Rev.* **17**, 265 (1965).
88. SCARPA, A., INESI, G.: Ionophore mediated equilibration of calcium ion gradients in fragmented sarcoplasmic reticulum. *FEBS Letters* **22**, 273 (1972).
89. SCARPA, A., BALDASSARE, JUDITH, INESI, G.: The effect of calcium ionophores on fragmented sarcoplasmic reticulum. *J. Gen. Physiol.* **60**, 735 (1972).
90. SCHUEL, H., LORAND, L., SCHUEL, R. és ANDERSON, N. G.: Isolation of relaxing particles from rat skeletal muscles in zonal centrifuges. *J. Gen. Physiol.* **48**, 737 (1965).
91. SERAYDARIAN, K., MOMMAERTS, W. F. H. M.: Density gradient separation of sarcotubular vesicles and other particulate constituents of rabbit muscle. *J. Cell Biol.* **26**, 641 (1965).
92. SZABOLCS, M., KÖVÉR, A.: Effect of detergents and phospholipase C on the properties of sarcoplasmic reticulum fraction. *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **2**, Suppl. 104 (1967).
93. SUMIDA, M. és TONOMURA, Y.: Reaction mechanism of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent ATPase of SR from skeletal muscle. IX. Direct evidence for  $\text{Ca}^{2+}$  translocation coupled with formation of a phosphorylated intermediate. *J. Biochem.* **75**, 283 (1974).
94. TILLACK, T. W.: The ultrastructure of developing sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **249**, 624 (1974).
95. UCHIDA, K., MOMMAERTS, W. F. H. M. és MERETSKY, D.: Myosin in association with preparations of sarcotubular vesicles from muscle. *Biochem. Biophys. Acta* **104**, 287 (1965).



96. VERATTI, E.: Recherche sulle fine struttura della fibra muscolare striata. *Memorie Inst. Lomb. Cl. Sci. e Nat.* **19**, 87 (1902).
97. VERATTI, E.: Investigations on the fine structure of the striated muscle fibre. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **10**, Suppl. 3 (1961).
98. WAUGH, R. A., SPRAY, T. L., SOMMER, J. R.: Fenestration of SR delineation by lanthanum acting as a fortuitous tracer and in situ negative stain. *J. Cell Biol.* **59**, 254 (1973).
99. WEBER, A.: On the role of calcium in the activity of adenosine 5'-triphosphate hydrolysis by actomyosin. *J. Biol. Chem.* **234**, 2764 (1959).
100. WEBER, A.: Energized calcium transport and relaxing factors. in: "Current Topics in Bioenergetics" (Ed: D. R. Sanadi) Vcl. **1**, p. 203. Academic Press New York and London.
101. WEBER, A. és HERZ, R.: Requirement for calcium in the syneresis of myofibrils. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **6**, 364 (1961).
102. WEBER, A. és HERZ, R.: The binding of calcium to actomyosin systems in relation to their biological activity. *J. Biol. Chem.* **238**, 599 (1963).
103. WEBER, A. és HERZ, R.: Study on the physiological mechanism regulating contraction and relaxation of actomyosin systems, in "Biochemistry of Muscle Contraction" (Ed: J. Gergely) p. 222. Little, Brown and Co., Boston.
104. WEBER, A., HERZ, R. és REISS, I.: The regulation of myofibrillar activity by calcium. *Proc. Roy. Soc. London, Ser. B.* **160**, 489 (1964).
105. WEBER, A., HERZ, R. és REISS, I.: Study of the kinetics of calcium transport by isolated fragmented sarcoplasmic reticulum. *Biochem. Z.* **345**, 329 (1966).
106. YAMADA, S., TONOMURA, Y.: Phosphorylation of the  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum coupled with cation translocation. *J. Biochem. (Tokyo)* **71**, 1101 (1972).
107. YAMADA, S., YAMAMOTO, T., KANAZAWA, T., TONOMURA, Y.: Reaction mechanism of the  $\text{Ca}^{2+}$  dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle. VII. Co-operative transition of ATPase activity during the initial phase. *J. Biochem.* **70**, 279 (1971).
108. YAMADA, S., YAMAMOTO, T. és TONOMURA, Y.: Reaction mechanism of the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle III.  $\text{Ca}^{2+}$  uptake and ATP splitting. *J. Biochem.* **67**, 789 (1970).
109. YAMADA, S., TONOMURA, Y.: Reaction mechanism of the  $\text{Ca}^{2+}$  dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle VII. Recognition and release of  $\text{Ca}^{2+}$  ions. *J. Biochem.* **72**, 417 (1972).
110. YAMADA, S., SUMIDA, M., TONOMURA, Y.: Reaction mechanism of the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent ATPase of SR from skeletal muscle VIII. Molecular mechanism of the conversion of osmotic energy to chemical energy in the SR. *J. Biochem.* **72**, 1537 (1972).
111. YAMADA, S. és TONOMURA, Y.: Reaction mechanism, of the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent ATPase of SR from skeletal muscle IX. Kinetic studies in the conversion of osmotic energy to chemical energy in the sarcoplasmic reticulum. *J. Biochem.* **74**, 1091 (1973).
112. YAMAMOTO, T. és TONOMURA, Y.: Reaction mechanism of the  $\text{Ca}^{2+}$  dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle I. Kinetic studies. *J. Biochem. (Tokyo)* **62**, 558 (1967).
113. YAMAMOTO, T. és TONOMURA, Y.: Reaction mechanism of the  $\text{Ca}^{2+}$  dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle II. Intermediate formation of phospheryl-protein. *J. Biochem. (Tokyo)* **64**, 137 (1968).
114. YAMAMOTO, T., YODA, A. és TONOMURA, Y.: Reaction mechanism of the  $\text{Ca}^{2+}$  dependent ATPase of SR from skeletal muscle IV. Hyroxamate formation from a phosphorylated intermediate and 2 hydroxy-5 nitrobenzyl hydroxylamine. *J. Biochem. (Tokyo)* **69**, 807 (1971).
115. YU, B. P., DE MARTINS, F. D. és MASORO, E. J.: Isolation of  $\text{Ca}^{2+}$  sequestering sarco-tubular membranes from rat skeletal muscle. *Anal. Biochem.* **24**, 523 (1968).
116. ZEBE, E. és HASSELBACH, W.: Über die Akkumulation von Calcium im sarkoplasmatischen Reticulum von Insectenmuskeln. *Z. Naturforsch.* **21b**, 1248 (1966).