

# A SZARKOPLAZMATIKUS RETIKULUM MEMBRÁNJÁNAK STRUKTURÁLIS ÉS FUNKCIONÁLIS SAJÁTSÁGAI

CSABAI ATTILA, KÖVÉR ANDRÁS és SZABOLCS MÁRTON

Debreceni Orvostudományi Egyetem Központi Kutató Laboratóriuma, Debrecen

Az előző közlemény (KÖVÉR és SZABOLCS 1975) elsősorban irodalmi adatok alapján részletesen foglalkozik a szarkoplazmatikus retikulum (SR) funkciójával. Ennek rövid, leegyszerűsített lényege a következő: az ingerületi folyamat alatt az SR-ből mobilizálódó  $Ca^{2+}$  aktiválja a kontraktilis rendszert, s ez vezet az izom összehúzódásához; ezt követően az SR  $Ca^{2+}$  akkumulációja folytán az intracelluláris szabad  $Ca$ -ion koncentráció ismét nyugalmi szintre csökken, s bekövetkezik a relaxáció.

A szarkoplazmatikus retikulumnak az izomfunkcióban betöltött, fent vázolt szerepe általánosságban viszonylag rövid idő alatt tisztázódott, működésének molekuláris biológiai alapja azonban még ma is kevésbé világos, mint pl. a kontrakcióban szerepet játszó miofibrilláris fehérjéké. Többek között keveset tudunk az SR membránjának permeabilitási viszonyairól, holott a permeabilitás változásának nyilvánvalóan fontos szerepe van a kontrakciós-relaxációs ciklus szabályozásában.

Ismertetendő kísérleteink objektuma az izom homogenizálása után differenciál centrifugálással előállított fragmentált szarkoplazmatikus retikulum (FSR) volt. Különböző tényezők hatását vizsgáltuk az FSR  $Ca$  felvételére, ATPáz aktivitására és kolinszteráz aktivitására. Vizsgálataink során összefüggéseket kerestünk a felsorolt funkciók és az FSR-membrán molekuláris struktúrájának rendezettsége között.

## Methodikai rész

Az FSR-preparátumot törpeharcsa fehér vázizmaiból a már korábban leírt módszer (SZABOLCS et al, 1966) szerint állítottuk elő. A 8000 g és 25 000 g között nyert frakciót 0,6 M KCl-ban szuszpendáltuk, majd 25 000 g-nél 1 óráig centrifugáltuk a miofibrilláris eredetű fehérjeszennyeződés eltávolítása végett. Mivel a törpeharcsa fehér izma gyakorlatilag mitokondrium-mentes, preparátumunk kizárólag FSR vezikulákat tartalmazott. Egyes esetekben nyúl vázizmából állítottuk elő az FSR-t.

Az FSR Ca felvételének meghatározásához  $^{45}\text{Ca}$ -izotópot használtunk. A kísérletek egy részében Millipore szűrőt alkalmaztunk (KÖVÉR és mtsai, 1974), más esetekben cellulóz oszlop segítségével történt a Ca-felvétel vizsgálata (SZABOLCS és KÖVÉR 1966). Az FSR által felvett  $\text{Ca}^{2+}$  mobilizációjának vizsgálata ugyancsak cellulóz oszlopon történt.

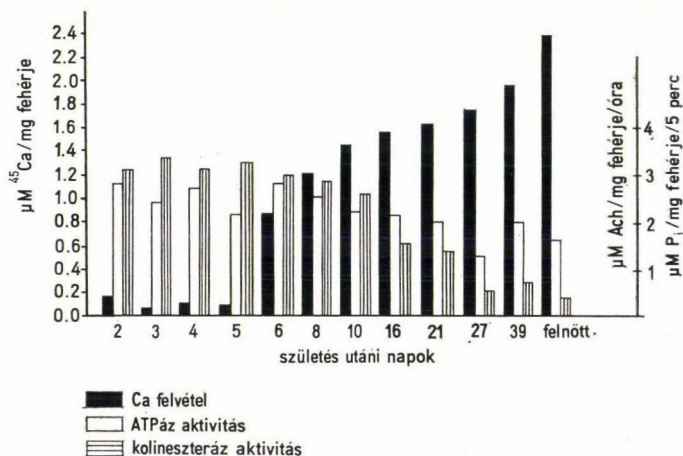
Az ATPáz aktivitást inkubációs elegyben mértük. A felszabaduló anorganikus foszfát ( $\text{P}_i$ ) mennyiségét TAUSSKY és SHORR (1953) szerint határoztuk meg.

A kolinszteráz aktivitást HESTRIN (1949) módszerével mértük.

### Eredményeink és megbeszélés

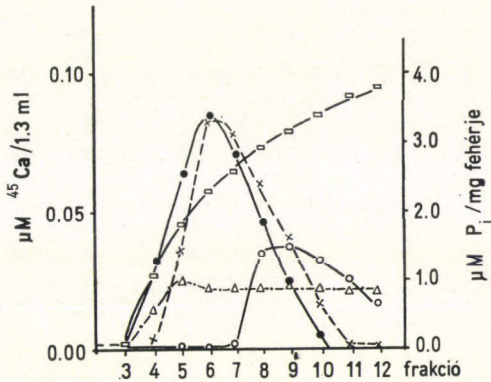
Az SR funkcióinak tanulmányozását célszerűnek látszott úgy kezdeni, hogy megvizsgáltuk e funkciók kialakulását az ontogenezis során. (Ezen kísérleteinkben az FSR-t különböző korú nyulak vázizmaiból állítottuk elő.) Az 1. ábrán láthatjuk, hogy a posztnatális élet kezdetén a kolinszteráz aktivitás és a  $\text{Ca}^{2+}$  távollétében mért ATPáz aktivitás (ún. alap ATPáz) magas, a Ca-felvétel alacsony. A posztnatális élet 6–10. napjától a kolinszteráz és ATPáz aktivitás csökken, a Ca-felvétel emelkedik, míg végül a felnőttre jellemző értékek meg nem jelennek (27. nap körül). További kísérleteinkben azt találtuk, hogy az extra ATP hasítás (a  $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétében és távollétében mért ATPáz aktivitás különbsége) is éppen a 6. napon jelenik meg, azaz pontosan akkor, amikor a Ca-felvétel emelkedése megkezdődik.

Eredményeinket úgy magyaráztuk (SZABOLCS és mtsai 1967), hogy az egyedfejlődés során a membrán molekuláris struktúrájának rendezettsége



I. ábra. A nyúlizom FSR ATPáz és kolinszteráz aktivitásának, valamint Ca-felvételének változása a posztnatális életben

fokozódik, s ez tükröződik a fenti funkcionális változásokban. Elképzeléseinket alátámasztják HOLLAND és PERRY (1969), valamint MARTONOSI és mtsai (1972) adatai is. Az SR alapvető funkcióira (Ca felvétel, ATPáz) vonatkozó eredmények értelmezése nem szorul bővebb magyarázatra, a kolineszterázról azonban még beszélnünk kell, mivel jelen tudásunk szerint ezen enzimaktivitásnak nincs szerepe az SR működésében. Véleményünk szerint a kolineszteráz molekula a membrán egyik építőköve, s az enzimaktivitása kevésbé jut érvényre, ha a membrán rendezett állapotban van. Ha azonban a membrán rendezettsége csökken, a kolineszteráz aktivitása minden esetben fokozódik



2. ábra. p-CMB hatása a hal FSR Ca felvételére és ATPáz aktivitására. A Ca-felvétel mérése cellulóz oszlopon történt. Ha az oszlopra hővel denaturált FSR-t vittünk, az ezután perfundált inkubáló oldat  $^{45}\text{Ca}$  tartalma teljes egészében átfolyik az oszlopon (●—●). (1,3 ml-es frakciókat gyűjtöttünk.) A natív FSR a felvett  $^{45}\text{Ca}$  nagy részét felveszi, ha a fel nem vett Ca (○—○) mennyiségét kivonjuk az oszlopra felvitt összes Ca (●—●) mennyiségéből, megkapjuk a natív FSR által felvett Ca mennyiségét. ×—× 0,1 mM p-CMB jelenlétében az FSR által fel nem vett Ca. □—□ az FSR ATPáz aktivitása Ca-felvétel alatt △—△ az FSR Ca-felvétel alatt mért ATPáz aktivitása 0,1 mM p-CMB jelenlétében

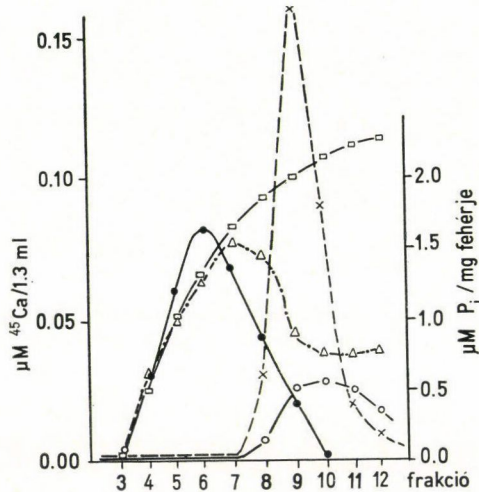
— mint ezt majd a további kísérleteink eredményei is mutatják. A membránnak ez a kolineszteráz típusú építőköve természetesen nem található meg valamennyi biológiai membránban.

További kísérleteinkben is az FSR-membrán rendezettségi állapotát kívántuk befolyásolni különböző ágensekkel. Ezeket aszerint csoportosíthatjuk, hogy a membrán mely komponensére hatnak: így a következőkben szó lesz fehérjére, lipidre, ill. a membrán-kötött  $\text{Ca}^{2+}$ -ra ható szerekéről.

Megvizsgáltuk különböző SH-gátlók hatását a törpeharcsa FSR Ca felvételére és ATPáz aktivitására (SZABOLCS és mtsai 1965, 1967). Az SH-gátlók közül a para-klórmerkuribenzonát (p-CMB) hatását mutatjuk be a 2. ábrán. 0,1 mM p-CMB gátolja mind az FSR Ca felvételét, mind a Ca jelenlétében mért ATPáz aktivitását.

0,1 mM p-CMB az FSR által előzetesen felvett  $\text{Ca}^{2+}$ -ot is képes mobilizálni, miközben a  $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétében mért ATPáz aktivitás csökken (3. ábra).

Érdekességként megjegyzem, hogy a 9. frakcióban mobilizálódott  $\text{Ca}^{2+}$  végkoncentrációja  $6 \times 10^{-5}$  M, ami *in vivo* elegendő a kontrakció kiváltásához.

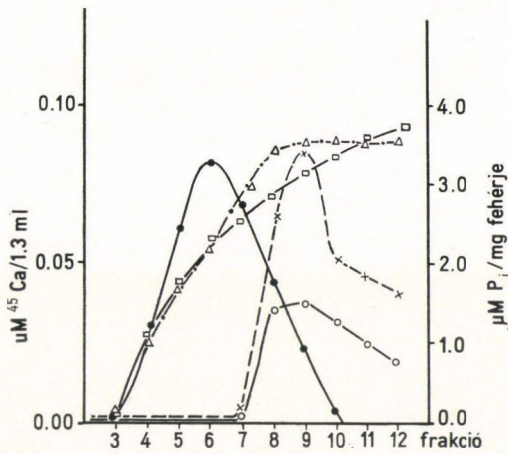


3. ábra. p-CMB hatása a hal FSR által előzetesen felvett Ca leadására és az ATPáz aktivitásra. Az ábramagyarázat ugyanaz, mint a 2. ábránál. A különbség az, hogy ebben a kísérletben a p-CMB nem volt végig jelen, hanem azt csak a  $^{45}\text{CaCl}_2$  tartalmú inkubáló oldat perfúziója után alkalmaztuk 0,1 mM koncentrációban (hatása csak a 7. frakció után jelentkezik)

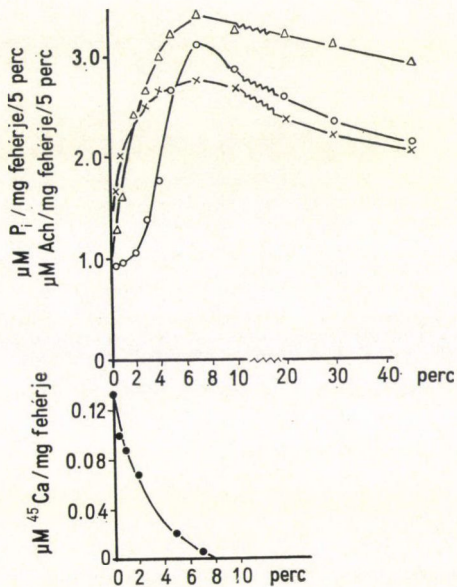
Az energiát szolgáltató ATPáz blokkolása tehát a Ca-felvétel gátlását okozza. Nem magyarázható azonban ugyanezzel a p-CMB-nek a  $\text{Ca}^{2+}$ -ot mobilizáló hatása, hiszen a Ca-pumpa gátlása önmagában ehhez nem elegendő (KÖVÉR és SZABOLCS 1975). Fel kell tehát tételezni, hogy ebben az esetben nemcsak az ATPáz, hanem egyéb membránfehérjék SH csoportjaival is reagál a p-CMB. E feltevés helyességét irodalmi adatok is támogatják (összefoglalóan MARTONOSI 1971), ugyanis az FSR-membránban háromféle SH csoportot tudtak elkülöníteni a NEM-mel való reakciójuk időállandója alapján.

Azt, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$  mobilizációját nem az ATPáz gátlása okozza, világosan bizonyítják a koffeinnel végzett kísérleteink (4. ábra). Láthatjuk, hogy a koffein hatására mobilizálódik a  $\text{Ca}^{2+}$ , miközben a  $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétében mért ATPáz aktivitás nemhogy csökkenne, hanem még fokozódik is. Ezt csakis az FSR-membrán permeabilitásának fokozódásával magyarázhatjuk.

Ha az FSR-t tripszinnel emésztjük (KÖVÉR és SZABOLCS 1968), az emésztési idő előrehaladtával a Ca-felvétel csökken, a kolinszteráz aktivitás emelkedik, az ATPáz aktivitások ( $\text{Ca}^{2+}$ -mal és  $\text{Ca}^{2+}$  nélkül) szintén fokozódnak, az extra ATP hasítás kezdetben emelkedik, majd a Ca-felvétel megszűnésével egy időben eltűnik (5. ábra).



4. ábra. Koffein hatása a hal FSR által előzetesen felvett Ca leadására és az ATPáz aktivítására. Ábramagyarázat ugyanaz, mint a 3. ábránál, de itt 0,1 mM p-CMB helyett 50 mM koffeint alkalmaztunk



5. ábra. Tripszin hatása a hal FSR funkcionális sajátságaira. Tripszin: fehérje arány = 1 : 62. ○—○ ATPáz aktivitás Ca-mentes közegben; ×—× ATPáz aktivitás 0,12 mM Ca-mal; △—△ kolinszteráz aktivitás; ●—● <sup>45</sup>Ca-felvétel (oxalátmentes közegben)

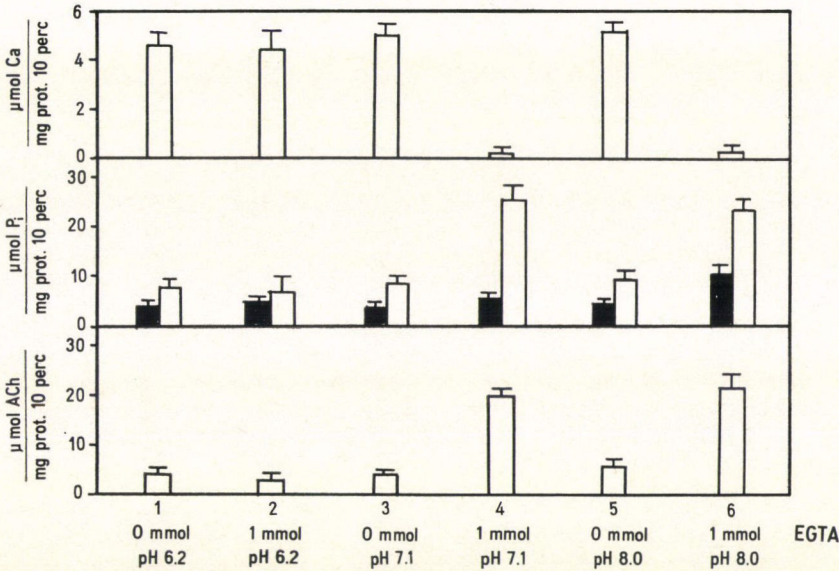
Lényegileg hasonló változásokat észleltünk, ha a membrán foszfolipidjeit foszfolipáz-C-vel emésztettük (KÖVÉR és SZABOLCS 1968), vagy detergensekkel (dodecilszulfát, dezoxikolát, Triton X-100 stb.) kezeltük (KÖVÉR és mtsai 1969). Ezekben a kísérletekben is a kolineszteráz aktivitás következtében inverz kapcsolatban állt a Ca-felvétellel, azaz ha az FSR Ca-felvétele csökkent, a kolineszteráz aktivitás nőtt.

Bár a membrán legfontosabb alkotórészeinek, a fehérjének és a foszfolipidnek az enzimes emésztése, ill. a detergensekkel való kezelés következtében fellépő változásokból néhány fontos következtetést lehetett levonni, az azonban nyilvánvaló, hogy fiziológiai viszonyok között nem ilyenféle behatások okozzák a szarkoplazmatikus retikulum permeabilitásának megváltozását a kontrakciós-relaxációs ciklus alatt. A korábbiakban felsorolt membránkonstituensek közül a membránhoz kötött bivalens kationoknak, elsősorban a Ca-nak lehet a membrán-permeabilitás szabályozásában szerepe, *in vivo* is.

Valóban, az irodalomból ismeretes, hogy a membrán-kötött  $\text{Ca}^{2+}$  fontos stabilizáló szerepet tölt be a különböző membránok esetében. Így pl. ha az excitábilis membránokból  $\text{Ca}^{2+}$ -ot vonunk el (pl. az extracelluláris tér  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációjának csökkentésével), akkor permeabilitás-fokozódás és depolarizáció következik be (KOKETSU és NODA 1962, JENDEN és REGER 1963). DUGGAN és MARTONOSI (1970) nyúl FSR-rel végzett vizsgálataikkal mutatták ki a membrán-kötött  $\text{Ca}^{2+}$  szerepét. Ezen irodalmi adatokból kiindulva megvizsgáltuk, hogy a hal FSR membránjából milyen körülmények között vonható el Ca, s ennek milyen következményei lesznek (KÖVÉR és mtsai közlés alatt, KÖVÉR és mtsai 1972).

A membrán-kötött  $\text{Ca}^{2+}$  és egyéb bivalens kationok szerepének vizsgálata során EGTA előkezelést alkalmaztunk különböző pH-értékeknél (6. ábra). Ezeknél a kísérleteknél kivételesen pufferezetlen közegben szuszpendáltuk fel a hal FSR-t, majd a mintákhoz 0, ill. 1 mM végkoncentrációban EGTA-oldatot adtunk, s az elegyek pH-ját 50 mM-os KOH-oldattal 6,2, 7,1, ill. 8,0-as pH értékekre állítottuk. 5 percig 0 °C-on történt előkezelés után az elegyeket nyolcszorosára hígítottuk EGTA-t nem tartalmazó puffer-oldattal, s az ebből kivett minták Ca-felvételét, ATPáz és kolineszteráz aktivitását inkubációs elegyekben meghatároztuk. Az előkezelés során alkalmazott EGTA, ill. KOH az inkubációs elegyekbe való bemérés során még tovább hígult (összesen az eredeti 160–200-szorosára), tehát lényegileg nem befolyásolta az inkubációs elegy EGTA-koncentrációját és 7-es pH-ját. Az ábrán a felső oszlopsor a Ca-felvétel mértékét, a középső oszlopsor fekete oszlopai a  $\text{Ca}^{2+}$  mentes közegben mért alap ATPáz-aktivitást, az üres oszlopok a  $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétében mért ATPáz-aktivitást mutatják, az üres és a fekete oszlop közötti különbség felel meg az extra ATP hasításnak, az alsó oszlopsor a kolineszteráz-aktivitás mértékét jelöli. Láthatjuk, hogy pH 6,2-nél 1 mM EGTA előkezelés az FSR-re hatástalan, pH 7,1-nél

viszont 1 mM EGTA hatására a Ca-felvétel nagymértékben lecsökken, az alap ATPáz kismértékben, a  $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétében mért ATPáz aktivitás nagyon kifejezetten fokozódik, s így az extra ATP hasítás is jelentősen nő. A kolineszteráz aktivitás ugyancsak többszörösére emelkedik. Lényegében hasonló változások figyelhetők meg a pH 8-nál végzett EGTA előkezelés esetében is.

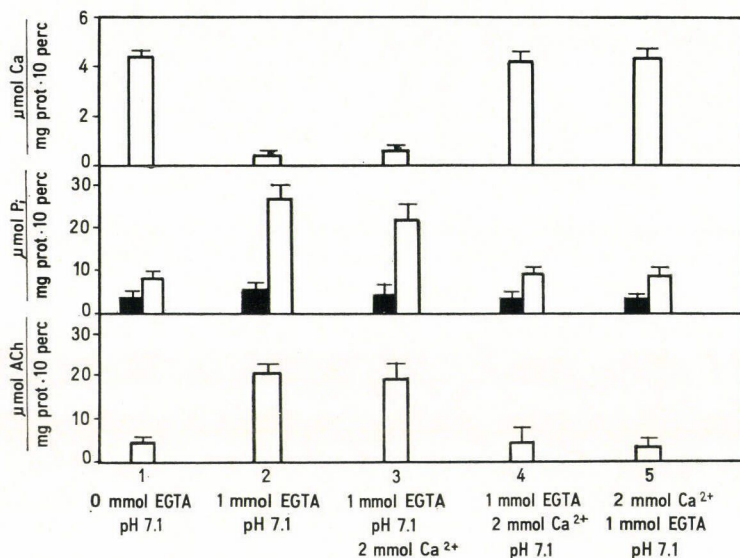


6. ábra. EGTA hatása a hal FSR sajátságaira különböző pH-értékeknél. A felső oszlopsor az FSR Ca-felvételét, a középső oszlopsor az alap (■), ill. a 0,15 mM  $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétében mért (□) ATPáz-aktivitásokat, az alsó oszlopsor a kolineszteráz-aktivitást mutatja az ordinátákon feltüntetett egységekben. A közös abszcisszán a kezelés szempontjából összetartozó oszlopok száma, ez alatt pedig az egyes minták kezelésének módja van feltüntetve

Megvizsgáltuk azt is, hogy a pH 7,1-nél végzett EGTA előkezelés hatására bekövetkező funkcionális változások (a Ca-felvétel csökkenése, az enzimaktivitások fokozódása) helyreállíthatók-e, ill. kivédhetők-e Ca alkalmazásával (7. ábra). Kiténik az ábrából, hogy az EGTA-nak az FSR szuszpenzióhoz való hozzáadása és a pH 7,1-re való beállítása után adott 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  nem állítja helyre az FSR eredeti funkcióit. Az FSR szuszpenzió pH-jának 7,1-re való állítása előtt alkalmazott  $\text{Ca}^{2+}$  viszont kivédi az EGTA kezelés hatásait.

Minthogy a pH 7,1-nél végzett EGTA kezelés során a megfelelő kontrollokhoz viszonyítva a preparátumok centrifugálás utáni üledékében sem az össz N, sem az össz P tartalom nem változott, ezért az EGTA kezelés hatására bekövetkező funkcióváltozások okát a membrán-kötött  $\text{Ca}^{2+}$  vagy egyéb bivalens kationok mennyiségének változásában kerestük. Az EGTA kezelt és kontroll FSR minták centrifugálás utáni üledékének roncsolatából atom-

abszorpciós módszerrel meghatároztuk a Ca, a Mg és a Zn tartalmat (8. ábra). Eredményeinket összevetve a 6. ábrával, megállapíthattuk, hogy csak a Ca tartalom változása hozható összefüggésbe az FSR funkcióinak megváltozásával. Az ezt követő spektrográfias mérések hasonló eredményeket hoztak, azzal kibővíve, hogy a Fe, a Mn, a Cu és az Pb tartalom változása sem hozható összefüggésbe az FSR-nek az EGTA hatására bekövetkező funkcionális változásaival. Tehát a pH 7,1-nél végzett EGTA kezelés a membrán-kötött Ca mintegy



7. ábra. Ca hatása az FSR sajátságainak EGTA kezeléssel kiváltott funkcionális változásaira. A felső oszlop sor az FSR Ca felvételét, a középső oszlop sor az alap (■), ill. a 0,15 mM Ca<sup>2+</sup> jelenlétében mért (□) ATPáz aktivitásokat, az alsó oszlop sor a kolineszteráz aktivitást mutatja az ordinátákon feltüntetett egységekben. A közös abszcisszán a kezelés szempontjából összetartozó oszlopok száma, ez alatt pedig a kezelés módja, azaz az egyes minták esetében a vegyszerek alkalmazásának és a pH beállításának sorrendje van feltüntetve

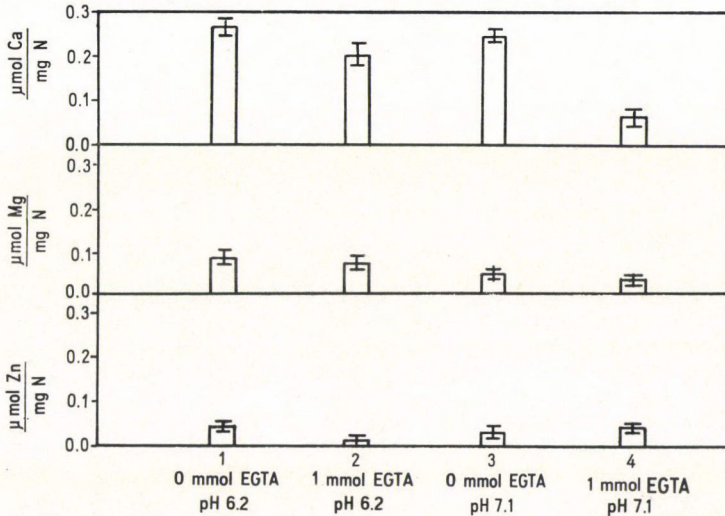
70%-át a membránból eltávolítja. Jogosnak látszik az a feltételezés, hogy ez a permeabilitás fokozódásához vezet, aminek következménye a Ca-felvétel nagymérvű lecsökkenése, annak ellenére, hogy ugyanakkor az extra ATP hasítás fokozódik.

Ez az elképzelésünk összhangban áll WATKINS (1965) hipotézisével (9. ábra). Szerinte egy kolineszterázhoz hasonló kötőhelyekkel rendelkező fehérjemolekula és egy foszotidilkolin-molekula közötti szoros kapcsolatot egy bivalens kation (a mi esetünkben Ca<sup>2+</sup>) biztosítja a membránban. E bivalens kation eltávolítása nyilvánvalóan a permeabilitás fokozódásához és a kolineszteráz aktivitás növekedéséhez vezet.

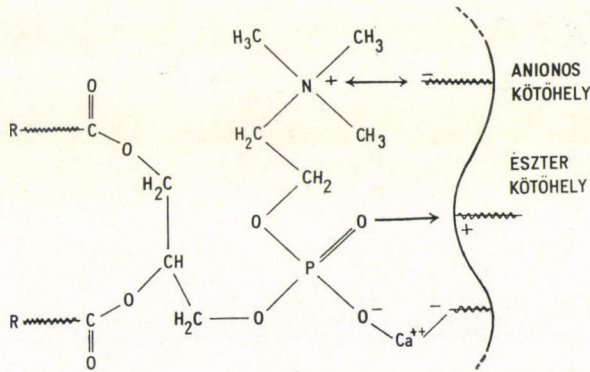
Ezek után érdekesnek látszott megvizsgálni, hogy milyen változásokat kapunk, ha a membrán-kötött Ca<sup>2+</sup>-ot valamilyen más kationnal helyettesít-



jük. Választásunk a  $\text{La}^{3+}$ -ra esett, mivel újabban számos szerző (TAKATA és mtsai 1966, MILEDI 1966, 1971, VANBREEMEN 1968) kimutatta, hogy a lantanidák módosítják a mesterséges foszfolipid membránok, ill. a különböző



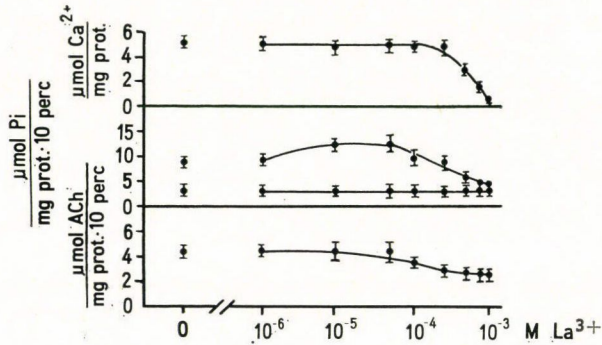
8. ábra. Az FSR divalens kation tartalmának változása EGTA kezelés hatására. A felső oszlopsor az FSR Ca tartalmát, a középső a Mg, az alsó a Zn tartalmát mutatja az ordinátákon feltüntetett egységekben. A közös abszcisszán a kezelés szempontjából összetartozó oszlopok száma, ez alatt pedig az egyes minták kezelésének módja van feltüntetve



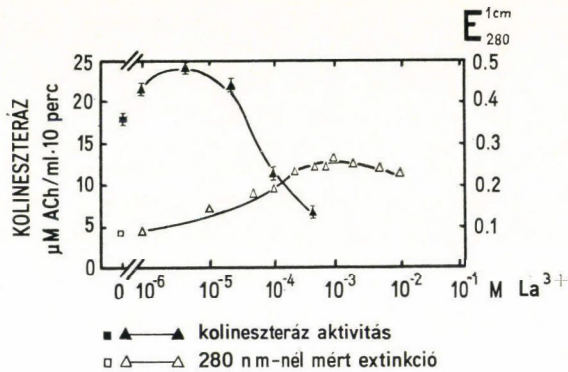
9. ábra. Foszfátidilkolin és kolineszteráz típusú fehérjemolekula feltételezett kapcsolata biológiai membránokban. WATKINS (1965) ábrája nyomán

típusú sejtek membránjainak permeabilitását,  $\text{Na}^+$  és  $\text{K}^+$  konduktanciáját, továbbá a neuromuszkuláris ingerületátvitelt. MELA és CHANCE (1969) megállapította, hogy a háromértékű ritka földfémek gátolják a mitokondriumok Ca-felvételét. SCHATZMANN és TSCHABOLD (1971) emberi vörösvérsejteken figyelték meg, hogy a lantanidák mind az aktív Ca transzportot, mind az azért felelős  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -aktivált ATPázt gátolják.

A 10. ábrán bemutatott kísérletek során az FSR szuszpenziót 0 °C-on 5 percig az ábrán megjelölt végkoncentrációban La ionokkal (LaCl<sub>3</sub>) előkezeltük. A Ca-felvétel és az enzimaktivitások mérésénél az inkubációs elegyek a La<sup>3+</sup>-t az előkezelésnél alkalmazott koncentrációban tartalmazták. 10<sup>-5</sup> M La<sup>3+</sup> koncentrációig a Ca-felvétel és a kolinszteráz aktivitás változatlan.



10. ábra. Különböző koncentrációban alkalmazott La<sup>3+</sup> hatása a hal FSR funkcióira. Az ábra felső harmadában az FSR Ca-felvételét, középső harmadában az alap (alsó görbe), ill. Ca jelenlétében mért (felső görbe) ATPáz aktivitásokat, alsó harmadában a kolinszteráz aktivitást tüntették fel. A közös abszcissza a LaCl<sub>3</sub> végkoncentrációját mutatja az előkezelés és az inkubálás során



11. ábra. La<sup>3+</sup> hatása a dezoxikoláttal kezelt, gélfiltrált FSR preparátum kolinszteráz aktivitására, ill. a 280 nm-nél mért extinkciójára

(Az extra ATP hasítás kismértékű emelkedése nem szignifikáns.) 10<sup>-4</sup> M La<sup>3+</sup> koncentrációtól mind a Ca-felvétel, mind a kolinszteráz aktivitás, valamint az extra ATP hasítás nagymértékben csökken, ill. megszűnik. E változások a La<sup>3+</sup> membrán-stabilizáló hatásával hozhatók összefüggésbe.

Megvizsgáltuk a La<sup>3+</sup> hatását a dezoxikoláttal feltárt, szolubilizált, majd gélfiltrált FSR preparátum kolinszteráz aktivitására (11. ábra). A dezoxikolát kezelés jelentősen megnöveli a preparátum aktivitását a natív FSR-hez viszonyítva. Megfigyelhető továbbá, hogy míg a La<sup>3+</sup> a natív FSR esetében

$10^{-4}$  M koncentráció fölött aktivitás-csökkenést okoz (10. ábra), addig a szolubilizált frakció esetében alacsonyabb  $\text{La}^{3+}$  koncentrációknál aktivitás-csökkenés észlelhető (11. ábra). Ismertett kísérleteink során megfigyeltük, hogy a kolineszteráz aktivitásának csökkenésével egyidejűleg, magasabb  $\text{La}^{3+}$  koncentrációknál a preparátumokban aggregátumok képződtek. Feltételeztük, hogy ez a folyamat együttjár a  $280 \text{ m}\mu$ -nál mért extinkció változásával. A 11. ábra bizonyítja, hogy a dezoxikoláttal szolubilizált preparátumnál  $10^{-3}$  M  $\text{La}^{3+}$  koncentrációig az extinkció növekedik, e fölött gyakorlatilag állandósul. Ha  $\text{La}^{3+}$  helyett  $\text{Ca}^{2+}$ -ot alkalmazunk hasonló koncentrációban, a preparátumok extinkciója gyakorlatilag nem változik. A  $\text{Ca}^{2+}$  a preparátumok kolineszteráz aktivitását sem befolyásolja.

A  $\text{La}^{3+}$ -nak az aggregáló és a kolineszteráz aktivitást csökkentő hatása reverzibilisnek bizonyult. Ha ugyanis a  $10^{-3}$  M  $\text{La}^{3+}$  koncentrációnál aggregáló, alacsony kolineszteráz aktivitású preparátumhoz  $10^{-3}$  M EGTA-t, ill.  $10^{-2}$  M EDTA-t adtunk, a kolineszteráz aktivitás az eredeti szintre emelkedik és az aggregáció is megszűnik (CSABAI és mtsai 1972).

Az eddig ismertetett kísérletek alapján feltételeztük, hogy az FSR kolineszteráz aktivitása a membrán-stabilitás indikátora. E szerepének további tisztázására az FSR-ből kolineszteráz preparátumot állítottunk elő. E preparátumok előállítása során felhasználtuk a  $\text{La}^{3+}$  előbb ismertetett hatásait.

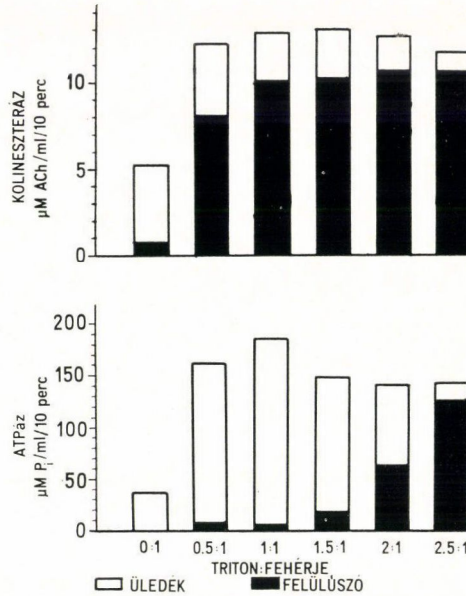
Első lépésként megvizsgáltuk, hogy a hal FSR-ből különböző koncentrációjú Triton X-100 hatására milyen enzimaktivitások oldódnak ki. (10 perces Triton kezelés és 90 percig  $59\,000 \text{ g}$ -vel végzett centrifugálás után a felúszóban talált fehérjét tekintettük „oldott”-nak.)

A 12. ábrán az FSR ATPáz és a kolineszteráz aktivitásának megoszlását mutatjuk be a csapadék és a szupernatans között az abszcisszán feltüntetett Triton : fehérje arány mellett. Kitűnik az ábrából, hogy  $1 : 1 = \text{Triton} : \text{fehérje}$  arány mellett a kolineszteráz aktivitás nagymértékben szolubilizálódik, az ATPáz aktivitás viszont alig. A  $2,5 : 1 = \text{Triton} : \text{fehérje}$  arány mellett mind az ATPáz, mind a kolineszteráz aktivitás szolubilizálódik. Az elmondottakból következik, hogy az FSR membrán ATPáza és a kolineszteráz szelektíve szolubilizálható.

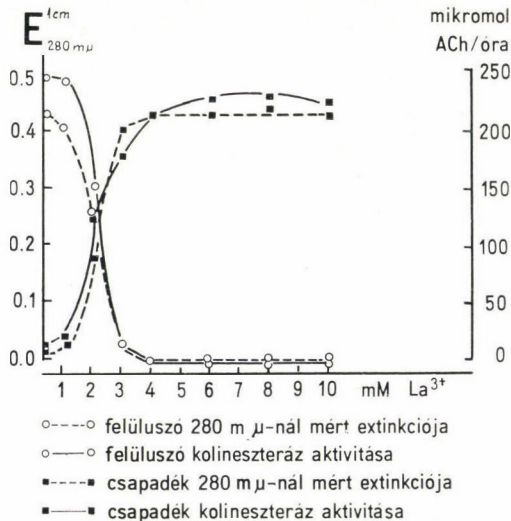
Az  $1 : 1 = \text{Triton} : \text{fehérje}$  arány mellett szolubilizált FSR kolineszteráz Sphadex G-25 fine oszlopon Triton-mentesítettük. A Triton gélfiltrálással történt eltávolítása azonban azzal a következménnyel járt, hogy az oszlopra vitt kolineszteráz aktivitás  $60-70\%$ -a elveszett.

A  $\text{La}^{3+}$ -nak az előzőekben elmondott hatásait figyelembe véve, célszerűnek látszott megvizsgálni, hogy az FSR  $1 : 1 = \text{Triton} : \text{fehérje}$  arány mellett készített extraktumának szupernatansában hogyan változik meg a kolineszteráz aktív fehérje oldhatósága a  $\text{La}^{3+}$  koncentráció függvényében.

A 13. ábrán a különböző  $\text{La}^{3+}$  koncentrációknál az  $1 : 1 = \text{Triton} : \text{fehérje}$  arány mellett feltárt FSR szupernatansából kicsapódó, ill. oldatban maradó



12. ábra. A Triton X-100-zal kezelt hal FSR kolinesteráz és ATPáz aktivitásának megoszlása a csapadék és a felüliszó között a Triton : fehérje arány függvényében. A közös abszcisszán a Triton : fehérje arányt, a felső ordinátán a kolinesteráz aktivitás, az alsó ordinátán az ATPáz aktivitás mértékét tüntettük fel



13. ábra. Különböző koncentrációban alkalmazott La<sup>3+</sup> precipitáló hatása az FSR-ből Triton : X-100-zal (Triton : fehérje = 1 : 1) szolubilizált kolinesteráz aktív fehérjére. Az abszcisszán a La<sup>3+</sup> végkoncentrációját mutatjuk (a La<sup>3+</sup> kezelés alatt). A fehérjetartalom (bal oldali ordináta) és a kolinesteráz összaktivitás (jobb oldali ordináta) megoszlását mutatja be az ábra

frakciók fehérje-tartalmának és kolineszteráz aktivitásának megoszlását mutatjuk be. A kolineszteráz aktivitás és a fehérje meghatározás előtt a  $\text{La}^{3+}$  koncentrációt főlegben alkalmazott EGTA oldattal csökkentettük, majd 0,1 mM-os EGTA oldattal szembeni dialízissel eltávolítottuk. A későbbiekben is a  $\text{La}^{3+}$  tartalmú frakciók kolineszteráz aktivitását hasonló kezelés után mértük. Látható az ábrán, hogy a 4 mM  $\text{La}^{3+}$  koncentrációnál mind a kolineszteráz aktivitás, mind a fehérje a kicsapódó frakcióba kerül. A  $\text{La}^{3+}$ -nal való kicsapás a Triton X-100 eltávolítását is lehetővé teszi, aminek az az előnye is megvan, hogy a hosszadalmas és kifejezett aktivitás-vesztéssel járó gélfiltrálást fölöslegessé teszi.

A kolineszteráz kicsaphatósága szempontjából hasonló eredményeket kaptunk akkor is, amikor a feltárást 2,5 : 1 = Triton : fehérje arány mellett végeztük. Ilyen körülmények között a kolineszterázzal együtt szolubilizálódó más membrán-komponensek — pl. az ATPáz —  $\text{La}^{3+}$ -nal nem csapódnak ki. Megpróbáltunk mindkét Tritonos extraktumból 5 mM  $\text{La}^{3+}$ -nal való kicsapás és EGTA-val való visszaoldás útján tiszta kolineszteráz frakciót preparálni. Ez azonban az eljárás többszöri megismétlésével sem sikerült, a nyert frakció ultracentrifugás analízissel inhomogénnek bizonyult.

Azt azonban fel lehetett tételezni, hogy az eredeti sorrend megfordítása, azaz előzetes La kezelés utáni Tritonos szolubilizálás, azt eredményezi, hogy a  $\text{La}^{3+}$  által csapadékban tartott kolineszteráz kivételével a többi fehérje kioldható.

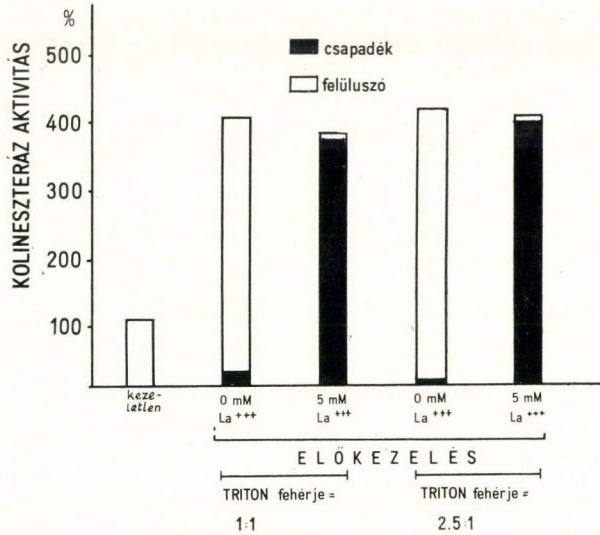
A 14. ábrán láthatjuk, hogy 5 mM  $\text{La}^{3+}$  előkezelés és ezt követően 5 mM  $\text{La}^{3+}$  jelenlétében az abszcisszán feltüntetett Triton : fehérje arányok mellett végzett extrakció után a kolineszteráz aktivitás valóban a csapadékban maradt, azaz  $\text{La}^{3+}$  előkezeléssel a kolineszteráz szolubilizálását meg lehet akadályozni.

Ezen adatok alapján egy új preparatív eljárás kidolgozására nyílt lehetőség, melynek vázlatát a 15. ábrán mutatjuk be.

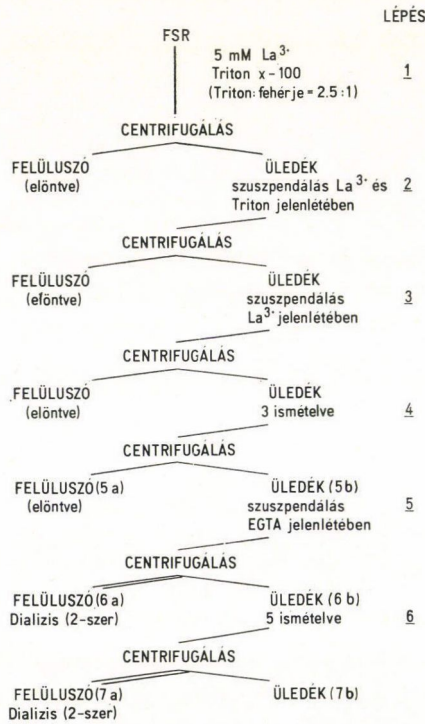
A módszer lényege, hogy  $\text{La}^{3+}$  előkezelés után az FSR-t ismételten Triton X-100-zal kezeljük (legalább 2,5 : 1 = Triton : fehérje arányban), mindig 5 mM  $\text{La}^{3+}$  jelenlétében, majd a Tritont  $\text{La}^{3+}$  tartalmú puffer oldattal eltávolítjuk. Végül a  $\text{La}^{3+}$ -t EGTA-val megkötjük, amikor is a kolineszteráz nagy részre kioldódik. Centrifugálás után a csapadékot (6b) EGTA tartalmú pufferrel extraháljuk. A szupernatansokat (6a, 7a) egyesítjük. Szükség esetén a kolineszteráz frakció  $\text{La}^{3+}$  kicsapással koncentrálható, majd EGTA-val a kívánt fehérje-koncentrációra visszaoldható.

A kiindulási FSR fehérjének 4–5%-a nyerhető ki. Az általunk előállított kolineszteráz specifikus aktivitása 2700  $\mu\text{M}$  ACh/mg fehérje/óra, ami kb. 100-szorosa a kezeletlen FSR specifikus kolineszteráz aktivitásának.

A preparátum ultracentrifugában homogén (16. ábra), szedimentációs koefficiense 1,84 S; diffúziós állandója  $2,9 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$ ; molekulásúlya 55 000; a formafaktora ( $f/f_0$ ) = 3 (CSABAI és mtsai 1974).

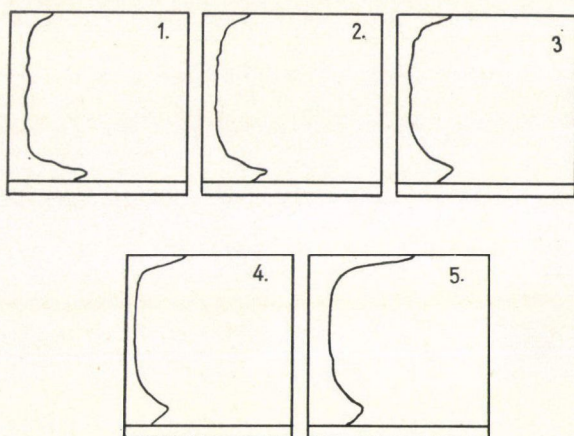


14. ábra.  $\text{La}^{3+}$  előkezelés hatása az FSR kolineszteráznak Triton X-100-zal végzett szolubilizálására. A  $\text{La}^{3+}$  végkoncentrációja 0, ill. 5 mM volt a 10 percig végzett kezelés során. Ezt követte a Triton X-100 kezelés



15. ábra. Az FSR kolineszteráz izolálásának folyamatábrája. A centrifugálás minden esetben 59 000 g-vel történt, időtartama az 1–4. lépés után 10 perc, az 5–6. lépés után 90 perc volt

A preparatív eljárás néhány lépését elektronmikroszkóppal is ellenőriztük. Az elektronmikroszkópos képekből számunkra az volt a legfontosabb információ, hogy a  $\text{La}^{3+}$  előkezelés után 2,5 : 1 = Triton : fehérje arányban alkalmazott Triton X-100 nem tette tönkre az FSR vezikulák membránstruktúráját. Ezt csak úgy lehet értelmezni, hogy ilyen körülmények között a kolinszterázon kívül foszfolipidek is vannak jelen. Ez egyúttal azt is jelenti, hogy az általunk preparált kolinszteráz nem „tisztá” fehérje, hanem lipoproteid komplex.



16. ábra. A 15. ábra sémája szerint preparált kolinszteráz frakció szedimentációs diagramja. Fehérje koncentráció: 5,4 mg/ml, 50 mM KCl, 0,1 mM EGTA, 5 mM hisztidin, pH 7 közegben. Fordulatszám: 45 000 ford./perc; hőmérséklet: 22 °C. Az első felvétel a felgyorsulás utáni 30. percben készült, a többi 15 percenként

Ilyen komplexekben a lipideknek és a bivalens kationoknak fontos szerepük lehet. Az FSR-ből izolált ATPáz lipidmentesítése céljából végzett kísérletek során HASSELBACH és MIGALA (1972) arra a következtetésre jutott, hogy az ATPáz-nak sokféle funkcionális és strukturális állapota lehet, attól függően, hogy milyen lipid komponensekkel van kapcsolatban az enzimfehérje. Ha lipid-mentesítést  $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétében végezték, a tisztított fehérje frakció kizárólag  $\text{Ca}^{2+}$ -mal aktivizálható ATPáz aktivitással rendelkezik. Ha azonban a lipid-mentesítéskor  $\text{Ca}^{2+}$  helyett  $\text{Mg}^{2+}$  van jelen, a tisztított fehérjének ATPáz aktivitása nincs. E fehérje enzimaktivitása visszanyerhető olajsav hozzáadásával, ez a helyreállított ATPáz azonban  $\text{Ca}^{2+}$ -mal nem aktiválható.

Az elmondottakból világosan következnek célkitűzéseink:

1. az általunk izolált FSR kolinszteráz lipidösszetételének meghatározása;
2. a kolinszteráz lipid-mentesítése;
3. a lipid-mentesített enzim tulajdonságainak vizsgálata.

Ezirányú kísérleteink folyamatban vannak.

## IRODALOM

- VAN BREEMEN, C.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **32**, 977 (1968).
- CSABAI A., SZABOLCS M., KÖVÉR A.: *Magyar Élettani Társ. XXXVIII. vándorgyűlése, Budapest. Előadás kivonatok* 30. old (1972).
- CSABAI, A., KÖVÉR, A., SZABOLCS, M., VARGA, S.: In: *Calcium Binding Proteins* (Ed: Drabikowski, W., Strzelecka-Golaszewska, H., Carafoli, E.) Elsevier, Amsterdam (1974).
- DUGGAN, P. F., MARTONOSI, A.: *J. Gen. Physiol.* **56**, 147 (1970).
- HASSELBACH, W., MIGALA, A.: *FEBS Letters* **26**, 20 (1972).
- HESTRIN, S.: *J. Biol. Chem.* **180**, 249 (1949).
- HOLLAND, D. L., PERRY, S. V.: *Biochem. J. (London)* **114**, 161 (1969).
- JENDEN, D. I., REGER, I. F.: *J. Physiol.* **169**, 889 (1963).
- KOKETSU, K., NODA, K.: *J. Cell. Comp. Physiol.* **59**, 323 (1962).
- KÖVÉR A., SZABOLCS M.: *MTA Biol. Osz. Közl.* **18**, 143 (1975).
- KÖVÉR A., SZABOLCS M.: *Acta Biol. Debrecina* **6**, 115 (1968).
- KÖVÉR A., SZABOLCS M., CSABAI A., KÓNYA L.: In: *Biochemistry of Intracellular Structures* (Ed: Wojtczak, L., Drabikowski, W., Strzelecka-Golaszewska, H.) PWN, Warszawa p. 167 (1969).
- KÖVÉR A., SZABOLCS M., CSABAI A., NAGY Z.: *Magyar Élettani Társ. XXXVIII. vándorgyűlése, Budapest, Előadás kivonatok* 120. old. (1972).
- KÖVÉR, A., SZABOLCS, M., CSABAI, A., NAGY, Z.: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **9**, 349, (1974).
- MARTONOSI, A.: In: *Biomembranes I*, (Ed: Manson, L. A.) Plenum Press, New York—London p. 191 (1971).
- MARTONOSI, A., BOLAND, R., HALPIN, R. A.: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **37**, 455 (1972).
- MELA, L., CHANCE, B.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **35**, 556 (1969).
- MILEDI, R.: *Nature* **212**, 1233 (1966).
- MILEDI, R.: *Nature* **229**, 410 (1971).
- SCHATZMANN, H. J., TSCHABOLD, M.: *Experientia* **27**, 59 (1971).
- SZABOLCS, M., KÖVÉR, A.: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **1**, 159 (1966).
- SZABOLCS, M., KÖVÉR, A., KOVÁCS, L.: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **2**, 409 (1967).
- SZABOLCS, M., KÖVÉR A., KOVÁCS L., CSABAI A.: *Magyar Biokémiai Társaság II. gyűlése, Budapest. Előadás kivonatok* 43. old. (1965).
- SZABOLCS, M., KÖVÉR, A., KOVÁCS, L., RÁCZ, M.: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **1**, 233 (1966).
- TAKATA, M., PICKARD, W. F., LETTVIN, J. Y., MOORE, J. W.: *J. Gen. Physiol.* **50**, 461 (1966).
- TAUSSKY, H. H., SHORR, E.: *J. Biol. Chem.* **202**, 675 (1953).
- WATKINS, J.: *J. THEORET. Biol.* **9**, 37 (1965).