

A HARÁNTCSÍKOLT IZOM MŰKÖDÉSÉNEK SZABÁLYOZÁSA

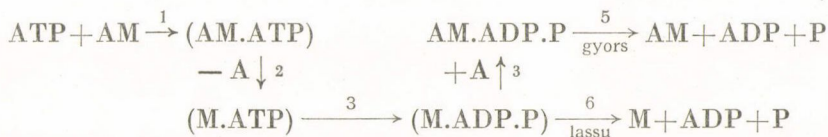
BIRÓ ENDRE

ELTE TTK Biokémiai Tanszék, Budapest

1. A szabályozás problémájának enzimológiai megfogalmazása

Az izomszövet specializált funkciója a kémiai energia munkává alakítása. Ebben a folyamatban két fehérje a miozin és az aktin játssza a fő szerepet. Az ATP-nek az aktin által aktivált miozinon történő hidrolízise a szereplő fehérjék egy eddig még közelebről nem ismert konformációváltozásával jár. A fehérjekomponensek szupramolekuláris organizációja révén ezek a konformáció változások összegeződnek s az izom aktív munkavégzéssel járó rövidülését eredményezik.

Az elmúlt néhány év kutatásainak eredményeképpen részletes enzimológiai képet tudunk adni az alapvető folyamatról, az aktin által aktivált miozin ATP-árról;²



Ez a séma TONOMURA (ld. TONOMURA és OOSAWA, 1972) TAYLOR és munkatársai (LYMN és TAYLOR, 1970; TAYLOR és mt. 1970; LYMN és TAYLOR, 1971) — továbbá EISENBERG és MOOS (1968, 1970) kutatásai alapján bontakozott ki. A séma megértéséhez tudnunk kell, hogy ATP kötődése a miozin és aktin komplexéhez disszociálja a komplexet, aktinra és M. ATP-re. A hidrolitikus lépés bekövetkezése után keletkező miozin-ADP · P komplex azonban újra reagál az aktinnal. Az aktin-miozin-termék komplexről a termék ledisszociálás igen gyors. Az 1.—5. indexelt reakciók mind azonos nagyságrendben vannak, gyorsak. Így stacionárius állapotban egy ciklikus folyamat jön létre, az aktin ismételt disszociál és kapcsolódik s minden ciklussal egy molekula ATP hasad el. Ennek a reakciónak az *in vivo* feltételezhető keresztmetszete elegendő

¹ A Magyar Biokémiai Társaság 1973. évi VI. Nagygyűlésén tartott referátum anyaga.

² Rövidítések: ATP = adenzin-trifoszfát; A = aktin; M = miozin; AM = aktomiozin, S-1 = a miozin ATP-áz aktív-aktinkötő fragmentuma, „heavy meromiozin-subfragment-1”; TP = troponin. — A TP alegységeinek elnevezéséről ld. 114. oldalon az 5. lábjegyzetet.

a maximális munkát végző izom energiaszükségletének fedezésére. Ezt a folyamatláncot az izom működő, munkát végző, kontrahált állapotával állíthatjuk párhuzamba.

A séma magába foglalja a nyugvó, relaxált izom enzimológiai állapotát is. Relaxált izomban valamilyen mechanizmus megakadályozza, hogy a M. ADP.P komplex (az enzim-termék komplex) az aktinnal, az aktivátorral egyesüljön, az aktin nem működik mint aktivátor. A miozinról magáról a termék (ADP. P) ledisszociálása az igen lassú 6. reakcióval történik. A miozin ATP-áz aktivitása — aktin nélkül — az *in vivónak* megfelelő körülmények között (0,1 M KCl, néhány mM Mg, neutr. pH) minimális — mint a sémából látható a termék lassú disszociációjának következtében. Ilyen körülmények között a *miozin* ATP-áz keresztmetszete nem több annál, ami az izom csekély nyugalmi légzése alapján várható.

A fentiek alapján a reguláció kérdését, az aktív, munkavégző állapot ki-be kapcsolásának kérdését így fogalmazhatjuk meg: mi az a mechanizmus, amely nyugvó izomban meggátolja, hogy a miozin (M. ADP. P) az aktivátorával (az aktinnal) kölcsönhatásba lépjen — illetőleg mi az a mechanizmus, amely az ingerület hatására elhárítja az akadályt a miozin és aktin kapcsolódása elől.

A 60-as évek elején egy sereg *in vivo* és *in vitro* vizsgálat egyértelműen bizonyította, hogy a kontraktilis apparátus bekapcsolását közvetítő jel a szarkoplazmatikus retikulumból felszabaduló Ca ion. A nyugvó izomban gyakorlatilag nincs ionizált Ca, az ingerület hatására viszont a Ca koncentráció 10^{-6} — 10^{-5} M-ra nő. (Ld. összefoglalva: EBASHI 1972.) Az ionizált Ca megjelenése váltja ki a miozinnak és aktivátorának az aktinnak a kapcsolódását.

Egy aktomiozin rendszer szabályozottságának *in vitro* tesztje, ezek alapján, az ún. „Ca érzékenység”. Egy szabályozatlan AM Ca ionok jelenlétében és távollétében egyaránt magas ATP-áz aktivitást mutat. Ha az aktomiozin szabályozott, Ca ionok megvonására, pl. EGTA hatására ATP-áz aktivitása erősen gátlódik. Egy teljesen tiszta, aktinból és miozinból álló aktomiozin nem Ca érzékeny, vagyis szabályozatlan.

2. Regulációs fehérjék — a tropomiozin és a troponin

A reguláció mechanizmusának tisztázását nagy lépésekkel vitték előre Ebashi iskolájának igen egyszerű eszközökkel végzett, hagyományos biokémiai gondolatmenetekre alapozott kísérletei. Megfigyelték, hogy kevésbé tisztított aktomiozin rendszerek, pl. izolált átmosot miofibrillumok, vagy izomból közvetlenül kivont aktimiozin minden esetben szabályozott (Ca érzékeny) Mg-ATP-áz aktivitást mutat, evvel szemben tisztított aktinból és miozinból összeállított rendszerek változó eredményt adnak. A változó tényező az aktin preparátumokban volt. Minden miozinnal lehetett szabályozott rendszert összeállítani, ezzel szemben egyes aktin készítmények szabályozott, mások nem szabályozott aktomiozint adtak. E vizsgálatokkal egyidőben észlelték (DRABI-

KOWSKY és GERGELY, 1962, továbbá LAKI és mt. 1962), hogy az akkor szokásos módszerekkel tisztított aktin több-kevesebb tropomiozin szenyvezést tartalmaz. Ebashi laboratóriumában megfigyelték, hogy a tropomiozin-mentesre sikerült aktin preparátumok soha nem adtak szabályozott aktomiozint, a tropomiozin tartalmú aktinok egy része szabályozott, más része nem szabályozott rendszert adott. Mindez a tropomiozinon kívül egy további faktor jelenlétére utalt. Tiszta tropomiozinnal a nem szabályozott aktomiozint adó aktinok szabályozottságát nem lehetett helyreállítani. A tropomiozin előállítására alkohollal szárított izomból történik. Ebashi laboratóriumában kidolgoztak egy olyan tropomiozin előállítást, mely az alkohol kezelést elkerüli. Az így kapott „natív tropomiozin” szabályozottá tette a nem szabályozott aktomiozinokat. Végül kiderült, hogy a „natív tropomiozin” két lényeges fehérje faktort tartalmaz a hagyományos tropomiozint és egy ettől teljesen különböző, eddig nem észlelt fehérjét, amit EBASHI troponinnak (TP) nevezett el (ld. összefoglalva: EBASHI, 1972).

A TP felfedezése kulcsjelentőségű volt az egész kérdés feltárásában, mert a szereplő három fehérje közül egyedül a TP az, amely Ca-t köt. Ca kötés alatt itt és a továbbiakban egy igen specifikus Ca kötetést értünk, amely millimólos Mg jelenlétében is és igen nagy, 10^6 – 10^7 körüli affinitással történik. Míg Mg-mal szemben nem specifikus és nem kiemelkedően nagy affinitású Ca kötéssel többé-kevésbé minden miofibrilláris fehérje rendelkezik, ez a fajta kötés egyedül a TP sajátja. Azt a kézenfekvő következtetést, hogy ezek szerint a Ca regulatív hatásának elsődleges támadáspontja a TP, megerősítették azok a vizsgálatok, amelyek kimutatták, hogy a TP mikromólos nagyságrendű Ca hatására konformáció változást szenved. (WAKABAYASHI és EBASHI, 1968; HAN és BENSON, 1970.)

Anticipálva azt a később részletesen tárgyalandó tényt, hogy a tropomiozin és a troponin az aktinnal képez komplexet és a miozinhoz nem kötődik, úgy foglalhatjuk össze az eddigieket, hogy a miozin-ATP-áz-nak aktivátora az aktin-tropomiozin-troponin komplexum, s ez az aktivátor kofaktorként mikromólos koncentrációban Ca ionok jelenlétét igényli. Ca hiányában az aktivátor affinitása a miozinhoz csekély. Ca hatására az aktivátor-komplex asszociációs konstansa megnő, változatlan V_{max} mellett. (EISENBERG és KIELLEY, 1970; KORETZ és mt. 1973.) A nem regulált, TM-TP mentes aktin önmagában is aktivátor, kissé ahhoz hasonlóan, mint ahogy egy szétkapcsolt mitokondrium foszforilációs szubsztrát nélkül is intenzíven oxidál. Megjegyzendő, hogy ATP távollétében az aktin-tropomiozin-troponin komplex miozinhoz való kötődése nagyjából azonos a tiszta aktinével.³

³ Megjegyzendő, hogy a modernebb enzimkinetikai vizsgálatok általában nem szoros értelemben vett aktomiozinnal, hanem a miozin megfelelő proteolitikus fragmentjeinek aktin-komplexével történnek. Az aktomiozin a fiziológiásan érdekes ionmilióben oldhatatlan s ez megnehezíti a kísérletek értelmezését. A miozinnal proteolízissel előállított „heavy mero-miozin” és az S-1 (ld. 2. lábjegyzet) többé-kevésbé sértetlen állapotban tartalmazza a miozin enzimatis-aktinkötő centrumát és aktin komplexük a megfelelő sómilióben homogén oldatként viselkedik.

3. A regulációs fehérjék lokalizációja, szerkezeti sajátosságai és kölcsönhatásai

Fontos vizsgálatok egész sora tisztázta a regulációs fehérjék lokalizációjának kérdését.

Mint ismeretes a harántcsíkolt miofibrillum a Z-membránok által összefogott vékony I-filamentumokból és a közöttük elhelyezkedő vastag A-filamentumokból épül fel. Az aktin, a TM és a TP az I filamentumokban, a miozin (és még néhány egyelőre funkció szempontjából kevésbé ismert fehérje) az A-filamentumokban helyezkedik el. Az A-filamentumok felépítése olyan, hogy a miozin ATP-áz aktív-aktinkötő centrumait tartalmazó S-1 régió, a miozin molekulák végén lévő globuláris képződmények, kinyúlnak a filamentum felületéből, ún. haránthidakat képeznek. Az izom aktív állapotában a miozin ezen haránthidak révén lép kapcsolatba az aktinnal.

Ezen szerkezeti háttér vázlatos ismertetése után rátérünk a regulációs rendszer egyes komponenseinek a leírására.

A TM két azonos 38 kilodalton molekulasúlyú alegységből épül fel. Közel 100%-ig helikális. Kettős alfa-hélix felépítésű, kereken 2×40 nm méretű, fonal alakú molekula. Az ionerősségtől függő polimerizációra képes. A polimerizáció a legnagyobb fokú sómentes közegben és kb. 1 M KCl-ben megszűnik. Az *in vitro*-nak megfelelő 0,1 körüli ionerősségen súlyátlag molekulasúlya több százszoros, milliós nagyságrendű.

A TM polimerizációja vég-a-véghez kapcsolódással történik, egy fonalon belül természetesen azonos irányítással. A jól kristályosítható TM kristályok igen részletes elektronmikroszkópos és röntgendiffrakciós vizsgálata nem mutatott ki semmiféle átfedést, vastagodást a molekulák összekapcsolásánál (CASPAR és mt. 1969, HIGASHI-FUJIME és OOI, 1969). Ugyanígy a teljes izomról készült röntgendiffrakciós képek, amelyekben az utóbbi néhány évben sikerült azonosítani a TM-nek megfelelő reflexiókat, a TM-t egy egyenes, egy-egy I-filamentumban kereken 25 monomérből álló hurkának mutatták. Az egyes monomerek különálló jelenlétét semmi nem jelezte.

HODGES és mtsai-nak a TM aminosav sorrendjére vonatkozólag nemrégiben publikált eredményei (SODEK és mt. 1972; HODGES és mt. 1973) igen érdekes hipotézissel meg tudják magyarázni ezt az önmagában igen érthetetlen, minden „varrat” nélküli vég-a-véghez illeszkedést. Ugyanezek a vizsgálatok magának a kettős alfa-hélixnek a felépülésére vonatkozólag is igen érdekes eredményeket adtak. A TM bromciános peptidjei közül — mint vizsgálataikból kiderült — az egyik az alegység-lánc teljes C-terminális *felével* azonos, az alegység-lánc kereken 300 peptidegységéből 150-et tartalmaz. Ennek a fél molekulának teljes szekvenciáját meghatározták (1. ábra). Mint látható, a szekvencia egy különös szabályosságot mutat: megközelítőleg az összes hidrofób oldal-láncok két periodikus sorban helyezkednek el. Az egy sorozatba tartozó oldal-láncok 7—7 pozícióval eltolódva követik egymást (körrel, ill. négyszöggel kere-

tezett aminosav jelek) s a két sorozat egymáshoz képest 3 aminosavval eltolódva foglal helyet a szekvenciában. Ez másképpen azt jelenti, hogy a szekvenciában szabályos váltakozással minden negyedik-harmadik-negyedik-harmadik aminosav hidrofób — s szinte minden hidrofób aminosav így helyezkedik el. Mint tudjuk az alfa helixben 3,6 aminosav felel meg egy menetnek, vagyis 3-nál több és 4-nél kevesebb. Ha a Hodges és mtsai által leírt szekvenciát alfa-

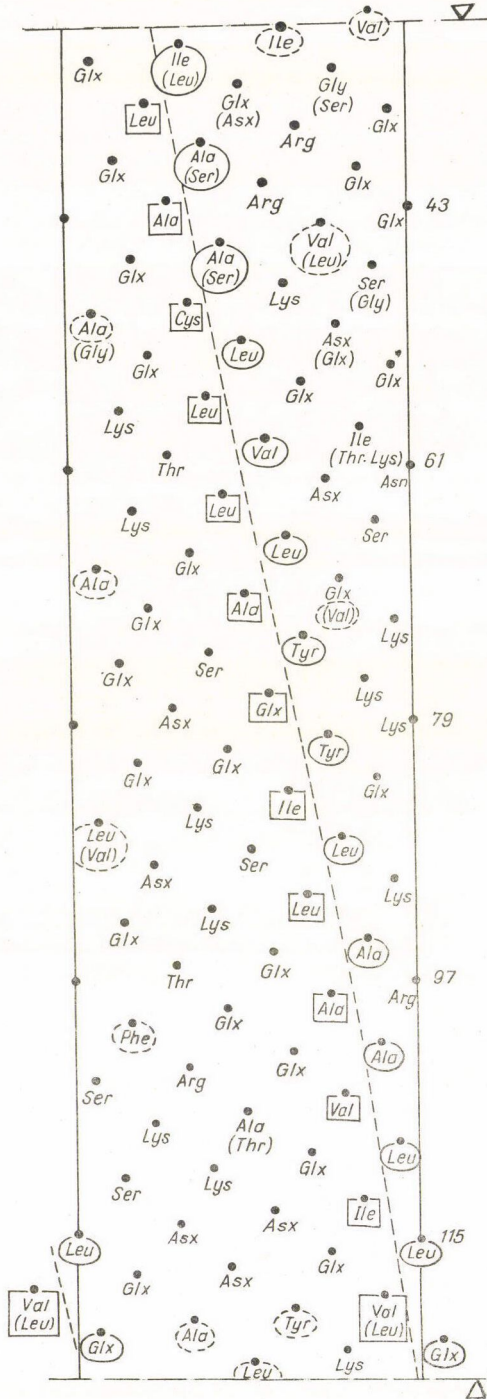
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
(GLX, - ILE, - GLX, - GLX, - ILE, - GLX),						LEU	- LYS -	GLU -	ALA	- LYS -	HIS -	ILE -	ALA -
15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
- GLU -	ASP -	ALA	- ASP -	ARG -	LYS -	TYR	- GLX -	GLX -	VAL	- ALA -	ARG -	LYS -	LEU
29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
- VAL -	ILE -	ILE	- GLX -	SER -	ASX -	LEU	- GLX -	ARG -	ALA	- GLX -	GLX -	ARG -	ALA
43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
- GLX -	LEU -	SER	- GLX -	GLY -	LYS -	CYS	- ALA -	GLX -	LEU	- GLX -	GLX -	GLX -	LEU
57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
- LYS -	THR -	VAL	- THR -	ASN -	ASX -	LEU	- LYS -	SER -	LEU	- GLX -	ALA -	GLX -	ALA
71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
- GLX -	LYS -	TYR	- SER -	GLX -	LYS -	GLX	- ASX -	LYS -	TYR	- GLX -	GLX -	GLX -	ILE
85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98
- LYS -	VAL -	LEU	- SER -	ASX -	LYS -	LEU	- LYS -	GLX -	ALA	- GLX -	THR -	ARG -	ALA
99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112
- GLX -	PHE -	ALA	- GLX -	ARG -	SER -	VAL	- ALA -	LYS -	LEU	- GLX -	LYS -	SER -	ILE
113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126
- ASX -	ASX -	LEU	- GLX -	ASX -	GLX -	LEU	- TYR -	ALA -	GLX	- LYS -	LEU -	LYS -	TYR
127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
- LYS -	ALA -	ILE	- SER -	GLU -	GLU -	LEU	- ASP -	HIS -	ALA	- LEU -	ASN -	ASP -	MET
141	142	143											
- THR -	SER -	ILE											

1. ábra. A tropomiozin polipeptidláncának ismert szekvencia részlete.

A feltüntetett 143 aminosav a molekula C-terminális része (kerekben fele). A körrel, illetőleg négyszöggel bekeretezett aminosavak a két periodikus sorban elhelyezkedő hidrofób gyökcsoportot tüntetik fel. (Bővebb leírást a szöveg ad).

HODGES és mt. (1973) közleményéből

helix-szé felesavarva képzeljük el az összes hidrofób gyökök egy, a spirált burkoló henger felületén futó vonal mentén, attól jobbra és balra helyezkednek el, mint az a 2. ábra síkba kiterített ábrázolásán látható. A TM-ban és a hasonló felépítésű alfa helikális molekulákban a két alfa helix egymás köré fonódik. A Hodges-féle szekvenciának megfelelő két alfahelixet úgy lehet egymás köré tekerni, hogy mindkét molekula hidrofób gyökcsorozata egyetlen, a két helix érintkezésén végigfutó hidrofób „varratot” képezzen. Ez a „hidrofób varrat” a globuláris molekulák hidrofób magjának megfelelő képződményeknek tekinthető.



2. ábra. Részlet az első ábra szekvenciájából, helix-hálózaton ábrázolva.
Az ábra az alfa-helix sugarát 5 Å-nek, a gyöktranszlációt 1,5 Å-nek, a menetenkénti gyök-
számot 3,6-nak feltételezi.
SODEK és mt. (1972) közleményéből

A Hodges-féle szekvencia vizsgálat érdekes hipotézisre vezetett a TM polimerizációs mechanizmusa tekintetében is: a kettős helix szerkezetére végzett modellépítési vizsgálatok azt mutatták, hogy a két helix közötti hidrofób kölcsönhatás akkor a legkedvezőbb — kedvező alatt azt értve, hogy a kettős molekula-képződménynek egy végig egyenletes vastagságát, a két helix egymástól való távolságának azonosságát akkor engedi meg —, ha az egyik helix „nagy” hidrofób gyökeivel szemben a másik helixnek „kis” hidrofób gyökei kerülnek — nagy alatt a leu, ilu, phe, és tyr-t, kicsi alatt ala és val-t értve. Ez az elrendezés akkor és csak akkor hozható létre maradéktalanul a megismert szekvenciával, ha a két helix egymáshoz 14 aminosavval eltolódva kapcsolódik. Ezzel ez a struktúra természetesen még nincs bizonyítva, de ez a feltevés igen elegáns magyarázatot ad a TM polimerizációjára. Ha 14 aminosavval eltolva fonjuk össze a két alegység helixet, a molekula két végén természetesen egy 14 tagú N-terminális és egy 14 tagú C-terminális szakasz pár nélkül marad. Hidrofób oldalláncai exponáltak az oldószernak. Így ezek mintegy „ragadós végeket” képeznek, amelyek *intermolekuláris* kettős helixet képezve tudják csak „elrejtetni” hidrofób oldalláncaikat. Ez magyarázná az átfedés nélkülinek látszó vég-a-véghez polimerizációt. Az N-terminális vég felől még csak az első kilenc aminosav szekvenciája ismeretes. Az ebben található hidrofób aminosavak elhelyezkedése megfelel a hipotézis mindkét elvárásának, a 3—4—3 elhelyezkedésnek és a „kicsi” és „nagy” hidrofókok váltakozásának.*

A TM-nek a regulatív rendszer többi komponenseivel való kölcsönhatására vonatkozólag a következő fő tényeket kell kiemelnünk; a TM határozott összetételű komplexet képez az aktinnal. Minden 7 aktin monomérre egy tropomiozin jut.

A TM-nal való komplex képzés az aktin egy sereg fizikai-kémiai sajátosságát befolyásolja: viszkozitási és áramlási kettőstörési mérések szerint, további ISHIWATA és FUJIME lézerefény szórás kísérletei szerint (1972) a komplex fonalak merevebben, mint a tiszta aktin polimer.

A TM-aktin kapcsolódásának (TP nélkül) nincs jelentős enzimológiai hatása: TM tartalmú vagy mentes aktomiozin egyaránt szabályozatlan: az aktin, mint aktivátor, a Ca ionok jelenlététől függetlenül maximálisan aktivált, „be” állásban van.

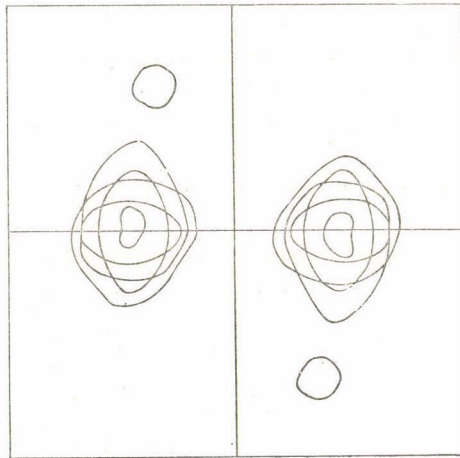
Maga az aktin egy elektronmikroszkóp vizsgálatokból, röntgendiffrakcióból igen pontosan ismert szerkezetű fonalas polimer, mind *in vitro*, mind a miofibrillum I-filamentumaiban. Ez a szerkezet a monomerek két gyöngysoroszerű sorozataként írható le, amelyek jobb menetes irányítással egymás körül tekerednek (ld. 5. ábra). Minden aktin monomer négy másikkal érintkezik. Egy gyöngysor 7 egységének a távolsága éppen megegyezik egy TM monomer hosszával.

* Ezen munka nyomdába adása óta Hodges és munkacsoportja befejezte a TM teljes szekvenciájának felderítését és a fenti két szabályosságot a molekula egészére érvényesnek találták. (Személyes közlés).

A fluoreszkáló antitest festési kísérletek fluoreszcencia mikroszkópiával egyértelműen mutatják, hogy a TM az I sávban vagyis az aktintartalmú I-filamentumokban helyezkedik el. (ENDO és mt. 1966.) Ugyanakkor a TM mentes és TM tartalmú aktin filamentumok elektronmikroszkóp képe nem mutat semmiféle feltűnő különbséget.

Mindezen tények figyelembevételével elsőnek HANSON és LOWY vetették fel azt az elképzelést (1963), hogy a TM az aktin fonalhoz hosszában, 7—7 monomerre ráfeküdve helyezkedik el. A kettős gyöngysor két árkában egy-egy TM polimer fonal fut végig.

Egészen újkeletű vizsgálatok ezt a képet tovább konkretizálták. Aktinból Mg ionokkal való kicsapással parakristály-szerkezetű képződményeket lehet létrehozni, melyben a „gyöngysorok” egymáshoz képest regiszterben vannak.



3. ábra. A TM elhelyezkedése az aktinspirálhoz képest.

Elektronmikroszkóp kép alapján készült háromdimenziós rekonstrukció hossz tengely irányában nézett vetülete. A rétegvonal ábrázolás az anyagsűrűséget tünteti fel a struktúra egy vékony rétegében. A két nagy anyagsűrűséget feltüntető gombolyag két aktinmonomer a két különböző kis kör a tropomiozin „hurka” metszete.

H. E. HUXLEY (1973) közleményéből

Szabályos regiszterben egymás mellé helyezett spirális szerkezetű objektumok vetületéből (amilyen az aktin parakristály elektronmikroszkópos képe is) a térbeli szerkezet matematikai eljárással ún. dekonvolúcióval rekonstruálható. Ezt az eljárást alkalmazva H. Huxley laboratóriumában (MOORE és mt. 1970) előállították az aktin és a TM-aktin komplex térbeli képét s differenciál eljárással a TM elhelyezkedését meghatározták. E munkák eredménye sematizálva a 3. ábrán látható: a két TM fonal nem a két aktin gyöngysor által képzett árok mélyén, hanem inkább a szegélyén helyezkedik el, az egyik az egyik, a másik a másik aktin monomersorozathoz közelebb.

Nézzük ezután a TM és TP kölcsönhatásait.

Viszkózitási (EBASHI és KODOMA, 1965) áramlási kettőtörési és ultracentrifugás (HARTSHORNE és MUELLER, 1967) vizsgálatok alapján könnyen kimutatható, hogy a TM és TP komplexet képez. Az *in vivo*-hoz hasonlóan néhány tizedes ionerősségnél a jelentősen polimerizált, jelentősen viszkózus TM oldatok viszkózitása, továbbá az áramlási kettőtörés a TP hatására fokozódik. Ultracentrifugában a TM és a TP jól megkülönböztethető sebességgel ülepedő, a szedimentációs állandó viszonylag csekély koncentráció függésére valló, meglehetősen szétterülő csúcsokat mutat. A kettő megfelelő arányú elegye viszont egyetlen „hypersharp”, tehát extrém asszimetriára valló sávot ad.

A TP az aktinnal is képez komplexet, ennek a funkcionális jelentősége azonban kétes. Így pl. bizonyos szűk ionerősség-intervallumban a TP az aktint kicsapja, ha azonban a rendszerhez TM-t is adunk, a csapadék újra feloldódik és ugyanaz a hármas komplex jön létre, mintha TM-tartalmú aktinhoz adtuk volna a TP-t.

Végül a hármas komplexre vonatkozóan: az aktin-TM komplexhez TP-t adva a viszkózitás és az áramlási kettőtörés paraméterei, továbbá ultracentrifugás vizsgálatok világosan mutatják a komplex-képzést. Ismét a lézer fény szórás vizsgálatok (ISHIWATA és FUJIME, 1972) azt mutatják, hogy TP megkötése az aktin-TM komplex fonalnak a hajlékonyságát tovább csökkenti (rigiditását fokozza). Ez a hatás függ a Ca koncentrációtól. Ca teljes hiányában a legnagyobb az aktin-TM-TP fonalak rigiditása. Mikromólos nagyságrendben, vagyis a reguláció szempontjából érdekes tartományban Ca-ot adva a rigiditás csökkenése mutatható ki.

Megjegyzendő, hogy sem a TM, sem a TP, sem a kettő komplexe semmiféle kölesönhatásba nem lép a miozinnal.

Mindezekből a vizsgálatokból összefoglalólag az a kép bontakozik ki, hogy a TP a TM-hez s a kettő komplexe az aktinhoz kötődve képezi a regulált komplexumot. Nyitott kérdés azonban egyelőre, hogy a hármas komplexben és *in vivo* a TP csak a TM-hez vagy a TP-hez és az aktinhoz is kapcsolódik-e.

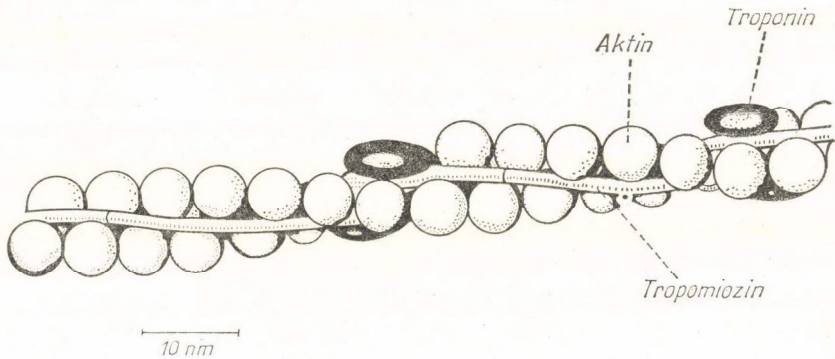
A vázolt vizsgálatok során többé-kevésbé pontos adatokat nyertek a hármas komplex stöchiometriájára vonatkozólag is. A természetesen fennálló diszkrepanciák mellett is az összes adatok összegegyeztethetőek egy 1 : 1 : 7 (TM : TP : A) összetétellel. Az egyik legmegbízhatóbb adatot a komplex összetételére BREMEL és WEBER vizsgálata szolgáltatotta (1972), TM és TP főleg jelenlétében polimerizált aktin kiultracentrifugálása és a szedimentáló komplex közvetlen analízise segítségével. Azonos eredményre jut BREMEL és WEBER (1972) gondos körülmények között izolált miofibrillum elektroforetikus analízisével is: meghatározza annak TM és TP tartalmát s az aktin között ADP-jének ugyanazon készítményeken mért mennyiségéhez viszonyítja. Egy további igen direkt bizonyíték PERRY teljes izomhomogenátumon végzett vizsgálata (PERRY és mt. 1973). A TP egyik alegysége a TP-C megfelelő körülmények között a teljes, ureában feloldott izomhomogenátum leggyorsabban vándorló,

jól elválasztható elektroforetikus komponense. ^{14}C brómacetáttal jelölt TP-C-t keverve a homogenátumhoz, izotóp hígítás alapján igen pontos meghatározást végzett PERRY e komponens mennyiségére. Hat független analízis $7,3 \pm 0,2 : 1$ aktin : TP-C arányt adott.

A hármas komplex enzimológiailag a teljes *in vivo* szabályozottságnak megfelelő állapotban van. Enzimológiai sajátságairól alább a TP alegységeinek leírása után fogunk részletesen szólni.

4. A regulációs rendszer modellje

Igen konkluzív vizsgálatok tisztázták a TP-nek az aktin fonal-komplexumon belüli elhelyezkedését. Ferritinnel jelölt anti-TP-vel végzett immunoelektronmikroszkópiás kísérletek világosan mutatták, hogy a TP mind a miofibrillumból kimacerált I-filamentumokon, mind *in vitro* előállított aktin-TM



6. ábra. A regulációs komplex Ebashi-féle modellje.
EBASHI (1972) közleményéből

polimereken kereken 40 nm periodicitással helyezkedik el (4. ábra). Ugyanezt alátámasztották, és kiegészítették HANSON és munkacsopótjának (HANSON 1973), továbbá H. E. Huxley laboratóriumának vizsgálatai (SPUDICH és mt., 1972), akik TP tartalmú aktin-TM-ből készült parakristályokban negatív és pozitív festéssel mutatták ki a TP periodikus felrakódását (5. ábra). Evvel az izom röntgendiffrakciós képének egy régi rejtélye is megoldódott, a régóta megfigyelt 38,5 nm-es periodicitás eredetének kérdése is.

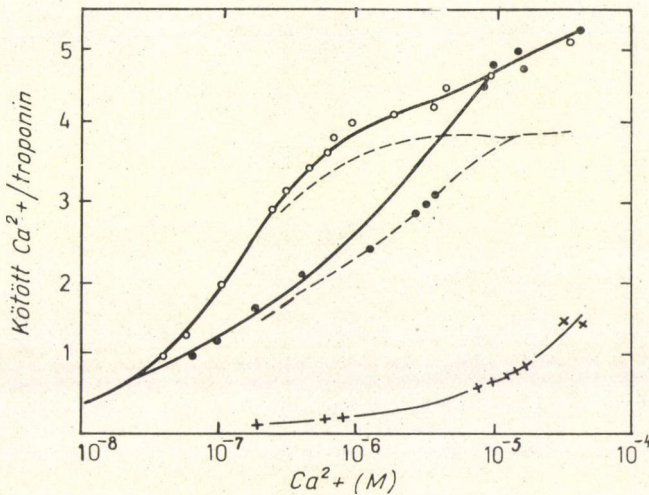
Az eddig vázolt és még sok egyéb vizsgálat eredményét összegezve (részben anticipálva) EBASHI volt az, aki HANSON és LOWEYnek az aktin-TM komplexum szerkezetére vonatkozó elképzelését kiegészítette avval, hogy az aktin hélixen végigfutó TM fonalra (a TM monomérek egy-egy határozott pontján) periodikusan kapcsolódnak a TP molekulák (6. ábra).

Minthogy egyrészt az egész rendszerben egyedül a TP az, amely a funkció szempontjából érdekes körülmények között Ca iont köt, s Ca ion hatására konformációját megváltoztatja, másrészt az ATP-áz aktivitásának a „be” állásra,

kontrakcióra jellemző magas szintje az aktin és a miozin kölcsönhatása révén jön létre, a reguláció mechanizmusát úgy kell elképzelnünk, hogy a TP-n fellépő konformáció változás a TM közvetítésével szétterjed az egész aktin fonalra s annak a szerkezetét úgy változtatja meg, hogy lehetővé teszi (az ATP bomlásával keletkezett tranzienst intermediérral feltöltött) miozin centrumokkal való reakciót. Az egész rendszer egy $Ca \rightarrow TP \rightarrow TM \rightarrow A \rightarrow (M. ADP. P)$ sorrendben egymásra ható kooperatív egységnek tekinthető.

A rendszer kooperativitását bizonyító számos vizsgálat közül csak egyet ismertetünk, mintegy példaképpen:

BREMEL és WEBER egyik közleménye (1972) közvetlen Ca kötési mérésekkel kimutatja, hogy a miofibrillumban, vagy *in vitro* rekonstruált rendszerben a TP Ca kötését befolyásolja az, hogy az aktin monomerek szabad állapotban vagy miozinnal kölcsönhatásban vannak-e. Ez más szóval azt jelenti, hogy a regulációs lánc utolsó láncszeme visszahat az elsőre. Kimutatható, hogy a kísérlet körülményei között egyedül a TP felelős a Ca kötésért. Refoszforilációs enzimrendszer (CP + CP-kináz) segítségével biztosították a kísérletben, hogy az enzimatis folyamat ellenére szigorúan konstans, előre megszabott ATP koncentráció álljon fenn. Az ATP koncentráció igen alacsony értékeinél időátlagban a miozin ATP-áz centrumok jelentős része szubsztrátmentes s ezért aktinhoz kapcsolt állapotban van, míg magas ATP koncentráció-



7. ábra. Miofibrillum Ca-kötése az aktin-miozin kapcsolódás mértékének függvényében. Az abszcissza a Ca koncentrációt ábrázolja (logaritmusos skálán), az ordináta a kötött Ca mólokot, mól tropomiozinra számítva.

A kihúzott vonalak a közvetlenül mért, a szaggatott vonalak a miozin Ca-kötésével korrigált értékeket ábrázolja. A korrekció a x- - - - - x jelölt görbe alapján történt, ami a troponintól enyhe tripszines kezeléssel megfosztott miofibrillummal végzett kontrollkísérletet ábrázol.

Az üres körök 8 μM a teli körök 2000 μM ATP jelenlétében végzett mérések.

BREMEL és WEBER (1972) közleményéből

nál a stacionárius állapot viszonylag kevés aktivátorhoz (aktinhoz) kapcsolt enzimet (miozin kereszthidat) eredményez. A 7. ábrán látható a miofibrillum közvetlenül meghatározott Ca kötése 8, ill. 2000 mikromól ATP jelenlétében. Mint látható, a kis ATP koncentrációk, vagyis a haránthidak nagy részének kötődése, a TP Ca iránti affinitásának növekedését eredményezi.

6. A szabályozás molekuláris mechanizmusának megközelítése⁴

A szabályozási mechanizmus mélyebb megismerésére irányuló vizsgálatok jelenleg főleg két irányban folynak. Egyrészt klasszikus biokémiai módszerekkel, a regulációs rendszer egyes komponenseinek részletes szerkezeti-funkcionális megismerésével, másrészt az ultrastruktúra kutatás módszereivel, elsősorban a kisszögű röntgenszórásnak élő izomra és modellrendszerekre való alkalmazásával.

A biokémiai jellegű eredmények közül csak a legkésőbb felfedezett TP sajátságaira vonatkozó adatokat ismertetjük részletesen.

E kérdésben meglepően hamar egységes kép alakult ki. A különböző kutatóhelyek véleménye elsősorban az egyes alegység-láncok funkciójának kisebb részletei tekintetében tér el.

A TP három alegység-láncát bizonyos terminológiai káosz után kezdik egységesen TP-T, TP-I és TP-C-nek nevezni.⁵ Ezek molekulásúlya rendre 37,23 és 18 kilodalton. Egy negyedik funkcionálisan még aktív komponens proteolitikus műtermékeknek, a TP-I megcsontított molekulájának bizonyult, míg a három fenti komponens egymástól teljesen független, immunológiailag és aminosavösszetételben egyaránt különböző polipeptid. A TP molekuláját az alegységek egy-egy-egy arányban építik fel. Ezek az elnevezések egyszersmind a funkcióra is utalnak. A TP-C a Ca kötő komponens, az egyetlen, amelyik az itt érdekes körülmények között vagyis millimólos Mg jelenlétében (és igen nagy, 10^6 M^{-1} körüli) affinitással Ca-ot köt. A TP-I I betűjét inhibitor sajátságaiból, nyerte. Ez a fehérje önmagában adva aktomiozinhoz, az ATP-áz jelentős gátlását eredményezi. Végül a TP-T T betűje azt jelzi, hogy a három komponens körül ez az egyetlen, amelyik a TM-hoz kötődik.

⁴ Itt jegyezzük meg, hogy az e referátumban tárgyalt regulációs mechanizmus elterjedtsége az élő világban korlátozott. A puhatestűek (harántesíktolt és sima) záróizmában s néhány más gerinctelen osztályban a szabályozás a miozin komponenshez kapcsolódik. Ezek az izmok TM-t tartalmaznak, de TP-t nem. (Lásd összefoglalólag LEHMAN és mt. 1973.)

⁵ A fentebb leírt jelölés egészen újkeletű. A közelmúlt irodalmában, sőt a jövőben is alternatív jelölésekkel is találkozhatunk. Ezekről egy kis táblázatot adunk:

Molekulásúly	18.000	23.000	37.000
Elnevezések	TP-C	TP-I	TP-T
	TP-III	TP-II	TP-I

A TP-I és TP-T komplexét, amit sok esetben együtt izolálnak TP-A-nak, a TP-C-t TP-B-nek is nevezik. — Megjegyzendő még, hogy régebbi irodalomban a TP-t szokás volt TN-nal rövidíteni, ami a TM-mal való könnyű összetéveszthetőség miatt kerülendő.

A három komponens egymáshoz és a regulatív rendszer többi komponenséhez való viszonya messzemenően tisztázott s meglehetősen bonyolult képet mutat. A legérdekesebb, hogy a TP-t nem lehet teljesen párhuzamba állítani egy alegységekből felépülő olyan fehérjével, amelynek funkciója csak a teljes strukturális egységnek a sajátja. Az egyes komponensek külön-külön is mutatnak bizonyos funkcionális jelenségeket.

A TP-I jelentősen gátolja az aktomiozin rendszer aktivitását akkor is, ha az TM-t nem tartalmaz. Míg azonban TM nélkül közel 1 : 1 TP-I : A arányánál, a TM tartalmú rendszerrel már 1 : 6 arányánál eléri a maximumát a gátlás (PERRY és mt. 1973). Érdekes, hogy a TP-I-ből származó proteolitikus műtermék a 14 kilodaltonos komponens is aktív inhibitor, de ennek viselkedése közömbös a TM jelenlétére vagy hiányára. Viszonylag nagy telítés szükséges a maximális gátláshoz TM jelenlétében is (PERRY és mt. 1973).

A TP-C legfőbb sajátja, hogy egyedül ez a Ca kötő komponens. Molekulánként 1 Ca-ot köt kb. 10^6 konstanssal. TP-T hozzáadása nem befolyásolja a kötést, viszont TP-I-vel képzett komplexe 2 Ca-t köt, ugyanolyan erősséggel, holott a TP-I önmagában nem köt Ca-t. A hármas komplex, a teljes TP szintén két Ca-t köt. (GREASER és mt. 1973) A TP-I és TP-C elektroforetikusan kimutatható komplexet képez Ca jelenlétében. Ez a komplex olyan erős, hogy 6 M ureában is csak a Ca elvonásának hatására (EGTA hozzáadására) bomlik meg.

További érdekes sajátja a TP-C-nek, hogy neutralizálja a TP-I gátló hatását. TM nélküli rendszerben ez a neutralizálás bekövetkezik Ca jelenlététől függetlenül is, míg TM jelenlétében jelentős, 10^{-5} -nél nagyobb Ca koncentráció hatására szűnik csak meg a gátlás. Az imént elmondottakból következik, hogy a TP-I és TP-C komplexe önmagában (TP-T nélkül is) Ca érzékennyé teszi a TM-tartalmú AM rendszert. Ca megvonása esetén szabadon érvényesül a TP-I gátló hatása. (PERRY és mt. 1973; GREASER és mt. 1973; EBASHI és mt. 1973.)

Bár a szabályozottság, a Ca érzékenység bizonyos mértékig visszaállítható TP-T nélkül is (TP-I + TP-C-vel) kétségtelen, hogy a TP-T is funkcionális része a rendszernek. Ez az egyetlen komponens a három közül, amelyeik a TM ultracentrifugás képében a TM + teljes TP-vel kapotthoz hasonló, jellegzetes „hypersharp” csúcsot eredményez. (GREASER és mt. 1973; HARTSHORNE és DREIZEN, 1973.) A másik két komponens úgy látszik nem kötődik a TM-hoz. A TP-T kétségtelenül reagál a TP-C-vel s ez a reakció Ca függő: az izolált TP-T kis ionerősségen kicsapódik. Ezt a csapadékot TP-C feloldja, de csak akkor, ha Ca ionok is jelen vannak. (EBASHI és mt. 1973.)

Végül enzimológiai szempontból: a TP-T fokozza a másik két komponenssel kapott szabályozottságot. Jelenlétében a többi komponensek azonossága mellett a Ca hatására fellépő aktivitás nagyobb.

A TP komponensek fő funkcionális sajátját az I. táblázat foglalja össze.

1. táblázat

A troponin-komponensek funkcionális sajátságainak áttekintése

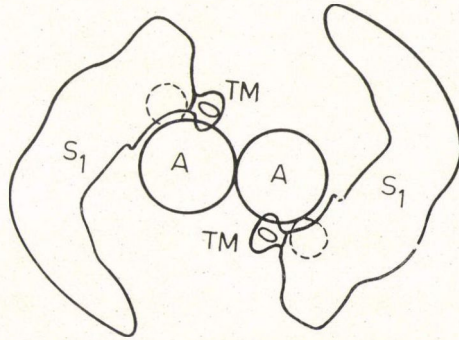
TP-I	TP-C	TP-T
ATP-áz gátlása. Ca nem függeszti fel. TM potenciálja.	Ca ²⁺ kötés (1 M/M)	TM kötés
Ca ²⁺ kötés (2 M/M) A gátlás felfüggesztődik. (TM jelenlétében Ca is szükséges a felfüggesztéshez: részleges szabályozottság)		
Ca-tól függő szolubilizáció		
Ca ²⁺ kötés TM jelenlétében teljes szabályozottság		

Érdeemes röviden megemlíteni a TP komponensek egymás közötti kölcsönhatására vonatkozólag az egyes szerzők között jelenleg fennálló legfőbb ellentmondást: GERGELY és mtsi továbbá PERRY nem kapják a Ca érzékenység helyreállítását (vagy legalábbis teljes helyreállítását), ha egyszerűen elegyítik az (ureában végzett ioncserével szétválasztott) komponenseket, hanem csak akkor, ha ureából együtt dializálják ki őket. Más szerzők viszont ezt nem találják szükségesnek.

Végeredményben nem fér kétség ahhoz, hogy a három alegységből felépülő TP tényleges, in vivo is létező funkcionális egység. Az ellentétek technikai jellegűek, abból adódnak, hogy in vitro a három alegységet nem minden körülmények között sikerül a natívnak pontosan megfelelő módon egyesíteni. Erre mutat GERGELY és mtsai-nak az a megfigyelése is, hogy ha a TP-C-t (magában, vagy TP-I-vel együtt) EGTA jelenlétében dializálják ureamentesre, a Ca kötés teljesen megszűnik. (GREASER és mt. 1973.)

Igen döntő adatokat szolgáltatott a reguláció mechanizmusára vonatkozólag a röntgendiffrakciós vizsgálatok. Az élő, működő izom kisszögű röntgendiffrakciós diagramjában kontrakció hatására észlelt változások egy részéről kétségtelenül kimutatható, hogy az az I-filamentumnak a működés során megváltozott szerkezetét tükrözi. A hatalmas matematikai apparátust, feltételezett modellek várható diffrakciós képének számítógépes szimulációját igénylő értelmezések azt mutatják, hogy a változás lényege a TM „hurkák” elmozdulása az aktin gyöngysor felületén. Aktivált izomban a TM-fonal beljebb húzódik az árok feneke felé (8. ábra). H. Huxley laboratóriumának aktin-szubfragment-1 komplexen végzett elektronmikroszkópos vizsgálatai (MOORE és mt. 1970),

a szerkezet háromdimenziós rekonstrukciója, pontosan definiálni tudta az aktinon az S-1 kapcsolódási területét. Ez a terület részben azonos avval, ahová a TM Ca távollétében kapcsolódik. Így elképzelhető, hogy a regulált rendszer „ki” állása egyszerűen azt jelenti, hogy a TM blokkolja a S-1 kötő helyet, „be” állásban viszont a TM „arrébb húzódik” s szabaddá teszi az aktin és miozin kapcsolódását. (MOORE és mt. 1970; HUXLEY, 1973.)



8. ábra. Az aktin-tropomiozin-HMM-S-1 rendszer felépítése.

Az I-filamentum tengelyére merőleges vetület egy aktinmonomer-pár szintjén. „S-1” a HMM-S-1, „A” az aktin monomér körvonala. A tropomiozin (TM) kihúzott pozíciója az aktív, pontozottan feltüntetett pozíciója az inaktív izomnak megfelelő állapot. Különböző elektronmikroszkóp és röntgendiffrakciós munkák szintézise alapján.

H. E. HUXLEY (1972) munkájából

A röntgendiffrakciós vizsgálatok egyelőre nyitva hagyják azt a kérdést, hogy a TM mozgása az aktinfonal felületén oka-e vagy következménye az aktív állapotnak, a miozin centrumok kapcsolódásának az aktinhoz. Egyrésztől elegáns röntgendiffrakciós vizsgálatok valószínűsítik, hogy a TM észlelt mozgását *nem* az S-1 kapcsolódása okozza: ha annyira megnyújtjuk az izmot, hogy az A és I filamentumok nem fedik át egymást, vagyis S-1-aktin kölcsönhatás lehetetlen, a TM elmozdulása mégis bekövetkezik ingerlés (vagy glicerinézett modell izomban Ca) hatására (HASELGROVE, 1973). Másrésztől viszont gerinctelenek izmába, mely TM-t tartalmaz, de TP-t nem (ld. 4. lábjegyzet, a 114. lapon), s amelynek a regulációja a miozin molekulához kötött, a TM elmozdulása az aktinhoz képest szintén kimutatható (VIBERT és mt. 1971). Minthogy itt a Ca érzékenység a miozin sajátosága, ezek a kísérletek úgy mutatják, mintha a TM elmozdulása mégis inkább a *következménye* és nem az oka volna a haránthidak kapcsolódásának.

Néhány egyszerű biokémiai megfigyelés is megkérdőjelezi a röntgendiffrakciós munkák alapján kínálkozó elegáns hipotézist. Úgy látszik, hogy a szabályozást gerinces izomban sem lehet maradéktalanul az aktin-komplexumnak tulajdonítani. HARTSHORNE és DANIEL (1972) továbbá BAILIN és BÁRÁNY

(1973) leírták, hogy a miozin bizonyos SH csoportjainak blokkolása olyan miozint eredményez, amely a teljes regulációs aktinkomplexum jelenlétében is nem regulált, Ca-ra nem érzékeny ATP-áz mutat. Ezek szerint a regulált állapot „felismerésében” a miozin struktúrája is szerepet játszhat.

7. Konklúziók

Az ismertetett eredményeknek a jelentősége az izomműködés mechanizmusának megismerése szempontjából nyilvánvaló. Érdekes azonban végiggondolni ezen eredményeket a fehérje szerkezet és funkció kapcsolatának sokkal általánosabb szemszögéből is.

Általában megszoktuk, hogy a szerkezet és funkció összefüggéséről az enzimológiában oly gyümölcsöző aktív centrum koncepció alapján gondolkodjunk. E tekintetben az egész ismertetett rendszer igen különleges. Mint láttuk, az aktin polimérben minden egyes aktin monomér négy másikkal érintkezik, eszerint négy aktin-aktin kötési centrum volna, s az aktin polimér szerkezetéből következik, hogy ezeknek a centrumoknak különbözniük kell egymástól. Sok jel arra mutat azonban, hogy helyesebb az aktin-aktin kötést, a több azonos alegységből álló fehérjemolekulák alegység-alegység kölcsönhatásával párhuzamba állítani. A polimerizációért felelős kontakt felületeken kívül az aktinnak tartalmaznia kell legalábbis egy TM kötő centrumot, de esetleg kettőt, a TM-nek a „ki-be kapcsolás” során történő mozgását tekintve, továbbá a miozin kötő centrumot. Tekintve, hogy a TP egyes komponensei TM nélkül is hatnak az aktomiozin rendszer ATP-áz aktivitására, nincs kizárva, hogy az aktin és TP között is fennáll valamiféle kölcsönhatás. Szinte úgy látszik, hogy az aktin felületén jóformán nincs olyan részlet, amely ne volna valamiféle specifikus funkció szempontjából fontos. Ez magyarázza talán azt a tényt, ami mostanában kezd kibontakozni, hogy evolúciós szempontból tekintve az aktin az egyik legkonzervatívabb fehérje.

További érdekes problémát vet fel az aktin-TM kapcsolódás különös 1 : 7 stöchiometriája. Geometriailag a TM „hurka” minden egyes szakasza azonos helyzetben van az aktin monomérekhez képest. Ez elsőre azt sugalná, hogy a TM-nak hét azonos aktinkötő centruma van. Az eddig feltárt szekvencia részlet azonban ezt nem támogatja, pedig már a molekula fele ismeretes. Ez a tény azt a feltevést sugallja, hogy az aktin azonos centrumai a TM más és más szerkezeti elemével, gyökcsoportjával reagálnak. Egyelőre azonban nem látszik, hogy a (formálisan véve) minden hétből hat — legalább is a TM felől nézve különböző — aktin-TM kötésnek más és más volna a funkciója. Ez arra a merőben példa nélkül álló eredményre vezetne, hogy azonos funkciót ugyanazon a fehérjén belül különböző struktúrák valósítanak meg.

Még tovább lehetne szaporítani a megszokott szemléletünkbe nehezen illeszthető problémákat. Az eddig elmondottak is elegendőek azonban annak

a demonstrálására, hogy az izom regulációs mechanizmusának megismerése a fehérje-fehérje kölcsönhatásokról kialakított képünket jelentős, általános érdekességű új vonásokkal gazdagíthatja.

IRODALOM

- BAILIN, G.—BÁRÁNY, M.: Evidence for the role of myosin in calcium sensitization of actomyosin. — *J. of Biol. Chem.* **248**, 373 (1973).
- BREMEL, R. D.—WEBER, A.: Cooperation within actin filament in vertebrate skeletal muscle. — *Nature* **238**, 97—101 (1972).
- CASPAR, D. L. D.—COHEN, C.—LONGLEY, V.: Tropomyosin: Crystal structure, polymorphism and molecular interactions. — *J. Mol. Biol.* **65**, 87 (1969).
- DRABIKOWSKI, W.—GERGELY, J.: The effect of the temperature of extraction on the tropomyosin content in actin. — *J. Biol. Chem.* **237**, 3412—3417 (1962).
- EBASHI, S.: Calcium ions and muscle contraction. — *Nature* **240**, 217 (1972).
- EBASHI, S.—KODAMA, A.: A new protein factor promoting aggregation of tropomyosin. — *J. Biochem.* **58**, 107—111 (1965).
- EBASHI, S.—OHTSUKI J.—MIHASHI, K.: Regulatory proteins of muscle with special reference to troponin. — *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **37**, 215—223 (1973).
- EISENBERG, E.—MOOS, C.: The ATP-ase activity of Acto-HMM. A kinetic analysis of actin activation. — *Biochemistry* **7**, 1486 (1968).
- EISENBERG, E.—MOOS, C.: Actin activation of heavy meromyosin adenosine triphosphatase. Dependence on adenosine triphosphate and actin concentrations. — *Biol. Chem.* **245**, 2451—2459 (1970).
- EISENBERG, E.—KIELLEY, W. W.: Native tropomyosin: Effect on the interaction of actin with heavy meromyosin and subfragment —1. — *Biochem. Biophys. Res. Com.* **40**, 50—54 (1970).
- ENDO, M.—NONOMURA, J.—MASAKI, T.—OKTSUKI I.—EBASHI, S.: Localization of native tropomyosin in relation to striation patterns. — *J. Biochem.* **60**, 605—608.
- GREASER, M. L.—YAMAGUCHI, M.—BREKKE, C.—POTTER, I.—GERGELY, J.: Troponin subunits and their interaction. — *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **37**, 235—244 (1973).
- HAN, M. H.—BENSON, E. S.: Conformational changes in troponin induced by Ca. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **38**, 378—384 (1970).
- HANSON, J.: Evidence from electron microscope studies on actin paracrystals concerning the origin of the crossstriation in the thin filaments of vertebrate skeletal muscle. — *Proc. Roy. Soc. Lond. B* **183**, 39—58 (1973).
- HANSON, J.—LOWY, J.: The structure of F-actin and of actin filaments isolated from muscle. — *J. Mol. Biol.* **6**, 46—60 (1963).
- HARTSHORNE, D. J.—DANIEL, J. L.: The importance of sulfhydryl groups for the calcium sensitive response of natural actomyosin. — *Biochim. Biophys. Acta* **223**, 214—218 (1971).
- HARTSHORNE, D. J.—DREIZEN, P.: Studies on the submit composition of troponin. — *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **37**, 225—234 (1973).
- HARTSHORNE, D. J.—MUELLER, H.: Fractionation of troponin into two distinct proteins. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **31**, 642—651 (1968).
- HASELGROVE, J. C.: X-ray evidence for a conformational change in the actin-containing filaments of vertebrate striated muscle. — *Cold Spring Harbor. Symp.* **37**, 341—352 (1973).
- HIGASHI—FUJIME, S.—OOI, T.: Electron microscopic studies on the crystal structure of tropomyosin. — *J. de Microscopie* **8**, 535 (1969).
- HODGES, R. S.—SODEK, J.—SMILLIE, L. B.—JURASEK, L.: Tropomyosin: Amino acid sequence and coiled-coil structure. — *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **37**, 299 (1973).
- HUXLEY, H. E.: Structural changes in actin and myosin containing filaments during contraction. — *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **37**, 361—377 (1973).
- ISHIWATA, S.—FUJIME, S.: Effect of Ca ions on the flexibility of reconstituted thin filaments of muscle studied by quasielastic scattering of light. — *J. Mol. Biol.* **68**, 511 (1972).
- KORETZ, J. E.—HUNT, T. és — TAYLOR, E. W.: Studies on the mechanism of myosin and actomyosin ATP-ase. — *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **37**, (1973).

- LAKI, K.—MARUYAMA, K.—KOMINZ, D. R.: Evidence for the interaction between tropomyosin and actin. — *Arch. Biochem. Biophys.* **98**, 323—330 (1962).
- LEHMAN, W.—KENDRICH — JONES, J.—SZENT-GYÖRGYI, A. G.: Myosin-linked regulatory systems: Comparative studies. — *Cold Spring Harbor Simp. Quant. Biol.* **37**, 319—330 (1972).
- LYMN, E. W.—TAYLOR, E. W.: Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. — *Biochemistry* **10**, 4617—4624 (1971).
- LYMN, R. W.—TAYLOR, E. W.: Transient state phosphate production in the hydrolysis of nucleotide triphosphates by myosine. — *Biochemistry* **9**, 2975—2983 (1970).
- MOORE, P. B.—HUXLEY, H. E.—DEROSIER, D. J.: Three-dimensional reconstruction of F-actin, thin filaments and decorated thin filaments. — *J. of Mol. Biol.* **50**, 279 (1970).
- OHTSUKI, I.—MASAKI, J.—NONOMURA, J.—EBASHI, S.: Periodic distribution of troponin along the thin filament. — *J. Biochem.* **61**, 817—821 (1967).
- PERRY, S. V.—COLE, H. A.—HEAD, J. F.—WILSON, F. J.: Localization and mode of action of the inhibitory component of the troponin complex. — *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **37**, 257—262 (1973).
- SODEK, J.—HODGES, R. S.—SMILLIE, L. B.—JURASSEK, L.: Aminoacid sequence of rabbit skeletal tropomyosin and its coiled-coil structure. — *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **69**, 3800—3804 (1972).
- SPUDICH, J. A.—HUXLEY, H. E.—FINCH, J. T.: Structural studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin. — *J. Mol. Biol.* **72**, 619—632 (1972).
- TAYLOR, E. W.—LYMN, E. W.—MOLL, G.: Myosin-product complex and its effect on the steady state rate of nucleotide triphosphate hydrolysis. *Biochemistry* **9**, 2984—2991 (1970).
- TONOMURA, J.—OOSAWA, F.: Molecular mechanism of contraction. — *Ann. Rev. Biophys.* **1**, 159 (1972).
- VIBERT, P. J.—HASELGROVE, J. C.—LOWY, J.—POULSEN, R. F.: Structural Changes in actin containing filaments of muscle. — *Nature New Biology* **236**, 182 (1971).
- WAKABAYASHI, T.—EBASHI, S.: Reversible change in physical state of troponin induced by calcium ion. — *J. Biochem.* **64**, 731 (1968).