

**KWALITATIEWE EN KWANTITATIEWE VERSKILLE
TUSSEN DIE SARKOPLASMIESE RETIKULUM
VAN
SKELET- EN HARTSPIER**

deur

FREDERIK CHRISTOFFEL ELOFF

**Proefskrif ingedien ter nakoming van die vereistes
vir die graad
Doctor Scientiae (Fisiologie)**

aan die

**POTCHEFSTROOMSE UNIVERSITEIT VIR
CHRISTELIKE HOËR ONDERWYS**

Leier: Prof. N.T. Malan

Potchefstroom

Mei 1987

INHOUDSOPGAVE

	Bladsy
HOOFSTUK 1	1
INLEIDING EN LITERATUURAGTERGROND	1
1.1	2
Historiese agtergrond	2
1.2	3
Struktuur en funksie van die skeletspier sarkotubulêre stelsel	3
1.2.1	3
Transversale buis en triade	3
1.2.2	5
Skeletspier sarkoplasmiese retikulum	5
1.2.2.1	5
Morfologiese struktuur	5
1.2.2.2	6
ATPase proteïen	6
1.2.2.3	7
Kalsekwestrien	7
1.2.2.4	7
Ca ²⁺ -bindingsproteïen (M ₅₅ -proteïen)	7
1.2.2.5	8
Glikoproteïene van 53 000 en 160 000 dalton	8
1.2.2.6	8
Lipiede	8
1.3	9
Struktuur en funksie van die hartspier sarkotubulêre stelsel	9
1.3.1	9
Strukturele ooreenkomste en verskille tussen die sarkotubulêre stelsels van skeletspier en hartspier	9
1.4	12
Eksitasie-kontraksiekoppeling in skeletspier	12
1.4.1	13
Ca ²⁺ -vrystelling	13
1.4.2	14
Ca ²⁺ -opname	14
1.5	16
Eksitasie-kontraksiekoppeling in hartspier	16
1.6	18
Doel en motivering	18
HOOFSTUK 2	23
METODES EN MATERIAAL	23
2.1	23
Bereiding van SR vesikels uit skeletspier	23
2.2	23
Bereiding van SR vesikels uit hartspier	23
2.3	24
Suiwering en isolering van SSR ATPase	24
2.4	25
Proteïenbepaling volgens die Folinmetode	25
2.5	25
ATPase-aktiwiteit van SR	25
2.6	25
ATP-afhanklike Ca ²⁺ -opname deur SR	25
2.6.1	26
ATP-afhanklike Ca ²⁺ -opname deur SR in afwesigheid van oksalaat	26

2.6.2	ATP-afhanklike Ca^{2+} -opname deur SR in teenwoordigheid van oksalaat	26	C
2.7	Die oplosbaarheid van SR in Triton X-100	26	
2.8	Die lipied:proteïenverhouding	27	
2.9	Lipiedbepaling	27	
2.10	Tripsienvertering	27	
2.11	Die bepaling van die vrye Ca^{2+} -konsentrasie en die handhawing van 'n konstante vrye Ca^{2+} -konsentrasie by verskillende pH-waardes	27	..
2.12	Chemikalieë	28	F
2.13	Statistiese verwerkings	28	
HOOFSTUK 3	MEGANISME VAN ONSTABILITEIT VAN CSR	30	
3.1	Inleiding	30	E
3.2	Resultate	35	
3.2.1	Meganisme van onstabiliteit van CSR	35	
3.2.1.1	Invloed van BHT, DTT en PMSF op die Ca^{2+} -opname van CSR	35	
3.2.1.2	Invloed van 1 mM BHT, 1 mM DTT en 1 mM PMSF op die stabiliteit van CSR Ca^{2+} -opname in afwesigheid van oksalaat	37	k
3.2.1.3	Vergelyking van die stabiliteit van CSR Ca^{2+} -opname sonder oksalaat met CSR Ca^{2+} -opname in teenwoordigheid van oksalaat	37	
3.2.1.4	Lipied:proteïenverhouding en cholesterolinhoud van SSR en CSR	37	1, 2, 3
3.2.1.5	Invloed van tripsienvertering op die Ca^{2+} -opname van SSR en CSR in teenwoordigheid van oksalaat en ook sonder oksalaat	40	3, 4
3.2.1.6	Invloed van tripsienvertering op die ATPase-aktiwiteit van SSR en CSR	40	4
3.2.2	Temperatuur-geïnduseerde membraanduurlaaatbaarheidsveranderinge	40	5
3.2.2.1	Effek van temperatuur op die SSR en CSR Ca^{2+} -opname in teenwoordigheid van oksalaat	40	6

3.2.2.2	Effek van verskillende preInkubasietye en preInkubasietemperatuur op die ATPase-aktiwiteit van SSR en CSR	45
3.2.2.3	Effek van verskillende temperatuur op die Ca^{2+} -inhoud van SSR vesikels gelaai met Ca^{2+} in die afwesigheid en teenwoordigheid van oksalaat	45
3.2.2.4	Effek van verskillende temperatuur op die Ca^{2+} -inhoud van CSR vesikels gelaai met Ca^{2+} in die afwesigheid en teenwoordigheid van oksalaat	45
3.2.2.5	Effek van 25 μ M A23187 op die Ca^{2+} -inhoud van SSR en CSR vesikels gelaai met Ca^{2+} in die afwesigheid en teenwoordigheid van oksalaat	48
3.2.2.6	Effek van preInkubasietemperatuur op die membraandeurlaatbaarheid van SSR en CSR	48
3.2.2.7	Invloed van rutheniumrooi op die temperatuur-geïnduseerde membraandeurlaatbaarheid van CSR	51
3.2.2.8	Invloed van rutheniumrooi op die temperatuur-geïnduseerde onderdrukking van CSR Ca^{2+} -opname	54
3.3	Bespreking	54
3.3.1	Meganisme van onstabiliteit van CSR	54
3.3.2	Invloed van proteolitiese vertering op die funksionering van SSR en CSR	56
3.3.3	Temperatuur-geïnduseerde membraandeurlaatbaarheidsveranderinge van SSR en CSR	58
HOOFSTUK 4	INVLOED VAN pH OP DIE SR	62
4.1	Inleiding	62
4.2	Resultate	69
4.2.1	Effek van pH op die Ca^{2+} -opname van SR in teenwoordigheid van K-oksalaat	69
4.2.2	Effek van pH op die ATPase-aktiwiteit van SR	69
4.2.2.1	Effek van pH op die ATPase-aktiwiteit van CSR	69
4.2.2.2	Effek van pH op die ATPase-aktiwiteit van SSR	72
4.3	Bespreking	72
4.3.1	Invloed van vrye Ca^{2+} -konsentrasieveranderinge wat tydens pH-veranderinge voorkom, op die SR-aktiwiteit	72
4.3.2	Vergelyking van die invloed van pH op SSR- en CSR-aktiwiteit	74

HOOFSTUK 5	INTERAKSIE TUSSEN TRITON X-100, A23187 EN DIE ATPase VAN SSR EN CSR	75
5.1	Inleiding	75
5.2	Resultate	79
5.2.1	Oplosbaarheid van SSR en CSR in Triton X-100	79
5.2.2	Invloed van A23187 en Triton op die SSR ATPase-aktiwiteit	79
5.2.3	Invloed van A23187 en Triton op die CSR ATPase-aktiwiteit	79
5.2.4	Invloed van vrye Ca^{2+} -konsentrasie op die SSR ATPase-aktiwiteit in teenwoordigheid van 20 μ M A23187 en verskillende Tritonkonsentrasies	84
5.2.5	Invloed van vrye Ca^{2+} -konsentrasie op die CSR ATPase-aktiwiteit in teenwoordigheid van 5 μ M A23187 en verskillende Tritonkonsentrasies	84
5.2.6	Lineêre-Burke-grafieke van die invloed van vrye Ca^{2+} -konsentrasies op die SSR ATPase-aktiwiteit in teenwoordigheid van A23187 en verskillende Tritonkonsentrasies	84
5.3	Bespreking	89
5.3.1	Oplosbaarheid van SSR en CSR in Triton X-100	89
5.3.2	Invloed van A23187 en Triton op die SSR ATPase-aktiwiteit	89
5.3.3	Invloed van A23187 en Triton op die CSR ATPase-aktiwiteit	91
HOOFSTUK 6	GEVOLGTREKKINGS	93
OPSOMMING		97
SUMMARY		99
LITERATUURLYS		101
AFKORTINGS		116
BEDANKINGS		117

HOOFSTUK 1

1. INLEIDING EN LITERATUURAGTERGROND

Gedurende die eksitasie-kontraksiekoppeling van skeletspier speel die sarkotubulêre sisteem 'n baie belangrike rol. Hierdie sisteem bestaan uit die transversale of T-buis en die sarkoplasmiese retikulum (SR). Dit word algemeen aanvaar dat die SR van skeletspier (SSR) die konsentrasie vrye Ca^{2+} in die sarkoplasma reguleer (Carafoli, 1985). Ontlading van die senuwee by die mioneurale aansluiting het tot gevolg dat die sarkolemma depolariseer. Die depolarisiegolf versprei oor die sarkolemma en beweeg ook in die T-buis af na die dieperliggende dele van die spiersel. As gevolg van die depolarisasie van die T-buis, stel die SSR Ca^{2+} vry wat spierkontraksie tot gevolg het. Spierverslapping word bewerkstellig wanneer die SSR weer die Ca^{2+} opneem en die vrye Ca^{2+} -konsentrasie in die sarkoplasma verlaag (Hasselbach, 1964).

In teenstelling met SSR is die rol wat die SR van hartspier (CSR) tydens die eksitasie-kontraksiekoppeling speel nie so duidelik afgebaken nie. Afleidings wat gemaak is oor die eksitasie-kontraksiekoppeling van skeletspier, is direk oorgedra na hartspier (Morad & Goldman, 1973). Navorsing wat na hierdie tydperk gedoen is op die CSR, het algaande getoon dat daar groot verskille bestaan tussen die eksitasie-kontraksiekoppeling van dié twee tipes spiere. Die lae aktiwiteit van die CSR het egter die vermoede laat ontstaan dat die CSR nie die enigste of selfs die grootste faktor is wat verantwoordelik is vir die verslapping van die hartspier nie (Naylor & Merrilees, 1971). Daar is vermoed dat die mitochondria 'n belangrike bydrae lewer tydens die verslapping van hartspier (Carafoli *et al.*, 1975). Hoewel mitochondria Ca^{2+} kan opneem en dit 'n belangrike rol tydens patologiese toestande soos isemie speel, is die tempo van Ca^{2+} -opname en Ca^{2+} -vrystelling deur mitochondria, te stadig om vir die slag-tot-slag veranderinge in die Ca^{2+} -konsentrasie voorsiening te maak (Carafoli, 1982). Gevolglik word dit vandag aanvaar dat die CSR die belangrikste organel is wat die intra-sellulêre vrye Ca^{2+} -konsentrasies beheer (Carafoli, 1985).

Die verkryging van inligting oor die eksitasie-kontraksiekoppeling van hartspier is belemmer deur die onstabiliteit en onsuiverheid van CSR preparate (Harigaya & Schwartz, 1969; Pretorius *et al.*, 1969). Die bereiding van CSR

lewer baie probleme (Lighty & Bertrand, 1979). Die redes vir die moeilike bereiding van CSR is dat die CSR swakker ontwikkel is as SSR en 'n baie laer opbrengs dus verkry word. Hartspier bevat ook baie meer mitochondria wat die CSR preparaate kontamineer (Bloom & Fawcett, 1975). Dit het tot gevolg gehad dat groot leemtes vandag bestaan in die kennis van die subcellulêre meganismes betrokke by die eksitasie-kontraksiekoppeling van hartspier.

Tydens hierdie projek is daar eerstens gepoog om die probleem van onstabieliteit van CSR preparaate te bowe te kom. Tweedens is die kennis wat bestaan oor SSR toegepas op die CSR om 'n vergelyking te tref en kwalitatiewe en kwantitatiewe verskille bloot te lê. Om hierdie verskille te ondersoek is van verskillende fisies-chemiese faktore gebruik gemaak soos tripsienvertering, verskillende temperature, pH-veranderinge en detergens behandeling.

In die res van Hoofstuk 1 word die historiese agtergrond van die ontwikkeling van SR-navorsing behandel. 'n Literatuurbespreking word gegee oor die ooreenkomste en verskille tussen SSR en CSR. In Hoofstuk 2 word die metodes wat tydens hierdie projek gebruik is, bespreek. Hoofstuk 3 handel oor die onstabieliteit van CSR naamlik die reaksie van SSR en CSR op veroudering, tripsienvertering en temperatuurbehandeling. Daar word ook gepoog om die meganisme betrokke by temperatuur-geïnduseerde deurlaatbaarheidsveranderinge vas te stel. In Hoofstuk 4 word die invloed van pH op SSR en CSR met mekaar vergelyk. In Hoofstuk 5 word die invloed van die detergens Triton X-100 en 'n Ca^{2+} -ionofoor A23187, op die SSR en CSR ondersoek.

1.1 Historiese agtergrond

In 1882 het Retzius met behulp van 'n ligmikroskoop 'n vertakte struktuur in die spiersel waargeneem en beskryf. Veratti beskryf in 1902 dieselfde struktuur en noem dit die retikulêre apparaat (Hasselbach, 1964). Veratti het vermoed die stelsel is deel van die motoriese sensuums wat die spiersel binnedring en daar 'n vertakte struktuur vorm (Langer, 1968). Die woord retikulêr beteken dan ook 'n netvormige vertakking. In 1883 vind Ringer dat 'n geïsoleerde paddahart se spontane kontraksies staak tensy Ca^{2+} in die perfusie-medium teenwoordig is (Langer, 1968). Dit was die eerste aanduiding van die belangrike rol wat Ca^{2+} in die eksitasie-kontraksiekoppeling van spierweefsel speel.

In 1952 het Marsh gevind dat miofibrille tekens van krimpung toon indien ATP bygevoeg word. Indien die supernatant van 'n spierhomogenaat saam met ATP by die miofibrille gevoeg word, vind daar 'n swelling van die miofibrille plaas. Die swelling is beskou as analoog aan verslapping en Marsh het afgelei dat daar 'n struktuur of 'n faktor in die supernatant is wat spierkontraksie inhibeer. Hy vind ook dat hoë temperatuur en suur hierdie faktor vernietig en dat dit waarskynlik 'n proteïen is wat hy die verslappingsfaktor noem (Marsh, 1952).

Hanson & Huxley het in 1953 voorgestel dat aktien en miosien as parallelle filamente in die spier voorkom en kontraksie veroorsaak deur oormekaar te gly sonder om self te verkort. Bennet & Porter het in dieselfde jaar met behulp van 'n elektronmikroskoop 'n interfibrillêre buisstelsel gerapporteer wat hulle die sarkoplasmiese retikulum noem.

Die rol van Ca^{2+} kom weer na vore in 1955 toe Niedergierke vind dat Ca^{2+} die enigste ioon is wat in die spier voorkom wat spierkontraksie tot gevolg het, indien dit met behulp van 'n mikropipet in die spiervesel ingespuut word.

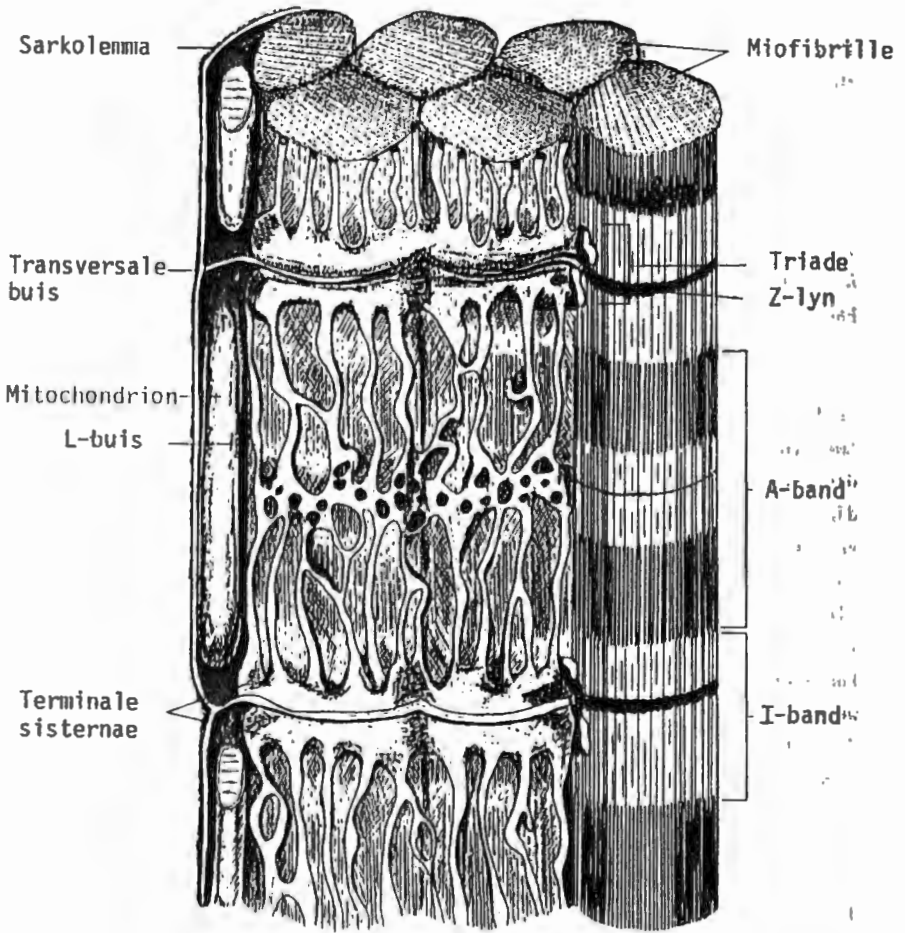
In 1960 het Ebashi gevind dat Marsh se verslappingsfaktor Ca^{2+} kan opneem in teenwoordigheid van ATP. Met elektronmikroskopiese studies is aangetoon dat die verslappingsfaktor uit vesikels bestaan wat vanaf 'n buisagtige struktuur, die sarkoplasmiese retikulum afkomstig is (Nagai et al., 1960). Daar is afgelei dat dit die SR buise in die spiersel is wat Ca^{2+} vrystel om kontraksie te gee en weer die Ca^{2+} opneem tydens spierverslapping (Ebashi & Endo, 1968).

1.2 Struktuur en funksie van die skeletspier sarkotubulêre stelsel

Die sarkotubulêre stelsel is 'n buisstelsel wat 'n netwerk rondom die miofibrille vorm. Die stelsel bestaan uit die transversale of T-buise en die SR. Die areas waar die SR sakvormige strukture aan weerskante van die T-buise vorm, staan as die triades bekend (Bloom & Fawcett, 1975).

1.2.1 Transversale buis en triade

Die T-buis is 'n instulping of invouing van die sarkolemma wat die interne dele van die spiervesel binnedring (Fuchs, 1974). Die T-buis verloop reg



Figuur 1.1: Skematiese voorstelling van die sarkotubulêre stelsel in die skeletspierseel

deur die spiervesel en kom transversaal tussen die miofibrille voor (Sommer & Johnson, 1970). Die opening van die T-buis kan met behulp van 'n elektronmikroskoop waargeneem word in visskeletspier (Franzini-Armstrong & Porter, 1964) maar in soogdierskeletspier is die deursnee van die T-buis slegs 20 nm en baie moeilik om waar te neem (Bloom & Fawcett, 1975). Twee sakvormige strukture, die terminale sisternae, kom aan weerskante van die T-buis voor. Die hele struktuur staan as 'n triade bekend (Franzini-Armstrong, 1970). Tussen die T-buis en die terminale sisternae is daar 'n spasie van 100-200 Å (Franzini-Armstrong, 1980). By amfibieë kom die triade voor op die vlak van die Z-lyn en by soogdiere op die raakvlakke tussen die A- en I-bande. Dus kom daar twee triades per sarkomeer voor (Bloom & Fawcett, 1975).

In die spasie tussen die terminale sisternae en die T-buis kom daar uitsteeksel-tjies voor wat algemeen bekend staan as SR-voetjies. Die voetjies vorm twee tot drie rye op die terminale sisternae en die rye verloop parallel met die T-buis (Franzini-Armstrong, 1980). In die middel van die spasie tussen die terminale sisternae en die T-buis is die naasliggende voetjies aan mekaar verbind. Tydens fraksionering bly die voetjies aan die SR gekoppel en daar kan dus aanvaar word dat die voetjies deel van die SR membraan is. Teenoor elke voetjie kom daar in die T-buis membraan groepe gespesialiseerde partikels voor terwyl 'n amorfe stof, bruggies tussen die voetjies en die T-buis vorm. Dit kan moontlik 'n aanduiding van kontak tussen die SR-voetjies en die T-buis wees (Franzini-Armstrong, 1980). Die SR-voetjies kan dus as skakel tussen die T-buis en die SR dien om die depolarisasiegolf wat in die T-buis af beweeg, oor te dra na die SR.

1.2.2 Skeletspier sarkoplasmiëse retikulum

1.2.2.1 Morfologiese struktuur

Die SR van skeletspier (SSR) bestaan uit twee dele wat onderling aan mekaar verbind is, naamlik die terminale sisternae en die longitudinale buise (Kyk Fig.1.1). Die terminale sisternae of laterale sakke is deel van die triade en vertoon 'n sakagtige struktuur. Die longitudinale of L-buise vorm 'n netvormige buisstelsel rondom die miofibrille en verbind die terminale sisternae van aangrensende triades met mekaar (Franzini-Armstrong & Porter, 1964). Die terminale sisternae het 'n groter deursnee as die L-buise en

verloop transversaal met die L-buise en parallel met die T-buis (Bloom & Fawcett, 1975). In die middel van die A-band (regoor die M-band) is die L-buise aan mekaar verbind en vorm dit dwarsverlopende bande of krae rondom die miofibrille (Bloom & Fawcett, 1975). Die SSR is beperk binne die grense van die sarkomeer (Sommer & Johnson, 1970) maar soms is die SR van aangrensende sarkomere met mekaar verbind om kontinuïteit te verseker (Franzini & Armstrong, 1980). Die SSR is dus 'n geordende en goed ontwikkelde buisstelsel.

1.2.2.2 ATPase proteïen

Die membraan van die SSR bestaan uit 65% proteïen en 35% lipiede (Eletr & Inesi, 1972). Die hoof membraanproteïen is die ATPase proteïen wat 70-90% van die totale proteïen in die membraan uitmaak en 'n massa van 100 000-115 000 dalton besit (MacLennan, 1974; Martonosi, 1984). Die ATPase is 'n membraanproteïen wat uit 'n enkel polipeptiedketting bestaan en verantwoordelik is vir die transport van Ca^{2+} (MacLennan *et al.*, 1985). Die polipeptiedketting begin in die sitoplasma en strek agt keer heen en weer deur die membraan om vier transmembraanlusse te vorm (MacLennan *et al.*, 1985). Die ATPase proteïen besit dus hidrofiliese dele wat in die sitoplasma in steek en hidrofobiese dele wat in die membraan ingebed is. Daar is vyf hidrofiliese peptiede wat aanmekaar gebind is deur vier hidrofobiese lusse van omtrent 100 aminosure elk (MacLennan & Reithmeier, 1982). Die hidrofiliese dele vorm die 35-40 Å partikels wat op die buitenste oppervlak van SR vesikels sigbaar is onder die elektronmikroskoop (MacLennan *et al.*, 1985). Hierdie sferiese 40 Å partikels is aan die membraan verbind deur 20 Å steeltjies en kan deur tripsienvertering verwyder word (Ikemoto *et al.*, 1971b). Die moontlikheid bestaan dat die basiese ATPase eenheid 'n oligomeer van 115 000 dalton kettings kan wees. Struktuur analise dui daarop dat die ATPase proteïene as dimere in die membraan voorkom (Inesi, 1985). In 1984 het Chiesi gevind dat kruisbindings tussen ATPase monomere, Ca^{2+} -vrystelling tot gevolg het. Chiesi beweer dat oligomere van ATPase Ca^{2+} -vrystelling moontlik maak en dat monomere of moontlik dimere verantwoordelik is vir die inpomp van Ca^{2+} tydens Ca^{2+} -opname. Onder fisiologiese kondisies kan 'n vinnige verskuiwing van die een vorm na 'n ander dus voorkom. Jorgensen *et al.* (1982) het aangetoon dat die ATPase gelokaliseer is in die L-buise en daardie dele van die terminale sisternae wat nie teenoor die T-buis geleë is nie. Die ATPase proteïen is verantwoordelik vir die hidro-

lise van ATP wat gekoppel is aan opname van Ca^{2+} . Tydens hierdie transport-proses word 2 mol Ca^{2+} opgeneem vir elke 1 mol ATP gehidroliseer (Hasselbach, 1964).

1.2.2.3 Kalsekwestrien

Kalsekwestrien is 'n ekstrinsieke proteïen wat in die luminale ruimte van die SR voorkom (Reithmeier *et al.*, 1980) en 5-10% van die totale proteïen in die SR membraan uitmaak (Meissner *et al.*, 1973). Dit het 'n molekulêre massa van 63 000 dalton en bevat 38% glutamien- en aspariensuur en slegs 7% lisien en arginien (MacLennan *et al.*, 1985). Dit is dus 'n baie suur proteïen. Kalsekwestrien het 'n hoë kapasiteit en 'n lae affiniteit vir die binding van Ca^{2+} . Dit bind byna 1 000 nmol Ca^{2+} per mg proteïen met 'n dissosiasiekonstante van 1 mM in die teenwoordigheid van soute in fisiologiese konsentrasies (MacLennan *et al.*, 1985). Die proteïen ondergaan groot konformasieveranderinge met die binding van Ca^{2+} en indien voldoende Ca^{2+} gebind is, presipiteer dit uit die oplossing (Ikemoto *et al.*, 1971a). Kalsekwestrien bind dus die opgeneemde Ca^{2+} in die SR en dit wil voorkom asof die proteïen slegs in die terminale sisternae aangetref word (Jorgensen *et al.*, 1983). Dit is in ooreenstemming met die feit dat die opgeneemde Ca^{2+} tydens rus in die terminale sisternae gestoor word (Martonosi, 1984). Die funksie van kalsekwestrien en die noodsaaklikheid daarvan in die SR is egter onseker, aangesien kalsekwestrien nie in die SR van alle dierspesies voorkom nie (Malan *et al.*, 1975). Reithmeier *et al.* (1980) het ook aangetoon dat kalsekwestrien deur poliribosome op granulêre endoplasmiese retikulum gevorm word en dan deur middel van Golgi-apparaat na die terminale sisternae oorgedra word.

1.2.2.4 Ca^{2+} -bindingsproteïen (M_{55} -proteïen)

Die tweede ekstrinsieke proteïen wat in die lumen van die geïsoleerde SR vesikel voorkom, is die Ca^{2+} -bindings- of M_{55} -proteïen (Michalak & MacLennan, 1980). Dit het 'n molekulêre massa van 54 000-55 000 dalton en besit 'n lae bindingskapasiteit en 'n hoë affiniteit vir Ca^{2+} (Meissner *et al.*, 1973; MacLennan *et al.*, 1985). Die M_{55} -proteïen bind 16-22 nmol Ca^{2+} per mg proteïen met 'n dissosiasiekonstante van 2,5-4,0 μM in teenwoordigheid van 0,1 M KCl (Ostwald & MacLennan, 1974). Die funksie van die M_{55} -proteïen is nog onbekend. Michalak & MacLennan (1980) het gevind dat die M_{55} -proteïen in hoë konsentrasies voorkom in fraksies verryk met T-buise en dit is dus moontlik dat die M_{55} -proteïen slegs in die SR mag voorkom as 'n kontaminant (MacLennan *et al.*, 1985).

1.2.2.5 Glikoproteïene van 53 000 en 160 000 dalton

Die SR membraan bevat ook twee intrinsieke glikoproteïene met molekulêre massas van 53 000 en 160 000 dalton. Beide bevat koolhidraatkettings met 'n hoë mannose-inhoud (MacLennan *et al.*, 1985). Die 53 000 dalton proteïen is 'n transmembraanproteïen waarvan die grootste deel op die sitoplasmiese oppervlak van die membraan voorkom (MacLennan *et al.*, 1985). Beide glikoproteïene bind ATP en daar is aanduidings dat die 160 000 dalton proteïen Ca^{2+} -bind (MacLennan *et al.*, 1985). Daar is aanduidings dat een of albei die glikoproteïene in die membraan van die terminale sisternae voorkom, maar hul bydraes tot die struktuur en funksie van die SR is nog onbekend (MacLennan *et al.*, 1985). Die SR bevat ook een of meer proteolipiede met lae molekulêre massa waarvoor daar min bekend is (MacLennan *et al.*, 1985).

1.2.2.6 Lipiede

Die SSR membraan se totale lipiedinhoud is 35% waarvan 80% hoogs onversadigde fosfolipiede en 20% neutrale lipiede is (Eletr & Inesi, 1972). Hierdie neutrale lipiede sluit in cholesterol, cholesterolesters, triasielgliserol en vrye vetsure. Volgens Chamberlain *et al.* (1983) is die fosfolipiedsamestelling (%) van SSR en CSR soos volg:

Fosfolipied	SSR(%)	CSR(%)
Fosfatidielcholien	72,7	60,7
Fosfatidieletanolamien	13,5	23,0
Fosfatidielinositol	8,7	9,9
Sfingomielien	1,0	3,3
Fosfatidieselerien	1,8	2,6
Kardioliipien	0,3	0
Ander	2,0	0,5

Hierdie fosfolipiede is noodsaaklik vir die aktiwiteit van die ATPase en Ca^{2+} -transport. Verwydering van die fosfolipiede inhibeer die ATPase en sodra die fosfolipiede teruggeplaas word, herstel die aktiwiteit weer (Martonosi, 1984). Die vloeibaarheid van die lipiede bepaal die vermoë van die ATPase om Ca^{2+} te transporteer (Inesi *et al.*, 1973). Byna alle lipiede is in 'n vloeibare vorm by temperature hoër as 0°C , maar 'n klein poel van lipiede in die mikro-omgewing van die Ca^{2+} -ATPase smelt by $15-20^{\circ}\text{C}$ (Blazyk *et al.*, 1985). Dit dui daarop dat die lipiede in die onmiddellike omgewing van die ATPase die temperatuurafhanklikheid van die ensiem beïnvloed.

Van die 90-100 lipiede per molekule ATPase is slegs 30 noodsaaklik om ATPase-aktiwiteit instand te hou (Möller et al., 1982). Hierdie 30 lipiede kom in 'n lagie om die ATPase voor en staan as die lipiedannulus bekend (Bennett et al., 1980). Die konformasieverandering wat noodsaaklik is vir die opname van Ca^{2+} is afhanklik van die fisiese toestand van die lipiedannulus. Die transport van Ca^{2+} deur die ATPase, word bevoordeel deur 'n meer vloeibare lipiedannulus (Bennett et al., 1980). Volgens Bennett et al. (1980) moet die lipiede in die annulus die volgende eienskappe besit om optimale ATPase-aktiwiteit te verseker:

- i) 'n lae oorgangstemperatuur van kristalyne na vloeibare kristalyne vorm,
- ii) vetsuurkettings met meer as 14 C-atome (16-20C),
- iii) 'n Zwitterioon- of dipolêre ioongroep,
- iv) 'n vrye amielgroep wat noodsaaklik is vir Ca^{2+} -transport.

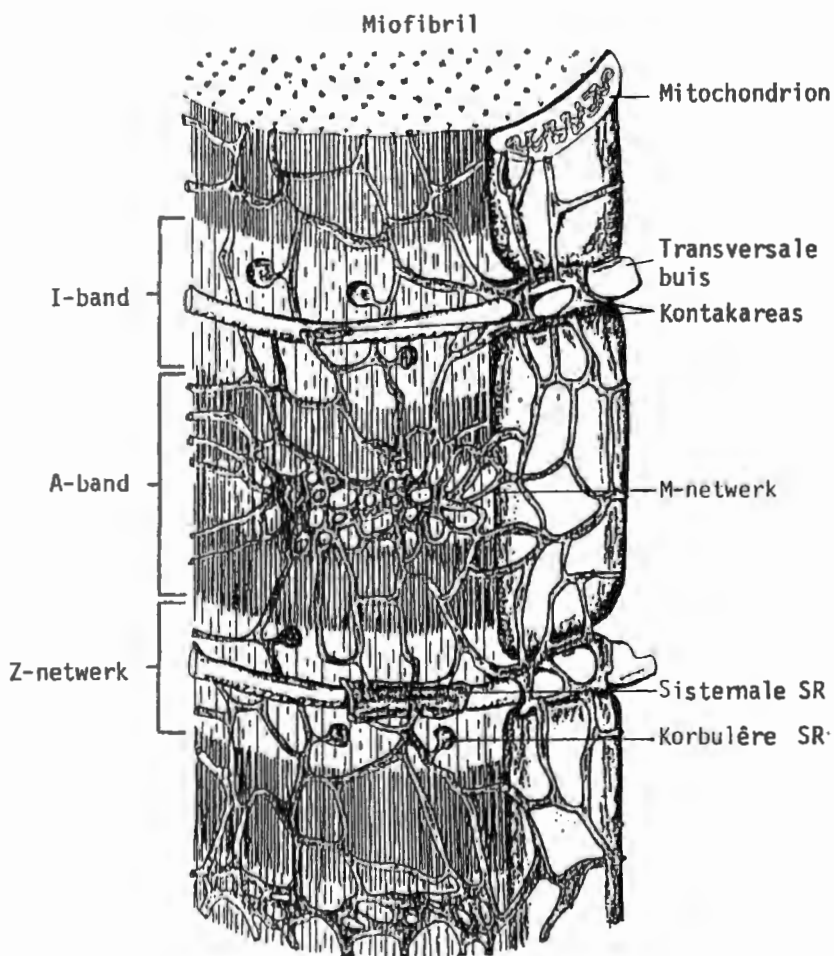
Die lipiedsamestelling van SSR en CSR verskil betekenisvol van mekaar (Chamberlain et al., 1983) en dit is onseker of hierdie verskille die verskil in tempo van Ca^{2+} -transport en ATPase-aktiwiteit veroorsaak.

1.3 Struktuur en funksie van die hartspier sarkotubulêre stelsel

Die hartspier sel bevat groot hoeveelhede mitochondria wat tydens die bereiding van CSR, die preparaat kontamineer en onsuiver maak (Pretorius, 1972). Die Ca^{2+} -opname vermoë van die CSR preparaat neem ook binne een tot vier dae af met 50% (Pretorius et al., 1969). Die onsuiverheid en onstabielheid van CSR preparate het tot gevolg gehad dat daar aanvanklik meer navorsing op SSR gedoen is. Die rol wat CSR tydens die eksitasie-kontraksiesiklus van hartspier speel is as gevolg hiervan nog nie duidelik afgebaken nie. Onlangse navorsing het getoon dat daar groot kwalitatiewe en kwantitatiewe verskille tussen SSR en CSR bestaan.

1.3.1 Strukturele ooreenkomste en verskille tussen die sarkotubulêre stelsels van skeletspier en hartspier

Elektronmikroskopie is daar verskeie ooreenkomste en verskille tussen die sarkotubulêre stelsel van skelet- en hartspier. Hartspier vertoon dieselfde dwarsgestreepte voorkoms as skeletspier en die A-, I-, M-, H-bande en Z-lyne van hartspier is identies aan die bande van skeletspier (Bloom & Fawcett, 1975). Die hartspier sel bevat meer sarkoplasma en die glikoogeenkonsentrasie



Figuur 1.2: Schematische voorstelling van die sarkotubulêre stelsel in die hartspiersel.

in die sarkoplasma is ook hoër (Forssmann & Girardier, 1970). Die hartspiersel bevat baie meer mitochondria as die skeletspier. Die volumefraksie van die spiersel wat deur mitochondria beslaan word, wissel afhange van die tipe skeletspier maar in witskeletspier is dit ongeveer 1%, terwyl dit in donkerhartspier 26% is (Canale et al., 1986). Dit het tot gevolg dat kontaminasie van CSR preparate deur mitochondriale fraksies so hoog as 50% kan wees (Pretorius, 1972).

Die T-buis van die hartspiersel het 'n baie groter deursnee as die T-buis van die skeletspiersel. Die deursnee van die skeletspiersel T-buis wissel tussen 20-50 nM terwyl die meeste dierspesies se hartspiersel T-buise 'n deursnee van 100-350 nM vertoon (Canale et al., 1986). In teenstelling met skeletspier besit die T-buis van die hartspiersel vesikulêre invouings (caveolae) en basale laminamateriaal kom in die wand voor (Peachey & Franzini-Armstrong, 1983). Die T-buis van die skeletspiersel is geleë op die vlak van die Z-lyn en die T-buis van die hartspiersel op die vlak van die A-I aansluiting (Sommer & Johnson, 1970). By die hartspiersel is die opening van die T-buis makliker sigbaar onder die elektronmikroskoop en volgens Bloom & Fawcett (1975) kan die hartspiersel se T-buis by die uitruiling van metaboliese stowwe betrokke wees. Die deursnee van die T-buis is ook afhanklik van die deursnee van die hartspiersel (Canale et al., 1986). Die hartspiersel se T-buise kan ook moontlik sywaarts en parallel aan die CSR verloop (Wheeldon & Gan, 1971) en aksiale vertakkinge verbind die T-buise met mekaar (Canale et al., 1986).

Die CSR is minder georden in struktuur en vertoon onderontwikkel as dit met SSR vergelyk word (Kyk Fig. 1.2). Die SSR bestaan uit goed geordende terminale sisternae wat met mekaar verbind is deur die L-buise wat regoor die M-band dwarsverlopende krae vorm (Bloom & Fawcett, 1975). Die SSR van aangrensende sarkomere is struktureel byna identies aan mekaar terwyl die CSR van aangrensende sarkomere struktureel baie van mekaar verskil (Canale et al., 1986). In vergelyking hiermee besit CSR verskillende dele wat struktureel van mekaar verskil afhange van die deel van die sarkomeer waar dit voorkom. Canale et al. (1986) beskryf die struktuur soos volg:
Soos SSR vorm die CSR kontakareas met die T-buis, maar hier is geen duidelike terminale sisternae wat 'n sakagtige struktuur om die T-buis vorm nie. Triades word dus ook deur die CSR en T-buis gevorm, maar dikwels is slegs die kontakarea van een sarkomeer se SR betrokke om dan 'n diade te vorm. Triades en diades word ook tussen die CSR en die aksiale vertakkinge van die T-buis

gevorm. In teenstelling met SSR vorm die CSR ook perifere kontakareas met die sarkolemma. By voëls waar geen T-buise teenwoordig is nie, vorm die CSR slegs perifere kontakareas met die sarkolemma. SR-voetjies kom net soos by SSR ook by CSR in die kontakareas voor. In die sentrale dele van die sarkomeer kan twee verskillende CSR strukture onderskei word. Teenoor die M-band kom daar soos by die SSR ook 'n netwerk van buise voor wat bekend staan as die M-netwerk. Longitudinaal gerangskikte buise verbind die M-netwerk met ander netwerke wat oor die Z-lyn voorkom. Die SR wat regoor die Z-lyn voorkom, kan opgedeel word in Z-buise, korbulêre SR en sisternale SR. Gesamentlik staan die strukture as die Z-netwerk bekend. Z-buise is 'n deel van die Z-netwerk wat die Z-lyn volg. Tussen die Z-buise en die Z-lyn is daar kort vesels wat die strukture aan mekaar anker. Korbulêre SR is 'n ronde of ovaal strukture wat in die Z-netwerk voorkom. Hierdie uitstulping het 'n deursnee van 70 nm en is gevul met elektrondigte granules. Aangesien die korbulêre SR SR-voetjies op die sitoplasmiese oppervlak besit en daar kalsekwestrien in die lumen voorkom stem dit baie ooreen met die CSR in die kontakareas maar vorm geen kontakarea met die T-buis of sarkolemma nie. Sisternale SR is plat, verlengde dele van die CSR in die omgewing van die Z-lyn. Die CSR vorm ook 'n eenvoudige netwerk van buise rondom die mitochondria wat in die spiersel voorkom (Canale *et al.*, 1986). Hierdie gekompliseerde struktuur van die CSR is 'n aanduiding dat die CSR moontlik 'n meer gespesialiseerde funksie in die hartspiersel kan vervul as wat aanvanklik vermoed is.

1.4 Eksitasie-kontraksiekoppeling in skeletspier

Die proses wat as skakel tussen die depolarisasie van die spiervesel en die kontraksie van die spier dien, staan as die eksitasie-kontraksiekoppeling bekend. Die belangrike rol wat SSR vervul in die eksitasie-kontraksiekoppeling van skeletspier word algemeen aanvaar (Carafoli, 1985). 'n Depolarisasiegolf vanaf die sarkolemma, die gevolg van 'n aksiepotensiaal, beweeg in die T-buis af na die dieperliggende dele van die spiersel. Ca^{2+} -vrystelling uit die terminale sisternae vind plaas en Ca^{2+} bind aan die troponien. Die inhiberende effek van die troponien-tropomiosienkompleks op die interaksie tussen aktien en miosien, word opgehef en spierkontraksie vind plaas. Indien die ontlading van die motoriese senuwee staak, begin die L-buise van die SR om Ca^{2+} aktief op te neem. Die Ca^{2+} -konsentrasie in die sarkoplasma daal en spierslacking tree in. Deur middel van die L-buise beweeg die Ca^{2+} terug na die terminale sisternae waar dit gestoor word vir die volgende kontraksie (Winegrad, 1970).

1.4.1 Ca^{2+} -vrystelling

Die meganisme van Ca^{2+} -vrystelling vanuit die terminale sisternae van SSR is nog onbekend en Ca^{2+} -vrystelling bly die grootste onsekerheid in die funksionering van SSR (Chiesi, 1984; Ikemoto et al., 1984). Studies van verskillende meganismes wat Ca^{2+} -vrystelling veroorsaak, is gedoen met die hoop om vas te stel wat die meganisme is wat *in vivo* geld. Hierdie studies het nog nie die oplossing van die probleem gevind nie, maar heelwat inligting is verkry oor die verskillende moontlikhede. Meganismes wat ondersoek is sluit in: Ca^{2+} -vrystelling as gevolg van pH-verandering (Nakamaru & Schwartz, 1972); Ca^{2+} -vrystelling as gevolg van kaffeïen (Weber, 1968); Ca^{2+} -vrystelling as gevolg van 'n ionofoor (Scarpa et al., 1972) en Ca^{2+} -vrystelling as gevolg van die omkeer van die Ca^{2+} -pomp (Barlogie et al., 1971). Hierdie meganismes is te stadig of onfisiologies om betekenisvolle bydraes te lewer tot die eksitasie-kontraksiekoppeling in die spier (Martonosi, 1984). Die swemblaas-spier van die seeduifwelvis (*Oreanus*) trek 200-300 keer per sekonde saam en die vrystelling en opname van Ca^{2+} vind binne 3-5 msek. plaas. Dit beteken dat die Ca^{2+} -vrystelling teen 'n tempo van 1 500 $\mu\text{mol Ca}^{2+}/\text{mg SR-proteïen}/\text{min.}$ moet plaasvind (Martonosi, 1984). Die enigste meganismes wat op hierdie stadium 'n moontlike fisiologiese rol kan speel, is depolarisasie-gestimuleerde Ca^{2+} -vrystelling en Ca^{2+} -gestimuleerde Ca^{2+} -vrystelling.

i) Depolarisasie-gestimuleerde Ca^{2+} -vrystelling

Die moontlikheid bestaan dat die SR membraan depolariseer indien die T-buis depolariseer (Kasai & Miyamoto, 1976). Oordrag van die depolarisasiegolf van die T-buis na die terminale sisternae vind moontlik deur middel van die SR-voetjies plaas (Franzini-Armstrong, 1980). Schneider & Chandler (1973) het beweer dat gelaai groepe oor die T-buis membraan beweeg tydens depolarisasie en dan deur middel van die SR-voetjies Ca^{2+} -vrystelling veroorsaak. Chandler et al. (1976) het 'n direkte meganiese koppeling tussen die beweging van gelaai groepe in die T-buis en Ca^{2+} -vrystelling voorgestel. Die meganiese koppeling is instaat om die Ca^{2+} -kanaal in die SR membraan te open en Ca^{2+} -vrystelling tot gevolg te hê. Tydens latere studies het hulle egter gevind dat dit waarskynlik 'n meer komplekse koppeling is (Baylor et al., 1983). Dat depolarisasie van die SR membraan Ca^{2+} -vrystelling veroorsaak is reeds in 1973 deur Kasai & Miyamoto bewys. Hulle het daarin geslaag om die SR membraan te depolariseer deur 'n potensiaal verskil oor die SR membraan te skep. Die potensiaal verskil is verkry deur ioonsubstitusie en depolarisasie van die SR membraan lei tot Ca^{2+} -vrystelling. Die moontlikheid bestaan dat Ca^{2+} -

vrystellingskanale hierby betrokke is. Fairhurst et al. (1983) het vier keer meer [^3H]-nitrendipienbindingsplekke (moontlik spanningsafhanklike Ca^{2+} -kanale) in die terminale sisternae gevind as in die L-buise.

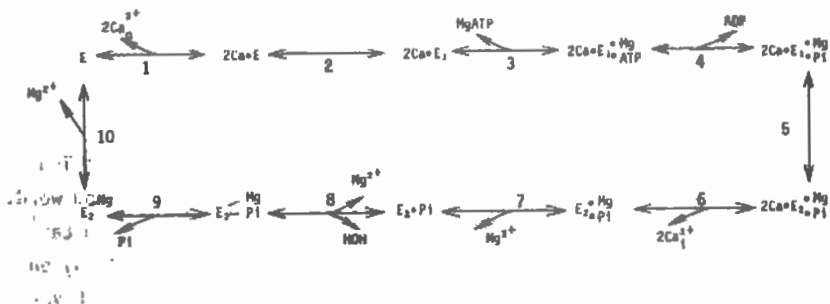
ii) Ca^{2+} -gestimuleerde Ca^{2+} -vrystelling

Tydens die bestudering van die vrystelling van Ca^{2+} as gevolg van kaffeïen het Ebashi et al. (1969) gevind dat die effek van kaffeïen baie verhoog word, indien 'n klein hoeveelheid Ca^{2+} bygevoeg word. Die moontlike rol van Ca^{2+} om Ca^{2+} -vrystelling tot gevolg te hê, is ook deur Ford & Podolsky (1970) en Endo et al. (1970) bevestig. Depolarisasie van die T-buis kan moontlik veroorsaak dat Ca^{2+} van buite die sel, of Ca^{2+} gebind aan die T-buismembraan, in die sel in beweging. Die hoeveelheid Ca^{2+} is te klein om kontrakisie te veroorsaak, maar dit prikkel die SR om meer Ca^{2+} vry te stel (Thorens & Endo, 1975). Die binding van Ca^{2+} aan kanale op die buite oppervlak van die SR membraan kan hierdie Ca^{2+} -kanale moontlik open om Ca^{2+} -vrystelling tot gevolg te hê (Martonosi, 1984). Uit die literatuur is dit duidelik dat die meganismes betrokke by Ca^{2+} -vrystelling kontroversieel is en nog geen eenstemmigheid bestaan oor die fisiologiese rol wat die verskillende meganismes speel nie.

1.4.2 Ca^{2+} -opname

Die Ca^{2+} -opnameproses deur die SR is 'n aktiewe proses en vereis energie om die Ca^{2+} teen die elektro-chemiese gradiënt op te neem. Die hidrolise van 1 mol ATP is nodig vir die opname van 2 mol Ca^{2+} (Weber et al., 1966). Die hidrolise van ATP en die transport van die Ca^{2+} word deur die ATPase proteïen bewerkstellig. Die eerste skema van reaksies wat tydens die Ca^{2+} -transport plaasvind, is in 1979 deur de Meis & Vianna voorgestel. Sedertdien is verskeie skemas gepubliseer waarvan die stappe verskil. Figuur 1.3 is 'n samevatting van skemas soos voorgestel deur Froud & Lee (1986), Inesi (1985), Martonosi (1984) en McIntosh & Boyer (1983).

Die ensiem kan in een van drie konformasietoestande verkeer. Die grondtoestand (E_0) oorheers in afwesigheid van Ca^{2+} . Die E_1 toestand word gekenmerk deur die teenwoordigheid van die Ca^{2+} -bindingsplekke aan die buitekant van die SR vesikel en die E_2 toestand deur die teenwoordigheid van die Ca^{2+} -bindingsplekke aan die binnekant van die vesikel. Die E_1 toestand besit 'n hoë affiniteit vir Ca^{2+} en E_2 'n lae affiniteit.



Figuur 1.3: Skema van reaksies wat plaasvind tydens Ca^{2+} -transport deur SR ATPase

Die Ca^{2+} -transport begin sodra Ca^{2+} aan die buitekant van die membraan (Ca_0^{2+}) aan die twee bindingsplekke van die ATPase bind (Stap 1). Sodra die eerste Ca^{2+} bind, verhoog die affiniteit van die tweede bindingsplek vir Ca^{2+} . Die moontlikheid bestaan dat slegs die een bindingsplek beskikbaar is en sodra die eerste Ca^{2+} daaraan bind, vind daar 'n konformasieverandering plaas wat die tweede bindingsplek blootlê (Inesi, 1985). Die binding van Ca^{2+} veroorsaak 'n ensiemkonformasieverandering van E na E_1 (Stap 2). Dit is die eerste tempobepalende stap in die reaksiesiklus (Rauch *et al.*, 1978). Sodra die tweede Ca^{2+} aan die ensiem bind word die ensiem gefosforileer deur die oordrag van 'n hoë energie fosfaat van die MgATP na die ensiem (Stappe 3 + 4). Die gefosforileerde ensiem ondergaan 'n konformasieverandering van E_1 na E_2 en translokasie van die eksterne gebonde Ca^{2+} na die binnekant van die membraan vind plaas (Stap 5). Hierdie konformasieverandering gaan gepaard met 'n daling in Ca^{2+} -affiniteit van die bindingsplekke (Inesi, 1985) en Ca^{2+} word binne-in die vesikel vrygestel (Ca_1^{2+} in Stap 6). Mg^{2+} -gekataliseerde hidrolise van die fosfo-ensiem vind plaas (Stap 8) en is die tweede tempobepalende stap in die reaksiesiklus (Martonosi, 1984). Pi word vrygestel (Stap 9) en die ensiem keer terug na die E toestand met die Ca^{2+} -bindingsplekke aan die buitekant van die membraan (Stap 10).

Hierdie proses van Ca^{2+} -transport is omkeerbaar indien ADP en Pi teenwoordig is, die intravesikulêre Ca^{2+} -konsentrasie hoog is en die eksterne Ca^{2+} -konsentrasie laag is (de Meis & Vianna, 1979). Dit het die omkeer van die Ca^{2+} -pomp tot gevolg en vir elke mol ATP wat vanaf ADP en Pi gevorm word, word twee mol Ca^{2+} buite die membraan vrygestel (Martonosi, 1984).

1.5 Eksitasie-kontraksiekoppeling in hartspier

Die meganisme van die eksitasie-kontraksiekoppeling in skeletspier is met enkele uitsonderinge byna volledig bekend. Die enigste onsekerheid wat nog bestaan, is die gebeure wat lei tot Ca^{2+} -vrystelling en die meganisme betrokke by die vrystelling van Ca^{2+} (Chiesi, 1984; Ikemoto *et al.*, 1984). In teenstelling hiermee is die eksitasie-kontraksiekoppeling van hartspier nog grootliks onbekend en die rol wat die CSR speel tydens die slag-tot-slag regulering van Ca^{2+} is tot so onlangs as 1980 bevraagteken (Hasselbach, 1980). Hierdie toestand kan grootliks toegeskryf word aan die onstabielheid en onsuiverheid van CSR preparate wat onder andere veroorsaak word deur substellulêre fragmente afkomstig van mitochondria, sarkolemma en lisosome. Op die sitoplasmiese oppervlak van die CSR is daar minder 40 Å partikels en minder ATPase proteïene in die membraan (Agostini *et al.*, 1975), terwyl die hartspiersel ook minder SR bevat as die skeletspiersel (Carsten, 1964). Hierdie feite plus die 3-5 keer laer aktiwiteit van CSR in vergelyking met SSR (Pretorius, 1972) het die vermoede laat ontstaan dat CSR nie verantwoordelik is vir die regulering van Ca^{2+} tydens die kontraksie en verslapping van hartspier nie. Die groot hoeveelhede mitochondria in die hartspiersel (26% van die totale volume volgens Canale *et al.* 1986) en die feit dat mitochondria Ca^{2+} kan opneem en vrystel (Harigaya & Schwartz, 1969), het die vermoede laat ontstaan dat die mitochondria die hoofreguleerder van Ca^{2+} in die hartspiersel is. Dit het gelei tot 'n groot twispunt oor die rol wat CSR en mitochondria speel tydens die slag-tot-slag regulering van die Ca^{2+} -konsentrasie in die hartspiersel. Weber *et al.* (1964) en ook Harigaya & Schwartz (1969) het beweer dat die mitochondria deel het aan die verslapping van hartspier. Carafoli *et al.* (1975), het gevind dat mitochondria 'n groot deel van die Ca^{2+} gebind aan troponien kan opneem. Die reaksie is taamlik vinnig en is as voldoende gevind om verslapping tot gevolg te hê. Die groot probleem was egter die vrystelling van Ca^{2+} deur die mitochondria. Kübler & Shinebourne (1971) toon aan dat mitochondriale Ca^{2+} -vrystelling 100 keer te klein is om kontraksie te gee. Dit het duidelik geword dat die affiniteit van die mitochondria vir Ca^{2+} en die maksimale tempo van Ca^{2+} -opname en vrystelling onvoldoende is vir die slag-tot-slag regulering van die Ca^{2+} -konsentrasie (Carafoli, 1982). Onder fisiologiese toestande ($1 \mu\text{M Ca}^{2+}$ + $1-3 \text{ mM Mg}^{2+}$) is die mitochondria se bydrae 6,3% van die totale Ca^{2+} -opname wat in die sel plaasvind, in vergelyking met die 88% van die CSR (Carafoli, 1985). Tydens patologiese toestande soos isemie kan groot hoeveelhede Ca^{2+} die spiersel binnedring en die Ca^{2+} -konsentrasie in die sel kan tot $10 \mu\text{M}$ styg.

Onder hierdie omstandighede is die mitochondria se bydrae 50% van die totale Ca^{2+} -opname wat in die sel plaasvind, in vergelyking met die CSR se bydrae van 46,5% (Carafoli, 1985). Die mitochondria is dus die grootste Ca^{2+} -reservoir in die sel en kan as 'n langtermyn Ca^{2+} -buffer optree om die Ca^{2+} -vlakke in die sel binne aanvaarbare grense te hou (Carafoli, 1982). Dit kan derhalwe aanvaar word dat CSR die grootste bydrae lewer tydens die slag-tot-slag regulering van die Ca^{2+} -konsentrasie in die hartsel (Carafoli, 1985).

Die gebeure wat lei tot Ca^{2+} -vrystelling by CSR is nog meer onbekend as by SSR (Endo, 1985). Dit wil voorkom asof Ca^{2+} -gestimuleerde Ca^{2+} -vrystelling 'n groter moontlikheid is as by SSR en dat die meganisme van die Ca^{2+} -gestimuleerde Ca^{2+} -vrystelling by CSR kwantitatief verskil van die proses by SSR (Endo, 1985). Depolarisasie-gestimuleerde Ca^{2+} -vrystelling by CSR is nog nie ondersoek nie en daar bestaan dus baie min inligting oor die meganisme van Ca^{2+} -vrystelling by CSR (Endo, 1985).

In hartsier is die molekulêre meganisme van kontraksie essensieel dieselfde as vir skeletspier maar die meganisme van eksitasie-kontraksiekoppeling is substansieel verskillend (Endo, 1985). Die verskil mag die gevolg wees van die feit dat dit nie nodig is om die kontraksiekrag van 'n skeletspiervesel te verander nie. Die kontraksiekrag van skeletspier word deur ruimtelike en temporale summasie verhoog. By hartsier is alle spierselle betrokke tydens elke kontraksie en geen tetanus kom voor nie. Die hoeveelheid Ca^{2+} wat beskikbaar is vir die kontraktiele proteïene word aangepas by die kontraksiekrag wat benodig word (Endo, 1985). Katesjolamiene beïnvloed die tempo en kontraksiekrag van hartsierkontraksies deur die c-AMP-afhanklike stimulering van die Ca^{2+} -pomp-aktiwiteit van die CSR (Chiesi *et al.*, 1983). Die stimulering vind plaas via die fosforilering van 'n 22 000 dalton proteolipied, fosfolamban, deur 'n c-AMP-afhanklike proteïenkinase (Chiesi *et al.*, 1983). Die stimulerende effek van c-AMP op die Ca^{2+} -opname en ATPase-aktiwiteit is waarskynlik as gevolg van die versnelling van die tempobepalende stappe in die ATPase reaksiesiklus (Davis *et al.*, 1983). Fosforilering van fosfolamban veroorsaak veranderinge in die hidrofobiese mikro-omgewing van die ATPase en dit versnel die transport van Ca^{2+} (Chiesi *et al.*, 1983). Dieselfde stimulerende effek word ook verkry deur die fosforilering van fosfolamban deur 'n endogene kalmodulienafhanklike kinase (Chiesi *et al.*, 1983).

Fosfolamban kan dus gefosforileer word deur c-AMP-afhanklike proteïenkinase en ook deur kalmodulienafhanklike proteïenkinase. Die twee weë is onafhanklik

van mekaar en indien fosfolamban deur beide die weë gefosforileer word, is die stimulerende effek van die twee weë aanvullend tot mekaar (Davis *et al.*, 1983). Chiesi *et al.* (1983), het bewyse gevind dat fosfolamban uit twee proteïenfraksies bestaan. Die polipeptied PL1 word gefosforileer deur kalmodulien-afhanklike proteïenkinase en PL2 deur c-AMP-afhanklike proteïenkinase.

Anders as by hartspier is die regulering van SSR deur c-AMP en kalmodulien nie duidelik nie (Molla *et al.*, 1985). Die c-AMP afhanklike stimulasie van Ca-transport is gerapporteer deur Schwartz *et al.* (1976) maar ander werkers kon dit nie herhaal nie (Kirchberger & Tada, 1976). Kalmodulien is aanvanklik as uniek aan CSR beskou (Bilezikjian *et al.*, 1982) maar die teenwoordigheid daarvan in SSR is gelyktydig deur Campbell & MacLennan (1982) en Chiesi & Carafoli (1982) gerapporteer. Daar is dus 'n kalmodulien-afhanklike proteïenkinase in die SSR membraan maar dit is nog nie geïdentifiseer nie (Molla *et al.*, 1985). Kalmodulien aktiveer ook die Ca^{2+} -pomp ATPase in die hartspier sarkolemma en die moontlikheid bestaan dat kalmodulien nie net via kalmodulien-afhanklike kinase die CSR-aktiwiteit kan verhoog nie, maar ook direk betrokke is by die basiese funksionering van Ca^{2+} -opname (Molla *et al.*, 1985). Daar is ook aanduidings dat kalmodulien moontlik betrokke is by die regulering van die Ca^{2+} -vrystellingskanale maar verdere navorsing hieroor is nodig (Meissner, 1986).

1.6 Doel en motivering

Uit die literatuurbespreking is dit duidelik dat daar groot leemtes bestaan oor die meganisme van eksitasie-kontraksiekoppeling in hartspier. Dit is in teenstelling met die goed geordende en grootliks bevestigde model wat reeds opgestel is oor die eksitasie-kontraksiekoppeling in skeletspier. Navorsing oor die CSR word bemoeilik deur die probleme van onstabielheid en onsuiverheid van CSR preparate. Dit het tot gevolg gehad dat navorsers hul toegespits het op die SSR en bevindinge is geëkstrapoleer na die CSR. Dit is egter vandag bekend dat die CSR gespesialiseerde strukture bevat waarvan die funksies nog onbekend is en wat nie by SSR voorkom nie. Die CSR membraan bevat ook onbekende proteïene en minstens sewe ongeïdentifiseerde kalmodulienbindende proteïene kom in die membraan voor (Molla *et al.*, 1985).

Die onstabiliteit van CSR preparate word weerspieël deur die onvermoë van die CSR om weerstand te bied teen eksterne fisies-chemiese faktore wat dit beskadig. Tydens hierdie studie is daar 'n vergelyking getref tussen die stabiliteit van SSR en CSR. Die stabiliteit van SSR en CSR is telkens ondersoek deur die SR bloot te stel aan eksterne fisies-chemiese faktore. Daar is ook gepoog om die meganismes betrokke by die beskadiging van die SR deur die eksterne faktore vas te stel om sodoende meer oor die struktuur-funksie verwantskappe in CSR te wete te kom. As fisiese faktor is temperatuur gebruik om die stabiliteit van SSR en CSR met mekaar te vergelyk en as chemiese faktore pH-veranderinge en die kombinasie van Triton X-100 en 'n Ca^{2+} -ionofoor.

Dit is algemeen bekend dat die Ca^{2+} -opname vermoë van CSR tydens veroudering van die CSR preparaat vinnig afneem. Binne 1-4 dae daal die Ca^{2+} -opname vermoë van CSR in afwesigheid van oksalaat met 50% (Scales & McIntosh, 1968; Pretorius et al., 1969). Die onstabiliteit van CSR Ca^{2+} -opname is veral nadelig omdat die aanvangsaktiwiteit van CSR direk na bereiding reeds so laag is. Daar kan dus nie lang reekse eksperimente uitgevoer word met dieselfde CSR preparaat nie. Die onsekerheid oor die meganisme betrokke by die onstabiliteit maak dit moeilik om afleidings te maak oor resultate wat verkry is met CSR.

Uit die literatuur kom daar 'n paar moontlike oorsake vir die onstabiliteit van CSR na vore. Dit is bekend dat kaliumpermanganaat reaktiewe SH-groepe oksideer en 'n afname in Ca^{2+} -opname tot gevolg het (Ariki & Shamoo, 1983). Oksidasie kan dus 'n rol speel by die onstabiliteit van CSR. 'n Ander moontlikheid is dat proteolitiese ensieme tydens die homogenisering van die CSR preparaat vrykom en die preparaat kontamineer en beskadig deur proteolitiese vertering. Die vermoede het bestaan dat die oksidasie en/of vertering van die membraan deur kontaminerende proteolitiese ensieme die deurlaatbaarheid van die SR membraan kan verhoog om sodoende die Ca^{2+} -opname te benadeel. *In vivo* beskerm glutatioon organelle teen oksidasie (Jones et al., 1983) en daar is toe besluit om anti-oksidente te gebruik om die stabiliteit van CSR preparate te probeer verbeter. Die effek van proteolitiese vertering op die stabiliteit van die CSR preparaat kan ondersoek word deur gebruik te maak van 'n inhibeerder van proteolitiese ensiemaktiwiteit en proteolitiese vertering deur kontaminerende ensieme kan nageboots word deur tripsienvertering. In hierdie projek is die onstabiliteit van CSR ondersoek deur gebruik te maak van anti-oksidente en 'n inhibeerder van proteolitiese ensieme. Die behandel-

ing van die SR membraan deur Tripsien kan ook nuttig gebruik word om meer lig te werp op die ligging van die ATPase proteïene in die membraan. Aangesien CSR preparate in vergelyking met SSR preparate meer vatbaar is vir beskadiging deur eksterne faktore, sou verwag kon word dat die funksionele dele van die CSR ATPase proteïene nader aan die oppervlak van die membraan geleë is of meer toeganklik is vir eksterne beskadiging. Hierdie dele sou ook moontlik vinniger deur tripsienvertering beskadig kon word. 'n Vergelyking tussen die effek van tripsienvertering op SSR en CSR is gedoen om hierdie saak te ondersoek.

Indien oksidasie en/of proteolitiese vertering membraandeurlaatbaarheid verhoog om die Ca^{2+} -opname te benadeel, sal 'n verhoogde temperatuur ook die stabiliteit van CSR preparate benadeel. Temperatuur is as fisiese eksterne faktor gebruik om die stabiliteit van SSR en CSR verder te ondersoek. Temperatuur word algemeen gebruik om membrane te manipuleer en uit die literatuur is dit duidelik dat verhoogde temperature verskeie membrane deurlaatbaar maak. Verhoogde temperatuur veroorsaak 'n toename in membraandeurlaatbaarheid van eritosietmembrane (Brahm, 1982), Golgimembrane (White *et al.*, 1984) en longselmembrane (Garrick & Chinard, 1982). Dieselfde effek van 'n toename in deurlaatbaarheid kan ook by die SR membraan verwag word. Verskeie aspekte van Ca^{2+} -vrystelling en membraandeurlaatbaarheid van geïsoleerde SR is alreeds ondersoek terwyl die SR vesikels *in vitro* vir lang tydperke by relatief hoë temperature soos $37^{\circ}C$ geïnkubeer is (Naylor & Dresel, 1984). Dit is duidelik dat die membraandeurlaatbaarheidsveranderinge wat moontlik as gevolg van die hoë temperatuur kan plaasvind, hierdie resultate kan benadeel. Die doel van hierdie ondersoek was om vas te stel wat die effek van temperatuur as fisiese eksterne faktor op die stabiliteit van SSR en CSR is en om vas te stel by watter temperature SSR en CSR membraandeurlaatbaarheidsveranderinge ondergaan. Die moontlike meganismes daarby betrokke, is ook ondersoek om vas te stel of dit dieselfde is vir SSR en CSR.

Die effek van pH-veranderinge, is 'n chemiese eksterne faktor wat algemeen gebruik word tydens die karakterisering van ensieme. Die rol wat H^{+} speel tydens die funksionering van die SR geniet tans baie aandag aangesien die H^{+} -ione ten nouste betrokke is by die funksionering van die SR en die ATPase-ensiem. H^{+} -ione kan moontlik 'n rol speel by die eksitasie-kontraksiekoppeling (Inesi, 1985), Ca^{2+} -vrystelling (Nakamaru & Schwartz, 1972) en tydens Ca^{2+} -opname is daar 'n uitruiling van Ca^{2+} en H^{+} om die elektrogeniese effek

van die Ca^{2+} -pomp te balanseer (Inesi, 1985). Hierdie navorsing moet met groot versigtigheid aangepak word, aangesien die vrye Ca^{2+} -konsentrasie in die reaksiemengsel verander sodra die pH verander (Fabiato & Fabiato, 1979a). 'n Verandering aan die vrye Ca^{2+} -konsentrasie sal opsigself 'n invloed op die aktiwiteit van die SR hê (Levitsky et al., 1981). Dit gebeur egter dikwels dat pH-studies gedoen word sonder om die gepaardgaande vrye Ca^{2+} -konsentrasieveranderinge in ag te neem (de Meis & Inesi, 1982; Shigekawa et al., 1976; Sreter, 1969). Tydens hierdie studie is 'n teoretiese studie gedoen om vas te stel watter veranderinge die vrye Ca^{2+} -konsentrasie ondergaan indien die pH van verskillende reaksiemengsels verander. Hierdie studie is uitgevoer met behulp van 'n rekenaarprogram wat ontwikkel is en gebruik maak van die dissosiasiestanties van Fabiato & Fabiato (1979a). Die optimale pH van SR Ca^{2+} -opname en ATPase-aktiwiteit soos gerapporteer in die literatuur varieer geweldig en tydens hierdie studie is pH-veranderinge as 'n chemiese eksterne faktor gebruik om die stabiliteit van SSR en CSR met mekaar te vergelyk en om die optimale pH van SSR en CSR vas te stel.

Bo en behalwe pH-veranderinge, is 'n tweede chemiese eksterne faktor gebruik om die stabiliteit van SSR en CSR met mekaar te vergelyk naamlik die kombinasie van Triton X-100 en die Ca^{2+} -ionofoor A23187. Triton X-100 is 'n detergens wat algemeen gebruik word om die SR membraan te vervloei, ATPase ensieme te isoleer en te bestudeer. Die vloeibaarheid van die lipiede in die membraan is belangrik en beïnvloed die aktiwiteit van die ATPase. Die inbou van die Triton in die membraan verander die vloeibaarheid van die membraan en kan meer inligting verskaf oor die lipied-proteïeninteraksie in die membraan. In kombinasie met Triton word dikwels ook gebruik gemaak van 'n Ca^{2+} -ionofoor om die ontwikkeling van 'n Ca^{2+} -konsentrasiegradiënt oor die vesikelmembraan te verhoed. Aanvanklik is aanvaar dat die ionofoor slegs as 'n draer van Ca^{2+} dien en nie direk die membraanproteïene beïnvloed nie. In 1983 het Hasselbach et al. egter gevind dat die ionofoor X537A in teenwoordigheid van 0 - 0,3 mg Triton/ml die ATPase-aktiwiteit onderdruk. Sodra die Tritonkonsentrasie egter verder verhoog word, verdwyn hierdie onderdrukking weer en die ATPase-aktiwiteit keer terug na die hoër vlakke. Hasselbach et al. het beweer dat hierdie verskynsel uniek is aan X537A en dat die verlaging in ATPase-aktiwiteit nie deur hoë Ca^{2+} -konsentrasies verhoed kan word nie. McIntosh & Ross het egter in 1985 gerapporteer dat hulle hierdie effek ook met 'n ander Ca^{2+} -ionofoor, A23187 gekry het. Tydens hierdie studie is die kombinasie van Triton en A23187 as chemiese eksterne

faktor gebruik om die stabiliteit van SSR en CSR te ondersoek en met mekaar te vergelyk. Daar is ook ondersoek ingestel of die effek wat Hasselbach et al. (1983) met Triton en X537A verkry het uniek is aan X537A en of dit by beide SSR en CSR voorkom. Daar is ook gepoog om vas te stel waar die ionofoor die reaksiesiklus van die ATPase ensiem beïnvloed.

HOOFSTUK 2

METODES EN MATERIAAL

2.1 Bereiding van SR vesikels uit skeletspier

Die witskeletspier wat van die agterbene van konyne verwyder is, is gebruik om die SR vesikels te berei. Die metode van Eletr & Inesi (1972) is met enkele wysigings gevolg. Die konyne is met 'n harde hou agter die kop bewusteloos geslaan en dan doodgemaak deur die karotis-arteries deur te sny. Sodra die konyne doodgebloeit het, is die spier verwyder en gewas in yskoue 0,1 mM EDTA, pH 7,0. Oortollige vet- en bindweefsel is verwyder en 170g fyngesnyde spier is in 500ml medium 1 (10 mM MOPS; 10% sukrose (w/v); 0,1 mM EDTA, pH 7,0) in 'n Waring-homogeniseerder gehomogeniseer.

Homogenisering is vir 15 sekondes elke 5 minute vir een uur lank uitgevoer. Gedurende die homogenisering is die pH van die homogenaat konstant gehou tussen 6,5 en 7,0 deur die byvoeging van klein hoeveelhede 5% KOH. Die homogenaat is 20 minute lank teen 9 600 o.p.m. in 'n Sorvall GSA rotor (15 000 g) gesentrifugeer. Hierna is die supernatant deur 'n 2 cm dik laag gaas gefiltreer om lae-digtheidslipiede te verwyder. Die gefiltreerde supernatant is 90 minute lank gesentrifugeer teen 25 000 o.p.m. in 'n Beckman rotor 30 (40 000 g).

Die sediment wat sō verkry is, is in 48 ml medium 2 (10 mM MOPS; 0,6 M KCl, pH 7,0) deur middel van 'n glas homogeniseerder gehersuspendeer en 40 minute lank geïnkubeer by 2-4°C. Inkubasie in 'n hoë konsentrasie KCl is noodsaaklik om die kontraktiele proteïene op te los. Hierna is die preparaat vir 20 minute teen 11 000 o.p.m. in 'n Beckman rotor 30 (15 000 g) gesentrifugeer. Die boonste 20% supernatant bevat lae-digtheidslipiede en is nie gebruik nie. Die onderste 20% supernatant bevat fragmente van mitochondria, sarkolemma en SR en is ook nie gebruik nie. Die oorblywende supernatant is vir 90 minute teen 25 000 o.p.m. in 'n Beckman rotor 30 (40 000 g) gesentrifugeer en die finale sediment is in medium 3 (10 mM MOPS; 30% sukrose (w/v), pH 7,0) gehersuspendeer. Die hele prosedure is in 'n koelkamer by 2-4°C uitgevoer.

2.2 Bereiding van SR vesikels uit hartspier

Eletr & Inesi (1972) se metode vir die bereiding van skeletspier SR (kyk par. 2.1) is aangepas sodat hartspier SR berei kon word.

Honde is met natriumpentobarbitoon genarkotiseer en die harte verwyder. Nadat die hart gespoel is met yskoue 0,1 mM EDTA, is die oortollige vet- en bindweefsel met 'n skêr verwyder. Slegs ventrikelspier is gebruik en 100 g fyngesnyde spier is gehomogeniseer in 500 ml medium 1 (40 mM MOPS; 10% sukrose (w/v); 0,1 mM EDTA, pH 7,2) in 'n Waring-homogeniseerder. Homogenisering is vir 20 sekondes elke minuut vir 3 minute herhaal. Na homogenisering is die homogenaat se pH ongeveer 7,0. Verder stem die metode ooreen met die bereiding van skeletspier SR soos beskryf onder 2.1 buiten dat die 40 minute inkubasiëperiode weggelaat is om die bereidingstyd so kort as moontlik te hou. Die meer onstabiele CSR is dus vir 'n korter tydperk blootgestel aan enige proteolitiese ensieme wat tydens die bereiding teenwoordig mag wees. Die medium waarin die finale hersuspensie plaasvind, bevat ook 1 mM DTT om oksidasie teen te werk (Cleland, 1964).

2.3 Sulfering en isolering van SSR ATPase

Die metode van Chu et al. (1983) is met enkele wysigings gevolg. SSR met 'n konsentrasie van ten minste 20-25 mg proteïen/ml (> 100 mg proteïen) is verdun met 'n gelyke volume van 'n oplossing wat bestaan uit 0,5 M sukrose; 10 mM Tes, pH 8,7; 2 M KCl; 2 mM CaCl₂; 2 mM MgCl₂; 1 mM DTT en 1 mM Na₂ATP. 10% Deoksicholaat (DOC) is versigtig hierby gevoeg totdat die oplossing helder word. Die finale DOC-konsentrasie is ongeveer 0,4 mg DOC/mg SR proteïen. Die mengsel is stadig geroer vir 5 minute by 4°C en daarna vir 20 minute lank teen 41 000 o.p.m. in 'n Beckman rotor 50.2 Ti (200 000 g) gesentrifugeer. Die supernatant is versigtig verwyder en verdun met 'n gelyke volume van 'n oplossing wat bestaan uit 40% gliseroï (w/v); 20 mM Tes, pH 7,0; 2 mM MgCl₂; 2 mM Na₂ATP en 2 mM CaCl₂. Die mengsel is stadig geroer vir 20 minute en daarna vir 30 minute lank teen 41 000 o.p.m. in 'n Beckman rotor 50.2 Ti (200 000 g) gesentrifugeer. Die sediment is gehersuspendeer in 10 mM Tes (pH 7,0) en op 'n liniêre 20-50% (w/v) sukrose gradiënt geplaas wat ook die volgende bevat het: 10 mM Tes, pH 7,0; 0,5 M KCl; 1,0 mM MgCl₂; 1,0 mM Na₂ATP en 1,0 mM CaCl₂. Die gradiënt is vir 6 uur (of oornag) teen 25 000 o.p.m. in 'n Beckman rotor SW 28 (85 000 g) gesentrifugeer. Die band in die middel van die gradiënt is verwyder, gehersuspendeer in 10 mM Tes (pH 7,0) en vir 45 minute lank teen 30 000 o.p.m. in 'n Beckman rotor 50.2 Ti (100 000 g) gesentrifugeer. Die sediment is finaal gehersuspendeer in 10 mM Tes (pH 7,0) en dieselfde dag gebruik.

2.4 Proteïenbepaling volgens die Folinmetode (Lowry et al., 1951)

Die volgende oplossings is opgemaak:

Oplossing 1:

190 mM NaCO₃

100 mM NaOH

Oplossing 2: 430 mM natriumtartraat (C₄H₄Na₂O₆)

Oplossing 3: 20 mM CuSO₄

Die drie oplossings is in die verhouding van 50:1:1 gemeng om oplossing 4 te kry. By 5 ml van oplossing 4 is 0,025 ml SR monster of blanko gevoeg en vir 3 minute by 37°C gekubeer. Hierna is 0,5 ml Phenolreagens bygevoeg en vir 'n verdere 20 minute gekubeer. Die optiese digtheid word by 700 mμ gelees en met 'n serumalbumien-standaard vergelyk.

2.5 ATPase-aktiwiteit van SR

Die tempo van ATP-hidrolise is bepaal deur die vrystelling van anorganiese fosfaat met behulp van die metode van Fiske & Subbarow (1925) vas te stel. Die volgende reaksiemengsel is gebruik: 20 mM MOPS, pH 7,4; 120 mM KCl; 0,2 mM CaCl₂; 0,2 mM EGTA; 2,5 mM MgCl₂; 5 mM NaN₃, en 0,2 - 0,3 mg SR proteïen/ml by temperature soos in die byskrifte van die verskillende figure aangedui is. Die reaksie is begin deur 2,5 mM ATP by die reaksiemengsel te voeg. Die reaksie is beëindig deur 1 ml monsters op spesifieke tye te onttrek en by gelyke volumes 10% TCA (w/v) op ys te voeg. Na 10 minute is die monsters vir 10 minute gesentrifugeer teen maksimum snelheid in 'n tafelsentrifuge. Die hoeveelheid anorganiese fosfaat gevorm in elke monster, is bepaal as aanduiding van die Ca²⁺-Mg²⁺-afhanklike ATPase-aktiwiteit. Om die invloed van pH op die ATPase-aktiwiteit te bepaal, is Tris-maleaat (pH 5,6 - 7,6) of Tris-HCl (pH 8,0 - 8,8) in die plek van MOPS as buffer gebruik.

2.6 ATP-afhanklike Ca²⁺-opname deur SR

Ca²⁺-opname is in teenwoordigheid van kalsiumpresipiteringsione soos oksalaat en ook in die afwesigheid daarvan uitgevoer.

2.6.1 ATP-afhanklike Ca^{2+} -opname deur SR in afwesigheid van oksalaat

Ca^{2+} -opname is uitgevoer in 'n reaksiemengsel bestaande uit 20 mM MOPS, pH 6,8; 120 mM KCl; 0,1 mM $^{45}\text{Ca}-\text{CaCl}_2$; 0,1 mM EGTA; 2,5 mM MgCl_2 ; 5 mM NaN_3 , en 0,15 mg SR proteïen/ml by temperature soos in die byskrifte van die verskillende figure aangedui is. Die opname is begin deur 2,5 mM ATP by die reaksiemengsel te voeg. Die opname is beëindig deur Millipore-filtrering. Die oorblywende Ca^{2+} in die filtraat is bepaal deur middel van vloei-stofsintillasiemetting.

In die afwesigheid van Ca^{2+} -presipiteringsione soos oksalaat styg die vrye Ca^{2+} -konsentrasie in die vesikel so hoog dat die inwaartse en uitwaartse transport van Ca^{2+} 'n ewewig bereik. Binne 20 tot 30 sekondes by 25°C is daar dus geen verdere toename in die Ca^{2+} -inhoud van die vesikel nie. Die Ca^{2+} -opname in afwesigheid van oksalaat soos verteenwoordig deur die ewewigsvlak, is bepaal. Dit is dus 'n aanduiding van die Ca^{2+} -inhoud of kapasiteit van die SR vesikel eerder as die tempo van Ca^{2+} -opname.

2.6.2 ATP-afhanklike Ca^{2+} -opname deur SR in teenwoordigheid van oksalaat

Ca^{2+} -opname is uitgevoer in 'n reaksiemengsel bestaande uit 20 mM MOPS, pH 6,8; 120 mM KCl; 1 mM $^{45}\text{Ca}-\text{CaCl}_2$; 1 mM EGTA; 10 mM $\text{K}_2\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$; 5 mM NaN_3 , en 0,15 mg SR proteïen/ml by temperature soos in die byskrifte van die verskillende figure aangedui is. Die opname is begin deur 2,5 mM MgATP by die reaksiemengsel te voeg. Die opname is beëindig deur Millipore-filtrering. Die oorblywende Ca^{2+} in die filtraat is bepaal deur middel van vloei-stofsintillasiemetting. Om die invloed van pH op Ca^{2+} -opname te bepaal, is Tris-maleaat (pH 5,6 - 7,6) of Tris-HCl (pH 8,0 - 8,8) in die plek van MOPS as buffer gebruik. In teenwoordigheid van oksalaat presipiteer die Ca^{2+} binne die vesikel in die vorm van onoplosbare kalsiumoksalaat en die vrye Ca^{2+} -konsentrasie in die SR vesikel styg dus nie so hoog dat die uitwaartse beweging van Ca^{2+} deur middel van uitruiling of passiewe uitvloei toeneem nie. Die tempo van Ca^{2+} -opname kan dus bepaal word deur die reaksie te beëindig op verskillende tye nadat die opname begin is.

2.7 Die oplosbaarheid van SR in Triton X-100

Die oplosbaarheid van SR in Triton X-100 is bepaal met behulp van die metode van Villalafn et al. (1982). Die volgende reaksiemengsel is gebruik:

0,3 M sukrose; 1 mM DTT; 10 mM MOPS, pH 7,0 en 1 mg SR proteïen. Verskillende konsentrasies Triton X-100 is by die reaksiemengsel gevoeg en vir 5 minute by kamertemperatuur gelaat. Optiese digtheid is by 550 nm gemeet.

2.8: Die lipied:proteïenverhouding

SR vesikels met 'n totale proteïeninhoud van 10 mg soos bepaal met behulp van die metode van Lowry et al. (1951), is gevriesdroog tot 'n konstante massa bereik is. Aangesien die membraan uit proteïen en lipiede saamgestel is en die proteïeninhoud bekend is (10 mg), kan die lipiedinhoud uit die SR vesikels se totale massa bereken word.

2.9: Lipiedbepaling

Die cholesterolinhoud van die SR membraan is bepaal volgens die metode van Borchman et al. (1982). Die totale lipiede is geëkstraheer in 'n CHCl_3 : MeOH (1:2 v/v) medium en die cholesterol is bepaal met behulp van die Liebermann-Burchardreaksie. Die geëkstraheerde lipiede is by gelyke volumes $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O} - \text{H}_2\text{SO}_4$ (30:1 v/v) gevoeg. Die monsters is vir 20 minute in die donker by kamertemperatuur gelaat, by 680 nm gelees en vergelyk met cholesterolstandaarde.

2.10: Tripsienvertering

Die metode van Inesi & Asai (1968) is met enkele wysigings gevolg. Die vertering van SR is gedoen by 25°C in 'n reaksiemengsel bestaande uit 20 mM MOPS, pH 7,0; 80 mM KCl; 12% sukrose (w/v); 2,5 mg SR proteïen/ml en tripsien in 'n 1:20 of 1:100 verhouding met SR proteïen. As kontrole is tripsieninhibeerder in 'n 4:1 verhouding tot tripsien by die reaksiemengsel gevoeg. Vertering is beëindig deur tripsieninhibeerder in dieselfde verhouding by te voeg.

2.11: Die bepaling van die vrye Ca^{2+} -konsentrasie en die handhawing van 'n konstante vrye Ca^{2+} -konsentrasie by verskillende pH-waardes

Die bepaling van die vrye Ca^{2+} -konsentrasie is moontlik gemaak deur die programme wat Fabiato & Fabiato (1979a) geskryf het vir 'n Texas Instruments TI-59-sakrekenaar oor te skryf vir 'n Hewlett Packard 86B-rekenaar. Dit bestaan uit drie programme.

Program 1 bereken die oënskynlike stabiliteits- of bindingskonstantes van verskillende ione by verskillende pH-waardes uit die absolute bindingskonstantes. Aangesien die verskillende ione, ligande en H^+ in die reaksiemengsel met mekaar kompeteer om binding, kan die absolute bindingskonstantes wat in die literatuur verskyn nie gebruik word nie. Die oënskynlike bindingskonstantes moet bereken word en dit kan dan in die ander twee programme gebruik word.

Program 2 bereken die totale konsentrasies van verskillende ione wat nodig is om spesifieke vrye ioonkonsentrasies in 'n komplekse reaksiemengsel te kry.

Program 3 bereken die vrye ioonkonsentrasies van verskillende ione vanuit die totale konsentrasies van die ione in 'n komplekse reaksiemengsel.

2.12 Chemikalieë

Daar is deurgaans gebruik gemaak van analitiese graad chemikalieë en gedeïoniseerde, dubbelglasgedistilleerde water. Radioaktiewe ^{45}Ca verkry van New England Nuclear en Aquagelsintillasievloeistof is gebruik. A23187 is verkry van Calbiochem en deoksicholaat van Fluka. Nupercaine is geskenk deur Ciba-Geigy.

2.13 Statistiese verwerkings

Standaard-afwykings is bepaal met behulp van die volgende vergelyking:

$$S_x = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n-1}}$$

Die aantal eksperimente wat uitgevoer is, is telkens so aangepas dat die standaard-afwyking nie met meer as 5% van die gemiddelde afgewyk het nie. Die aantal eksperimente uitgevoer word telkens by die figure aangedui.

Liniêre regressiepassings is gedoen met behulp van die volgende vergelykings:

$$y = a_1 x + a_0$$

$$\text{met } a_1 = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} \quad \text{en } a_0 = \bar{y} - a_1 \bar{x}$$

Die korrelasie koeffisiënt r^2 is gebruik om liniêre verwantskappe te toets.

$$r^2 = \frac{\left[\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n} \right]^2}{\left[\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right] \left[\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \right]}$$

HOOFSTUK 3

MEGANISME VAN ONSTABILITEIT VAN CSR

3.1 Inleiding

Dit is algemeen bekend dat geïsoleerde CSR 'n lae funksionele stabiliteit vertoon as dit met SSR vergelyk word. Die Ca^{2+} -opname van SSR bly stabiel vir minstens sewe dae (Eletr & Inesi, 1972) terwyl die Ca^{2+} -opname vermoë van CSR binne een tot vier dae met 50% afneem (Carsten, 1964; Scales & McIntosh, 1968; Pretorius et al., 1969). Die onstabiliteit van CSR is veral nadelig omdat die aanvangsaktiwiteit van CSR slegs ongeveer 10% van SSR aktiwiteit is (Pretorius et al., 1969). Hierdie onstabiliteit het navorsing oor die funksionering van CSR benadeel en tot gevolg gehad dat daar vandag groot leemtes bestaan in die kennis van die meganismes betrokke by die funksionering van CSR.

Verskeie bereidingsmetodes en tegnieke is ontwikkel om die stabiliteit van CSR te verbeter. Dikwels word CSR preparate slegs direk na bereiding gebruik (Shigekawa et al., 1976; Drummond & Dunham, 1978). Sommige navorsers stoor die SR preparaat by -70°C (Toogood et al., 1983) maar volgens Chamberlain et al. (1983) veroorsaak dit agteruitgang van die SR funksionering. Mouradfan et al. (1985) vriesdroog die SR preparaat in teenwoordigheid van trehalose. Gradiëntsentrifugering is ook al toegepas om 'n stabielere CSR preparaat te probeer berei (Katz et al., 1970). Katz et al. (1970) het bevind dat gradiëntsentrifugering nie veel verbetering gee nie tensy litiumbromied in hipertoneiese sukrose (40%) as bereidingsmedium gebruik word. Sukrose stabiliseer die CSR en het 'n groot verlaging in die aziedsensitiewe ATPase-aktiwiteit (van mitochondriale oorsprong) tot gevolg (Katz & Repke, 1967). Pretorius & Malan (1974) het gevind dat 35% sukrose die halfleeftydperk van die CSR preparaat van vyftien na sestig uur verleng. Repke & Katz (1969) beweer dat die hipertoneiese sukrose die CSR stabiliseer as gevolg van die inhibering van lisosoomkontaminante in die preparaat. In teenstelling hiermee is daar navorsers wat natriumbikarbonaat as bereidingsmedium gebruik en beweer dat sukrose nadelig is vir die SR preparaat (Harigaya & Schwartz, 1969; Nayler et al., 1975).

Om die inhiberende effek van vrye vetsure op die CSR te verhoed is albumien by die preparaat gevoeg (Masoro & Yu, 1970). Die teenwoordigheid van albumien

in die preparaat bemoeiik egter die bepaling van die preparaat se proteïen-konsentrasie. Ander middels wat al gebruik is om die CSR te probeer stabiliseer sluit in askorbiensuur, sisteïen, ammoniumasetaat (Carsten, 1964; MacLennan, 1970) en β -merkaptop-etaanol (Bonnet *et al.*, 1978). Anti-oksidante soos ditiotreitol (DTT) (Van Winkle *et al.*, 1978) en vitamien E (α -tokoferol) (Scales & McIntosh, 1968) is by die preparate gevoeg om die oksidasie van CSR te beperk.

211

Die meganisme betrokke by die lae stabiliteit van CSR is egter nog onbekend en gemengde sukses is met die pogings om die stabiliteit te verbeter behaal. Wat wel na vore gekom het is dat 'n afname in Ca^{2+} -opname voorkom indien die SR blootgestel word aan oksidasie deur kaliumpermanganaat ($KMnO_4$) (Ariki & Shamoo, 1983). Die afname in Ca^{2+} -opname is gekoppel aan oksidasie van reaktiewe SH-groepe na sulfoonsuurgroepe ($-SO_3H$) (Ariki & Shamoo, 1983). Oksidasie kan dus moontlik ook tydens die bereiding en die stoor van CSR preparate 'n bydrae lewer tot die onstabiliteit van die preparaat.

1187

Katz *et al.* (1970) het gevind dat daar in die CSR preparaat lisosome voorkom asook proteolitiese ensieme wat van die lisosome afkomstig is. Die moontlikheid bestaan dat hierdie proteolitiese ensieme 'n bydrae kan lewer tot die onstabiliteit van die CSR preparaat. Die suiwerheid van 'n preparaat het dus 'n groot invloed op die stabiliteit daarvan.

212

Tydens hierdie studie is daar gepoog om die stabiliteit van die CSR preparaat te verbeter deur die effek van oksidasie en proteolitiese ensieme tee te werk. Om oksidasie te probeer beperk is twee anti-oksidante gebruik naamlik gebutileerde hidroksitolueen (BHT) en ditiotreitol (DTT). BHT is 'n anti-oksidant wat algemeen in die voedselindustrie gebruik word (Windholz *et al.*, 1983) en dit is bekend dat DTT SH-groepe teen oksidasie beskerm (Cleland, 1964). In 'n poging om die effek van kontaminerende proteolitiese ensieme uit te skakel is gebruik gemaak van 'n kragtige inhibeerder van proteolitiese ensieme naamlik fenielmetielsulfonieflooried (PMSF) (Farney & Gold, 1963).

Die hoëronstabiliteit van die CSR kan moontlik 'n aanduiding wees dat die funksionele dele van die ATPase proteïen meer oppervlakkig in die CSR membraan voorkom of meer toeganklik is vir eksterne beskadiging. Om hierdie moontlikhede te ondersoek is daar gebruik gemaak van tripsienvertering. Die fragmentering van membraanproteïene deur tripsienvertering is suksesvol gebruik om meer inligting te bekom van rodopsien en ionkanale in die eritrosietmembraan

(Toogood et al., 1983). Dit is ook gebruik om die ATPase-ensiem van SSR in kleiner fragmente op te breek en om sodoende meer te wete te kom oor die struktuur-funksieverwantskap van die ATPase (Inesi & Scales, 1974). Matige tripsienvertering verdeel die ATPase proteïene (106 000 dalton) in twee kleiner fragmente naamlik A (55 000 dalton) en B (45 000 dalton) en indien die vertering vir langer tye toegepas word, word fragment A weer in twee subfragmente A₁ (30 000 dalton) en A₂ (20 000 dalton) verdeel (Saito et al., 1984). Minstens drie van die vier reaktiewe SH-groepe is teenwoordig op die A₁-fragment (Saito et al., 1984). Toogood et al. (1983) het gevind dat indien die fragmente in gesintetiseerde vesikelmembrane ingebou word, die B-fragment optree soos 'n nie-spesifieke transmembraan ionkanaal terwyl die A₂-fragment optree soos 'n funksionele Ca²⁺-hek. Hieruit het Toogood et al. (1983) afgelei dat tripsienvertering 'n kanaal blootlê waardeur Ca²⁺-vrystelling moontlik kan plaasvind.

Die vatbaarheid van die SR membraan vir tripsienvertering word deur verskeie faktore beïnvloed. Die temperatuur waarby die vertering plaasvind het 'n groot invloed op die mate van vertering (Saito et al., 1984; Blazyk et al., 1985). Hierdie invloed van temperatuur het waarskynlik te doen met die vloeibaarheid van die lipiedannulus om die ATPase proteïene. 'n Meer vloeibare annulus het tot gevolg dat die ATPase proteïene meer toeganklik is vir tripsienvertering (Blazyk et al., 1985). Die membraan kan beskerm word teen vertering deur die byvoeging van Ca²⁺ (Ikemoto et al., 1971b; Saito et al., 1984) of sukrose (Ikemoto et al., 1971b).

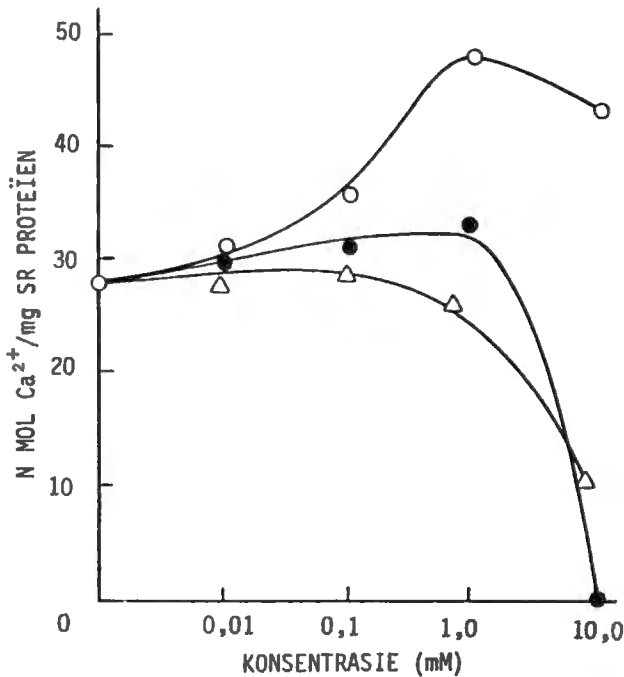
Die lipiedlae van die SR membraan beskerm die hidrofobiese gedeeltes van die ATPase proteïene aangesien die membraan ondeurlaatbaar is vir tripsien (Ikemoto, 1982). Die ATPase molekule besit hidrofobe en hidrofiele dele wat heen en weer deur die SR membraan strek en lusse aan die sitoplasmiese kant van die membraan vorm (Ikemoto, 1982). Die hidrofiele lusse is dus meer blootgestel aan tripsienvertering. Deur die SSR en CSR aan tripsienvertering bloot te stel kan die effek van vertering op die funksionering van die ATPase-ensieme met mekaar vergelyk word om meer lig te werp op kwalitatiewe en kwantitatiewe verskille en moontlik die oorsaak van die onstabieleit van CSR.

Die Ca²⁺-transport van CSR is baie meer onstabiel as die ATPase-aktiwiteit (Carsten, 1964) wat moontlik die gevolg is van deurlaatbaarheidsveranderinge. Die bestudering van deurlaatbaarheidsveranderinge is dus noodsaaklik en dit kan gedoen word deur die membraan bloot te stel aan hoë temperature. Alhoewel

temperatuur-geïnduseerde veranderinge aan die SR membraan waarskynlik geen fisiologiese rol speel nie, is dit tog 'n nuttige parameter om die struktuur-funksieverhouding van die SR te bestudeer. Temperatur is dan ook een van die veranderlikes wat algemeen gebruik word om ensieme te karakteriseer.

Temperatuur het verskillende effekte op biologiese membrane en dit wissel van vervaag van die lipiede in die membraan (Inesi et al., 1973) tot onomkeerbare denaturering van die proteïene in die membraan by hoë temperature (Carvalho & Santos, 1976). Denaturering van die ATPase vind plaas by 48-50°C en geen ATPase-aktiwiteit is aanwesig bokant dié temperature nie (Inesi et al., 1973; Carvalho & Santos, 1976). Indien Arrheniusplottings van die temperatuurafhanklikheid van membraan geboonde ensieme gedoen word is dit algemeen bekend dat nie-linieêre kromme verkry word (Sandermann, 1978). Die waarskynlikste rede vir die veranderinge in die aktiveringsenergie wat deur 'n breëpunt in die kromme weerspieël word, is 'n orde-wanorde faseverandering in die lipieddeel van die membraan (Inesi et al., 1973). Hierdie verandering in aktiveringsenergie kom voor by 20°C in die SR membraan en bokant 20°C vertoon die lipiede 'n groter mate van wanorde en vloeibaarheid (Inesi et al., 1973). Tussen 5 en 20°C word ensiemreaksies vertraag as gevolg van die hoogs geordende omgewing waarin die ATPase voorkom (Inesi et al., 1983). Tussen -30°C en 0°C is daar 'n skerp toename in die vloeibaarheid van die lipiede in die membraan en bokant 0°C is die meeste lipiede reeds in 'n vloeibare vorm. Daar is egter 'n klein poel van lipiede wat naby 15-20°C vervaag en die lipiedannulus om die ATPase vorm (Blazyk et al., 1985). Die geïsoleerde ATPase toon geen verandering by 20°C nie en die lipiedannulus reageer dus met die proteïene om die ATPase se temperatuur afhanklike gedrag te beïnvloed (Blazyk et al., 1985). Die volledige vervaag van die lipiedannulus is gekoppel aan 'n konformasieverandering in die proteïene self, moontlik 'n ruimtelike oriëntasieverandering in die membraan. Hierdie konformasieverandering lê die proteïene meer bloot vir vertering (Blazyk et al., 1985). By 37-40°C vind daar nog 'n konformasieverandering plaas wat meer SH-groepe beskikbaar stel (Inesi et al., 1973). Carvalho & Santos (1976) het gevind dat indien SSR vesikels lekbaar gemaak word en daarna gepreïnkubeer word by 35-45°C die SSR 'n hoër ATPase-aktiwiteit vertoon by 20°C. Die preïnkubasie by 35-45°C het moontlik die ATPase molekule laat oopvou na 'n vorm wat meer aktief is as die natuurlike vorm (Carvalho & Santos, 1976).

Verhoogde temperatuur veroorsaak 'n toename in die membraandeurlaatbaarheid van eritrosietmembrane (Brahm, 1982), Golgimembrane (White et al., 1984), tongselmembrane (Garrick & Chinard, 1982) en SSR membrane (Vale & Carvalho, 1980; Volmer, 1981). Volgens Inesi et al. (1973) is die optimale temperatuur



Figuur 3.1: Invloed van BHT, DTT en PMSF op die Ca²⁺-opname van CSR.
 Reaksiemengsel: 20 mM MOPS, pH 6,8; 120 mM KCl; 0,025 mM ⁴⁵Ca-CaCl₂; 0,025 mM EGTA; 2,5 mM MgCl₂; 5 mM NaN₃; 2,5 mM ATP en 0,15 mg SR proteïen/ml. Temperatuur 37°C.
 BHT (○) en PMSF (●) is in etanol opgelos en DTT (Δ) in water.
 Hierdie figuur verteenwoordig die resultate van vier afsonderlike eksperimente.

vir SSR Ca^{2+} -opname sonder oksalaat 35°C en in teenwoordigheid van oksalaat is die optimale temperatuur 42°C . Die optimale temperatuur vir die bepaling van die ATPase-aktiwiteit is volgens Inesi et al. (1973) 48°C . By hoër temperatuur neem Ca^{2+} -opname dus af, terwyl die ATPase-aktiwiteit toeneem as gevolg van verhoogde membraandeurlaatbaarheid (Inesi et al., 1973). Met oksalaat is hierdie deurlaatbaarheid met verhoogde temperatuur baie minder opvallend of afwesig (Sreter, 1969; Inesi et al., 1973; Meltzer & Berman, 1984). Dit wil dus voorkom asof dit slegs vrye Ca^{2+} is wat uit die vesikel kan lek. Die effluks van Ca^{2+} vind moontlik deur 'n temperatuurafhanklike hekproses (Palade et al., 1983) of 'n kanaal plaas (Toogood et al., 1983).

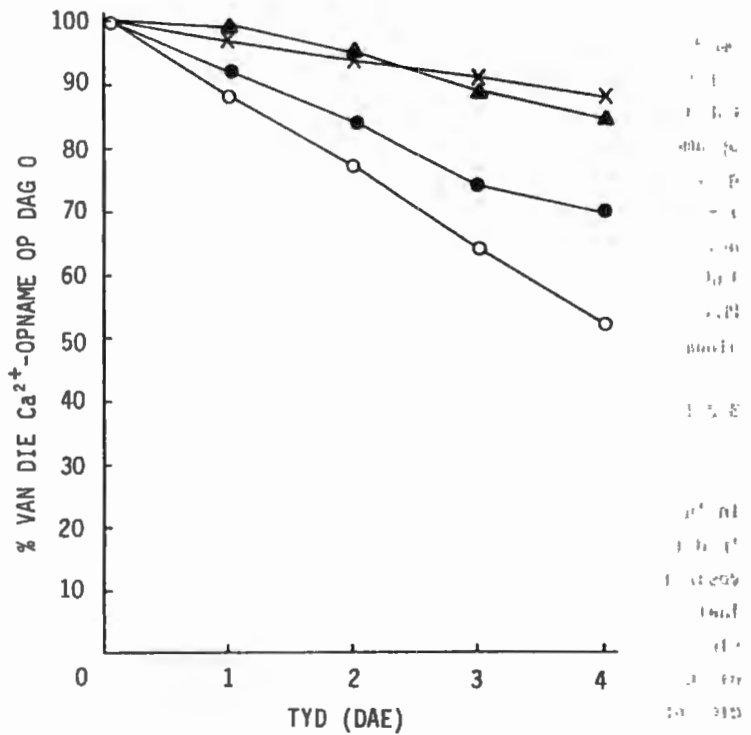
Verskeie aspekte van Ca^{2+} -effluks, Ca^{2+} -vrystelling en membraandeurlaatbaarheid van geïsoleerde CSR is al bestudeer terwyl die vesikels vir lang periodes by 37°C geïnkubeer is (Nayler & Dresel, 1984). Dit is duidelik dat veranderinge aan die membraandeurlaatbaarheid as gevolg van hierdie temperatuur, die waarde van hierdie resultate sal verminder. Tydens hierdie studie is die effek van temperatuur op die membraandeurlaatbaarheid van SSR en CSR ondersoek asook die moontlike meganisme betrokke by die temperatuur-geïnduseerde deurlaatbaarheidsveranderinge.

3.2 Resultate

3.2.1 Mekanisme van onstabiliteit van CSR

3.2.1.1 Invloed van BHT, DTT en PMSF op die Ca^{2+} -opname van CSR

Om die optimale konsentrasies te bepaal, is dosis-responskrommes van die uitwerking van verskillende konsentrasies BHT, DTT en PMSF op die Ca^{2+} -opname van CSR getrek (Fig. 3.1). Die byvoeging van 1 mM BHT het 'n stimulering van 70% op die opname-aktiwiteit van CSR ten spyte van die etanol waarin die BHT opgelos is. Met 'n verdere verhoging in die BHT-konsentrasie na 10 mM begin die Ca^{2+} -opname weer afneem. DTT het min effek op die CSR tot op 'n DTT-konsentrasie van 1 mM waarna daar 'n daling in die opname-aktiwiteit voorkom. PMSF het 'n geringe toename in Ca^{2+} -opname tot gevolg tot by 'n konsentrasie van 1 mM. In teenwoordigheid van 10 mM PMSF word geen opname-aktiwiteit waargeneem nie.



Figuur 3.2: Invloed van 1 mM BHT, 1 mM DTT en 1 mM PMSF op die stabiliteit van CSR Ca^{2+} -opname in afwesigheid van oksalaat. Die reaksiemengsel is soos beskryf in Figuur 3.1. Die stabiliteit van CSR gestoor sonder enige byvoeging (o) en gestoor in teenwoordigheid van 1 mM BHT (x), 1 mM DTT (▲) en 1 mM PMSF (●) word getoon. Die Ca^{2+} -opname direk na bereiding (31 nmol Ca^{2+} /mg SR proteïen) is as 100% geneem. Temperatuur 37°C . Hierdie figuur verteenwoordig die resultate van agt afsonderlike eksperimente.

3.2.1.2 Invloed van 1 mM BHT, 1 mM DTT en 1 mM PMSF op die stabiliteit van CSR Ca^{2+} -opname in afwesigheid van oksalaat

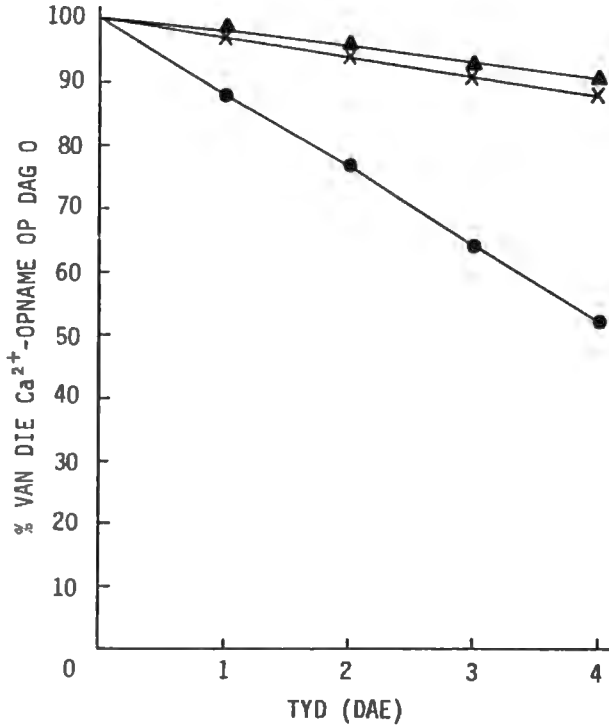
Om die invloed van BHT, DTT en PMSF op die stabiliteit van CSR te bepaal is CSR preparate in 4 dele verdeel en gestoor by 0°C (Fig. 3.2). Die kontrole CSR is gestoor sonder enige addisionele beskerming en na 4 dae het die Ca^{2+} -opname gedaal tot 50% van die oorspronklike opname. Indien die CSR egter gestoor word in teenwoordigheid van 1 mM BHT of 1 mM DTT is daar slegs 'n 12-15% afname in die Ca^{2+} -opname oor 4 dae. Die CSR gestoor in teenwoordigheid van 1 mM PMSF het na 4 dae 'n daling van 30% in die Ca^{2+} -opname getoon. Indien CSR gestoor word in teenwoordigheid van beide 'n anti-oksidadant en PMSF het dit nie die stabiliteit van die CSR verder verbeter nie en 'n 12-15% afname in Ca^{2+} -opname het steeds plaasgevind (Resultate nie getoon).

3.2.1.3 Vergelyking van die stabiliteit van CSR Ca^{2+} -opname sonder oksalaat met CSR Ca^{2+} -opname in teenwoordigheid van oksalaat

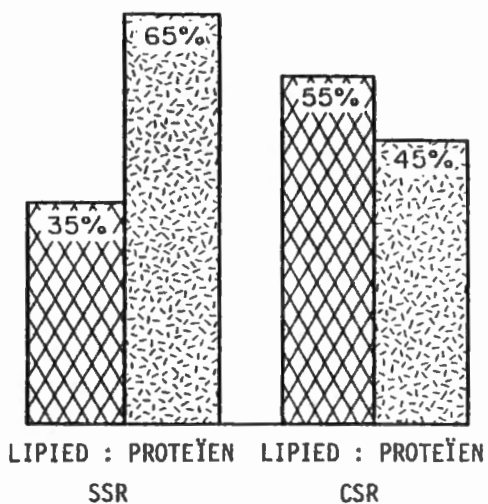
In 'n poging om vas te stel of die onstabiliteit van CSR die gevolg is van 'n daling in die Ca^{2+} -opnametempo of die afname in die kapasiteit van die vesikels, is die Ca^{2+} -opname van verouderende CSR bepaal met en sonder oksalaat (Fig. 3.3). Die Ca^{2+} -opname van CSR in teenwoordigheid van oksalaat toon slegs 'n geringe afname met veroudering en vertoon dieselfde stabiliteit as die Ca^{2+} -opname sonder oksalaat van CSR wat gestoor is in teenwoordigheid van die anti-oksidadant BHT. Daar vind dus oor 4 dae slegs 'n daling van 10-12% in Ca^{2+} -opname plaas teenoor die 50% daling van die kontrole CSR wat gestoor is in afwesigheid van 'n anti-oksidadant. Die Ca^{2+} -opname direk na bereiding is $245 \text{ nmol Ca}^{2+}/\text{mg SR proteïen}/\text{min.}$ in teenwoordigheid van oksalaat en $33 \text{ nmol Ca}^{2+}/\text{mg SR proteïen}$ sonder oksalaat.

3.2.1.4 Lipied:proteïenverhouding en cholesterolinhoud van SSR en CSR

Die samestelling van die SSR en CSR membraan is ondersoek sodat die membraane met mekaar vergelyk kan word. Die CSR membraan se lipied:proteïenverhouding (55:45) is veel hoër as die lipied:proteïenverhouding van die SSR membraan (35:65) (Fig. 3.4). Die cholesterolinhoud van die SSR en CSR membraan is ook ondersoek (eksperimentele prosedure word beskryf in Hoofstuk 2: Metodes en materiaal). Die cholesterolinhoud van CSR ($0,069 \text{ mg}/\text{mg proteïen}$) is meer as drie keer hoër as die cholesterolinhoud van SSR ($0,02 \text{ mg}/\text{mg proteïen}$).



Figuur 3.3: Vergelyking van die stabiliteit van CSR Ca^{2+} -opname sonder oksalaat met CSR Ca^{2+} -opname in teenwoordigheid van oksalaat. Die reaksiemengsels vir die kontrole CSR gestoor sonder antioksidant (●) en die CSR gestoor in teenwoordigheid van 1 mM BHT (▲) is soos beskryf in Figuur 3.1. Die CSR Ca^{2+} -opname in teenwoordigheid van oksalaat (x) is gedoen in 'n reaksiemengsel wat bestaan het uit: 20 mM MOPS, pH 6,8; 120 mM KCl; 1 mM $^{45}\text{Ca}-\text{CaCl}_2$; 1 mM EGTA; 10 mM $\text{K}_2\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$; 2,5 mM MgCl_2 ; 5 mM NaN_3 ; 2,5 mM ATP en 0,15 mg SR proteïen/ml. Hierdie CSR is gestoor in afwesigheid van 'n anti-oksidadant. Temperatuur 37°C . Die Ca^{2+} -opname direk na bereiding is as 100% geneem. Hierdie figuur verteenwoordig die resultate van agt afsonderlike eksperimente.



Figuur 3.4: Histogram van die lipied:proteïenverhouding van SSR en CSR. Eksperimentele prosedure word beskryf in Hoofstuk 2: Metodes en materiaal.

3.2.1.5 Invloed van tripsienvertering op die Ca^{2+} -opname van SSR en CSR in teenwoordigheid van oksalaat en ook sonder oksalaat

Om vas te stel of die funksionele dele van die CSR ATPase wat betrokke is by Ca^{2+} -transport, meer oppervlakkig in die membraan voorkom as SSR ATPase is die SR vesikels blootgestel aan tripsienvertering (Fig. 3.5). Na 20 minute se vertering het die CSR Ca^{2+} -opname in afwesigheid van oksalaat gedaal met 77% en in teenwoordigheid van oksalaat met 98%. Hierteenoor het die SSR Ca^{2+} -opname in afwesigheid van oksalaat gedaal met slegs 35% en in teenwoordigheid van oksalaat met 72%. Die CSR Ca^{2+} -opname word dus meer geredelik beskadig deur tripsienvertering. Vertering het ook 'n nadeliger invloed op die Ca^{2+} -opname in teenwoordigheid van oksalaat as op die Ca^{2+} -opname sonder oksalaat. Die tempo van opname word dus meer benadeel as die kapasiteit van die vesikels. Voor vertering is die CSR Ca^{2+} -opname in teenwoordigheid van oksalaat 240 nmol Ca^{2+} /mg SR proteïen/min. en sonder oksalaat 30 nmol Ca^{2+} /mg SR proteïen. Die ooreenstemmende waardes vir SSR Ca^{2+} -opname was 1 225 nmol Ca^{2+} /mg SR proteïen/min. en 131 nmol Ca^{2+} /mg SR proteïen.

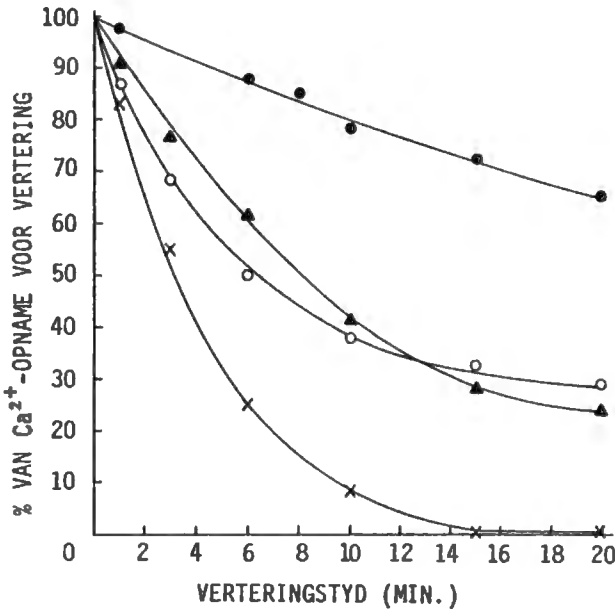
3.2.1.6 Invloed van tripsienvertering op die ATPase-aktiwiteit van SSR en CSR

Die SSR en CSR vesikels is blootgestel aan tripsienvertering om vas te stel of daar enige kwalitatiewe verskille bestaan tussen SSR en CSR ATPase (Fig. 3.6). Die ATPase van CSR is baie meer sensitief vir tripsienvertering as SSR ATPase. Na 15 minute se vertering was die SSR ATPase-aktiwiteit nog 84% van die aktiwiteit voor vertering in vergelyking met die 43% van CSR ATPase-aktiwiteit. Die ATPase-aktiwiteit van SSR was voor vertering 1,9 $\mu\text{mol Pi/mg SR proteïen/min.}$ en die ATPase-aktiwiteit van CSR 0,295 $\mu\text{mol Pi/mg SR proteïen/min.}$

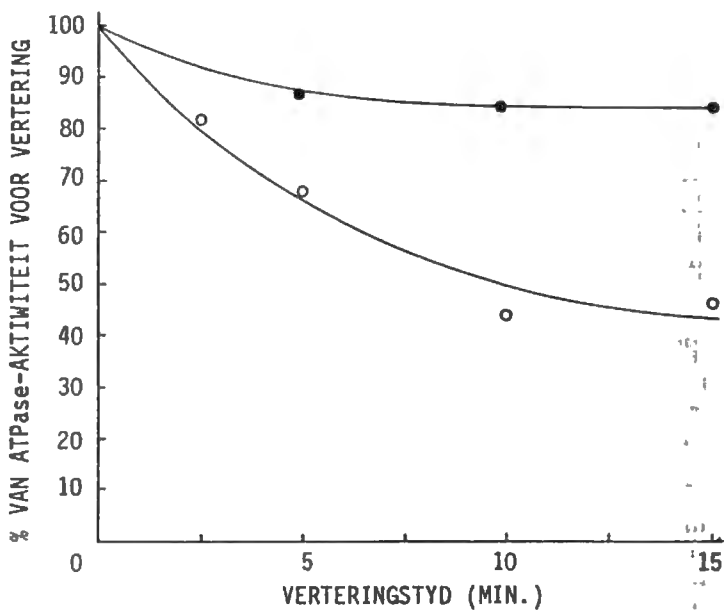
3.2.2 Temperatuur-geïnduseerde membraanduurlaatbaarheidsveranderinge

3.2.2.1 Effek van temperatuur op die SSR en CSR Ca^{2+} -opname in teenwoordigheid van oksalaat

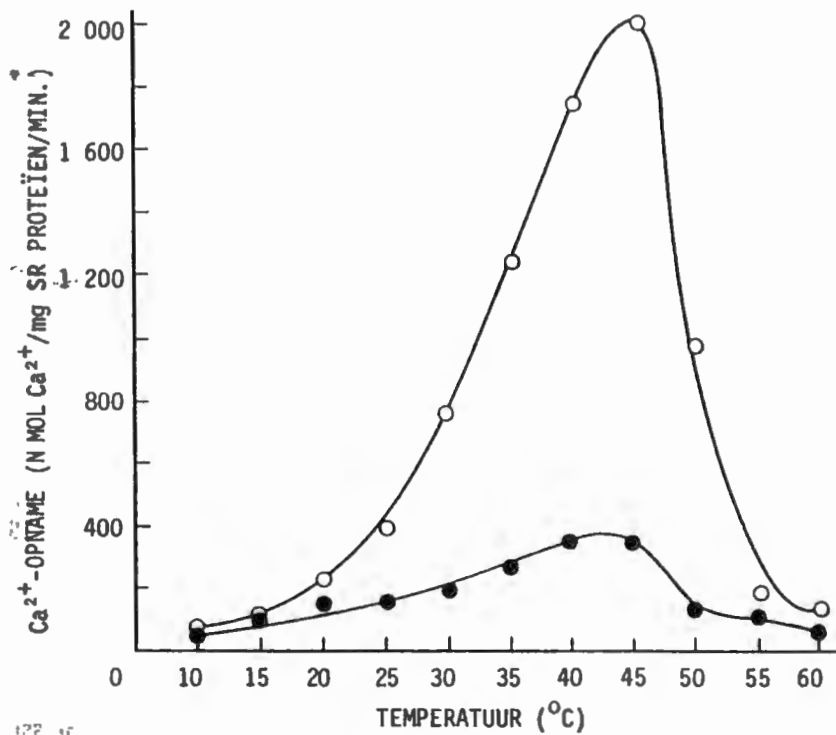
SSR en CSR Ca^{2+} -opnames in teenwoordigheid van oksalaat is uitgevoer by verskillende temperature (Fig. 3.7). Dit wil voorkom asof die tempo van Ca^{2+} -transport deur SSR en CSR dieselfde reageer by verskillende temperature. Die maksimale Ca^{2+} -opname van SSR (2 051 nmol Ca^{2+} /mg SR proteïen/min.) en die van CSR (380 nmol Ca^{2+} /mg proteïen/min.) is verkry by 45°C en 42-43°C respektiewelik.



Figuur 3.5: Invloed van tripsienvertering op die Ca^{2+} -opname van SSR en CSR in teenwoordigheid van oksalaat en ook sonder oksalaat. Die vertering van die SR membrane is gedoen by 25°C in 'n reaksiemengsel bestaande uit 20 mM MOPS, pH 7,0; 80 mM KCl; 12% sukrose (w/v); 2,5 mg SR proteïen/ml en tripsien in 'n verhouding van 1:20 met SR proteïen. As kontrole is tripsieninhibeerder in 'n 4:1 verhouding tot tripsien by die reaksiemengsel gevoeg. Vertering is beëindig deur tripsieninhibeerder in dieselfde verhouding by te voeg. Die Ca^{2+} -opname van SSR (●) en CSR (▲) in afwesigheid van oksalaat is gedoen in 'n reaksiemengsel soos beskryf in Figuur 3.1. Die Ca^{2+} -opname van SSR (○) en CSR (×) in teenwoordigheid van oksalaat is gedoen in 'n reaksiemengsel soos beskryf in Figuur 3.3. Die Ca^{2+} -opnames voor vertering is as 100% geneem. Temperatuur 37°C . Hierdie figuur verteenwoordig die resultate van ses afsonderlike eksperimente.

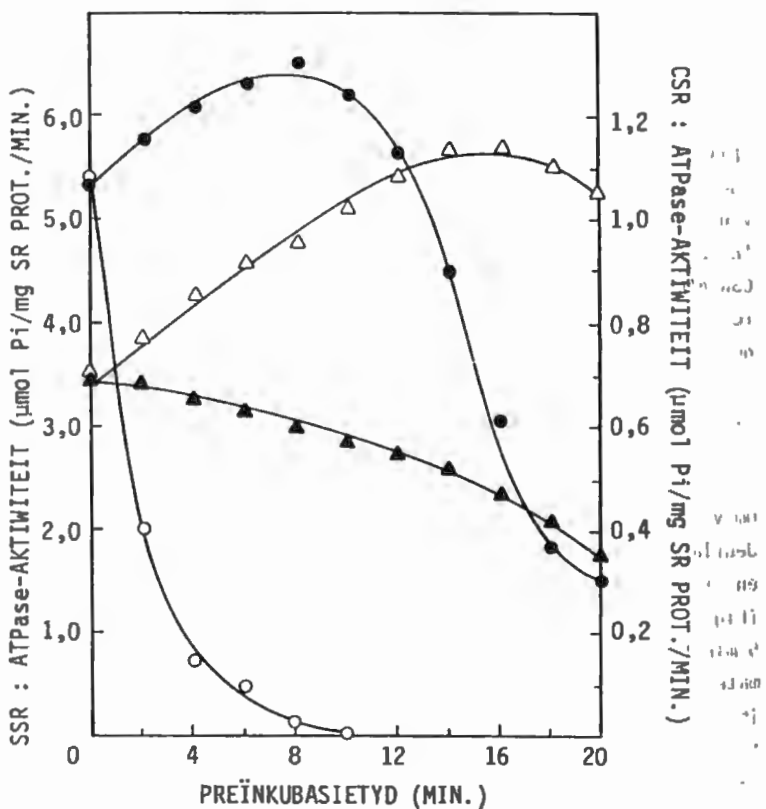


Figuur 3.6: Invloed van tripsienvertering op die ATPase-aktiwiteit van SSR en CSR. Tripsienvertering is gedoen in 'n reaksiemengsel soos beskryf in Figuur 3.5 behalwe dat die tripsien:proteïen verhouding 1:100 was. Die reaksiemengsel vir die bepaling van die ATPase-aktiwiteit het bestaan uit: 20 mM MOPS, pH 7,4; 120 mM KCl; 0,2 mM CaCl₂; 0,2 mM EGTA; 2,5 mM MgCl₂; 5 mM NaN₃; 2,5 mM ATP en 0,3 mg SR proteïen/ml. Temperatuur, 25°C. Die ATPase-aktiwiteit van SSR (●) en CSR (○) word getoon. Die ATPase-aktiwiteit voor vertering is as 100% geneem. Hierdie figuur verteenwoordig die resultate van vier afsonderlike eksperimente.



177
 100
 100
 100

Figuur 3.7: Effek van temperatuur op die SSR en CSR Ca²⁺-opname in teenwoordigheid van oksalaat. Die Ca²⁺-opname van SSR (○) en CSR (●) in teenwoordigheid van oksalaat is gedoen in 'n reaksiemengsel soos beskryf in Figuur 3.3. Hierdie figuur verteenwoordig die resultate van vier afsonderlike eksperimente.



Figuur 3.8: Effek van verskillende preïnkubasietye en preïnkubasietytemperatuur op die ATPase-aktiwiteit van SSR en CSR. Die reaksiemengsel is geïnkubeer totdat dit die gewenste temperatuur bereik het, voordat die SR bygevoeg is en die preïnkubasietyd begin is, gevolg deur die bepaling van die ATPase-aktiwiteit by dieselfde temperatuur. Reaksiemengsels soos beskryf in Figuur 3.6 is gebruik en die volgende reekse is gedoen: CSR by 45°C (Δ) en 50°C (○) en SSR by 45°C (Δ) en 50°C (●). Hierdie figuur verteenwoordig die resultate van vyf afsonderlike eksperimente.

3.2.2.2 Effek van verskillende preïnkubasietye en preïnkubasietemperatuur op die ATPase-aktiwiteit van SSR en CSR

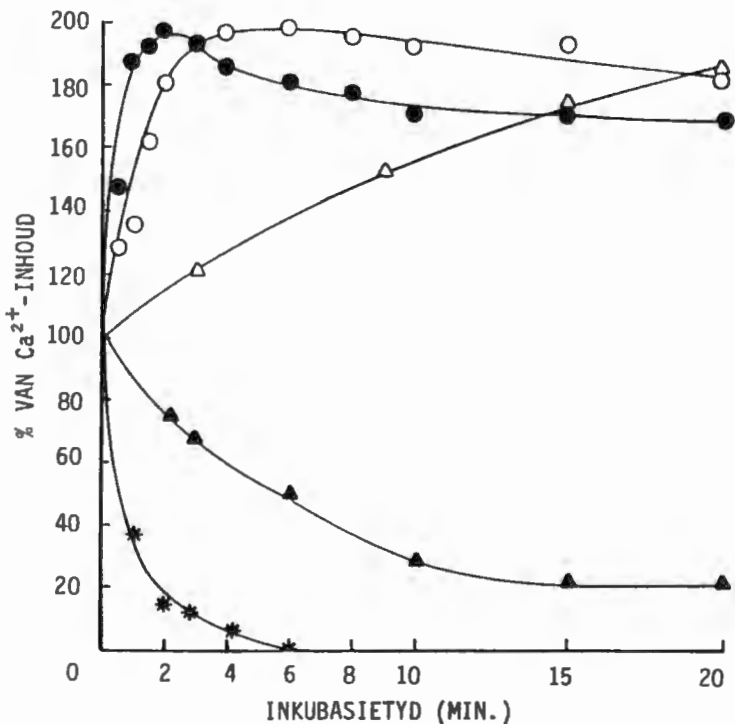
SSR en CSR vesikels is gepreïnkubeer by verskillende temperature en vir verskillende tye voordat die ATPase-aktiwiteit bepaal is by dieselfde temperatuur (Fig. 3.8). By 45 en 50°C het die preïnkubasietyd die ATPase-aktiwiteit van CSR baie meer drasties beïnvloed. By 45°C vertoon SSR ATPase-aktiwiteit 'n verhoogde aktiwiteit tot en met 'n preïnkubasietyd van 16 minute terwyl die CSR ATPase-aktiwiteit 'n daling toon. By 50°C neem die SSR ATPase-aktiwiteit toe tot met 'n preïnkubasietyd van 8 minute waarna dit skerp daal. By 50°C neem die CSR ATPase-aktiwiteit onmiddellik af sodra die preïnkubasie begin.

3.2.2.3 Effek van verskillende temperature op die Ca^{2+} -inhoud van SSR vesikels gelaai met Ca^{2+} in die afwesigheid en teenwoordigheid van oksalaat

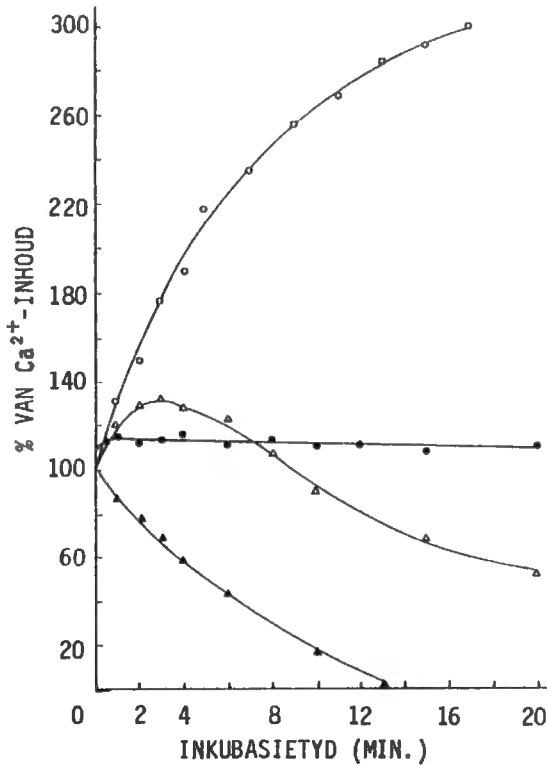
Om vas te stel wat die effek van verhoogde temperatuur op die SSR membraan-deurlaatbaarheid is, is SSR vesikels gelaai met Ca^{2+} by 25°C in teenwoordigheid en afwesigheid van oksalaat en daarna blootgestel aan 40°C, 45°C en 50°C (Fig. 3.9). SSR vesikels is gelaai in afwesigheid van oksalaat by 25°C vir 5 minute en 'n lading van 152 nmol Ca^{2+} /mg SR proteïen is bereik. Nadat die mate van lading bepaal is, is die temperatuur binne 1 minuut verhoog na 40°C, 45°C of 50°C. Verdere inkubasie by 40°C het tot gevolg gehad dat die Ca^{2+} -inhoud van die SSR vesikel toeneem. Inkubasie by 45°C het 'n geleidelike verlies aan Ca^{2+} tot gevolg en na 20 minute is die Ca^{2+} -inhoud van die vesikels slegs 20%. Inkubasie by 50°C het tot gevolg gehad dat die Ca^{2+} baie vinnig uit die vesikels beweeg het en na 6 minute het alle Ca^{2+} uitbeweeg. In die teenwoordigheid van oksalaat is die SSR vesikels gelaai vir 10 minute by 25°C en 'n lading van 5120 nmol Ca^{2+} /mg SR proteïen is bereik. Inkubasie by 40°C het binne 4 minute gelei tot 'n verdere opname van Ca^{2+} waarna die Ca^{2+} -inhoud van die vesikels 'n geringe afname toon tot op 20 minute. Inkubasie by 50°C het ook 'n vinnige opname van Ca^{2+} tot gevolg maar na 2 minute begin die geleidelike afname reeds.

3.2.2.4 Effek van verskillende temperature op die Ca^{2+} -inhoud van CSR vesikels gelaai met Ca^{2+} in die afwesigheid en teenwoordigheid van oksalaat

Die effek van verhoogde temperatuur op die CSR membraan-deurlaatbaarheid is vasgestel deur die CSR vesikels met Ca^{2+} te laai by 25°C in teenwoordigheid



Figuur 3.9: Effek van verskillende temperature op die Ca^{2+} -inhoud van SSR vesikels gelaai met Ca^{2+} in die afwesigheid en teenwoordigheid van oksalaat. Die vesikels is gelaai sonder oksalaat by 25°C vir 5 minute in 'n reaksiemengsel soos beskryf in Figuur 3.1 behalwe dat die CaCl_2 en EGTA-konsentrasies na $0,1 \text{ mM}$ verhoog is. Na lading is die temperatuur vinnig ($< 1 \text{ min}$) verhoog na 40°C (Δ), 45°C (\blacktriangle) of 50°C (\bullet) en die Ca^{2+} -inhoud van die vesikels is bepaal oor 'n periode van 20 minute. In die teenwoordigheid van oksalaat is die vesikels gelaai by 25°C vir 10 minute in 'n reaksiemengsel soos beskryf in Figuur 3.3. Na lading is die temperatuur vinnig verhoog na 40°C (O) of 50°C (\bullet). Die mate van lading by 25°C is as 100% geneem. Hierdie figuur verteenwoordig die resultate van vier afsonderlike eksperimente.



Figuur 3.10: Effek van verskillende temperature op die Ca²⁺-inhoud van CSR vesikels gelaai met Ca²⁺ in die afwesigheid en teenwoordigheid van oksalaat. Die vesikels is gelaai sonder oksalaat by 25°C vir 5 minute in 'n reaksiemengsel soos beskryf in Figuur 3.1 behalwe dat die CaCl₂ en EGTA-konsentrasies na 0,1 mM verhoog is. Na lading is die temperatuur vinnig (<1 min) verhoog na 40°C (Δ) of 45°C (▲) en die Ca²⁺-inhoud van die vesikels is bepaal oor 'n periode van 20 minute. In die teenwoordigheid van oksalaat is die vesikels gelaai by 25°C vir 10 minute in 'n reaksiemengsel soos beskryf in Figuur 3.3. Na lading is die temperatuur vinnig verhoog na 40°C (○) of 50°C (●). Die mate van lading by 25°C is as 100% geneem. Hierdie figuur verteenwoordig die resultate van vier afsonderlike eksperimente.

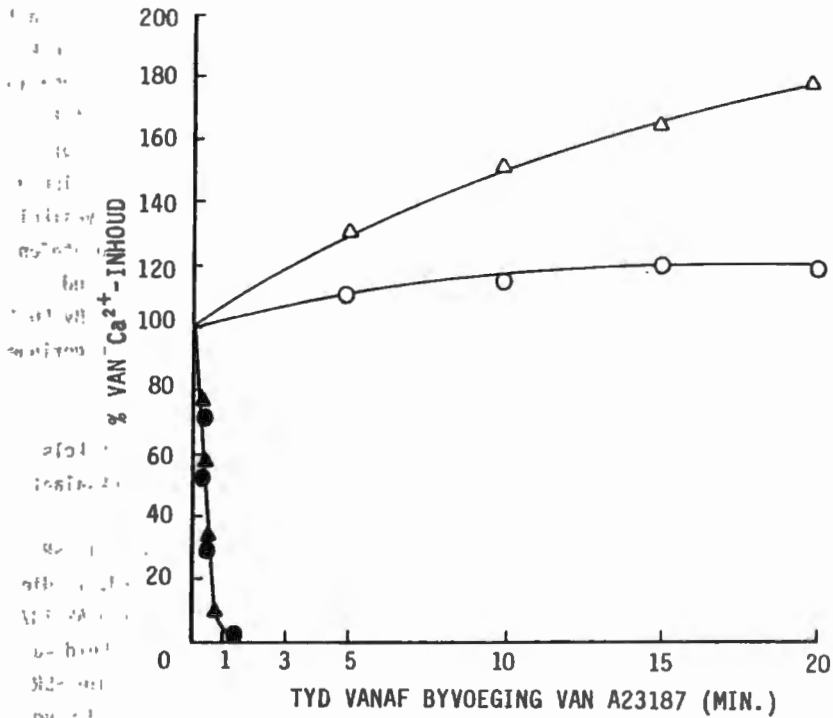
en afwesigheid van oksalaat en die vesikels daarna bloot te stel aan 40°C, 45°C en 50°C (Fig. 3.10). CSR vesikels is gelaai in afwesigheid van oksalaat by 25°C vir 5 minute en 'n lading van 45 nmol Ca²⁺/mg SR proteïen is bereik. Hierna is die temperatuur binne 1 minuut verhoog tot 40°C of 45°C. Inkubasie by 40°C het 'n aanvanklike toename in Ca²⁺-inhoud van die CSR vesikel tot gevolg maar na 3 minute begin die Ca²⁺-inhoud daal tot op 50% van die oorspronklike lading. By 45°C daal die Ca²⁺-inhoud van die CSR vesikels vinnig tot 0% na 13 minute. In die teenwoordigheid van oksalaat is die CSR vesikels gelaai vir 10 minute by 25°C en 'n lading van 2 109 nmol Ca²⁺/mg SR proteïen is bereik. Nadat die temperatuur verhoog is na 40°C het die Ca²⁺-inhoud vinnig toegeneem tot hoër as 300% van die oorspronklike Ca²⁺-inhoud. By 50°C het die Ca²⁺-inhoud van die CSR vesikels taamlik konstant gebly na 'n geringe aanvanklike toename.

3.2.2.5 Effek van 25 µM A23187 op die Ca²⁺-inhoud van SSR en CSR vesikels gelaai met Ca²⁺ in die afwesigheid en teenwoordigheid van oksalaat

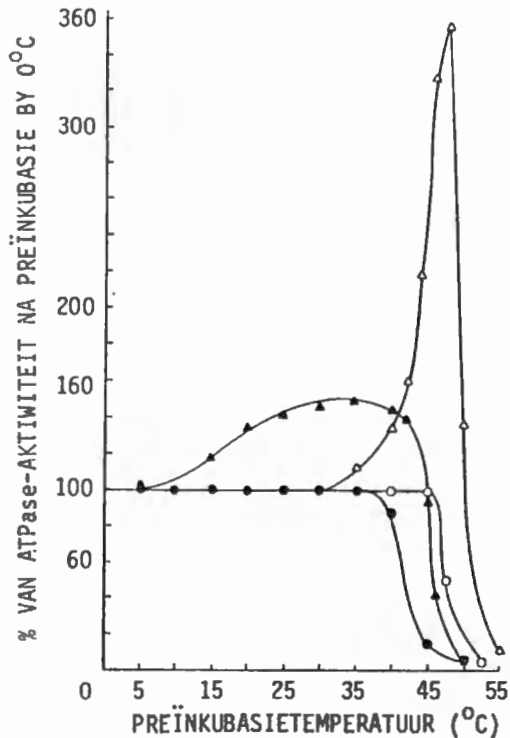
In 'n poging om vas te stel of Ca²⁺ in teenwoordigheid van oksalaat die SR vesikel kan verlaat, indien die vesikeldeurlaatbaarheid verhoog word, is die Ca²⁺-ionofoor A23187 by gelaai vesikels gevoeg (Fig. 3.11). Indien A23187 by SSR en CSR vesikels gevoeg word wat met Ca²⁺ gelaai is in afwesigheid van oksalaat, beweeg alle Ca²⁺ uit die vesikels binne enkele sekondes. Die SSR vesikels wat gelaai is in teenwoordigheid van oksalaat, se Ca²⁺-inhoud styg tot 118% nadat A23187 bygevoeg is en die CSR inhoud styg tot 176%. Die mate van lading van SSR in teenwoordigheid van oksalaat is 5 034 nmol Ca²⁺/mg proteïen en in afwesigheid van oksalaat 159 nmol Ca²⁺/mg proteïen. Die ooreenstemmende waardes vir CSR is 1 940 nmol Ca²⁺/mg proteïen en 42 nmol Ca²⁺/mg proteïen.

3.2.2.6 Effek van preïnkubasiestemperatuur op die membraandeurlaatbaarheid van SSR en CSR

'n Vergelykende studie van die effek van temperatuur op die membraandeurlaatbaarheid van SSR en CSR is gedoen deur die SR vesikels bloot te stel aan verskillende preïnkubasiestemperature (Fig. 3.12). Die ATPase-aktiwiteit verhoog indien die vesikelmembraan meer deurlaatbaar word en kan dus as maatstaf gebruik word om die membraandeurlaatbaarheid te monitor.



Figuur 3.11: Effek van 25 μM A23187 op die Ca^{2+} -inhoud van SSR en CSR vesikels gelaai met Ca^{2+} in die afwesigheid en teenwoordigheid van oksalaat. Die SSR vesikels (●) en CSR vesikels (▲) is gelaai sonder oksalaat by 25°C vir 5 minute in 'n reaksiemengsel soos beskryf in Figuur 3.1 behalwe dat die CaCl_2 en EGTA-konsentrasies na 0,1 mM verhoog is. SSR vesikels (○) en CSR vesikels (△) is ook in teenwoordigheid van oksalaat gelaai by 25°C vir 10 minute in 'n reaksiemengsel soos beskryf in Figuur 3.3. Nadat die mate van lading bepaal is, is 25 μM A23187 by die reaksiemengsel gevoeg en die Ca^{2+} -inhoud van die vesikels bepaal oor 'n periode van 20 minute. Temperatuur 25°C. Die mate van lading voordat A23187 bygevoeg is, is as 100% geneem. Hierdie figuur verteenwoordig die resultate van vier afsonderlike eksperimente.



Figuur 3.12: Effek van preïnkubasietemperaatur op die membraandeurlaatbaarheid van SSR en CSR. Die ATPase-aktiwiteit is gebruik as parameter om die membraandeurlaatbaarheidsveranderinge te monitor. Die SR vesikels is vir 10 minute gepreïnkubeer by verskillende temperature in 'n reaksiemengsel soos beskryf in Figuur 3.6. Na 10 minute preïnkubasie is die temperatuur verander na 25°C en die reaksie begin deur die byvoeging van 2,5 mM ATP. Die ATPase-aktiwiteit van SSR (Δ) en CSR (▲) in afwesigheid van A23187 word getoon asook die SSR (○) en CSR (●) ATPase-aktiwiteit bepaal in teenwoordigheid van 10 μM A23187. Die ATPase-aktiwiteit van elke reeks na preïnkubasie by 0°C is as 100% geneem. Hierdie figuur verteenwoordig die resultate van ses afsonderlike eksperimente.

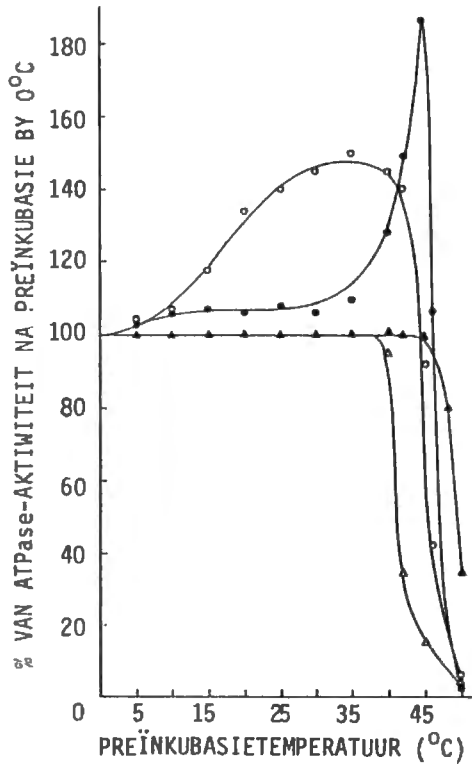
Indien die Ca^{2+} -ionofoor A23187 by die reaksiemengsel gevoeg word het die verskillende preïnkubasiestemperature geen addisionele effek op die ATPase-aktiwiteit nie. Die ionofoor het dus die membraan ten volle deurlaatbaar vir Ca^{2+} gemaak. Uit die figuur is dit duidelik dat die SSR ATPase by 'n hoë temperatuur (45°C) nog funksioneel bly terwyl CSR ATPase-aktiwiteit begin afneem na blootstelling aan 40°C . In afwesigheid van A23187 begin die deurlaatbaarheid van die SSR membraan verhoog na blootstelling aan 30°C . Blootstelling van SSR aan temperature tussen 30° en 48°C het 'n drastiese toename in membraandeurlaatbaarheid en ATPase-aktiwiteit tot gevolg, waarna die ATPase-aktiwiteit skerp afneem as gevolg van denaturering. Die CSR vesikels toon reeds tekens van verhoogde deurlaatbaarheid by temperature laer as 25°C en denaturering van die ATPase tree ook vroeër in. Die SSR ATPase-aktiwiteit na preïnkubasie by 0°C is $3,8 \mu\text{mol Pi/mg proteïen/min}$. in teenwoordigheid van A23187 en $1,9 \mu\text{mol Pi/mg proteïen/min}$. in afwesigheid van A23187. Die ooreenstemmende waardes vir CSR is $0,489 \mu\text{mol Pi/mg proteïen/min}$. en $0,291 \mu\text{mol Pi/mg proteïen/min}$.

3.2.2.7 Invloed van rutheniumrooi op die temperatuur-geïnduseerde membraandeurlaatbaarheid van CSR

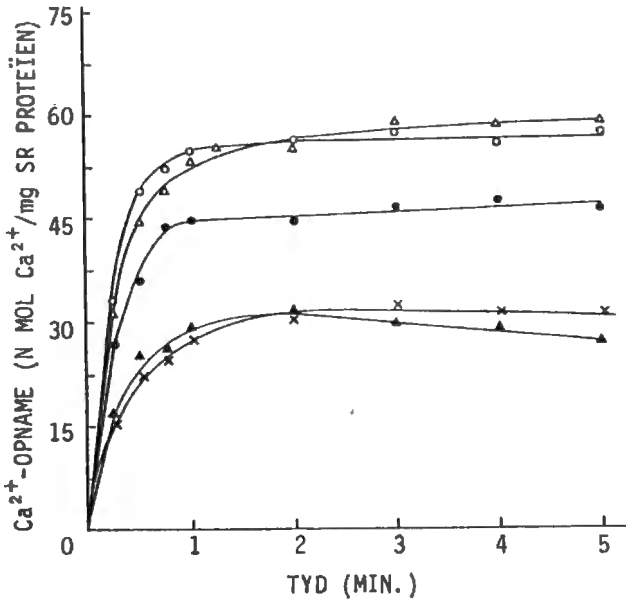
In 'n poging om die meganisme betrokke by temperatuur-geïnduseerde membraandeurlaatbaarheid te ondersoek, is gebruik gemaak van rutheniumrooi. CSR vesikels is gepreïnkubeer vir 10 minute by verskillende temperature waarna die ATPase-aktiwiteit bepaal is by 25°C (Fig. 3.13). Indien $10 \mu\text{M}$ A23187 by die CSR gevoeg word is die vesikels ten volle deurlaatbaar vir Ca^{2+} en geen toename in ATPase-aktiwiteit word verkry met preïnkubasie by hoë temperatuur nie.

Preïnkubering van CSR sonder enige toevoeging toon tekens van verhoogde deurlaatbaarheid by temperature laer as 25°C soos ook in Figuur 3.12 getoon. In teenwoordigheid van $60 \mu\text{M}$ rutheniumrooi word die deurlaatbaarheid by temperature laer as 35°C in 'n groot mate onderdruk, gevolg deur 'n skielike toename in deurlaatbaarheid tussen 35° en 45°C soos aangedui deur die skielike verhoging in ATPase-aktiwiteit. Hierdie skielike toename in deurlaatbaarheid stem baie ooreen met die reaksie van SSR op preïnkubasie by verskillende temperature soos getoon in Figuur 3.12.

In teenwoordigheid van $120 \mu\text{M}$ rutheniumrooi word die deurlaatbaarheid van die CSR membraan ten volle onderdruk en geen toename in ATPase-aktiwiteit word



Figuur 3.13: Invloed van rutheniumrooi op die temperatuur-geïnduseerde membraandeurlaatbaarheid van CSR. Die CSR vesikels is vir 10 minute gepreïnkubeer by verskillende temperature in 'n reaksiemengsel soos beskryf in Figuur 3.6. Na 10 minute preïnkubasie is die temperatuur verander na 25°C en die reaksie begin deur die byvoeging van 2,5 mM ATP. Die ATPase-aktiwiteit van die volgende reekse word getoon: CSR sonder enige toevoegings (○); CSR met 10 μM A23187 (Δ); CSR met 60 μM rutheniumrooi (●) en CSR met 120 μM rutheniumrooi (▲). Die ATPase-aktiwiteit van elke reeks na preïnkubasie by 0°C is as 100% geneem. Hierdie figuur verteenwoordig die resultate van sewe afsonderlike eksperimente.



Figuur 3.14: Invloed van rutheniumrooi op die temperatuur-geïnduseerde onderdrukking van CSR Ca^{2+} -opname. CSR vesikels is vir 10 minute gepreïnkubeer by 45°C in 'n reaksiemengsel soos beskryf in Figuur 3.1 behalwe dat die CaCl_2 en EGTA-konsentrasies na $0,1 \text{ mM}$ verhoog is. Na preïnkubasie is die temperatuur vinnig verander na 25°C en by die reekse waar rutheniumrooi gebruik is, is $120 \mu\text{M}$ rutheniumrooi bygevoeg. $400 \mu\text{M}$ nupercaine is reeds voor preïnkubasie by die een reeks gevoeg. Die Ca^{2+} -opname is onmiddelik na preïnkubasie begin deur die byvoeging van $2,5 \text{ mM}$ ATP. Die volgende reekse word getoon: geen preïnkubasie of rutheniumrooi (●); geen preïnkubasie plus $120 \mu\text{M}$ rutheniumrooi (○); preïnkubasie sonder rutheniumrooi (Δ); preïnkubasie plus $120 \mu\text{M}$ rutheniumrooi (Δ) en preïnkubasie plus $400 \mu\text{M}$ nupercaine (X). Hierdie figuur verteenwoordig die resultate van vyf afsonderlike eksperimente.

verkry nie. Die rutheniumrooi is in alle gevalle waar dit gebruik is eers na preïnkubasie by die reaksiemengsel gevoeg. Die CSR ATPase-aktiwiteit na preïnkubasie by 0°C is 0,489 $\mu\text{mol Pi/mg proteïen/min.}$ in teenwoordigheid van A23187 en 0,293 $\mu\text{mol Pi/mg proteïen/min.}$ in afwesigheid van A23187. Die temperatuur-geïnduseerde membraandeurlaatbaarheidsveranderinge by SSR vesikels kan nie herstel word deur die byvoeging van rutheniumrooi nie (Resultate nie getoon). Konsentrasies van tot 1 mM rutheniumrooi is gebruik.

3.2.2.8 Invloed van rutheniumrooi op die temperatuur-geïnduseerde onderdrukking van CSR Ca^{2+} -opname

Rutheniumrooi is na preïnkubasie by die reaksiemengsel gevoeg om vas te stel of dit die vermoë van die CSR om Ca^{2+} op te neem, na preïnkubasie by 45°C sou herstel (Fig. 3.14). Nupercaine is ook bygevoeg om die moontlike rol wat endogene fosfolipase tydens preïnkubasie kan speel te ondersoek. Die teenwoordigheid van 120 μM rutheniumrooi het die Ca^{2+} -opname van CSR, wat nie by 45°C gepreïnkubeer is nie, met 25% verhoog. Preïnkubasie vir 10 minute by 45°C het 'n daling van 35% in die Ca^{2+} -opname van die CSR vesikels tot gevolg. Die byvoeging van 120 μM rutheniumrooi na preïnkubasie herstel die vermoë van CSR om Ca^{2+} op te neem en in die vesikel te hou, volledig. Die byvoeging van 400 μM nupercaine het geen effek op die temperatuur-geïnduseerde onderdrukking van Ca^{2+} -opname nie.

3.3 Bespreking

3.3.1 Meganisme van onstabilditeit van CSR

Die mees opvallende verskil tussen die stabiliteit van SSR en CSR is die vinnige afname in die Ca^{2+} -opname van CSR tydens veroudering. Die CSR Ca^{2+} -opname in afwesigheid van oksalaat daal binne een tot vier dae met 50% (Carsten, 1964; Scales & McIntosh, 1968; Pretorius et al., 1969). Navorsingsresultate wat onder sekere toestande verkry is kan nadelig beïnvloed word deur die onstabilditeit van die CSR. Dit is dus belangrik dat die oorsake van die onstabilditeit vasgestel word en dat die stabiliteit verbeter word. Twee faktore wat tot die onstabilditeit van CSR preparate kan bydra is oksidasie en die teenwoordigheid van proteolitiese ensieme. Proteolitiese ensieme afkomstig van lisosome kan moontlik tydens die bereidingsproses vrygestel word.

Om oksidasie te beperk is twee anti-oksidante naamlik gebutileerde hidroksitolueen (BHT) en ditiotreitool (DTT) gebruik. Fenielmetielsulfonielfluoried (PMSF) is gebruik om die effek van kontaminerende proteolitiese ensieme uit te skakel. BHT en PMSF is onoplosbaar in water en is in etanol opgelos. Die maksimale etanolkonsentrasie in die reaksiemengsel is onder 4% gehou en het slegs 'n geringe effek op die reaksie gehad. Op grond van die dosis-responskrommes in Figuur 3.1 is 1 mM as optimale konsentrasie vir al drie die reagentse aanvaar en by verdere eksperimente gebruik. Dit is ook duidelik dat BHT 'n addisionele stimulerende effek op Ca^{2+} -opname het.

Die onstabiliteit van CSR word in Figuur 3.2 bevestig en na slegs 4 dae het die Ca^{2+} -opname van CSR gestoor sonder enige byvoeging gedaal met 50%. In teenwoordigheid van 1 mM PMSF het die Ca^{2+} -opname na 4 dae gedaal met 30% en vergelyking met die 12-15% daling in teenwoordigheid van 'n anti-oksidant. Beide oksidasie en proteolise dra dus by tot die onstabiliteit van CSR maar oksidasie lewer die grootste bydrae tot die daling in Ca^{2+} -opname tydens veroudering.

Die Ca^{2+} -opname van CSR is baie meer onstabiel as die ATPase-aktiwiteit (Carstan, 1964) en by beide SSR en CSR preparate daal die ATPase-aktiwiteit oor 'n tydperk van 7 dae glad nie (Resultate nie getoon). Die veroudering van CSR het dus ont koppeling van die ATPase-aktiwiteit en Ca^{2+} transport tot gevolg wat waarskynlik plaasvind as gevolg van deurlaatbaarheidsveranderinge van die CSR membraan.

Om die molekulêre meganisme van oksidasie en die mate van deurlaatbaarheid van verouderde CSR membrane te ondersoek is Ca^{2+} -opname gedoen in teenwoordigheid en afwesigheid van oksalaat (Fig. 3.3). Dit is duidelik dat Ca^{2+} -opname in teenwoordigheid van oksalaat baie meer stabiel is as Ca^{2+} -opname sonder oksalaat. Die Ca^{2+} -opname in teenwoordigheid van oksalaat vertoon dieselfde stabiliteit as die CSR wat gestoor is in teenwoordigheid van 'n anti-oksidant. Dit dui daarop dat die tempo van Ca^{2+} -opname relatief konstant bly maar dat die kapasiteit van die vesikels afneem. Die vrye Ca^{2+} in die vesikel kan dus gereedlik uit die vesikel lek. Indien oksalaat teenwoordig is presipiteer die Ca^{2+} as kalsiumoksalaat neer in die vesikel. Die deurlaatbaarheid van die membraan is ook nie so verhoog dat die kalsiumoksalaat die vesikel kan verlaat nie. Dit wil dus voorkom dat die lipied en/of proteïen deel van die membraan deur oksidasie beskadig word en vrye Ca^{2+} kan uitlek sonder om die ATPase-aktiwiteit te benadeel. Die 12-15% afname in Ca^{2+} -opname, wat tydens veroudering in teenwoordigheid van 'n anti-oksidant verkry word, is moontlik die

oorsaak van ander faktore soos die teenwoordigheid van vrye vetsure in die preparaat.

Indien die proteïen en lipied samestelling van SSR en CSR membrane met mekaar vergelyk word is dit duidelik dat daar kwalitatiewe en kwantitatiewe verskille bestaan. Elektroforese ondersoeke van CSR membrane het aangetoon dat die relatiewe konsentrasie van ATPase in die CSR membraan laer is as in die SSR membraan en dat daar verskeie ander proteïene voorkom (Campbell *et al.*; 1983). Die konsentrasie van ATPase in die CSR membraan is al so laag as 8% van die totale proteïeninhoud gerapporteer (Dux & Martonosi, 1984) maar ons beraming is tussen 20-25% van die totale proteïeninhoud. Die ATPase inhoud van SSR is veel hoër naamlik 70-90% (Malan *et al.*, 1975). Die lipied:proteïenverhouding van SSR en CSR verskil grootliks van mekaar (Ffig. 3.4). Die lipied:proteïenverhouding van SSR is 35:65 en die van CSR 55:45. Die CSR membraan bevat dus baie meer lipiede as die SSR membraan en dit verhoog die moontlikheid van oksidatiewe beskadiging van veral die onversadigde vetsure in die CSR membraan.

Volgens Borchman *et al.* (1982) wissel die fosfolipied:cholesterolverhouding van die SR van verskillende tipes skeletspier tussen 6,0 en 12,0 en volgens Owens *et al.* (1973) is dieselfde verhouding vir CSR 9,0. Tydens hierdie ondersoek is daar bevind dat die cholesterolinhoud van CSR (0,069 mg/mg proteïen) drie keer hoër is as in SSR (0,02 mg/mg proteïen). Dit dui daarop dat die fosfolipiedinhoud van CSR ook baie hoër is as in SSR. Indien die lipiede van SR membrane deur fosfolipase A-behandeling beskadig word verhoog die deurlaatbaarheid van die vesikels en vind ont koppeling van ATPase-aktiwiteit en Ca^{2+} -opname plaas (Fiehn & Hasselbach, 1970; Ng & Howard, 1980). Daar is dus groot ooreenkomste tussen die beskadiging van die lipiede deur fosfolipase A en die effek van oksidasie tydens veroudering van CSR. As gevolg van die hoë lipiedinhoud van CSR membrane is die oksidasie van lipiede waarskynlik die groot oorsaak van die onstabiliteit van CSR preparate.

3.3.2 Invloed van proteolitiese vertering op die funksionering van SSR en CSR

Tripsienvertering is gebruik om die struktuur en funksionering van SSR en CSR met mekaar te vergelyk. Die blootstelling van die SR membraan aan tripsienvertering kan meer lig werp op die liging van die funksionele dele van die ATPase proteïen in die membraan. Die hoër sensitiwiteit van die CSR vir eksterne veranderinge dui daarop dat die CSR ATPase se funksionele dele moontlik nader aan die oppervlak van die membraan geleë is of meer beskikbaar is

vir beskadiging. Die invloed van tripsienvertering op die funksionering van CSR, kan ook as model gebruik word om die bydrae van proteolitiese ensieme tot die onstabiliteit van CSR, te ondersoek.

In Figuur 3.5 word getoon dat die Ca^{2+} -opname van CSR in teenwoordigheid en afwesigheid van oksalaat, meer gereël deur tripsienvertering benadeel word. Die ATPase-aktiwiteit van CSR word ook baie makliker deur tripsienvertering onderdruk (Fig. 3.6). Nadat CSR vir 15 minute blootgestel is aan tripsienvertering is die ATPase-aktiwiteit slegs 43% van die aktiwiteit voor vertering in vergelyking met die 84% van SSR. Dit is dus duidelik dat die SSR ATPase proteïene baie beter beskerm is in die membraan en dat die funksionele dele van die CSR ATPase gouer beskadig word deur proteolitiese vertering. Hierdie hoër sensitiwiteit van die CSR ATPase kan verklaar word indien die CSR ATPase proteïene se funksionele dele meer oppervlakkig geleë is of indien die lipiedannulus van die CSR ATPase van so 'n aard is dat die ATPase meer blootgestel is aan vertering.

Die temperatuur waarby vertering plaasvind het 'n groot invloed op die mate van vertering (Saito *et al.*, 1984; Blazyk *et al.*, 1985). 'n Meer vloeibare annulus het tot gevolg dat die ATPase proteïene meer toeganklik is vir tripsienvertering (Blazyk *et al.*, 1985). Die moontlikheid bestaan dus dat die lipiedannulus van die CSR ATPase meer vloeibaar is by lae temperature as die annulus van die SSR ATPase. Die CSR ATPase word dus minder beskerm en is meer toeganklik vir eksterne faktore wat die funksionele dele kan beskadig.

Dit is opvallend dat die Ca^{2+} -opname in teenwoordigheid van oksalaat, van beide SSR en CSR, meer sensitief is vir vertering as die Ca^{2+} -opname in afwesigheid van oksalaat (Fig. 3.5). Die tempo van Ca^{2+} -opname word dus meer nadelig getref deur tripsienvertering as die kapasiteit van die SR vesikels. Beskadiging van die ATPase proteïene lei dus tot minder effektiewe transport van Ca^{2+} , eerder as tot verhoogde membraandeurlaatbaarheid. Die invloed van proteolitiese vertering op die CSR funksionering verskil dus van die effek van veroudering op die CSR. Tydens veroudering verhoog die membraandeurlaatbaarheid van die CSR sonder veel invloed op die transport van Ca^{2+} . Hierdie resultate bevestig die bevinding dat proteolitiese ensieme 'n ondergeskikte rol by die onstabiliteit van CSR preparate speel.

3.3.3 Temperatuur-geïnduseerde membraandeurlaikbaarheidsveranderinge van SSR en CSR

SSR en CSR Ca^{2+} -opname in teenwoordigheid van oksalaat vertoon optimale temperatuur van 45°C en $42-43^{\circ}\text{C}$ respektiewelik (Fig. 3.7). Die teenwoordigheid van oksalaat verhoed dat Ca^{2+} na opname uit die vesikel kan beweeg en die kurwes verteenwoordig dus die tempo van Ca^{2+} -opname. Die maksimale Ca^{2+} -opnametempo van SSR en CSR verskil met 'n faktor van 5 wat ooreenstem met die bevindinge van Pretorius (1972). Dit dui op kwantitatiewe verskille tussen SSR en CSR ATPase. In die literatuur word die ATPase-inhoud van die CSR membraan so laag as 8% van die totale proteïeninhoud geskat (Dux & Martonosi, 1984). Tydens vorige studies in hierdie laboratorium is met behulp van elektroforese bepalinge vasgestel dat die CSR ATPase-inhoud nader aan 20-25% van die totale proteïen is in vergelyking met die 70-90% van die SSR ATPase (Resultate nie getoon). Die laer Ca^{2+} -opnametempo van CSR kan dus deur kwantitatiewe verskille verklaar word.

Preïnkubasie van SSR en CSR by die optimale temperatuur (45°C) en hoër (50°C) toon egter dat die ATPase-aktiwiteit van SSR en CSR baie verskillend reageer (Fig. 3.8). Die CSR ATPase is meer sensitief vir hoër temperature en word selfs beskadig by 45°C indien die preïnkubasie lank genoeg duur. In vergelyking hiermee stimuleer die hoër temperatuur aanvanklik die SSR ATPase-aktiwiteit en denaturering begin eers op 'n later stadium intree. Alhoewel die optimale temperatuur vir SSR en CSR Ca^{2+} -opname in teenwoordigheid van oksalaat baie dieselfde is, is die blootstellingstydperk vir CSR krities. Dit mag daarop dui dat die oriëntasie van die CSR ATPase in die membraan verskil van dié van SSR ATPase of dat die CSR lipiedannulus om die ATPase proteïen, nie dieselfde beskerming bied teen hoër temperature as die SSR lipiedannulus nie.

Die aanvanklike stimulasie van die SSR ATPase-aktiwiteit deur die hoër temperatuur kan verklaar word deur die membraandeurlaikbaarheidsveranderinge wat by hoër temperature voorkom. Om vas te stel of daar wel 'n uitlek van Ca^{2+} plaasvind, is SSR en CSR met Ca^{2+} gelaai en daarna blootgestel aan verskillende temperature (Fig. 3.9 + 3.10). Uit die betrokke figure is dit duidelik dat die Ca^{2+} -inhoud van SSR en CSR vesikels by 45°C , in afwesigheid van oksalaat, daal.

In teenwoordigheid van oksalaat daal die inhoud van die SR vesikels nie maar addisionele Ca^{2+} word opgeneem by die hoër temperature. Die SSR Ca^{2+} -inhoud

bereik gou weer 'n nuwe ewewigsvlak maar die CSR is instaat om by 40°C vir 'n langer tydperk nog Ca^{2+} op te neem. Dit kan moontlik verklaar word deur kleiner hoeveelhede ATPase proteïene wat in die CSR membraan voorkom en dus langer neem om die ewewigsvlak te bereik.

Indien die effek van hoë temperatuur op die Ca^{2+} -inhoud van die vesikels in teenwoordigheid en afwesigheid van oksalaat met mekaar vergelyk word, is dit duidelik dat indien oksalaat teenwoordig is, die Ca^{2+} -inhoud van die vesikels nie afneem nie. Die deurlaatbaarheidsveranderinge wat as gevolg van die hoë temperatuur ontstaan is dus van so 'n aard dat vrye Ca^{2+} kan deurbeweg maar nie kalsiumoksalaat nie. Dit stem ooreen met die toestand wat verkry word indien die SR vesikels deurlaatbaar gemaak word deur die byvoeging van 'n Ca^{2+} -ionofoor (Fig. 3.11). Die totale Ca^{2+} -inhoud van beide SSR en CSR, verjaat die vesikels binne sekondes nadat A23187 by die reaksiemengsel gevoeg is in afwesigheid van oksalaat. Die A23187 het egter geen uitbeweg van Ca^{2+} tot gevolg by die kalsiumoksalaat gelaaië vesikels nie. Die temperatuur-geïnduseerde membraandeurlaatbaarheidsveranderinge is dus nie die gevolg van die oopbreek van die vesikels nie, maar eerder die skepping van klein porieë of die beskadiging van bestaande kanale, byvoorbeeld die normale vrystellingskanale.

Om vas te stel by watter temperature die deurlaatbaarheidsveranderinge begin, is die ATPase-aktiwiteit van SSR en CSR as maatstaf gebruik (Fig. 3.12). Verhoogde membraandeurlaatbaarheid word gekenmerk deur 'n verhoogde ATPase-aktiwiteit aangesien 'n hoë Ca^{2+} -konsentrasiegradiënt nie oor die vesikels membraan kan opbou, en die hidrolise van ATP inhibeer nie. Indien daar 'n Ca^{2+} -ionofoor teenwoordig is, word ook geen verhoogde ATPase-aktiwiteit verkry met hoë temperature nie.

Temperature bo 30°C het SSR membraandeurlaatbaarheidsveranderinge tot gevolg. Dit stem ooreen met Millman (1980) se bevindinge. Die CSR toon reeds membraandeurlaatbaarheidsveranderinge by temperature laer as 25°C. Hierdie deurlaatbaarheidsveranderinge wat veroorsaak word deur preïnkubasie by temperature onder 25°C word waarskynlik gedeeltelik veroorsaak deur die blootstelling van die vesikels aan 25°C tydens die bepaling van die ATPase-aktiwiteit. Dit het tot gevolg dat die presiese temperatuur waarby CSR membraandeurlaatbaarheidsveranderinge begin, nie bepaal kan word nie. Dit is egter redelik seker dat dit onder 25°C begin. Die CSR membraan is dus baie sensitiewer vir verhoogde temperature as SSR.

In 'n poging om die meganisme betrokke by die temperatuur-geïnduseerde membraandeurlaatbaarheidsveranderinge te ondersoek is daar gebruik gemaak van rutheniumrooi. Rutheniumrooi is 'n bekende inhibeerder van Ca^{2+} -vrystelling deur Ca^{2+} -vrystellingskanale in SSR en CSR (Miyamoto & Racker, 1981; Chamberlain *et al.*, 1984). Gewoonlik word 10-20 μM rutheniumrooi gebruik om Ca^{2+} -vrystelling te onderdruk (Chamberlain *et al.*, 1984). Met 'n heelwat hoër rutheniumrooikonsentrasie naamlik 60 μM , maar met dieselfde rutheniumrooi:proteïenverhouding as Chamberlain *et al.* (1984), is 'n gedeeltelike herstel van die temperatuur-geïnduseerde membraandeurlaatbaarheidsveranderinge by CSR verkry (Fig. 3.13). Bo 35°C kan 60 μM rutheniumrooi nie die deurlaatbaarheidsveranderinge herstel nie en is 'n skerp toename in ATPase-aktiwiteit aanwesig. Hierdie skerp toename bo 35°C, is identies aan die reaksie van SSR vesikels op preïnkubasie by verskillende temperature soos getoon in Figuur 3.12. Die deurlaatbaarheidsveranderinge van CSR word egter ten volle opgehef deur 120 μM rutheniumrooi.

In Figuur 3.14 word getoon dat die onderdrukking van Ca^{2+} -opname deur preïnkubasie by 45°C ook deur 120 μM rutheniumrooi herstel word. Die deurlaatbaarheidsveranderinge wat deur 45°C veroorsaak word, word gedeeltelik herstel deur die temperatuur te verlaag na 25°C. In Figuur 3.10 is getoon dat inkubasie by 45°C tot gevolg het dat alle vrye Ca^{2+} die vesikel verlaat. Indien die vesikels egter na preïnkubasie by 45°C weer afgekoel word, kan dit weer 'n redelike hoeveelheid Ca^{2+} opneem (Fig. 3.14).

Dit is algemeen bekend dat sellulêre membrane soos plasmamembrane (Franson *et al.*, 1978), mitochondria (Cheah & Cheah, 1981) en endoplasmiese retikulum (Chien *et al.*, 1980) intrinsieke fosfolipase ensieme bevat. Die preïnkubasie van CSR membrane by 45°C kan dus membraan, beskadiging deur vrye vetsure, afkomstig van fosfolipase-aktiwiteit, tot gevolg hê (Fiehn & Hasselbach, 1970). Die byvoeging van nupercaine hidrochloried, 'n fosfolipase A-inhibeerder (Scarpa & Lindsay, 1972), het egter nie die verhoogde membraandeurlaatbaarheid van CSR tydens preïnkubasie by 45°C, verhoed nie (Fig. 3.14). Fosfolipase-aktiwiteit speel dus nie 'n rol by die membraandeurlaatbaarheidsveranderinge nie.

Die hoë rutheniumrooikonsentrasie (120 μM) wat gebruik is, het 'n afname van 20-25% in ATPase-aktiwiteit tot gevolg gehad (Resultate nie getoon). Dit is egter bekend dat SR membrane nie so sensitief vir rutheniumrooi is as ander membrane soos mitochondria nie (Howell, 1982). Dit word ook bevestig deur

die 25% toename in die Ca^{2+} -kapasiteit van CSR vesikels wat met $120 \mu\text{M}$ rutheniumrooi verkry is in Figuur 3.14.

Die $120 \mu\text{M}$ rutheniumrooi is veel hoër as die rutheniumrooikonsentrasies wat nodig is om Ca^{2+} -gestimuleerde Ca^{2+} -vrystelling te verhoed. Die beskadiging of blootlê van die kanale kan van so 'n aard wees dat meer rutheniumrooi benodig word, om die deurbeweg van Ca^{2+} te verhoed, as tydens Ca^{2+} -gestimuleerde Ca^{2+} -vrystelling. Die moontlikheid bestaan dus dat die hoë temperature die vrystellingskanale kan beskadig.

Die moontlikheid bestaan ook dat die temperatuur-geïnduseerde membraandeurlaatbaarheidsveranderinge, die gevolg is van nuwe porieë wat ontstaan in die membraan. Die meganisme waarvolgens rutheniumrooi hierdie effek kan herstel is onseker.

Aangesien $1 \mu\text{M}$ rutheniumrooi nie die SSR membraandeurlaatbaarheidsveranderinge by hoë temperature kan herstel nie, bestaan die moontlikheid dat die meganisme betrokke by temperatuur-geïnduseerde membraandeurlaatbaarheidsveranderinge by SSR verskil van die meganisme betrokke by CSR.

Indien Ca^{2+} -effluks of Ca^{2+} -vrystellings studies gedoen word, moet daar met groot versigtigheid gewerk word, sodat die SR vesikels nie vir lang tydperke by byvoorbeeld 37°C (Naylor & Dresel, 1984) geïnkubeer word nie. Die temperatuur-geïnduseerde membraandeurlaatbaarheidsveranderinge sal die resultate so verkry waardeloos maak.

HOOFSTUK 4

INVLOED VAN pH OP DIE SR

4.1 INLEIDING

Om die SR membraan te bestudeer, is dit nuttig om die membraan bloot te stel aan veranderinge aan die omgewing waarin die SR vesikels voorkom. Die reaksie van die SR op hierdie manipulasie kan dan nuttige inligting verskaf oor die struktuur en funksionering van die SR. Indien daar kwalitatiewe en kwantitatiewe verskille tussen SSR en CSR bestaan sou verwag kon word dat die reaksie van die SR membraan op die manipulasie verskillend sou wees. Een verandering wat aangebring kan word, is die pH van die reaksiemengsel.

Die effek van pH-verandering op ensieme, word algemeen gebruik tydens die karakterisering van ensieme (de Meis & Inesi, 1982). Ensieme is baie afhanklik van die pH en die optimale pH van elke ensiem bepaal in watter omgewing die ensiem effektief kan funksioneer. By die SR speel die H^+ 'n belangrike rol omdat dit waarskynlik betrokke is by die eksitasie-kontraksiekoppeling (Inesi, 1985). In 1970 het Nakamaru & Schwartz die moontlikheid dat die H^+ -konsentrasie die intrasellulêre Ca^{2+} -konsentrasie beheer, deur as boodskapper vir Ca^{2+} -vrystelling op te tree, begin ondersoek. In 1972 vind hulle dat 'n pH-verandering van 6,46 na 7,82 lei tot 'n vrystelling van 80-90 nmol Ca^{2+} /mg proteïen. Die geleiding van 'n depolarisasiegolf deur die intrasellulêre membraan kan dus gepaard gaan met 'n verandering in pH in die omgewing van die membraan. Die SR membraan is sensitief vir pH-veranderinge en dit het 'n verandering in die Ca^{2+} -deurlaatbaarheid tot gevolg (Nomura & Nakamaru, 1976; Dunnett & Nayler, 1979). Schneider & Chandler het reeds in 1973 gepostuleer dat protone 'n belangrike rol by die eksitasie-kontraksiekoppeling speel. Hulle het beweer dat gelaaiede groepe oor die T-buismembraan beweeg tydens depolarisasie en dan deur middel van die SR-voetjies Ca^{2+} -vrystelling veroorsaak.

Die belangrikheid van protone is deur Shoshan *et al.* (1981) bevestig. Hulle het gevind dat tydens Ca^{2+} -opname daar 'n H^+ -gradiënt oor die SR membraan ontstaan as gevolg van 'n uitruiling van Ca^{2+} en H^+ . Hulle beweer dat die handhawing van hierdie H^+ -gradiënt die Ca^{2+} -vrystellingskanale geslote hou. Indien Ca^{2+} -vrystelling plaasvind, sal die vrygestelde Ca^{2+} die kanaal sluit en sodoende toelaat dat die H^+ -gradiënt, as gevolg van die uitruiling van Ca^{2+} en H^+ , weer ontwikkel. Ca^{2+} -vrystelling is deur Shoshan *et al.* (1981) bewerk-

stellig deur die H^+ -gradiënt op te hef met die byvoeging van H^+ -ionofore in die reaksiemengsel. Tydens Ca^{2+} -opname vind daar dus uitruiling van Ca^{2+} en H^+ plaas (Inesi, 1985; Yamaguchi & Kanazawa, 1985). Die uitruiling vind waarskynlik plaas om 'n wanbelans van ladings oor die SR membraan te voorkom. Of hierdie uitruilingsproses siklies plaasvind en of dit noodsaaklik is vir die funksionering van die ATPase, is onseker.

Dit is dus duidelik dat H^+ -ione 'n baie belangrike rol tydens die normale funksionering van die SR speel en moontlik betrokke is by die oordrag van die depolarisasiegolf van die T-buis na die terminale sisternae (Schneider & Chandler, 1973), die prikkeling van die SR om Ca^{2+} -vrystelling te laat plaasvind (Nakamaru & Schwartz, 1972) en moontlik by die beheer van die Ca^{2+} -vrystellingskanale (Shoshan et al., 1981). H^+ is ook moontlik betrokke by die uitruiling met Ca^{2+} om die elektrogeniese effek van die Ca^{2+} -pomp te balanseer (Inesi, 1985). Daar bestaan egter nog baie onsekerhede en teenstrydighede in die literatuur oor die moontlike rol van H^+ -ione.

3.6.1.1

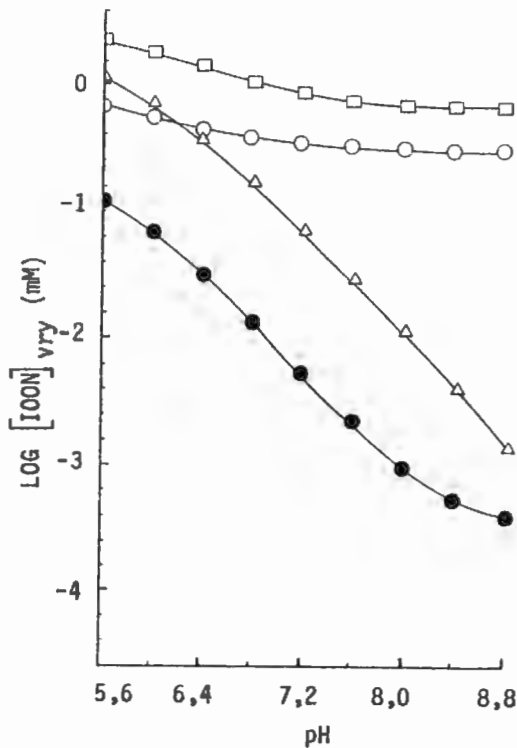
Verseke navorsers beweer dat die effek van pH-verandering op die SR te klein en te stadig is om 'n rol by eksitasie-kontraksiekoppeling te speel (Dunnet & Nayler, 1979; Endo, 1977; Fabiato & Fabiato, 1979b).

3.6.1.2

Die SR membraan is hoogs deurlaatbaar vir H^+ -ione (Inesi & Hill, 1983; Inesi, 1985; Yamaguchi & Kanazawa, 1985). As gevolg van hierdie H^+ -deurlaatbaarheid is dit onseker hoe dit moontlik is dat 'n H^+ -gradiënt, wat deur H^+ -ionofore opgehef kan word, oor die SR membraan kan ontstaan, soos beweer deur Shoshan et al. (1981).

3.6.1.3

Die optimale pH van SR Ca^{2+} -opname en ATPase-aktiwiteit soos gerapporteer in die literatuur varieër geweldig. Waardes wissel tussen pH 7,2-8,3 vir ATPase-aktiwiteit en pH 6,2-6,8 vir Ca^{2+} -opname (Carvalho & Leo, 1967; Nakamaru & Schwartz, 1970; Sreter, 1969; Tate et al., 1981). Dit is duidelik dat die optimale pH-grense vir Ca^{2+} -opname en die bepaling van die ATPase-aktiwiteit van mekaar verskil (Tate et al., 1981). Die ATPase vertoon dus verskillende optimale pH-waardes afhangende van die spesifieke proses waarby die ensiem betrokke is. Die funksionele betekenis van hierdie skeiding in optimale pH is onbekend maar dit is 'n aanduiding van die belangrike rol wat H^+ in die mikro-omgewing van die membraan speel.

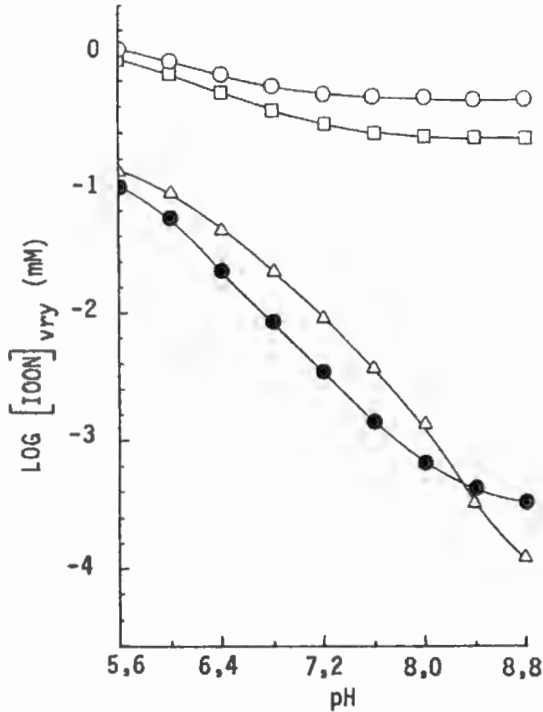


Figuur 4.1: Effek van pH op die vrye ioonkonsentrasies van Ca^{2+} , Mg^{2+} , EGTA en ATP in die standaard Ca^{2+} -opname reaksiemengsel. Reaksiemengsel: 20 mM Tris-maleaat of Tris-HCl; 120 mM KCl; 1 mM CaCl_2 ; 1 mM EGTA; 10 mM $\text{K}_2\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$; 2,5 mM MgCl_2 en 2,5 mM ATP. Die vrye ioonkonsentrasies is teoreties bereken met behulp van 'n rekenaarprogram wat ontwikkel is en die dissosiasiekonstantes van Fabiato & Fabiato (1979a) gebruik. Die volgende vrye ioonkonsentrasies word getoon: ATP (□); Mg^{2+} (○); EGTA (Δ) en Ca^{2+} (●).

Om hierdie leemtes en onsekerhede op te klaar, sal daar in die toekoms meer aandag aan die effek van H^+ op die SR en die karakterisering van die ATPase gegee moet word. Ander navorsing wat aandag geniet, is die rol van H^+ tydens toestande van isemie (Krause & Hess, 1984; Okabe et al., 1985) en ook konformasieveranderinge van die ATPase as gevolg van pH-veranderinge (Meltzer & Berman, 1984; Grassi de Gende & Alonso, 1985). Hierdie navorsing moet egter met groot versigtigheid aangepak word, aangesien die vrye Ca^{2+} -konsentrasie in die reaksiemengsel verander sodra die pH verander (Fabiato & Fabiato, 1979a). Hierdie verandering in vrye Ca^{2+} -konsentrasies kan een van die redes vir die teenstrydighede in die literatuur wees.

Indien die effek van verskillende H^+ -konsentrasies op die SR bepaal word, moet die reaksiemengsels dus telkens so verander word, dat die vrye Ca^{2+} -konsentrasie konstant bly. 'n Verandering aan die vrye Ca^{2+} -konsentrasie sal op sigself 'n invloed op die aktiwiteit van die SR hê (Vianna, 1975; Levitsky et al., 1981). Dit gebeur egter dikwels dat pH-studies gedoen word sonder om die gepaardgaande vrye Ca^{2+} -konsentrasieveranderinge in ag te neem (de Meis & Inesi, 1982; Shigekawa et al., 1976; Sreter, 1969).

Om die effek van pH-veranderinge op die vrye ioonkonsentrasies in reaksiemengsels te bepaal, is 'n teoretiese studie gedoen met behulp van Fabiato & Fabiato (1979a) se dissosiasiekonstantes en sakrekenaarprogram wat oorgeskryf is vir 'n Hewlett Packard 86 B-rekenaar. Die vrye ioonkonsentrasies van Ca^{2+} , Mg^{2+} , EGTA en ATP in die Ca^{2+} -opname reaksiemengsel is ondersoek (Fig. 4.1). Indien die pH van 5,6 verhoog word na 8,8 is daar relatief min verandering in die vrye konsentrasies van ATP en Mg^{2+} . Die vrye EGTA en Ca^{2+} -konsentrasies daal egter skerp. By pH 6,7 en 7,2 is die vrye Ca^{2+} -konsentrasie 10 μM en 3 μM respektiewelik. Dit is dus duidelik dat die vrye Ca^{2+} -konsentrasie in die Ca^{2+} -opname reaksiemengsel drasties verander indien die pH verander. Volgens Levitsky et al. (1981) is die optimale vrye Ca^{2+} -konsentrasie vir Ca^{2+} -opname 3-10 μM . Ca^{2+} -opnames word gewoonlik gedoen by pH 6,8 wat 'n vrye Ca^{2+} -konsentrasie van 7,9 μM in die Ca^{2+} -opname reaksiemengsel tot gevolg het. Die boonste grens van die optimale vrye Ca^{2+} -konsentrasie (10 μM) word by pH 6,7 bereik en indien die pH laer daal, het dit 'n skerp toename in vrye Ca^{2+} tot gevolg (80 μM Ca^{2+} by pH 5,6). Hoër vrye Ca^{2+} -konsentrasies het die vorming van CaATP-komplekse tot gevolg wat met MgATP kompeteer. Aangesien MgATP die substraat vir die ATPase ensiem van SR is, sal 'n toename van CaATP 'n inhiberende effek op die ATP-hidrolise uitoefen (Vianna, 1975). Die membraan se affiniteit vir CaATP is agt keer hoër as vir



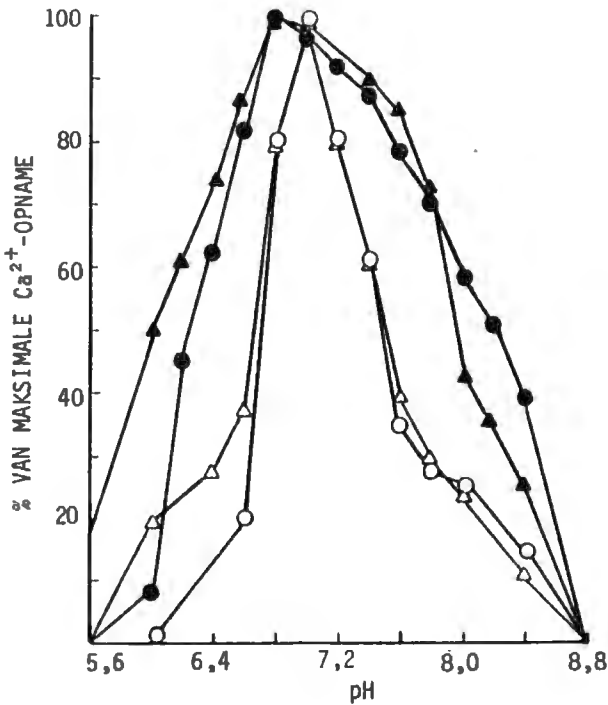
Figuur 4.2: Effek van pH op die vrye ioonkonsentrasies van Ca^{2+} , Mg^{2+} , EGTA en ATP in die standaard reaksiemengsel waarin die ATPase-aktiwiteit bepaal is. Reaksiemengsel: 20 mM Tris-maleaat of Tris-HCl; 120 mM KCl; 0,2 mM CaCl_2 ; 0,2 mM EGTA. 2,5 mM MgCl_2 ; 2,5 mM ATP en 5 mM NaN_3 . Die vrye ioonkonsentrasies is bereken met behulp van 'n rekenaarprogram wat ontwikkel is en die dissoiasiekonstantes van Fabiato & Fabiato (1979a) gebruik. Die volgende vrye ioonkonsentrasies word getoon: ATP (□); Mg^{2+} (○); EGTA (△) en Ca^{2+} (●).

MgATP en 'n toename in vrye Ca^{2+} -konsentrasies inhibeer die ATP-hidrolise en Ca^{2+} -opname dus baie vinnig (Vianna, 1975).

Indien die pH van die reaksiemengsel hoër styg as 7,2, daal die vrye Ca^{2+} -konsentrasie laer as $3 \mu\text{M}$. By pH 8,8 is die vrye Ca^{2+} -konsentrasie slegs $0,3 \mu\text{M}$. Die vrye Mg^{2+} -konsentrasie verander egter min indien die pH van die reaksiemengsel styg en by pH 8,8 is die vrye Mg^{2+} -konsentrasie $182 \mu\text{M}$. Daar is dus 'n groot oormaat vrye Mg^{2+} in die reaksiemengsel, indien dit vergelyk word met die vrye Ca^{2+} -konsentrasie. Die kompetisie tussen Mg^{2+} en Ca^{2+} inhibeer die tempo van fosfoproteïen vorming, ten spyte van die feit dat die SR se affiniteit vir Mg^{2+} drie keer laer is as vir Ca^{2+} (Vianna, 1975). Die Mg^{2+} verhoog ook die dissosiasiekonstante vir die passiewe binding van Ca^{2+} aan die SR (Vianna, 1975). Indien die pH van Ca^{2+} -opname reaksiemengsels dus onder 6,7 daal of hoër as 7,2 styg, kan die vrye Ca^{2+} -konsentrasies die Ca^{2+} -opname nadelig beïnvloed.

Die vrye ionkonsentrasies in die reaksiemengsel waarin die ATPase-aktiwiteit bepaal word, is ook onderhewig aan pH-veranderinge. 'n Teoretiese studie is uitgevoer om die effek van pH op die vrye konsentrasies van Ca^{2+} , Mg^{2+} , EGTA en ATP vas te stel (Fig. 4.2). Die vrye Mg^{2+} en ATP-konsentrasies het nie veel verander nie, terwyl die vrye EGTA en Ca^{2+} -konsentrasies baie verander met pH veranderinge. By pH 5,6 is die vrye Ca^{2+} -konsentrasie $100 \mu\text{M}$ en by pH 8,8 is dit $0,3 \mu\text{M}$. 'n Vrye Ca^{2+} -konsentrasie van $1-3 \mu\text{M}$ word verkry tussen pH 7,2 en 7,8 wat volgens Krause & Hess (1984) die optimale vrye Ca^{2+} -konsentrasie vir die bepaling van die ATPase-aktiwiteit is. Die ATPase-aktiwiteit word bepaal by pH 7,4 wat 'n vrye Ca^{2+} -konsentrasie van $2 \mu\text{M}$ in die reaksiemengsel tot gevolg het. Sodra die pH in die reaksiemengsel buite die pH 7,2-7,8 grense is, sal die vrye Ca^{2+} -konsentrasie 'n nadelige invloed op die ATPase-aktiwiteit uitoefen.

Hierdie effek wat pH-veranderinge op die vrye Ca^{2+} -konsentrasie het, kan moontlik die verskillende optimale H^+ -konsentrasies verklaar wat in die literatuur gerapporteer word. Hierdie studie is gedoen om die effek van die veranderende vrye Ca^{2+} -konsentrasie met pH-veranderinge op die SR te ondersoek en om die optimale pH vir Ca^{2+} -opname en ATPase-aktiwiteit vas te stel.



Figuur 4.3: Effek van pH op die Ca^{2+} -opname van SSR en CSR in teenwoordigheid van K-oksalaat. Die Ca^{2+} -opnames is verkry in reaksiemengsels waarvan die vrye Ca^{2+} -konsentrasie konstant gehou is (SSR \blacktriangle en CSR \triangle) en ook met veranderende vrye Ca^{2+} -konsentrasie as gevolg van pH veranderinge (SSR \bullet en CSR \circ).

Reaksiemengsel: 20 mM Tris- maleaat of Tris-HCl; 120 mM KCl; 1 mM CaCl_2 ; 1 mM EGTA; 10 mM $\text{K}_2\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$; 2,5 mM MgCl_2 ; 2,5 mM ATP en 0,15 mg SR proteïen/ml. Temperatuur 25°C. In die gevalle waar die Ca^{2+} -konsentrasie konstant gehou is, is die reaksiemengsel telkens aangepas met behulp van 'n rekenaarprogram wat ontwikkel is en die dissosiasiekonstantes van Fabiato & Fabiato (1979a) gebruik. Die vrye Ca^{2+} -konsentrasie is konstant gehou op 8,3 μM .

Hierdie figuur verteenwoordig die resultate van sewe afsonderlike eksperimente.

4.2 Resultate

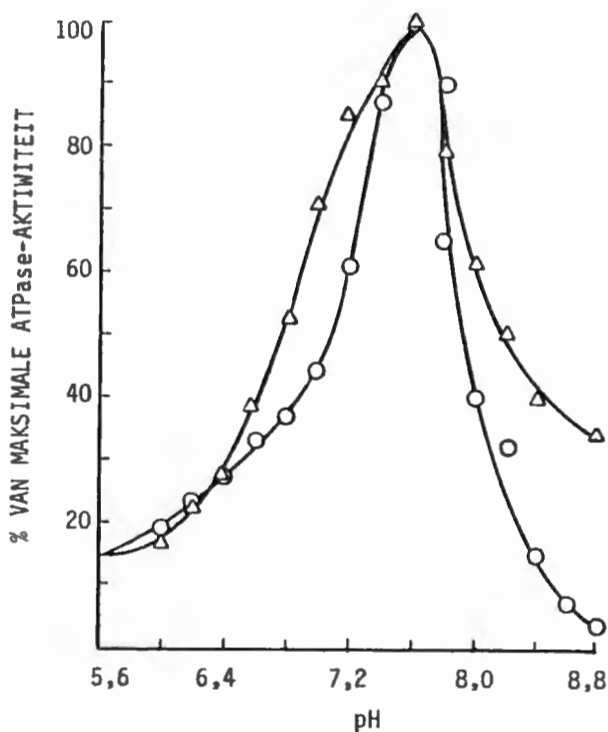
4.2.1 Effek van pH op die Ca^{2+} -opname van SR in teenwoordigheid van K-oksalaat

Om vas te stel of die veranderende vrye Ca^{2+} -konsentrasie 'n invloed het op die effek van pH op SR Ca^{2+} -opname, is opnames gedoen in reaksiemengsels waarvan die vrye Ca^{2+} -konsentrasies konstant op $8,3 \mu\text{M}$ gehou is. Opnames is ook by verskillende pH-waardes gedoen in die standaard reaksiemengsel sonder om die vrye Ca^{2+} -konsentrasie te beheer (Fig. 4.3). Die optimale pH vir SSR Ca^{2+} -opname is in albei gevalle 6,8. Indien die vrye Ca^{2+} -konsentrasie nie beheer word nie, is die SSR sensitiewer vir lae pH-waardes. Onder pH 6,2 het dit betekenisvol verskil van die opnames waar die vrye Ca^{2+} -konsentrasie konstant gehou is. Die optimale pH vir CSR Ca^{2+} -opname is in albei gevalle 7,0. Die CSR Ca^{2+} -opname is sensitiewer vir lae pH-waardes, indien die vrye Ca^{2+} -konsentrasie nie konstant bly nie. By pH 6,6 en laer het dit betekenisvol verskil van die opnames waar die vrye Ca^{2+} -konsentrasie konstant gehou is. Indien die SSR en CSR opnames met mekaar vergelyk word, is dit duidelik dat die CSR meer sensitief is vir pH-veranderinge as SSR. Indien die vrye Ca^{2+} -konsentrasie konstant gehou word, daal die CSR opname onder 50% van die maksimale opname sodra die pH laer as 6,6 daal of hoër as 7,6 styg. By beide hierdie pH-vlakke is die SSR opnames steeds 80% van die maksimale opname. Die optimale pH vir CSR Ca^{2+} -opname is ook 7,0 in vergelyking met die 6,8 van SSR. Die maksimale Ca^{2+} -opname van SSR was $980 \text{ nmol Ca}^{2+}/\text{mg proteïen}/\text{min}$, en die van CSR $197 \text{ nmol Ca}^{2+}/\text{mg proteïen}/\text{min}$.

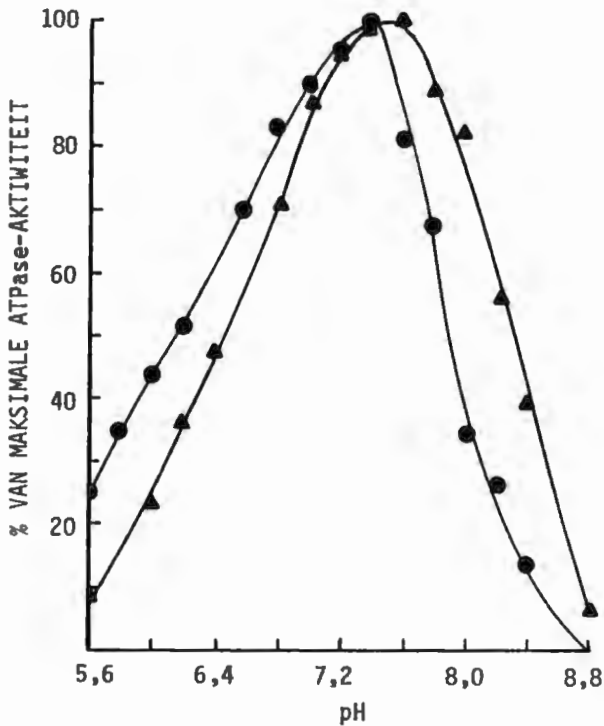
4.2.2 Effek van pH op die ATPase-aktiwiteit van SR

4.2.2.1 Effek van pH op die ATPase-aktiwiteit van CSR

Om vas te stel wat die invloed van veranderende vrye Ca^{2+} -konsentrasie op die effek van pH op CSR ATPase-aktiwiteit is, is bepalinge gedoen in reaksiemengsels waarvan die vrye Ca^{2+} -konsentrasie konstant gehou is en ook in die standaard reaksiemengsel sonder om die vrye Ca^{2+} -konsentrasie te beheer (Fig. 4.4). Die optimale pH vir CSR ATPase-aktiwiteit is in alle gevalle 7,6. Indien die vrye Ca^{2+} -konsentrasie in die reaksiemengsel konstant bly, vertoon die CSR ATPase ensiem oor wyer pH-grense nog hoë aktiwiteit. Met veranderende vrye Ca^{2+} -konsentrasie is die ATPase-aktiwiteit by pH-waardes onder 7,1 en bo 7,9 reeds laer as 50% van die maksimale aktiwiteit van $0,496 \mu\text{mol Pi}/\text{mg}$



Figuur 4.4: Effek van pH op die Ca^{2+} - Mg^{2+} -afhanklike ATPase-aktiwiteit van CSR. Die ATPase-aktiwiteit is bepaal in reaksiemengsels waarvan die vrye Ca^{2+} -konsentrasie konstant gehou is (Δ) en ook met veranderende vrye Ca^{2+} -konsentrasie as gevolg van pH veranderinge (O). Reaksiemengsel: 20 mM Tris-maleaat of Tris-HCl; 120 mM KCl; 0,2 mM CaCl_2 ; 0,2 mM EGTA; 2,5 mM MgCl_2 ; 2,5 mM ATP; 5 mM NaN_3 ; 5 μM A23187 en 0,2 mg SR proteïen/ml. Temperatuur 25°C. Hierdie figuur verteenwoordig die resultate van vyf afsonderlike eksperimente.



Figuur 4.5: Effek van pH op die Ca^{2+} - Mg^{2+} -afhanklike ATPase-aktiwiteit van SSR. Die ATPase-aktiwiteit is bepaal in reaksiemengsels waarvan die vrye Ca^{2+} -konsentrasie konstant gehou is (\blacktriangle) en ook met veranderende vrye Ca^{2+} -konsentrasie as gevolg van pH veranderinge (\bullet). Reaksiemengsel: 20 mM Tris-maleaat of Tris-HCl; 120 mM KCl; 0,2 mM CaCl_2 ; 0,2 mM EGTA; 2,5 mM MgCl_2 ; 2,5 mM ATP; 5 mM NaN_3 ; 20 μM A23187 en 0,2 mg SR proteien/ml. Temperatuur 25°C. Hierdie figuur verteenwoordig die resultate van vyf afsonderlike eksperimente.

proteïen/min. Indien die vrye Ca^{2+} -konsentrasie egter konstant gehou word, is die ATPase-aktiwiteit by pH 7,1 en 7,9 steeds 77% en 72% respektiewelik. Met konstante vrye Ca^{2+} -konsentrasie daal die ATPase-aktiwiteit onder 50% sodra die pH laer as 6,8 en hoër as 8,2 is.

4.2.2.2 Effek van pH op die ATPase-aktiwiteit van SSR

Die invloed van veranderende vrye Ca^{2+} -konsentrasie op die effek van pH op die SSR ATPase-aktiwiteit, is ondersoek. ATPase-aktiwiteit is bepaal in reaksiemengsels met konstante sowel as veranderende vrye Ca^{2+} -konsentrasies (Fig. 4.5). Optimale pH in die reaksiemengsel met konstante vrye Ca^{2+} -konsentrasie is 7,6, maar met veranderende vrye Ca^{2+} -konsentrasie het die optimale pH na 7,4 verskuif. Met konstante vrye Ca^{2+} -konsentrasie daal die ATPase-aktiwiteit onder 50% sodra die pH laer as 6,5 en hoër as 8,2 is. Die ooreenstemmende waardes met veranderende vrye Ca^{2+} -konsentrasie is pH 6,2 en 7,9. Daar het dus 'n geringe verskuiwing na laer pH-waardes plaasgevind as gevolg van die veranderende vrye Ca^{2+} -konsentrasies. Die maksimale ATPase-aktiwiteit van SSR was 3,6 $\mu\text{mol Pi/mg proteïen/min}$.

4.3 Bespreking

Die effek van pH op die SR is om verskeie redes in die verlede ondersoek. Die reaksie van die ATPase ensiem op 'n pH-verandering kan meer lig werp op die struktuur en funksionering van die SR en die karakterisering van die ATPase ensiem. Dit is ook van fisiologiese belang, omdat die pH wissel tydens die normale funksionering van die liggaam sowel as tydens toestande soos isemie (Krause & Hess, 1984). Daar vind ook pH-veranderinge in die mikro-omgewing van die SR membraan plaas as gevolg van Ca^{2+} en H^+ -uitruiling tydens Ca^{2+} -opname (Inesi, 1985; Yamaguchi & Kanazawa, 1985). Die pH en die vrye Ca^{2+} -konsentrasie in die reaksiemengsel beïnvloed ook mekaar se effek op die SR. Die pH beïnvloed die Ca^{2+} -affiniteit van die ATPase (Nakamaru & Schwartz, 1970), terwyl die Ca^{2+} die ATPase kan beskerm teen die effek van die H^+ (Meltzer & Berman, 1984). pH-studies word dikwels gedoen sonder om die gepaardgaande vrye Ca^{2+} -konsentrasieveranderinge in ag te neem (Shigekawa et al., 1976).

4.3.1 Invloed van vrye Ca^{2+} -konsentrasieveranderinge wat tydens pH-veranderinge voorkom, op die SR-aktiwiteit

Die effek van die veranderende vrye Ca^{2+} -konsentrasie met pH-veranderinge is

duidelik sigbaar in Figuur 4.3. Beide SSR en CSR Ca^{2+} -opnames is oënskynlik meer sensitief vir lae pH-waardes, indien die vrye Ca^{2+} -konsentrasie nie beheer word nie. Sodra die vrye Ca^{2+} -konsentrasie styg as gevolg van 'n daling in pH, het dit 'n inhiberende invloed op die Ca^{2+} -opname bo en behalwe die inhiberende effek van die dalende pH. Hierdie inhiberende effek van die verhoogde vrye Ca^{2+} -konsentrasie is moontlik die gevolg van die vorming van CaATP -komplekse wat met MgATP kompeteer as substraat vir die ATPase ensiem. Die daling in vrye Ca^{2+} -konsentrasie by hoër pH-waardes het nie die verwagte effek op die Ca^{2+} -opname gehad nie. Moontlik is die tempo van fosfoproteïen vorming nie so nadelig deur die vrye Mg^{2+} -konsentrasie getref nie. Die optimale pH van beide SSR en CSR Ca^{2+} -opname is nie deur die vrye Ca^{2+} -konsentrasie verander nie, aangesien die vrye Ca^{2+} -konsentrasie by pH 6,8 en 7,6 onderskeidelik 5 en 8 μM is. Dit val binne die optimale vrye Ca^{2+} -konsentrasiegrense van 3-10 μM .

Die ATPase-aktiwiteit om beide SSR en CSR is deur die verandering in vrye Ca^{2+} -konsentrasie wat voorkom tydens pH-verandering, beïnvloed. Die optimale pH van CSR ATPase-aktiwiteit naamlik 7,6 is nie deur die veranderende vrye Ca^{2+} -konsentrasie beïnvloed nie (Fig. 4.4). 'n Styging sowel as 'n daling in die vrye Ca^{2+} -konsentrasie het 'n addisionele inhiberende effek op die ATPase-aktiwiteit van CSR. Hierdie inhiberende effek is waarskynlik as gevolg van die vorming van CaATP -komplekse indien die pH daal en 'n hoë $\text{Mg}^{2+}:\text{Ca}^{2+}$ -verhouding wat die tempo van fosfoproteïen vorming benadeel indien die pH styg. In teenstelling met die Ca^{2+} -opname word die ATPase-aktiwiteit van CSR nadelig getref deur 'n daling in die vrye Ca^{2+} -konsentrasies.

Indien die vrye Ca^{2+} -konsentrasie in die reaksiemengsel waarin die SSR ATPase-aktiwiteit bepaal is, nie beheer word nie, verskuif die optimale pH van 7,6 na 7,4 (Fig. 4.5). Hoewel klein, kom hierdie verskuiwing na links regdeur die pH-spektrum van pH 5,6 tot 6,8 voor. Met konstante vrye Ca^{2+} -konsentrasies hidroliseer die ATPase ensiem ATP dus optimaal by 'n effens meer alkaliese pH.

Dit is dus duidelik dat indien die pH van reaksiemengsels verander word, die gepaardgaande veranderinge in vrye Ca^{2+} -konsentrasies verskillende effekte op die aktiwiteit van die SSR en CSR het. Geen studie oor die invloed van pH op SR membrane kan dus uitgevoer word sonder dat die vrye Ca^{2+} -konsentrasie bepaal en konstant gehou word nie.

4.3.2 Vergelyking van die invloed van pH op SSR-en CSR-aktiwiteit

Indien die vrye Ca^{2+} -konsentrasies in die reaksiemengsels konstant gehou word, is dit duidelik dat die SSR en CSR verskillend reageer met pH-veranderinge.

Die maksimale Ca^{2+} -opname en ATPase-aktiwiteit verkry met CSR by die optimale pH is heelwat laer as die maksimale aktiwiteit van SSR. Dit bevestig die bevindinge van Hoofstuk 3 dat daar kwantitatiewe verskille bestaan tussen die ATPase van SSR en CSR.

Uit Figure 4.3, 4.4 en 4.5, is dit duidelik dat die CSR meer sensitief is vir 'n lae pH in die reaksiemengsel. Die CSR Ca^{2+} -opname daal skerp indien die pH afwyk van die optimale pH van 7,0. Hierteenoor word die Ca^{2+} -opname van SSR nie so nadelig beïnvloed deur pH-veranderinge nie (Fig. 4.3). Die CSR Ca^{2+} -opname daal onder 50% van die maksimale opname indien die pH laer as 6,6 daal of hoër as 7,6 styg. By hierdie pH-vlakke is die SSR Ca^{2+} -opname steeds 80% van die maksimale opname. Hierdie hoër sensitiwiteit dui op kwantitatiewe verskille tussen SSR en CSR. Die optimale pH van SSR Ca^{2+} -opname (6,8) verskil van die optimale pH van CSR Ca^{2+} -opname (7,0) wat ook op moontlike kwantitatiewe verskille dui.

Die invloed van pH op die ATPase-aktiwiteit van SSR en CSR kom baie ooreen veral by hoër pH-vlakke (Fig. 4.4 + 4.5). Die optimale pH met konstante vrye Ca^{2+} -konsentrasies is in albei gevalle 7,6. Tussen pH 7,2 en pH 6,0 is daar 'n vinniger afname in CSR ATPase-aktiwiteit as by SSR ATPase-aktiwiteit. Dit wil dus voorkom asof die CSR veral vir hoër H^+ -konsentrasies sensitief is en ont koppeling van Ca^{2+} -opname en ATPase aktiwiteit as gevolg van pH-veranderinge, vind makliker plaas in vergelyking met SSR. Hierdie hoër sensitiwiteit dui, soos by die Ca^{2+} -opname, op kwantitatiewe verskille tussen die ATPase van SSR en CSR. Hierdie verskille kan veroorsaak word deur molekulêre struktuurverskille tussen SSR en CSR ATPase of oriëntasieverskille van die ensiemolekule in die SR membraan.

HOOFSTUK 5

INTERAKSIE TUSSEN TRITON X-100, A23187 EN DIE ATPase VAN SSR EN CSR

5.1., Inleiding

Uit die literatuur is dit duidelik dat die lipiedsamestelling van SSR en CSR membrane verskil (Chamberlain *et al.*, 1983) en dat die vloeibaarheid van die lipiedannulus van die ATPase proteïene, die toeganklikheid van die ATPase vir triptisienvertering beïnvloed (Blazyk *et al.*, 1985). Uit die resultate van Hoofstuk 3 blyk dit dat die lipiedannulusse van SSR en CSR ATPase moontlik van mekaar verskil en dat die CSR ATPase meer blootgestel is aan eksterne faktore.

Detergense word dikwels gebruik om fosfolipiede in die SR membraan te vervang en so meer inligting te bekom oor die interaksie tussen die fosfolipiede en die ATPase proteïene (Dean & Saurez, 1984). Een van die detergense wat die meeste gebruik word is Triton X-100. Triton is 'n nie-ioniese detergent wat geen konformasieverandering aan die ATPase proteïene veroorsaak of geen denaturering laat plaasvind nie (Helenius & Simons, 1975). Die rede hiervoor is dat Triton 'n rigiede en groot apolêre deel besit wat nie die hidrofobiese areas van die proteïene kan binnedring en denaturering veroorsaak nie (Helenius & Simons, 1975). Indien die vrye Tritonmonomeerkonsentrasies baie hoog sou styg, kon denaturering van die proteïene wel plaasvind. Dit vind egter nie plaas nie aangesien die monomere in miselle ingebou word sodra die Tritonkonsentrasies $2,4 \times 10^{-4} M$ bereik (Helenius & Simons, 1975). 'n Verdere voordeel is dat Triton die ATPase-aktiwiteit verhoog met 80% in vergelyking met ander detergense soos Brij 58 en Brij 35 wat slegs 'n 10% verhoging tot gevolg het (Dean & Saurez, 1984). Die hoë aktiwiteit wat verkry word met Triton is waarskynlik omdat Triton aan al die beskikbare amfifiele setels op die ATPase proteïene bind en ook instaat is om die proteïene-proteïeninteraksie te breek om ATPase monomere te lewer (Dean & Saurez, 1984).

Helenius & Simons (1975) beskryf die interaksie tussen Triton en sellulêre membrane soos volg:

Indien Triton in lae konsentrasies teenwoordig is in 'n reaksiemengsel kom dit as monomere in die reaksiemengsel voor. Van die Tritonmonomere word ingebou in die lipiedlae van die membraan sonder om die membraan op te breek.

By hoër Tritonkonsentrasies word Tritonmiselle gevorm. Die konsentrasie waarby die miselle begin vorm staan as die kritiese miselkonsentrasie bekend en vir Triton is dit $2,4 \times 10^{-4} M$ of 0,016% in water. Die miselle word gevorm met die hidrofobe groepe van Triton na binne en die hidrofiële of polêre groepe na buite. Detergensmonomere is teenwoordig in die membraan terwyl miselle ook teenwoordig is in die reaksiemengsel. Met hoër Tritonkonsentrasies word alle fosfolipiede ingebou in die miselle. Die sferiese vorm van suiwer tritonmiselle is die gevolg van die tritonmolekule se wigvormige konformasie. Gemengde miselle van Triton en fosfolipiede is ellipties met Triton ingebou in die ronde punte. Die miselle verklein indien die Tritonkonsentrasie verhoog word.

Triton veroorsaak die vervloeiing van die SSR membraan en dit geskied soos volg:

Met 'n Tritonkonsentrasie van $2 \times 10^{-5} M$ (0,0007%) is ongeveer 10 molekule Triton gebind aan elke ATPase proteïen (McIntosh & Ross, 1985). 'n Tritonkonsentrasie van $1 \times 10^{-4} M$ (0,007%) het min effek op die funksionering van geïsoleerde SSR (Prado *et al.*, 1983). Min morfologiese veranderinge kan waargeneem word met tot $8 \times 10^{-4} M$ (0,05%) Triton (Prado *et al.*, 1983). Die ATPase-aktiwiteit neem egter toe as gevolg van die vervloeiing van die membraan wat tussen 0,04 en 0,08% plaasvind (McIntosh & Ross, 1985). Met 'n Tritonkonsentrasie van $2 \times 10^{-4} M$ (0,013%) in die reaksiemengsel is daar reeds 110 molekule Triton gebind aan die ATPase proteïen en met 0,1% Triton is 36% van die fosfolipiede reeds vanuit die membraan verplaas (McIntosh & Ross, 1985). Met Tritonkonsentrasies hoër as $10^{-3} M$ (0,6%) het die meeste fosfolipiede vervloei en 90% van die ATPase molekule is in monomeervorm (McIntosh & Ross, 1985).

Triton vervang dus die lipiede om die hidrofobiese deel van die ATPase en daarom reageer die ensiem soos die intakte ensiem in die membraan en is dit nog aktief (Helenius & Simons, 1975). Die Triton kan egter nie die ensiemstruktuur stabiel hou nie en daar moet dus 'n spesifieke fosfolipied-ATPase-interaksie in die intakte SR membraan bestaan wat die ATPase stabiliseer (McIntosh & Ross, 1985). Twee klasse bindingsetels kom op die ATPase voor waaraan Triton bind. By konsentrasies laer as die kritiese miselkonsentrasie bind Triton aan 35-40 bindingsetels op die ATPase om die normale ATPase-aktiwiteit van die SR te lewer. Dit is dieselfde aantal bindingsetels as die aantal fosfolipiede wat bind aan die ATPase proteïen. Die moontlikheid bestaan dus dat Triton en die fosfolipiede aan dieselfde bindingsetels bind.

Die fosfolipiede bind egter met 'n hoër affiniteit aan die setels (McIntosh & Ross, 1985). 'n Addisionele 70 Tritonmolekule bind aan die ATPase sodra die kritiese miselkonsentrasie bereik word (McIntosh & Ross, 1985).

Triton verhoog die membraandeurlaatbaarheid van die SR vesikel en dus verhoog die ATPase-aktiwiteit ook. Dit bemoeilik die bestudering van die effek van Tritonbinding en die vervanging van fosfolipiede op die ATPase-aktiwiteit. Dit is dus belangrik dat SR vesikels gebruik word wat vooraf ten volle deurlaatbaar vir Ca^{2+} gemaak is. Die byvoeging van 'n Ca^{2+} -ionofoor verseker dat alle vesikels deurlaatbaar is vir Ca^{2+} (Berman, 1982). Die tempo van ATP-hidrolise kan dus onder verskillende kondisies en met verskillende Triton-konsentrasies bestudeer word sonder dat veranderende ATPase-aktiwiteit enige rol speel. Die ionofoor verhoed dat daar 'n Ca^{2+} -gradiënt oor die SR membraan ontstaan tydens Ca^{2+} -opname in afwesigheid van oksalaat (Chiesi, 1979). Dit is bekend dat die Ca^{2+} -gradiënt wat tydens Ca^{2+} -opname ontstaan, 'n inhiberende invloed het op die hidrolise van ATP deur ATPase (Inesi & Hill, 1983).

Hierdie ionofore is antibiotikums wat geïsoleer word uit bakterieë en in staat is om katione deur die membraan te transporteer (Windholz *et al.*, 1983). Volgens Scarpa *et al.* (1972) kan ionofore in twee klasse ingedeel word:

- 1) Neutrale ionofore met sikliese konfigurasies soos valinomisien wat K^+ , Rb^+ en Cs^+ oor lipiedmembrane transporteer.
- ii) Elektrogeniese ionofore met liniêre konfigurasies wat negatief gelaaië groepe bevat en betrokke raak by kompleksvorming met katione byvoorbeeld X537A wat mono- en divalente katione bind.

Die twee ionofore wat die meeste gebruik word is X537A en A23187 (Hasselbach *et al.*, 1983). Beide X537A en A23187 het geen effek op die elektronmikroskopiese voorkoms van die SR membraan nie (Scarpa *et al.*, 1972). In teenstelling met ander ionofore, onderdruk dié twee ionofore nie die ATP onafhanklike binding van Ca^{2+} deur die SR nie. X537A en A23187 vorm lipofiele komplekse met divalente katione en fasiliteer so die beweging van ione oor die membraan (Scarpa *et al.*, 1972). In teenwoordigheid van 'n ionofoor word alle Ca^{2+} vinnig vanuit gelaaië SR vesikels vrygestel (Berman, 1982). Ca^{2+} wat in teenwoordigheid van oksalaat gelaai is beweeg egter nie uit die SR vesikel indien 'n ionofoor by die reaksiemengsel gevoeg word nie (Sulakhe & Sulakhe, 1979).

Volgens Berman (1982) en Klausner et al. (1979) is daar drie moontlike meganismes waarvolgens die ionofoor kan funksioneer:

- i) Die ionofoor vorm 'n kanaal deur die lipiedmembraan onafhanklik van die ATPase proteïen.
- ii) Die ionofoor los op in die fosfolipiedannulus van die ATPase en die interaksie tussen die ionofoor en die ATPase geskied by die proteïen-lipiedraakvlak.
- iii) Die ionofoor reageer direk met 'n hidrofobiese bindingsplek of kanaal in die ATPase proteïen.

Die effek wat die ionofoor op die ATPase proteïen het is egter nog kontroversiël. Die eenvoudigste verklaring vir die funksionering van die ionofoor is dat dit optree as Ca^{2+} -draer oor die lipiedlae van die SR membraan sonder om die ATPase proteïen direk te affekteer (Hasselbach et al., 1983). Daar is egter al gerapporteer dat sekere ionofore membraanproteïene direk affekteer. Spesifieke interaksie tussen A23187 en die intrinsieke proteïene in die limfosietmembrane is gevind deur Klausner et al. (1979). Interaksie tussen valinomisien, 'n K^+ -ionofoor, en die SSR ATPase is ook gerapporteer (Davidson & Berman, 1985).

Daar is ook gerapporteer dat 'n kombinasie van $40\mu\text{M}$ X537A en Triton X-100 in die konsentrasiegrense van 0 - 0,3 mg Triton/ml, 'n skerp afname in die SSR ATPase-aktiwiteit tot gevolg het (Hasselbach et al., 1983). By hoër Triton-konsentrasies word die normale ATPase-aktiwiteit weer herstel. Hasselbach et al. (1983) het beweer dat hierdie verskynsel uniek is aan X537A en nie deur A23187 in teenwoordigheid van Triton veroorsaak word nie. Hierdie inhiberende effek of "inhibisiegebied" kan volgens Hasselbach et al. (1983) nie deur hoër Ca^{2+} -konsentrasies uitgeskakel word nie. McIntosh & Ross (1985) het egter met A23187 en Triton ook 'n inhibisiegebied waargeneem in die SSR ATPase aktiwiteit.

In hierdie studie is daar gepoog om hierdie kontraversiële bevindinge te ondersoek en meer lig op die meganisme betrokke te werp. Daar is ook gepoog om vas te stel of dieselfde verskynsels by CSR voorkom en dit sodoende as 'n parameter te gebruik om die struktuur-funksieverwantskap tussen SSR en CSR te vergelyk.

5.2 Resultate

5.2.1 Oplosbaarheid van SSR en CSR in Triton X-100

Die byvoeging van 10^{-6} M Triton by SSR toon 'n toename in die optiese digtheid gevolg deur 'n skerp afname in optiese digtheid met hoër Tritonkonsentrasies (Fig. 5.1). In teenwoordigheid van 10^{-3} M Triton is die optiese digtheid slegs 17% van die optiese digtheid in afwesigheid van Triton. Die byvoeging van Triton by CSR het 'n geleidelike afname in optiese digtheid tot gevolg (Fig. 5.1). In teenwoordigheid van 10^{-3} M Triton is die optiese digtheid steeds 50% van die oorspronklike optiese digtheid in afwesigheid van Triton.

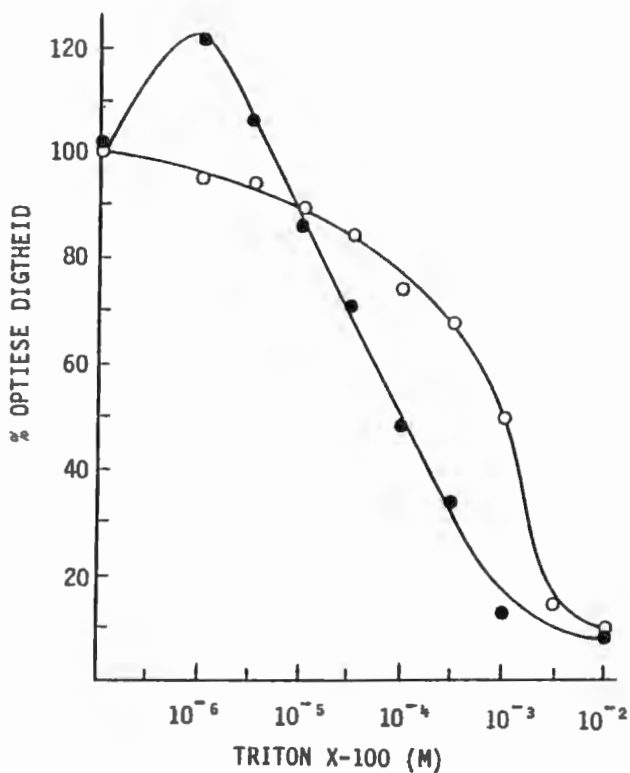
Fig. 5.1

5.2.2 Invloed van A23187 en Triton op die SSR ATPase-aktiwiteit

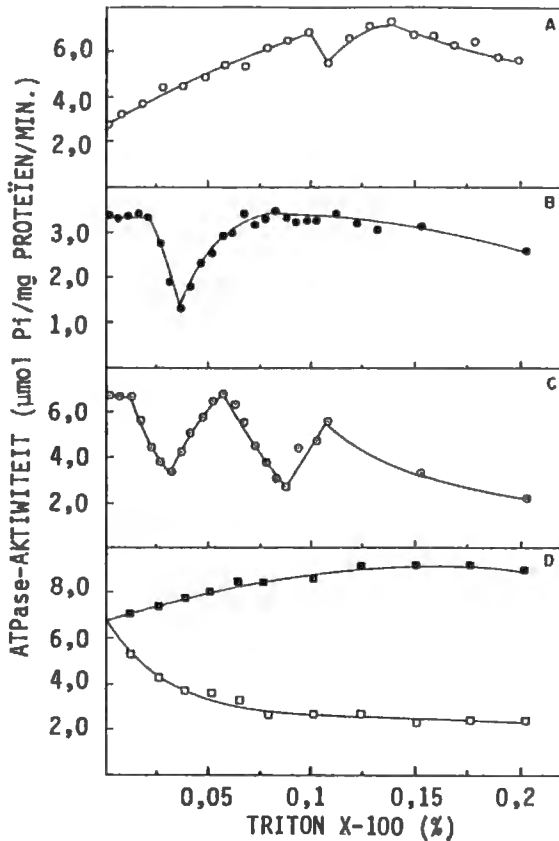
Die invloed van $20\mu\text{M}$ A23187 en verskillende Tritonkonsentrasies op SSR ATPase-aktiwiteit word in Figuur 5.2 getoon. In Figuur 5.2A is die effek van verskillende Tritonkonsentrasies bepaal in afwesigheid van A23187. As gevolg van 'n toename in Tritonkonsentrasies neem die ATPase-aktiwiteit toe met 250% gevolg deur 'n inhibisiegebied in teenwoordigheid van 0,1% Triton met 'n daling van 18% in ATPase-aktiwiteit. Hierdie inhibisiegebied in afwesigheid van A23187 kan nie met hoër Ca^{2+} -konsentrasies uitgekakel word nie (Resultate nie getoon). In teenwoordigheid van $20\mu\text{M}$ A23187 kom 'n groot inhibisie van ATPase-aktiwiteit voor in teenwoordigheid 0,03 - 0,04% Triton (Fig. 5.2B). Die ATPase-aktiwiteit daal met 61% en herstel by hoër Tritonkonsentrasies volledig. Deur die temperatuur van 25°C te verhoog na 35°C word 'n tweede inhibisiegebied by 0,08% Triton verkry in teenwoordigheid van A23187 (Fig. 5.2C). Die eerste inhibisiegebied by 35°C begin reeds by laer Tritonkonsentrasies en 'n daling van 52% in ATPase-aktiwiteit word gevolg deur 'n volledige herstel. Die tweede inhibisiegebied vertoon 'n 61% daling in ATPase-aktiwiteit gevolg deur 'n herstel van 80%. Triton in afwesigheid van A23187 het geen inhererende effek op geïsoleerde ATPase nie (Fig. 5.2D). In teenwoordigheid van beide Triton en A23187 word die ATPase-aktiwiteit van die geïsoleerde ATPase onderdruk. 'n Afname van 59% kom voor tot by 'n Tritonkonsentrasie van 0,075% gevolg deur 'n geringe verdere afname by hoër Tritonkonsentrasies.

5.2.3 Invloed van A23187 en Triton op die CSR ATPase-aktiwiteit

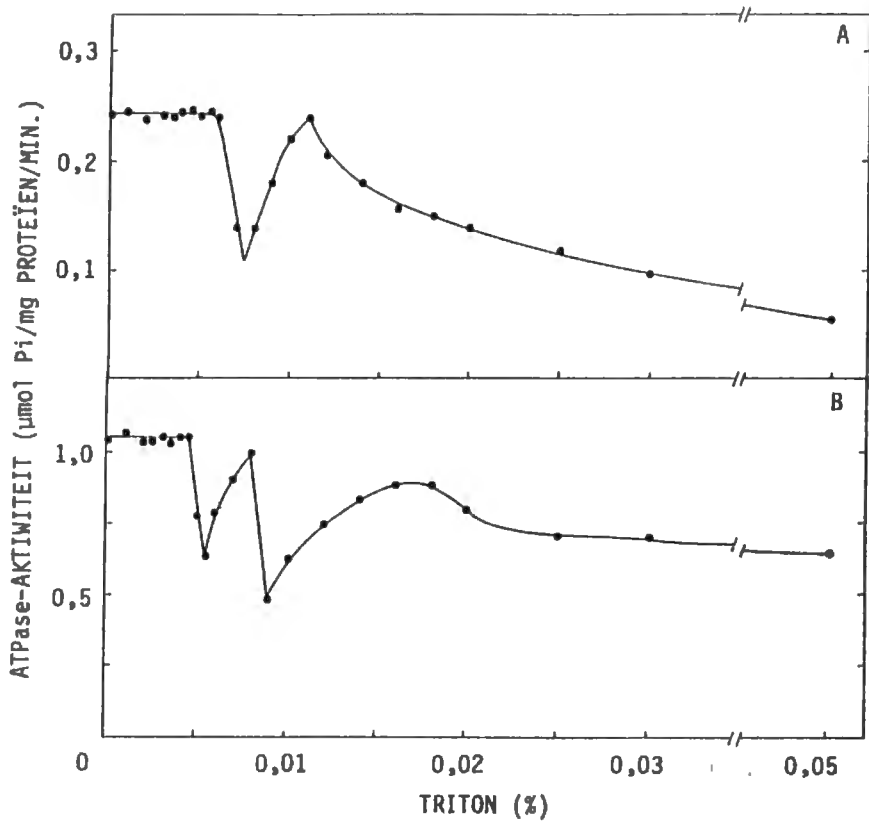
Om vas te stel of dieselfde inhibisiegebiede by die intakte CSR membraan voorkom is die effek van $5\mu\text{M}$ A23187 in teenwoordigheid van verskillende Triton-



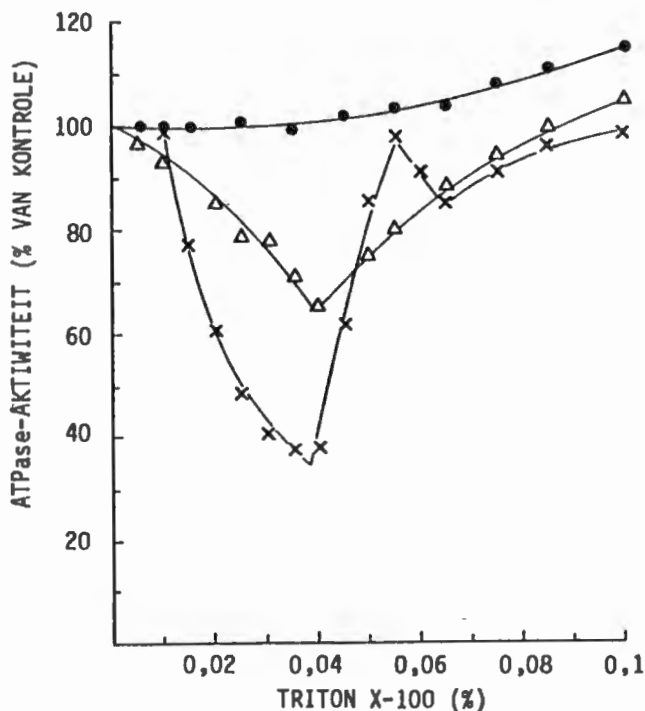
Figuur 5.1: Oplosbaarheid van SSR en CSR in Triton X-100. Eksperimentele prosedure word beskryf in Hoofstuk 2: Metodes en materiaal. Die optiese digtheid in afwesigheid van Triton is as 100% geneem. Oplosbaarheid van SSR (●) en CSR (○) word getoon. Hierdie figuur verteenwoordig die resultate van drie afsonderlike eksperimente.



Figuur 5.2: Invloed van A23187 en Triton op die SSR ATPase-aktiwiteit. Die invloed van Triton in afwesigheid van A23187 by 35°C word getoon (A). B en C verteenwoordig die effek van 20 µM A23187 in teenwoordigheid van Triton op die ATPase-aktiwiteit by 25°C en 35°C respektiewelik. Die invloed van Triton op geïsoleerde ATPase by 35°C word ook getoon in afwesigheid (■) en in teenwoordigheid (□) van 20 µM A23187. Die reaksiemengsel het bestaan uit: 20 mM MOPS, pH 7,4; 120 mM KCl; 0,2 mM CaCl₂; 0,2 mM EGTA; 2,5 mM MgCl₂; 5 mM NaN₃; 2,5 mM ATP en 0,3 mg SR proteïen/ml. Hierdie figure verteenwoordig die resultate van tussen drie (Fig. 5.2 A en D) en agt afsonderlike eksperimente (Fig. 5.2 B en C).



Figuur 5.3: Invloed van A23187 en Triton op CSR ATPase-aktiwiteit. Die invloed van 5 µM A23187 in teenwoordigheid van Triton by 25°C (A) en 35°C (B) word getoon. Reaksiemengsels soos beskryf in Figuur 5.2 is gebruik. Die figure verteenwoordig die resultate van sewe afsonderlike eksperimente.



Figuur 5.4: Invloed van vrye Ca^{2+} -konsentrasie op die SSR ATPase-aktiwiteit in teenwoordigheid van $20 \mu\text{M}$ A23187 en verskillende Triton-konsentrasies. Die invloed van die volgende vrye Ca^{2+} -konsentrasies word getoon: $4 \times 10^{-6}\text{M}$ (x), $6 \times 10^{-6}\text{M}$ (Δ) en $2 \times 10^{-5}\text{M}$ (\bullet). Die reaksiemengsel soos beskryf in Figuur 5.2 is telkens aangepas om die gewenste vrye Ca^{2+} -konsentrasie te lewer. Hierdie aanpassings is gedoen met behulp van 'n rekenaarprogram wat ontwikkel is en die dissosiasiekonstantes van Fabiato & Fabiato (1979a) gebruik. Temperatuur = 35°C . Die ATPase-aktiwiteit van elke reeks in afwesigheid van Triton is as 100% geneem. Hierdie figuur verteenwoordig die resultate van vier afsonderlike eksperimente.

konsentrasies op die CSR bepaal (Fig. 5.3). Dieselfde patroon van inhibisiegebiede, naamlik een by 25°C en twee by 35°C is met CSR verkry. Slegs 5µM A23187 is nodig en die Tritonkonsentrasies waar die inhibisiegebiede voorkom is tien keer laer. By 25°C kom die inhibisiegebied voor tussen 0,003 en 0,005% Triton (Fig. 5.3A) en 'n afname van 56% word gevolg deur 'n volledige herstel in ATPase-aktiwiteit. By 35°C kom 'n tweede inhibisiegebied by 0,008% Triton voor (Fig. 5.3B). Die eerste inhibisiegebied vertoon 'n daling van 41% in ATPase-aktiwiteit. Die tweede inhibisiegebied vertoon 'n 53% daling gevolg deur 'n 85% herstel in ATPase-aktiwiteit. Soos by SSR begin die eerste inhibisiegebied by 35°C by laer Tritonkonsentrasies.

5.2.4 Invloed van vrye Ca²⁺-konsentrasie op die SSR ATPase-aktiwiteit in teenwoordigheid van 20µM A23187 en verskillende Tritonkonsentrasies

Beide die inhibisiegebiede soos verkry in Figuur 5.2C is sensitief vir Ca²⁺ en is uitgeskakel deur die vrye Ca²⁺-konsentrasie in die reaksiemengsel te verhoog (Fig. 5.4). Uit Figuur 5.4 is dit duidelik dat die tweede inhibisiegebied meer sensitief vir Ca²⁺ is en uitgeskakel is deur 'n vrye Ca²⁺-konsentrasie van 6 x 10⁻⁶M terwyl die eerste inhibisiegebied eers by 2 x 10⁻⁶M vrye Ca²⁺ uitgeskakel is.

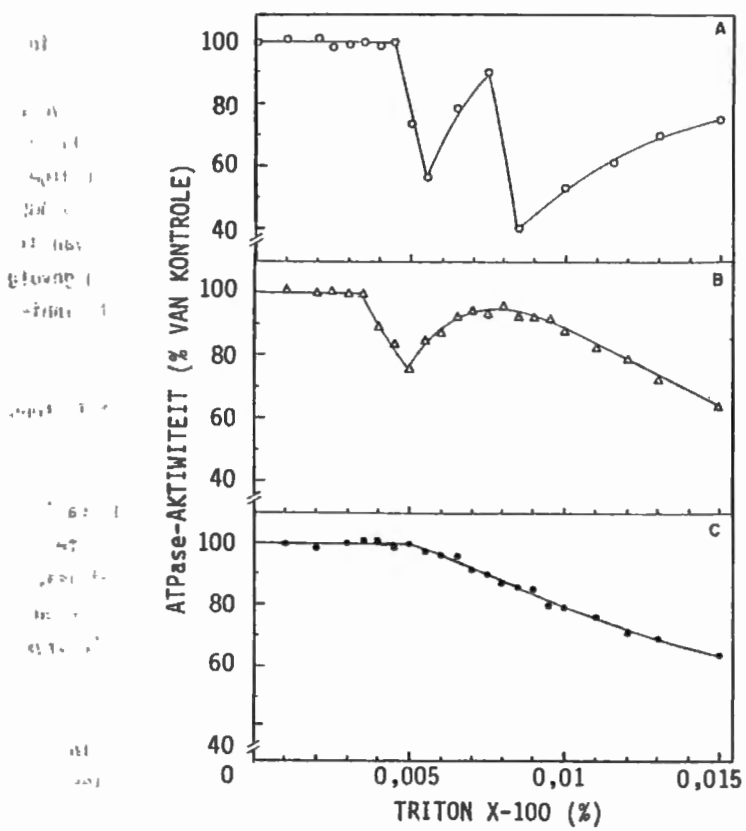
5.2.5 Invloed van vrye Ca²⁺-konsentrasie op die CSR ATPase-aktiwiteit in teenwoordigheid van 5µM A23187 en verskillende Tritonkonsentrasies

By CSR word die inhibisiegebiede ook deur hoër Ca²⁺-konsentrasies uitgeskakel maar heelwat laer Ca²⁺-konsentrasies is nodig, naamlik 4 x 10⁻⁶M Ca²⁺ skakel die tweede inhibisiegebied uit en 6 x 10⁻⁶M Ca²⁺ die eerste inhibisiegebied (Fig. 5.5).

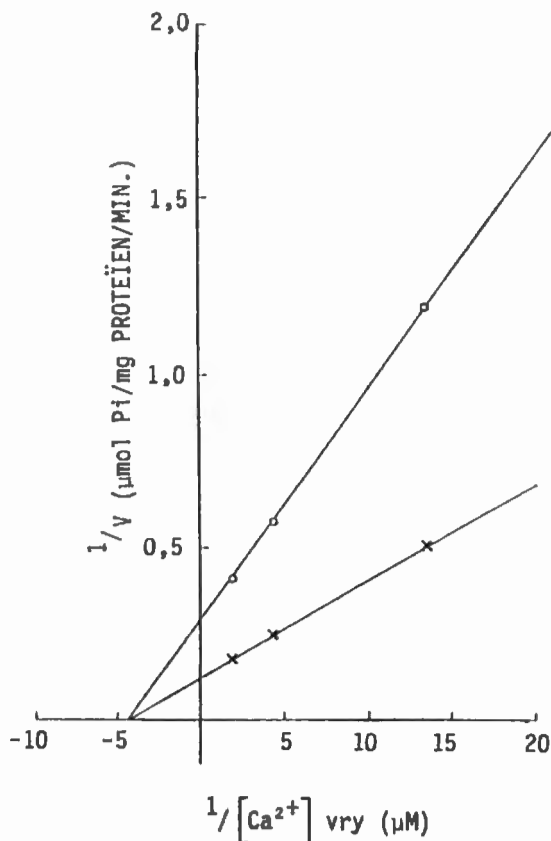
5.2.6 Lineweaver-Burke-grafieke van die invloed van vrye Ca²⁺-konsentrasies op die SSR ATPase-aktiwiteit in teenwoordigheid van A23187 en verskillende Tritonkonsentrasies

Figuur 5.6 toon die invloed van verskillende vrye Ca²⁺-konsentrasies op die SSR ATPase-aktiwiteit in teenwoordigheid en afwesigheid van 5µM A23187. Die teenwoordigheid van 5µM A23187 versnel die ATPase-aktiwiteit aansienlik en die snypunt van die twee reguit lyne val op die X-as.

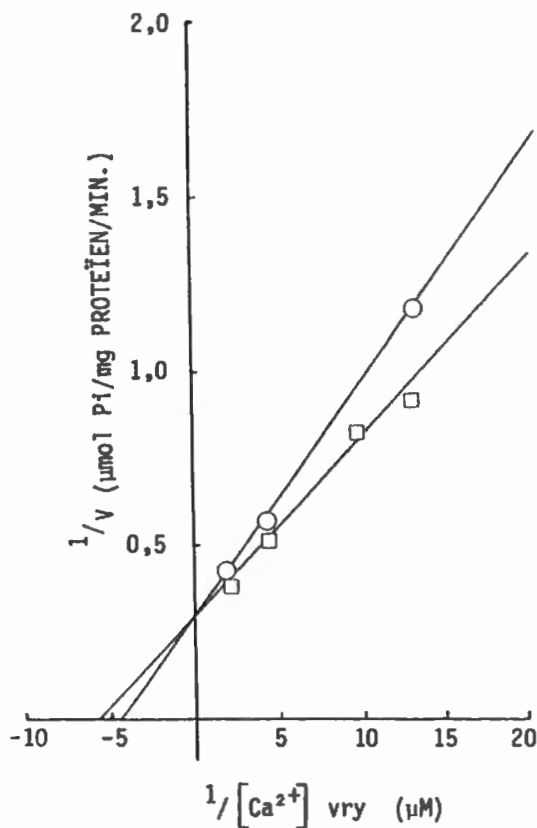
Uit Figuur 5.7 is dit duidelik dat Triton in afwesigheid van 'n ionofoor 'n stimulerende effek op die ATPase-aktiwiteit het. Die snypunkte van die twee



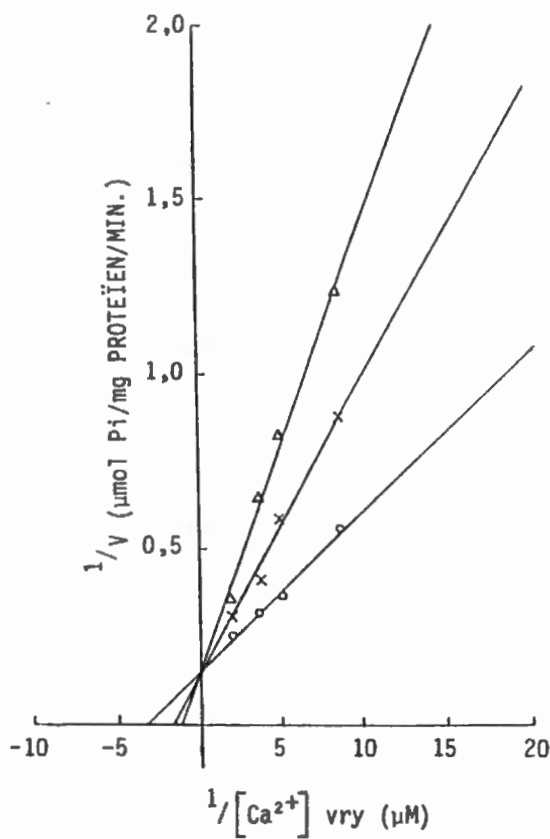
Figuur 5.5: Invloed van vrye Ca²⁺-konsentrasie op die CSR ATPase-aktiwiteit in teenwoordigheid van 5 μM A23187 en verskillende Tritonkonsentrasies. Die invloed van die volgende vrye Ca²⁺-konsentrasies word getoon: 2 x 10⁻⁶M (A), 4 x 10⁻⁶M (B) en 6 x 10⁻⁶ M (C). Die reaksiemengsel soos beskryf in Figuur 5.2 is telkens aangepas om die gewenste vrye Ca²⁺-konsentrasie te lewer. Hierdie aanpassings is gedoen met behulp van 'n rekenaarprogram wat ontwikkel is en die dissosiasiestokantantes van Fabiato & Fabiato (1979a) gebruik. Temperatuur = 35°C. Die ATPase-aktiwiteit van elke reeks in afwesigheid van Triton is as 100% geneem. Hierdie figuur verteenwoordig die resultate van vyf afsonderlike eksperimente.



Figuur 5.6: Lineweaver-Burke-grafiek van die invloed van verskillende vrye Ca^{2+} -konsentrasies op die SSR ATPase-aktiwiteit in teenwoordigheid van $5 \mu\text{M}$ A23187. Reaksiemengsels soos beskryf in Figuur 5.2 is telkens aangepas om die gewenste vrye Ca^{2+} -konsentrasie te lewer. Hierdie aanpassings is gedoen met behulp van 'n rekenaar-program wat ontwikkel is en die dissovasiekonstantes van Fabiato & Fabiato (1979a) gebruik. Geen Triton is bygevoeg nie. Temperatuur = 35°C . Die bepaling is gedoen sonder ionofoor (○) en in teenwoordigheid van $5 \mu\text{M}$ A23187 (x). Hierdie figuur verteenwoordig die resultate van drie afsonderlike eksperimente.



Figuur 5.7: Lineweaver-Burke-grafiek van die invloed van verskillende vrye Ca^{2+} -konsentrasie op die SSR ATPase-aktiwiteit in teenwoordigheid van 0,1% Triton. Reaksiemengsels soos beskryf in Figuur 5.2 is telkens aangepas om die gewenste vrye Ca^{2+} -konsentrasie te lewer. Hierdie aanpassings is gedoen met behulp van 'n rekenaar-program wat ontwikkel is en die dissosiasiekonstante van Fabiato & Fabiato (1979a) gebruik. Geen ionofoor is bygevoeg nie en die temperatuur = $35^{\circ}C$. Die bepaling is gedoen sonder Triton (○) en in teenwoordigheid van 0,1% Triton (□). Hierdie figuur verteenwoordig die resultate van drie afsonderlike eksperimente.



Figuur 5.8: Lineweaver-Burke-grafiek van die invloed van verskillende vrye Ca^{2+} -konsentrasies op die SSR ATPase-aktiwiteit in teenwoordigheid van $10 \mu M$ A23187 en Triton. Reaksiemengsels soos beskryf in Figuur 5.2 is telkens aangepas om die gewenste vrye Ca^{2+} -konsentrasie te lewer. Hierdie aanpassings is gedoen met behulp van 'n rekenaarprogram wat ontwikkel is en die dissosiasiestreekkonstantes van Fabiato & Fabiato (1979a) gebruik. Temperatuur = $35^{\circ}C$. Die bepaling is gedoen sonder Triton (O) en in teenwoordigheid van 0,01% Triton (x) en 0,035% Triton (Δ). Hierdie figuur verteenwoordig die resultate van vier afsonderlike eksperimente.

reguit lyne val op die Y-as. Indien Triton en A23187 gelyktydig in die reaksiemengsel teenwoordig is word 'n inhibering van die ATPase-aktiwiteit waargeneem (Fig. 5.8). Die sny punte van die drie reguit lyne val op die Y-as.

5.3 Bespreking

Tydens hierdie studie is daar ondersoek ingestel na die kontroversiële bevindinge wat gerapporteer is oor die effek van die ionofoor A23187 op die SR membraan in teenwoordigheid van Triton X-100 en is die effek van die ionofoor op SSR en CSR ATPase met mekaar vergelyk.

5.3.1 Oplosbaarheid van SSR en CSR in Triton X-100

Uit Figuur 5.1 is dit duidelik dat die SSR meer geredelik oplos in Triton. In teenwoordigheid van $10^{-9}M$ Triton is die SSR reeds byna volledig opgelos terwyl die CSR by dieselfde Tritonkonsentrasie nog in 'n groot mate onopgelos is (OD = 50% van aanvangswaarde). Hierdie verskynsel kan moontlik verklaar word deur die hoë lipied:proteïenverhouding wat in die CSR membraan voorkom (Fig. 3.4). Hoër Tritonkonsentrasies word dus benodig om die lipiede in die CSR membraan op te los. Die toename in optiese digtheid wat by SSR en $10^{-6}M$ Triton verkry word, is waarskynlik as gevolg van aggregasie van vesikels wat by lae Tritonkonsentrasies voorkom voordat die vesikels opgelos word.

5.3.2 Invloed van A23187 en Triton op die SSR ATPase-aktiwiteit

Die effek van Triton op die SSR ATPase in afwesigheid van A23187 is eers vasgestel. Die geringe afname in ATPase-aktiwiteit wat met 0,1% Triton verkry is (Fig. 5.2A), mag wees as gevolg van die oplossing van die membraan wat voorkom by hierdie Tritonkonsentrasie (McIntosh & Ross, 1985). Dit het dus waarskynlik geen verband met die inhibisiegebied wat voorkom in teenwoordigheid van 'n ionofoor nie. Dit word ook bevestig deur die Ca^{2+} -onsensitiwiteit van hierdie inhibisiegebied.

In teenstelling met die bevindings van Hasselbach *et al.* (1983) is A23187 ook in staat om in teenwoordigheid van Triton, SSR ATPase te inhibeer (Fig. 5.2B). Die ATPase-aktiwiteit word onderdruk by sekere Tritonkonsentrasies en by hoër Tritonkonsentrasies herstel die ATPase-aktiwiteit weer. Die enkele inhibisiegebied wat by $25^{\circ}C$ verkry is, is waarskynlik as gevolg van

die direkte effek van die ionofoor op die ATPase ensiem in die intakte membraan. Hierdie effek word slegs verkry indien die lipiedannulus van die ATPase versteur is deur Triton. Hasselbach *et al.* (1983) het voorgestel dat omdat die inhibering voorkom in teenwoordigheid van sekere Tritonkonsentrasie-grense, dit daarop dui dat die effektiwiteit van die ionofoor afhanklik is van die verspreiding van die ionofoor tussen die ensiem en die lipied-Tritonfase. By hoër Tritonkonsentrasies mag die ionofoor eerder bind met die Tritonmiesele wat in oormaat teenwoordig is en dit het die herstel van die ATPase-aktiwiteit tot gevolg.

Dat die ionofoor wel die ATPase proteïen direk inhibeer is bevestig deur gebruik te maak van geïsoleerde SSR ATPase ensieme (Fig. 5.2D). Die ionofoor in teenwoordigheid van Triton het 'n inhiberende effek op die ATPase-aktiwiteit maar geen herstel van aktiwiteit is verkry tot by 'n Tritonkonsentrasie van 0,2%. By hoër Tritonkonsentrasies is daar wel 'n geleidelike herstel (Resultate nie getoon). Die herstel van die ATPase-aktiwiteit na die eerste inhibisiegebied is dus die gevolg van die spesifieke struktuur-funksieverhouding in die intakte membraan. Die verskynsel van inhibisiegebiede kom dus slegs by intakte membrane voor en nie by geïsoleerde ATPase nie. Die studies wat in die literatuur gerapporteer is het ook van intakte SR membrane gebruik gemaak. Daar is dus verder gekonsentreer op die intakte SR membraan.

Dit is duidelik dat die inhibisiegebiede moet saamval met tempobepalende stappe in die reaksiesiklus van die SR ATPase ensiem. McIntosh & Ross (1985) het gerapporteer dat inhibering van die hidrolise van die fosfo-ensiem voorkom by 0,03% Triton in teenwoordigheid van A23187. Aangesien die eerste inhibisiegebied voorkom by 0,03% Triton is dit dus moontlik dat A23187 'n inhiberende effek uitoefen op hierdie stap in die reaksiesiklus van die SR ATPase (Stap 8 van Fig. 1.3).

Hierdie eerste inhibisiegebied word deur hoë Ca^{2+} -konsentrasies uitgeskakel (Fig. 5.4). Dit is nie duidelik hoe Ca^{2+} hierdie inhibisie kan voorkom nie. Moontlik verhoed hoë vrye Ca^{2+} -konsentrasies dat die ionofoor aan die ATPase proteïen bind. Figuur 5.8 ondersteun hierdie moontlikheid aangesien die kombinasie van A23187 en Triton 'n tipiese kompeterende inhibisiepatroon lewer. Die presiese meganisme betrokke moet nog vasgestel word.

Daar is gerapporteer dat die inbou van Triton in biologiese membrane meer effektief plaasvind by hoër temperature (Helenius & Simons, 1975). Dit mag

verklaar waarom daar by 25°C nie 'n tweede inhibisiegebied voorkom nie, maar wel by 35°C (Fig. 5.2C). Hierdie tweede inhibisiegebied kom voor by 0,08% Triton en is die opvallendste by lae vrye Ca²⁺-konsentrasies. Dit mag verband hou met die verandering in Ca²⁺-affiniteit tydens die binding van Triton aan die SR membraan wat onlangs gerapporteer is (Plank & McIntosh, 1985). Hierdie tweede inhibisiegebied is baie sensitief vir vrye Ca²⁺ en word geredelik verhoog deur die vrye Ca²⁺-konsentrasie te verhoog (Fig. 5.4). Dit ondersteun die vermoede dat die verlaging van die Ca²⁺-affiniteit van die ATPase ensiem hier 'n rol speel.

In teenstelling met die bevindinge van Hasselbach et al. (1983) het die kombinasie van A23187 en Triton ook inhibisiegebiede tot gevolg. Figuur 5.6 toon dat A23187 in afwesigheid van Triton 'n stimulerende effek op die ATPase-aktiwiteit het. Die snypunt van die reguit lyn op die X-as is 'n aanduiding dat die ionofoor se stimulerende effek indirek is en nie as gevolg van 'n interaksie tussen die ionofoor en die Ca²⁺-bindingsplekke van die ATPase proteïen nie. Figuur 5.7 toon dat Triton 'n direkte stimulerende effek op die Ca²⁺-bindingsplekke van die ATPase proteïen het en die snypunt van die reguit lyn op die Y-as val. Dit word bevestig deur die stimulerende effek wat Triton in afwesigheid van A23187 op die geïsoleerde ATPase het (Fig. 5.2D). Figuur 5.8 vertoon 'n tipiese kompeterende inhibisiepatroon. Die kombinasie van A23187 en Triton het dus 'n direkte inhiberende effek op die Ca²⁺-bindingsplekke van die ATPase proteïen. Dit word ook bevestig deur die effek van A23187 en Triton op die geïsoleerde ATPase (Fig. 5.2D). Dit is dus duidelik dat A23187 slegs in teenwoordigheid van Triton die Ca²⁺-bindingsplekke van die ATPase proteïen direk kan beïnvloed. Die A23187 word dus saam met die Triton in die lipiedannulus ingedra en is dan in staat om die ATPase-aktiwiteit direk te inhibeer. By hoër temperature (35°C) is die lipiedannulus meer vloeibaar en word die inhiberende effek van A23187 by laer Tritonkonsentrasies verkry (Fig. 5.2C). Die effek van die ionofoor is waarskynlik op die tempo-bepalende stappe van die reaksiesiklus van die ensiem. Hierdie inhibering van die ATPase-aktiwiteit deur die ionofoor is ook, in teenstelling met die bevindinge van Hasselbach et al. (1983), Ca²⁺-sensitief.

5.3.3 Invloed van A23187 en Triton op die CSR ATPase-aktiwiteit

Inhibisiegebiede kom ook voor indien die CSR ATPase-aktiwiteit bepaal word in teenwoordigheid van A23187 en verskillende Tritonkonsentrasies. Hierdie inhibisiegebiede vertoon dieselfde patroon as dié wat met SSR verkry is. Die

inhibering is in dieselfde orde (40-60%) as by SSR. Die herstel na die eerste inhibisiegebied is ook telkens byna volledig en na die tweede inhibisiegebied slegs 85%. Dit is byna identies aan die bevindinge met SSR.

Die CSR ATPase is egter sensitiewer vir die kombinasie van A23187 en Triton. Die hoeveelheid Triton wat nodig is om die inhibisiegebiede by CSR te vertoon verskil met 'n faktor 10 van die Tritonkonsentrasie by SSR. Baie minder Triton en A23187 is dus nodig om die inhibisiegebiede te vertoon. Dit is in ooreenstemming met die resultate wat verkry is met tripsienvertering en temperatuurstudies waar daar aanduidings gevind is dat die lipiedannulus van die CSR ATPase waarskynlik meer vloeibaar is by laer temperature en die ATPase dus meer toeganklik is vir eksterne faktore (Hoofstuk 3). Die ionofoor benodig dus laer Tritonkonsentrasies om die lipiedannulus te versteur en die A23187 in kontak met die ATPase proteïene te bring. Laer vrye Ca^{2+} -konsentrasies is ook nodig om die inhibisiegebiede by CSR uit te skakel (Fig. 5.5). Dit is in ooreenstemming met die bevindinge van Plank & McIntosh (1985) dat Triton die Ca^{2+} -affiniteit van die ATPase verlaag. Die inhibisiegebiede by CSR kom by laer Tritonkonsentrasies voor en minder Ca^{2+} sal dus nodig wees om die inhibisiegebied uit te skakel.

Die volgende gevolgtrekkings kan gemaak word:

- i) Die A23187 en Triton kan moontlik dieselfde tempobepalende stappe in die reaksiesiklusse van SSR en CSR ATPase ensiem beïnvloed. Moontlik besit SSR en CSR ATPase ensieme dieselfde reaksiesiklusse, maar daar is nie genoeg bekend oor die reaksiesiklus van die CSR ATPase om 'n afleiding te maak nie.
- ii) Die CSR ATPase is klaarblyklik meer sensitief vir die ionofoor as SSR ATPase.
- iii) Die CSR ATPase is meer onstabiel, moontlik as gevolg van 'n hoër vloeibaarheid van die lipiedannulus.

Uit hierdie resultate is dit duidelik dat die verskille in die reaksies van CSR en SSR op die toevoeging van Triton en A23187 kwantitatief eerder as kwalitatief is. Daar is egter ook opvallende ooreenkomste wat mag dui op ooreenkomste in die reaksiesiklusse van die twee tipes ATPase. Voorlopige resultate wat in samewerking met Prof. M.C. Berman verkry is deur gebruik te maak van TNP-ATP, bevestig hierdie vermoede. Hierdie ondersoek is egter nog onafgehandel.

HOOFSTUK 6

GEVOLGTREKKINGS

Tydens hierdie vergelykende studie is die stabiliteit van SSR en CSR ondersoek deur die SR bloot te stel aan eksterne fisies-chemiese faktore. Daar is ook aandag gegee aan die meganismes betrokke by die interaksie tussen die SR en die eksterne faktore. Die gevolgtrekkings wat gemaak is na die verskillende afdelings word dus kortliks hier saamgevat.

Daar is vasgestel dat die onstabiliteit van CSR tydens die veroudering van die CSR preparaat, gepaard gaan met 'n verhoogde membraandeurlaatbaarheid vir Ca^{2+} . Die verhoogde deurlaatbaarheid het 'n ont koppeling tussen Ca^{2+} -opname en ATPase-aktiwiteit tot gevolg. Deur gebruik te maak van PMSF, 'n inhibeerder van proteolitiese ensieme, is vasgestel dat kontaminerende proteolitiese ensieme in 'n mindere mate bydra tot die onstabiliteit van CSR tydens veroudering. Dit word bevestig deur die bevindinge wat met tripsienvertering verkry is. Proteolitiese vertering deur tripsien benadeel die tempo van Ca^{2+} -transport meer as die kapasiteit van die SR vesikels. Tydens veroudering vind die teenoorgestelde plaas en die kapasiteit van die vesikels neem af as gevolg van deurlaatbaarheid terwyl die tempo van Ca^{2+} -transport stabiel bly. Veroudering het dus 'n verhoogde deurlaatbaarheid tot gevolg en proteolitiesevertering inhibeer ensiemaktiwiteit. Daar is bevind dat oksidasie die grootste bydrae tot die onstabiliteit van CSR lewer en dat oksidasie van die lipiedkomponent van die SR membraan waarskynlik die oorsaak van verhoogde deurlaatbaarheid is. Die CSR membraan bevat meer lipiede as die SSR membraan en dit verklaar waarom veroudering en oksidasie die CSR preparaat meer gereidelik beskadig. Die meganisme betrokke by beskadiging van die membraan deur oksidasie is van só 'n aard dat slegs vrye Ca^{2+} die vesikel kan verlaat en nie Ca^{2+} -oksalaat nie. Oksidasie het dus die skepping van klein porieë of die beskadiging van bestaande kanale tot gevolg.

Die vertering van die SR membrane deur tripsien het ook aan die lig gebring dat die ATPase-aktiwiteit van CSR, meer gereidelik beskadig word deur tripsienvertering as die geval by SSR. Die CSR ATPase is ook meer sensitief vir hoë temperature, pH-veranderinge en die Ca^{2+} -ionofoor A23187. Die CSR ATPase word dus makliker deur eksterne fisies-chemiese faktore beskadig as SSR ATPase. Hierdie hoër sensitiwiteit dui op kwantitatiewe verskille tussen SSR en CSR.

Dit mag dui op oriëntasieverskille van die ensiemolekule in die SR membraan en dat die CSR ATPase proteïene se funksionele dele meer oppervlakkig geleë is. 'n Ander moontlikheid is dat die lipiedannulus van die CSR ATPase van so 'n aard is dat die ATPase minder beskerm is teen eksterne faktore. Die lipiedannulus van CSR ATPase is moontlik meer vloeibaar by lae temperature as die annulus van die SSR ATPase.

CSR is ook minder stabiel as SSR indien dit blootgestel word aan hoë temperature. Alhoewel die optimale temperatuur vir SSR en CSR Ca^{2+} -opname in teenwoordigheid van oksalaat baie dieselfde is, word die CSR ATPase reeds by 45°C beskadig indien die inkubasie lank genoeg duur. Die CSR ATPase is dus sensitiewer as SSR ATPase vir hoë temperature. CSR vesikels word meer deurlaatbaar vir vrye Ca^{2+} by temperature laer as 25°C in vergelyking met SSR wat by $30-35^{\circ}\text{C}$ meer deurlaatbaar word. Die hoë temperature verhoog die membraandeurlaatbaarheid deur die skepping van klein porieë of die beskadiging van bestaande kanale soos die normale vrystellingskanale, en nie deur die oopbreek van die vesikels nie. Hierdie verhoogde membraandeurlaatbaarheid word nie veroorsaak deur endogene fosfolipase nie. Rutheniumrooi, 'n bekende inhibeerder van Ca^{2+} -vrystellingskanale in SSR en CSR, is instaat om die temperatuur-geïnduseerde membraandeurlaatbaarheidsveranderinge by CSR te voorkom. Dit wil dus voorkom asof die hoë temperatuur die Ca^{2+} -vrystellingskanale van die CSR vesikel beskadig om sodoende die membraan deurlaatbaar te maak vir Ca^{2+} . Die meganisme betrokke by die temperatuur-geïnduseerde membraandeurlaatbaarheidsveranderinge by SSR verskil egter van die meganisme betrokke by CSR aangesien selfs hoë rutheniumrooikonsentrasies geen effek daarop het nie. Dit dui op kwalitatiewe verskille tussen SSR en CSR membrane en kan ook dui op kwalitatiewe verskille wat die meganisme van Ca^{2+} -vrystelling betref. Dit bevestig die bevindinge van Endo (1985) dat daar verskille bestaan tussen SSR en CSR Ca^{2+} -vrystelling. Ontkoppeling tussen CSR Ca^{2+} -opname en ATPase-aktiwiteit vind ook meer gereedelik plaas tydens pH-veranderinge. Die CSR is dus minder stabiel tydens pH-veranderinge as SSR. Daar is gevind dat die optimale pH vir beide SSR en CSR Ca^{2+} -opname 7,0 is terwyl die optimale pH vir die bepaling van ATPase-aktiwiteit 7,6 is. Daar is ook gevind dat indien pH-veranderinge aangebring word in reaksiemengsels, die vrye Ca^{2+} -konsentrasies baie verander. Hierdie veranderende vrye Ca^{2+} -konsentrasies beïnvloed die eksperimentele resultate nadelig en moet voorkom word deur die vrye Ca^{2+} -konsentrasies konstant te hou indien pH-veranderinge aangebring word.

Aangesien die CSR membraan groter hoeveelhede lipiede bevat word meer Triton X-100 benodig om die lipiede op te los. SSR los dus meer geredelik op in Triton in vergelyking met CSR. Hasselbach *et al.* (1983) het beweer dat slegs X537A in teenwoordigheid van Triton instaat is om SSR ATPase-aktiwiteit te inhibeer. In teenstelling hiermee is daar aangetoon dat A23187 ook die SSR ATPase-aktiwiteit inhibeer en hierdie verskynsel is dus nie uniek aan die Ca^{2+} -ionofoor X537A nie. Die ionofoor in teenwoordigheid van Triton het ook 'n inhiberende effek op geïsoleerde SSR ATPase ensieme maar geen herstel van ATPase-aktiwiteit kom by hoër Tritonkonsentrasies voor nie. Die verskynsel van 'n inhibering van ATPase aktiwiteit by sekere Tritonkonsentrasies, gevolg deur 'n herstel van ATPase-aktiwiteit by hoër Tritonkonsentrasies ('n inhibisiegebied), kom dus slegs by die intakte SR membraan voor en moet die gevolg van die spesifieke struktuur-funksieverhouding in die intakte membraan wees.

Die enkele inhibisiegebied wat by 25°C waargeneem word en ook as die eerste van twee inhibisiegebiede by 35°C waargeneem word, vind waarskynlik plaas as gevolg van die inhibering van die hidrolise van die fosfo-ensiem deur A23187. Hierdie eerste inhibisiegebied word deur hoë Ca^{2+} -konsentrasies uitgeskakel. Moontlik verhoed hoë vrye Ca^{2+} -konsentrasies dat die ionofoor aan die ATPase proteïen bind. Die tweede inhibisiegebied wat by 35°C voorkom is baie sensitief vir vrye Ca^{2+} en mag verband hou met die verandering in Ca^{2+} -affiniteit tydens die binding van Triton aan die SR membraan. Hierdie Ca^{2+} -sensitiwiteit van die inhibisiegebiede is in teenstelling met die bevindinge van Hasselbach *et al.* wat beweer het dat die inhibisiegebied nie deur Ca^{2+} uitgeskakel kan word nie. Uit die resultate is dit duidelik dat A23187 slegs in teenwoordigheid van Triton instaat is om die ATPase ensiem direk te inhibeer. Die A23187 word saam met die Triton in die lipiedannulus ingedra waar dit die ATPase ensiem direk kan inhibeer. Die effek van die ionofoor is waarskynlik op die tempobepalende stappe van die reaksiesiklus van die ensiem.

Hierdie patroon van inhibisiegebiede wat met SSR en die kombinasie van A23187 en Triton verkry is, is ook met CSR verkry. Die inhibering en herstel van die ATPase-aktiwiteit by CSR vertoon dieselfde patroon as by SSR. Die CSR ATPase is egter sensitiewer vir die kombinasie van A23187 en Triton en tien keer minder Triton is nodig om die inhibisiegebiede te kry. Dit dui daarop dat die lipiedannulus van die CSR ATPase meer vloeibaar is en minder Triton is nodig om A23187 tot by die ATPase ensiem te dra. Dit het tot gevolg dat by laer Tritonkonsentrasies minder Ca^{2+} nodig is om die inhibisiegebied uit te skakel.

Dit is dus duidelik dat die verskille in die reaksie van SSR en CSR op die kombinasie van A23187 en Triton kwantitatief eerder as kwalitatief is. Die opvallende ooreenkomste mag dui op ooreenkomste in die reaksiesiklusse van SSR en CSR ATPase.

Dit wil dus voorkom asof daar beide kwantitatiewe en kwalitatiewe verskille tussen SSR en CSR bestaan. Die CSR membraan bevat meer lipiede en cholesterol, terwyl die ATPase-inhoud van die CSR membraan baie laer is as in die SSR membraan. Dit het tot gevolg dat die Ca^{2+} -opname en ATPase-aktiwiteit van CSR laer vertoon as die van SSR. Die CSR ATPase is in die membraan meer toeganklik vir eksterne faktore en word maklik onderdruk. Dit is waarskynlik omdat die lipiedannulus van die CSR ATPase meer vloeibaar is by lae temperature. As gevolg van die hoë sensitiwiteit van CSR moet navorsingsprojekte so beplan word dat die CSR nie blootgestel word aan temperature hoër as $25^{\circ}C$ vir lang tydperke nie. pH-veranderinge moet ook nie aangebring word in reaksiemengsels sonder om die vrye Ca^{2+} -konsentrasie te beheer nie.

Daar is ook aanduidings van kwalitatiewe verskille tussen SSR en CSR. Die meganisme van temperatuur-geïnduseerde membraanleakbaarheid verskil tussen SSR en CSR en dit dui op verskille wat die meganisme van Ca^{2+} -vrystelling betref. Resultate en bevindinge wat met SSR verkry word kan dus nie gebruik word om die funksionering van CSR te verklaar nie.

Daar is ook ooreenkomste gevind tussen SSR en CSR. Dieselfde optimale pH geld vir die funksionering van SSR en CSR en die optimale temperature verskil ook baie min van mekaar. Dit wil voorkom asof die reaksiesiklusse van SSR en CSR ATPase groot ooreenkomste vertoon en 'n ondersoek is tans besig om hierdie moontlikheid verder te ondersoek.

OPSOMMING

In hierdie projek is die probleem van onstabiliteit van hartspier SR preparate en die meganismes daarby betrokke ondersoek. Die verkose werkswyse was om gegewens wat eksperimenteel en uit die literatuur oor skeletspier SR (SSR) verkry is te vergelyk met eksperimentele gegewens van hartspier SR (CSR) en so die CSR gegewens te interpreteer. Tydens hierdie vergelykende studie is SSR en CSR blootgestel aan veroudering, tripsienvertering, verhoogde temperatuur, pH-veranderinge en die verval van die membraan deur Triton X-100. Die interaksie tussen die ATPase proteïene en Ca^{2+} -ionofore is ook ondersoek.

Uit die literatuur en ons eie resultate is dit duidelik dat die CSR preparaat onstabiel is as die SSR preparaat. Die Ca^{2+} -opname van CSR in afwesigheid van oksalaat neem binne 4 dae na bereiding af met tot 50% terwyl SSR vir ten minste 7 dae stabiel bly. Die moontlike bydrae wat proteolitiese ensieme en oksidasie tot die onstabiliteit van CSR preparate lewer, is ondersoek met behulp van fenielmetielsulfonielfluoried (PMSF), 'n kragtige inhibeerder van proteolitiese ensieme, en twee anti-oksidente, ditiotreitol (DTT) en gebutierdehidroksitolueen (BHT). Daar is vasgestel dat beide proteolitiese vertering en oksidasie 'n bydrae lewer tot die onstabiliteit. Uit die resultate is dit duidelik dat oksidasie die grootste enkele bydrae tot die onstabiliteit lewer.

Daar is ook gevind dat die onstabiliteit gepaard gaan met 'n verhoogde membraandeurlaatbaarheid vir Ca^{2+} en gevolglik 'n ont koppeling tussen Ca^{2+} -opname en ATPase-aktiwiteit veroorsaak. Die lipied:proteïenverhouding van SSR is 35:65 in vergelyking met die 55:45 van CSR. Vanuit die literatuur blyk dit dat oksidasie van die lipiedkomponent waarskynlik die oorsaak van die verhoogde deurlaatbaarheid is.

In vergelyking met SSR, word beide die Ca^{2+} -opname en ATPase-aktiwiteit van CSR meer geredelik deur tripsienvertering benadeel. 'n Moontlike verklaring hiervoor is dat die funksionele dele van die CSR ATPase meer oppervlakkig in die membraan geleë is en meer beskikbaar is vir vertering. Die lipiedannulus van die CSR ATPase kan ook moontlik so 'n samestelling hê dat die CSR ATPase meer blootgestel is aan vertering. Toekomstige navorsing kan meer lig werp op hierdie moontlikhede.

Tripsienvertering van SSR en CSR benadeel die tempo van Ca^{2+} -transport meer as die kapasiteit van die SR vesikels. Dit bevestig die gevolgtrekking dat proteolitiese ensieme 'n ondergeskikte rol speel tydens CSR veroudering wat gepaard gaan met 'n daling in kapasiteit.

Met behulp van temperatuurstudies is vasgestel dat CSR vesikels reeds by 'n temperature laer as 25°C meer deurlaatbaar vir Ca^{2+} word en SSR by $30-35^{\circ}\text{C}$. Daar is vasgestel dat Ca^{2+} die vesikels verlaat deur bestaande kanale of nuutgevormde porieë en nie as gevolg van die oopbreek van die vesikels nie. Met behulp van $120\ \mu\text{M}$ rutheniumrooi ('n Ca^{2+} -vrystellingskanaal-inhibeerder by SSR en CSR) en $400\ \mu\text{M}$ nupercaine ('n fosfolipase A-inhibeerder) is vasgestel dat hoër temperatuur waarskynlik die CSR Ca^{2+} -vrystellingskanale blokkeer en dat intrinsieke fosfolipase A nie betrokke is nie. Aangesien selfs $1\ \text{mM}$ rutheniumrooi nie dieselfde resultate by SSR kon oplewer nie kan aanvaar word dat die meganisme betrokke by SSR temperatuur-geïnduseerde membraandeurlaatbaarheid kwalitatief verskil van die meganisme wat by CSR 'n rol speel.

In vergelyking met SSR vind ont koppeling van Ca^{2+} -opname en ATPase-aktiwiteit van CSR meer gereedelik plaas indien daar pH-veranderinge voorkom. Dit dui op verskille in molekulêre struktuur of oriëntasie van die ATPase molekule in die SR membraan. Daar is ook aangedui dat pH-veranderinge in 'n medium bestaande uit KCl , MgCl_2 , CaCl_2 , EGTA en ATP, gepaard gaan met groot veranderinge in die vrye Ca^{2+} -konsentrasie. Hierdie vrye Ca^{2+} -konsentrasieveranderinge kan eksperimentele resultate beïnvloed en moet verhoed word deur die vrye Ca^{2+} -konsentrasie in die reaksie-medium konstant te hou.

In kombinasie met Triton X-100 het die ionofoor A23187 'n kenmerkende direkte effek op die SSR en CSR ATPase. By SSR kom 'n inhibering van ATPase-aktiwiteit by 25°C in die gebied $0,03-0,05\%$ Triton in teenwoordigheid van $20\ \mu\text{M}$ A23187 voor. By hoër Tritonkonsentrasies herstel die ATPase-aktiwiteit weer. By 35°C kom twee sulke "inhibisiegebiede" voor by Tritonkonsentrasies wat in ooreenstemming gebring kan word met spesifieke tempobepalende stappe in die ensiem se reaksiesiklus. Die ionofoor het ook 'n inhiberende effek op die geïsoleerde SSR ATPase hoewel geen herstel in die Tritonkonsentrasiegebied $0,05-0,08\%$ waarneembaar is nie.

By CSR kom dieselfde reaksiepatroon voor by tien keer laer Tritonkonsentrasies en slegs $5\ \mu\text{M}$ A23187 is nodig. Dit is 'n indirekte aanduiding van ooreenkomste in SSR en CSR ATPase reaksiesiklusse hoewel CSR meer sensitief is.

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DIFFERENCES BETWEEN THE SARCOPLASMIC RETICULUM OF SKELETAL AND CARDIAC MUSCLE

101

SUMMARY

In this project the problem of the instability of cardiac sarcoplasmic reticulum (CSR) preparations and the mechanisms concerned were investigated. The chosen method was to compare experimental results obtained together with those given in the literature on the skeletal sarcoplasmic reticulum (SSR) with experimental results obtained on the CSR and thus to interpret the CSR results. During this comparative study the SSR en CSR were exposed to aging, trypsin digestion, increased temperature, pH changes and solubilization of the membrane by Triton X-100. The interaction between the ATPase protein and Ca^{2+} ionophores was also investigated.

From the literature

From the literature and our own results it is clear that CSR preparations are not as stable as SSR preparations. The Ca^{2+} uptake of CSR in the absence of oxalate is reduced to 50% within 4 days after preparation while SSR remains stable for at least 7 days. The possible contribution of proteolytic enzymes and oxidation to the instability of CSR preparations was investigated with the aid of phenylmethanesulfonyl flouride (PMSF) which has a strong inhibiting influence on proteolytic enzymes and two antioxidants dithiothreitol (DTT) and butylated hydroxytoluene (BHT). It was found that both the proteolytic digestion and oxidation contribute to the instability. From the results obtained it is clear that oxidation is the greatest single factor causing the instability.

It was also found that the instability is coupled with an increased Ca^{2+} permeability of the CSR membrane and the uncoupling of Ca^{2+} transport from ATPase activity. The lipid:protein ratio of SSR is 35:65 compared with the 55:45 of CSR. From the literature it is clear that oxidation of the lipid component is probably the cause of the increased permeability.

Compared with SSR, both the Ca^{2+} uptake and ATPase activity of CSR are more adversely affected by trypsin digestion. A possible explanation for this is that the functional parts of the CSR ATPase is located nearer the surface of the membrane and is thus more readily digested. The lipid annulus of the CSR ATPase may also be of such a nature that the CSR ATPase is more exposed to digestion. Future research should shed more light on these possibilities.

Trypsin digestion of the SSR and CSR reduces the rate of Ca^{2+} transport more than the capacity of the SR vesicles. This confirms the assumption that proteolytic enzymes play a minor role during CSR aging and instability, which is coupled with a reduction in capacity.

With the aid of temperature studies it was found that CSR vesicles become more permeable to Ca^{2+} at temperatures below 25°C , while SSR becomes more permeable to Ca at $30\text{--}35^{\circ}\text{C}$. It was determined that Ca^{2+} leakage from the vesicles occurs through existing channels or through newly formed pores and not as the result of the break up of the vesicles. With the aid of $120\ \mu\text{M}$ ruthenium red (an inhibitor of Ca^{2+} release channels in SSR and CSR) and $400\ \mu\text{M}$ nupercaine (an inhibitor of phospholipase activity) it was determined that high temperatures seem to expose the CSR Ca^{2+} release channels and that intrinsic phospholipase A is not involved. Due to the fact that $1\ \mu\text{M}$ ruthenium red cannot give the same results with SSR, it can be assumed that the mechanism involved in SSR temperature-induced permeability changes differ from the mechanism which affects CSR.

Compared with SSR, uncoupling of Ca^{2+} uptake and ATPase activity in CSR occurs more readily during pH changes. This indicates differences in molecular structure or orientation of the ATPase molecule in the SR membrane. It was also shown that pH changes in a medium consisting of KCl, MgCl_2 , CaCl_2 , EGTA and ATP, are coupled with great changes in the free Ca^{2+} concentration. These free Ca^{2+} concentration changes can influence the experimental results and must be prevented by keeping the free Ca^{2+} concentration in the reaction medium constant.

In combination with Triton X-100 the Ca^{2+} ionophore A23187 has a distinctive direct effect on the SSR and CSR ATPase. In the presence of $20\ \mu\text{M}$ A23187 and 0,03-0,05% Triton the SSR ATPase activity at 25°C declines. At higher Triton concentrations the ATPase activity increases again. At 35°C there are two such "inhibiting areas" or dips at Triton concentrations which can be coupled to specific rate-limiting steps in the enzyme's reaction cycle. The ionophore also has an inhibiting effect on the isolated SSR ATPase but no increase of activity in the Triton concentration area 0,05-0,08% was noticeable.

CSR shows the same reaction pattern at ten times lower Triton concentrations and only $5\ \mu\text{M}$ A23187 is necessary. This is an indirect indication that the SSR and CSR ATPase reaction cycles are similar, although CSR is more sensitive.

LITERATUURLYS

- AGOSTINI, B., SUKO, J. & HASSELBACH, W. 1975. Cytochemical studies on sarcoplasmic reticulum of heart and skeletal muscle. (In Fleckenstein, A. & Dhalla, N.S., *red.* Recent advances in studies on cardiac structure and metabolism, Volume 5. Baltimore: University Park Press. p. 125-131.)
- ARIKI, M. & SHAMOO, A.E. 1983. Oxidation of reactive sulfhydryl groups of sarcoplasmic reticulum ATPase. Biochim. Biophys. Acta, 734: 83-90.
- BARLOGIE, B., HASSELBACH, W. & MAKINOSE, M. 1971. Activation of calcium efflux by ADP and inorganic phosphate. FEBS Lett., 12: 267-268.
- BAYLOR, S.M., CHANDLER, W.K. & MARSHALL, M.W. 1983. Sarcoplasmic reticulum calcium release in frog skeletal muscle fibres estimated from arsenazo III calcium transients. J. Physiol. (London), 344: 625-666.
- BENNET, H.S. & PORTER, K.R. 1953. An electron microscope study of sectioned breast muscle of the domestic fowl. J. Anat., 93: 61-105.
- BENNETT, J.P., MCGILL, K.A. & WARREN, G.B. 1980. The role of lipids in the functioning of a membrane protein: the sarcoplasmic reticulum calcium pump. Curr. Top. Membr. Transp., 14: 127-164.
- BERMAN, M.C. 1982. Energy coupling and uncoupling of active calcium transport by sarcoplasmic reticulum membranes. Biochim. Biophys. Acta, 694: 95-121.
- BILEZIKJIAN, L.M., KRANIAS, E.G., POTTER, J.D. & SCHWARTZ, A. 1982. Studies on phosphorylation of canine cardiac sarcoplasmic reticulum by calmodulin-dependent protein kinase. Circ. Res., 49: 1356-1362.
- BLAZYK, J., WU, C.-J. & WU, S.-C. 1985. Correlation between lipid fluidity and tryptic susceptibility of Ca^{2+} -ATPase in sarcoplasmic reticulum membranes. J. Biol. Chem., 260: 4845-4849.
- BLOOM, W. & FANCETT, D.W. 1975. A textbook of histology, 10th ed. Philadelphia: W.B. Saunders. p. 288-330.
- BONNET, J.P., GALANTE, M., BRÉTHES, D., DEDIEU, J.C. & CHEVALLIER, J. 1978. Purification of sarcoplasmic reticulum vesicles through their loading with calcium phosphate. Arch. Biochem. Biophys., 191: 32-41.

- BORCHMAN, D., SIMON, R. & BICKNELL-BROWN, E. 1982. Variation in the lipid composition of rabbit muscle sarcoplasmic reticulum membrane with muscle type. J. Biol. Chem., 257: 14136-14139.
- BRAHM, J. 1982. Diffusional water permeability of human erythrocytes and their ghosts. J. Gen. Physiol., 79: 791-819.
- CAMPBELL, K.P. & MacLENNAN, D.H. 1982. A calmodulin-dependent protein kinase system from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. J. Biol. Chem., 257: 1238-1246.
- CAMPBELL, K.P., MacLENNAN, D.H., JORGENSEN, A.O. & MINTZER, M.C. 1983. Purification and characterization of calsequestrin from canine cardiac sarcoplasmic reticulum and identification of the 53 000 dalton glycoprotein. J. Biol. Chem., 258: 1197-1204.
- CANALE, E.D., CAMPBELL, G.R., SMOLICH, J.J. & CAMPBELL, J.H. 1986. Cardiac muscle. (In Oksche, A. & Vollrath, L., eds. Handbook of Mikroskopio Anatomy, Volume II/7. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. 318 p.)
- CARAFOLI, E. 1982. The transport of calcium across the inner membrane of mitochondria. (In Carafoli, E., red. Membrane transport of calcium. London: Academic Press. p. 109-139.)
- CARAFOLI, E. 1985. Homeostasis of calcium in heart cells. J. Mol. Cell. Cardiol., 17: 203-212.
- CARAFOLI, E., DABROWSKA, R., CROVETTI, F., TIOZZO, R. & DRABIKOWSKI, W. 1975. An *in vitro* study of the interaction of heart mitochondria with troponin-bound Ca^{2+} . Biochem. Biophys. Res. Comm., 62: 908-912.
- CARSTEN, M.E. 1964. The cardiac calcium pump. Proc. Natl. Acad. Sci., 52: 1456-1462.
- CARVALHO, A.P. & LEO, B. 1967. Effects of ATP on the interaction of Ca^{2+} , Mg^{2+} and K^+ with fragmented sarcoplasmic reticulum isolated from rabbit skeletal muscle. J. Gen. Physiol., 50: 1327-1352.
- CARVALHO, C.A.M. & SANTOS, M.S.V. 1976. Effect of heat treatment on the ATPase activity of various sarcoplasmic reticulum preparations. Experientia, 32: 428-430.

- CHAMBERLAIN, B.K., LEVITSKY, D.O. & FLEISCHER, S. 1983. Isolation and characterization of canine cardiac sarcoplasmic reticulum with improved Ca^{2+} transport properties. J. Biol. Chem., 258: 6602-6609.
- CHAMBERLAIN, B.K., VOLPE, P. & FLEISCHER, S. 1984. Inhibition of calcium-induced calcium release from purified cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles. J. Biol. Chem., 259: 7547-7553.
- CHANDLER, W.K., RAKOWSKI, R.F. & SCHNEIDER, M.F. 1976. A nonlinear voltage-dependent charge movement in frog skeletal muscle. J. Physiol. (London), 254: 245-283.
- CHEAH, K.S. & CHEAH, A.M. 1981. Skeletal muscle mitochondrial phospholipase A_2 and the interaction of mitochondria and sarcoplasmic reticulum in porcine malignant hyperthermia. Biochim. Biophys. Acta, 638: 40-49.
- CHIEN, K.R., SHERMAN, S.C., MITTNACHT, S. Jr. & FARBER, J.L. 1980. Microsomal membrane structure and function subsequent to calcium activation of an endogenous phospholipase. Arch. Biochem. Biophys., 205: 614-622.
- CHIESI, M. 1979. Temperature-dependency of the functional activities of dog cardiac sarcoplasmic reticulum: a comparison with sarcoplasmic reticulum from rabbit and lobster muscle. J. Mol. Cell. Cardiol., 11: 245-259.
- CHIESI, M. 1984. Cross-linking agents induce rapid calcium release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Biochemistry, 23: 3899-3907.
- CHIESI, M. & CARAFOLI, E. 1982. The regulation of Ca^{2+} transport by fast skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. J. Biol. Chem., 257: 984-991.
- CHIESI, M., GASSER, J. & CARAFOLI, E. 1983. Phospholamban of cardiac sarcoplasmic reticulum consists of two functionally distinct proteolipids. FEBS Lett., 160: 61-66.
- CHU, A., BICK, R.J., TATE, C.A., VAN WINKLE, W.B. & ENTMAN, M.L. 1983. Anion effects on *in vitro* sarcoplasmic reticulum function. J. Biol. Chem., 258: 10543-10550.
- CLELAND, W.W. 1964. Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. Biochemistry, 3: 480-482.

- DAVIDSON, G.A. & BERMAN, M.C. 1985. Interaction of valinomycin and monovalent cations with the (Ca^{2+} , Mg^{2+})-ATPase of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. J. Biol. Chem., 260: 7325-7329.
- DAVIS, B.A., SCHWARTZ, A., SAMAHA, F.J. & KRANIAS, E.G. 1983. Regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport by calcium-calmodulin-dependent phosphorylation. J. Biol. Chem., 258: 13587-13591.
- DEAN, W.L. & SUAREZ, C.P. 1984. Binding, activation and solubilization of the Ca^{2+} -ATPase from sarcoplasmic reticulum by nonionic detergents. Membr. Biochem., 5: 181-191.
- DE MEIS, L. & INESI, G. 1982. ATP synthesis by sarcoplasmic reticulum ATPase following Ca^{2+} , pH, temperature and water activity jumps. J. Biol. Chem., 257: 1289-1294.
- DE MEIS, L. & VIANNA, A.L. 1979. Energy interconversion by the Ca^{2+} -dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum. Ann. Rev. Biochem., 48: 275-292.
- DRUMMOND, G.I. & DUNHAM, J. 1978. Adenylate cyclase in cardiac microsomal fractions. J. Mol. Cell. Cardiol., 10: 317-331.
- DUNNETT, J. & NAYLER, W.G. 1979. Effect of pH on calcium accumulation and release by isolated fragments of cardiac and skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Arch. Biochem. Biophys., 198: 434-438.
- DUX, L. & MARTONOSI, A. 1984. Membrane crystals of Ca^{2+} ATPase in sarcoplasmic reticulum of fast and slow skeletal and cardiac muscle. Eur. J. Biochem., 141: 43-49.
- EBASHI, S. 1960. Calcium binding and relaxation in the actomyosin system. J. Biochem. (Tokyo), 48: 150-151.
- EBASHI, S. & ENDO, M. 1968. Calcium ion and muscle contraction. Progr. Biophys. Mol. Biol., 18: 123-183.
- EBASHI, S., ENDO, M. & OHTSUKI, I. 1969. Control of muscle contraction. Quart. Rev. Biophys., 2: 351-384.
- ELETR, S. & INESI, G. 1972. Phospholipid orientation in sarcoplasmic membranes: spin-label ESR and proton NMR studies. Biochim. Biophys. Acta, 282: 174-179.

- ENDO, M. 1977. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. Phys. Rev., 57: 71-108.
- ENDO, M. 1985. Calcium release from sarcoplasmic reticulum. (In Bronner, F. & Shamoo, A.E., eds. Current topics in membranes and transport, Volume 25. Orlando: Academic Press. p. 181-230.)
- ENDO, M., TANAKA, M. & OGAWA, Y. 1970. Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned muscle fibres. Nature, 228: 34-36.
- FABIATO, A. & FABIATO, F. 1979(a). Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells. J. Physiol. (Paris), 75: 463-505.
- FABIATO, A. & FABIATO, F. 1979(b). Calcium and cardiac excitation-contraction coupling. Ann. Rev. Physiol., 41: 473-484.
- FAIRHURST, A.S., THAYER, S.A., COLKER, J.E. & BEATTY, D.A. 1983. A calcium antagonist drug binding site in skeletal muscle sarcoplasmic reticulum: evidence for a calcium channel. Life Sci., 32: 1331-1339.
- FARNEY, D.E. & GOLD, A.M. 1963. Sulfonyl fluorides as inhibitors of esterases. I. Rates of reaction with acetylcholinesterase, α -chymotrypsin and trypsin. J. Am. Chem. Soc., 85: 997-1000.
- FIENN, W. & HASSELBACH, W. 1970. The effect of phospholipase A on the calcium transport and the role of unsaturated fatty acids in ATPase activity of sarcoplasmic vesicles. Eur. J. Biochem., 13: 510-518.
- FISKE, C.H. & SUBBAROW, Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorous. J. Biol. Chem., 66: 375-400.
- FORD, L.E. & PODOLSKY, R.J. 1970. Regenerative calcium release within muscle cells. Science, 167: 58-59.
- FORSSMANN, W.G. & GIRARDIER, L. 1970. A study of the T-system in rat heart. J. Cell. Biol., 44: 1-8.
- FRANSON, R.C., PANG, D.C., TOWLE, D.W. & WEGLIICKI, W.B. 1978. Phospholipase A activity of cardiac sarcolemma from hamster and dog. J. Mol. Cell. Cardiol., 10: 921-930.

- FRANZINI-ARMSTRONG, C. 1970. Studies on the triad. I. Structure of the junction in frog twitch fibres. J. Cell. Biol., 47: 488-499.
- FRANZINI-ARMSTRONG, C. 1980. Structure of sarcoplasmic reticulum. Federation Proc., 39: 2403-2409.
- FRANZINI-ARMSTRONG, C. & PORTER, K. 1964. Sarcolemmal invaginations constituting the T-system in fish muscle fibres. J. Cell. Biol., 22: 675-696.
- FROUD, R.J. & LEE, A.G. 1986. Conformational transitions in the Ca^{2+} + Mg^{2+} -activated ATPase and the binding of Ca^{2+} ions. Biochem. J., 237: 197-206.
- FUCHS, F. 1974. Striated muscle. Ann. Rev. Physiol., 36: 461-502.
- GARRICK, R.A. & CHINARD, F.P. 1982. Membrane permeability of isolated lung cells to nonelectrolytes at different temperatures. Am. J. Physiol., 243: C285-292.
- GRASSI DE GENDE, A.O. & ALONSO, G.L. 1985. Effect of pH on Calcium ion dependence of dog cardiac sarcoplasmic reticulum adenosine triphosphatase activity. J. Mol. Cell. Cardiol., 17: 505-509.
- HANSON, J. & HUXLEY, H.E. 1953. Structural basis of the cross-striations in muscle. Nature, 172: 530-532.
- HARIGAYA, S. & SCHWARTZ, A. 1969. Rate of calcium binding and uptake in normal and failing human cardiac muscle. Circ. Res., 25: 781-794.
- HASSELBACH, W. 1964. Relaxing factor and the relaxation of muscle. Progr. Biophys. & Biophys. Chem., 14: 167-222.
- HASSELBACH, W. 1980. Quantitative aspects of the calcium concept of excitation contraction coupling: a critical evaluation. Basic. Res. Cardiol., 75: 2-12.
- HASSELBACH, W., LÜDI, H. & MIGALA, A. 1983. Inactivation of the calcium-transport ATPase in the sarcoplasmic reticulum by the combined effect of Lasoloid and Triton X-100. Eur. J. Biochem., 132: 9-13.
- HELENIUS, A. & SIMONS, K. 1975. Solubilization of membranes by detergents. Biochim. Biophys. Acta, 415: 29-79.

- HOWELL, J.N. 1982. The interaction between ruthenium red and the isolated sarcoplasmic reticulum. Membr. Biochem., 4: 235-245.
- IKEMOTO, N. 1982. Structure and function of the calcium pump protein of sarcoplasmic reticulum. Ann. Rev. Physiol., 44: 297-317.
- IKEMOTO, N., ANTONIU, B. & KIM, D.H. 1984. Rapid calcium release from the isolated sarcoplasmic reticulum is triggered via the attached transverse tubular system. J. Biol. Chem., 259: 13151-13158.
- IKEMOTO, N., BHATNAGAR, G.M. & GERGELY, J. 1971(a). Fractionation of solubilized sarcoplasmic reticulum. Biochem. Biophys. Res. Comm., 44: 1510-1517.
- IKEMOTO, N., SRETER, F.A. & GERGELY, J. 1971(b). Structural features of the surface of the vesicles of FSR - lack of functional role in Ca^{2+} -uptake and ATPase activity. Arch. Biochem. Biophys., 147: 571-582.
- INESI, G. 1985. Mechanism of calcium transport. Ann. Rev. Physiol., 47: 573-601.
- INESI, G. & ASAI, H. 1968. Trypsin digestion of fragmented sarcoplasmic reticulum. Arch. Biochem. Biophys., 126: 469-477.
- INESI, G. & HILL, T. 1983. Calcium and proton dependence of sarcoplasmic reticulum ATPase. Biophys. J., 44: 271-280.
- INESI, G., MILLMAN, M. & ELETR, S. 1973. Temperature-induced transitions of function and structure in sarcoplasmic reticulum membranes. J. Mol. Biol., 81: 483-504.
- INESI, G. & SCALES, D. 1974. Tryptic cleavage of sarcoplasmic reticulum protein. Biochemistry, 13: 3298-3306.
- JONES, D.P., THOR, H., SMITH, M.T., JEWELL, S.A. & ORRENIUS, S. 1983. Inhibition of ATP-dependent microsomal Ca^{2+} sequestration during oxidative stress and its prevention by glutathione. J. Biol. Chem., 258: 6390-6393.
- JORGENSEN, A.O., SHEN, A.C.-Y., CAMPBELL, K.P. & MacLENNAN, D.H. 1983. Ultrastructural localization of calsequestrin in rat skeletal muscle by immunoferritin labeling of ultrathin frozen sections. J. Cell. Biol., 97: 1573-1581.

- JORGENSEN, A.D., SHEN, A.C.-Y., MacLENNAN, D.H. & TOKUYASU, K.T. 1982. Ultrastructural localization of the Ca^{2+} + Mg^{2+} -dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum in rat skeletal muscle by immunoferritin labeling of ultrathin frozen sections. J. Cell. Biol., 92: 409-416.
- KASAI, M. & MIYAMOTO, H. 1973. Depolarization induced calcium release from sarcoplasmic reticulum membrane fragments by changing ionic environment. FEBS Lett., 34: 299-301.
- KASAI, M. & MIYAMOTO, H. 1976. Depolarization-induced calcium release from sarcoplasmic reticulum fragments. J. Biochem., 79: 1053-1066.
- KATZ, A.M. & REPKE, D.I. 1967. Quantitative aspects of dog cardiac microsomal calcium binding and calcium uptake. Circ. Res., 21: 153-162.
- KATZ, A.M., REPKE, D.I., UPSHAW, J.E. & POLASCIK, M.A. 1970. Characterization of dog cardiac microsomes. Use of zonal centrifugation to fractionate fragmented sarcoplasmic reticulum, $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -activated ATPase and mitochondrial fragments. Biochim. Biophys. Acta, 205: 473-490.
- KIRCHBERGER, M.A. & TADA, M. 1976. Effects of adenosine 3^1 - 5^1 -monophosphate-dependent protein kinase on sarcoplasmic reticulum isolated from cardiac and slow and fast contracting skeletal muscles. J. Biol. Chem., 251: 725-729.
- KLAUSNER, R.D., FISHMAN, M.C. & KORNOVSKY, J.M. 1979. Ionophore A23187 disrupts membrane structure by modifying protein-lipid interactions. Nature, 281: 82-83.
- KRAUSE, S. & HESS, M.L. 1984. Characterization of cardiac sarcoplasmic reticulum dysfunction during short-term, normothermic, global ischemia. Circ. Res., 55: 176-184.
- KÜBLER, W. & SHINEBOURNE, E.A. 1971. Calcium and the mitochondria. (In: Harris, P. & Opie, L., eds. Calcium and the heart. London: Academic Press. p. 93-123.)
- LANGER, G.A. 1968. Ion fluxes in cardiac excitation and contraction and their relation to myocardial contractility. Physiol. Rev., 48: 708-757.

- LEVITSKY, D.O., BENEVOLENSKY, D.S., LEVCHENKO, T.S., SMIRNOV, V.N. & CHAZOV, E.I. 1981. Calcium-binding rate and capacity of cardiac sarcoplasmic reticulum. J. Mol. Cell. Cardiol., 13: 785-796.
- LIGHTY, G.W. & BERTRAND, H.A. 1979. Cardiac sarcoplasmic reticulum isolation from slaughterhouse beef heart. Anal. Biochem., 99: 41-52.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275.
- MacLENNAN, D.H. 1970. Purification and properties of an adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum. J. Biol. Chem., 245: 4508-4518.
- MacLENNAN, D.H. 1974. Isolation of a second form of calsequestrin. J. Biol. Chem., 249: 980-984.
- MacLENNAN, D.H. & REITHMEIER, R.A.F. 1982. The structure of the $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ -ATPase of sarcoplasmic reticulum. Membr. Transp., 1: 567-571.
- MacLENNAN, D.H., ZUBRZYCKA-GAARN, E. & JORGENSEN, A.O. 1985. Assembly of the sarcoplasmic reticulum during muscle development. (In Bronner, F., Knauf, P.A. & Cook, J.S., eds. Current topics in membranes and transport, Volume 24. Orlando: Academic Press. p. 337-368.)
- MALAN, N.T., SABBADINI, R., SCALES, D. & INESI, G. 1975. Functional and structural roles of sarcoplasmic reticulum protein components. FEBS Lett., 60: 122-125.
- MARSH, B.B. 1952. The effects of adenosine triphosphate on the fibre volume of a muscle homogenate. Biochim. Biophys. Acta, 9: 247-260.
- MARTONOSI, A.M. 1984. Mechanisms of Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. Physiol. Rev., 64: 1240-1320.
- MASORO, E.J. & YU, B.P. 1970. The functions of the lipids and lipoproteins of sarco-tubular membranes in calcium transport. Lipids, 6: 357-368.
- McINTOSH, D.B. & BOYER, P.D. 1983. Adenosine 5¹-triphosphate modulation of catalytic intermediates of calcium ion activated adenosine triphosphatase of sarcoplasmic reticulum subsequent to enzyme phosphorylation. Biochemistry, 22: 2867-2875.

- McINTOSH, D.B. & ROSS, D.C. 1985. Role of phospholipid and protein-protein associations in activation and stabilization of soluble Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. Biochemistry, 24: 1244-1251.
- MEISSNER, G. 1986. Evidence of a role for calmodulin in the regulation of calcium release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Biochemistry, 25: 244-251.
- MEISSNER, G., CONNER, G.E. & FLEISCHER, S. 1973. Isolation of sarcoplasmic reticulum by zonal centrifugation and purification of Ca^{2+} -pump and Ca^{2+} -binding proteins. Biochim. Biophys. Acta, 298: 246-269.
- MELTZER, S. & BERMAN, M.C. 1984. Effects of pH, temperature, and calcium concentration on the stoichiometry of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum. J. Biol. Chem., 259: 4244-4253.
- MICHALAK, M. & MacLENNAN, D.H. 1980. Assembly of sarcoplasmic reticulum. Biosynthesis of the high affinity calcium binding protein in rat skeletal muscle cell cultures. J. Biol. Chem., 255: 1327-1334.
- MILLMAN, M.S. 1980. A thermal transition of passive calcium efflux in fragmented sarcoplasmic reticulum. Membr. Biochem., 3: 271-290.
- MIYAMOTO, H. & RACKER, E. 1981. Calcium-induced calcium release at terminal cisternae of skeletal sarcoplasmic reticulum. FEBS Lett., 133: 235-238.
- MOLLA, A., KATZ, S. & DEMAILE, J.G. 1985. Role of calmodulin in the regulation of muscle contraction. (In Bronner, F. & Shamoo, A.E. eds. Current topics in membranes and transport, Volume 25. Orlando: Academic Press, p. 147-180.)
- MÖLLER, J.V., ANDERSON, J.P. & LE MAIRE, M. 1982. The sarcoplasmic reticulum calcium ATPase. Mol. Cell. Biochem., 42: 83-107.
- MORAD, M. & GOLDMAN, Y. 1973. Excitation-contraction coupling in heart muscle: membrane control of development of tension. Prog. Biophys. Mol. Biol., 27: 259-313.
- MOURADIAN, R., WOMERSLEY, C., CROWE, L.M. & CROWE, J.H. 1985. Degradation of functional integrity during long-term storage of a freeze-dried biological membrane. Cryobiology, 22: 119-127.

- NAGAI, T., MAKINOSE, M. & HASSELBACH, W. 1960. Der physiologische erschlaffungsfaktor und die muskelgrana. Biochim. Biophys. Acta, 43: 223-238.
- NAKAMARU, Y. & SCHWARTZ, A. 1970. Possible control of intracellular Ca-metabolism by $[H^+]$: Sarcoplasmic reticulum of skeletal and cardiac muscle. Biochem. Biophys. Res. Comm., 41: 830-836.
- NAKAMARU, Y. & SCHWARTZ, A. 1972. The influence of hydrogen ion concentration on calcium binding and release by skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. J. Gen. Physiol., 59: 22-32.
- NAYLER, W.G. & DRESEL, P.E. 1984. Ca^{2+} and the sarcoplasmic reticulum. J. Mol. Cell. Cardiol., 16: 165-174.
- NAYLER, W.G., DUNNETT, J. & BERRY, D. 1975. The calcium accumulating activity of subcellular fractions isolated from rat and guinea pig heart muscle. J. Mol. Cell. Cardiol., 7: 275-288.
- NAYLER, W.G. & MERRILLEES, N.C.R. 1971. Cellular exchange of calcium. (In Harris, P. & Opie, L., eds. Calcium and the heart. London: Academic Press. p. 24-66.)
- NG, R.H. & HOWARD, B.D. 1980. Mitochondria and sarcoplasmic reticulum as model targets for neurotoxic and myotoxic phospholipase A_2 . Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 1346-1350.
- NIEDERGERKE, R. 1955. Local muscular shortening by intracellular applied calcium. J. Physiol. (LONDON), 128: 12 p.
- NOMURA, K. & NAKAMARU, Y. 1976. Determination of the intravesicular pH of fragmented sarcoplasmic reticulum with 5,5-Dimethyl-2,4-oxazolidinedione. J. Biochem., 80: 1393-1399.
- OKABE, E., KATO, Y., KOHNO, H., HESS, M.L. & ITO, H. 1985. Inhibition by free radical scavengers and by cyclo-oxygenase inhibitors of the effects of acidosis on calcium transport by masseter muscle sarcoplasmic reticulum. Biochemical Pharmacology, 34: 961-968.
- OSTWALD, T.J. & MacLENNAN, D.H. 1974. Isolation of a high affinity calcium-binding protein from sarcoplasmic reticulum. J. Biol. Chem., 249: 974-979.

- OWENS, K., WEGGLICKI, W.B., RUTH, R.C., STAM, A.C. & SONNENBLICK, E.H. 1973. Lipid composition, Ca^{2+} uptake and Ca^{2+} -stimulated ATPase activity of sarcoplasmic reticulum of the cardiomyopathic hamster. Biochim. Biophys. Acta, 296: 71-78.
- PALADE, P., MITCHELL, R.D. & FLEISHER, S. 1983. Spontaneous calcium release from sarcoplasmic reticulum. General description and effects of calcium. J. Biol. Chem., 258: 8098-8107.
- PEACHEY, L.D. & FRANZINI-ARMSTRONG, C. 1983. Structure and function of membrane systems of skeletal muscle cells. (In Peachey, L.D., *red.* Handbook of physiology, sect. 10, Skeletal muscle. Bethesda Maryland: American Physiological Society. p. 23-71.)
- PLANK, B. & McINTOSH, D.B. 1985. Triton X-100 induced changes in conformation and self-association of Ca-ATPase of sarcoplasmic reticulum. (In Berman, M.C., Gevers, W. & Opie, L.H., *reds.* Membranes and Muscle. Oxford: IRL Press. p. 366-367.)
- PRADO, A., ARRONDO, J.L.R., VILLENA, A., GÓÑI, F.M. & MACARULA, J.M. 1983. Membrane-surfactant interactions. The effect of Triton X-100 on sarcoplasmic reticulum vesicles. Biochim. Biophys. Acta, 733: 163-171.
- PRETORIUS, P.J. 1972. The role of cardiac sarcoplasmic reticulum in heart muscle contraction. S.A. Med. J., 46: 777.
- PRETORIUS, P.J. & MALAN, N.T. 1974. Factors affecting calcium transport by cardiac sarcoplasmic reticulum. (In Dhalla, N.S., *red.* Myocardial biology. Recent advances in studies on cardiac structure and metabolism, Volume 4. Baltimore: University Park Press. p. 461-471.)
- PRETORIUS, P.J., POHL, W.G., SMITHEN, C.S. & INESI, G. 1969. Structural and functional characterization of dog heart microsomes. Circ. Res., 25: 487-499.
- RAUCH, B., VON CHAK, D. & HASSELBACH, W. 1978. An estimate of the kinetics of calcium binding and dissociation of the sarcoplasmic reticulum transport ATPase. FEBS Lett., 93: 65-68.
- REITHMEIER, R.A.F., DE LEON, S. & MacLENNAN, D.H. 1980. Assembly of the sarcoplasmic reticulum. Cell-free synthesis of the Ca^{2+} + Mg^{2+} -Adenosin triphosphatase and calsequestrin. J. Biol. Chem., 255: 11839-11846.

- REPKE, D.I. & KATZ, A.M. 1969. Stabilization of cardiac microsomal calcium uptake by hypertonic sucrose solutions. Biochim. Biophys. Acta, 172: 348-350.
- SAITO, K., IMAMURA, Y. & KAWAKITA, M. 1984. Effect of temperature and added ligands on the susceptibility of Ca^{+} , Mg^{+} -adenosine triphosphatase of the sarcoplasmic reticulum to trypsin. J. Biochem., 95: 1297-1304.
- SANDERMANN, H. 1978. Regulation of membrane enzymes by lipids. Biochim. Biophys. Acta, 515: 209-237.
- SCALES, B. & McINTOSH, D.A.D. 1968. Studies on the radiocalcium uptake and the adenosine triphosphatases of skeletal and cardiac sarcoplasmic reticulum fractions (SRF). J. Pharmacol. Exp. Therap., 160: 249-260.
- SCARPA, A., BALDASSARE, J. & INESI, G. 1972. The effect of calcium ionophores on fragmented sarcoplasmic reticulum. J. Gen. Physiol., 60: 735-749.
- SCARPA, A. & LINDSAY, J.G. 1972. Maintenance of energy-linked functions in rat-liver mitochondria aged in the presence of nupercain. Eur. J. Biochem., 27: 401-407.
- SCHNEIDER, M.F. & CHANDLER, W.K. 1973. Voltage dependent charge movement in skeletal muscle: a possible step in excitation-contraction coupling. Nature, 242: 244-246.
- SCHWARTZ, A., ENTMAN, M.L., KANIKE, K., LANE, L.K., VAN WINKLE, W.B. & BORNET, E.P. 1976. The rate of calcium uptake into SR of cardiac muscle and skeletal muscle. Biochim. Biophys. Acta, 426: 57-72.
- SHIGEKAWA, M., FINEGAN, J-A.M. & KATZ, A.M. 1976. Calcium transport ATPase of canine cardiac sarcoplasmic reticulum. J. Biol. Chem. 251: 6894-6900.
- SHOSHAN, V., MacLENNAN, D.H. & WOOD, D.S. 1981. A proton gradient controls a calcium-release channel in sarcoplasmic reticulum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 4828-4832.
- SOMMER, J.R. & JOHNSON, E.A. 1970. Comparative ultrastructure of cardiac cell membrane specializations. A review. Ann. J. Cardiol., 25: 184-194.

- SRETER, F.A. 1969. Temperature, pH and seasonal dependence of Ca-uptake and ATPase activity of white and red muscle microsomes. Arch. Biochem. Biophys., 134: 25-33.
- SULAKHE, S.J. & SULAKHE, P.V. 1979. Interactions of ionophores (A23187 and X537A) with sarcolemma and sarcoplasmic reticulum. Gen. Pharmac., 10: 103-113.
- TATE, C.A., CHU, A., McMILLIN-WOOD, J., VAN WINKLE, W.B. & ENTMAN, M.L. 1981. Evidence for a calcium-sensitive factor which alters the alkaline pH sensitivity of SR calcium transport. J. Biol. Chem., 256: 2934-2939.
- THORENS, S. & ENDO, M. 1975. Calcium-induced calcium release and "depolarization"-induced calcium release: their physiological significance. Proc. Jpn. Acad., 52: 473-478.
- TOOGOOD, K.C., FOLSOM, B., TOPPING, T., McCUTCHAN, H., DOLEJSI, M.J., JOHNS, S., STUART, G. & DUNKER, A.K. 1983. Evidence that trypsin digestion exposes a channel in the sarcoplasmic reticulum membrane. Membr. Biochem., 5: 49-75.
- VALE, M.G. & CARVALHO, A.P. 1980. Effect of temperature on the reversal of the calcium ion pump in sarcoplasmic reticulum. Biochem. J., 186: 461-467.
- VAN WINKLE, W.B., PITTS, B.J.R. & ENTMAN, M. 1978. Rapid purification of canine cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. J. Biol. Chem., 253: 8671-8673.
- VIANNA, A.L. 1975. Interaction of calcium and magnesium in activating and inhibiting the nucleoside triphosphatase of sarcoplasmic reticulum vesicles. Biochim. Biophys. Acta, 410: 389-406.
- VILLALAIN, J., FÉLIX, M. & MACARULLA, J.M. 1982. A comparative study of the effect of various detergents on the structure and function of sarcoplasmic reticulum vesicles. Molec. Cell. Biochem., 49: 113-118.
- VOLMER, H. 1981. Temperature-dependence of the functional activities of sarcoplasmic reticulum from locust, cockroach and crayfish muscle. Comp. Biochem. Physiol., 70a: 351-358.
- WEBER, A. 1968. The mechanism of action of caffeine on sarcoplasmic reticulum. J. Gen. Physiol., 52: 760-772.

WEBER, A., HERZ, R. & REISS, I. 1964. Role of calcium in contraction and relaxation of muscle. Fed. Proc., 23: 896-900.

WEBER, A., HERZ, R. & REISS, I. 1966. Study of the kinetics of calcium transport by isolated fragmented sarcoplasmic reticulum. Biochemistry, 345: 329-369.

WHEELDON, L.W. & GAN, K. 1971. Resolution of fragments of plasma and sarcotubular membranes in heart muscle microsomes. Biochim. Biophys. Acta, 233: 37-48.

WHITE, M.D., WARD, S. & KUHN, M.J. 1984. Pore properties of the Golgi membrane from lactating-rat mammary gland. Effects of pH and temperature and reconstitution into phospholipid vesicles. Biochem. J., 217: 297-301.

WINDHOLZ, M., BUDAVARI, S., BLUMETTI, R.F. & OTTERBEIN, E.S., *eds.* 1983. The Merck index. An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals, 10th ed. Rahway, N.J.: Merck & Co. 10000 p.

WINEGRAD, S. 1970. The intracellular site of calcium activation of contraction in frog skeletal muscle. J. Gen. Physiol., 55: 77-88.

YAMAGUCHI, M. & KANAZAWA, T. 1985. Coincidence of H^+ binding and Ca^{2+} dissociation in the sarcoplasmic reticulum Ca -ATPase during ATP hydrolysis. J. Biol. Chem., 260: 4896-4900.

AFKORTINGS

ANSA:	1-Amino-2-hidroksienaftaleen-4-sulfoonsuur	
ATP:	Adenosientrifosfaat	
ATPase:	Adenosientrifosfatase	
BHT:	Gebutileerde hidroksitolueen	
c-AMP:	Sikliese Adosienmonofosfaat	
CSR:	Sarkoplasmiese retikulum van hartspier	
DOC:	Deoksicholaat	-
DTT:	1,4-Ditiotreitol	
EDTA:	Etieleendiamientetra-asynsuur	" 11
EGTA:	Etieleenglikol-bis-(β -amino-eteleter) N,N'-tetra-asynsuur	
K ₂ C ₂ H ₂ O ₄ :	Kaliumoksaalaat	"
MOPS:	Morfolinopropaansulfoonsuur	
Pi:	Anorganiese fosfaat	11
PMSF:	Fenielmetielsulfonielfluoried (C ₇ H ₇ FO ₂ S)	
SSR:	Sarkoplasmiese retikulum van skeletspier	
TCA:	Trichloor-asynsuur	
Tris:	2-Amino-2-hidroksiemetiel-1,3-propaandiol	
v/v	Volume per volume	
w/v	Gewig per volume	

BEDANKINGS

Graag wil ek die volgende persone bedank vir bydraes wat elkeen tot hierdie werk gemaak het:

- Prof. N.T. Malan wat as leier 'n onskatbare bydrae gelewer het. Graag wil ek hom bedank vir sy leiding en die positiewe invloed wat hy op my as navorser, dosent en mens uitgeoefen het.
- Prof. P.J. Pretorius vir sy belangstelling en aanmoediging.
- Mev. R. Taljaard vir haar hulp, vriendskap en aanmoediging.
- Mev. N. Barnard vir haar hulp en bydrae.
- Die personeel van die Departement Fisiologie vir hul vriendskap.
- Mev. H.W. van Wyk vir die skets van Figure 1.1 en 1.2.
- Mevv. G.M. Els en R. Ehlers vir die taalkundige versorging van die proefskrif.
- Mr. N.P. van den Heever vir die taalkundige versorging van die Engelse opsomming.
- My vrou, Delene vir die tikwerk en ook vir haar bystand, liefde en opofferings.
- My ouers vir hul liefde, hulp en ondersteuning deur die jare.

Aan God drie-enig kom al die lof, dank en aanbidding toe.