

**PROTEIENSINTESE IN
HARTSPIERWEEFSEL VAN DIE ROT**

deur

JAN DANIEL VAN DER WALT

**Proefskrif voorgelê ter voldoening aan die vereistes vir die graad
Doctor Scientiae (Biochemie) aan die Potchefstroomse
Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys**

Promotor: Dr. C.J. Reinecke

POTCHEFSTROOM

OKTOBER 1972

Aan my vrou, kinders en familie.

INHOUD

HOOFSTUK 1	INLEIDING	1
HOOFSTUK 2	LITERATUUROORSIG	4
2.1	Inleiding	4
2.2	Sintese van proteïene	6
2.2.1	Biosintese van spesifieke proteïene in hartspierweefsel	6
2.2.1.1	<u>In vivo</u> -sintese	7
2.2.1.2	<u>In vitro</u> -sintese met polisome	12
2.2.1.3	Sintese met hartspier-skyfies	16
2.3	Gevolgtrekking en Probleemstelling	21
2.4	Benaderingswyse van die ondersoek	22
2.4.1	Rol van Ca^{++} en Mg^{++} in proteïensintese	22
2.4.2	Eksitasie-kontraksie-koppeling	24
2.4.3	Die effek van inhibeerders	27
2.4.3.1	Lokalisering van glikosiede	28
2.4.3.2	Effek van glikosiede op Ca^{++} -transport	30
HOOFSTUK 3	DIE ROL VAN Ca^{++} EN Mg^{++} IN PROTEÏENSINTESE BY GEÏSOLEERDE POLISOME	34

3.1	Inleiding	34
3.2	Strukturele en funksionele karakteristieke van rothart- polisome	35
3.2.1	Metode vir die bereiding van polisome	35
3.2.2	Sukrosegradiëntsentrifugering van die polisoompreparaat	36
3.2.3	<u>In vitro</u> -proteïensintese met rothartpolisome	39
3.3	Die invloed van Ca^{++} en Mg^{++} in die bereiding van polisome op die proteïensintese-aktiwiteit	40
3.4	Die invloed van Ca^{++} en Mg^{++} op proteïensintese met polisome berei in aanwesigheid van Mg^{++}	43
3.5	Invloed van Ca^{++} en Mg^{++} op proteïensintese met polisome berei in aanwesigheid van Ca^{++}	50
3.6	Sedimentasie van polisome in sukrosegradiënte met Ca^{++} en Mg^{++}	54
3.7	Konklusies	58

HOOFSTUK 4	DIE EFFEK VAN HARTGLIKOSIEDE OP DIE KALSIUMOPNAME DEUR DIE MIKRO- SOMALE-FRAKSIE VAN HARTSPIER- WEEFSEL	59
4.1	Inleiding	59
4.2	Die opname van Ca^{++} deur rot- hart sarkoplasmatiese retikulum	60

4.2.1	Metode	61
4.2.1.1	Isolering van mikrosome uit rothartweefsel	61
4.2.1.2	Ca^{++} -opname	63
4.2.1.3	Radioaktiwiteitsmeting van $^{45}\text{Ca}^{++}$	64
4.2.1.4	Berekening	64
4.3	Resultate	64
4.3.1	Die effek van ouabaïen op die Ca^{++} -opname	65
4.3.2	Die effek van digitoksien op die Ca^{++} -opname	67
4.4	Samevatting	69

HOOFSTUK 5	DIE INVLOED VAN HARTGLIKOSIEDE OP DIE PROTEÏENSINTESE IN HART- SPIERWEEFSEL	71
5.1	Inleiding	71
5.2	Sintese van proteïene in hart- spierweefselpreparate	72
5.2.1	Bereiding van die preparate en kondisies vir sintese	72
5.2.2	Ekstraksie van oplosbare proteïene	73
5.2.3	Ekstraksie van aktomiosien	74
5.3	Die effek van Ca^{++} en Mg^{++} op die sintese	75
5.4	Die invloed van hartglikosiede op proteïensintese met hart- spierpreparate	78
5.4.1	Die effek van ouabaïen	79

	5.4.2 Die effek van digitoksien	83
	5.5 Konklusies	88
HOOFSTUK 6	DIE DIREKTE EN INDIREKTE EFFEK VAN OUABAÏEN EN DIGITOKSIEN OP DIE PROTEÏENSINTESE	90
6.1	Inleiding	90
6.2	Die effek van ouabaïen en digi- toksien op proteïensintese deur geïsoleerde rothartpoliso- me	91
6.2.1	Die invloed van ouabaïen	92
6.2.2	Die invloed van digitoksien	93
6.3	Die opname van suurstof deur geïsoleerde mitochondria	94
6.3.1	Metode	95
6.4	Resultate	97
6.4.1	Die effek van ouabaïen	97
6.4.2	Die effek van digitoksien	99
6.5	Konklusies	101
HOOFSTUK 7	ALGEMENE BESPREKING	103
HOOFSTUK 8	MOONTLIKE TOEPASSING VAN DIE GEGEWENS	114
8.1	Inleiding	114
8.2	Metode	115
8.2.1	Dosering van die proef- diere	115
8.2.2	Isolering van hartmikro- some	115

8.3	Resultate	116
8.3.1	Die invloed van gousiekte op die Ca^{++} -opname	117
8.4	Konklusies	120
HOOFSTUK 9	OPSOMMING	122
	SUMMARY	124
	LITERATUUR	126
	AFKORTINGS	132
	MATERIAAL	133
	BEDANKINGS	134

HOOFSTUK 1

INLEIDING

Die meganisme van proteïensintese is vandag, in hoof-trekke, reeds goed opgeklaar. Hiertoë is veral deur gebruikmaking van selvrye sisteme van bakteriële oorsprong gekom. Die mees algemeen gebruikte van hierdie selvrye sisteme is dié van Escherichia coli en Bacillus Stearotermophilus. Na mate die kennis aangaande die proteïensintese egter toegeneem het, is meer aandag geskenk aan die sintese by hoër organismes waaronder ook soogdiere. Aangesien dit bekend is dat die lewer 'n aktiewe orgaan is in die sintese van verskillende metaboliete, onder andere ook proteïene, is die ondersoeke na die in vitro-sowel as in vivo-proteïensintese taamlik algemeen op die lewer uitgevoer. Ook die selvrye sisteem van retikulosiete is by die bestudering van proteïensintese by hoër organismes besonder goed gebruik. Dit is veral omdat in hierdie seltipes 'n homogene boodskapper RNA voorkom (wat die informasie vir die α en β -kettings van hemoglobien bevat) en omdat die polisome van retikulosiete nie membraangebonde is nie. Hierdeur kan die polisome dus met 'n redelike milde metode van sellise in 'n hoë mate van intaktheid verkry word.

Proteïensintese in weefseltipes byvoorbeeld spierweefsel, waarby veel moeiliker tegnieke vir polisoombe-reiding gebruik moet word, staan vandag egter meer in die sentrum van belangstelling. Dit kan veral

toegeskryf word aan die besondere eie aard van hierdie weefsel tipe maar andersyds ook aan die moontlikheid om die sintese van spesifieke proteïene, byvoorbeeld miosien, in hierdie sisteme te bestudeer. Hierdie aspekte word in hoofstuk 2 van hierdie proefskrif nader bespreek.

Verskeie ondersoekers het die waarneming gemaak dat Ca^{++} -ione 'n stimulerende effek op die proteïensintese uitoefen (Farese, 1971). Teenstrydige hipoteses aangaande die betekenis van hierdie verskynsel bestaan in die literatuur (vergelyk hoofstuk 2). Enersyds word gestel dat Ca^{++} -ione in hartspierweefsel sy invloed via membraanpermeabiliteit vir die monomere vir proteïensintese, naamlik aminosure, uitoefen (Kypson & Hait, 1971), terwyl Kaplan & Richman (1971) andersyds postuleer dat die Ca^{++} -effek direk op die translasië-vlak uitgeoefen word. In hoofstuk 3 van hierdie proefskrif word hierdie probleem nader ondersoek, en tewens tot die ewe belangrike rol van Mg^{++} -ione in die proteïensintese, gerelatifeer.

Aangesien Ca^{++} intrasellulêr by uitstek gemoeid is met die eksitasie-kontraksie-koppelingsmeganisme is met behulp van die invloed van hartglikosiede op die Ca^{++} -transport (hoofstuk 4) en die proteïensintese (hoofstuk 5) 'n korrelasie getrek tussen intrasellulêre Ca^{++} en die proteïensintese. Die effek van die glikosiede op die energie verskaffing in die sel (hoofstuk 6) as moontlike bydraende faktor tot die inhibitoriese effek van hierdie stowwe op die proteïensintese is ook gekontroleer.

Al hierdie resultate word in hulle geheel en in hulle samehang in hoofstuk 7 bespreek. Die betekenis en implikasie van hierdie gegewens word dan ten slotte toegepas op 'n besondere tipe kardiomiopatie wat veral in die landboubedryf in Suid-Afrika van besondere belang is, naamlik gousiekte (hoofstuk 8). Hierdie laaste hoofstuk dien dan veral tot doel om enkele perspektiewe vir toekomstige navorsing, waar die basiese navorsing ook 'n toegepaste aksent verkry, daar te stel.

LITERATUUROORSIG

2.1 INLEIDING

Spierweefsel, een van die vernaamste weefsels in die liggaam, is in die verlede nie dikwels gebruik as 'n bron vir polisome nie, aangesien spierweefsel besonder moeilik is om te homogeniseer. Die relatief ruwe prosedures wat aangewend word om die taai sitostruktuur te verbreek om die ribosome vry te stel, het uitgesproke beskadiging aan subsellulêre strukture tot gevolg en lei tot swak opbrengste van ribosome wat swaar gekontamineer is met ander sellulêre strukture. 'n Ander probleem is die relatief lae sintetiese aktiwiteit van veral hartspierweefsel in vergelyking met 'n orgaan met 'n hoë mitotiese indeks soos die lewer (Earl & Korner, 1965). Alhoewel die sisteme vir proteïensintese in hartspierweefsel dus alreeds bekend is, word daar by die bestudering daarvan probleme ondervind. Metodes word bespreek waardeur proteïensintese in vitro bestudeer kan word.

Voordat tot 'n bespreking van die sintese van hartspierproteïene oorgegaan kan word, is dit allereers nodig dat kortliks verwys word na die aard en organisasie van die kontraktiele elemente, waarna telkens in die bespreking verwys sal word.

Ekstraksie van proteïen uit hartspeer met water gee 'n oplossing wat hoofsaaklik uit glikolitiese ensieme bestaan. Met gekontroleerde ekstraksie met 0,6M KCl kan hoofsaaklik twee proteïene geïsoleer word, naamlik miosien en aktien.

Miosien is 'n proteïen met 'n lengte van 1 600 Å en 'n molekulêre gewig van 480 000. Die molekule bestaan uit 'n swaarder kop-gedeelte en 'n twee tot drie bandige heliese stert-gedeelte. Met tripsienvertering van miosien kan dan ook twee fraksies verkry word, naamlik 'n fraksie wat met ultrasentrifugering vinnig sedimenteer en 'n stadiger-sedimenterende fraksie. Eersgenoemde besit beide ATPase aktiwiteit en die vermoë om aktien te bind en staan bekend as swaar meromiosien. Die ligtere fraksie besit geeneen van bogenoemde eienskappe nie en staan bekend as ligte meromiosien.

Aktien is 'n wateroplosbare, globulêre proteïen met 'n molekulêre gewig van 60 000. As die ioniese sterkte van die medium waarin globulêre aktien (G-aktien) voorkom, verander word na 'n samestelling soortgelyk aan sarkoplasma, dan polimeriseer die proteïen na 'n veselagtige, dubbelbandige heliks, naamlik F-aktien.

Aktomiosien wat ook uit spierweefsel geïsoleer kan word, bestaan uit miosien en aktien in 'n verhouding van 3:1 (White et al, 1968; Katz, 1970).

Die dwarsgestreepteid wat so kenmerkend van hart- en

skeletspier is, ontstaan as gevolg van die ligging van die miosienfilamente. Laasgenoemde is die hoofkomponent van die A-band en bepaal ook die lengte daarvan. By die middelpunte van hierdie filamente is daar effense verdikkings wat die miosien in posisie hou. Hierdie dikker gedeelte gee aanleiding tot die M-lyn. Die dunner aktienfilamente strek ongeveer 1 μ na weerskante van die Z-lyn en vorm sodoende die I-band. Hierdie filamente verloop ook nog vir 'n gedeelte van die A-band (dit wil sê tussen die miosien). Die afstand wat die aktienfilamente van weerskante nie in die A-band verloop nie, is die H-band. In die Z-lyngebied skyn dit asof die aktien aan weerskante van hierdie lyn aaneenlopend is met 'n reeks dun, vertakte filamente naamlik die Z-filamente. Hierdie filamente vorm 'n sig-sagpatroon in die Z-lyn. Dit word verder beweer dat die Z-filamente uit die spierproteïen tropomiosien bestaan (Bloom & Fawcett, 1968; Katz, 1970). Troponien op sigself is uiters belangrik in die Ca^{++} -beheer van kontraksie (Schaub et al, 1972).

2.2 SINTESE VAN PROTEÏENE

2.2.1 Biosintese van spesifieke proteïene in hartspierweefsel

2.2.1.1 In vivo-sintese

Verskeie aspekte van proteïensintese in hartspierweefsel word teenswoordig goed ondersoek. Baie van die ondersoeke is egter nie spesifiek vir bepaalde tipes proteïene nie, maar handel veelal oor totale proteïensintese. Wat veral belangrik is ten opsigte van proteïensintese in spierweefsel is die verhouding waarin anaboliese en kataboliese prosesse staan en die relatiewe snelheid van sintese van bepaalde proteïene.

Die navorsingswerk van Kimata & Morkin (1971) werp meer lig op die sintese van veral miosien in verskillende tipes spierweefsel. Hierdie outeurs het die miosiensintese in spierweefsel in vivo ondersoek. Konyne is as proefdiere gebruik. Na 'n vastydperk van 12 uur is ^3H -lisien intraveneus in die diere ingespuut. Proefdiere is geslag na tydperke van 1 - 45 dae na toediening van die radioaktiewe aminosuur. Hartspier en skeletspierweefsel is verwyder. Miosien is uit hierdie weefsels geïsoleer deur toediening van ATP en differensiële ultrasentrifugering. Die miosien is gesuiwer deur middel van chromatografie op DEAE-sellulose. Die hoeveelheid radioaktiwiteit wat ingebou is, is met behulp van 'n vloeistofsintillatieseteller bepaal.

Die bevindings wat met hierdie ondersoek verkry is, dui daarop dat die inkorporasie van lisien na 'n tydsverloop van 24 uur maksimaal is in die geval van hartspier. Die maksimale inkorporasie van lisien in

skeletspier vind eers na 5 dae plaas. In hartspier-weefsel bly die radioaktiwiteit redelik konstant tot en met die vyfde dag en neem daarna vinnig af. Die toestand in skeletspier is ietwat anders, naamlik dat die radioaktiwiteit na die bereiking van die maksimum weer stadig relatief tot hartspier verminder. Die gevolgtrekkings wat hieruit gemaak word, is dat ten spyte van die ooreenkomste in fisiese eienskappe en ensiematiese aktiwiteit tussen hart en rooi skeletspiermiosien die omset van miosien in hartspier heelwat vinniger is as in skeletspier. Alhoewel die mitotiese indeks van hartspier laag is, blyk dit dus dat hierdie weefsel 'n relatief hoë proteïensintese-aktiwiteit het, aangesien die tydsverloop vir maksimale miosiensintese 'n tydsverskil van 24 uur in hartspier ten opsigte van 5 dae in skeletspier vertoon.

Die hart reageer op 'n toename in arbeidbelading deur sy gewig te verhoog. Tydens hierdie respons gaan die hart deur 'n serie van metaboliese aanpassings, insluitende veranderinge in die snelheid en afbreking van miokardiale proteïene. Volgens die meeste ondersoekers wat hierdie probleem ondersoek het, is gevind dat die aminosuur-inkorporasie in hartspierproteïene verhoog word. Schreiber et al (1970) het die sintese van 3 verskillende, spesifieke proteïene tydens akute hemodinamiese oorbelading ondersoek. Hierdie outeurs het die inbou van ^{14}C -lisien in miosien, 'n kontraktilie proteïen en mioglobien, 'n suurstofdraende proteïen asook die omsetting van ^{14}C -prolien na hidroksieprolien, in die vorming van kollageen as aanduiding van die sintese van hierdie

betrokke proteïene gebruik. Hiervoor is van 'n in vivo-sisteem gebruik gemaak. Marmotte is genarkotiseer en die aortas gekateteriseer. Perfusie is hier na onmiddellik begin. Die harte is uit die diere verwyder en in 'n perfusiekamer geplaas waar 500ml van 'n gemodifiseerde aminosuur-Kerbs-Hanseliet-oplossing voortdurend deur die hart gesirkuleer is. ^{14}C -Lisien is by die perfusiemedium gevoeg en die aortadruk hier na verhoog deur gedeeltelike afsluiting van die aortakateter. Na verloop van die gewenste tyd is die hart deurspoel met 'n nie-radioaktiewe perfusiemedium. Die linkerventrikel is gehomogeniseer en miosien met behulp van KCl-ekstraksie daarin geïsoleer. Hierdie ekstrak is dan ontleed vir die aanwesigheid van radioaktiwiteit. Mioglobien is uit 'n ventrikelhomogenaat geëkstraheer deur presipitasie met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Hierdie proteïen is dan ook ondersoek vir die aanwesigheid van radioaktiwiteit. Die omsetting van ^{14}C -prolien na ^{14}C -hidroksieprolien is chromatografies bepaal. Dit is geneem as 'n indikasie vir kollageensintese.

Die bevindings wat deur hierdie outeurs gemaak is, dui daarop dat die sintese van totale proteïene en miosien tydens akute oorbelading verhoog word maar dat dit nie die geval is met mioglobien en kollageensintese nie. Hierdie verskille in sintese was veral betekenisvol na 'n drie uur-perfusietydperk. Dit blyk ook logies dat kollageensintese op hierdie stadium nie verhoog is nie, aangesien dit gewoonlik gepaard gaan met herstelprosesse wat hoogs waarskynlik nog nie binne drie uur na vore sal kom nie. Alles dui dus daarop dat die toename in aminosuur-inkorpora-

sie in totale proteïene geassosieer is met 'n verhoogde inkorporasie in miosien, terwyl mioglobien en kollageen nie direk betrokke is by hierdie vroeë respons nie.

Met hierdie ondersoek is slegs die vroeë effekte van akute oorbelading ondersoek. Geen afleidings kan gemaak word aangaande die meer langtermynrespons nie. Hierdie metode leen homself egter goed daartoe om in vivo-proteïensintese te ondersoek. Verder bied die metode die voordeel dat die sintese van drie spesifieke proteïene ondersoek kan word. Dit bied egter nie die moontlikheid om die subsellulêre meganisme van proteïensintese as sodanig in detail te ondersoek nie en dit moet dus as 'n beperking beskou word. Aan die ander kant hou dit die voordeel in dat hier die sintese onder toestande van korrekte translasie plaasvind, waardeur byvoorbeeld miskodering uitgeskakel word.

In aansluiting by bogenoemde bevindings het Morkin & Ashford (1968) bevind dat rotte waarby eksperimentele hipertrofie opgewek is 'n hoër timidien-³H inbou in DNA vertoon. Hierdie toename in DNA is egter hoofsaaklik gelokaliseer in die interstisiële selle. Daar vind tog wel 'n hoër sintese van RNA en proteïene in die hartsel self plaas. Moroz (1967) het ook bevind dat eksperimenteel-geïnduseerde hipertrofie deur gedeeltelike afsluiting van die aorta die proteïensintese verhoog en dat die effek gelokaliseer is op die mikrosome.

Aangesien die hart op oorbelading reageer deur 'n netto verhoging in proteïensintese, kom die relatiewe verband van sintese en degradering van proteïene nog sterker na vore. 'n Verder studie insake die sintese en degradasie van miosien tydens die ontwikkeling van hipertrofie in die hart is deur Morkin et al (1972) uitgevoer. Konyne is weer eens as proefdiere gebruik. Die proefdiere is egter vooraf geopereer om gedeeltelike afsluiting van die stygende aorta te bewerkstellig. Die eksperimentele prosedure is uitgevoer soos in die studie deur Kimata & Morkin (1971) beskryf.

Die waarnemings wat met hierdie ondersoek verkry is, sluit die volgende in: die linker ventrikulêre gewig tot liggaamsgewig-verhouding het toegeneem; na die tweede dag was die sintese van miosien groter in die proefdiere met gedeeltelike afsluiting van die aorta en het 'n maksimum toename van 117% getoon op die tiende dag; sintese van die linker ventrikulêre totale proteïene het ook 'n maksimum van 56% bereik op die tiende dag en die afname in die spesifieke radioaktiwiteit van miosien in konyne met afsluiting van die aorta was stadiger as kontroles. Die resultate is met behulp van 'n komputer geanaliseer en so-doende is die metabolisme van miosien geëvalueer. Hierdie metode van evaluering van resultate is hoofsaaklik ingevoer ten einde te probeer om die volgende vraag te beantwoord: Is die toename in miosien tydens afsluiting van die aorta as gevolg van 'n verminderde katabolisme of is dit as gevolg van 'n spesifieke verhoging in die sintese? Na sorgvuldige beredenering en vergelyking met die talle teensprekinge

in die literatuur kom die outeurs tot die gevolgtrekking dat die toename in miosieninhoud tydens hipertrofie primêr 'n gevolg is van 'n verhoogde sintese. Schreiber et al (1966, 1967 & 1968) bied gegewens ter ondersteuning van die resultate van Morkin et al (1972) en word ook deur laasgenoemde outeurs aangehaal. In teenstelling tot die voorafgaande beweer Wannemacher (1968) dat proteïene wat tydens hipertrofie gevorm word, hoofsaaklik fibrillêre en sarkoplasmatiese proteïene met 'n vinnige omset is. Dieselfde afleidings is ook deur Gudbjarnason et al (1964) gemaak, naamlik dat infarksie die sintese van proteïene en nukleïesure binne 'n kort tyd verhoog en dat herkonstruksie van kernmateriaal, mitochondria en mikrosome plaasvind. Volgens werk wat deur Zühlke et al (1966) gedoen is, blyk dit dat hartweefsel wat onderhewig is aan kunsmatig geïnduseerde hipertrofie aanvanklik wel 'n stimulerings van die sintese gee, maar tydens die sogenoemde derde stadium of uitputtingstadium daar 'n inhibisie van die sintese plaasvind.

2.2.1.2 In vitro-sintese met polisome

Uit die voorafgaande is dit duidelik dat miosiensintese in hartspierweefsel veral prominent is. Verskeie metodes bestaan ook om die sintese van hierdie spesifieke proteïen te ondersoek. Die vraag ontstaan nou of die spesifieke sintese van miosien deur geïsoleerde polisome in 'n in vitro-sisteem ondersoek kan word. Larson et al (1969) beweer uit elektronmikroskopiese waarnemings wat gemaak is dat polisome in noue asso-

siënsie met miosien voorkom. Volgens hierdie outeurs sou die ribosome op die miosien staties bly terwyl die mRNA oor die ribosome beweeg. Die gevormde proteïensubeenhede (miosien) sou dan direk in die posisie waar dit sal funksioneer ingevoeg word. Heywood et al (1968) het bevind dat RNA wat geassosieer is met miosien hoofsaaklik ribosomale RNA is. Hulle is van mening dat hierdie polisome verantwoordelik is vir die sintese van miosien. Strohman (1966) is van mening dat slegs 20% van die ribosome in spierweefsel aan membrane gebind is. 'n Verdere waarneming wat in hierdie verband gemaak is, is dié van Munro (1970). Hy het bevind dat die polisome wat in spierweefsel voorkom buitengewoon groot is en bestaan uit sowat 50 ribosome wat op 'n boodskapper geaggregeer is. Hierdie groot polisome sou verantwoordelik wees vir miosiensintese.

Nihei (1971) maak 'n duidelike onderskeid tussen membraangebode en vry polisome. 'n Metode vir die bestudering van in vitro-proteïensintese met geïsoleerde polisome is deur bogenoemde outeur beskryf. As proefmateriaal is skeletspierweefsel van rotte gebruik. Die weefsel is uit die proefdier gehaal en alle omhullende membrane, bindweefsel en senuwees is verwyder. Die weefsel is in 'n koue Tris-buffer gehomogeniseer. Polisome is verkry deur die homogenaat aan differensiële ultrasentrifugering te onderwerp. Vry polisome is verkry na sedimentering van die postmitochondriale supernatant deur 2M-sukrose. Gebonde polisome is uit die laag wat na sentrifugering op die 2M-sukrose gedryf het, verkry. Hierdie fraksie is met Lubrol WX en deoksiecholaat behandel en weer

gesedimenteer soos vir vry polisome.

Polisoommateriaal is op sukrosegrediënte ondersoek. Daar is gevind dat die profiele van bogenoemde polisome grootliks ooreenkom maar dat die hoeveelheid vry polisome baie meer is as die gebonde polisome. 'n Selvrye, in vitro-sisteem, is vir die inkorporasie van aminosure saamgestel. Dit het die nodige elektoliete en energiekomponente bevat. 'n Radioaktiewe aminosuurmengsel is toegevoeg en dan geïnkubeer. Na inkubasie is die reaksiemengsel gesentrifugeer. By die supernatant is gesuiwerde rotmiosien en RNase gevoeg. Die mengsel is gedialiseer en die sediment wat na sentrifugering verkry is, is verder ondersoek deur chromatografie van die miosien, akrielamied gelelektroforese van miosien en ook analisering van die geïnkorporeerde radioaktiwiteit. Uit die resultate blyk dit dat 80% van die polisome vry voorkom. Met behulp van die chromatografiese ondersoeke is aangetoon dat die vry polisome verantwoordelik is vir die sintese van miosien.

Alhoewel miosiënsintese 'n groot gedeelte van die totale proteïënsintese in spierweefsel verteenwoordig bestaan verskeie metodes om totale proteïënsintese met behulp van geïsoleerde polisome te bestudeer. Earl & Morgan (1968) het rotte as proefdier gebruik. Die harte is verwyder en in 'n sukrose-Tris-buffer gehomogeniseer. Die homogenaat is aan differensiële ultrasentrifugering onderwerp. Hieruit is polisome en selsap berei. Hierdie preparate is dan vir sintese-eksperimente gebruik. By 'n inkubasiebuffer

wat die nodige ione en energiekomponente bevat, is ^{14}C -leusien gevoeg. Hierdie outeurs lê veral klem op die kondisies waaronder gehomogeniseer word. Dit het geblyk dat K^+ 'n baie belangrike kation in die homogeniseringsmedium is. Verandering van die K^+ -konsentrasie van 0 tot 150mM het 'n skerp toename in die opbrengs van hartpolisome tot gevolg gehad. Konsentrasies van hoër as 150mM het aansienlike oplossing van proteïenmateriaal veroorsaak wat saam met die RNA gesedimenteer het. Die afleiding is gemaak dat konsentrasies van monovalente katione wat as geskik beskou word vir 'n homogeniseringsmedium 100mM KCl en 50mM NaCl is. Hulle het ook bevind dat polisome wat in die aanwesigheid van NH_4Cl berei is, stabiel was tydens inkubasie vir tot 1 uur. Wanneer NH_4Cl uit die bereiding weggelaat is, het 20% van die aktiwiteit ten opsigte van die inkorporasie van aminosure binne die eerste 10 minute verlore gegaan en het daarna geleidelik afgeneem. Hieruit is afgelei dat NH_4Cl in 'n konsentrasie van 0,25M in staat is om kontaminerende nukleases te verwyder. Die isolering van nuklease-vrye preparate uit hartweefsel hou verder dié voordeel in dat korrelasies hierdeur moontlik word tussen aminosuur-inkorporasie in 'n selvrye sisteem en inkorporasie van aminosure deur geïsoleerde, geperfuseerde harte.

Wanneer deoksiecholaat tydens die bereiding weggelaat is, het membrane ook met sentrifugering gesedimenteer. Byvoeging van deoksiecholaat het egter die membraanmateriaal verwyder maar geen verandering veroorsaak in die opbrengs van polisome nie. Verder het dit ook

nie die aktiwiteit van die polisome ten opsigte van die inkorporasie van aminosure geaffekteer nie. Die gevolgtrekking wat hieruit gemaak word, is dat die polisome in hartweefsel nie gebind is aan 'n retikulum nie maar vry voorkom. Gevolglik kan deoksiecho-laas as 'n geskikte en skadelose metode gebruik word om membrane te verwyder.

Die voordele van hierdie metode is (1) dat hoogs reaktiewe polisome hiervolgens uit hartweefsel geïsoleer kan word, en (2) dat dit die moontlikheid bied om verskeie invloede direk op die polisome met betrekking tot die sintese na te gaan. Hier is dus nie sprake van die sintese van 'n spesifieke proteïen nie maar dit gaan om proteïensintese deur hartpolisome in die algemeen.

2.2.1.3 Sintese met hartspierskyfies

Dit is duidelik dat geskikte metodes bestaan vir die bestudering van in vitro-proteïensintese met geïsoleerde polisome. Die proteïensintese is onder hierdie omstandighede egter uit sy verband met ander biochemiese prosesse gehaal en dit is dus nie dieselfde as die normale situasie in vivo nie. Deur gebruik te maak van hartspierskyfies in die bestudering van die proteïensintese word hierdie probleem egter grootliks oorbrug, aangesien van intakte weefsel selle in so 'n sisteem gebruik gemaak word. Beller (1968) beskryf 'n metode om proteïensintese met rothartspierskyfies te bestudeer.

Die harte van proefdiere is uit die diere na 'n kort eter-anestesia verwyder en dadelik afgekoel. Die weefsel is fyngemaak en in 0,1M KCl geplaas. Gelyke dele van die fyngemaakte weefsel is by Eagle se medium gevoeg en geïnkubeer. Tydens die inkubasie is ^3H -leusien toegevoeg. Na verloop van die inkubasie is die weefsel gehomogeniseer en twee proteïen-fraksies geëkstraheer. Oplosbare proteïene is met behulp van 0,1M KCl geëkstraheer en aktomiosien in 0,6M KCl met die byvoeging van ATP. Albei fraksies is in 'n vloeistofsintillasieteller vir radioaktiwiteit ondersoek.

Die resultate wat met hierdie ondersoek verkry is, dui daarop dat die inkorporasie van ^3H -leusien in beide oplosbare proteïene en aktomiosien vir 'n tydperk van ten minste drie uur lineêr is. 'n Verdere waarneming is dat weefselpreparate uit jonger diere 'n hoër spesifieke aktiwiteit vertoon. Die gevolgtrekkings wat uit hierdie ondersoek gemaak is, is dat die inkorporasie van 'n radioaktiewe aminosuur in hartspierproteïene lineêr is met die tydverloop en dat so 'n in vitro-sisteem soos hierbo beskryf, geskik is vir die bestudering daarvan. Die proteïene wat uit die weefsel geëkstraheer word, word op grond van hulle oplosbaarheid in buffers van verskillende ioniese sterktes geïsoleer. Geen aanspraak word gemaak op die suiwerheid van die ekstrakte nie. Daar word verder gekonkludeer dat die omsetting van aktomiosien aansienlik minder is as dié vir oplosbare proteïene.

Die besondere voordele van hierdie metode is ten eerste dat hartweefsel as sodanig gebruik word. Dit beteken dat intakte selle in so 'n preparaat aanwesig is. Hierdeur is verskillende intrasellulêre prosesse dus nie van mekaar geïsoleer nie en sodoende kan die invloed van verskillende eksterne faktore op 'n intakte sisteem nagegaan word, waardeur die onderlinge verband tussen verskillende prosesse moontlik beter geëvalueer kan word. Ten tweede word die sintese van spesifieke proteïene deur hierdie metode bestuur. Dit hou op sigself die moontlikheid in dat verskillende invloede op die sintese van hierdie besondere proteïene nagegaan kan word en dat die spesifieke hoeveelheid sintese van 'n bepaalde proteïen ondersoek kan word.

Die nadele aan hierdie metode verbonde is dat die inwerking van verskillende eksterne faktore op die polisome en ander komponente van die proteïensintese-sisteem nie direk geëvalueer kan word nie. Dit beperk dus die toepassing van hierdie metode in die bestudering van die proteïensintese in die breëre konteks.

'n Toepassing van die metode om proteïensintese met hartweefselstykies uit te voer is deur Kypson & Hait (1971) gemaak om die effek van Ca^{++} , K^{+} en ouabaïen op die sintese na te gaan. Rotte is vir hierdie proefnemings gebruik. Die harte is vinnig uit die proefdier verwyder en die atria baie versigtig van die res van die weefsel losgedissekteer en in strokies gesny. Die weefsel is in 'n fisiologiese soutoplossing geplaas en geweeg. Inkubasie is in 'n gemodi-

fieerde Krebs-Hanseliet-bikarbonaat-buffer uitgevoer nadat die medium deurgespoel is met 'n 95% O₂ en 5% CO₂ mengsel. Twee radioaktiewe aminosure, naamlik ¹⁴C-leusien en ³H-tirosien is bygevoeg. In die eksperimente is K⁺, Ca⁺⁺ en ouabaïen in verskillende konsentrasies toegevoeg om die effek daarvan op die sintese vas te stel.

Na afloop van die inkubasie is die weefsel in sout-oplossing gewas, daarna gehomogeniseer en gesentrifugeer. Die sediment is vir radioaktiwiteit geanaliseer. Oorblywende weefselstroke is voorts gehomogeniseer en differensieel gesentrifugeer. Die verskillende fraksies wat ondersoek is, is totale proteïene, nukleï, mitochondria en mikrosome.

Die belangrikste gegewens wat met hierdie ondersoek na vore gekom het, is die volgende: Ten eerste is gevind dat ouabaïen in konsentrasies van 10⁻⁴ tot 10⁻⁶M die inkorporasie van beide leusien en tirosien in totale proteïene asook al drie die sedimente inhibeer. Dieselfde konsentrasies ouabaïen verminder ook die intrasellulêre aminosuurkonsentrasie. Tweedens is vasgestel dat Ca⁺⁺ in konsentrasies van 2,5 en 5mM die inkorporasie van leusien en tirosien in al die fraksies verhoog. Onder hierdie toestande is die intrasellulêre konsentrasies van albei hierdie aminosure ook verhoog. Derdens is bevind dat hoë konsentrasies K⁺ (119,6M ekw/L) 'n inhibisie van die inkorporasie van leusien in al die fraksies veroorsaak.

Die afleidings wat uit hierdie bevindings gemaak word,

is dat die invloede van ouabaïen, K^+ en Ca^{++} op die inkorporasie van leusien en tiro sien in atriale proteïene veroorsaak word deur 'n effek op die membraantransport van hierdie aminosure. Ouabaïen (10^{-4} en $10^{-6}M$) en K^+ ($119,6M$ ekw/L) inhibeer en Ca^{++} ($2,5$ en $5mM$) stimuleer die transport van die aminosure.

Met hierdie metode is gebruik gemaak van differensiële fraksionering van weefselmateriaal na inkubasie met 'n radioaktiewe aminosuur. Hier is dus nie sprake van die sintese van enige spesifieke proteïene nie. 'n Nadeel van die metode is dat die suiwerheid van die verskillende fraksies onbekend is. Dit bring mee dat slegs 'n globale indruk van die sintese verkry kan word en dat die invloed van 'n eksterne faktor op die sintese deur polisome slegs kwalitatief geëvalueer kan word. Desnieteenstaande bied hierdie metode die moontlikheid om proteïensintese in hartspier in vitro te bestudeer.

'n Soortgelyke studie is deur Kaplan & Richman (1971) uitgevoer. In hierdie ondersoek is die rol van Ca^{++} en Mg^{++} op die snelheid van 3H -leusien inkorporasie in hartspierproteïene ondersoek. Rothartspierskyfies is in Krebs-Ringer-fosfaatbuffer in die aanwesigheid van δf $0,11M$ Ca^{++} δf $0,154M$ Mg^{++} geïnkubeer. Na inkubasie is die skyfies in buffer gewas en gehomogeniseer. Die volgende fraksies is deur differensiële ultrasentrifugering geïsoleer naamlik miofibrille, mitochondria, mitochondria-lisosome, ribosome en sarkoplasma. Hulle het bevind dat die grootste inkorporasie van gemerkte aminosure na vier ure in

die sarkoplasmatiese fraksie voorgekom het met 'n mindere mate van radioaktiwiteit in die ander fraksies. Verder is bevind dat Ca^{++} die sintese na 'n vier uur inkubasieperiode nog verder gestimuleer het, terwyl Mg^{++} geen effek of selfs 'n effense inhiberende effek op hierdie verdere sintese vertoon het. Die afleiding word gemaak dat Ca^{++} moontlik betrokke kan wees by die regulering van die proteïensintese in hartspier=weefsel, terwyl Mg^{++} nie dieselfde rol vervul nie.

2.3 GEVOLGTREKKING EN PROBLEEMSTELLING

Uit al die voorafgaande gegewens is dit duidelik dat Ca^{++} wel die sintese van proteïene in spierweefsel stimuleer. Dit is egter nog slegs waargeneem waar die totale proteïensintese in 'n in vitro-sisteem met hartspierskyfies ondersoek is. Daar bestaan egter 'n meningsverskil oor die vlak waarop die Ca^{++} -effek uitgeoefen word (membraantransport teenoor translasie).

Aangesien daar 'n teenstrydigheid bestaan oor die meganisme van werking van Ca^{++} ten opsigte van proteïensintese, is die primêre vraag wat beantwoord moet word of Ca^{++} 'n invloed op die sintese met geïsoleerde hartpolisome het. Indien dit wel die geval is, kom die volgende aspek na vore, naamlik hoedanig die integrasie tussen biochemiese prosesse in hartspierweefsel is, veral met die oog op die distribusie van Ca^{++} in die sel asook die relatiewe belangrikheid van Ca^{++} en Mg^{++} in die sellulêre metabolisme. Die betekenis van die Ca^{++} -invloed op

die proteïensintese in hartspierweefsel is veral ook interessant in die lig van die besondere rol wat Ca^{++} -ione in 'n ander spierspesifieke proses speel, naamlik die eksitasie-kontraksie-koppeling.

2.4 BENADERINGSWYSE VAN DIE ONDERSOEK

Die invloed van Ca^{++} en Mg^{++} in verskillende konsentrasies is op die sintese van proteïene deur geïsoleerde polisome en hartspierskyfies in vitro ondersoek. Om 'n korrelasie te probeer vind tussen proteïensintese en ander biochemiese prosesse is onder andere die Ca^{++} -opname deur hartmikrosome onder verskillende toestande nagegaan, aangesien Ca^{++} intrasellulêr hoofsaaklik betrokke is by eksitasie-kontraksie-koppeling. Ten einde 'n verband te vind tussen die Ca^{++} -transport en hartspierproteïensintese is in hierdie ondersoek van die invloed van glikosiede gebruik gemaak. Hierdie aspekte sal nou elk in die breë bespreek word.

2.4.1 Rol van Ca^{++} en Mg^{++} in proteïensintese

Uit 'n ondersoek deur Munro et al (1964) na die aard van lewer-polisome is gevind dat Mg^{++} die samestelling van polisome grootliks kan beïnvloed. Hierdie outeurs neem naamlik waar dat vermindering van die Mg^{++} -konsentrasie vanaf 10mM tot 0,001mM die tipiese polisoom-distribusiepatroon met min deeltjies in die monomere ribosoomgebied verander tot feitlik net monomere en dimere met geen polisome nie. Hulle merk verder op dat die aktiwiteit

van hierdie preparate egter nie grootliks verskil ten opsigte van die inbou van aminosure in proteïene nie. Earl & Korner (1965) het bevind dat hartpoliosome geheel en al afgebreek word in die afwesigheid van Mg^{++} . Onder hierdie toestande is slegs monomere ribosome aanwesig en die vermoë om aminosure te inkorporeer is feitlik afwesig. Dit word deur hierdie outeurs beklemtoon dat hartpolisome 'n duidelike sensitiwiteit ten opsigte van Mg^{++} -ione vertoon en dat die boodskapper RNA maklik van die ribosome in die afwesigheid van hierdie ione gedissosieer kan word. Die struktuur van die ribosoom word nie onder hierdie omstandighede beskadig nie, aangesien toevoeging van poli-U 'n sterk stimulerings van aminosuurinkorporasie in vitro veroorsaak. Dit beteken dus dat die ribosome in staat is om 'n aktiewe deeltjie met nuwe m-RNA te vorm. Uit studies wat deur Falvey & Staehelin (1970) uitgevoer is, blyk dit ook duidelik dat die dissosiasie en die reassosiasie van 80S ribosome en 60S en 40S subeenhede tydens die terminering van die sintese van 'n polipeptiedketting ten nouste afhanklik is van Mg^{++} . Bogenoemde outeurs wys ook daarop dat verhoging van die Mg^{++} -konsentrasie die inkorporasie van aminosure in 'n in vitro-sisteem verhoog en dat 'n duidelike optimum konsentrasie eksperimenteel waarneembaar is. Die rol van Ca^{++} in die proteïensintese is egter minder duidelik. Dat Ca^{++} wel 'n invloed op die proteïensintese het, is reeds in 2.2.1.3 aangedui. Die essensiële rol wat Ca^{++} in die eksitasie-kontraksie-koppeling speel, is egter wel bekend. Die hooftrekke hiervan sal nou bespreek word.

2.4.2 Eksitasie-kontraksie-koppeling

Volgens die huidige konsep van eksitasie-kontraksie-koppeling veroorsaak die bewegende sarkolemmale aksiepotensiaal uiteindelik 'n loslating van intrasellulêre Ca^{++} vanuit die sarkoplasmatiese retikulum asook 'n invloed van Ca^{++} deur die sarkolemma. Die vrygestelde Ca^{++} en invloeiende Ca^{++} verhoog die intrasellulêre Ca^{++} -konsentrasie en het tot gevolg die interaksie van die miofibril met ATP wat dan kontraksie veroorsaak. Hierna word die vrygestelde Ca^{++} deur 'n aktiewe proses in die sarkoplasmatiese retikulum terug opgeneem en deur die sarkolemma uitgepomp. Hierdie akkumulering van Ca^{++} veroorsaak dan verslapping wanneer die intrasellulêre Ca^{++} -konsentrasie 'n waarde van kleiner as 10^{-7}M bereik (Lee, 1965). Mitochondria speel waarskynlik ook 'n rol (Carafoli, 1972)

Daar is verskeie aspekte van die aktiewe opname deur die sarkoplasmatiese retikulum wat van die uiterste belang is by die hele eksitasie-kontraksie-koppelingsmeganisme. Prosesse wat nog ondersoek word en waaroor daar nog nie algehele duidelikheid is met betrekking tot die interaksie van Ca^{++} en die membraan van die sarkoplasmatiese retikulum nie, is onder andere die binding van Ca^{++} aan die vesikel-membraan en die ensimatiese aard van die membraan. Chevallier & Butow (1971) het byvoorbeeld aangetoon dat daar in sarkoplasmatiese retikulum-membrane drie verskillende bindingsetels vir Ca^{++} bestaan. Twee van die drie bindingsetels

is spesifiek vir Ca^{++} , terwyl die derde 'n nie-spesifieke setel is nie. Hieruit is dit dus duidelik dat Ca^{++} wel aan die sarkoplasmatiese retikulummembraan bind. Dit is ook deur Ikemoto et al (1971) aangetoon dat ensiemaktiwiteit sowel as alle ander belangrike aktiwiteite met betrekking tot Ca^{++} -transport in die membraan-gedeelte van die sarkoplasmatiese retikulum geleë is. Hierdie outeurs wys egter ook daarop dat 'n beter begrip van struktuur en funksie gevorm sal kan word as die verskillende proteïene van die sarkoplasmatiese retikulum in verband gebring kan word met morfologies-spesifieke komponente.

Die belangrikheid van sis-onversadigde vetsure in die fosfolipiede, vir die funksionering van die membraan ATPase-sisteem ten opsigte van Ca^{++} -transport, blyk uit die gegewens van Fiehn & Hasselbach (1970) en Meissner & Fleischer (1972). Hulle het naamlik bevind dat opbreking van die β -esterband van die fosfolipiede in die membrane van die sarkoplasmatiese retikulum deur middel van fosfolipase A of C, die deurlaatbaarheid van die membraan vir Ca^{++} verhoog waardeur die ATP-aangedrewe berging van Ca^{++} verlore gaan. Makinose (1969) het aangetoon dat 'n membraan-fosfoproteïen-kompleks gevorm word sodra die Ca^{++} -pomp aktief raak. Hierdie kompleks is nie afhanklik van fosfolipiede nie maar wel van Ca^{++} -ione (Meissner & Fleischer, 1972). Benewens die belangrikheid van die lipiede in die Ca^{++} -transportmeganisme dui bogenoemde gegewens ook op die noodsaaklikheid van proteïene in die Ca^{++} -

bindingsmeganisme. Fiehn & Migala (1971) het verder aangetoon dat daar geen verskil bestaan tussen die Ca^{++} -bindingsvermoë van sogenoemde lekkende en oop sarkoplasmatische retikulummembrane in die afwesigheid van ATP nie. Hulle stel voor dat daar 'n spesifieke bindingsmeganisme aan die binnekant van die membraan moet wees. Hierdie bindingsetels is in elk geval nie geheel afhanklik van fosfolipiede nie en die outeurs stel voor dat die waarskynlik proteïen van aard is. 'n Deurbraak is deur MacLennan & Wong (1971) gemaak deurdat hulle 'n spesifieke Ca^{++} -bindingsproteïen, wat hulle kalsekwestrien noem, geïsoleer het. Hierdie proteïen sou volgens dié outeurs aan die binnekant van die sarkoplasmatische membraan voorkom en is betrokke by die gebonde Ca^{++} -fraksie. Dieselfde bevindings is deur Hajdu et al (1971) gemaak deur werk wat op rotdiagragma gedoen is. Verder is deur die Ca^{++} -bindingsproteïen immunologies te toets, gevind dat dit identies is met rotplasma-kardioglobulien-C.

Dhalla et al (1970) het bevind dat adenielsiklase geen rol in die Ca^{++} -transport in hart-sarkoplasmatische retikulum speel nie. Daar heers egter heelwat onsekerheid op hierdie gebied soos ook deur dié outeurs aangetoon word.

Om die verskille en/of ooreenkomste tussen die effekte van Ca^{++} en Mg^{++} op die sintese van hartspierproteïene na te gaan, is die effekte van hierdie katione onder verskillende eksperimentele kondisies ondersoek. In die ondersoeke is van geïsoleerde rothart-polisome

gebruik gemaak. Hierdeur is gepoog om meer inligting in te win aangaande die minder bekende effekte van Ca^{++} , uitgaande van die meer bekende rol van Mg^{++} in die proteïensintese-proses.

2.4.3 Die effek van inhibeerders

Daar bestaan min of geen gegewens aangaande stowwe wat 'n invloed op beide Ca^{++} -transport en proteïensintese uitoefen. Glikosiede het wel 'n duidelike effek op veral hartspierweefsel. Hierdie stowwe veroorsaak 'n sogenoemde positiewe inotrope effek, wat teweeg gebring word deur 'n verandering in die Ca^{++} -distribusie en -opname in die sel (Koch-Weser, 1967; Goodman & Gilman, 1970; Glancy et al, 1971; Koch-Weser, 1971 a,b). Wat die effek van glikosiede op proteïensintese betref en veral hartspierproteïene, is feitlik nog niks bekend nie (Kypson & Hait, 1971). Hierdie outeurs het egter die invloed van ouabaïen op die sintese van hartspierproteïene ondersoek. Die waarneming is gemaak dat ouabaïen by 'n konsentrasie van 10^{-4}M 'n inhibisie van die sintese veroorsaak maar dat hierdie glikosied by 'n konsentrasie van 10^{-7}M 'n swak stimulerings van die sintese tot gevolg het. Verdere waarnemings dui daarop dat toegevoegde Ca^{++} die inhiberende effek van die glikosied ophef en 'n stimulerings van die sintese tot gevolg het.

2.4.3.1 Lokalisering van glikosiede

Gordon & Brown (1966) het bevind dat digitalis nie direk op die kontraktiele proteïen van die hart inwerk nie, maar waarskynlik op die membraan van die verslappingsfaktor. Fricke & Klaus (1971 a) het aangetoon dat hartglikosiede wel aan die mikrosomale membraan bind waar die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ geïnhibeer word. Die konsentrasies waarby die verskillende kardenoliede, naamlik digitoksien, K-strofantien en strofantidien-3-bromoasetaat inhibisie veroorsaak, is 10^{-4} , 2×10^{-4} en 10^{-4}M onderskeidelik. Dit blyk verder dat die graad van fosforilering van 'n intermediêre vorm van die ATPase ook die inhibisie bepaal, naamlik hoe meer gefosforileer hoe minder die inhibisie. Daar word op grond van die werkingstye van die digitalisglikosiede beweer dat daar op die membraansisteem waarskynlik twee reseptore is vir hierdie stowwe en dat een daarvan moontlik die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ kan wees (Fricke & Klaus, 1971 b). Werk wat deur Fujita et al (1971) uitgevoer is, werp meer lig op die digitalis-reseptore in dié opsig dat hulle 'n spesifieke ouabaïensensitiwe ATPase in die intestinale mukosa van rotte aangetoon het. Hierdie is dus nie dieselfde as die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ nie.

Sover dit die opname en binding van glikosiede aangaan, het Dutta et al (1968) verrassende bevindings gemaak. In hulle eksperimente is van ses glikosiede gebruik gemaak, naamlik dihidro-ouabaïen, ouabaïen, digoksien, konvallatoksol, digitoksien en proskillariden. Tydens perfusie van hartweefsel is gevind dat vier van die glikosiede na 2-4 minute 'n ewewig

tussen die hartweefsel en die perfusiemedium bereik. Digitoksien en proskillaridien het nie ewewig bereik nie en na 64 minute het die hartweefsel nog aanhoudend hierdie glikosiede vanuit die perfusiemedium geëkstraheer. Daar is ook verder bevind dat laasgenoemde twee glikosiede die vinnigste uit die weefsel uitge- was kan word. Hulle het aangetoon dat binding aan die mikrosome tweemaal hoër was as aan mitochondria en nuklei. Verder word beweer dat hierdie stowwe deur 'n ATPase-sisteem oor die selmembraan getrans- porteer word. Intracellulêr vind daar dan binding aan spesifieke reseptore plaas. Die teenwoordigheid van twee reseptore word voorgestel. Die normale digitalisreseptor word deur K^+ geïnhibeer en hieraan bind al die genoemde glikosiede behalwe digitoksien en proskillaridien. Die ander reseptor word nie deur K^+ beïnvloed nie en die binding van laasgenoemde twee glikosiede is ook nie afhanklik van ATP nie. Hierdie outeurs is ook van mening dat die Na^+-K^+ -ATPase dus nie die primêre reseptor vir glikosiede is nie. Die gevolgtrekking wat hieruit gemaak word, is dat daar 'n belangrike bindingsetel en reseptor- meganisme vir digitalis in die sarkoplasmatiese retikulum bestaan, waarvan die betekenis nou nie geëvalueer kan word nie.

Lindenmayer & Schwartz (1970) het ook aangetoon dat die binding van ouabafien gepaard gaan met inbouing van fosfaat en dat dit geïnhibeer word deur K^+ en Rb^+ . Bogenoemde outeurs beklemtoon die gedagte van 'n ouabafien-reseptor-kompleks. Die idee van 'n reseptor-glikosied-kompleks word ook deur Allen et

al (1970 en 1971) gehuldig.

Wat die lokalisering van digoksien en digitoksien betref, het Conrad & Baxter (1964) aangetoon dat ^3H -digoksien feitlik uitsluitlik by die A-bande in die spiersel konsentreer en tot 'n geringe mate in die sarkolemma. Hierdie waarnemings is radio-outografies gemaak. Daar is ook verder met behulp van radio-outografie aangetoon dat ^3H -digitoksien op die moment van inotrope-aksie binne in die sel voorkom (Waser, 1962). Met behulp van dieselfde tegniek is ook aangetoon dat ^3H -digoksien in die A-band in die spiersel gelokaliseer is en dat baie min in ander subselelulêre strukture aangetoon kan word (Smith & Fozzard, 1963). Volgens aanhalings van Thorp & Cobbin (1967) is duidelik aangetoon dat ^3H -digitoksien en ^3H -digoksien wel in die A-bandgebied van die spiersel konsentreer, dit wil sê in die miosien-gebied. Daar word geredeneer dat indien hierdie glikosiede direk op aktien, miosien en aktomiosien inwerk, daar veranderinge in die fisiese eienskappe hiervan kan optree.

2.4.3.2 Effek van glikosiede op Ca^{++} -transport

Daar bestaan uitgebreide 'n aansienlike literatuur wat oor die effek van glikosiede op die opname en vrystelling van Ca^{++} handel. Hier volg 'n kort oorsig van die belangrikste aspekte. Selinger et al (1970) beweer dat ouabafien by 'n konsentrasie van 0,1mM geen inhibering van die Ca^{++} -opname veroorsaak nie. Daar is gevind dat amital die Ca^{++} -opname inhibeer en dat hierdie effek teengewerk word

deur ouabaïen, terwyl hoë konsentrasies ouabaïen geen effek op die Ca^{++} -transport het nie (Briggs et al, 1966). Daar is ook deur Lee & Choi (1966) aangetoon dat die hartglikosiede onder andere K-strofantien en ouabaïen die Ca^{++} -opname inhibeer en dat hierdie effek die duidelikste na vore kom by 'n konsentrasie van 10^{-6}M . Die verskynsel dat hoër konsentrasies van die glikosiede 'n minder duidelike effek op die Ca^{++} -opname-inhibering het, kan moontlik toegeskryf word aan 'n inhibering van die $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}$ -geaktiveerde ATPase. Sabatini-Smith & Holland (1967) beweer ook dat Ca^{++} meer uitruilbaar word in die teenwoordigheid van glikosiede. Ouabaïen in terapeutiese konsentrasies ($5 \times 10^{-7}\text{M}$) versnel die vermindering in isometriese kontraktiespanning betekenisvol. Die verklaring wat deur hulle gegee word, is dat die glikosied by hierdie konsentrasies die vrystelling van Ca^{++} uit die bindingsetels verhoog. Resultate wat deur Lüllmann & Holland (1962) verkry is, wys op 'n aantal belangrike aspekte ten opsigte van Ca^{++} en glikosiede. Daar is byvoorbeeld gevind dat Ca^{++} belangrik is vir die werking van glikosiede. Daar word egter gewys op die sogenoemde weefsel Ca^{++} en die uitruilbare fraksie van weefsel Ca^{++} , laasgenoemde waarvan betrokke is by die eksitasie-kontrak-siekoppeling. Ouabaïen in konsentrasies van $2 \times 10^{-7}\text{M}$ tot $2 \times 10^{-6}\text{M}$ het geen effek op die sogenoemde stadige- Ca^{++} uitwaskurwe nie (dit is waarskynlik gebonde Ca^{++} in verskillende weefselfraksies), terwyl 'n konsentrasie van $6 \times 10^{-7}\text{M}$ wat 'n sterk positiewe inotrope-effek vertoon, 'n betekenisvolle toename in die uitruilbare Ca^{++} veroorsaak. By

konsentrasies van $1 \times 10^{-6} \text{M}$ tot $1 \times 10^{-5} \text{M}$ is daar geen effek op $^{45}\text{Ca}^{++}$ -opname in stroke weefsel nie, terwyl hoër konsentrasies ($1 \times 10^{-4} \text{M}$) die opname van $^{45}\text{Ca}^{++}$ aansienlik verhoog het. Wassermann & Holland (1971) het bevind dat ouabaïen by 'n konsentrasie van $5 \times 10^{-7} \text{M}$ 'n verhoogde vrystelling van Ca^{++} tot gevolg het. Daar kan met digitoksien geen effek op die Ca^{++} -opname aangetoon word nie. Die outeurs stel voor dat die effek van ouabaïen moontlik direk op 'n sellulêre bindingsproses vir Ca^{++} uitgeoefen word. Die verskynsel dat lae (nie-toksiese) konsentrasies van ouabaïen die Ca^{++} -opname merkbaar verlaag maar dat hoër (toksiese) konsentrasies die opname van Ca^{++} verhoog, word deur Thorp & Cobbin (1967) sterk beklemtoon. Verskeie ander outeurs wat ook bogenoemde verskynsel waargeneem het, word deur Thorp & Cobbin aangehaal, naamlik Harvey & Daniel (1952), Thomas et al (1958) en Farah & Witt (1963). Verder word ook gestel dat Ca^{++} -ione aan aktomiosien gebind word en in die geval van aktiewe glikosiede is hierdie effek veral duidelik. Hierdie binding gee dan ook verhoogde kontraktiliteit. Bing (1965) wys ook daarop dat glikosiede direk assosieer met die retikulum. Hy beweer ook verder dat ouabaïen die sarkoplasmatiese retikulum antagoneer en Ca^{++} in die sel mobiliseer. Bogenoemde outeur beweer ook dat digitoksien by 'n konsentrasie van 10^{-6}M binding van Ca^{++} aan miosien veroorsaak. Verder beweer Bailey & Ong (1972) dat ouabaïen die loslating van sogenaamde sneller- Ca^{++} in die sel veroorsaak.

Daar bestaan 'n kompetisie deur Na^{+} en K^{+} vir Ca^{++} -

bindingsetels in spierweefsel (Comar & Bronner, 1969). Die gedagte dat digitalis-glikosiede inhibeerders is van die $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -transport en dat hulle ook kontraktieliet beïnvloed deurdat hierdie stowwe veranderinge in die distribusie en mobilisering van Ca^{++} tot gevolg het, waarskynlik sekondêr tot 'n verandering in die intrasellulêre Na^+ konsentrasie, word deur Parsons & Summers (1971) ondersteun. Prasad & Callaghan (1970) het die waarneming gemaak dat ouabaïen (10^{-10}M) 'n inhibisie van membraan ATPase in menslike hartweefsel veroorsaak. Daar is bevind dat met elektriese stimulerings van die ventrikels in honde deur middel van 'n pasaangeër om die aritmieë as gevolg van ouabaïen te oorkom, laasgenoemde glikosied die kontraksiekrag tot 131% bo die normale laat styg. Dit is in dieselfde orde as met isoproterenol (Beiser et al, 1970). Daar is egter outeurs wat geen effek van die glikosiede op die Ca^{++} -opname kon aantoon nie (vergelyk Pretorius et al, 1969).

Voorspruitend uit hierdie genoemde invloede van die hartglikosiede op die hartspierweefsel, is die invloed van twee hartglikosiede, naamlik ouabaïen en digitoksien op die Ca^{++} -transport sowel as die proteïensintese onder verskillende eksperimentele toestande ondersoek. Hierdeur is gepoog om die moontlike onderlinge verband tussen Ca^{++} en proteïensintese verder te ondersoek.

HOOFSTUK 3

DIE ROL VAN Ca^{++} EN Mg^{++} IN PROTEÏENSINTESE BY GEÏSOLEERDE POLISOME

3.1 INLEIDING

Die invloed van Mg^{++} op die proteïensintese in die algemeen sowel as die samestelling van hartpolisome is in die verlede goed ondersoek en verskeie outeurs het reeds na die absolute noodsaaklikheid van Mg^{++} ten opsigte van hierdie aspekte verwys (Munro et al, 1964; Earl & Korner, 1965).

Die belangrike rol van Ca^{++} in die eksitasie-kontrak-sie-koppelings-meganisme en daardeur as faktor in intrasellulêre metabolisme in hartspeer is reeds aangetoon (Lee, 1965; MacLennan & Wong, 1971). Hoewel die invloed van Ca^{++} met betrekking tot die proteïensintese in soogdierweefsel tot onlangs nog minder bekend was, is aangetoon dat Ca^{++} die sintese van proteïene stimuleer. Die verklaring wat hieraan geheg word is (1) 'n verhoging van die membraan-transport van aminosure en (2) volgens Kaplan & Richman moontlik 'n direkte intrasellulêre effek. Ten einde hieroor uitsluitel te kry moet dus direk op polisome gewerk word. Veral in die lig van die besondere rol van Ca^{++} in hartspeer is dit verder ook van algemene belang. Verskillende aspekte van hierdie probleem word in hierdie hoofstuk bespreek.

3.2 STRUKTURELE EN FUNKSIONELE KARAKTERISTIEKE VAN ROTHARTPOLISOME

3.2.1. Metode vir die bereiding van polisome

Die metode wat vir die isolering van rothartpolisome gebruik is, is 'n wysiging van 'n metode soos beskryf deur Earl & Morgan (1968). Die harte van jong rotte, waarvan die herkoms verskil het, is vir alle proefnemings gebruik. Rotte van beide geslagte is gebruik.

Die proefdiere is onthoof en die harte so gou moontlik uit die diere verwyder, oopgeknip en in yskoue homogeniseringsbuffer (200mM sukrose; 20mM Tris-HCl, pH 8,2; 100mM KCl; 50mM NaCl; 1mM $MgCl_2$ of 1mM $CaCl_2$ en 1mM EDTA) gewas. Oorblyfsels van die aortas is verwyder. Die weefsel is deur middel van verplasing geweeg en by 4 volumes homogeniseringsbuffer gevoeg. Daar is met behulp van 'n Ultra Turrax-homogeniseerder by 20 000 o.p.m. vir 30 sekondes gehomogeniseer en na verloop van 1 minuut is weer eens vir 30 sekondes gehomogeniseer. Die homogenaat is met behulp van 'n Spinco 50Ti-rotor in 'n L2 of L3 40 Beckman-ultrasentrifugeerder vir 10 minute by 7 000 o.p.m. gesentrifugeer. Die supernatant is gedekanteer en 5M NH_4Cl , pH 7,6, is bygevoeg tot 'n finale konsentrasie van 0,25M. Vervolgens is 'n oplossing van 10% natriumdeoksiecholaat bygevoeg tot 'n eindkonsentrasie van 0,3%. Die oplossing is liggies geskud om te verseker dat deeglike vermenging van die stowwe plaasvind.

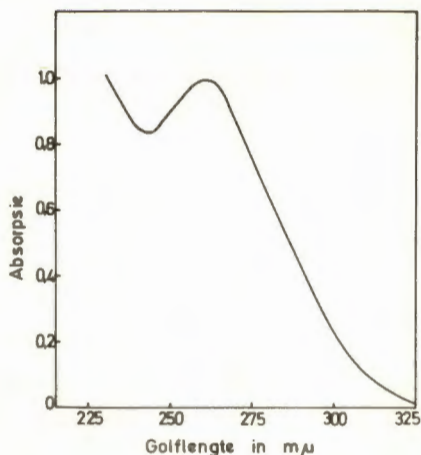
Vir die bereiding van polisome is hierdie behandelde supernatant op 4ml 1M sukrosebuffer (20mM Tris-HCl, pH 7,6; 100mM KCl; 40mM NaCl; 1mM MgCl₂; 1mM EDTA; 6mM β-merkpto-etanol en 250mM NH₄Cl) in 'n sentrifugeerbuis geplaas. Die buise is in 'n Spinco 50-rotor van 'n L3 40 ultrasentrifugeerder geplaas en vir 4 ure by 33 000 o.p.m. gesentrifugeer. Om na sentrifugering kontaminasie van die gesedimenteerde materiaal met die supernatant te verhoed is laasgenoemde met behulp van 'n suigpipet tot by die sukroslaag afgesuig en die wande van die buis met hersuspensiebuffer (20mM Tris-HCl, pH 7,6; 100mM KCl; 40mM NaCl; 3mM MgCl₂ of 3mM CaCl₂; 1mM EDTA en 6mM β-merkpto-etanol) gewas. Die hersuspensiebuffer is verwyder en die sukrose daarna afgegooi. Die oppervlak van die sediment is so gou moontlik met hersuspensiebuffer gewas. Die polisoommateriaal is hierna opgelos in 'n klein volume hersuspensiebuffer (gewoonlik 0,3 - 0,4ml).

Vir die bereiding van selsap is die oorspronklike homogenaat vir 4 ure by 33 000 o.p.m. gesentrifugeer. Alle prosedures en sentrifugering is uitgevoer by 'n temperatuur van 0-4°C.

3.2.2. Sukrosegradiëntsentrifugering van die polisoompreparaat

Die konsentrasie van die RNA in die monster is uit die ultravioletspektrum van die polisome (figuur 3.1) bepaal. Die ultravioletspektrum wat verkry is, is die normale wat vir RNA of RNA-bevattende strukture,

byvoorbeeld virusse, ribosome of polisome, verkry word.



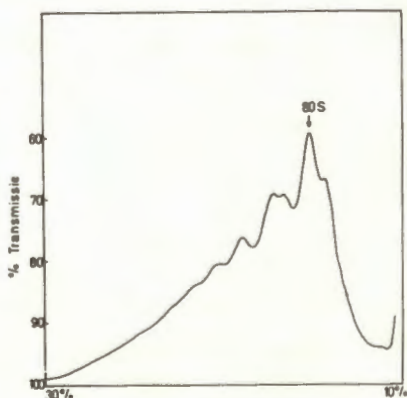
FIGUUR 3.1: Ultravioletspektrum van 'n polisoompreparaat, berei soos beskryf in 3.2.1.

Die absorpsiemaksimum was by 260 mμ. Volgens Ts-O & Vinograd (1961) is die RNA inhoud bereken as $(A_{260} - A_{280}) \times \text{verdunning}/12$. 'n Suspensie van polisome (berei volgens 3.2.1.) is met behulp van sukrosegrediëntsentrifugering ondersoek om die aard van die polisome vas te stel. 'n Lineêre sukrosegrediënt van 10-30% in hersuspensiebuffer is gebruik. 'n Volume van 1ml polisoomsuspensie met 'n konsentrasie van 0,5mg/ml is op die gradiënt geplaas en in 'n SW 27-rotor in 'n Beckman L2 65B ultrasentrifugeerder vir 3 ure by 22 500 o.p.m. gesentrifugeer.

Die distribusie van ultravioletabsorberende materiaal is na sentrifugering bepaal deur die inhoud van die sentrifugeerbuis vanaf die bodem na die meniskus teen

'n konstante vloeisnelheid deur 'n LKB Uvicord II te stuur. Hierdie apparaat was met 'n Beckman-registreerder verbind wat die resultaat kontinuu met deurvloeiing geregistreer het. Die LKB Uvicord II was by 258 m μ ingestel. Die resultaat word in figuur 3.2 weergegee.

Indien na die polisoomprofiel in figuur 3.2 gekyk word, kan verskeie pieke onderskei word. 'n Groot persentasie van die materiaal sedimenteer by waardes groter as 80 S. In die minder digte gebied van die gradiënt kan 'n duidelike 80 S-piek onderskei word. Dit stel ongedissosieeerde ribosome en monosome voor. Na die ribosoompiek (monomere) volg verskeie pieke wat dimere, trimere, tetramere en groter aggregate voorstel. Hierdie strukture neem af in hoeveelheid met toename in grootte. Die grootste polisoompartikels word in die digste gebied van die gradiënt (30%) aangetref.



FIGUUR 3.2: Polisoomprofiel van rothartpolisome by 6mM Mg⁺⁺. 'n Volume van 1ml van 'n polisoomsuspensie, met 'n RNA-konsentrasie van 0,5 mg/ml, is op die gradiënt geplaas. Die prosedure is verder uitgevoer soos beskryf in 3.2.2.

3.2.3 In vitro-proteïensintese met rothartpolisome

Die aktiwiteit van die polisome ten opsigte van proteïensintese is vervolgens nagegaan.

Die sintese is uitgevoer in reaksiemengsels van 100 μ l.

'n Reaksiemengsel het die volgende komponente bevat: 40 μ l selsap en 20 μ l polisome (100 μ g/ml) met konsentrasies van ander komponente as volg: 18mM Tris-HCl, pH 7,6; 90mM KCl; 40mM NaCl; 0,9mM EDTA; 3,0mM β -merkaptto-etanol; 1,5mM ATP; 0,06mM GTP; 3mM kreatienfosfaat; kreatienkinase 0,1mg/ml; 14 C-leusien 0,5 μ Ci/ml en alle natuurlike nie-radioaktiewe aminosure in 'n konsentrasie van 0,03mM elk.

Variasie in Mg^{++} , Ca^{++} en ander komponente van die reaksiemengsel is aangedui by die onderskrif van figure waar van toepassing.

Die reaksiemengsel is in 'n ysbad voorberei en daarna in 'n skudwaterbad by 37°C geïnkubeer vir 'n tyd soos aangedui. Die reaksie is beëindig deur die byvoeging van $\pm$ 5 ml 10% TCA. Gepresipiteerde proteïenmateriaal is in 'n Roto Uni II-sentrifugeerder by maksimum snelheid vir 10 minute gesedimenteer.

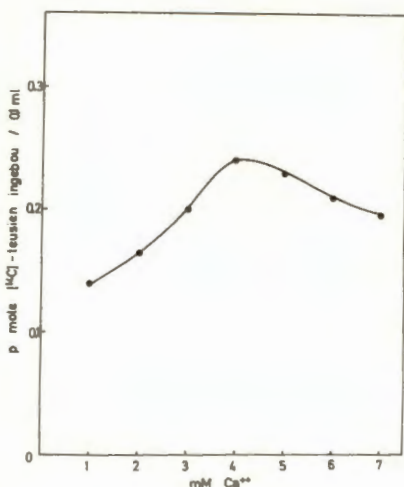
Die helder supernatant is gedekanteer en die sediment opgelos in 0,25 ml 1M NaOH. Hierna is weer eens vir 30 minute by 37°C geïnkubeer om die aminosuur residuë vanaf elke tRNA te verwyder. Proteïenmateriaal is nog eens deur toevoeging van $\pm$ 5 ml 10% TCA gepresipiteer en die presipitaat op Millipore filters (25mM deursnee en 0,45 μ poriegrootte) gefiltreer. Die filters is 3 maal met $\pm$ 5 ml 5% TCA gewas en in 'n

oond by 60°C gedroog. Die gedroogde filters is in telflessies met 15 ml sintillator (4g PPO, 0,05g POPOP in 1 L Tolueen) geplaas en die radioaktiwiteit is gemeet in 'n Beckman LS230-vloeistofsintillasieteller. Die resultaat word telkens weergegee as p mole (μmole) ^{14}C -leusien ingebou/0,1 ml reaksiemengsel.

3.3 DIE INVLOED VAN Ca^{++} EN Mg^{++} IN DIE BEREIDING VAN POLISOME OP DIE PROTEÏENSINTESE-AKTIWITEIT

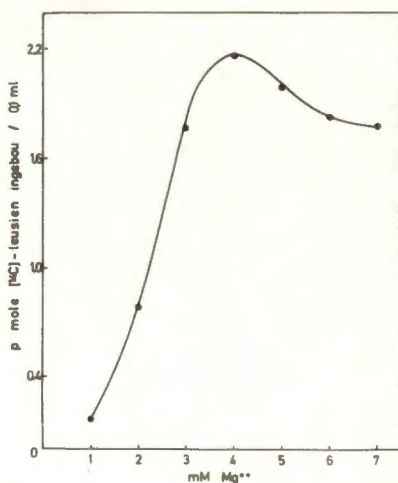
Indien die rol van Ca^{++} en Mg^{++} op proteïensintese met hartpolisome nagegaan wil word, is dit essensieel om die invloed van die samestelling van die medium wat tydens die isolering van die polisome gebruik word, ten opsigte van hierdie twee divalente ione vooraf vas te stel. Hiervoor is die polisome ten eerste berei in 'n medium wat slegs Ca^{++} en geen Mg^{++} bevat het nie. Die proteïensintetiseringsvermoë van 'n polisoompreparaat wat volgens hierdie metode berei is, word in figuur 3.3, aangedui.

Aangesien 'n minimum hoeveelheid divalente ione essensieel is vir die behoud van die polisoomstruktuur, is die onderste grens vir die variasie in die divalente ioonkonsentrasie 1mM. Verhoging in die Ca^{++} -konsentrasie lei tot stimulering van proteïensintese. Die optimale Ca^{++} -konsentrasie hiervoor is 4mM. Die direkte invloed van Ca^{++} op die proteïensintetiseringsvermoë van hartspierpolisome volg duidelik hieruit.



FIGUUR 3.3: Die effek van verskillende konsentrasies (1-7mM) Ca^{++} op die sintese van proteïene deur geïsoleerde hartpolisome. Polisome is berei in 'n medium wat 1mM Ca^{++} bevat het en gesuspendeer in hersuspensiebuffer waarin daar 3mM Ca^{++} was. Volgens die samestelling van die reaksiemengsel was die finale Ca^{++} -konsentrasie 1mM. Ca^{++} is bygevoeg sodat einkonsentrasies van 1 tot 7 mM verkry is. Die eksperimentele prosedure is voorts uitgevoer soos beskryf in 3.2.3. Die inkubasieperiode was 30 minute by 37°C .

In ooreenstemming met die voorafgaande is die effek van Mg^{++} nagegaan. Die polisome is voorberei in 'n medium wat 1mM Mg^{++} bevat het en dan gehersuspendeer in hersuspensiebuffer met 3mM Mg^{++} daarin. Die resultaat van die sintesevermoë van hartpolisome in die aanwesigheid van Mg^{++} in konsentrasies van 1-7mM word in figuur 3.4 weergegee.



FIGUUR 3.4: Die effek van Mg^{++} in konsentrasies van 1-7mM op die proteïensintetiseringsvermoë van hart-polisome. Polisome is berei en gehersuspendeer in media waarin Mg^{++} teenwoordig was. Die eksperiment is verder uitgevoer soos in 3.2.3. Die inkubasieperiode was 30 minute by $37^{\circ}C$.

Verhoging in die Mg^{++} -konsentrasie lei insgelyks tot 'n stimulerings van die proteïensintese. Die optimale konsentrasie van Mg^{++} is ook 4mM.

Uit die voorafgaande is dit dus duidelik dat divalente ione 'n belangrike invloed het op die proteïensintese. Veral is die effek van Mg^{++} bekend en verskeie outeurs het reeds melding gemaak van die belangrikheid van eersgenoemde vir sintese sowel as die optimale konsentrasie vir Mg^{++} naamlik 10mM maar dan in die aanwesigheid van 5mM ATP (Munro et al, 1964; Earl & Korner, 1965). Uit figure 3.3 en 3.4 blyk dit dat beide Ca^{++} en Mg^{++} in die bereidingsmedia geskik is vir sintese. Die aanwesigheid van Mg^{++} in

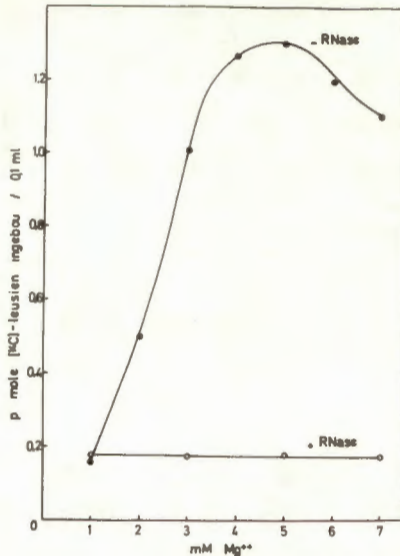
die bereidingsmedium het egter 'n gunstige invloed op die hoeveelheid aminosure wat geïnkorporeer word.

3.4 DIE INVLOED VAN Ca^{++} EN Mg^{++} OP PROTEÏEN-SINTESE MET POLISOME BEREI IN AANWESIGHEID VAN Mg^{++}

In die voorafgaande eksperimente is die invloed van Ca^{++} en Mg^{++} op proteïensintese met hartspierpolisome aangetoon (figure 3.3 en 3.4).

Aangesien daar egter moontlik verskille ten opsigte van die invloed van genoemde katione op die polisome (vergelyk 3.3) met betrekking tot die sintese mag wees, is die relatiewe belangrikheid van hierdie katione in die sinteseproses ondersoek. Die eerste aspek wat aandag geniet het, is die effek van wisselende Ca^{++} -en Mg^{++} -konsentrasies in 'n in vitro-sisteem, in die aanwesigheid van polisome en selsap wat in 'n 1mM Mg^{++} -homogeniseringsbuffer berei is.

In figuur 3.5 word die resultaat van die effek van Mg^{++} by konsentrasies van 1-7mM weergegee. Ten einde te verseker dat die radioaktiewe materiaal wat presipiteer werklik in vitro-gesintetiseerde proteïene is, is 'n kontrole-eksperiment wat 10 μl RNase per inkubasiemengsel bevat ook uitgevoer.

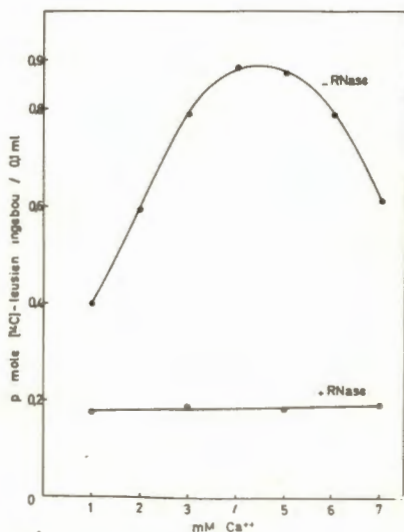


FIGUUR 3.5: Die magnesiumafhanklike inkorporasie van ^{14}C -leusien deur rothartpolisome. Polisome is berei en gehersuspendeer in media wat onderskeidelik 1mM Mg^{++} en 3mM Mg^{++} bevat het. Die magnesium-konsentrasie is tussen 1 en 7 mM gevarieer. Die eksperimentele prosedure is uitgevoer soos beskryf in 3.2.3 met 'n inkubasieperiode van 30 minute by 37°C .

Die stimulerende invloed van Mg^{++} op die sintese kan duidelik in figuur 3.5 gesien word, indien dit vergelyk word met die RNase - kontrole waar geen sintese plaasgevind het nie.

Polisome en selsap is vervolgens in 'n homogeniseringsbuffer met 1mM Mg^{++} berei en die sediment is gesuspendeer in hersuspenderingsbuffer met 3mM Ca^{++} . Dit beteken dat die eindkonsentrasie van Ca^{++} in die reaksiemengsel 0,6mM is. Die invloed van verskillende konsentrasies Ca^{++} is in hierdie sisteem ondersoek

deur 'n CaCl_2 -oplossing by te voeg om eindkonsentrasies te gee, soos in figuur 3.6 aangedui. 'n Kontrole-eksperiment met RNase is weer eens ingesluit.



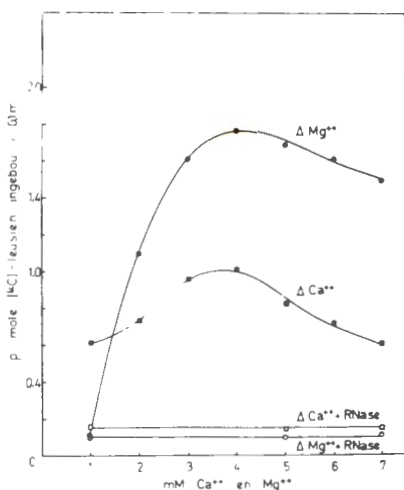
FIGUUR 3.6: Die kalsiumafhanklike inkorporasie van ^{14}C -leusien deur rothartpolisome. Polisome is berei en gesuspender in 1mM Mg^{++} en 3mM Ca^{++} onderskeidelik. Die kalsiumkonsentrasie is tussen 1 en 7 mM gevarieer. Die eksperiment is verder uitgevoer soos beskryf in figuur 3.5.

Dit is duidelik dat Ca^{++} ook die sintese van proteïene deur rothartpolisome onder hierdie omstandighede stimuleer, indien die sintese met dié in die aanwesigheid van RNase vergelyk word.

Ooglopende waarnemings wat uit figure 3.5 en 3.6 gemaak kan word, is (1) dat proteïensintese in die aanwesigheid van 1mM Ca^{++} onderhou word, terwyl Mg^{++} by dieselfde konsentrasie geen sintese tot gevolg

het nie en (2) dat die persentasie stimulerings in die geval van Mg^{++} hoër is as dié met Ca^{++} .

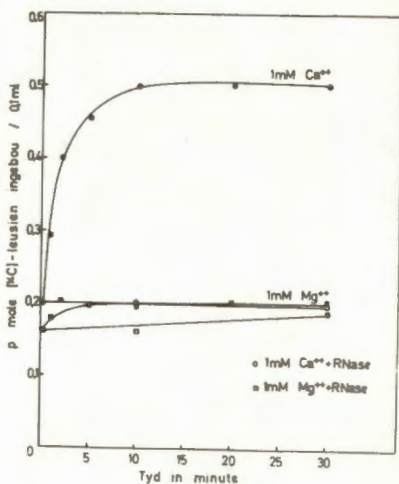
Die afleidings wat hierbo gemaak is, spruit uit waarnemings wat gemaak is uit eksperimente waarin verskillende polisoompreparate gebruik is. Vir meer geldige vergelykings sou dus uitgegaan moet word van dieselfde polisoompreparaat. Vir hierdie doel is polisome in homogeniseringsbuffer met 1mM Mg^{++} berei, soos beskryf in 3.2.1, en die sediment in twee gelyke dele verdeel. Die twee dele is ghesuspendeer in hersuspensiebuffers met 3mM Ca^{++} en 3mM Mg^{++} respektiewelik. Reaksiemedie vir konsentrasies wisselende van 1 tot 7mM vir Ca^{++} sowel as Mg^{++} is saamgestel. RNase-kontroles is telkens ook ingesluit. Inkubasie is verder uitgevoer soos beskrywe in 3.2.3. Die resultaat van so 'n gekombineerde eksperiment word in figuur 3.7 voorgestel. Uit hierdie figuur blyk dit duidelik dat wisselende Ca^{++} - en Mg^{++} -konsentrasies stimulerings van die sintese by dieselfde polisoompreparaat veroorsaak. Die verskil in sintese by 1mM Ca^{++} en 1mM Mg^{++} , asook die verskil in persentasie stimulerings tussen Ca^{++} en Mg^{++} blyk ook duidelik. Die optima is in beide gevalle by 'n konsentrasie van 4mM. Die aanwezigheid van RNase elimineer, in die teenwoordigheid van Ca^{++} en Mg^{++} , die sintese van proteïene. Hieruit is dit duidelik dat die afleidings wat hierbo gemaak is ten opsigte van die resultate uit eksperimente met verskillende polisoompreparate geldig is aangesien dieselfde resultaat verkry is waar van 'n enkele polisoompreparaat gebruik gemaak is.



FIGUUR 3.7: Die invloed van Ca^{++} en Mg^{++} in konsentrasies van 1-7 mM op die sintese van proteïene deur 'n enkele polisoompreparaat. RNase-kontroles by 1,5 en 7 mM Ca^{++} en Mg^{++} word ook aangedui. Kromme 1 dui aan verandering van die Mg^{++} -konsentrasie + RNase; kromme 2 dui aan die ooreenkomstige Ca^{++} -konsentrasies + RNase; kromme 3 toon die invloed van Ca^{++} (1-7 mM) aan op die inkorporasie van ^{14}C -leusien en kromme 4 die ooreenstemmende Mg^{++} -effek. Die inkubasieperiode was 30 minute by 37°C . Die procedure is soos in 3.2.3.

Dit is reeds duidelik dat Ca^{++} by 'n lae konsentrasie die sintese van proteïene onderhou terwyl Mg^{++} nie dieselfde eienskap vertoon nie. Om hierdie belangrike verskil verder te ondersoek en te verifieer is die kinetiek van proteïensintese by 1mM Ca^{++} en 1mM Mg^{++} nagegaan en vergelyk met die kinetiek van sintese by 5mM Ca^{++} en 5mM Mg^{++} . Hierdie gekombineerde eksperimente is telkens op 'n enkele polisoompreparaat uitgevoer. Dit beteken dat die polisoomsediment in 'n 1mM Mg^{++} -medium berei is,

daarna in 2 dele verdeel is, wat onderskeidelik in 3mM Mg^{++} en 3mM Ca^{++} in hersuspensiebuffer geheerspendeër is. Die tydsafhanklike inkorporasie van ^{14}C -leusien by 1mM Ca^{++} en 1mM Mg^{++} tesame met RNase-kontroles word in figuur 3.8 aangetoon.

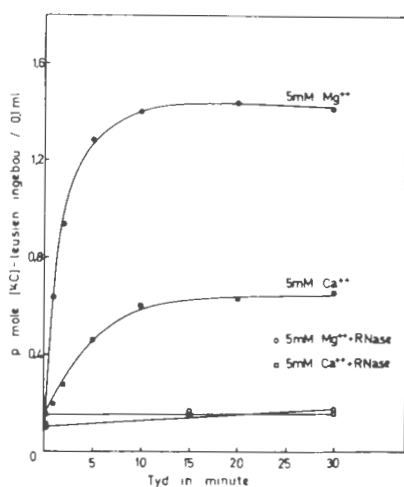


FIGUUR 3.8: Kinetiek van sintese by 1mM Ca^{++} en 1mM Mg^{++} met rothartpolisome. Die verskillende krommes is as volg; 1: Proteïensintese by 1mM Mg^{++} in die aanwesigheid van RNase, 2: Tydsafhanklike inkorporasie van ^{14}C -leusien by 1mM Mg^{++} , 3: Proteïensintese by 1mM Ca^{++} in die aanwesigheid van RNase, 4: Tydsafhanklike inkorporasie van ^{14}C -leusien by 1mM Ca^{++} . Die inkubasieperiodes was 0,1,2,5,10,20 en 30 minute by $37^{\circ}C$.

Uit hierdie kinetiese proef blyk duidelik dat 1mM Ca^{++} rothartpolisome aktiveer tot sintese van proteïene, terwyl dieselfde konsentrasie Mg^{++} geen sintese onder dieselfde omstandighede tot gevolg het nie.

Trouens, die sintese in die teenwoordigheid van 1mM Mg^{++} is in dieselfde orde as dié waar RNA deur middel van RNase vernietig is (vergelyk krommes 1, 2 & 3 in figuur 3.8).

Figuur 3.9 stel die vergelykende eksperiment voor waar tydsafhanklike inkorporasie van ^{14}C -leusien deur rothartpolisome plaasvind in 'n medium waar Ca^{++} en Mg^{++} beide in 'n konsentrasie van 5mM teenwoordig is, asook met die betrokke RNase-kontroles.



FIGUUR 3.9: Kinetiek van proteïensintese by 5mM Ca^{++} en 5mM Mg^{++} met rothartpolisome. Die verskillende krommes stel die volgende voor;

- 1: Proteïensintese by 5mM Ca^{++} in die aanwesigheid van RNase,
- 2: Proteïensintese by 5mM Mg^{++} in die aanwesigheid van RNase,
- 3: Tydsafhanklike inkorporasie van ^{14}C -leusien by 5mM Ca^{++}
- 4: Tydsafhanklike inkorporasie van ^{14}C -leusien by 5mM Mg^{++} .

Die inkubasieperiodes was 0,1,2,5,10,20 en 30 minute by 37°C .

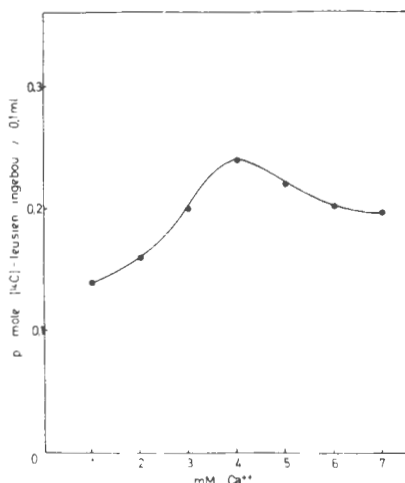
Volgens die gegewens in figuur 3.9 is dit duidelik dat die sinteseaktiwiteit in die aanwesigheid van 5mM Mg^{++} (kromme 4) heelwat hoër is as dié in die teenwoordigheid van 5mM Ca^{++} (kromme 3). Albei katione het egter wel duidelike proteïensintese tot gevolg indien dit vergelyk word met die RNase-kontroles (krommes 1 en 2). Hierdie resultate van die kinetiese proewe by 1mM Ca^{++} en 1mM Mg^{++} asook 5mM Ca^{++} en 5mM Mg^{++} is dus 'n finale bevestiging van die gevolgtrekkings wat gemaak is uit die resultate van figure 3.5, 3.6 en 3.7.

3.5 INVLOED VAN Ca^{++} EN Mg^{++} OP PROTEÏEN-SINTESE MET POLISOME BEREI IN AANWESIGHEID VAN Ca^{++}

Uit die resultate van 3.4 volg dat Ca^{++} -ione die mees effektiewe ioon is vir sinteseaktiwiteit by lae divalente ioonkonsentrasies, (1mM) terwyl Mg^{++} meer effektief is vir sinteseaktiwiteit by hoër divalente ioonkonsentrasies (5mM). Hierdie gevolgtrekkings is egter gebaseer op eksperimente waar die aanvanklike bereiding van die polisome uitgevoer is in die aanwesigheid van Mg^{++} -ione. Dat sintese wel kan plaasvind met preparate wat in die aanwesigheid van Ca^{++} -ione berei is, is reeds aangetoon (figuur 3.3). Dit moet nou egter geëvalueer word of die verskille tussen die effekte van Mg^{++} en Ca^{++} soos hierbo uiteengesit ook geld wanneer die polisome in Ca^{++} berei is. Om hierdie probleem te ondersoek is polisome berei in 'n homogeniseringsbuffer wat 1mM Ca^{++} bevat

het en dan in hersuspenderingsbuffer opgeneem wat 3mM Ca^{++} of 3mM Mg^{++} bevat het. Die Ca^{++} - en Mg^{++} -konsentrasies is dan in hierdie afsonderlike eksperimente gevarieer tussen 1 en 7mM.

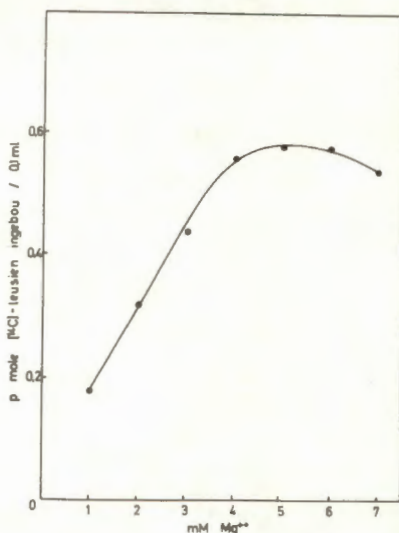
Die resultaat van die invloed van Ca^{++} op die sintese van proteïene met polisome wat in 'n Ca^{++} -medium berei is, word in figuur 3.10 weergegee.



FIGUUR 3.10: Die invloed van Ca^{++} in konsentrasies van 1-7mM op die inkorporasie van ^{14}C -leusien deur polisome wat in 'n 1mM Ca^{++} -medium berei is en gehersuspendeer is in 'n medium wat 3mM Ca^{++} bevat. Die eksperimentele prosedure is verder soos in 3.2.3 beskryf. Die inkubasieperiode was 30 minute by 37°C .

Die hoeveelheid sintese wat verkry word met polisome wat by lae kalsiumkonsentrasies berei is en waar die konsentrasie van Ca^{++} gevarieer is, blyk laer te wees as in gevalle waar die polisome by 'n lae magnesiumkonsentrasie berei is (vergeelyk figuur 3.6).

Die resultaat wat verkry word met proteïensintese deur polisome wat eweneens by 'n lae kalsiumkonsentrasie berei en in Mg^{++} gesuspendeer is, maar waar die Mg^{++} -konsentrasie gewissel word, word in figuur 3.11 aangetoon.

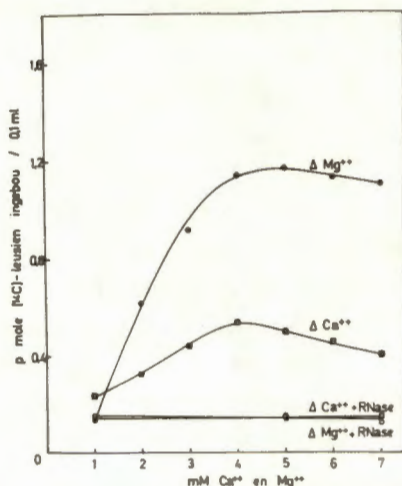


FIGUUR 3.11: Die invloed van Mg^{++} in konsentrasies van 1-7mM op die inkorporasie van ^{14}C -leusien deur polisome wat in 'n medium met lae kalsiumkonsentrasie (1mM) berei is en gesuspendeer is in 3mM Mg^{++} . Die proef is uitgevoer soos in 3.2.3 beskryf. Die inkubasieperiode was 30 minute by $37^{\circ}C$.

Volgens die gegewens in figuur 3.11 vervat, is dit verder duidelik dat die aanwesigheid van magnesiumione in verskillende konsentrasies onder bogenoemde toestande ook nie so 'n hoë sintese tot gevolg het as wat die geval is met wisselende Mg^{++} -konsentrasies in die teenwoordigheid van polisome wat in 'n medium met 'n lae Mg^{++} -konsentrasie berei is nie (vergelyk figuur 3.5).

Die waarnemings wat in die voorafgaande gedeeltes gemaak is, word nog sterker beklemtoon as na die resultate gekyk word wat in 'n gekombineerde proef verkry is. Daarmee word bedoel dat die invloed van Ca^{++} sowel as Mg^{++} in verskillende konsentrasies (1-7mM) op dieselfde polisoompreparaat ondersoek is. Die polisome is by 'n konsentrasie van 1mM Ca^{++} in homogeniseringsbuffer berei. Hierna is die sediment in 2 gelyke dele verdeel en in hersuspensiebuffer opgeneem wat 3mM Ca^{++} en 3mM Mg^{++} onderskeidelik bevat het. Die Ca^{++} - en Mg^{++} -konsentrasies is voorts gevarieer tussen 1 en 7mM. RNase is weer eens bygevoeg om as kontrole vir sintese te dien. Die resultaat word in figuur 3.12 aangetoon.

Indien die resultate wat in figure 3.7 en 3.12 vervat is, vergelyk word, is dit duidelik dat die bereiding van polisome in 'n medium wat 1mM Ca^{++} in plaas van 1mM Mg^{++} bevat, nie die sintese van proteïene begunstig nie. Die totale hoeveelheid sintese is in figuur 3.12 laer as dié waarin die bereiding in 'n magnesiummilieu geskied (figuur 3.7). 'n Verdere waarneming wat gemaak kan word, is dat die sintese by 1mM Ca^{++} deur polisome wat in 'n medium bevattende Ca^{++} berei is opvallend laer is as in die ooreenstemmende geval waar die polisome in 'n medium bevattende Mg^{++} berei is. Daar kan dus gekonstateer word dat die bereiding van polisome in 'n magnesiummilieu belangrik blyk te wees vir die sintese van proteïene in vitro.



FIGUUR 3.12: Die invloed van Ca^{++} en Mg^{++} in konsentrasies van 1-7mM op die sintese van proteïene deur rothartpolisome wat berei is in 1mM Ca^{++} en gesuspendeer is in 3mM Ca^{++} en 3mM Mg^{++} respektiewelik. Die verskillende krommes stel die volgende voor;

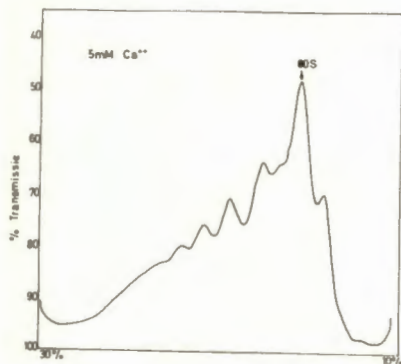
- 1: Proteïensintese by 1,5 en 7mM Mg^{++} in aanwesigheid van RNase.
- 2: Sintese by die ooreenstemmende konsentrasies Ca^{++} en RNase.
- 3: Die invloed van Ca^{++} (1-7mM) op die sintese van proteïene.
- 4: Die invloed van Mg^{++} (1-7mM) op die proteïensintese.

Die inkubasieperiode was 30 minute by 37°C en die verdere prosedure soos in 3.2.3.

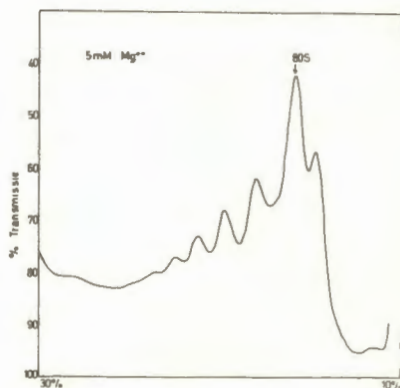
3.6 SEDIMENTASIE VAN POLISOME IN SUKROSEGRADIËNTE MET Ca^{++} EN Mg^{++}

Die vraag ontstaan nou of die verskil in effektiwiteit van die polisoompreparate ten opsigte van sinte-

seaktiwiteit by lae en hoë divalente ioonkonsentrasies soos waargeneem in 3.4 herlei kan word tot strukturele verskille tussen die preparate. Hiervoor is die sedimentasie van polisome, wat in 'n medium met 1mM Mg^{++} berei is, in 'n lineêre sukrosegadiënt van 10-30% in resuspensiebuffer by verskillende Ca^{++} - en Mg^{++} -konsentrasies nagegaan. Ten eerste is polisome in 1mM Ca^{++} en 1mM Mg^{++} onderskeidelik gesuspender. Hiervan is op sukrosegadiënte, waarvan die Ca^{++} - en Mg^{++} -konsentrasies 5mM was, geplaas. Die prosedure is verder uitgevoer soos in 3.2.2. Die resulterende polisoomprofile word in figuur 3.13 voorgestel.



3.131



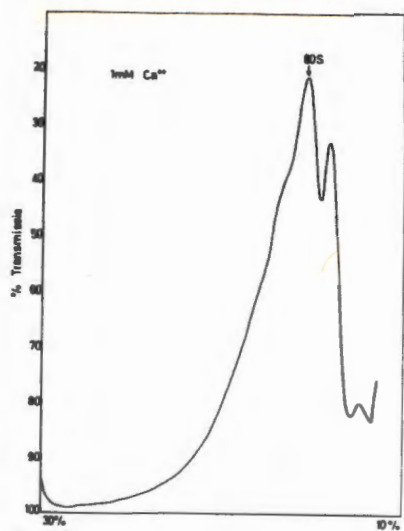
3.132

FIGUUR 3.13: Polisoomprofile van rothartpolisome. Die konsentrasie van die polisoommateriaal wat op die gradiënt gesit is, is $0,6\text{mg RNA/ml}$. Die gradiënt verteenwoordig konsentrasies van 5mM Ca^{++} (3.131) en 5mM Mg^{++} (3.132) respektiewelik.

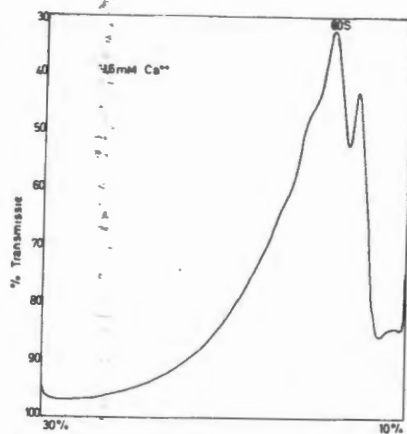
In albei gevalle is dit duidelik dat intakte polisome aanwesig is. Verskeie polisoompieke kan in die 5mM Ca^{++} -medium sowel as in die medium wat 5mM Mg^{++} bevat op die profiele onderskei word. Aangesien 'n konsentrasie van $\pm$ 5mM vir beide Ca^{++} en Mg^{++} optimaal is vir proteïensintese (figure 3.5 en 3.6), is dit te wagte dat duidelik onderskeibare, stabiele polisome by hierdie divalente ioonkonsentrasie aanwesig behoort te wees. Die verskil in aktiwiteit kan egter nie uit hierdie polisoomprofiele afgelei word nie.

Vir sover dit die stabiliteit van die rothartpolisome by lae konsentrasies van kalsium en magnesium betref, is polisome wat in 'n homogeniseringsmedium bevattende 1mM Mg^{++} berei is, deur middel van ultrasentrifugering deur 'n lineêre sukrosegrediënt gesedimenteer by 1mM, 1,2mM en 1,6mM Ca^{++} en die ooreenstemmende Mg^{++} -konsentrasies. Die eksperimentele prosedure is weer eens soos in 3.2.2 beskryf. Die polisoomprofiele by konsentrasies van slegs 1mM en 1,6mM Ca^{++} sowel as die ooreenkomstige Mg^{++} -konsentrasies word in figuur 3.14 vergelyk.

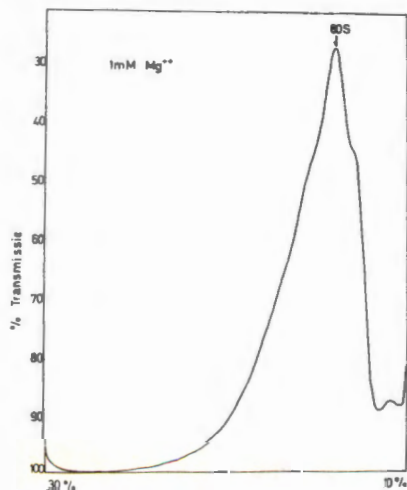
Uit figuur 3.14 kan gesien word dat die polisoomprofiele in die aanwesigheid van Ca^{++} ietwat meer swaar materiaal in die meer digte gebied van die gradiënt vertoon as wat die geval in die aanwesigheid van Mg^{++} is. Hieruit kan dan die afleiding gemaak word dat dit moontlik die rede mag wees waarom Ca^{++} in lae konsentrasies (1-1,6mM) meer gereedelik proteïensintese onderhou, terwyl die ooreenstemmende Mg^{++} -konsentrasies en meer spesifiek 1mM Mg^{++} geen sintese tot gevolg het nie.



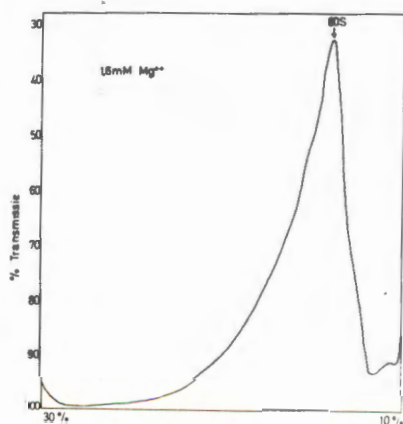
3.141



3.142



3.143



3.144

FIGUUR 3.14: Polisoomprofielen van rothartpolisome. Bereiding in homogeniseringsmedium bevattende 1mM Mg^{++} . Die konsentrasie polisoommateriaal is in elke geval 0,6mg RNA/ml. Die gradiënte is voorberei in her-suspenderingsbuffer met 1mM Ca^{++} (3.141), 1,6mM Ca^{++} (3.142), 1mM Mg^{++} (3.143) en 1,6mM Mg^{++} (3.144).

3.7 KONKLUSIES

Uit die verskillende resultate soos hierbo uiteengesit, kan die volgende aantal afleidings gemaak word:

1. Beide Ca^{++} - en Mg^{++} -ione stimuleer die sintese van hartspierproteïene indien die konsentrasie van die ione van 'n lae (1mM) na 'n hoër (7mM) konsentrasie gewissel word.
2. Beide ione se optimale konsentrasie vir polipeptiedsintese is 4-5mM.
3. Die persentasie stimulerings tussen 1mM en die optimum konsentrasie is hoër in 'n sisteem waar die polisome in 'n medium bevattende Mg^{++} berei is en waar die konsentrasie van Mg^{++} gevarieer word, as waar die ooreenstemmende konsentrasies Ca^{++} aanwesig is.
4. Proteïensintese word by 'n lae kalsiumkonsentrasie (1mM) onderhou terwyl Mg^{++} by hierdie konsentrasie geen sintese tot gevolg het nie.
5. 'n Bereidingsmetode waarin Mg^{++} ingesluit is, begunstig die hoeveelheid polipeptiedsintese in teenstelling tot 'n laer sintese waar van 'n bereidingsmetode wat Ca^{++} bevat gebruik gemaak word.

Om die rol wat Ca^{++} in die sintese van hartspierproteïene speel verder te ondersoek is met behulp van hartglikosiede 'n korrelasie getrek tussen kalsiumtransport en proteïensintese. Hierdie resultate word in die volgende hoofstuk weergegee.

DIE EFFEK VAN HARTGLIKOSIEDE OP DIE KALSIUM-
OPNAME DEUR DIE MIKROSOMALE-FRAKSIE VAN HART-
SPIERWEEFSEL

4.1 INLEIDING

Verskeie aspekte aangaande die meganisme van Ca^{++} -transport deur die sarkotubulêresisteem het in die jongste tyd aan die lig gekom. Dit het geblyk dat sekere lipiede belangrik is by die funksionering van die transportsisteme in skeletspiersarkotubulêre-membrane (Fiehn & Hasselbach, 1970). Ook die proteïenkomponent blyk belangrik te wees vir Ca^{++} -binding (Fiehn & Migala, 1971). Volgens die bevindings van Mac Lennan & Wong (1971) kan 'n spesifieke Ca^{++} -bindingsproteïen, naamlik kalsekwestrien uit skeletspierweefsel geïsoleer word.

Hierdie transport-meganisme vir Ca^{++} oor die membrane van die sarkoplasmatiese retikulum het ook geblyk gevoelig te wees vir verskeie tipes geneesmiddels en ander stowwe. Sodanige stowwe beïnvloed byvoorbeeld beide die opname en vrystelling van Ca^{++} deur die sarkotubulêresisteem (vergelyk hoofstuk 2). Verskeie outeurs het reeds aangetoon dat verskillende glikosiede die opname van Ca^{++} deur die sarkotubulêresisteem beïnvloed (vergelyk byvoorbeeld Selinger et al, 1970; Sabatini-Smith & Holland, 1967; Lee & Choi, 1966 en andere soos beskryf in hoofstuk 2).

In hierdie hoofstuk word die effek van twee glikosiede, naamlik ouabaiën en digitoksien, by verskillende konsentrasies op die opname van Ca^{++} deur rothartmikrosomale-membrane bespreek. 'n Volledige uiteensetting van die eksperimentele opstelling wat gebruik is, word gegee.

4.2 DIE OPNAME VAN Ca^{++} DEUR ROTHART SARKO-PLASMATIESE RETIKULUM

Verskeie metodes is bekend waarmee die Ca^{++} -opnames deur sarkoplasmatiese retikulum ondersoek kan word. Sommige is meer geslaagd as andere en eksperimentele omstandighede bepaal ook grootliks watter metode aangewend moet word. Die metode waarvan in hierdie ondersoek gebruik gemaak is, is dié soos beskryf deur Pretorius et al (1969). In die eksperimente wat deur hierdie outeurs beskryf word, is van honde as proefdiere gebruik gemaak. Dit beteken dat redelike groot hoeveelhede weefsel beskikbaar was. In hierdie ondersoek is egter van rotte as proefdiere gebruik gemaak. Dit is duidelik dat die hoeveelheid weefsel wat beskikbaar is baie beperk is. Vir 'n eksperiment is altyd 3-4 rotte gebruik, afhangende van die grootte van die proefdiere. Dit het noodwendig beteken dat sekere aanpassings aan die metode aangebring moes word.

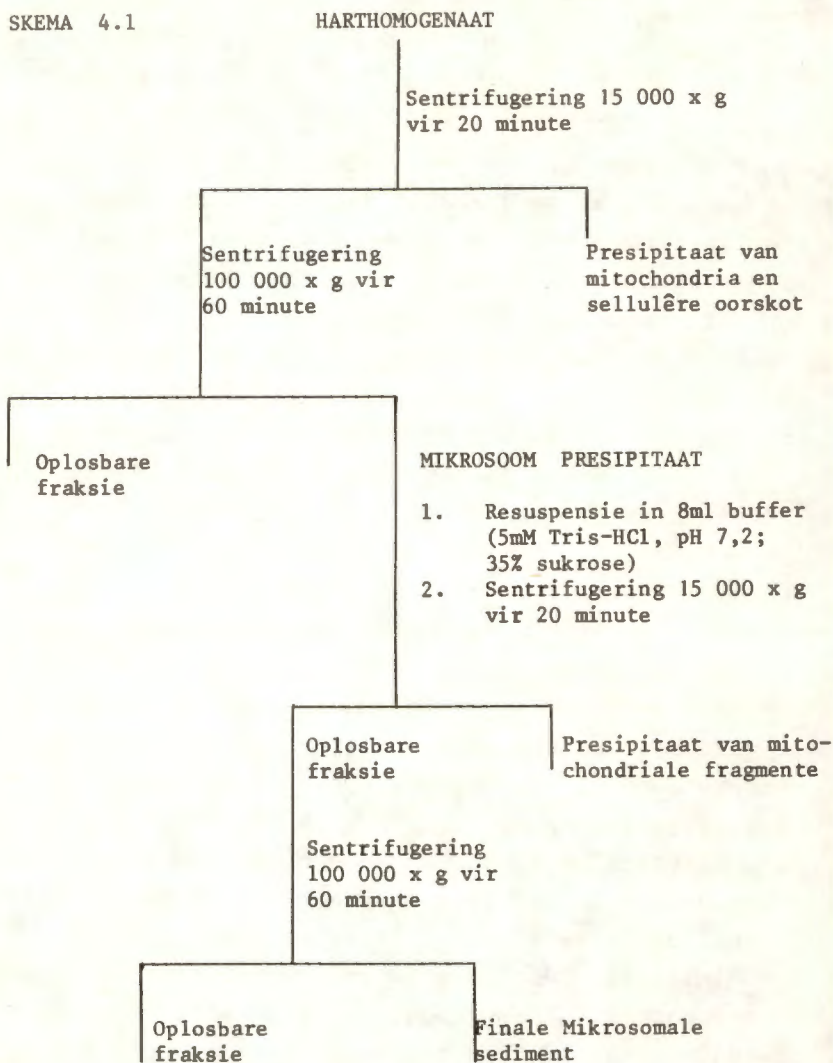
Die metode wat aangewend is vir die bestudering van die Ca^{++} -opname deur rothartmikrosome, word volledig in die volgende afdeling beskrywe.

4.2.1. Metode

4.2.1.1 Isolering van mikrosome uit rothartweefsel

Die proefdiere is doodgemaak deur 'n hou agter op die kop, daarna is die dier onthoof en die bloed toegelaat om uit die sisteem te dreineer. Die harte is hierna vinnig verwyder en dadelik in yskoue homogeniseringsbuffer (20mM Tris-HCl pH 7,0; 300mM sukrose) geplaas. Die harte is hierna oorgeplaas in 10 ml van dieselfde buffer in 'n ysbad en die weefsel met behulp van 'n skêr fyngesny. Die fyngeknippte hartweefsel is vir 45 sekondes met behulp van 'n Ultra-Turrax-homogeniseerder gehomogeniseer, vir 15 sekondes laat staan en dan weer vir 45 sekondes gehomogeniseer. Die homogenaat is oorgeplaas in 'n sentrifugeerbuis en verseël. Laasgenoemde is in 'n vooraf verkoelde rotor van 'n Beckman Spinco L2-ultrasentrifugeerder geplaas. Die metode is verder uitgevoer soos uiteengesit in skema 4.1. Hiervolgens word die homogenaat aan differensiële ultrasentrifugering onderwerp. Die hartweefselsuspensie word eerstens by 15 000 x g gesentrifugeer om mitochondria en sellulêre oorskot te verwyder. Hierna word die mikrosomale-fraksie by 100 000 x g gesedimenteer. Om die suiwerheid van die preparaat so ver moontlik te verhoog, is laasgenoemde geher-suspendeer en die genoemde sedimentasies deur 'n digte, gebufferde sukrosemedium (35%) herhaal.

SKEMA 4.1



Die helder mikrosomale sediment wat volgens skema 4.1 berei is, is dan met behulp van 'n pipet gehersuspendeer in 3 ml van die resuspensiebuffer.

Volgens Pretorius et al (1969) is die mikrosomale-preparaat wat volgens hierdie prosedure berei word,

gekontamineer met mitochondrialefragmente en bestaan dus nie slegs uit sarkoplasmatiese retikulum nie. Die preparaat word egter as sodanig algemeen gebruik in die bestudering van Ca^{++} -opname.

4.2.1.2. Ca^{++} -opname

Die volgende reaksiemengsel is saamgestel:

mikrosomale-suspensie	0,1 ml
stamoplossing	0,5 ml
†water	1,3 ml
ATP-oplossing	0,1 ml

Totaal 2,0 ml

Die eindkonsentrasies en samestelling van die verskillende bestanddele in die stamoplossing is as volg: 0,9mM Tris-HCl, pH 6,8-7,0; 5mM MgCl_2 ; 0,1mM CaCl_2 ; 1,8 $\mu\text{g/ml}$ ^{45}Ca as $^{45}\text{CaCl}_2$; 6,3% sukrose; 113mM KCl; 9mM histidien; 0,1mM EGTA en 10mM ATP.

Die reaksie-medium is sonder ATP geïnkubeer by 25°C. Die ATP-oplossing is vanuit 'n ysbad by die reaksie-medium gevoeg. Die reaksie is gestop deur na die

†Waar glikosied in die reaksiemengsel toegevoeg is, is ooreenstemmend minder water toegevoeg.

gewenste tyd deur 'n Millipore filter met 'n poriegrootte van $0,45\mu$ te filtreer. Vir die nulwaarde is mikrosomalepreparaat bygevoeg en dadelik gefiltreer.

4.2.1.3. Radioaktiwiteitsmeting van $^{45}\text{Ca}^{++}$

By 15 ml van Bray se sintillasie-oplossing is 1 drupple gekonsentreerde HCl, 1ml etanol en 0,3 ml van die filtraat (uit 4.2.1.2) gevoeg. Die mengsel is in 'n Beckman LS 230-vloeistofsintillasieteller getel om die hoeveelheid radioaktiwiteit in elke monster te bepaal.

4.2.1.4. Berekening

'n Proteïenbepaling, volgens die Biuret-metode, is op elke mikrosomale suspensie uitgevoer. Die radioaktiwiteit van elke monster, uitgedruk in telle per minuut, is omgewerk na μ mole Ca^{++} opgeneem/gram proteïen. Die resultate is dan grafies voorgestel.

4.3 RESULTATE

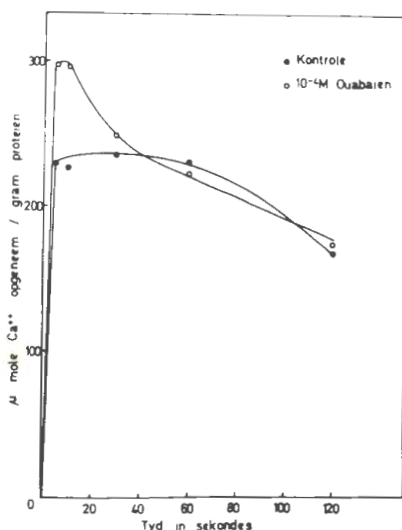
Die invloed van twee hartglikosiede, naamlik ouabaiën en digitoksien, is op die opname van kalsium deur die mikrosomale-fraksie van rothartspierweefsel ondersoek. Die effek van verskillende konsentrasies van die hartglikosiede op die Ca^{++} -opname is oor 'n tydsverloop van 120 sekondes nagegaan. Daar is ook wat die verskillende konsentrasies betref 'n vergelyking opgestel tussen die onderskeie konsentrasies na gelang van

die effek na 'n tydsverloop vir die maksimale opname van kalsium. Hierdie eksperimentele bevindings word in die volgende afdelings aangetoon en bespreek.

4.3.1. Die effek van ouabaïen op die Ca^{++} -opname

Die effek wat deur ouabaïen op die opname van Ca^{++} deur die sarkoplasmatiese retikulum uitgeoefen word, is oor die algemeen inhiberend van aard. By sekere konsentrasies van hierdie glikosied word egter geen inhibitoriese effek verkry nie en word die opname van kalsium selfs verhoog (vergelyk hoofstuk 2).

In figuur 4.1 word die effek van ouabaïen by 'n konsentrasie van 10^{-4}M vergelyk met 'n kontrole waar geen glikosied aanwesig is nie. In alle figure word die gemiddelde waardes oor 2 eksperimente voorgestel.

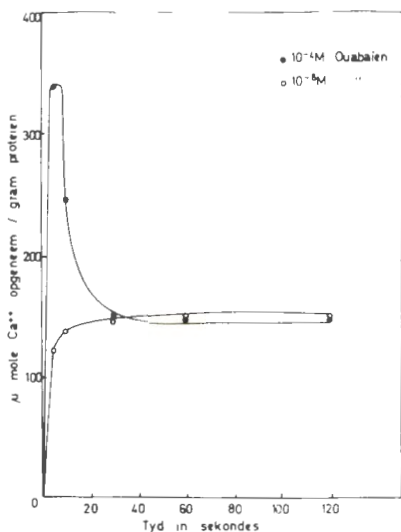


FIGUUR 4.1: Die effek van ouabaïen (10^{-4}M) op die opname van kalsium deur geïsoleerde mikrosome.

Uit figuur 4.1 kan gesien word dat ouabaiën by hierdie konsentrasie binne die eerste 30 sekondes die opname van Ca^{++} effens verhoog, maar dat hierdie effek met verdere tydsverloop minder duidelik word. Hierdie verskynsel stem ooreen met verskeie outeurs waar onder Lee & Choi (1966), Lüllmann & Holland (1962), en Thorp & Cobbin (1967).

By 'n konsentrasie van 10^{-6}M van hierdie glikosied, dit wil sê die minder toksiese konsentrasie asook dié konsentrasie waar 'n positiewe inotrope effek verkry word, is die opname van kalsium verminder. In figuur 4.2 word die effek van ouabaiën by 'n konsentrasie van 10^{-6}M met die opname by 'n konsentrasie van 10^{-4}M vergelyk. Dit is duidelik dat hierdie glikosied die kalsiumopname by 'n konsentrasie van 10^{-6}M inhibeer maar net gedurende die eerste 20 sekondes, indien dit vergelyk word met die opname van Ca^{++} by 'n konsentrasie van 10^{-4}M van dieselfde stof.

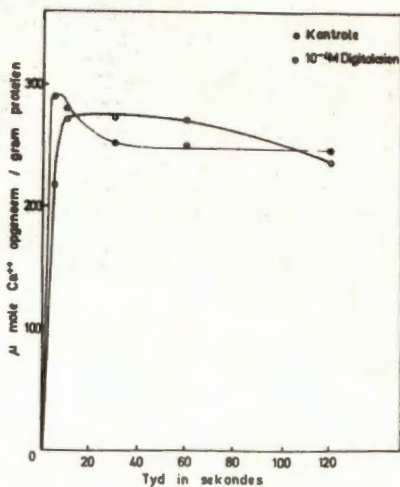
Daar is verder ook gevind dat laer konsentrasies van die glikosied as 10^{-6}M die kalsiumopname weer verhoog {kyk figuur 4.5; vergelyk ook Lüllmann & Holland (1962), Lee & Choi (1966)}. Die afleiding kan dus gemaak word dat die sterkste inhiberingseffek van ouabaiën op die kalsiumopname by 'n konsentrasie van 10^{-6}M verkry word.



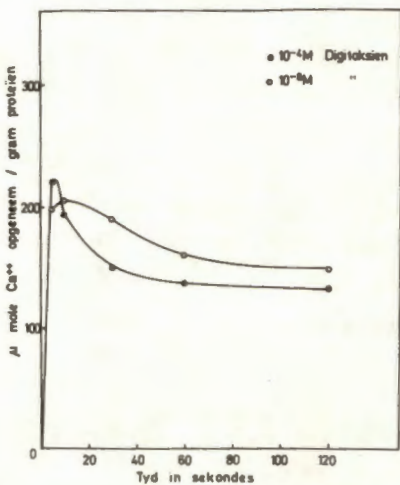
FIGUUR 4.2: Die effek van ouabaïne (10^{-4} M en 10^{-6} M) op die kalsiumopname deur mikrosome.

4.3.2. Die effek van digitoksien op die Ca^{++} -opname

Die invloed van digitoksien by verskillende konsentrasies op die opname van kalsium deur 'n geïsoleerde mikrosomale fraksie, is ondersoek. Uit figure 4.3 en 4.4 kan gesien word dat digitoksien by konsentrasies van 10^{-4} M en 10^{-6} M nie 'n betekenisvolle effek het op die opname van kalsium nie. Dit is in teenstelling tot die invloed van ouabaïne op die kalsiumopname in mikrosomale membrane.

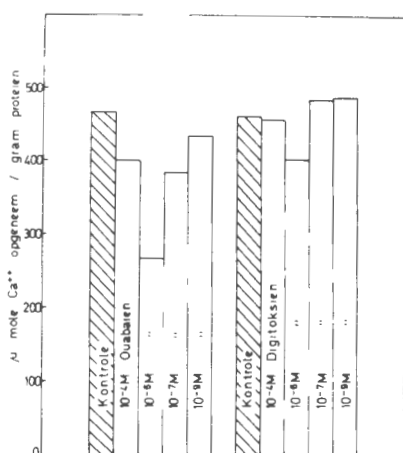


FIGUUR 4.3: Die invloed van digitoksien (10^{-4}M) op die kalsiumopname deur mikrosomale membrane.



FIGUUR 4.4: Die invloed van digitoksien (10^{-4}M en 10^{-6}M) op die opname van kalsium deur mikrosome.

Aangesien daar verskille bestaan in die effek van die twee verskillende hartglikosiede by die betrokke konsentrasies, soos uiteengesit in die voorafgaande dele, is verder 'n aantal eksperimente uitgevoer om die effek van 'n reeks konsentrasies (10^{-4} - 10^{-9} M) van albei stowwe telkens met kontroles, waarby daar geen glikosied aanwesig is nie, te vergelyk. Die resultate wat met hierdie eksperimentele ondersoek verkry is, word in figuur 4.5 grafies voorgestel.



FIGUUR 4.5: Die effek van ouabaïen en digitoksien, elk by konsentrasies van 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-9} respektiewelik, op die kalsiumopname deur geïsoleerde mikrosome.

4.4 SAMEVATTING

Uit die voorafgaande beskrywing van die resultate is dit duidelik dat, van die genoemde hartglikosiede, ouabaïen 'n merkbare invloed het op die kalsiumop-

name deur geïsoleerde mikrosome. In die geval van digitoksien is die effek minder opvallend. Die konsentrasie van ouabaïen waarby maksimum inhibisie van die kalsiumopname verkry word, is 10^{-6} M. Hoër sowel as laer konsentrasies van hierdie glikosied het 'n hoër opname van kalsium tot gevolg as wat by 'n konsentrasie van 10^{-6} M verkry is (vergelyk figuur 4.5). 'n Volledige bespreking wat oor hierdie verskynsel handel, word in hoofstuk 2 gegee.

DIE INVLOED VAN HARTGLIKOSIEDE OP DIE PROTEÏEN- SINTESE IN HARTSPIERWEEFSEL

5.1 INLEIDING

Die hartglikosiede ouabaïen en digitoksien het verskillende effekte op die kalsiumopname. Ouabaïen veroorsaak 'n merkbare inhibisie van die kalsiumopname by 'n konsentrasie van $10^{-6}M$, terwyl digitoksien nie 'n duidelike effek vertoon nie (vergelyk hoofstuk 4). Deur middel van eksperimentele ondersoek is gepoog om met behulp van die twee kardenoliede hartglikosiede 'n verband te vind tussen die effek van bogenoemde stowwe op die kalsiumopname en die proteïensintese in hartspierweefsel. Vir hierdie doel is van rothartspierskyfies gebruik gemaak.

Die literatuur bied geen voor die hand liggende antwoord op hierdie vraag nie. 'n Paar outeurs verwys egter wel na die verband tussen sommige glikosiede en proteïensintese. Weinreich & Karler (1971) het byvoorbeeld bevind dat difenielhidantoïen proteïensintese moontlik maak in die teenwoordigheid van ouabaïen. Difenielhidantoïen op sigself veroorsaak inhibisie van die proteïensintese (Beller & Mongillo, 1969). Sommige van die hartglikosiede assosieer direk met die sarkoplasmatiese retikulum en mag moontlik sodoende 'n invloed op die proteïensintese uitoefen (Bing, 1965; Dutta et al, 1968).

Volgens Kypson & Hait (1971) is baie min bekend aangaande die effek van harglikosiede op die transport en inkorporasie van aminosure in proteïene. Hierdie outeurs maak egter melding van die feit dat ouabaiën die sintese van proteïen inhibeer maar dat hierdie effek opgehef word in die aanwesigheid van hoër konsentrasies van kalsium en dat die proteïensintese onder sulke toestande selfs gestimuleer word. Hierdie gegewens beklemtoon weer eens die verband wat daar tussen Ca^{++} en proteïensintese bestaan (vergelyk hoofstuk 3). Die resultate van hierdie ondersoek word in hierdie hoofstuk weergegee en bespreek.

5.2 SINTESE VAN PROTEÏENE IN HARTSPIERWEEFSEL-PREPARATE

5.2.1. Bereiding van die preparate en kondisies vir sintese

Die metode wat gebruik word vir die sintese van miokardiale proteïene is basies volgens Beller (1968), gewysig vir spesifieke eksperimentele omstandighede.

Vir die in vitro-sintese van proteïene volgens die bogenoemde metode is harte van Wistar- en Sprague-Dawley-rotte in alle gevalle gebruik. Afhangende van die grootte van die proefdiere is 3-4 rotharte vir elke eksperiment geneem. Die diere is doodgemaak deur 'n hou agter die kop en is daarna onthoof. Soveel moontlik bloed is toegelaat om uit die sisteem te dreineer. Hierna is die harte vinnig uit die

proefdiere verwyder, alle bindweefsel afgesny en die hartweefsel afgespoel is yskoue ($0-4^{\circ}\text{C}$) 100mM KCl wat in 10mM KH_2PO_4 / K_2HPO_4 -buffer (pH 7,4) opgelos is. Die weefsel is in 'n ysbad koud gehou en voortdurend klam gemaak met buffer. Die harte is met behulp van 'n skêr fyngesny. Die fyngemaakte weefsel is baie deeglik vermeng om sodoende te verseker dat 'n homogene mengsel verkry word waarvan 'n gedeelte dan geneem en vir die res van die eksperiment gebruik is.

Die hartweefsel-mengsel is in 500 mg dele verdeel en elk is in 9,9 ml van Eagle se minimum essensiële kultuurmedium gevoeg (Eagle, 1959). Hierdie inkubasiemedium is sonder leusien opgemaak. Alle bogenoemde prosedures is tussen 0 en 4°C uitgevoer. In alle gevalle is 0,1 ml van die medikament by die proef en 0,1 ml water by die kontroles gevoeg. Na 'n inkubasietyd van 15 minute by 37°C in 'n skudwaterbad is $10\mu\text{l}$ L-leusien- ^{14}C (U) (spesifieke aktiwiteit 344mCi/mM) tot 'n finale aktiwiteit van $0,06\mu\text{Ci/ml}$ bygevoeg. Daar is dan verder vir 2 uur geïnkubeer.

5.2.2 Ekstraksie van oplosbare proteïene

Na afloop van die inkubasie is die weefsel afgespoel met 100mM KCl-buffer by 4°C . Hierdeur is die reaksie beëindig. Die weefsel is daarna vir 1 minuut in 5 ml KCl-buffer, met behulp van 'n Ultra-Turrax-homogeniseerder, gehomogeniseer. Die homogenaat is by 20 ml 100mM KCl-buffer (pH7,4) gevoeg. Hierdie mengsel is dan vir 30 minute by 'n temperatuur van tussen 0 en 4°C met behulp van 'n skudmasjien geskud om sodoende

die oplosbare proteïenfraksie te ekstraheer. Die mengsel is hierna vir 5 minute in 'n Roto Uni II by maksimum snelheid gesentrifugeer om swaar materiaal te sedimenteer. Die supernatant is vervolgens met TCA behandel tot 'n eindkonsentrasie van 5%. Die TCA-gepresipiteerde materiaal is driemaal met koue 5% TCA gewas deur herhaaldelik te hersuspendeer en te sentrifugeer.

Die gewaste presipitaat is uiteindelik opgelos in 1ml 1M NaOH. Die opgeloste proteïen is dan vir ten minste 30 minute by kamertermperatuur gelaat sodat die oplossing helder kon word. Hiervan is dan 0,3 ml geneem en by 15 ml sintillator (700 mg POPOP, 7g PPO, 1 400ml tolueen, 1 200ml etanol en 100 g Cab-O-Sil) gevoeg. Radioaktiwiteit is in 'n Packard Tri Carb-vloeistofsintillasieteller gemeet. Die hoeveelheid radioaktiwiteit, uitgedruk as telle per minuut per gram nat weefsel, is gebruik as indikasie van die hoeveelheid geïnkorporeerde ^{14}C -leusien.

5.2.3. Ekstraksie van aktomiosien

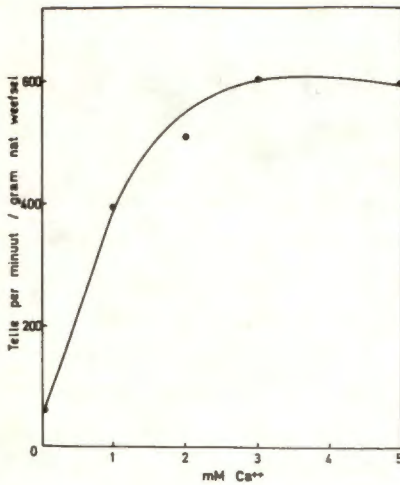
Die presipitaat wat oorgebly het na die ekstrahering van die oplosbare proteïene is gehersuspendeer in 10ml 600mM KCl (pH 7,0), met die byvoeging van 1mg ATP. Hierdie mengsel is vir 18 uur by 'n temperatuur van tussen 0 en 4°C geskud. Die mengsel is hierna gesentrifugeer om vaste materiaal te sedimenteer. Die supernatant is na 100ml verdun deur die byvoeging van gedistilleerde water. Dit het die KCl-konsentrasie van die oplossing verander na 60mM. Onder hierdie kondisies presipiteer die aktomiosien. Die presipitaat

is tweemaal gewas met 60mM KCl en uiteindelik opgelos in 1ml 1M NaOH en verder behandel soos in 5.2.2 beskryf vir radioaktiwiteitsbepaling.

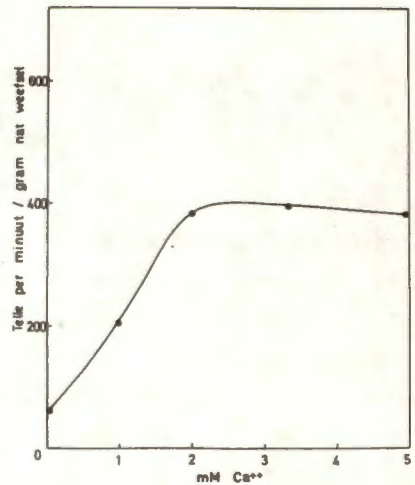
5.3 DIE EFFEK VAN Ca^{++} EN Mg^{++} OP DIE SINTESE

Aangesien beide Ca^{++} en Mg^{++} 'n duidelike stimulerende effek op die proteïensintese by geïsoleerde polisome het (vergelyk hoofstuk 3), is die vraag wat ontstaan of hierdie twee divalente katione dieselfde effek vertoon op die proteïensintese by hartweefselstudies. Die effek van verskillende konsentrasies van beide Ca^{++} en Mg^{++} , soos aangedui in die verskillende figure, op die sintese van oplosbare proteïene en aktomiosien is eksperimenteel ondersoek. Vir hierdie doel is 'n Eagle se medium voorberei waarin daar geen Ca^{++} of Mg^{++} voorkom nie. Deur verskillende konsentrasies Ca^{++} of Mg^{++} by die inkubasiemedium te voeg kon die effek van verskillende konsentrasies van enigeen van hierdie katione in afwesigheid van die ander nagegaan word. Die resultaat word vervolgens aangetoon en bespreek.

Uit figuur 5.1 kan gesien word dat Ca^{++} die proteïensintese in rothartweefsel stimuleer, soos ook waargeneem vir sintese met geïsoleerde polisome. Die konsentrasie van Ca^{++} waar optimale sintese verkry word, is tussen 3 en 5mM. Dit stem ooreen met die resultate wat met geïsoleerde polisome verkry is (vergelyk hoofstuk 3).



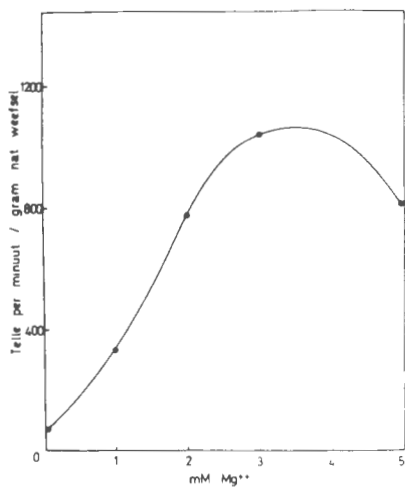
5.1.1



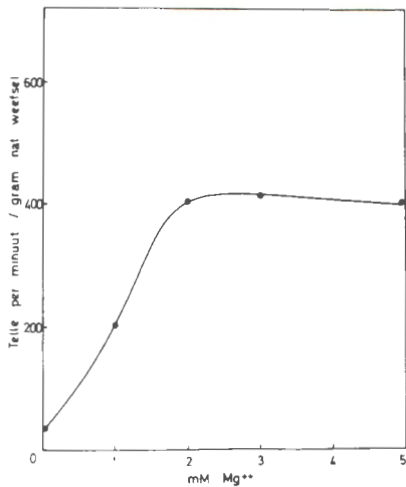
5.1.2

FIGUUR 5.1: Die effek van Ca^{++} in konsentrasies van 0-5mM op die sintese van oplosbare proteïene (5.1.1) en aktomiosien (5.1.2) 100 μl van verskillende stamoplossings van CaCl_2 is by die verskillende inkubasiemengsels gevoeg om eindkonsentrasies soos aangedui te gee. Die eksperimentele prosedure is uitgevoer soos beskryf in 5.2. Die inkubasieperiode was 120 minute by 37°C .

Vervolgens is die effek van Mg^{++} by die ooreenstemmende konsentrasies op die sintese nagegaan.



5.2.1



5.2.2

FIGUUR 5.2: Die invloed van Mg^{++} in konsentrasies van 0-5mM op die sintese van oplosbare proteïene (5.2.1) en aktomiosien (5.2.2) in rothartweefsel. 100 μ l van verskillende stamoplossings van $MgCl_2$ is bygevoeg om bogenoemde eindkonsentrasies te gee. Die prosedure is soos in 5.2 beskryf. Die inkubasieperiode was 120 minute by 37°C.

Hieruit is dit duidelik dat Mg^{++} die sintese van beide oplosbare proteïene sowel as aktomiosien stimuleer. Die konsentrasie waar optimale sintese verkry word, is weer eens tussen 3 en 5mM. Hierdie optimum kom ooreen met dié wat in die geval van sintese by geïsoleerde polisome verkry is (vergelyk figuur 3.4). Volgens die gegewens in figure 5.1 en 5.2 volg dit dat die totale hoeveelheid proteïensintese in die aanwesigheid van Mg^{++} hoër is as dié met Ca^{++} . Die sintese blyk egter effens hoër te wees by 1mM Ca^{++} in vergelyking met die toestand by Mg^{++} . Hierdie effek is egter nie so uitgesproke as in die geval

van geïsoleerde polisome nie (kyk hoofstuk 3).

Teen die hierbo beskrewe agtergrond is die invloed van die hartglikosiede op die proteïensintese in rothartweefsel ondersoek. Die eksperimentele bevinding word in die volgende gedeeltes gegee en bespreek.

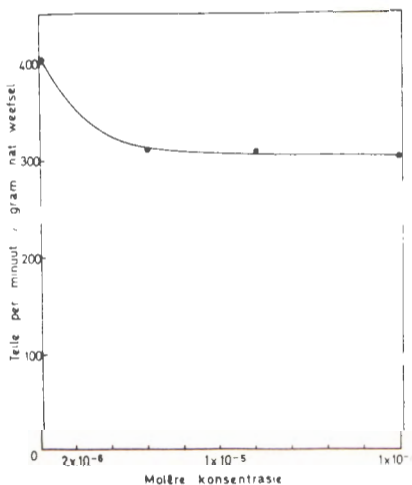
5.4 DIE INVLOED VAN HARTGLIKOSIEDE OP PROTEÏEN-SINTESE MET HARTSPIERPREPARETE

Uit die resultate wat in figure 5.1 en 5.2 aangetoon is, is dit dus duidelik dat sintese met hartspierpreparate duidelike ooreenkomste vertoon met die resultate verkry met geïsoleerde hartspierpolisome. Vervolgens is die invloed van hartglikosiede op eersgenoemde preparate nagegaan.

Die effek van verskillende konsentrasies ouabaïen en digitoksien op die sintese van beide oplosbare proteïene en aktomiosien is ondersoek. Die konsentrasies waarvan in die eksperimentele ondersoek gebruik gemaak is, is gevarieer van 1×10^{-11} tot 1×10^{-4} M. Konsentrasies van 10^{-11} tot 10^{-7} M vir hartglikosiede word as nietoksies beskou, terwyl hoër konsentrasies, byvoorbeeld 10^{-5} tot 10^{-4} M, wel as toksies vir die liggaam van die mens beskou word. 'n Konsentrasie van 10^{-6} M word aanvaar as op die grensgebied tussen die twee uiterstes te wees (Thorp & Cobbin, 1967).

5.4.1 Die effek van ouabaïen

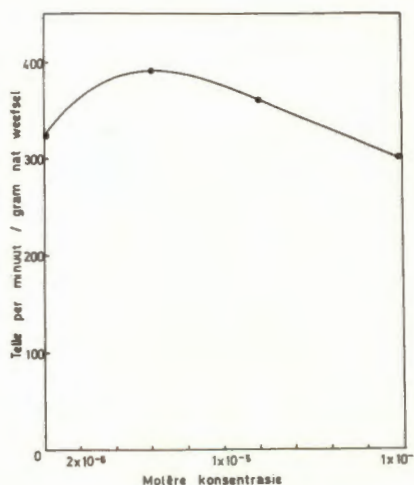
Die invloed van ouabaïen by konsentrasies vanaf $1 \times 10^{-4} \text{M}$ tot $2 \times 10^{-6} \text{M}$ op die sintese van oplosbare proteïene sowel as aktomiosien is nagegaan. Hiervoor is die weefselstukke vir 2 uur by 37°C in die aanwesigheid van ouabaïen by die konsentrasies soos hierbo genoem geïnkubeer. Stamoplossings van ouabaïen is vir alle eksperimente gebruik en hiervan is telkens $100 \mu\text{l}$ bygevoeg om dan die eindkonsentrasies soos aangedui te gee. Die ouabaïen-invloed word in hierdie eksperiment vergelyk met 'n kontrole waar geen glikosied toegevoeg is nie. Die resultaat van hierdie eksperiment, vir die sintese van die oplosbare proteïene, word in figuur 5.3 weergegee.



FIGUUR 5.3: Die sintese van oplosbare proteïene in die teenwoordigheid van ouabaïen in konsentrasies van 0 – $1 \times 10^{-4} \text{M}$. Die konsentrasies wat ondersoek is, was 6×10^{-6} , 2×10^{-5} en 1×10^{-4} molêr. Hierdie konsentrasies word vergelyk met 'n kontrole waar geen glikosied aanwesig is nie. Die inkubasieperiode was 120 minute by 37°C . Die eksperiment is uitgevoer soos uiteengesit in 5.2.

Volgens hierdie figuur is dit duidelik dat ouabaïen, in geeneen van die konsentrasies wat in hierdie eksperiment gebruik is 'n sterk inhiberende effek op die sintese tot gevolg gehad het nie.

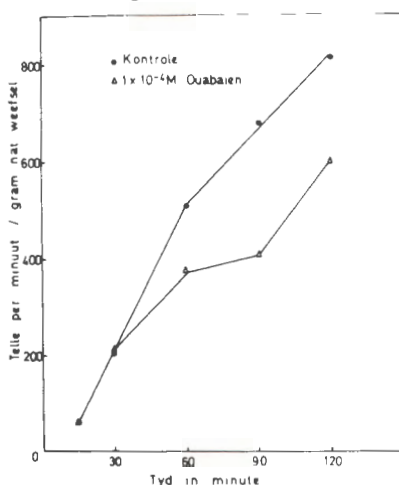
Voorts is die inkorporasie van ^{14}C -leusien in aktomiosien onder dieselfde eksperimentele toestande as vir oplosbare proteïene ondersoek. Die resultaat hiervan word in figuur 5.4 voorgestel.



FIGUUR 5.4: Die sintese van aktomiosien in die aanwesigheid van ouabaïen in konsentrasies van 6×10^{-6} , 2×10^{-5} en 1×10^{-4} molêr. Die effek van hierdie konsentrasies van ouabaïen is vergelyk met 'n kontrole waar geen ouabaïen teenwoordig was nie. Die inkubasieperiode was 120 minute by 37°C . Die ekstraksie van aktomiosien en die bepaling van die hoeveelheid radioaktiwiteit is uitgevoer soos in 5.2 beskryf.

By konsentrasies tussen 2×10^{-6} en $2 \times 10^{-5}\text{M}$ kan die effek van ouabaïen moontlik as 'n swak stimulerings beskryf word. 'n Konsentrasie van $1 \times 10^{-4}\text{M}$ gee egter 'n laer sintese as die kontrole. Dit is hieruit

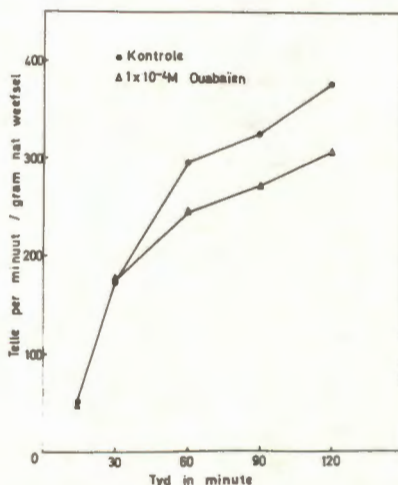
duidelik dat geen uitgesproke invloed van ouabaïen op die sintese van proteïene aangetoon kon word nie. 'n **Algemeen inhiberende** invloed is op die sintese van die oplosbare proteïene gevind, terwyl 'n geringe inhibisie van aktomiosiensintese slegs by relatief hoë ouabaïen-konsentrasies (10^{-4}M) waargeneem kan word. Die vraag kan nou gestel word of die afname in die totale hoeveelheid ^{14}C -leusien ingebou (figuur 5.3 by 10^{-4}M ouabaïen) wêl inhibisie voorstel, aangesien die effek by veral aktomiosiensintese nie baie duidelik was nie. Ten einde hieroor verder duidelikheid te kry is die kinetiek van proteïensintese by 'n konsentrasie van 10^{-4}M vir oplosbare proteïene sowel as aktomiosien ondersoek. Die resultaat van die invloed van ouabaïen in 'n konsentrasie van $1 \times 10^{-4}\text{M}$ op die tydsafhanklike inkorporasie van ^{14}C -leusien in oplosbare proteïene word in figuur 5.5 aangedui.



FIGUUR 5.5: Die invloed van ouabaïen by 'n konsentrasie van $1 \times 10^{-4}\text{M}$ op die tydsafhanklike sintese van oplosbare proteïene. Die inkubasiëperiodes was 15, 30, 60, 90 en 120 minute by 37°C . Die eksperimentele prosedure is soos in 5.2 beskryf.

Volgens figuur 5.5 kon daar geen betekenisvolle verskil in die sintese tussen die kontrole en die toets binne die eerste 15 minute van inkubasie waargeneem word nie. Met verdere tydsverloop kom 'n inhiberende invloed van ouabaïen na vore. Hierdie effek is waarneembaar by alle tye van inkubasie vanaf 30 minute tot 120 minute.

Die invloed van ouabaïen is vervolgens onder dieselfde eksperimentele omstandighede op die tydsafhanklike sintese van aktomiosien ondersoek. Die resultaat hiervan word in figuur 5.6 voorgestel.



FIGUUR 5.6: Die tydsafhanklike sintese van aktomiosien in die aanwesigheid van $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ ouabaïen. Die inkubasieperiodes was 15, 30, 60, 90 en 120 minute by 37°C . Die eksperimentele prosedure is verder uitgevoer soos beskryf vir figuur 5.5.

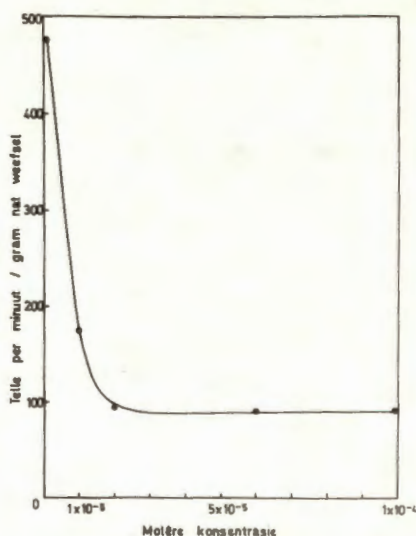
Dieselfde uitwerking word hier deur ouabaïen uitgeoefen. Die mate van inhibering is egter in die geval van aktomiosien duidelik minder as vir die oplosbare proteïene.

Uit die voorafgaande gegewens kan die afleiding dus gemaak word dat relatief hoë konsentrasies van ouabaïen (10^{-4} M) wél 'n inhibisie van die sintese van oplosbare proteïene en aktomiosien veroorsaak. Aan die hand van die kinetiese proewe kan dan gestel word dat die laer sintese van aktomiosien by 1×10^{-4} M ouabaïen (figuur 5.4) en ook die sintese in die geval van oplosbare proteïene (figuur 5.5) swak inhibisie verteenwoordig.

5.4.2. Die effek van digitoksien

Vervolgens is die invloed van 'n glikosied wat, in teëstelling tot ouabaïen, 'n swak invloed op die kalsiumopname uitgeoefen het, op die sintese van proteïene nagegaan.

Die inkorporasie van ^{14}C -leusien in proteïene in die aanwesigheid van verskillende konsentrasies digitoksien is eksperimenteel ondersoek. Die proteïenfraksies waarby radioaktiewe metings gedoen is, is die oplosbare proteïene asook aktomiosien. Ten eerste is die invloed van digitoksien in konsentrasies wat wissel tussen 1×10^{-5} en 1×10^{-4} molêr op die sintese van oplosbare proteïene in rothartspierweefsel ondersoek. Die sintese onder hierdie kondisies is vergelyk met 'n kontrole waar geen glikosied toegevoeg is nie. Die resultaat hiervan word in figuur 5.7 gegee.

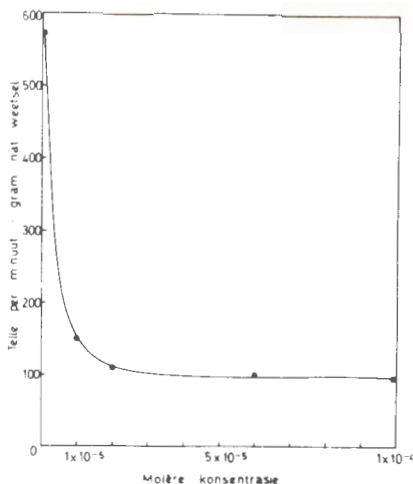


FIGUUR 5.7: Die sintese van oplosbare proteïene in die teenwoordigheid van digitoksien. Die konsentrasies van hierdie glikosied wat ondersoek is, was 1×10^{-5} , 2×10^{-5} , 6×10^{-5} en 1×10^{-4} M. Die inkubasieperiode was 120 minute by 37°C . Digitoksien is in 'n 50 : 50 alkohol/chloroform mengsel opgelos. By alle kontroles is 100 μl van hierdie mengsel gevoeg en by die proef verskillende konsentrasies van die oplossing. Die verdere eksperimentele prosedure is uitgevoer soos in 5.2 beskryf.

Die gegewens in figuur 5.7 dui op 'n redelik sterk inhibisie van die sintese van oplosbare proteïene. Persentasiegewys uitgedruk stel hierdie resultaat 'n inhibisie van 84% voor. Daar is egter oor 'n aantal van 3 eksperimente gevind dat die inhibisie van die sintese van oplosbare proteïene 'n gemiddeld van 64% bedra.

Voorts is die sintese van aktomiosien in die teenwoordigheid van digitoksien onder dieselfde bogenoemde

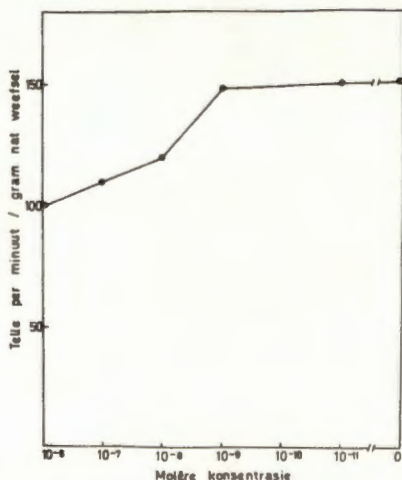
eksperimentele toestande ondersoek. Die resultaat word in figuur 5.8 voorgestel.



FIGUUR 5.8: Die sintese van aktomiosien onder invloed van digitoksien. As kontrole is geneem die sintese in die afwesigheid van digitoksien. Die verskillende konsentrasies van die glikosied wat in die ondersoek gebruik is, was 1×10^{-5} , 2×10^{-5} , 6×10^{-5} en 1×10^{-4} molêr. Die inkubasieperiode was 120 minute by 37°C . Die verdere prosedure is soos in figuur 5.7 beskryf.

Hieruit volg dit dat digitoksien die sintese van aktomiosien insgelyks sterk onderdruk. Aangesien hierdie effek van digitoksien so prominent is, ontstaan die vraag by watter digitoksien-konsentrasie die inhibitoriese effek na vore begin kom. Om hieroor duidelikheid te kry is 'n eksperiment uitgevoer waarin die konsentrasie van die glikosied sodanig gevarieer is dat meer gegewens verkry kon word aangaande die inhibitoriese effek tussen 0 en 1×10^{-5} molêr (kyk figure 5.7 en 5.8). Hiervoor is die invloed van digitoksien in konsentrasies wat wissel

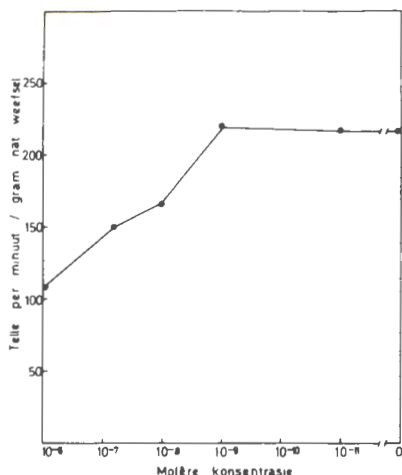
van 10^{-11} - 10^{-6} M op die sintese van oplosbare proteïene nagegaan. Die resultate van hierdie ondersoek word in figuur 5.9 voorgestel.



FIGUUR 5.9: Die invloed van lae konsentrasies van digitoksien op die sintese van oplosbare proteïene in rothart-spierweefsel. Die verskillende konsentrasies van die glikosied wat in hierdie ondersoek gebruik is, was 10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} en 10^{-6} molêr. As kontrole is geneem die sintese in afwesigheid van die glikosied. Die inkubasieperiode was 120 minute by 37°C . Die proef is verder uitgevoer soos in figuur 5.7 beskryf.

Volgens bostaande gegewens kan die afleiding gemaak word dat 'n toename in konsentrasie van digitoksien vanaf die nie-toksiese na die meer toksiese gebied in 'n toenemende mate 'n inhibisie van die sintese van oplosbare proteïene veroorsaak. Uit figuur 5.9 blyk dit dat die inhibitoriese effek van digitoksien ten opsigte van sintese van oplosbare proteïene by 'n konsentrasie van $1 \times 10^{-9}\text{M}$ begin. Dieselfde eksperimentele ondersoek is op die sintese van akto-

miosien uitgevoer. Die resultaat hiervan word in figuur 5.10 gevind.



FIGUUR 5.10: Die invloed van lae konsentrasies van digitoksien op die sintese van aktomiosien in rothartspierweefsel. Die verskillende konsentrasies waarvan gebruik gemaak is, was 10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} en 10^{-6} molêr. As kontrole is geneem die sintese-aktiwiteit in die afwesigheid van die glikosied. Die inkubasieperiode was 120 minute by 37°C . Die proef is verder uitgevoer soos in figuur 5.7 beskryf.

Hier word dieselfde tendens vertoon naamlik 'n toename in die hoeveelheid inhibisie met toename in konsentrasie van die glikosied. Die konsentrasie waarby inhibering aanvanklik waargeneem kan word, stem ook ooreen met dié verkry by die sintese van oplosbare proteïene, naamlik 10^{-9}M (figuur 5.9).

5.5 KONKLUSIES

Die resultate wat in hierdie hoofstuk behandel word, is gebaseer op die effek wat die twee digitalis-glikosiede, ouabaïen en digitoksien, op die proteïensintese in rothartspierweefsel vertoon. Die proteïenfraksies wat in die sinteseproses ondersoek is, is oplosbare proteïene en aktomiosien. Die invloed van verskillende konsentrasies van hierdie medikamente op die proteïensintese is ondersoek.

Uit die eksperimentele ondersoeke blyk dit dat ouabaïen nie 'n buitengewoon opvallende effek op die proteïensintese in hartspierweefsel vertoon nie. Hierdie konklusie is gebaseer op konsentrasiekurwes van ouabaïen op proteïensintese sowel as op kinetiese eksperimente. Pas by hoë konsentrasies van ouabaïen ($1 \times 10^{-4}M$) word 'n inhibisie van die sintese waargeneem.

In teenstelling tot ouabaïen veroorsaak digitoksien 'n sterk inhibisie van die sintese van beide oplosbare proteïene en aktomiosien (figure 5.7 en 5.8). 'n Hoë mate van inhibisie van die sintese is met konsentrasies van $1 \times 10^{-5}M$ en hoër verkry. Hierdie inhibitiese effek kom by 'n konsentrasie van $10^{-9}M$ na vore en neem progressief toe met styging in die konsentrasie (figure 5.9 en 5.10).

Dit is hieruit duidelik dat ouabaïen en digitoksien

opvallende verskille vertoon ten opsigte van die invloed van hierdie stowwe op die opname van Ca^{++} (hoofstuk 4) en die sintese van proteïene (hoofstuk 5). Voorts is die effek van hierdie glikosiede op (1) die sintese met geïsoleerde polisome en (2) die O_2 -opname deur geïsoleerde mitochondria ondersoek. Die resultate word in die volgende hoofstuk weergegee en bespreek.

DIE DIREKTE EN INDIREKTE EFFEK VAN OUABAÏEN
EN DIGITOKSIEN OP DIE PROTEÏENSINTESE

6.1 INLEIDING

Die inhiberende invloed van hartglikosiede op die transport van aminosure in Ehrlich-karsenoom-askitis-selle, eritrosiete, breinkortekssnitte en rotdiafragma is reeds aangetoon (Kypson & Hait, 1971). Dieselfde outeurs maak egter ook melding daarvan dat baie min op hierdie stadium bekend is aangaande die direkte invloed van hartglikosiede op die inkorporasie van aminosure in miokardiale proteïene. Hulle het bevind dat ouabaïen die sintese in hartweefsel snitte inhibeer.

Oor die energieverbruik en -aanwending in die miokardium bestaan heelwat meer gegewens. Daar is vasgestel dat 60-80% van die miokardiale energie-metabolisme gerig word op kontraksie, terwyl 30-40% vir ander doeleindes, waaronder ook proteïensintese, aangewend word (Opie, 1965). Die meting van die O_2 -opname van hartspierweefsel as maatstaf vir die oksidasietempo, word deur verskeie outeurs genoem (Bing, 1965; Opie, 1965). Hierdie outeurs bevind ook dat glikosiede oor die algemeen nie 'n verhoging van die O_2 -opname in hartspier teweegbring nie. Dit toon 'n goeie korrelasie met die waarnemings van Dutta et al (1968), naamlik dat die glikosiede 'n

hoër binding aan mikrosome vertoon as aan mitochondria en nuklei.

In hierdie hoofstuk volg 'n uiteensetting van die eksperimentele opstelling wat gebruik is om die effek van die glikosiede op (1) die proteïensintese deur geïsoleerde polisome en (2) die opname van suurstof deur geïsoleerde mitochondria te ondersoek. 'n Bespreking van die resultate word gegee.

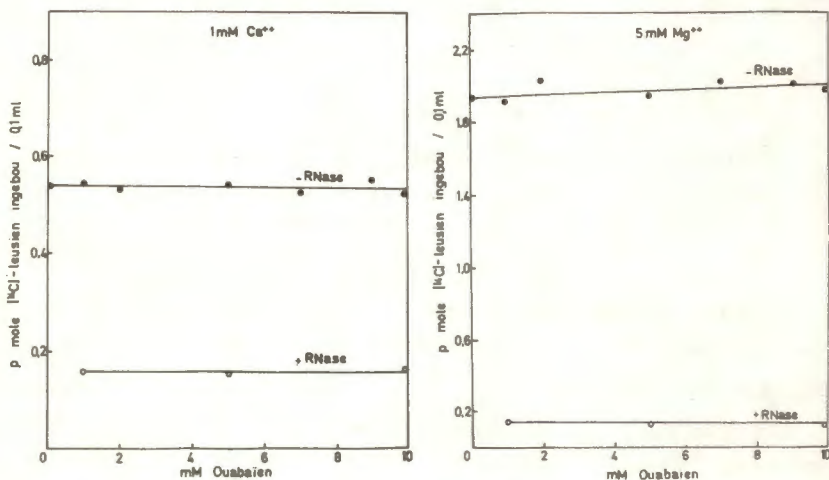
6.2 DIE EFFEK VAN OUABAÏEN EN DIGITOKSIEN OP PROTEÏENSINTESE DEUR GEÏSOLEERDE ROTHART-POLISOME

Geïsoleerde polisome is berei volgens die prosedure wat in hoofstuk 3 beskryf is. Ten einde vas te stel of die glikosiede moontlik 'n direkte invloed op die polisome het, is verskillende konsentrasies ouabaïen en digitoksien by die reaksiemengsels vir in vitro-proteïensintese in 'n selvrye sisteem gevoeg. Aangesien verskillende konsentrasies Ca^{++} en Mg^{++} die sintese van proteïene verskillend beïnvloed het, byvoorbeeld dat Ca^{++} in 'n konsentrasie van 1mM sintese onderhou, terwyl 'n hoë sinteseaktiwiteit by 5mM Mg^{++} voorkom (vergelyk hoofstuk 3), is die invloed van die glikosiede onder hierdie toestande nagegaan. Die sintese in die aanwesigheid van die glikosiede is telkens vergelyk met dié in die teenwoordigheid van RNase. Hierdeur is gepoog om die invloed van ouabaïen en digitoksien op die sintese enersyds by 'n kritiese kalsiumkonsentrasie (1mM) en andersyds onder toestande

vir optimale sintese (5mM Mg^{++}) te evalueer.

6.2.1. Die invloed van ouabaïen

Die effek van ouabaïen op die proteïensintese is by 1mM Ca^{++} en 5mM Mg^{++} ondersoek. Hiervoor is ouabaïen tot die reaksiemengsels toegevoeg om eindkonsentrasies wat wissel tussen 1 en 10mM te gee. Die resultaat van hierdie ondersoek word in figuur 6.1 aangedui.



6.1.1

6.1.2

FIGUUR 6.1: Die invloed van ouabaïen op die sintese van proteïene deur geïsoleerde hartpolisome by 1mM Ca^{++} (6.1.1) en 5mM Mg^{++} (6.1.2). Die konsentrasies wat ondersoek is, is soos in die figure aangedui. As kontrole is RNase (1mg/ml) by inkubasiemengsels met 1,5 en 10mM gevoeg. Die inkubasieperiode was 30 minute by 37°C . Die eksperiment is uitgevoer soos in 3.2.3 beskryf.

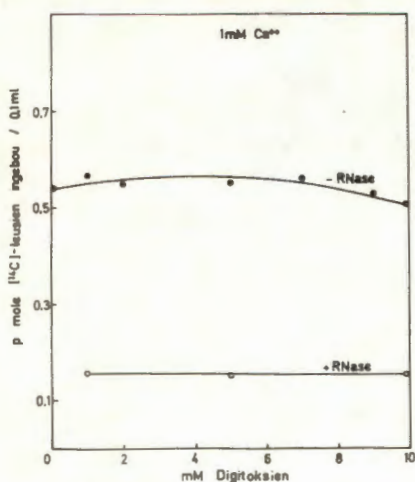
Hieruit is dit duidelik dat ouabaïen in verskillende konsentrasies geen invloed op die proteïensintese deur geïsoleerde polisome in die aanwesigheid van 1mM Ca^{++} en 5mM Mg^{++} onderskeidelik, het nie. Uit figuur

6.1 is dit verder duidelik dat die totale hoeveelheid sintese by 5mM Mg^{++} betekenisvol hoër is as dié by 1mM Ca^{++} . Die sintese vind egter wel by 1mM Ca^{++} onder hierdie kondisies plaas. Dit word bevestig deurdat RNase 'n algehele opheffing van die sintese by 1mM Ca^{++} asook by 5mM Mg^{++} veroorsaak (vergelyk ook hoofstuk 3).

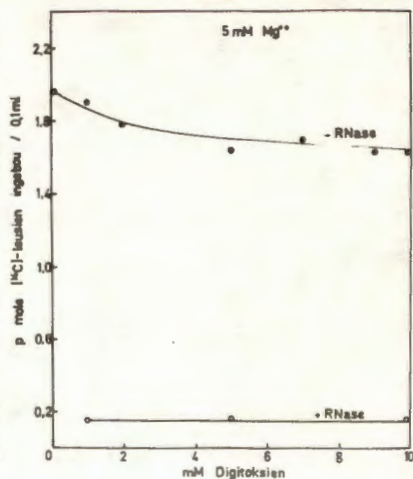
6.2.2. Die invloed van digitoksien

Om die invloed van digitoksien op die in vitro-sintese met geïsoleerde hartpolisome te ondersoek, is verskillende konsentrasies van digitoksien by reaksiemengsels met 1mM Ca^{++} en 5mM Mg^{++} gevoeg. Die eindkonsentrasies waarin digitoksien in albei gevalle voorkom, wissel tussen 1 en 10mM. Die resultaat hiervan word in figuur 6.2 gegee.

Aan die hand van hierdie resultaat kan die afleiding gemaak word dat digitoksien, by die konsentrasies wat ondersoek is, geen uitgesproke effek op die sintese vertoon nie. In die geval van sintese by 5mM Mg^{++} mag die effek moontlik as swak inhibering vertolk word. Die sintese is in hierdie geval weer eens hoër by 5mM Mg^{++} as by 1mM Ca^{++} , terwyl geen sintese in die aanwesigheid van RNase plaasvind nie.



6.2.1



6.2.2

FIGUUR 6.2: Die effek van digitoksien op die sintese van proteïene deur geïsoleerde hartpolisome by 1mM Ca⁺⁺ (6.2.1.) en 5mM Mg⁺⁺ (6.2.2). Die konsentrasies van digitoksien wat ondersoek is, is soos aangedui in die figure. As kontroles is RNase (1mg/ml) by reaksiemengsels met 1,5 en 10mM digitoksien gevoeg. Die inkubasieperiode was 30 minute by 37°C. Die prosedure is verder soos in 3.2.3 beskryf.

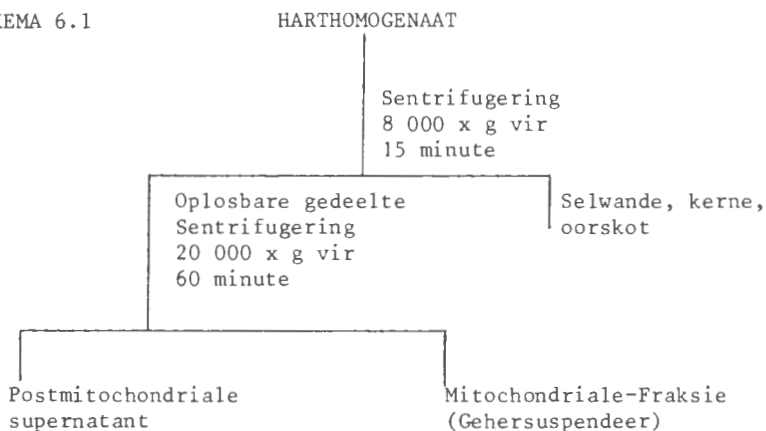
6.3 DIE OPNAME VAN SUURSTOF DEUR GEÏSOLEERDE MITOCHONDRIA

Om 'n moontlike indirekte effek van die glikosiede op die sintese te kontroleer is die invloed van ouabaïen en digitoksien op die energievoorsiening in die miokardium ondersoek. Hiervoor is die opname van suurstof deur geïsoleerde mitochondria nagegaan. Die metode wat hiervoor gebruik is, is dié soos beskryf deur Umbreit et al (1964) vir soogdierweefsel. Die eksperimentele opstelling en resultate word vervolgens uiteengesit en bespreek.

6.3.1. Metode

Die harte van 3-4 rotte, afhange van die grootte van die proefdiere, is geneem en onmiddellik na verwydering uit die dier met 'n skêr stukkend geknip en afgespoel met yskoue sukrose-Tris-buffer (20mM Tris-HCl, pH 7,0; 300mM sukrose). Die weefsel is in 10 ml van dieselfde buffer by 0-4°C met behulp van 'n Ultra-Turrax-homogeniseerder gehomogeniseer. Die homogenaat is aan differensiële ultrasentrifugering onderwerp soos in skema 6.1 uiteengesit.

SKEMA 6.1



Die mitochondriale-fraksie is in 1,7 ml sukrose-Tris-buffer deur middel van 'n pipet gehersuspendeer.

Hierdie suspensie is in 'n ysbad vir verdere gebruik gehou. Die volgende reaksiemengsel soos in tabel 6.1 uiteengesit, is saamgestel.

TABEL 6.1

		KONTROLE	PROEF
STOF	KONSENTRASIE	VOLUME (ml).	VOLUME (ml).
KH_2PO_4	4,0827 g/100ml	0,1	0,1
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,9926 g/100ml	0,1	0,1
KCl	1,4612 g/100ml	0,1	0,1
Glukose	9 g/100ml	0,1	0,1
Na-Piruvaat	0,0715 g/100ml	0,1	0,1
†Mitochondria	-	0,3	0,3
H_2O	-	0,7	0,6
††Glikosied	veranderlik	-	0,1
		1,5	1,5
†KOH	10%	0,1	0,1

†Die mitochondriale suspensie is in die syarm van die respirometerflessie geplaas en die KOH in die sentrale silindertjie.

††In die geval van proewe met digitoksien is 0,1 ml alkohol/chloroform -mengsel by die kontrole gevoeg en 0,6 ml water in plaas van 0,7 ml soos by die ander kontroles.

Na ewwilibrering vir 10 minute by 37°C is die inhoud

van die syarm by die inhoud van die flessie gevoeg. Dit is as die nultyd geneem. Die suurstofopname is direk op die manometers van 'n Gilson differensiële respirometer afgelees op tye soos aangedui in die onderskrifte van elke figuur.

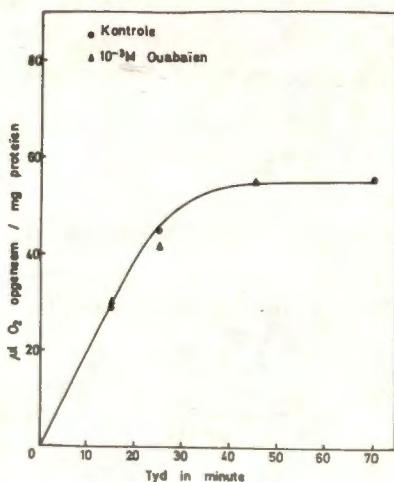
'n Proteïenbepaling, volgens die Biuret-metode, is op die mitochondriale suspensie uitgevoer. Die resultaat van 'n eksperiment is telkens uitgedruk as $\mu\text{l O}_2$ opgeneem/mg proteïen.

6.4 RESULTATE

Die effek van ouabaïen en digitoksien in verskillende konsentrasies, soos in elke figuur aangedui, is op die O_2 -opname deur geïsoleerde mitochondria uit rothartspierweefsel nagegaan.

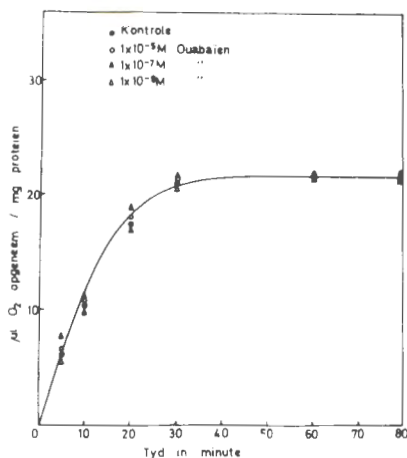
6.4.1. Die effek van ouabaïen

Om die effek van 'n relatief hoë konsentrasie van ouabaïen (10^{-3}M) op die O_2 -opname deur geïsoleerde mitochondria vas te stel is hierdie glikosied by die reaksiemengsel gevoeg en die resultaat vergelyk met 'n kontrole waar geen glikosied toegevoeg is nie. Die bevindings hiervan word in figuur 6.3 gegee.



FIGUUR 6.3: Die effek van ouabaïen in 'n konsentrasie van $1 \times 10^{-3}\text{M}$ op die suurstofopname deur geïsoleerde rothartmitochondria. Die inkubasieperiodes waarby lesings geneem is, is 0, 15, 25, 45 en 70 minute by 37°C .

Dit is hieruit duidelik dat die aanwesigheid van ouabaïen in hierdie konsentrasie geen betekenisvolle invloed op die opname van suurstof het nie indien dit vergelyk word met die kontrole. Om verder duidelikheid te kry oor die effek van ouabaïen is die invloed van laer konsentrasies ondersoek. Hier-voor is ouabaïen in konsentrasies van 10^{-9} - 10^{-5}M bygevoeg en die effek vergelyk met 'n kontrole waar geen glikosied toegevoeg is nie. Die resultaat hiervan word in figuur 6.4 aangetoon.



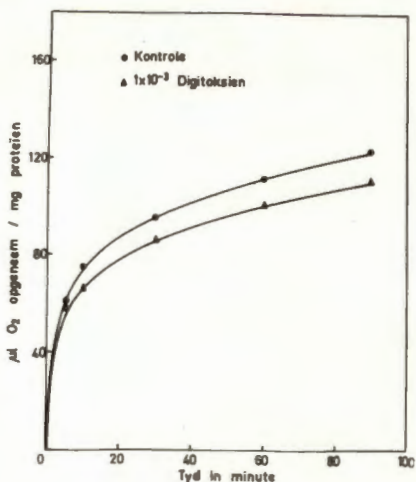
FIGUUR 6.4: Die effek van ouabaïne in konsentrasies van 1×10^{-9} , 1×10^{-7} en 1×10^{-5} M op die opname van suurstof deur geïsoleerde hartmitochondria. As kontrole is geneem die O_2 -opname in die afwesigheid van die glikosied. Die inkubasieperiodes waarby lesings geneem is, is 0,5, 10, 20, 30, 60 en 80 minute by 37°C .

Hieruit blyk dit ook duidelik dat ouabaïne in hierdie konsentrasies geen duidelike effek ten opsigte van die O_2 -opname vertoon nie. Die afleiding kan dus gemaak word dat ouabaïne in geeneen van die konsentrasies waarby die effek van hierdie glikosied nagegaan is enige betekenisvolle invloed op die mitochondriale funksie ten opsigte van die verbruik van suurstof uitoefen nie.

6.4.2. Die effek van digitoksien

Na analogie van die ondersoek met ouabaïne is die invloed van digitoksien op die suurstofopname eksperimenteel nagegaan. Ten eerste is die effek van digi-

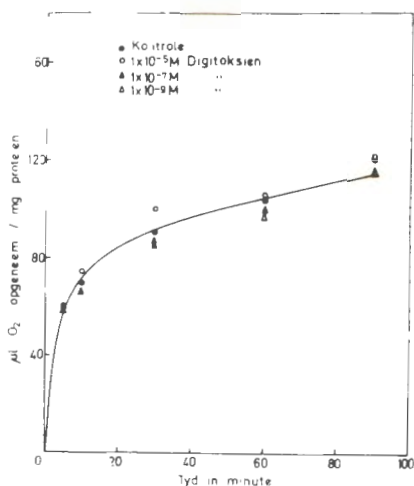
toksien in 'n konsentrasie van $1 \times 10^{-3} \text{M}$ op die O_2 -opname deur mitochondria ondersoek. Die resultaat hiervan word in figuur 6.5 aangetoon.



FIGUUR 6.5: Die effek van digitoksien in 'n konsentrasie van $1 \times 10^{-3} \text{M}$ op die O_2 -opname deur geïsoleerde hartmitochondria. As kontrole is geneem die O_2 -opname in die afwesigheid van digitoksien. Die inkubasiëperiodes waarby lesings geneem is, is 0, 5, 10, 30, 60 en 90 minute by 37°C .

Aan die hand van die gegewens in hierdie figuur kan gesien word dat digitoksien nie 'n betekenisvolle effek op die O_2 -opname het nie. Die O_2 -opname is egter deurgaans effens laer in die aanwesigheid van hierdie glikosied indien dit vergelyk word met die kontrole.

Ten einde ook die moontlike effek van laer konsentrasies van hierdie glikosied na te gaan is digitoksien in konsentrasies wat wissel tussen 10^{-5} en 10^{-9}M tot inkubasiemedia toegevoeg. Die resultaat hiervan word in figuur 6.6 weergegee.



FIGUUR 6.6: Die invloed van digitoksien in konsentrasies van 10^{-9} , 10^{-7} en 10^{-5} M op die O_2 -opname deur geïsoleerde rothartmitochondria in vergelyking met 'n kontrole waar geen glikosied toegevoeg is nie. Die inkubasiëperiodes waarby lesings geneem is, is 0, 5, 10, 30, 60, en 90 minute by $37^{\circ}C$.

Dit volg uit die hiervoorafgaande dat bogenoemde konsentrasies van digitoksien eweneens geen uitgesproke effek op die suurstofopname vertoon nie en dus nie die mitochondriale-aktiwiteit enigsins opvallend beïnvloed nie.

6.5 KONKLUSIES

Uit die voorafgaande gedeelte volg dit dat geen duidelike effek met die glikosiede, ouabaïne en digitoksien, op die proteïensintese deur geïsoleerde rothartpolisome aangetoon kon word nie. Verder is

daar ook geen duidelijke effek van hierdie glikosiede
waar te neem op die O_2 -opname deur geïsoleerde rot-
hartmitochondria nie.

HOOFSTUK 7

ALGEMENE BESPREKING

Die invloed van kalsium- en magnesiumione op die sintese van proteïene deur geïsoleerde rothartpolisome, asook aspekte van die proteïensintese in intacte hartspierselle en die verband van laasgenoemde met enkele ander biochemiese prosesse, is in hierdie ondersoek nagegaan.

Soos reeds in hoofstuk 2 aangetoon, bestaan daar in die literatuur 'n teenstrydigheid oor die direkte rol van kalsiumione op die proteïensintese in hartspier, al dan nie. Die rol van magnesiumione is egter welbekend. Ten eerste sal dus aandag gegee word aan die vraag of kalsiumione 'n direkte invloed op die proteïensintese uitoefen en daarna aan die relatiewe belangrikheid van hierdie twee divalente ione onder bespreking.

Beide Ca^{++} en Mg^{++} stimuleer aminosuurinkorporasie in proteïene wat gesintetiseer word in die aanwesigheid van rothartpolisome (kyk figuur 3.7). Uit die resultate wat verkry is, blyk dit dat Ca^{++} en Mg^{++} in konsentrasies van 1 tot 7mM 'n progressief stimulerende effek op die sintese vertoon, met optima by 4-5mM (vergelyk figure 3.5 en 3.6). Die waargenome verskil is egter dat die persentasie stimulering tussen 1mM en die optimum in die geval van Mg^{++} aansienlik

hoër is as wat met Ca^{++} -ione die geval is. Dit moet vermeld word dat die optimum konsentrasies wat hier vir sintese verkry word waarskynlik hoër is as die normale intrasellulêre divalente ionkonsentrasies wat in vivo in die hartspiersel voorkom. Onder laasgenoemde kondisies speel egter sulke polivalente katione soos spermidiene en protamiene ook 'n rol in die sintese. Hieroor is egter nog min bekend en dit is in hierdie ondersoek ook buite rekening gelaat.

In die geval van in vitro-proteïensintese met hartspierskyfies vertoon beide Ca^{++} en Mg^{++} 'n soortgelyke stimulerende effek (vergelyk figure 5.1 en 5.2). 'n Opvallende verskil in die effekte van Mg^{++} en Ca^{++} word by lae konsentrasies van hierdie ione waargeneem. Daar is naamlik gevind dat Ca^{++} in 'n konsentrasie van 1mM die proteïensintese onderhou. 'n Kontrole onder dieselfde omstandighede maar in teenwoordigheid van RNase het geen proteïensintese tot gevolg nie (vergelyk figuur 3.7). Magnesiumione daarenteen onderhou by 'n konsentrasie van 1mM geen sintese nie en die hoeveelheid sintese is in hierdie geval identies aan dié verkry met 'n RNase-kontrole (vergelyk figuur 3.7). Die verskil kom veral duidelik na vore uit die kinetiek van proteïensintese by 'n konsentrasie van 1mM vir beide Ca^{++} en Mg^{++} . Oor 'n inkubasieperiode van 30 minute vind proteïensintese in die aanwesigheid van 1mM Ca^{++} plaas, terwyl, indien dit vergelyk word met 'n RNase-kontrole, geen sintese plaasvind by 1mM Mg^{++} nie (vergelyk figuur 3.8). Hieruit kan die afleiding gemaak word dat Ca^{++} in 'n lae konsentrasie (1mM) sintese van proteïene onderhou, terwyl Mg^{++} nie

hierdie eienskap vertoon nie.

Die volgende aspek wat behandel word is wat die relatiewe belangrikheid van Ca^{++} en Mg^{++} ten opsigte van die proteïensintese is. Mg^{++} blyk belangrik te wees in die isoleringsproses wat gevolg word om polisome vir die in vitro-sintese van proteïene te berei. Wanneer polisome in 'n Ca^{++} -milieu geïsoleer word, is die aktiwiteit daarvan aansienlik verlaag, terwyl polisome wat in die aanwesigheid van Mg^{++} voorberei is 'n hoër aktiwiteit vertoon (vergelyk figure 3.3 en 3.4 en paragrawe 3.4 en 3.5). Hieruit volg dan dat Mg^{++} , as divalente kation, moontlik noodsaaklik is vir die handhawing van ribosomale aktiwiteit en struktuur tydens 'n relatief ruwe isoleringsprosedure.

Uit bogenoemde kan dus die konklusie gemaak word dat

- (a) beide Ca^{++} en Mg^{++} sintese van proteïene kan stimuleer met optima van ongeveer dieselfde orde;
- (b) dat Ca^{++} die preferente ioon vir sintese by lae divalente ioonkonsentrasies is en (c) dat Mg^{++} die preferate ioon vir die stabilisering van die sel-vrye sisteem tydens die isolasie prosedure is.

In die lig van die besondere plek wat tans aan Ca^{++} toegeken word ten opsigte van die regulering van die proteïensintese (sien later in hierdie hoofstuk) sal nou hoofsaaklik aan die betekenis van die Ca^{++} -effek aandag gegee word. 'n Indikasie van die invloed van Ca^{++} op die stabiliteit van polisome is met behulp van sukrosegrediëntsentrifugering gekry. Uit hierdie ondersoek het geblyk dat Ca^{++} by 1mM meer swaar materiaal in die polisoom struktuur tot gevolg het

as wat met Mg^{++} by dieselfde konsentrasie die geval is. Aangesien 'n konsentrasie van $\pm 5mM$ vir beide Ca^{++} en Mg^{++} optimale sintetiese aktiwiteit tot gevolg het, is hierdie waarneming waarskynlik te verklaar in die lig van die stabiele polisome wat by hierdie konsentrasie aangetref word (vergelyk figure 3.13 en 3.14). Die feit dat Mg^{++} 'n hoër sintese as Ca^{++} by hoër konsentrasies tot gevolg het, moet moontlik gesoek word in die belangrikheid van magnesiumione in verskillende fasette van die sintesemeganisme.

Oor die invloed van Mg^{++} op die polisome van 'n hele aantal organe van verskillende organismes is heelwat in die literatuur bekend. Wanneer polisome uit rotuleur deur middel van sukrosegrediëntsentrifugering ondersoek is, is gevind dat groter hoeveelhede swaar materiaal in die aanwesigheid van Mg^{++} verkry word as in die afwesigheid daarvan. Die aktiwiteit van die ribosome ten opsigte van die inkorporasie van aminosure is ook hoër in eersgenoemde geval. Die afleiding is gemaak dat ribosome van die polisoomstruktuur verwyder word met 'n verlaging van die magnesiumkonsentrasie (vergelyk Munro et al, 1964). Met 'n ondersoek na die eienskappe van hartribosome en - polisome het Earl & Korner (1965) vasgestel dat hartpolisome heeltemaal gedegradeer word in die afwesigheid van Mg^{++} -ione. Hulle het ook aangetoon dat hartpolisome 'n duidelike sensitiwiteit ten opsigte van Mg^{++} vertoon en dat proteïensintese baie intiem hiermee gemoeid is. Latere studies het daarop gewys dat Mg^{++} belangrik is vir die binding van ribo-

some aan die endoplasmatiese retikulum asook vir die handhawing van die katernêre struktuur van die ribosoom (Khawaja, 1971). Dit is dus duidelik dat die aanwesigheid van 'n divalente katioon, in die vorm van Mg^{++} , sy invloed op die proteïensintese onder andere deur sy invloed op die ribosoom- en polisoom-stabiliteit kan uitoefen. Vir sover dit Ca^{++} betref en die moontlike rol daarvan met betrekking tot proteïensintese in soogdierweefsel is daar minder gegewens beskikbaar. Sover bekend is die invloed van Ca^{++} op die sedimentasiepatroon van polisome, soos beskryf in hierdie proefskrif (vergelyk figure 3.13 en 3.14) die eerste ondersoek op hierdie terrein.

Ten einde verdere bespreking oor die betekenis van die Ca^{++} -effek op die proteïensintese te voer, sal eers aandag gegee word aan die vergelykende studie oor die invloed van glikosiede op die Ca^{++} -transport en die proteïensintese.

Wanneer na die effek van die glikosiede naamlik ouabaïen en digitoksien op die kalsiumopname deur geïsoleerde hartmikrosome en die proteïensintese deur rothartweefselstukkies gekyk word, is duidelike verskille waar te neem. Ouabaïen het byvoorbeeld 'n onderdrukking van die kalsiumopname deur geïsoleerde mikrosome tot gevolg. Hierdie effek kom die sterkste by 'n konsentrasie van $1 \times 10^{-6}M$ (vergelyk figuur 4.5) na vore. Hierdie waargenome effek van ouabaïen is in ooreenstemming met die bevindings van Lee & Choi (1966). Hierdie glikosied het in teenstelling tot bogenoemde min effek op die proteïensintese en veroorsaak selfs 'n swak stimulerings van die sintese

van aktomiosien by 'n konsentrasie van $6 \times 10^{-6}M$ (vergelyk figure 5.3, 5.4, 5.5 en 5.6). Digitoksien daarenteen het min effek op die kalsiumopname (figuur 4.5) maar vertoon 'n baie sterk inhiberende effek ten opsigte van die proteïensintese in hartspierskyfies (vergelyk figure 5.7 en 5.8). Hierdie inhiberende effek kom reeds by 'n konsentrasie van $10^{-9}M$ te voorskyn (kyk figure 5.9 en 5.10).

Die vraag is hoe hierdie waargenome effekte moontlik te verklaar is. Wat die kalsiumopname betref bestaan daar nog heelwat verskil van mening oor die preparate wat gebruik word en ook die interpretasie van die gegewens. Die meningsverskil aangaande die gebruik van hartsarkoplasmatiese retikulum in die bestudering van kalsiumopname is gesentreer om die suiwerheid van die produk wat geïsoleer word. Die belangrikste kontaminerende materiaal is mitochondriale fragmente. Dit behoort egter nie die interpretasie van resultate ernstig te beïnvloed nie, aangesien dit aangetoon is dat die regulering van die intrasellulêre kalsiumkonsentrasie in die geval van hartspier nie so eenvoudig is nie. Hierby is die mitochondria ook juis betrokke (Carafoli, 1972). Meeste outeurs is van mening dat daar verskille bestaan in die sarkoplasmatiese retikulum van skelet- en hartspier. Volgens die bevindings van Pretorius et al (1969) is daar egter basies 'n ooreenkoms tussen die sarkoplasmatiese retikulum van skelet- en hartspier. Pretorius & Malan (1972) doen ook 'n interessante skema aan die hand waarvolgens die intrasellulêre Ca^{++} beheer sou kon word. Hiervolgens bestaan daar 'n

intieme interaksie tussen die sarkolemma, mitochondria, sarkoplasmatiese retikulum en proteïene soos troponien in die regulering van die intrasellulêre kalsiumkonsentrasie. Die glikosiede kan dus via een of meer van hierdie beheerkomponente die intrasellulêre Ca^{++} genoegsaam verhoog om 'n positiewe inotrope effek te veroorsaak.

Dit is bekend dat digitalis 'n positiewe inotrope effek op die hart het. Hartglikosiede werk egter nie direk op die kontraktiele proteïene van hartspier in nie (Gordon & Brown, 1966) maar bind aan die sarkoplasmatiese retikulummembraan (Fricke & Klaus, 1971a). Dutta et al (1968) het egter aangetoon dat digitoksien nie aan die normale intrasellulêre digitalisreseptor bind nie. Verskeie outeurs is die mening toegedaan dat digitoksien in die A-bandgebied of miosiengebied van die spiërsel konsentreer (Waser, 1962; Smith & Fozzard, 1963; Conrad & Baxter, 1964 en Thorp & Cobbin, 1967). Wat die effek van ouabaïen en digitoksien ten opsigte van Ca^{++} in die sel betref, is aangetoon dat ouabaïen die vrystelling van Ca^{++} verhoog (Wassermann & Holland, 1971). Bailey & Ong (1972) wys ook daarop dat ouabaïen 'n direkte effek op die loslating van sogenaamde sneller- Ca^{++} in die hart het. Verskeie outeurs het bevind dat ouabaïen in sekere konsentrasies die opname van Ca^{++} antagoniseer (Lee & Choi, 1966; Sabatini-Smith & Holland, 1967 en Thorp & Cobbin, 1967). Digitoksien daarenteen veroorsaak binding van Ca^{++} aan miosien (Bing, 1965). Hieruit volg dit dus dat ouabaïen en digitoksien heeltemaal verskillende effekte ten op-

sigte van intrasellulêre Ca^{++} het.

Daar kan geredeneer word dat die inhiberende effek wat digitoksien ten opsigte van die proteïensintese vertoon 'n gevolg kan wees van 'n direkte invloed op die sinteseproses of indirek via byvoorbeeld die energieverkaffingsreaksies in die sel. Volgens Cohen et al (1969) is laasgenoemde 'n belangrike faktor in die proteïensintese. Eksperimenteel kon egter weinig effek van die twee glikosiede ten opsigte van die suurstofopname deur geïsoleerde hartspier-mitochondria aangetoon word (kyk hoofstuk 6). Dit korreleer met die bevindings van Dutta et al (1968) dat relatief min binding van die glikosiede aan mitochondria voorkom. Alhoewel dit wil voorkom asof digitoksien in konsentrasies wat varieer tussen 1 en 10mM 'n swak inhibitoriese effek op die sintese deur geïsoleerde polisome by 5mM Mg^{++} vertoon (kyk figuur 6.2) asook 'n effense laer O_2 -opname deur geïsoleerde mitochondria (kyk figuur 6.5), is hierdie invloede te gering om die inhibisie van digitoksien op die sintese in hartspierweefsel te verklaar. Die inhibitoriese effek van die glikosiede kan dus hoofsaaklik waargeneem word in 'n sisteem waar selle intakt is. Hieruit volg dat die invloed van die glikosiede op proteïensintese waarskynlik geassosieer is met ander metabolismiese prosesse tot uitdrukking kom, en wel eers wanneer die sellulêre organisasie nie deur homogenisering versteur is nie. Die verskillende effekte van die glikosiede op die proteïensintese deur weefselsnitte en geïsoleerde polisome beklemtoon nogmaals die verskil in reaksie van verskillende sisteme. Glazer & Sartorelli (1972) lê nadruk op

die kompleksiteit van die verskillende proteïensintese-sisteme en wys ook daarop dat groot versigtigheid aan die dag gelê moet word by die interpretasie van resultate wat uit verskillende sisteme, soos hierbo genoem, verkry word.

Volgens Nihei (1971) en Larson et al (1969) kom ribosome grootliks vry in spierweefsel voor. Hierdie ribosome sou dan verantwoordelik wees vir die sintese van miosien. Die moontlikheid ontstaan nou dat die Ca^{++} wat as gevolg van die werking van ouabaiën intrasellulêr beskikbaar raak die vry polisome kan stimuleer tot 'n hoër sintese van aktomiosien. Die sintese van oplosbare proteïene word onder hierdie omstandighede baie swak geïnhibeer wat die vraag laat ontstaan of die sintese hiervan nie dan in assosiasie met die retikulum plaasvind nie. Die inhibitiese effek wat met digitoksien waargeneem is (kyk figure 5.7 en 5.8) kan moontlik verklaar word in die lig van die feit dat hierdie glikosied binding van Ca^{++} aan miosien veroorsaak (Bing, 1965) sodat daardeur die Ca^{++} in die omgewing van die proteïensintesesetel tot 'n kritiese punt verlaag word.

Uit die voorafgaande bespreking kan die volgende stellings oor die waarskynlike betekenis van die resultate gemaak word:

- (1) Ca^{++} het 'n direkte effek op die sintese beide in 'n selvrye sisteem en weefselstelsels. Dit is in ooreenstemming met die hipotese van Kaplan & Richman (1971). Die meganisme wat deur Kypson & Hait (1971) vir die Ca^{++} -effek voorge-

stel is, mag 'n bydrae lewer maar in ieder geval is die effek van Ca^{++} op die sintese nie eksklusief via membraanaktiwiteit nie.

- (2) Proteïensintese vind nie kompartementeel plaas nie maar word beïnvloed deur ander prosesse waaronder die energie- en Ca^{++} -metabolisme.
- (3) Ca^{++} en Mg^{++} kom beide intrasellulêr voor en sal waarskynlik in vivo elk 'n bydraende rol tot die sintese speel. Die preferensie vir Ca^{++} by laer konsentrasies mag meewerk tot die toename in proteïensintese by akute oorbelading.
- (4) In die lig van die hoë mate van regulering van die intrasellulêre Ca^{++} -konsentrasie sal Ca^{++} waarskynlik nie as reguleringsmeganisme vir proteïensintese in hartspierweefsel optree nie. Dit is in teenstelling tot die hipotese van Kaplan & Richman (1971) dat Ca^{++} die proteïensintese beheer. Dit volg dus dat bogenoemde bevindings die eksperimentele gegewens aansluit by die hipotese van Kaplan & Richman maar dat 'n ander betekenis aan die gegewens geheg word as wat die hipotese van hierdie outeurs stel. Eksperimente waar die verskil in interpretasie onder andere na vore kom is die verskil in Ca^{++} -invloed op weefsel-skyfies waar die Ca^{++} -effek veel minder opvallend as in geïsoleerde polisoom-preparate is. 'n Moontlike verklaring hiervoor is dat die intrasellulêre Ca^{++} -reguleringsmeganismes die invloed van die aangelegde Ca^{++} -kon-

sentrasie in die medium waarskynlik teenwerk, sodat die intrasellulêre konsentrasie in weefsel-skyfies dus ná aan die wat in vivo bestaan bly. In preparate met geïsoleerde polisome is so 'n reguleringsmeganisme nie aanwesig nie en dus is die Ca^{++} -effek daar baie duidelik. In teenstelling tot hierdie voorstelling oor die rol van Ca^{++} in proteïensintese by hartspierweefsel, staan die resultate van Farese (1971) vir proteïensintese in adrenaalkliere, naamlik dat die proteïensintese-effek van ACTH deur Ca^{++} bewerkstellig word en Ca^{++} sodoende as intrasellulêre sintesereguleerder optree. In hierdie weefsel tipes sou 'n reguleringsmeganisme via die Ca^{++} -konsentrasie wel aanvaarbaar wees.

Hierdie stellings kan onder andere verder eksperimenteel geëvalueer word wanneer afwyking in die hartmetabolisme byvoorbeeld tydens oorbelading van die hart of sekere patologiese toestande soos kardiomiopatie bestudeer word. Enkele eksperimente ter illustrasie hiervan word in die volgende hoofstuk bepsreek.

MOONTLIKE TOEPASSING VAN DIE GEGEWENS

8.1 INLEIDING

Gedurende die eksperimentele fase van die werk wat in hierdie proefskrif bespreek word, is ook enkele toepassings van die gebruikte tegnieke gemaak. Hierdie eksperimente sluit aan by, en kan as inleidende verdere evaluering van die stellings oor die invloed en betekenis van Ca^{++} op proteïensintese beskou word. Sommige van hierdie gegewens word in hierdie hoofstuk bespreek en dien veral ten doel as riglyn vir verdere navorsing.

'n Siektetoestand wat by herkouers aangetref word, bekend as gousiekte, bestaan daarin dat by hierdie diersoorte 'n kardiomiopatie ontstaan waarvan die prognose en uiteinde in baie opsigte 'n noue ooreenkoms vertoon met kongestiewe kardiomiopatie by die mens. Hierdie siektetoestand word veroorsaak deur een of ander tot nog toe onbekende toksien(e) in 5 verskillende plante wat deur die herkouers as voedsel ingeneem word (Pretorius & Terblanche, 1967; Pretorius et al 1972). Na 'n breedvoerige ondersoek na die hemodinamika van proefdiere waarby die toestand eksperimenteel opgewek is, word deur bogenoemde outeurs tot die slotsom gekom dat die primêre defek in hierdie skiekte waarskynlik tot 'n versteuring op biochemiese vlak herlei sal kan word.

Met hierdie ondersoek is gepoog om 'n paar aspekte van die basiese biochemiese prosesse betrokke by hartspierkontraksie eksperimenteel na te gaan. Hiervoor is die Ca^{++} -opname deur die hartmikrosome van normale en gousiekte diere, met duidelike simptome, ondersoek.

'n Uiteensetting van die bevindings word vervolgens gegee en bespreek.

8.2 METODE

8.2.1. Dosering van die proefdiere

Die proefdiere wat vir hierdie ondersoek gebruik is, was jong uitgegroeide merinoskape waarvan die herkoms verskil het. Die plantemateriaal wat versamel, gedroog, gemaal en vir alle doserings gebruik is, het bestaan uit die toksiese plant bekend as Pachystigma pygmaeum. Hierdie gedroogte plantemateriaal is in die vorm van 'n watersuspensie per maagbuis daaglik aan proefdiere toegedien. Die dosis wat deurgaans gebruik is, is 250g/dag vir 48 dae, vir 'n dier met 'n liggaamsmassa van 40 kg. As kontroles is nie-gedoseerde diere asook harte van gesonde diere wat van 'n munisipale slagpale verkry is, gebruik.

8.2.2. Isolering van hartmikrosome

Dieselfde metode as dié beskryf in paragraaf 4.2.1.1

van hoofstuk 4 is gevolg. Die enigste verskil is egter dat weefsel en homogeniseringsbuffer gebruik is in 'n verhouding van 1:2(g/v). Sentrifugering is uitgevoer by 15 000 x g vir 20 minute en dan weer 90 minute by 40 000 x g. Na resuspensie is hierdie twee sentrifugeringstappe herhaal en daarna is die sediment finaal geheruspendeer en verder gebruik.

8.3 RESULTATE

In eksperimente waar die effek van gousiekte op die opname van Ca^{++} deur die hartmikrosome ondersoek is, is telkens op die aanwesigheid van spesifieke kliniese simptome van die gedoseerde proefdiere getel, wat dan as indikasie gebruik is vir die slag van so 'n dier vir eksperimentele ondersoek. Die simptome waarna hierbo verwys word, is die volgende: (1) die aanwesigheid van tagikardie, wat gewoonlik gepaard gegaan het met 'n hartfrekwensie van 140 slae per minuut en hoër, (2) duidelik hoorbare pansistoliese klepperuise en (3) 'n omgekeerde T-golf van die elektrokardiogram en met 'n post mortem-ondersoek duidelike simptome van kongestiewe hartversaking, vergrote miokardium en hidroperikardium.

In een geval is die simptome van 'n proefdier in die krisisfase net voor dood waargeneem. Dit het die skielike ontstaan van 'n gallopritmie wat vir 'n kort tydjie geduur het ingesluit. Hierna het 'n ventriku-

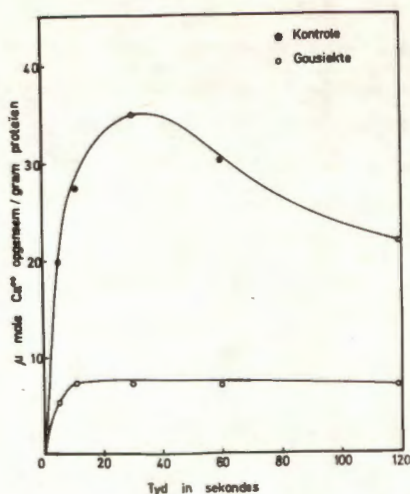
lere fibrillasie met ektopiese slae gevolg. Die fibrillasie het vinnig toegeneem en die ektopiese slae het verminder. Die hartgeluide het vinnig verswak. Asemhalingsnood het geleidelik ontwikkel. Die dier het 'n merkbare duiseligheid vertoon. Hier na het die dood ingetree.

Die effek van hierdie siektetoestand op die Ca^{++} -opname-funksie van die hartmikrosome word vervolgens bespreek.

8.3.1. Die invloed van gousiekte op die Ca^{++} -opname

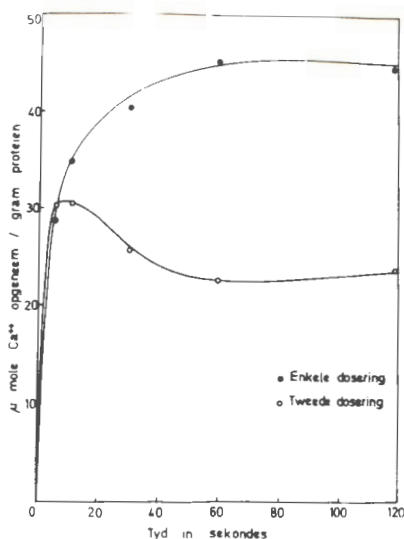
Die invloed van dosering van genoemde toksiese plantmateriaal aan proefdiere en die resulterende effek op die Ca^{++} -opname deur geïsoleerde skaap-hartmikrosome is eksperimenteel ondersoek en vergelyk met kontroles. Alle individuele gevalle word nie hier afsonderlik bespreek nie. In figuur 8.1 word die invloed van gousiekte op die Ca^{++} -opname aangetoon en met 'n kontrole vergelyk. Die waardes wat in hierdie figuur weergegee word, is gemiddelde waardes geneem oor 'n aantal van 10 eksperimente.

Uit figuur 8.1 kan gesien word dat die Ca^{++} -opname in diere met gousiekte betekenisvol laer is as in die geval van normale kontrole diere.



FIGUUR 8.1: Die effek van gousiekte op die Ca^{++} -opname deur geïsoleerde mikrosome van skape.

In twee gevalle het gedoseerde proefdiere nie op die inisiële dosering gereageer nie en geen duidelike simptome het ontwikkel nie. Pretorius & Terblanche (1967) het ook bevind dat 4% van gevalle nie op dosering reageer nie. Daar kan dus aangeneem word dat genoemde twee gevalle onder hierdie groep sorteer. Een van die proefdiere is vir 'n tweedemaal gedoseer en na verloop van 14 dae geslag en die hartweefsel vir Ca^{++} -opname ondersoek. In figuur 8.2 word die Ca^{++} -opname van genoemde gevalle grafies voorgestel.



FIGUUR 8.2: Die effek van gousiekte dosering op die Ca^{++} -opname in gevalle waar proefdiere geen simptome ontwikkel nie.

Die Ca^{++} -opname in hierdie proefdiere verskil effens. In die geval waar die proefdier aanvanklik geen reaksie op die dosering getoon het nie en weer vir 'n tweede maal gedoseer is, is die Ca^{++} -opname ietwat laer as in die geval waar die proefdier slegs aan 'n enkele doseringstydperk blootgestel was. Die verskil is egter nie betekenisvol groot nie. Albei hierdie gevalle vertoon egter 'n opname van Ca^{++} wat aansienlik hoër is as die gevalle waar duidelike simptome as gevolg van gousiekte wel ontwikkel het en stem ooreen met die kontrolewaardes (vergelyk figure 8.1 en 8.2).

8.4 KONKLUSIES

Uit die voorafgaande bespreking blyk dit dat die siektetoestand, bekend as gousiekte, 'n onderdrukking van die Ca^{++} -opname deur die kardiaale mikrosome tot gevolg het. Dit mag ontstaan as gevolg van die primêre effek vanweë die aanwesigheid van een of ander toksien self of dit mag 'n sekondêre gevolg wees van die kardiomiopatie of as gevolg van toksiese stowwe. In gevalle waar daar geen reaksie op dosering verkry is nie, is die opname van Ca^{++} en dus een van die funksies van die mikrosome feitlik normaal. Verder moet in gedagte gehou word dat uit voorlopige bevindings aanduidings gevind is dat die aktien-miosien organisasie in die miokardium, volgens elektronmikroskopiese waarnemings, geheel en al versteur raak. Daar is moontlik geringe hipertrofie maar dit is nog onseker. 'n Moontlike verklaring van hierdie waargenome veranderinge is die volgende. Uitgaande vanuit die voorgestelde beheer van die intrasellulêre Ca^{++} -konsentrasie, soos voorgestel deur Pretorius & Malan (1972), sou die intrasellulêre Ca^{++} -konsentrasie as gevolg van die verlaagde opname tydens gousiekte verhoog word. Hierdeur sou die verskillende beheerkomponente naamlik die sarkoplasmitiese retikulum, mitochondria, troponien en ander proteïene asook die sarkolemma op die hoër intrasellulêre Ca^{++} -konsentrasie reageer. 'n Moontlike aanpassing onder hierdie toestande sou die uitpomp van Ca^{++} deur die sarkolemma kon wees waardeur die intrasellulêre Ca^{++} -konsentrasie verlaag sou word. Hierdie verlaagde

Ca^{++} -konsentrasie kan dan moontlik die grondliggende oorsaak vir die versteurde proteïenmetabolisme wees. Die volle implikasie hiervan hou die potensiaal vir 'n vrugbare ondersoek vir toekomstige navorsing op hierdie terrein in.

OPSOMMING

Die doel van hierdie ondersoek was om proteïensintese in hartspierweefsel na te gaan. Alhoewel dit bekend is dat Ca^{++} die proteïensintese stimuleer bestaan daar egter nie eenstemmigheid aangaande die juiste setel van werking van Ca^{++} in die sinteseproses nie, naamlik of dit via membraanaktiwiteit of translasië tot uitdrukking kom. Ten einde hieroor meer duidelikeheid te kry is die effek van Ca^{++} op die proteïensintese ondersoek.

Rotte is as proefdiere gebruik. Die sintese is deur middel van geïsoleerde polisome in 'n selvrye sisteem sowel as met hartweefsel-skyfies nagegaan. Daar is vasgestel dat beide Ca^{++} en Mg^{++} die sintese van hartspierproteïene stimuleer. Hierdie effek was nie slegs aanwesig in die eksperimente met hartweefsel-skyfies nie maar het nog duideliker na vore gekom met die sintese deur geïsoleerde hartpolisome. Verder kon daar aangetoon word dat Ca^{++} by 'n lae konsentrasie (1mM) sintese onderhou terwyl Mg^{++} nie hierdie effek vertoon nie. Magnesiumione het egter 'n veel hoër totale sintese as Ca^{++} tot gevolg.

'n Indikasie van die invloed van Ca^{++} op die stabiliteit van polisome is met behulp van suikrogradiënt sentrifugering verkry. Die afleiding is gemaak dat

Ca^{++} die preferente ioon vir sintese by 'n lae konsentrasie is, terwyl Mg^{++} die preferente ioon in die stabilisering van die selvrye sisteem tydens die isolasie prosedure is.

Ten einde die effek van Ca^{++} op die proteïensintese te evalueer is met behulp van twee glikosiede naamlik ouabaïen en digitoksien 'n korrelasie getrek tussen Ca^{++} -transport en proteïensintese. Daar is vasgestel dat die inhibitoriese effek van die glikosiede op die proteïensintese nie toegeskryf kan word aan 'n versteurde energieproduksie in die sel nie.

Moontlike verklarings van die waargenome resultate asook enkele praktiese toepassings daarvan word bespreek.

SUMMARY

The object of this study was to investigate myocardial protein synthesis. Although it is known that Ca^{++} stimulates protein synthesis there is some difference of opinion as to the exact site of action of the synthesis process. The different points of view on the Ca^{++} effect are membrane transport of amino acids versus a direct effect on translation. To clarify this point the effect of Ca^{++} on protein synthesis was investigated.

Albino rats were used in all experiments. The synthesis was examined by way of isolated polysomes in a cell free system as well as with heart tissue slices. It was determined that both, Ca^{++} and Mg^{++} , stimulate cardiac protein synthesis. This effect was not only present in experiments with tissue slices, but was even more significant during synthesis with isolated cardiac polysomes. It could further be shown that Ca^{++} at low concentrations (1mM) maintained synthesis while Mg^{++} did not show the same effect. Magnesium ions, on the other hand, are responsible for a much larger total synthesis than Ca^{++} .

An indication of the effect of Ca^{++} on the stability of the polysome structure was obtained through sucrose gradient centrifugation. The deduction was made that Ca^{++} ions are preferable for synthesis at low ionic concentrations, whereas Mg^{++} ions are

preferred for the stabilisation of the cell free system during the isolation procedure.

To further evaluate the effect of Ca^{++} on protein synthesis a correlation was drawn between Ca^{++} transport and protein synthesis with the aid of two glycosides namely ouabain and digitoxin. It was determined that the inhibitory effect of these cardiac glycosides on protein synthesis could not be attributed to a disturbed production of energy in the cell.

Possible explanations and a few practical applications of the observed results are given.

LITERATUUR

- Allen, J.C., Harris, R.A. & Schwartz, A. (1971).
Biochemical and Biophysical Research Communications,
42, 336.
- Allen, J.C., Lindenmayer, G.E. & Schwartz, A. (1970).
Archives of Biochemistry and Biophysics, 141, 322.
- +Bailey, L.E., & Ong, S.D. (1972). 5th Annual Meeting
of the International Study Group for Research in
Cardiac Metabolism. Winnipeg, Manitoba.
- Beiser, G.D., Epstein, S.E., Goldstein, R.E. (1970).
Circulation, 52, 805.
- Bing, R.J. (1965). Physiological Reviews, 45, 171.
- Bloom, W., Fawcett, D.W. (1968). Histology. W.B. Saun-
ders, Co. Philadelphia London Toronto.
- Beller, B.M. (1968). Circulation Research, 22, 501.
- Beller, B.M., & Mongillo, S. (1969). Circulation
Research, 25, 401.
- Briggs, F.N., Gertz, E.W. & Hess, M.L. (1966)
Biochemische Zeitschrift, 345, 122.
- Cheva-lier, J., & Butow, R.A. (1971). Biochemistry,
10, 2733.
- Cohen, J., Feldman, R.E., & Whitbeck, A.A. (1969).
American Journal of Physiology, 216, 112.
- Comar, C.L., & Bronner, F. (1969). Protein Metabolism,
Academic Press, New York & London.
- Conrad, L.L., & Baxter, D.J. (1964). Journal of
Pharmacology and Experimental Therapeutics, 145, 210
- Dhala, N.S., Sulakhe, P.V., Khandelwal, R.L., &
Hamilton, I.R. (1970). Life Sciences, 9, 625.

- Dutta, S., Goswami, S., Datta, D.K., Lindowen, J.O. & Marks, B.H. (1968). Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 164, 10.
- Eagle, H. (1959). Science, 130, 432.
- Earl, D.C.N. & Korner, A. (1965). Biochemical Journal, 94, 721.
- Earl, D.C.N. & Morgan, H.E. (1968). Archives of Biochemistry and Biophysics, 128, 460.
- Earl, D.C.N. & Korner, A. (1965). Biochemical Journal, 94, 721.
- Farah, A. & Witt, P.N. (1963). In: Thorp, R.H. Cobbin, L.B. (1967).
- Farese, R.V. (1971). Science, 173, 447.
- Falvey, A.K. & Staehelin, T. (1970). Journal of Molecular Biology, 53, 21.
- Fiehn, W. & Migala, A. (1971). European Journal of Biochemistry, 20, 245.
- Fiehn, W. & Hasselbach, W. (1970). European Journal of Biochemistry, 13, 510.
- Fricke, U. & Klaus, W. (1971). Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 268, 192.
- Fricke, U. & Klaus, W. (1971). Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 268, 200.
- Fujita, M., Matsui, H., Nagano, K. & Nakao, M. (1971). Biochimica et Biophysica Acta, 233, 404.
- Glancy, D.L., Higgs, Z.M., O'Brien, K.P. & Epstein, S.E. (1971). Circulation, 53, 45.
- Glazer, R.I. & Sartorelli, A.C. (1972). Biochemical and Biophysical Research Communications, 46, 1418.
- Goodman, L.S. & Gilman, A. (1970). The Pharmacological Basis of Therapeutics. The Macmillan Co.

- Gordon, M.S. & Brown, A.L. (1966). Circulation Research, 18, 534.
- Gudbjarnason, S., De Schryver, C., Chiba, C., Yamanaka, J. & Bing, R.J. (1964). Circulation Research, 15, 320.
- Gudbjarnason, S., Telerman, M. & Bing, R.J. (1964). Circulation Research, 15, 294.
- Hajdu, S., Posner, C.J. & Leonard, E.J. (1971). Circulation Research, 29, 358.
- Harvey, S.C. & Daniel, E.E. (1952). In: Thorp, R.H. & Cobbin, L.B. (1967).
- Heywood, S.M., Dowben, R.M. & Rich, A. (1968). Biochemistry, 7, 3289.
- Ikemoto, N., Sreter, F.A. & Gergely, J. (1971). Archives of Biochemistry and Biophysics, 147, 571.
- Kaplan, E. & Richman, H.G. (1971). Federation Proceedings, 30, Abstract 919.
- Katz, A.M. (1970). Physiological Reviews, 50, 63.
- Kimata, S. & Morkin, E. (1971) American Journal of Physiology, 221, 1706.
- Kock-Weser, J. (1967). Circulation Research, 15, 120.
- Kock-Weser, J. (1971). Circulation Research, 28, 34.
- Kock-Weser, J. (1971). Circulation Research, 28, 109.
- Khawaja, J.A. (1971). Biochimica et Biophysica Acta, 254, 117.
- Kypson, J. & Hait, G. (1971). Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 117, 398.
- Larson, P.F., Hudgson, P. & Walton, J.N. (1969). Nature, 222, 1168.
- Lee, K.S. (1965). Federation Proceedings, 24, 1432.
- Lee, K.S. & Choi, S.J. (1966). Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 153, 114.
- Lindenmayer, G.E. & Schwartz, A. (1970). Archives of Biochemistry and Biophysics, 140, 371.

- Lüllmann, H. & Holland, W. (1962). Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 137, 192.
- Makinose, M. (1969). European Journal of Biochemistry, 10, 74.
- Meissner, G. & Fleischer, S. (1972). Biochimica et Biophysica Acta, 255, 19.
- MacLennan, D.H. & Wong, P.T.S. (1971). Proceedings of the National Academy of Sciences, 68, 1231.
- Morkin, E., Kimata, S. & Skillman, J.J. (1972). Circulation Research, 30, 690.
- Morkin, E. & Ashford, T.P. (1968). American Journal of Physiology, 215, 1409.
- Moroz, L.A. (1967). Circulation Research, 21, 449.
- Munro, A.J., Jackson, R.J. & Korner, A. (1964). Biochemical Journal, 92, 289.
- Munro, H.N. (1970). Mammalian Protein Metabolism, Volume 4. Academic Press New York and London.
- Nihei, T. (1971). Biochemical and Biophysical Research Communications, 43, 1139.
- Opie, L.H. (1965). American Heart Journal, 69, 401.
- Opie, L.H. (1965). Journal of Physiology, 180, 529.
- Parsons, J.A. & Summers, R.J. (1971). British Journal of Pharmacology, 42, 143.
- Prasad, K. & Callaghan, J.C. (1970). Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 48, 801.
- Pretorius, P.J., Pohl, W.G. Smithen, C.S. & Inesi, G. (1969). Circulation Research, 25, 487.
- Pretorius, P.J. & Terblanche, M. (1967). Journal of the South African Veterinary Medical Association, 38, 29.

- Pretorius, P.J., Terblanche, M., v.d. Walt, J.D.
& van Ryssen, J.C.J. (1972). In: Cardiomyopathies, Ed. Bajuz, E. & Rona, G. with Brink, A.J. & Lochner, A. University Park Press.
- Sabatini-Smith, S. & Holland, W.C. (1967). Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 158, 22.
- Schaub, M.C., Perry, S.V. & Häcker, W. (1972). Biochemical Journal, 126, 237.
- Schreiber, S.S., Evans, C., Oratz, M. & Rothschild, M.A. (1967). American Journal of Physiology, 212, 35.
- Schreiber, S.S., Oratz, M., Evans, C., Silver, E. & Rothschild, M.A. (1968). American Journal of Physiology, 215, 1250.
- Schreiber, S.S., Oratz, M. & Rothschild, M.A. (1966). American Journal of Physiology, 211, 314.
- Schreiber, S.S., Oratz, M. & Rothschild, M.A. (1967). American Journal of Physiology, 213, 1552.
- Schreiber, S.S., Oratz, M. & Rothschild, M.A. (1968). Federation Proceedings 27, 580.
- Schreiber, S.S., Oratz, M. & Rothschild, M.A. (1970). American Journal of Physiology, 219, 2.
- Selinger, Z., Naim, E. & Lasser, M. (1970). Biochimica et Biophysica Acta, 203, 326.
- Smith, J.R. & Fozzard, H.A. (1963). Nature, 197, 56.
- Strohmman, R.C. (1966). Biochemische Zeitschrift, 345, 148.
- Thomas, L. et al. (1958). In: Thorp, R.H. and Cobbin, L.B. (1967).
- Thorp, R.H. & Cobbin, L.B. (1967). Cardiac Stimulant Substances, volume 6. Academic Press, New York & London,

- Ts-O, P.O.P. & Vinograd, S.J. (1961). Biochimica et Biophysica Acta, 49, 113.
- Umbreit, W.W., Burris, R.H. & Stauffer, J.F. (1964). Manometric Techniques. Burgess Life Science Series, 4th edition. Burgess Publishing Company, Minneapolis, U.S.A.
- Wannemacher, R.W. (1968). American Journal of Physiology, 216, 4.
- Waser, P.G. (1962). Experientia, 18, 35.
- Wassermann, O. & Holland, W.C. (1971). Archives of the institute of Pharmacodynamics, 189, 213.
- Weinreich, D. & Karler, R. (1971). Archives of the institute of Pharmacodynamics, 190, 330.
- White, A., Handler, P. & Smith, E.L. (1968). Principles of Biochemistry Fourth Edition. McGraw-Hill Book Co. New York St. Louis San Francisco London Mexico Sydney Toronto
- Zühlke, V., de Rochemont, W.M., Gudbjarnason, S. & Bing, R.J. (1966). Circulation Research, 18, 558.

†Ander referate wat uit dieselfde simposium aangehaal is, is:

Carafoli, E. (1972).

Pretorius, P.J. & Malan, N. (1972).

AFKORTINGS

ACTH	adrenokortikotrope hormoon
ATP	adenosientrifosfaat
ATPase	adenosientrifosfatase
EDTA	etileendiamien-tetra-asynsuur
EGTA	etileenglikool-bis-(β -amino-etieleter) N,N'-tetra-asynsuur
DEAE-sellulose	Di-etiel-amino-etiel-sellulose
DNA	deoksieribonukleïensuur
GTP	guanosientrifosfaat
POPOP	4,4-bis(2-5-feniel)oksasotiel-benseen
PPO	2,5-difenieloksasool
RNA	ribonukleïensuur
RNase	ribonuklease
TCA	trichloorasynsuur
mRNA	boodskapper RNA
tRNA	transporteur RNA
Tris	tris(hidroksiemetiel) amino-metaan
Poli-U	poli-uridielsuur

MATERIAAL

ATP	Miles-Seravac, Kaapstad
Aminosure	BDH (Hickman & Kleber); Merk
Cab-O-Sil	Beckman
^{14}C -aminosure	Radio-Chemical Centre, Amersham
Digitoksien	Merk
Dioksaan	Merk
GTP	Miles-Seravac, Kaapstad
kreatienfosfaat	Miles-Seravac, Kaapstad
kreatienkinase	Miles Seravac, Kaapstad
β -merkapto-etanol	Merk
Naftaleen	Merk
Ouabaïen	Merk
POPOP	Pacard Instrument Company
PPO	Pacard Instrument Company
RNase	Miles-Seravac, Kaapstad
Tolueen	Merk
Tris	Miles-Seravac, Kaapstad

BEDANKINGS

Graag wil ek my opregte dank betuig teenoor die volgende persone en instansies wat hierdie studie moontlik gemaak het:

- Dr. C.J. Reinecke, aangewese hoof van die departement biochemie aan die P.U. vir CHO, onder wie se leiding hierdie studie voltooi is. U insig, diepgaande kennis en entoesiasme was vir my die inspirasie om die werk te voltooi. U opregte vriendelikheid en vriendskap word hoog waardeer.
- Prof. P.J. Pretorius, hoof van die departement fisiologie aan die P.U. vir CHO, vir die nuttige samesprekings asook u aandeel aan hierdie studie.
- Prof. A.C. Esterhuizen, hoof van die departement fisiologie aan die geneeskunde fakulteit van die U.O.V.S., deur wie se bemiddeling, belangstelling en vriendelike tegemoetkomendheid hierdie proefskrif 'n werklikheid geword het.
- Dr. D.P. Wissing, vir die taalkundige versorging.
- Mnr. C.L.E. du Plessis, my skoonvader, vir die dra van die drukkoste van die proefskrif.
- Mej. L. Müller vir die netjiese tikwerk.
- Mnr. A. Crous vir sy hoogs gewaardeerde hulp met die uitvoering van eksperimente asook met die fotografering van die figure.
- Mev. J. Laning vir tegniese hulp.
- Die departement Mikrobiologie aan die U.O.V.S. vir gebruik van die sentrifugeerder en apparaat.

- Die departement Biochemie aan die U.O.V.S. vir apparaat en chemikalië.
- Die departement plantkunde aan die U.O.V.S. vir gebruik van die respirometer en sentrifugeerder.
- Die Raad op Atoomkrag vir finansiële steun.
- Die Instituut vir Veeartsenykundige navorsing te Onderstepoort vir die verskaffing van proefmateriaal vir die eksperimente oor gousiekte.
- My ouers en familie vir hulle liefde en aanmoediging gedurende al my studiejare.
- My vrou vir haar liefde, toewyding en onderskraging tydens my studie.