

**'n VERGELYKENDE STUDIE VAN ENKELE  
STRUKTURELE EN FUNKSIONELE EIENSKAPPE  
VAN DIE SARKOPLASMIESE RETIKULUM VAN  
SKELET- EN HARTSPIER**

**deur**

**FREDERIK CHRISTOFFEL ELOFF**

- **Verhandeling ingedien ter gedeeltelike  
nakoming van die vereistes vir die graad  
Magister Scientiae (Fisiologie)**

**aan die**

**POTCHEFSTROOMSE UNIVERSITEIT VIR  
CHRISTELIKE HOËR ONDERWYS**

**Leier: Dr. N.T. Malan**

**Potchefstroom**

**Desember 1980**

## INHOUDSOPGAWE

## Bladsy

|            |                                                                                                      |    |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| HOOFSTUK 1 | INLEIDING EN LITERATUURAGTERGROND                                                                    | 1  |
| 1.1        | Historiese agtergrond                                                                                | 3  |
| 1.2        | Struktuur en funksionering van die skeletspier sarkotubulêre stelsel                                 | 5  |
| 1.2.1      | T-buis en triade                                                                                     | 5  |
| 1.2.2      | Skeletspier sarkoplasmiese retikulum                                                                 | 6  |
| 1.2.2.1    | Morfologiese struktuur                                                                               | 6  |
| 1.2.2.2    | ATPase proteïen                                                                                      | 7  |
| 1.2.2.3    | $\text{Ca}^{2+}$ -bindingsproteïen ( $\text{M}_{55}$ ) en kalsekwestrien ( $\text{M}_{45}$ )         | 8  |
| 1.2.2.4    | Lipiede                                                                                              | 9  |
| 1.2.3      | Eksitasie-kontraksiekoppeling in skeletspier                                                         | 9  |
| 1.2.3.1    | $\text{Ca}^{2+}$ -vrystelling                                                                        | 10 |
| 1.2.3.2    | $\text{Ca}^{2+}$ -opname                                                                             | 11 |
| 1.3        | Struktuur en funksionering van die hartspier sarkotubulêre stelsel                                   | 13 |
| 1.3.1      | Strukturele ooreenkomste en verskille tussen die sarkotubulêre stelsels van hartspier en skeletspier | 13 |
| 1.3.2      | Eksitasie-kontraksiekoppeling in hartspier                                                           | 15 |
| 1.3.2.1    | Rol en funksionering van hartspier sarkoplasmiese retikulum in eksitasie-kontraksiekoppeling         | 15 |
| 1.3.2.2    | Rol van die mitochondria in die eksitasie-kontraksiekoppeling                                        | 18 |
| 1.3.2.3    | Rol van die ekstrasellulêre spasie in die eksitasie-kontraksiekoppeling                              | 19 |

|            |                                                                                                                              |    |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.3.2.4    | Hipotetiese model van eksitasie-kontraksie=koppeling in hartspier                                                            | 20 |
| 1.3.3      | Probleme ondervind met hartspier sarkoplas=iese retikulumpreparate                                                           | 21 |
| 1.4        | Doel en motivering                                                                                                           | 26 |
| HOOFSTUK 2 | METODE EN MATERIAAL                                                                                                          | 28 |
| 2.1        | Bereiding van SR vesikels uit skeletspier                                                                                    | 28 |
| 2.2        | Bereiding van SR vesikels uit hartspier                                                                                      | 29 |
| 2.2.1      | Bereiding van hartspier SR vesikels volgens die metode van Eletr en Inesi (1972)                                             | 29 |
| 2.2.2      | Bereiding van hartspier SR vesikels volgens die metode van Harigaya en Schwartz (1969) soos aangepas deur Hicks et al (1979) | 30 |
| 2.2.3      | Bereiding van hartspier SR vesikels volgens die metode van Lighty en Bertrand (1979)                                         | 30 |
| 2.3        | Bereiding van mitochondria uit hartspier                                                                                     | 31 |
| 2.4        | Proteïenbepalings gedoen met behulp van twee verskillende metodes                                                            | 32 |
| 2.4.1      | Buiret proteïenbepaling (Gornall et al, 1949)                                                                                | 32 |
| 2.4.2      | Proteïenbepaling volgens die Folinmetode (Lowry et al, 1951)                                                                 | 32 |
| 2.5        | Bepaling van die ATPase-aktiwiteit van skeletspier- en hartspier SR                                                          | 33 |
| 2.5.1      | ATPase-aktiwiteit van skeletspier SR                                                                                         | 33 |
| 2.5.2      | ATPase-aktiwiteit van hartspier SR                                                                                           | 34 |
| 2.6        | Bepaling van die ATP-afhanklike $Ca^{2+}$ -opname van skelet- en hartspier SR                                                | 34 |

|            |                                                                                                                                         |    |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.6.1      | ATP-afhanklike $\text{Ca}^{2+}$ -opname van skeletspier SR                                                                              | 34 |
| 2.6.2      | ATP-afhanklike $\text{Ca}^{2+}$ -opname van hartspier SR                                                                                | 35 |
| 2.7        | Gel-elektroforese                                                                                                                       | 35 |
| 2.8        | Bepaling van die invloed van 1 mM PMSF op<br>proteolitiese ensiem-aktiwiteit                                                            | 36 |
| 2.9        | Chemikalieë                                                                                                                             | 36 |
| 2.10       | Statistiese verwerkings                                                                                                                 | 36 |
| HOOFSTUK 3 | RESULTATE                                                                                                                               | 38 |
| 3.1        | Hartspier SR berei volgens verskillende<br>metodes                                                                                      | 39 |
| 3.1.1      | Hartspier SR berei volgens die metode van<br>Eletr en Inesi (1972)                                                                      | 39 |
| 3.1.1.1    | ATPase-aktiwiteit van fraksies versamel tydens<br>die bereiding van hartspier SR volgens die<br>metode van Eletr en Inesi (1972)        | 39 |
| 3.1.2      | Hartspier SR berei volgens die metode van<br>Harigaya en Schwartz (1969)                                                                | 39 |
| 3.1.2.1    | ATPase-aktiwiteit van fraksies versamel tydens<br>die bereiding van hartspier SR volgens die<br>metode van Harigaya en Schwartz (1969)  | 39 |
| 3.1.3      | Hartspier SR berei volgens die metode van<br>Lighty en Bertrand (1979)                                                                  | 42 |
| 3.1.3.1    | ATPase-aktiwiteit van fraksies versamel tydens<br>die bereiding van hartspier SR volgens die<br>metode van Lighty en Bertrand (1979)    | 42 |
| 3.1.4      | $\text{Ca}^{2+}$ -opname van fraksies versamel tydens die<br>bereiding van hartspier SR volgens die ver-<br>skillende bereidingsmetodes | 42 |

|         |                                                                                                                    |    |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1.5   | Vergelyking van die elektroforesepatrone van hartspier SR verkry met behulp van die verskillende bereidingsmetodes | 49 |
| 3.1.6   | Vergelyking van die elektroforesepatrone van hartspier SR en skeletspier SR                                        | 51 |
| 3.1.7   | Vergelyking van die elektroforesepatrone van hartspier SR en mitochondria                                          | 51 |
| 3.2     | Bekamping van kontaminasie in die hartspier SR preparaat veroorsaak deur mitochondria en ander chemiese faktore    | 51 |
| 3.2.1   | Bekamping van mitochondriale-aktiwiteit deur $\text{NaN}_3$                                                        | 54 |
| 3.2.1.1 | Invloed van $\text{NaN}_3$ op skeletspier SR ATPase-aktiwiteit                                                     | 54 |
| 3.2.1.2 | Invloed van $\text{NaN}_3$ op skeletspier SR $\text{Ca}^{2+}$ -opname                                              | 54 |
| 3.2.1.3 | Invloed van $\text{NaN}_3$ op hartspier SR ATPase-aktiwiteit                                                       | 54 |
| 3.2.1.4 | Invloed van $\text{NaN}_3$ op hartspier SR $\text{Ca}^{2+}$ -opname                                                | 58 |
| 3.2.2   | Bekamping van proteolitiese ensiem-aktiwiteit deur PMSF                                                            | 58 |
| 3.2.2.1 | Invloed van PMSF op die proteolitiese ensiem pronase                                                               | 58 |
| 3.2.2.2 | Invloed van PMSF op skeletspier SR ATPase-aktiwiteit                                                               | 58 |
| 3.2.2.3 | Invloed van PMSF op hartspier SR $\text{Ca}^{2+}$ -opname                                                          | 62 |
| 3.2.3   | Bekamping van oksidasie in die SR preparaat deur BHT                                                               | 62 |

|            |                                                                                                         |    |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.3.1    | Invloed van BHT op skeletspier SR ATPase-<br>aktiwiteit                                                 | 62 |
| 3.2.3.2    | Invloed van BHT op skeletspier SR $\text{Ca}^{2+}$ -opname                                              | 65 |
| 3.2.3.3    | Invloed van BHT op hartspier SR $\text{Ca}^{2+}$ -opname                                                | 65 |
| 3.2.4      | Invloed van verskillende alkohole op hart=<br>spier SR                                                  | 65 |
| 3.2.4.1    | Invloed van 2,5% merkpto-etanol, 5% etanol en<br>5% propanol op die hartspier SR ATPase-akti=<br>witeit | 68 |
| 3.2.4.2    | Invloed van merkpto-etanol, etanol en propa=<br>nol op hartspier SR $\text{Ca}^{2+}$ -opname            | 70 |
| 3.3        | Invloed van 0,01 mM PMSF en 1 mM BHT op die<br>stabiliteit van hartspier SR                             | 70 |
| HOOFSTUK 4 | BESPREKING                                                                                              | 74 |
| 4.1        | Bereidingsmetodes van SR preparate                                                                      | 75 |
| 4.1.1      | Verskille tussen die bereidingsmetodes van<br>skeletspier SR en hartspier SR                            | 75 |
| 4.1.2      | Bereidingsmetode van Eletr en Inesi om hart=<br>spier SR te isoleer                                     | 77 |
| 4.1.3      | Bereidingsmetode van Harigaya en Schwartz om<br>hartspier SR te isoleer                                 | 78 |
| 4.1.4      | Bereidingsmetode van Lighty en Bertrand om<br>hartspier SR te isoleer                                   | 79 |
| 4.1.5      | ATPase-aktiwiteit van hartspier SR berei<br>volgens die verskillende metodes                            | 79 |
| 4.1.5.1    | ATPase-aktiwiteit van hartspier SR berei<br>volgens die metode van Eletr en Inesi                       | 79 |

|         |                                                                                                      |     |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.1.5.2 | ATPase-aktiwiteit van hartspier SR berei volgens die metode van Harigaya en Schwartz                 | 80  |
| 4.1.5.3 | ATPase-aktiwiteit van hartspier SR berei volgens die metode van Lighty en Bertrand                   | 80  |
| 4.1.6   | Ca <sup>2+</sup> -opname van hartspier SR berei volgens die verskillende metodes                     | 81  |
| 4.1.7   | Elektroforesepatrone van die verskillende SR preparate                                               | 81  |
| 4.1.8   | Keuse van bereidingsmetode om hartspier SR te isoleer                                                | 82  |
| 4.2     | Bekamping van kontaminasie in die hartspier SR preparaat deur mitochondria en ander chemiese faktore | 82  |
| 4.2.1   | Bekamping van mitochondriale-aktiwiteit deur NaN <sub>3</sub>                                        | 82  |
| 4.2.2   | Bekamping van proteolitiese ensiem-aktiwiteit deur PMSF                                              | 83  |
| 4.2.3   | Bekamping van oksidasie in die SR preparaat deur BHT                                                 | 84  |
| 4.2.4   | Invloed van verskillende alkohole op hartspier SR                                                    | 85  |
| 4.3     | Invloed van 0,01 mM PMSF en 1 mM BHT op die stabiliteit van hartspier SR                             | 87  |
|         | OPSOMMING                                                                                            | 91  |
|         | SUMMARY                                                                                              | 94  |
|         | LITERATUURLYS                                                                                        | 97  |
|         | AFKORTINGS                                                                                           | 108 |
|         | BEDANKINGS                                                                                           | 109 |

## HOOFSTUK 1

### INLEIDING EN LITERATUURAGTERGROND

Gedurende die eksitasie-kontraksie koppeling van skeletspier speel die sarkotubulêre sisteem 'n baie belangrike rol. Hierdie sisteem bestaan uit die transversale of T-buise en die sarkoplasmiese retikulum (SR). Dit word algemeen aanvaar dat die SR van skeletspier die konsentrasie vrye  $\text{Ca}^{2+}$  in die sarkoplasma reguleer (Hasselbach, 1964; Fuchs, 1974). Ontlading van die senuwee by die mioneurale aansluiting het tot gevolg dat die sarkolemma depolariseer. Die depolarisasiegolf versprei oor die sarkolemma en beweeg ook in die T-buis af na die dieperliggende dele van die spiersel. As gevolg van die depolarisasie van die T-buis stel die SR  $\text{Ca}^{2+}$  vry wat spierkontraksie tot gevolg het. Spierverslapping word bewerkstellig wanneer die SR weer die  $\text{Ca}^{2+}$  opneem en die vrye  $\text{Ca}^{2+}$  konsentrasie in die sarkoplasma verlaag.

Baie prosedures is effektief bewys om skeletspier SR te berei (Yu et al, 1968) maar hartspier SR lewer baie meer probleme as dieselfde tegnieke toegepas word (Lighty & Bertrand, 1979). Die redes vir die moeilike bereiding van hartspier SR is dat die hartspier SR swakker ontwikkel is as skeletspier SR en dat hartspier baie meer mitochondria bevat wat die hartspier SR preparaat kontamineer (Bloom & Fawcett, 1968).

Daar bestaan ooreenkomste tussen die SR van hartspier en skeletspier maar groot verskille bestaan ook (Carsten, 1964). Die SR van hartspier en skeletspier bestaan albei uit 'n buisagtige struktuur wat rondom die miofilamente voorkom. Die hartspier SR

is egter minder kompleks in struktuur en geen terminale sisternae kom voor nie. Daar bestaan ook nie net 'n strukturele verwantskap tussen die hartspier SR en die T-buis nie, maar ook tussen die hartspier SR en die sarkolemma (Bloom & Fawcett, 1968). Die fisiologiese betekenis van hierdie verskille is onseker en min is nog bekend oor die funksionering van hartspier SR. Die rol wat die SR van hartspier in die eksitasie-kontraksie koppeling vervul is baie kontroversiël en baie teenstrydighede bestaan oor die funksie van hartspier SR. Hierdie teenstrydighede en die gebrek aan kennis oor die funksionering van hartspier SR word veroorsaak deur die probleme wat daar ondervind word met hartspier SR. Onder hierdie probleme is onsuiverheid van hartspier SR preparate, lae aktiwiteit en onstabiliiteit (Carsten, 1964).

Om hierdie probleme te oorkom sal 'n suiwer en stabiele hartspier SR preparaat eers ontwikkel moet word. Met só 'n preparaat kan dan meer kennis ingewin word oor die funksionering van hartspier SR om die teenstrydighede wat bestaan op te los.

In hierdie projek is eerstens gepoog om 'n vergelyking te tref tussen die funksionering van hartspier SR en skeletspier SR. Tweedens is gepoog om die probleme van onsuiverheid en onstabiliiteit van hartspier SR preparate te bowe te kom.

In die res van Hoofstuk I word die historiese agtergrond van die ontwikkeling van SR-navorsing behandel. 'n Literatuurbespreking word gegee oor die ooreenkomste en verskille tussen die SR van hartspier en skeletspier. Die onsekerheid wat bestaan oor die rol van hartspier SR in die eksitasie-kontraksie koppeling word aangetoon en daar word ook aandag gegee aan die probleme van on-

suiwerheid en onstabiliteit wat ondervind word met hartspier SR preparate. In Hoofstuk 2 word die metodes wat tydens hierdie projek gebruik is bespreek. Hoofstuk 3 handel oor die resultate wat verkry is. Daar word getoon dat daar in geslaag is om 'n relatief suiwer hartspier SR preparaat te berei en die tegniek word beskryf waarmee die stabiliteit van die preparaat grootliks verbeter is. In Hoofstuk 4 word die resultate bespreek en gevolgtrekkings gemaak oor die oorsake van onstabiliteit van hartspier SR.

### 1.1 Historiese agtergrond

Die woord retikulêr beteken 'n netvormige vertakking. So 'n netvormige vertakking in die spiersel is reeds in 1882 deur Retzius beskryf en twintig jaar later in 1902, beskryf Veratti ook hierdie retikulêre struktuur en noem dit die retikulêre apparaat (Hasselbach, 1964). Veratti het gemeen dat hierdie stelsel 'n voortsetting is van die motoriese senuwees wat die spiersel binnedring (Langer, 1968). In 1883 vind Ringer dat 'n paddahart se kontrakties staak indien dit in 'n  $\text{Ca}^{2+}$  vrye perfusie-medium geplaas word (Langer, 1968). Dit was die eerste aanduiding van die belangrike rol wat  $\text{Ca}^{2+}$  in die eksitasie-verslappingsiklus van spierweefsel speel.

Na hierdie vroeë bevindings is daar eers weer in 1951 'n belangrike deurbraak op die gebied van sarkoplasmiese retikulum gemaak toe Marsh die sogenoemde verslappingsfaktor bekendstel in 'n publikasie. Hy het gevind dat die homogenaat van skeletspier wat die miofilamente bevat, geen sametrekking toon indien ATP bygevoeg word nie. Indien ATP by geïsoleerde miofilamente gevoeg word,

vind daar egter wel sametrekking plaas. Hieruit het Marsh afgelei dat daar 'n verslappingsfaktor in die spier homogenaat is wat spiersametrekking inhibeer (Marsh, 1952). In 1953 stel Hanson en Huxley voor dat die spierproteïene, aktien en miosien, in die spiervesel voorkom as twee parallelle filamente wat kontraksie laat plaasvind deur oormekaar te gly sonder om self te verkort. In dieselfde jaar beskryf Bennet en Porter met behulp van elektronmikroskoop waarnemings die bestaan van 'n buisstelsel wat tussen die miofilamente geleë is en noem dit die sarkoplasmiese retikulum.

Die rol van  $\text{Ca}^{2+}$  kom weer na vore in 1955 toe Niedergerke vind dat  $\text{Ca}^{2+}$  die enigste ioon is wat in die spier voorkom wat spierkontraksie tot gevolg het indien dit in die spier gespuut word. Huxley en Taylor vind in 1958 dat 'n verkorting van 'n enkele I-band, of aangrensende I-bande van aparte sarkomere, verkry word indien 'n padder skeletspier elektries geprik word in die omgewing van die Z-lyn. Dit het gelei tot verdere navorsing oor die moontlike rol van  $\text{Ca}^{2+}$  in spierkontraksie. Podolsky en Constantin (1964) vind dat toediening van  $\text{Ca}^{2+}$  in die omgewing van die Z-lyn en I-band ook kontraksie van 'n enkele I-band gee. Die rol van  $\text{Ca}^{2+}$  in die kontraksieproses is dus met sekerheid vasgestel.

Omdat Marsh se verslappingsfaktor meer lig kon werp op spierverslapping is die belangrikheid daarvan weer besef. In 1960 het Ebashi gevind dat die verslappingsfaktor  $\text{Ca}^{2+}$  kan opneem in teenwoordigheid van ATP. Elektronmikroskoopstudies het getoon dat die verslappingsfaktor in werklikheid vesikels van 'n buisagtige struktuur is (Nagai et al, 1960). Daar is afgelei dat hierdie organel die sarkoplasmiese retikulum is en dat die T-buis die weg

is waarlangs die depolarisasiegolf die spiersel binnedring. Daar is voorgestel dat die SR dan  $\text{Ca}^{2+}$  vrystel wat spierkontraksie tot gevolg het en weer die  $\text{Ca}^{2+}$  opneem wanneer spierverslapping intree (Ebashi & Endo, 1968).

## 1.2 Struktuur en funksionering van die skeletspier sarkotubulêre stelsel

Die sarkotubulêre stelsel bestaan uit die transversale of T-buis en die sarkoplasmiese retikulum. Die sarkotubulêre stelsel is dus 'n buisstelsel wat rondom die miofilamente verloop. Die T-buis en SR is in sekere areas baie naby aan mekaar geleë en die areas staan as die triades bekend (Bloom & Fawcett, 1968; Sommer & Johnson, 1970).

### 1.2.1 T-buis en triade

Die T-buis is 'n instulping wat die sarkolemma vorm en die interne dele van die spiersel binnedring. Die binnekant van die T-buis is dus in direkte kontak met die ekstrasellulêre spasie en kom transversaal voor tussen die miofilamente (Sommer & Johnson, 1970). Die opening van die T-buis is met behulp van 'n elektronmikroskoop sigbaar in vis skeletspier maar in soogdierskeletspier is dit baie moeilik sigbaar (Franzini-Armstrong & Porter, 1964). In soogdierskeletspier is die deursnee van die T-buis 20 nm en geleë op die vlak van die aansluiting tussen die A- en I-bande. Volgens Bloom en Fawcett (1968) versprei die depolarisasiegolf na 'n senuwee-ontlading oor die sarkolemma en dan in die T-buis af na die dieperliggende dele van die spiersel. Hierdie impuls veroorsaak vrystelling van  $\text{Ca}^{2+}$  uit die intrasellulêre store en spierkontraksie vind plaas (Fabiato & Fabiato, 1977).

Die triade word gevorm deur die SR en die T-buis wat parallel met mekaar verloop met 'n spasie van 120-140 Å tussenin. Daar is dus geen direkte kontak tussen die SR en die T-buis nie. Die SR vorm sakvormige strukture genoem terminale sisternae in die omgewing van die T-buis. Die triade word gevorm deur 2 terminale sisternae met die T-buis tussenin. Op die terminale sisternae of laterale sakke kom klein uitsteeksels voor wat omtrent 300 Å van mekaar geleë is. Die uitsteeksels of SR-voetjies is verbind aan die T-buis deur middel van 'n amorfe stof. Die SR-voetjies is gerangskik in 2 parallelle rye en beslaan nie meer as 30% van die T-buis oppervlak area nie (Franzini-Armstrong, 1970).

Die meganisme waarmee die depolarisasiegolf in die T-buis af beweeg en  $\text{Ca}^{2+}$ -vrystelling uit die terminale sisternae tot gevolg het, is nog onseker. Daar bestaan egter 'n paar moontlikhede, waarvan die belangrikste elektries-gestimuleerde  $\text{Ca}^{2+}$ -vrystelling,  $\text{Ca}^{2+}$ -gestimuleerde  $\text{Ca}^{2+}$ -vrystelling en  $\text{Ca}^{2+}$ -vrystelling as gevolg van 'n pH verandering is.

## 1.2.2 Skeletspier sarkoplasmiese retikulum

### 1.2.2.1 Morfologiese struktuur

Die SR van skeletspier bestaan uit 2 dele, die terminale sisternae en die longitudinale of L-buise. Die L-buise verbind die terminale sisternae van aangrensende triades met mekaar (Franzini-Armstrong & Porter, 1964). Die L-buise vorm 'n netvormige buisstelsel rondom die miofilamente en eindig in die terminale sisternae. Die terminale sisternae het 'n groter deursnee en verloop transversaal met die L-buise en parallel met die T-buis. Die T-buis is deel van die sarkolemma en nie deel van die SR nie. In

die middel van die A-band is die L-buise aan mekaar verbind en vorm dit dwarsverlopende bande of krae rondom die miofilamente (Bloom & Fawcett, 1968). Die SR van skeletspier is beperk binne die grense van die sarkomeer (Sommer & Johnson, 1970). Die skeletspier SR is dus 'n geordende en goed ontwikkelde buisstelsel.

#### 1.2.2.2 ATPase proteïen

Die membraan van die SR bestaan uit 65% proteïen en 35% lipiede (Eletr & Inesi, 1972). Die belangrikste komponent van die SR membraan is die ATPase proteïen wat 70-90% van die totale proteïen in die membraan uitmaak en 'n massa van 106 000 dalton besit (MacLennan, 1974).

Op die buitenste oppervlak van negatief gekleurde SR vesikels is daar 35-40 Å partikels sigbaar onder die elektronmikroskoop. Hierdie sferiese 40 Å partikels is aan die membraan verbind deur 20 Å steeltjies. Tripsien vertering verwyder dié partikels en bewys dus dat dit uit proteïen bestaan (Ikemoto et al, 1971). Sarzala et al (1975) het gevind dat SR vesikels van embryos en pasgebore diere glad is en geen 40 Å partikels besit nie. Op 5-8 dae na geboorte begin die partikels verskyn op konyn SR vesikels en die aantal neem toe met ouderdom. Sarzala et al (1975) het ook gevind dat die ATPase proteïen op 'n vroeë stadium van ontwikkeling slegs 10% van die totale proteïen inhoud van die SR membraan vorm en dat dit met ouderdom styg tot 70%. Die lae ATPase inhoud en die afwesigheid van die 40 Å partikels stem ooreen met die lae  $\text{Ca}^{2+}$ -afhanklike ATPase en die lae  $\text{Ca}^{2+}$ -opname wat by hierdie ontwikkelende SR vesikels gevind is. Daar kan dus

aanvaar word dat die 40 Å partikels deel van die ATPase vorm (Sarzala et al, 1975).

Tydens vriesfraksionering van die SR vesikel membraan word die membraan in 'n buitenste en binneste deel gesplit. Beide hierdie 2 dele besit 'n konkawe en konvekse oppervlak. Die binneste deel van die membraan se konvekse oppervlak het voor fraksionering teen die konkawe oppervlak van die buitenste deel gelê. Deamer en Baskin het in 1969 vir die eerste keer 90 Å partikels beskryf op die konkawe oppervlak van die buitenste deel van die membraan. Hierdie 90 Å partikels beslaan 20% van die konkawe oppervlak en kom nie op die konvekse oppervlak van die binneste deel van die membraan voor nie. Die 90 Å partikels is ongeveer 3 keer minder as die 35 Å partikels wat op die buite oppervlak van die vesikel voorkom. Dit dui daarop dat ATPase-poliipeptiedkettings individueel op die buite oppervlak verskyn en moontlik met mekaar bind om oligomere (3-4 per 90 Å partikel) te vorm binne in die membraan. Dit lyk dus asof die buite membraan van die SR grootliks bestaan uit ATPase-proteïen en die binneste deel van die membraan 'n enkel lipiedlaag is (Malan, 1976; Scales & Inesi, 1976).

### 1.2.2.3 $\text{Ca}^{2+}$ -bindingsproteïen ( $M_{55}$ ) en kalsekwestrien ( $M_{45}$ )

Die skeletspier SR membraan bevat nog 2 ander proteïene nl  $\text{Ca}^{2+}$ -bindingsproteïen of  $M_{55}$ -proteïen en kalsekwestrien of  $M_{45}$ -proteïen. Die  $M_{55}$ -proteïen besit 'n massa van 55 000 dalton en die  $M_{45}$ -proteïen het 'n massa van 45 000 dalton (MacLennan & Holland, 1975). Hierdie twee proteïene se funksies is onseker en hul posisie is kontroversiële. Volgens Zubrzycka et al (1978) is die  $\text{Ca}^{2+}$ -bindingsproteïen ( $M_{55}$ ) gelokaliseer op die uitwendige oppervlak van die membraan en die kalsekwestrien aan die binne opper=

vlak gebonde. Die  $M_{55}$ -proteïen besit 'n hoë affiniteit vir  $Ca^{2+}$  maar 'n lae bindingskapasiteit. Die  $M_{45}$ -proteïen besit 'n hoë bindingskapasiteit vir  $Ca^{2+}$  maar 'n lae affiniteit daarvoor (Meisner et al, 1973). MacLennan et al (1974) stel voor dat die  $M_{55}$ - en  $M_{45}$ -proteïne moontlik betrokke kan wees by die binding van  $Ca^{2+}$  aan die binnekant van die SR membraan om sō die rol van fisiologiese katioonbindingsplek in die membraan te vervul.

#### 1.2.2.4 Lipiede

Die membraan van die SR vesikel besit 35% lipiede en 65% proteïne. Die 35% lipiede bestaan uit 80% hoogs onversadigde fosfolipiede en 20% neutrale lipiede (Eletr & Inesi, 1972). Die fosfolipiede is relatief stewig aan die membraan gebind terwyl cholesterol en ander neutrale lipiede los gebind is en geen direkte rol in die funksie van die SR speel nie (Drabikowski et al, 1972). Scales en Inesi (1976) het voorgestel dat die binneste deel van die SR membraan uit 'n enkel lipiedlaag bestaan.

#### 1.2.3 Eksitasie-kontraksiekoppeling in skeletspier

Die belangrike rol wat skeletspier SR vervul in die eksitasie-kontraksiekoppeling, word algemeen aanvaar. Sodra 'n motoriese senuwee by die motoriese eindplaat ontlaaï, depolariseer die sarkolemma. Die depolarisasiegolf versprei oor die sarkolemma, dring die T-buis binne en veroorsaak  $Ca^{2+}$ -vrystelling uit die terminale sisternae. Die vrygestelde  $Ca^{2+}$  bind aan troponien en hef die inhibisie van die troponien-tropomiosienkompleks op die interaksie tussen aktien en miosien op. Kontraksie vind plaas as gevolg van dwarsbrugbeweging. Indien die ontlading van die motoriese senuwee

staak, begin die L-buise van die SR om  $\text{Ca}^{2+}$  aktief op te neem. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -konsentrasie in die sarkoplasma daal en spierverslapping tree in. Die L-buise vervoer die  $\text{Ca}^{2+}$  terug na die terminale sisternae waar dit gestoor word vir die volgende kontrakisie (Winegrad, 1970).

#### 1.2.3.1 $\text{Ca}^{2+}$ -vrystelling

Die grootste onsekerheid oor die funksionering van skeletspier SR is die meganisme waarop die depolarisasie van die T-buis,  $\text{Ca}^{2+}$ -vrystelling tot gevolg het. Die belangrikste moontlikhede is elektries-gestimuleerde  $\text{Ca}^{2+}$ -vrystelling,  $\text{Ca}^{2+}$ -gestimuleerde  $\text{Ca}^{2+}$ -vrystelling en  $\text{Ca}^{2+}$ -vrystelling as gevolg van 'n verandering in pH.

##### a) Elektries of depolarisasie-gestimuleerde $\text{Ca}^{2+}$ -vrystelling

Die moontlikheid bestaan dat daar 'n direkte elektriese koppeling is tussen die T-buis en die SR. Die SR membraan sal dus depolariseer indien die T-buis depolariseer (Kasai & Miyamoto, 1976). Direkte stimulerings deur middel van elektrodes is gebruik om  $\text{Ca}^{2+}$ -vrystelling uit SR vesikels te bewerkstellig, maar Kasai en Miyamoto (1976) het bewys dat dit die vesikels beskadig. Kasai en Miyamoto (1973) het daarin geslaag om die SR membraan te depolariseer deur 'n potensiaalverskil oor die SR membraan te veroorsaak. Dit is gedoen deur ione wat by die reaksie-medium gevoeg is. Die gevolg is vergelykbaar met normale depolarisasie van 'n membraan en het  $\text{Ca}^{2+}$ -vrystelling tot gevolg. Die deurlaatbaarheid van die SR membraan vir  $\text{Ca}^{2+}$  is dus afhanklik van die elektriese potensiaal oor die SR membraan.

#### b) $\text{Ca}^{2+}$ -gestimuleerde $\text{Ca}^{2+}$ -vrystelling

Daar bestaan ook 'n moontlikheid dat  $\text{Ca}^{2+}$ -vrystelling plaasvind as gevolg van  $\text{Ca}^{2+}$  wat die vesikel binnedring. Sodra 'n depolarisasiegolf met die T-buis afbeweeg, kan daar 'n klein hoeveelheid  $\text{Ca}^{2+}$  van buite die vesikel inbeweeg en die SR beïnvloed om groot hoeveelhede  $\text{Ca}^{2+}$  vry te stel (Ford & Podolsky, 1970). Volgens Leonard (1966) is die skeletspiersel egter 'n selfonderhoudende eenheid en kan kontraksie plaasvind al is daar geen  $\text{Ca}^{2+}$  in die ekstrasellulêre spasie nie. Fabiato en Fabiato (1977) beweer ook dat min of geen  $\text{Ca}^{2+}$  die spiersel binnedring tydens die depolarisasie van die T-buis. Dit wil dus voorkom asof  $\text{Ca}^{2+}$ -gestimuleerde  $\text{Ca}^{2+}$ -vrystelling by skeletspier SR nie 'n belangrike fisiologiese rol speel nie.

#### c) $\text{Ca}^{2+}$ -vrystelling as gevolg van 'n verandering in pH

Die moontlikheid bestaan ook dat  $\text{Ca}^{2+}$ -vrystelling plaasvind as gevolg van 'n pH verandering in die sarkoplasma. Volgens Nakamaru en Schwartz (1972) kan die geleiding van 'n depolarisasiegolf deur die intrasellulêre membrane, gepaard gaan met 'n verandering in pH in die omgewing van die membrane. Hulle het ook gevind dat 'n toename in pH  $\text{Ca}^{2+}$ -vrystelling tot gevolg het en 'n daling in pH gee weer heropname van die vrygestelde  $\text{Ca}^{2+}$ . Die membraan van die SR is dus sensitief vir pH veranderinge en die  $\text{Ca}^{2+}$ -deurlaatbaarheid verander met 'n verandering in pH (Nomura & Nakamaru, 1976).

#### 1.2.3.2 $\text{Ca}^{2+}$ -opname

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -opnameproses deur die SR is 'n aktiewe proses en vereis

ATP. Die hidrolise van 1 mol ATP is noodsaaklik vir die opname van 2 mol  $\text{Ca}^{2+}$  (Weber et al, 1966). Die hidrolise van ATP en die transport van die  $\text{Ca}^{2+}$  word deur die ATPase proteïen bewerkstellig. Tonomura (1975) het die volgende meganisme voorgestel vir die transport van  $\text{Ca}^{2+}$  deur ATPase: ATPase-ensiem bind aan Mg-ATP en daarna aan  $\text{Ca}^{2+}$  op die buite oppervlak van die SR membraan om 'n kompleks te vorm. Anorganiese fosfaat ( $\text{Pi}$ ) word vrygestel en die kompleks vorm 'n gefosforileerde proteïen. Die  $\text{Ca}^{2+}$  beweeg deur die membraan tydens die vorming van die gefosforileerde proteïen en die  $\text{Ca}^{2+}$  word aan die binnekant van die membraan vrygestel. Daar bestaan 2 fases van ATPase-aktiwiteit in die SR membraan. In afwesigheid van  $\text{Ca}^{2+}$  vind daar 'n lae  $\text{Mg}^{2+}$ -afhanklike ATPase-aktiwiteit plaas. Indien  $\text{Ca}^{2+}$  teenwoordig is verhoog die ATPase-aktiwiteit. Dit is dus 'n  $\text{Ca}^{2+}$ -afhanklike ATPase.  $\text{Ca}^{2+}$ -opname vind slegs tydens die hoër  $\text{Ca}^{2+}$ -afhanklike ATPase plaas.

In die literatuur word 2 terme gebruik om die opname van  $\text{Ca}^{2+}$  te beskryf nl  $\text{Ca}^{2+}$ -opname en  $\text{Ca}^{2+}$ -binding.  $\text{Ca}^{2+}$ -opname is die aktiewe opneem van  $\text{Ca}^{2+}$  in teenwoordigheid van oksalaat of ander  $\text{Ca}^{2+}$ -presipiterende agente. Die  $\text{Ca}^{2+}$  wat opgeneem word presipiteer as onoplosbare kalsiumsoute in die vesikel en die vrye  $\text{Ca}^{2+}$ -konsentrasie bly dus laag. Dié proses kan tot 100 keer meer  $\text{Ca}^{2+}$  uit die reaksiedium verwyder, maar dit is 'n baie stadige proses.  $\text{Ca}^{2+}$ -binding vind plaas in afwesigheid van 'n  $\text{Ca}^{2+}$ -presipiterende agent en is 'n baie vinniger proses as  $\text{Ca}^{2+}$ -opname, maar minder  $\text{Ca}^{2+}$  word opgeneem. Volgens Katz en Repke (1973) is die teorieë oor die meganismes wat by  $\text{Ca}^{2+}$ -opname en  $\text{Ca}^{2+}$ -binding betrokke is kontroversiël. Een teorie beweer dat  $\text{Ca}^{2+}$ -binding, die binding van  $\text{Ca}^{2+}$  aan spesifieke setels op die vesikel membraan is en dat  $\text{Ca}^{2+}$ -opname 'n aparte en onafhanklike transportproses is. Die

ander teorie beweer dat  $\text{Ca}^{2+}$ -binding dieselfde proses is as  $\text{Ca}^{2+}$ -opname, maar beperk word deur die afwesigheid van  $\text{Ca}^{2+}$ -presipiterende anione (Katz & Repke, 1973). Tydens hierdie projek is geen presipiterende anione gebruik nie en die  $\text{Ca}^{2+}$ -opname waarna verwys word in Hoofstukke 2, 3 en 4 stem ooreen met die  $\text{Ca}^{2+}$ -bindingsproses. Die term  $\text{Ca}^{2+}$ -opname word gebruik aangesien  $\text{Ca}^{2+}$ -binding moontlik bindingsetels betrek wat  $\text{Ca}^{2+}$  na die binnekant van die vesikel vervoer (Entman et al, 1973).

### 1.3 Struktuur en funksionering van die hartspier sarkotubulêre stelsel

Aangesien daar met hartspier SR preparate baie probleme soos onsuiverheid en onstabiliteit ondervind word, is daar aanvanklik baie navorsing op die skeletspier SR gedoen. Tot so onlangs as 1973 is afleidings wat gemaak is oor die eksitasie-kontraksiekoppeling van skeletspier, direk oorgedra na hartspier (Morad & Goldman, 1973). Navorsing wat na hierdie tydperk gedoen is op die hartspier SR, het getoon dat daar groot verskille bestaan tussen die eksitasie-kontraksiekoppeling van die 2 tipes spiere.

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

Elektronmikroskopie is daar verskeie ooreenkomste en verskille tussen die sarkotubulêre stelsels van hartspier en skeletspier. Die sarkolemma van die hartspiersel is soortgelyk aan die sarkolemma van skeletspier en die dwarsgestreepte voorkoms is ook duidelik sigbaar. Die A-, I-, M-, H- en Z-bande van hartspier is identies aan die bande van skeletspier (Bloom & Fawcett, 1968).

Die hartspiersel bevat meer sarkoplasma en die glikogeen-konsentrasie in die sarkoplasma is ook hoër. Die hartspiersel bevat baie meer mitochondria as die skeletspiersel en daar is aanduidings dat die mitochondria soms naby aan die T-buis geleë is (Forssmann & Girardier, 1970). Die T-buis van die hartspiersel het 'n baie groter deursnee ( $0,2\mu$ ) as die T-buis van skeletspier ( $20\mu$ ) en is geleë op die vlak van die Z-lyn. Die T-buis van die skeletspiersel is geleë op die vlak van die A-I aansluiting. Daar is ook spesie-verskille wat die posisie van die T-buis betref (Sommer & Johnson, 1970). By die hartspiersel is die opening van die T-buis makliker sigbaar onder die elektronmikroskoop en volgens Bloom en Fawcett (1968) kan die hartspiersel se T-buise betrokke wees by die uitruiling van metabolisme stowwe. Wheeldon en Gan (1971) beweer dat die T-buis in die hartspiersel ook sywaarts en parallel aan die SR verloop.

Die hartspier SR is minder kompleks in struktuur en vertoon onderontwikkel as dit met die skeletspier SR vergelyk word. Daar kom geen terminale sisternae voor nie en die vertakkings van die SR wat die terminale sisternae vervang kom nie net in noue "kontak" met die T-buis nie maar ook met die sarkolemma. Hierdie verwantskap tussen die SR en die sarkolemma is afwesig by skeletspier. Die "kontakareas" wat die SR met die T-buis en sarkolemma vorm kan baie wees, maar die totale oppervlakarea betrokke is nog baie minder as die van die triade in skeletspier (Bloom & Fawcett, 1968). By die hartspier SR kan daar nie verwys word na die longitudinale of L-buise nie, aangesien hierdie buise nie in 'n spesifieke rigting loop nie. Die buise loop dus nie parallel met mekaar nie en geen kraag kom in die middel van die A-band voor nie (Sommer & Johnson, 1970). By die skeletspier SR eindig die

buisse wat die triade binnegaan in die terminale sisternae, maar by die hartspier SR eindig die aansluitings SR nie noodwendig nadat "kontak" gemaak is met die T-buis of sarkolemma nie. Die hartspier SR verloop in teenstelling met die skeletspier SR, oor die grense van die sarkomeer en versprei deur die hele spiersel. SR-voetjies kom ook voor by die aansluitings van hartspier SR met die T-buis en sarkolemma (Sommer & Johnson, 1970). Op die buite oppervlak van die hartspier SR vesikels is daar minder 40 Å partikels (Agostini et al, 1975) terwyl die hartsel ook minder SR bevat as die skeletspiersel (Carsten, 1964). Die funksionele betekenis van hierdie verskille is nog onduidelik maar dit is moontlik dat die hartspier wat relatief stadig saamtrek, nie so 'n komplekse SR vereis as die skeletspier nie.

### 1.3.2 Eksitasie-kontraksiekoppeling in hartspier

Die meganisme van eksitasie-kontraksiekoppeling in skeletspier is met enkele uitsonderinge byna volledig bekend. Die enigste onsekerheid wat nog bestaan is die gebeure wat lei tot  $\text{Ca}^{2+}$ -vrystelling deur die SR. Dit word algemeen aanvaar dat skeletspier SR kontraksie en verslapping veroorsaak. In teenstelling hiermee is die eksitasie-kontraksiekoppeling van hartspier nog onbekend en daar is bykans op geen aspek van die meganisme, ooreenstemming tussen die navorsers nie. Die onsekerheid en verwarring wat heers is duidelik indien die teenstrydige bevindings van navorsers vergelyk word. Hierdie toestand kan grootliks toegeskryf word aan die probleme wat daar ondervind word indien daar met die hartspier SR preparaat gewerk word.

#### 1.3.2.1 Rol en funksionering van hartspier sarkoplasmiese retikulum in eksitasie-kontraksiekoppeling

Aanvanklik is daar beweer dat die basiese meganisme wat lei tot spierverslapping by hartspier dieselfde is as by skeletspier (Fanburg et al, 1964; Inesi et al, 1964). Die lae aktiwiteit van die hartspier SR het egter die vermoede laat ontstaan dat die hartspier SR nie 100% verantwoordelik is vir verslapping nie (Mayler & Merrillees, 1971). Die aktiwiteit van hartspier SR is 10 keer laer as skeletspier SR. Die verhouding van maksimum  $\text{Ca}^{2+}$ -opname deur die SR tot die hoeveelheid kontraktiele proteïne is ook baie laer in hartspier as in skeletspier (Pretorius et al, 1969). Fabiato en Fabiato (1977) stel voor dat  $\text{Ca}^{2+}$ -vrystelling uit die hartspier SR plaasvind as gevolg van 'n invloed van  $\text{Ca}^{2+}$  deur die sarkolemma. Die hartspier SR is baie meer sensitief vir  $\text{Ca}^{2+}$  om vrystelling van  $\text{Ca}^{2+}$  te gee as die skeletspier SR.  $\text{Ca}^{2+}$ -gestimuleerde  $\text{Ca}^{2+}$ -vrystelling kan dus 'n belangriker rol speel in die hartspier (Endo, 1977). Volgens Fabiato en Fabiato (1979) is die hipotese van  $\text{Ca}^{2+}$ -gestimuleerde  $\text{Ca}^{2+}$ -vrystelling nog te vaag om ander moontlikhede uit te skakel en het Langer selfs uit eksperimentele resultate afgelei dat die hartspier SR in die soogdier, geen  $\text{Ca}^{2+}$  vrystel nie. Hierdie standpunt word ook deur Winegrad (1970) ingeneem. Die moontlikheid van 'n meganiese koppeling tussen die T-buis en die hartspier SR kan ook nie uitgeskakel word nie. Fabiato en Fabiato (1979) bespreek 'n hipotese waarvolgens die SR-voetjies moontlik betrokke kan wees by 'n meganiese verandering van die SR membraan deurlaatbaarheid vir  $\text{Ca}^{2+}$ .

Volgens Solaro en Briggs (1974) kan die hartspier SR meer  $\text{Ca}^{2+}$  bind as wat nodig is om die kontraktiele proteïne volledig te aktiveer. Winegrad (1970) trek die feit dat die hartspier SR voldoende  $\text{Ca}^{2+}$  kan opneem om verslapping van die spier te gee

egter in twyfel. Die hartspier SR se aktiwiteit is ongeveer 3-5 keer laer as die aktiwiteit van skeletspier SR (Pretorius, 1972). Thomas en Hidalgo (1978) het gevind dat die  $\text{Ca}^{2+}$ -opname veroorsaak word deur die  $\text{Ca}^{2+}$ -gestimuleerde ATPase wat die  $\text{Ca}^{2+}$  opneem en deur die membraan vervoer deur 'n roterende beweging uit te voer. Dutton et al (1976) het egter gevind dat die ATPase geen roterende beweging uitvoer nie. Daar bestaan dus teenstrydige resultate oor die  $\text{Ca}^{2+}$ -vrystelling en  $\text{Ca}^{2+}$ -opname van die hartspier SR.

Nog 'n gebied wat kontroversiël is, is die invloed van c-AMP op die hartspier SR. Volgens Entman et al (1976) en Hicks et al (1979) tree hartspier SR op soos 'n interne reseptor vir c-AMP. Bevindings toon dat die hartspier SR se  $\text{Ca}^{2+}$ -opname 2-3 keer verhoog na inkubasie met c-AMP en proteïenkinase (Hicks et al, 1979). Dieselfde effek word ook verkry met die toevoeging van epinefrien en glukagon tot die inkubasiemedium. Katz en Repke (1973) het die volgende meganisme voorgestel: Indien die c-AMP vlakke intrasellulêr toeneem het dit die aktivering van c-AMP-afhanklike proteïenkinase tot gevolg. Proteïenkinase het fosforilasie van die SR tot gevolg en die tempo van  $\text{Ca}^{2+}$ -opname neem toe, dus staak die kontraksie, verslapping tree in en met die volgende kontraksie word meer  $\text{Ca}^{2+}$  vrygestel. Dit het 'n toename in kontraktiliteit tot gevolg. Tada et al (1980) het die volgende gevind: c-AMP-afhanklike proteïenkinase kataliseer die fosforilering van 'n 22 000 dalton proteïen, fosfolamban van hartspier SR. Dit gee 'n toename in  $\text{Ca}^{2+}$ -afhanklike ATPase-aktiwiteit. Die gefosforileerde of ongefosforileerde toestand van fosfolamban kan dus die mate bepaal waarmee die  $\text{Ca}^{2+}$ -afhanklike ATPase gestimuleer word. So reguleer fosfolamban die aktiewe  $\text{Ca}^{2+}$ -transport deur die hartspier SR. Hierdie effek van c-AMP kon egter nie

deur ander werkers verkry word nie (Carsten & Mommaerts, 1964). Ook Entman et al (1976) kon in sommige SR preparate met hoë  $\text{Ca}^{2+}$ -transport aktiwiteit geen verdere verhoging kry deur c-AMP toe te dien nie.

### 1.3.2.2 Rol van die mitochondria in die eksitasie-kontraksie-koppeling

Daar is ooreenkomste gevind tussen hartspier SR en mitochondriale ATP-afhanklike  $\text{Ca}^{2+}$ -opname (Carsten, 1964). Onder sekere toestande kan mitochondria  $\text{Ca}^{2+}$  vinniger opneem as hartspier SR en dit kan ook  $\text{Ca}^{2+}$  vrystel (Harigaya & Schwartz, 1969). Weber et al (1964) en ook Harigaya en Schwartz (1969) beweer dat die mitochondria deel het aan die verslapping van hartspier. Ook Lehninger (1970) beweer dat mitochondria 'n moontlike rol speel tydens eksitasie-kontraksiekoppeling van veral rooispier waar die mitochondria in sommige selle kontak maak met die T-buis. Forssmann en Girardier (1970) vind ook aanduidings dat die mitochondria in hartselle soms in kontak is met die T-buis. Carafoli et al (1975) het gevind dat mitochondria 'n groot deel van die  $\text{Ca}^{2+}$  gebind aan troponien kan opneem. Die reaksie is taamlik vinnig en is voldoende gevind om verslapping tot gevolg te hê. Die eksperiment kon egter nie die betrokkenheid van mitochondria bewys in die slag-tot-slag regulering van die hart nie. Die groot probleem is die vrystelling van  $\text{Ca}^{2+}$  deur die mitochondria (Lehninger, 1970). Klübler en Shinebourne (1971) toon egter aan dat mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -vrystelling 100 keer te klein is om kontraksie te gee. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -opname is ook te klein om verslapping te gee. Die mitochondria kan moontlik 'n rol vervul by die bepaling van die hoeveelheid  $\text{Ca}^{2+}$  beskikbaar vir eksitasie-kontraksiekoppeling. Die mitochondria kan moontlik as 'n  $\text{Ca}^{2+}$ -buffer in die hartspiersel

optree deur klein hoeveelhede  $\text{Ca}^{2+}$  vry te stel of op te neem. 'n Groter rol vir die mitochondria kan egter nie uitgesluit word nie.

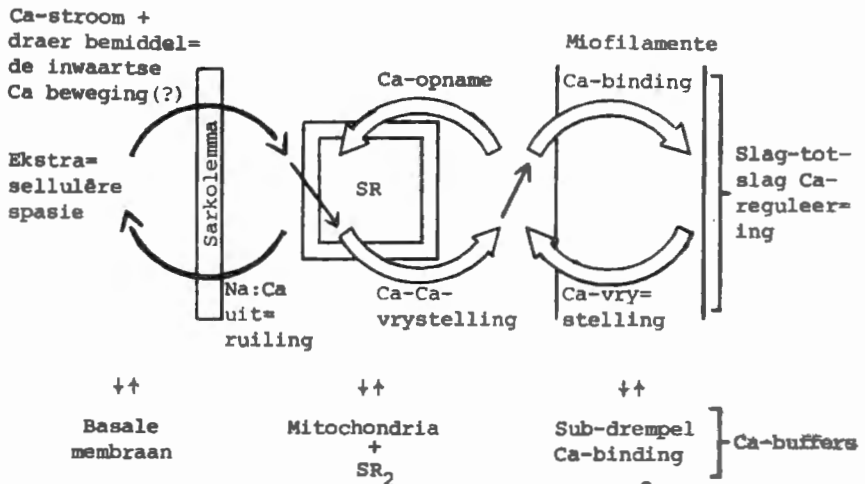
### 1.3.2.3 Rol van die ekstrasellulêre spasie in die eksitasie-kontraksiekoppeling

As gevolg van die kleiner hartspiersel, stadige kontraksies en die sensitiwiteit vir ekstrasellulêre  $\text{Ca}^{2+}$ -veranderings is dit afgelei dat die  $\text{Ca}^{2+}$  in die ekstrasellulêre spasie 'n groot bron is van  $\text{Ca}^{2+}$  vir die hartsel. Soos Ringer het Leonard (1966) gevind dat daar geen kontraksies by hartsier voorkom as die ekstrasellulêre  $\text{Ca}^{2+}$ -konsentrasie nul is nie. Dit is moontlik dat die ekstrasellulêre  $\text{Ca}^{2+}$  van die sarkolemma tot by die miofilamente kan diffundeer om kontraksie te veroorsaak (Repke & Katz, 1969; Morad & Goldman, 1973). Winegrad (1961) beweer egter dat die hoeveelheid  $\text{Ca}^{2+}$  wat invloed te min is om kontraksie te veroorsaak. Die ekstrasellulêre  $\text{Ca}^{2+}$ -konsentrasie is volgens Leonard (1966) 1 000 keer hoër as die interne  $\text{Ca}^{2+}$ -konsentrasie. Hy beweer dat die sarkolemma nie  $\text{Ca}^{2+}$  deurlaat voor die sel nie gestimuleer word nie. Morcos en Drummond (1980) het bewyse gevind vir 'n  $\text{Ca}^{2+}$ - en  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase in die sarkolemma wat  $\text{Ca}^{2+}$  bind en opneem. Hulle stel voor dat dié ATPase  $\text{Ca}^{2+}$  uit die sel pomp. Sommer en Johnson (1970) stel voor dat die  $\text{Ca}^{2+}$ -vrystelling in hartsier deur 2 meganismes gereguleer word:

- a) Inwendig gestoorde  $\text{Ca}^{2+}$  word vrygestel gedurende die eerste 100 msek. van die aksiepotensiaal.
- b) Voortgesette transport van  $\text{Ca}^{2+}$  vanaf die oppervlakmembrane.

### 1.3.2.4 Hipotetiese model van eksitasie-kontraksiekoppeling in hartspier

Fabiato en Fabiato (1979) het die volgende hipotetiese model voorgestel wat die meeste aanvaarbare moontlikhede insluit:



Bo en behalwe die slag-tot-slag regulering van  $Ca^{2+}$  deur die sarkolemma en die SR, is daar ook  $Ca^{2+}$ -buffers in elke kompartement wat stadige  $Ca^{2+}$ -verskuiwings veroorsaak. Die  $Ca^{2+}$ -verskuiwings kan moontlik 'n rol speel in die krag : frekwensieverhouding. In die miofilament-kompartement is daar moontlik 'n klein hoeveelheid  $Ca^{2+}$  wat aan die troponien en ander spierproteïene gebind bly. Die klein hoeveelhede  $Ca^{2+}$  is nie genoeg om spierkontraksie tot gevolg te hê nie (sub-drempel). In die SR-kompartement is daar mitochondria en sekere  $SR_2$  fraksies wat slegs in staat is om stadige vrystelling of opname van  $Ca^{2+}$  te gee. Die basale membraan van die sarkolemma kan ook as  $Ca^{2+}$ -buffer optree deur  $Ca^{2+}$  te bind of vry te stel.

### 1.3.3 Probleme ondervind met hartspier sarkoplasmiese retikulum=preparate

Dit is algemeen bekend dat die bereiding van 'n suiwer en aktiewe hartspier SR baie moeiliker is as die bereiding van skeletspier SR (Pretorius et al, 1969; Lighty & Bertrand, 1979). Die redes hiervoor is:

- a) Die hartspier SR is minder ontwikkel as skeletspier SR (Bloom & Fawcett, 1968).
- b) Kontaminasie van die SR preparaat deur ander organelle (veral mitochondria) lewer baie probleme (Pretorius et al, 1969).
- c) Die SR preparaat is onstabiel en die  $\text{Ca}^{2+}$ -opname vermoë van die hartspier SR neem vinnig af (Harigaya & Schwartz, 1969).

Hierdie probleme van kontaminasie en onstabiliteit het tot gevolg dat baie variërende en teenstrydige resultate met hartspier SR verkry word. Dit het daartoe gelei dat die bereidingsmetode van hartspier SR nog nie gestandaardiseer is nie. Verskillende metodes is ontwikkel in 'n poging om die probleme te oorkom.

Kontaminasie van die hartspier SR preparaat word grootliks deur mitochondria veroorsaak. Die hartspiersel bevat meer mitochondria as die skeletspiersel (Bloom & Fawcett, 1968). Kontaminasie deur mitochondria kan so hoog as 50% wees (Pretorius, 1972). 'n Toename in kontaminasie gaan gepaard met 'n daling in  $\text{Ca}^{2+}$ -opname (Lighty & Bertrand, 1979). Daar is deur verskeie werkers gevind dat die verlenging van die homogenisering daartoe lei dat kontami-

nasie van die SR preparaat toeneem. Lighty en Bertrand (1979) het gevind dat die verlenging van die homogenisering van 30 sekondes na 40 sekondes 'n opmerklke toename in mitochondriale kontaminasie lewer. Volgens Katz en Repke (1973) lewer homogenisering van hartspier, mitochondriale vesikels wat elektronmikroskopies identies vertoon aan hartspier SR en moet interpretasies van studies oor hartspier SR met versigtigheid benader word. Om die mitochondria te onderdruk word 5 mM  $\text{NaN}_3$  by die homogeniseringsmedium en reaksiediums gevoeg (Harigaya & Schwartz, 1969). Ander strukture wat ook kontaminasie veroorsaak is lisosome, lisosoomensieme, T-buise en die sarkolemma (Katz et al, 1970). Onaktiewe kontaminante dra by tot die lae aktiwiteit van hartspier SR deur die proteïenkonsentrasie te verhoog, maar die aktiwiteit van die preparaat neem af (Repke & Katz, 1969).

Die lae aktiwiteit van hartspier SR preparate veroorsaak baie probleme en maak dit moeilik om sinvolle eksperimentele resultate te verkry. Die aktiwiteit van die hartspier SR preparaat is slegs ongeveer 10% van die skeletspier SR aktiwiteit (Pretorius et al, 1969). Volgens Carsten (1964) kan die oorsaak van die lae aktiwiteit 'n vinnige verlies in aktiwiteit tydens die bereiding wees. Vrye vetsure is kragtige inhibeerders van die  $\text{Ca}^{2+}$ -transportstelsel (Masoro & Yu, 1970). Currie et al (1978) het direk na bereiding 'n baie hoë vrye vetsuur-konsentrasie in die SR preparaat gevind. Dit kan moontlik veroorsaak word deur lipiedhidrolise gedurende die bereiding. Die moontlikheid bestaan dus dat die vrye vetsure die  $\text{Ca}^{2+}$ -transportstelsel in die hartspier SR preparaat inhibeer. Albumien kan by die preparaat gevoeg word om dié probleem te probeer oorkom. Die albumien bind aan die vrye vetsure (Masoro & Yu, 1970). Harte met baie epikar-

diale vet lewer 'n minder aktiewe SR preparaat (Katz & Repke, 1967). Die lae aktiwiteit kan ook veroorsaak word deur kontaminasie (Lighty & Bertrand, 1979). Volgens Bonnet et al (1978) is daar reeds direk na bereiding 'n groot deel van die SR vesikels wat nie deelneem aan die  $\text{Ca}^{2+}$ -opname proses nie. Dit kan wees omdat hierdie onaktiewe vesikels verkeerd georiënteer is met die binne-membraan na buite of dat die vesikels lek. Die aktiewe vesikels kan met kalsiumfosfaat gelaai word en dan weer gesentrifugeer word. Slegs die aktiewe vesikels neem kalsiumfosfaat op en swaai dus vinniger uit omdat dit swaarder is. Nadat die kalsiumfosfaat vrygestel is, is die SR preparaat wat verkry word aktiewer as die oorspronklike SR preparaat. Daar word ook algemeen gebruik gemaak van gradiëntsentrifugering in 'n poging om 'n aktiewer SR preparaat te isoleer.

Skeletspier SR preparate se  $\text{Ca}^{2+}$ -opname bly stabiel vir minstens 'n week lank (Eletr & Inesi, 1972). In teenstelling hiermee is die hartspier SR baie onstabiel en die  $\text{Ca}^{2+}$ -opnamevermoë neem binne 1-4 dae af met 50% (Carsten, 1964; Scales & McIntosh, 1968; Pretorius et al, 1969). Die onstabiliteit van hartspier SR is veral nadelig omdat die aanvangsaktiwiteit direk na bereiding reeds so laag is. Daar kan dus nie lang reekse eksperimente uitgevoer word met dieselfde SR preparaat nie. Volgens Carsten (1964) kan die kontaminasie van die SR met bloed tydens die vroeë stadium van bereiding, moontlik bydra tot die onstabiliteit. Verskeie metodes is probeer om die stabiliteit van die hartspier SR te verbeter. Askorbiensuur, sisteïen en ammoniumasetaat is deur navorsers by die preparate gevoeg om dit te probeer stabiliseer (Carsten, 1964; MacLennan, 1970). Gradiëntsentrifugering is ook al toegepas om 'n stabielere hartspierpreparaat te probeer

kry maar die SR opbrengs is baie min (Pretorius et al, 1969; Katz et al, 1970). Volgens Katz et al (1970) help gradiëntsentrifugering met sukrose nie veel nie en moet daar van LiBr in hipertoniese sukrose (40%) gebruik gemaak word vir beter resultate. Volgens Pretorius et al (1969) en ook Repke en Katz (1969) is sukrose die mees effektiefste byvoegmiddel om die aktiwiteit van hartspier SR te preserveer. Sukrose het geen nadelige invloed op die hartspier SR-aktiwiteit nie, terwyl dit die SR stabiliseer en 'n groot vermindering van aziedsensitiewe ATPase-aktiwiteit (mitochondria) tot gevolg het (Katz & Repke, 1967). Pretorius en Malan (1974) het gevind dat 35% sukrose die halfleeftydperk van die hartspier SR van 15 na 60 uur verleng. Repke en Katz (1969) beweer dat die hipertoniese sukrose die stabilisering van die hartspier SR tot gevolg het, as gevolg van die inhibering van lisosoomkontaminante in die preparaat.

In teenstelling hiermee is daar navorsers wat  $\text{NaHCO}_3$  as bereidingsmedium gebruik en beweer dat sukrose nadelig is vir die SR preparaat (Harigaya & Schwartz, 1969; MacLennan, 1970; Nayler et al, 1975). MacLennan (1970) beweer dat die aktiwiteit van gesuiwerde ATPase vinnig daal indien dit in sukrose geplaas word. Entman et al (1976) beweer dat indien die sukrosemethode gebruik word in plaas van die bikarbonaat-azied metode, die SR preparaat 30% gekontamineer is met ander materiaal waarskynlik afkomstig van die sarkolemma. Dit is dus duidelik dat daar wyd uiteenlopende bereidingsmetodes en tegnieke bestaan om die hartspier SR preparaat te probeer stabiliseer.

Verskeie navorsers het al spesie-verskille tussen diere gevind wat hartspier SR  $\text{Ca}^{2+}$ -opname en ATPase betref (Harigaya & Schwartz,

1969; Nayler et al, 1975). Hierdie verskille wat bestaan tussen diersoorte bemoeilik die vergelyking van eksperimentele resultate wat op verskillende diersoorte verkry is.

Indien daar 'n reeks eksperimente met dieselfde hartspierpreparaat gedoen moet word, is dit nodig om heelwat hartspier te gebruik. Dit beteken dat groot hoeveelhede klein proefdiere gedood moet word of daar moet van groter diere gebruik gemaak word. Hierdie groter diere word normaalweg nie in laboratoriums aangehou nie en die navorser moet dan hartspierweefsel by 'n slagpale gaan kry. Hier kan tyd en temperatuur weer 'n nadelige invloed uitoefen op die sensitiewe en onstabiele hartspier SR.

Lighty en Bertrand (1979) het gevind dat die tyd wat dit neem om die hartweefsel te verwerk kritiek is en net so kritiek is die tyd tussen homogenisering en die eerste sentrifugering. Indien daar tyd verlore gaan tydens dié tydperke daal die  $\text{Ca}^{2+}$ -opname van die SR preparaat.

Tydens die bereidingsproses moet daar gedurig in 'n koelkamer met 'n temperatuur van  $2-4^{\circ}\text{C}$  gewerk word. Indien die preparaat tydens bereiding kamertemperatuur nader word dit onaktief (Katz en Repke, 1967).

Die spierweefsel verkry van verskillende dele van die hart (atria en ventrikel) toon groot variasies wat aktiwiteit van SR betref (Morad & Goldman, 1973). Dit is dus duidelik dat die bereiding van hartspier SR en die uitvoer van eksperimente met die SR preparaat geweldig baie probleme kan oplewer.

## 1.4 Doel en motivering

Uit die literatuurbespreking is dit duidelik dat daar 'n groot leemte bestaan oor die meganisme van eksitasie-kontraksiekoppeling in hartspeer. In teenstelling met die goed geordende en bevestigde model wat reeds opgestel is oor eksitasie-kontraksiekoppeling in die skeletspier, bestaan daar slegs enkele teenstrydige hipoteses oor die eksitasie-kontraksiekoppeling in die hartspeer. Eksperimentele resultate wat in die literatuur verskyn is teenstrydig en baie probleme word ondervind om nuwe kennis in te win oor die funksionering van hartspeer SR.

Voordat die oorsake van hierdie probleme nie opgelos word nie, sal daar nie gevorder word met navorsing op hierdie gebied nie en kan die resultate wat gepubliseer word nie as geloofwaardig beskou word nie. Na baie jare se navorsing oor die adenielsiklase van hartspeer SR, verskyn 'n publikasie deur Katz en Dobovicnik (1979) waarin daar verklaar word dat die adenielsiklase wat opgemerk is in hartspeer SR preparate van kontaminerende plasma-membrane afkomstig is.

Dit is dus noodsaaklik dat die probleme van kontaminasie, lae aktiwiteit en onstabiliteit eers opgelos word, voor daar voortgegaan kan word om ingewikkelde en sensitiewe studies op die hartspeer SR uit te voer.

In hierdie projek is daar gepoog om 'n suiwer en aktiewe hartspeer SR preparaat te berei en dan die stabiliteit van hierdie preparaat te probeer verbeter. Daar is gebruik gemaak van 'n anti-oksidadant en 'n proteolitiese ensiem-inhibeerder wat by die reaksie-medium en preparaat gevoeg is. Uit die resultate is dit duidelik dat oksida-

dasie die grootste oorsaak is van die onstabiliteit van hartspier SR preparate. Die oksidasie vind tydens die stoorproses plaas en ook tydens die inkubasie en verhitting van die reaksie-medium. Deur die toevoeging van 'n anti-oksident kan hierdie oksidasie onderdruk word soos in die projek gedoen is. Daar is ook gevind dat proteolitiese ensieme in 'n mindere mate ook 'n bydrae lewer tot die onstabiliteit van die hartspier SR. Hierdie proteolitiese ensieme is ook onderdruk om 'n hartspier SR preparaat te lewer wat na 4 dae steeds 'n  $\text{Ca}^{2+}$ -opname lewer wat 89% is van die oorspronklike  $\text{Ca}^{2+}$ -opname. In teenstelling met die gewone hartspier SR preparaat wat binne 1-3,5 dae 'n afname van 50% in aktiwiteit toon.

Die bekamping van vrye vetsure in die hartspier SR preparaat deur die byvoeging van albumien, lewer addisionele eksperimentele probleme. Die invloed van vrye vetsure op die stabiliteit van die hartspier SR preparaat is dus nie tydens hierdie projek bepaal nie. 'n Beter tegniek moet ontwikkel word om die invloed van vrye vetsure uit te skakel.

Daar is dus 'n begin gemaak om 'n tegniek te ontwikkel wat die stabiliteit van hartspier SR preparate grootliks kan verbeter. Met so 'n stabiele hartspier SR preparaat kan daar verdere navorsing gedoen word om meer oor die struktuur en funksionering van hartspier SR te wete te kom.

## HOOFSTUK 2

### METODE EN MATERIAAL

#### 2.1 Bereiding van SR vesikels uit skeletspier

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

Homogenisering word vir 15 sekondes elke 5 minute vir een uur lank uitgevoer. Gedurende die homogenisering word klein hoeveelhede 5% KOH bygevoeg om die pH tussen 6,5 en 7,0 te hou. Die homogenaat word teen 15 000 g vir 20 minute gesentrifugeer. Hierna word die supernatant deur 'n 2 cm dik laag gaas gefiltreer om lae digtheid lipiede te verwyder. Die gefiltreerde supernatant word teen 40 000 g vir 90 minute gesentrifugeer.

Die sediment wat s6 verkry word, word gehersuspendeer in 48 ml medium 2(10 mM MOPS; 0,6 M KCl, pH 7) deur middel van 'n glas homogeniseerder en geïnkubeer vir 40 minute by 2-4°C. Inkubasie in 'n hoë konsentrasie KCl is noodsaaklik om die kontraktiele proteïne op te los. Hierna word die preparaat teen 15 000 g vir

20 minute gesentrifugeer. Die boonste lagie supernatant bevat lae digtheid lipiede en word nie gebruik nie. Ook die onderste laag supernatant word weggegooi om kontaminasie met deeltjies van die sediment te voorkom. Die oorblywende supernatant word gesentrifugeer teen 40 000 g vir 90 minute en die finale sediment word in medium 3 (10 mM MOPS; 30% sukrose, pH 7) gehersuspendeer. Die hele prosedure word in 'n koelkamer uitgevoer by 2-4°C.

## 2.2 Bereiding van SR vesikels uit hartspier

Verskeie bereidingsmetodes is gevolg om die SR vesikels uit hartspier te berei.

### 2.2.1 Bereiding van hartspier SR vesikels volgens die metode van Eletr en Inesi (1972)

Eletr en Inesi (1972) se metode vir die bereiding van skeletspier SR (Kyk par. 2.1, p. 28) is aangepas sodat hartspier SR berei kon word. Skaapharte wat van die lokale slagpale verkry is, is gebruik. Onmiddelik nadat die skaap doorgemaak is, word die hart verwyder en met 'n yskoue 0,9% NaCl-oplossing gespoel om die bloed te verwyder. Vet- en bindweefsel word met 'n skêr verwyder en 100 g fyngesnyde ventrikelspier word gehomogeniseer in 'n Waring-homogeniseerder in 500 ml medium 1 (40 mM MOPS; 10% sukrose; 0,1 mM EDTA, pH 7,2). Homogenisering word vir 10 sekondes elke minuut vir 3 minute herhaal. Na homogenisering is die homogenaat se pH ongeveer 7. Verder stem die metode ooreen met die bereiding van skeletspier SR soos beskryf onder 2.1 buiten dat die 40 minute inkubasie periode weggelaat word.

### 2.2.2 Bereiding van hartspier SR vesikels volgens die metode van Harigaya en Schwartz (1969) soos aangepas deur Hicks et al (1979)

'n Skaaphart word na verwydering in yskoue gedeïoniseerde, glasge-distilleerde water gewas. Vet- en bindweefsel asook bloedvate word sover moontlik met 'n skêr verwyder en 100 g ventrikelspier word in blokkies van ongeveer 1 g elk, gesny. Die fyngesnyde spier word in 500 ml medium bestaande uit 0,1 M  $\text{NaHCO}_3$ , pH 7,2 gevoeg en met behulp van 'n Waring-homogeniseerder vir 10 sekondes elke minuut vir 4 minute gehomogeniseer. Die homogenaat word teen 5 000 g vir 10 minute gesentrifugeer. Die supernatant word daarna deur 'n 2 cm dik laag gaas gefiltreer om lae digtheid lipiede te verwyder. Die gefiltreerde supernatant word dan teen 5 000 g vir 20 minute gesentrifugeer en daarna word die supernatant weer deur 'n 2 cm dik laag gaas gefiltreer. Die supernatant word hierna teen 27 000 g vir 30 minute gesentrifugeer. Die sediment word in 'n medium bestaande uit 0,6 M KCl en 40 mM MOPS, pH 7-7,2 gehearsuspendeer en dan teen 27 000 g vir 30 minute gesentrifugeer. Die sediment word nou in 'n medium bestaande uit 0,4 M sukrose en 40 mM MOPS, pH 7-7,2 finaal gehearsuspendeer. Die hele prosedure word in 'n koelkamer by 2-4°C uitgevoer.

### 2.2.3 Bereiding van hartspier SR vesikels volgens die metode van Lighty en Bertrand (1979)

'n Skaaphart word direk na verwydering met yskoue gedeïoniseerde, glasgedistilleerde water gewas en vet- en bindweefsel word verwyder. 125 g Ventrikelspier word fyngesny in 500 ml medium bestaande uit 10% sukrose en 40 mM Histidien-Tris, pH 7. Die spierweefsel word dan in 'n Waring-homogeniseerder vir 15 sekondes

des elke minuut vir 3 minute lank, gehomogeniseer. Die homogenaat word teen 650 g gesentrifugeer vir 5 minute en die supernatant dan deur 'n 2 cm dik laag gaas gefiltreer. Hierna word die supernatant teen 23 300 g gesentrifugeer vir 15 minute. Die supernatant wat so verkry word, word vervolgens teen 53 400 g vir 30 minute gesentrifugeer. Die sediment word dan gehersuspendeer in 48 ml medium bestaande uit 10% sukrose en 10 mM Tris-HCl, pH 7. Hierna word 8,3 ml van die suspensie bo-op 30 ml 28% sukrose en 10 mM Tris-HCl, pH 7, in 'n sentrifugebuis geplaas. Die gradient word in 'n Beckman SW-27 rotor teen 54 400 g vir 60 minute gesentrifugeer. Drie bande word geïsoleer (Diagram 3, p. 45). Die boonste band (Fraksie 5) bevat hoofsaaklik SR vesikels en word afgepipeteer.

### 2.3 Bereiding van mitochondria uit hartspleer

Vir die bereiding van mitochondria is verskillende metodes wat in die literatuur beskryf is (Dransfeld et al, 1967; Gloster en Harris, 1969; Maisterrena et al, 1974), gekombineer en gewysig. 'n Skaaphart word direk na die dier doodgemaak is, verwyder en gespoel met yskoue 0,1 mM EDTA, pH 7,4. Vet- en bindweefsel asook bloedvate word met behulp van 'n skêr vanaf die ventrikels verwyder. 70 g Ventrikelspleer word fyngesny en in 500 ml medium bestaande uit 40 mM MOPS; 0,1 mM EDTA en 10% sukrose, pH 7,4 gevoeg. Die weefsel word vervolgens in 'n Waring-homogeniseerder vir 10 sekondes elke minuut vir 3 minute, gehomogeniseer. Hierna word die homogenaat teen 1 600 g vir 10 minute gesentrifugeer en die supernatant word deur 'n 2 cm dik laag gaas gefiltreer. Die gefiltreerde supernatant word teen 15 000 g vir 20 minute gesentrifugeer. Hierna word die sediment in 500 ml van dieselfde

medium gehersuspendeer en die sentrifugering word herhaal teen 15 000g vir 20 minute. Die hersuspendering word in dieselfde medium herhaal en daarna teen 15 000 g vir 20 minute gesentrifugeer. Die sediment word daarna in 'n medium bestaande uit 10 mM MOPS en 30% sukrose, pH 7,2 gehersuspendeer. Die hele proses word uitgevoer by 2-4°C.

## 2.4 Proteïenbepalings gedoen met behulp van twee verskillende metodes

### 2.4.1 Biuret proteïenbepaling (Gornall et al, 1949)

Die biuretreagens bevattende 6 mM kopersulfaat ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), 21 mM kaliumnatriumtartraat ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) en 0,75 M NaOH word gemeng in 'n 4 : 1 verhouding met die SR suspensie. Die prepraat word vir 30 minute gelaat vir volledige kleurontwikkeling voor die monster gelees word teenoor 'n blanko by 555 mμ. Die proteïenkonsentrasie word bepaal met behulp van 'n proteïenstandaardkromme wat verkry is met behulp van verskillende konsentrasies albumien.

### 2.4.2 Proteïenbepaling volgens die Folinmetode (Lowry et al, 1951)

Die volgende oplossings word opgemaak:

Oplossing 1: 190 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$   
100 mM NaOH

Oplossing 2: 430 mM natriumtartraat

Oplossing 3: 20 mM kopersulfaat

Oplossings 1, 2 en 3 word in die verhouding van 50 : 1 : 1 gemeng om oplossing 4 te kry. By 5 ml van oplossing 4 word 0,1 ml SR monster of blanko gevoeg en gekubeer by 37°C vir 3 minute. 0,5 ml Phenolreagens word bygevoeg en verder gekubeer vir 20 minute. Die optiese digtheid word by 700 mμ gelees en vergelyk met 'n serum albumien standaard.

## 2.5 Bepaling van die ATPase-aktiwiteit van skeletspier- en harts-pier SR

### 2.5.1 ATPase-aktiwiteit van skeletspier SR

Die ATPase-aktiwiteit is bepaal in die volgende medium:

20 mM MOPS, pH 7; 0,4 mM EGTA; 80 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub> en 0,3 mg SR proteïen/ml by 25°C. Geen CaCl<sub>2</sub> word bygevoeg nie en die Mg<sup>2+</sup>-afhanklike of basiese ATPase-aktiwiteit word begin deur 5 mM ATP by die medium te voeg. Monsters word op 1, 3 en 5 minute na aanvang van die reaksie geneem. Die monsters word onmiddelik by 'n gelyke volume yskoue 10% TCA gevoeg om die reaksie te stop. Op 6 minute word 0,3 mM CaCl<sub>2</sub> by die medium gevoeg om die Ca<sup>2+</sup>-afhanklike ATPase te aktiveer. Monsters word op 7, 9, 11, 13 en 15 minute geneem en by gelyke volumes TCA gevoeg. Nadat die monsters vir minstens 10 minute in 'n ysbad gelaat is, word dit vir 20 minute gesentrifugeer. Die hoeveelheid Pi gevorm in elke monster word deur die metode van Fiske en Subbarow (1925) bepaal as aanduiding van die ATPase-aktiwiteit. 1 ml Supernatant word by 4,0 ml 0,4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,4 ml 2,5% ammoniummolibdaat en 0,2 ml ANSA gevoeg en gelaat vir 30 minute. Hierna word die monster gelees teenoor 'n blanko by 700 mμ.

Die blanko bevat 0,5 ml 10% TCA en 0,5 ml  $H_2O$  in plaas van 1 ml supernatant. ANSA (Fiske-Subbarow reagens) bestaan uit 0,5 g droë ANSA poeier opgelos in 195 ml 15%  $NaHSO_3$  en 5 ml 20%  $Na_2SO_3$ .

### 2.5.2 ATPase-aktiwiteit van hartspier SR

Die ATPase-aktiwiteit is bepaal in die volgende medium:

20 mM MOPS, pH 7,2; 0,1 mM EGTA; 80 mM KCl; 5 mM  $MgCl_2$ ; 5 mM  $NaN_3$  (om mitochondriale ATPase-aktiwiteit te onderdruk; Bielawski & Lehninger, 1966; Katz et al, 1970; Entman et al, 1973) en 0,1 mM  $CaCl_2$ . Temperatuur  $37^{\circ}C$ . Die prosedure gevolg stem verder ooreen soos in 2.5.1 beskryf.

### 2.6 Bepaling van die ATP-afhanklike $Ca^{2+}$ -opname van skelet- en hartspier SR

Die ATP-afhanklike  $Ca^{2+}$ -opnames van skelet- en hartspier SR is bepaal. In hierdie projek is alle  $Ca^{2+}$ -opnames gedoen in afwesigheid van anione soos oksalaat. Die  $Ca^{2+}$ -opname waarna verwys word stem dus ooreen met die  $Ca^{2+}$ -binding wat in die literatuur beskryf word.

#### 2.6.1 ATP-afhanklike $Ca^{2+}$ -opname van skeletspier SR

$Ca^{2+}$ -opname is uitgevoer by  $25^{\circ}C$  in 'n medium bestaande uit 20 mM MOPS, pH 7,2; 0,1 mM EGTA; 0,1 mM  $^{45}Ca-CaCl_2$ ; 120 mM KCl; 2,5 mM  $MgCl_2$  en 0,2-0,3 mg SR proteïen/ml. Die opname is begin deur die byvoeging van 2,5 mM ATP. Na 5, 10, 30, 60 en 120 sekondes is monsters geneem en die opnameproses is beëindig deur millipore-filtrering. Die  $Ca^{2+}$  wat nie opgeneem is nie is bepaal deur

middel van vloeistofsintillasietelling.

## 2.6.2 ATP-afhanklike $\text{Ca}^{2+}$ -opname van hartspier SR

$\text{Ca}^{2+}$ -opname van hartspier SR is uitgevoer by  $37^{\circ}\text{C}$  en in die volgende medium: 20 mM MOPS, pH 7,2; 0,025 mM EGTA; 0,025 mM  $^{45}\text{Ca}-\text{CaCl}_2$ ; 120 mM KCl; 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$  en 0,2-0,3 mg SR proteïen/ml. Die opname is begin deur die byvoeging van 2,5 mM ATP. Die prosedure gevolg stem verder ooreen soos in 2.6.1 beskryf.

## 2.7 Gel-elektroforese

Die SR proteïen is opgelos deur 0,05 mg proteïen by die volgende mengsel te voeg:

0,02 ml Tris-natriumasetaat buffer, pH 7,4

0,05 ml 4% SDS

0,71 ml  $\text{H}_2\text{O}$

Die mengsel is vir 5 minute gekook. Na die kookproses is dit goed afgekoel en is 0,02 ml 0,1 M DTT bygevoeg om oksidasie te verhoed. Elektroforese is uitgevoer in skeidingsgelle wat 7% akrilamied; 2,63% bisakrilamied; 4,5% Tris; 0,03% Temed; 0,11 M HCl; 0,1% SDS en 0,07% ammoniumpersulfaat bevat met 'n finale pH 7,4. Pakgelle bevat 4% akrilamied; 1,2% Tris; 0,09% Temed; 0,11 M HCl; 0,0008% Riboflavin en 8% sukrose. Die buffer bevat 1% Tris; 0,328% Natriumasetaat en 0,2% SDS met 'n finale pH 7,4. Pironien Y geel kleurstof is as merker gebruik en 'n stroom van 3mA/gel is gebruik. Na ongeveer 15 uur van elektroforese is die gelle oornag gefikseer in 50% TCA. Daarna is die gelle vir 5 uur gekleur met Coomassie-helder-blou R opgelos in 20% metanol en 20% TCA. Die gelle is ontkleur in 20% metanol en 5,6% asynsuur.

Elektroforesepatrone is van die gelle getrek met behulp van 'n Joyce Loebel "Chromoscan" densitometer.

## 2.8 Bepaling van die invloed van 1 mM PMSF op proteolitiese ensiem-aktiwiteit

Die metode gevolg vir die bepaling van proteolitiese ensiem-aktiwiteit is soos beskryf deur Bergmeyer (1974). As substraat is kaseïen gebruik met pronase as proteolitiese ensiem. Pronase-aktiwiteit is bepaal op tyd 10, 25 en 45 minute nadat die reaksie begin is. Om die invloed van PMSF op die pronase-aktiwiteit te bepaal is 'n tweede reeks gedoen met 1 mM PMSF in die reaksiedim.

## 2.9 Chemikalieë

Daar is deurgaans gebruik gemaak van analitiese graad chemikalieë met Merck of BDH handelsmerke, behalwe BHT wat van Bayer verkry is. Radioaktiese  $^{45}\text{Ca}$  is verkry vanaf New England Nuclear en Aquagel sintillasië-vloeistof is gebruik. Gedeïoniseerde, dubbel glasgedistilleerde water is deurgaans gebruik.

## 2.10 Statistiese verwerkings

Standaard afwykings is bepaal met behulp van die volgende vergelyking:

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

Liniëre regressiepassings is gedoen met behulp van die volgende vergelykings:

$$y = a_1 x + a_0$$

$$\text{met } a_1 = \frac{\Sigma xy - \frac{\Sigma x \Sigma y}{n}}{\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n}}$$

$$\text{en } a_0 = \bar{y} - a_1 \bar{x}$$

$$\text{Die korrelasie koëffisiënt } r^2 = \frac{\left[ \Sigma xy - \frac{\Sigma x \Sigma y}{n} \right]^2}{\left[ \Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n} \right] \left[ \Sigma y^2 - \frac{(\Sigma y)^2}{n} \right]}$$

## HOOFSTUK 3

### RESULTATE

Uit die literatuur is dit duidelik dat daar baie probleme ondervind word met hartspier SR preparate. Hartspier SR preparate is baie onstabiel as skeletspier SR preparate en navorsers het gevind dat die hartspier SR se  $\text{Ca}^{2+}$ -opname vermoë binne 1-3,5 dae na bereiding met 50% afneem (Carsten, 1964; Scales & McIntosh, 1968; Pretorius et al, 1969; Lighty & Bertrand, 1979).

'n Tweede probleem wat ondervind word is kontaminasie van die hartspier SR preparaat deur ander selorganelle veral mitochondria (Katz & Repke, 1967; Fuchs et al, 1968; Pretorius et al, 1969; Katz et al, 1970). Pretorius (1972) het gevind dat die kontaminasie so hoog as 50% kan wees. Voordat navorsing gedoen kan word om meer in verband met die struktuur en funksie van hartspier SR te wete te kom, moet 'n suiwer en stabiele preparaat verkry word. Verskeie bereidingsmetodes is in die literatuur beskryf in 'n poging om die probleme van onsuiverheid en onstabieliteit te oorkom (Katz & Repke, 1967; Harigaya & Schwartz, 1969; Pretorius et al, 1969; Katz et al, 1970; Solaro & Briggs, 1974; Lighty & Bertrand, 1979).

Enkele van hierdie bereidingsmetodes is gebruik om vas te stel watter metode die aktiefste en suiwerste SR preparaat lewer. Tydens die bereiding van die hartspier SR volgens die verskillende metodes is ook verskillende fraksies versamel om vas te stel waar daar moontlik SR vesikels verlore gaan. Die ATPase-aktiwiteit en  $\text{Ca}^{2+}$ -opname van hierdie fraksies is bepaal. Daar is ook elektro-

forese uitgevoer met die verskillende fraksies en skeletspier SR om die suiwerheid en ATPase-inhoud te kan vergelyk.

### 3.1 Hartspier SR berei volgens verskillende metodes

#### 3.1.1 Hartspier SR berei volgens die metode van Eletr en Inesi (1972)

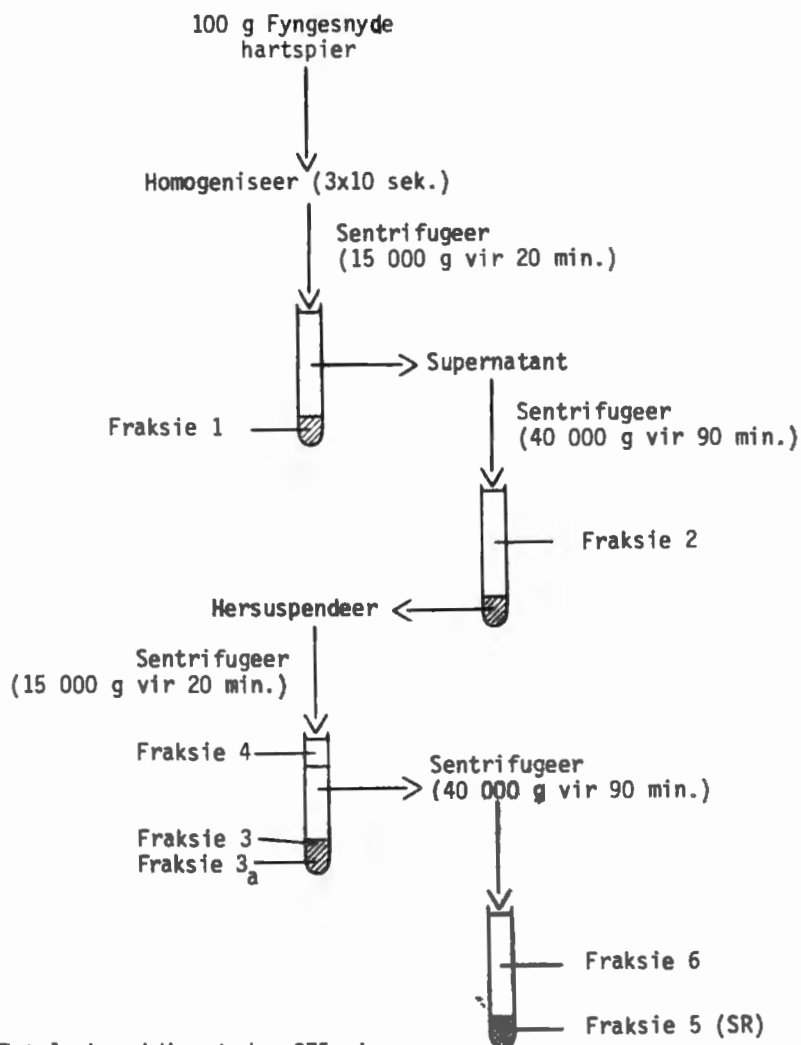
##### 3.1.1.1 ATPase-aktiwiteit van fraksies versamel tydens die bereiding van hartspier SR volgens die metode van Eletr en Inesi (1972)

ATPase-aktiwiteit van fraksies 1, 3, 3<sub>a</sub> en 5 is bepaal om vas te stel hoeveel ATPase verlore gaan tydens die bereiding van die hartspier SR (Fig. 1). ATPase-aktiwiteit van die ander fraksies is nie bepaal nie aangesien die proteïen inhoud daarvan baie laag was. Daar is gevind dat fraksie 5 (SR) die hoogste ATPase-aktiwiteit besit met 'n  $\text{Ca}^{2+}$ -gestimuleerde ATPase-aktiwiteit van 0,35 mikromol Pi/mg SR proteïen/min. Hierna volg fraksie 3 (0,26 mikromol Pi/mg proteïen/min.) en dan fraksie 3<sub>a</sub> (0,21 mikromol Pi/mg proteïen/min.) Fraksie 1 het die laagste aktiwiteit (0,09 mikromol Pi/mg proteïen/min.).

#### 3.1.2 Hartspier SR berei volgens die metode van Harigaya en Schwartz (1969)

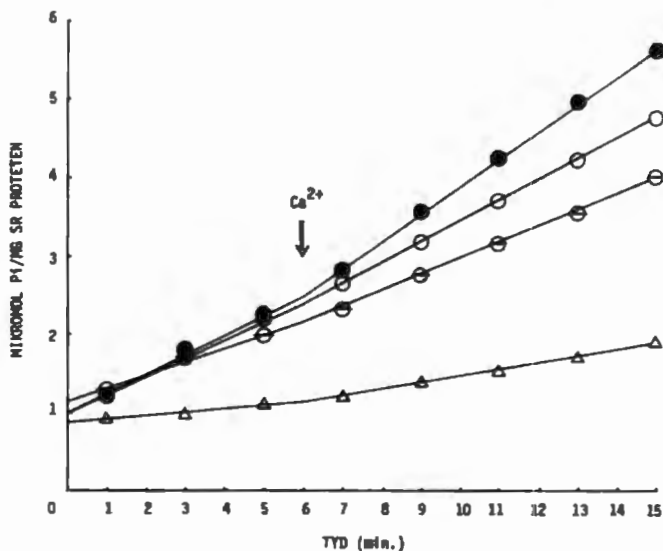
##### 3.1.2.1 ATPase-aktiwiteit van fraksies versamel tydens die bereiding van hartspier SR volgens die metode van Harigaya en Schwartz (1969)

Die ATPase-aktiwiteit is bepaal van fraksies 1, 2, 3, 4 en 5 (SR)



Totale bereidingstyd: 375 min.

Diagram 1: Diagram van die bereiding van hartspier SR volgens die metode van Eletr & Inesi (1972). (Verskillende fraksies wat versamel is word aangetoon). Die metode is volledig in par. 2.2.1, p. 29 beskryf.



Figuur 1: ATPase-aktiwiteit van fraksies versamel tydens die bereiding van hartspier SR volgens die metode van Eletr en Inesi. Reaksiemedium: 20 mM MOPS, pH 7,2; 0,1 mM EGTA; 80 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM NaN<sub>3</sub> en 0,3 mg proteïen/ml. Die reaksie is begin met 5 mM ATP en na 6 minute is 0,1 mM CaCl<sub>2</sub> bygevoeg. Temperatuur 37°C. Die volgende fraksie is gebruik: Fraksie 1 (Δ); Fraksie 3 (O); Fraksie 3<sub>a</sub> (◐) en Fraksie 5 (●). (Kyk Diagram 1, p. 40 ).

(Fig. 2). Fraksie 5 (SR) besit die hoogste ATPase-aktiwiteit nl 0,21 mikromol Pi/mg SR proteïen/min. wat heelwat laer is as die ATPase-aktiwiteit van fraksie 5 van die metode van Eletr en Inesi. Fraksies 1, 2, 3 en 4 se ATPase-aktiwiteit is op grond van standaard afwykings beduidend laer as fraksie 5.  $\text{Ca}^{2+}$ -gestimuleerde ATPase-aktiwiteit van fraksies is as volg: Fraksie 1(0,09 mikromol Pi/mg proteïen/min.); fraksie 2(0,08 mikromol Pi/mg proteïen/min.); fraksie 3(0,03 mikromol Pi/mg proteïen/min.) en fraksie 4(0,08 mikromol Pi/mg proteïen/min.).

### 3.1.3 Hartspier SR berei volgens die metode van Lighty en Bertrand (1979)

#### 3.1.3.1 ATPase-aktiwiteit van fraksies versamel tydens die bereiding van hartspier SR volgens die metode van Lighty en Bertrand (1979)

ATPase-aktiwiteit van fraksies 1, 2, 5 (SR) en 8 is bepaal (Fig. 3). ATPase-aktiwiteit van die ander fraksies is nie bepaal nie as gevolg van die lae proteïen inhoud daarvan. Daar is byna geen verskil tussen die ATPase-aktiwiteit van fraksie 5 (SR) en fraksie 8 nie. Beide het 'n  $\text{Ca}^{2+}$ -gestimuleerde ATPase-aktiwiteit van 0,18 mikromol Pi/mg proteïen/min. Op grond van standaard afwykings bestaan daar wel beduidende verskille tussen die ATPase-aktiwiteit van fraksies 5, 1 en 2.  $\text{Ca}^{2+}$ -gestimuleerde ATPase-aktiwiteit van fraksie 1 is 0,17 mikromol Pi/mg proteïen/min. en die van fraksie 2 is 0,07 mikromol Pi/mg proteïen/min.

#### 3.1.4 $\text{Ca}^{2+}$ -opname van fraksies versamel tydens die bereiding van hartspier SR volgens die verskillende bereidingsmetodes

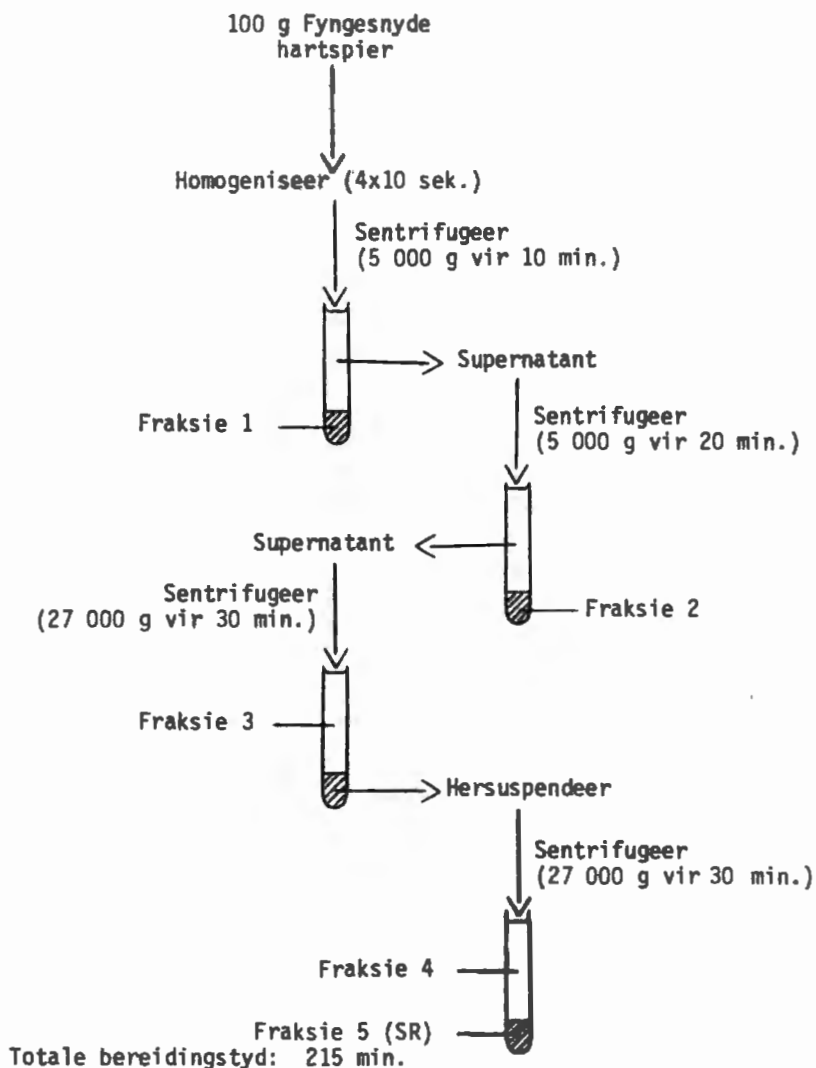
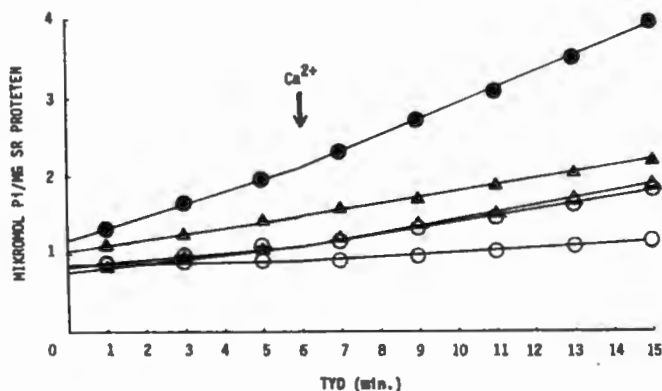
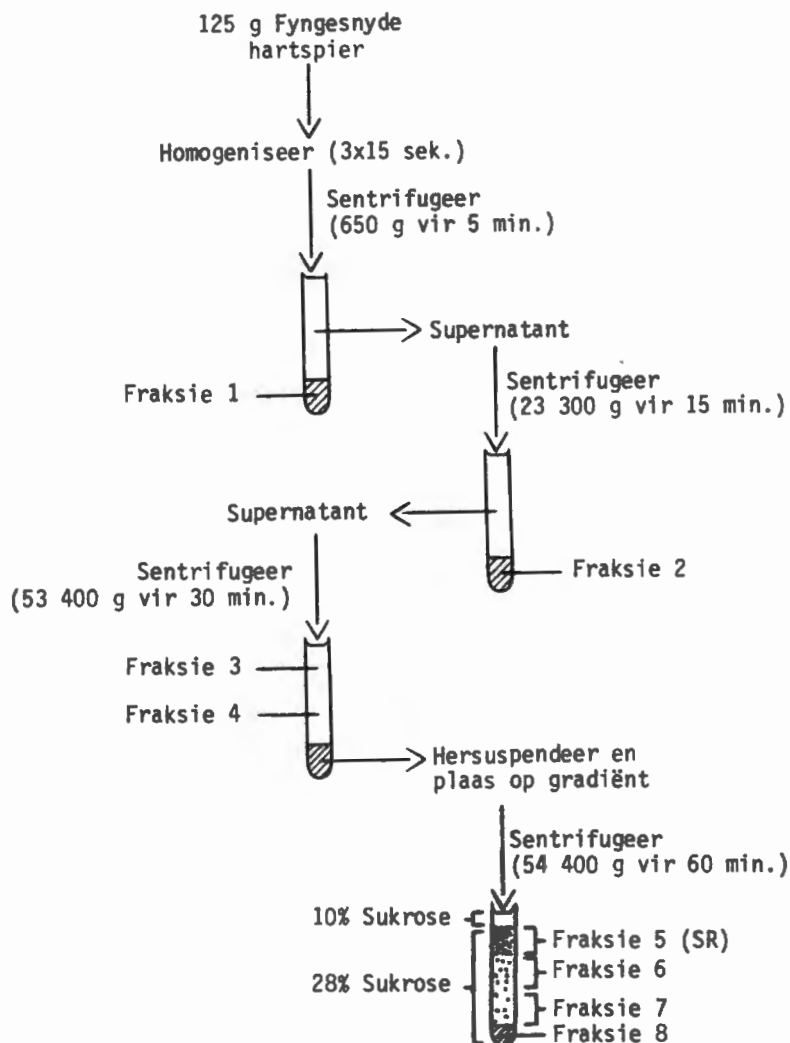


Diagram 2: Diagram van die bereiding van hartspeer SR volgens die metode van Harigaya & Schwartz (1969). (Verskillende fraksies wat versamel is word aangetoon). Die metode is volledig in par. 2.2.2, p. 30 beskryf.

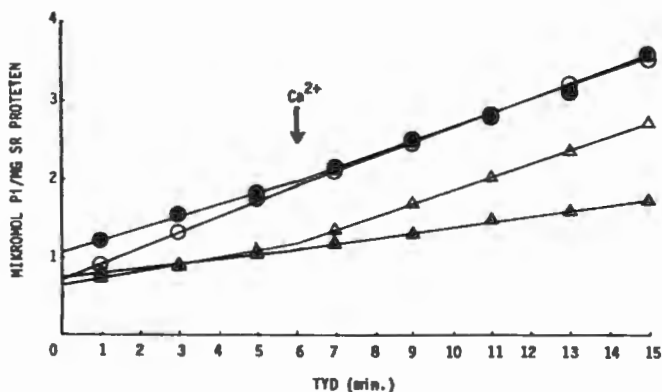


Figuur 2: ATPase-aktiwiteit van fraksies versamel tydens die bereiding van hartspier SR volgens die metode van Harigaya en Schwartz. Reaksiemedium: 20 mM MOPS, pH 7,2; 0,1 mM EGTA; 80 mM KCl; 5 mM  $MgCl_2$ ; 5 mM  $NaN_3$  en 0,3 mg proteïen/ml. Die reaksie is begin met 5 mM ATP en na 6 minute is 0,1 mM  $CaCl_2$  bygevoeg. Temperatuur  $37^{\circ}C$ . Die volgende fraksies is gebruik: Fraksie 1 ( $\Delta$ ); Fraksie 2 ( $\blacktriangle$ ); Fraksie 3 ( $\circ$ ); Fraksie 4 ( $\ominus$ ) en Fraksie 5 ( $\bullet$ ). (Kyk Diagram 2, p. 43).



Totale bereidingstyd: 235 min.

Diagram 3: Diagram van die bereiding van hartspeer SR volgens die metode van Lighty & Bertrand (1979). (Verskillende fraksies wat versamel is word aangetoon). Die metode is volledig in par. 2.2.3, p. 30 beskryf.



Figuur 3: ATPase-aktiwiteit van fraksies versamel tydens die bereiding van hartsier SR volgens die metode van Lighty en Bertrand. Reaksiemedium: 20 mM MOPS, pH 7,2; 0,1 mM EGTA; 80 mM KCl; 5 mM  $MgCl_2$ ; 5 mM  $NaN_3$  en 0,3 mg proteïen/ml. Die reaksie is begin met 5 mM ATP en na 6 minute is 0,1 mM  $CaCl_2$  bygevoeg. Temperatuur  $37^{\circ}C$ . Die volgende fraksies is gebruik: Fraksie 1 (Δ); Fraksie 2 (▲); Fraksie 5 (●) en Fraksie 8 (○). (Kyk Diagram 3, p. 45 ).

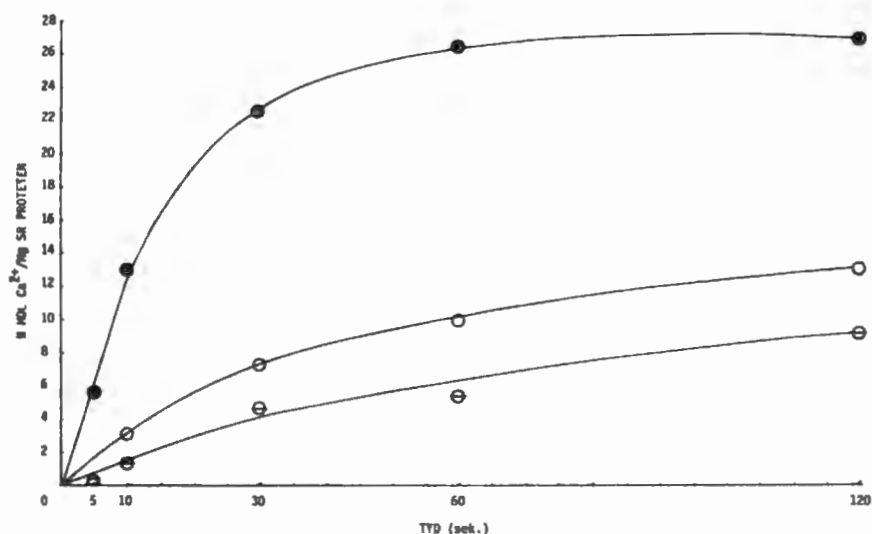
$\text{Ca}^{2+}$ -opname is gedoen met die fraksie 5 (SR) van al drie die metodes.  $\text{Ca}^{2+}$ -opname is bepaal op tyd 5, 10, 30, 60 en 120 sekondes na die toevoeging van ATP. Op grond van standaard afwykings is vasgestel dat die SR berei met die metode van Eletr en Inesi 'n beduidend hoër  $\text{Ca}^{2+}$ -opname gee as die SR berei met die ander twee metodes (Fig. 4). Die SR verkry met die metode van Harigaya en Schwartz lewer 'n hoër  $\text{Ca}^{2+}$ -opname as die SR verkry met die metode van Lighty en Bertrand, maar die verskil is nie beduidend nie.

$\text{Ca}^{2+}$ -opnames van die verskillende fraksies is ook bepaal op tyd 120 sekondes na die toevoeging van ATP. In tabel 1 word die opnames van die verskillende fraksies getoon sowel as die  $\text{Ca}^{2+}$ -gestimuleerde ATPase-aktiwiteit. Daar bestaan 'n goeie ooreenkoms tussen die  $\text{Ca}^{2+}$ -opname en die ATPase-aktiwiteit van elke fraksie.

Tabel 1

ATPase-aktiwiteit en  $\text{Ca}^{2+}$ -opnames van fraksies versamel tydens die verskillende bereidingsmetodes

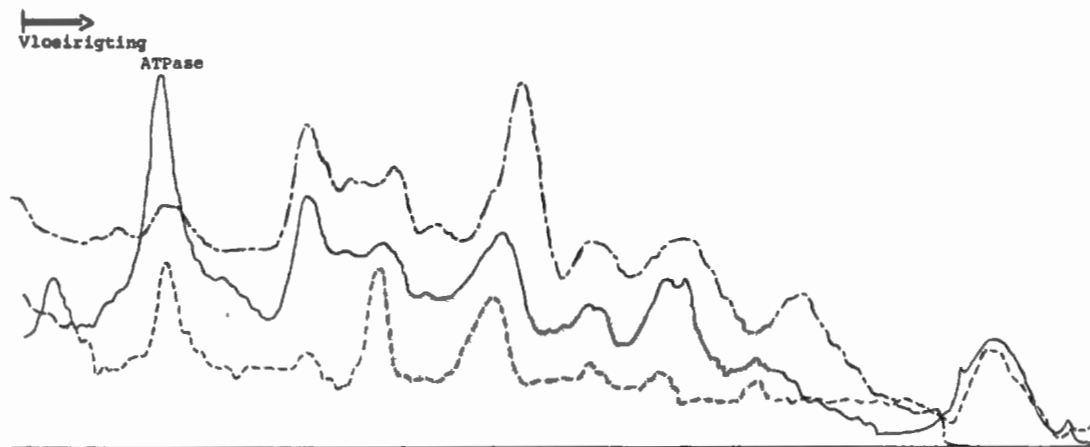
| Bereidingsmetode     | Fraksie        | ATPase-aktiwiteit<br>(mikromol Pi/mg<br>proteïen/min.) | $\text{Ca}^{2+}$ -opname<br>n mol $\text{Ca}^{2+}$ /mg<br>proteïen |
|----------------------|----------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| Eletr en Inesi       | 1              | 0,09                                                   | 0,1                                                                |
|                      | 3              | 0,26                                                   | 3,6                                                                |
|                      | 3 <sub>a</sub> | 0,21                                                   | 2,5                                                                |
|                      | 5              | 0,35                                                   | 26,8                                                               |
| Harigaya en Schwartz | 1              | 0,09                                                   | 4,41                                                               |
|                      | 2              | 0,08                                                   | 1,2                                                                |
|                      | 3              | 0,03                                                   | 0,0                                                                |
|                      | 4              | 0,00                                                   | 0,0                                                                |
|                      | 5              | 0,21                                                   | 13,02                                                              |
| Lighty en Bertrand   | 1              | 0,17                                                   | 0,8                                                                |
|                      | 2              | 0,07                                                   | 1,8                                                                |
|                      | 5              | 0,18                                                   | 9,1                                                                |
|                      | 8              | 0,18                                                   | 3,8                                                                |



FIGUUR 4:  $\text{Ca}^{2+}$ -opname van fraksies 5 (SR) verkry tydens die bereiding van hartspier SR volgens die verskillende bereidingsmetodes. Reaksiemedium: 20 mM MOPS, pH 7,2; 0,025 mM EGTA; 0,025 mM  $^{45}\text{Ca}-\text{CaCl}_2$ ; 120 mM KCl; 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$  en 0,2-0,3 mg SR proteïen/ml. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -opname is begin deur die byvoeging van 2,5 mM ATP. Temperatuur  $37^\circ\text{C}$ . Bereidingsmetodes: Eletr en Inesi (●); Harigaya en Schwartz (○); Lighty en Bertrand (⊙).

### 3.1.5 Vergelyking van die elektroforesepatrone van hartspier SR verkry met behulp van die verskillende bereidingsmetodes

Elektroforese is uitgevoer op die hartspier SR verkry met verskillende bereidingsmetodes sodat die suiwerheid van die hartspier SR preparate vergelyk kon word (Fig. 5). Goeie ooreenkomste bestaan tussen die verskillende hartspier SR preparate. Om die suiwerheid van die verskillende SR preparate te vergelyk is die hoeveelheid ATPase as % van die totale hoeveelheid proteïen in elke preparaat uitgedruk. Die SR (fraksie 5) berei volgens die metode van Eletr en Inesi, bevat 31,4% ATPase en 68,6% ander proteïne. Elektroforese is ook uitgevoer op al die ander fraksies versamel soos aangedui in Diagram 1. Die ATPase van al die fraksies behalwe fraksie 5 is bymekaar getel en uitgedruk as % van die totale hoeveelheid proteïen in die fraksies. In hierdie fraksies is gesamentlik 10,9% ATPase en 89,1% ander proteïne. Die hartspier SR (fraksie 5) berei volgens die metode van Harigaya en Schwartz bevat 14,8% ATPase en 85,2% ander proteïne. Die fraksies versamel soos aangedui in Diagram 2 (behalwe fraksie 5) bevat gesamentlik 8,8% ATPase en 91,2% ander proteïne. Die hartspier SR (fraksie 5) berei volgens die metode van Lighty en Bertrand bevat 11,8% ATPase en 88,2% ander proteïne. Die fraksies versamel soos aangedui in Diagram 3 (fraksie 5 uitgesluit) bevat gesamentlik 22,6% ATPase en 77,4% ander proteïne. Die metode van Eletr en Inesi lewer dus 'n SR wat meer ATPase bevat as die ander twee metodes en min ATPase gaan verlore in die fraksies wat nie gebruik word nie. Die metode van Harigaya en Schwartz lewer die helfte minder ATPase. Die metode van Lighty en Bertrand lewer die minste ATPase van die drie metodes. Groot hoeveelhede ATPase gaan met die metode van Lighty en Bertrand verlore in die ander fraksies.



Figuur 5: Vergelyking van die elektroforesepatrone van hartspier SR verkry met behulp van verskillende bereidingsmetodes. Elektroforese is uitgevoer volgens die metode beskryf in paragraaf 2.7. Hartspier SR berei volgens die volgende metodes is gebruik: Metode van Eletr en Inesi ( — ); metode van Harigaya en Schwartz (---) en die metode van Lighty en Bertrand (-----).

Die elektroforesepatrone van hartspier SR en skeletspier SR verkry tydens hierdie projek toon goeie ooreenkomste met die elektroforesepatrone verkry deur Fanburg en Matsushita (1973). Fanburg en Matsushita het die posisie van die ATPase in die elektroforesepatroon bewys deur die opname van  $^{32}\text{P}$ -ATP. Daar kan dus met redelike sekerheid gesê word dat die proteïen wat tydens hierdie projek as ATPase aanvaar is, wel die ATPase is.

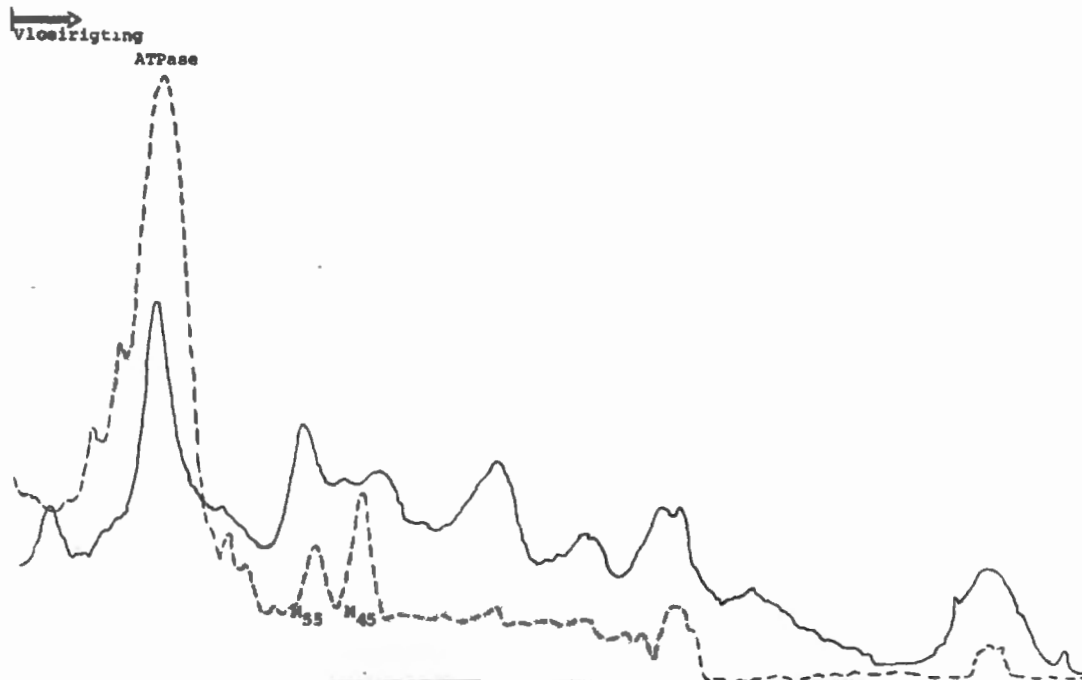
### 3.1.6 Vergelyking van die elektroforesepatrone van hartspier SR en skeletspier SR

Die elektroforesepatroon van die skeletspier SR preparaat toon 'n relatief suiwer SR preparaat met min ander kontaminerende proteïne (Fig. 6). Die ATPase,  $M_{55}$ -en  $M_{45}$ -proteïne word duidelik aangetoon. Die ATPase maak volgens die elektroforesepatroon 83% uit van die skeletspier SR. Die elektroforesepatroon van die hartspier SR preparaat toon duidelik dat daar meer vreemde proteïne teenwoordig is as by die skeletspier SR (Fig. 6). Die hartspier SR preparaat bevat 31,4% ATPase en 68,6% ander proteïne.

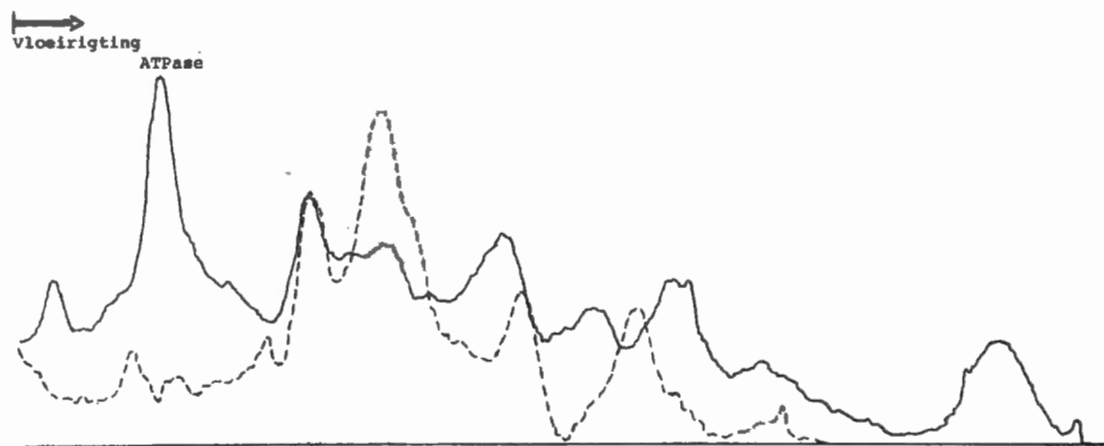
### 3.1.7 Vergelyking van die elektroforesepatrone van hartspier SR en mitochondria

Daar is wel ooreenkomste maar ook verskille tussen die elektroforesepatrone van hartspier SR en mitochondria (Fig. 7).

### 3.2 Bekamping van kontaminasie in die hartspier SR preparaat veroorsaak deur mitochondria en ander chemiese faktore



Figuur 6: Vergelyking van die elektroforesepatrone van skeletspier SR en hartspier SR. Elektroforese is uitgevoer volgens die metode beskryf in paragraaf 2.7. Soliede lyn: hartspier SR; gebroke lyn: skeletspier SR.



Figuur 7: Vergelyking van die elektroforesepatrone van hartspier SR en mitochondria. Elektroforese is uitgevoer volgens die metode beskryf in paragraaf 2.7. Soliede lyn: hartspier SR; gebroke lyn: mitochondria.

### 3.2.1 Bekamping van mitochondriale-aktiwiteit deur $\text{NaN}_3$

$\text{NaN}_3$  is 'n sterk inhibeerder van mitochondriale ATPase en  $\text{Ca}^{2+}$ -opname. Dit word algemeen gebruik in die literatuur om mitochondriale-aktiwiteit in SR preparate te onderdruk (Entman et al, 1973). Die invloed daarvan op die SR is ondersoek.

#### 3.2.1.1 Invloed van $\text{NaN}_3$ op skeletspier SR ATPase-aktiwiteit

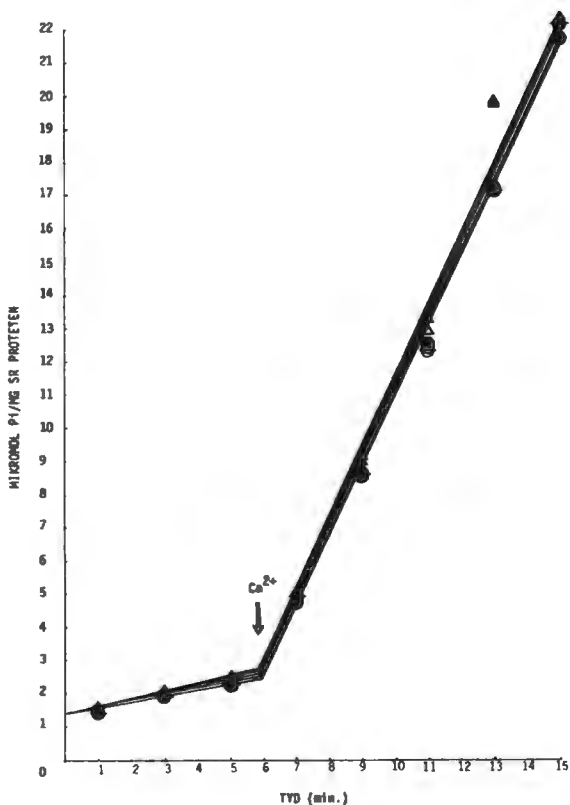
Om vas te stel watter invloed  $\text{NaN}_3$  het op skeletspier SR ATPase is verskillende konsentrasies by die reaksiediums gevoeg (2,5 mM; 5 mM; 7,5 mM en 10 mM). Die teenwoordigheid van  $\text{NaN}_3$  het geen invloed op die ATPase-aktiwiteit nie (Fig. 8). Mitochondria is dus nie verantwoordelik vir enige bydrae tot die ATPase-aktiwiteit nie.

#### 3.2.1.2 Invloed van $\text{NaN}_3$ op skeletspier SR $\text{Ca}^{2+}$ -opname

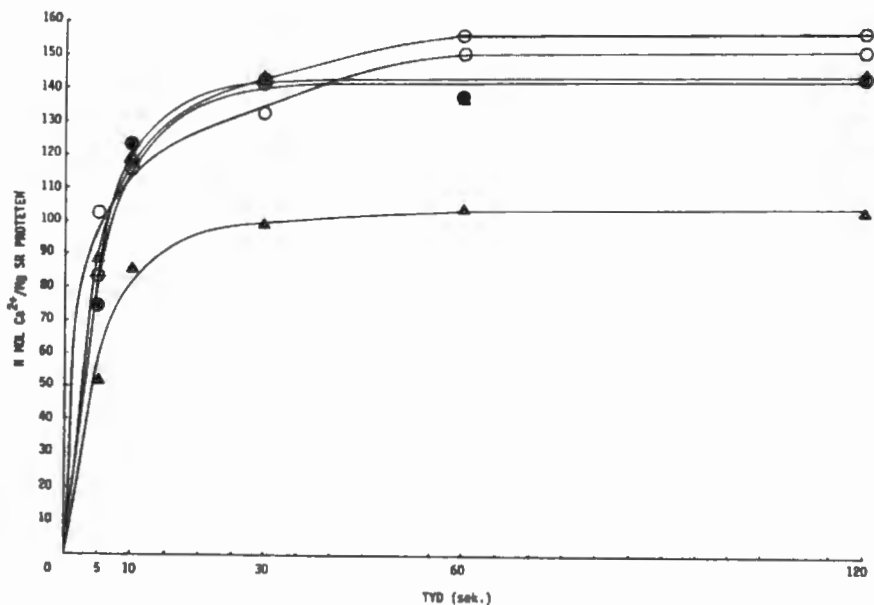
Die volgende  $\text{NaN}_3$ -konsentrasies is by die reaksiedium gevoeg: 2,5 mM; 5 mM; 7,5 mM en 10 mM. Die laer  $\text{NaN}_3$ -konsentrasies het byna geen invloed op die  $\text{Ca}^{2+}$ -opname nie en slegs by 10 mM  $\text{NaN}_3$  is op grond van standaard afwykings 'n beduidende afname (28%) in  $\text{Ca}^{2+}$ -opname gevind (Fig. 9).

#### 3.2.1.3 Invloed van $\text{NaN}_3$ op hartspier SR ATPase-aktiwiteit

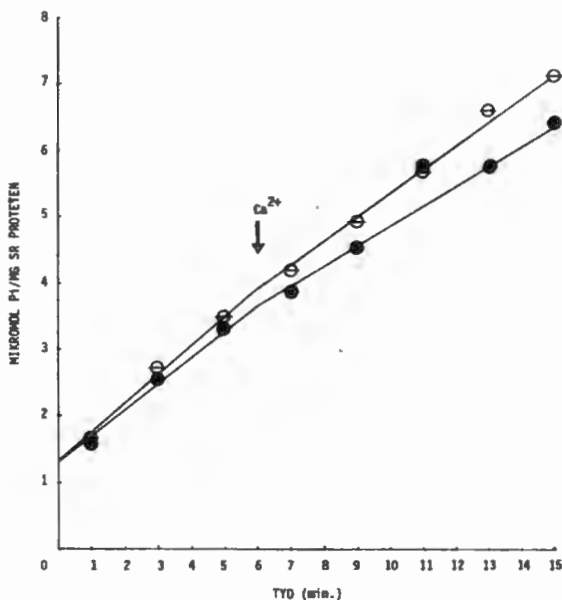
5 mM  $\text{NaN}_3$  is by die reaksiedium gevoeg. Daar is gevind dat geen beduidende verskil in ATPase-aktiwiteit voorkom wanneer 5 mM  $\text{NaN}_3$  by die reaksiedium gevoeg word nie (Fig 10).



**Figuur 8:** Invloed van  $\text{NaCN}_3$  op skeletspier SR ATPase-aktiwiteit. Reaksiemedium: 20 mM MOPS, pH 7,2; 0,4 mM EGTA; 80 mM KCl; 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,1% Triton X-100 en 0,3 mg SR proteïen/ml. Die reaksie is begin met 5 mM ATP en na 6 minute is 0,3 mM  $\text{CaCl}_2$  bygevoeg. Temperatuur  $25^\circ\text{C}$ . Die volgende konsentrasies  $\text{NaCN}_3$  is gebruik: Kontrolle, 0 mM (●); 2,5 mM (○); 5 mM (◐); 7,5 mM (◑) en 10 mM (▲).



Figuur 9: Invloed van  $\text{NaN}_3$  op skeletspier SR  $\text{Ca}^{2+}$ -opname.  
 Reaksiemedium: 20 mM MOPS, pH 7,2; 0,1 mM EGTA;  
 0,1 mM  $^{45}\text{Ca}-\text{CaCl}_2$ ; 120 mM KCl; 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$  en  
 0,2-0,3 mg SR proteïen/ml. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -opname is begin  
 deur die byvoeging van 2,5 mM ATP. Temperatuur  $25^\circ\text{C}$ .  
 Die volgende konsentrasies  $\text{NaN}_3$  is gebruik: Kontrolle,  
 0 mM (●); 2,5 mM (○); 5 mM (◐); 7,5 mM (▲) en  
 10 mM (△).



Figuur 10: Invloed van 5 mM  $\text{NaN}_3$  op hartspier SR ATPase-aktiwiteit. Reaksiemedium: 20 mM MOPS, pH 7,2; 0,1 mM EGTA; 80 mM KCl; 5 mM  $\text{MgCl}_2$  en 0,3 mg SR proteïen/ml. Die reaksie is begin met 5 mM ATP en na 6 minute is 0,1 mM  $\text{CaCl}_2$  bygevoeg. Temperatuur  $37^\circ\text{C}$ . Kontrolle (●) en 5 mM  $\text{NaN}_3$  (○).

#### 3.2.1.4 Invloed van $\text{NaN}_3$ op hartsier SR $\text{Ca}^{2+}$ -opname

Die volgende  $\text{NaN}_3$ -konsentrasies is by die reaksiedium gevoeg: 2,5 mM; 5 mM; 7,5 mM en 10 mM.  $\text{Ca}^{2+}$ -opname is bepaal op tyd 120 sekondes na toevoeging van 2,5 mM ATP. 'n Afname (23%) in  $\text{Ca}^{2+}$ -opname is gevind met 2,5 mM  $\text{NaN}_3$  in die reaksiedium. Met die hoër  $\text{NaN}_3$ -konsentrasies (5 mM; 7,5 mM en 10 mM) is geen verdere afname in  $\text{Ca}^{2+}$ -opname gevind nie (Fig. 11).

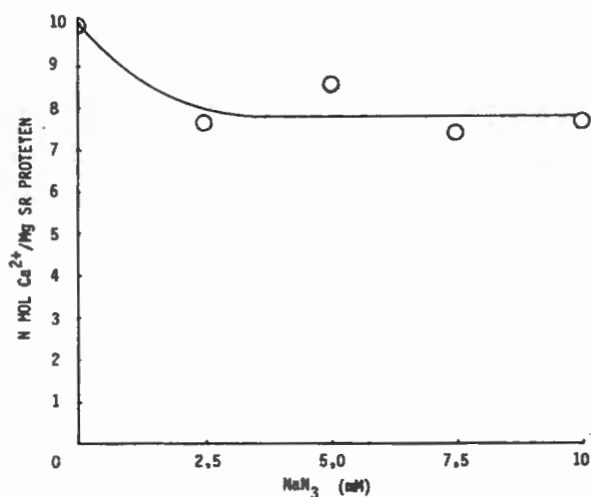
#### 3.2.2 Bekamping van proteolitiese ensiem-aktiwiteit deur PMSF

##### 3.2.2.1 Invloed van PMSF op die proteolitiese ensiem pronase

Farney en Gold (1963) het gevind dat PMSF 'n groot inhiberende invloed op proteolitiese ensieme het. Om hierdie bevindings te staaf is die aktiwiteit van pronase bepaal en die invloed van PMSF daarop vasgestel. Daar is gevind dat die aktiwiteit van pronase sterk geïnhibeer word deur 1 mM PMSF en 'n afname van 85% in pronase-aktiwiteit is gekry (Fig. 12).

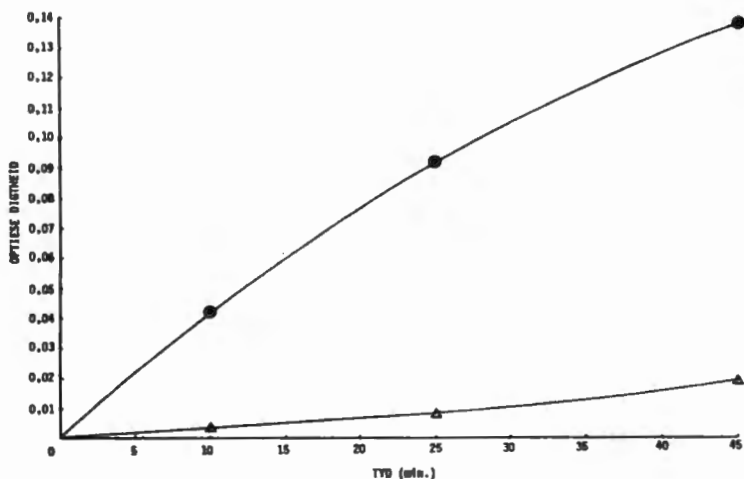
##### 3.2.2.2 Invloed van PMSF op skeletspier SR ATPase-aktiwiteit

PMSF is opgelos in etanol en om die invloed van etanol alleen op die ATPase-aktiwiteit te bepaal, is 'n reeks gedoen met verskillende konsentrasies etanol (0,01-10%). Die etanol het 'n inhiberende invloed op die ATPase-aktiwiteit vanaf 'n etanol-konsentrasie van 0,01%. 'n Geleidelike daling in aktiwiteit word waargeneem met geen skielike afname by die hoogste konsentrasie etanol nie (Fig. 13). In teenwoordigheid van lae konsentrasies PMSF (0,01 mM; 0,1 mM en 1,0 mM opgelos in 0,01; 0,1 en 1%

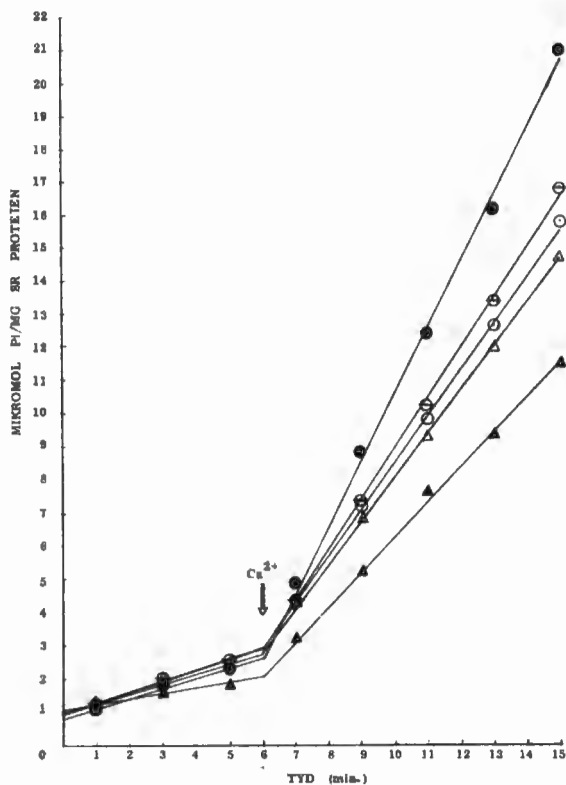


Figuur 11: Invloed van NaN<sub>3</sub> op hartspier SR Ca<sup>2+</sup>-opname.

Reaksiemedium: 20 mM MOPS, pH 7,2; 0,025 mM EGTA; 0,025 mM <sup>45</sup>Ca-CaCl<sub>2</sub>; 120 mM KCl; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> en 0,2-0,3 mg SR proteïen/ml. Die Ca<sup>2+</sup>-opname is begin deur die byvoeging van 2,5 mM ATP. Temperatuur 37°C. Die opnames getoon is verkry 120 sekondes nadat die reaksie begin is.



Figuur 12: Invloed van 1 mM PMSF op proteolitische enzym-activiteit. Pronase-activiteit wordt getoond (●). 'n Kaseïensubstraat is gebruik. Die invloed van 1 mM PMSF op die pronase-activiteit is bepaal deur dit in die reaksie-medium te voeg (Δ). Temperatuur 37°C.



Figuur 13: Invloed van etanol op skeletspier SR ATPase-aktiwiteit. Reaksiemedium: 20 mM MOPS, pH 7; 0,4 mM EGTA; 80 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1% Triton X-100 en 0,3 mg SR proteïen/ml. Die reaksie is begin met 5 mM ATP en na 6 minute is 0,3 mM CaCl<sub>2</sub> bygevoeg. Temperatuur 25°C. Die volgende konsentrasies etanol is gebruik: Kontrolle, 0% (●); 0,01% (○); 0,1% (◐); 1% (△) en 10% (▲).

etanol onderskeidelik) is daar geen duidelike verdere afname in ATPase-aktiwiteit nie (Fig. 14). Die afname verkry met PMSF is baie dieselfde as die afname wat verkry is met etanol. Met 'n hoë konsentrasie PMSF (10 mM opgelos in 10% etanol) is daar egter wel 'n skielike afname wat op grond van standaard afwykings be-  
duidend verskil van die afname in teenwoordigheid van 10% etanol  
alleen. Die beduidende afname is gevind in beide  $Mg^{2+}$ -afhanklike  
ATPase (64%) en in  $Ca^{2+}$ -afhanklike ATPase (33%).

### 3.2.2.3 Invloed van PMSF op hartspier SR $Ca^{2+}$ -opname

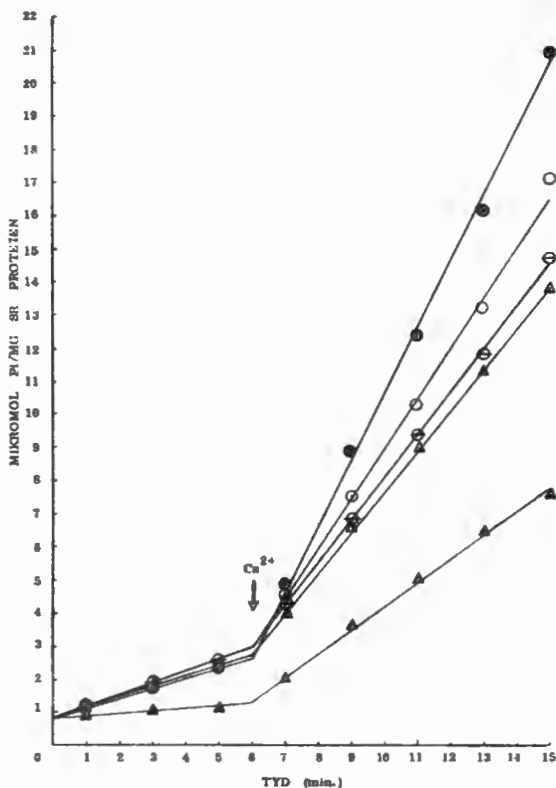
Die volgende finale konsentrasies PMSF is by die reaksiedium  
gevoeg: 0,01 mM; 0,1 mM; 1 mM en 10 mM.  $Ca^{2+}$ -opnames is be-  
paal op tyd 60 en 120 sekondes na toevoeging van 2,5 mM ATP en  
die gemiddelde van dié twee waardes is uitgewerk en aangetoon in  
Fig. 15. Die PMSF het 'n toename (19%) in  $Ca^{2+}$ -opname tot gevolg  
tot by 'n konsentrasie van 1 mM waarna die  $Ca^{2+}$ -opname skerp ge-  
inhibeer word met 'n verdere verhoging in PMSF-konsentrasie. By  
'n PMSF-konsentrasie van 10 mM is geen  $Ca^{2+}$ -opname gevind nie.

### 3.2.3 Bekamping van oksidasie in die SR preparaat deur BHT

Om die oksidasie van die SR preparaat te bekamp is 'n anti-oksi-  
dant BHT by die SR gevoeg. BHT is 'n bekende anti-oksidant wat  
in voedsel gebruik word (Merck Index, 1968). Die invloed van BHT  
op die SR is vasgestel.

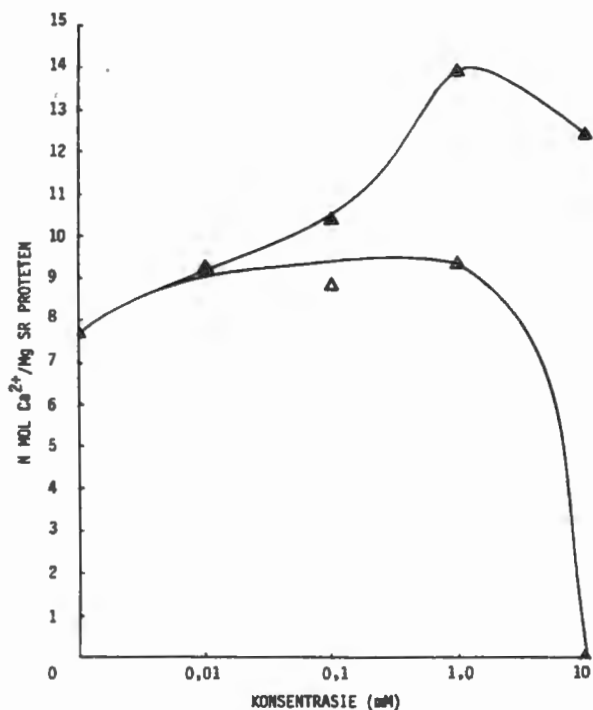
#### 3.2.3.1 Invloed van BHT op skeletspier SR ATPase-aktiwiteit

Die volgende BHT-konsentrasies is by die reaksiediums gevoeg:



Figuur 14: Invloed van PMSF op skeletspier ATPase-aktiwiteit.

Reaksiemedium: 20 mM MOPS, pH 7; 0,4 mM EGTA; 80 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1% Triton X-100 en 0,3 mg SR proteïen/ml. Die reaksie is begin met 5 mM ATP en na 6 minute is 0,3 mM CaCl<sub>2</sub> bygevoeg. Temperatuur 25°C. Die volgende PMSF-konsentrasies is gebruik: Kontrolle, 0 mM (●); 0,01 mM (○); 0,1 mM (◐); 1 mM (◑) en 10 mM (▲).



Figuur 15: Invloed van PMSF en BHT op hartspier  $\text{Ca}^{2+}$ -opname. Reaksiemedium: 20 mM MOPS, pH 7,2; 0,025 mM EGTA; 0,025 mM  $^{45}\text{Ca}-\text{CaCl}_2$ ; 120 mM KCl; 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$  en 0,2-0,3 mg SR proteïen/ml. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -opname is begin deur die byvoeging van 2,5 mM ATP. Temperatuur  $37^\circ\text{C}$ . Die opnames getoon is die gemiddeldes van opnames verkry 60 en 120 sekondes nadat die reaksie begin is. Die invloed van PMSF ( $\Delta$ ) en BHT ( $\blacktriangle$ ) word getoon.

0,001 mM; 0,01 mM en 0,1 mM. Daar is gevind dat BHT-konsentrasies wat gebruik is geen beduidende invloed op die ATPase-aktiwiteit het nie. Dit geld vir beide  $Mg^{2+}$ -afhanklik en  $Ca^{2+}$ -afhanklike ATPase (Fig. 16).

### 3.2.3.2 Invloed van BHT op skeletspier SR $Ca^{2+}$ -opname

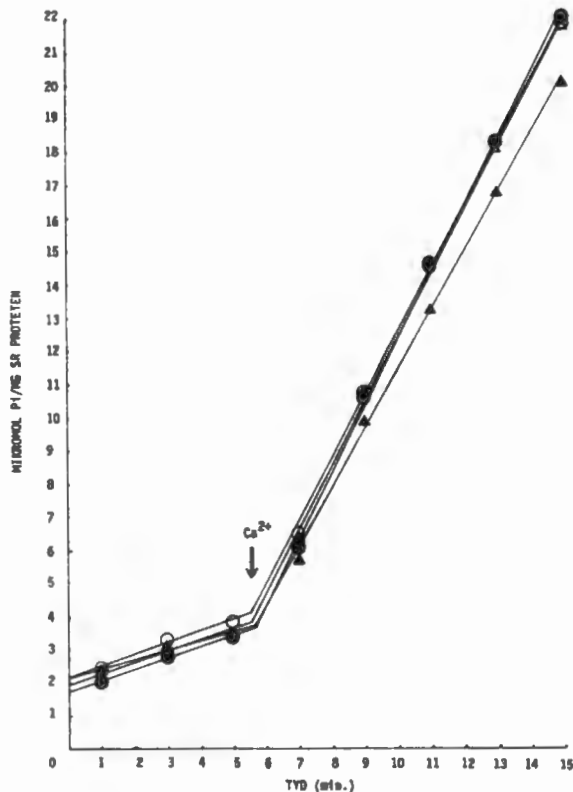
Nadat verskillende BHT-konsentrasies by die reaksiedium gevoeg is (0,001 mM; 0,01 mM en 0,1 mM), is gevind dat hierdie BHT-konsentrasies geen beduidende invloed op  $Ca^{2+}$ -opname het nie (Fig. 17).

### 3.2.3.3 Invloed van BHT op hartspier SR $Ca^{2+}$ -opname

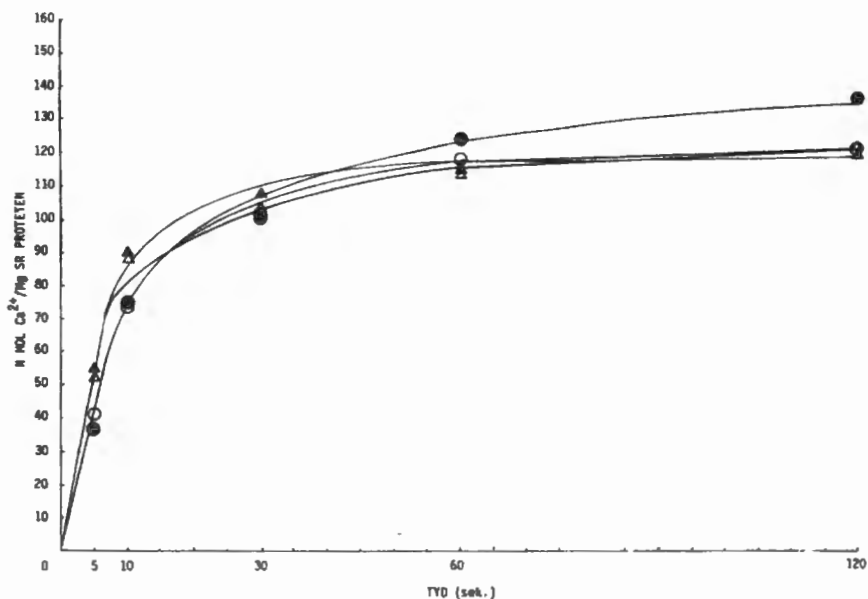
Die volgende BHT-konsentrasies is by die reaksiediums gevoeg: 0,01 mM; 0,1 mM; 1 mM en 10 mM.  $Ca^{2+}$ -opnames is bepaal op tyd 60 en 120 sekondes na die toevoeging van 2,5 mM ATP. Die gemiddelde van dié twee waardes is uitgewerk en aangetoon in Fig. 15. Dit kon gedoen word aangesien hierdie waardes op die plato-fase van die kromme lê. Daar is gevind dat BHT 'n stimulerende invloed op  $Ca^{2+}$ -opname het tot op 'n konsentrasie van 1 mM waar die  $Ca^{2+}$ -opname byna 100% hoër is as die kontrole  $Ca^{2+}$ -opname. Die stimulering is waarskynlik die gevolg van 'n afname in oksidasie wat die aktiwiteit van die SR onderdruk. Met 'n verdere verhoging in die BHT-konsentrasie na 10 mM begin die  $Ca^{2+}$ -opname weer afneem.

### 3.2.4 Invloed van verskillende alkohole op hartspier SR

Aangesien PMSF en BHT onoplosbaar is in  $H_2O$  en dit opgelos moet word in 'n alkohol, is die invloed van verskillende alkohole op hartspier SR bepaal. Die alkohol wat die SR die minste onderdruk



**Figuur 16:** Invloed van BHT op skeletspier SR ATPase-aktiwiteit. ReaksiemEDIUM: 20 mM MOPS, pH 7,2; 0,4 mM EGTA; 80 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1% Triton X-100 en 0,3 mg SR proteïen/ml. Die reaksie is begin met 5 mM ATP en na 6 minute is 0,3 mM CaCl<sub>2</sub> bygevoeg. Temperatuur 25°C. Die volgende konsentrasies BHT is gebruik: Kontrole, 0 mM (●); 0,001 mM (○); 0,01 mM (△) en 0,1 mM (▲).



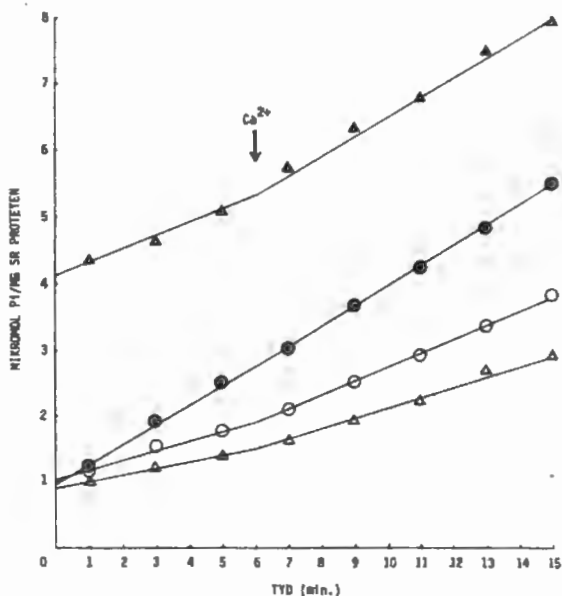
Figuur 17: Invloed van BHT op skeletspier SR  $\text{Ca}^{2+}$ -opname.

Reaksiemedium: 20 mM MOPS, pH 7,2; 0,1 mM EGTA;  
 0,1 mM  $^{45}\text{Ca}-\text{CaCl}_2$ ; 120 mM KCl; 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$  en  
 0,2-0,3 mg SR proteïen/ml. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -opname is begin  
 deur die byvoeging van 2,5 mM ATP. Temperatuur  $25^\circ\text{C}$ .  
 Die volgende konsentrasies BHT is gebruik: Kontrolle,  
 0 mM (●); 0,001 mM (○); 0,01 mM (△) en 0,1 mM (▲).

kan dan as oplosmiddel gebruik word.

#### 3.2.4.1 Invloed van 2,5% merkpto-etanol, 5% etanol en 5% propanol op die hartspier SR ATPase-aktiwiteit

Aangesien die PMSF begin uitsak indien die alkoholkonsentrasie in die reaksiedium te laag daal, moet die hoogste moontlike alkoholkonsentrasie gebruik word sonder om die SR aktiwiteit te veel te inhibeer. Farney en Gold (1963) het 5% propanol gebruik om PMSF in oplossing te hou. 5% Propanol en etanol is dus gebruik om die invloed daarvan op die hartspier SR ATPase-aktiwiteit te bepaal (Fig. 18). Merkpto-etanol word gebruik om ensieme te stabiliseer (Uyeda, 1969) en die invloed daarvan is dus ook bepaal. Daar is vermoed dat merkpto-etanol 'n groter inhiberende invloed op die hartspier SR sal uitoefen as propanol en etanol en 2,5% merkpto-etanol is toe gebruik (Fig. 18). Die vermoede is bevestig deur die resultate wat in Fig. 19 getoon word. Daar is gevind dat op grond van standaard afwykings beduidende verskille bestaan tussen die ATPase-aktiwiteit in teenwoordigheid van die verskillende alkohole. Merkpto-etanol het 'n kleurreaksie tot gevolg tydens die bepaling van die hoeveelheid  $P_i$  gevorm. Dit het tot gevolg dat die hoeveelheid mikromol  $P_i$ /mg SR proteïen oënskynlik baie verhoog. Die  $Ca^{2+}$ -gestimuleerde ATPase-aktiwiteit is egter 0,275 mikromol  $P_i$ /mg SR proteïen/min. wat nog laer is as die 0,3 mikromol  $P_i$ /mg SR proteïen/min. van die kontrole. Daar is ook gevind dat 5% etanol die ATPase-aktiwiteit beduidend inhibeer en die  $Ca^{2+}$ -gestimuleerde ATPase-aktiwiteit is 0,21 mikromol  $P_i$ /mg SR proteïen. Die inhiberende invloed van 5% propanol is beduidend hoër as die inhiberende invloed van 5% etanol en die  $Ca^{2+}$ -gestimuleerde ATPase-aktiwiteit is slegs 0,16 mikromol  $P_i$ /mg



Figuur 18: Invloed van merkapt-*etanol*, *etanol* en *propanol* op hartspleer SR ATPase-aktiwiteit. Reaksiemidum: 20 mM MOPS, pH 7,2; 0,1 mM EGTA; 80 mM KCl; 5 mM  $MgCl_2$ ; 5 mM  $NaN_3$  en 0,3 mg SR proteïen/ml. Die reaksie is begin met 5 mM ATP en na 6 minute is 0,1 mM  $CaCl_2$  bygevoeg. Temperatuur  $37^{\circ}C$ . Die volgende konsentrasies is gebruik: Kontrol, 0 mM (●); 2,5% merkapt-*etanol* (▲); 5% *etanol* (○) en 5% *propanol* (△).

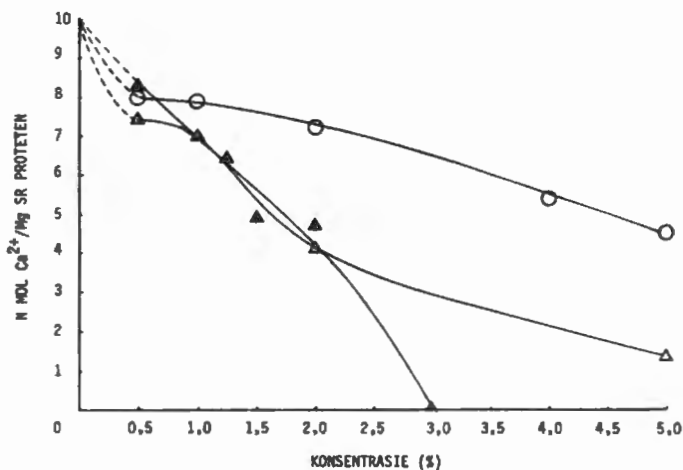
SR proteïen/min.

### 3.2.4.2 Invloed van merkaptto-etanol, etanol en propanol op harts- spier SR $\text{Ca}^{2+}$ -opname

Verskillende konsentrasies merkaptto-etanol, etanol en propanol is by die reaksiediums gevoeg om die invloed daarvan op  $\text{Ca}^{2+}$ -opname te bepaal (Fig. 19). Etanol het die minste inhiberende invloed op die  $\text{Ca}^{2+}$ -opname en by 'n finale etanolkonsentrasie van 5% is die  $\text{Ca}^{2+}$ -opname verminder na slegs 50% van die oorspronklike  $\text{Ca}^{2+}$ -opname van die kontrole. Propanol het aanvanklik 'n groot inhiberende invloed tot op 'n konsentrasie van 2%, waarna die inhiberende invloed stadiger toeneem tot op 5% waar die  $\text{Ca}^{2+}$ -opname ongeveer 10% van die kontrole  $\text{Ca}^{2+}$ -opname is. Die inhiberende invloed van merkaptto-etanol is baie groot en by 'n konsentrasie van 3% is daar reeds geen  $\text{Ca}^{2+}$ -opname meer gevind nie.

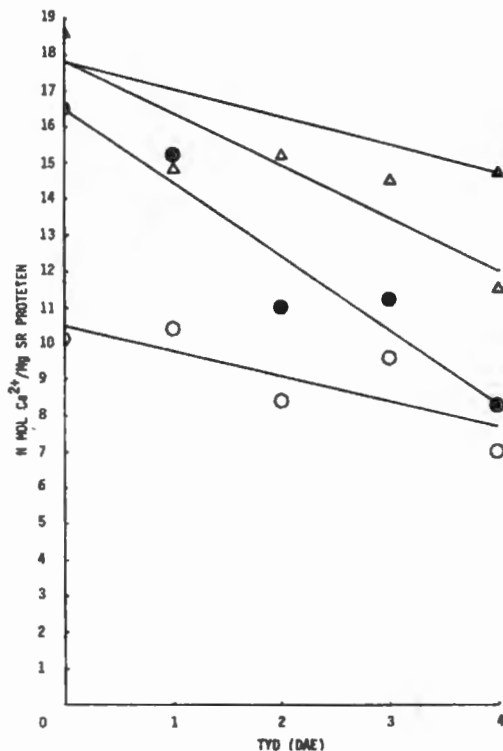
### 3.3 Invloed van 0,01 mM PMSF en 1 mM BHT op die stabiliteit van harts- spier SR

Om die invloed van 1 mM BHT en 0,01 mM PMSF gesamentlik op die harts-  
spier SR  $\text{Ca}^{2+}$ -opname te bepaal is hierdie twee reagense saam by die reaksiedium gevoeg. Direk na die bereiding van die harts-  
spier SR (dag 0) is  $\text{Ca}^{2+}$ -opnames op 60 en 120 sekondes na aanvang van die reaksie bepaal. Die gemiddelde waarde van die twee opnames is bepaal. Op die daaropvolgende 4 dae is die  $\text{Ca}^{2+}$ -opnames herhaal en vergelyk met kontrole  $\text{Ca}^{2+}$ -opnames wat ook bepaal is. Aangesien die 1 mM BHT en 0,01 mM PMSF opgelos is in 2% etanol, is telkens ook kontrole  $\text{Ca}^{2+}$ -opnames gedoen in teenwoordigheid van 2% etanol maar in afwesigheid van BHT en PMSF. Die invloed van



Figuur 19: Invloed van merkpto-etaanol, etanol en propanol op hartspier SR  $\text{Ca}^{2+}$ -opname. ReaksiemEDIUM: 20 mM MOPS, pH 7,2; 0,025 mM EGTA; 0,025 mM  $^{45}\text{Ca}-\text{CaCl}_2$ ; 120 mM KCl; 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$  en 0,2-0,3 mg SR proteïen/ml. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -opname is begin deur die byvoeging van 2,5 mM ATP. Temperatuur  $37^\circ\text{C}$ . Die opnames getoon is verkry 120 sekondes nadat die reaksie begin is. Die invloed van merkpto-etaanol (▲), etanol (O) en propanol (Δ) word getoon.

2% etanol op die stabiliteit van die hartsier SR  $\text{Ca}^{2+}$ -opname kon dus so bepaal word. Verder is op dag 0 'n deel van die hartsier SR van die res van die preparaat geskei. By hierdie deel is finale konsentrasies van 1 mM BHT en 0,01 mM PMSF gevoeg. Daarna is dit deurgeborrel met  $\text{N}_2$ , verseël en by  $2-4^\circ\text{C}$  gestoor. Met hierdie deel van die hartsier SR preparaat is slegs op dag 4 'n  $\text{Ca}^{2+}$ -opname bepaal. Geen verdere BHT en PMSF is by die reaksie-medium gevoeg nie. Fig. 20 toon die resultate wat verkry is met die verskillende reekse wat uitgevoer is. Liniêre regressie-passing is gedoen op elke reeks en die volgende korrelasie koëffisiënte ( $r^2$ ) is vir die passings verkry: Kontrole:  $r^2=0,928$ ; 1 mM BHT en 0,01 mM PMSF by reaksie-medium:  $r^2=0,824$ ; 2% Etanol:  $r^2=0,625$ . Beide die  $r^2$  van die kontrolereeks en die reeks met BHT en PMSF in die reaksie-medium dui daarop dat dit wel reguitlyne is. Op grond van standaardafwykings is gevind dat daar beduidende verskille op dae 2 en 4 bestaan tussen die verskillende reekse. Die kontrolereeks toon dat die hartsier SR  $\text{Ca}^{2+}$ -opname 'n skerp afname oor 4 dae ondervind om dan slegs 50% van die oorspronklike  $\text{Ca}^{2+}$ -opname te toon. Die teenwoordigheid van 1 mM BHT en 0,01 mM PMSF in die reaksie-medium stimuleer die  $\text{Ca}^{2+}$ -opname om 'n 12% hoër opname op dag 0 te gee as die kontrolereeks se opname op dag 0. Na 4 dae is hierdie reeks se  $\text{Ca}^{2+}$ -opname nog 62% van die  $\text{Ca}^{2+}$ -opname wat op dag 0 verkry is. Indien dié reeks se opname op dag 4 vergelyk word met die kontrolereeks se opname op dag 0 is die  $\text{Ca}^{2+}$ -opname steeds 70% van die oorspronklike kontrole opname. Indien die  $\text{Ca}^{2+}$ -opname van die hartsier SR wat gestoor is in teenwoordigheid van BHT en PMSF op dag 4 vergelyk word met die  $\text{Ca}^{2+}$ -opname op dag 0 van die kontrole, is die  $\text{Ca}^{2+}$ -opname steeds 89% van die oorspronklike  $\text{Ca}^{2+}$ -opname.



Figuur 20:

Invloed van 0,01 mM PMSF en 1 mM BHT op die stabiliteit van hartspier SR  $\text{Ca}^{2+}$ -opname. Reaksiemedium: 20 mM MOPS, pH 7,2; 0,025 mM EGTA; 0,025 mM  $^{45}\text{Ca}-\text{CaCl}_2$ ; 120 mM KCl; 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$  en 0,2-0,3 mg SR proteïen/ml. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -opname is begin deur 2,5 mM ATP by te voeg. Temperatuur  $37^\circ\text{C}$ . Die  $\text{Ca}^{2+}$ -opnames getoon is die gemiddeldes van opnames verkry 60 en 120 sekondes nadat die reaksie begin is. Die invloed van 2% etanol (○); 0,01 mM PMSF en 1 mM BHT (Δ) is bepaal deur die chemikalieë by die reaksiemediums te voeg. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -opname van hartspeer SR wat in teenwoordigheid van 0,01 mM PMSF en 1 mM BHT gestoor is vir 4 dae word getoon (▲). 'n Reeks kontrole  $\text{Ca}^{2+}$ -opnames word ook getoon (●). Liniêre regressiepassings is gedoen op elke reeks.

## HOOFSTUK 4

### BESPREKING

Die meeste aanvanklike navorsing op die gebied van SR is gedoen op skeletspier SR en is daar weggeskram van hartspier SR. Die rede hiervoor is die groot probleme wat daar ondervind word met hartspier SR preparate (Carsten, 1964). Na jare se navorsing op skeletspier SR is baie reeds bekend oor skeletspier SR. Die metodes en tegnieke is gestandaardiseer op skeletspier SR en die neiging is dat daar al hoe meer navorsing gedoen word op die hartspier SR om die funksionele en strukturele verskille en ooreenkomste tussen die SR van skelet- en hartspier vas te stel. Die groot struikelblok in die weg van die navorsing oor hartspier SR is egter die onsuiverheid en onstabiliteit van die hartspier SR preparaat. Dit het dus 'n prioriteit geword om 'n suiwer en stabiele SR preparaat te kry. Die belangrikheid van hierdie probleem word weerspieël in die hoeveelheid publikasies wat in die literatuur verskyn oor hierdie aspek (Katz et al, 1970; Solaro & Briggs, 1974; Lighty & Bertrand, 1979). Die algemene bevinding is dat hartspier SR preparate baie onstabiel is as skeletspier SR preparate en dat die  $\text{Ca}^{2+}$ -opnamevermoë binne 1-4 dae na bereiding met 50% afneem (Carsten, 1964; Scales & McIntosh, 1968; Pretorius et al, 1969; Lighty & Bertrand, 1979). Aangesien die hartspier SR se aktiwiteit baie laer is as die aktiwiteit van skeletspier SR (Carsten, 1964), is 'n verdere daling in aktiwiteit as gevolg van onstabiliteit baie nadeliger by hartspier SR as by skeletspier SR. Dit is dus belangrik om vas te stel wat die oorsaak van die onstabiliteit van hartspier SR is en hierdie oorsaak uit te skakel om 'n stabiele hartspier SR preparaat te kry. Onsuiverheid van die SR preparate word veroorsaak deur mitochondrië

ale kontaminasie, lisosome en ander ensieme wat in die hartspier SR preparate voorkom (Katz & Repke, 1967; Fuchs et al, 1968; Pretorius et al, 1969; Katz et al, 1970). In 'n poging om die probleme van onsuiverheid en onstabiliteit te oorkom is verskeie bereidingsmetodes en wysigings van metodes in die literatuur beskryf. In hierdie projek is daar enkele bereidingsmetodes ge-evalueer om die metode te vind wat die suiwerste en aktiefste SR preparaat lewer.

#### 4.1 Bereidingsmetodes van SR preparate

##### 4.1.1 Verskille tussen die bereidingsmetodes van skeletspier SR en hartspier SR

Daar is baie meer mitochondria in hartspier as in skeletspier (Bloom & Fawcett, 1968). Hoe langer die homogenisering van die spierweefsel duur hoe meer mitochondria word in die SR preparaat gevind (Katz et al, 1970; Lighty & Bertrand, 1979). Daarom is die homogenisering tydens die bereiding van hartspier SR nie langer as 45 sekondes nie; terwyl dit by isolering van skeletspier SR 180 sekondes is. Dit is moontlik dat die hartspier SR vesikels na die kort homogenisering groter is as die skeletspier SR vesikels. Dit sal moeiliker wees om die swaar SR vesikels van die mitochondria te skei en dit kan lei tot kontaminering.

Tydens die homogenisering van die spier moet 'n hoër konsentrasie buffer by die hartspier gevoeg word (40 mM MOPS) as by die skeletspier (10 mM MOPS) omdat die pH tydens homogenisering baie meer verander by die hartspier. 'n Moontlike verklaring is dat daar meer vrye vetsure in die hartspier vrygestel word. Currie et al (1978) vind 'n baie hoër vrye vetsuur-konsentrasie in die SR pre-

paraat direk na bereiding en beweer dat dit moontlik is as gevolg van lipiedhidrolise tydens die bereidingsproses. Volgens Masoro en Yu (1970) is vrye vetsure kragtige inhibeerders van die  $\text{Ca}^{2+}$ -transportsisteen en kan albumien by die preparaat gevoeg word sodat albumien dan aan die vrye vetsure bind. Hierdie tegniek lewer egter verskeie eksperimentele probleme en is nie tydens hierdie projek gebruik nie.

Tydens die bereiding van hartspier SR word die preparaat nie gekubeer in 'n hoë konsentrasie KCl om die kontraktiele elemente op te los nie. Daar bestaan dus 'n moontlikheid dat van die kontraktiele elemente die preparaat kan kontamineer. Daar is gevind dat skeletspier SR 'n  $\text{Ca}^{2+}$ -opname van ongeveer 140 nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg SR proteïen lewer (Fig. 9) en hartspier SR 'n opname van slegs ongeveer 10-26 nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg SR proteïen (Fig. 4). Hierdie verskil word bevestig deur die literatuur (Lee et al, 1966). 'n Moontlike verklaring vir die verskil is kontaminasie. Elektroforese van skeletspier SR het getoon dat die SR preparaat bestaan uit 83% ATPase in vergelyking met die 31,4% van hartspier SR (par. 3.1.6). Daar is dus minder ATPase en meer kontaminerende proteïen in die hartspier SR preparaat (Fig. 6). Die SR proteïen wat by die reaksie-medium gevoeg word (0,2 - 0,3 mg SR proteïen/ml) bevat dus minder ATPase. As gevolg van die relatief minder ATPase in die reaksie-medium sal die hartspier SR aktiwiteit dus laer wees. By die skeletspier SR elektroforesepatroon is die  $M_{45}$ - en  $M_{55}$ - proteïene duidelik onderskeibaar, maar nie by die hartspier SR elektroforesepatroon nie (Fig. 6).

Nog 'n moontlikheid is dat in die SR membraan van die hartspier daar meer ander proteïene voorkom as wat die geval is met skeletspier SR en daarom vertoon dit meer proteïene tydens elektroforese

(Fig. 6). Shigekawa et al (1976) het gevind dat daar in hartspier SR minder  $\text{Ca}^{2+}$ -transportsetels is as in skeletspier SR en daar kan dus meer van ander proteïne in die membraan van hartspier SR teenwoordig wees.

Skeletspier SR is baie stabiel as die SR van hartspier. Daar is gevind dat die hartspier SR se  $\text{Ca}^{2+}$ -opnamevermoë binne 1-3,5 dae na bereiding met 50% afneem (Carsten, 1964; Pretorius et al, 1969). Hierdie afname is tydens hierdie studie ook gevind (Fig. 20). 'n Moontlike verklaring is dat die aktiewe sentrums van hartspier SR ATPase nader aan die buite oppervlak van die SR membraan geleë is en dus meer vatbaar is vir proteolitiese ensieme en oksidasie. Repke en Katz (1972) het gevind dat die  $\text{Ca}^{2+}$ -bindingsplekke op die hartspier SR membraan verminder tydens veroudering. Die onstabiliteit van hartspier SR word ook moontlik veroorsaak deur die beskadiging van hierdie bindingsplekke deur proteolitiese ensieme en oksidasie.

'n Moontlike fisiologiese verklaring van die lae aktiwiteit van hartspier SR is die feit dat hartspier relatief stadig en ritmies saamtrek, in teenstelling met die baie vinniger skeletspier kontraksies. Die hartspier SR hoef dus nie so 'n hoë aktiwiteit te lewer nie (Carsten, 1964).

#### 4.1.2 Bereidingsmetode van Eletr en Inesi om hartspier SR te isoleer

Die medium waarin die hartspier gehomogeniseer word bestaan uit 40 mM MOPS en 10% sukrose. Die voordeel van die sukrose is dat dit 'n stabiliserende invloed het op die SR (Pretorius et al,

1969; Inesi, 1972). Die nadeel van die sukrose medium is egter dat dit die sentrifugeringstyd wat nodig is om die SR te isoleer, verleng. Die 40 mM MOPS is baie effektief as buffer en die pH van die medium verander slegs van 7,2 na 7,1 tydens homogenisering. 'n Suiwer SR preparaat word verseker deur die gebruik van slegs die middelste deel van die supernatant vir die laaste 90 minute sentrifugering (Diagram 1). Sodoende word die lae digtheid lipiede en swaar kontaminerende deeltjies (mitochondria) geëlimineer. Daar gaan egter wel SR verlore saam met die dele van die supernatant wat nie gebruik word nie. Dit is duidelik as daar gekyk word na die hoë ATPase-aktiwiteit van fraksie 3 (Tabel 1). Die metode van Eletr en Inesi lewer nogtans 'n groot hoeveelheid SR. Die metode neem egter baie lank om die SR te isoleer n 375 minute.

#### 4.1.3 Bereidingsmetode van Harigaya en Schwartz om hartspier SR te isoleer

Die medium waarin die hartspier gehomogeniseer word bestaan uit 0,1 M  $\text{NaHCO}_3$ . Hierdie medium verskaf probleme deur pH wat oornag van 7,2 na 7,6 verander. Geen sukrose is in die medium teenwoordig om te help met die stabilisering van die hartspier nie. Die 0,1 M  $\text{NaHCO}_3$  verkort egter die sentrifugeringstyd wat nodig is om die SR te isoleer en die totale bereidingstyd is slegs 215 minute. Die gevaar bestaan egter dat die SR as gevolg van die  $\text{NaHCO}_3$  medium kan deurswaai en saam met die sediment weggegooi kan word. Die metode lewer dan ook minder SR as die metode van Eletr en Inesi.

#### 4.1.4 Bereidingsmetode van Lighty en Bertrand om hartspller SR te isoleer

Die medium waarin die hartspller gehomogeniseer word bestaan uit 10% sukrose en 40 mM Histidien-Tris. Die 10% sukrose kan bydra tot die stabiliteit van die SR maar die Tris is nie so 'n effektiwede buffer as MOPS nie want die pH verander tydens homogenisering van 7 na 6,8. Tris se  $pK_a$  waarde is 8,3 by  $20^{\circ}\text{C}$  terwyl dit vir MOPS 7,2 by  $20^{\circ}\text{C}$  is (Merck Index, 1968). MOPS kan dus beter funksioneer by die pH waarby daar gewerk word nl 7,2. Die handhawing van 'n neutrale pH is baie belangrik (Pretorius et al, 1969). Die totale bereidingstyd is 235 minute wat 'n voordeel is van die hoë snelheid sentrifugering. Die gradiënt sentrifugering wat laastens uitgevoer word kan moontlik 'n goeie suiwer SR preparaat lewer maar die SR wat versamel word het 'n baie lae proteïenkonsentrasie en die hoeveelheid eksperimente wat daarmee uitgevoer kan word, word beperk.

#### 4.1.5 ATPase-aktiwiteit van hartspller SR berei volgens die verskillende metodes

##### 4.1.5.1 ATPase-aktiwiteit van hartspller SR berei volgens die metode van Eletr en Inesi

Uit Fig. 1 en Tabel 1 is dit duidelik dat fraksie 5 (SR) die hoogste  $\text{Ca}^{2+}$ -opname en ATPase-aktiwiteit vertoon. Dit is ook opmerklik dat fraksie 3 'n hoë  $\text{Ca}^{2+}$ -afhanklike ATPase-aktiwiteit vertoon en dus heelwat SR besit. Die elektroforesepatrone van die verskillende fraksies toon egter dat fraksie 5 uit 31,4% ATPase bestaan en die ander fraksies gesamentlik bevat slegs 10,9%

ATPase (Kyk par. 3.1.5). Daar kan dus aangeneem word dat die hartspier SR preparaat wat geïsoleer is relatief suiwer is en dat min SR verlore gaan in die ander fraksies.

#### 4.1.5.2 ATPase-aktiwiteit van hartspier SR berei volgens die metode van Harigaya en Schwartz

Fig. 2 en Tabel 1 toon dat fraksie 5 (SR) berei met Harigaya en Schwartz se metode 'n beduidende hoër ATPase-aktiwiteit en  $\text{Ca}^{2+}$ -opname besit as die ander fraksies. Die ATPase-aktiwiteit wat verkry is met dié SR, is egter 40% laer as die ATPase-aktiwiteit wat verkry is met die SR berei volgens Eletr en Inesi se metode. Elektroforese van die fraksies toon dat fraksie 5 14,8% ATPase besit teenoor die 8,8% ATPase in die ander fraksies gesamentlik (Kyk par. 3.1.5). Ook hierdie bereidingsmetode lewer 'n relatief suiwer SR preparaat met min SR in die ander fraksies.

#### 4.1.5.3 ATPase-aktiwiteit van hartspier SR berei volgens die metode van Lighty en Bertrand

Fig. 3 en Tabel 1 toon dat fraksie 5 (SR) en fraksie 8 dieselfde ATPase-aktiwiteit besit nl 0,18 mikromol Pi/mg proteïen/min. Die moontlikheid bestaan dus dat die swaar SR vesikels tydens die finale gradiënt sentrifugering deurswaai en in die sediment versamel. Die ATPase-aktiwiteit van die SR is egter byna 50% minder as die ATPase-aktiwiteit van die SR berei met die metode van Eletr en Inesi. Elektroforese van die fraksies toon dat slegs 11,8% van die SR preparaat ATPase is en die ander fraksies besit gesamentlik 22,6% ATPase (Kyk par. 3.1.5). Dit blyk dus dat baie SR verlore gaan tydens die bereiding van die SR preparaat.

#### 4.1.6 $\text{Ca}^{2+}$ -opname van hartspier SR berei volgens die verskillende metodes

Fig. 4 toon dat die SR berei met Eletr en Inesi se metode 'n beduidende hoër  $\text{Ca}^{2+}$ -opname lewer as die SR berei met die ander twee metodes. Die metode van Eletr en Inesi lewer dus 'n aktiewer SR as die ander twee metodes. 'n Moontlike verklaring vir die laer aktiwiteit van die SR van die ander twee metodes is dat as gevolg van die teenwoordigheid van meer kontaminerende proteïene, die 0,2-0,3 mg SR proteïen/ml wat in die reaksie-medium gevoeg word minder SR besit.

#### 4.1.7 Elektroforesepatrone van die verskillende SR preparate

Dit is duidelik dat die SR gelewer deur die metode van Eletr en Inesi die suiwerste SR preparaat is. Die verhouding van ATPase tot ander proteïene in die SR preparaat toon dat die SR preparaat van Eletr en Inesi 112% meer ATPase besit as die preparaat van Harigaya en Schwartz, en 166% meer as die preparaat van Lighty en Bertrand (par. 3.1.5). Dit kan moontlik verklaar waarom die SR aktiwiteit van die laasgenoemde twee metodes so laag is. Indien die  $\text{Ca}^{2+}$ -opname van die SR berei volgens die metode van Harigaya en Schwartz met hierdie 112% verhoog word, gee dit 27,6 nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg proteïen wat baie na aan die 26,8 nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg proteïen van die SR berei volgens die metode van Eletr en Inesi is. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -opname van Lighty en Bertrand gee 24,2 nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg proteïen wanneer dit met 166% verhoog word. Dié waarde is ook naby die 26,8 nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg proteïen van die SR berei met die metode van Eletr en Inesi. Dit blyk dus asof die oorsaak van die lae  $\text{Ca}^{2+}$ -opname en ATPase-aktiwiteit van die SR wat met die metode van Harigaya en Schwartz en ook met die metode van Lighty en Bertrand verkry word,

kontaminasie deur ander proteïne is.

#### 4.1.8 Keuse van bereidingsmetode om hartspier SR te isoleer

Tabel 1, p. 47 toon dat die SR wat met die metode van Eletr en Inesi berei is 'n hoër aktiwiteit vertoon, wat  $\text{Ca}^{2+}$ -opname en ATPase-aktiwiteit betref, as die ander twee bereidingsmetodes. Elektroforese van die hartspier SR het ook getoon dat die SR preparaat soos verkry met die metode van Eletr en Inesi die suiwerste is (par. 3.1.5).

Die bereidingsmetode van Eletr en Inesi is die langste van die drie metodes maar op grond van suiwerheid en aktiwiteit is daar besluit op hierdie metode. Wanneer die elektroforesepatroon van die SR wat met hierdie metode gelewer word vergelyk word met die elektroforesepatroon van mitochondria (Fig. 7) kan gesien word dat daar wel ooreenkomste bestaan maar ook groot verskille. Hieruit kan afgelei word dat daar wel 'n mate van kontaminasie, veroorsaak deur mitochondria, in die SR preparaat bestaan. Nog 'n moontlikheid is dat daar komponente van die mitochondria en hartspier SR membrane is wat dieselfde beweeglikheid tydens elektroforese vertoon. Die moontlikheid van kontaminasie in die mitochondria=preparaat, veroorsaak deur SR, kan ook nie uitgesluit word nie. Met hierdie SR preparaat is daar voortgegaan in 'n poging om die probleem van onstabiliteit te oorkom.

#### 4.2 Bekamping van kontaminasie in die hartspier SR preparaat deur mitochondria en ander chemiese faktore

##### 4.2.1 Bekamping van mitochondriale-aktiwiteit deur $\text{NaN}_3$

As gevolg van die ooreenkomste wat daar gevind is tussen die elektroforesepatrone van die hartspier SR en mitochondria (Fig. 7), is besluit om vas te stel watter bydrae mitochondriale ATPase en  $\text{Ca}^{2+}$ -opname lewer tot die aktiwiteit wat gekry is met die SR. As gevolg van die suiwerheid en stabiliteit van die skeletspier SR preparaat is die effek van  $\text{NaN}_3$  eers op die skeletspier SR getoets.

Uit Figuur 9 kan afgelei word dat die  $\text{NaN}_3$  by alle konsentrasies (2,5 mM–7,5 mM) geen invloed op die skeletspier SR  $\text{Ca}^{2+}$ -opname uitoefen nie. By 5 mM  $\text{NaN}_3$  wat algemeen in die literatuur gebruik word om mitochondriale-aktiwiteit te onderdruk (Entman et al, 1973), is dus geen invloed op die skeletspier SR  $\text{Ca}^{2+}$ -opname gevind nie. Dieselfde afleiding kan ook gemaak word oor die invloed van  $\text{NaN}_3$  op die skeletspier SR ATPase (Fig. 8). Die  $\text{NaN}_3$  self het dus geen invloed op die skeletspier SR nie en kan dus by die hartspier SR gevoeg word om vas te stel of daar enige mitochondriale-aktiwiteit is. Uit die resultate is dit duidelik dat die 5 mM  $\text{NaN}_3$  geen invloed op die hartspier SR ATPase het nie (Fig. 10). Op die hartspier  $\text{Ca}^{2+}$ -opname is daar slegs 'n geringe afname gevind in teenwoordigheid van  $\text{NaN}_3$  wat nie beduidend is nie. Dit wil dus voorkom asof die probleem van kontaminasie wat bestaan by hartspier SR (Katz et al, 1970) grootliks oorkom is en dat 'n hartspier SR preparaat verkry is wat relatief suiwer is van funksionele kontaminerende mitochondria-reste.

#### 4.2.2 Bekamping van proteolitiese ensiem-aktiwiteit deur PMSF

Katz et al (1970) het gevind dat in die hartspier SR preparaat lisosome voorkom en dat daar aanduidings is van proteolitiese ensieme wat van die lisosome afkomstig is. Die moontlikheid bestaan dat hierdie proteolitiese ensieme verantwoordelik kan wees

vir die onstabiliteit en vinnige verval van hartspier SR. Om hierdie proteolitiese ensieme te bekamp is daar op PMSF (feniel=metielsulfonielfluoried) besluit. Volgens Farney en Gold (1963) het PMSF 'n inhiberende invloed op proteolitiese ensieme. Fig. 12 toon dat 1 mM PMSF 'n afname van 85% in proteolitiese ensiem-aktiwiteit tot gevolg het indien dit by die reaksie-medium gevoeg word. PMSF sou dus effektief die proteolitiese ensiem-aktiwiteit kon onderdruk. Die groot nadeel van PMSF is die feit dat dit onoplosbaar is in water en opgelos moet word in 'n alkohol. Die invloed van PMSF en die etanol waarin dit opgelos is op die SR, is eers op die stabiele en betroubare skeletspier SR getoets. Uit die resultate (Fig. 13 en 14) blyk dit dat, alhoewel die etanol 'n beduidende inhiberende invloed op die skeletspier SR het, die PMSF wat in die etanol opgelos is geen addisionele invloed by lae konsentrasies (0,01-1 mM) uitoefen nie. Die invloed van PMSF op die  $\text{Ca}^{2+}$ -opname van hartspier SR (Fig. 15) is dat 'n toename (19%) in  $\text{Ca}^{2+}$ -opname tot by 'n PMSF-konsentrasie van 1 mM ondervind word. By 'n hoër konsentrasie PMSF as 1 mM tree die inhiberende effek wat by die skeletspier SR ATPase waargeneem is, vinnig in. Dus moet laer konsentrasies as 1 mM PMSF gebruik word. Uit die resultate (Fig. 15) is daar aanduidings dat die teenwoordigheid van PMSF in die reaksie-medium 'n heilsame effek op die hartspier SR het, wat ook die inhiberende effek van die etanol ophef.

#### 4.2.3 Bekamping van oksidasie in die SR preparaat deur BHT

Die moontlikheid bestaan dat die oksidasie van die hartspier SR 'n bydrae lewer tot die onstabiliteit van die hartspier. Om hierdie oksidasie proses te bekamp kan 'n anti-oksident by die reaksie-medium gevoeg word. BHT is 'n bekende anti-oksident wat in voed=

sel gebruik word as preserveermiddel (Merck Index, 1968). BHT is onoplosbaar in water en moet dus ook soos PMSF in 'n alkohol opgelos word. Die invloed van BHT op SR is weereens eerstens op die stabielerskeletspier SR getoets alvorens dit op hartspier getoets is. Uit Figure 16 en 17 is dit duidelik dat die BHT geen invloed op die ATPase-aktiwiteit en  $\text{Ca}^{2+}$ -opname van die skeletspier SR uitoefen nie. Die inhiberende effek van die etanol word heeltemal uitgekanselleer deur die voordelige invloed van BHT. In teenwoordigheid van BHT is daar 'n toename in die  $\text{Ca}^{2+}$ -opname van hartspier SR gevind (Fig. 15). Die hoogste  $\text{Ca}^{2+}$ -opname word met 1 mM BHT in die reaksiedium verkry waar die  $\text{Ca}^{2+}$ -opname byna 100% hoër is as die kontrole  $\text{Ca}^{2+}$ -opname waar geen BHT bygevoeg is nie. 1 mM BHT is dan gebruik tydens verdere eksperimente wat uitgevoer is. Uit hierdie resultate wat met BHT verkry is blyk dit dus dat oksidasie die grootste bydrae lewer tot die onstabiliiteit van die hartspier SR en ook tot die lae aktiwiteit wat selfs direk na bereiding ondervind word. Hierdie oksidasie vind dus waarskynlik nie net oor 'n lang tydperk plaas nie, maar ook sodra die hartspier SR in die reaksiedium gevoeg word en verhit word tot  $37^{\circ}\text{C}$ . Die tydperk van inkubasie is dus krities, aangesien oksidasie ook tydens die verhitting van die reaksiedium groot skade aanrig. Deur oksidasie te onderdruk kan die hartspier SR aktiwiteit met byna 100% verhoog word, terwyl die onderdrukking van proteolitiese ensieme 'n 19% verhoging in aktiwiteit gee. Oksidasie speel dus 'n baie groter rol as proteolitiese ensieme.

#### 4.2.4 Invloed van verskillende alkohole op hartspier SR

Beide PMSF en BHT is onoplosbaar in water en moet in 'n alkohol opgelos word. Daar is gevind dat alkohol 'n inhiberende invloed

op die SR uitoeven (Fig. 13). Die alkohol met die minste invloed op die hartsier SR moet dus gebruik word. PMSF begin uitsak indien die finale alkoholkonsentrasie in verhouding tot die PMSF-konsentrasie te laag daal en die hoogste moontlike alkoholkonsentrasie moet dus gebruik word sonder om die SR aktiwiteit te veel te inhibeer. Farney en Gold (1963) het 5% alkohol as finale konsentrasie gebruik om die PMSF in oplossing te hou. Daar moes dus vasgestel word wat die hoogste konsentrasie alkohol is wat 'n beperkte inhiberende invloed op SR aktiwiteit uitoeven. Die volgende alkohole is getoets; etanol, propanol en merkpto-etanol. Etanol is reeds tydens die uitvoer van vorige eksperimente gebruik en Farney en Gold (1963) het 5% propanol gebruik om die PMSF in op te los. Merkpto-etanol word algemeen gebruik om ensieme te stabiliseer (Uyeda, 1969).

Uit Figuur 18 is dit duidelik dat 2,5% merkpto-etanol die hartsier ATPase die minste inhibeer. 5% Etanol inhibeer die ATPase-aktiwiteit beduidend en 5% propanol het nog 'n groter inhiberende invloed. Wat die invloed van die alkohole op die hartsier SR ATPase-aktiwiteit betref wil dit voorkom asof merkpto-etanol die geskikste van die drie alkohole is. Indien daar egter na die effek van die alkohole op die  $\text{Ca}^{2+}$ -opname gekyk word, blyk dit dat etanol die minste inhiberende effek uitoeven en dat merkpto-etanol die grootste inhiberende invloed op die hartsier SR  $\text{Ca}^{2+}$ -opname het. Op grond hiervan is daar dus op etanol besluit en wel op 'n finale konsentrasie van 2% etanol. Die 2% etanol is die hoogste konsentrasie waarby die inhiberende invloed van etanol nog beperk is.

Dit is opmerklik dat merkpto-etanol 'n veel groter inhiberende

invloed op  $\text{Ca}^{2+}$ -opname uitoefen as op die ATPase-aktiwiteit. Dit is ook in 'n mindere mate by etanol en propanol gevind. 'n Moontlike verklaring hiervoor is dat die alkohole optree soos detergente deur die ATPase te ontkoppel van die  $\text{Ca}^{2+}$ -opname. Die SR vesikels se membrane word gedeeltelik opgelos en die ATPase molekule se funksionering bly normaal, maar as gevolg van beskadigde membrane kan die  $\text{Ca}^{2+}$  nie in die vesikel gestoor word nie. Om te verhoed dat die PMSF nie begin uitsak by 'n finale etanol-konsentrasie van 2% nie is besluit om slegs 0,01 mM PMSF te gebruik in verdere eksperimente.

#### 4.3 Invloed van 0,01 mM PMSF en 1 mM BHT op die stabiliteit van hartspier SR

Die aanvanklike werk oor die invloed van PMSF en BHT op die SR van skelet- en hartspier is afgehandel en het getoon dat by finale konsentrasies van 0,01 mM PMSF en 1 mM BHT opgelos in etanol, daar 'n verbetering in die hartspier SR aktiwiteit is. Om vas te stel of die PMSF en BHT die stabiliteit van die hartspier SR verbeter is die twee reagense saam in die reaksie-medium gevoeg. In paragraaf 3.3 word die resultate wat verkry is beskryf. Daar is 4 reekse uitgevoer om die afname in aktiwiteit van die SR preparaat oor 4 dae te bepaal. Die eerste reeks is 'n kontrole-reeks wat die afname in aktiwiteit van die hartspier SR preparaat toon. Die tweede reeks is gedoen met 2% etanol in die reaksie-medium om die invloed daarvan op die stabiliteit van die SR preparaat vas te stel. Dit is gedoen aangesien die 0,01 mM PMSF en 1 mM BHT in 2% etanol opgelos is. Die derde reeks is gedoen om die invloed van 0,01 mM PMSF en 1 mM BHT op die stabiliteit van die hartspier SR te bepaal deur die reagense saam in die reaksie-

medium te voeg. Die vierde reeks is gedoen met hartsier SR wat vir 4 dae gestoor is in teenwoordigheid van 0,01 mM PMSF en 1 mM BHT. Op dag 4 is 'n  $\text{Ca}^{2+}$ -opname met hierdie SR gedoen sonder om nog PMSF en BHT by die reaksie-medium te voeg.

Die kontroiereeks se  $\text{Ca}^{2+}$ -opname het oor 4 dae gedaal tot net 50% van die oorspronklike  $\text{Ca}^{2+}$ -opname wat direk na bereiding verkry is. (Fig. 20). Die kontroiereeks toon dus die verwagte onstabiliteit soos wat dit ook in die literatuur beskryf is (Carsten, 1964; Scales & McIntosh, 1968; Pretorius et al, 1969; Lighty en Bertrand, 1979). Die reeks gedoen met 2% etanol in die reaksie-medium sonder PMSF en BHT toon 'n inhibering op dag 0 (direk na bereiding) van ongeveer 36%. Op dag 2 is die inhiberende effek van die 2% etanol slegs 24,5% en op dag 4 ongeveer 15,7%. Die inhiberende effek van 2% etanol verminder dus soos die SR prepraat verouder en die aktiwiteit van die kontrole hartsier SR met tyd afneem. Die moontlikheid bestaan dus dat die skade wat deur die 2% etanol veroorsaak word dieselfde is as wat veroudering tot gevolg het. Die 2% etanol kan dus moontlik dieselfde dele van die SR vesikel beskadig as wat oksidasie en proteolitiese ensieme vernietig. Hierdie dele wat beskadig word is moontlik die meer oppervlakkige aktiewe setels van die ATPase molekules wat die hartsier SR moontlik kan besit. Daar is reeds voorgestel dat die etanol die ATPase ontkoppel van die  $\text{Ca}^{2+}$ -opname deur die SR membraan te beskadig. Dit wil dus voorkom asof daar met veroudering van die hartsier SR prepraat ook 'n ont koppeling van die ATPase en  $\text{Ca}^{2+}$ -opname plaasvind. Die membrane van die SR vesikels word dus sodanig beskadig dat  $\text{Ca}^{2+}$ -opname nie kan plaasvind nie.

Die reeks waar 0,01 mM PMSF en 1 mM BHT saam in die reaksie-medium gevoeg is tydens die  $\text{Ca}^{2+}$ -opname, lewer op dag 0 reeds 'n 12%

hoër  $\text{Ca}^{2+}$ -opname as die kontrole  $\text{Ca}^{2+}$ -opname op dieselfde dag (Fig. 20). Dit bevestig weereens dat die lae aktiwiteit wat hartspier SR reeds op dag 0 lewer, die gevolg is van oksidasie en proteolitiese ensieme wat die SR vesikels beskadig sodra die inkubasieproses by  $37^{\circ}\text{C}$  begin. Die grootste faktor by hierdie beskadiging is oksidasie terwyl die proteolitiese ensieme in 'n mindere mate betrokke is (Fig. 15). Kontaminerende proteïne wat ook in die hartspier SR preparaat mag voorkom kan tot gevolg hê dat minder SR in die reaksiedium gevoeg word as wat beplan word. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -opname wat per mg proteïen verkry word is dus laer. Die invloed van kontaminasie is egter baie gering in vergelyking met die invloed van oksidasie. Die reeks waar PMSF en BHT telkens in die reaksiedium gevoeg word vertoon op dag 4 nog 62% van die reeks se oorspronklike  $\text{Ca}^{2+}$ -opname wat op dag 0 verkry is en 70% van die kontrolereeks se  $\text{Ca}^{2+}$ -opname op dag 0. Hieruit kan dus afgelei word dat oksidasie en proteolitiese ensieme 'n groot bydrae lewer tot die onstabiliteit van die hartspier SR deur die SR te beskadig wanneer die temperatuur verhoog word tydens die inkubasie proses by  $37^{\circ}\text{C}$ . Die onstabiliteit van hartspier SR kan dus nie voorkom word deur bloot die SR preparaat te beskerm tydens die stoorproses nie. Die SR moet dus ook beskerm word tydens die uitvoer van die eksperiment self.

Die deel van die hartspier SR preparaat wat gestoor is in teenwoordigheid van 0,01 mM PMSF en 1 mM BHT lewer op dag 4 'n  $\text{Ca}^{2+}$ -opname wat 89% van die kontrolereeks se  $\text{Ca}^{2+}$ -opname op dag 0 is. Daar is geen verdere PMSF en BHT by die reaksiedium gevoeg nie. Hieruit is dit duidelik dat oksidasie en in 'n mindere mate proteolitiese ensieme ook tydens die stoorproses die hartspier SR beskadig, selfs by 'n temperatuur van  $2-4^{\circ}\text{C}$ . Uit die resultate

is dit duidelik dat proteolitiese ensieme en veral oksidasie 'n groot bydrae lewer tot die onstabiliteit van hartspier SR preparaat. Hierdie skade wat deur oksidasie en proteolitiese ensieme veroorsaak word, vind plaas tydens die stoorproses van die hartspier SR preparaat en ook tydens die inkubasie in die reaksie-medium. Indien 'n stabiele hartspier SR preparaat vereis word moet dit dus deur proteolitiese ensiem-inhibeerders en anti-oksidente beskerm word tydens die stoor- en inkubasieproses.

## OPSOMMING

In hierdie projek is gepoog om die probleme van onsuiverheid en onstabiliteit van hartspier SR preparate op te los en om 'n vergelyking te tref tussen hartspier en skeletspier SR.

Uit die literatuur is dit duidelik dat die hartspier SR preparaat onsuiverder en onstabiel is as die skeletspier SR preparaat. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -opnamevermoë van die hartspier SR neem binne 3 dae na bereiding af met tot 50% (Carsten, 1964; Scales & McIntosh, 1968; Pretorius et al, 1969). Kontaminasie van die hartspier SR preparaat word deur selorganelle, veral mitochondria, veroorsaak (Katz & Repke, 1967; Fuchs et al, 1968).

Verskeie bereidingsmetodes is in die literatuur beskryf in 'n poging om die probleme van onsuiverheid en onstabiliteit van die hartspier SR preparaat te oorkom. In die eksperimentele werk is drie bereidingsmetodes gebruik om vas te stel watter metode die suiwerste en aktiefste hartspier SR preparaat lewer.

Die bereidingsmetodes wat gebruik is, is die metodes van Harigaya en Schwartz (1969), Eletr en Inesi (1972) en Lighty en Bertrand (1979). Daar is gevind dat die metode van Eletr en Inesi die suiwerste en aktiefste hartspier SR preparaat lewer en verdere eksperimentele werk is met SR gedoen wat met behulp van hierdie metode berei is.

Die afwesigheid van aktiewe mitochondriale fraksies in die hartspier SR preparaat is bevestig deurdat 5 mM  $\text{NaN}_3$  geen invloed op die ATPase-aktiwiteit en  $\text{Ca}^{2+}$ -opname getoon het nie. Dit is

bekend dat  $\text{NaN}_3$  'n inhiberende invloed op mitochondriale-aktiwiteit uitoefen (Bielawski & Lehninger, 1966).

Daar is gepoog om vas te stel watter bydrae proteolitiese ensieme en oksidasie tot die onstabiliteit van die hartspier SR preparaat lewer. Farney en Gold (1963) het gevind dat PMSF 'n inhiberende invloed het op proteolitiese ensieme. Die invloed van PMSF is eers op skeletspier SR getoets omdat dit 'n aktiewer en stabielere SR preparaat is en daarna is dit op hartspier SR getoets. Daar is gevind dat PMSF in lae konsentrasies (0,01 mM - 1 mM) geen inhiberende invloed op die  $\text{Ca}^{2+}$ -opname van hartspier SR het nie. 'n Anti-oksidadant BHT is ook by skeletspier SR en hartspier SR gevoeg en daar is gevind dat BHT 'n stimulerende invloed uitoefen op die  $\text{Ca}^{2+}$ -opname van hartspier SR. Die invloed van BHT en PMSF op die stabiliteit van hartspier SR is getoets deur elke dag na die bereiding van die SR 'n  $\text{Ca}^{2+}$ -opname te doen met 1 mM BHT en 0,01 mM PMSF in die reaksie-medium. Daar is ook direk na bereiding 'n deel van die hartspier SR preparaat in teenwoordigheid van 1 mM BHT en 0,01 mM PMSF verseël en gestoor by  $2-4^{\circ}\text{C}$  vir 4 dae. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -opname van hierdie gestoorde SR is slegs op dag 4 bepaal sonder dat enige verdere BHT en PMSF in die reaksie-medium gevoeg is. Die resultate verkry, toon dat die kontrole hartspier SR (waar geen BHT of PMSF bygevoeg is nie) se  $\text{Ca}^{2+}$ -opname na 4 dae slegs 50% van die oorspronklike opname is. Die reeks waar BHT en PMSF in die reaksie-medium gevoeg is, se  $\text{Ca}^{2+}$ -opname was na 4 dae nog 70% van die kontrole reeks se oorspronklike  $\text{Ca}^{2+}$ -opname. Daar is ook gevind dat die hartspier SR preparaat wat gestoor is in teenwoordigheid van BHT en PMSF na 4 dae 'n  $\text{Ca}^{2+}$ -opname lewer wat steeds 89% is van die kontrole  $\text{Ca}^{2+}$ -opname soos op dag 0 verkry.

Dit is dus duidelik dat die onstabiliteit van die hartspier SR preparaat veroorsaak word deur proteolitiese ensieme en veral oksidasie. Die nadelige invloed van die proteolitiese ensieme en oksidasie vind plaas wanneer die hartspier SR by die reaksie-medium gevoeg word en dit by  $37^{\circ}\text{C}$  geïnkubeer word. Tydens die stoorproses by  $2-4^{\circ}\text{C}$  vind daar ook beskadiging van die hartspier SR plaas, veral deur oksidasie.

'n Meer stabiele hartspier SR preparaat kan dus verkry word indien 'n anti-oksidant en 'n proteolitiese ensiem-inhibeerder by die SR preparaat en ook by die reaksie-medium gevoeg word.

# A COMPARATIVE STUDY OF SOME STRUCTURAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF THE SARCOPLASMIC RETICULUM OF SKELETAL AND CARDIAC MUSCLE

## SUMMARY

In this project an attempt was made to solve the problems of impurity and instability of cardiac SR preparations, and to compare cardiac SR and skeletal SR.

From the literature it is clear that cardiac SR preparations are not as pure and as stable as skeletal SR preparations. The  $\text{Ca}^{2+}$  uptake of cardiac SR decreases by 50% within 3 days after preparation (Carsten, 1964; Scales & McIntosh, 1968; Pretorius et al, 1969). Contamination of the cardiac SR preparation is caused by cell organelles, especially mitochondria (Katz & Repke, 1967; Fuchs et al, 1968).

Various methods of preparation are described in the literature which attempt to solve the problems of impurity and instability of the cardiac SR preparation. In the experimental work three methods were used to determine which method would yield the purest and most active cardiac SR preparation.

The methods used were those of Harigaya & Schwartz (1969), Eletr & Inesi (1972) and Lighty & Bertrand (1979). It was found that the method of Eletr & Inesi yielded the purest and most active cardiac SR preparation and further experiments were done with SR prepared by this method.

The absence of active mitochondria in the cardiac SR preparation is confirmed by the fact that 5 mM  $\text{NaN}_3$  had no effect on the

ATPase activity or on the  $\text{Ca}^{2+}$  uptake.  $\text{NaN}_3$  is known to have an inhibiting influence on mitochondrial activity (Bielawski & Lehninger, 1966).

An attempt was made to determine what role proteolytic enzymes and oxidation play in the instability of the cardiac SR preparation. Farney & Gold (1963) found that PMSF had an inhibiting influence on proteolytic enzymes. The influence of PMSF was first tested on skeletal SR because it is a more active and stable SR preparation and thereafter it was tested on cardiac SR. It was found that low concentrations (0,01 mM - 1 mM) of PMSF had no inhibiting effect on the  $\text{Ca}^{2+}$  uptake of cardiac SR. An antioxidant BHT was added to skeletal SR and cardiac SR and it was found that BHT stimulated the uptake of  $\text{Ca}^{2+}$  by the cardiac SR. -

The influence of BHT and PMSF on the stability of the cardiac SR was tested by determining the  $\text{Ca}^{2+}$  uptake daily after preparation of the SR with 1 mM BHT and 0,01 mM PMSF in the reaction medium. Immediately after preparation a portion of the cardiac SR preparation, with 1 mM BHT and 0,01 mM PMSF added, was sealed and stored at  $2-4^{\circ}\text{C}$  for 4 days. The  $\text{Ca}^{2+}$  uptake of this portion was only determined on the 4th day without adding any further BHT or PMSF to the reaction medium. The results showed that after 4 days the control cardiac SR series (to which no BHT or PMSF was added) had only a 50%  $\text{Ca}^{2+}$  uptake compared to the original uptake. After 4 days the  $\text{Ca}^{2+}$  uptake of the series to which BHT and PMSF were added to the reaction medium, was 70% of the original uptake of the control cardiac SR series. After 4 days it was also found that the cardiac SR preparation which had been stored in the presence of BHT and PMSF had a  $\text{Ca}^{2+}$  uptake of 89% of the control cardiac SR series as determined on day 0.

It is therefore clear that the instability of the cardiac SR preparation is caused by proteolytic enzymes and especially oxidation. This adverse effect of the proteolytic enzymes and oxidation takes place when the cardiac SR is added to the reaction medium and is incubated at 37°C. During the storage at 2-4°C damage to the cardiac SR also occurs, mainly by oxidation.

A more stable cardiac SR preparation can thus be obtained by adding an antioxidant and a proteolytic enzyme inhibitor to both the SR preparation and the reaction medium.

## LITERATUURLYS

- AGOSTINI, B., SUKO, J. & HASSELBACH, W. 1975.. Cytochemical studies on sarcoplasmic reticulum of heart and skeletal muscle. (In: FLECKENSTEIN, A. & DHALLA, N.S. Recent advances in studies on cardiac structure and metabolism, Vol. 5. Baltimore, University Park).
- BENNETT, H.S. & PORTER, K.R. 1953. An electron microscope study of sectioned breast muscle of the domestic fowl. J. Anat., 93:61-105.
- BERGMEYER, H.U. 1974. Methods of enzymatic analysis, Vol. II, 2nd Eng. Ed. N.Y., Academic, pp. 1007-1009.
- BIELAWSKI, J. & LEHNINGER, A.L. 1966. Stoichiometric relationship in mitochondrial accumulation of calcium and phosphate supported by hydrolysis of adenosine triphosphate. J. Biol. Chem., 241:4316-4322.
- BLOOM, W. & FAWCETT, D.W. 1968. A textbook of histology, 9th Ed. Philadelphia, W.B. Saunders, pp. 263-303.
- BONNET, J.P., GALANTE, M., BRÉTHES, D., DEDIEU, J.C. & CHEVALLIER, J. 1978. Purification of sarcoplasmic reticulum vesicles through their loading with calcium phosphate. Arch. Biochem. Biophys., 191:32-41.
- CARAFOLI, E., DABROWSKA, R., CROVETTI, F., TIOZZO, R. & DRABIKOWSKI, W. 1975. An in vitro study of the interaction of heart mitochondria with troponin-bound  $\text{Ca}^{2+}$ . Biochem. Biophys. Res. Comm., 62:908-912.
- CARSTEN, M.E. 1964. The cardiac calcium pump. Proc. Nat. Acad. Sci., 52:1456-1462.

- CARSTEN, M.E. & MOMMAERTS, W.F.H.M. 1964. The accumulation of calcium ions by sarcotubular vesicles. *J. Gen. Physiol.*, 48:183-197.
- CURRIE, R.W., HAY, J.D., WOLFE, F.H. & SANDERS, E.J. 1978. Effects of postmortem aging on chicken breast muscle sarcoplasmic reticulum lipids. *Can. J. Anim. Sci.*, 58:143-149.
- DEAMER, D.W. & BASKIN, R.J. 1969. Ultrastructure of sarcoplasmic reticulum preparations. *J. Cell Biol.*, 42:296-307.
- DRABIKOWSKI, W., SARZALA, M.G., WRONISZEWSKA, A., LAGWINSKA, E. & DRZEWIECKA, B. 1972. Role of cholesterol in the  $\text{Ca}^{2+}$ -uptake and ATPase activity of fragmented sarcoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta*, 274:158-170.
- DRANSFELD, H., GREEFF, K., HESS, D. & SCHORN, A. 1967. Die abhängigkeit der  $\text{Ca}^{2+}$ -aufnahme isolierter mitochondrien des herzmuskels von der  $\text{Na}^{+}$ -und  $\text{K}^{+}$ -konzentration als mögliche ursache der inotropen digitaliswirkung. *Experientia*, 23:375-377.
- DUTTON, A., REES, E.D. & SINGER, S.J. 1976. An experiment eliminating the rotating carrier mechanism for the active transport of Ca ion in sarcoplasmic reticulum membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73:1532-1536.
- EBASHI, S. 1960. Calcium binding and relaxation in the actomyosin system. *J. Biochem. (Tokyo)*, 48:150-151.
- EBASHI, S. & ENDO, M. 1968. Calcium ion and muscle contraction. *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, 18:123-183.
- ELETR, S. & INESI, G. 1972. Phospholipid orientation in sarcoplasmic membranes: spin-label ESR and proton NMR studies. *Biochim. Biophys. Acta*, 282:174-179.

- ENDO, M. 1977. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Phys. Rev.*, 57:71-108.
- ENTMAN, M.L., GOLDSTEIN, M.A. & SCHWARTZ, A. 1976. The cardiac sarcoplasmic reticulum-glycogenolytic complex, an internal beta adrenergic receptor. *Life Sciences*, 19:1623-1630.
- ENTMAN, M.L., SNOW, T.R., FREED, D. & SCHWARTZ, A. 1973. Analysis of calcium and release by canine cardiac relaxing system (sarcoplasmic reticulum). *J. Biol. Chem.*, 248:7762-7772.
- FABIATO, A. & FABIATO, F. 1977. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Cir. Res.*, 40:119-129.
- FABIATO, A. & FABIATO, F. 1979. Calcium and cardiac excitation-contraction coupling. *Ann. Rev. Physiol.*, 41:473-484.
- FANBURG, B., FINKEL, R.M. & MARTONOSI, A. 1964. Role of calcium in the mechanism of relaxation of cardiac muscle. *J. Biol. Chem.*, 239:2298-2304.
- FANBURG, B.L. & MATSUSHITA, S. 1973. Phosphorylated intermediate of ATPase of isolated cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 5:111-115.
- FARNEY, D.E. & GOLD, A.M. 1963. Sulfonyl fluorides as inhibitors of esterases. I. Rates of reaction with acetylcholinesterase,  $\alpha$ -chymotrypsin and trypsin. *J. Am. Chem. Soc.*, 85:997-1000.
- FISKE, C.H. & SUBBAROW, Y. 1925. The colometric determination of phosphorous. *J. Biol. Chem.*, 66:375-400.
- FORD, L.E. & PODOLSKY, R.J. 1970. Regenerative calcium release within muscle cells. *Science*, 167:58-59.
- FORSSMANN, W.G. & GIRARDIER, L. 1970. A study of the T-system in rat heart. *J. Cell. Biol.*, 44:1-8.

- FRANZINI-ARMSTRONG, C. 1970. Studies on the triad. I. Structure of the junction in frog twitch fibres. *J. Cell Biol.*, 47:488-499.
- FRANZINI-ARMSTRONG, C. & PORTER, K. 1964. Sarcolemmal invaginations constituting the T-system in fish muscle fibres. *J. Cell Biol.*, 22:675-696.
- FUCHS, F. 1974. Striated muscle. *Ann. Rev. Physiol.*, 36:461-502.
- FUCHS, F., GERTZ, E.W. & BRIGGS, F.N. 1968. The effect of quinine on calcium accumulation by isolated sarcoplasmic reticulum of skeletal and cardiac muscle. *J. Gen. Physiol.*, 52:995-968.
- GLOSTER, J. & HARRIS, P. 1969. The lipid composition of mitochondrial and microsomal fractions of human myocardial homogenates. *Cardiovasc. Res.*, 3:45-51.
- GORNALL, A.G., BARDAWILL, C.J. & DAVID, M.M. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, 177:751-766.
- HANSON, J. & HUXLEY, H.E. 1953. Structural basis of the cross-striations in muscle. *Nature*, 172:530-532.
- HARIGAYA, S. & SCHWARTZ, A. 1969. Rate of calcium binding and uptake in normal and failing human cardiac muscle. *Circ. Res.*, 25:781-794.
- HASSELBACH, W. 1964. Relaxing factor and the relaxation of muscle. *Progr. Biophys. & Biophys. Chem.*, 14:167-222.

- HICKS, M.J., SHIGEKAWA, M. & KATZ, A.M. 1979. Mechanism by which cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase stimulates calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Circ. Res.*, 44:384-391.
- HUXLEY, A.F. & TAYLOR, R.E. 1958. Local activation of striated muscle fibres. *J. Physiol. (London)*, 144:426-441.
- IKEMOTO, N., SRETER, F.A. & GERGELY, J. 1971. Structural features of the surface of the vesicles of FSR - lack of functional role in  $\text{Ca}^{2+}$ -uptake and ATPase activity. *Arch. Biochem. Biophys.*, 147:571-582.
- INESI, G. 1972. Active transport of calcium ion in sarcoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1:292-210.
- INESI, G., EBASHI, S. & WATANABE, S. 1964. Preparation of vesicular relaxing factor from bovine heart tissue. *Am. J. Physiol.*, 207:1339-1344.
- KASAI, M. & MIYAMOTO, H. 1973. Depolarization induced calcium release from sarcoplasmic reticulum membrane fragments by changing ionic environment. *FEBS Letters*, 34:299-301.
- KASAI, M. & MIYAMOTO, H. 1976. Depolarization-induced calcium release from sarcoplasmic reticulum fragments. *J. Biochem.*, 79:1053-1066.
- KATZ, A.M. & REPKE, D.I. 1967. Quantitative aspects of dog cardiac microsomal calcium binding and calcium uptake. *Circ. Res.*, 21:153-162.
- KATZ, A.M. & REPKE, D.I. 1973. Calcium-membrane interactions in the myocardium: effects of ouabain, epinephrine and 3',5'-cyclic adenosine monophosphate. *Am. J. Cardiol.*, 31:193-201.

- KATZ, A.M., REPKE, D.I., UPSHAW, J.E. & POLASCIK, M.A. 1970. Characterization of dog cardiac microsomes. Use of zonal centrifugation to fractionate fragmented sarcoplasmic reticulum,  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -activated ATPase and mitochondrial fragments. *Biochim. Biophys. Acta*, 205:473-490.
- KATZ, S. & DOBOVICNIK, B. 1979. Possible localization of adenylate cyclase in microsomal fractions of cardiac muscle enriched in sarcoplasmic reticulum. *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, 22:395-399.
- KÜBLER, W. & SHINEBOURNE, E.A. 1971. Calcium and the mitochondria. (In: Ed. Harris, P. & Opie, L. *Calcium and the heart*, 1st Ed. London & N.Y., Academic, pp. 93-123).
- LANGER, G.A. 1968. Ion fluxes in cardiac excitation and contraction and their relation to myocardial contractility. *Physiol. Rev.*, 48:708-757.
- LEE, K.S., LADINSKY, H., CHOI, S.J. & KASUYA, Y. 1966. Studies on the in vitro interaction of electrical stimulation and  $\text{Ca}^{2+}$  movement in sarcoplasmic reticulum. *J. Gen. Physiol.*, 49:689-715.
- LEHNINGER, A.L. 1970. Mitochondria and calcium ion transport. *Biochem. J.*, 119:129-138.
- LEONARD, E.J. 1966. Excitation-contraction coupling and control of cardiac contractility. *Circ.*, 33:673-675.
- LIGHTY, G.W. & BERTRAND, H.A. 1979. Cardiac sarcoplasmic reticulum isolation from slaughterhouse beef heart. *Anal. Biochem.*, 99:41-52.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275.

- MACLENNAN, D.H. 1970. Purification and properties of an adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, 245:4508-4518.
- MACLENNAN, D.H. 1974. Isolation of a second form of calsequestrin. *J. Biol. Chem.*, 249:980-984.
- MACLENNAN, D.H. & HOLLAND, P.C. 1975. Calcium transport in sarcoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 5:377-404.
- MACLENNAN, D.H., OSTWALD, T.J. & STEWART, P.S. 1974. Structural components of the sarcoplasmic reticulum membrane. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 227:527-536.
- MAISTERRENA, B., COMTE, J. & GAUTHERON, D.C. 1974. Purification of pig heart mitochondrial membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 367:115-126.
- MALAN, N.T. 1976. A study on some structural and functional properties of the sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle. Ongepubliseerde proefskrif. P.U. vir C.H.O.
- MARSH, B.B. 1952. The effects of adenosine triphosphate on the fibre volume of a muscle homogenate. *Biochim. Biophys. Acta*, 9:247-260.
- MASORO, E.J. & YU, B.P. 1970. The functions of the lipids and lipoproteins of sarcotubular membranes in calcium transport. *Lipids*, 6:357-368.
- MEISSNER, G., CONNER, G.E. & FLEISCHER, S. 1973. Isolation of sarcoplasmic reticulum by zonal centrifugation and purification of  $\text{Ca}^{2+}$ -pump and  $\text{Ca}^{2+}$ -binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 298:246-269.
- MERCK INDEX. 1968. An encyclopedia of chemicals and drugs, 8th Ed., Merck & Co. Inc., p. 179.

- MORAD, M. & GOLDMAN, Y. 1973. Excitation-contraction coupling in heart muscle : membrane control of development of tension. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 27:259-313.
- MORCOS, N.C. & DRUMMOND, G.I. 1980. ( $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ )-ATPase in enriched sarcolemma from dog heart. *Biochim. Biophys. Acta*, 598:27-39.
- NAGAI, T., MAKINOSE, M. & HASSELBACH, W. 1960. Der physiologische Erschlaffungsfaktor und die Muskelgrana. *Biochim. Biophys. Acta*, 43:223-238.
- NAKAMARU, Y. & SCHWARTZ, A. 1972. The influence of hydrogen ion concentration on calcium binding and release by skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Gen. Physiol.*, 59:22-32.
- NAYLER, W.G., DUNNETT, J. & BERRY, D. 1975. The calcium accumulating activity of subcellular fractions isolated from rat and guinea pig heart muscle. *J. Molec. Cell. Cardiol.*, 7:275-288.
- NAYLER, W.G. & MERRILLEES, N.C.R. 1971. Cellular exchange of calcium. (In: Ed. HARRIS, P. & OPIE, L. *Calcium and the heart*, 1st Ed. London & N.Y., Academic, pp. 24-66).
- NIEDERGERKE, R. 1955. Local muscular shortening by intracellular applied calcium. *J. Physiol. (London)*, 128:12P.
- NOMURA, K. & NAKAMARU, Y. 1976. Determination of the intravesicular pH of fragmented sarcoplasmic reticulum with 5,5-Dimethyl-2,4-oxazolidinedione. *J. Biochem.*, 80:1393-1399.
- PODOLSKY, R.J. & CONSTANTIN, L.L. 1964. Regulation by calcium of the contraction and relaxation of muscle fibres. *Fed. Proc.*, 23:933-939.

- PRETORIUS, P.J. 1972. The role of cardiac sarcoplasmic reticulum in heart muscle contraction. S.A. Med. J., 46:777.
- PRETORIUS, P.J. & MALAN, N.T. 1974. Factors affecting calcium transport by cardiac sarcoplasmic reticulum. (In: DHALLA, N.S. Myocardial biology. Recent advances in studies on cardiac structure and metabolism, Vol. 4. Baltimore, University Park).
- PRETORIUS, P.J., POHL, W.G., SMITHEN, C.S. & INESI, G. 1969. Structural and functional characterization of dog heart microsomes. Circ. Res., 25:487-499.
- REPKE, D.I. & KATZ, A.M. 1969. Stabilization of cardiac microsomal calcium uptake by hypertonic solutions. Biochim. Biophys. Acta, 172:348-350.
- REPKE, D.I. & KATZ, A.M. 1972. Calcium binding and calcium-uptake by cardiac microsomes: A kinetic analysis. J. Molec. Cell. Cardiol., 4:401-416.
- SARZALA, M.G., PILARSKA, M., ZUBRZYCKA, E. & MICHALAK, M. 1975. Changes in the structure, composition and function of sarcoplasmic reticulum membrane during development. Eur. J. Biochem., 57:25-34.
- SCALES, B. & McINTOSH, D.A.D. 1968. Studies on the radiocalcium uptake and the adenosine triphosphatases of skeletal and cardiac sarcoplasmic reticulum fractions (SRF). J. Pharmacol. Exp. Therap., 160:249-260.
- SCALES, D. & INESI, G. 1976. Assembly of ATPase protein in sarcoplasmic reticulum membranes. Biophys. J., 16:735-751.

- SHIGEKAWA, M., FINEGAN, J.-A.M. & KATZ, A.M. 1976. Calcium transport ATPase of canine cardiac sarcoplasmic reticulum. J. Biol. Chem., 251:6894-6900.
- SOLARO, R.J. & BRIGGS, F.N. 1974. Estimating the functional capabilities of sarcoplasmic reticulum in cardiac muscle. Circ. Res., 34:531-540.
- SOMMER, J.R. & JOHNSON, E.A. 1970. Comparative ultrastructure of cardiac cell membrane specializations. A review. Am. J. Cardiol., 25:184-194.
- TADA, M., YAMADA, M., OHMORI, F., KUZUYA, T., INUI, M. & ABE, H. 1980. Transient state kinetic studies of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent ATPase and calcium transport by cardiac sarcoplasmic reticulum. J. Biol. Chem., 255:1985-1992.
- THOMAS, D.D. & HIDALGO, C. 1978. Rotational motion of the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:5488-5492.
- TONOMURA, Y. 1975. Muscle protein, muscle contraction and cation transport. University of Tokyo, pp. 305-356.
- UYEDA, K. 1969. Reaction of phosphofructokinase with maleic anhydride, succinic anhydride and pyridoxal 5'-phosphate. Biochem., 8:2366.
- WEBER, A., HERZ, R & REISS, I. 1964. Role of calcium in contraction and relaxation of muscle. Fed. Proc., 23:896-900.
- WEBER, A., HERZ, R. & REISS, I. 1966. Study of the kinetics of calcium transport by isolated fragmented sarcoplasmic reticulum. Biochem. Z., 345:329-369.

- WHEELDON, L.W. & GAN, K. 1971. Resolution of fragments of plasma and sarcotubular membranes in heart muscle microsomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 233:37-48.
- WINEGRAD, S. 1961. The possible role of calcium in excitation-contraction coupling of heart muscle. *Circ.*, XXIV:523-529.
- WINEGRAD, S. 1970. The intracellular site of calcium activation of contraction in frog skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.*, 55:77-88.
- YU, B.P., DE MARTINIS, F.D. & MASORO, E.J. 1968. Isolation of  $\text{Ca}^{2+}$ -sequestering sarcotubular membranes from rat skeletal muscle. *Analyt. Biochem.*, 24:523-530.
- ZUBRZYCKA, E., KORCZAK, B., SARZALA, M.G. & DRABIKOWSKI, W. 1978. Location of the peripheral proteins in sarcoplasmic reticulum vesicles. *FEBS Letters*, 90:215-217.

## AFKORTINGS

|         |                                                                     |
|---------|---------------------------------------------------------------------|
| ANSA:   | 1-Amino-2-hidroksienaftaleen-4-sulfoonsuur                          |
| ATP:    | Adenosientrifosfaat                                                 |
| ATPase: | Adenosientrifosfatase                                               |
| BHT:    | Butyleerde hidroksitolueen                                          |
| c-AMP:  | Sikliese Adenosienmonofosfaat                                       |
| DTT:    | 1,4-Ditiotreitol                                                    |
| EDTA:   | Etileendiamientetra-asynsuur                                        |
| EGTA:   | Etileenglikol-bis-( $\beta$ -amino-etieleter) N,N'-tetra-asyn= suur |
| MOPS:   | Morfolinopropaansulfoonsuur                                         |
| Pi:     | Anorganiese fosfaat                                                 |
| PMSF:   | Fenielmetielsulfonielfluoried ( $C_7H_7FO_2S$ )                     |
| SDS:    | Natriumdodesielsulfaat                                              |
| SR:     | Sarkoplasmiese retikulum                                            |
| TCA:    | Trichloor-asynsuur                                                  |
| Temed:  | N,N,N',N'-tetrametieleendiamien                                     |
| Tris:   | 2 Amino-2-hidroksiemetiel-1,3-propaandiol                           |

## BEDANKINGS

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

- Dr. N.T. Malan wat as leier geen moeite ontsien het om my te help nie. Graag wil ek hom ook bedank vir die lesings wat hy namens my waargeneem het sodat ek die praktiese werk kon afhandel.
- Prof. P.J. Pretorius vir sy belangstelling en aanmoediging.
- Mev. R. Taljaard vir haar hulp, belangstelling en opofferings.
- My vrou, Delene vir die tikwerk en ook vir haar bystand en aanmoediging.
- My ouers vir hul liefde en motivering deur die jare.

Aan die Tuinier wat hierdie onvrugbare vyeboom gespaar en versorg het, kom al die lof, dank en aanbidding toe.