

MUSKELPROTEINE

von

HANS H. WEBER

Physiologisches Institut, Tübingen (Deutschland)

Es ist wahrscheinlich, dass bei keinem anderen Gewebe Stoffwechsel, Energetik und kolloidaler Feinbau so gut bekannt sind wie beim Skelettmuskel. Es ist sicher, dass bei keinem anderen Gewebe der *Zusammenhang* zwischen diesen Eigenschaften lebender Systeme auch nur annähernd so weit geklärt ist, wie bei der Muskeltätigkeit.

Bei den Muskelproteinen betraf sogar die erste fundamentale Entdeckung gar nicht die Proteine selbst, sondern gerade diesen Zusammenhang: 1922 stellte O. MEYERHOF¹⁹ fest, dass etwa $\frac{1}{3}$ der Wärmeproduktion der Arbeitsphase des Muskels auf der Bindung der H-Ionen der Milchsäure durch die Muskeleiweißkörper beruhe und dass in der Erholungsphase ein entsprechender Betrag der Verbrennungsenergie der Milchsäure verbraucht würde, um die H-Ionen wieder von dem Eiweiss abzulösen.

Man wusste damals fast nichts über Zahl und Art der Muskeleiweißkörper. VON FÜRTH¹² hatte aus dem Muskelpresssaft ein Muskelalbumin isoliert, das Myogen, mit zahlreichen und verwickelten Denaturierungsmechanismen. Er hielt es außerdem für möglich, dass im Presssaft auch noch ein besonderes Protein vorhanden sei, das er für den Träger der Muskelkontraktion hielt, und für das er den Namen Myosin vorschlug. Er war allerdings nicht sicher, dass dieses Myosin ein Eiweißkörper *sui generis* sei und nicht ein Denaturierungsprodukt des Myogens. Soweit diese Zweifel die Anwesenheit des Myosin im Muskelpresssaft betrafen, waren sie berechtigt: denn das kontraktile Protein geht nicht in den Muskelpresssaft über^{38, 27}.

Die Entdeckung MEYERHOF's war trotz oder gerade wegen dieser Unsicherheiten außerordentlich folgenreich. Denn MEYERHOF hatte schon selbst gleich in seiner ersten Originalarbeit festgestellt, dass die angeführten Wärmetönungen bei H'-Bindung und H'-Abgabe offenbar bei *allen* Proteinen in neutralem und alkalischen Milieu auftreten. Nun verläuft aber H'-Bindung und H'-Abgabe durch Carboxylgruppen in der Regel athermisch, durch organische basische Gruppen aber mit solchen Wärmetönungen, wie sie MEYERHOF gefunden hatte. Das würde bedeuten, dass Eiweißkörper auf der alkalischen Seite des isoelektrischen Punktes nicht, wie man bis dahin geglaubt hatte, mit ihren Carboxylgruppen, sondern mit ihren basischen Gruppen puffern, oder mit anderen Worten, dass isoelektrische Eiweissteilchen nicht Moleküle sondern Zwitterionen sind. Und so wurde die MEYERHOF'sche Entdeckung am Muskel zu einem fundamentalen Argument der Zwitterionentheorie der Aminosäuren und Eiweißkörper³⁵.

Da aber im übrigen grosse Unterschiede in der Wärmetönung der H'-Bindung nicht nur zwischen Carboxylgruppen und basischen Gruppen bestehen, sondern auch zwischen den verschiedenen basischen Gruppen unter sich, wirkte die MEYERHOF-Entdeckung noch weiter. JESSE P. GREENSTEIN¹⁵ mass diese Wärmetönungen an den trivalenten

Aminosäuren und ihren Peptiden. Er schuf damit die Unterlagen, um die Wärmetönung der Eiweisspufferung in verschiedenen p_H -Bereichen auszuwerten für die Beantwortung der Frage, welche der ionogenen Gruppen in dem jeweiligen p_H -Bereich Träger der Pufferung wären³⁹. Wenn wir heute am intakten Proteinteilchen Zahl und Dissoziationsbereich der einzelnen ionogenen Gruppen weitgehend kennen, so ist das u.a. eine Folge der MEYERHOF'schen Muskelstudien.

II

Das fehlende systematische Wissen um die Zahl und Art der Muskeleiweisskörper wurde in den nächsten 15 Jahren nach MEYERHOF's Entdeckung im Groben nachgeholt. Der Stand dieses Wissens wurde 1934³⁷ erschöpfend und 1939³⁸ in den wesentlichsten Zügen zusammenfassend dargestellt. Das, was wir heute wissen, ist — unter Ausschluss der elektrischen Ladungsverhältnisse der Proteine und der optischen Resultate* aus Tabelle I zu ersehen.

Für die Beurteilung der Bedeutung der Hauptfraktionen der Muskelproteine gelten folgende Überlegungen: die Myogenfraktion umfasst nicht nur 20% der Muskeleiweisskörper, sondern sie beansprucht auch 20% des Faservolumens. 80% des Faservolumens sind für Myogen "nichtlösender Raum"¹⁶. Das bedeutet, dass Myogen dort, wo es im Muskel ist, sich in einer Konzentration von 20% vorfindet. Ebenso stimmt der kolloidodynamische Druck der Muskelfaser recht gut mit dem osmotischen Druck einer 20%igen Myogenlösung überein^{10, 37}. Da Myogen unter physiologischen Bedingungen > 30% löslich ist, ist das Myogen also auch im Muskel selbst gelöst. Da diese Myogenlösung im Muskel noch nicht einmal den Raum des Sarkoplasmas vollständig beanspruchen würde, liegt es nahe wenigstens den Hauptteil der Fraktion (Myogen B) als Bestandteil des Sarkoplasma anzusehen.

Die Stromafraktion umfasst — nach mikroskopischer Beobachtung an der erschöpfend extrahierten Muskelfaser — bindegewebige Anteile, Sarkolemm und vielleicht noch einige weitere nicht oder nicht wesentlich doppelbrechende unlösliche Strukturanteile.

Über die Bedeutung der Globulin X-Fraktion sind Aussagen noch nicht möglich.

Die Stellung der Myosinfaktion in der Muskelfaser wurde bisher auf Grund folgender Tatsachen beurteilt: die Eigendoppelbrechung der Faser beträgt ~ 40 (44%) der Eigendoppelbrechung des Myosinfadens gleicher Eiweisskonzentration^{36, 22}, während die Stäbchendoppelbrechung sogar genau 40% der Stäbchendoppelbrechung des Fadens ausmacht^{36, 22}. Die Stäbchendoppelbrechung des Fadens ist dabei auch quantitativ die Doppelbrechung eines idealen WIENER'schen Stäbchenmischkörpers. Da ferner auch 40% der Muskeleiweisskörper der Myosinfaktion angehören, wurde gefolgert, dass die gesamte Doppelbrechung des Muskels ausschliesslich auf der Doppelbrechung der Myosinfaktion beruhe und dass auch im Muskel die Myosin- (Aktomyosin) Stäbchen streng achsenparallel angeordnet sind. Da ferner das Volumen der A-Abschnitte auf etwa 40% des Faservolumens geschätzt werden muss, ergab sich als zweiter Schluss, dass wahrscheinlich alles Aktomyosin sich in den doppelbrechenden Abschnitten befindet³⁶. Daraus und aus der weiteren Tatsache, dass das Aktomyosin der Träger der röntgenoptischen Phänomene des Muskels und ihrer Veränderung bei der Kontraktion ist^{5, 1}, ergab sich schliesslich, dass Aktomyosin offenbar das kontraktile Protein sei.

Nun fanden WOLPERS⁴², sowie SCHMITT und Mitarbeiter²⁸, dass elektronenmikroskopische Eiweissfäden von einer Dicke von 50 bis 250 Å in gleicher Dichte den A- und

* Röntgen-, Polarisations- und Elektronenoptik, sowie Streuung des sichtbaren Lichtes.

TABELLI

| Protein-Fraktion | Anteil am Gesamtprotein | Name des einzelnen Proteins | Löslich zwischen pH 6 u. 7 bei | $\frac{\eta' - 1}{c}$ (c = o) (G* = 40) |
|------------------------------------|-------------------------|--|---|--|
| Albumin ¹² | 20% ²⁰ | Myogen B (80% der Fraktion) | o bis 6μ ³⁷ | 0.04 ³⁷ |
| | | Myogen A ⁴ = Aldolase ⁷ (20% der Fraktion) | — | — |
| Globulin X ²⁰ | 20% ²⁰ | nicht bearbeitet | 0.005 μ ²⁰ bis ? | 0.14 ³⁷ |
| Myosin ^{10a} | 40% ²⁰ | L-Myosin ³¹ | 0.05 μ bei pH 6.7 ^{20, 34} bis 5.7 μ bei pH 5.5 ⁹ | 2.2 ²⁶ |
| | | Aktomyosine ³³ | 0.3 μ bei pH 6.7 ²⁶ bis 3.3 μ bei pH 5.5 ⁹ | 3 bis 4.5 ²⁰ |
| | | Aktin (aktiv) ³² | o bis 2 μ ³² | 2.3 bis 3.2 ²⁶ |
| | | Aktin (inaktiv) ³² | o μ ³² | 0.01 ⁴⁰ |
| Stroma | 20% ²⁰ | nicht bearbeitet | nicht löslich | |
| Summe | 100% | | | |
| Proteine unbekannter Zugehörigkeit | 6% ³ | Tropomyosin ³ | 0.1 bis 7 μ ³ | — |

* G = Gefälle

den I-Abschnitt durchziehen. Infolgedessen sollte im I-Abschnitt etwa dieselbe positive Stäbchen-Do* auftreten wie im A-Abschnitt, d.h. etwa 70% der Gesamt-Do des A-Abschnittes²². Diese Do der I-Bande aber fehlt! Der Widerspruch würde sich lösen, wenn man annimmt, dass die elektronenmikroskopischen Fadenmizellen des I-Abschnittes eine negative Eigen-Do besitzen, die die positive Stäbchen-Do ungefähr kompensiert. Tatsächlich fanden SZENT-GYÖRGYI und seine Schüler¹³, dass gerade in der I-Bande ein Protein—von ihnen N-Protein genannt—vorhanden ist von beträchtlicher negativer Eigen-Do und positiver Stäbchen-Do. Beim Brechungsindex des Wassers wird die positive Stäbchen-Do durch die negative Eigen-Do vollständig aufgehoben. Die Gesamt-Do der I-Bande wird nach erschöpfender Extraktion des Muskels sogar ganz schwach negativ**. Es bleibt zu prüfen, ob die Menge des N-Proteins reicht, um aus

* Do = Doppelbrechung.

** SZENT-GYÖRGYI³⁴ nimmt an, dass sich in der I-Bande die gleichen Mengen und Strukturen an Aktomyosin finden wie in der A-Bande und infolgedessen die gleiche positive Gesamt-Do wie dort — nur maskiert durch eine entsprechende hohe negative Do des N-Protein. Er übersieht dabei aber, dass die von ihm angeführte negative Gesamt-Do des N-Protein nur bei Einbettung in Medien

I

| $s_{20} \cdot 10^{13}$ (c = o) | $D_{20} \cdot 10^7$ (c = o) | M | $\frac{I}{\zeta}$ osmot. | $\frac{I}{\zeta}$ aus D_{20} u. s_{20} |
|------------------------------------|--|--|-----------------------------|---|
| 6.4 ** | — | 81000 osmot. ^{31a} | 3.0 aus M u. s_{20} | — |
| 7.86 ¹⁴ | 4.7 ⁸¹⁴ | 1.5 · 10 ⁵ aus s_{20} u. D_{20} | — | 5.5 |
| — | — | — | — | — |
| 7.1 ^{26a, 30, 23} | 0.9 ^{26a} 0.5 ^{33, 40(?)} | 0.84 · 10 ⁶ (^{26a}) 1 bis 1.5 · 10 ⁶ (?) ³³ | 128 — | 100.2 aus M u. s_{20} 180(?) |
| 93 bis 280 ⁴⁰ | 0.5 ** | 14 · 10 ⁶ aus s_{20} u. D_{20} | — | — |
| 64 ⁴⁰ bei c = 0.1% | — | — | — | — |
| 3.7 ** ⁴⁰ bei c = 0.24% | — | 76000 ³³ | — | — |
| — | — | — | — | — |
| 2.5 ² | 2.7 ⁸ | 88000 osmot. ² 93000 aus s_{20} u. D_{20} ² | III | 56 |

** Einzelne Versuchsreihe

ihm die elektronenmikroskopischen Fadenmizellen des I-Abschnittes aufzubauen. Die Tatsache, dass die Gesamt-Do der I-Bande durch erschöpfende Extraktion schwach negativ wird, deutet darauf hin, dass sich in der I-Bande neben dem N-Protein noch ein wenig extrahierbares Protein mit positiver Do findet. Man könnte dabei an Tropomyosin² (6% des Muskeleiweiss) oder auch an einen kleinen Teil des Aktomyosins denken. Die neuen Entdeckungen scheinen eher das Rätsel der Struktur der I-Bande der Lösung näher zu führen als zu neuen Annahmen über den Aufbau des A-Abschnittes zu nötigen. Die kontraktilen A-Banden dürften zu ihrem Aufbau den Hauptteil des Aktomyosins verbrauchen, und das Aktomyosin dürfte also das kontraktile Protein sein.

III

1930 hatte DEUTICKE⁸ gefunden, dass bei pH 7 die Löslichkeit der Muskeleiweiss von hohem Brechungsindex auftritt (Xylol-Canadabalsam). Denn nur hier ist die hohe positive Stäbchen-Do des N-Protein selbst infolge des geringen Brechungsunterschiedes zwischen Eiweissfädchen und Einbettungsmedium weitgehend verschwunden.

körper als Folge excessiven anaeroben Stoffwechsels (Ermüdung, Totenstarre, längere Aufbewahrung von Muskelbrei) deutlich abnimmt. 1933 fanden MEYER UND WEBER²⁰, dass bei 24 stündiger Aufbewahrung von Muskelbrei die Löslichkeit der Myosinfraktion fast völlig schwindet. 1938 zeigten KAMP¹⁷ und WEBER³⁸ am lebenden Kaninchen, dass die Löslichkeitsminderung durch Ermüdung in Sekunden und Minuten mit der Erholung wieder verschwindet. Sie zeigten ferner am Frosch, dass diese Löslichkeitsminderung ausserordentlich viel schneller auftritt, wenn dem Muskel durch Halogenacetat die Milchsäurebildung unmöglich gemacht ist. Die Löslichkeitsminderung beruht also offenbar auf einem Stoffwechselvorgang, der durch die Bildung der Milchsäure rückgängig gemacht wird. Da die Löslichkeitsänderungen durch Zusatz von Kreatin, Kreatinphosphat und Adenylsäure nicht beeinflussbar waren, musste es sich um einen sehr frühen Stoffwechselprozess handeln, der zeitlich der Kontraktion nahe steht. Und schliesslich ergab sich, dass allein die kontraktile Eiweissfraktion, die Myosinfraktion, durch diesen Stoffwechselvorgang reversibel in ihrer Löslichkeit geändert wird.

1939 entdeckten ENGELHARDT UND LJUBIMOVA¹¹, dass zwischen Myosinfraktion und Adenosintriphosphat-(ATP)-spaltung enge Beziehungen bestehen: der Elastizitätsmodul von Myosinfäden sinkt bei ATP-Gegenwart ab, und das ATP wird gleichzeitig vom Myosin gespalten. Diese Befunde wurden 1941 von NEEDHAM und Mitarbeitern²¹ erweitert: auch die Viskosität (η') und die Strömungsdooppelbrechung (DRF) sinken unter ATP reversibel ab. — 1942 gelang SCHRAMM UND WEBER³¹ mit der Ultrazentrifuge die Auflösung der Myosinfraktion und ihre Trennung in mehrere Komponenten: eine langsam sedimentierende Komponente (L-Myosin) und mehrere schnell sedimentierende Komponenten (S-Myosin).

Alle diese verschiedenen Linien der Forschung vereinigten sich 1942 in den sensationalen und bedeutenden Ergebnissen von SZENT-GYÖRGYI und seinen Schülern³² und in den Untersuchungen anderer Autoren, die von diesen Ergebnissen ihren Ausgang nahmen. SZENT-GYÖRGYI bestätigte die Befunde der NEEDHAM-Gruppe—übrigens ohne sie zu kennen—and erweiterte sie dahin, dass durch ATP auch noch die Lichtstreuung und die Löslichkeit reversibel beeinflusst würden — aber nicht der Myosinfraktion sondern nur einer Komponente, des Aktomyosin. Damit war auch der Befund WEBER UND SCHRAMM bestätigt, dass die Myosinfraktion aus mehreren Komponenten besteht. Einen gewissen Abschluss fand die Erklärung aller dieser Phänomene durch den Beweis, dass die Aktomyosinkomponente eine Verbindung zweier Fadenproteine, des Aktin und des Myosin, darstellt, die bei Gegenwart von ATP unter Änderung aller der Eigenschaften dissoziert, deren ATP-Abhängigkeit oben angeführt wurde. Schliesslich ergaben die Untersuchungen der Szegeder Schule auch noch, dass die Extrahierbarkeit der Myosinfraktion aufhört, sobald die gesamte ATP des Muskels gespalten ist. Damit war der DEUTICKE-KAMP-Effekt auf Bildung des schwer löslichen Aktomyosin durch ATP-Mangel zurückgeführt.

IV

Der Versuch, die Komponenten der Myosinfraktion zu trennen, führte zunächst nur zu einer Reindarstellung des L-Myosin (SCHRAMM UND WEBER³¹) bezw. des von SZENT-GYÖRGYI³⁴ so genannten "Myosin" (kristallisiertes Myosin). Es ist aber leicht²⁶, L-Myosin und S-Myosine sauber quantitativ von einander zu trennen: ein Muskelextrakt von 0.6 μ (0.3 m KCl + 0.15 m Standartphosphat nach SZENT-GYÖRGYI) wird auf

0.04μ verdünnt und die Myosinfraktion abzentrifugiert. Aus der ATP freien Lösung des Niederschlags fallen dann bei p_H 6.8 alle S-Myosine geschlossen durch Verdünnung auf 0.28 bis 0.3μ aus. Die überstehende Lösung enthält nur noch L-Myosin, das bei 0.05μ als Gel von 0.5 bis 1% und bei 0.03μ als Gel von $\geq 2\%$ quantitativ ausfällt. Der lockere Niederschlag der S-Myosine schliesst etwas gelöstes L-Myosin ein, dass durch weitere Umfällungen entfernt werden kann*. Nach solcher Trennung ist es leicht zu beweisen, dass L-Myosin mit dem Myosin SZENT-GYÖRGYI's und die S-Myosine mit seinem Aktomyosin identisch sind.

Werden Extrakte in dieser Weise aufgeteilt, so ordnen sich die Sedimentationskonstanten von mehr als 10 Präparaten des L-Myosin in schwacher und geradliniger Abhängigkeit von der Eiweisskonzentration zur Kurve 1 der Fig. 1. Auf dieser Kurve liegen auch unsere Werte für "kristallisiertes" Myosin. Bei $c = 0$ beträgt s_{20} 7.1.

Die Sedimentationskonstanten der S-Myosine sind viel grösser, hängen von der Eiweisskonzentration viel stärker und außerdem nicht geradlinig ab (vergl. Kurven 2 und 3 der Fig. 1). Bei den S-Myosinen ist vielmehr $1/s$ der Konzentration geradlinig proportional nach der Formel

$$\frac{1}{s} = \frac{1}{s_{(c=0)}} + K \cdot c$$

s_{20} ($c = 0$) ist bei verschiedenen Präparaten der S-Myosine sehr verschieden, K dagegen weniger: so hat s_{20} ($c = 0$) in Kurve 2 den Wert 93, in Kurve 3 den Wert 280, während $K = \Delta^1_{s/c}$ für die Kurven 2 und 3 den Wert 8.8 bzw. 8.2 besitzt. Wenn das immer so ist, so würde es bedeuten, dass die Wechselwirkung der Einzelteilchen bei den verschiedenen Aktomyosinen annähernd gleich ist, während Gestalt und Grösse der Teilchen von einem Aktomyosin zum anderen sehr verschieden sein können. Denn K charakterisiert die Wechselwirkung, s_{20} ($c = 0$) dagegen das Einzelteilchen. Es wurden unter 40 Sedimentationskonstanten von S-Myosinen keine Werte gefunden, die tiefer lagen als die Werte von Kurve 2. In Abbildung 1 sind nur solche Konstanten eingezeichnet, die an einheitlichen Präparaten gefunden wurden. Reine Präparate von S-Myosinen enthalten nämlich häufig 2 S-Myosine mit scharf unterschiedlichen Sedimentationskonstanten.

Werden S-Myosine mit einer genügenden Menge ATP versetzt, so fallen ihre

* Die Trennung bei einem 0.6 m KCl-Extrakt ist kurz beschrieben im FIAT-Review⁴⁰.

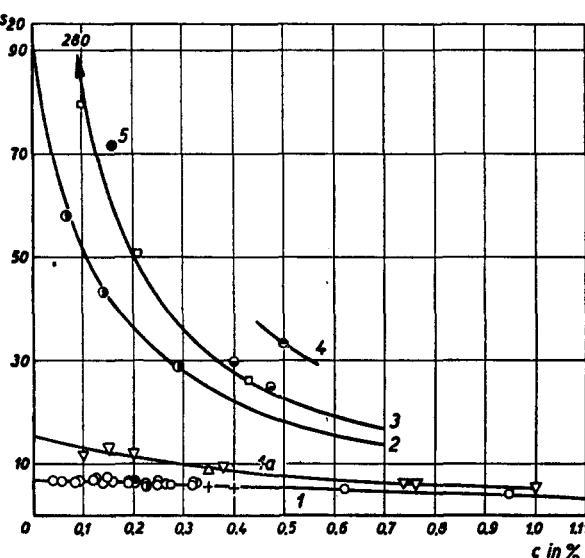


Fig. 1. Sedimentationskonstante
Kurve 1: L-Myosin ○○ rein durch fraktionierte Umfällung, ++ rein durch Kristallisation, ○○ aus Aktomyosin der Kurven 2 und 4 durch ATP; Kurve 2, 3, 4: Aktomyosine ○□○ aus Muskelextrakt isoliert durch fraktionierte Umfällung; ● 5 aus L-Myosin der Kurve 1 durch Aktin; ○ durch Rückbildung aus ○ der Kurve 1 bei Aufspaltung der ATP; Kurve 1a: Denaturiertes L-Myosin ▽ rein, △ zu 50% gemischt mit undenaturiertem L-Myosin.

Sedimentationskonstanten reversibel auf die Werte des L-Myosin (vergl. Punkt ● der Kurven 2 und 1 und Punkt ○ der Kurve 4 der Fig. 1, siehe ferner Fig. 2).



Fig. 2. a) Aktomyosin der Kurve 4 (Fig. 1); b) nach ATP-Zusatz

Wird L-Myosin mit einer genügenden Menge Aktin versetzt, so verschwindet seine Sedimentationskonstante und es tritt dafür die Sedimentationskonstante eines S-Myosin auf (vergl. Punkt ● Kurve 1 mit Punkt ○ 5 der Fig. 1). Wird zu wenig Aktin hinzugesetzt, so tritt ebenfalls die Sedimentationskonstante eines Aktomyosin auf, aber es bleibt außerdem ein Teil des L-Myosin erhalten.

Die Präparate des langsam sedimentierenden Myosin und des Myosin nach SZENT-GYÖRGYI haben eine niedrige, ATP-unempfindliche Viskosität, die vom Gefälle erst bei sehr niedrigen Werten stärker abhängt; die Viskosität der S-Myosine ist für jedes Präparat verschieden, sehr viel höher, stärker vom Gefälle abhängig und fällt auf ATP-Zusatz ungefähr auf den Wert des L-Myosin (vergl. die Kurven 1, 2 und 3 der Fig. 1 und 3)*.

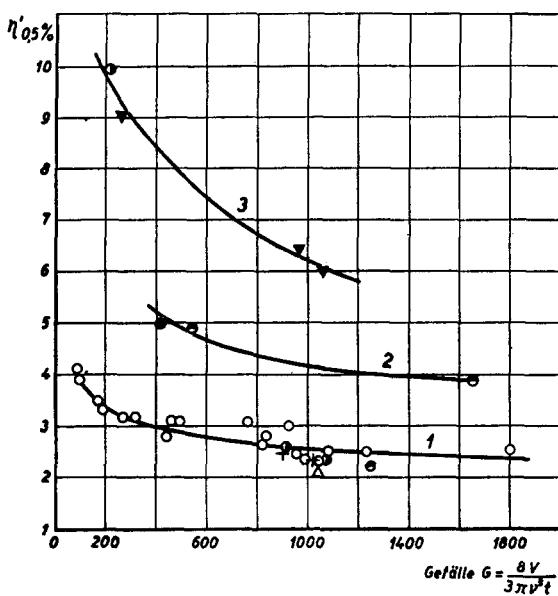


Fig. 3. Viskositäten.

Kurve 1: L-Myosin, Kurve 2 und 3: Aktomyosine, die Zeichen für die einzelnen Versuchspunkte haben dieselbe Bedeutung wie in Fig. 1.

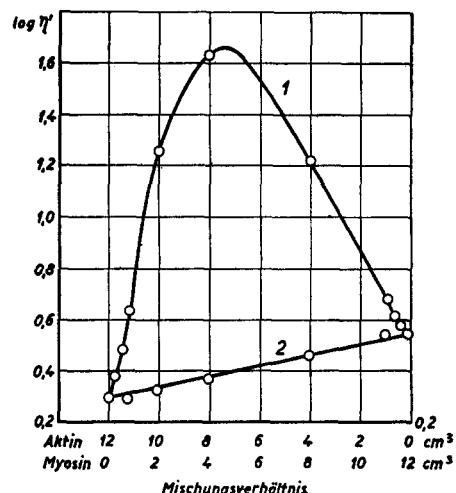


Fig. 4. Viskositäten künstlicher Aktomyosine, Kurve 1 vor ATP-Zusatz, Kurve 2 nach ATP-Zusatz; Abszisse Mischungsverhältnis von Aktin- und L-Myosinlösung in ml, Ordinate $\log \eta'$. Aktin 0.385%ig, L-Myosin 0.701%ig.

Genau genommen fällt die Viskosität von Aktomyosinen durch ATP auf einen Wert, der sich

* Vergleicht man nur die Aktomyosine unter sich, so wachsen Viskosität und Sedimentationskonstante keineswegs parallel (vergl. Punkt ○ der Kurve 4 der Fig. 1 mit Punkt ○ der Kurve 2 der Fig. 3). Das ist nicht wunderbar: denn das Achsenverhältnis wirkt auf beide Phänomene entgegengesetzt.

aus einem Beitrag des freien L-Myosin und freien Aktin des Komplexes zusammensetzt — und zwar so, dass sich unter ATP der $\log \eta'$ der L-Myosin- und der Aktinkomponente addiert und nicht etwa die beiden η' Werte selbst (Fig. 4)¹⁸. Da aber im ATP-Versuch nach SZENT-GYÖRGYI immer die Viskosität auf die Gesamteiweisskonzentration (L-Myosin + Aktin) bezogen wird und da ferner η' für Aktin- und Myosinlösungen gleicher Konzentration sehr ähnlich ist, fällt der Unterschied nicht sehr auf (s. u.).

Von der Konzentration hängen die Viskositäten aller Myosinkomponenten und des aktiven Aktin nach der ARRHENIUS-Formel $\log \eta' = K \cdot c$ ab*. Bei Gefälle 1000 beträgt der K-Wert für L-Myosin 0.9 und streut für aktives Aktin zwischen 0.9 und 1.3.

Die häufig auftretenden³⁰ Sedimentationskonstanten der Kurve 1a der Fig. 1 stammen von einheitlichem, denaturierten L-Myosin: einheitliche Präparate mit diesen Sedimentationskonstanten und Mischungen solcher Präparate mit L-Myosin geben die niedrige Viskosität des L-Myosin und sind ATP-unempfindlich (vergl. Kurve 1a der Fig. 1 mit Kurve 1 der Fig. 3)³⁰. Die Komponente mit $s_{20} (c=0) = 15$ ist also kein Akto- oder S-Myosin. Und sie entsteht aus L-Myosin im Laufe der Zeit und der Umfällungen (vergl. Fig. 5). Die "Kristallisation" begünstigt durch ihre höhere Dauer diesen Vorgang mehr als die oben beschriebene Abtrennung des L-Myosin durch fraktionierte Umfällung (vergl. Fig. 5b und c). Die Denaturierung vollzieht sich offenbar in scharfen Stufen. Zwischenwerte zwischen den Kurven 1 und 1a wurden nie beobachtet. Mit fortschreitender Denaturierung wächst nur der Anteil der denaturierten Komponente ($s_{20} (c=0) = 15$) auf Kosten des ursprünglichen L-Myosin (vergl. d und e der Fig. 5).

Während der letzten Jahre wurden im Laboratorium von SVEDBERG gleichzeitig mit unseren Untersuchungen die Sedimentationskonstanten der unfractionierten Myosinlösungen untersucht³⁰. Die Ergebnisse stimmen experimentell mit den hier angegebenen Werten für die gereinigten einheitlichen Komponenten überein. Dagegen sind die Sedimentationskonstanten bei den schneller sedimentierenden Komponenten etwas anders auf $c=0$ extrapoliert. Dies beruht darauf, dass die Extrapolationsstrecke wesentlich grösser ist als bei uns und dass s und nicht $1/s$ geradlinig extrapoliert wurde. So werden die Sedimentationskonstanten der Kurve 1a (Fig. 1) für $c=0$ auf 12 und der Kurve 2 auf 50 extrapoliert statt auf 15 bzw. 93. Für die langsamste Komponente und ebenso für das kristallisierte Myosin nach SZENT-GYÖRGYI wird $s_{20} (c=0)$ mit 7.2 Svedberg²⁸ angegeben in guter Übereinstimmung mit unserem Wert von 7.1 Svedberg. Die angegebenen Sedimentationsdaten dürfen also als gesichert angesehen werden.

Fügen wir hinzu, dass der scheinbare Absorptionskoeffizient infolge von Lichtstreuung bei L-Myosinlösungen $\sim 0.1 \text{ cm}^{-1}$ ist — nach Abzentrifugieren sehr feiner

* Dies gilt im Grunde nur streng, wenn η' aus Messungen mit üblichen OSTWALD- oder UBBELOHDE-Viskosimetern ohne HAGENBACH-Korrektur berechnet wird. Mit HAGENBACH-Korrektur hängt $\log \eta'$ nicht mehr ganz geradlinig von der Konzentration ab; die Abhängigkeit folgt dann der Formel von G. V. SCHULZ UND F. BLASCHKE^{18, 29}.

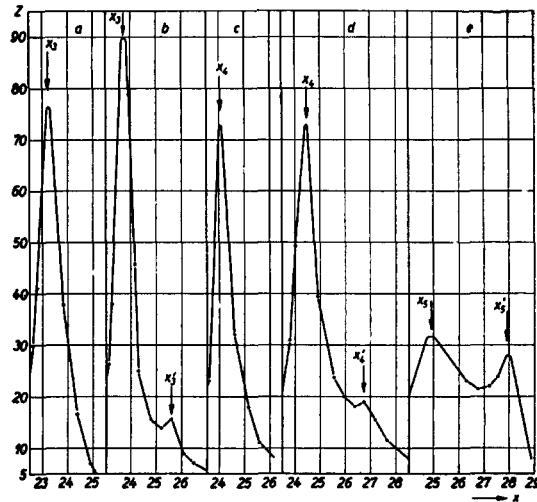


Fig. 5. Sedimentationsgradienten.

Linker Gipfel = L-Myosin mit der Sedimentationsgeschwindigkeit der Kurve 1 der Fig. 1, rechter Gipfel (in b, d und e) denaturiertes L-Myosin mit der Sedimentationsgeschwindigkeit der Kurve 1a der Fig. 1. a) = 1 × "kristallisiert" 4 Tage p.m., b) = 2 × "kristallisiert" 8 Tage p.m., c) = 2 × fraktioniert umgefällt 4 Tage p.m., d) = ebenso, aber 20 Tage p.m., e) = 2 × "kristallisiert", 1 × umgefällt, 9 Tage p.m.

ungelöster Partikel mit 16000 Touren sogar nur 0.05 cm^{-1} , während er bei S-Myosinen und künstlichen Aktomyosinen $\sim 1 \text{ cm}^{-1}$, so ist damit die Identität von S-Myosinen mit Aktomyosinen und von L-Myosinen mit "Myosin" durch Übereinstimmung in allen Eigenschaften bewiesen*.

Zu SZENT-GYÖRGYI's Anschauungen ergibt sich nur in einem wichtigen Punkt eine Differenz: Aktomyosine sedimentieren mit verschiedenen scharf getrennten Sedimentationsgeschwindigkeiten—häufig sogar in derselben Aktomyosinlösung. Die Aktomyosinbildung aus den beiden Komponenten scheint also in Stufen stattzufinden und nicht gleitend in beliebiger Proportion—genau so wie das L-Myosin in scharf getrennten Sedimentationsstufen denaturiert.

Die spärlichen vorläufigen Angaben über Sedimentation und Viskosität des inaktiven und aktiven *Aktin* sind aus Tabelle I zu ersehen.

V

Werden die zahlreichen L-Myosin-Präparationen der Sedimentationskurve I der

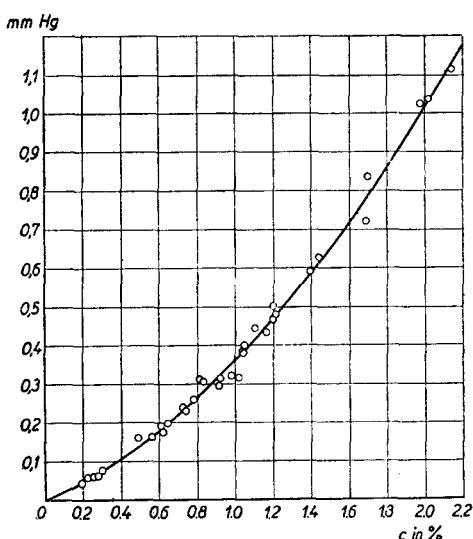


Fig. 6. Osmotischer Druck von L-Myosin

Fig. I auf ihren osmotischen Druck untersucht, so steigt der osmotische Druck bis zur Konzentration 2.2% von 0 auf 1.16 mm Hg (Fig. 6)**. Aus der P/c Kurve (Fig. 7) ergibt sich für $P/c_{\lim 0}$ der Wert $2.05 \cdot 10^{-1}$, d.h. ein Teilchengewicht von 840000 (± 33000).

Aus diesem Teilchengewicht und s_{20} ($c = 0$) errechnet sich $D_{20}(c = 0)$ zu $0.874 \cdot 10^{-7}$. Der vorläufige Mittelwert unserer direkten Bestimmung ergibt $D_{20} = 0.9 \cdot 10^{-7}***$.

Wird aus dem Teilchengewicht und der Sedimentationskonstanten das Achsenverhältnis berechnet, so ergibt es sich zu $1/\zeta = 102$.

Wird das Achsenverhältnis auf Grund der Untersuchungen von G. V. SCHULZ^{28a} über Mischungsentropie und osmotischen Druck berechnet nach der Formel****

$$q = \frac{4 \zeta B}{\pi A} \cdot 10^3$$

so ergibt sich das Achsenverhältnis q zu 128.

* Da der Ausdruck Myosin sehr häufig für die Gesamtfraktion und ihre Lösungen gebraucht wird, erscheint es als eine klare und kurze Bezeichnungsweise, dies weiterhin zu tun, das sogenannte "kristallisierte" Myosin als L-Myosin und die Myosin-Aktin-Komplexe als Aktomyosin zu bezeichnen. Die Ausdrücke Myosin A und B für kurz, bezw. lang extrahierte Gesamtfraktionen würden sich gut in diese Nomenklatur einfügen. Die allgemeine Annahme dieses Vorschlags würde die Verständigung erleichtern.

** Die Methodik der "Messung sehr kleiner osmotischer Drucke" ist von H. PORTZEL und H. H. WEBER beschrieben²⁵.

*** Der in den FIAT-Reviews auf Grund einer einzigen Konzentrationsreihe, die von G. BERGOLD durchgeführt wurde, angeführte Wert für D_{20} ($c = 0$) von $0.45 \cdot 10^{-7}$ hat sich bei Nachprüfung der Unterlagen als unzuverlässig erwiesen und muss fallen gelassen werden, obwohl er mit den Werten übereinstimmt, die PEDERSEN²³ auf mündliche Mitteilung von SNELLMAN, JENOW UND ERDÖS angegeben hat.

**** q = Achsenverhältnis; ζ = Dichte des Eiweiss; A = $p/c_{\lim 0}$; B = $\Delta p/c$; c = Gramm/Liter.

Bei der ausgezeichneten experimentellen Sicherheit der Sedimentationskonstanten und der Kurve des osmotischen Druckes erscheint das Teilchengewicht $\sim 840\,000$ und das Achsenverhältnis ~ 100 recht zuverlässig. Die auf Grund von s_{20} und D_{20} früher^{40, 23, 33} angegebenen Teilchengewichte scheinen dagegen einer sorgfältigen Überprüfung von D_{20} zu bedürfen. Denn die Messungen von D_{20} sind nicht nur bisher widerspruchsvoll sondern auch sehr empfindlich gegen Beimengungen langsam diffundierender Denaturierungsformen des L-Myosin.

Reine Präparate von L-

Myosin scheinen monodispers zu sein. Fig. 8 zeigt ein Sedimentationsdiagramm einer L-Myosinlösung nach Skalenmethode. Berechnet man nach dem Verfahren von BERGOLD³ den Betrag, um den sich die Gradientenkurve vom Zeitpunkt 1 bis zum Zeitpunkt 10 durch Diffusion verbreitert und addiert diesen Betrag zur Breite der Kurve 1, so erhält man die gestrichelte Glockenkurve, die die Gradientenkurve 10 einschließt. Die gefundene Sedimentation ist also einheitlicher, als sie unter Berücksichtigung des Diffusionseffektes hätte sein dürfen. Der Grund liegt in der Zunahme der Sedimentationsgeschwindigkeit mit abnehmender Konzentration: die durch Diffusion zurückgebliebene Teilchen sedimentieren infolgedessen schneller und die Gradientenkurve wird infolgedessen schmäler und in ihrem vorderen Teil steiler, als sie es auf Grund unbeeinflusster Diffusion geworden wäre. Da aber die Konzentrationsabhängigkeit beim L-Myosin nicht gross ist, und da die experimentelle Gradientenkurve nicht unbeträchtlich schmäler ist, als sie bei reiner Diffusion sein müsste, ist es wahrscheinlich, dass die Sedimentationskonstanten aller einzelnen Myosinteilchen gleich sind.

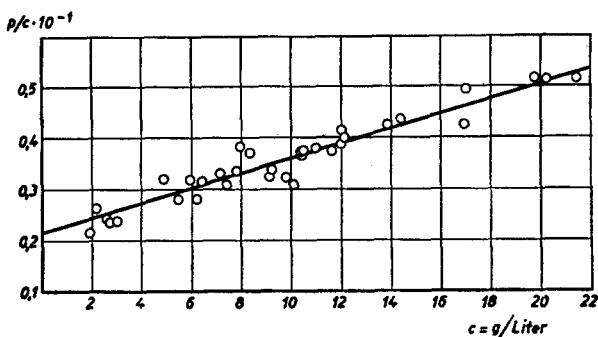


Fig. 7.

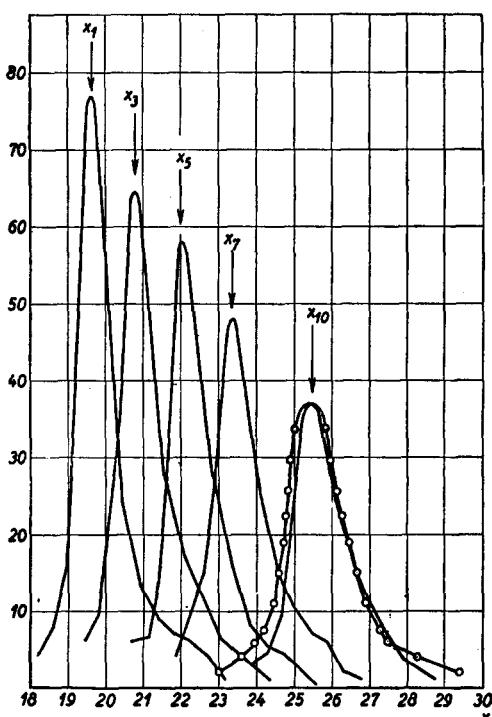


Fig. 8. Sedimentationsgradienten von L-Myosin.
— Sedimentationsgradienten gefunden, o—o—o berechnet aus Kurve x_1 und D_{20} .

experimentell gefundener Diffusionsgradientenkurven zeigt (Fig. 9), dass die Quadrate der Breiten rechts und links der Symmetriearchse (x_1^2 und x_2^2) gleich oder fast gleich sind, und dass beide geradlinig von $\log H$ abhängen. Es handelt sich also um störungsfreie Diffusion mit einheitlicher Diffusionskonstante.

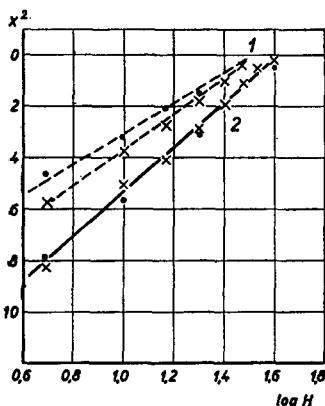
Einheitliche Sedimentations- und Diffusionskonstante aber bedeutet, einheitliche Grösse und einheitliche Gestalt der einzelnen Teilchen des L-Myosin.

Für diese Grösse und Gestalt ergeben sich aus s_{20} und Teilchengewicht und unter der plausibelen Annahme eines spezifischen Volumens von 0.75 folgende Masse: 22 bis 23 Å Dicke bei 2200 bis 2400 Å Länge für quadratischen bzw. runden Querschnitt. Vorläufige frühere Angaben⁴⁰ sind durch diese Werte überholt.

Das β -Myosin DUBUISSONS⁹ scheint mit dem L-Myosin identisch zu sein. Sollte sich das bestätigen, d.h. sollten die Spuren des γ -Myosin mit dem L-Myosin nichts zu tun haben, so wären alle Teilchen des L-Myosin nicht nur in Grösse und Gestalt, sondern auch in ihrer elektrischen Ladung gleich (vergl. auch SZENT-GYÖRGYI³³).

VI

Fig. 9. $x^2 =$ (Breite der Diffusionsgradientenkurve von der Symmetriearchse aus)².
 —— nach rechts = x_1^2 .
 ×—×— nach links = x_2^2 .
 für 2 verschiedene Gradientenkurven (1 und 2).



An MEYERHOF's Entdeckung jenes Zusammenhanges zwischen Kolloidik und Stoffwechsel, der durch die Ionisationswärme der Proteine gegeben ist, schloss sich die erste Periode systematischer Erforschung der Muskelproteine an. Sie führte in der Feststellung der Wechselwirkungen zwischen Adenosintriphosphat und Myosin zu einem neuen Zusammenhang von Stoffwechsel und Eiweisszustand— diesmal sogar Zustand gerade des kontraktilen Proteins. Dieser Zusammenhang gewann eine eindrucksvolle Aktualität dadurch, dass sich Myosinfäden auf ATP-Zusatz bei niedriger Ionenstärke zusammenziehen und bei höherer Ionenstärke wieder ausdehnen (SZENT-GYÖRGYI³², 6). Von neuem folgte systematische Proteinforschung mit dem Ziel einer verfeinerten Analyse gerade der kontraktilen Eiweissfraktion. Diese Analyse steht noch in ihren Anfängen. Infolgedessen kann der Mechanismus der ATP-Wirkung auf Myosin nur mit Zurückhaltung erörtert werden: in Lösung besteht er zweifellos in einer reversiblen Verminderung der Kohäsionskräfte zwischen Aktin und L-Myosin. Das fadenförmige Gel dagegen wird offenbar (s.o.) nicht von ATP sondern von der Ionenstärke reversibel beeinflusst. ATP scheint nur nötig zu sein, damit der Faden beim Übergang von einer Ionenstärke zur anderen das neue Gleichgewicht wirklich erreicht und nicht in einem falschen Gleichgewicht stecken bleibt. ATP macht offenbar die Fadenmoleküle beweglich, d.h. es setzt auch im Gel ihre Kohäsionskräfte herab. Es scheint somit, als genügte der ATP-Einfluss auf die Kohäsionskräfte des Aktomyosin zur Erklärung der bisher vorliegenden Beobachtungen am Gel wie am Sol. Ob dieser Einfluss allerdings das einzige Prinzip der Wirkung ist, muss solange offen bleiben wie man nicht weiß, warum Pyrophosphat auf Aktomyosinlösungen ähnlich oder gleich wirkt wie ATP, während es Aktomyosinfäden nicht beeinflusst³².

Die umgekehrte Wirkung, die Wirkung des Myosins auf das ATP ist einem gewissen, vorläufigen Abschluss der Erkenntnis zugeführt durch die Entdeckungen von POLIS

UND MEYERHOF²⁴. Die ATPase-Wirkung des Myosin ist zusammen mit einer kleinen Eiweissmenge abtrennbar, ohne dass die Wirkung verloren geht! Das ATPase-Ferment-eiweiss gehört also offenbar nur in soweit zum Myosin, als es auf den Myosinkomplex gebunden ist. Auf Grund der Monodispersität dieses Komplexes—eben des L-Myosin—liegt es allerdings nahe anzunehmen, dass es sich hier nicht um einen zufälligen, sondern um einen stöchiometrischen Komplex handelt.

Und so schliesst heute die Betrachtung der Muskeleiweisskörper mit dem Namen O. MEYERHOF, mit dem sie vor einem guten Vierteljahrhundert begann.

ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen eines kurzen zusammenfassenden Berichtes über Muskelproteine werden einige neue Tatsachen gebracht:

1. Die Diskrepanz zwischen der parallelfaserigen Struktur des I-Abschnittes und dem Fehlen von Stäbchendoppelbrechung der I-Bande kann erklärt werden, wenn man annimmt, die Stäbchen beständen aus dem stark negativ doppelbrechenden N-Protein von SZENT-GYÖRGYI. In der I-Bande würden sich dann die positive Stäbchendoppelbrechung dieses Proteins und seine negative Eigen-doppelbrechung gerade aufheben.

2. Die L-Myosinkomponente und die Aktomyosinkomponenten des Myosin können sauber getrennt werden.

3. Es werden für die einzelnen isolierten Komponenten Sedimentationskonstanten, Viskositäten und Werte für die Lichtstreuung angegeben — und ebenso die Änderungen dieser Werte bei Zusatz von ATP oder Aktin.

4. Eine häufig vorkommende Komponente des Myosin besteht aus einer scharf abgegrenzten Denaturierungsstufe des L-Myosin.

5. Aktin und L-Myosin vereinigen sich stufenweise zu Actomyosinen ganz verschiedener Sedimentationskonstanten.

6. Das L-Myosin sedimentiert und diffundiert monodispers.

7. Das L-Myosinteilchen ist ein Stäbchen von 2200–2400 Å Länge und 22–23 Å Dicke.

8. Die beobachteten ATP-Wirkungen können vorläufig sowohl im Sol wie auch im Gel als eine reversible Verminderung der Kohäsionskräfte zwischen L-Myosin und Aktin befriedigend behandelt werden.

SUMMARY

The information available on muscle proteins is reviewed and in addition the following new facts are presented:

1. The discrepancy of the parallel-fibred structure of the I-band and the lack of the form birefringence might be explained by supposing that the micelles consist of the strongly negative birefringent N-Protein of SZENT-GYÖRGYI. Thus the positive form birefringence of this protein is compensated by its own negative birefringence.

2. It is possible to separate completely both components: L-myosin and actomyosin.

3. The sedimentation constants, viscosities, and values for light scattering of the isolated compounds are given. The changes of these values produced by addition of ATP or actin are also indicated.

4. It is shown that one component of the myosin which is frequently found consists of a sharply limited stage of denatured L-myosin.

5. Actin and L-myosin combine step by step to actomyosins of quite different sedimentation constants.

6. The sedimentation and diffusion of L-myosin is monodispers.

7. The L-myosin particle is a micelle with a length of 2200–2400 Å and a diameter of 22–23 Å.

8. The observed effects of ATP in sol as well as in gel may satisfactorily be interpreted as a reversible weakening of the cohesive forces linking L-myosin and actin.

RÉSUMÉ

Quelques faits nouveaux sont décrits dans un rapport sur les protéines du muscle.

1. En supposant que les micelles soient formées par la N-protéine de SZENT-GYÖRGYI à réfraction double négative, il est possible d'interpréter la discordance entre la structure fibrillaire du segment I du muscle et le manque de la réfraction double. Dans ce cas, la positivité de la réfraction double formale pourrait être compensée par la négativité de la réfraction double propre de la même protéine.

2. On peut séparer complètement les deux constituants L-myosine et actomyosine.

3. Les constantes de sédimentation, les viscosités et les valeurs de l'absorption apparente des constituants isolés sont décrites. En plus, les variations de ces valeurs produites par l'addition d'ATP ou d'actine sont données.

4. Il est démontré, qu'un constituant de la myosine fréquemment trouvé est une fraction exactement délimitée de L-myosine dénaturé.

5. L-myosine et actine se combinent en plusieurs étapes formant des actomyosines avec des constantes de sédimentation complètement différentes.

6. La sédimentation et la diffusion de L-myosine sont monodisperses.

7. Une particule de L-myosine a une longueur de 2200–2400 Å et un diamètre de 22–23 Å.

8. A l'état actuel les effets observés de l'ATP, en solution ou en gel, peuvent être interprétés comme une diminution réversible des forces d'union entre L-myosine et actine.

LITERATUR

- 1 W. T. ASTBURY UND S. DICKINSON, *Nature*, 135 (1935) 95, 1765.
- 2 K. BAILEY, *Nature*, 157 (1946) 368; *Biochem. J.*, 43 (1948) 271, 279.
- 3 G. BERGOLD UND G. SCHRAMM, *Naturforschung*, 2b (1947) 108.
- 4 T. BARANOWSKI, *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.*, 260 (1939) 43.
- 5 G. BÖHM UND H. H. WEBER, *Kolloid-Z.*, 61 (1932) 269.
- 6 F. BUCHTHAL, *Acta Physiol. Scand.* 13 (1947) 167.
- 7 G. T. CORI (nach brieflicher Mitteilung).
- 8 H. J. DEUTICKE, *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, 224 (1930) 1, 44.
- 9 M. DUBUSSON, *Experientia*, 2/10 (1946) 1; 3/11 (1947) 1.
- 10 R. E. DUFF, *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.*, 29 (1932) 508.
- 10a J. T. EDSELL UND J. T. EDSELL UND A. V. MURALT, *J. Biol. Chem.*, 89 (1930) 289a, 315.
- 11 W. A. ENGELHARDT UND LJUBIMOVA, *Nature*, 145 (1939) 668; *Biokhimiya*, 4 (1939) 716.
- 12 v. FÜRTH, *Arch. exptl. Path. Pharmakol.*, 36 (1895) 231.
- 13 M. GÉRENDAKS UND A. G. MATOLTSY, *Hung. Acta Physiol.*, 1 (1948) 116, 121, 128.
- 14 N. GRALÉN, *Biochem. J.*, 33 (1939) 1342.
- 15 J. P. GREENSTEIN, *J. Biol. Chem.*, 101 (1933) 602.
- 16 W. HAUMANN UND H. H. WEBER, *Biochem. Z.*, 283 (1935) 146.
- 17 F. KAMP, *Biochem. Z.*, 307 (1941) 226.
- 18 H. KAUMANN UND H. H. WEBER, *Makromolekulare Chemie* (erscheint demnächst).
- 19 O. MEYERHOF, *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, 195 (1925) 22; 204 (1924) 295.
- 20 K. MEYER UND H. H. WEBER, *Biochem. Z.*, 266 (1933) 137.
- 21 D. M. NEEDHAM, J. NEEDHAM, S. C. SHEN UND A. S. C. LAWRENCE, *Nature*, 147 (1941) 766.
- 22 D. NOLL UND H. H. WEBER, *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, 235 (1934) 234.
- 23 K. O. PEDERSEN, *Ann. Rev. Biochem.* (1948) 169.
- 24 D. B. POLIS UND O. MEYERHOF, *J. biol. Chem.*, 169 (1947) 389, 401.
- 25 H. PORTZELH UND H. H. WEBER, *Makromolekulare Chemie* (im Erscheinen).
- 26 H. PORTZELH, G. SCHRAMM UND H. H. WEBER (1943) unveröffentlicht.
- 26a H. PORTZELH UND H. H. WEBER (erscheint demnächst).
- 27 E. ROTH, *Biochem. Z.*, 318 (1946) 74.
- 28 F. O. SCHMITT, C. E. HALL UND JAKUS, *Biol. Bull.*, 90 (1946) 32.
- 28a G. V. SCHULZ, *Z. Naturforsch.*, 2a (1947) 348.
- 29 G. V. SCHULZ UND F. BLASCHKE, *J. prakt. Chem.* 158 (1941) 130.
- 30 O. SNELLMAN UND M. TENOW, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 384.
- 31 G. SCHRAMM UND H. H. WEBER, *Kolloid Z.*, 100 (1942) 242.
- 31a R. STÖVER UND H. H. WEBER, *Biochem. Z.*, 259 (1933) 269.
- 32 SZENT-GYÖRGYI UND Mitarbeiter, *Studies Inst. med. Chem. Univ. Szeged* (G. Karger, Basel, New York) 1 (1942); 2 (1942); 3 (1943); *Hung. Acta Physiol.*, 1 (1948) 2, 3 (1948); 4, 5 (1948).
- 33 SZENT-GYÖRGYI, *Nature of Life*, Academic Press Inc. New York.
- 34 SZENT-GYÖRGYI, *Chemistry of Muscular Contraction*, Academic Press Inc. New York.
- 35 H. H. WEBER, *Biochem. Z.*, 218 (1930) 1.
- 36 H. H. WEBER, *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 235 (1934) 205.
- 37 H. H. WEBER, *Ergeb. Physiol.*, 36 (1934) 109.
- 38 H. H. WEBER, *Naturwissenschaften*, 27 (1939) 33.
- 39 H. H. WEBER, Eiweisskörper als Riesenionen, *Schriften Königsberg Gelehrten-Ges.*, *Naturw. Klasse* H. 4 (1942).
- 40 H. H. WEBER, *FIAT-Review*, Band III, Physiologie Abschnitt Muskel (im Erscheinen).
- 41 C. WOLPERS, *Deut. med. Wochsch.* 29/30 (1944) 495; *Sitzber. Berlin Med. Ges.* von 24-5-45

Eingegangen den 4. April 1949