

³⁴ F. J. WIERCINSKI, *Federation Proc.*, 11 (1952) 172.

³⁵ W. J. BOWEN AND T. D. KERWIN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 49 (1954) 149.

³⁶ S. A. KUBY, L. NODA AND H. A. LARDY, *J. Biol. Chem.*, 210 (1954) 65.

³⁷ L. LORAND, *Arch. Biochem. Biophys.*, 59 (1955) 125.

³⁸ H. KUMAGAI, S. EBASHI AND F. TAKEDA, *Nature*, 176 (1955) 166.

³⁹ S. EBASHI, F. TAKEDA, M. OTSUKA, AND H. KUMAGAI, *Symposium Enzyme Chem.*, (Japanese), 11 (1956) 11.

Received January 21st, 1957

BEWIRKT DAS SYSTEM PHOSPHOKREATIN-PHOSPHOKINASE DIE ERSCHLAFFUNG DES LEBENDEN MUSKELS?

HILDEGARD PORTZEHL

*Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Institut für Physiologie,
Heidelberg (Deutschland)*

I

5 Beobachtungen haben zu der Meinung geführt^{1,2,3,4,5}, die Restitution des ATP nach der Spaltung sei ein wesentlicher Faktor der Muskelererschaffung. Es handelt sich um die folgenden Beobachtungen:

1. BOZLER¹ findet, dass kontrahierte, recht dicke Fasermodelle des Skelettmuskels auf Kreatinphosphatzusatz (CP) bei pH 7 erschaffen, wenn sie sehr kurz extrahiert sind und wenn die vorhergegangene Kontraktion in einem ATP (Adenosin-triphosphat)-Bad von physiologischer Konzentration ($4 \cdot 10^{-3} M$) stattgefunden hat.

2. Die Schule von SZENT-GYÖRGYI^{2,3} findet, dass solche Faserbündel auf Zugabe von CP und CPase (Kreatinphosphokinase) zwar nicht bei pH 7, aber bei pH 6 erschaffen, wenn sie vorher bei pH 7 zur Kontraktion gebracht sind.

3. BENDALL⁴ kommt bei den Versuchen, den "relaxing factor" aus Muskelfasern zu isolieren, zu dem Ergebnis, dass Myokinase und "relaxing factor" identisch seien.

4. Das CP-System kann als System der Erschaffung auch durch Phosphopyruvat und Pyruvatkinase ersetzt werden (LORAND⁵).

5. Auch mit Phosphocarnosin erschaffen Modelle (GOODALL⁶).

Alle die genannten Systeme restituieren gespaltenes ATP. Es ist aber schwer einzusehen, warum die Restitution des gespaltenen ATP nicht nur neues ATP für die Kontraktion zur Verfügung stellt, sondern auch gleichzeitig Erschaffung bewirken soll.

Deshalb wird in dieser und der folgenden Mitteilung überprüft und analysiert, worauf die erschaffende Wirkung eines ATP restituierenden Systems, des CP-Systems, unter den Bedingungen der Versuche von BOZLER einerseits und der SZENT-GYÖRGYI Schule andererseits beruht. In einer weiteren Mitteilung wird gezeigt, dass die Myokinaseaktivität eines Muskelextraktes durch Abtrennung der Muskelgranula nicht abnimmt, während die ganze erschaffende Wirkung sich in den Granula wiederfindet.

II

Die BOZLER'schen Ergebnisse legen die Deutung nahe, dass die erschlaffenden Wirkungen des CP-Systems auf zwei Besonderheiten der Versuchsanordnung beruhen.

1. Die erschlaffenden Wirkungen des CP-Systems treten nur an kurz extrahierten Faserbündeln ein.

2. Die Faserbündel sind aussergewöhnlich dick. Sie bestehen aus ~ 50 Einzel Fasern mit einem Gesamtdurchmesser von ~ 0.5 mm.

Diese Bündel werden zum Versuch zwischen ihrem oberen und unteren Befestigungspunkt mit einer Nadel in etwa 12 Stränge aufgespalten. Trotzdem bleibt der Durchmesser der einzelnen Stränge von 150μ weit über der Warburg'schen Grenzscheidtdicke.

Da so kurz extrahierte Fasermodele noch beträchtliche Mengen des von MARSH⁷ entdeckten "relaxing factors" enthalten, sollte die von BOZLER angewendete ATP-Konzentration von $4-6 \cdot 10^{-3} M$ durchaus überoptimal sein. Dass die BOZLER'schen Faserbündel in ATP-Lösungen dieser Konzentration trotzdem kräftig kontrahieren ist zu erwarten, weil sie so dick sind. Daher muss die ATP-Konzentration "innen" viel niedriger sein als "ausen", so dass die Konzentration "innen" im Gegensatz zur Konzentration "ausen" nicht überoptimal ist (vergl. PERRY²¹). Wird dagegen die ATP-Konzentration "innen" durch die Zugabe von hochkonzentriertem CP (durch Restitution des gespaltenen ATP) der "ausen"-Konzentration angeglichen, so wird sie auch "innen" überoptimal, so dass Erschlaffung auf CP-Zusatz zu erwarten ist.

Die hier gegebene, sehr einfache Interpretation der BOZLER'schen Ergebnisse wird anschliessend experimentell bestätigt.

III

Die ATP-Konzentration im Innern der Modelle und im Bad ist praktisch gleich, wenn an Stelle Wasser-Glycerin extrahierter Faserbündel mit einem Durchmesser von $\sim 500 \mu$, dünne Fibrillenbündel mit einem Durchmesser von $\sim 2 \mu$ verwendet werden.

Es lässt sich mit Hilfe der SCHULZ-MEYERHOF-Formel¹⁸, der bekannten Spaltungsrate des ATP durch Fibrillen und der von HASSELBACH⁹ ermittelten Konstanten für die Diffusionsgeschwindigkeit des ATP im Innern von Fasermodele leicht berechnen, dass die ATP-Konzentration in solchen Fibrillenbündeln von der Oberfläche bis zum Zentrum nur auf ~ 90 bis 99% der Aussenkonzentration absinkt (Tabelle I). Damit ist auch die ATP-Konzentration "innen" am Wirkungsort genügend bekannt.

TABELLE I

DIE ABHÄNGIGKEIT DER [ATP] "INNEN" VON DEM DURCHMESSER DER FIBRILLENBÜNDEL UND DER [ATP] "AUSSEN" (IM STATIONÄREN ZUSTAND DER DIFFUSION)

Fibrillen- durchmesser = $2 r$ in μ	ATP-Gehalt im Zentrum der Fibrille in % der [ATP] aussen von				
	$0.8 \cdot 10^{-3} M$	$2.5 \cdot 10^{-3} M$	$5 \cdot 10^{-3} M$	$7.5 \cdot 10^{-3} M$	$10 \cdot 10^{-3} M$
2	90	96	98	99	99
3	76	92	96	97	98

Die Kontraktion 1 bis 2 μ dicker Fibrillenpräparate lässt sich unter dem Mikroskop als Verkürzung messen und die Wirkung erschlaffender Faktoren durch das Ausbleiben der Verkürzung feststellen.

Das Verfahren setzt voraus, dass die Kontraktion so lange verhindert werden kann, bis die ATP-Konzentration "innen" die Höhe der ATP-Konzentration "ausen" erreicht hat. Denn bei 20° C kontrahieren sich die Fibrillen schon auf die ersten eindringenden ATP-Spuren mit einer Geschwindigkeit von $\sim 200\%$ der Standardlänge pro Sekunde (PORTZEHL, 1954¹⁰).

Es hat sich nun gezeigt, dass die Kontraktion Wasser-Glycerin extrahierter Fasern oder Fibrillen über Minuten hinaus völlig oder fast völlig verhindert wird, wenn das pH ~ 6.3 beträgt und die Temperatur 0° C nicht überschreitet. Deshalb werden im temperaturkonstanten Raum von 0° C die Ansätze mit und ohne CP-CPase, sowie mit und ohne den "Erschlaffungsfaktor" von MARSH⁷ gemischt, die Länge einiger Fibrillen der Fibrillensuspension gemessen und dann der heizbare Objektträger auf 20° C langsam erwärmt. 30 bis 60 Sekunden nach Beginn der Erwärmung sind die Fibrillen auf etwa 20% der Anfangslänge verkürzt, falls keine Hemmung durch Erschlaffungsfaktoren stattgefunden hat, während sie im entgegengesetzten Fall ihre Ausgangslänge behalten.

Die Wirkung von Erschlaffungsfaktoren auf die ATP-Spaltung lässt sich dagegen bei pH ~ 7 und Zimmertemperatur verfolgen. Denn die ATP-Spaltung durch das Aktomyosin der Fibrillen ist nicht beendet, wenn die Kontraktion beendet ist, sondern läuft beliebig lange weiter, wenn genügend ATP angeboten wird. Daher ist es möglich, durch Verwendung sehr dünner Fibrillensuspensionen in einem verhältnismässig grossen ATP-Volumen die Zeit der ATP-Spaltung so lange auszudehnen, dass das, was in den ersten 2 bis 3 Sekunden geschieht, gegenüber der Gesamtspaltung vernachlässigt werden kann.

IV

Fig. 1 zeigt, dass sich Wasser-Glycerin extrahierte und ausgewaschene Fibrillen bei \sim pH 6.3, einer Ionenstärke $\sim 0.17 \mu$ in Mg-Gegenwart um 80% der Anfangslänge verkürzen, wenn die Temperatur von 0° C auf 20° C erhöht wird. Der Betrag dieser Verkürzung ist gleich für alle ATP-Konzentrationen von 0.8 bis $9 \cdot 10^{-3}$. Dies war zu erwarten, weil bei 20° C der überoptimale Bereich der ATP-Konzentration erst mit Konzentrationen $> 10^{-2} M$ beginnt, während wir aus Spaltungsversuchen wissen, dass die der Kontraktion zu Grunde liegende ATP-Spaltung bis herab zu einer ATP-Konzentration $< 5 \cdot 10^{-4} M$ mit der gleichen maximalen Geschwindigkeit verläuft (Vgl. auch Fig. 2b).

Fig. 1. Einfluss des CP-CPase-Systems und des Erschlaffungsfaktors auf die Abhängigkeit der Fibrillenkontraktion von der ATP-Kontraktion. $\mu \sim 0.17$, pH ~ 6.3 , Oxalat $\sim 4 \cdot 10^{-3} M$, $MgCl_2$ 2 $\rightarrow 6 \cdot 10^{-3} M$, Fibrillenkonzentration = 4 mg/ml, \blacktriangle mit ATP, * ATP + 0.01 M CP + 3 \rightarrow 13 mg/ml CPase, \bullet ATP + Faktor, \circ ATP + Faktor + $4.5 \cdot 10^{-3} M$ Ca.

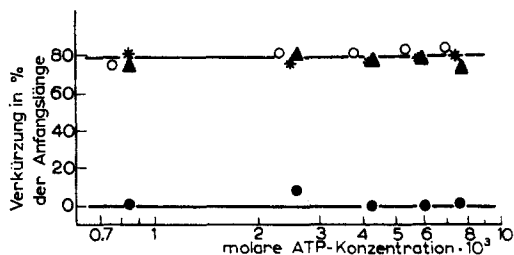


TABELLE II

DIE BESEITIGUNG DES ADP DURCH CP-CPase WÄHREND DER ATP-SPALTUNG DURCH FIBRILLEN
(Ionenstärke $\sim 0.17 \mu$, $0.005M$ $MgCl_2$, $0.005M$ Oxalat, $pH \sim 7$, Temp. $20^\circ C$)

Der Spaltungsansatz enthält				Spaltungs- zeit in Min.	Auftreten von	
CPase mg/ml	Fibrill. mg/ml	ATP $\mu Mol/ml$	CP $\mu Mol/ml$		μMol ADP/ml chromatogr. bestimmt	μMol Kreatin/ml colorimetr. bestimmt
10.3	0.42	4.25	10	0'	kein	0.28
10.3	0.42	4.25	10	2'	kein	0.77
10.3	0.49	7.65	10	0'	—	0.2
10.3	0.49	7.65	10	2'	kein	0.64
5.1	0.49	7.65	10	2'	kein	0.67
5.1	0.49	7.65	10	4'	kein	0.96
5.1	0.49	7.65	10	8'	kein	1.64

Werden den gleichen Ansätzen CP + CPase in einer Konzentration zugesetzt, die das Auftreten von freiem ADP als Folge der ATP-Spaltung vollständig verhindert (Tabelle II)—oder mit anderen Worten, die das ATP ebenso schnell restituiert wie es gespalten wird—so tritt die gleiche Verkürzung mit der gleichen Geschwindigkeit auf wie ohne CP-System. Auch dies gilt für den ganzen Konzentrationsbereich von 1 bis $9 \cdot 10^{-3}M$ ATP (Fig. 1).

Dass die ATP-Spaltung durch die Fibrillen in Gegenwart von CP-System nicht zum Auftreten von papierchromatographisch nachweisbarem ADP führt, zeigt zwar, dass es infolge der Restitution des ATP durch das CP-System nicht zu einer Anhäufung von ADP kommt, aber dieser Test sagt noch nichts darüber aus, wie gross die Lebensdauer des einzelnen ADP-Teilchens zwischen Spaltung und Restitution des ATP ist. Um diese Lebensdauer des einzelnen ADP-Teilchens möglichst kurz zu halten, wurde die CPase-Konzentration bei der Prüfung der Fibrillenkontraktion 200 bis 300 mal höher gehalten, als es nötig ist, um die ATP-Spaltung durch die Fibrillen zu kompensieren. Tabelle III zeigt, dass die Creatinbildung aus CP als Folge der ATP-Restitution* bereits bei einer CPase-Konzentration von 0.035 mg/ml ebenso gross ist wie die gleichzeitige Phosphatabspaltung aus dem ATP durch die Fibrillen (gemessen in Abwesenheit von CP und CPase). Tabelle III zeigt ferner, dass infolgedessen die Transphosphorylierungsgeschwindigkeit dieselbe bleibt, auch wenn die

TABELLE III

ABHÄNGIGKEIT DER KREATINBILDUNG VON DER CPase-KONZENTRATION WÄHREND DER ATP-SPALTUNG DURCH FIBRILLEN

(Ionenstärke 0.16μ , $0.005M$ $MgCl_2$, $0.005M$ K-Oxalat, $pH \sim 7$, Temp. $20^\circ C$)

Im ml Spaltungsansatz sind enthalten an:				gebildetes Kreatin in μMol min · mg Fibr.	ATP-Spaltung ohne CP-CPase $\mu Mol P$ min · mg Fibr.
mg CPase	mg Fibr.	μMol ATP	μMol CP		
0.035	0.89	4.72	11	0.38	} 0.38
0.35	0.89	4.72	11	0.41	
3.5	0.89	4.72	11	0.38	
5.26	0.89	4.72	11	0.36	

* Entsprechend der Gleichung $CP + ADP \rightarrow Cr + ATP$.

CPase-Konzentration um angenähert das 200 fache auf 5.26 mg/ml gesteigert wird. Dies ist ein zweites Argument, dass bereits 0.035 mg/ml CPase die ATP-Spaltung voll kompensieren. Im Kontraktionsversuch aber wurde nicht 0.035 mg/ml, sondern 3 bis 13 mg/ml CPase der gleichen Fibrillenmenge zugegeben.

Es zeigt sich also, dass CP + CPase keinerlei erschlaffende und kontraktionsbehindernde Wirkung besitzt, falls durch das CP-CPase-System die ATP-Konzentration "innen" nicht verändert werden kann, weil sie "innen" und "ausen" von vornherein gleich ist. Die gleichen Fibrillen sind andererseits gegen die Wirkung des von MARSH entdeckten "relaxing factor" ausserordentlich empfindlich. Wird nämlich dieser Marsh-Faktor im aktiven Zustand, d.h. bei völliger Abwesenheit von Ca-Ionen^{11,12}, hinzugefügt, so wird die Verkürzung der Fibrillen bei Erwärmung von 0° auf 20° C vollständig unterdrückt, während die Inaktivierung des Faktors durch Zugabe von Ca-Ionen genügt, um wieder die volle Verkürzung um 80% der Ausgangslänge herbeizuführen (Fig. 1).

Auch auf die ATP-Spaltung wirkt das CP-CPase-System nicht hemmend, wenn die Versuchsanordnung die Möglichkeit ausschliesst, dass das CP-CPase-System die ATP-Konzentration "innen" erhöht und dadurch optimale ATP-Konzentrationen "innen" auf überoptimale Werte anwachsen lässt.

Fig. 2a bestätigt für 10° C und Fig. 2b für 20° C die schon länger bekannte Tatsache, dass die ATP-Spaltung ebenso wie die ATP-Kontraktion zwischen 10^{-3} und $10^{-2} M$ ATP bei 20° C von der ATP-Konzentration vollständig unabhängig ist und bei 10° C nur in Konzentrationen $> 7 \cdot 10^{-3} M$ ATP ein wenig absinkt, falls die Mg-Konzentration $5 \cdot 10^{-3} M$ nicht überschreitet. Die Fig. 2a und 2b zeigen ferner, dass die Gegenwart des von MARSH entdeckten Erschlaffungsfaktors die ATP-Spaltung in dem ganzen fraglichen Bereich der ATP-Konzentrationen bei 10 und 20° C praktisch aufhebt, so lange kein Ca zugegen ist, während Ca-Gegenwart die ursprüngliche Spaltungsgrösse wiederherstellt (Fig. 2b).

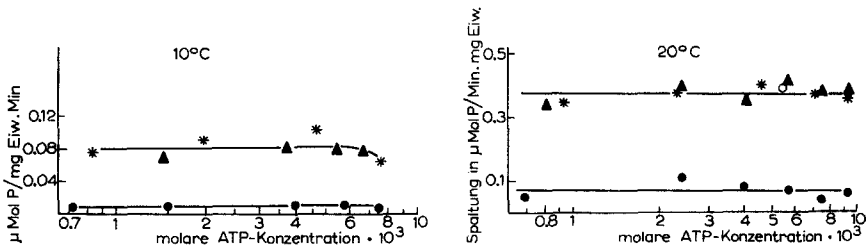


Fig. 2a und 2b: Der Einfluss des Erschlaffungsfaktors und des CP-CPase-Systems auf die Abhängigkeit der ATP-Spaltung von der ATP-Konzentration. (a) Reaktionsbedingungen wie in Fig. 1 doch beträgt das pH abweichend 6.8 und die CPase-Konzentration 0.9 mg/ml. (b) wie (a), doch beträgt das pH 7 und die CPase-Konzentration variiert zwischen 0.03 und 10 mg/ml.

Trotz dieser Empfindlichkeit der Fibrillen gegen den von MARSH entdeckten Faktor spalten diese Fibrillen bei 10° C (Fig. 2a) und 20° C (Fig. 2b) in Anwesenheit von CP + CPase über den ganzen Bereich der ATP-Konzentrationen in genau dem gleichen Umfang wie in Abwesenheit dieses transphosphorylierenden Systems. Dass das System wirklich maximal transphosphoryliert, ergibt sich daraus, dass in jedem einzelnen Versuch eine Menge von Kreatin frei gesetzt und gemessen ist, die dem Betrag an gespaltenem ATP gleich ist.

Die mitgeteilten Versuche zeigen:

1. Die Fähigkeit isolierter Fibrillen, physiologische Konzentrationen an ATP (von 10^{-3} bis $10^{-2}M$) zu spalten und sich dabei zu kontrahieren, wird durch den von MARSH entdeckten Erschlaffungsfaktor unterdrückt.

2. Wenn dagegen CP + CPase—selbst in extrem hohen Konzentrationen—anwesend sind, spalten die gleichen Fibrillen die gleichen ATP-Konzentrationen völlig ungehemmt und kontrahieren sich dabei.

Die Befunde zeigen darüber hinaus, dass das CP-CPase-System weder die Kontraktion durch ATP noch die ATP-Spaltung hemmt, sobald dafür gesorgt ist, dass dieses System nicht in der Lage ist, die ATP-Konzentration im Innern des kontraktile Systems zu erhöhen. Die entgegenstehenden Befunde der Literatur erklären sich tatsächlich daraus, dass das CP-CPase-System die niedrige ATP-Konzentration im Innern dicker Bündel extrahierter Fasern auf die höheren Werte des Aussenbades zu erhöhen vermag. Hierdurch wird die Innenkonzentration häufig überoptimal.

Da aber im *lebenden* Muskel—wie in den Fibrillen—die Innenkonzentration an ATP durch das CP-CPase-System nie erhöht wird, sondern höchstens durch Restitution in der ursprünglichen Höhe erhalten bleiben kann, scheidet das CP-CPase-System als physiologischer Erschlaffungsfaktor aus.

EXPERIMENTELLER TEIL

Herstellung der Fibrillensuspensionen

(a) Für die Kontraktionsversuche wurden die totenstarren Fasern eines Kaninchen-psoas im Starmix 1 Minute (Stufe III) zerkleinert. Dies geschah entweder sofort oder nachdem die Fasern einige Tage in 90%igem Glycerin mit $0.01M$ K-Oxalat bei $-16^{\circ}C$ aufbewahrt waren. Die Zerkleinerung—von 8 g Fasern—geschah in 70 ml $0.01M$ Phosphatpuffer pH 6.2, um einer Quellung vorzubeugen. Die so erhaltene Suspension wurde abzentrifugiert und einmal mit ~ 100 ml $0.1M$ KCl + $0.01M$ Phosphat pH 6.4 gewaschen. Von dem Zentrifugenniederschlag der Waschung wurde nur die oberste Schicht verwendet, die lange Einzelfibrillen und Fibrillenbündel bis zu einem maximalen Durchmesser von 2μ enthält. Die Fibrillen wurden in 80%igem Glycerin + $0.01M$ K-Oxalat bei $-16^{\circ}C$ aufbewahrt. Ihre Kontraktionsfähigkeit wie die Hemmung dieser Kontraktion durch den Erschlaffungsfaktor ist noch nach 10 Tagen solcher Aufbewahrung unverändert. Für die Versuche wurde die Glycerin-haltige Fibrillensuspension nach 50-facher Verdünnung unmittelbar verwendet.

(b) Die Herstellung der Fibrillen für die Spaltungsversuche weicht von dem oben beschriebenen Verfahren im Folgenden ab:

1. Alle Lösungen sind phosphatfrei, um die Empfindlichkeit der Bestimmung der ATP-Spaltung nicht zu verkleinern.

2. wurde in einem doppelt so grossen Volumen einer $0.07M$ KCl + $0.01M$ K-Oxalat-Lösung mit dem Starmix zerkleinert—und zwar 3×3 Min. mit Stufe III, insgesamt also 9 Minuten. Denn die Fibrillensuspension soll so fein und homogen sein, dass die Suspension mit der Pipette abgemessen werden kann, ohne dass der Eiweissanteil des Pipetteninhaltes schwankt.

3. Schliesslich wurden diese Fibrillen $3 \times$ gewaschen, um alle Phosphatreste der Muskelfaser zu beseitigen.

4. Die Aufbewahrung der Suspension fand in 45%igem Glycerin + $0.01M$ K-Oxalat bei $-16^{\circ}C$ statt.

Für den Versuch wurde das Glycerin auf der Zentrifuge ausgewaschen und die Suspension noch 1 Minute mit dem Starmix behandelt, um den zusammenzentrifugierten Bodensatz wieder völlig zu homogenisieren.

Der Fermentgehalt der Fibrillensuspensionen

Die Fibrillensuspension der Kontraktionsversuche enthält nicht unbeträchtliche Mengen an Myokinase und möglicherweise auch etwas CPase. Beides erscheint unwesentlich, weil die Fibrillen in allen Fällen, in denen nicht Erschlaffungsfaktor zugesetzt wird, voll kontrahieren.

Die Fibrillensuspension der Spaltungsversuche enthält sehr wenig CPase: CP-Spaltung $\sim 10\%$ der ATP-Spaltung. Der Myokinasegehalt wurde nicht untersucht.

Literatur S. 482.

Die Herstellung der Kreatinphosphokinase (CPase)

Dies geschah nach der Methode B von KUBY, NODA UND LARDY¹³. Nur auf die Kristallisation wurde verzichtet. Die Wirksamkeit solcher Präparate geht aus Fig. 3 hervor. Die Fig. 3 zeigt, dass durch 1 mg Ferment nach 30 Sek. 46.5 μ Mol Phosphat von CP auf ADP übertragen sind. Da der Ansatz am Anfang 87 μ Mol ADP enthielt, heisst dies, dass nach 30 Sek. über die Hälfte des ADP aufphosphoryliert worden ist.

Aus der anfänglichen ADP-Konzentration von $2 \cdot 10^{-3}M$ und der anfänglichen CP-Konzentration von $5.5 \cdot 10^{-3}M$ berechnet sich mit Hilfe der von KUBY, NODA UND LARDY¹⁴ für $30^\circ C$ ermittelten Michaeliskonstanten für ADP ($K_{ADP} = 8 \cdot 10^{-4}$) und für CP ($K_{CP} = 5 \cdot 10^{-3}$) für diesen Versuch eine Fermentsättigung von $0.68 \text{ ADP} \times 0.5 \text{ CP} = 0.34 = 34\%$ des Fermentes. Für das Substrat-gesättigte Ferment ergibt sich demnach eine Transphosphorylierungsrate von 270 μ Mol Phosphat/mg Ferment·Min. bei $20^\circ C$. Diese Umsatzrate dürfte sich für $30^\circ C$ auf ungefähr 600 μ Mol Phosphat/mg Ferment·Min. erhöhen. Diese Durchschnittsgeschwindigkeit korrespondiert einigermaßen befriedigend mit der von KUBY, NODA UND LARDY¹⁴ für die kristallisierte CPase angegebenen Anfangsgeschwindigkeit 1,100 μ Mol Phosphat/mg Ferment·Min. Denn es handelt sich um die Durchschnittsgeschwindigkeit der Phosphorylierung von mehr als der Hälfte des anwesenden Phosphats.

Die Herstellung des Erschlaffungsfaktors

Die Muskeln des frisch getöteten Kaninchens werden mit dem 3-fachen Volumen einer $0.04M$ KCl + $0.02M$ Histidin + $0.005M$ K-Oxalat-Lösung, pH 7, 2×2 Min. mit dem Starmix (Stufe III) bei etwa $0^\circ C$ zerkleinert. Nach Entfernung der unlöslichen Strukturen (durch Zentrifugieren bei $0^\circ C$, noch etwa 20 Min.) wird der Extrakt auf $0.1M$ KCl, $0.02M$ Histidin, $5 \cdot 10^{-3}M$ K-Oxalat und $4 \cdot 10^{-3}M$ $MgCl_2$ genau eingestellt und in der Regel nicht länger als 4 Tage bei $0^\circ C$ aufbewahrt und gebraucht. Sehr häufig—für die Spaltungsversuche immer—wurden die aus dem Muskel stammenden Phosphate und anderen wasserlöslichen Substanzen des Muskels durch Dialyse gegen die oben angegebene Salzpuffer-Mischung entfernt. Das während der Dialyse ausfallende Myogenfibrin wurde abzentrifugiert.

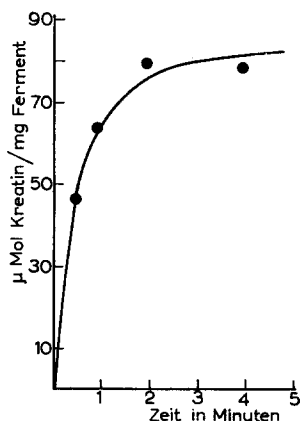


Fig. 3. Die Phosphorylierung von ADP durch das CP-CPase-System. $2 \cdot 10^{-3}M$ ADP, $5.5 \cdot 10^{-3}M$ CP, $5 \cdot 10^{-3}M$ $MgCl_2$, $5 \cdot 10^{-3}M$ K-Oxalat, Ionenstärke $\sim 0.18 \mu$, pH ~ 7 , Temperatur $20^\circ C$.

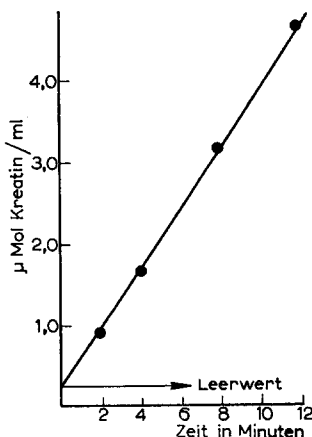


Fig. 4. Die Bildung von Kreatin aus CP in Gegenwart von CPase während der ATP Spaltung durch Fibrillen. $4.7 \cdot 10^{-3}M$ ATP, $0.011M$ CP, 0.35 mg CPaseeiweiss/ml, 0.89 mg Fibrilleneiweiss/ml, $5 \cdot 10^{-3}M$ $MgCl_2$, $5.5 \cdot 10^{-3}M$ K-Oxalat, Ionenstärke $\sim 0.17 \mu$, pH ~ 7 , Temperatur $20^\circ C$.

Das ATP der Firma Pabst, Milwaukee, Wisc. USA. enthielt nach papierchromatographischer Analyse nur $\sim 1\%$ ADP und Spuren von anorganischem Phosphat. Weitere Verunreinigungen fehlten.

Das ADP und das CP stammten von der Sigma Co., St. Louis, USA. Zum Teil wurde das CP auch nach dem Verfahren von ENNOR UND STOCKEN¹⁵ durch Phosphorylierung von Kreatin im Institut hergestellt.

Das Phenylmercuriacetat stammt von der Firma Schuchardt, München, die übrigen Chemikalien waren analysenreine Präparate der Firma Merck, Darmstadt.

Die Bestimmung der ATP-Spaltung erfolgte bei Abwesenheit von Kreatinphosphat durch die Bestimmung des anorganischen Phosphats nach FISKE UND SUBBAROW¹⁶, modifiziert nach ROCKSTEIN UND HARRON¹⁷. In diesem Fall wurde der fermentative Vorgang durch Eiweissfällung mit 10%iger Trichloressigsäure (Trichloressigsäurekonzentration $\sim 4\%$) gehemmt.

Wenn CP und CPase zugegen waren, wurde die ATP-Spaltung in der Regel durch die Bestimmung des freigesetzten Kreatin nach ENNOR UND STOCKEN¹⁸ gemessen. Um den Zerfall des noch intakten CP zu vermeiden, erfolgte die Unterbrechung des Fermentprozesses durch Phenylmercuriacetat nach CHAPPELL UND PERRY¹⁹ und nachfolgender Enteiweissung mit 0.3 N Ba(OH)₂ und 5% ZnSO₄ bei pH 8 nach SOMOGYI²⁰.

Auch unter diesen Umständen hat man mit einigermaßen unregelmässigen Kreatin-Leerwerten infolge der Labilität des CP zu rechnen. Die hierdurch bedingte Ungenauigkeit wird vermieden, wenn das freigesetzte Kreatin nicht als Differenz von Versuch und Leerwert (blank) bestimmt wird, sondern wenn es aus einer Umsatz-Zeitkurve abgelesen wird (vgl. Fig. 4).

Da nämlich die ATP-Spaltung und also auch die Freisetzung des Kreatin gradlinig mit der Zeit verläuft, kann die Geschwindigkeit der Kreatin-Freisetzung aus der Steigung der Geraden abgelesen werden, ohne dass ein parallel bestimmter Leerwert berücksichtigt zu werden braucht. Selbstverständlich erhält man durch den Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate zusätzlich auch noch den Leerwert—aber den Leerwert des Versuches selbst und nicht einer parallelen Kontrolle. Diese Methode hat sich als so überlegen erwiesen, dass sie von ihrer Einführung an ausschliesslich angewendet wurde.

Die Kontraktion der Fibrillen wurde mit dem Phasenkontrastmikroskop (Okular 12.5 + Hilfslinse 1.6, Objektiv Ph II 40/0.65) im 0° C-Raum beobachtet. Es wurde ein Tropfen einer Suspension verwandt, der im Gesichtsfeld 10 bis 20 Fibrillen enthielt. In der Regel wurde die Anfangslänge und der Verkürzungsbetrag an 10 Fibrillen ausgemessen.

Die Verkürzung findet statt bei Erwärmung der Fibrillen auf $\sim 20^\circ$ C. Hierfür wurde Wasser von 20° C durch eine 4 mm dicke Plexiglaskammer geleitet, die den Objektträger ersetzte. Auf diese Kammer wurde ein Deckglas mit einem Tropfen der Fibrillensuspension gelegt, der von einem zweiten Deckglas bedeckt war. So war ein rascher und sauberer Wechsel der Ansätze möglich. Die Erwärmung erfolgt durch Wasser von 20° C mit einer Strömungsintensität von etwa 70 ml/Min. Da die Wand (Plexiglas und Deckglas) zwischen der Suspension und dem Wasserstrom nur eine Dicke von 0.8 mm hatte, war die Suspension ~ 20 Sek. nach Strömungsbeginn auf ungefähr 20° C erwärmt und gleichzeitig die Kontraktion maximal. Trotzdem wurde die Fibrilllänge erst nach einer Minute zum zweiten Mal ausgemessen.

Die Kontraktion lässt sich auch durch die Temperatur von 0° C nur vollständig unterdrücken, wenn der pH saurer als 6.5 ist. Er betrug in der Regel 6.3.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Phosphokreatin (CP) in Gegenwart von Phosphokinase (CPase) bringt ATP-haltige Muskelmodelle nur dadurch zur Erschlaffung, dass das CP-System die ATP-Konzentration "innen" durch Restitution des gespaltenen ATP auf überoptimale Werte erhöht.

2. Es wurde deshalb untersucht, wie weit die ATP-Kontraktion und die ATP-Spaltung durch das CP-CPase-System beeinflusst werden, wenn als Modelle Fibrillen-Bündel mit einem Radius $\sim 1 \mu$ verwendet werden. Denn im Innern so dünner Fibrillenbündel ist die ATP-Konzentration—im Gegensatz zum Innern von Fasern—von vornherein praktisch ebenso hoch wie im Aussenbad. Sie kann infolgedessen auch durch die Aktion des CP-CPase-Systems nicht weiter erhöht werden.

3. Diese Fibrillenbündel verkürzen sich in Gegenwart und Abwesenheit des CP-CPase-Systems in genau gleichem Umfang. Dies gilt auch dann, wenn das CP-CPase-System in einer Konzentration zugegen ist, die 300 mal grösser ist als die Konzentration, die die ATP-Spaltung durch die Fibrillen gerade kompensiert.

4. Dagegen verschwinden ATP-Kontraktion und -Spaltung sofort und vollständig, wenn den gleichen Fibrillenbündeln der von MARSH entdeckte "relaxing factor" des lebenden Muskels im aktiven Zustand zugesetzt wird.

5. Erschlaffungsfaktor und CP-CPase-System sind also nicht identisch. Vielmehr ist der Erschlaffungsfaktor das einzige bisher bekannte physiologische Agens, das in der Lage ist, die Erschlaffung und den Ruhezustand des lebenden Muskels zu bewirken, solange dieser Faktor im aktiven Zustand ist.

SUMMARY

1. Phosphocreatine (CP) in the presence of phosphokinase (CPase) produces relaxation in ATP-containing muscle models only as a result of the CP system raising the ATP concentration inside the muscle model to overoptimal values by restitution of the split ATP.

2. It has therefore been investigated to what extent the ATP contraction and the ATP

splitting are influenced by the CP-CPase system, when fibril bundles with a radius of *ca.* $1\ \mu$ are used as models. Inside such a thin fibril bundle (in contrast to the interior of fibre models) the ATP concentration is, to begin with, practically as high as in the bath. Consequently it cannot be increased further even by the action of the CP-CPase system.

3. These fibril bundles contract in exactly equal extent in the presence and absence of the CP-CPase system. This also holds good when the CP-CPase system is present in a concentration 300 times greater than that which exactly compensates the ATP splitting by the fibrils.

4. On the other hand, ATP contraction and splitting disappear immediately and completely when the "relaxing factor" of living muscles (discovered by MARSH) is added in the active state to the same fibril bundles.

5. Relaxing factor and CP-CPase system are thus not identical. Further, the relaxing factor is the only physiological agent known at present that is able to bring about relaxation and a state of rest in living muscle, as long as it is in the active state.

LITERATUR

- ¹ E. BOZLER, *J. Gen. Physiol.*, 37 (1953) 63.
- ² M. C. GOODALL UND A. G. SZENT GYÖRGYI, *Nature*, 172 (1953) 84.
- ³ L. LORAND, *Nature*, 172 (1953) 1181.
- ⁴ J. R. BENDALL, *Proc. Roy. Soc. (London)*, B, 142 (1954) 409.
- ⁵ L. LORAND UND C. M. MOOS, *Federation Proc.*, 15 (1956) 121.
- ⁶ M. C. GOODALL, *Nature*, 178 (1956) 539.
- ⁷ B. B. MARSH, *Nature*, 167 (1951) 1065; *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1952) 247.
- ⁸ O. MEYERHOF UND W. SCHULZ, *Pflügers Arch. Physiol.*, 217 (1927) 547.
- ⁹ W. HASSELBACH, *Z. Naturforsch.*, 7b (1952) 334.
- ¹⁰ H. PORTZEHL, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 195.
- ¹¹ J. R. BENDALL, *Nature*, 170 (1952) 1058; *Proc. Roy. Soc. (London)*, B, 139 (1952) 523; *J. Physiol.*, 121 (1953) 232.
- ¹² W. HASSELBACH UND H. H. WEBER, *Biochim. Biophys. Acta*, 11 (1953) 160.
- ¹³ S. A. KUBY, L. NODA UND H. A. LARDY, *J. Biol. Chem.*, 209 (1954) 191.
- ¹⁴ S. A. KUBY, L. NODA UND H. A. LARDY, *J. Biol. Chem.*, 210 (1954) 65.
- ¹⁵ A. H. ENNOR UND L. A. STOCKEN, *Biochem. J.*, 43 (1948) 190.
- ¹⁶ C. H. FISKE UND Y. SUBBAROW, *J. Biol. Chem.*, 66 (1925) 375.
- ¹⁷ M. ROCKSTEIN UND P. W. HARRON, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 1500.
- ¹⁸ A. H. ENNOR UND L. A. STOCKEN, *Biochem. J.*, 42 (1948) 557.
- ¹⁹ J. B. CHAPPELL UND S. V. PERRY, *Biochem. J.*, 57 (1954) 421.
- ²⁰ M. SOMOGYI, *J. Biol. Chem.*, 160 (1945) 69.
- ²¹ S. V. PERRY UND T. C. GREY, *Biochem. J.*, 64 (1956) 184.

Eingegangen den 3. Januar 1957

THE INFLUENCE OF RELAXING FACTOR ON THE pH DEPENDENCE OF THE CONTRACTION OF MUSCLE MODELS

F. N. BRIGGS*, ** AND H. PORTZEHL

*Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Institut für Physiologie,
Heidelberg (Deutschland)*

I

In the experiments of BOZLER¹ the system phosphocreatine-phosphokinase (PC system) produces relaxation (through ATP restitution) by increasing the ATP concentration inside the muscle fiber model to the overoptimal concentration of the bath*** (see the preceding report of PORTZEHL).

* Postdoctoral Research Fellow, National Heart Institute, U.S. Public Health Service.

** Present address: Department of Pharmacology, Harvard Medical School, Boston.

*** Physiological ATP concentrations are over-optimal if the models contain sufficient relaxing factor.