

ACKNOWLEDGEMENT

The author is much indebted to Miss M. POLAK for the assistance given during the course of this investigation.

SUMMARY

The photochemical esterification of inorganic phosphate into adenosine triphosphate by chloroplasts was investigated under anaerobic conditions in the presence of either vitamin K₃ or flavin mononucleotide. Evidence is presented in support of the conclusion that vitamin K₃ and flavin mononucleotide are involved in separate pathways for photosynthetic phosphorylation. A tentative scheme for the generation of adenosine triphosphate in chloroplasts, consistent with this conclusion, is given.

REFERENCES

- ¹ J. S. C. WESSELS, *Rec. trav. chim.*, 73 (1954) 529.
- ² F. R. WHATLEY, M. B. ALLEN AND D. I. ARNON, *Biochim. Biophys. Acta*, 16 (1955) 605.
- ³ D. I. ARNON, F. R. WHATLEY AND M. B. ALLEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 16 (1955) 607.
- ⁴ D. I. ARNON, M. B. ALLEN AND F. R. WHATLEY, *Biochim. Biophys. Acta*, 20 (1956) 449.
- ⁵ F. R. WHATLEY, M. B. ALLEN, L. L. ROSENBERG, J. B. CAPINDALE AND D. I. ARNON, *Biochim. Biophys. Acta*, 20 (1956) 462.
- ⁶ K. LOHMANN AND L. JENDRASSIK, *Biochem. Z.*, 178 (1926) 419.
- ⁷ M. KUNITZ AND M. R. McDONALD, *J. Gen. Physiol.*, 29 (1946) 393.
- ⁸ A. KORNBERG, *J. Biol. Chem.*, 182 (1950) 805.
- ⁹ L. BERGER, M. W. SLEIN, S. P. COLOWICK AND C. F. CORI, *J. Gen. Physiol.*, 29 (1946) 379.
- ¹⁰ H. E. DAVENPORT AND R. HILL, *Proc. Roy. Soc. (London)*, B., 139 (1952) 327.
- ¹¹ H. LUNDEGARDH, *Physiol. Plantarum*, 7 (1954) 375.
- ¹² L. N. M. DUYSENS, *Science*, 121 (1955) 210.
- ¹³ M. D. KAMEN AND L. P. VERNON, *J. Biol. Chem.*, 211 (1954) 663.

Received January 28th, 1957

PHOSPHAT-AUSTAUSCH ZWISCHEN ATP UND AD³²P
DURCH HOCHGEREINIGTE AKTOMYOSIN-PRÄPARATE UND
GEWASCHENE MUSKELFIBRILLEN

I. MITTEILUNG

G. ULBRECHT UND M. ULBRECHT

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

I

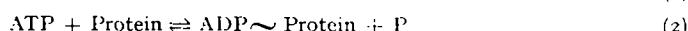
Es herrscht weitgehende Übereinstimmung darüber, dass die Energie für den Kontraktionszyklus aller Muskeln durch Spaltung der endständigen Bindung der Triphosphatkette der Nukleosid-tri-Phosphate — besonders des ATP — geliefert wird. Es bestehen gegensätzliche Meinungen darüber, ob diese Energie in der Kontraktionsphase (vergl. WEBER^{1,2}, HILL³ und DUBUSSON⁴) oder aber in der Erschlaffungsphase (KUHN⁶, Literatur S. 109.

MORALES⁸ u.a.^{5,7,9}) benötigt wird. Die Frage nach dem Mechanismus der Energieübertragung wird durch solche Differenzen nur mittelbar berührt.

Für den Betriebsstoffwechsel wissen wir, seit den bahnbrechenden Untersuchungen von MEYERHOF und seiner Schule, dass die Übertragung der Energie sog. energiereicher Phosphat-Bindungen in der Regel dadurch erfolgt, dass Phosphat aus einer energiereichen Bindung an die erste Substanz in eine energiereiche Bindung an die zweite Substanz hinüberwechselt.

II

Nimmt man an, dass dieses Reaktionsschema auch für die Übertragung von ATP-Energie⁸ auf das kontraktile Protein gilt, so ergeben sich folgende zwei Möglichkeiten:



Wenn das jeweilige ATP-Bruchstück energiereich an das Protein gebunden ist, müssen die formulierten Reaktionen reversibel sein. Dann aber sollten unter günstigen Umständen die beiden angegebenen Möglichkeiten mit Hilfe von ³²P einer experimentellen Prüfung zugänglich sein. Es sollte nämlich durch Rückreaktion nach der Formel (1) gezeichnetes ATP entstehen, wenn für den Spaltungsansatz ungezeichnetes ATP verwendet und gezeichnetes ADP in einigermassen beträchtlicher Konzentration hinzugefügt wird. Im Falle der Gültigkeit der Formel (2) sollte der gleiche Effekt auftreten, wenn radioaktives anorganisches Phosphat im Spaltungsansatz anwesend ist.

Es zeigt sich, dass ³²P gezeichnetes ATP nie entsteht, wenn die Spaltung durch Aktomyosin-Präparate in Gegenwart von radioaktivem anorganischem Phosphat stattfindet¹⁰ (vergl. Tab. I). Diese Unmöglichkeit AT³²P durch Zusatz von radioaktivem anorganischem Phosphat zu erhalten, beruht nicht darauf, dass die Protein-ADP-

TABELLE I

AUSTAUSCHVERSUCHE IN GEGENWART VON ³²P

Eiweißpräparat	Temp.	Gift Art u. molare Konz.	[ATP] mol	[Mg ⁺⁺] mol	[³² P] mol	Aktivitäts- zunahme im ATP
Fibrillen	20°C	—	0.0025	0.001	0.02	—
Fibrillen	20°C	—	0.0125	0.001	0.016	—
Fibrillen	0°C	—	0.003	0.0007	0.007	—
Fibrillen	20°C	Fuadin* 0.0044	0.003	0.0013	0.02	—
Fibrillen	20°C	Fuadin* 0.0087	0.003	0.0013	0.02	—
Fibrillen	20°C	Fuadin* 0.013	0.003	0.0013	0.02	—
Fibrillen	20°C	Germanin** 0.0006	0.003	0.0013	0.02	—
Fibrillen	20°C	Salyrgan*** 0.0005	0.01	0.001	0.008	—
Myosin	20°C	—	0.005	0.006	0.005	—
Myosin	0°C	—	0.005	0.006	0.005	—

* Fuadin = Antimon-bis(brenzkatechin-Na-disulfonat).

** Germanin = Suramin = Na₆-N,N'-bis(m-aminobenzoyl-m-amino-*p*-methylbenzoyl-1-naphthylaminotrisulfonat)-carbamid.

*** Salyrgan = Mersaly = *o*-[(3-Hydroxymercuri-2-methoxypropyl)-carbamyl]-phenoxyessigsäure.

§ Anmerkung: ATP = Adenosintriphosphat, ADP = Adenosindiphosphat, P = anorg. Phosphat

Literatur S. 109.

Verbindung so schnell weiter gespalten wird, dass für eine Rückreaktion keine Zeit bleibt; denn diese Rückreaktion tritt auch dann nicht auf, wenn die konkurrierende Weiterreaktion durch Vergiftung der Aktomyosin-ATP-ase oder durch tiefe Temperaturen sehr stark gehemmt wird, Tab. I. Diese Versuche schliessen also eine Reaktion nach Formel 2 aus. Wenn dagegen die ATP-Spaltung in Gegenwart von radioaktivem ADP und inaktivem ATP verläuft, wird immer gezeichnetes ATP erhalten, falls Mg^{++} zugegen sind (vergl. Tab. II und Fig. 1 und 2).

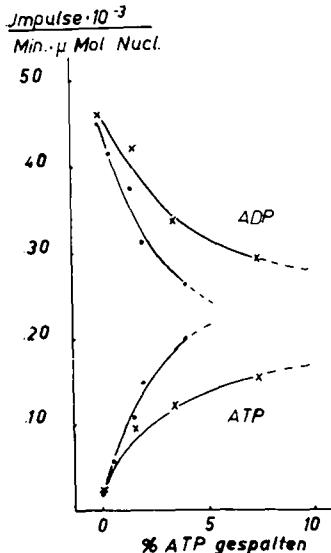


Fig. 1. Aktomyosin: Aktivitätsaustausch zwischen ATP und $AD^{32}P$ in Abhängigkeit vom Spaltungsgrad. Ordinate: spezifische Aktivität in Impulsen $min^{-1} \mu Mol Nukleotid^{-1}$. Abszisse: gespaltenes ATP in % der Ausgangsmenge. \times — \times $20^{\circ}C$; \bullet — \bullet $0^{\circ}C$. ATP = $0.0033 M$, $AD^{32}P$ = $0.0033 M$, $MgCl_2$ = $0.006 M$, pH = 7, Eiweiss = 0.12% , Ionenstärke = 0.26μ .

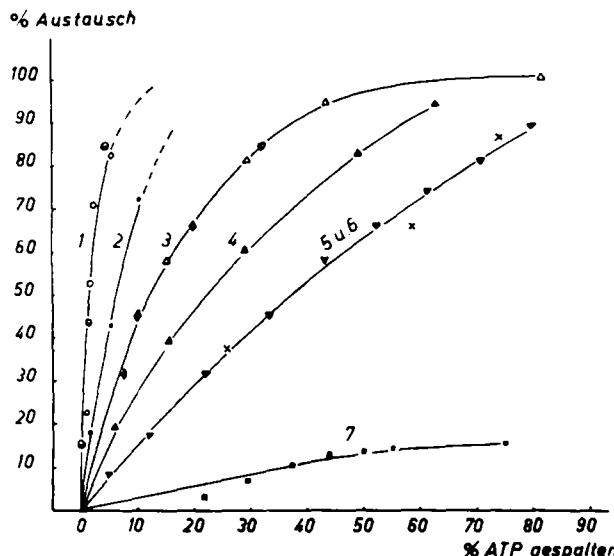


Fig. 2. Beziehung zwischen Austausch- und Spaltungsgrad von Aktomyosin- und Fibrillen-Präparaten unter verschiedenen Bedingungen. Ordinate: spezifische Aktivität im ATP in % der maximal möglichen Aktivität. Abszisse: gespaltene ATP-Menge in % der Anfangsmenge. Kurve 1: Aktomyosin $0^{\circ}C$ \bullet — \bullet 0.26μ ; \circ — \circ 0.08μ ; Kurve 2: Aktomyosin $0^{\circ}C$ \bullet — \bullet 0.08μ ; Kurve 3: Aktomyosin $20^{\circ}C$ \blacklozenge — \blacklozenge 0.26μ , \bullet — \bullet 0.4μ , \triangle — \triangle 0.08μ ; Kurve 4: Aktomyosin $20^{\circ}C$ \blacktriangle — \blacktriangle 0.18μ ; Kurve 5: Fibrillen $0^{\circ}C$ \times — \times 0.1μ ; Kurve 6: Fibrillen $20^{\circ}C$ \blacktriangledown — \blacktriangledown 0.18μ in Gegenwart von $0.01 M$ Fuadin; Kurve 7: Fibrillen $20^{\circ}C$ \blacksquare — \blacksquare 0.18μ .

Die Geschwindigkeit, mit der Phosphatreste zwischen $AD^{32}P$ und ATP ausgetauscht werden, ist unter verschiedenen Bedingungen außerordentlich verschieden.

Diese Geschwindigkeit ist immer dann gross, wenn Präparate aus gereinigtem Aktomyosin verwandt werden. Sie ist im Gegensatz zur Spaltungsrate für ein gegebenes Aktomyosin-Präparat von der Ionenstärke nicht deutlich abhängig (vergl. Tab. II). Die Geschwindigkeit des Phosphat-Austausches ist immer grösser als die Spaltungs geschwindigkeit des ATP; die Austauschrate erreicht den 20-fachen Wert der Spaltungsrate, wenn die Spaltungsrate niedrig ist (d.h. bei hoher Ionenstärke und Mg^{++} -Gegenwart, Tab. II Spalte 6, Fig. 2).

Nun ist seit langem bekannt (SZENT-GYÖRGYI^{13,14} und HASSELBACH¹²), dass die ATP-Spaltung — im Gegensatz zum Phosphat-Austausch — etwa von 0.1 – 0.3μ außerordentlich stark abnimmt. Dieser Abfall der Spaltungsgeschwindigkeit wird darauf

TABELLE II

AUSTAUSCHRÄTEN VON AKTOMYOSIN- UND FIBRILLEN-PRÄPARATEN BEI 0°C UND 20°C
(Berechnung siehe methodischer Teil)

Präparat	Ionenstärke	[ATP] 10 ³ mol	[ADP] 10 ³ mol	Austauschrate*	Spaltungsrate*	Quotient: Spalte 4 Spalte 5
Aktomyosin 20	0.18	3.4	4.9	0.95	0.020	1.7
Aktomyosin 20	0.26	3.25	3.3	0.95	0.01	9.5
Aktomyosin 20	0.8	3.2	4.3	0.1	(0.027)	(3.7)
Aktomyosin 0	0.08	3.5	3.2	0.020	0.005	5.2
Aktomyosin 0	0.26	3.1	3.3	0.023	0.001	23
Aktomyosin 0	0.4	5.2	5.2	0.023	0.001	23
Aktomyosin 0	0.43	5.5	4.8	0.02	0.0015	13
Fibrillen ** 20	0.18	3.5	7.2	0.014	0.13	0.11
Fibrillen + Fuadin 0.01M	0.18	3.5	5.4	0.023	0.019	1.2
Fibrillen 0	0.1	5.5	4.4	0.009	0.012	0.75
Fibrillen 0**	0.4	5.0	4.4	0.009	0.0009	10
Fibrillen 0	0.4	5.3	4.6	0.0063	0.0009	7

MgCl₂ = 0.005-0.006M.

* Austausch- bzw. Spaltungsrate in $\mu\text{Mol P min}^{-1} \text{mg Eiweiss}^{-1}$.

** Diese Fibrillen sind zusätzlich zur Entfernung von Myokinase 15 Std. in 0.1M KCl und 0.05M NaHCO₃ bei pH 8.5 suspendiert worden (7 mg Eiweiss/ml). Danach wurde 1 mal mit 0.01M Boratpuffer von pH 7 gewaschen. Die Spaltungsrate beträgt nach der Behandlung nur 0.13 $\mu\text{Mol P min}^{-1} \text{mg Eiweiss}^{-1}$ gegenüber 0.35 $\mu\text{Mol P min}^{-1} \text{mg Eiweiss}^{-1}$ vor der Behandlung. Über die Sicherheit der Angaben über "Austauschräten" von Fibrillen siehe Abschnitt III.

bezogen, dass Aktomyosin bei Ionenstärken $< 0.1 \mu$ in jedem Falle assoziiert ist und bei Ionenstärken $> 0.3 \mu$ in ATP-Gegenwart vollständig dissoziiert ist^{12, 15}. Dass der Phosphat-Austausch (im Gegensatz zur Spaltung) von diesen Strukturänderungen des Proteins nicht oder nicht wesentlich beeinflusst wird, weist darauf hin, dass die Transphosphorylierung ausschliesslich auf eine der beiden Komponenten des Aktomyosins erfolgt – unabhängig davon, ob diese Komponente frei oder an die andere Aktomyosin-Komponente gebunden ist.

Der Phosphat-Austausch verläuft bei 20°C etwa 4 mal so schnell wie bei 0°C (Tab. II, Spalte 4), während die Spaltung bei 20°C etwa 10 mal so schnell verläuft wie bei 0°C (Tab. II, Spalte 5). Infolgedessen ist die vollständig gleiche Verteilung des gezeichneten Phosphats bei 0°C bereits vollendet, wenn 7-10% des ATP gespalten sind, bei 20°C dagegen erst, wenn etwa 20-25% gespalten sind (Fig. 1). Während der Temperaturkoeffizient der Spaltung hier wie in zahlreichen früheren Beobachtungen ähnlich 3 ist, ist der Temperaturkoeffizient des Phosphat-Austausches deutlich niedriger (ähnlich 2).

III

Werden anstelle von Aktomyosin-Lösungen oder Aktomyosin-Flocken 10 mal gewaschene Muskelfibrillen (nach Aufbewahrung in Glycerin, vergl. methodischer Teil) als Enzym der ATP-Spaltung verwendet, so variiert die Austauschrate sehr stark mit den experimentellen Bedingungen.

Werden die Fibrillen bei 20°C in einer Lösung von 0.18 μ suspendiert, so ist die Austauschrate zwischen AD³²P und ATP niedrig, alles ATP ist gespalten, lange bevor

das ^{32}P auf ADP und ATP gleichmässig verteilt ist (Tab. II, Spalte 6 und Fig. 2, Kurve 7).

Dagegen wird völliger Ausgleich des ^{32}P erreicht (wenn 85% ATP gespalten sind) falls die ATP-Spaltung durch Erniedrigung der Temperatur auf 0°C oder aber (bei 20°C) durch Fuadin* auf etwa 10% der normalen Spaltungsgeschwindigkeit herabgesetzt wird (Tab. II, Spalte 6 und Fig. 2, Kurve 5 und 6).

Diese Ergebnisse sind den Ergebnissen mit gereinigtem Aktomyosin grundsätzlich gleich. Quantitativ unterscheiden sie sich dagegen dadurch, dass vollständiger Ausgleich entweder nicht oder aber erst bei deutlich höheren Spaltungsgraden des ATP erreicht wird (Fig. 2).

Dieser Unterschied dürfte in erster Linie darauf beruhen, dass in Aktomyosin-Lösungen und angenähert auch in sehr lockeren Aktomyosinflocken das gezeichnete und das ungezeichnete ATP etwa gleich schnell gespalten werden, denn die Aktomyosin-Lösungen sind homogen. In den Fibrillen-Suspensionen dagegen ist die Wahrscheinlichkeit, dass das gezeichnete ATP gespalten wird, viel grösser als die Spaltungswahrscheinlichkeit des ungezeichneten ATP. Das im Innern der Fibrillen gebildete gezeichnete ATP erlangt erst die gleiche Spaltungswahrscheinlichkeit wie das ungezeichnete ATP, sobald es aus den Fibrillen herausdiffundiert ist. Vorher aber wird schon ein grosser Teil in der Fibrille gespalten. Dieser gefährliche Diffusionsweg nach aussen fällt aber in Aktomyosin-Lösungen fort.

Da die Wahrscheinlichkeit, auf dem Diffusionsweg aus der Fibrille heraus gespalten zu werden bei 0°C viel kleiner ist als bei 20°C, kann der Temperaturkoeffizient der Austauschreaktion in Versuchen an Fibrillen nicht bestimmt werden. Er kann ausschliesslich aus den Ergebnissen mit gereinigtem Aktomyosin entnommen werden (siehe oben Abschnitt II).

IV

Wird die Mg^{++} -Aktivierung der ATP-Spaltung durch Aktomyosin durch eine Ca^{++} -Aktivierung ersetzt, so bleibt der Phosphat-Austausch zwischen AD^{32}P und ATP aus (Fig. 3). Diese Sonderstellung der Ca^{++} -Ionen korrespondiert mit der schon lange bekannten Tatsache^{12, 16, 17, 34}, dass Ersatz der Mg^{++} -Aktivierung durch Ca^{++} -Aktivierung weder zu einer Kontraktion noch zu einem Weichmachereffekt von gelartigen Aktomyosinmodellen führt und ebenso auch den Viskositätsabfall von Aktomyosinsolen auf Zusatz von ATP unmöglich macht.

Diese Sonderstellung der Ca^{++} erklärt ferner, warum frühere Autoren, die mit Ca^{++} aktivierte (KOSHLAND¹⁰, GERGELY¹¹) nicht in der Lage waren, einen durch Aktomyosin-Präparate bewirkten Phosphat-Austausch zwischen AD^{32}P und ATP zu beobachten.

V

Aus totenstarren Fibrillen lässt sich nach HASSELBACH¹⁸ und HANSON UND HUXLEY¹⁹ selektiv das L-Myosin extrahieren. Das Aktin bleibt dabei in der Fibrille zurück. Eine Gewichtseinheit der Fibrillen spaltet ATP nach der Extraktion nur noch mit etwa 10% der ursprünglichen Geschwindigkeit. Dagegen bleibt der Phosphat-Austausch

* Fuadin = Antimon-bis(brenzkatechin-disulfosaures Natrium).

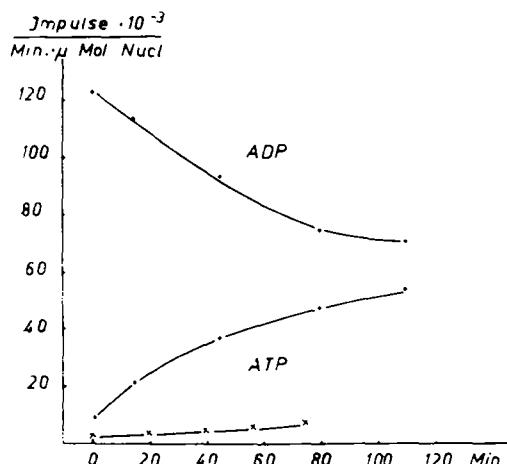


Fig. 3. Aktivitätsaustausch zwischen ATP und AD³²P durch Aktomyosin-Sol in Gegenwart von Mg⁺⁺ bzw. Ca⁺⁺. Ordinate: spezifische Aktivität in Impulsen min⁻¹ μMol Nukleotid⁻¹. Abszisse: Zeit in Minuten. ●—● MgCl₂, 0.006 M; ×—× CaCl₂, 0.006 M. ATP = 0.0055 M, AD³²P = 0.0048 M, pH = 7.0. Temp. 0°C, Eiweiss = 0.23 %, Ionenstärke = 0.43 μ. — 0.005 M, AD³²P = 0.0044 M, MgCl₂ = 0.006 M, Ionenstärke = 0.4 μ, pH = 7.0, Temp. 0°C.

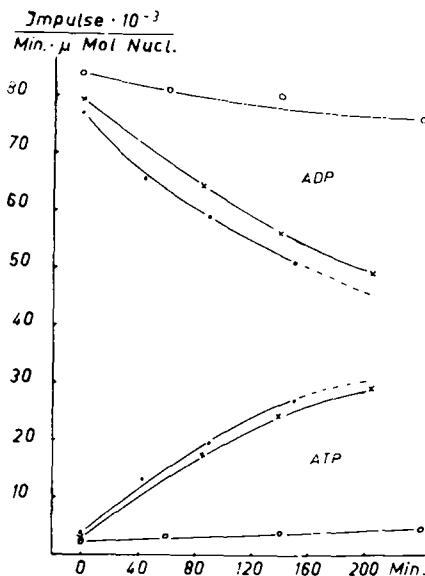


Fig. 4. Die zeitliche Änderung der spezifischen Aktivität von ATP- und ADP-Fraktion durch Fibrillen, extrahierte Fibrillen und den Fibrillen-Extrakt ~ L-Myosin. Ordinate: spezifische Aktivität in Impulsen min⁻¹ μMol Nukleotid⁻¹. Abszisse: Zeit in Minuten. ●—● normale Fibrillen, 3.1 mg Eiweiss/ml; ×—× extrahierte Fibrillen, 1.7 mg Eiweiss/ml*; ○—○ Fibrillen-Extrakt = L-Myosin, 1.7 mg Eiweiss/ml. ATP = 0.005 M, AD³²P = 0.0044 M, MgCl₂ = 0.006 M, Ionenstärke = 0.4 μ, pH = 7.0, Temp. 0°C.

durch die Extraktion vollständig unverändert, wenn der Austausch auf die Gewichtseinheit der Fibrillen-Präparation vor der Extraktion bezogen wird (Fig. 4). Wird dagegen die Austauschrate auf die Gewichtseinheit der Fibrillenschatten nach der Extraktion berechnet, wächst die Austauschrate auf etwa das Doppelte an, da ungefähr die Hälfte des ursprünglichen Fibrilleneiweiss durch die Extraktion entfernt ist. Dieses Ergebnis bedeutet, dass die Substanz, die den Austausch bewirkt, bei der Extraktion vollständig in den Fibrillenschatten zurückbleibt. Dieser Schluss wird durch die Erfahrung bestätigt, dass der Extrakt aus den Fibrillen zwar ATP spaltet, aber Phosphat zwischen ATP und AD³²P nicht austauscht (Fig. 4).

Ein solcher Extrakt enthält im Wesentlichen L-Myosin (vergl. HASSELBACH¹⁸) neben einem bescheidenen Anteil des X-Protein der SZENT-GYÖRGYI-Schule^{20, 21}. Wird hochgereinigtes L-Myosin nach den klassischen Verfahren²² hergestellt, findet ebenfalls praktisch kein Austausch von Phosphat statt: Die beobachtete Austauschrate beträgt bei 0°C wie bei 20°C nur 2–5 % der Austauschrate von Aktomyosin-Präparaten. Das Gleiche gilt auch für L-Myosin, das durch Zentrifugation von Aktomyosin-Lösungen bei 100,000 g in Gegenwart von ATP (nach A. WEBER¹⁵) vom Aktin abgetrennt wird.

Es ist also sicher, dass L-Myosin allein Phosphat zwischen AD³²P und ATP nicht austauscht, obwohl es ATP spaltet.

Es ist wahrscheinlich, dass der Austausch durch das Aktin stattfindet, den einzi-

* Extrahiert wurden 50 % des Fibrilleneiweisses.

gen Eiweisskörper, der sowohl in hochgereinigten Aktomyosin-Präparaten und gewaschenen Fibrillen wie auch in den extrahierten Fibrillenschatten vorhanden ist.

Die Sicherheit der letzten Schlussfolgerung wird etwas beeinträchtigt durch die Tatsache, dass es bisher nicht gelungen ist, einen Phosphat-Austausch durch Aktin-Lösungen zu erhalten, die aus Acetontrockenpulver (STRAUB²², JAISLE²⁴, vergl. methodischer Teil) hergestellt sind. Das Aktin, das aus ATP-haltigen Aktomyosin-Lösungen bei 100,000 g abzentrifugiert werden kann¹⁵, konnte auf seine Austauschfähigkeit nicht geprüft werden, weil es nicht möglich war, es wieder zu lösen.

Der Gegensatz zwischen der hohen Austauschrate von Aktomyosin-Lösungen einerseits und der Austauschunfähigkeit von L-Myosin-Lösungen und Aktin-Lösungen (nach STRAUB) andererseits beweist nicht, dass erst die Vereinigung von Aktin und L-Myosin den Austausch hervorruft — und zwar aus zwei Gründen:

1. Die Mischung einer Aktinlösung aus Acetontrockenpulver mit einer L-Myosin-Lösung führt zu einem künstlichen Aktomyosin, das im Gegensatz zum natürlichen Aktomyosin genau so wenig austauscht wie seine beiden Komponenten.

2. Die Extraktion des L-Myosin aus den Fibrillen trennt das L-Myosin fast vollständig vom Aktin, ohne dass die Austauschrate dabei kleiner wird.

VI

Es ist also sehr wahrscheinlich, dass die zur Kontraktion führende Reaktion zwischen ATP und Aktomyosin mit einer energiereichen Phosphorylierung des Aktins beginnt. Das Aktin allein kann die übernommene Energie nicht verwerten: es spaltet kein ATP und kontrahiert nicht. Die Energienutzung zur Kontraktion wird erst durch gleichzeitige Myosin-Gegenwart möglich: dabei wird das übertragene Phosphat freigesetzt und das Aktomyosin kontrahiert sich.

METHODISCHER TEIL

Die Temperatur war bei der Herstellung aller Eiweisspräparate 0°C.

Aktomyosin wird durch Extraktion aus mit Blender zerkleineter Kaninchenmuskulatur nach HASSELBACH¹² gewonnen und 6–8 mal umgefällt. Falls Ca⁺⁺-Aktivierung beabsichtigt ist, erfolgen die letzten beiden Umfällungen in Gegenwart von $6 \times 10^{-2} M$ Sequestrene zur weitgehenden Beiseitigung der Erdalkalimetalle. In 50%-iger wässriger Glycerinlösung bei —15°C aufbewahrt, behält das Aktomyosin über mehrere Monate eine unveränderte ATP-ase-Aktivität und Fähigkeit zum Austausch. Vor Gebrauch wird das Aktomyosin durch zweimalige Umfällung vom Glycerin befreit.

Fibrillen: Die Muskulatur des Rückens und der Hinterbeine von Kaninchen wird zerkleinert (Fleischmaschine, anschliessend 2 min Waring Blender), mit 10 fachem Volumen 0.1 M KCl gewaschen und 2 min bei 800 g zentrifugiert. Die oberen Schichten des Präzipitats werden abgehoben, in 0.1 M KCl 2 min im Blender zerkleinert, 2 mal mit 15–20 fachem Volumen 0.1 M KCl gewaschen, bei 1800 g zentrifugiert. Die obere Schicht, die Fibrillenschicht, wird abgehoben und 7–10 mal mit 15–20 fachem Volumen 0.1 M KCl gewaschen, nach jeder zweiten Waschung ½ min im Blender aufgerührt. Zum Schluss werden nochmals die oberen Schichten abgenommen und in 50% Glycerin bei —15°C aufgehoben. Diese Suspension enthält 20–30 mg Eiweiss im ml und ist ebenfalls mehrere Monate ohne Änderung der ATP-ase-Aktivität haltbar. Vor Gebrauch wird das Glycerin durch zweimaliges Waschen in 10–15 fachem Volumen 0.1 M KCl entfernt und der Rückstand in 0.1 M KCl suspendiert.

L-Myosin-Präparationen werden aus einem A-Extrakt (15–20 min bei 0°C) durch 6–8 maliges Umfällen gewonnen. Nach der 2. Umfällung erfolgt die Fraktionierung (vergl. PORTZEBEL²³), um das L-Myosin von kleinen Mengen ebenfalls extrahierten Aktomyosins zu trennen. Die Lösungen werden in 50% Glycerin (0.25–0.3 M KCl) bei —15°C aufbewahrt. Vor Benutzung wird das Glycerin wie oben beschrieben, entfernt.

Oder: Aktomyosin wird 1–2 Std. bei 0.6 μ und 0°C in Gegenwart von $5 \cdot 10^{-3} M$ ATP, $2 \cdot 10^{-3} M$

Literatur S. 109.

MgCl₂ bei 100,000 g zentrifugiert (vergl. A. WEBER¹⁵). In der oberen Hälfte der Zentrifugenröhren befindet sich dann reines L-Myosin.

Die selektive L-Myosin-Extraktion aus isolierten Fibrillen erfolgt nach HASSELBACH¹⁶. Aus totenstarren Fibrillen, die 10 mal gewaschen sind, werden durch 15-faches Volumen 0.4 M KCl, 0.01 M Pyrophosphat, 0.001 M MgCl₂ bei pH 6.5 und 0°C (Extraktionsdauer = 5 min) 50-60% Eiweiss extrahiert. Das Pyrophosphat wird durch einmalige Umfällung bei 15-facher Verdünnung entfernt. Dieses Eiweiss erweist sich bei enzymatischer Prüfung als reines L-Myosin.

Die Aktin-haltigen Fibrillenschatten werden in 0.25 M und 0.1 M KCl gewaschen, dann in 0.1 M KCl suspendiert. Sie besitzen eine Restspaltung ($\sim 10\%$ der ursprünglichen Spaltung) und sind imstande die Spaltungsrate des L-Myosins zu einer Aktomyosin-Spaltungsrate zu aktivieren.

Aktin: Aceton-trockenpulver wird nach dem STRAUBSchen Verfahren in der von JAISLE²⁴ angegebenen Modifikation gewonnen. Aus dem Trockenpulver wird G-Aktin mit dem 30-40 fachen Volumen 0.0002 M Ascorbinsäure, 0.0002 M ATP bei pH 7 extrahiert (40 min bei 20°C). Die unlöslichen Bestandteile werden abzentrifugiert und der Überstand durch ein großes Filter gegossen. Aus dem Filtrat wird das Aktin 2-3 mal iso-elektrisch nach TSAO²⁵ bei pH 4.5-4.7 gefällt, abzentrifugiert und mit wenig NaHCO₃ wieder in Lösung gebracht. Zum Schluss werden KCl (Endkonzentration 0.15 M) und MgCl₂ (Endkonzentration 0.001 M) zugesetzt.

Inaktives ATP stammt von der Fa. Pabst, Milwaukee. Der ADP-Gehalt beträgt 3-4%. AMP ist nicht nachweisbar.

AT³²P mit gleichmässiger Signierung aller Phosphate wurde in den Forschungslaboratorien der Zellstoff-Fabrik Waldhof, Mannheim hergestellt*. Die Präparate enthalten 70-80% AT³²P, ausser AD³²P sind papierchromatografisch keine Verunreinigungen nachweisbar.

Radioaktives ADP wird aus obigem AT³²P fermentativ mit Aktomyosin-ATP-ase gewonnen und nach LE PAGE²⁶ als Barium-ADP gefällt. Aus dem Ba-ADP wird durch Zusatz äquivalenter Mengen H₂SO₄ und anschliessender Neutralisierung mit NaOH Na-ADP direkt dargestellt. Die Na-ADP-Lösungen sind frei von Ba²⁺ und SO₄²⁻.

AMP und *IMP* stammen von der Zellstoff-Fabrik Waldhof, Mannheim. Beide Nukleosid-Phosphate erweisen sich im Papierchromatogramm als rein.

Fuadin: Bisulfit-freies Antimon-bis(brenzkatechin-Na-disulfonat) verdanken wir den Bayer-Werken, Leverkusen.

Germanin = Suramin wurde aus handelsüblichen Trockenampullen der Fa. Bayer benutzt.

Salyrgan = Mersalyl, Theophyllin-frei, verdanken wir den Farbwerken Hoechst, Frankfurt.

Die Trennung des anorganischen Phosphates und der Nukleosid-Phosphate erfolgt für Ansätze mit radioaktivem anorganischem Phosphat entweder papierchromatografisch oder nach CRANE UND LIPPMANN²⁷ durch Adsorption an Kohle (Aktiv-Kohle der Fa. Merck, Darmstadt. Methylenblautiter 10-11). Zur Aktivitätsbestimmung wurde das Phosphat aus dem Kohlehydrolysat nach Zugabe von Trägerphosphat als MgNH₄PO₄ gefällt.

Für Ansätze mit AD³²P erfolgte die Trennung der Nukleosid-Phosphate und des anorganischen Phosphates immer papierchromatografisch nach den Angaben von KREBS UND HEMS²⁷.

Papierchromatografische Trennung: Wir verwenden bei hoher spezifischer Aktivität des ADP Whatman Nr. 1 Papier oder bei abklingender Aktivität (für grössere Nukleotidmengen) Filterpapier Nr. 214 der Fa. Macherey und Nagel, Duren. Alle Papiere werden nacheinander in 2 N Essigsäure, gesättigter alkoholischer Oxychinolinlösung, mehrmals in 25% Alkohol, 1 N Ammoniak und mehrfach in Aqua dest. gewaschen. Das in 50 m langer Rolle gelieferte Papier wird auf einen Waschapparat so aufgespult, dass es vom Waschmittel allseitig gut umspült wird, die Spule wird durch einen Motor langsam in der Lösung gedreht. Nur gewaschene Papiere ermöglichen eine einwandfreie Trennung der Nukleotidfraktionen. Der P-Gehalt des Papiers liegt nach der Waschung bei $\leq 0.001 \mu\text{Mol P/cm}^2$.

Wir entwickeln die Chromatogramme im 1. Lösungsmittel (Isopropyläther-Ameisensäure) zur Abtrennung des anorg. P 12 Std. bei 15°C oder 6-8 Std. bei 20°C. Im 2. Lösungsmittel zur Auf-trennung der Nukleotide (Ammonium-Isobutyryl-Isobuttersäure) entwickeln wir absteigend die 80-100 cm langen Chromatogramme 48-56 Std. bei etwa 22°C.

Die Lokalisation erfolgt nach MARKHAM UND SMITH²⁸. Die mit einem Sicherheitsabstand ausgeschnittenen Flecke (Grösse 10-60 cm²) werden in Mikro-Kjeldahl-Kölbchen, die mit einer Eichmarke für 30 ml versehen sind, nach HANES UND ISHERWOOD²⁹ verascht. Nach Auffüllung auf 30 ml erfolgen aus derselben Probe die Phosphat- und Aktivitätsbestimmungen.

Zur Aktivitätsbestimmung wird ein Aliquot mit 20 μMol inaktivem Trägerphosphat versetzt, als MgNH₄PO₄ gefällt, getrocknet und in einer Schichtdicke $< 25 \text{ mg/cm}^2$ gemessen. Die Aktivitätsmessung geschieht unter einem Stirnfensterzählrohr (1.8 mg Glimmer/cm²) der Fa. Philips.

Die Phosphatbestimmungen der chromatografisch getrennten Nukleosid-Phosphate erfolgen nach BERENBLUM UND CHAIN³⁰ sonst nach ROCKSTEIN UND HERRON³¹.

* Herrn Prof. Dr. REIFF und Herrn Dr. KIRCHHOFF gilt unser besonderer Dank für die mehrfache Herstellung von AT³²P mit hoher spez. Aktivität.

Für die *Austauschansätze* werden einem Sammelansatz zu den gewünschten Zeiten jeweils 2 ml entnommen und in 0.5 ml 6% Trichloressigsäure pipettiert. Die Trichloressigsäure enthält einen Zusatz von $3 \cdot 10^{-3} M$ AMP und $3 \cdot 10^{-3} M$ IMP. Dadurch wird im Papierchromatogramm eine ausreichende Trennung und Lokalisation der $AD^{32}P$ — und $IM^{32}P$ — Spuren von den in höherer Konzentration vorliegenden anderen Nukleotiden ermöglicht. Alle Austauschansätze finden bei pH 7 statt, als Puffer wird TRIS-Maleinsäure-Puffer 0.01–0.02 M nach GOMORI³³ verwendet.

Bei Verwendung von Fuadin wird aus den enteiweißten Proben das Antimon des Fuadin durch Einleiten von H_2S als Antimonsulfid gefällt. Das verbleibende Brenzkatechin stört das Chromatogramm nicht.

Die Berechnung der *Austauschraten* geschieht nach der Differenzmethode aus einem möglichst kurzen Anfangsstück der experimentell gewonnenen Aktivitätskurve des ATP.

Der Aktivitätszuwachs in diesem kurzen Anfangsbereich wird durch die mittlere spezifische Aktivität des ADP (= Impulse $min^{-1} \mu\text{Mol ADP}^{-1}$), die für den betrachteten Zeitraum aus den Experimentaldaten berechnet wird, dividiert. Man erhält die $\mu\text{Mole ADP}$, die durch Austausch in ATP verwandelt worden sind.

Die erhaltenen Werte sind etwas zu klein, da unsere ATP-Fraktion bei Versuchsbeginn schon immer kleine Mengen $AT^{32}P$ enthält, die aus der $AD^{32}P$ -Fraktion stammen (etwa 4–8% der $AD^{32}P$ -Aktivität). Da sich natürlich auch dieses $AT^{32}P$ am Austausch beteiligt, und da ein Austausch zwischen $AD^{32}P$ und $AT^{32}P$ nicht entdeckt werden kann, erscheint der Austausch um einen Betrag zu niedrig, der dem Anteil des gezeichneten ATP am Gesamt-ATP gleich ist. Aus diesem Grunde dürfte die wahre Rate des Austausches etwa um 4–8% grösser sein als die so berechnete.

Die Ratenberechnung mit dem Differentialquotienten^{36,38} ist in den meisten Fällen nicht möglich, da die Spaltungsrate gegenüber der Austauschrate nicht vernachlässigt werden kann. Wenn die Spaltungsrate gross ist, werden die errechneten Austauschraten etwas zu klein, weil mit der Spaltung durch Austausch entstandenes $AT^{32}P$ wieder in $AD^{32}P$ überführt und somit nicht erfasst wird.

ZUSAMMENFASSUNG

1. 8–10 mal umgefällte Präparationen von "natürlichem" Aktomyosin tauschen Phosphat zwischen $AD^{32}P$ und ATP mit hoher Geschwindigkeit aus, wenn Mg^{++} zugegen sind.

2. Die Austauschgeschwindigkeit ist von der Ionenstärke im Bereich von 0.08–0.8 μ unabhängig, sie hängt dagegen stark ab von der Temperatur; Austauschrate bei $20^\circ C \sim 0.1 \mu\text{Mol min}^{-1} \text{mg Eiweiss}^{-1}$, bei $0^\circ C \sim 0.02–0.025 \mu\text{Mol min}^{-1} \text{mg Eiweiss}^{-1}$.

3. Die Austauschrate ist immer grösser als die Spaltungsrate. Die Austauschrate kann 10–20 mal so gross sein wie die Spaltungsrate, wenn die Spaltungsrate in Mg^{++} -haltigen Aktomyosin-Lösungen niedrig ist.

4. Grundsätzlich die gleichen Befunde gelten auch für 10–12 mal gewaschene isolierte Fibrillen; doch erscheinen hier die Austauschraten zu klein, weil das im Innern der Fibrillen gebildete $AT^{32}P$ schneller gespalten wird als das inaktive ATP des umgebenden Bades.

5. Werden die Mg^{++} durch Ca^{++} ersetzt, so verschwindet der Phosphataustausch.

6. Wird aus den 10 mal gewaschenen Fibrillen selektiv das L-Myosin extrahiert, so bleibt der Phosphat-Austausch auch quantitativ unverändert, während das extrahierte L-Myosin kein Phosphat austauscht.

7. Hochgereinigte L-Myosin-Präparate aus A-Myosin spalten ATP ebenfalls ohne Phosphat-Austausch. Das Gleiche gilt für das L-Myosin, das bei Ultrazentrifugation von Aktomyosin-Lösungen in ATP-Gegenwart im Überstand zurückbleibt.

8. Aus den Beobachtungen 6 und 7 wird geschlossen, dass der Phosphat-Austausch durch die Aktin-Komponente des Aktomyosins stattfindet.

9. Aktin aus Aceton-trockenpulver bewirkt dagegen keinen Phosphat-Austausch.

10. Ein Phosphat-Austausch tritt auch nicht auf, wenn Aktin aus Aceton-trockenpulver mit L-Myosin zu "künstlichem" Aktomyosin vereinigt wird.

SUMMARY

1. Preparations of "natural" actomyosin, dissolved and reprecipitated 8–10 times, transfer phosphate between $AD^{32}P$ and ATP with great speed if Mg^{++} are present.

2. The exchange rate is independent of the ionic strength in the range 0.08–0.8 μ , whereas it is closely dependent on the temperature; exchange rate at $20^\circ C \sim 0.1 \mu\text{moles/min/mg protein}$, at $0^\circ C \sim 0.02–0.025 \mu\text{moles/min/mg protein}$.

3. The exchange rate is always greater than the rate of splitting. The exchange rate can be 10–20 times as great as the rate of splitting when the latter is low in actomyosin solutions containing Mg^{++} .

4. Fundamentally, the same conditions hold for isolated fibrils washed 10-12 times; however, in this case the exchange rates seem to be too low, since the ATP³²P formed in the interior of the fibrils is more rapidly split than the inactive ATP of the surrounding bath.

5. If Mg⁺⁺ are replaced by Ca⁺⁺, the phosphate transfer stops.

6. If L-myosin is selectively extracted from the fibrils that have been washed 10 times, the phosphate transfer remains quantitatively unchanged, whereas the extracted L-myosin transfers no phosphate.

7. Highly purified L-myosin preparations obtained from A-myosin, likewise split ATP without phosphate transfer. The same holds for the L-myosin that remains in the supernatant after ultracentrifugation of actomyosin solutions in the presence of ATP.

8. It is concluded from observations 6 and 7 that the phosphate transfer occurs by means of the actin component of actomyosin.

9. Actin obtained from acetone-dried powder, however, causes no phosphate transfer.

10. Phosphate transfer also does not occur when actin from acetone-dried powder is mixed with L-myosin to form "artificial" actomyosin.

LITERATUR

- ¹ H. H. WEBER, *Fortschr. Zool.*, 10 (1956) 304.
- ² H. H. WEBER UND H. PORTZEL, *Progress in Biophysics and Biophys. Chem.*, 4 (1954) 60.
- ³ A. V. HILL, *Proc. Roy. Soc. (London)*, B 137 (1950) 40;
- A. V. HILL, *Nature*, 167 (1951) 377;
- A. V. HILL, *Proc. Roy. Soc. (London)*, B 136 (1949) 420.
- ⁴ M. DUBUSSON, *Proc. Roy. Soc. (London)*, B 137 (1950) 63.
- ⁵ E. GUTH, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 47 (1947) 715.
- ⁶ W. KUHN UND G. HARGITAY, *Z. Elektrochem.*, 55 (1951) 490.
- ⁷ M. G. M. PRYOR, *Progress in Biophysics and Biophys. Chem.*, 1 (1950) 216.
- ⁸ M. F. MORALES, J. BOTTs, J. J. BLUM UND T. L. HILL, *Physiol. Revs.*, 35 (1955) 475.
- ⁹ A. FLECKENSTEIN, *Der Kalium-Natrium-Austausch*, Springer Verlag, Berlin, 1955.
- ¹⁰ D. E. KOSHLAND, Z. BUDENSTEIN UND A. KOWALSKY, *J. Biol. Chem.*, 211 (1954) 279.
- ¹¹ J. GERGELY UND W. P. JENCKS, zitiert nach KOSHLAND.
- ¹² W. HASSELBACH, *Z. Naturforsch.*, 7b (1952) 163.
- ¹³ A. SZENT-GYÖRGYI, *Chemistry of Muscular Contraction*, Academic Press Inc., New York, 1947, S. 30, 53.
- ¹⁴ I. BÁNGA UND A. SZENT-GYÖRGYI, *Studies Inst. Med. Chem. Univ. Szeged*, 3 (1943) 72.
- ¹⁵ A. WEBER, *Biochim. Biophys. Acta*, 19 (1956) 345.
- ¹⁶ W. HASSELBACH, *Biochim. Biophys. Acta*, 20 (1956) 355.
- ¹⁷ H. PORTZEL, unveröffentlichte Versuche, 1956.
- ¹⁸ W. HASSELBACH, *Z. Naturforsch.*, 8b (1953) 449.
- ¹⁹ J. HANSON UND H. E. HUXLEY, *Symposia Soc. Exptl. Biol.*, 9 (1955) 228.
- ²⁰ A. G. SZENT-GYÖRGYI, D. MAZIA UND A. SZENT-GYÖRGYI, *Biochim. Biophys. Acta*, 16 (1955) 339.
- ²¹ G. W. DE VILLAFRANCA, *Arch. Biochem. Biophys.*, 61 (1956) 378.
- ²² F. B. STRAUB, *Studies Inst. Med. Chem. Univ. Szeged*, 2 (1942) 3;
- F. B. STRAUB, *Studies Inst. Med. Chem. Univ. Szeged*, 3 (1943) 23.
- ²³ H. PORTZEL, G. SCHRAMM UND H. H. WEBER, *Z. Naturforsch.*, 5b (1950) 61.
- ²⁴ F. JAISLE, *Biochem. Z.*, 321 (1951) 451.
- ²⁵ T. C. TSAO UND K. BAILEY, *Biochim. Biophys. Acta*, 11 (1953) 102.
- ²⁶ G. A. LE PAGE, IN W. W. UMBREIT, R. H. BURRIS UND J. B. STAUFFER, *Manometric Techniques and Tissue Metabolism*, Burgess Publishing Co., Minneapolis, 1947, S. 205.
- ²⁷ H. A. KREBS UND R. HEMS, *Biochim. Biophys. Acta*, 12 (1953) 172.
- ²⁸ R. MARKHAM UND J. D. SMITH, *Biochem. J.*, 45 (1949) 294.
- ²⁹ C. S. HANES UND F. A. ISHERWOOD, *Nature*, 164 (1949) 1107.
- ³⁰ J. BERENBLUM UND F. CHAIN, *Biochem. J.*, 32 (1938) 295.
- ³¹ M. ROCKSTEIN UND P. W. HERRON, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 1500.
- ³² G. GOMORI, IN S. P. COLOWICK UND N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, Vol. 1, Academic Press Inc., New York, 1955, S. 138.
- ³³ R. K. CRANE UND F. LIPMANN, *J. Biol. Chem.*, 201 (1953) 235.
- ³⁴ S. SPICER UND W. J. BOWEN, *J. Biol. Chem.*, 188 (1951) 741.
- ³⁵ H. A. KREBS, L. A. EGGLESTON UND C. TERNER, *Biochem. J.*, 48 (1951) 530.
- ³⁶ C. A. STEWART, *Biochem. J.*, 54 (1953) 117.

Ein eingegangen den 16. Februar 1957