

BERUHT DER PHOSPHAT-AUSTAUSCH ZWISCHEN ATP UND AD³²P DURCH HOCHGEREINIGTE AKTOMYOSIN-PRÄPARATE AUF DEM AKTOMYOSIN ODER AUF VERUNREINIGUNGEN?

II. MITTEILUNG

G. ULBRECHT, M. ULBRECHT UND H. J. WUSTROW

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

I

Der Phosphat-Austausch der Aktomyosin-Präparate (vergl.¹) ist nur dann ein Argument zugunsten der Phosphat-Übertragung in eine energiereiche Bindung an das Aktomyosin, wenn er von dem Aktomyosin selbst bewirkt wird. AT³²P* kann bei Gegenwart von inaktivem ATP und AD³²P aber auch durch folgende Fermente erzeugt werden, die in Aktomyosin-Präparaten häufig spurenweise vorhanden sind:

1. Durch *Nukleosid-diphospho-Kinase*^{2,3}.
2. Erzeugt *Myokinase* AT³²P aus AD³²P mindestens in dem Betrage, in dem AM³²P gebildet wird.
3. Bei Gegenwart von *Kreatin* oder *Phosphokreatin* und *Phosphokinase* entsteht AT³²P aus inaktivem ATP und aktivem ADP.

4. Die sogenannte MEYERHOF-KIELLEY-ATP-ase^{4,5} der Grana erzeugt aus AD³²P ebenfalls AT³²P, sowohl in Gegenwart von Mg⁺⁺ wie deutlich schwächer in Anwesenheit von Ca⁺⁺ (Fig. 1).

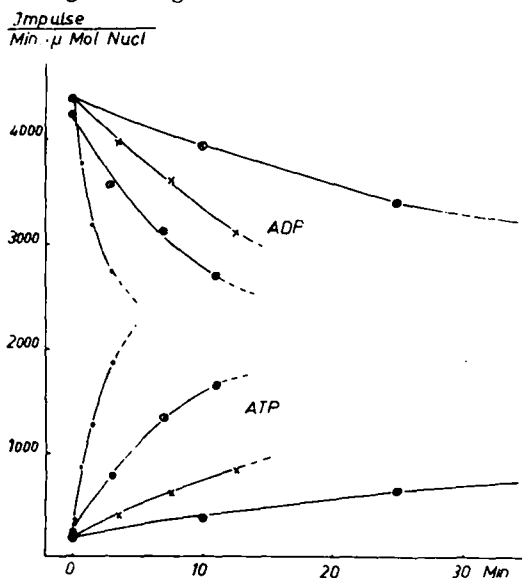


Fig. 1. Aktivitätsaustausch zwischen ATP und AD³²P durch Grana in Gegenwart von Mg⁺⁺ bzw. Ca⁺⁺. Ordinate: spezifische Aktivität in Impulsen · min⁻¹ μMol Nukleotid⁻¹. Abszisse: Zeit in Minuten. ●—● 20°C Mg⁺⁺; ×—× 20°C Ca⁺⁺; ⊙—⊙ 0°C Mg⁺⁺; ⊗—⊗ 0°C Ca⁺⁺. ATP = 0.005 M, AD³²P = 0.0045–0.005 M, MgCl₂ bzw. CaCl₂ = 0.006 M, pH = 7.0, Ionenstärke = 0.4 μ, Eiweiss = 0.9 mg/ml.

* Abkürzungen: ATP = Adenosintriphosphat, ADP = Adenosindiphosphat, AMP = Adenosinmonophosphat, P = anorg. Phosphat, ITP = Inosintriphosphat, IDP = Inosindiphosphat, IMP = Inosinmonophosphat.

II

Eine Bildung von radioaktivem ATP durch das System *Phosphokinase-Phosphokreatin* ist besonders leicht auszuschliessen: Denn

(1) enthalten die Präparate so wenig Kreatin-Phosphokinase, dass sie selbst bei Gegenwart von $1.1 \cdot 10^{-2} M$ Kreatinphosphat und $5 \cdot 10^{-3} M$ ADP, d.h. bei Ferment-sättigung mit beiden Substraten, ATP nur mit 6–10% der Geschwindigkeit bilden, mit der das ³²P zwischen ATP und AD³²P ausgetauscht wird, wenn *Aktomyosin* ATP spaltet.

(2) Die Versuchsansätze enthalten nicht $10^{-2} M$ sondern nur $2-5 \cdot 10^{-5} M$ Phosphokreatin. Dadurch sinkt die Geschwindigkeit der ATP-Bildung auf etwa 1–2% der Geschwindigkeit ab, die mit $10^{-2} M$ Phosphokreatin erreicht wird (vergl. KUBY UND NODA⁶). Unter Berücksichtigung von (1) ergibt sich eine Bildungsgeschwindigkeit des ATP durch das Phosphokreatin-Phosphokinase-System kleiner als 0.2% der gefundenen Austauschgeschwindigkeit.

(3) Unter den Bedingungen der Austauschversuche bei pH 7 läuft die Bildung von ATP aus Phosphokreatin mehr als 100 mal schneller ab als die Bildung des hierfür nötigen Phosphokreatins aus dem ATP des Spaltungsansatzes (vergl. NODA UND KUBY⁷). Für die Phosphatübertragung von ATP auf AD³²P ist aber diese Reaktion die Geschwindigkeits-limitierende Reaktion. Die Geschwindigkeit der Phosphatübertragung durch das Phosphokreatin-Phosphokinase-System sinkt damit auf 0.002% der gefundenen Geschwindigkeit des Phosphat-Austausches.

Weitere Untersuchungen ergaben, dass Kreatin-Phosphokinase zu einem direkten Aktivitätsaustausch zwischen AD³²P und ATP in Abwesenheit von Kreatin oder Phosphokreatin im pH-Bereich von 6.8–9.8 nicht fähig ist (Tab. I). Dies wird betont, weil ein solcher direkter Austausch theoretisch zu fordern wäre für den Fall, dass die Transphosphorylierung durch Kreatin-Phosphokinase auf der Bildung einer phosphorylierten CP-ase als Zwischenprodukt beruht.

TABELLE I
DER FEHLENDE PHOSPHAT-AUSTAUSCH ZWISCHEN AD³²P UND ATP DURCH
KREATIN PHOSPHOKINASE IN ABWESENHEIT VON KREATIN UND PHOSPHOKREATIN

pH	Inkubationszeit	Aktivität in 1 ml Ansatz ATP	Aktivität in 1 ml Ansatz ADP
6.8	20 min	14,300 Impulse/min	290,000 Impulse/min
7.7	20 min	14,800 Impulse/min	283,500 Impulse/min
8.5	20 min	14,900 Impulse/min	285,000 Impulse/min
9.8	20 min	16,100 Impulse/min	285,000 Impulse/min
Ausgangswert	0 min	14,700 Impulse/min	290,000 Impulse/min

ATP = $0.005 M$, ADP = $0.006 M$, MgCl₂ = $0.004 M$, TRIS-Puffer = $0.015 M$, 0.21 mg Eiweiss/ml, Ionenstärke = 0.11μ , Temp. = $20^\circ C$.

III

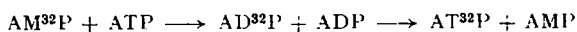
Der Gehalt der Präparate an *Nukleosid-diphospho-Kinase* ist in der Regel nur in der Lage 0–2% der AT³²P-Menge zu bilden, die im Austauschversuch gefunden wird. Dieses ist kontrolliert durch Zusatz von AT³²P und IDP in den gleichen Konzentrationen, in denen ATP und AD³²P im Normalversuch vorhanden sind. Die Bildung von ITP wird auf radiometrischem Wege gemessen.

Literatur S. 117.

IV

Der *Myokinase-Gehalt* der Präparationen ist sehr klein: 10 mal umgefällte Aktomyosin-Lösungen und 10–12 mal gewaschene Fibrillen spalten bei einer Ionenstärke von $\sim 0.08 \mu$, $5\text{--}6 \cdot 10^{-3} M$ Mg^{++} und pH 7 ATP 70–300 mal schneller als sie ATP durch ihren Myokinase-Gehalt aus ADP bilden (vergl. methodischer Teil).

Wie gering der Anteil der Myokinase-Aktivität an der Bildung von $AT^{32}P$ im eigentlichen Austauschversuch ist, kann unmittelbar bestimmt werden. Es zeigt sich nämlich, dass für jedes $IM^{32}P$, das während der ATP-Spaltung gebildet wird, nur ein $AT^{32}P$ durch Myokinase-Wirkung auftritt. Das ist nicht selbstverständlich, denn die Myokinase kann mehr als ein $AT^{32}P$ auf ein $AM^{32}P$ oder $IM^{32}P$ bilden, falls sich $AM^{32}P$ intermediär im Ansatz anhäuft. Durch rückläufige Myokinase-Reaktion kann dann $AM^{32}P$ wieder verschwinden und zu einem kleinen Teil zu $AT^{32}P + AMP$ führen.



Zu einer intermediären Anhäufung von $AM^{32}P$ kommt es aber bei der ATP-Spaltung durch unsere Präparate nicht. Es findet sich nie eine Aktivitätszunahme in der AMP-Fraktion, sondern nur in der IMP-Fraktion. Es wird sogar noch der Hauptteil der kleinen $AM^{32}P$ -Menge, die mit dem $AD^{32}P$ als Verunreinigung in den Ansatz kommt (1–2 % des $AD^{32}P$) desaminiert.

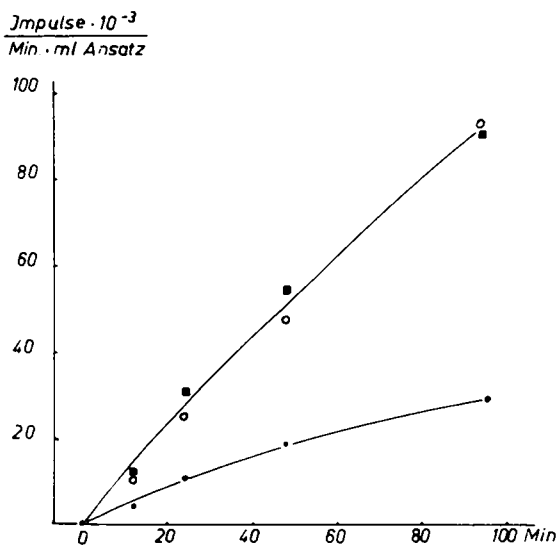


Fig. 2. Myokinase: Parallelität der $AM^{32}P$ - und $AT^{32}P$ -Bildung aus $AD^{32}P$. Ordinate: Änderung der Aktivität in Impulsen $\cdot \text{min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$. Abszisse: Zeit in Minuten. ●—● Aktivitätszunahme der AMP-Fraktion; ○—○ Aktivitätszunahme der ATP-Fraktion; ■—■ Aktivitätszunahme der ATP-Fraktion; berechnet (= AMP-Aktivität $\times 3$). ATP = $0.0054 M$, $AD^{32}P$ = $0.0042 M$, $MgCl_2$ = $0.0063 M$, Eiweiss = 0.33 %, Temp. $0^\circ C$, pH = 7.0, Ionenstärke = 0.4μ .

Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass selbst dann $AT^{32}P$ und $AM^{32}P$ in gleicher Menge gebildet werden, wenn 5–6 % des zugesetzten $AD^{32}P$ durch Myokinase in undesaminiertes $AM^{32}P$ verwandelt werden (vergl. Fig. 2). Für diese Kontrolle werden Aktomyosin-Präparate 2 min auf $80^\circ C$ bei pH 2 erhitzt; dadurch werden ATP-ase- und Desaminase-Aktivität vollständig zerstört¹⁷. Danach wird $AD^{32}P$ und ATP in den Konzentrationen des Austauschversuches zugegeben. Auch in diesem Fall besteht Äquivalenz zwischen gebildetem $AM^{32}P$ und $AT^{32}P$ (Fig. 2). Dieses Resultat der Kontrolle, das theoretisch nicht unbedingt vorherzusehen war, gestattet die Bildung von

AT³²P durch Myokinase in jedem einzelnen Versuch der gefundenen Menge an IM³²P gleichzusetzen⁸.

Solche Kontrollen in jedem einzelnen Versuch zeigen, dass der Anteil der Myokinase am Phosphat-Austausch immer innerhalb der Grenzen von 0 und 10% liegt, in der Regel beträgt er 0-2% bei 0°C, 4-5% bei 20°C.

V

Die Aktivität der *Grana-ATP-ase* kann im Gegensatz zu der Aktivität der vorher behandelten Enzym-Systeme qualitativ nicht eindeutig von der Aktivität der Aktomyosin-ATP-ase unterschieden werden. Die Aktivität der Grana-ATP-ase kann auch infolgedessen in Kontrollversuchen nicht quantitativ getestet werden. Auf der anderen Seite machen es allerdings die in der Literatur niedergelegten Erfahrungen nicht sehr wahrscheinlich, dass 10-12 mal gewaschene Fibrillen oder 10 mal umgefällte Aktomyosin-Präparate noch grössere Mengen an Grana-ATP-ase enthalten. Trotzdem versuchen wir, den etwaigen Einfluss der Grana auf den Phosphat-Austausch durch Fibrillen und Aktomyosin-Präparate abzuschätzen.

Tab. II zeigt, dass in Gegenwart von $6 \cdot 10^{-3} M$ Mg²⁺ der Phosphat-Austausch durch 1 mg Grana 10-20 mal so gross ist wie der Phosphat-Austausch durch 1 mg Aktomyosin, wenn die Ionenstärke 0.4 μ ist. Die gleiche Tabelle zeigt, dass unter den gleichen Bedingungen auch die Spaltung durch 1 mg Grana 10-20 mal so gross ist wie durch 1 mg Aktomyosin. Infolgedessen ist die Proportion der Bildungsrate von AT³²P zur Spaltungsrate des ATP für Grana auf der einen Seite und für Aktomyosin auf der anderen Seite ungefähr gleich (Spalte 6 der Tab. II). Das aber bedeutet folgendes: Der Phosphat-Austausch durch Aktomyosin-Präparate und Fibrillen kann nur dann als Effekt der Grana erklärt werden, wenn auch die ATP-Spaltung der Aktomyosin-Präparate und der Fibrillen vollständig als ATP-Spaltung durch Grana anerkannt wird.

Dass in Wirklichkeit nur ein sehr bescheidener Teil der ATP-Spaltung und somit

TABELLE II
AUSTAUSCH- UND SPALTUNGSRATEN VON GRANA, AKTOMYOSIN UND FIBRILLEN-PRÄPARATEN

1 Präparat	2 Ionenstärke	3 Temp.	Mg ²⁺ 0.006 M		6 Quotient: Spalte 5 Spalte 4	Ca ²⁺ 0.006 M		9 Quotient: Spalte 8 Spalte 7
			4 Spaltungsrate*	5 Austauschrate*		7 Spaltungsrate*	8 Austauschrate*	
Grana	0.4	0°C	0.02-0.035	0.3-0.5	13-15	0.025	0.03-0.04	1-1.5
Aktomyosin	~0.3	0°C	0.001	0.023	23			
Aktomyosin	0.4	0°C	0.001-0.0015	0.02-0.023	13-23	0.0075	0.00075	0.1
Fibrillen	0.4	0°C	0.0009	0.006-0.009	7-10			
Grana	0.4	20°C	0.22	1.4	6	0.008	0.062	0.63
Aktomyosin	0.3	20°C	0.01	0.1	10			

* Spaltungs- und Austauschraten: in $\mu\text{Mol P} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg Eiweiss}^{-1}$.

§ Eine zweite Kontrolle ergibt sich in den Spaltungsversuchen, in denen der Versuch erst nach Aufspaltung des gesamten ATP abgebrochen wird. In diesem Falle nämlich werden gleiche Mengen an Radioaktivität im IMP und im abgespaltenen anorganischen Phosphat gefunden. Das abgespaltene Phosphat aber ist das γ -Phosphat des ATP und dieses γ -Phosphat kann nur soweit radioaktiv sein, wie es durch Myokinase und nicht durch Aktomyosin gebildet wird.

auch des Phosphat-Austausches auf den Einfluss der Grana zurückgeführt werden kann, folgert sich aus dem geringen Grana-Gehalt der Skelettmuskulatur des Kaninchens. 100 g Frischmuskel ergeben etwa 8 g Aktomyosin oder 10 g Eiweiss in Fibrillen, während die Grana-Ausbeute nur etwa 500 mg Eiweiss beträgt. Bei 0.4μ und 20°C spaltet diese Grana-Menge etwa $150 \mu\text{Mol ATP/min}$, während 8 g Aktomyosin unter den gleichen Bedingungen ebenfalls etwa $150 \mu\text{Mol ATP/min}$ spalten, d.h. die Grana könnten, wenn sie vollständig in das Aktomyosin-Präparat gelangten etwa 50% der bei hoher Ionenstärke erhaltenen Spaltung bewirken. Das würde bedeuten, dass die Grana auch etwa 50% des Austausches verursachen könnten.

Nun ist es aber ausserordentlich unwahrscheinlich, dass bei 10-maliger Umfällung bzw. 10–12-maliger Waschung immer die gesamten Grana des Muskels mitgefällt bzw. abzentrifugiert werden. Es ist vielmehr zu erwarten, dass nur ein Bruchteil der ursprünglich vorhandenen Grana in das Aktomyosin-Präparat hineingerät.

Werden die Grana anstelle von Mg^{++} mit Ca^{++} aktiviert, so wird die ATP-Spaltung bei 20°C wesentlich kleiner, während sie bei 0°C unverändert bleibt (vergl. Tab. II, Spalte 7). Der Phosphat-Austausch durch die Grana sinkt bei Ersatz der Mg^{++} durch Ca^{++} auf $1/10$ des bei Mg^{++} -Gegenwart erreichten Wertes (Tab. II, Spalte 8). Wenn dagegen die Aktivierung der Aktomyosin-Präparate durch Ca^{++} anstelle von Mg^{++} stattfindet, sinkt der Phosphat-Austausch durch das Aktomyosin auf $1/30$ des Wertes bei Mg^{++} -Aktivierung (Tab. II). Wenn also der Phosphat-Austausch des Aktomyosins auf Verunreinigung durch Grana beruhen sollte, müsste dieser Phosphat-Austausch unter Ca^{++} mindestens 3 mal so gross sein, wie er gefunden wird.

Schliesslich sollte die Wahrscheinlichkeit, dass Grana in 10 fach umgefällte Aktomyosin- oder L-Myosin-Präparate gelangen, einigermaßen gleich sein. Auf solche Verunreinigungen durch Grana-ATP-ase könnte die Restspaltung bezogen werden, die trotz Salyrgan-Vergiftung der Aktomyosin- und L-Myosin-Präparate übrig bleibt. Denn die Grana-ATP-ase ist weniger Salyrgan-empfindlich (Tab. III, vergl. auch⁹). Diese Restspaltung unter Salyrgan aber ist für Aktomyosin- und L-Myosin-Präparate gleich. Trotzdem beträgt die Rate des Phosphat-Austausches durch L-Myosin nur 2–5% der Austauschrate des Aktomyosins.

TABELLE III
SALYRGANVERGIFTBARKEIT DER ATP-SPALTUNG VON GRANA,
AKTOMYOSIN- UND L-MYOSIN-LÖSUNGEN

Präparat	Spaltungsrate in $\mu\text{Mol P} \cdot \text{mg Eiweiss}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	
	$5 \cdot 10^{-3} M \text{ ATP}$	$5 \cdot 10^{-3} M \text{ ATP}$ $2 \cdot 10^{-4} M \text{ Salyrgan}$
Grana	0.25 – 0.35	0.09 – 0.12
L-Myosin	0.008 – 0.009	0.002 – 0.0025
Aktomyosin	0.009 – 0.015	0.0015 – 0.002

$\text{MgCl}_2 = 0.006 M$, Temp. 20°C , Ionenstärke = 0.4μ .

Es sieht also nicht so aus, als ob der Phosphat-Austausch unserer Präparate zu einem irgendwie wesentlichen Anteil durch Grana oder Grana-ATP-ase bewirkt wird.

Die Entdeckung, dass auch die Grana zu einem hohen Phosphat-Austausch fähig sind, legt den Gedanken nahe, dass im Muskel noch weitere bisher ganz unbe-

kannte Systeme vorhanden sein könnten, die als Verunreinigung unserer Präparate zu dem beobachteten Phosphat-Austausch beitragen. Dies scheint nicht so zu sein: Wird nämlich eine Aktomyosin-Lösung über verschieden lange Zeiten hin bei pH 8 auf 50°C erwärmt, so nimmt die ATP-ase-Aktivität im Laufe von 30 min bis auf etwa 0 ab. Das ist schon länger bekannt. Wird an dem gleichen Präparat die Aktivität des Phosphat-Austausches gemessen, so zeigt sich, dass diese Aktivität im gleichen Masse mit der Dauer der Erwärmung abnimmt (Fig. 3).

Ein unbekanntes System könnte also nur dann den Phosphat-Austausch bewirken, wenn angenommen wird, dass seine Denaturierungstemperatur und ebenso die Denaturierungsgeschwindigkeit bei dieser Temperatur mit der Denaturierungsgeschwindigkeit des Aktomyosins identisch ist.

Die Gesamtheit der berichteten Analysen macht es ausserordentlich unwahrscheinlich, dass der Phosphat-Austausch nicht mit der ATP-Spaltung durch das Aktomyosin ursächlich verknüpft ist.

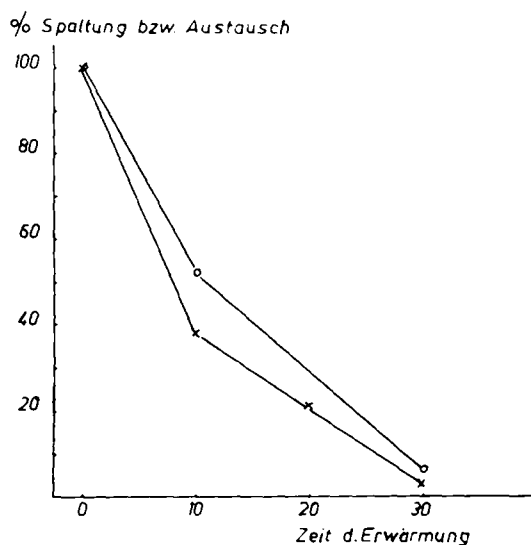


Fig. 3. Aktomyosin: Wärmeinaktivierung von ATP-Spaltung einerseits und Phosphat-Austausch andererseits. Ordinate: Reaktionsgeschwindigkeit in % der Geschwindigkeit des unbehandelten Eiweiss. Abszisse: Zeit der Wärmeinaktivierung bei 50°C und pH 8. x—x Austauschgeschwindigkeit; o—o Spaltungsgeschwindigkeit. Austausch: ATP = 0.0055 M, AD³²P = 0.0048 M, MgCl₂ = 0.006 M, Temp. 0°C, pH = 7.0, Ionenstärke = 0.4 μ. Spaltung: ATP = 0.005 M, MgCl₂ = 0.006 M, pH = 7.0, Temp. 20°C, Ionenstärke = 0.4 μ.

METHODISCHER TEIL

Aktomyosin- und Fibrillen-Herstellung siehe¹.

Kreatinphosphokinase wird nach NODA, KUBY UND LARDY⁸ hergestellt. (Präparation B ohne Kristallisation.)

Grana: Kaninchenmuskulatur wird nach Zerkleinerung in der Fleischmaschine mit 4-fachem Volumen 0.1 M KCl 2 min im Waring Blendor zerschlagen, 3 min bei 900 g zentrifugiert*. Dann werden die vereinigten Überstände durch Gaze gegossen und 20 min bei 600 g zur Entfernung etwaiger fibrillärer Bestandteile zentrifugiert.

Fraktion I: Der Überstand wird auf der SPINCO Ultrazentrifuge 20 min bei 15,000 g zentrifugiert. Der Niederschlag wird in 30-fachem Volumen 0.004 M Sequestrene und 0.1 M KCl suspendiert und erneut 20 min bei 15,000 g zentrifugiert. Der Niederschlag wird nochmals in 20-fachem Volumen 0.1 M KCl suspendiert und wie oben zentrifugiert. Der Niederschlag wird in 0.1 M KCl und 0.001 M KCN homogenisiert = Grana I.

Fraktion II: Der Überstand aus der ersten Zentrifugation der Fraktion I wird 60 min bei 45,000 g zentrifugiert, sonst analog wie Fraktion I behandelt, nur jeweils bei 45,000 g zentrifugiert = Grana II.

* Der Rückstand wird 2 mal mit dem doppelten Volumen 0.1 M KCl 2 min im Blendor aufgerührt und bei 900 g zentrifugiert.

Solche Grana-Suspensionen besitzen nur geringe Nukleosid-diphospho-Kinase- und Myokinase-Aktivität, ihre ATP-ase-Aktivität ist weitgehend von der Ionenstärke unabhängig. Die ATP-ase-Eigenschaften sind aus der Tabelle IV zu entnehmen.

TABELLE IV
EIGENSCHAFTEN DER GRANA-ATP-ASE BEI 20°C UND pH 7.0

Ionen- stärke	Art und Konzentration der aktivierenden Erdalkali-Ionen	Spaltungsrate in $\mu\text{Mol P} \cdot \text{mg Eiweiss}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	
		Grana I (15,000 g)	Grana II (45,000 g)
0.4	keine Erdalkali-Ionen	0.043	0.03
0.4	Mg ⁺⁺ 0.005 M	0.35	0.25
0.08	Mg ⁺⁺ 0.005 M	0.33	0.25
0.4	Ca ⁺⁺ 0.005 M	0.09	0.12
0.4	Mg ⁺⁺ 0.005 M + Ca ⁺⁺ 0.005 M	0.09	0.12

ATP = 0.005 M

ATP, AT³²P, AD³²P siehe¹.

ITP und IDP wurden nach dem von KLEINZELLER¹⁰ angegebenen Verfahren durch Desaminierung der entsprechenden Adenosin-Phosphate hergestellt.

Phosphokreatin wurde als Natriumsalz nach ENNOR UND STOCKEN¹¹ gewonnen und nach zweimaliger Umkristallisation verwendet.

Salyrgan = Mersaly = theophyllin-freie *o*-[(3-Hydroxymercuri-2-methoxypropyl)-carbamyl]-phenoxyessigsäure verdanken wir den Farbwerken Hoechst, Frankfurt.

ATP-ase-Bestimmungen erfolgen bei pH 7 (TRIS-Maleinsäure-Puffer¹⁵ 0.01–0.02 M oder Borat-Puffer 0.01 M) in Gegenwart von 0.003–0.005 M Na-ATP und 0.003–0.005 M MgCl₂. Einem Sammelansatz wird zu den gewünschten Zeiten jeweils ein Aliquot entnommen und in 3 ml Trichloressigsäure (3 %) pipettiert. Die Bestimmung des abgespaltenen Phosphates erfolgt nach ROCKSTEIN UND HERRON¹². Aus der Steigung der gewonnenen Zeitkurven ergibt sich die Spaltungsrate.

Myokinase-Bestimmung geschieht bei pH 7 (TRIS-Maleinsäure-Puffer) in Gegenwart von 0.005 M ADP und 0.004–0.006 M MgCl₂. Im Abstand von 10–15 min werden 4 ml zur Phosphat-Bestimmung entnommen. Das abgespaltene Phosphat wird nach ROCKSTEIN UND HERRON¹² bestimmt. Die Steigung der Zeitkurve gibt die Rate der ATP-Bildung durch Myokinase. Die Myokinasewirkung ist von 0.1 μ –0.8 μ von der Ionenstärke unabhängig.

Kreatinphosphokinase-Bestimmung erfolgt ebenfalls aus einem Sammelansatz (ADP 0.005 M, Kreatin-Phosphat 0.011 M, MgCl₂ 0.006 M, TRIS-Maleinsäure-Puffer 0.01 M, pH 7, Ionenstärke 0.3 μ , Temp. 20°C). Zu entsprechenden Zeiten werden je 4 ml entnommen, die Fermentaktivität mit Phenylmercuriacetat (vergl. CHAPPELL UND PERRY¹³) gehemmt und das Eiweiss durch ZnSO₄ und Ba(OH)₂ gefällt (SOMOGYI¹⁶). Die Kreatin-Bestimmung erfolgt nach ENNOR UND STOCKEN¹⁴.

Austauschansätze mit Kreatinphosphokinase enthalten 0.006 M AD³²P, 0.005 M ATP, 0.004 M MgCl₂. Die pH-Einstellung im Bereich von pH 6.8–9.8 erfolgt durch TRIS-Puffer¹⁵.

Zur Untersuchung auf Nukleosid-diphospho-Kinase werden 0.005 M AT³²P, 0.005 M IDP und 0.006 M MgCl₂ zugesetzt. Zu gewünschten Zeiten werden je 2 ml entnommen und in 0.5 ml Trichloressigsäure (6 %) pipettiert. Die Trichloressigsäure enthält 0.003 M ITP (inaktiv), 0.003 M AMP und 0.003 M IMP. Dadurch lassen sich auch Spuren entstehenden IT³²P papierchromatografisch nachweisen und sauber von den übrigen Nukleotiden trennen.

Austauschansätze mit Grana-Suspensionen werden wie normale Austauschansätze durchgeführt (vergl. ¹).

Papierchromatografische Trennung und Aufarbeitung der Chromatogramme sind in ¹ beschrieben.

ZUSAMMENFASSUNG

1. In 8–10 mal umgefällten Aktomyosin-Lösungen und 10–12 mal gewaschenen isolierten Fibrillen des Kaninchenmuskels ist Nukleosid-diphospho-Kinase in so geringen Spuren vorhanden, dass nur 0–2 % des Phosphat-Austausches durch eine Nudiki-Reaktion erklärt werden können.

2. Kreatinphosphokinase tauscht zwischen AD³²P und ATP überhaupt kein Phosphat aus wenn Phosphokreatin oder Kreatin abwesend sind.

Literatur S. 117.

3. In Gegenwart der Kreatin- und Phosphokreatin-Spuren, die in den angegebenen hochgereinigten Präparaten vorhanden sind, tragen die ausserdem vorhandenen Reste der Kreatinphosphokinase $\ll 1\%$ zum Phosphat-Austausch bei.

4. Myokinase bildet AT³²P aus AD³²P nicht in einem grösseren Betrage als auch IM³²P oder AM³²P gebildet werden, solange die Menge an AM³²P 5-6% des anfänglichen AD³²P nicht überschreitet.

5. Der Myokinase-Gehalt der erwähnten Präparate ist so klein, dass in der Regel nicht mehr als 0-2% des entstandenen AT³²P bei 0°C und 4-5% bei 20°C auf Myokinase-Wirkung bezogen werden können.

6. Die Grana-ATP-ase der Muskeln tauscht Phosphat zwischen AD³²P und ATP in erheblichem Umfang aus. Die Proportion Phosphat-Austausch: ATP-Spaltung ist aber für Grana und Aktomyosin gleich. Infolgedessen kann der Anteil der Grana-ATP-ase an dem Phosphat-Austausch der angeführten hochgereinigten Aktomyosin-Präparate und Fibrillen nicht grösser sein als ihr Anteil an der ATP-Spaltung.

7. Es wird auf verschiedene Weise wahrscheinlich gemacht, dass der Anteil der Grana an der ATP-Spaltung durch hochgereinigte Aktomyosin-Präparate und Fibrillen nicht gross, wahrscheinlich sogar sehr klein ist.

SUMMARY

1. In solutions of actomyosin dissolved and reprecipitated 8-10 times and isolated fibrils of rabbit muscle washed 10-12 times, nucleoside diphosphokinase is present in such slight traces that only 0-2% of the phosphate transfer can be explained by a nucleoside-diphosphokinase reaction.

2. Creatine phosphokinase does not transfer any phosphate at all between AD³²P and ATP if phosphocreatine or creatine are absent.

3. In the presence of traces of creatine and phosphocreatine that occur in the highly purified preparations described, the remainder of the creatine phosphokinase present contributes $\ll 1\%$ to the phosphate transfer.

4. The amount of AT³²P formed by myokinase from AD³²P is not greater than the amounts of IM³²P and AM³²P formed, as long as the AM³²P content of the mixture does not exceed 5-6% of the original AD³²P.

5. The myokinase content of the preparations mentioned is so low that as a rule not more than 0-2% of the resulting AT³²P at 0°C, and 4-5% at 20°C, can be related to myokinase action.

6. The granular ATP-ase of the muscles transfers phosphate between AD³²P and ATP to a considerable extent. The proportion phosphate transfer: ATP splitting is, however, the same for granules and actomyosin. Consequently, the share of granular ATP-ase in the phosphate transfer of the highly purified actomyosin preparations cannot be greater than its share in the ATP splitting.

7. For various reasons it seems probable that the share of the granules in ATP splitting by highly purified actomyosin preparations and fibrils is not great, and probably even very slight.

LITERATUR

- ¹ G. ULBRECHT UND M. ULBRECHT, *Biochim. Biophys. Acta*, 25 (1957) 100.
- ² P. BERG UND W. JOKLIK, *J. Biol. Chem.*, 210 (1954) 657.
- ³ P. BERG UND W. JOKLIK, *Nature*, 172 (1953) 1008.
- ⁴ W. W. KIELLEY UND O. MEYERHOF, *J. Biol. Chem.*, 176 (1948) 591.
- ⁵ S. V. PERRY, *Biochim. Biophys. Acta*, 8 (1952) 499.
- ⁶ S. A. KUBY, L. NODA UND H. A. LARDY, *J. Biol. Chem.*, 210 (1954) 65.
- ⁷ L. NODA, S. A. KUBY UND H. A. LARDY, *J. Biol. Chem.*, 210 (1954) 83.
- ⁸ L. NODA, S. A. KUBY UND H. A. LARDY, *J. Biol. Chem.*, 209 (1954) 191.
- ⁹ H. HOFFMANN-BERLING, *Biochim. Biophys. Acta*, 19 (1956) 453.
- ¹⁰ A. KLEINZELLER, *Biochem. J.*, 36 (1942) 729.
- ¹¹ A. H. ENNOR UND L. A. STOCKEN, *Biochem. J.*, 43 (1948) 190.
- ¹² N. ROCKSTEIN UND P. W. HERRON, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 1500.
- ¹³ J. B. CHAPPELL UND S. V. PERRY, *Biochem. J.*, 57 (1954) 421.
- ¹⁴ A. H. ENNOR UND L. A. STOCKEN, *Biochem. J.*, 42 (1948) 557.
- ¹⁵ G. GOMORI, in S. P. COLOWICK UND N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, Vol. I, Academic Press Inc., New York, 1955, p. 138.
- ¹⁶ M. SOMOGYI, *J. Biol. Chem.*, 160 (1945) 69.
- ¹⁷ H. M. KALCKAR, *J. Biol. Chem.*, 148 (1943) 127.

Eingegangen den 16. Februar 1957