

# DIE NUKLEOSIDTRIPHOSPHATASE-AKTIVITÄT VON L-MYOSIN UND AKTOMYOSIN IN ABHÄNGIGKEIT VON DEN IONALEN BEDINGUNGEN

WILHELM HASSELBACH

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

## I

### EINLEITUNG\*

Es ist schon länger bekannt, dass die ATPase-Aktivität der verschiedenen Zustandsformen und Komplexe des L-Myosin als Aktivität von nur zwei ATPasen dargestellt werden kann<sup>1</sup>. Die Gesetze der ATP-Spaltung durch das Aktomyosin-gel können als die Regeln gelten, die die ATP-Spaltung durch die Aktomyosin-ATPase beherrschen. Die Gesetze, die der ATP-Spaltung durch Aktomyosin-sol, L-Myosin-sol und L-Myosin-gel gemeinsam sind, berechtigen dazu, diese drei ATPase-Aktivitäten unter dem gemeinsamen Begriff der L-Myosin-ATPase zusammenzufassen. Der Grund für dieses Verhalten liegt in der Tatsache, dass gelöstes Aktomyosin in ATP-Gegenwart vollständig in freies L-Myosin einerseits und unwirksames Aktin andererseits dissoziiert. Umgekehrt ist das geschilderte fermentative Verhalten gleichzeitig ein Beweis für die Dissoziation des gelösten Aktomyosin in Gegenwart von ATP.

Bezieht man in die Betrachtung neben der ATP-Spaltung auch die Spaltung der anderen Nukleosidtriphosphate ein, so sieht es auf den ersten Blick so aus, als wenn man die fermentativen Leistungen der fraglichen Proteine ebenfalls und in analoger Weise als Leistungen einer Aktomyosin- und einer L-Myosin-NTPase zusammenfassen könnte.

So spaltet das Aktomyosin-gel mit und ohne Erdalkalitionen als Aktivatoren ATP und CTP mit grösserer Rate als UTP, ITP und GTP<sup>2</sup>. Dagegen setzten L-Myosin-gel, L-Myosin-sol und Aktomyosin-sol nach Zusatz von  $\text{Ca}^{+2}$  und  $\text{Mg}^{++}$  die 6-OH-NTP schneller um als die 6-NH<sub>2</sub>-NTP<sup>3,4,5</sup>.

Bevorzugte Spaltung der 6-NH<sub>2</sub>-NTP wäre auf Basis dieser Befunde kennzeichnend für die Aktomyosin-NTPase, bevorzugte Spaltung der 6-OH-NTP wäre charakteristisch für die L-Myosin-NTPase. Diese Unterscheidung stösst aber auf Schwierigkeiten. Denn der angegebene Unterschied zwischen den beiden NTPasen findet sich nur in Gegenwart von Erdalkalitionen. Die Ergebnisse von BLUM<sup>3</sup>, und GREVILLE UND REICH<sup>5</sup> lassen erkennen, dass ohne Erdalkalionenzusatz die 6-NH<sub>2</sub>-NTP nicht

\* Abkürzungen: NTP = Nukleosidtriphosphat; 6-OH-NTP = Nukleosidtriphosphat mit einer OH-Gruppe in 6-Stellung; 6-NH<sub>2</sub>-NTP = Nukleosidtriphosphat mit einer NH<sub>2</sub>-Gruppe in 6-Stellung; ATP = Adenosintriphosphat; CTP = Cytidintriphosphat; UTP = Uridintriphosphat; ITP = Inosintriphosphat; GTP = Guanosintriphosphat; EDTA = Äthylendiamintetraessigsäure.

nur vom Aktomyosin<sup>2</sup>, sondern auch vom Aktomyosin<sup>1</sup> und den L-Myosinpräparaten besser gespalten werden als die 6-OH-NTP.

Werden Erdalkalireste, die in den Präparaten auch dann vorhanden sind, wenn keine Erdalkalitionen zugesetzt werden, durch EDTA blockiert, so sollte man erwarten, dass die Spaltungsgeschwindigkeiten der 6-NH<sub>2</sub>-NTP noch weiter über die Spaltungsgeschwindigkeiten der 6-OH-NTP hinaus steigen. Diese Erwartung wird aber nur bei der Spaltung durch Aktomyosin<sup>1</sup> und L-Myosin<sup>1</sup> bestätigt<sup>4,5,6</sup>. Dagegen wird die Spaltung aller NTP durch L-Myosin<sup>1</sup> und Aktomyosin<sup>1</sup> von EDTA so stark gehemmt, dass deutliche Unterschiede zwischen den beiden NTPgruppen nicht mehr festgestellt werden können<sup>6</sup>.

Die hier zusammengestellten Angaben der Literatur sind nicht so zahlreich, dass sie nicht der Ergänzung bedürften. Grundsätzlich wichtig aber ist die Tatsache, dass eine weitgehend identische Art der NTPase-Aktivität von Aktomyosin<sup>1</sup> und L-Myosinpräparationen für die Spaltung vieler NTP gar nicht zu erwarten ist. Denn ATP ist das einzige Nukleosidtriphosphat, das ohne Zusatz von Magnesium ein Aktomyosin<sup>1</sup> vollständig dissoziiert, während ITP und GTP unter diesen Umständen die Viskosität eines Aktomyosin<sup>1</sup> überhaupt nicht erniedrigen (Siehe Tab. I und Fig. 1). Ein gleichartiges Verhalten der NTPase-Aktivitäten von Aktomyosin<sup>1</sup> und L-Myosin<sup>1</sup> wäre eine reine Koinzidenz in all den Fällen, in denen durch die Art des NTP oder durch Gegenwart von EDTA eine Dissoziation des Aktomyosin<sup>1</sup> gar nicht stattfindet.

## II

### DIE SPALTUNG DER NTP IN GEGENWART VON Mg<sup>++</sup>

Bei dieser Situation ist es zweckmässig, die Spaltung der verschiedenen NTP zunächst zu vergleichen unter Bedingungen, unter denen der kolloidale Zustand der Proteine eindeutig ist. Das ist der Fall, wenn alle Präparate mit  $1 \cdot 10^{-3} M$  Mg<sup>++</sup> aktiviert sind. Denn das Mg<sup>++</sup>-aktivierte Aktomyosin<sup>1</sup> wird durch alle NTP vollständig dissoziiert. Es wird zunächst die Spaltung durch das Aktomyosin<sup>1</sup> in Mg<sup>++</sup>-Gegenwart ( $10^{-3} M$ )<sup>2</sup> verglichen mit der Spaltung durch L-Myosin<sup>1</sup>, L-Myosin<sup>1</sup> und durch Aktomyosin<sup>1</sup>.

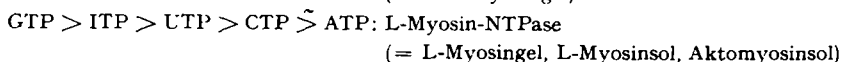
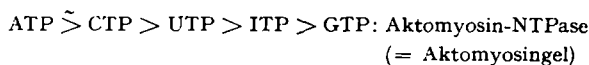
Es ergibt sich:

1. Die Reihenfolge der Spaltungsgeschwindigkeiten der verschiedenen NTP durch L-Myosinpräparate und Aktomyosin<sup>1</sup> ist identisch.

2. Auch die Absolutbeträge der Spaltungsgeschwindigkeiten jedes einzelnen NTP sind etwa gleich für L-Myosin<sup>1</sup>, L-Myosin<sup>1</sup> und Aktomyosin<sup>1</sup>.

Unter Mg<sup>++</sup>-Aktivierung zeigen also L-Myosin<sup>1</sup>, L-Myosin<sup>1</sup> und Aktomyosin<sup>1</sup> identische NTPase-Aktivität, die demnach als L-Myosin-NTPase-Aktivität bezeichnet werden kann.

3. Die Reihenfolge, in der die NTP durch die L-Myosin-NTPase gespalten werden, ist eine genaue Umkehrung der Reihenfolge, in der die NTP durch die Aktomyosin-NTPase gespalten werden:



(Vergl. Fig. 1 und Fig. 2a, b, c).

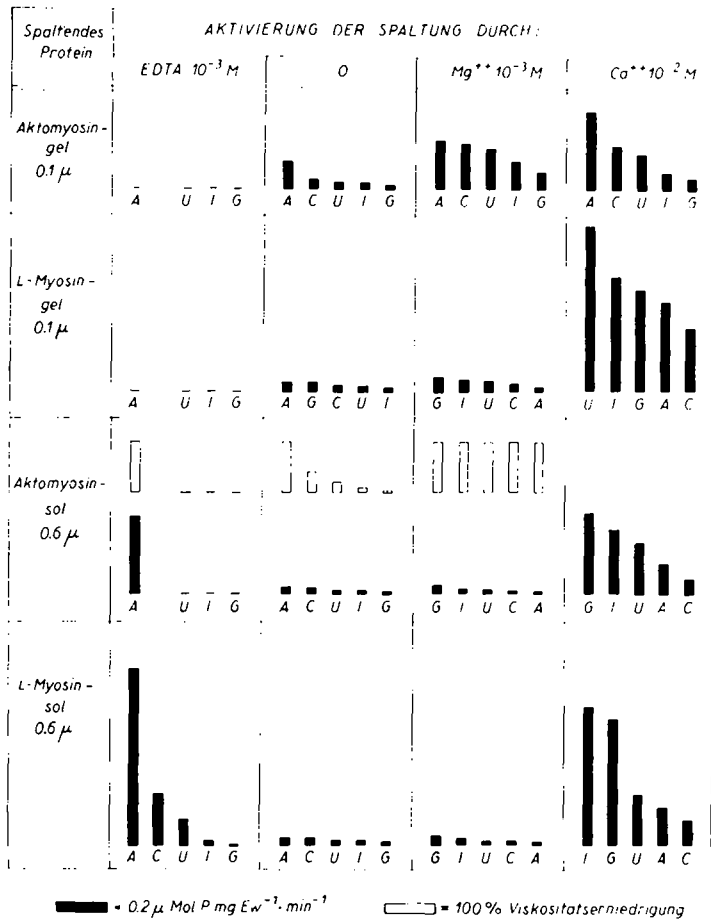


Fig. 1. NTPase-Aktivität von Aktomyosin-gel, L-Myosin-gel, Aktomyosin-sol und L-Myosin-sol unter verschiedenen Aktivierungsbedingungen. T = 21° C, pH = 7.0, Ionenstärke mit KCl eingestellt. : Anfangsgeschwindigkeit der Spaltung; : Prozentuale Viskositätserniedrigung.

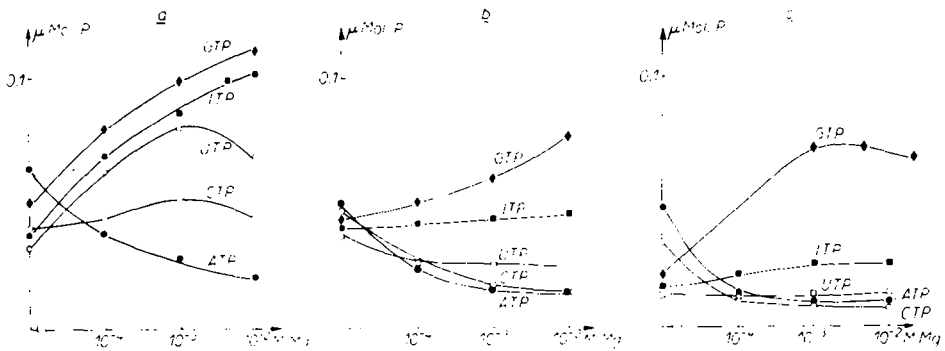


Fig. 2. Abhängigkeit der L-Myosin-NTPase-Aktivität von der Magnesiumkonzentration. Spaltung durch das L-Myosin-gel (0.1  $\mu$ ) 2a, durch das L-Myosin-sol 2b, durch das Aktomyosin-sol (0.6  $\mu$ ) 2c. Ordinaten: Anfangsgeschwindigkeit der Spaltung in  $\mu\text{Mol P} \times \text{mg Eiweiss}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ . Abszissen: Magnesiumkonzentration. T = 21° C, pH = 7.0.

Das gleichartige Verhalten der NTPase-Aktivitäten von L-Myosin- und Aktomyosin-beruht darauf, dass die Mg-aktivierte L-Myosin-NTPase in ihrer Aktivität wenig von der Ionenstärke abhängt (Fig. 3).

Den Übergang der Aktomyosin-ATPase in die L-Myosin-NTPase zwischen 0.1 und 0.4  $\mu$  zeigt Fig. 4. Fig. 4 und der Vergleich der Fig. 2a, 2b und 2c zeigen ferner, dass die Absolutwerte der Spaltungsrate der L-Myosin-NTPase kleiner sind als die der Aktomyosin-NTPase. Dies gilt selbst für das GTP, das durch die Aktomyosin-NTPase am schwächsten und durch die L-Myosin-NTPase am stärksten unter allen NTP gespalten wird.

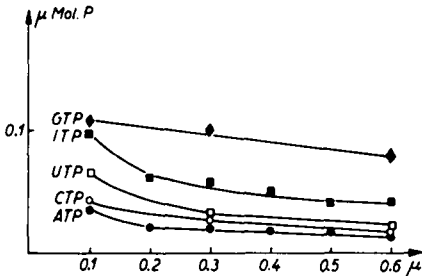
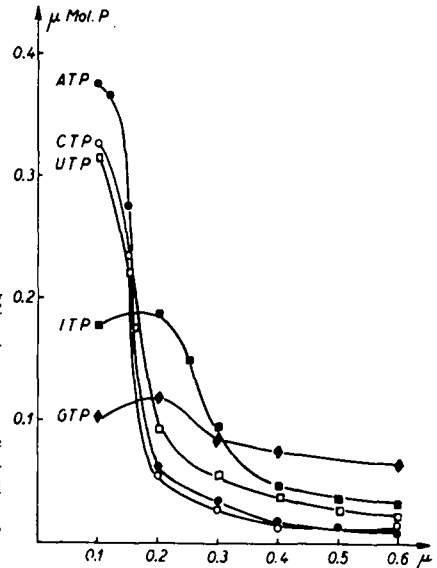


Fig. 3. Einfluss der Ionenstärke auf die Spaltung der NTP durch L-Myosin in Gegenwart von  $5 \cdot 10^{-3} M$   $Mg^{++}$ . Ordinate: Anfangsgeschwindigkeit der Spaltung in  $\mu Mol P \times mg Eiweiss^{-1} \times min^{-1}$ . Abszisse: Ionenstärke.  $T = 21^\circ C$ ,  $pH = 7.0$ .

Fig. 4. Übergang der Aktomyosin-NTPase in die L-Myosin-NTPase bei Magnesiumaktivierung. Ordinate: Anfangsgeschwindigkeit der Spaltung in  $\mu Mol P \times mg Eiweiss^{-1} \times min^{-1}$ . Abszisse: Ionenstärke. Magnesiumkonzentration: Für jedes einzelne NTP optimal.  $T = 21^\circ C$ ,  $pH = 7.0$ .



### III

#### VERGLEICH DER NTP-SPALTUNG DURCH AKTOMYOSINGEL EINERSEITS UND GEREINIGTEN L-MYOSINPRÄPARATEN ANDERERSEITS NACH AKTIVIERUNG DURCH CALCIUM

Bei der  $Ca^{++}$ -aktivierten Spaltung haben wir mit L-Myosin-NTPase-Aktivität einerseits und Aktomyosin-NTPase-Aktivität andererseits nur zu rechnen, wenn wir Aktomyosin- mit reinen L-Myosinpräparaten vergleichen (siehe II). Auch hier kehrt sich beim Übergang vom Aktomyosin- zu den reinen L-Myosinpräparaten die Reihenfolge der Raten um, mit denen einerseits die 6- $NH_2$ -NTP und andererseits die 6-OH-NTP gespalten werden. Innerhalb dieser Gruppen aber wird die Reihenfolge nicht einfach umgekehrt.

1. Sowohl die L-Myosin- als auch die Aktomyosin-NTPase spaltet immer ATP schneller als CTP. Dies gilt für alle  $Ca^{++}$ -Konzentrationen zwischen  $10^{-4}$  und  $10^{-2} M$  (Fig. 1, 5a-c). Die Raten der Spaltung durch die L-Myosin NTPase sind für alle NTP grösser als die entsprechenden Raten der Spaltung durch die Aktomyosin-NTPase, wenn die  $Ca^{++}$ -Konzentration  $10^{-2} M$  und die Ionenstärke 0.1  $\mu$  beträgt. Wenn die  $Ca^{++}$ -Konzentration klein und die Ionenstärke gross ist, werden nur die 6-OH-NTP

durch die L-Myosin-NTPase (Fig. 5a und 5b) schneller gespalten als durch die Aktomyosin-NTPase (Fig. 5c).

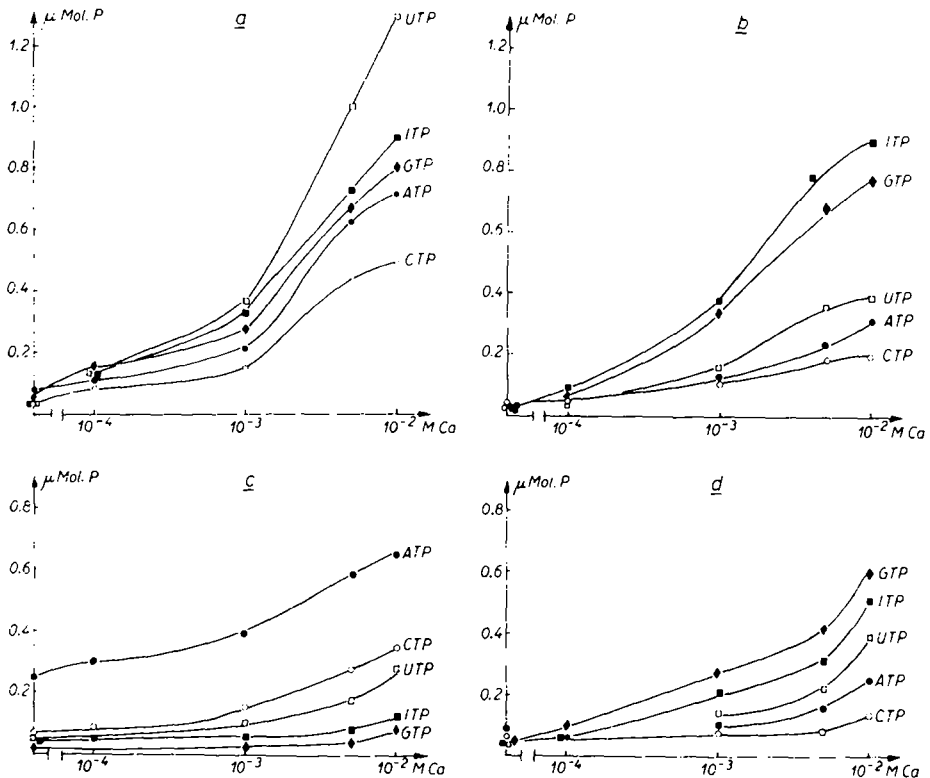


Fig. 5. Abhängigkeit der NTPase-Aktivität von der Calciumkonzentration. Spaltung durch das L-Myosin 5a, durch das L-Myosinsol 5b, durch das Aktomyosin 5c und durch das Aktomyosinsol 5d. Ordinaten: Anfangsgeschwindigkeit der Spaltung in  $\mu\text{Mol P} \times \text{mg Eiweiss}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ . Abszissen: Calciumkonzentration.  $T = 21^\circ \text{C}$ ,  $\text{pH} = 7.0$ .

2. Die Reihenfolge der Spaltung der drei NTP mit einer 6-OH-Gruppe ist ganz verschieden, je nach der Ionenstärke, die auf die L-Myosin-NTPase einwirkt. Denn der Einfluss der Ionenstärke auf die  $\text{Ca}^{++}$ -aktivierte L-Myosin-NTPase ist ausserordentlich stark. Das ist einer der fundamentalen Unterschiede zwischen der  $\text{Ca}^{++}$ - und der  $\text{Mg}^{++}$ -Aktivierung. Fig. 6 zeigt Folgendes:

(a) Bei niedriger Ionenstärke spaltet die L-Myosin-NTPase alle NTP wesentlich schneller, als es die Aktomyosin-NTPase bei der gleichen Ionenstärke tut.

(b) Mit wachsender Ionenstärke nimmt die Spaltung durch die  $\text{Ca}^{++}$ -aktivierte L-Myosin-NTPase zwischen  $0.1 \mu$  und  $0.6 \mu$  steil und gradlinig ab für UTP, ATP und CTP, für GTP und ITP nimmt sie dagegen zunächst zu und erst bei hohen Ionenstärken wieder ab.

Die Reihenfolge der Spaltungsraten zwischen  $0.1 \mu$  und  $0.15 \mu$  stimmt mit den Ergebnissen von GREVILLE UND REICH<sup>5</sup> bei etwa der gleichen Ionenstärke überein. Auch die Reihenfolge der Spaltungsraten zwischen  $0.4$  und  $0.6 \mu$  ist die gleiche, wie sie GREVILLE UND REICH<sup>5</sup> bei etwa  $0.45 \mu$  und BLUM<sup>3</sup> für ITP, UTP und ATP bei  $0.6 \mu$  gefunden haben. Von diesen übereinstimmenden Befunden weicht die von KIELLEY *et al.*<sup>4</sup> an L-Myosin gefundene Reihenfolge ab. Sie finden

nämlich, dass  $\text{Ca}^{++}$ -aktiviertes L-Myosin GTP und ITP schneller spaltet als UTP. Möglicherweise erklärt sich diese Diskrepanz aus den unterschiedlichen Spaltungsbedingungen. Denn KIELLEY *et al.*<sup>4</sup> haben die Spaltungsraten bei 37° C und einer Ionenstärke von knapp 0.1  $\mu$  in Gegenwart von nur 0.05 M KCl gemessen. Unsere Spaltungsexperimente und die von GREVILLE UND REICH<sup>5</sup> aber wurden bei 21° C bzw. 25° C und bei Ionenstärken zwischen 0.1 und 0.15  $\mu$  in Gegenwart von 0.08 bzw. 0.1 M KCl durchgeführt. Wenn für alle NTP in diesem Ionenstärkebereich eine ähnlich starke Abhängigkeit der Spaltungsraten von der Kaliumionenkonzentration besteht, wie sie MOMMAERTS<sup>7</sup> für das ATP gefunden hat, können die geringen Unterschiede in der KCl-Konzentration der Spaltungsansätze sehr wohl grosse Verschiedenheiten in der Grösse der Spaltungsraten zur Folge haben.

#### IV

##### VERGLEICH DER $\text{Ca}^{++}$ UND DER $\text{Mg}^{++}$ AKTIVIERUNG DER NTP-SPALTUNG

Wird die Beeinflussung der Spaltungsraten der verschiedenen NTP durch  $\text{Mg}^{++}$  einerseits und  $\text{Ca}^{++}$  andererseits verglichen, so ergeben sich folgende generellen Aussagen:

$\text{Ca}^{++}$ -Ionen aktivieren die Spaltungsraten aller NTP sowohl durch Aktomyosin-NTPase wie durch L-Myosin-NTPase. Die Verschiedenheit in der Reihenfolge der Spaltungsraten zwischen Aktomyosin-NTPase einerseits und L-Myosin-NTPase andererseits beruht also nie auf einer Hemmung. Diese Verschiedenheit beruht vielmehr immer nur darauf, dass die Spaltung der verschiedenen NTP durch Aktomyosin-NTPase und L-Myosin-NTPase in verschiedenem Umfang durch  $\text{Ca}^{++}$  beschleunigt wird.

Durch  $\text{Mg}^{++}$  werden im Aktomyosin die Spaltungsraten aller NTP erhöht. Diese Erhöhung ist für alle NTP grösser als die Erhöhung der Spaltungsraten durch  $\text{Ca}^{++}$ , mit der alleinigen Ausnahme der Spaltungsraten des ATP.

Dagegen beschränkt sich die  $\text{Mg}^{++}$ -Aktivierung der Spaltung durch L-Myosin-NTPase auf GTP und ITP und ist bei allen Ionenstärken kleiner als die entsprechende Aktivierung der Spaltung durch Aktomyosin-NTPase. Die Spaltung der beiden 6-NH<sub>2</sub>-NTP und des UTP durch L-Myosin-NTPase wird dagegen unter allen Bedingungen gehemmt.

#### V

##### DIE SPALTUNG DER NTP DURCH L-MYOSINPRÄPARATE UND AKTOMYOSINGEL IN GEGENWART VON EDTA

Aktomyosin- und L-Myosinpräparate ohne Zusatz enthalten gewisse Mengen an fest gebundenem  $\text{Ca}^{++}$  und  $\text{Mg}^{++}$  (vergl. HASSELBACH<sup>12</sup>). Der Einfluss dieser fest gebundenen Beträge an  $\text{Ca}^{++}$  und  $\text{Mg}^{++}$  auf die Spaltung kann in einem gewissen Umfang durch die Blockade der beiden Erdalkalitionen mit EDTA analysiert werden<sup>4, 5, 8, 9</sup>.

Das Experiment zeigt, dass unter EDTA die ATP-Spaltung durch L-Myosin-NTPase im kalium-haltigen Sol (0.6  $\mu$ ) auf die höchste Spaltungsrate emporschnellt, die überhaupt beobachtet ist (Fig. 1). Die Spaltung von CTP und UTP wird wesentlich schwächer, aber immer noch stark aktiviert, während die ITP- und GTP-Spaltung gehemmt wird. Das Anwachsen der ATP, CTP und UTP-Spaltung durch Zugabe von EDTA muss auf die Blockierung des Magnesiums bezogen werden und nicht auf die

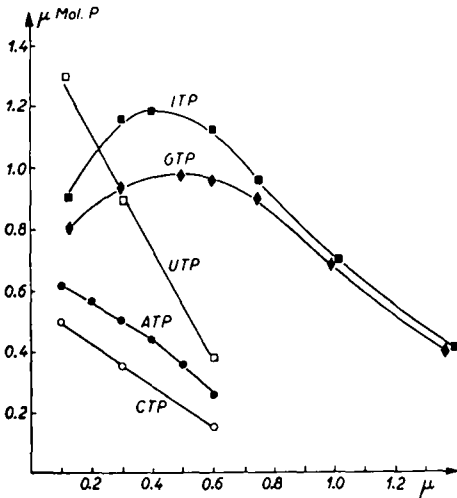


Fig. 6. Einfluss der Ionenstärke auf die Calcium-aktivierte Spaltung des L-Myosin. Ordinate: Anfangsgeschwindigkeit der Spaltung in  $\mu\text{Mol P} \times \text{mg Eiweiss}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ . Abszisse: Ionenstärke. Calciumkonzentration =  $10^{-2}M$ ,  $T = 21^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH } 7.0$ .

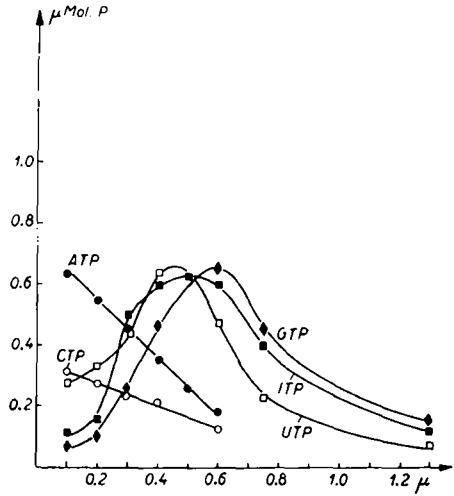


Fig. 7. Einfluss der Ionenstärke auf die Calcium-aktivierte Spaltung des Aktomyosin. Ordinate: Anfangsgeschwindigkeit der Spaltung in  $\mu\text{Mol P} \times \text{mg Eiweiss}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ . Abszisse: Ionenstärke. Calciumkonzentration =  $10^{-2}M$ ,  $T = 21^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH } 7.0$ .

Blockierung des  $\text{Ca}^{++}$ . Denn die Blockierung des  $\text{Ca}^{++}$ , das die Spaltung nie hemmt und immer fördert, sollte die Spaltungsraten erniedrigen und nicht erhöhen. Es muss infolgedessen aus dem EDTA-Effekt geschlossen werden, dass das gebundene  $\text{Mg}^{++}$  die Spaltung von ATP, CTP und UTP stark hemmt, während das gebundene  $\text{Ca}^{++}$  die Spaltung dieser NTP nur schwach fördert. Die Hemmung der ITP- und GTP-Spaltung durch EDTA kann dagegen sowohl auf die Blockade des  $\text{Mg}^{++}$  als auch des  $\text{Ca}^{++}$  bezogen werden, da die Spaltung dieser beiden NTP durch  $\text{Ca}^{++}$  wie  $\text{Mg}^{++}$  gefördert wird.

Die Spaltung der NTP durch das Aktomyosin ist in Gegenwart von EDTA in allen Fällen gehemmt. Das ist verständlich, weil im Aktomyosin die Spaltung aller NTP sowohl durch  $\text{Ca}^{++}$  als auch durch  $\text{Mg}^{++}$ -Ionen aktiviert wird. Auch die NTP-Spaltung durch L-Myosin verschwindet unter EDTA fast vollständig, und zwar für alle NTP gleichmässig. Dass auch die ATP-Spaltung durch das L-Myosin unter EDTA fast vollständig verschwindet, ist merkwürdig. Denn  $\text{Mg}^{++}$  hemmt die ATP-Spaltung durch die L-Myosin-NTPase auch bei der niedrigen Ionenstärke eines L-Myosins, während die Spaltung der anderen NTP durch die L-Myosin-NTPase nur gehemmt wird, wenn die Ionenstärke höher ist. Infolgedessen muss die EDTA-Hemmung der ATP-Spaltung aus der Blockierung des Calciums erklärt werden. Das würde heissen, dass bei sehr niedrigen Ionenstärken die Aktivität der L-Myosin-ATPase durch das gebundene Magnesium gehemmt wird. Denn in diesem Falle muss die Blockierung beider Erdalkalitionen zu Hemmung der ATP-Spaltung führen. Die gleichen Aktivierungs- und Hemmungseffekte, wie sie mit EDTA erzielt werden können, treten auch bei Zusatz von "Na-Hexametaphosphat" (1 mg/ml)<sup>1</sup> und einigen anderen Enthärtern<sup>6</sup> auf. Es scheint also nicht notwendig zu sein, für die EDTA-Effekte eine spezifische Wirkung ausser der enthärtenden anzunehmen.

## VI

## DIE NTPASE-AKTIVITÄT DES UNDISOZIIERTEN AKTOMYOSINSOL

In Abwesenheit von Magnesium dissoziiert das Aktomyosin unter UTP, ITP und GTP auch bei hohen Ionenstärken nicht oder nur unwesentlich (Tabelle I). In Gegenwart dieser drei NTP kann also das bisher noch nicht untersuchte Enzym "Aktomyosin-NTPase im Solzustand" beobachtet werden. Wir vergleichen zunächst die Spaltung dieser drei NTP durch Aktomyosinsol-NTPase und L-Myosin-NTPase.

TABELLE I

VISKOSITÄTSERNIEDRIGUNG VON AKTOMYOSINSOL DURCH NUKLEOSIDTRIPHOSPHATE

Ionale Bedingungen	Prozentuale Viskositätserniedrigung 100% = Viskositätserniedrigung unter ATP + Mg <sup>++</sup>				
	ATP	CTP	UTP	ITP	GTP
0.6 $\mu$ + 0.01 M EDTA	90-100	—	0	0	0
0.6 $\mu$	100	40	23	11	2.5
1.2 $\mu$	100	72	41	34	22
0.6 $\mu$ + 10 <sup>-3</sup> M Mg <sup>++</sup>	100	100	100	100	100

T = 21° C, NTP = 1 · 10<sup>-3</sup> M, pH = 7.0.

Das Experiment zeigt (Fig. 5a, 5b und 5d), dass unter Ca<sup>++</sup>-Aktivierung ITP und GTP von der undissoziierten Aktomyosinsol-NTPase bei allen Ionenstärken nur etwa halb so schnell gespalten werden wie durch die L-Myosin-NTPase. Die Abhängigkeit der Spaltung dieser beiden NTP von der Ionenstärke ist für das Aktomyosinsol und das L-Myosinsol ungefähr gleich. Ausgesprochene Optima befinden sich im Bereich der Ionenstärke 0.4 bis 0.6  $\mu$ . Kleinere Unterschiede in der Lage und Form der Optima gehen aus Fig. 7 hervor.

UTP wird von der undissoziierten Aktomyosin-NTPase zwischen 0.3 und 0.6  $\mu$  ebenfalls schlechter gespalten als durch L-Myosinsol. Dagegen ist bei höheren Ionenstärken die Spaltung durch L-Myosinsol und Aktomyosinsol gleich. Dies mag zum Teil damit zusammenhängen, dass bei diesen höheren Ionenstärken das UTP doch eine zunehmende Dissoziation bewirkt. Obwohl der Unterschied in der Spaltungsgrösse des UTP durch Aktomyosinsol und L-Myosinsol quantitativ kleiner ist als der Unterschied der GTP- und ITP-Spaltung, ist das Verhalten dieser beiden NTPasen gegenüber UTP nicht weniger verschieden als gegenüber ITP und GTP. Denn die Spaltung des UTP durch die beiden Ca<sup>++</sup>-aktivierten NTPasen hängt in ganz verschiedener Weise von der Ionenstärke ab. Während die UTP-Spaltung durch die L-Myosin-NTPase (Fig. 6) mit zunehmender Ionenstärke linear abfällt, steigt die Spaltung durch die Aktomyosinsol-NTPase mit der Ionenstärke bis 0.5  $\mu$  steil an und fällt erst bei höheren Ionenstärken wieder ab (Fig. 7).

Wenn kein Calcium zugesetzt ist, werden bei einer Ionenstärke von 0.6  $\mu$  UTP, ITP und GTP ebenfalls von Aktomyosinsol-NTPase schwächer als von der L-Myosinsol-NTPase gespalten. Auch in EDTA-Gegenwart werden diese drei NTP durch die Aktomyosinsol-NTPase langsamer gespalten als durch die L-Myosinsol NTPase.

Für die Spaltung von UTP, ITP und GTP ist also die Aktomyosinsol-NTPase ein weniger aktives Enzym als die L-Myosin-NTPase. Für die Spaltung von UTP,



ITP und GTP wird Aktin zum Inhibitor der L-Myosin-NTPase, wenn alle Erdalkalitionen durch Blockierung ausgeschaltet sind. Wie der Vergleich von Fig. 5a und Fig. 5c zeigt, ist auch bei niedrigen Ionenstärken Aktin ein Inhibitor der  $\text{Ca}^{++}$ -aktivierten L-Myosin-NTPase. Dies steht in schroffem Gegensatz zu der fördernden Wirkung des Aktin auf die NTP-Spaltung bei niedrigen Ionenstärken in Gegenwart von Magnesium. Denn unter Magnesium spaltet das Aktomyosin alle NTP schneller als das L-Myosin. Mit ATP ist das Aktomyosin unter allen Bedingungen vollständig und mit CTP recht weitgehend dissoziiert. Daher finden wir, dass ATP und CTP in Ansätzen ohne Erdalkalizusatz und in  $\text{Ca}^{++}$ -haltigen Ansätzen durch Aktomyosin und L-Myosin gleich schnell gespalten werden.

Dieses einfache Bild wird kompliziert durch die Befunde in EDTA-Gegenwart. In EDTA-Gegenwart wird nämlich ATP durch Aktomyosin zwar sehr stark gespalten, aber viel schwächer als durch L-Myosin<sup>8,9</sup>. Der Gedanke liegt nahe, dass Aktomyosin in EDTA-Gegenwart sogar unter ATP nicht mehr vollständig dissoziiert ist. Unvollständige oder fehlende Dissoziation unter EDTA oder Hexametaphosphat ist in einer früheren Arbeit auch behauptet worden. Diese Behauptung hat sich als nur begrenzt richtig erwiesen. In Gegenwart von Enthärtern lässt sich weitgehende Dissoziation des Aktomyosins erzwingen, wenn die ATP-Konzentration hoch genug gewählt wird ( $10^{-3} M$ ). Aber selbst unter solchen hohen ATP-Konzentrationen ist die ATP-Spaltung durch Aktomyosin in EDTA-Gegenwart kleiner als durch L-Myosin.

#### TECHNISCHER TEIL

L-Myosin und Aktomyosin wurden nach PORTZEHL, SCHRAMM UND WEBER<sup>10</sup> hergestellt.

Die Nukleosidtriphosphate waren Präparate der Firmen Sigma Chemical Company, St. Louis (USA), und Pabst, Milwaukee, Wisconsin (USA). Alle Nukleosidtriphosphate wurden papierchromatographisch geprüft.

Das Volumen der Spaltungsansätze betrug zwischen 2 und 10 ml. Die Eiweisskonzentration in den Ansätzen betrug 0.01 bis 0.03%. Die Spaltung der Nukleosidtriphosphate durch die Proteingele erfolgte bei einer Ionenstärke von 0.1 bis 0.12  $\mu$ , die Spaltung durch die Proteinsole bei einer Ionenstärke von 0.6  $\mu$ . Die Ionenstärke wurde mit KCl eingestellt. Die Spaltungsansätze wurden mit Histidin 0.01 M, pH 7.0 gepuffert. Wenn etwa 10 bis 20% des gesamten Nukleosidtriphosphat im Ansatz gespalten waren, wurde die Spaltung mit 5%iger Trichloressigsäure unterbrochen. Phosphat wurde nach ROCKSTEIN UND HERRON<sup>11</sup> bestimmt.

Die Viskosität der Aktomyosinole wurde mit einem Ubbelohde-Viskosimeter gemessen. Die prozentuale Viskositätsniedrigung wurde aus den relativen Viskositäten vor und nach Zugabe des Nukleosidtriphosphat und aus der relativen Viskosität des völlig dissoziierten Aktomyosins errechnet.

$$\text{prozentuale Viskositätsniedrigung} = \frac{(\log \eta_{rel_{un}} - \log \eta_{rel_x})}{\log \eta_{rel_{un}} - \log \eta_{rel_v}} \cdot 100$$

$\eta_{rel_{un}}$ : relative Viskosität des undissoziierten Aktomyosins

$\eta_{rel_v}$ : relative Viskosität des vollständig dissoziierten Aktomyosins

$\eta_{rel_x}$ : relative Viskosität des Aktomyosins in Gegenwart des zu untersuchenden Nukleosidtriphosphat.

#### ZUSAMMENFASSUNG

1. Es wird die Abhängigkeit der NTPase-Aktivität des Aktomyosins und des L-Myosins von den ionalen Bedingungen systematisch untersucht.

2. Für die NTPase-Aktivität des Calcium-aktivierten L-Myosins gilt:

(a) Durch Calciumionen wird die Spaltung der 6-OH-NTP durch L-Myosin und L-Myosin sehr viel stärker aktiviert als die Spaltung der 6-NH<sub>2</sub>-NTP.

(b) Die Reihenfolge, in der die 6-OH-NTP mit zunehmender Rate gespalten werden, hängt sehr stark von der Ionenstärke ab.

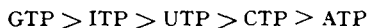
(c) Die Reihenfolge, in der die 6-NH<sub>2</sub>-NTP gespalten werden, ist unabhängig von der Ionenstärke. ATP wird immer schneller gespalten als CTP.

(d) Alle NTP werden durch das L-Myosin schneller gespalten als durch das L-Myosin.

Literatur S. 375.

3. Für die NTPase-Aktivität des L-Myosin in Gegenwart von Magnesiumionen gilt:

- (a) In Magnesiumumgebung sind die Raten der Spaltung durch das L-Myosin klein ( $< 0.1 \mu\text{Mol P} \times \text{mg Ew}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ ).
- (b) Magnesiumionen aktivieren die Spaltung von GTP und ITP durch Gel und Sol. Die Spaltung von UTP und CTP durch das Gel wird nur unwesentlich beeinflusst. Die Spaltung der beiden NTP durch das Sol wird durch Magnesium gehemmt. Die Spaltung des ATP wird durch Magnesiumionen immer gehemmt.
- (c) Durch L-Myosin-Gel und L-Myosin-Sol werden die NTP in der Reihenfolge



mit abnehmender Rate gespalten.

- (d) Die Reihenfolge der Spaltungsraten der NTP ist von der Ionenstärke unabhängig. Mit steigender Ionenstärke werden die Raten nur wenig kleiner.

4. Ohne Erdalkalizusatz und in Anwesenheit von Enthärtern spaltet L-Myosin-Sol die 6-NH<sub>2</sub>-NTP schneller als die 6-OH-NTP.

- (a) Ohne Erdalkalizusatz sind die Raten aller NTP klein.

(b) Zusatz von Enthärtern aktiviert die ATP- und CTP-Spaltung sehr stark und die UTP-Spaltung wenig. Die Spaltung von ITP und GTP wird gehemmt.

5. Die NTPase-Aktivität des Aktomyosin-Gel ist grundsätzlich verschieden von der des Aktomyosin-Sol und der L-Myosin-Präparate.

6. Das Gel spaltet ohne Erdalkalizusatz sowie in Magnesium- und Calcium-Gegenwart die NTP in der Reihenfolge  $\text{ATP} \lesssim \text{CTP} > \text{UTP} > \text{ITP} > \text{GTP}$  mit abnehmender Rate. Die Spaltung aller NTP mit Ausnahme des ATP wird durch  $10^{-3} M \text{ Mg}^{++}$  stärker aktiviert als durch  $10^{-2} M$  Calcium. EDTA hemmt die Spaltung aller NTP durch das Aktomyosin-Gel.

7. Beim Anstieg der Ionenstärke von 0.1 auf 0.4  $\mu$  wandelt sich die NTPase-Aktivität des Aktomyosin-Gel in die NTPase-Aktivität des Aktomyosin-Sol um.

8. Ist die Ionenstärke 0.4  $\mu$ , so dissoziieren in Magnesiumumgebung alle NTP das Aktomyosin. Das abdissoziierte L-Myosin besitzt die gleiche NTPase-Aktivität wie das L-Myosin-Sol.

9. Ohne Magnesiumzusatz wird das Aktomyosin-Sol nur durch ATP vollständig dissoziiert. CTP bewirkt eine stärkere partielle Dissoziation als UTP. ITP und GTP sind unwirksam.

10. Ohne Erdalkalizusatz und in Calciumumgebung sind deshalb die ATPase- und CTPase-Aktivitäten des Aktomyosin- und des L-Myosin-Sol einander gleich und die UTPase-Aktivität der beiden Proteine sehr ähnlich.

11. Ohne Erdalkalizusatz werden ITP, GTP und UTP durch das undissoziierte Aktomyosin-Sol mit ähnlich kleinen Raten gespalten wie durch das L-Myosin-Sol.

12. In Calciumumgebung wird GTP durch die Aktomyosin-Sol-NTPase schneller gespalten als ITP, während von der L-Myosin-NTPase ITP mit grösserer Rate als GTP umgesetzt wird.

13. Alle NTP werden durch das Aktomyosin-Sol langsamer gespalten als durch das L-Myosin-Sol.

14. Auch in Gegenwart von EDTA dissoziiert ATP das Aktomyosin-Sol vollständig. UTP, ITP und GTP bewirken im EDTA-haltigen Aktomyosin-Sol keine Dissoziation.

15. Die EDTA-Aktivierung der ATP-Spaltung durch das Aktomyosin-Sol ist kleiner als durch L-Myosin-Sol. Durch EDTA wird die UTP, ITP und GTP-Spaltung durch undissoziiertes Aktomyosin-Sol gehemmt.

## SUMMARY

1. The dependence of nucleosidetriphosphatase (NTPase) activity of actomyosin and L-myosin on the ionic conditions has been investigated.

2. The following holds with regard to the NTPase activity of calcium-activated L-myosin: (a) Ca ions activate much more strongly the splitting of 6-OH-NTP by L-myosin gel and L-myosin sol than the splitting of 6-NH<sub>2</sub>-NTP.

(b) The order in which the 6-OH-NTP is split at an increasing speed is very markedly dependent on the ionic strength.

(c) The order in which the 6-NH<sub>2</sub>-NTP is split is independent of the ionic strength. ATP is always split more rapidly than CTP.

(d) All the NTPs are split more rapidly by L-myosin gel than by L-myosin sol.

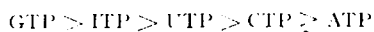
3. The following holds with regard to NTPase activity of L-myosin in the presence of magnesium ions:

(a) In the presence of  $\text{Mg}^{++}$  the rates of splitting by L-myosin are low ( $< 0.1 \mu\text{mole P} \times \text{mg protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ ).

(b) Mg ions activate the splitting of guanosine triphosphate (GTP) and inosine triphosphate (ITP) by gel and sol. The splitting of uridine triphosphate (UTP) and cytidine triphosphate (CTP) by the gel is only insignificantly altered. The splitting of both NTPs by the sol is inhibited by magnesium. The splitting of adenosine triphosphate (ATP) is always inhibited by Mg ions.

*Literatur S. 375.*

(c) The rate at which L-myosin gel and L-myosin sol split NTP decreases in the order:



(d) The order of the rate of splitting of NTP is independent of the ionic strength. With increasing ionic strength the rates decrease only slightly.

4. In the absence of alkaline earth and in the presence of chelating agents L-myosin sol splits 6-NH<sub>2</sub>-NTP more rapidly than 6-OH-NTP.

(a) Without addition of alkaline earth the rates for all NTPs are low.

(b) Addition of chelating agents activates the splitting of ATP and CTP very strongly and the splitting of UTP only slightly. The splitting of ITP and GTP is inhibited.

5. The NTPase activity of actomyosin gel is fundamentally different from that of actomyosin sol and L-myosin preparations.

6. Both in the absence of alkaline earth and in the presence of Mg and Ca, the gel splits NTP at a decreasing rate in the order  $\text{ATP} \gtrsim \text{CTP} > \text{UTP} > \text{ITP} > \text{GTP}$ . Splitting of all the NTPs, with the exception of ATP, is more strongly activated by  $10^{-3} M \text{ Mg}^{++}$  than by  $10^{-2} M \text{ Ca}^{++}$ . EDTA inhibits the splitting of all NTP by actomyosin gel.

7. When the ionic strength increases from 0.1 to 0.4  $\mu$  the NTPase activity of actomyosin gel becomes converted to the NTPase activity of actomyosin sol.

8. At an ionic strength of 0.4  $\mu$ , in the presence of  $\text{Mg}^{++}$ , all the NTPs dissociate actomyosin. The dissociated L-myosin has the same NTPase activity as the L-myosin sol.

9. When no  $\text{Mg}^{++}$  is added the actomyosin sol is dissociated completely only by ATP. CTP causes a stronger partial dissociation than UTP. ITP and GTP are ineffective.

10. In the absence of alkaline earth and in the presence of Ca, the ATPase and CTPase activities of actomyosin and L-myosin sol are therefore equal and the UTPase activity of both proteins is very similar.

11. When no alkaline earth is added ITP, GTP and UTP are split by the undissociated actomyosin sol and the L-myosin sol at a similar low rate.

12. In the presence of  $\text{Ca}^{++}$ , GTP is split more rapidly than ITP by actomyosin sol-NTPase, while ITP is split more rapidly than GTP by L-myosin-NTPase.

13. All NTPs are split more slowly by actomyosin sol than by L-myosin sol.

14. In the presence of EDTA also, ATP dissociates actomyosin completely. UTP, ITP and GTP do not bring about dissociation in EDTA-containing actomyosin sol.

15. The EDTA-activation of the ATP-splitting by actomyosin sol is less than that by L-myosin sol. UTP-, ITP- and GTP-splitting by undissociated actomyosin sol is inhibited by EDTA.

## LITERATUR

- <sup>1</sup> W. HASSELBACH, *Z. Naturforsch.*, 7b (1952) 163.
- <sup>2</sup> W. HASSELBACH, *Biochim. Biophys. Acta*, 20 (1956) 355.
- <sup>3</sup> J. J. BLUM, *Arch. Biochem. Biophys.*, 55 (1955) 486.
- <sup>4</sup> W. KIELLEY, H. M. KALCKAR UND L. B. BRADLEY, *J. Biol. Chem.*, 219 (1956) 95.
- <sup>5</sup> G. D. GREVILLE UND E. REICH, *Biochim. Biophys. Acta*, 20 (1956) 440.
- <sup>6</sup> W. J. BOWEN UND T. D. KERWIN, *J. Biol. Chem.*, 211 (1954) 237.
- <sup>7</sup> W. F. H. M. MOMMAERTS UND I. GREEN, *J. Biol. Chem.*, 208 (1954) 833.
- <sup>8</sup> E. T. FRIESS, *Arch. Biochem. Biophys.*, 51 (1954) 17.
- <sup>9</sup> E. T. FRIESS, M. F. MORALES UND W. J. BOWEN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 53 (1954) 311.
- <sup>10</sup> H. PORTZEHL, G. SCHRAMM UND H. H. WEBER, *Z. Naturforsch.*, 5b (1950) 61.
- <sup>11</sup> M. ROCKSTEIN UND P. W. HERRON, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 1500.
- <sup>12</sup> W. HASSELBACH, *Biochim. Biophys. Acta*, (im Druck).

Eingegangen am 7. März 1957