

- <sup>6</sup> M. E. FREEMAN, P. ANDERSON, M. OBERG AND A. DORFMAN, *J. Biol. Chem.*, 186 (1950) 201.
- <sup>7</sup> J. PARK AND W. JOHNSON, *J. Biol. Chem.*, 181 (1949) 149.
- <sup>8</sup> L. HOFSTEE, *Science*, 116 (1952) 329.
- <sup>9</sup> H. THORN, *Nature*, 164 (1949) 27.
- <sup>10</sup> H. EYRING, *Chem. Rev.*, 17 (1935) 65.
- <sup>11</sup> B. WEISSMANN, *J. Biol. Chem.*, 216 (1955) 783.
- <sup>12</sup> R. J. FOSTER AND C. NIEMAN, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 39 (1953) 999.
- <sup>13</sup> K. MEYER AND M. RAPPORT, *Science*, 113 (1951) 596.
- <sup>14</sup> E. A. DAVIDSON AND K. MEYER, *J. Biol. Chem.*, 211 (1954) 605.
- <sup>15</sup> R. H. PEARCE, *Biochem. J.*, 55 (1953) 467.
- <sup>16</sup> W. H. FISHMAN, B. SPRINGER AND R. BRUNETTI, *J. Biol. Chem.*, 173 (1948) 449.
- <sup>17</sup> M. E. EAST, J. MADINAVEITA AND A. TODD, *Biochem. J.*, 35 (1941) 872.
- <sup>18</sup> J. C. HOUCK AND R. H. PEARCE, *J. Biol. Chem.*, 226 (1957) 267.
- <sup>19</sup> G. BLIX, *Acta Chem. Scand.*, 2 (1948) 467.
- <sup>20</sup> E. J. KING, *Microanalysis in Medical Biochemistry*, J. & A. Churchill, Ltd., London, 1951.
- <sup>21</sup> G. TOENNIES AND B. BAKAY, *Anal. Chem.*, 25 (1953) 160.

Received March 22nd, 1957

## DIE BINDUNG VON ADENOSINDIPHOSPHAT, VON ANORGANISCHEM PHOSPHAT UND VON ERDALKALIEN AN DIE STRUKTURPROTEINE DES MUSKELS

WILHELM HASSELBACH

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

### I

Die Untersuchungen BOZLERS<sup>1</sup> haben gezeigt, dass Muskelfasern vom Psoas des Kaninchens nach Glycerin-Wasser-Extraktion noch etwa 0.6  $\mu\text{Mol Ca}^{++}/\text{g}$  Nassgewicht und etwa die gleiche Menge Magnesium enthalten. Diese Erdalkalitionen sind sehr fest an die Proteinstrukturen der extrahierten Fasern gebunden. Selbst länger dauernde EDTA-Behandlung entfernt aus diesen Fasern praktisch kein Magnesium und nur etwa 50% des Calciums. Auch Aktomyosinlösungen<sup>2</sup> und Aktinlösungen<sup>3</sup> enthalten Erdalkalitionen, die bei üblicher Reinigung nicht zu entfernen sind.

Auf Grund der grossen Bedeutung der Erdalkalitionen für die ATP-Kontraktion und die ATP-Spaltung durch die Proteine der kontraktilen Strukturen werden die Bindungsverhältnisse im folgenden im einzelnen untersucht. Insbesondere wird festgestellt, wie sich die Erdalkalitionen und das gebundene ADP PERRY'S<sup>4</sup> auf die verschiedenen Proteine der Fibrille verteilen.

### II

Wird Muskelbrei mit Latapie und Starmix zerkleinert und gründlich mit 0.1 *M* KCl gewaschen, so lassen sich nach etwa fünf Waschungen – bei jeder Waschung wird der Muskelbrei achtfach verdünnt – in der Waschflüssigkeit weder Eiweiss, Phosphat noch Erdalkalitionen nachweisen. Bei dieser Waschprozedur verliert der Muskel etwa

30% seines Eiweisses, die sogenannten wasserlöslichen Proteine, einen Teil seiner Sarkosomen, seine Betriebsstoffe und den Hauptteil seiner Ionen. Wir bezeichnen solche Präparate, die in ihrer Zusammensetzung den sogenannten Modellen entsprechen, weiterhin als ungelöste Proteinstrukturen des Muskels.

Die ungelösten Proteinstrukturen bestehen zu 72% aus Aktomyosin und zu 28% aus Stromaproteinen. Aus diesen Proteinen werden durch Behandlung mit Perchlorsäure in der Kälte Phosphat, Adenin, Calcium und Magnesium freigesetzt. Der Perchlorsäureextrakt enthält alle vom Protein gebundene Erdalkalitionen und praktisch alles Adenin. Durch eine Nachbehandlung des gewaschenen Perchlorsäure-Extraktes mit heisser Perchlorsäure werden keine Erdalkalitionen und nur Spuren von Adenin vom denaturierten Protein abgelöst. Auch nach feuchter Veraschung des gefällten Proteins konnte weder  $\text{Ca}^{++}$  noch  $\text{Mg}^{++}$  nachgewiesen werden. Der Phosphatgehalt des Fibrillenbreies wird durch die Perchlorsäure-Behandlung in der Kälte nur um 15% von 100 auf 85  $\mu\text{Mol P/g Ew}$  erniedrigt. Das Phosphat, das im Perchlorsäureniederschlag verbleibt, ist nicht nur an das Eiweiss gebunden<sup>5</sup> sondern auch an Lipide<sup>6</sup>.

Der Gehalt dieser ungelösten Proteinstrukturen an anorganischem und organischem Phosphat sowie an Adenin und Magnesium weist keine Verschiedenheiten auf, wenn einmal mit und einmal ohne EDTA\* gewaschen wird und wenn als Ausgangsmaterial einmal frischer und einmal totenstarrer Muskel benutzt wird (Tab. I, 2, 4, 5). Dagegen ist der Gehalt an gebundenem  $\text{Ca}^{++}$  nur noch etwa halb so gross, wenn die ungelösten Proteinstrukturen entweder aus totenstarrten Muskeln dargestellt werden (Tab. I, 4) oder wenn sie erschöpfend mit EDTA gewaschen werden (Tab. I, 2, 4). EDTA-Waschung von totenstarrten ungelösten Proteinstrukturen vergrössert den Calciumverlust nicht weiter (Tab. I, 5). Es ist also offenbar dieselbe Calciumportion, die durch die Totenstarre auswaschbar wird und die durch EDTA entfernt werden kann.

Der Anteil des strukturgebundenen Calcium am Gesamtcalcium des lebenden Muskels beträgt 10  $\mu\text{Mol/g Ew}$ , das sind etwa 60% des Gesamtcalcium des lebenden Muskels. Der Anteil des Calcium, der weder durch EDTA noch durch Totenstarre entfernt werden kann, beträgt etwa ein Drittel des Gesamtcalcium.

Ein Drittel des Gesamtcalcium ist also verhältnismässig locker gebunden, so dass es bei der Muskelregung auf den relaxing factor übertragen werden könnte.

Der an die ungelösten Proteinstrukturen gebundene Anteil des Magnesium beträgt dagegen nur 10% des Magnesiumgehaltes des lebenden Muskels (Tab. VI).

Der Gehalt der ungelösten Proteinstrukturen an organisch gebundenem Phosphat beträgt ein wenig mehr als das Doppelte des gebundenen Adenin. Wie sich papierchromatographisch zeigen lässt, beruht dies darauf, dass das ganze organisch gebundene Phosphat als ADP oder ATP, und zwar zu 90% als ADP und 10% ATP als, vorliegt (Tab. II) (vergl. PERRY<sup>4</sup>).

Dass der Gesamtbetrag an gebundenem Phosphat (organisch + anorganisch) dem Gesamtbetrag an gebundenen Erdalkalitionen annähernd gleich ist, wird sich in den folgenden Abschnitten als zufällige Übereinstimmung erweisen.

### III

Der Anteil der fraglichen Substanzen, der an die einzelnen Strukturproteine des Muskels gebunden ist, kann auf zwei verschiedenen Wegen festgestellt werden.

\* EDTA — Aethylendiamintetraessigsäure.

TABELLE I  
DER ERDALKALI-, ADENIN- UND PHOSPHATGEGALT DER UNGELÖSTEN PROTEINSTRUKTUREN BEI STUFENWEISER EXTRAKTION DER STRUKTURPROTEINE

Nr.	Zahl der Versuche	Präparat	Eiweiss in % des Gesamtmuskelwassers	1 g Protein enthält gebunden $\mu\text{Mol an}$			
				anorg. P.	organ. P.	Adenin	Calcium
1	20	Ungelöste Proteinstrukturen	$72 \pm 1$	$3.9 \pm 0.2$	$8.6 \pm 0.4$	$3.8 \pm 0.1$	$7.3 \pm 0.2$
2	12	Dasselbe nach EDTA	$72 \pm 1$	$3.9 \pm 0.2$	$9.1 \pm 0.5$	$4.0 \pm 0.2$	$6.7 \pm 0.25$
3	5	Dasselbe nach Pyrophosphat	$72 \pm 1$	—	—	$3.9 \pm 0.2$	$7.3 \pm 0.2$
4	7	Ungelöste Proteinstrukturen nach Totenstarre	$72 \pm 1$	$3.4 \pm 0.4$	$7.2 \pm 0.4$	$3.3 \pm 0.2$	$7.7 \pm 0.4$
5	4	Dasselbe nach EDTA	$72 \pm 1$	$3.7 \pm 0.4$	$8.5 \pm 0.5$	$3.8 \pm 0.2$	$7.3 \pm 0.3$
6	15	Ungelöste Proteinstrukturen nach L-Myosinextraktion	$35 \pm 2$	$6.3 \pm 0.6$	$15.1 \pm 0.6$	$6.3 \pm 0.3$	$7.9 \pm 0.4$
7	8	Dasselbe nach EDTA	$35 \pm 2$	$6.0 \pm 0.4$	$16.2 \pm 0.8$	$6.7 \pm 0.6$	$7.6 \pm 0.6$
8	4	Ungelöste Proteinstrukturen nach Extraktion des Aktomyosin	$23 \pm 1$	$4.7 \pm 0.3$	$7.7 \pm 0.5$	$3.0 \pm 0.1$	$5.1 \pm 0.3$
9	4	Ungelöste Proteinstrukturen nach Extraktion des Aktomyosin und Entfernung des Restaktin	$19 \pm 1$	$1.5 \pm 0.2$	$3.3 \pm 0.5$	0.15	0

TABELLE II  
DER ADP- UND ATP-GEGALT UNGELÖSTER PROTEINSTRUKTUREN

Versuchsnummer	Ungelöste Proteinstrukturen enthalten gebunden $\mu\text{Mol an}$		Versuchsnummer	Ungelöste Proteinstrukturen nach L-Myosinextraktion enthalten gebunden $\mu\text{Mol an}$	
	ADP	ATP		ADP	ATP
9	3.75	0	10	7.50	0
12	2.67	0.35	15	5.50	0.40
14	3.60	0.20	18	6.00	0.80
17	2.40	0.90	26	5.90	0.35
25	2.45	0.60	27	5.70	0.45
Mittelwerte:	3.00	0.40	Mittelwerte:	6.10	0.40

Wieviel der fraglichen Substanzen von den einzelnen Strukturproteinen innerhalb der Fibrille gebunden wird, ergibt sich durch die sogenannte fraktionierte Extraktion nach HASSELBACH UND SCHNEIDER<sup>7</sup>.

Wird aus den ungelösten Proteinstrukturen der Tabelle I zunächst nur das L-Myosin extrahiert und in dem Rest der Gehalt an den fraglichen Substanzen von neuem bestimmt (Tab. I, 6), so gibt die Abnahme dieser Substanzen infolge der L-Myosinextraktion den Betrag, der von L-Myosin *in situ* gebunden war. Wird anschliessend auch das Aktin extrahiert und wieder der Betrag der gebundenen Substanzen im Rest, d.h. im Stroma bestimmt, so ergibt die weitere Abnahme den von Aktin *in situ* gebundenen Anteil dieser Substanzen, während der Restgehalt des Niederschlages den an das Stroma gebundenen Anteil gibt (Tab. I, 9).

Werden die extrahierten Proteine L-Myosin und Aktin weiter gereinigt und schliesslich auf ihren Gehalt an Erdalkalien, Adenin und Phosphaten untersucht, so erhält man den Anteil, der an die Proteine nach ihrer Isolierung gebunden bleibt.

Man sollte erwarten, dass der gebundene Anteil der fraglichen Substanzen nicht davon abhängt, ob das betreffende Protein in der Fibrille verbleibt oder ob es isoliert wird.

Wir werden sehen, dass das isolierte Protein nicht immer die gleiche Menge der fraglichen Substanzen bindet, die von dem gleichen Protein innerhalb der Fibrille gebunden wird.

Aktin bindet tatsächlich an anorganischem und organischem Phosphat, Adenin, Magnesium und Calcium in der Fibrille ebensoviel wie nach Isolierung und weiterer Reinigung (Tab. III, 1, 2). Die gebundenen Mengen an organischem Phosphat, Adenin, Magnesium und Calcium sind ausserdem gleich für Aktin, das aus Acetontrockenpulver, aus gewaschenen und aus EDTA-behandelten ungelösten Proteinstrukturen hergestellt ist (Tab. III). Diese Mengen unterscheiden sich auch dann nicht, wenn die EDTA-Behandlung der ungelösten Proteinstrukturen einmal vor und einmal nach Extraktion des L-Myosin vorgenommen wird. Die Nukleosidphosphate, Magnesium und Calcium sind also ausserordentlich fest an das Aktin gebunden.

Ob die Bindung des anorganischen Phosphates durch Aktin unter allen Bedingungen gleich ist, kann nicht mit Sicherheit entschieden werden. Nach Tab. III, könnte es scheinen, als ob die gebundene Phosphatmenge durch EDTA-Behandlung abnimmt. In Tab. I aber bleibt die gebundene Phosphatmenge bei EDTA-Behandlung unverändert. Die in Tab. I registrierten Phosphatmengen sind aber im wesentlichen die Phosphatmengen, die an das Aktin gebunden sind. Denn das L-Myosin enthält kaum gebundenes anorganisches Phosphat.

#### IV

Die durch ein Gramm L-Myosin gebundenen Mengen an anorganischem und organischem Phosphat sowie an Adenin und Erdalkalien sind sehr viel kleiner als die Mengen, in denen diese Substanzen durch ein Gramm Aktin gebunden werden (Tab. III, IV). Die gebundenen Mengen an Adenin und anorganischem Phosphat sind so klein, dass ihre Realität zweifelhaft erscheint, da die L-Myosinpräparate Spuren von Aktin enthalten.

Wirklich gesichert erscheint nur die Tatsache, dass L-Myosin ebenfalls Magnesium und Calcium bindet.

Die Mengen der fraglichen Substanzen, die einerseits von L-Myosin in der Fibrille und andererseits von extrahiertem L-Myosin gebunden werden, sind untereinander

*Literatur S. 574.*

TABELLE III

DIE UNBEEINFLUSSBARKEIT DER BINDUNG DER ERDALKALIEN UND DES ADP AN DAS AKTIN DURCH DIE VORBEHANDLUNG DES AKTINPRÄPARATES

Nr.	Zahl der Versuche	Präparat	1 g Aktin enthält gebunden $\mu\text{Mol an}$			
			anorg. P	organ. P	Adenin	Magnesium
1	9	Isoliertes Aktin	$14.2 \pm 2.0$	$31.6 \pm 3.3$	$18.0 \pm 1.7$	$12.5 \pm 2.2$
2		Aktin in der Fibrille	$13.0 \pm 2.0$	$31.0 \pm 3.6$	$14.0 \pm 1.7$	$18.0 \pm 2.0$
3	11	EDTA-Behandlung vor L-Myosin-extraktion	$7.3 \pm 0.5$	$30.8 \pm 2.5$	$19.6 \pm 1.5$	$11.2 \pm 1.4$
4	5	Aktin extrahiert aus EDTA behandelten Fibrillen				
		EDTA-Behandlung nach L-Myosin-extraktion	$8.0 \pm 1.5$	$27.4 \pm 2.7$	$20.2 \pm 1.2$	$10.0 \pm 3.2$
5		Aktin in der EDTA-behandelten Fibrille	$13.0 \pm 2.0$	$35.0 \pm 4.2$	$15.0 \pm 2.0$	$17.0 \pm 2.0$

TABELLE IV

DIE BEEINFLUSSUNG DER ERDALKALIBINDUNG AN DAS L-MYOSIN DURCH DIE VORBEHANDLUNG DES L-MYOSINPRÄPARATES

Nr.	Zahl der Versuche	Präparat	1 g L-Myosin enthält gebunden $\mu\text{Mol an}$			
			anorg. P	organ. P	Adenin	Magnesium
1	12	L-Myosin extrahiert	$1.6 \pm 0.3$	$4.7 \pm 0.6$	$0.7 \pm 0.1$	$6.0 \pm 0.7$
2		L-Myosin in der Fibrille	$1.5 \pm 0.8$	$1.4 \pm 1.2$	$1.0 \pm 0.6$	$6.7 \pm 0.7$
3	9	L-Myosin extrahiert und mit EDTA behandelt	$0.6 \pm 0.2$	$2.9 \pm 0.1$	$0.6 \pm 0.1$	$1.4 \pm 0.2$
4	6	L-Myosin aus EDTA behandelten Fibrillen	$0.8 \pm 0.2$	$4.1 \pm 0.7$	$0.64 \pm 0.2$	$4.0 \pm 0.4$
5		L-Myosin in der EDTA behandelten Fibrille	$1.9 \pm 0.7$	$2.1 \pm 1.6$	$1.3 \pm 0.7$	$6.0 \pm 1.2$

gleich, wenn die Fibrillen und die L-Myosinpräparation ohne EDTA gereinigt sind (Tab. IV, 1 u. 2). Wenn das L-Myosin aus EDTA-gewaschenen Fibrillen hergestellt ist, ist die gebundene Menge an Calcium viel kleiner (Tab. IV, 4 u. 5). Aber auch in diesem Fall ist die innerhalb und ausserhalb der Fibrille vom L-Myosin gebundene Calcium-Menge etwa gleich (Tab. IV, 4, 5). Die vom L-Myosin gebundene Magnesium-Menge wird durch die EDTA-Behandlung überhaupt nicht beeinflusst.

Die an das L-Myosin gebundene Calcium-Menge beträgt nach der EDTA-Waschung nur noch etwa ein Drittel der Menge, die vor der EDTA-Waschung gebunden war (Tab. IV, 1, 2, 4 u. 5). Myosin gibt also bei EDTA-Behandlung der ganzen Fibrille nur Calcium ab, das aber in beträchtlichen Mengen.

Das Bild ändert sich in interessanter Weise, wenn die EDTA-Behandlung nicht vor der Extraktion stattfindet, sondern erst nach der Extraktion. Wird das L-Myosin aus Fibrillen extrahiert, die ohne EDTA erschöpfend gewaschen sind, und wird dieses L-Myosin nachträglich bei den weiteren Umfällungen mit EDTA behandelt, so zeigt sich, dass sich die Bindungsfestigkeit der beiden Erdalkalien durch die Extraktion umgekehrt hat (Tab. IV, 3). Jetzt gibt das L-Myosin an das EDTA nicht oder nur unwesentlich Calcium, aber stattdessen fast alles Magnesium ab.

Diese Ergebnisse scheinen darauf hinzudeuten, dass das L-Myosin im Strukturverband der Fibrille das Magnesium sehr fest (EDTA-fest) bindet, während ein Teil des Calcium nur locker gebunden wird. Die Affinität des L-Myosin zu diesen beiden Erdalkalien ist also vor und nach der Isolierung ganz verschieden.

## V

Die angegebenen Mengenverhältnisse der gebundenen Substanzen legen Spekulationen darüber nahe, in welcher Art die Phosphate einerseits und die Erdalkalien andererseits an das Eiweiss gebunden sind. Denn die fraglichen Gruppen und Substanzen sind überwiegend an das Aktin gebunden; die an das Aktin gebundenen Mengen der Erdalkalien und die Mengen des organischen und anorganischen Phosphats sind immer ungefähr äquivalent. Der Gedanke liegt also nahe, dass Erdalkalikomplexe der organischen und anorganischen Phosphate an das Aktin gebunden sind.

Da das vom Aktin gebundene Phosphat ganz überwiegend als ADP gebunden ist, sollte man erwarten, dass eine Aufspaltung des ADP in AMP und Phosphat nicht nur die gebundenen Mengen an Nukleosidphosphat und Phosphat, sondern auch den Gehalt an Erdalkalien markant beeinflusst, falls tatsächlich ein Komplex von ADP und Erdalkalien an das Eiweiss gebunden ist.

Der Versuch zeigt, dass durch Kartoffelapyrase das gebundene ADP gespalten wird. Denn die Apyrasebehandlung lässt den Gehalt an organischem Phosphat um den erwarteten Betrag abnehmen und den Gehalt an gebundenem anorganischem Phosphat um den gleichen Betrag zunehmen (Tab. V, 5). Das Papierchromatogramm (Fig. 1) zeigt ebenfalls, dass nach Apyrasebehandlung der Fibrille das ADP vollständig verschwunden ist. Gleichzeitig aber zeigt der Versuch, dass bei dieser Spaltung aus dem gebundenen ADP gebundenes AMP und gebundenes Phosphat geworden ist. Denn durch die Apyrasebehandlung ist kein Phosphat verloren gegangen. Ebenso bleiben die gebundenen Mengen der beiden Erdalkalien völlig unbeeinflusst.

Dieses überraschende Resultat scheint dafür zu sprechen, dass das gebundene ADP sowohl durch sein endständiges Phosphat wie auch durch irgendeine Gruppe des

TABELLE V

DIE UNBEEINFLUSSBARKEIT DER ADENIN-, PHOSPHAT- UND ERDALKALIBINDUNG AN DIE UNGELÖSTEN PROTEINSTrukTUREN DURCH SPALTUNG DES ADP MIT HILFE VON APYRASE

Nr.	Präparat	1 g Protein enthält gebunden $\mu\text{Mol an}$			
		abspaltbarem anorg. P	organ. P	Adenin	Magnesium Calcium
1	Ungelöste Proteinstrukturen	3.8	11.2	5.5	5.3 9.6
2	Ungelöste Proteinstrukturen nach Apyrasebehandlung	8.0	7.8	5.2	4.8 7.8
3	Ungelöste Proteinstrukturen nach EDTA-Behandlung	4.0	12.2	5.1	5.4 4.9
4	Ungelöste Proteinstrukturen nach Apyrasebehandlung und an- schliessender EDTA-Behandlung	8.3	8.2	5.0	4.4 4.8

TABELLE VI

VERGLEICH DER APYRASEWIRKUNG AUF UNGELÖSTE PROTEINSTrukTUREN

Nr.	Zahl der Versuche	Präparat	1 g Protein enthält gebunden $\mu\text{Mol an}$			
			abspaltbarem anorgan. P	organ. P	Adenin	Magnesium Calcium
1	20	Ungelöste Proteinstrukturen	3.9 $\pm$ 0.2	8.6 $\pm$ 0.4	3.8 $\pm$ 0.1	7.3 $\pm$ 0.2 10.2 $\pm$ 0.5
2	4	Ungelöste Proteinstrukturen nach Apyrasebehandlung	6.3 $\pm$ 0.6	4.8 $\pm$ 0.6	3.2 $\pm$ 0.2	5.8 $\pm$ 0.6 9.6 $\pm$ 0.4
3	16	Ungelöste Myosinfreie Protein- Strukturen	6.3 $\pm$ 0.6	15.1 $\pm$ 0.6	6.3 $\pm$ 0.3	7.9 $\pm$ 0.4 13.2 $\pm$ 0.8
4	4	Ungelöste Myosinfreie Protein- strukturen nach Apyrase-	12.1 $\pm$ 1.0	8.3 $\pm$ 0.4	5.2 $\pm$ 0.4	6.2 $\pm$ 0.4 14.5 $\pm$ 0.7

TABELLE VII  
VERTEILUNG VON CALCIUM, MAGNESIUM UND ADENIN IM MUSKEL

	100 g Muskel enthalten μMol an	Davon sind gebunden an				Davon sind in dem sedimentierten Wachsser enthalten
		1 L-Myosin	2 Aktin	3 Stroma	4 ungelöste Protein- strukturen → Summe 1 + 2 + 3	5 Grana
Calcium	200	45	71	7	120	50
Magnesium	950**	37	30, (45)*	0	87	22
Adenin	970	—	45-50	0	48	8

\* Aus den myosinfreien ungelösten Strukturproteinen errechneter Wert.  
\*\* Nur im Frühjahr wurden im Mittel 1280 μMol gefunden.

←-ATetra P

Fig. 1. Der Adenosinphosphatgehalt von ungelösten Proteinstrukturen vor und nach Apyraseinwirkung. a) vor Apyraseinwirkung; b) nach Apyraseinwirkung; c) ATP mit Spuren von ADP und A-tetra-P als Vergleich.

TABELLE VIII

DIE BINDUNG VON ADP, ANORGANISCHEM PHOSPHAT UND ERDALKALIEN AN AKTOMYOSIN,  
DAS NACH KONVENTIIONELLEN METHODEN EXTRAHIERT IST IM VERGLEICH MIT DER BINDUNG AN AKTOMYOSIN, DAS AUS AKTIN UND L-MYOSIN IN  
PHYSIOLOGISCHER PROPORTION ZUSAMMENGESETZT IST

Nr.	Zahl der Versuche	Präparat	1 g Aktomyosin enthält gebunden μMol an			
			anorg. P	organ. P	Adenin	Calcium
1		Aktomyosin in der Fibrille (Strukturprotein + Stroma-protein)	4.9 ± 0.3	10.7 ± 0.7	5.3 ± 0.2	10.1 ± 0.4
2		Aktomyosin in der Fibrille (L-Myosin + Aktin)	4.6 ± 0.65	12.5 ± 1.4	5.7 ± 0.8	7.8 ± 0.9
3	7	Extrahiertes Aktomyosin	1.7 ± 0.3	7.6 ± 0.6	3.3 ± 0.2	5.2 ± 0.5

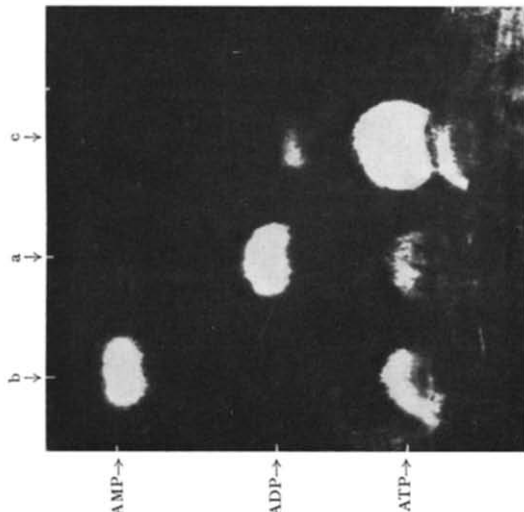


Fig. 1.



AMP-Restes mit dem Protein verbunden ist. Diese Ansicht findet eine Stütze darin, dass eine EDTA-Behandlung nach der Apyraseeinwirkung die ADP-Bruchstücke und das gebundene Magnesium ebensowenig vom Eiweiss ablöst wie vor der Apyrasebehandlung. Auch der Calciumverlust durch EDTA bleibt gleich, ob das ADP gespalten ist oder nicht (Tab. V).

Die Tatsache, dass der Bestand an gebundenen Erdalkalien durch die ADP-Spaltung weder in seinem Betrag noch in seiner Bindungsfestigkeit verändert wird, spricht dafür, dass die Erdalkalibindung mit der ADP-Bindung nichts zu tun hat. Denn es ist schwer vorstellbar, dass eine Komplexbildung des Erdalkali mit dem ADP nicht durch Aufspaltung des ADP beeinflusst werden sollte<sup>8</sup>. Eine unmittelbare Bindung der Erdalkalien an das Eiweiss ist ausserdem für das L-Myosin nachgewiesen, das ja viel mehr Erdalkali enthält, als durch Phosphatreste irgend einer Art gebunden werden kann.

Der gleiche Sachverhalt, der aus diesem Einzelversuch abgeleitet wurde, ergibt sich aus Tabelle VI, in der die Mittelwerte aus den gebundenen Mengen an ADP, Phosphat, Magnesium und Calcium vor und nach Apyrasebehandlung zusammengestellt sind. Die Tabelle VI erhärtet, dass durch die Apyrase die Spaltung des ADP am Aktin stattfindet, weil sie auch eine Reihe von Versuchen mit L-Myosin-freien Fibrillen enthält.

## VI

Aus den Ergebnissen der Abschnitte II bis IV ergeben sich für den Zustand des Calcium, Magnesium und der Nukleosidphosphate im Muskel folgende Tatsachen: Die Adenosinphosphate sind zu 5 % an die Strukturbestandteile des Muskels, wahrscheinlich ausschliesslich an das Aktin <sup>4,9</sup> und wahrscheinlich in sehr kleinen Beträgen auch an die Grana gebunden. Vom Magnesium sind 10 % an die Strukturproteine gebunden und zwar knapp die Hälfte an das Aktin und etwas mehr als die Hälfte an das L-Myosin. Der Magnesiumgehalt der Grana ist sehr klein.

Dagegen ist das Calcium des lebenden Muskels fast vollständig an die Strukturproteine gebunden. Es wird etwas weniger als 40 % vom Aktin, etwa 25 % vom L-Myosin und etwa 25 % von den Grana gebunden. Der Anteil des L-Myosin an der Bindung des Calcium und Magnesium ist verhältnismässig gross trotz der verhältnismässig geringen Erdalkalibindung pro Gramm L-Myosin; denn der Muskel enthält beinahe dreimal so viel L-Myosin wie Aktin und etwa achtmal soviel L-Myosin wie Grana.

Diese Aussagen über die Bindungsverhältnisse der Erdalkalien und Adenosinphosphate im lebenden Muskel ergeben sich auf verschiedenen Wegen.

An die einzelnen Struktureiweisse von 100 g Muskel gebundene Mengen können berechnet werden, indem die von 1 g der einzelnen Strukturproteine gebundenen Mengen mit der Gesamtmenge des betreffenden Strukturproteins in 100 g Muskel multipliziert werden. Diese Beträge werden dann

1. mit dem bekannten Gehalt des Muskels an den fraglichen Substanzen verglichen.

2. Sie werden verglichen mit den Mengen der fraglichen Substanzen, die bei der Herstellung der gewaschenen Muskelstrukturen (d.h. der ungelösten Proteinstrukturen) in das Waschwasser gehen. Tabelle VII zeigt, dass sich auf beiden Wegen etwa die gleichen Werte ergeben.

Von besonderem Interesse ist die Sicherung der Behauptung, dass das Muskelcalcium sehr weitgehend an Myofibrillen und Grana gebunden sei. Diese Behauptung bedarf einer besonderen Sicherung der  $\text{Ca}^{++}$ -Werte, die von den Grana gebunden sind. Denn über die Menge der Grana und ihre Ca-Bindung ist nicht viel Sicheres bekannt<sup>10</sup>. Infolgedessen wird die Calcium-Menge bestimmt, die bei der Herstellung der ungelösten Proteinstrukturen in die Gesamtmenge des Waschwassers übergegangen ist. Diese Calcium-Menge ist gleich der Differenz des Muskelcalcium und des Calciumgehaltes der ungelösten Proteinstrukturen. Wird aus diesen Waschwassern der unlösliche Niederschlag abzentrifugiert, so befinden sich etwa 25% des Muskelcalcium im Niederschlag, während der Überstand 15% enthält. 1 g dieses Niederschlages bindet im Mittel aus sechs Versuchen  $52 \mu\text{Mol Ca}^{++}$ . Die von 1 g Niederschlag gebundene Calcium-Menge ist also deutlich grösser als die Calcium-Menge, die von 1 g Aktin und sehr viel grösser als die Calcium-Menge, die von 1 g L-Myosin gebunden wird. Der Niederschlag aus dem Waschwasser, das vorher von allen groben Partikeln gereinigt ist, enthält praktisch nur Grana. Der Grananiederschlag aus 100 g Muskel enthält im Mittel 860 mg Protein, das sind etwa 4% des Muskeleiweisses.

Aus den gegebenen Daten geht hervor, dass nur 15% des Gesamtcalcium des Muskels nicht fest an die Strukturproteine oder die Grana gebunden sind. Das bedeutet, dass die Konzentration an freiem Calcium in der Muskelfaser höchstens *ca.*  $2 \cdot 10^{-4} M$  ist. Es ist aber möglich, dass auch dieses  $\text{Ca}^{++}$  ganz oder zum Teil an die sogenannten wasserlöslichen Proteine gebunden ist.

Physiologisch bedeutungsvoll erscheint die Tatsache, dass der grösste Teil des Muskelmagnesium nicht gebunden, dagegen aber fast das ganze oder das ganze Muskelcalcium gebunden ist. Denn diese Tatsache stellt die Vorbedingung dafür dar, dass im ruhenden Muskel der relaxing factor aktiv und damit der Muskel in Ruhe ist. Ob das von den Strukturproteinen, insbesondere vom L-Myosin, locker, d.h. nicht EDTA-fest, gebundene Calcium beim Übergang von der Ruhe zur Erregung oder vom aktiven zum inaktiven Zustand des relaxing factors eine Rolle spielt, bleibt offen.

#### ANHANG

Es kann für den Experimentator von einem gewissen Interesse sein zu wissen, wieviel an Adenin, Erdalkalien und gebundenem anorganischem und organischem Phosphat in einer konventionell zubereiteten Aktomyosinlösung gebunden ist.

Der korrekte Gehalt des Aktomyosin ergibt sich einmal aus der Abnahme der fraglichen Substanzen, die eintritt, wenn aus den gewaschenen Muskelproteinen alles L-Myosin und alles Aktin extrahiert wurde. Zum anderen muss er die Summe der vom gelösten Aktin und L-Myosin gebundenen Substanzen darstellen. Tab. VIII zeigt, dass die auf beiden Wegen gefundenen Werte übereinstimmen.

Vergleicht man mit diesen Werten den Gehalt an Phosphat, Adenin und Erdalkali von Aktomyosinlösungen, die aus einem kurz geblenderten Latapiebrei des Muskels gewonnen sind, so findet man, dass die gebundenen Beträge an allen drei Substanzen deutlich herabgesetzt sind (Tab. VIII, 3). Das hat seine Ursache darin, dass bei einer derartigen Extraktion des Aktomyosin zwar alles L-Myosin, aber nicht alles Aktin extrahiert wird. Von der Gesamt-Aktinmenge des Muskels, die 15 bis 16% des Muskeleiweisses beträgt, bleibt bei dieser Art der Extraktion  $\frac{1}{4}$  bis  $\frac{1}{3}$ , d.h. 4 bis 5% des Muskeleiweisses in der Struktur zurück (Tab. I, 8, 9). Die von diesen nicht extrahierten

Aktinresten gebundenen Mengen der fraglichen Substanzen decken den Minderbetrag an Calcium, Magnesium, Adenin und Phosphat, durch den sich das konventionell extrahierte Aktomyosin von dem idealen Aktomyosin unterscheidet. •

#### TECHNISCHER TEIL

Alle Eiweisspräparate wurden aus Kaninchenmuskulatur hergestellt. Wenn nicht besonders vermerkt, wurden alle Präparationen zwischen 0°C und 5°C durchgeführt.

(a) Bei der Präparation der sogenannten ungelösten Proteinstrukturen aus frischer Muskulatur wurden die in Eis aus destilliertem Wasser gekühlten Muskelstücke zunächst mit Fleischmaschine und Latapie zerkleinert. Dann wurde der Muskelbrei mit 0.1 *M* KCl-Lösung (1 Teil Muskelbrei + 3 Teile KCl-Lösung) versetzt und 30 sec im Starmix zerkleinert. Anschliessend wurde der Muskelbrei sechsmal mit 0.1 *M* KCl-Lösung (1 Teil Muskelbrei + 8 Teile 0.1 *M* KCl) gewaschen. Im Anschluss an die KCl-Waschungen wurden die Proteinstrukturen zweimal mit destilliertem Wasser behandelt (Tab. I, 1). Die ungelösten Proteinstrukturen wurden von der Waschflüssigkeit durch Zentrifugation bei 1500 *g* abgetrennt.

(b) Zur Gewinnung der Proteinstrukturen aus totenstarrer Muskulatur wurde die Muskulatur nach Zerkleinerung mit Fleischmaschine und Latapie etwa 6 bis 8 Stunden in einem verschlossenen Gefäss bei 20°C aufbewahrt und anschliessend wie unter (a) beschrieben behandelt (Tab. I, 4).

(c) Zur EDTA-Behandlung der ungelösten Proteinstrukturen wurde der Eiweissbrei im Anschluss an die vierte KCl-Waschung zweimal 10 Minuten in einer 0.01 *M* Na-EDTA-Lösung von pH 7.0 aufgerührt. Die EDTA-Ionen wurden durch vier KCl-Waschungen weitgehend entfernt (Tab. I, 2, 4, 5, 7). Bei der Pyrophosphatbehandlung der ungelösten Proteinstrukturen wurde in gleicher Weise verfahren (Tab. I, 3).

(d) Die myosinfreien ungelösten Proteinstrukturen wurden nach HASSELBACH UND SCHNEIDER<sup>7</sup> durch Extraktion des L-Myosin aus frischem Muskelbrei mit 0.6 *M* KCl + 0.01 *M* Pyrophosphat, pH 6.5, erhalten. Nach einer Waschung des Eiweissbreies mit 0.6 *M* KCl erfolgte seine weitere Reinigung wie beschrieben (a), (Tab. I, 6, 3).

(e) Zur Gewinnung des Muskelstromas nach Aktomyosinextraktion wurde der Muskel nach Zerkleinerung im Latapie 24 h mit 0.6 *M* KCl + 0.05 *M* NaHCO<sub>3</sub> extrahiert und die extrahierten Proteine durch gründliches Waschen mit 0.6 *M* KCl und 0.1 *M* KCl entfernt (Tab. I, 8). Aus diesem Stroma wurden durch eine Behandlung mit 0.6 *M* KJ noch 20 bis 25% Eiweiss entfernt (Tab. I, 9).

(f) Das L-Myosin wurde aus frischer Muskulatur nach HASSELBACH UND SCHNEIDER<sup>7</sup> extrahiert. Nach fünf Umfällungen wurde das präparierte Eiweiss zweimal mit Wasser gewaschen. Wenn die Präparate stärker mit Aktin verunreinigt waren (Viskositätsempfindlichkeiten > 15%), wurden sie nach PORTZEHL, SCHRAMM UND WEBER<sup>11</sup> fraktioniert (Tab. IV).

Die EDTA-Behandlung der L-Myosinpräparate wurde nach der vierten Umfällung vorgenommen. Das gefällte Protein wurde in 0.01 *M* EDTA gelöst und nach zehn Minuten durch Erniedrigung der Ionenstärke auf 0.02 bis 0.03  $\mu$  wieder ausgefällt. Diese EDTA-Behandlung wird noch einmal wiederholt. Anschliessend wurde das L-Myosin noch zweimal in üblicher Weise umgefällt und einmal mit Wasser gewaschen (Tab. IV, 3).

(g) Das Aktin wurde aus den gründlich gewaschenen myosinfreien Proteinstrukturen isoliert. In den meisten Versuchen wurde die KJ-Methode von SZENT-GYÖRGYI<sup>12</sup>, in einigen Versuchen die STRAUB'sche Aceton-Methode<sup>13</sup> angewandt. Bei der Anwendung der KJ-Methode wurde nach der Alkoholfällung das Aktin gegen destilliertes Wasser dialysiert. Bei der Anwendung der Straub'schen Methode unterblieb natürlich der Calciumzusatz (Tab. III).

(h) Aus EDTA-vorbehandelten ungelösten Proteinstrukturen wurde das L-Myosin mit 0.6 *M* KCl + 0.01 *M* Pyrophosphat + 0.002 *M* MgCl<sub>2</sub>, pH 6.5, extrahiert. Die Reinigung des L-Myosin und die Isolierung des Aktin wurden wie unter (f) bzw. (g) angegeben vorgenommen.

Das Aktomyosin wurde fünfmal umgefällt und zweimal mit Wasser gewaschen (Tab. VIII).

(i) Zur Apyrasebehandlung der ungelösten Proteinstrukturen wurde der Eiweissbrei nach der vierten Waschung der Präparate 18 Stunden lang unter dauernder Durchmischung mit Kartoffelaprase behandelt. Etwa 6 bis 7 *g* Protein in 200 ml 0.1 *M* KCl aufgeschwemmt, wurden mit Apyrase aus 2 *kg* Kartoffeln versetzt. Nach der Apyrasebehandlung wurden die Proteinstrukturen noch dreimal mit 0.1 *M* KCl und anschliessend zweimal mit Wasser gewaschen.

Zur Kontrolle wurde ein Präparat in gleicher Weise ohne Apyrasezusatz behandelt (Tab. V, Tab. VI). Es erscheint bemerkenswert, dass die Apyrase nur das gebundene ADP, nicht aber das gebundene ATP spaltet (Fig. 1). Die Kartoffelaprase wurde nach SZEKELY<sup>14</sup> hergestellt.

(k) Die Grana wurden aus den Waschwässern der Proteinstrukturen (a) isoliert. Die Waschwasser wurden bei 1000 *g* zentrifugiert, um sie von groben Partikeln zu befreien. Dann wurden die Grana durch Zentrifugation bei 60,000 *g* niedergeschlagen. Zur Entfernung der in dem Grana-niederschlag eingeschlossenen gelösten Proteine wurde der Niederschlag in 0.1 *M* KCl aufgeschwemmt und nochmals zentrifugiert.

Zur Ablösung der gebundenen Ionen vom Eiweiss wurde der Brei der Proteinstrukturen mit Wasser versetzt (1 Vol. Brei + 3 Vol. Wasser), kurz im Starmix aufgewirbelt und nach Zugabe von 20%  $\text{HClO}_4$  (v/v) (10 Vol. Suspension + 1 Vol.  $\text{HClO}_4$ ) nochmals kurz in Starmix suspendiert. Die wässrigen Lösungen oder Suspensionen von Aktin, L-Myosin, Aktomyosin und der Grana wurden in gleicher Weise mit  $\text{HClO}_4$  denaturiert. Aus dem frischen Muskel wurden die Erdalkalitionen und die gebundenen und gelösten Ionen abgetrennt, indem 20 g Muskel mit 100 ml Wasser im Starmix zerkleinert und die Proteine mit  $\text{HClO}_4$  ausgefällt wurden (Tab. VII). Die Säure wurde 10 Minuten auf die Proteine einwirken gelassen. Dann wurde das gefällte Protein abzentrifugiert und der Überstand mit KOH neutralisiert. Nach Filtration durch ein aschefereies Filter wurde des Perchlorsäureextrakt analysiert. Für eine Analyse der ungelösten Proteinstrukturen wurden im allgemeinen 60 g Muskel verarbeitet. Die reinen Proteine wurden aus 200 bis 300 g Muskel gewonnen.

Die Phosphate wurden nach HERRON UND ROCKSTEIN<sup>15</sup>, das Adenin photospektrometrisch gemessen. Magnesium wurde nach der Methode von ABRAHAMCZIK<sup>16</sup> kolorimetrisch bestimmt. Die mit dieser Methode gefundenen Werte stimmen mit den Werten überein, die bei der Titration des Magnesium mit EDTA (Indikator: Eriochromschwarz) erhalten wurden.

Das Calcium wurde mit EDTA und Murexid als Indikator bei  $\text{pH} \sim 12$  titriert. Es erwies sich insbesondere bei der Analyse der Extrakte aus frischem Muskel als notwendig, vor der titrimetrischen Bestimmung der Erdalkalitionen störende Anionen durch eine Behandlung der zu analysierende Lösung mit Dowex-1 zu entfernen. Die so behandelten Lösungen wurden mit  $\text{HNO}_3$  ( $d = 1.4$ ) und  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf dem Sandbad verascht. Aus der in HCl gelösten Asche wurde das Calcium mit Oxalat gefällt und zweimal mit ammoniakalische Oxalatlösung gewaschen. Das Calciumoxalat wurde in 0.1 M HCl gelöst und titriert.

Die papierchromatographische Trennung der Adenosinphosphate erfolgte nach KREBS UND HEMS<sup>17</sup>. Die isolierten Phosphate wurden nach BERENBLUM UND CHAIN<sup>18</sup> bestimmt.

Zur Berechnung der Adenin-, Phosphat- und Erdalkaligehalte der Strukturproteine in der Fibrille wurden die in Tab. I angegebenen Mengenverhältnisse zu Grunde gelegt.

Zu den experimentell ermittelten und den errechneten Werten sind die mittleren Fehler der Mittelwerte angegeben.

#### ZUSAMMENFASSUNG

1. 60% des Muskelcalciums, 10% des Muskelmagnesiums und 5% des Muskeladenins sind an die Strukturproteine des Muskels gebunden.

2. Das Adenin ist als Adenosindiphosphat praktisch ausschliesslich an das Aktin gebunden.

3. Der ADP-Gehalt des Aktin in der Fibrille ist ebenso gross wie der ADP-Gehalt des isolierten Aktin.

4. Der ADP-Gehalt des Aktin ändert sich nicht, wenn das Aktin mit EDTA behandelt wird.

5. Kartoffelapyrase spaltet das gebundene ADP im AMP und Phosphat. Beide Bruchstücke des ADP bleiben auch nach EDTA-Behandlung der ungelösten Proteinstrukturen fest gebunden.

6. Der Calciumgehalt der ungelösten Proteinstrukturen aus totenstarrem Muskel beträgt mit  $5 \mu\text{Mol/g}$  Ew nur die Hälfte des Calciumgehaltes der Strukturproteine aus frischem Muskel.

7. Der Magnesiumgehalt der ungelösten Proteinstrukturen aus frischem und totenstarrem Muskel ist gleich.

8. Der Calciumgehalt der ungelösten Proteinstrukturen aus frischem Muskel wird durch EDTA-Waschung um 50% erniedrigt. Der Magnesiumgehalt wird durch EDTA-Behandlung nicht verändert.

9. Der Calciumgehalt der ungelösten Proteinstrukturen aus totenstarrem Muskel wird durch EDTA-Behandlung nicht weiter erniedrigt.

10. Das Calcium ist in der Fibrille zu 60% an Aktin und zu 35% an L-Myosin gebunden. Die restlichen 5% sitzen am Stroma. Das Magnesium ist zu 50% an Aktin und zu 50% an L-Myosin gebunden.

11. Der Calcium- und Magnesiumgehalt von Aktin und L-Myosin in der Fibrille ist ebenso gross wie der Calcium- und Magnesiumgehalt der isolierten Proteine.

12. Das Calcium ist in der EDTA-behandelten Fibrille ganz vorwiegend an das Aktin gebunden. Aktin und L-Myosin binden in der Fibrille vor und nach EDTA-Behandlung gleich viel Magnesium.

13. Das isolierte Aktin verliert bei der EDTA-Behandlung weder Calcium noch Magnesium. Das isolierte L-Myosin verliert durch EDTA nur wenig Calcium und viel Magnesium.

14. Das nicht an die Strukturproteine gebundene Calcium sitzt zu 65% an den Muskelgrana; die restlichen 35% werden mit den wasserlöslichen Proteinen aus dem Muskel entfernt.

15. Im Gegensatz zu Calcium ist der Hauptteil des physiologischen Gehaltes an Magnesium und der Adenosinphosphate nicht gebunden sondern frei.

## SUMMARY

1. 60% of muscle calcium, 10% of muscle magnesium, and 5% of muscle adenine are bound to the structure proteins of muscle.
2. Adenine in the form of adenosinediphosphate is bound almost exclusively to the actin.
3. The adenosinediphosphate (ADP) content of actin in the fibrils is just as great as the ADP content of isolated actin.
4. The ADP content of actin does not alter when actin is treated with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).
5. Apyrase from potatoes splits the bound ADP into AMP and phosphate. Even after EDTA treatment of the undissolved structure proteins both fragments of the ADP remain firmly bound.
6. The calcium content of the undissolved structure proteins from muscles in rigor mortis — 5  $\mu$ moles/g protein — amounts to only half the calcium content of the structure proteins from fresh muscle.
7. The magnesium content of undissolved structure proteins from fresh muscle and muscle in rigor mortis is the same.
8. The calcium content of the undissolved structure proteins from fresh muscle is diminished by 50% by washing with EDTA. The magnesium content is not altered by EDTA treatment.
9. The calcium content of the undissolved structure proteins from muscle in rigor mortis is not lessened further by EDTA treatment.
10. The calcium in the fibrils is bound for 60% to actin and for 35% to L-Myosin. The other 5% is bound to the stroma. The magnesium is bound for 50% to actin and for 50% to L-Myosin.
11. The Ca- and Mg-content of actin and L-Myosin in the fibrils is as great as the Ca- and Mg-content of isolated proteins.
12. In the EDTA-treated fibrils the calcium is almost entirely bound to the actin. The magnesium bound to actin and L-Myosin in the fibrils is the same before and after EDTA treatment.
13. Isolated actin loses neither Ca nor Mg when treated with EDTA. Isolated L-myosin loses very little Ca but much Mg on EDTA treatment.
14. Of the calcium not bound to the structure proteins 65% is attached to the muscle grana; the other 35% is removed from the muscle with the water-soluble proteins.
15. In contrast to calcium the greatest amount of the physiological content of magnesium and adenosinphosphates is free and not bound to the protein.

## LITERATUR

- <sup>1</sup> E. BOZLER, *J. Gen. Physiol.*, 38 (1955) 735.
- <sup>2</sup> E. T. FRIESS, M. F. MORALES UND W. J. BOWEN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 53 (1954) 311.
- <sup>3</sup> G. FEUER, F. MOLNÁR, E. PETTKÓ UND F. B. STRAUB, *Hung. Acta Physiol.*, 1 (1948) 150.
- <sup>4</sup> S. V. PERRY, *Biochem. J.*, 51 (1952) 495.
- <sup>5</sup> F. BUCHTHAL, A. DEUTSCH, G. G. KNAPPEIS UND A. MUNCH-PETERSEN, *Acta Physiol. Scand.*, 24 (1952) 368.
- <sup>6</sup> A. LAJTHA, *Hung. Acta Physiol.*, 1 (1948) 134.
- <sup>7</sup> W. HASSELBACH UND G. SCHNEIDER, *Biochem. Z.*, 321 (1951) 462.
- <sup>8</sup> A. E. MARTELL UND G. SCHWARZENBACH, *Helv. Chim. Acta*, 39 (1956) 635.
- <sup>9</sup> N. A. BIRÓ UND B. NAGY, *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, 8 (1955) 313.
- <sup>10</sup> E. C. SLATER UND K. W. CLELAND, *Biochem. J.*, 54 (1954) xxii.
- <sup>11</sup> H. PORTZEHL, G. SCHRAMM UND H. H. WEBER, *Z. Naturforsch.*, 5b (1950) 61.
- <sup>12</sup> A. G. SZENT-GYÖRGYI, *J. Biol. Chem.*, 192 (1951) 361.
- <sup>13</sup> F. B. STRAUB, *Studies Inst. Med. Chem. Univ. Szeged*, 2 (1942) 3.
- <sup>14</sup> M. SEKELY, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.*, 1 (1951) 325.
- <sup>15</sup> M. ROCKSTEIN UND P. W. HERRON, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 1500.
- <sup>16</sup> E. ABRAHAMCIK, *Angew. Chem.*, 61 (1949) 96.
- <sup>17</sup> H. A. KREBS UND R. HEMS, *Biochim. Biophys. Acta*, 12 (1953) 172.
- <sup>18</sup> I. BERENBLUM UND E. CHAIN, *Biochem. J.*, 32 (1938) 295.

Eingegangen den 7. März, 1957