

DER MECHANISMUS EINES NEUEN,
VON DER MUSKELKONTRAKTION VERSCHIEDENEN
KONTRAKTIONSZYKLUS

HARTMUT HOFFMANN-BERLING

*Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Institut für Physiologie und
Zoologisches Institut der Universität, Heidelberg (Deutschland)*

Die bisher untersuchten Zell- und Muskelbewegungen ordneten sich zu einem verhältnismässig einheitlichen Bild: sie waren aktive Gestaltänderungen von Proteinstrukturen, und es sah aus, als seien solche Bewegungen auf nur zwei Mechanismen aufgebaut, ein muskelähnliches Prinzip der Kontraktion^{1,2,3} und einen davon verschiedenen Mechanismus aktiver Verlängerung⁴. Immer war eine unmittelbare Umsetzung zwischen Strukturprotein und ATP* die Ursache der Veränderungen. Es lag nahe anzunehmen, der bevorzugte, vielleicht sogar der einzige Weg, um bewegliche Strukturen zu aktivieren, sei eine Reaktion mit ATP⁵.

Mittlerweile haben sich zwei Bewegungen gefunden, für die diese Verallgemeinerung nicht gilt. Die Stiele von Vorticellen (Ciliaten) kontrahieren sich und die Trichocysten von Paramecien strecken sich, ohne dass ATP erforderlich ist. Im Gegenteil, ATP hemmt diese Bewegungen; es bewirkt, dass kontrahierte Vorticellenstile erschlaffen und dass Trichocysten unabgeschossen bleiben.

Vorticellenstile verhalten sich wie Geisseln und Cilien⁶: setzt man ihnen einen geeigneten Betriebsstoff zu, so bewegen sie sich auch dann noch rhythmisch, wenn sie von der lebenden Zelle abgetrennt worden sind. Im Gegensatz zu Geisseln können aber bei ihren Bewegungen die Kontraktions- und Erschlaffungsphase unterschieden und auch einzeln hervorgerufen werden. Infolgedessen lassen sich die Mechanismen der beiden Teilprozesse trennen und mit denjenigen der Muskelbewegung vergleichen. Überraschend findet man, dass sie nicht übereinstimmen.

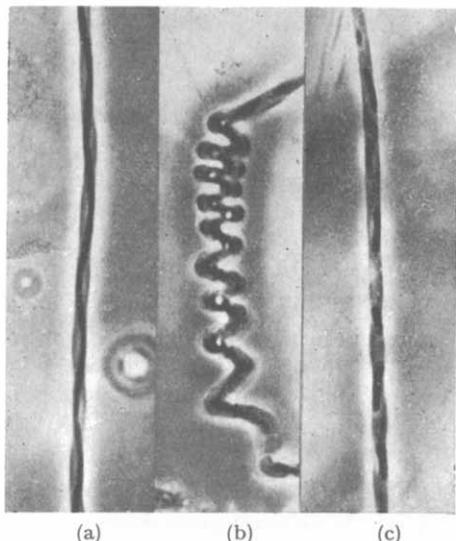
Vorticellenstile enthalten ein locker gewundenes kontraktiles Element, das sog. Myonema in einer biegungselastischen Hülle. Wird die Zelle gereizt, so kontrahiert sich das Myonema und legt den Stiel zu einer engen Schraube zusammen. Erschlafft das Myonema, so streckt sich der Stiel durch die Elastizität der Hülle. Der Vorgang sieht aus wie eine Fluchtbewegung, kann aber auch spontan auftreten und sich rhythmisch wiederholen.

Die ATP-freie Kontraktion und Erschlaffung

Tötet man Vorticellen ab, indem man ihre Zellmembranen zerstört (vgl. im techni-

* Folgende Abkürzungen werden verwandt: ATP = Adenosintriphosphat, ITP = Inosintriphosphat, EDTA = Äthyldiaminotetraacetat, CTA = Cetyl-trimethylammoniumchlorid Salyrgan = Salicyl-hydroxymercuri-methoxypropyl-amidoorthoacetat, Germanin = Na/-bis-aminobenzol-aminomethylbenzoyl-naphthylaminotrisulfonat.

schen Teil), die Zellkörper durch Schütteln abtrennt und die zurückbleibenden Stiele auswäscht, so erhält man "Stiel-Modelle". Sie entsprechen den sog. Muskel- und Zellmodellen, verhalten sich aber ganz anders: Sie kontrahieren unter keinen Bedingungen durch ATP. Sie kontrahieren sofort, wenn man ihnen in ATP-freien



Bädern Ca- oder Sr-Ionen oder aber die Ionen bestimmter quaternärer Ammoniumverbindungen zusetzt, z.B. CTA.

Ca^{++} und Sr^{++} bewirken maximale Kontraktion schon in Konzentrationen $< 10^{-5}$ grammion/l (Fig. 1a und b). Mit steigender Konzentration nehmen die Geschwindigkeit, aber nicht das Ausmass der Verkürzung zu.

Fig. 1. (a) Modell eines Vorticellenstiels in EDTA-Lösung. (b) Nach Entfernung des EDTA und Zugabe von $5 \cdot 10^{-5}$ grammion/l Ca^{++} . Um eine Selbstzerreissung zu verhindern, ist die Ionenstärke der Versuchslösung über 0.3μ erhöht und die Kontraktion dadurch eingeschränkt worden. (c) Selbstzerreissung nach Freigabe der Kontraktion durch Verdünnen der Versuchslösung auf $I = 0.1 \mu$.

Bei der Kontraktion entwickeln die Modelle Spannung. Die Spannung ist so gross, dass sich die kontraktile Elemente selbst zerreißen, wenn man die Modelle einige Sekunden im Zustand maximaler Spiralisierung verharren lässt. Die Bruchstücke verkürzen sich danach auf ein Drittel ihrer Ausgangslänge weiter, während sich die elastische Hülle wieder streckt (Fig. 1c).

Die Kontraktionsbewegung wird langsamer oder bleibt stehen, wenn man das Ca^{++} oder Sr^{++} auswäscht. Die Modelle erschlaffen und kehren in den gestreckten Zustand zurück, sobald dem Auswaschen noch die Bindung der zurückgehaltenen Erdalkalispuren folgt. Verschiedene Erdalkali-Komplexbildner wirken umso besser erschlaffend, je fester sie das Ca^{++} oder Sr^{++} binden (vgl. Tab. I und II). Am wirksamsten sind EDTA und sog. Hexametaphosphat. Beide wirken maximal erschlaffend schon in 10^{-4} – 10^{-3} M Konzentration. Durch einen Wechsel Ca^{++} - und EDTA-haltiger Bäder lassen sich Kontraktion und Erschlaffung beliebig oft wiederholen (geprüft bis 12 mal), ohne dass ihr Ausmass und ihre Geschwindigkeit abnehmen und ohne dass ATP-Zusätze notwendig werden, um die Beweglichkeit zu erhalten.

Die Modelle werden in EDTA-haltigen Lösungen hergestellt und aufbewahrt (vgl. im technischen Teil). Entfernt man das EDTA durch Auswaschen, so kontrahieren sich die Modelle (langsam) auch dann, wenn den Waschlösungen ausser KCl und Phosphatpuffer keine anderen Bestandteile, insbesondere kein Ca^{++} oder Sr^{++} zugesetzt wurden. Das kann bedeuten, dass die Waschlösungen Ca^{++} schon als Verunreinigung enthalten oder aber, dass die Vorticellenstile Erdalkali binden, das vom EDTA blockiert, aber nicht vollständig entfernt wird.

SH-Gifte (Salyrgan) und Germanin bis $2 \cdot 10^{-3}$ Mol/l unterdrücken weder die Kontraktion durch Ca^{++} noch die Erschlaffung durch EDTA. Beide Verbindungen

TABLE I
LÖSLICHKEITSPRODUKTE UND DISSOZIATIONSKONSTANTEN VERSCHIEDENER
Ca- UND Mg-KOMPLEXE
(bei pH-7)

Komplexbildner	Ca-Komplex		Mg-Komplex
	— log Löslichkeit. produkt	— log Dissoz. konstante	— log Dissoz. konstante
EDTA ²³		10.59	8.69
ATP ²⁴		3.6	4.0
Zitrat		3.2	
Oxalat	8.59		
Pikrolonat	9.28		

TABLE II
ERSCHLAFFUNG DURCH VERSCHIEDENE Ca-KOMPLEXBILDNER

Komplexbildner	Ca-Gehalt der Versuchsbäder		Erschlaffung
	[Ca _{gesamt}] (Grammatom/l)	[Ca ⁺] (Grammion/l)	
EDTA, 1 · 10 ⁻³ M	10 ⁻⁶	2.6 · 10 ⁻¹⁴	+++
Zitrat, 3 · 10 ⁻² M		2.0 · 10 ⁻⁸	(+)
Oxalat, 5 · 10 ⁻² M		7.9 · 10 ⁻⁸	(+)
Pikrolonat, 1 · 10 ⁻³ M		5.0 · 10 ⁻⁴	0
Zitrat, 3 · 10 ⁻² M	10 ⁻⁴	2.0 · 10 ⁻⁶	0
ATP, 10 ⁻³ M ohne Mg ⁺⁺ -Zusatz		2.1 · 10 ⁻⁵	(+)
ATP, 10 ⁻³ M mit 1 · 10 ⁻³ M Mg ⁺⁺		5.1 · 10 ⁻⁵	+
ATP, 10 ⁻³ M mit 10 · 10 ⁻³ M Mg ⁺⁺		9.4 · 10 ⁻⁵	+++

vergiften die ATP-Kontraktion von Muskel⁷- und Fibroblastenmodellen³ schon in zwanzig mal kleineren Konzentrationen vollständig.

Die zuletzt angeführten Beobachtungen zeigen, dass die Kontraktion nicht durch ATP-Spuren hervorgerufen wird, die von den Vorticellen-Modellen festgehalten werden und deren Spaltung durch Ca⁺⁺ aktiviert und durch EDTA blockiert wird. Solche ATP-Spuren sollten sich durch Spaltung erschöpfen, wenn man den Zyklus von Kontraktion und Erschlaffung mehrmals ablaufen lässt. Die Kontraktionen sollten in diesem Falle schwächer werden; sie sollten ganz unterbleiben, wenn man die Nutzung des ATP durch Gifte verhindert, die die ATP-Spaltung muskelähnlicher Systeme unterdrücken.

Unter den geprüften Erdalkaliionen wirken nur Ca⁺⁺ und Sr⁺⁺ kontrahierend, Be⁺⁺ und Mg⁺⁺ sind unwirksam, Ba⁺⁺ wirkt nur schwach. Die Unwirksamkeit des Be⁺⁺ und Mg⁺⁺ wird besonders deutlich, wenn man sie im Überschuss mit EDTA kombiniert (z.B. 6 · 10⁻³ Mol/l MgCl₂, 5 · 10⁻³ Mol/l EDTA). Dann ist freies Be⁺⁺ oder Mg⁺⁺, vorhanden, etwaige Ca⁺⁺-Spuren aber werden durch die höhere Affinität des EDTA zum Ca⁺⁺ blockiert (vgl. Tab. I). Kombiniert man andererseits einen Ca⁺⁺- oder Sr⁺⁺-Überschuss mit EDTA, so kontrahieren die Modelle sofort.

Unter den organischen Verbindungen wirken nur solche kontrahierend, deren Ionen ausser der positiven Ladung einen grossen apolaren Molekülrest tragen, d.h. Verbindungen, die nach Art der sog. Invertseifen gebaut sind. CTA-Ionen führen schon in 5 · 10⁻⁵ M Konzentration zu fast maximaler Verkürzung, die homologe

C_{12} -Verbindung muss in zehnmal höherer Konzentration zugegeben werden, die C_8 -Verbindung ist praktisch unwirksam. Unwirksam sind auch alle untersuchten Alkaloid- und Farbstoffbasen (Chinin, Brucin in gesättigter Lösung, Toluidinblau, Trypaflavin bis $5 \cdot 10^{-3}$ Mol/l) und Verbindungen, die statt einer zwei quaternäre Stickstoffgruppen tragen (10^{-2} Mol/l Dekamethonium, Hexamethonium).

Die Kontraktion durch organische Kationen sieht etwas anders aus als die Kontraktion durch Erdalkaliionen: sie ist langsamer, sie führt nur selten zu einer Verkürzung um mehr als die halbe Ausgangslänge, sie endet nicht mit Selbstzerreissung, und sie wird durch EDTA (auch in hundertfachem Überschuss) nicht verhindert. Sie ist weder durch Waschen rückgängig zu machen, noch durch irgendwelche Zusätze zu den Waschlösungen. Geprüft wurden besonders Polysulfosäuren wie Germanin und Heparin. Anscheinend ist es unmöglich, die gebundenen Invertseifen vom Eiweiss wieder abzulösen. Wendet man die Invertseifen in hohen Konzentrationen an, so bewirken sie nicht Kontraktion, sondern heben jede Beweglichkeit irreversibel auf.

Da den Modellen alle Stoffwechsel- und Erregungsprozesse fehlen, wirken die genannten Kontraktionssubstanzen offenbar direkt auf das kontraktile Protein. Dadurch werden positive Ladungen in das System hineingetragen. Man kann sich vorstellen, dass die Ladungsänderung die eigentliche Ursache der Kontraktion sei.

Kontraktion durch Ladungsänderung ist schon von WÖHLISCH⁸ UND MEYER⁹ vorausgesagt und von KUHN UND HARGITAY¹⁰ sowie von KATCHALSKY¹¹ an synthetischen (Polyacrylsäure-) Fasern nachgewiesen worden. Wenn die ATP-freie Motilität der Vorticellenstiele dem gleichen Prinzip gehorcht, so sollte das kontraktile Protein der Stiele erschlafft sein, weil seine negativ geladenen Gruppen einander abstossen. Eine Kontraktion sollte dann eintreten, wenn die Überschussladungen durch Anlagerung geeigneter Kationen ausgeschaltet werden. Dass nicht alle Kationen wirksam sind, liesse sich durch eine Spezifität ihrer Bindung erklären.

Unter den wirksamen Kationen ist das physiologische Agens wahrscheinlich das Ca^{++} . Es ist in lebenden Systemen sicher vorhanden, es wirkt in der niedrigsten Konzentration, führt zur stärksten Verkürzung, entwickelt die höchste Geschwindigkeit, und seine Wirkung ist beliebig reversibel. Von den unphysiologischen Invertseifen ist bekannt, dass sie bereitwillig und sehr fest mit den sauren Gruppen von Proteinen kombinieren.

In den Modellversuchen von KUHN UND HARGITAY¹⁰ verkürzt sich der elektroneutrale Polyacrylsäurefaden thermokinetisch. Nach MEYER¹² könnten die Zwitterionen kontraktiler Proteine aber auch deshalb kontrahieren, weil freigebliebene Ladungen einander anziehen. Versucht man zwischen diesen Alternativen zu entscheiden, indem man die basischen Gruppen des Vorticellenproteins ausschaltet (durch Vorbehandlung mit $3 \cdot 10^{-2}$ Mol/l Benzaldehyd oder $2 \cdot 10^{-2}$ Mol/l Essigsäureanhydrid in gepufferter Lösung), so wird die folgende Ca^{++} -Kontraktion zwar verlangsamt, aber nicht aufgehoben (beide Substanzen wirkten 15 min bei 22° C ein). Dieser Befund schliesst die Verkürzung durch elektrostatische Kräfte jedoch nicht aus, weil es fraglich ist, ob durch die relativ milde Vorbehandlung wirklich alle basischen Gruppen erfasst werden.

Die rhythmische Erschlaffung durch ATP

Die vorgeschlagene, einfache Deutung der Vorticellenmotilität macht Schwierigkeiten S. 255.

keiten, sobald man die Verhältnisse im Leben betrachtet. Im Leben gibt es Ca^{++} , aber es gibt kein EDTA.

Auf der Suche nach einem physiologischen Agens findet man, dass die Modelle auch durch ATP erschlaffen können. Setzt man zusammen mit dem Ca^{++} (oder Sr^{++}) den Modellen noch ATP zu, so wird die Kontraktion verhindert und eine vollzogene Kontraktion wird rückgängig gemacht (10^{-4} grammion/l Ca^{++} , $2 \cdot 10^{-3}$ Mol/l ATP und $4 \cdot 10^{-3}$ grammion/l Mg^{++}).

Die Erschlaffung durch ATP hält in der Regel nicht an. Die Modelle kontrahieren nach einigen Sekunden von neuem und erschlaffen abermals: ATP versetzt sie, wenn es gleichzeitig mit kleinen Mengen Ca^{++} in den Bädern vorhanden ist, in einen rhythmischen Wechsel spontaner Kontraktionen und spontaner Erschlaffungen ohne dass ausgewaschen oder an der Zusammensetzung der Bäder etwas geändert wird. Die Kontraktionsbewegungen dieses Zyklus sind blitzschnell, die Erschlaffungen langsam. Sie folgen sich in ungleichen Abständen bis zu 20 mal in der Minute; sie sind ebenso unregelmässig und von Perioden der Bewegungsruhe unterbrochen wie die Bewegungen lebender Stiele.

Schon die Rhythmik der Vorgänge lässt erkennen, dass das ATP nach einem anderen Plan wirkt als das EDTA. Hätte nämlich ATP einfach eine höhere Affinität zum Ca^{++} als das kontraktile Protein, so sollten die Modelle dauerhaft erschlaffen — oder aber dauerhaft kontrahieren, je nachdem, ob das ATP genügend Ca -Ionen blockiert oder nicht.

Ausserdem reicht die schwache Aktivität des ATP als Komplexbildner¹³ gar nicht aus, um die Erschlaffung zu erklären. Citrat und Oxalat binden Ca -Ionen annähernd ebenso gut; dennoch wirken sie im Gegensatz zum ATP praktisch gar nicht. Man kann die Bedingungen sogar so auswählen, dass durch das ATP 50 mal mehr Ca^{++} ungebunden bleibt als durch Citrat und Oxalat (Tab. II). Ähnliches gilt für den Vergleich von ATP mit anorganischem Pyrophosphat und dem verwandten ITP. Pyrophosphat und ITP bewirken keine Erschlaffung, obwohl nach Hasselbach¹⁴ ITP und ATP die gleiche Affinität zum Ca -Ion haben.

Damit das ATP wirkt, muss Mg^{++} anwesend sein. In einem Bereich zwischen 1 und $10 \cdot 10^{-3}$ grammion/l nimmt die erschlaffende Wirkung des ATP mit der Mg^{++} -Konzentration zu. In Gegenwart noch höherer Mg^{++} -Konzentrationen kann die Rhythmik unterdrückt werden. Die Modelle bleiben dann in Erschlaffung stehen. Mg^{++} -Konzentrationen $> 10^{-2}$ grammion/l verleihen auch dem ITP eine schwach erschlaffende Wirkung.

Alle diese Befunde sind unverständlich, solange man in den Nucleosidtriphospaten nur Ca^{++} -Komplexbildner sieht. Denn da Mg^{++} vom ATP und ITP fester gebunden wird als Ca^{++} (vgl. Tab. I), sollte ein 50facher Mg^{++} -Überschuss praktisch alles Ca^{++} aus seiner Bindung verdrängen*.

Man muss infolgedessen annehmen, dass das ATP nicht mit dem Ca^{++} der Bäder reagiert, sondern mit dem kontraktilem Protein. Es ist denkbar, dass mit Hilfe dieser Reaktion das Ca^{++} aus seiner Kontraktionsbindung entfernt wird.

Die rhythmische Bewegung der Stiele verbraucht Energie, und eine ATP-Spaltung ist die einzige Energiequelle, die in unserm einfachen System einem Dauerrhythmus zur Verfügung steht. Da Vorticellenprotein bisher nicht rein gewonnen

* Über die antagonistische Beeinflussung anderer Zelleistungen durch Ca^{++} und ATP vgl. RAAFLAUB¹⁵, ERNSTER UND LÖW¹⁶ u.a.

werden kann, ist diese Spaltung nicht direkt durch Messung bestätigt. Es gibt jedoch ein starkes indirektes Argument. Wie früher gezeigt worden ist, bleibt die ATP-Kontraktion von Zellen und Muskeln aus, wenn die ATP-Spaltung der kontraktilen Proteine durch sehr kleine Konzentrationen Salyrgan (5 bis $20 \cdot 10^{-5}$ Mol/l) unterdrückt wird, obwohl solch kleine Salyrgan-Konzentrationen alle übrigen unlöslichen ATPasen der Zellen nicht oder fast nicht hemmen⁸. Genau die gleichen Salyrgan-Konzentrationen lähmen aber auch den Bewegungsrhythmus der Vorticellenstiele.

Eine Vergiftung mit Salyrgan kann den Rhythmus der Stiele sowohl im Zustand der Kontraktion wie im Zustand der Erschlaffung beenden. Das hängt vor allem davon ab, ob das Salyrgan vor oder nach dem ATP zugegeben wird. Werden 5 bis $20 \cdot 10^{-5}$ Mol/l Salyrgan zuerst zugegeben, so bewirkt Ca^{++} die übliche Kontraktion, während die Erschlaffung durch ATP fortfällt. Die Erschlaffung durch EDTA erfolgt wie immer. Dieser Befund bestätigt, dass die Erschlaffung durch ATP auf Umsetzungen des ATP beruht und nicht einfach auf Affinitäten wie beim EDTA.

Wird das Salyrgan zuletzt zugegeben, so bleiben die rhythmisch arbeitenden Modelle nicht in Kontraktion, sondern in Erschlaffung stehen. Sie werden dann selbst durch hohe Ca^{++} -Gaben (bis 10^{-3} grammion/l) nicht oder nur nach längerer Zeit zu einer einmaligen, langsamen Kontraktion veranlasst. Sie sind vorübergehend gegen Ca^{++} so unempfindlich geworden, dass man das ATP aus den Bädern entfernen kann, ohne dass es zur Kontraktion kommt. Jedoch tritt die Kontraktion ein, wenn man genügend lange wartet, und zwar umso später, je niedriger die vergiftende Salyrgan-Konzentration gewählt wurde.

Zusammengenommen erwecken beide Beobachtungen den Eindruck, als bewirkte das ATP die Erschlaffung durch eine ganze Kette von Reaktionen und als sei die Spaltung des ATP nur die Bilanz dieser Vorgänge. Durch eine oder mehrere Zwischenstufen der Reaktion wird das kontraktile Protein daran gehindert, sich zu kontrahieren. Salyrgan muss dann in den Ablauf an zwei verschiedenen Stellen eingreifen; einmal im Beginn: wird Salyrgan zuerst zugesetzt, so kommt die Reaktion nicht bis zu diesen Zwischenstufen — und einmal später: wird Salyrgan zuletzt zugesetzt, so verschwinden die Zwischenstufen infolge der Giftwirkung nicht wieder. Ehe die Zwischenstufen beseitigt sind, kann aber das Ca^{++} keine neue Kontraktion herbeiführen. Was für erschlaffende Zwischenstadien durch Salyrgan fixiert werden, kann vorerst nur mit pharmakologischen Mitteln untersucht werden.

Es ist deshalb interessant, dass die durch ATP + Salyrgan dauerhaft erschlafften Modelle in jedem Stadium der Vergiftung sofort kontrahieren, wenn man ihnen neben dem Ca^{++} noch 10^{-5} Mol/l CTA oder 10^{-3} Mol/l Dodecylsulfat oder Desoxycholat oder aber 10^{-5} g/ml der sog. Fraktion I aus Bienengift* zusetzt. Nichtionische Detergentien wie Tween 80 u.a. sind unwirksam. Der Kontraktion folgt natürlich keine Erschlaffung mehr, weil das Salyrgan nun den Beginn der nächsten Reaktionskette genau so verhindert, als wenn es zuerst zugegeben wäre.

Alle diese Kontraktionen sind durch EDTA voll reversibel. Außerdem haben Dodecylsulfat und Bienengift allein ohne Ca^{++} gar keine Kontraktionswirkung; CTA bewirkt erst in 50 mal höherer Konzentration eine Kontraktion, wenn es ohne

* Die Fraktion I ist ein basischer Eiweisskörper (M.G. 35 000, IP \approx 11) mit einem auffallend hohen Gehalt an Aminosäureresten mit apolaren Seitenketten¹⁷ (gereinigte Fraktion I¹⁸ und den Hinweis, dass Fraktion I pharmakologisch ähnlich wirkt wie Invertseifen¹⁹, verdanke ich Dr. HABERMANN, Würzburg).

Ca^{++} gegeben wird. Die Kontraktionen sind also Kontraktionen durch das anwesende Ca^{++} . Die genannten Mittel stellen nur die physiologische Empfindlichkeit der Modelle gegen Ca^{++} wieder her.

Die Vielfalt der Stoffe, die die Beweglichkeit der Vorticellenstiele beeinflussen, kann durch eine Einteilung in drei Gruppen übersichtlicher gemacht werden:

1. Ca^{++} und Sr^{++} bewirken eine Kontraktion, die durch EDTA reversibel ist. Sie kann auch durch ATP aufgehoben werden, doch nur vorübergehend, sodass bei gleichzeitiger Anwesenheit von ATP und Ca^{++} die bekannte Rhythmik der Stiele auch in den Modellen auftritt. Mg^{++} kann das Ca^{++} nicht ersetzen.

2. Quaternäre Ammoniumverbindungen bewirken ebenfalls Kontraktion, wenn sie bestimmte konstitutive Bedingungen erfüllen. Kontraktionen durch solche organische Ionen werden weder durch EDTA noch durch ATP aufgehoben. Andererseits sind die genannten Ammoniumverbindungen in der Lage, eine durch viel ATP erzeugte oder durch Salyrgan fixierte Kontraktionshemmung sofort zu beseitigen.

3. Bienengift und anionische Detergentien machen alleine keine Kontraktion. Sie sind aber imstande, eine Kontraktionshemmung durch ATP aufzuheben.

Schliesslich muss erwähnt werden, dass auch der sog. Marsh-Faktor aus Skelettmuskeln²⁰ die Beweglichkeit der Vorticellenstiele beeinflusst. Wird den Modellen zusammen mit ATP ($2 \cdot 10^{-3}$ Mol/l und $5 \cdot 10^{-3}$ grammion/l Mg^{++}) eine Faktoraufschwemmung aus Kaninchenmuskel²¹ zugesetzt, so hört die Rhythmik auf und die Modelle bleiben in Erschlaffung stehen. Auch sehr lange aufbewahrte Modelle, die erst durch hohe ATP-Konzentrationen (10^{-2} Mol/l) oder gar nicht mehr durch ATP erschlaffen, erschlaffen dann, wenn die ATP-Bäder noch Marsh-Faktor enthalten. Ebenso wie bei Muskeln wirkt der Faktor nur zusammen mit ATP. Die Modelle erschlaffen nicht, wenn der Faktor ohne ATP gegeben wird.

Die Gesamtheit der Befunde zeigt, dass das Modell von KUHN UND HARGITAY nicht ausreicht, um die Vorticellenbeweglichkeit zu erklären. Die Komplikationen betreffen allerdings vorwiegend die Erschlaffungsphase. Es ist möglich, dass zwar die Kontraktion dem Schema von KUHN folgt; doch ist die Erschlaffung nicht einfach die Umkehr dieses Vorgangs.

Die physiologische Erschlaffungsubstanz der Stiele ist offenbar ATP. Es wirkt nicht als Ca^{++} -bindendes Mittel, aber auch nicht einfach deshalb, weil es negative Ladungen an das kontraktile Protein heranträgt. Denn dann sollten auch andere negativ geladene Körper erschlaffend wirken, sofern sie gebunden werden. Eine solche Bindung ist erwiesen für das Dodecylsulfat, denn es beseitigt eine Kontraktionshemmung. Dennoch macht Dodecylsulfat keine Erschlaffung, sondern hebt im Gegenteil die erschlaffende Wirkung einer ATP-Salyrgan-Kombination auf. Ausserdem wird durch eine einfache Ladungsänderung die Rhythmik nicht erklärt, für die als Dauer-Energiequelle nur eine ATP-Spaltung in Frage kommt. Es sieht vielmehr so aus, als würde die Betriebsstoffenergie des ATP während der Erschlaffungsphase durch einen komplizierten Vorgang genutzt und im kontraktilen System gewissermassen gespeichert. Während der Kontraktionsphase verwandelt ein einfacher Auslösemechanismus — ohne grössere Umsetzungen — diese chemische in mechanische Energie. Das bedeutet aber, dass wir bei Vorticellen jenen Mechanismus vor uns haben, der so lange für den Muskel gefordert worden ist²². Die Technik der Muskel- und Zellmodelle gestattet also ohne weiteres, zwischen einer aktiven Erschlaffung (bei Vorticellenstielen) und einer aktiven Kontraktion (bei Muskeln) zu unterscheiden.

TECHNIK

Vorticella gracilis wurde bei Zimmertemperatur in einer dünnen Aufschwemmung von Trockenhefe gezüchtet. Die Kulturgefäße enthielten geschnittene Watte, an der sich die Tiere festsetzen. Die Tiere wurden mitsamt der Watte in die eiskalte Zytolyselösung versenkt. Sie blieben in ihr 20–30 min und kamen dann entweder direkt in die Versuchslösungen oder in die glycerinhaltige Aufbewahrungslösung. In Glycerinlösung können sie bei -18°C tagelang funktionstüchtig aufgehoben werden. Doch lassen sich rhythmische Bewegungen nur an kurz (nicht mehr als 2 Tage) aufbewahrten Modellen erzeugen.

Während der Versuche befinden sich die Objekte in einer Kammer mit seitlichem Zu- und Abfluss und werden im Phasenkontrastmikroskop kontrolliert.

Zusammensetzung der Lösungen:

Zytolyselösung: KCl 0.12 Mol/l , Tris-Maleinat-Puffer 0.02 Mol/l , EDTA 0.004 Mol/l , Saponin 0.1% (pH 6.8). — Das EDTA verhindert, dass sich die Modelle während der Herstellung kontrahieren und selbst zerreißen.

Aufbewahrungslösung: 40–50%ige Glycerinlösung, enthaltend 0.12 Mol/l KCl , $0.01 \text{ Mol/l Phosphatpuffer}$, 0.004 Mol/l EDTA (pH vor Glycerinzugabe 6.8).

Versuchslösung: KCl 0.12 Mol/l , Phosphatpuffer 0.01 Mol/l oder Tris-Maleinat-Puffer 0.02 Mol/l (pH 6.8). Um maximale Kontraktion zu erzeugen, genügen 10^{-5} grammion/l Ca^{++} , durch $10^{-3} \text{ Mol/l EDTA}$ erschlaffen die Modelle vollständig.

Die direkt kontrahierende Wirkung organischer Kationen (CTA) wurde in Lösungen geprüft, die $5 \cdot 10^{-3} \text{ Mol/l EDTA}$ enthielten, um störende Verunreinigungen durch Erdalkalzionen auszuschalten.

Die Modelle kontrahieren rhythmisch, wenn die Versuchslösungen ausser dem KCl und Puffer (pH 6.6–6.8) $2\text{--}4 \cdot 10^{-3}$ grammion/l Mg^{++} und $1\text{--}4 \cdot 10^{-3} \text{ Mol/l ATP}$ enthalten. Die Ca^{++} -Zusätze richten sich nach dem Alter der Modelle. Frisch hergestellte Modelle benötigen etwa 10^{-4} grammion/l, ältere Modelle erfordern keine Ca^{++} -Zusätze. Ausserdem muss mehr Ca^{++} zugesetzt werden, wenn die ATP- und Mg^{++} -Konzentration hoch gewählt werden.

Marsh-Faktor wurde nach PORTZELH²¹ hergestellt. Bienengift verdanke ich der Firma H. Mack, Illertissen. ATP wurde als Dinatriumsalz von der Firma Pabst, Milwaukee, bezogen.

ZUSAMMENFASSUNG

Das isolierte kontraktile System ("Modell") der Stiele von Vorticellen kontrahiert durch eine ATP-freie Reaktion, wenn man ihm Ca^{++} -Ionen zusetzt, und es erschlafft, wenn man ihm das Ca^{++} wieder entzieht. Das Ca^{++} lässt sich nicht durch Mg^{++} , wohl aber durch die Ionen sog. Invertseifen ersetzen. Die Kontraktion durch Invertseifen ist irreversibel.

Die kontrahierten Modelle erschlaffen ausser durch Ca^{++} -bindende Mittel auch durch ATP. Sind Ca^{++} und ATP gleichzeitig anwesend, so verfallen die Modelle in einen spontanen rhythmischen Wechsel von Kontraktionen und Erschlaffungen — wie lebende Stiele. Das ATP führt zur Erschlaffung, weil es mit dem kontraktilem Protein reagiert, und nicht, weil es das Ca^{++} der Bäder durch Bindung ausschaltet. Rhythmus und Erschlaffung durch ATP werden verhindert, wenn man Gifte zugibt (Salyrgan), die die ATP-Spaltung von kontraktilem Muskelprotein blockieren.

Es wird geschlossen:

1. dass Vorticellenstiele kontrahieren, weil negative Überschussladungen des kontraktilen Protein durch Ca^{++} blockiert werden,
2. dass diese Veränderung mit Hilfe von ATP in der Erschlaffungsphase rückgängig gemacht wird, d.h., dass die Erschlaffung der thermodynamisch unfreie willige, die Kontraktion der frei-willige Teil des Bewegungszyklus ist,
3. dass die Nutzung des ATP mit einer Spaltung des ATP verbunden ist,
4. dass die Mechanismen der Vorticellen- und Muskelkontraktion verschieden sind.

SUMMARY

The isolated contractile system (model) of the stalks of vorticellae contracts owing to an ATP-free reaction when Ca ions are added and relaxes when the Ca^{++} is withdrawn. The Ca^{++} can be displaced by ions of so-called invert soaps but not by Mg^{++} .

The contracted models can be made to relax not only by Ca -binding substances but also by ATP. If Ca^{++} and ATP are present, the models fall into spontaneous rhythmical movements of contraction and relaxation — like living stalks. ATP causes relaxation because it reacts with the contractile protein and not because it removes the Ca^{++} of the baths by combination. The rhythm of contraction and relaxation is inhibited on addition of poisons (Salyrgan), which block the ATP-splitting of the contractile muscle protein.

It has been concluded:

1. that the contraction of the *Vorticella* stalks is due to the blocking of the negative excess charges of the contractile protein by Ca^{++} ;
2. that this change is reversed in the relaxation phase by means of ATP, which indicates that relaxation is the thermodynamically involuntary, and contraction the voluntary part of the movement cycle;
3. that the use of ATP is connected with the splitting of ATP;
4. that the mechanisms of vorticellar and muscular contraction differ.

LITERATUR

- 1 Vgl. H. H. WEBER UND H. PORTZELH, *Progr. in Biophys. Biophys. Chem.*, 4 (1954) 60.
- 2 H. HOFFMANN-BERLING, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 183.
- 3 H. HOFFMANN-BERLING, *Biochim. Biophys. Acta*, 19 (1956) 453.
- 4 H. HOFFMANN-BERLING, *Biochim. Biophys. Acta*, 15 (1954) 226.
- 5 H. H. WEBER UND H. HOFFMANN-BERLING, *Mitt. Max-Planck-Gesellsch.*, (1954) 262.
- 6 H. HOFFMANN-BERLING, *Biochim. Biophys. Acta*, 16 (1955) 146.
- 7 H. PORTZELH, *Z. Naturforsch.*, 7b (1952) 1.
- 8 E. WÖHLISCH, *Verhandl. phys. med. Gesellsch. Würzburg*, 51 (1926) 53.
- 9 K. H. MEYER, *Biochem. Z.*, 214 (1929) 253.
- 10 W. KUHN, *Experientia*, 5 (1949) 318.
- W. KUHN UND B. HARGITAY, *Experientia*, 7 (1951) 1.
- 11 A. KATCHALSKY, *Experientia*, 5 (1949) 319.
- 12 K. H. MEYER, *Experientia*, 7 (1951) 361.
- 13 G. SCHWARZENBACH UND H. ACKERMANN, *Helv. Chim. Acta*, 30 (1947) 1798.
- 14 W. HASSELBACH, persönliche Mitteilung.
- 15 E. RAAFLAUB, *Helv. Chim. Acta*, 38 (1955) 27.
- 16 L. ERNSTER UND H. LÖW, *Expl. Cell Research*, Suppl. 3 (1955) 133.
- 17 H. DENGLER UND H. W. RAUDONAT, in H. RAUEN, *Biochemisches Taschenbuch*, Berlin, 1956, p. 1017.
- 18 F. G. FISCHER UND W. P. NEUMANN, *Biochem. Z.*, 324 (1953) 447.
- 19 W. NEUMANN UND E. HABERMANN, *Arch. exptl. Pathol. Pharmakol.*, 222 (1954) 367.
- 20 B. MARSH, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 247.
- 21 H. PORTZELH, *Biochim. Biophys. Acta*, 24 (1957) 474.
- 22 z.B. E. WÖHLISCH, *Naturwiss.*, 28 (1940) 305, 326.
- 23 Entnommen aus Alrose Chem. Comp. Providence, Technical Bulletin "Sequestrene".
- 24 G. SCHWARZENBACH UND A. E. MARTELL, *Helv. Chim. Acta*, 39 (1956) 653.

Eingegangen am 2. September 1957

INTRACELLULAR PROTEIN AND NUCLEIC ACID TURNOVER IN RESTING YEAST CELLS*

HARLYN HALVORSON

Department of Bacteriology, University of Wisconsin, Madison, Wis. (U.S.A.)

INTRODUCTION

In exponentially growing yeast, protein and nucleic acid are stable end products^{1,2}. However, in resting yeast cells the situation appears to be quite different. Glucose utilization in resting cells leads to a loss of induced enzymes³ and of an alphaglucoside permease⁴. Under such conditions, induced enzyme-synthesizing capacity is retained

* This investigation was supported in part by Research Grant (E 1459) from the Division of Research Grants of the National Institutes of Health and in part by a Merck Fellowship from the National Sciences of the National Research Council.

References p. 266.