

# DER PHYSIOLOGISCHE ERSCHLAFFUNGSFAKTOR UND DIE MUSKELGRANA

TORAO NAGAI\*, MADOKA MAKINOSE UND WILHELM HASSELBACH

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

(Eingegangen am 16. Dezember, 1959)

## SUMMARY

*The physiological relaxing factor produced by the muscle granules*

1. Practically the entire granule fraction which inhibits ATP-splitting and contraction is precipitated from crude rabbit-muscle extract by centrifuging at  $25,000 \times g$  for 1 h. The diameter of the granules in this fraction is about 1000 Å (700–3000 Å).
2. The activity of the granules is irreversibly destroyed by SH-reagents, thymol and u.v. light. Inhibition caused by certain detergents, e.g. antarox is partially reversible.
3. The activity of the granules is irreversibly lost when the granules are digested with several times their weight of trypsin in the absence of ATP, but is not affected when ATP is present.
4. Before they can produce inhibition, the granules must be activated by ATP and Mg in the absence of Ca. Activation takes only a few minutes, and occurs normally during the experiments themselves.
5. The inhibition of ATP splitting and contraction of fibrils or actomyosin floccules produced by the granules ceases as soon as the granules are removed.
6. Thus, the granules do not withdraw any functionally essential substances from the contractile proteins, nor do they release any stable contraction-inhibiting substance to the actomyosin or to the solution.
7. Over a wide concentration range, the effect of the granules does not depend on their absolute concentration, but on the granule/fibril ratio, in spite of the fact that the granules are not bound to the fibrils. Hence, the granules can not be identical with the inhibitor which reacts directly with the actin- and myosin-filaments.
8. It seems probable, however, that the granules release a labile inhibitor, since their relaxing effect can be exhausted by repeated washing with fibril suspensions. During such washings, the fibrils remove no granules, but merely take away their activity.
9. It is shown that all relaxing and inhibiting effects of the granules in actomyosin gels are brought about only by dissociation of the actomyosin in the presence of ATP and granules. The L-myosin-ATPase as well as the ability for and the state of polymerisation of the actin are not affected by the relaxing granules.

\* Gegenwärtige Adresse: Prof. Dr. T. NAGAI, Direktor des Physiologischen Institutes der Med. Hochschule Sapporo, Japan.

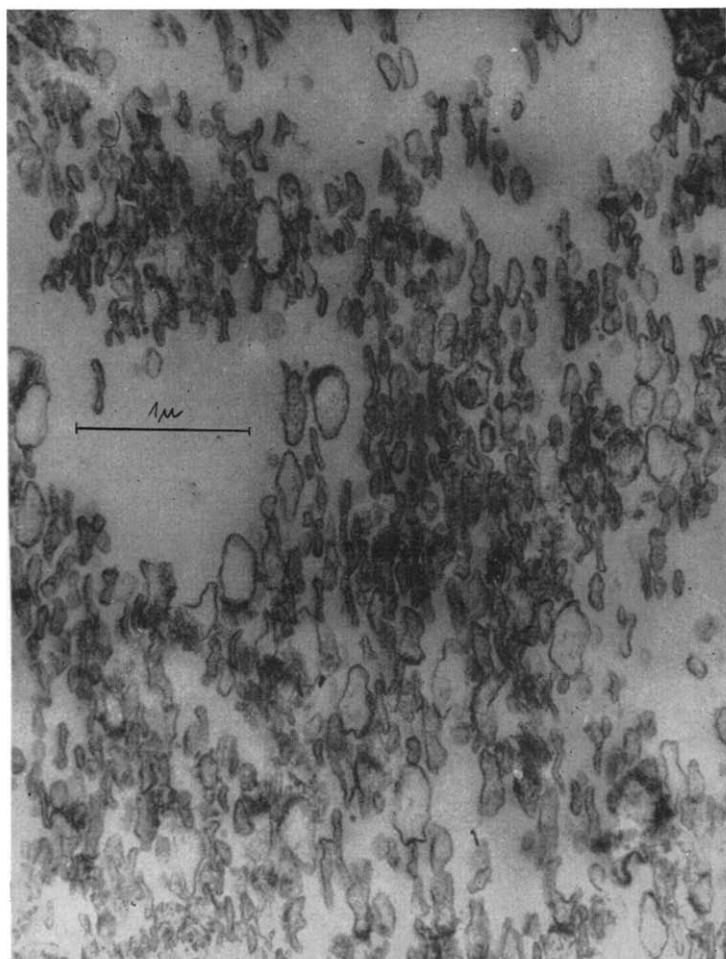


Fig. 1. Dünnschnitt durch einen Grananiederschlag. Die Grana wurden durch einstündiges Zentrifugieren bei  $25,000 \times g$  niedergeschlagen und in Osmiumsäure fixiert. Dünnschnitt und Aufnahme wurde von H. E. HUXLEY, London, gemacht.

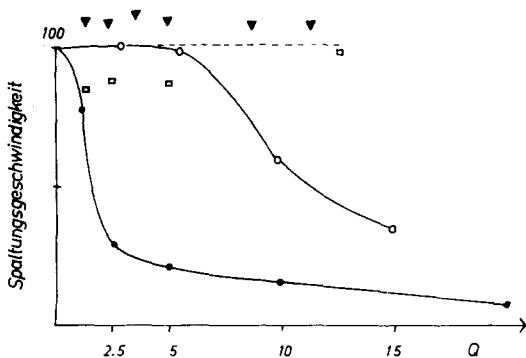


Fig. 2. Die Schädigung der Grana durch verschiedene Reagenzien und u.v. Licht. Ordinate: Geschwindigkeit der ATP-Spaltung durch Fibrillen in Prozenten der ungehemmten Spaltung. Abszisse: Grana-N·Fibrillen-N<sup>-1</sup>. 100 = Q. ● Grana ohne Vorbehandlung. ○, 30 mg Grana mit 10 mg Digitonin 15 Min inkubiert; □, 10 mg Granaprotein mit 10 mg Antarox 15 Min inkubiert; ▼, 10 mg Granaprotein 20 Min mit u.v. Licht bestrahlt.

## EINLEITUNG

Es ist seit einer Reihe von Jahren bekannt, dass kontrahierte Aktomyosinstrukturen erschlaffen, sobald die Spaltung des anwesenden ATP durch ATPase-Gifte unterdrückt wird, und dass die Strukturen im erschlafften Zustand bleiben, solange diese Hemmung andauert<sup>1</sup>. Erst seit dem Symposium über Molecular Biology<sup>2</sup> und dem Symposium der New York Academy<sup>3</sup> ist es bekannt, dass der von MARSH<sup>4,5</sup> entdeckte und von BENDALL<sup>6,7</sup> identifizierte natürliche Erschlaffungsfaktor nicht durch Blockierung der Myosin-ATPase, sondern durch Verwandlung der Aktomyosin-ATPase in die L-Myosin-ATPase wirkt. Diese Erkenntnis beruht experimentell auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit.

Die Ansicht, dass nicht nur die Beeinflussung der ATP-Spaltung, sondern auch die Restitution des ATP durch alle ATP regenerierenden Systeme<sup>8-10</sup> Erschlaffung bewirkt, ist inzwischen durch PORTZEH<sup>11</sup> sowie durch BRIGGS UND PORTZEH<sup>12</sup> widerlegt. Darüber hinaus hat zuerst PORTZEH<sup>13</sup> (vergl. WEBER<sup>14</sup>) gezeigt, dass das wirksame Prinzip des physiologischen Erschlaffungsfaktors eng mit gewissen Grana verbunden ist.

Ein Hinweis auf diese Tatsache ergibt sich aus der älteren Mitteilung von KUMAGAI *et al.*<sup>15</sup>, die Meyerhof-Kielley-ATPase sei eine Komponente des Erschlaffungsfaktors. Das Ergebnis von PORTZEH<sup>13</sup> wurde sehr schnell von BENDALL<sup>16</sup> bestätigt. Zu dem gleichen Ergebnis kamen kurze Zeit später unabhängig EBASHI<sup>17</sup> sowie LORAND<sup>18,19</sup>.

In dieser Mitteilung wird weiterhin über Beobachtungen berichtet, die dafür sprechen, dass die Grana nicht mit dem Erschlaffungsfaktor identisch sind, sondern den Faktor abgeben und ihn wahrscheinlich vorher produzieren. Es werden Angaben gemacht über die Bedingungen der Abgabe (Produktion) dieses Faktors durch die Grana und seine Wirkung.

#### Die Natur der Grana

Wird Blender behandelter Muskelbrei mit einer Lösung von 0.1 M KCl bei pH 7.0 (Phosphatpuffer, 0.005 M) in Anwesenheit von 0.005 M Oxalat extrahiert, so werden die wirksamen Grana zusammen mit anderen Grana ausgewaschen. Die wirksamen Grana gehören der Fraktion an, die durch Zentrifugieren mit 8000 × g (20 Min) noch nicht und mit 25,000 × g (60 Min) fast vollständig niedergeschlagen wird (vergl. LORAND *et al.*<sup>18</sup> und BRIGGS *et al.*<sup>20</sup>).

Aus Fig. 1 geht hervor, dass die Teilchen oder Bläschen dieser Fraktion einen mittleren Durchmesser von ~ 1000 Å haben (Fig. 1; 700–3000 Å).

Solche Grana bleiben in einer 50 % Glycerin-Wasser-Mischung mit einem Gehalt von 0.1 M KCl, 0.005 M Oxalat, pH 7.0, bei Temperaturen um Null Grad etwa 10 Tage aktiv. Die Wirkung erlischt sofort, wenn in der Granasuspension oberflächenaktive Stoffe oder SH-Reagenzien (Salyrgan\* und N-Äthylmaleimid) in genügender Konzentration anwesend sind. Die entsprechenden Angaben von LORAND *et al.*<sup>18</sup> und GERGELY *et al.*<sup>21</sup> für Thymol und Desoxycholsäure werden bestätigt und um Antarox\*\* und Digitonin als weitere oberflächenaktive Granagifte vermehrt (Fig. 2). Es ist für Thymol und Salyrgan (Tabelle I) geprüft, dass die Granaschädigung

\* Salyrgan = Mersalyl, Salicyl-( $\alpha$ -Hydroxymercuri- $\beta$ -Methoxypropyl)-amidoacetat.

\*\* Nonyl-Phenoxy-Polyoxyäthylen-Äthanol.

irreversibel ist. Für Antarox ist die Schädigung partiell reversibel. Auch die Bestrahlung mit u.v.-Licht in genügender Intensität vernichtet die Granawirkung irreversibel.

TABELLE I  
DIE IRREVERSIBLE VERGIFTUNG DER GRANA DURCH SALYRGAN

Vorbehandlung der Grana mit Salyrgan	Nach Entgiftung der Grana durch Cystein	
	ATP-Spaltung durch Fibrillen in Prozenten der ungehemmten Spaltung	Spaltungshemmung in Prozenten der maximalen Hemmung
0	16	100
$3 \cdot 10^{-6}$	42	69
$10^{-5}$	70	36
$3 \cdot 10^{-5}$	76	28
$10^{-4}$	90	12
$3 \cdot 10^{-4}$	100	0

Auch eine 10 Min-Inkubation der Grana mit calciumarmem Trypsin macht die Grana unfähig, die Spaltung von 0.005 M ATP durch Fibrillen zu hemmen. Findet dagegen die Verdauung der Grana in Gegenwart von 0,005 M ATP statt, so ist die spaltungshemmende Aktivität nach 40 Min noch voll erhalten (Fig. 3).

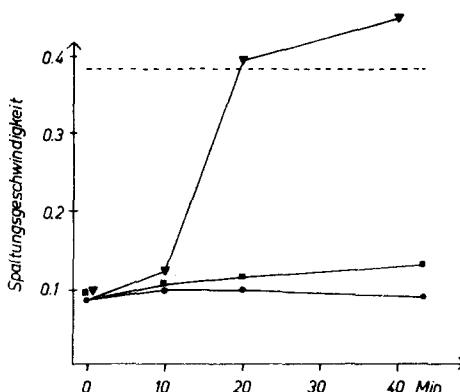


Fig. 3. ATP schützt die Granawirkung gegen Trypsinverdauung. Ordinate: Geschwindigkeit der ATP-Spaltung durch Fibrillen  $\mu\text{Mol P}/\text{mg Ew. Min.}$ . Abszisse: Dauer der Vorbehandlung der Grana. ●, Grana in Mg-ATP-haltiger Lösung inkubiert; ▼, Grana in ATP-freier Lösung mit Trypsin behandelt; ■, Grana in Gegenwart von  $5 \cdot 10^{-3} M$  ATP mit Trypsin behandelt. —, Fibrillenspaltung ohne Grana. Grana N · Fibrillen N<sup>-1</sup> · 100 = 5.3; 0.2 mg Grana wurden mit 1 mg Trypsin behandelt bei pH 7.0; Temperatur, 22°.

#### Grana und Rohextrakt

Wird die hemmende Wirkung der Grana und des Rohextraktes auf die ATP-Spaltung und ATP-Kontraktion von gewaschenen Muskelfibrillen vergleichend gemessen, so ergeben sich folgende Wirkungen und Wirkungsbedingungen, sowohl für die Granasuspension wie für den Rohextrakt: (a) Die Hemmung der ATP-Spaltung und ATP-Kontraktion durch Grana und Rohextrakt ist umso höher je höher die ATP-Konzentration ist<sup>22</sup>. Die Hemmung nimmt auch in Gegenwart hoher Granakonzentrationen mehr und mehr ab, wenn die ATP-Konzentration entsprechend verkleinert

wird (Fig. 4). (b) Die hemmende Wirkung verschwindet ferner, sobald Spuren von Calciumionen anwesend sind<sup>5</sup>. Die notwendige Calciumkonzentration wächst mit zunehmender Konzentration der Grana (Fig. 5). (c) Grana und Rohextrakt wirken nur spaltungshemmend und erschlaffend, falls Magnesiumionen anwesend sind. Die Spaltungshemmung erreicht ihren Maximalwert, wenn die Magnesiumkonzentration  $10^{-3} M$  ist (Fig. 6). (d) Wie schon PORTZEH<sup>13</sup> festgestellt hat, ist die Hemmwirkung verschiedener Verdünnungen eines Rohextraktes und der aus diesem Rohextrakt isolierten Grana auch quantitativ gleich oder fast gleich.

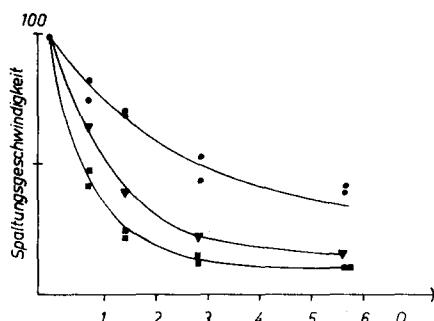


Fig. 4. Die Abhängigkeit der Granawirkung von der ATP-Konzentration. Ordinate: Geschwindigkeit der ATP-Spaltung durch Fibrillen in Prozenten der ungehemmten Spaltung. Abszisse: Grana-N·Fibrillen-N<sup>-1</sup> · 100 = Q; [ATP], ●,  $1 \cdot 10^{-3} M$ ; ▼,  $2.5 \cdot 10^{-3} M$ ; ■,  $5 \cdot 10^{-3} M$ .  $[Mg^{++}]$ ,  $2.5 \cdot 10^{-3} M$ .

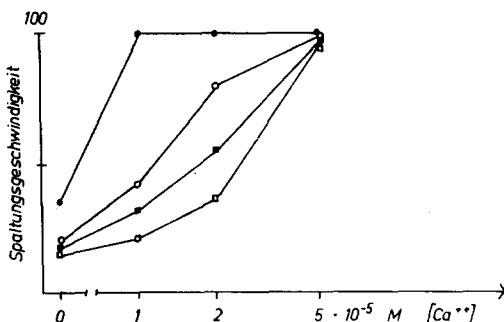


Fig. 5. Die Inaktivierung der Granawirkung durch Calcium. Ordinate: Geschwindigkeit der ATP-Spaltung durch Fibrillen in Prozenten der ungehemmten Spaltung. Abszisse: Gesamtcalcium. Die Konzentration des freien Calciums ergibt sich aus der Anwesenheit von  $5 \cdot 10^{-3} M$  ATP und  $5 \cdot 10^{-3} M$  Oxalat.  
Grana-N·Fibrillen-N<sup>-1</sup> · 100: ●, 2, ○, 4;  
■, 6; □, 8.

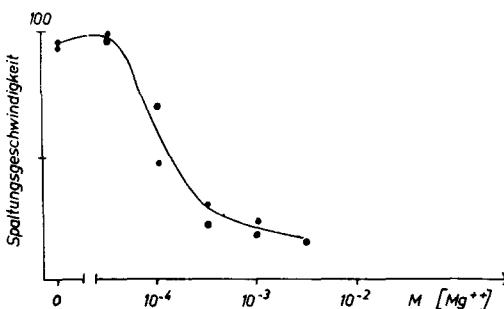


Fig. 6. Der Einfluss der Magnesiumkonzentration auf die Granawirkung. Ordinate: Geschwindigkeit der ATP-Spaltung durch Fibrillen in Gegenwart von Grana (Grana-N·Fibrillen-N<sup>-1</sup> · 100 = 2.5) in Prozenten der Spaltungsgeschwindigkeit ohne Grana. Abszisse: Magnesiumkonzentration.

#### Die Bedingungen der Granaaktivierung

Wird eine so kleine Menge von Grana\* mit Fibrillen gemischt, dass in einem Magnesium-, ATP- und Oxalat-haltigen System eine unvollständige oder eben vollständige Hemmung der ATP-Spaltung eintritt, so setzt die Hemmung nicht schlagartig

\* Die Angaben dieses Abschnittes gelten für Grana, die mehr als 2 Tage nach dem Tod des Tieres verwendet werden. Ganz frische Grana verhalten sich schon ohne Inkubation so wie 2 oder mehr Tage alte Grana nach Inkubation.

ein, sondern steigt über eine Dauer von 5 bis 10 Min an (Fig. 7, Kurve 1). In dem Maße, in dem die zugesetzte Granamenge vergrößert wird, verkürzt sich die Zeit, in der der stationäre Wert der Hemmung erreicht wird (Fig. 7, Kurve 4). Ebenso setzt die Granawirkung sehr schnell ein, wenn die Grana vor ihrer Mischung mit den

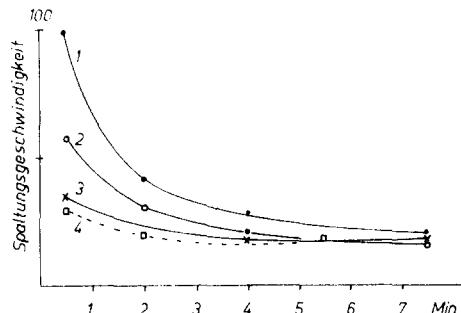


Fig. 7. Die Aktivierung und die Aktivierungszeit der Grana in Gegenwart von Mg-ATP<sub>4</sub> und Oxalat. Ordinate: Geschwindigkeit der ATP-Spaltung durch Fibrillen in Prozenten der ungehemmten Spaltung. Abszisse: Zeit nach Mischung von Grana, Fibrillen und Mg-ATP. Kurven 1 und 4: nicht mit Mg-ATP vorinkubiert. Kurve 1: Grana-N·Fibrillen-N<sup>-1</sup> · 100 = 1.5. Kurve 4: Grana-N·Fibrillen-N<sup>-1</sup> · 100 = 5.0. Kurve 2: 1 Min vorinkubiert. Kurve 3: 2 Min vorinkubiert. Grana-N·Fibrillen-N<sup>-1</sup> · 100 = 1.5 für Kurven 2 und 3.

TABELLE II

## DIE WIRKUNG CALCIUM-BINDENDER SUBSTANZEN AUF DIE AKTIVIERUNG DER GRANA

In der	Hemmung der Fibrillen-ATPase durch Grana in Prozenten der maximalen Hemmung nach 3 Min Vorbehandlung mit Mg-ATP <sub>4</sub> und				Ohne Vorbehandlung
	Citrat (5 · 10 <sup>-3</sup> M)	Oxalat (5 · 10 <sup>-3</sup> M)	EDTA (5 · 10 <sup>-3</sup> M)	—	
1. Min	66	68	75	57	34
2. Min	90	85	93	76	60
3. Min	95	90	98	85	78
4. Min	100	100	100	90	87
8. Min	100	100	100	100	100

TABELLE III

## BEDARF DER GRANA-AKTIVIERUNG AN MAGNESIUM, ATP UND OXALAT

Die 3-Min inkubierten Grana werden in einem kleinen Volumen gleichzeitig mit den Fibrillen einem normalen Spaltungsansatz (ATP = Mg<sup>++</sup> = Oxalat = 5 · 10<sup>-3</sup> M) zugesetzt. Die Spaltungszeit beträgt 3 Min. Grana-N·Fibrillen-N<sup>-1</sup> · 100 = 1.6–4.0.

Konzentration der varierten Substanz im Inkubations-Ansatz*	Spaltung in Prozenten der ungehemmten Spaltung bei Variation* von		
	ATP	Magnesium	Oxalat
0	90	85	67
10 <sup>-4</sup>	85	63	65
3 · 10 <sup>-4</sup>	70	50	65
10 <sup>-3</sup>	60	42	52
5 · 10 <sup>-3</sup>	30	38	42

\* Die beiden nicht variierten Komponenten sind in optimalen Konzentrationen vorhanden.

Fibrillen für mindestens 3 Min in einer ATP- und Magnesium-haltigen Lösung inkubiert werden, deren Calciumspuren durch Oxalat, Citrat oder EDTA weitgehend gebunden sind (Fig. 7, Kurven 2 und 3; Tabelle II). Der Erfolg der Inkubation verschwindet, wenn eine der notwendigen Komponenten in der Inkubationslösung fehlt. Die Intensität der Aktivierung der Grana während der Inkubationszeit wächst mit der Konzentration aller drei Komponenten, d.h. des ATP, des Magnesiums und des Oxalats bis zu den höchsten untersuchten Konzentrationen von  $5 \cdot 10^{-3} M$  an (Tabelle III).

Die Inkubationseffekte zeigen, dass die Wirkung der Grana einer vorbereitenden Reaktion bedarf. Fehlt die Inkubationsperiode, so findet diese vorbereitende Reaktion in der ATP-, Magnesium- und Oxalat-haltigen Fibrillensuspension statt. Wenn der Granaüberschuss sehr grosz ist, tritt volle Hemmung schon in der ersten Minute auf, obwohl das einzelne Granum erst nach mehreren Minuten voll aktiv ist.

Die bekannte Unentbehrlichkeit des Magnesiums für die Wirkung des Erschlaffungsfaktors beruht nicht allein auf seiner fördernden Wirkung auf die Granaaktivierung. Denn die hemmende Wirkung der Grana bleibt auch dann aus, wenn während der aktivierenden Vorinkubation genügend Magnesium anwesend ist, aber das Magnesium in Fibrillen-haltigen Spaltungsansatz selbst nur in ungenügender Konzentration vorhanden ist (Tabelle IV). Das Magnesium ist also zusätzlich auch für die hemmende Wirkung der bereits aktivierte Grana notwendig.

TABELLE IV

WIRKUNGSLOSIGKEIT MIT Mg-ATP VORBEHANDELTER GRANA IN MAGNESIUM-ARMEN SPALTUNGSANSÄTZEN

$$\text{Mg}^{++} = 2 \cdot 10^{-5} M, \text{Grana-N/Fibrillen-N} \cdot 100 = 2.5.$$

ATP-Spaltung*	
	Mg-ATP-inkubierten Grana Mit $2 \cdot 10^{-5} M$
Ohne Grana	
0.28	0.28
0.30	0.30
0.18	0.19
0.175	0.16

\*  $\mu\text{Mol P/mg Fibrillen Protein/Min.}$

### Das Ende der Granawirkung

Man kann die Grana aus einer ATP- und Magnesium-haltigen Mischung mit Fibrillen entfernen. Die Fibrillen werden abzentrifugiert; aus dem granahaltigen Überstand werden die Grana mit der Ultrazentrifuge beseitigt; die abzentrifugierten Fibrillen werden in dem granafreien Überstand resuspendiert. Es zeigt sich dann, dass die Hemmung der ATP-Spaltung durch die Fibrillen nach der Entfernung der Grana aufgehoben ist. Im granafreien Überstand spalten die Fibrillen wieder ungehemmt und kontrahieren sich gleichzeitig. Das gleiche Resultat ergibt sich, wenn die aus der Granasuspension abzentrifugierten Fibrillen in eine frisch bereitete ATP-Lösung gebracht werden (Tabelle V).

TABELLE V

## ENTHEMMUNG DER FIBRILLEN DURCH DIE ENTFERNUNG DER GRANA

ATP-Spaltung durch Fibrillen in Prozenten der ungehemmten Spaltung			
Vor Entfernung der Grana	Nach Entfernung der Grana und Resuspension der Fibrillen in frischer ATP-Lösung	Vor Entfernung der Grana	Nach Entfernung der Grana und Resuspension der Fibrillen in der Ausgangslösung
19	103	12	106
20	99	19	89
15	94	20	106
17	92	23	94
		17	100
		12	100

Dieser einfache Versuch schliesst eine ganze Reihe von Mechanismen der Grana-wirkung aus.

Er zeigt, dass die Grana nicht dadurch hemmend wirken können, dass sie aus den Fibrillen eine Substanz entfernen, die für die Magnesium-aktivierte ATP-Spaltung und die Kontraktion notwendig ist. Denn dann sollte die Kontraktion der Fibrillen und die ATP-Spaltung auch nach Entfernung der Grana gehemmt bleiben, weil zusammen mit den Grana auch dieser kontraktions- und spaltungswichtige Stoff entfernt ist. Die Wirkung der Grana beruht also auch nicht auf der Entfernung von Calcium oder Magnesium, wie gelegentlich angenommen wurde<sup>23\*</sup>.

TABELLE VI

Der Einfluss der Grana auf den Calciumgehalt  
der Myofibrillen\*

Vor Inkubation mit Grana	Nach Inkubation mit Grana
12.6	11.6
12.7	11.8
12.8	11.9
11.6	11.3

\*  $\mu\text{Mol Ca}^{++}/\text{Gr. Prot.}$

Das Ende der Granawirkung mit der Entfernung der Grana schliesst aber auch aus, dass die Grana an die Fibrillen stabile Hemmstoffe abgeben. Auch in diesem Falle müsste die Granawirkung die Granaentfernung überdauern. Selbst wenn mehrere Stoffe bei der Hemmung zusammenwirken sollten, treffen alle diese Stoffe wieder zusammen, sobald die Fibrillen in der gleichen, nur von den Grana befreiten Lösung resuspendiert werden, in der sie sich während der Hemmungsperiode befunden haben. Gegen eine Abgabe von Hemmstoff ausschliesslich an die Lösung spricht ferner die Beobachtung, dass der granafreie Überstand ATP-Magnesiumhaltiger Granasuspen-

\* Auch die Bestimmung des Calciumgehaltes von Fibrillen vor und nach Inkubation mit Grana, Magnesium und ATP zeigt, dass die Grana den Fibrillen Calcium nicht oder kaum entziehen (Tabelle VI), obwohl die Fibrillenkontraktion und die ATP-Spaltung in den granahaltigen Ansätzen gehemmt sind.

TABELLE VII  
WIRKUNGSLOSIGKEIT DER GRANAFREIEN ÜBERSTÄNDE VON  
Mg-ATP<sub>4</sub>-HALTIGEN GRANASUSPENSIONEN

<i>ATP-Spaltung durch unbehandelte Fibrillen in Prozenten der ungehemmten Spaltung in Gegenwart von</i>	
<i>Granafreien Lösungen, abgetrennt aus Mg-ATP<sub>4</sub> und enthaltenden Grana- suspensionen</i>	<i>Granafreien Lösungen, abgetrennt aus Mg-ATP<sub>4</sub> + Fibrillen haltigen Granasuspensionen</i>
97	105
102	103
95	96

sionen nicht mehr wirkt. Der Überstand ist auch dann wirkungslos, wenn die Grana-suspension zusätzlich mit Fibrillen inkubiert war (Tabelle VII).

Infolgedessen scheint nur folgende Alternative übrig zu bleiben. Entweder: die Grana reagieren wie eine chemische Substanz mit den Aktin- und Myosinfilamenten, deren enzymatische Interaktion (als Aktomyosin-ATPase) und deren mechanische Interaktion (als Kontraktion) sie verhindern. Oder: die Grana geben eine hemmende Substanz ab, die so labil ist, dass ihr Spiegel sehr schnell auf Null sinkt, falls die Substanz von den Grana nicht mehr nachgeliefert wird.

Es ist unwahrscheinlich, dass die Grana mit der Erschlaffungssubstanz identisch sind. Denn von einer Erschlaffungssubstanz müssen auch die innersten Filamente der Fibrillen erreicht werden. Grana mit einem Durchmesser von 1000 Å aber können nicht in das Innere der Fibrillen eindiffundieren.

Ferner müsste die Hemmungswirkung der Grana nach dem Massenwirkungsgesetz von der Granakonzentration abhängen, wenn die Grana selbst als Hemmstoff mit den Fibrillen reagierten. Die Intensität der Hemmung hängt aber nur dann von der Granakonzentration ab, wenn die Granakonzentration in den Ansätzen sehr klein ist ( $\lesssim 0.003$  mg Granaprotein/ml). Ist die Granakonzentration grösser, so hängt

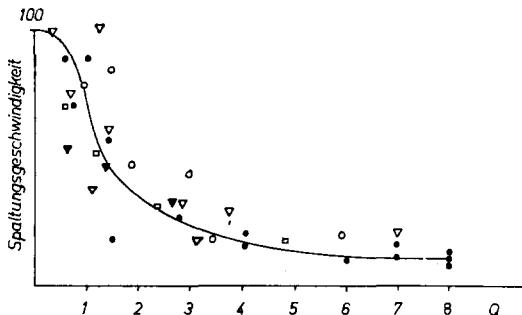


Fig. 8. Die Abhängigkeit der Fibrillen-ATPase von der Proportion der Grana zu den Fibrillen. Ordinate: Geschwindigkeit der ATP-Spaltung durch Fibrillen, ungehemmte Spaltung = 100. Abszisse: Grana-N · Fibrillen-N<sup>-1</sup> · 100 = Q. ○, 0.26 mg Fib. Prot./ml; ●, 0.38 mg Fib. Prot./ml; □, 0.8 mg Fib. Prot./ml; ▼, 2.2 mg Fib. Prot./ml; ▽, 3.8 mg Fib. Prot./ml. Die zu den angegebenen Fibrillenkonzentrationen gehörige Granakonzentration beträgt 0.0025 mg/ml für die niedrigen Q-Werte und die niedrigsten Fibrillenkonzentrationen. Sie wächst mit steigenden Q-Werten und steigenden Fibrillenkonzentrationen bis 0.25 mg/ml.

die Intensität der Hemmung von der Proportion der Grana zu den Fibrillen ab ( $Q$ -Wert = Grana-N · Fibrillen-N<sup>-1</sup> · 100). Dies zeigt Fig. 8, in der bei konstantem  $Q$ -Wert die absolute Konzentration der beiden Komponenten bis zum zehnfachen variiert wird, ohne dass sich die ATP-Spaltung für den gegebenen  $Q$ -Wert deutlich dabei ändert. Dieser Befund ist mit der Gültigkeit des Massenwirkungsgesetzes für die Reaktion zwischen Grana und Fibrillen nur unter der Voraussetzung vereinbar, dass die Fibrillen die Grana mehr oder weniger unabhängig von ihrer absoluten Konzentration vollständig oder fast vollständig binden.

Das aber ist nicht der Fall. Denn die freien Grana lassen sich im Überstand nachweisen. Der Überstand hemmt nach dem Abzentrifugieren der Fibrillen frische Fibrillen in genau dem gleichen Umfang, in dem die ursprünglichen Fibrillen vor dem Abzentrifugieren gehemmt wurden, wenn die Grana-Fibrillen-Proportion  $\geq 1.5$  ist (Fig. 9). Mit kleineren  $Q$ -Werten als 1.5 ist eine hemmende Wirkung weder vor noch nach dem Abzentrifugieren der Fibrillen deutlich nachzuweisen. Der Überstand enthält also nach dem Abzentrifugieren der Fibrillen praktisch ebensoviel Grana wie vorher.

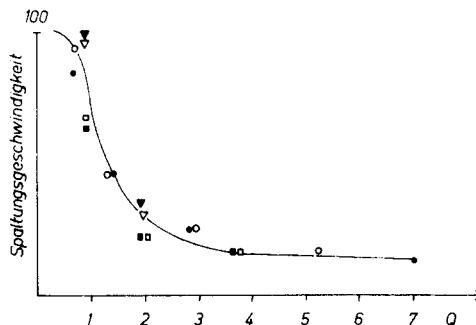


Fig. 9. Die Granawirkung im Überstand einer Grana-Fibrillen-Mischung nach Abzentrifugieren der Fibrillen. Abszisse:  $Q$ -Werte. Ordinate: Geschwindigkeit der ATP-Spaltung durch Fibrillen, ungehemmte Spaltung = 100. Offene Symbole, in Anwesenheit von Grana aus dem Überstand; gefüllte Symbole, in der ursprünglichen Grana-Fibrillen-Mischung. Die Grana-Fibrillen-Proportion bezieht sich auf die ursprüngliche Mischung vor dem Abzentrifugieren der Fibrillen. Der  $Q$ -Wert der Mischung des Überstandes mit frischen Fibrillen ist unter der Annahme berechnet, dass die Granakonzentration im Überstand der ursprünglichen Granakonzentration gleich ist.

Diese Beobachtung führt per exclusionem zu der Vermutung, dass die Grana eine Erschlaffungssubstanz abgeben, die so labil ist, dass sie nach Entfernung der Grana sehr schnell nicht mehr nachgewiesen werden kann.

Ob diese Annahme richtig ist, lässt sich nur auf einem Wege prüfen. Eine intensive Abgabe der labilen Substanz muss zu einer Erschöpfung der Granawirkung führen. Denn entweder die labile Substanz selbst oder irgendwelche Vorstufen der labilen Substanz müssen in den Grana verbraucht werden\*.

Werden Grana dreimal mit 60-fachem Volumen von Magnesium-haltiger ATP-Lösung gewaschen, so ist keine Wirkungsabnahme nachweisbar (Tabelle VIII). Dagegen lässt sich die Wirkung der Granalösung sofort weitgehend erschöpfen, wenn wenige Grana mit sehr viel Fibrillen gewaschen werden.

\* Eine Erschöpfung der Grana braucht trotz Abgabe einer labilen Substanz nicht einzutreten, wenn das immer gegenwärtige ATP die Vorstufe der Erschlaffungssubstanz ist oder wenn die Grana die zerstörte Erschlaffungssubstanz immer wieder restituieren.

TABELLE VIII

GLEICHHEIT DER WIRKUNG UNGEWA SCHEN ER UND SEHR GRÜNDLICH MIT OXALAT SOWIE Mg-ATP-OXALAT GEWA SCHEN ER GRANA

Grana N/Fibrillen N · 100	ATP-Spaltung in $\mu\text{Mol P/mg Fibrillen Prot. · Min}$		
	Ungewaschene Grana	Mit Oxalat gewaschene Grana *	Mit Mg-ATP und Oxalat gewaschene Grana *
1	0.43	0.40	0.41
3	0.26	0.23	0.22
5	0.12	0.13	0.13

\* Dreimal mit dem 60-fachen Volumen.

Dann genügt bisweilen schon eine einmalige Waschung für eine erkennbare und immer eine zweimalige Waschung für eine grosse Abnahme der hemmenden Granawirkung (Tabelle IX), obwohl bei der Prüfung der restierenden Granawirkung viele Grana mit wenigen Fibrillen gemischt werden ( $Q = 5$ , s. Tabelle IX).

TABELLE IX

ABNAHME DER GRANAWIRKUNG NACH WASCHUNG EINER KLEINEN GRANAMENGE MIT EINER GROSSEN FIBRILLENMENGE ( $Q = 0.75$ ) IN Mg-ATPat-LÖSUNG

Anzahl der Waschungen	Hemmung der ATP-Spaltung in Prozenten der maximalen Hemmung durch gewaschene Grana (gemessen mit $Q = 5$ )	
	Gewaschen mit Fibrillen	Gewaschen ohne Fibrillen
1	90	100
1	76	100
2	4	—
1	87	98
2	1	67
1	100	100
2	12	97
1	94	97
2	64	94

Diese Erschöpfung der Granasuspension beruht mit Sicherheit nicht darauf, das die sehr dichte Fibrillensuspension die Grana mit in den Niederschlag reisst. Der Überstand enthält nach dem Abzentrifugieren der Fibrillen ebensoviele Grana wie vorher, wie die nephelometrische Kontrolle ergibt (Tabelle X). Infolgedessen kann eine Erschöpfung der Granasuspension nur dann durch eine Verarmung an Grana erklärt werden, wenn man zusätzlich zwei Annahmen macht. (a) Nur eine sehr kleine Fraktion der suspendierten Grana gibt die labile Erschlaffungsubstanz ab. (b) Diese unmessbar kleine Fraktion wird von den Fibrillen selektiv in den Niederschlag mitgenommen.

Die zweite Annahme ist nicht sehr wahrscheinlich. Vor allem aber spricht das Experiment gegen die zweite Annahme.

Wenn wenige Grana mit sehr viel Fibrillen ( $Q = 0.5$ ) in Abwesenheit von Magnesium-ATPat ein- bis zweimal gewaschen werden, so können die Grana während der

TABELLE X

KONSTANZ DER GRANAKONZENTRATION TROTZ WASCHUNG EINER KLEINEN GRANAMENGE MIT EINER GROSSEN FIBRILLENMENGE IN GEGENWART VON Mg-ATPat

Grana-Konzentration mg Prot./ml	Trübung der Granalösung*	
	Vor Waschung mit Fibrillen	Nach Waschung mit Fibrillen**
0.01	32	—
0.02	48	53
0.05	79	86
0.075	92	99
0.1	100	108

\* Die Trübung der 0.01 % Granalösung ist gleich 100 gesetzt.

\*\* Die Trübung ist korrigiert um den kleinen Trübungsbeitrag, der selbst von gut gewaschenen Fibrillen erzeugt wird. Er ist in jedem Versuch gesondert bestimmt. 0.1 mg Granaprotein/ml entspricht einem Q von 1.0.

Waschungen keine Erschlaffungssubstanz abgeben, weil die Grana nur in Gegenwart von Magnesium-ATPat aktiv sind (vergl. *Die Bedingungen der Granaaktivierung*). Tabelle XI zeigt, dass der granahaltige Überstand nach dem Abzentrifugieren der Fibrillen unverändert volle Hemmung hervorruft, wenn die Grana unter Normalbedingungen ( $Q = 1.6-3.0$ ) mit Fibrillen und Magnesium-ATPat gemischt werden. Im inaktiven Zustand werden die Grana durch die Waschung mit einem Fibrillenüberschuss weder erschöpft noch aus dem Überstand entfernt.

TABELLE XI

KONSTANZ DER GRANAWIRKUNG NACH WASCHUNG EINER KLEINEN GRANAMENGE MIT EINER GROSSEN FIBRILLENMENGE IN ABWESENHEIT VON Mg-ATPat

Anzahl der Waschungen	Grana-Fibrillen Proportion $Q$	Hemmung der ATP-Spaltung in Prozenten der maximalen Hemmung*	
		Nach Waschung mit Fibrillen	Vor Waschung mit Fibrillen
1	0.55	84	82
1	0.55	92	92
1	0.65	85	90
2	0.61 u. 0.5	92	82
2	0.61 u. 0.5	95	100

\* Gemessen bei einer Grana-Fibrillen-Proportion  $Q$ , 1.6 bis 3.0.

Wird infolgedessen angenommen, dass die Erschöpfung der Granawirkung auf der Abgabe und Zerstörung eines labilen Inhibitors beruht, so ergibt sich die weitere Folgerung: Der labile Inhibitor wird nur dann in messbarem Umfang abgegeben, wenn er an Fibrillen gebunden wird. Denn sonst müsste auch eine Waschung mit reiner Magnesium-ATPat-Lösung zur Erschöpfung der Grana führen.

Wenn der Hauptteil des abgegebenen Inhibitors an die Fibrillen gebunden wird und wenn der Inhibitor labil ist, ist zu erwarten, dass die Hemmungswirkung nur von der Proportion der Grana zu den Fibrillen und nicht von der absoluten Konzentration noch von der Einwirkungszeit der Grana abhängt. (a) Die Labilität des

Inhibitors verhindert seine Akkumulation und damit ein Anwachsen der Hemmungswirkung mit der Einwirkungszeit der Grana. (b) Die Bindung eines "labilen" Inhibitors an die Fibrillen macht die Geschwindigkeit der Nachlieferung zum limitierenden Faktor der gebundenen Inhibitormenge, solange die Fibrillen nicht mit dem Inhibitor gesättigt sind. Die Menge des in der Zeiteinheit nachgelieferten Inhibitors steigt proportional mit der Menge der anwesenden Grana, während der für einen bestimmten Hemmungsgrad notwendige Bedarf proportional mit der Menge der Fibrillen ansteigt. Die absolute Konzentration von Grana und Fibrillen fällt aus dieser Betrachtung heraus; die Hemmung ist allein durch die Proportion Grana: Fibrillen bestimmt, solange nicht angenommen wird, dass ein wesentlicher Teil des Inhibitors frei in der Lösung zerstört wird (vergl. dazu Fig. 8).

Die Q-Abhängigkeit der Hemmung ist mit der Annahme einer labilen Erschlaffungssubstanz vereinbar, weil die Fibrillen die Erschlaffungssubstanz weitgehend oder fast vollständig zu binden scheinen. Die Q-Abhängigkeit der Hemmung spricht dagegen gegen eine unmittelbare Reaktion der Grana mit den Fibrillen, weil sich nachweisen lässt, dass die Fibrillen die Grana nicht wesentlich binden.

#### *Der Erschlaffungsfaktor als Interaktions-Inhibitor*

Es ist lange bekannt, dass der Erschlaffungsfaktor und das ATP zusammenwirken<sup>22</sup>. 1952 haben HASSELBACH UND WEBER erstmals gezeigt, dass die Hemmung der ATP-Verwertung durch Aktomyosinstrukturen darauf beruht, dass der Bereich der sogenannten überoptimalen Hemmung der ATP-Verwertung sich in Gegenwart des Faktors auf physiologische ATP-Konzentrationen ausdehnt.

Wir zeigen nun, dass das Zusammenwirken von ATP und Faktor ausschliesslich darauf beruht, dass in Gegenwart dieser beiden Komponenten Fibrillen und Aktomyosingele vollständig dissoziiert sind.

1. Nach HUXLEY UND HANSON<sup>24</sup> beruht im physiologischen Ionenmilieu die Dehnung Wasser-Glycerin-extrahierter Muskelfasern auf dem Abgleiten der I-Filamente von den A-Filamenten der Fibrille. Infolgedessen ist der Widerstand gegen die Dehnung ein Maß für die Affinität und Komplexbildung zwischen Aktin- und L-Myosin-Filamenten. Dieser Dehnungswiderstand sinkt bei gleichzeitiger Anwesenheit von ATP und hemmenden Faktormengen auf Null<sup>22, 25</sup>.

2. Wenn die Affinität zwischen Aktin- und Myosin-Filamenten in Fibrillen oder zwischen Aktin- und Myosin-Molekülen in geordneten Aktomyosinfäden verschwunden ist, ist eine Kontraktion nach dem Schema von HUXLEY UND HANSON<sup>24</sup> unmöglich.

3. In Gegenwart von ATP und Erschlaffungsfaktor wird aus der Aktomyosin-ATPase eine L-Myosin-ATPase. Die Magnesium-aktivierte ATP-Spaltung durch Fibrillen wie durch Aktomyosinflocken fällt in Gegenwart des Faktors nie auf Null. Es bleibt vielmehr immer eine Restspaltung übrig, die in ihrer Grösze der ATP-Spaltung durch L-Myosin in Gegenwart von Magnesium entspricht (Fig. 8).

4. Auf der anderen Seite übt der Faktor auf die beiden Komponenten Aktin und L-Myosin keine Wirkung aus, sobald sie einzeln untersucht werden. Die ATP-Spaltung durch die L-Myosin-ATPase ist von der Faktorkonzentration völlig unabhängig und verläuft mit und ohne Faktor gleich (Tabelle XII). Die Polymerisation von G-Aktin zu F-Aktin (vergl. Spalte 2 mit 1 der Tabelle XIII) und die Viskosität von F-Aktin-

Lösungen (vergl. Spalte 3 mit 1 der Tabelle XIII) werden durch Faktor nicht beeinflusst.

Die Beobachtungen 1-3 zeigen, dass der Faktor in ATP-Gegenwart jede Interaktion zwischen Aktin und L-Myosin aufhebt, während die Beobachtung 4 ergibt, dass er darüber hinaus keine anderen Wirkungen hat. Er ist ein reiner Interaktions-Inhibitor und gehört damit zu einer Reihe von Substanzen, die außer dem Erschlafungsfaktor auch noch eine Anzahl anderer chemisch bekannter Stoffe enthält, deren Wirkung in unserem Laboratorium in jüngster Zeit systematisch analysiert und als Wirkung der Interaktions-Inhibitoren zusammengefasst wurde<sup>25, 26</sup>.

TABELLE XII  
GRANAWIRKUNG AUF DIE ATP-SPALTUNG DURCH L-MYOSINFLOCKEN

Grana-Fibrillen Proportion Q	Spaltungsrate in $\mu\text{Mol P/mg L-Myosin} \cdot \text{Min}$
0	0.016
1	0.016
2	0.013
4	0.016
6	0.017

TABELLE XIII  
FEHLENDE WIRKUNG DER GRANA AUF G- UND F-AKTIN

Ohne Grana	$\eta_{rel}$ nach Polymerisation einer G-Aktin-Lösung	
	Nach Zugabe von Grana	
	Vor der Polymerisation	Nach der Polymerisation
2.6	2.7	2.7
2.1	2.3	2.3
2.4	2.6	2.7

#### TECHNISCHER TEIL

Zur Gewinnung der Grana wurde die frische Kaninchenmuskulatur zunächst in Eis aus destilliertem Wasser gekühlt und mit dem Fleischwolf zerkleinert. Dann wurde ein Teil Muskelbrei bei 0° mit vier Teilen einer Lösung, die 0.1 M KCl, 0.005 M Oxalat und 0.005 M Phosphat- oder Histidinpuffer enthält, 2 Min lang im Starmix zerkleinert. Zur Abtrennung der Myofibrillen und der Mitochondrien wurde der Brei 20 Min lang bei 8000 × g zentrifugiert. Aus dem Überstand (Rohextrakt) wurden die Grana durch einstündiges Zentrifugieren bei 25,000 × g niedergeschlagen. Der Grananiederschlag wurde in einer Lösung, die 0.1 M KCl und 0.001 M Oxalat enthält, aufgeschwemmt und mit einem Homogenisator suspendiert. Einige Präparationen wurden zur Konservierung mit 50 Volumeneilen 90 % Glycerin versetzt.

Einige Myofibrillensuspensionen enthielten nach der üblichen Präparation<sup>27</sup> noch spaltungs- und kontraktionshemmende Grana. Zur Inaktivierung der Grana wurde die Fibrillensuspension mit Thymol gesättigt. Überschüssiges Thymol wurde durch gründliches Waschen mit 0.1 M KCl entfernt.

L-Myosin wurde nach PORTZEL, SCHRAMM UND WEBER<sup>28</sup> und Aktin nach den Angaben von STRAUB<sup>29</sup> präpariert.

Die ATP-Spaltung durch Myofibrillen wurde in den Ansätzen gemessen, die 0.055 M KCl, 0.005 M ATP, 0.005 M Mg<sup>++</sup>, 0.003 M Oxalat, 0.01 M Histidin (pH 7.0) und 0.03–0.05 % Fibrillenprotein enthielten. In den Spaltungsansätzen zur Messung der ATPase-Aktivität von L-Myosinflocken betrug die KCl-Konzentration nur 0.03–0.04 M bei sonst gleicher ionaler Zusammensetzung und gleicher Proteinkonzentration. Die Spaltungsexperimente wurden bei Zimmertemperatur (20–23°) durchgeführt. Abweichungen von diesen Angaben sind in den Legenden vermerkt. Zur Messung der Spaltungsgraten wurden den Versuchsansätzen in bestimmten Zeitabständen aliquote Teile entnommen und in Trichloressigsäure (Endkonzentration 1 %) pipettiert. Wenn in den Legenden nicht anders vermerkt, wurde das zwischen der 2. und 7. Min nach Komplettierung der Ansätze freigesetzte Phosphat gemessen. Phosphatbestimmung: nach ROCKSTEIN UND HARRON<sup>30</sup>.

Zur Entfernung des Calciums aus kristallisiertem Trypsin wurde das Trypsin in 1 % Lösung 10 Stunden gegen Dowex 50 × 8·Na (pH, 7.0) dialysiert. Die Trypsinverdauung der Grana wurde durch Zugabe von Trypsin Inhibitor (Trypsin:Inhibitor = 1:2) beendet.

Calcium wurde komplexometrisch mit EDTA und Murexid als Indikator bestimmt.

#### NACHTRAG BEI DER KORREKTUR

Die Eigenspaltung der Grana beträgt 0.1 bis 0.2 μMol ATP/mg Pr. · Min. Sie ist in den Experimenten abgezogen worden.

(Eingegangen am 28 März, 1960)

#### DANK

Wir danken Herrn Professor H. H. WEBER und Mr. A. F. HUXLEY für anregende Diskussionen, Dr. H. E. HUXLEY für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Grana und Fräulein E. GEYRHALTER für die fleissige Unterstützung bei den Versuchen.

#### ZUSAMMENFASSUNG

1. Die spaltungs- und kontraktionshemmende Granafraktion des Kaninchensmuskels wird aus dem Rohextrakt durch einstündiges Zentrifugieren bei 25,000 × g praktisch vollständig niedergeschlagen. Der Durchmesser der Grana dieser Fraktion beträgt etwa 1000 Å (700 Å–3000 Å).

2. Die Granawirkung wird irreparabel zerstört durch SH-Reagenzien, Thymol und u.v.-Licht. Die Funktionslähmung durch manche Detergentien, wie Antarox, ist teilweise reparabel.

3. Verdauung der Grana mit dem mehrfachen Eigengewicht an Trypsin zerstört die Granawirkung irreversibel in Abwesenheit von ATP und beeinflusst die Wirkung gar nicht in Anwesenheit von ATP.

4. Bevor die Grana hemmend wirken müssen sie in Abwesenheit von Calcium durch ATP und Magnesium in einen aktiven Zustand gebracht werden. Die Aktivierung dauert wenige Minuten und findet in den üblichen Versuchen während des Versuches selbst statt.

5. Die spaltungs- und kontraktionshemmende Wirkung der Grana auf Fibrillen und Aktomyosinflöckchen hört mit der Entfernung der Grana sofort auf.

6. Die Grana entziehen also den kontraktilen Proteinen keine kontraktionswichtige Substanz und geben auch keine stabile kontraktionshemmende Substanz an das Aktomyosin oder die Lösung ab.

7. In einem grossen Konzentrationsbereich ist die Wirkung der Grana nicht von ihrer absoluten Konzentration, sondern von der Proportion der Grana zu den Fibrillen abhängig, obwohl die Grana von den Fibrillen nicht gebunden werden. Infolgedessen können die Grana nicht mit dem Inhibitor identisch sein, der mit den Aktin- und Myosinfilamenten unmittelbar reagiert.

8. Dagegen wird die Abgabe eines labilen Inhibitors durch die Grana wahrscheinlich, durch die Beobachtung, dass die Granawirkung durch mehrmaliges Waschen mit Fibrillensuspensionen erschöpft werden kann. Die Fibrillen entfernen bei diesen Waschungen keine Grana, sondern nur ihre Wirkung.

9. Es wird gezeigt, dass die Grana auf Fasern und andere Aktomyosinsysteme allein dadurch wirken, dass sie bei Anwesenheit von ATP eine vollständige Dissoziation der Aktin- und Myosinfilamente oder -Moleküle herbeiführen. Die L-Myosin-ATPase, sowie der Polymerisationszustand und die Polymerisationsfähigkeit des Aktin werden durch Erschlaffungsfaktor nicht beeinflusst.

#### LITERATUR

- <sup>1</sup> H. PORTZEHLD, *Z. Naturforsch.*, 7b (1952) 1.
- <sup>2</sup> H. H. WEBER, *Symp. Molecular Biology*, Academic Press, New York, 1960, p. 25.
- <sup>3</sup> H. H. WEBER, *Ann. New York Acad. Sci.*, 81 (1959) 409.
- <sup>4</sup> B. B. MARSH, *Nature*, 167 (1951) 1065.
- <sup>5</sup> B. B. MARSH, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 247.
- <sup>6</sup> J. R. BENDALL, *Nature*, 170 (1952) 1058.
- <sup>7</sup> J. R. BENDALL, *Proc. Roy. Soc., (London) B*, 139 (1952) 523.
- <sup>8</sup> M. C. GOODALL UND A. G. SZENT-GYÖRGYI, *Nature*, 172 (1953) 84.
- <sup>9</sup> L. LORAND, *Nature*, 172 (1953) 1181.
- <sup>10</sup> C. MOSS UND L. LORAND, *Biochim. Biophys. Acta*, 24 (1957) 461.
- <sup>11</sup> H. PORTZEHLD, *Biochim. Biophys. Acta*, 24 (1957) 474.
- <sup>12</sup> F. N. BRIGGS UND H. PORTZEHLD, *Biochim. Biophys. Acta*, 24 (1957) 483.
- <sup>13</sup> H. PORTZEHLD, *Biochim. Biophys. Acta*, 26 (1957) 373.
- <sup>14</sup> H. H. WEBER, *Ann. Rev. Biochem.*, 26 (1957) 673.
- <sup>15</sup> H. KUMAGAI, S. EBASHI UND F. TAKEDA, *Nature*, 176 (1955) 166.
- <sup>16</sup> J. R. BENDALL, *Nature*, 181 (1958) 1188.
- <sup>17</sup> S. EBASHI, *Arch. Biochem. Biophys.*, 76 (1958) 410.
- <sup>18</sup> L. LORAND, J. MOLNAR UND C. MOSS, *Conference on the Chemistry of Muscular Contraction*, Tokyo 1957, Jgaku Shoin Ltd., p. 85.
- <sup>19</sup> L. LORAND, J. MOLNAR UND C. MOSS, *Biol. Bull.*, 113 (1957) 322.
- <sup>20</sup> F. N. BRIGGS, G. KALDOR UND J. GERGELY, *Biochim. Biophys. Acta*, 34 (1959) 211.
- <sup>21</sup> J. GERGELY, G. KALDOR UND F. N. BRIGGS, *Biochim. Biophys. Acta*, 34 (1959) 218.
- <sup>22</sup> W. HASSELBACH UND H. H. WEBER, *Biochim. Biophys. Acta*, 11 (1953) 160.
- <sup>23</sup> S. V. PERRY, *Physiol. Rev.*, 26 (1956) 1.
- <sup>24</sup> J. HANSON UND H. E. HUXLEY, *Symp. Soc. Exptl. Biol.*, 9 (1955) 228.
- <sup>25</sup> M. BÁRÁNY UND F. JAISLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 41 (1960) 192.
- <sup>26</sup> M. BÁRÁNY UND K. BÁRÁNY, *Biochim. Biophys. Acta*, 41 (1960) 204.
- <sup>27</sup> A. WEBER UND W. HASSELBACH, *Biochim. Biophys. Acta*, 15 (1954) 237.
- <sup>28</sup> H. PORTZEHLD, G. SCHRAMM UND H. H. WEBER, *Z. Naturforsch.*, 5b (1950) 61.
- <sup>29</sup> F. B. STRAUB, *Studies Inst. Med. Chem. Univ. Szeged*, 2 (1942) 3.
- <sup>30</sup> M. ROCKSTEIN, UND P. W. HARRON, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 1500.