

DIE ABHÄNGIGKEIT DER GRANAWIRKUNG VON DER ART DES AKTOMYOSINSYSTEMS UND GERGELY'S CO-FACTOR

MADOKA MAKINOSE UND WILHELM HASSELBACH

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

(Eingegangen am 16. Dezember, 1959)

SUMMARY

The dependence of granule effect on the nature of the actomyosin system and Gergely's co-factor

1. Granules inhibit the ATP-cleavage and superprecipitation of Mg-activated single fibrils, actomyosin floccules and very thin actomyosin threads. Inhibition stops when the granules are removed.

2. Extracted single fibres are completely inhibited by their intrinsic granule system, if extraction has not exceeded 1–2 days. Such fresh fibres contract immediately upon addition of Ca.

3. The contraction of fibres that have been extracted over somewhat longer time can be suppressed by the addition of granules in only about 30 % of the cases. After removal of the granules, contraction sets in anew.

4. Inhibition becomes total if in addition to the granules GERGELY's co-factor is added. After the removal of the granules and co-factor, contraction sets in again in only 60 % of the cases.

5. Where the intrinsic granules in the extracted fibres have been irreversibly destroyed by Salyrgan or excessively long extraction, contraction cannot be inhibited longer even by added granules plus co-factor. Similarly, the contraction of thick actomyosin threads cannot be inhibited either by granules alone, or by granules plus the co-factor.

6. The contraction of thick actomyosin threads, however, is at once inhibited if the granules are embedded in the threads instead of being added to the bath. The ATP-splitting produced by thick (100 μ) microtome sections is not affected by the granules; at the moment, however, when the microtome sections have been minced by an homogenizer the splitting is inhibited.

7. All experiments with myosin particles of different dispersity, or with single fibres whose intrinsic granules have been destroyed, support the conclusion that the granules do not work when the diffusion paths of the relaxing substance become long. This is a fresh argument in favour of the assumption of a labile relaxing agent.

8. The effect of added granules plus co-factor on fibres whose intrinsic granule system has been damaged but not irreversibly destroyed, seems to indicate that besides releasing the relaxing agent, granules and co-factor release—or, in the case of the co-factor, are themselves—substances that restore the intrinsic granules of the fibre.

EINLEITUNG

Gereinigte Granasuspensionen verwandeln immer die Aktomyosin-ATPase isolierter Fibrillen in die L-Myosin-ATPase und verhindern die Fibrillenkontraktion, falls ATP und Magnesium zugegen sind¹. Die für die Wirkung notwendigen Q-Werte* sind gut reproduzierbar. Mit den gleichen Q-Werten werden die gleichen Effekte mit feinen Flocken gereinigten Aktomyosins erzielt (Fig. 1, Tabelle III). (Über weitere Beobachtungen an Aktomyosinflocken und Granawirkung vergleiche die ausführliche Arbeit von MUELLER².)

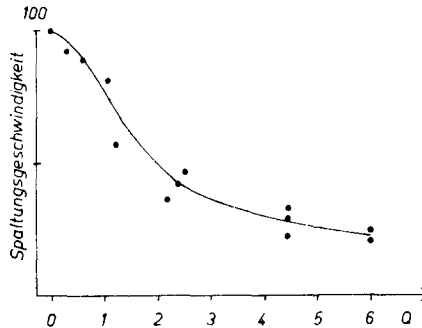


Fig. 1. Die Abhängigkeit der ATP-Spaltung durch Aktomyosinflocken von der Proportion des Grana-N zum Aktomyosin-N. Ordinate: Geschwindigkeit der Spaltung des ATP durch Aktomyosin, ungehemmte Spaltung = 100. Abszisse: Q-Werte = Grana-N · Aktomyosin N⁻¹ · 100. Mg⁺⁺ = ATP = Oxalat = $2.5 \cdot 10^{-3}$ M.

Auf isolierte extrahierte Fasern und Faserbündel wirken gereinigte Suspensionen der Grana in normalem Umfange nur in einem gewissen Prozentsatz der Versuche (in 8 von 26 Experimenten). (Über die häufige Wirkungslosigkeit der Grana allein vergl. auch die Arbeit von BRIGGS *et al.*³.)

Wie BRIGGS *et al.*³ gezeigt haben, wirken die Grana viel häufiger hemmend, wenn zu den Fasern ausser der Granasuspension auch der von den genannten Autoren entdeckte Cofaktor hinzugefügt wird. Wir erhalten mit Cofaktor Hemmung in 44 von 52 Experimenten.

Der Rest der Fasern (8 von 52) erschlafft selbst in Gegenwart von Grana und Cofaktor nicht. Er ist doppelt so lange gealtert wie die erschlaffungsfähigen Fasern (zwei Monate, davon einige Tage bei Zimmertemperatur).

Wenn die Granawirkung nicht an feinen Aktomyosinflockchen, sondern an kontraktile, wohlgeordneten Aktomyosinfäden nach PORTZEHL⁴ (16 Versuche) oder an ungeordneten, unter ATP schrumpfenden Fadenstückchen nach A. SZENT-GYÖRGYI⁵ (18 Versuche) geprüft wird, so zeigt sich, dass die Kontraktion und Schrumpfung weder durch Grana allein, noch durch Grana zusammen mit Cofaktor gehemmt wird.

Wenn die gereinigte Granasuspension von den extrahierten Fasern oder Faserbündeln entfernt wird, tritt in allen Fällen eine neue Kontraktion ein, in denen die Granasuspension allein vorher erschlaffend gewirkt hat. Unter diesen Bedingungen wird die Hemmung der Fasern durch die Granaentfernung ebenso beendet wie die Hemmung isolierter Fibrillen. Wenn dagegen eine Erschlaffung durch das Zusammen-

* Q = Grana-N · Fibrillen-N⁻¹ · 100.

wirken von Grana und Cofaktor hervorgerufen war, überdauert die Erschlaffung ganzer extrahierter Fasern die Entfernung der Grana in etwa 50 % der Experimente (20 von 38) und die Entfernung von Grana und Cofaktor in einer beträchtlichen Zahl von Experimenten (13 von 34).

Zusammenfassend sagen diese Beobachtungen folgendes: (a) Wenn die Diffusionswege innerhalb der geprüften Partikel lang sind (Fasern, Faserbündel, Bruchstücke von Aktomyosinfäden) fehlt die erschlaffende Wirkung der Grana oft (extrahierte Fasern) oder immer (Aktomyosinfäden und ihre Bruchstücke). (b) Auf der anderen Seite überdauert die Erschlaffung von Fasern und Faserbündel, die durch das System Grana und Cofaktor hervorgerufen ist, häufig die Entfernung der Grana und nicht selten sogar die Entfernung von Grana und Cofaktor.

I

Die Unzuverlässigkeit und das Fehlen der erschlaffenden Wirkung der Grana scheint nicht auf chemischen Verschiedenheiten zwischen den grob dispersen Partikeln (Aktomyosinfäden und Fasern) und den fein dispersen Partikeln (Aktomyosinflocken und Fibrillen) zu beruhen, sondern auf der verschiedenen Dispersität. Die ATP-Spaltung durch 100 μ dicke Gefrierschnitte von extrahierter Muskulatur wird nämlich durch gereinigte Granasuspensionen selbst dann nicht oder nur geringfügig beeinflusst, wenn die Proportion der Grana zu den Schnitten sehr hoch ist. Die Hemmung setzt dagegen sofort ein, wenn in der gleichen Lösung die gleichen Schnitte mechanisch in feine Teilchen zerlegt werden (Tabelle I). Ebenso wird aus der ungehemmten Kontraktion und Schrumpfung der geordneten Aktomyosinfäden nach PORTZEHL⁴ und der groben Fadenbruchstücke nach A. SZENT-GYÖRGYI⁵ volle Hemmung von Superpräzipitation und ATP-Spaltung, wenn aus der gleichen Aktomyosin-Lösung feine Flöckchen hergestellt werden (vergl. Tabelle III).

TABELLE I

ABHÄNGIGKEIT DER GRANAWIRKUNG AUF DIE AKTOMYOSIN-ATPASE
VOM DISPERSITÄTSGRAD DES EXTRAHIERTEN MUSKELGEWEBES

<i>Die ATP-Spaltung in Prozent der Spaltung ohne Grana</i>			
<i>Durch ganze Schnitte</i>		<i>Durch zerkleinerte Schnitte</i>	
<i>Ohne Grana</i>	<i>Mit Grana*</i>	<i>Ohne Grana</i>	<i>Mit Grana*</i>
100	100	100	52
100	100	100	38
100	80	—	—
100	78	—	—

* Q, \sim 10.

Man kann sogar die Schrumpfung 400 μ dicker Fadenbruchstücke nach SZENT-GYÖRGYI fast vollständig aufheben, wenn die Grana nicht in einer Suspension von aussen zugegeben werden, sondern bei der Herstellung der Fäden in die Grana eingelagert werden (Tabelle II)*. Eine eben erkennbare Anfangsschrumpfung der Faden-

* Granahaltige geordnete Fäden nach PORTZEHL⁴ konnten nicht hergestellt werden, weil die granahaltigen Fäden zu brüchig sind.

TABELLE II

DER EINFLUSS DER GRANA AUF DIE SCHRUMPUNG VERSCHIEDENER AKTOMYOSINPRÄPARATE

Art der Präparation Proteingehalt der Fäden: 0,5% Q = 10-20	Schrumpfung in Prozenten des Anfangsvolumens					
	Ohne Grana		Grana aussen		Grana innen	
	Ohne Cofaktor	Mit Cofaktor	Ohne Cofaktor	Mit Cofaktor	Ohne Cofaktor	Mit Cofaktor
Flocken	85	—	0 (12)*	—	—	—
Fäden: 2r = \sim 800 μ	85 (6)	85 (12)	85 (9)	85 (12)	60 (9)	60 (11)
Fäden: 2r = \sim 400 μ	85 (8)	85 (18)	85 (7)	85 (10)	20 (10)	20 (10)

* (..): Anzahl der Versuche.

bruchstücke nach SZENT-GYÖRGYI⁵ ist allerdings unvermeidbar, weil die Grana nur dann hemmen, wenn gleichzeitig genügend ATP zugegen ist. In dicken Fadenstücken nach SZENT-GYÖRGYI⁵ dauert es aber eine gewisse Zeit, bis die ATP-Konzentration im Inneren von Null auf den Betrag angestiegen ist, der für die Granahemmung notwendig ist. Der Betrag dieser Anfangsschrumpfung wächst mit der Diffusionszeit der ATP, d.h. mit der Dicke der Fadenbruchstücke (Tabelle II).

TABELLE III

DER EINFLUSS DER GRANA AUF DIE ATP-SPLATUNG VERSCHIEDENER AKTOMYOSINPRÄPARATE

Art der Präparation Proteingehalt der Fäden: 2-3% Q = 10-40	Geschwindigkeit der ATP-Spaltung $\mu\text{Mol P/mg Protein} \cdot \text{Min}$							
	Ohne Grana		Grana aussen		Grana innen			
	Ohne Cofaktor	Mit Cofaktor	Ohne Cofaktor	Mit Cofaktor	Ohne Cofaktor	Mit Cofaktor	Zusätzl. Grana aussen	
Flocken	0.40 (10)*	0.40 (5)	0.06 (12)	0.06 (12)	—	—	—	—
Fäden: 2r = 200 μ	0.36 (12)	0.36 (12)	0.15 (10)	0.15 (10)	0.15 (12)	0.13 (12)	0.10 (14)	0.08 (14)
Fäden: 2r = 600 μ	0.20 (10)	0.20 (6)	0.15 (10)	0.14 (8)	0.20 (10)	0.14 (6)	0.10 (12)	0.08 (6)

* (..): Anzahl der Versuche.

Tabelle III zeigt die Hemmung der ATP-Spaltung durch Aktomyosinflocken und ungeordnete Aktomyosinfäden unter dem Einfluss von Grana. Die ATP-Spaltung durch Aktomyosinflöckchen wird durch Grana genau so gehemmt, wie die Superpräzipitation der Flöckchen. Auch die ATP-Spaltung durch sehr dünne ungeordnete Fäden niedrigen Eiweissgehaltes (2-3 %) wird durch Grana "ausen" voll gehemmt. Wenn die Aktomyosinfäden dagegen sehr dick sind, lässt sich nicht entscheiden, wie weit die Grana die ATP-Spaltung hemmen. Denn dicke Fäden spalten auch in Abwesenheit von Grana so schlecht (Tabelle III, Reihe 3), dass eine weitere Herabsetzung der Spaltungsgeschwindigkeit durch Granaeinfluss nicht mehr sicher messbar ist. Diese geringe Spaltungsrate beruht darauf, dass die dicken Fäden dreimal so dick sind wie die Warburg-Meyerhofsche Grenzschichtdicke*. Infolgedessen wird ohne

* Die Grenzschichtdicke von Fäden mit einem Aktomyosingehalt von 2-3 % ist mit Hilfe der Diffusionskonstanten $D = 8 \cdot 10 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ berechnet. Diese Diffusionskonstante ergibt sich aus dem Vergleich der ATP-Spaltung von Flocken, dünnen Fäden und dicken Fäden, in Abwesenheit von Grana (vgl. TECHNISCHER TEIL).

Grana das ATP in den Randschichten ungehemmt und in den tieferen Schichten gar nicht oder kaum gespalten. Es ist deshalb zu erwarten: (a) Eine Spaltungshemmung durch Grana setzt die Spaltungsgeschwindigkeit in den Randschichten herab. Die Spaltungsgeschwindigkeit wird nicht null, weil die Grana die Aktomyosin-ATPase in die L-Myosin-ATPase verwandelt¹. (b) Infolge der Herabsetzung der Spaltung dringt das ATP tiefer in das Fadeninnere ein. (c) Dieses tiefer eindringende ATP wird in dem vorher ATP-freien Kern der Fäden doch noch gespalten. Denn die Spaltung von sehr verdünntem ATP wird durch Grana nicht gehemmt.

Die Abnahme der ATP-Spaltung in den Aussenschichten unter dem Einfluss der Grana wird infolgedessen durch eine ATP-Spaltung in den vorher ATP-freien Innenschichten mehr oder minder kompensiert.

Die Anwesenheit des Cofaktors erhöht den Einfluss der Grana auf die ATP-Spaltung durch gereinigte Flocken und Fäden ebensowenig wie die Hemmung von Superpräzipitation und Schrumpfung.

II

Eine Aufhebung der Granawirkung und nicht nur eine Verzögerung durch lange Diffusionswege ist zu erwarten, wenn die von den Grana abgegebene eigentliche Erschlaffungssubstanz labil ist¹. Denn dann sollte sie schon auf dem Diffusionswege zerstört werden. Es liegt dann nahe anzunehmen, dass der Cofaktor von GERGELY⁶ und BRIGGS³ die Granasuspensionen auch gegenüber extrahierten Fasern und Muskelschnitten deshalb wirksam macht, weil er die labile Erschlaffungssubstanz stabilisiert. Wenn diese Annahme richtig ist, sollte die Hemmung der ATP-Spaltung durch Fibrillen in Anwesenheit von Cofaktor die Entfernung der Grana überdauern. Das Ergebnis eines solchen Versuches ist von WEBER unter Hinweis auf diese Arbeit bereits 1958 in New York veröffentlicht worden^{7,8}. In der Cofaktor-freien Lösung hörte die Granawirkung mit der Granaentfernung auf, während bei dauernder Anwesenheit des Cofaktors die Hemmung durch die Grana die Granaentfernung für eine begrenzte, aber gut messbare Zeit überdauerte. Hieraus schloss WEBER, dass der Cofaktor die Lebensdauer der labilen Erschlaffungssubstanz verlängert.

Dieser Schluss hat aus drei Gründen viel von seiner Beweiskraft verloren.

1. Hat es sich bei einer grösseren Versuchszahl herausgestellt, dass die geschilderten Ergebnisse nur in 25 % der Versuche beobachtet werden. In den übrigen 75 % hört die Granawirkung in Anwesenheit und Abwesenheit des Cofaktor mit der Granaentfernung auf. Dieses Zahlenverhältnis weckt den Verdacht, dass in einigen Experimenten die Entfernung der Grana weniger vollständig war, als es geplant war.

2. Wenn der Cofaktor durch Stabilisierung auch das Innere grob disperser Partikel für die sonst labile Erschlaffungssubstanz zugänglich macht, müssen in Anwesenheit von Cofaktor und Grana nicht nur die extrahierten Fasern, sondern auch die Aktomyosinfäden gehemmt werden. Aktomyosinfäden genügender Dicke und ihre Bruchstücke aber werden durch Grana "aussen" weder in Anwesenheit noch in Abwesenheit von Cofaktor gehemmt (Tabelle III). Als genügend dick werden Fäden bezeichnet, in denen das Verhältnis des Durchmessers zur Grenzschichtdicke für ATP etwa 3-4:1 beträgt.

3. Die hemmende Wirkung einer "guten" Granasuspension auf die ATP-Spaltung durch Fibrillen wird durch die Anwesenheit von Cofaktor nicht erhöht. Die Hemmung

wird auch dann nicht erhöht, wenn die Proportion der "guten" Grana zu den Fibrillen so klein gewählt wird, dass mit und ohne Cofaktor nur eine unvollständige Hemmung eintritt. Die Hemmung müsste aber durch Akkumulation der Erschlaffungssubstanz erhöht werden, wenn die Lebensdauer der von den Grana gelieferten Erschlaffungssubstanz in Gegenwart des Cofaktors grösser ist als in seiner Abwesenheit (Fig. 2) (vergl. auch GERGELY *et al.*⁶).

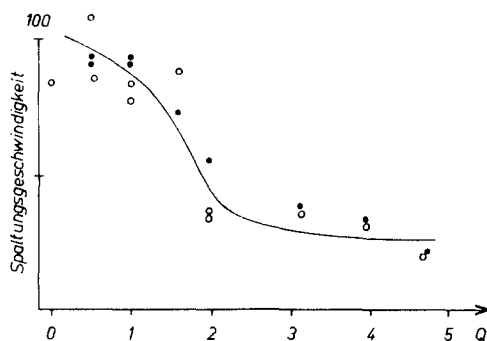


Fig. 2. Der fehlende Einfluss des Cofaktors auf die Hemmung der Fibrillen-ATPase durch ungeschädigte Grana. Ordinate: Geschwindigkeit der ATP-Spaltung durch Fibrillen in Prozenten der ungehemmten Spaltung. Abszisse: Q-Werte. Gefüllte Symbole: ohne Cofaktor. Offene Symbole: mit Cofaktor.

Aus allen diesen Gründen muss bezweifelt werden, dass eine Stabilisierung der Erschlaffungssubstanz durch den Cofaktor für die Wirkung des Faktors entscheidend ist.

Offenbar wird aber auch die Abgabe der Erschlaffungssubstanz seitens der Grana durch den Cofaktor von GERGELY⁶ und BRIGGS³ nicht aktiviert. Denn eine solche Aktivierung müsste sich (genauso wie eine Stabilisierung der labilen Erschlaffungssubstanz) in einer Erhöhung der hemmenden Wirkung der Grana auf die ATP-Verwertung durch Fibrillen bemerkbar machen. Dagegen haben GERGELY *et al.*⁶ die verminderte Wirkung geschädigter Grana fast vollständig restituiert, wenn sie der Grana-Fibrillen-Suspension Cofaktor zufügten.

Es liegt also auf Grund der Fibrillenversuche nahe anzunehmen, dass der Cofaktor weder stabilisierend auf die Erschlaffungssubstanz noch aktivierend auf normale Grana, aber reaktivierend auf geschädigte Grana wirkt.

III

Für das Zusammenspiel von Grana, labiler Erschlaffungssubstanz und Cofaktor gegenüber Wasser-Glycerin-extrahierten Faserbündeln scheint sich aus den Ergebnissen der letzten beiden Abschnitte folgendes Bild zu ergeben.

1. Die granaproduzierte labile Erschlaffungssubstanz ist anscheinend unfähig, im Inneren von Aktomyosinsystemen lange Diffusionswege zurückzulegen. Deshalb wirkt sie weder in Anwesenheit noch in Abwesenheit des Cofaktors auf granafreie Aktomyosinfäden, genügender Dicke.

2. In extrahierten Muskelfasern ist das Granasystem vorhanden. Dieses bodenständige Granasystem ist voll aktionsfähig, wenn die Fasern sehr frisch sind. Infolge-

dessen kontrahieren sich sehr frisch extrahierte Fasern in der Regel nur dann, wenn ausser dem ATP noch soviel Calcium zugesetzt wird, dass das bodenständige Granasystem durch dieses Calcium inaktiviert wird.

Wenn die Fasern sehr stark gealtert sind (\sim zwei Monate unter Einschaltung einiger Tage bei Zimmertemperatur), ist das bodenständige Granasystem in der Regel vollständig und irreversibel funktionsunfähig. In diesem Falle erschlaffen die Fasern ebenso wenig in einer Cofaktor-haltigen Granasuspension wie die Aktomyosinfäden*. Im mittleren Stadium der Alterung dürfte das bodenständige Granasystem in einem mehr oder minder reversiblen Zustand der Schädigung sein. In diesem Stadium werden die Fasern nicht selten durch die Granasuspension allein und sehr oft durch Grana und Cofaktor gehemmt.

Es liegt infolgedessen nahe, die Erschlaffung extrahierter Fasern mittleren Alters auf eine Reaktivierung des fasereigenen Granasystems zu beziehen. Denn (a) ist die Reaktivierung geschädigter Grana die einzige Wirkung des Cofaktors, die bisher nachgewiesen werden konnte⁶; (b) wird die Schrumpfung "granafreier" Aktomyosinfäden durch Zugabe von Grana und Cofaktor nicht gehemmt.

Da Fasern mittleren Alters aber nicht selten durch Grana allein gehemmt werden, müssen wir schliessen, dass auch die Grana eine Reaktivierungssubstanz abgeben, die ähnlich wie der ebenfalls reaktivierende Cofaktor in der Lage ist, tief in die Fasern bis zu den bodenständigen Grana vorzudringen. Es ist möglich, dass die labile Erschlaffungssubstanz und die vermutete reaktivierende Substanz von verschiedenen Fraktionen der Granasuspension abgegeben werden.

TECHNISCHER TEIL

Aktomyosin wurde nach PORTZEHL, SCHRAMM UND WEBER⁹ präpariert. Um ein konzentriertes Aktomyosin-Gel zu erhalten, wurde das dreimal umgefällte Aktomyosin bei einer Ionenstärke von 0.1μ durch Zentrifugieren ($40,000 \times g$, 30 Min) niedergeschlagen. Durch Zusatz von festem KCl wurde die Ionenstärke des 4–5 % Aktomyosin-Gel auf 1.0μ erhöht.

Die Grana-freien und die Grana-haltigen Aktomyosinfäden wurden aus Aktomyosin-Solen gleicher Aktomyosinkonzentration (2–3 %) hergestellt. Diese Aktomyosin-Sole wurden durch Zusatz von $0.1 M$ KCl, bzw. einer Granasuspension in $0.1 M$ KCl, zu dem 4–5 % Aktomyosin-Sol erhalten. Die Durchmischung des konzentrierten Aktomyosin-Sol mit der $0.1 M$ KCl-Lösung, bzw. mit der Granasuspension, erfolgte in einem Polyäthylen-Röhrchen, an dessen Innenwand ein langsam rotierende Plexiglasstab fest angepresst war. Die in das Sol eingeschlossenen Luftblasen wurden durch Zentrifugieren entfernt. Je 0.1 – 0.15 ml des Aktomyosin wurden mit Agla-Mikrometerspritzen, deren Glasspitzen zu Kapillaren (200μ und 600μ) ausgezogen waren, in die ATP-freien Spaltungsansätze gespritzt¹.

Zur Bestimmung der Spaltungsgeschwindigkeit wurde die Spaltung im ersten Ansatz 2 Min nach ATP-Zugabe und in einem zweiten Ansatz gleicher Zusammensetzung 7 Min oder 12 Min nach ATP-Zugabe durch Zusatz von 5 % TCA unter-

* Dass diese Resistenz sehr alter Fasern nicht auf einer Veränderung des eigentlich kontraktile Systems beruht, lässt sich durch Zusatz chemischer Interaktionsinhibitoren zeigen. Auf Zusatz der diffusiblen chemischen Interaktionsinhibitoren (Mg-EDTA, Polyäthylensulfonsäure) erschlaffen auch die sehr alten Fasern sofort.

brochen. Alle Spaltungsexperimente wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Neben der Spaltung des ATP durch die Fäden wurde in allen Experimenten auch die Spaltung des ATP durch feine Aktomyosinflocken geprüft, die durch mechanische Zerkleinerung der Grana-freien und Grana-haltigen Fäden erhalten wurden.

Phosphat wurde nach ROCKSTEIN UND HARRON¹⁰ bestimmt. In gesonderten Experimenten wurde der Durchmesser der Fäden vor und nach ATP-Einwirkung gemessen. Der Durchmesser der Fäden mit einem Proteingehalt von 2–3 % nimmt unter ATP-Einwirkung praktisch nicht ab.

Die lockeren Aktomyosinfäden nach SZENT-GYÖRGYI⁵ wurden aus 0.5 % Aktomyosinlösungen hergestellt. Ihre Schrumpfung wurde mit dem Mikroskop beobachtet.

Die geordneten Aktomyosinfäden, an denen Spannungsmessungen vorgenommen wurden, wurden nach PORTZEHL⁴ hergestellt. Die Spannungsentwicklung der geordneten Aktomyosinfäden und der extrahierten Psoasfasern wurde mit dem Dilatometer nach WEBER¹¹ gemessen.

Die Diffusionskonstante des ATP in den Aktomyosinfäden wurde mit Hilfe der Meyerhof-schen Formel¹² und der von HILL¹³ angegebenen Gleichung bestimmt.

Die 100 μ dicken Muskelschnitte wurden nach Extraktion der Faserbündel in 0.1 M KCl mit dem Gefriermikrotom hergestellt. Die Schnitte wurden mit grossem Volumen 0.1 M KCl-Lösung (pH 7.0 Histidinpuffer) wiederholt gewaschen. Zur Bestimmung der ATP-Spaltung wurden in einen 20-ml-Ansatz 5–10 Schnitte gegeben. Ein feinmaschiges Kunststoffsieb verhinderte, dass beim Herauspipettieren aliquoter Anteile des Ansatzes die Schnitte aus dem Spaltungsansatz mitentfernt wurden. In einer Reihe von Versuchen wurden nach Messung der Spaltungsaktivität der Schnitte diese Schnitte in dem gleichen Spaltungsansatz schnell mit dem Homogenisator zerkleinert und anschliessend die Spaltungsaktivität der zerkleinerten Schnitte bestimmt.

Zur Präparation der Grana und zur Messung der Geschwindigkeit der Spaltung des ATP durch Aktomyosinflocken und Fibrillen siehe die vorangegangene Mitteilung¹.

Proteinfreie Kofaktorlösungen werden durch 12–18-stündige Dialyse des Grana-Rohextraktes vor oder nach Entfernung der Grana gegen ein kleines Volumen einer Lösung von 0.1 M KCl hergestellt.

ANHANG

Werden die bodenständigen Grana, die in allen extrahierten Fasern vorhanden sind, durch Salyrgan* irreversibel vergiftet, so kontrahieren sich die Fasern noch völlig normal, sobald das Salyrgan ausgewaschen ist. Dieser kontrahierte Zustand lässt sich nun aber nicht mehr dadurch aufheben, dass hochwirksame Grana + Cofaktor dem Bad in derselben Konzentration zugesetzt werden, in der sie vor der Vergiftung voll wirksam waren (Fig. 3). Grana + Cofaktor im Bad wirken also auf extrahierte Fasern, deren eigene bodenständige Grana zerstört sind, genausowenig wie auf dicke Aktomyosinfäden, die keine bodenständigen Grana enthalten.

Damit sind durch direkten Beweis die Schlussfolgerungen unserer Arbeit bestätigt: (a) Das Erschlaffungssystem produziert eine Erschlaffungssubstanz, die in Fibrillen und Aktomyosinflocken die Interaktion zwischen Myosin und Aktin unmittelbar aufhebt. Diese Substanz vermag keine langen Diffusionswege zurück-

* Salyrgan = Mersalyl, Salicyl (α -hydroxymercuri- β -methoxypropyl) amidoacetat.

zulegen. (b) Das Erschlaffungssystem produziert Substanzen, die funktionsunfähige, aber noch nicht zu sehr geschädigte Grana in extrahierten Fasern reaktivieren, weil sie die dafür notwendigen langen Diffusionswege zurückzulegen vermögen.

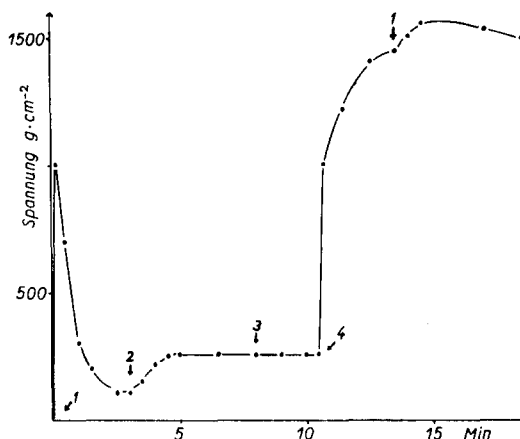


Fig. 3. Die Abhängigkeit der Erschlaffungswirkung des Systems Grana + Cofaktor "ausser" von der Reaktivierbarkeit der fasereigenen Grana. Ordinate: Spannung g/cm^2 . Abszisse: Zeit in Minuten. Die Versuchsbäder enthielten: 1. $\text{ATP} = \text{Mg}^{++} = \text{Oxalat} = 5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; Histidin, 0.01 M ; pH, 7.0; KCl, 0.05 M ; Granaprotein, 0.1% ; Cofaktor, 40% v/v. 2. Salyrgan, $2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; KCl, 0.1 M . 3. Cystein, $5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; KCl, 0.1 M ; pH, 7.0. 4. $\text{ATP} = \text{Mg}^{++} = \text{Oxalat} = 5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; Histidin, 0.01 M ; pH, 7.0; KCl, 0.05 M . Temperatur, 22° .

Wir danken Herrn Prof. Dr. H. H. WEBER für anregende Diskussionen, Frau H. VON GRAFF, Fräulein E. GEYRHÄLTER und Herrn K. J. KLETTI für die Hilfe bei den Experimenten.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Grana hemmen die ATP-Spaltung und die Superpräzipitation von Magnesium-aktivierten Einzelfibrillen, Aktomyosinflocken und sehr dünnen Aktomyosinfäden. Die Wirkung erlischt mit der Entfernung der Grana.

2. Extrahierte Einzelfasern werden von dem fasereigenen Granasystem vollständig gehemmt, wenn sie nur 1–2 Tage extrahiert sind. Solche frischen Fasern kontrahieren sofort auf Calciumzusatz.

3. Die Kontraktion etwas länger extrahierter Fasern kann nur in etwa 30 % der Fälle durch Zusatz von Grana aufgehoben werden. Auf Entfernung der Grana tritt eine neue Kontraktion ein.

4. Der Erfolg der Hemmung erhöht sich auf 100 %, wenn ausser den Grana auch GERGELYS Cofaktor hinzugefügt wird.

Wenn Grana und Cofaktor wieder entfernt werden, tritt nur in 60 % der Fälle eine neue Kontraktion ein.

5. Wenn die fasereigenen Grana im Innern der extrahierten Fasern durch Salyrgan oder sehr lange Extraktion irreversibel zerstört sind, lässt sich die Kontraktion auch durch Grana und Cofaktor nicht mehr hemmen. Ebenso ist die Schrumpfung dicker Aktomyosinfäden weder durch Grana noch durch Grana und Cofaktor hemmbar.

6. Wenn in Aktomyosinfäden einer Dicke, die die Schrumpfung der Fäden gegen Grana "aussen" resistent macht, Grana eingelagert werden, wird die Schrumpfung fast vollständig unterdrückt.

Die Resistenz dicker Mikrotomschnitte ($100\ \mu$) von extrahierten Faserbündeln gegen die Granahemmung der ATP-Spaltung verschwindet, sobald die Schnitte mit dem Homogenisator zerkleinert werden.

7. Alle Versuche mit Myosinpartikeln verschiedener Dispersität und die Versuche an Einzelfasern, deren fasereigene Grana zerstört sind, sprechen dafür, dass die Granawirkung ausbleibt, sobald die Diffusionswege für die Erschlaffungssubstanz lang werden. Dies ist ein neues Argument für die Annahme einer labilen Erschlaffungssubstanz.

8. Der Einfluss des Zusatzes von Grana + Cofaktor auf Fasern, deren eigenes Grana-System geschädigt, aber noch nicht irreversibel zerstört ist, spricht dafür, dass zugesetzte Grana und Cofaktor neben der Erschlaffungssubstanz auch Substanzen abgeben (Grana) oder sind (Cofaktor), die die fasereigenen Grana restituieren.

LITERATUR

- ¹ T. NAGAY, M. MAKINOSE UND W. HASSELBACH, *Biochim. Biophys. Acta*, 43 (1960) 223.
- ² H. MUELLER, *Biochim. Biophys. Acta*, 34 (1959) 93.
- ³ F. N. BRIGGS, G. KALDOR UND J. GERGELY, *Biochim. Biophys. Acta*, 34 (1959) 211.
- ⁴ H. PORTZEHL, *Z. Naturforsch.*, 7b (1952) 1.
- ⁵ A. SZENT-GYÖRGYI, *Studies Inst. Med. Chem. Univ. Szeged*, 1 (1942) 17.
- ⁶ J. GERGELY, G. KALDOR UND F. N. BRIGGS, *Biochim. Biophys. Acta*, 34 (1959) 218.
- ⁷ H. H. WEBER, *Symposium Mol. Biol.*, Acad. Press, New York, 1960, p. 25.
- ⁸ H. H. WEBER, *Ann. New York Acad. Sci.*, 81 (1959) 409.
- ⁹ H. PORTZEHL, G. SCHRAMM UND H. H. WEBER, *Z. Naturforsch.*, 5b (1950) 61.
- ¹⁰ M. ROCKSTEIN UND P. W. HARRON, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 1500.
- ¹¹ A. WEBER, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 214.
- ¹² O. MEYERHOF UND W. SCHULZ, *Arch. ges. Physiol. Pflüger's*, 217 (1927) 546.
- ¹³ A. V. HILL, *Proc. Roy. Soc., (London) B*, 104 (1929) 39.