

DIE HEMMUNG DER AKTIN-L-MYOSIN INTERAKTION IN LEBENDEN UND EXTRAHIERTEN MUSKELN DURCH UREA

M. BÁRÁNY*, K. BÁRÁNY* UND W. TRAUTWEIN

Max-Planck-Institut für Physiologie, Heidelberg und Physiologisches Institut der Universität,
Heidelberg (Deutschland)

(Eingegangen am 13. April, 1960)

SUMMARY

The inhibition of the actin-L-myosin interaction by urea

1. With increasing concentration, urea transforms actomyosin ATPase of washed myofibrils and of purified actomyosin gels into L-myosin ATPase. This transformation is completed as soon as the urea concentration has risen to about 1 M. This transformation is reversible.
2. Up to a urea concentration of 1 M the activity of L-myosin ATPase is not affected. The inefficacy of 1 M urea on the activity of L-myosin ATPase has been determined with L-myosin gels and L-myosin sols in the presence of Ca and Mg.
3. With a further increase in the urea concentration up to 2 M a slight inactivation of L-myosin ATPase takes place. This inactivation appears to be completely or to a large extent irreversible.
4. The action of acetamid is similar to that of urea. The interaction of actin and L-myosin, however, is not completely inhibited until acetamid reaches a concentration of 2 M, whereas L-myosin ATPase apparently begins to be impaired by acetamid when the concentration of acetamid exceeds 1 M.
5. Also the mechanical interaction of actin and L-myosin filaments is inhibited by 1 M urea in the presence of ATP. The ATP-contraction of extracted fibres is followed by relaxation on the addition of 1 M urea and the resistance to stretch falls to values similar to zero.
6. Living muscles in 1 M urea solutions no longer respond mechanically to electrical stimulation. This inhibition is fully reversible. The analogous inhibition by means of 1 M acetamid is incomplete. 2 M acetamid causes complete inhibition, which is only partially reversible.
7. Living muscles in 1 M urea solutions loose only a small amount of water, whereas urea rapidly penetrates into the interior of the fibre until complete equilibrium of the urea concentration has been reached.
8. 1 M urea within living muscle fibres does not affect the ATP turnover of resting living muscle. 1 M urea, however, strongly decreases ATP splitting if the living muscle is induced to an increased chemical and mechanical activity by contracture substances or other contracture producing factors.

* Jetzige Adresse: Institute for Muscle Disease, New York 21, N.Y., U.S.A.

9. The chemical and mechanical inhibition of muscular activity is not based on the effect of urea on the excitation of the membrane. Resting potential as well as action potential remain practically unchanged in the presence of 1 M urea.

10. All experimentally tested forms of muscle contracture (produced by eleven different contracture substances) are completely inhibited by 1 M urea. As far as was experimentally determined, this inhibition is reversible. This result is independent of whether the contractures are accompanied by a depolarization of the membranes or take place in depolarized muscles.

11. All experiments show that apparently in living muscle, too, the activity of urea attacks the last common link of the reaction chains which lead to contraction or contractures. This last common link is apparently the interaction between actin filaments, L-myosin filaments, and ATP.

EINLEITUNG

Es ist seit langem bekannt, dass die Kohäsionskräfte zwischen Aktin und L-Myosin auch bei niedrigen Ionenstärken verschwinden, wenn ATP anwesend ist, aber nicht gespalten wird. So sinkt der statische Dehnungswiderstand extrahierter Muskelfasern auf \sim Null, wenn in ATP-haltigen Lösungen die ATP-Spaltung durch Salyrgan vergiftet wird¹. In diesem Fall wird die ATP-Spaltung durch Vergiftung der L-Myosin-ATPase verhindert. Kürzlich wurde gezeigt, dass auch durch eine bestimmte Gruppe von Substanzen, die Interaktions-Inhibitoren, in Anwesenheit von ATP komplette Dissoziation der Aktin- und L-Myosin-Filamente in der extrahierten Muskelfaser erreicht werden kann, obwohl diese Interaktions-Inhibitoren die Aktivität der L-Myosin-ATPase überhaupt nicht beeinflussen². Zur Gruppe der Interaktions-Inhibitoren gehören außer dem Erschlaffungsfaktor³ eine Reihe Substanzen von bekannter chemischer Konstitution.

Die Interaktions-Inhibitoren eröffnen durch die eigenartige Spezifität ihrer Wirkung die Möglichkeit, den Mechanismus der Muskel- und Aktomyosinkontraktion in verfeinerter Weise zu analysieren. Denn die Kontraktion beruht offensichtlich auf der Interaktion zwischen Aktin- und L-Myosin-Filamenten^{4,5}. Es erscheint deshalb nützlich die Liste der chemisch bekannten Interaktions-Inhibitoren zu verlängern um zu sehen, welche chemische Eigenschaften allen Interaktions-Inhibitoren gemeinsam sind. Die bisher bekannten Interaktions-Inhibitoren sind teils Kationen, teils Anionen^{2,6}. Einige von ihnen tragen viele Ladungen (Polylysin, Protamin, Polyäthensulfonat, Fuadin, EDTA) andere tragen nur eine Ladung (SCN).

Es wird in dieser Arbeit gezeigt, dass auch Nicht-Elektrolyte als Interaktions-Inhibitoren wirken können.

Die interaktionshemmenden Nicht-Elektrolyte Urea und Acetamid sind außerdem so klein-molekular, dass sie auch in lebenden Muskeln eindringen. Infolgedessen kann gezeigt werden, dass diese Interaktions-Inhibitoren in lebenden Muskeln ebenso wirken wie in Aktomyosingelen, gewaschenen Fibrillen und Wasser-Glyzerin extrahierten Fasern.

I

Bei einer Ionenstärke von 0.08μ wird die ATP-Spaltung durch Mg aktivierte Aktomyosin-Systeme mit steigender Urea-Konzentration stark gehemmt (Fig. 1 und

2). Sowohl in natürlichen und künstlichen Aktomyosin-gele wie in gewaschenen Fibrillen beträgt die ATPase Aktivität in Anwesenheit von 1.0-1.5 M Urea nur noch zwischen 10-20 % der unbeeinflussten Aktivität. Das bedeutet, die ATPase-Aktivität ist unter 1.0-1.5 M Urea in allen Mg aktivierte Aktomyosin Systemen vom Wert der AAktomyosin-ATPase auf den Wert der L-Myosin-ATPase abgesunken (Fig. 1 Kurve 3 und 4, Fig. 2 Kurve 2). Bei weiterer Erhöhung der Urea-Konzentration sinkt die Spaltungsgeschwindigkeit des ATP deutlich aber nur unwesentlich noch weiter ab.

Dagegen beeinflusst die Anwesenheit von Urea die ATP-Spaltung durch Sole und Gele von reinem L-Myosin weder bei Ca-Aktivierung noch bei Mg-Aktivierung bis zu einer Urea-Konzentration grösser als 1 M (Fig. 3). Hierin verhält sich Urea

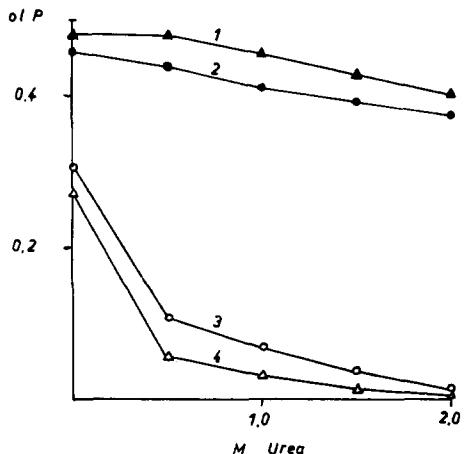


Fig. 1. Die ATP-Spaltung durch künstliches und natürliches Aktomyosin-gele unter dem Einfluss von Urea (pH, 7.0; Temperatur, 22°; μ , 0.08; $5 \cdot 10^{-3}$ M ATP). Abszisse: Molarität des Urea. Ordinate: Spaltungsgeschwindigkeit in $\mu\text{Mol}/\text{mg Eiweiss}/\text{min}$. ▲—▲, durch 10^{-2} M Ca-aktiviertes künstliches Aktomyosin-gele; ●—●, 10^{-2} M Ca-aktiviertes natürliches Aktomyosin-gele; ○—○, $5 \cdot 10^{-3}$ M Mg-aktiviertes natürliches Aktomyosin-gele; △—△, $5 \cdot 10^{-3}$ M Mg-aktiviertes künstliches Aktomyosin-gele.

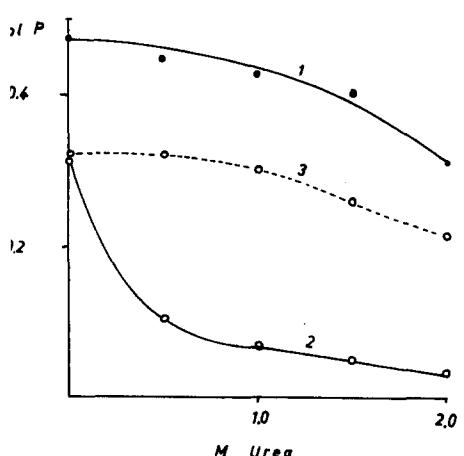


Fig. 2. Die ATP-Spaltung durch Fibrillen unter dem Einfluss von Urea. ●—●, 10^{-2} M Ca-Aktivierung; ○—○, $5 \cdot 10^{-3}$ M Mg-Aktivierung; ○ - - ○, $5 \cdot 10^{-3}$ M Mg-Aktivierung nach Auswaschen des Urea. Sonst wie Fig. 1.

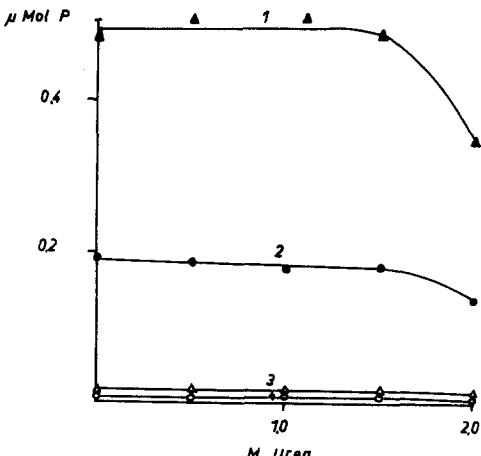


Fig. 3. Die ATP-Spaltung durch L-Myosin-gele ($\mu = 0.08$) und L-Myosin-Insol ($\mu = 0.56$) unter dem Einfluss von Urea. ▲—▲, 10^{-2} M Ca-aktiviertes L-Myosin-gele; ●—●, 10^{-2} M Ca-aktiviertes L-Myosin-Insol; △—△, $2.5 \cdot 10^{-3}$ M Mg-aktiviertes L-Myosin-gele; ○—○, $2.5 \cdot 10^{-3}$ M Mg-aktiviertes L-Myosin-Insol; $5 \cdot 10^{-3}$ M ATP bei Ca-Aktivierung; $2.5 \cdot 10^{-3}$ M ATP bei Mg-Aktivierung. Sonst wie Fig. 1.

wie alle anderen bisher untersuchten Interaktions-Inhibitoren, die frei von Nebenwirkungen sind (z.B. Erschlaffungsfaktor, Polyäthensulfonat, EDTA, Protamin). In noch höheren Konzentrationen ($\sim 2 M$) wird auch die Aktivität der L-Myosin

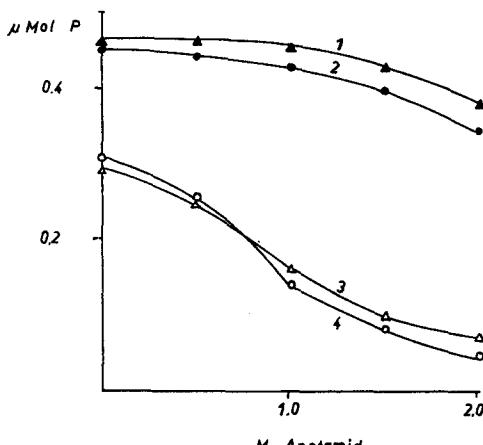


Fig. 4. Die ATP-Spaltung durch natürliches Aktomyosingel und Fibrillen unter dem Einfluss von Acetamid. Abszisse: Molarität des Acetamid. $\blacktriangle-\blacktriangle$, $10^{-2} M$ Ca-aktiviertes Aktomyosingel; $\bullet-\bullet$, $10^{-2} M$ Ca-aktivierte Fibrillen; $\triangle-\triangle$, $5 \cdot 10^{-3} M$ Mg-aktiviertes Aktomyosingel; $\circ-\circ$, $5 \cdot 10^{-3} M$ g-aktivierte Fibrillen. Sonst wie Fig. 1.

ATPase deutlich herabgesetzt (Fig. 3). In diesen höheren Konzentrationen des Urea wird die Hemmung der Interaktion durch eine Schädigung der L-Myosin-ATPase überlagert. Ähnliche Nebenwirkungen wurden auch mit zu hohen Konzentrationen bestimmter anderer Interaktions-Inhibitoren gefunden (z.B. Polyanetholsulfonat; siehe 6).

Bis zu einer Urea-Konzentration von $1 M$, das heisst im Bereich der reinen Interaktionshemmung, ist die Urea-Wirkung voll reversibel (vgl. Kurve 3 mit Kurve 2 der Fig. 2). In Gegenwart höherer Urea-Konzentrationen, dass heisst im Bereich der Schädigung der L-Myosin-ATPase ist die Urea-Wirkung auf Mg aktivierte Aktomyosin-Systeme nicht mehr voll reversibel (Kurve 3 der Fig. 2).

Die Ca-aktivierte ATP-Spaltung durch Aktomyosingel und Fibrillen wird durch Urea bis zu einer Konzentration ähnlich $1 M$ genau so wenig beeinflusst (Kurve 1 und 2 der Fig. 1 und Kurve 1 der Fig. 2) wie durch alle anderen untersuchten Interaktions-Inhibitoren⁶. Mit höheren Urea-Konzentrationen nimmt auch die Ca-aktivierte ATP-Spaltung durch Aktomyosin in ähnlichem Umfang ab wie die Ca-aktivierte ATP-Spaltung durch reine L-Myosin-Präparate (vgl. die Kurve 1 und 2 der Fig. 1, sowie Kurve 1 der Fig. 2 mit der Kurve 1 der Fig. 3).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass Urea bis zu einer Konzentration ähnlich $1.0 M$ ein Interaktions-Inhibitor ohne Nebenwirkungen ist, und dass bei einer Konzentration des Urea ähnlich $1 M$ die enzymatische Interaktion zwischen Aktin und L-Myosin vollständig gehemmt ist.

Auch Acetamid erniedrigt die ATP-Spaltung durch Mg-Aktivierte Fibrillen und Aktomyosinge auf ungefähr den Wert der L-Myosin-ATPase. Doch wird dieser Betrag der Hemmung, erst mit $2 M$ Acetamid erreicht (Kurven 3 und 4 der Fig. 4). Auf der anderen Seite wird die Ca-aktivierte ATP-Spaltung von Fibrillen und Akto-

myosingen durch 2 M Acetamid in ähnlichem Umfang herabgesetzt (Kurven 1 und 2 der Fig. 4), wie durch 2 M Urea. Der Acetamid-Einfluss auf reines L-Myosin ist nicht untersucht. Trotzdem sehen diese Beobachtungen so aus als wäre auch Acetamid ein Interaktions-Inhibitor, der schwächer wirkt als Urea, während die Nebenwirkungen etwa die gleichen sind. Infolgedessen wird durch 1 M Acetamid die Interaktion noch keineswegs vollständig aufgehoben, während unter 2 M Acetamid bereits deutliche Nebenwirkungen vorliegen. Zu dieser Annahme passt die Tatsache, dass die Wirkung einer 2 M Acetamidlösung nicht mehr voll reversibel ist (vgl. Abschnitt III).

II

Ebenso wie die enzymatische Interaktion wird auch die mechanische Interaktion zwischen den Aktinfilamenten und den L-Myosinfilamenten der extrahierten Psoasfasern in der gleichen Weise beeinflusst, wie durch die anderen bisher untersuchten Interaktions-Inhibitoren. Der hohe Dehnungswiderstand der starren Fasern wird durch 1 M Urea überhaupt nicht beeinflusst, aber durch Zusammenwirken von Urea und ATP auf Werte ähnlich Null herabgesetzt (Tabelle I). Die Nebenwirkungen

TABELLE I

DEHNUNGSWIDERSTAND VON EXTRAHIERTEN EINZELFASERN IN ANWESENHEIT VON UREA
 $\text{pH}, 7.0; 0.05\text{ M KCl}; 3 \cdot 10^{-3}\text{ M MgSO}_4$; Temperatur, 22° .

Ausgangslänge ($\frac{L}{L_0} \times 100$)	Staticher Dehnungswiderstand ($\text{g} \times \text{cm}^{-2} \times \text{L} \times \Delta\text{L}^{-1}$)		Zahl der Versuche
	Mit ATP $3 \cdot 10^{-4}\text{ M}$	Ohne ATP	
1 M Urea	50	$\sim 0^*$	4
1 M Urea	100	6,600 7,200	2
2 M Urea	100	$\sim 0^*$ 5,200 4,500	4
Ohne Urea	100	6,500	1

* Ein Dehnungswiderstand ähnlich Null ist kleiner als $150\text{ g} \times \text{cm}^{-2} \times \text{L} \times \Delta\text{L}^{-1}$. Für andere methodischen Einzelheiten, siehe TECHNISCHER TEIL.

höherer Urea-Konzentrationen (2 M) sind angedeutet in einer sehr geringfügigen Erniedrigung des Dehnungswiderstandes auch in Abwesenheit von ATP (vgl. Tabelle I).

Wenn eine extrahierte Psoasfaser durch $3 \cdot 10^{-3}\text{ M}$ ATP zur Kontraktion gebracht ist, führt der Austausch des ATP gegen 1 bis 2 M Urea (vgl. Fig. 5a und 5b) nicht zu einer wesentlichen Spannungsabnahme, weil Urea ohne ATP die Fasern nicht weich macht, sondern in kontrahiertem Zustand erstarren lässt. Auf Zusatz von $3 \cdot 10^{-3}\text{ M}$ ATP zu dem ureahaltigen Bad tritt dagegen sofort die rapide und vollständige Erschlaffung ein, die auf Grund des Absinkens des Dehnungswiderstandes auf Null zu erwarten ist (vgl. Fig. 5a und 5b). Diese Erschlaffung in Gegenwart von Urea ist ebenso reversibel, wie die Erschlaffung durch alle anderen Interaktions-Inhibitoren². Dass Urea allein eine kontrahierte Faser nicht oder kaum zur Erschlaffung bringt während Urea und ATP zusammen Erschlaffung hervorrufen ist zuerst

von BOZLER beobachtet worden⁷. Die hohe Wirksamkeit der Kombination von Urea und ATP ist außerdem von HOFFMANN-BERLING zur Verhinderung bestimmter Zellbewegungen in Glyzerin-extrahierten Zellen benutzt worden⁸.

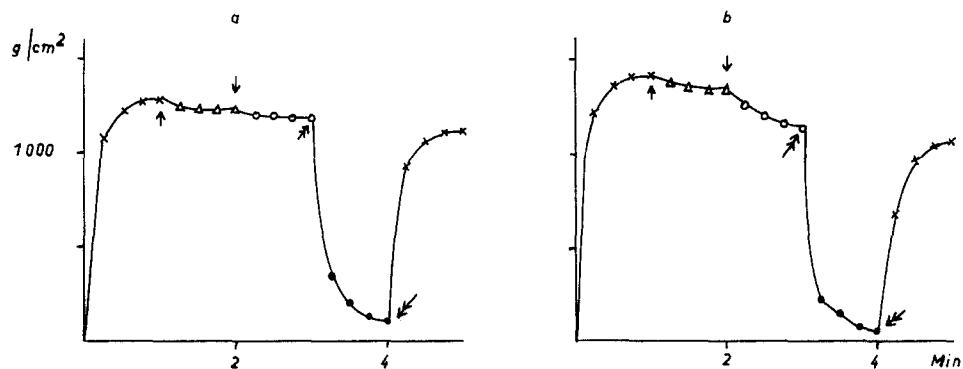


Fig. 5. Erschlaffung der kontrahierten Fasern durch Urea und ATP. ($3 \cdot 10^{-3} M$ $MgSO_4$; $5 \cdot 10^{-2} M$ KCl; $10^{-2} M$ PO_4 ; pH, 7.0; Zimmertemperatur; Anfangslänge = 33 % der Standardlänge; Faserdurchmesser: (a) = 40μ , (b) = 50μ). Abszisse: Zeit; Ordinate: Spannung. \times — \times , $3 \cdot 10^{-3} M$ ATP; ↑, Auswaschen des ATP; ↓, (a) 1 M Urea; (b) 2 M Urea; ↗, (a) 1 M Urea + $3 \cdot 10^{-3} M$ ATP; (b) 2 M Urea + $3 \cdot 10^{-3} M$ ATP; ↘, $3 \cdot 10^{-3} M$ ATP.

III

Werden lebende Muskeln in eine Ringer-Lösung gebracht, die außerdem eine 1 M Konzentration an Urea enthält, so dringt das Urea außerordentlich schnell in die einzelnen Muskelfasern ein (Tab. II). Infolgedessen wird das Konzentrationsgleichgewicht zwischen "außen" und "innen" in erster Linie durch Diffusion und nicht durch osmotischen Wasserentzug von Muskelwasser erreicht. Der osmotische Wasserverlust beschränkt sich auf die ersten Minuten der Urea-Anwesenheit, weil nur während dieser ersten Minuten der Konzentrationsgradient des Urea an der

TABELLE II

DIFFUSION UND WIRKUNG DES UREA IM LEBENDEN MUSKEL

Belastung der Muskeln: Sartorius 3 g; Rectus 7 g; Gastrocnemius 15 g. Erklärung siehe im Text
Methodische Einzelheiten siehe TECHNISCHER TEIL.

	Zeit in Minuten nach Zugabe des Urea (1)	Kontraktilität in % der Kontraktilität vor Zugabe des Urea (2)	im Gesamtvolumen des Muskels (3)	Molare Urea Konzentration				im Muskel (8)	
				im Wasser der Muskelfasern		Unterer Grenzwert (4)	Oberer Grenzwert (7)		
				Unkorrigiert (4)	Korrigiert (5)				
(1) Sartorius	1.5	7	0.38	0.40	0.43	0.49	0.51	0.91	
	7.0	0	0.69	0.90	0.98	0.90	0.96	0.89	
(2) Rectus	2.0	40	0.23	0.18	0.18	0.30	0.30	0.90	
	10.0	0	0.42	0.47	0.49	0.55	0.57	0.93	
(3) Gastrocnemius	5.0	78	0.15	0.04	0.04	0.19	0.19	0.92	
	30.0	0	0.39	0.43	0.43	0.51	0.51	0.88	

Membran steil ist. Mit dem Konzentrationsausgleich des Urea kehrt das Gewicht langsam wieder zum normalen Gewicht zurück. Der maximale Wasserverlust tritt bei kleinen Muskeln früher ein und ist grösser als bei grossen Muskeln, weil in sehr kleinen Muskeln die Oberfläche der einzelnen Fasern ziemlich unmittelbar mit der 1 M Urea-Lösung in Berührung kommt. Infolgedessen ist der Konzentrationsgradient des Urea an der Faseroberfläche und infolgedessen auch der osmotische Wasserverlust hier verhältnismässig gross. Auf der anderen Seite führt der steile Konzentrationsgradient zu einem schnellen Urea-Durchtritt durch die Membran und damit zu einem frühen Konzentrationsausgleich zwischen Faserinnern und Bad (vgl. Tab. II). In grossen Muskeln grenzt die Oberfläche der meisten Fasern an den extracellulären Raum, in den das Urea nur langsam hineindiffundiert und aus dem es gleichzeitig fortlaufend in die Fasern eindringt. Infolgedessen ist der Konzentrationsgradient an der Oberfläche der Mehrzahl der Fasern in dicken Muskeln viel kleiner. Dies führt zum verminderteren osmotischen Wasserverlust und zu einem langsameren Konzentrationsausgleich zwischen Faserinnerem und Bad. Infolgedessen verlieren sehr kleine Muskeln von 50 mg (Sartorien) in Maximum des Wasserverlustes etwa 30 % ihres Anfangsgewichtes, Muskeln von 140 mg (Recti) 20 % und Muskeln von 325 mg (Gastrocnemii) nur 10 % des Anfangsgewicht. Das Minimum des Muskelgewichtes (Maximum des Wasserverlustes) wird bei den 50 mg Muskeln nach 5 Min, bei den 140 mg Muskeln nach 10 Min, und den 325 mg Muskeln nach etwa 20 Min erreicht.

Durch einen 20 %igen osmotischen Wasserverlust wächst die Salzkonzentration im Innern der Fasern auf das 1.45fache, mit 10 %igem osmotischen Wasserverlust auf das 1.19fache, falls das "freie" Muskelwasser nach HILL⁹ zu 77 % und des auf den extracellulären Raum fallende Wasser nach CONWAY¹⁰ als 13 % des Muskelgewichtes angenommen wird. Da in dieser Arbeit für die Beobachtungen des Urea Einflusses auf lebende Muskeln, Sartorien und Recti, von einem Gewicht von über 100–500 mg verwendet werden, dürfte sich die Salzkonzentration "innen" aus osmotischen Gründen höchstens auf das 1.5fache und meist weniger erhöht haben. Diese Erhöhung der Salzkonzentration bleibt weit hinter den Salzkonzentrationen zurück, die in den Arbeiten von HILL¹¹, HOWARTH¹², HODGKIN UND HOROWICZ¹³ die maximale Spannung und maximale Arbeit der Muskelzuckung herabsetzen.

Die Wirkungen von Urea und Acetamid sind also offenbar direkte Folgen des Eindringens dieser Substanzen in die Muskelfaser und nicht Folgen der damit ver-

Fig. 6. Vergleich der Kontraktionshemmung eines Rectusmuskels (465 mg) mit Urea und Acetamid in Ringer-Lösung. Osmotischer Gewichtsverlust durch Urea oder Acetamid < 5 %. Abszisse: Zeit, Reizintervall 5 Sec. Ordinate: Hubhöhe bei Belastung mit 15 g. Zunächst Reizung in Ringer-Lösung, dann ↓, Austausch gegen 1 M Urea enthaltende Ringer-Lösung; ↑, Auswaschen des Urea mit Ringer; ↓↓, 1 M Acetamid in Ringer; ↑, Auswaschen des Acetamid; ↓↓↓, 2 M Acetamid in Ringer; ↑, Auswaschen des Acetamid.

bundenen Erhöhung der Salzkonzentration "innen". Hierfür spricht auch die Tatsache dass die Wirkungen von 1 M Acetamid und 1 M Urea sehr verschieden sind obwohl ihre osmotischen Wirkungen auf die Salzkonzentration "innen" völlig gleich sind (Fig. 6).

Die Urea-Konzentration innerhalb der Fasern kann berechnet werden aus der Urea-Konzentration, die im Gesamtvolumen des Muskels analytisch bestimmt ist (Spalte 3 der Tabelle II). Das Ergebnis der Berechnung hängt ab von dem Anteil des Urea-lösenden Wassers im Innern der Fibrille am Gesamtgewicht des Muskels, sowie von der Urea-Konzentration im extracellulären Wasser des Muskels und seinem Volumenanteil. Für die Urea-Konzentration im extracellulären Wasser wird einmal angenommen, sie sei der Konzentration im Wasser des Faserinnern gleich. Unter dieser Annahme ergibt sich der obere Grenzwert der Urea-Konzentration im Faserwasser. Für die Annahme des unteren Grenzwertes ist angenommen, dass die Urea-Konzentration in extracellulärem Wasser und im Muskelbad gleich sei. Der Volumenanteil des extracellulären Raums ist mit 0.13 des Muskelgewichtes angesetzt¹⁰. Dann ergeben sich die Werte, die in Tabelle II als unterer und oberer Grenzwert "unkorrigiert" (Spalte 4 und 6) aufgeführt sind, falls der Anteil des Urea lösenden Muskelwassers (intracellulär + extracellulär) nach HILL mit 0.77 angesetzt wird⁹.

Bei dieser Berechnungsart ist nicht berücksichtigt, dass der Anteil des extracellulären Raumes und des von Eiweiss erfüllten "Nichtlösenden Raumes" am Gesamtmuskel unter Urea vergrössert ist, weil das intracelluläre Wasser und damit auch der Gesamtmuskel durch osmotische Schrumpfung abgenommen haben, während das extracelluläre Wasser und der "Nichtlösende Raum" bei osmotischer Schrumpfung unverändert bleiben. Wenn die durch osmotische Schrumpfung hervorgerufenen Änderungen im Verhältnis des intracellulären Wassers zum extracellulären Wasser und zum "Nichtlösenden Raum" in Rechnung gestellt werden (siehe TECHNISCHER TEIL), ergeben sich die Werte unterer und oberer Grenzwert "korrigiert" (Spalten 5 und 7 der Tabelle II). Die Werte aller vier Spalten unterscheiden sich nicht allzu stark; doch dürften die "korrigierten" Grenzwerte der Wahrheit näher kommen.

Die Ergebnisse zeigen, dass bereits nach 7 Min die Urea-Konzentration im Innern der Fasern eines Sartorius (von 100 mg) der Konzentration im Bad vollständig gleich ist (Versuch 1 der Tabelle II). Bereits nach 1.5 Min ist die Urea-Konzentration im Mittelwert aller Fasern etwa halb so hoch, wie die Konzentration im Bad (Versuch 1 der Tabelle II). Mit zunehmender Dicke der Muskeln (Musculus rectus, rund 230 mg und Musculus gastrocnemius, rund 470 mg) nimmt die Zeit bis zum Konzentrationsausgleich erheblich zu. Mit dem M.rectus (Versuch 2 der Tabelle) werden 10 Min benötigt und mit dem M.gastrocnemius (Versuch 3 der Tabelle) sogar 30 Min, bis die Innenkonzentration ungefähr auf 0.5 M Urea angestiegen ist. Die ausserordentlich starke Zunahme der Zeit, die für den Konzentrationsausgleich benötigt wird, mit der Dicke des Muskels zeigt, dass die Ausgleichszeit mehr durch die Länge des Diffusionsweges als durch die Verlangsamung der Diffusion während des Durchtritts durch die Muskelmembran bestimmt ist.

Die Wirkung des Urea auf die Kontraktion des lebenden Muskels ist gross; immer dann, wenn die Urea-Konzentration im Innern der Faser einen Wert $\sim 0.5\text{ M}$ erreicht hat, verschwindet die Kontraktion auf übermaximalen elektrischen Reiz vollständig (Tabelle II).

Das Verschwinden der Kontraktion ist zu erwarten, weil durch Urea-Konzentrationen zwischen 0.5 M und 1 M die Interaktion der Aktinfilamente und L-Myosinfilamente aufgehoben wird (vgl. Abschnitte I und II). Ebenso wie die Aufhebung der

Interaktion zwischen Aktin und L-Myosin ist auch die Kontraktionshemmung des lebenden Muskels, die durch 1 M Urea bewirkt wird, voll reversibel (Fig. 7).

Ebenso wie die Interaktion wird auch die Kontraktion des lebenden Muskels durch 1 M Acetamid nur unvollständig, dagegen durch 2 M Acetamid vollständig aufgehoben (Fig. 6). Die Hemmung der Vital-Kontraktion durch 2 M Acetamid ist nur noch teilweise reversibel. Dies passt zu der Tatsache, dass 2 M Acetamid zusätzlich zu der reversiblen Interaktionshemmung auch eine Schädigung der Ca-aktivierten ATPase herbeiführt (vgl. Abschnitt I).



Fig. 7. Reversible Kontraktionshemmung eines Sartoriusmuskels (153 mg) durch 1 M Urea in Ringer-Lösung. Abszisse: Zeit, Reizintervall 5 Sec. Ordinate: Hubhöhe bei Belastung mit 10 g. ↓, Austausch gegen eine 1 M Urea enthaltende Ringer-Lösung; ↑, Auswaschen des Urea mit Ringer-Lösung.

IV

Die Wirkung des Urea auf die Kontraktion ist auch im lebenden Muskel mit einer Hemmung der enzymatischen Interaktion zwischen Aktin- und L-Myosin-Filamenten verbunden. Kontrakturen des lebenden Muskels durch Chloroform, Avertin und Coffein führen bei Zimmertemperatur zu einer schnellen Abnahme der ATP-Konzentration (siehe z.B.¹⁴). Wird den fraglichen Lösungen aber 1 M Urea zugesetzt, so unterbleibt nicht nur die Kontraktur, sondern auch die Abnahme der ATP-Konzentration wird stark verlangsamt (Tabelle III).

Wenn dagegen der Muskel in Ruhe bleibt, wird der ATP-Spiegel durch die Anwesenheit von 1 M Urea nicht messbar beeinflusst (Tabelle IV). Ebensowenig

TABELLE III

EINFLUSS VON 1 M UREA AUF DIE MIT KONTRAKTUREN VERBUNDENE
ATP-SPALTUNG LEBENDER MUSKELN (*M. rectus*).

Zimmertemperatur; Kontrakturstoffe und Urea sind in Ringer, pH 7.0, gelöst; Belastung 25 g; Vorbehandlung der Muskeln ohne oder mit Urea 15 Min unter O₂-Durchperlung, Kontraktur ohne O₂-Durchperlung.

Durch	Kontraktur	Dauer in Minuten	Mechanische Arbeit in g × cm/g Muskel		ATP-Gehalt*	
			Ohne Urea	Mit Urea	in μMol/g Muskel	
			Ohne Urea	Mit Urea	Ohne Urea	Mit Urea
1) Chloroform gesättigt		5	29.7	0	0.86	1.52
2) Avertin 0.5 %		15	41.4	0	0.62	1.56
3) Coffein 0.3 %		30	50.0	0	0.19	1.28
4) Coffein 0.3 %		45	53.3	0	0.00	1.11

* Analysiert mit Säulenchromatographie, methodische Einzelheiten siehe TECHNISCHER TEIL.

wird die Einbaurate von [^{32}P] anorganischem Phosphat, das dem Muskelbad zugefügt ist, durch die Anwesenheit von Urea verändert. ATP isoliert vom Urea behandelten ruhenden Muskel gibt 5,890 Impulse/Min./ μMol und ATP vom Kontrollmuskel 5,760 Impulse (für Einzelheiten siehe TECHNISCHER TEIL). Auch der Gehalt des lebenden ruhenden Muskels an Spaltprodukten des ATP scheint in Gegenwart und Abwesenheit von Urea gleich zu sein (Tabelle IV).

TABELLE IV

NUCLEOTIDGEHALT IN UREAHALTIGEN UND UREAFREIEN RUHENDEN MUSKELN (M. RECTUS* UND M. SARTORIUS*)

Zimmertemperatur; 1 M Urea in Ringer gelöst.

Vorbehandlung der Muskeln 15 Min unter O_2 -Durchperlung	$\mu\text{Mol/g Muskel}$				
	ATP	ADP	AMP	IMP	Inosin
Mit Urea	2.13	0.69	0.30	0.27	0.88
Ohne Urea	2.09	0.70	0.26	0.30	0.84

* Die Rectus- und Sartorius-Muskeln werden zusammen papierchromatographisch analysiert, (methodische Einzelheiten, siehe TECHNISCHER TEIL). Rectus/Sartorius Gewichtsverhältnis rund 2.5. Der ATP-Gehalt der Rectusmuskeln ist geringer. Wir finden in zwei gesonderten Versuchen mit der Säulenchromatographie $\mu\text{Mol ATP/g Rectus}$:

	Ohne Urea	Mit Urea
(1)	1.49	1.67
(2)	1.43	1.38

TABELLE V

EINFLUSS VON 1 M UREA AUF DIE ATP-SPALTUNG NACH AUFTAUEN LEBEND GEFRORENER MUSKEL (M. RECTUS)

Nach dem Auftauen stehen die Muskeln 10 Min bei 0°. Erklärung siehe im Text. Analysiert mit Säulenchromatographie, methodische Einzelheiten, siehe TECHNISCHER TEIL.

Behandlung der Muskeln vor dem Gefrieren: O_2 -Durchperlung 15 Min bei 22°	$\mu\text{Mol/g Muskel}$					
	ATP	ADP	AMP	Adenosin	IMP	Inosin
Mit Urea	1.29	0.51	0.40	0.33	0.58	0.66
Ohne Urea	0.57	0.76	0.59	0.35	0.94	0.65

Wenn dagegen dem ruhenden ureahaltigen und ureafreien Muskel nach dem Gefrieren in flüssiger Luft Gelegenheit gegeben wird, wieder aufzutauen und vor der Analyse 10 Min bei 0° in aufgetautem Zustand zu bleiben, so ergibt sich ein ganz anderes Bild (Tabelle V). In dem ureafreien Muskel findet während dieser 10 Min der rapide ATP-Abbau statt, der die Taukontraktur gefrorener Muskel zu begleiten pflegt^{15,16}. Im Muskel der 1 M Urea enthält findet in der gleichen Zeit nur ein bescheidener ATP-Abbau statt. Vollständige Hemmung des Abbaus ist auch durch Urea nicht zu erwarten, weil dieser Interaktions-Inhibitor weder die L-Myosin-ATPase noch die Grana-ATPase inaktiviert.

V

Der lebende ureahaltige Muskel verhält sich chemisch und mechanisch genau so, wie es auf Grund der Reaktion zwischen Urea und den isolierten kontraktilen Strukturen zu erwarten ist. Die gleiche Hemmung der Kontraktion und der ATP-Spaltung müsste aber auch auftreten, wenn die Erregbarkeit der Muskelmembran durch Urea aufgehoben würde. Wie weit Letzteres der Fall ist, ergibt sich aus der Höhe des

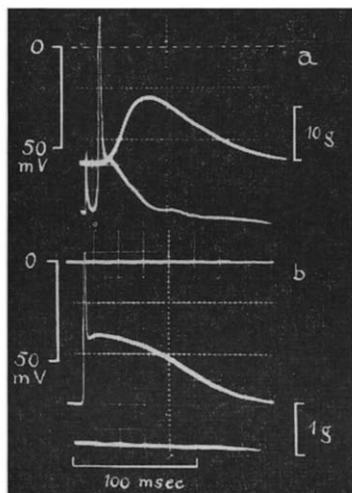


Fig. 8. Aktionspotential und Mechanogramm eines Sartoriusmuskels (a) in Ringer-Lösung (oberes Bild), (b) 5 Min in einer 1 M Urea enthaltenden Ringer-Lösung (unteres Bild). Abszisse: Zeit. Ordinate: links; mV des Membranpotentials, rechts; mechanische Spannung. Das Mechanogramm oben zeigt einen isometrischen Spannungsgipfel von etwa 12 g etwa 15 msec nach dem Reiz. Die Potentialkurve zeigt vor dem "spike" des Aktionspotentials eine kleine "spike"-ähnliche Zacke, die auf dem Einbruch des Reizstroms beruht. Im unteren Bild verläuft die Spannungskurve völlig parallel zur Abszisse auf einen Spannungswert ähnlich 0,1 g, der durch die Vorspannung des ruhenden Muskels gegeben ist. Die Amplitude der elektrischen Potentialkurve ist trotz des Fehlens einer mechanischen Antwort von normaler Grösse.

des Membranpotentials und Aktionspotentials. Beide Potentiale können gleichzeitig nur an Einzelfasern gemessen werden. Da die Kontraktion als maximale mechanische Spannung des Gesamtmuskels bestimmt wurde, wurden in jedem Zustand des Muskels die Membran- und Aktionspotentiale mehrerer Einzelfasern gemessen. Wenn nach 5 Min der Einwirkung von 1 M Urea der Ausschlag des Mechanogramms verschwunden ist, zeigt sich in der Höhe des Ruhepotentials und des "spike" keine wesentliche Änderung (vgl. Fig. 8a mit 8b). Nur das Ruhepotential ist um 5 mV erniedrigt*.

Dieser Befund zeigt, dass die Urea-Wirkung an dem lebenden Muskel nicht aus einer Änderung der Membran-Erregbarkeit erklärt werden kann.

Durch welche Mechanismen im lebenden Muskel die Erregung der Membran mit der Aktivierung des kontraktilen Systems verbunden ist, ist noch sehr wenig

* Über die elektrischen Folgen einer länger dauernden Urea Wirkung, sowie über gewisse Änderungen in der Geschwindigkeit der Repolarisation der Membran nach dem Reiz werden TRAUTWEIN UND GROSSE-SCHULTE in einer gesonderten Mitteilung berichten.

bekannt. Wie kompliziert die Situation ist, ergibt eine Betrachtung der Liste der kontrakturerzeugenden Substanzen. Unter den Kontrakturstoffen, die nicht in den Muskel eindringen, finden sich Stoffe, die ähnlich wie die physiologische Membranerregung, nur durch Depolarisierung polarisierter Muskelmembranen flüchtige Kontraktionen erzeugen; ferner finden sich Stoffe, die Dauerkontraktionen erzeugen mit oder ohne gleichzeitige Depolarisation der Membran; schliesslich finden sich Stoffe, wie Coffein, die auch an depolarisierten Membranen genau die gleiche Kontraktur hervorrufen, wie an polarisierten Membranen. In der Tabelle VI sind 11 solcher Kontrakturstoffe aufgeführt und gleichzeitig zeigt Tabelle VI, dass durch

TABELLE VI.

EINFLUSS VON 1 M UREA AUF MUSKELKONTRAKTIONEN

Zimmertemperatur; Kontrakturstoff und Urea sind in Ringer, pH 7.0, gelöst*; Belastung bei den Sartoriusmuskeln (110–160 mg) 7–10 g, bei den Rectusmuskeln (350–530 mg) 15–25 g; DAUER der Vorbehandlung ohne oder mit Urea: Sartorien 10 Min, Recti 15 Min; O₂-Durchperlung**.

Kontrakturstoffe und ihre Konzentrationen	Muskel	Mechanische Arbeit in g × cm/g Muskel und Einwirkungsdauer des Kontrakturstoffes		
		Ohne Urea	Mit Urea	Nach Auswaschen des Urea
Avertin*** 0.5 %	Sartorius	69.3 (5 Min)	0 (5 Min)	67.3 (10 Min)
Avertin*** 0.5 %	Rectus	66.0 (10 Min)	0 (10 Min)	63.4 (20 Min)
Chloroform gesättigt	Sartorius	38.0 (2 Min)	0 (2 Min)	39.1 (10 Min)
Chloroform gesättigt	Rectus	17.7 (2 Min)	0 (2 Min)	18.5 (10 Min)
Coffein 0.25 %	Sartorius	44.0 (2.5 Min)	0 (5 Min)	43.0 (15 Min)
Coffein 0.3 %	Rectus	67.7 (5 Min)	0 (5 Min)	65.3 (30 Min)
Coffein 0.3 % nach Depolarisierung mit KCl 0.76 % [§]	Rectus	54.1 (3 Min)	0 (3 Min)	57.9 (20 Min)
Acetylcholin 0.1 %	Rectus	25.6 (0.5 Min)	0 (5 Min)	
Cholin 1.0 %	Rectus	14.9 (1 Min)	0 (5 Min)	
KCl 0.76 %	Sartorius	33.1 (0.5 Min)	0 (5 Min)	
KCl 0.76 %	Rectus	22.6 (0.5 Min)	0 (5 Min)	
Nikotin 0.1 %	Sartorius	8.8 (1 Min)	0 (5 Min)	
Nikotin 0.1 %	Rectus	31.6 (2 Min)	0 (5 Min)	
Veratrin 0.2 %	Sartorius	8.6 (0.5 Min)	0 (5 Min)	
Veratrin 0.2 %	Rectus	24.0 (2 Min)	0 (8 Min)	
Monojodacetat 0.1 M	Sartorius	7.5 (30 Min)	0 (45 Min)	
Monojodacetamid 0.1 M	Sartorius	9.7 (30 Min)	0.2 (60 Min)	
Cetyltrimethylammoniumchlorid 1 %	Sartorius	7.8 (1 Min)	0 (10 Min)	
Saponin 1 %	Rectus	2.9 (2 Min)	0 (10 Min)	

* Mit der Ausnahme von KCl, welches ohne und mit Urea in Wasser gelöst ist.

** Mit der Ausnahme der Monojodacetat und Monojodacetamid-Versuche.

*** Tribromäthylalkohol.

§ Nach¹⁷.

1 M Urea alle diese Kontraktionen aufgehoben werden. Die Tabelle zeigt ferner, dass immer dann, wenn der Kontrakturstoff eine Dauerkontraktur macht, die durch Urea zunächst gehemmte Kontraktur nachgeholt wird, sobald das Urea ausgewaschen ist.

Das Urea macht offensichtlich einen Vorgang unmöglich, der allen Kontraktionen und allen Kontraktionen gemeinsam ist. In Anbetracht der Verschiedenheit der Wege, auf denen Kontraktionen und Kontraktionen ausgelöst werden, dürfte dieses gemein-

same Glied auch im lebenden Muskel das Endglied der Reaktionskette sein, die von der Membran zur Aktivität des kontraktilen Systems führt: die Interaktion zwischen Aktinfilamenten, L-Myosinfilamenten und ATP.

Die Gleichartigkeit der Urea-Wirkung auf den ATP-Mechanismus der Kontraktion im lebenden Muskel und in isolierten kontraktilen Systemen ist bedeutungsvoll. Diese Übereinstimmung ist ein starkes Argument dafür, dass der ATP-Mechanismus der Kontraktion auch ohne Urea im lebenden Muskel und in den kontraktilen Systemen gleich ist.

ANHANG

Die hemmende Wirkung von 1 M Urea-Lösung auf die Kontraktion lebender Froschmuskeln trotz annähernd normaler Aktions- und Ruhepotentiale findet ihr mechanisches und elektrisches Analogon in der Unterdrückung der mechanischen Antwort der Muskeln in 2.5-3fach konzentrierter Ringer-Lösung¹¹⁻¹³. Es lässt sich zusätzlich zeigen, dass auch die Coffein-, Chloroform- und Acetylcholinkontraktur in lebenden Muskeln unterdrückt wird, wenn die Ringer-Konzentration auf das 5fache des normalen Wertes erhöht wird. Auch in diesem Fall werden die Kontrakturen nachgeholt, wenn das störende Agent beseitigt wird, d.h. wenn der Muskel aus der Lösung der Kontraktursubstanz in 5fach Ringer in eine Lösung der Kontraktursubstanz in 1fach Ringer übertragen wird.

Es ist durch SZENT-GYÖRGYI seit langem bekannt, dass die Erhöhung der Salzkonzentration und damit der Ionenstärke in Gegenwart von ATP ebenso Dissoziation des Aktomyosins bewirkt¹⁸ wie die Anwesenheit von Interaktions-Inhibitoren bei niedriger Ionenstärke². Es ist infolgedessen nicht unwahrscheinlich, dass auch der Einfluss hoch konzentrierter Ringer-Lösung auf Hemmung der Interaktion von Aktin- und L-Myosin-Filamenten beruht. Die Vorstellung von HILL, die Wirkungen hoher Ringer-Konzentrationen hingen mit dem Zustand des Aktomyosins zusammen¹¹, gewinnt durch die vorgeschlagene Erklärung eine präzisere Form.

TECHNISCHER TEIL

Versuche mit Modell-Systemen

Die Herstellung des L-Myosins erfolgt nach PORTZEHLS, SCHRAMM UND WEBER¹⁹, des Aktins nach MOMMAERTS²⁰, des natürlichen Aktomyosins nach BÁRÁNY UND BÁRÁNY²¹, der Fibrillen nach ULBRECHT UND ULBRECHT²². Künstliches Aktomyosin wird von 3 Teilen L-Myosin und 1 Teil F-Aktin hergestellt.

Die Bestimmung der ATPase-Aktivität erfolgt mit 0.1 % Eiweiss, im Histidinpuffer pH 7.0, in Parallelansätzen. Vor Zugabe des ATP werden die Ansätze 5 Min lang mit Urea oder Acetamid magnetisch gerührt. Die Spaltungszeit dauert 3-10 Min. Es wird darauf geachtet, dass während dieser Zeit nicht mehr als 25 % des zugesetzten ATP gespalten werden. Das freigesetzte anorganische Phosphat wird nach ROCKSTEIN UND HERRON²³ gemessen.

Die Glyzerin-extrahierten Fasern aus dem *M. psoas* werden nach dem Verfahren von A. WEBER²⁴ hergestellt. Ihr Durchmesser wird mit dem Leitz-Objektiv U.M 3 20 × gemessen. Die Messung der Spannungsentwicklung und des Dehnungswiderstandes erfolgt mit dem von A. WEBER²⁴ angegebenen Tensiometer. Der Dehnungswiderstand wird durch Dehnung um 10 % der Ausgangslänge und Ablesung nach 2 Min

bestimmt. Für die Messung des Dehnungswiderstandes in Anwesenheit von ATP werden Urea und ATP gleichzeitig hinzugefügt. Mit 1 M Urea und $3 \cdot 10^{-3}$ M ATP tritt eine kurze Anfangskontraktion auf (vgl. 2) deshalb erfolgt die Dehnung erst nach Beendigung der Anfangskontraktion. Die Messung ohne ATP erfolgt mit einer frischen Wasser-Glyzerin extrahierten Faser in einem neuen Bad, das nur Urea enthält.

Versuche mit lebenden Muskeln

Die meisten Experimente wurden an Muskelpaaren von *Rana esculenta*, einige auch von *Rana temporaria* zwischen November und Dezember durchgeführt. Die isolierten Muskeln werden an den isotonischen Hebel gespannt und die Ringer-Lösung 15 Min vor dem Anfang und während der Versuche mit O₂ durchperlt. Die Ringer-Lösung enthält: (mM) NaCl, 115.5; KCl, 2.5; CaCl₂, 1.8 (siehe 25) und wird vor Gebrauch mit 0.5 mM Natrium Phosphat, pH 7.0, gepuffert. Urea und Acetamid (puriss. Präparate der Fa. Merck) werden in Ringer-Lösung angewendet, ihre Stammlösungen auf pH 7.0 eingestellt. Die Muskeln werden direkt mit einer Kammelektrode durch Kondensatorentladung übermaximal gereizt. (Ein Kondensator von 0.5 μF wird auf 60 V aufgeladen und in 5 Sec Zeitabständen über den Muskel entladen.) Der Reizstrom wird durch eine Kontaktuhr mit Hg-Schalter gesteuert. Die Muskelzuckungen werden an einem Russkymographion registriert. Die Vergrößerung des Hebels ist rund 12fach. Das Volumen des Muskelbades 25 cm³. Sämtliche Experimente wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt. Die Belastung der Muskeln ist in den Legenden und Tabellen angegeben.

Zu den elektrophysiologischen Versuchen werden Sartoriusmuskeln in einer Plexiglaskammer (Volumen 10 cm³) angewendet. Durch die Kammer zirkuliert eine mit 95 % O₂ und 5 % CO₂ gesättigte Ringer-Lösung bei Zimmertemperatur mit einer Geschwindigkeit von 10 cm³/Min. Die mechanische Spannung wird mit einem Transducer (RCA 5734) gemessen. Die Ruhe- und Aktionspotentiale einzelner Fasern werden mit Glaskapillarelektroden von LING UND GERARD abgeleitet²⁶. Die Verstärkung erfolgt mit Kathodenfolger und Tektronix Oszillograph. Die Elektroden werden mit 3 M KCl gefüllt, ihr Widerstand liegt zwischen 10 und 30 M Ω, ihr Spitzendurchmesser < 0.5 μ. Der Muskel wird im Bad in rechteckigen Spannungsstößen (Grass Stimulator mit Isolation Unit) gereizt. Die Reizelektroden sind zwei bis auf die Spitze isolierte Platindrähte, die an den beiden Muskelrändern liegen.

Bestimmung der Urea-Konzentration in den Muskeln

Die Muskeln werden aus dem ureaenthaltenden Bad herausgenommen, mit Filterpapier abgetupft, auf der analytischen Wage gewogen, mit 4 % Trichloressigsäure geblendet. Der Muskelextrakt wird durch Zentrifugieren isoliert, neutralisiert und ein bestimmter Teil davon in Gegenwart von 0.05 M PO₄, pH 7.0, mit 30 mg Urease (Präparat der Fa. Schuchardt) gemischt. Die Spaltung des Urea erfolgt bei 25°; das freigesetzte NH₃ wird mit Nessler-Reagenz bestimmt. Gleichzeitig wird die Urea-Konzentration im Inkubationsbad gemessen. (Kontrollmuskeln, die mit Urea nicht behandelt sind, besitzen einen NH₃-Gehalt von 0.002 M. Der NH₃-Gehalt der Reagenzien ist praktisch Null.)

Die Berechnung der Urea-Konzentration des Wassers im innern der Muskelfasern

Die Urea Analyse bezieht sich auf 1 g Muskel nach der in Tabelle II ange-

gegebenen Zeit der Inkubation im Urea-Bad (Spalte 3 der Tabelle). Für die Berechnung der Urea-Konzentration im freien Wasser des Faserinnern muss bekannt sein (a) der extracelluläre Raum im Muskel, (b) der Anteil des freien Wassers im Muskelgewicht. Der extracelluläre Raum ist nach CONWAY¹⁰ für den normalen Muskel des Frosches zu 0.13 des Muskelgewichtes angenommen. Das freie Wasser ist nach HILL⁹ zu 0.77 des Muskelgewichtes angenommen. Beide Werte werden für die Berechnung der unkorrigierten Urea-Konzentrationen verwendet. Für die Berechnung des oberen Grenzwertes im Wasser der Muskelfasern (im Intracellulärtraum) wird angenommen, dass die Urea-Konzentration im Intra- und Extracellulärtraum des Muskels gleich ist. Der unkorrigierte obere Grenzwert (Spalte 6 der Tabelle II) ist demnach gleich mit der Urea-Konzentration im freien Muskelwasser ($[U]_W$):

$$[U]_W = \frac{[U]_g \text{ Muskel}}{0.77} \quad (1)$$

wobei $[U]_g$ Muskel = Urea-Konzentration in 1 g des Muskels. Für die Berechnung des unkorrigierten unteren Grenzwertes (Spalte 4) wird angenommen, dass die Urea-Konzentration im Extracellulärtraum ($[U]_E$) gleich der Konzentration im Bad ($[U]_B$) ist.

Für den Anteil des Extracellulärtraumes am freien Muskelwasser (A_E) gilt folgende Beziehung:

$$A_E = \frac{0.13}{0.77} = 0.17 \quad (2)$$

und für den Anteil des Intracellulärtraums am Muskelwasser (A_I):

$$A_I = 1 - 0.17 = 0.83 \quad (3)$$

Die Urea-Konzentration im freien Muskelwasser ist gleich:

$$[U]_W = 0.17 \times [U]_E + 0.83 \times [U]_I \quad (4)$$

wobei $[U]_I$ = Urea-Konzentration im Intracellulärtraum des Muskels.

Nach Anwendung von $[U]_E = [U]_B$ ergibt sich die Urea-Konzentration im Intracellulärtraum oder der unkorrigierte untere Grenzwert:

$$[U]_I = \frac{[U]_W - 0.17 \times [U]_B}{0.83} \quad (5)$$

Für die Berechnung der korrigierten Urea-Konzentration im freien Wasser des Faserinnern wird berücksichtigt, dass das Muskelgewicht durch osmotischen Wasserverzug in Urea-Lösungen abnimmt. Es wird angenommen, dass dieser Wasserverlust nur den Intracellulärtraum und nicht den Extracellulärtraum betrifft. Der Anteil des freien Muskelwassers am Muskelgewicht (A_W) im Falle eines Gewichtsverlustes (ΔG) wird aus der Formel berechnet:

$$A_W = \frac{77 - \Delta G}{23 + (77 - \Delta G)} \quad (6)$$

ΔG wird aus Eichkurven entnommen, die ΔG in Abhängigkeit von der Verweildauer in der Urea-Lösung einerseits und dem Anfangsgewicht des Muskels andererseits

angeben). Für den Anteil des Extracellulärraums am freien Wasser des osmotischen geschrumpften Muskels (A_E, o) gilt folgende Beziehung:

$$A_{E,o} = \frac{0.13}{A_w} \quad (7)$$

und für den Anteil des Intracellulärraumes am freien Wasser des osmotischen geschrumpften Muskels (A_I, o):

$$A_{I,o} = 1 - A_{E,o} \quad (8)$$

Weiterhin erfolgt die Berechnung der korrigierten Grenzwerte analog der Berechnung der unkorrigierten Grenzwerte. Der korrigierte obere Grenzwert (Spalte 7 der Tabelle II) ist demnach:

$$[U]_{w,o} = \frac{[U]_g \text{ osm. Muskel}}{A_w} \quad (9)$$

wobei $[U]_{w,o}$ = Urea-Konzentration im freien Wasser des osmotischen geschrumpften Muskels; $[U]_g$ osm. Muskel = Urea-Konzentration in 1 g des osmotischen geschrumpften Muskels; und für A_w ist der Wert einzusetzen der sich aus (6) ergeben hat.

Der korrigierte untere Grenzwert (Spalte 5) ist gleich:

$$[U]_{I,o} = \frac{[U]_{w,o} - A_{E,o} \times [U]_B}{A_{I,o}} \quad (10)$$

wobei $[U]_{I,o}$ = Urea-Konzentration im Intracellulärraum des osmotischen geschrumpften Muskels; $[U]_B$ = Urea-Konzentration im Muskelbad; und für $[U]_{w,o}$, $A_{E,o}$ und $A_{I,o}$ sind die Werte einzusetzen, die sich aus (9), (7) und (8) ergeben haben.

Bestimmung des Nukleotidgehaltes in den Muskeln

Vor Beginn des Versuches werden die Muskeln gewogen und nach Beendigung des Versuches mit flüssiger Luft zerrieben. Bei 0° wird das Pulver mit 4 %iger HClO_4 geblendet, abzentrifugiert, neutralisiert und der Kaliumperchloratniederschlag entfernt.

Wenn die Analyse papierchromatographisch erfolgt, werden die Überstände gefriergetrocknet, in minimalen Mengen von Wasser gelöst, und ein bestimmter Teil davon nach dem Verfahren von KREBS UND HEMS papierchromatographiert²⁷. Nach rund 60 Stunden Laufzeit bei Zimmertemperatur ist die Trennung vollständig, die Chromatogramme werden bei 260 m μ photographiert und die Nukleotidflecke nach der Lokalisierung eluiert. Die Identifizierung der Nukleotide erfolgt durch Testsubstanzen einerseits und andererseits spektrophotometrisch bei 250; 260; 280 und 300 m μ . Zur Bestimmung der Nukleotid-Konzentration werden die folgenden molaren Absorptionskoeffizienten benutzt: bei 260 m μ Adenosin-Derivate $14.2 \cdot 10^3$, Inosin-Derivate $7.15 \cdot 10^3$.

Wenn die Analyse säulenchromatographisch erfolgt, werden die Muskelextrakte nach Entfernung des Kaliumperchloratniederschlages alkalisiert (pH 10–11) und auf Dowex X 10 Ionenaustauscher (Durchmesser der Säule 0.5 cm, Höhe 4.0 cm) aufgetragen. Es werden Nukleotidmengen zwischen 2.5–3.0 μMol adsorbiert.

Bei der Analyse der Nukleotidverteilung werden folgende Lösungsmittel angewendet (modifiziert nach²⁸): (a) 0.01 M (NH₄)Cl, eluiert: Adenosin + Inosin; (b) 0.003 M HCl, eluiert: AMP; (c) 0.006 M HCl + 0.005 M NaCl, eluiert: IMP; (d) 0.006 M HCl + 0.01 M NaCl, eluiert: IMP + ADP; (e) 0.01 M HCl + 0.02 M NaCl, eluiert: ADP; (f) 0.01 M HCl + 0.2 M NaCl, eluiert: ATP.

In einer Stunde laufen 40 ml Lösungsmittel durch die Säule. Die Elution mit demselben Lösungsmittel wird solange fortgesetzt, bis die Absorption bei 260 m μ weniger als 0.02 ist. Die Konzentrationen der verschiedenen Fraktionen werden spektrophotometrisch bestimmt, bei den Wellenlängen 250; 260; 265 m μ . Die Adenosin- und Inosin-Gemische werden nach BENDALL analysiert²⁹.

Wenn aus den Nukleotiden nur die Menge an ATP bestimmt wird, werden sämtliche anderen Nukleotide aus der Dowex-Säule gleich mit 0.01 M HCl + 0.02 M NaCl entfernt.

ATP-Resynthese von radioaktivem Orthophosphat

Die isolierten M. recti werden 15 Min bei einer Belastung von 10 g in sauerstoffdurchperlte Phosphat-Ringer-Lösung gebracht ($7 \cdot 10^{-3}$ M PO₄, pH 7.0). Dann wird diese Lösung gegen 20 ml einer identisch zusammengesetzten Phosphat-Ringer-Lösung ausgetauscht, die zusätzlich 20 μ C ³²P/ml und in einem Falle auch 1.0 M Urea enthält. Nach weiteren 15 Min werden die Muskeln aus dem Bad herausgenommen, in 250 ml Phosphat-Ringer-Lösung 2 Min gewaschen um das extracelluläre ³²P möglichst zu entfernen. Die Muskeln werden dann mit flüssiger Luft pulverisiert, mit 4 % HClO₄ bei 0° geblendet und die Extrakte auf die Dowex-Säule adsorbiert, wie schon früher beschrieben. Die ATP-Fraktion wird ebenfalls mit 0.01 M HCl + 0.2 M NaCl eluiert, und die Konzentration spektrophotometrisch bestimmt. Je 0.5 μ Mol aus dem isolierten ATP werden auf 50 mg Aktivkohle adsorbiert, und 0.1 ml Triton X zu der Suspension zugegeben. Die Kohle wird in der Zentrifuge (bei 25,000 \times g) in Gegenwart von Triton einmal mit 5 % Trichloressigsäure, zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und schliesslich mit 96 %igem Alkohol in kleine Petrischalen quantitativ übergespült. Nach Verdunsten des Alkohols bei 80° wird die Radioaktivität des ATP an der trockenen Kohle bestimmt (nach 30). Es werden 3 mal 3,000 Stösse gezählt und der Leerwert berücksichtigt.

DANK

Wir sind verpflichtet, Herrn Professor H. H. WEBER für wertvolle Ratschläge und Diskussionen zu danken.

Wir danken Fräulein R. MÜLLER, Frau E. ARNOLD und Herrn GROSSE-SCHULTE für fleissige und gewissenhafte Mitarbeit, Herrn W. HEINEMANN für die Zusammenstellung des Reizgerätes und für seine Unterstützung bei dieser Arbeit.

ZUSAMMENFASSUNG

I. Urea verwandelt mit steigender Konzentration die Aktomyosin-ATPase von ausgewaschenen Fibrillen und gereinigten Aktomyosingelen in L-Myosin-ATPase. Diese Umwandlung ist abgeschlossen sobald die Urea-Konzentration auf etwa 1 M angestiegen ist. Diese Umwandlung ist reversibel.

2. Bis zur Urea-Konzentration von $1 M$ wird die Aktivität der L-Myosin-ATPase nicht beeinflusst. Die Wirkungslosigkeit von $1 M$ Urea auf die Aktivität der L-Myosin-ATPase ist gemessen an L-Myosingenen und L-Myosinsolen unter Ca und unter Mg.

3. Mit weiterem Anwachsen der Urea-Konzentration bis $2 M$ tritt auch eine geringfügige Inaktivierung der L-Myosin-ATPase ein. Diese scheint nicht oder nicht voll reversibel zu sein.

4. Acetamid wirkt sehr ähnlich wie Urea. Doch ist die Interaktion von Aktin un L-Myosin erst mit $2 M$ Acetamid völlig aufgehoben, während die Schädigung der L-Myosin-ATPase durch Acetamid bereits mit Überschreitung der $1 M$ Konzentration einzusetzen scheint.

5. Auch die mechanische Interaktion der Aktin- und L-Myosin-Filamente wird durch $1 M$ Urea in Gegenwart von ATP aufgehoben. Der ATP-Kontraktion extrahierter Fasern folgt beim Zusatz von $1 M$ Urea eine Erschlaffung. Der Dehnungswiderstand sinkt dabei auf Werte ähnlich Null.

6. Lebende Muskeln antworten in Bädern mit einem Gehalt von $1 M$ Urea nicht mehr auf elektrische Reizung. Diese Hemmung ist voll reversibel. Die analoge Hemmung durch $1 M$ Acetamid ist dagegen unvollständig. $2 M$ Acetamid bewirkt vollständige Hemmung, die aber nur teilweise reversibel ist.

7. Die lebenden Muskeln verlieren in $1 M$ Urea-Bädern nur wenig Wasser, dagegen dringt das Urea schnell bis zum völligen Konzentrationsausgleich in das Faserinnere ein.

8. $1 M$ Urea im Inneren lebender Muskelfasern beeinflusst den ATP-Umsatz des ruhenden lebenden Muskels nicht. Dagegen setzt $1 M$ Urea die ATP-Spaltung stark herab, wenn der lebende Muskel durch Kontrakturstoffe oder durch andere kontrakturerzeugende Faktoren zu erhöhter chemischer und mechanischer Aktivität veranlasst wird.

9. Die chemische und mechanische Hemmung der Muskelaktivität beruht nicht auf einem Urea-Einfluss auf die Membranerregung. Ruhepotential und Aktionspotential bleiben unter $1 M$ Urea praktisch unverändert.

10. Alle untersuchten Arten der Muskelkontraktur (durch 11 verschiedene Kontrakturstoffe) werden durch $1 M$ Urea vollständig und, soweit untersucht, auch reversibel gehemmt. Dieser Erfolg ist davon unabhängig, ob die Kontraktionen unter Depolarisierung polarisierter Membranen stattfinden oder aber auch an depolarisierten Muskeln ausgelöst werden können.

11. Die Gesamtheit der Versuche zeigt, dass die Urea-Wirkung auch im lebenden Muskeln anscheinend an dem letzten gemeinsamen Endglied der Reaktionsketten angreift, die zur Kontraktion oder Kontraktionen führen. Dieses letzte gemeinsame Endglied ist offenbar die Interaktion zwischen Aktinfilamenten, L-Myosinfilamenten und ATP.

LITERATUR

- ¹ H. PORTZELH, *Z. Naturforsch.*, 7b (1952) 1.
- ² M. BÁRÁNY UND F. JAISLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 1 (1960) 192.
- ³ T. NAGAI, M. MAKINOSE UND W. HASSELBACH, *Biochim. Biophys. Acta*, 43 (1950) 223.
- ⁴ J. HANSON UND H. E. HUXLEY, *Symposia Soc. Exptl. Biol.*, 9 (1955) 228.
- ⁵ A. F. HUXLEY, *Progr. in Biophys. Chem.*, 7 (1957) 257.
- ⁶ M. BÁRÁNY UND K. BÁRÁNY, *Biochim. Biophys. Acta*, 41 (1960) 204.
- ⁷ E. BOLZER, *Am. J. Physiol.*, 167 (1951) 276.

- ⁸ H. HOFFMANN-BERLING, *Biochim. Biophys. Acta*, 15 (1954) 226.
⁹ A. V. HILL, *Proc. Roy. Soc. (London)*, B., 106 (1930) 477.
¹⁰ P. J. BOYLE, E. J. CONWAY, F. KANE UND H. O'REILLY, *J. Physiol. (London)*, 99 (1941) 401; zitiert nach M. DUBUSSON, *Muscular contraction*, Charles C. Thomas, Publisher, Springfield, Illinois, U.S.A., 1954.
¹¹ A. V. HILL, *Proc. Roy. Soc. (London)* B., 148 (1958) 397.
¹² J. V. HOWARTH, *J. Physiol. (London)*, 144 (1958) 167.
¹³ A. L. HODGKIN UND P. HOROWICZ, *J. Physiol. (London)*, 136 (1957) 17P.
¹⁴ A. FLECKENSTEIN, *Der Kalium-Natrium-Austausch als Energieprinzip in Muskel und Nerv.*, Springer-Verlag, 1955.
¹⁵ P. CREPAX UND A. HÉRION, *Biochim. Biophys. Acta*, 6 (1950) 54.
¹⁶ E. M. SZENTKIRÁLYI, *Arch. Biochem. Biophys.*, 67 (1957) 298.
¹⁷ J. AXELSSON UND S. THESLEFF, *Acta Physiol. Scand.*, 44 (1958) 55.
¹⁸ A. SZENT-GYÖRGYI, *Acta Physiol. Scand.*, 9 Suppl. XXV, (1945).
¹⁹ H. PORTZELH, B. SCHRAMM UND H. H. WEBER, *Z. Naturforsch.*, 5b (1950) 61.
²⁰ W. F. H. MOMMAERTS, *J. Biol. Chem.*, 188 (1951) 599.
²¹ M. BÁRÁNY UND K. BÁRÁNY, *Biochim. Biophys. Acta*, 35 (1959) 293.
²² G. ULBRECHT UND M. ULBRECHT, *Biochim. Biophys. Acta*, 25 (1957) 100.
²³ M. ROCKSTEIN UND P. W. HERRON, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 1500.
²⁴ A. WEBER, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 214.
²⁵ A. V. HILL, *Proc. Roy. Soc. (London)* B., 143 (1954) 81.
²⁶ G. LING UND R. W. GERARD, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 34 (1949) 383.
²⁷ H. A. KREBS UND R. HIEMS, *Biochim. Biophys. Acta*, 12 (1953) 172.
²⁸ A. DEUTSCH UND R. NILSSON, *Acta Chem. Scand.*, 7 (1953) 1288.
²⁹ J. R. BENDALL UND C. L. DAVEY, *Biochim. Biophys. Acta*, 26 (1957) 93.
³⁰ Y. AVI-DOR UND O. GONDA, *Biochem. J.*, 72 (1959) 8.

Biochim. Biophys. Acta, 45 (1960) 317-335