

DIE ERSCHÖPFENDE REINIGUNG VON AKTIN-PRÄPARATEN ZAHL UND ART DER PHOSPHATHALTIGEN PROSTHETISCHEN GRUPPEN VON G- UND F-AKTIN

M. ULBRECHT, N. GRUBHOFER, F. JAISLE UND S. WALTER
*Institut für Physiologie im Max-Planck-Institut für medizinische Forschung,
Heidelberg (Deutschland)*
(Eingegangen am 2. April 1960)

SUMMARY

Exhaustive purification of actin preparations. Number and kind of phosphate containing prosthetic groups of G- and F-actin

1. Previous investigations on the nucleoside phosphate content of G- and F-actin have all been carried out with unpurified or little purified protein preparations. It has never been tested whether the purification was complete or whether the purification itself inactivated the preparation.

2. In F-actin solutions prepared according to STRAUB the content of adenine decreases by repeated ultracentrifugal sedimentation or Mg-precipitation according to BÁRÁNY to a constant level which is identical with both methods (16 μ moles/g protein). The adenine and phosphate content of the actin remains constant after the second purification procedure. Both procedures remove protein impurities present in the crude extract.

3. The protein impurities are, however, not removed by repeated isoelectric precipitation of the crude unpolymerized STRAUB-extract. This procedure removes only contaminating phosphate and nucleoside phosphate of the crude extract. The actin polymerizes spontaneously during isoelectric precipitation.

4. Ultracentrifugal sedimentation of F-actin, precipitation by $MgCl_2$ or isoelectric precipitation in presence of ATP do not inactivate the actin. The viscosity of F-actin, the ability for activating the ATP-ase of added L-myosin and the ATP-sensitivity of the resulting actomyosin remain constant even after repeating the purification procedure five times.

5. Repeated isoelectric precipitation of actin in absence of ATP leads to an increasing loss of adenine phosphate and also to a stepwise decrease of $Z\eta$ and ATP-sensitivity.

6. In the nucleoside phosphate of purified F-actin the proportion of adenine to phosphate is 1:2 as in ADP. Paperchromatographic methods reveal in addition traces of AMP and ATP.

7. G-actin and the contaminating proteins in the crude extracts contain also 16 μ moles adenine/g protein.

Abkürzungen: AMP, adenosin monophosphat; ADP, adenosin diphosphat; ATP, adenosin triphosphat.

8. From the content of adenosine phosphates bound to G- or F-actin ($16 \mu\text{moles/g}$ protein) the minimal molecular weight of the actin monomer is calculated as 62.000.

9. The proportion adenine: phosphate and paperchromatographic methods show, that in the crude unpolymerized extract the protein-bound nucleoside-phosphate consists of 70–75 % ATP and 25–30 % ADP. Only 70–75 % of the protein in the crude extract are able to polymerize.

10. However, G-actin obtained from purified F-actin containing also 70–75 % of its nucleoside phosphates as ATP does polymerize entirely. Thus whether or not ADP-G-actin polymerizes seems to depend on the history of the protein preparation.

11. G-actin, whose ability for polymerization has been destroyed by X-rays, nevertheless activates the L-myosin-ATP-ase to a normal extent. The same holds for actin partly denatured by isoelectric precipitation in the absence of ATP. Thus, the ability of actin for polymerisation and its ability to activate the L-myosin-ATP-ase are independent properties.

12. In phosphate or ATP containing solutions, purified F-actin binds ATP and inorganic phosphate reversibly (in addition to the tightly bound ADP). However, actin is not phosphorylated in presence of ATP.

EINLEITUNG

Durch die Entdeckung von H. HUXLEY und Mitarbeitern^{1–4}, dass die Kontraktion des Skelettmuskels auf einem Gleiten der Aktin-Filamente längs der L-Myosin-Filamente beruht, hat das Problem der Beteiligung des F-Aktins an der Kontraktion eine spezielle Form angenommen. So hat H. H. WEBER^{5,6} in der schematischen Darstellung der chemischen Theorie der Filament-Verschiebung das Aktin als P-Akzeptor für das γ -Phosphat des ATP gewählt. Diese Wahl ist zwar mehr oder minder willkürlich, auf der anderen Seite aber ist die Phosphorylierung des F-Aktin-ADP während der Depolymerisierung die einzige Phosphorylierungs-Reaktion, die an einem kontraktilem Protein bisher direkt nachgewiesen ist⁷. KOSHLAND⁸ nimmt ähnlich wie WEBER an, dass die Kontraktion mit der Phosphorylierung eines kontraktilem Proteins beginnt, aber er führt Argumente dafür an, dass das γ -Phosphat des ATP bei der Spaltung auf das L-Myosin übertragen wird.

In dieser Situation ist es lohnend unser Wissen über die chemischen Beziehungen zwischen F-Aktin und organischen wie anorganischen Phosphaten zu überprüfen und zu erweitern.

Es scheint gesichert, dass F-Aktin das ADP als fest gebundene prosthetische Gruppe enthält^{9–11}. Dagegen beruht die Meinung, das Aktin enthalte auch im G-Zustand ein Nukleosid-Phosphat fest gebunden, nur auf einer einzelnen Beobachtung von STRAUB *et al.*¹². Diese Autoren beobachteten, dass nur ein Teil des ATP in polymerisationsfähigen G-Aktin-Lösungen durch Apyrase mit normaler Geschwindigkeit gespalten wird. Ebenso herrscht keine Einigkeit darüber, ob eine etwaige prosthetische Gruppe des G-Aktin aus ADP¹³ oder ATP¹² besteht.

Um zu entscheiden, wie weit Phosphate überhaupt als prosthetische Gruppe an Aktin fest gebunden sind, muss festgestellt werden, ob Aktin ganz bestimmte Mengen an Nukleosid-Phosphaten und anderen Phosphaten auch dann enthält, wenn durch extreme Reinigung alle Phosphate aus dem Lösungsmittel entfernt werden.

NUKLEOSID-GEHALT VON AKTINEN VERSCHIEDENER HERSTELLUNGSART

Präparat	Reinigungsverfahren	Nukleosid-Gehalt in $\mu\text{Mol/g}$ Eiweiss			Funktionsproben des Aktins
		Gesamt	ATP	ADP	
F-Aktine					
PERRY ¹¹	Myofibrillen	20.2	2.3	13.5	Keine
	6-malige Waschung mit 0.08 M Borat	pro g F-Aktin in der Fibrille			
HASSELBACH ¹⁰	Fibrillenschatten *	18.0	1.1	16.9	Keine
	6-malige Waschung in 0.1 M KCl	pro g F-Aktin in den Fibrillenschatten			
SZENT-GYÖRGYI ¹⁴	H ₂ O-Extrakt aus Aceton-Trockenpulver, polymerisiert	15.1	2.3	11.6	Keine
MOMMAERTS ⁹	H ₂ O-Extrakt aus Aceton-Trockenpulver, polymerisiert	15-17			Keine
Diese Arbeit	H ₂ O-Extrakt aus Aceton-Trockenpulver, polymerisiert Polymerisiert durch isoelektrische Fällung	16.0 Konstant nach d. 2. Waschung 17.0 Konstant nach 2. Fällg. 14.0 über alle Fällungen konstant	Spuren ~ 15.0		$\left\{ \begin{array}{l} \text{Z}\eta \text{ der Aktinlösung} \\ \text{ATP-Empfindlichkeit der L-Myosin-Aktin-Mischung} \\ \text{Aktivierung von L-Myosin-ATPase} \end{array} \right\}$
	1-malige Waschung auf der Ultrazentrifuge				
	$\left\{ \begin{array}{l} \text{4-malige Waschung auf der Ultrazentrifuge} \\ \text{4-malige MgCl}_2\text{-Fällung} \\ \text{5-malige Fällung **} \\ \text{in ATP-Gegenwart} \end{array} \right\}$				
G-Aktine					
STRAUB UND FEUER ¹²	H ₂ O-Extrakt aus Aceton-Trockenpulver	12-19			Keine
SZENT-GYÖRGYI ¹⁴	H ₂ O-Extrakt aus Aceton-Trockenpulver	11.8	7.7	1.9	Keine
Diese Arbeit	H ₂ O-Extrakt aus Aceton-Trockenpulver	17.0 von d. 1. zur 3. Behandlung konstant	~ 13.0	~ 4.0	Nach Polymerisierung Tests wie bei F-Aktin
	3-malige Behandlung mit Amberlite IRA 400				
	Mittelwert für G- und F-Aktin dieser Arbeit	16.0			
	Mittelwert über G- und F-Aktine aller Autoren	16.0			

* Fibrillenschatten = fibril ghosts = Fibrillen nach Extraktion des L-Myosins.

** Isoelektrische Fällung in Abwesenheit von ATP führt zu fortlaufender Abnahme des gebundenen Nukleosids.

Eine praktisch vollständige Abwesenheit freier Phosphate scheint bisher nur in den Arbeiten von HASSELBACH¹⁰ vorzuliegen, der seine Aktin-Präparationen aus 8-mal gewaschenen Fibrillen hergestellt hat.

Da Aktin sehr leicht denaturiert, muss geprüft werden, ob mit fortschreitender Reinigung der Phosphat-Anteil des Aktins fortlaufend abnimmt oder aber ein Endwert erreicht wird, der durch weitere Reinigungsprozeduren gleicher Art nicht mehr vermindert wird. Diese Prüfung scheint bisher nicht vorgenommen worden zu sein (Tabelle I).

Die Nukleosid-Phosphat-Bestimmungen in G-Aktin-Lösungen scheinen überhaupt nur an ungereinigten STRAUB'schen Rohextrakten durchgeführt worden zu sein.

Es werden infolgedessen in der vorliegenden Arbeit eine Anzahl von Reinigungsverfahren darauf geprüft, ob sie zu konstanten Endwerten an Phosphaten im G- und F-Aktin führen und die so gefundenen Werte an Phosphat und Nukleosid-Phosphat mit den Angaben der Literatur verglichen. Es wird ferner geprüft, wie weit die Reinigungsverfahren die kolloidalen und funktionellen Eigenschaften des F-Aktin verändern.

I

Die Verunreinigung eines Rohextraktes aus Aceton-Trockenpulver nach STRAUB hängt sehr stark von der Herstellung des Trockenpulvers ab. Wenn der Muskelbrei durch ausgiebige Waschung vollständig von Salzen befreit ist und hinterher durch gründliche Aceton-Waschung schnell völlige Trocknung erreicht wird, enthält der Rohextrakt neben polymerisationsfähigem Aktin nur etwa 20–30 % an langsam sedimentierenden Eiweiss-Verunreinigungen. Ein solcher Extrakt enthält ausserdem nicht

TABELLE II
VERTEILUNG VON NUKLEOSID UND PHOSPHAT VOR UND NACH ULTRAZENTRIFUGATION
VON STRAUB'SCHEN AKTIN-EXTRAKTEN

	mg Eiweiss/ml	Nukleoside μMol/ml spektrophotometrisch A = Adenosin I = Inosin	Phosphate in μMol/ml			
			Nukleosid- phosphat	Anorganisches Phosphat		Gesamt- Phosphat
				Im Perchlorsäure Überstand	In der Perchlorsäure- fällung	
(a) Rohextrakt nach Polymerisation	3.02	0.145* A I 0.067 0.079	0.164	0.253**	0.045	0.462
Nach Ultrazentrifugation:						
(b) Überstand	0.74	0.100* A I 0.022 0.078	0.074	0.224**	0.017	0.315
(c) Aktin	2.28	0.045 A I 0.045 —	0.09	0.029	0.032	0.151

* Für das abzentrifugierte Aktin ergibt sich die Absorptionskurve des Adenins; die Menge ist aus der Absorption bei 260 mμ mit dem Absorptionskoeffizienten des Adenosins berechnet. Im Überstand und Rohextrakt liegt das Absorptionsmaximum bei 250 mμ. Es handelt sich möglicherweise um eine Mischung von Adenosin- und Inosin-Derivaten. Die Nukleosid-Menge wurde aus der Absorption bei 250, 260 und 265 mμ nach dem Verfahren von BENDALL UND DAVEY²⁶ berechnet und der Adenosin- und Inosin-Anteil ermittelt.
** ~ 0.045 μMol anorganisches Phosphat sind bei der Polymerisation freigesetzt worden.

unbeträchtliche Mengen an anorganischem Phosphat und geringere Mengen an Nukleosid-Phosphat, die nicht an das Aktin gebunden sind.

Diese Menge hängt von der Extraktionsdauer ab. Bei einer Extraktionszeit von 2 Min entfallen etwa 200 μMol solchen Phosphats auf 1 g Protein, bei einer Extraktionsdauer von 30 Min nur etwa 100 μMol . Die Abhängigkeit der Proportion Phosphat : Protein von der Extraktionsdauer beruht darauf, dass die Verunreinigungen schnell und das Protein langsam extrahiert werden. Die Verteilung der Phosphate und des Eiweisses nach einer Extraktionsdauer von 30 Min ergibt sich aus Tabelle II.

Die Reinigung des polymerisationsfähigen Aktins von anderen Proteinen ist spezifisch, (a) wenn das Aktin polymerisiert und auf der Ultrazentrifuge sedimentiert wird, (b) wenn das F-Aktin durch niedrige Konzentrationen von MgCl_2 nach BÁRÁNY¹⁵ umgefällt wird. Eine sehr viel geringere Spezifität ist zu erwarten bei der isoelektrischen Fällung¹², obwohl auch wiederholte isoelektrische Fällung verhältnismässig häufig als Reinigungsverfahren verwendet wird. Es werden in erster Linie diese 3 Reinigungsverfahren benutzt und geprüft.

Die Entfernung ausschliesslich der organischen und anorganischen Phosphat-Verunreinigungen ist auch mit anderen Methoden (Ionenaustauscher, Dialyse) möglich.

Der Fortschritt in der Reinigung des Aktins von den anderen Eiweisskörpern wird kontrolliert durch das Anwachsen der Viskositätszahl ($Z\eta^*$) der F-Aktin-Lösungen und der ATP-Empfindlichkeit* der Mischungen des F-Aktin-Präparates mit L-Myosin-Lösungen. Die Aktivierung der L-Myosin-ATPase durch die Aktin-Präparate nimmt mit steigender Reinheit des Aktin nicht zu.

II

Wird das Aktin im Rohextrakt polymerisiert und anschliessend 4 mal mit der Ultrazentrifuge oder durch MgCl_2 gefällt und resuspendiert (siehe TECHNISCHER TEIL), so wird der Gesamtgehalt an Phosphat pro Gramm Protein, das durch Perchlorsäure freigesetzt wird, mit der dritten Umfällung konstant; das gleiche gilt für den sehr niedrigen Gehalt an anorganischem durch Perchlorsäure ablösbaren Phosphor (Fig. 1 und 2). Der Adeningehalt fällt schon von der ersten zur zweiten Umfällung nur sehr wenig ab und bleibt dann konstant, weil der Rohextrakt mit Adenin viel weniger verunreinigt ist als mit anorganischem Phosphat.

Der optisch bestimmte Nukleotid-Gehalt stimmt in allen Versuchen exakt überein mit dem Nukleotid-Gehalt, der sich aus der Differenz von Gesamtphosphat und anorganischem Phosphat ergibt, wenn das Nukleotid als Di-phosphat angesehen wird. Alle Phosphat-Werte bei Reinigung des F-Aktins auf der Ultrazentrifuge und durch MgCl_2 -Fällung sind identisch. Sie betragen nach vollständiger Entfernung der Phosphat-Verunreinigungen im Mittel 16 μMol ADP/g Protein und 3 μMol anorganisches Phosphat/g Protein als durch Perchlorsäure ablösbare prosthetische Gruppen.

Die Eiweissverunreinigungen des Rohextraktes sind offensichtlich bereits durch die erste Umfällung sowohl im Ultrazentrifugen- wie im MgCl_2 -Verfahren praktisch

* ATP-Empfindlichkeit = $\frac{Z\eta - Z\eta_{\text{ATP}}}{Z\eta_{\text{ATP}}} \cdot 100$, wobei $Z\eta = \frac{2.3 \cdot \log \eta_{\text{rel}}}{c}$ ($Z\eta = 0.1$ intrinsic viscosity $[\eta]$) (vergl. PORTZEHL *et al.*²⁴). Da die Arrhenius Beziehung für F-Aktin-Präparate nicht streng gilt, wurden alle Messungen bei einer Eiweiss-Konzentration ausgeführt.

vollständig beseitigt. Dies geht aus den Kurven von $Z\eta$ und ATP-Empfindlichkeit in der oberen Hälfte der Fig. 1 und 2 hervor. Die Ordinate dieser Kurven gibt die Viskositätszahl und die ATP-Empfindlichkeit der Eiweisspräparate der verschiedenen Reinigungsstufen, bezogen auf den Gehalt an Protein (nicht an Aktin). Infolgedessen müssen Viskositätszahl und ATP-Empfindlichkeit mit fortschreitender Reinigung des Aktins ansteigen. Zahlenmässig sind beide Werte ausgedrückt in % des Standardwertes. Der Standardwert ist der Generalmittelwert zahlreicher gereinigter Aktin-Präparate. Er beträgt für $Z\eta$ 0.85 bei dem hier gegebenen sehr niedrigen Geschwindigkeits-Gradienten von 250 sec^{-1} . Der Standardwert der ATP-Empfindlichkeit beträgt unter den Bedingungen dieser Arbeit 120 % (siehe TECHNISCHER TEIL).

Mit beiden Methoden ist dieser Höchstwert bereits nach der ersten Umfällung erreicht, obwohl im Rohextrakt mit seinen Eiweissverunreinigungen diese Werte nur zwischen 80 und 90 % des Standardwertes für gereinigte Aktine liegen.

Wir können daher die oben angegebenen Werte für die prosthetische Gruppe auf reines Aktin beziehen. Infolgedessen ergibt sich aus dem Gehalt an ADP ein Äquivalent-Gewicht des Aktins von 62,000. Dieser Wert liegt im Streubereich der bisherigen Molekulargewichtsbestimmungen für das G-Aktin-Monomer^{9, 16-20, 28}. Diesem Wert kommen auch die schon früher gefundenen Werte für den ADP-Gehalt

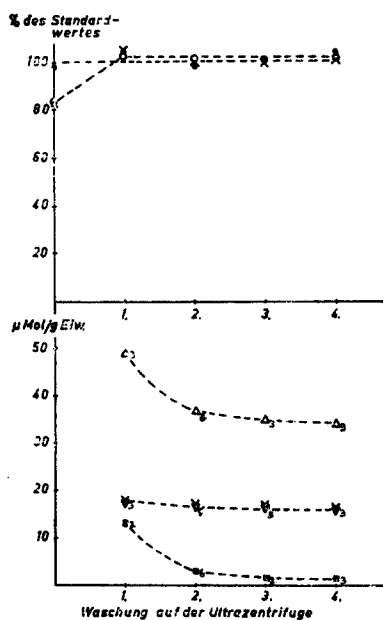


Fig. 1. Reinigung von F-Aktin durch Waschung auf der Ultrazentrifuge. Abszisse: Zahl der Waschungen. Ordinate: Untere Hälfte durch Perchlorsäure ablösbare Phosphat-Fractionen in $\mu\text{Mol/g}$ Eiweiss. \triangle --- \triangle , Gesamt-Phosphat; \blacksquare --- \blacksquare , anorganisches Phosphat; \times --- \times , $\frac{1}{2}$ Differenz zwischen Gesamt-Phosphat und anorganischem Phosphat; \blacktriangledown --- \blacktriangledown , Adenin (spektrophotometrisch). Die Zahlen an den Symbolen bedeuten die Anzahl der Versuche. Obere Hälfte: $Z\eta$, ATP-Empfindlichkeit, ATPase-Aktivierung in % der Standardwerte. \circ --- \circ , $Z\eta$ bei 0.1 M KCl , 0.001 M MgCl_2 , $0.001 \text{ M Histidin-Puffer}$; \times --- \times , ATP-Empfindlichkeit in 0.6 M KCl ; \bullet --- \bullet , Aktivierung der L-Myosin-ATPase bei 0.085μ . Mittelwerte aus 2-4 Versuchen. pH 7.0. Temperatur, 20° .

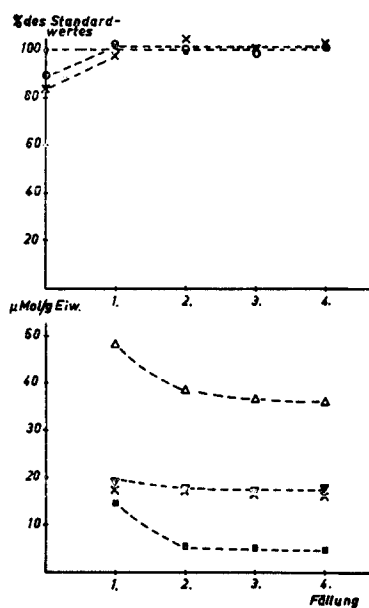


Fig. 2. Reinigung des F-Aktins durch Umfällung mit MgCl_2 . Abszisse: Zahl der Umfällungen, die den Einzelmessungen vorhergegangen sind. Sonst wie Fig. 1. Mittelwerte aus 2 Versuchen.

des F-Aktins sehr nahe (siehe Tabelle I). Die Übereinstimmung beweist, dass auch die früheren ADP- und Adenin-Analysen sich auf weitgehend reines F-Aktin beziehen, obwohl die Reinigung dort nicht systematisch bis zur Konstanz des gebundenen ADP fortgeführt wurde. Die Übereinstimmung ist nicht erstaunlich, weil die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass die Verunreinigungen bereits bei der ersten Umfällung fast vollständig verschwinden (mit Ausnahme des anorganischen Phosphates).

III

Es ist nicht möglich, das Aktin des Rohextraktes zu polymerisieren und das so gewonnene F-Aktin durch isoelektrische Umfällung nach STRAUB zu reinigen, weil es nicht möglich ist, den isoelektrischen F-Aktin-Niederschlag wieder klar zu lösen. Wird dagegen das G-Aktin des Rohextraktes ohne vorherige Polymerisation isoelektrisch gefällt, so kann der Niederschlag bei pH 7 wieder aufgelöst werden.

Das ist deshalb sehr merkwürdig, weil dieser Niederschlag nach seiner Auflösung sich viskosimetrisch mehr oder minder wie F-Aktin verhält. Bereits nach der ersten Umfällung besitzt die neutralisierte Lösung ohne Zusatz polymerisierender Salze etwa 75 % der Viskosität, die durch nachträglichen Salzzusatz erreicht werden kann. Nach der dritten Umfällung ist die Viskosität ohne Salzzusatz auf Werte angestiegen, die durch den Zusatz polymerisierender Salze nicht mehr gesteigert werden können (Tabelle III). Dieser Befund sieht so aus, als ob die kleinen Mengen an Acetat-Puffer und Bikarbonat, die für die pH-Verschiebungen gebraucht werden, bereits für eine "normale" Polymerisation genügen. Die Reversibilität der isoelektrischen Fällung des spontan entstandenen F-Aktin muss infolgedessen auf die Abwesenheit von KCl, die Irreversibilität der Fällung des normal gebildeten F-Aktin auf die Anwesenheit von 0.1 M KCl bezogen werden.

TABELLE III

POLYMERISIERUNG DES G-AKTINS DURCH ISOELEKTRISCHE FÄLLUNG
(in Gegenwart von $2 \cdot 10^{-4}$ M ATP.)

	Acetat-Konzentration	Z η nach isoelektrischer Fällung in % von Z η nach Salzzusatz				
1. Fällung	0.002–0.007	78.5	71.6	72.0	58.5	100
2. Fällung	0.014–0.02	97.8	104	88	75.5	111
3. Fällung	0.017–0.05	108	100	110	88.0	110
4. Fällung	0.035–0.1	105	104	114	96.0	114
5. Fällung	0.045–0.15	111	103	97		115

Wird nun das Aktin der isoelektrischen Fällung als F-Aktin angesehen und in Abwesenheit von ATP mehrfach isoelektrisch umgefällt (Fig. 3), so zeigt sich, dass das Aktin fortschreitend denaturiert wird. Die Menge des gebundenen Nukleosid-Phosphates nimmt dabei fortlaufend ab. Nach der 6. Umfällung ist der ADP-Gehalt auf weniger als die Hälfte des Normalwertes abgesunken. Ebenso wird der Polymerisationsgrad von Fällung zu Fällung kleiner (abgelesen an der Abnahme von Z η und ATP-Empfindlichkeit), trotz nachträglichen Zusatzes optimaler KCl- und MgCl₂-Mengen. Dagegen bleibt die ATPase-Aktivität des künstlichen Aktomyosins, das aus diesen nachpolymerisierten Aktin-Präparaten hergestellt wird, völlig normal.

Die isoelektrischen Umfällungen wirken nicht denaturierend, wenn sie in Gegen-

wart von $2 \cdot 10^{-4} M$ ATP (siehe ¹²) vorgenommen werden (Fig. 4). Die Aktivierung der L-Myosin-ATPase, die ATP-Empfindlichkeit und die Viskositätszahl ändern sich über 5 Umfällungen nicht (das Aktin-Präparat ist vor der viskosimetrischen und ATPase-Testung durch Salz polymerisiert oder nachpolymerisiert).

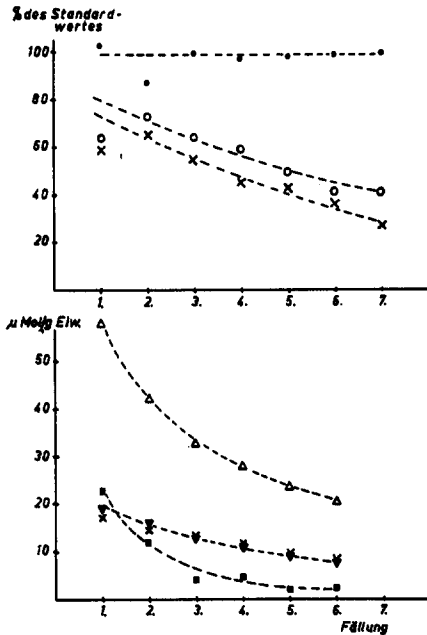


Fig. 3. Reinigung des Aktins durch isoelektrische Fällungen in Abwesenheit von ATP. Abszisse: Zahl der isoelektrischen Fällungen. Sonst wie Fig. 1 und 2. Mittelwerte aus 2-3 Versuchen.

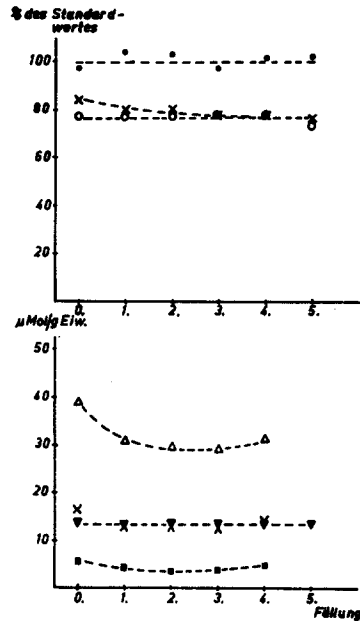


Fig. 4. Reinigung des Aktins durch isoelektrische Fällungen in Gegenwart von ATP. Abszisse: Zahl der isoelektrischen Fällungen. Zeichenerklärung wie Fig. 1 und folgende.

Die Bestimmung der Phosphat-Fractionen hat nur Sinn, wenn das zugesetzte ATP und damit gleichzeitig auch alle P-Verunreinigungen im Rohextrakt und nach jeder Umfällung vor der Analyse durch einen Ionen-Austauscher beseitigt werden (siehe TECHNISCHER TEIL). Unter diesen Umständen sind der Gehalt an gebundenem Adenin und gebundenem anorganischem Phosphat vom Rohextrakt bis zur 5. Umfällung konstant. Nur der Gehalt an Gesamt-Phosphat nimmt durch die erste Umfällung beträchtlich ab, weil durch die gleichzeitige Polymerisation aus Aktin-gebundenem ATP Aktin-gebundenes ADP wird*.

Man kann auf Grund der beobachteten Viskositätszunahme bei isoelektrischer Fällung und der gleichzeitigen Phosphat-Abspaltung, die mit der Polymerisierung verbunden ist, annehmen, dass es sich auch bei dieser Art der Polymerisierung um den normalen Mechanismus des Überganges von G-Aktin zu F-Aktin handelt. Wenn man das annimmt, ist zu folgern, dass nicht nur G-Aktin, sondern auch F-Aktin bei pH 4.8 immer dann denaturiert, wenn kein ATP zugegen ist.

Die Ergebnisse, die in Fig. 4 dargestellt sind, zeigen, dass die isoelektrische

* Dass bei der Ansäuerung auf pH 4.8 eines Austauscherbehandelten G-Aktin-haltigen Rohextraktes gebundenes Phosphat abgespalten wird, ist auch durch direkte Analyse des freigesetzten Phosphates gesichert.

Fällung auch in Gegenwart von ATP nicht als Reinigungsverfahren des Aktins empfohlen werden kann. Denn die ATP-Empfindlichkeit und die Viskositätszahl bleiben während der Reinigungsschritte auf dem niedrigen Wert stehen, der bereits im Rohextrakt gefunden wird (ähnlich 80 % des Wertes einer gereinigten Aktin-Lösung, vergl. Fig. 4). Die verunreinigenden Eiweiss-Körper des Rohextraktes werden

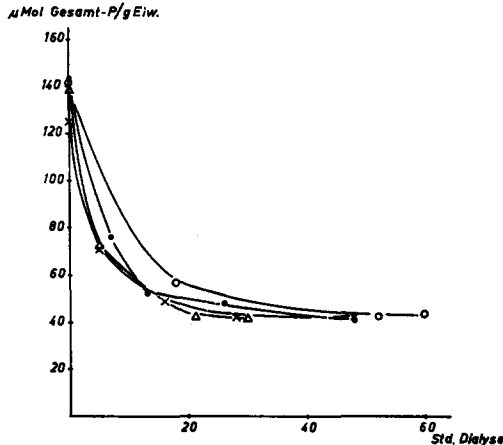
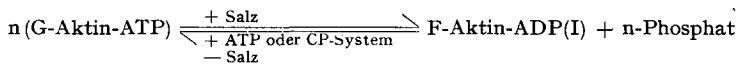


Fig. 5. Änderungen des Phosphat-Gehaltes von polymerisierten STRAUB-Extrakten während der Dialyse. Ordinate: Gesamt-Phosphat des Extraktes in $\mu\text{Mol/g}$ Eiweiss. Abszisse: Dauer der Dialyse. Jede Kurve repräsentiert einen Einzelversuch. Dialyse gegen 0.1 M KCl , 0.001 M MgCl_2 , $0.001\text{ M Histidin-Puffer}$, pH 7.0. Temperatur, 0° . Alle 3 Stunden Wechsel der Dialysierflüssigkeit. Dialysierschlauch der Firma Kalle und Co., Wiesbaden-Biebrich.

offenbar nicht entfernt. Es sieht also so aus, als wenn das isoelektrische Reinigungsverfahren nicht viel anderes leistet als Behandlung mit Ionenaustauschern oder Dialyse. Denn auch Dialyse und Behandlung mit geeigneten Ionenaustauschern beseitigen die Verunreinigungen an organischen und anorganischen Phosphaten, ohne gebundene Phosphate aus der Bindung an das Eiweiss abzuspalten. Für den Ionenaustauscher ergibt sich das aus den Erfahrungen bei der isoelektrischen Fällung (siehe auch Abschnitt IV), für die Dialyse aus Fig. 5.

IV

Es wird im allgemeinen angenommen^{7, 12, 20}, dass der Adenin-Gehalt von G-Aktin und F-Aktin gleich ist und dass die Polymerisation verbunden ist mit der Reaktion



Experimentelle Zahlenangaben über den Adenin-Gehalt des G-Aktins sind selten und widerspruchsvoll. STRAUB und Mitarbeiter¹² geben an, dass Rohextrakte 11–19 μMol an Aktin-gebundenem ATP enthalten. A. G. SZENT-GYÖRGYI findet im Rohextrakt $\sim 7\text{ } \mu\text{Mol/g}$ Eiweiss¹⁴. GERGELY¹³ schliesst aus seinen Versuchen, dass G-Aktin, das durch Depolymerisation von F-Aktin in Anwesenheit von ATP entstanden ist, nicht ATP, sondern ADP enthielte. STROHMAN⁷ findet dagegen nach Depolymerisation von F-Aktin in Gegenwart von Phosphokreatin und Phosphokinase ein ATP-haltiges G-Aktin.

Werden durch Amberlite IRA 400 (100 mg/ml) alle kristalloiden Ionen des Rohextraktes entfernt, so ergeben sich 16–18 μMol Adenin/g Eiweiss (Fig. 6). Dieser Adenin-Gehalt ändert sich auch bei weiteren Behandlungen mit Amberlite nicht mehr. Der Adenin-Gehalt des Proteins im Rohextrakt ist also dem Adenin-Gehalt des F-Aktins gleich. Da im Mittel nur etwa 75 % des Proteins im Rohextrakt polymerisierbar sind, bedeutet diese Feststellung, dass der Adenin-Gehalt des nicht polymerisierbaren Proteins ebenso gross ist wie der Adenin-Gehalt des Aktins.

Die Eigenschaften des F-Aktins, das aus dem Amberlite-gereinigten G-Aktin hergestellt ist, werden durch die Amberlite-Behandlung nicht (ATP-Empfindlichkeit und ATPase-Aktivität des künstlichen Aktomyosins) oder kaum (Viskositätszahl) verändert (Fig. 6).

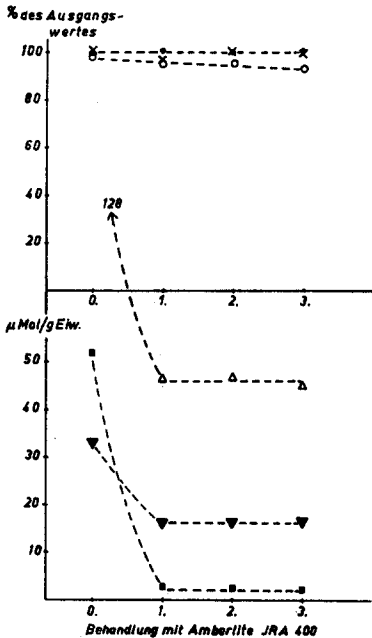


Fig. 6. Die Wirkung von Amberlite IRA 400 auf die Eigenschaften der Proteine im unpolymerisierten STRAUB'schen Rohextrakt. Abszisse: Zahl der Behandlungen vor der Messung. 1 und 2, Behandlung je 100 mg Amberlite/ml; 3, Behandlung 150 mg Amberlite/ml. Ordinate und Zeichengebung wie in Fig. 1–4. Vor den Funktionsproben der oberen Hälfte der Abbildung wurde das G-Aktin polymerisiert. Mittelwerte aus 2 Versuchen.

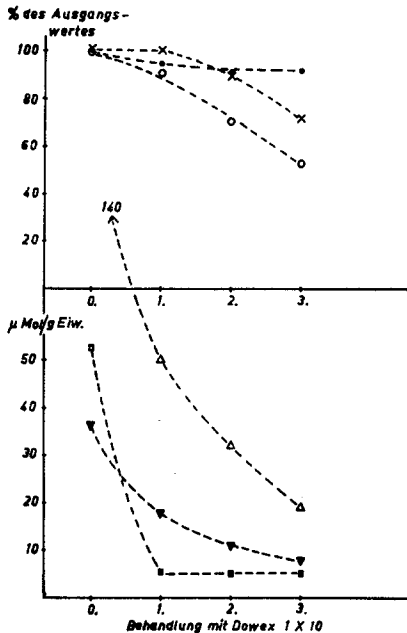


Fig. 7. Einfluss der Behandlung von unpolymerisiertem STRAUB-Extrakt mit Dowex 1×10 . Abszisse: Zahl der Behandlungen mit Dowex, 1. Behandlung 160 mg/ml, 2. Behandlung 230 mg/ml, 3. Behandlung 400 mg/ml. Sonst wie Fig. 6.

Dagegen führt Behandlung mit grösseren Quantitäten des feinkörnigen Anionen-Austauschers Dowex 1×10 zu einer Denaturierung, die mit der Zahl der Dowex-Inkubierungen zunimmt (Fig. 7).

Aus der Differenz zwischen dem Gesamt-Phosphat und dem anorganischen Phosphat, das durch Säure ablösbar ist, ergibt sich, dass auf 1 g Protein-gebundenes Adenin des gereinigten Rohextraktes 2.7 Phosphat-Reste entfallen. Das entspricht einer Proportion von 0.7 ATP zu 0.3 ADP. Auch die papierchromatographische

Analyse zeigt viel ATP neben wenig ADP. Während der Polymerisation werden auf 4 Teile Adenin 3 Teile Phosphat abgespalten (Mittel aus 10 Versuchen). Also wird alles ATP während der Polymerisation gespalten. Dieser Befund passt zu der Tatsache, dass sich durchschnittlich 75 % des Eiweisses auf der Ultrazentrifuge sedimentieren lassen. Dass entsprechend 75 % des Nukleosid-Gehaltes Phosphat abgespalten und gleichzeitig 75 % des Proteins polymerisiert werden, spricht dafür, dass ausschliesslich das ATP-G-Aktin in F-Aktin-ADP übergeht. Das unsedimentierbare und offensichtlich auch unpolymerisierbare Protein enthält die restlichen 25 % des Adenins zum grössten Teil als ADP (21 % des Gesamt-Adenins), zum kleinen Teil als AMP (4 % des Gesamt-Adenins). Dies ergibt sich rechnerisch aus dem Verhältnis Adenin: Phosphat und ist durch papierchromatographische Analyse gesichert.

Wenn ein abzentrifugiertes F-Aktin in einer salzfreien $1 \cdot 10^{-4} M$ ATP-Lösung mit Hilfe des Homogenisators resuspendiert wird, so fällt seine Viskositätszahl von 0.85 auf 0.05, d.h. es depolymerisiert. Auch in solchen *in vitro* depolymerisierten G-Aktinen findet sich nach der Behandlung mit Amberlite ein Gehalt von 16 μMol Adenin/g Aktin³⁰.

Die säulenchromatographische Analyse der prosthetischen Gruppe des G-Aktins ergibt, dass das Adenin zu etwa 70 % als ATP, zu etwa 20 % als ADP und zu etwa 10 % als AMP vorliegt. Diese Zahlen zeigen im Gegensatz zu GERGELY's Ergebnissen, dass nicht nur in Anwesenheit des Phospho-Kreatin-Systems⁷, sondern auch in Anwesenheit von ATP während der Depolymerisation die prosthetische Gruppe ADP weitgehend durch ATP ersetzt wird. Der Gehalt des Proteins an Adenosin-Phosphat ist im Rohextrakt und nach Depolymerisierung gleich, die Verteilung der prosthetischen Gruppe auf die Formen ATP, ADP und AMP ist sehr ähnlich. Das G-Aktin, das durch Depolymerisierung von F-Aktin gewonnen ist, polymerisiert aber im Gegensatz zum Rohaktin praktisch vollständig. Das zeigt, dass es auch polymerisationsfähiges ADP-G-Aktin gibt. Die Bedingungen, unter denen sich polymerisationsfähiges ADP-G-Aktin bildet, werden in einer späteren Mitteilung behandelt³¹.

V

Es wird vielfach angenommen, dass das nicht polymerisierbare Protein des STRAUB'schen Rohextraktes nichts anderes sei als denaturiertes Aktin. Die bisher fehlenden Argumente für diese Annahme können aus den Versuchen dieser Arbeit abgelesen werden.

1. Fig. 4 und Fig. 6 zeigen, dass an 1 g Protein des Rohextraktes die gleiche Adenin-Menge von 15–16 μMol gebunden ist, die auch im gereinigten Aktin-Präparat gefunden wird.

2. Fig. 1 und Fig. 2 zeigen, dass auch die Aktivierung der L-Myosin-ATPase durch 1 g Protein des Rohextraktes gleich ist der Aktivierung durch 1 g gereinigtes Aktin. Aktivierung der L-Myosin-ATPase und der Adenin-Gehalt sind Eigenschaften, die für Aktin sehr spezifisch sind. Trotzdem sind die nicht polymerisierbaren Proteine des Rohextraktes in diesen beiden Eigenschaften dem gereinigten Aktin gleich oder sehr ähnlich.

Auf der anderen Seite zeigt unsere Arbeit (Fig. 3 und Fig. 7), dass die artefizielle Denaturierung des Aktins seine Fähigkeit der ATPase-Aktivierung selbst dann unberührt lässt, wenn ATP-Empfindlichkeit, Viskositätszahl und Adenin-Gehalt stark abnehmen. Es ist sogar möglich, durch Röntgenbestrahlung von G-Aktin die Poly-

merisationsfähigkeit stark herabzusetzen und gleichzeitig die Aktivierung der L-Myosin-ATPase durch das röntgengeschädigte, unvollständig polymerisierte Aktin bis zu 50 % zu erhöhen²¹ (Fig. 8). Durch sehr hohe Röntgendosen lässt sich sogar die Polymerisationsfähigkeit des G-Aktins fast vollständig aufheben, ohne dass die Aktivierung der L-Myosin-ATPase unter den Normalwert sinkt (Fig. 8).

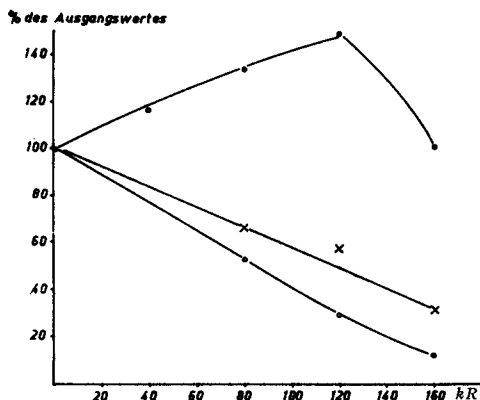


Fig. 8. Einfluss von Röntgenstrahlung auf die Reaktionsfähigkeit von G-Aktin im STRAUB'schen Rohextrakt. Abszisse: Röntgendosis. Ordinate: $Z\eta$, ATP-Empfindlichkeit und ATPase-Aktivierung in % der unbestrahlten Probe. Zeichen wie in Fig. 1-4. Dosisleistung 1500 R/min, 2 mm Al-Filter, 250 kV, 15 mA, 4.3 mg Eiweiss/ml; pH, 7.0; Temperatur, 20°.

Diese Beobachtungen legen folgende Schlüsse nahe: Denaturierung des Aktins beeinträchtigt in erster Linie die Polymerisationsfähigkeit und ihre Folgeerscheinungen, d.h. die ATP-Empfindlichkeit des künstlichen Aktomyosins. Für diese Wirkung scheint es zu genügen, dass das gebundene ATP zu ADP oder AMP wird (vergl. Abschnitt iv). Eine weitergehende Denaturierung führt zusätzlich zum Verlust prosthetischer Gruppen, ohne gleichzeitigen Verlust der Aktivierungsfähigkeit für L-Myosin-ATPase. Also scheinen die prosthetischen Gruppen keine Bedeutung für die enzymatische Interaktion von Aktin und L-Myosin zu besitzen.

ANHANG

Ausser den anorganischen und Adenosin-Phosphaten, die von G- und F-Aktin als prosthetische Gruppe fest gebunden sind, finden sich am F-Aktin auch organische und anorganische Phosphate in reversibler Gleichgewichtsbindung.

Wenn F-Aktin aus Lösungen mit einem abgestuften, nicht zu hohen Gehalt von anorganischem ^{32}P oder $[^{32}\text{P}]\text{ATP}$ mit der Ultrazentrifuge abgetrennt wird, so ist der Gehalt des Niederschlages an ATP, anorganischem Phosphat und Radioaktivität grösser als der Gehalt des Überstandes. Wir beziehen den Überschuss an Phosphaten und Radioaktivität, der im Niederschlag gefunden wird, auf das g F-Aktin im Niederschlag, wir bezeichnen das Resultat als scheinbar gebundenes Phosphat, ATP oder Radioaktivität und messen diese Beträge in $\mu\text{Mol/g}$ F-Aktin. Die scheinbar gebundenen Mengen ergeben sich in ihrer Abhängigkeit von der zugegebenen Konzentration an anorganischem Phosphat bzw. ATP aus Fig. 9.

Die Fig. 9 zeigt, dass die scheinbar gebundenen Mengen der Phosphate mit wachsender Konzentration zunächst zunehmen und für das ATP wieder abnehmen und schliesslich sogar negativ werden, sobald die Konzentration von $1 \cdot 10^{-3}$ überschritten ist. Es ist zu erwarten, dass die scheinbar gebundene Menge schliesslich wieder abnimmt, weil der Überschuss des Reaktionspartners im eiweisshaltigen

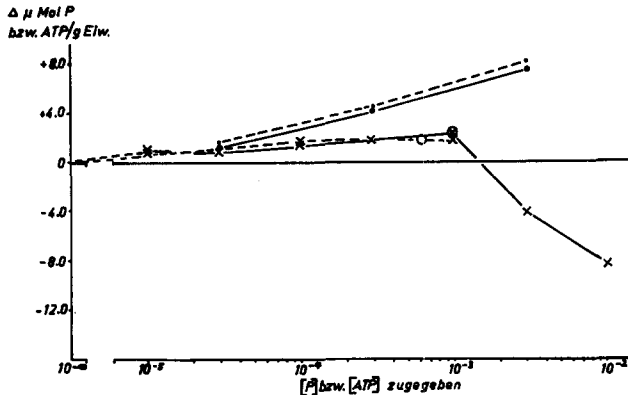


Fig. 9. Scheinbare Bindung von ortho-Phosphat und ATP durch gereinigtes F-Aktin (vergl. METHODIK). Abszisse: Konzentration des zugegebenen anorganischen Phosphates bzw. ATP. Ordinate: nach oben positive scheinbare Bindung in $\mu\text{Mol/g}$ Eiweiss, nach unten negative scheinbare Bindung. Bindung von anorganischem Phosphat: \bullet — \bullet , kolorimetrisch; \circ — \circ , aus ^{32}P Aufnahme. ATP-Bindung: \times — \times , $1/3$ des kolorimetrisch bestimmten Phosphat-Zuwachses; \times — \times , $1/3$ des aus der Aktivitätsaufnahme bestimmten Phosphat-Zuwachses; \circ — \circ , Adenin-Zuwachs.

Volumen des Systems, d.h. in diesem Falle im Pellet nicht nur von der wirklich gebundenen Menge des Reaktionspartners abhängt, sondern auch von dem nicht-lösenden Raum, der durch das Eigenvolumen des Eiweisses und seines Hydratationsmantels bedingt ist. Der nicht-lösende Raum aber hat eine negative scheinbare Bindung zur Folge. Sein Einfluss wächst mit zunehmender Konzentration des zugegebenen Phosphats bzw. ATP und wird mehr und mehr vorherrschend, sobald die wahre Bindung den Sättigungswert erreicht hat. Solange der nicht-lösende Raum des F-Aktins für Phosphat und ATP unbekannt ist, ist es nicht möglich, die wahre Bindung der Reagenzien aus den Kurven der scheinbaren Bindung abzuleiten. Dass die scheinbare Bindung für ATP viel früher abnimmt als für Phosphat, kann z.B. bedeuten, dass der nicht-lösende Raum für das ATP-Ion grösser ist als für das anorganische Phosphat-Ion; es kann aber auch bedeuten, dass die Sättigung des Aktins mit ATP viel früher erreicht wird als mit Phosphat. Die Kurven zeigen also nur, dass eine reversible Bindung zusätzlich zur festen Bindung vorhanden ist.

Wichtiger ist Folgendes: die scheinbare Bindung von radiometrisch und analytisch bestimmbarer Phosphat ist immer gleich, sowohl für anorganisches Phosphat wie für ATP. Ausserdem beträgt für ATP die optisch bestimmte scheinbare Adenin-Bindung $1/3$ der scheinbaren Bindung, die sich aus der Phosphat- und Aktivitätsbestimmung ergibt. Die Äquivalenz der scheinbaren Bindung von Phosphat, Radioaktivität und Adenin schliesst es aus, dass das F-Aktin neben der reversiblen ATP-Bindung auch noch Phosphat durch Transphosphorylierung in messbaren Mengen aufnimmt. Denn wenn γ -Phosphat des ATP auf das Aktin transphosphoryliert würde,

müsste die scheinbare Bindung von Phosphat und Radioaktivität grösser sein als die scheinbare Bindung von Adenin.

Das Fehlen einer nachweisbaren Transphosphorylierung von ATP auf F-Aktin passt zu den früheren Befunden, durch die auf anderem Wege eine Transphosphorylierung von ATP auf F-Aktin aus Aceton-Trockenpulver ausgeschlossen wurde^{8, 22}.

METHODIK

Aktin: Acetontrockenpulver wird nach etwas modifiziertem STRAUB'schen Verfahren¹⁷ gewonnen. Der Rückstand der L-Myosin-Extraktion (20 min) wird 1 mal mit 0.6 M KCl, 3 mal mit dem 10-fachen Volumen 0.1 M KCl, 2 mal mit Aqua dest., 1 mal mit 0.01 M NaHCO₃ und nochmals mit dem 10-fachen Volumen Aqua dest. gewaschen. Danach erfolgt Aceton-Trocknung wie üblich²³. Aus dem Trockenpulver wird G-Aktin mit dem 30-fachen Volumen Aqua dest. extrahiert (30 min bei 0°). Der Extrakt wird durch ein grobes Filter abgesaugt.

Zur Polymerisation wird die Lösung auf 0.1 M KCl und 0.001 M MgCl₂ gebracht, 10 min bei Zimmertemperatur belassen. Die Eiweiss-Konzentration dieser Lösungen beträgt 3–4 mg/ml.

L-Myosin wird nach dem Verfahren von PORTZEHL²⁴ hergestellt. Die Lösungen werden in 50 % Glycerin bei –15° aufgehoben, das Glycerin vor Gebrauch durch Umfällung entfernt.

Aktinreinigungen

Durch Ultrazentrifugation: Der polymerisierte Rohextrakt wird 3 Stunden bei $80,000 \times g$ (SPINCO Rotor 30) oder 1.5 Stunden bei $100,000 \times g$ (SPINCO Rotor 40) bei 0° zentrifugiert. Man erhält einen festen glasigen Niederschlag von F-Aktin, der etwa 1/40 des ursprünglichen Volumens einnimmt. Das Zentrifugengläschen wird mit 0.1 M KCl ausgespült, das Aktin-Pellet wird mit einem Spatel in einen Glas-homogenisator mit eingepasstem Teflon-Stempel (A. H. Thomas, Philadelphia, Best. Nr. 4288-B) gebracht und in 0.1 M KCl und 0.001 M MgCl₂ homogenisiert. Die Eiweiss-Konzentration wird wieder auf etwa 3 mg/ml gebracht. Es ist also möglich, den F-Aktin-Niederschlag direkt wieder in Lösung zu bringen, ohne den Umweg über eine Depolymerisation zu machen (vergl. Ref. 29). Diese Reinigung wird 4 mal vorgenommen. Bei der ersten Zentrifugation bleiben 20–30 % Eiweiss im Überstand, bei den nachfolgenden Zentrifugationen sedimentiert das Eiweiss jedesmal nahezu quantitativ.

MgCl₂-Fällung nach BÁRÁNY¹⁵: Das Aktin kann durch MgCl₂ von 0.025–0.1 M gefällt werden. Das Volumen des Niederschlages nimmt mit steigender MgCl₂-Konzentration ab (15 min zentrifugieren bei $15,000 \times g$). Der Niederschlag lässt sich leicht mit dem Teflon-Homogenisator aufrühren.

Zur mehrfachen Reinigung von F-Aktin benutzen wir 0.07 M MgCl₂. Das Aktin lässt sich dabei auf etwa 1/20 seines Volumens zusammenzentrifugieren. Bei der ersten Fällung werden 70–75 % des Proteins im Rohextrakt sedimentiert. In den nachfolgenden Reinigungsschritten lassen sich jeweils 85–90 % des erhaltenen Eiweisses abzentrifugieren. Die Aktin-Lösungen enthalten nach jedem Schritt etwa $5 \cdot 10^{-3}$ M MgCl₂.

Die isoelektrische Fällung¹²: Geschieht an G-Aktin. Mit wenig 1 M Acetat Puffer

(pH 4.5) wird die G-Aktin-Lösung auf pH 4.8 gebracht, das gefällte Eiweiss abzentrifugiert (10 min $2,000 \times g$), der Niederschlag mit wenig NaHCO_3 unter Rühren bei pH ~ 7.0 wieder in Lösung gebracht. Wenn die Denaturierung des Aktins vermieden werden soll, ist $2 \cdot 10^{-4} M$ ATP während der ganzen Fällungs- und Wiederauflösungsprozeduren gegenwärtig. Für die Prüfung von $Z\eta$, ATP-Empfindlichkeit und ATPase-Aktivierung wird nach jeder Fällung ein Aliquot entnommen. Alle Aliquots werden gleichzeitig mit Salz ($0.1 M$ KCl, $0.001 M$ MgCl_2 , $0.001 M$ Histidin-Puffer) versetzt, bevor $Z\eta$, ATP-Empfindlichkeit und Aktivierung der L-Myosin-ATPase gemessen werden. Vor der Bestimmung von gebundenem Phosphat und gebundenem Nukleotid werden die Aktin-Proben (ohne Salzzusatz) mit Amberlite IRA 400 (100 mg/ml bei 2.5–3.0 mg Eiweiss/ml) 5 min gerührt und der Ionen-Austauscher dann abzentrifugiert. Geschieht die Fällung in Abwesenheit von ATP, tritt von der 3. Fällung an zunehmende Trübung auf, Zusatz von Ascorbinsäure¹² gewährt keinen Schutz.

Ionenaustauscher-Behandlung: Die G-Aktin-Lösungen (~ 3 mg Eiweiss/ml) werden mit Dowex 1×10 (200–400 mesh, Chlorid-Form) oder Amberlite IRA 400 (20–50 mesh, Chlorid- oder Acetat-Form) 5 min bei pH 7 gerührt, dann über ein grobes Filter abgesaugt.

Die viskosimetrischen Messungen erfolgen in Kapillar-Viskosimetern mit gewundener Kapillare (Höhendifferenz 12 cm, Kapillarlänge ~ 70 cm, Kapillardurchmesser 0.9 mm, Durchlauf-Volumen ~ 1 ml, Auslaufzeit für H_2O ~ 25 sec) bei 20° und pH 7. Zur Bestimmung der Viskositätszahl beträgt die Eiweiss-Konzentration 0.7 mg/ml. Die Kapillaren haben ein Gefälle von $\sim 250 \text{ sec}^{-1}$, für gereinigte Aktine ergeben sich $Z\eta$ -Werte von ~ 0.85 ($0.1 M$ KCl, $0.001 M$ MgCl_2 , $0.001 M$ Histidin-Puffer).

Zur Bestimmung der ATP-Empfindlichkeit²⁴ werden künstliche Aktomyosin-Sole hergestellt, bei denen das Verhältnis Aktin: Myosin ähnlich 1:7 ist. Dadurch wird die mit höherem Aktin-Gehalt verbundene thixotrope Komponente der Viskosität ausgeschaltet. Gereinigte Aktine geben bei diesem Mischungsverhältnis eine ATP-Empfindlichkeit von 120 % ($0.6 M$ KCl, $0.001 M$ MgCl_2 , $0.001 M$ Histidin-Puffer).

Die Spaltungsaktivierung der L-Myosin-ATPase erfolgt in Aktin-L-Myosin-Mischungen von etwa 1:9 und ähnlich 1:4 ($0.003 M$ ATP, $0.003 M$ MgCl_2 , $\mu = 0.085$).

Zur Bestimmung von gebundenem anorganischem Phosphat, gebundenem Gesamt-Phosphat und gebundenem Adenin werden die Aktin-Lösungen mit kalter 20 % Perchlorsäure versetzt (10 Vol. Aktin-Lösung, 1 Vol. Perchlorsäure). Das gefällte Eiweiss wird abzentrifugiert, der Überstand mit KOH neutralisiert. Die Bestimmung der freigesetzten anorganischen Phosphate geschieht sofort, die des ablösbaren Gesamt-Phosphats nach Veraschung mit einem H_2SO_4 - HClO_4 -Gemisch (Konz. H_2SO_4 - HClO_4 60 %, 3:2 v/v). Die Phosphate werden nach ROCKSTEIN UND HERRON²⁵, das Adenin spektrofotometrisch gemessen.

Für die Phosphat- und ATP-Bindungsversuche wird 1 mal auf der Ultrazentrifuge gewaschenes Aktin mit ^{32}P bzw. ^{32}P ATP 3 Stunden bei 0° inkubiert ($0.1 M$ KCl, $0.001 M$ MgCl_2 , $0.001 M$ Histidin-Puffer). Danach wird das F-Aktin aus der Lösung durch erneute Ultrazentrifugation abgetrennt (SPINCO 1.5 Std $100,000 \times g$). Der Ueberstand wird möglichst vollständig vom Pellet abgegossen. Der F-Aktin-Niederschlag wird aus dem Zentrifugenröhrchen herausgekratzt, die gewonnene Menge gewogen und mit konz. H_2SO_4 verascht. Nach der Veraschung wird auf ein bekanntes

Volumen aufgefüllt; an Aliquots erfolgen: Eiweissbestimmungen nach Kjeldahl, P-Messungen und Messungen der Radioaktivität. Die gleichen Messungen werden für den Überstand durchgeführt. Von den Konzentrationen im Niederschlag werden die Konzentrationen des Überstandes subtrahiert. Die im F-Aktin gefundene Radioaktivität dividiert durch die spezifische Aktivität des Überstandes ergibt die angelagerten Phosphatmengen. Zum Nachweis, dass Phosphatmenge: 3 = der aufgenommenen Adenin-Menge (dh. Anlagerung des ganzen ATP-Moleküls) wird das abzentrifugierte und gewogene F-Aktin in wenig Aqua dest. homogenisiert. Dann erhält man eine konzentrierte, pipettierbare Eiweiss-Lösung, da das Aktin z.T. depolymerisiert. Nach Perchlorsäure-Behandlung und Neutralisation folgt für das aufgelöste Aktin-Pellet und den Überstand die Adenin-Messung. Von dem Adenin-Wert für das abzentrifugierte F-Aktin wird ebenfalls ein Abzug für eingeschlossenen Überstand gemacht. Daneben erfolgen auch hier Eiweiss-Phosphat- und Radioaktivitäts-Bestimmungen.

[³²P]ATP mit gleichmässiger Signierung aller Phosphate wurde in den Forschungslaboratorien der Zellstoff-Fabrik Waldhof, Mannheim hergestellt. Herrn Professor Dr. REIFF und Herrn Dr. KLEMM danken wir sehr herzlich für die Herstellung von Präparaten mit hoher spezifischer Aktivität. Die Präparate enthalten 70–80 % [³²P]ATP, papierchromatographisch zeigt sich daneben nur ADP. Vor Gebrauch werden die Präparate durch Ionen-Austauscher nach dem Verfahren von COHN UND CARTER²⁷ gereinigt und das [³²P]ATP isoliert.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Untersuchungen über den Nukleosid-Phosphat-Gehalt von G- und F-Aktin sind bisher immer an ungereinigten oder wenig gereinigten Präparaten durchgeführt worden. Es ist nie geprüft worden, ob die Reinigung vollständig war und ob die Reinigungsverfahren nicht zu einer Schädigung der Präparate führen.

2. In F-Aktin Präparaten aus STRAUB'schem Rohextrakt sinkt der Adenin-Gehalt durch wiederholte Waschung auf der Ultrazentrifuge oder MgCl₂-Fällung nach BÁRÁNY auf einen konstanten und für beide Verfahren identischen Wert von 16 μ Mol/g Aktin. Die Konstanz des Adenin-Gehaltes und des Gehaltes an Phosphat ist im allgemeinen nach zweifacher Wiederholung der Reinigung erreicht. Durch beide Verfahren werden ausserdem die Eiweissverunreinigungen des Rohextraktes entfernt.

3. Diese Eiweissverunreinigungen werden dagegen durch mehrmalige isoelektrische Umfällung des unpolymerisierten Rohextraktes nicht entfernt. Die isoelektrische Fällung entfernt nur das verunreinigende freie Phosphat und Nukleosid-Phosphat des Rohextraktes. Das Aktin polymerisiert durch isoelektrische Umfällung spontan.

4. Die ultrazentrifugale Waschung, die MgCl₂-Fällung und die isoelektrische Fällung in ATP-Gegenwart schädigen das Aktin nicht. Die Viskosität des F-Aktins, die Aktivierung der ATP-ase von zugesetztem L-Myosin und die ATP-Empfindlichkeit des gebildeten Aktomyosins bleiben bis zu fünfmaliger Wiederholung der Reinigung konstant.

5. Isoelektrische Umfällung in ATP-Abwesenheit ist mit fortschreitendem Verlust von Adenin-Phosphat, ATP-Empfindlichkeit und fortschreitender Abnahme von $Z\eta$ verbunden.

6. Im abgelösten Nukleosid-Phosphat des F-Aktins ist die Proportion von

Adenin zu Phosphat 1:2 wie in ADP. Papierchromatographisch finden sich neben dem ADP ganz schwache Spuren von ATP und AMP.

7. Das G-Aktin und die verunreinigenden Proteine des Rohextraktes enthalten ebenfalls 16 μ Mol Adenin/g Eiweiss.

8. 16 μ Mol Adenin/g Eiweiss ergeben für G-Aktin und F-Aktin ein minimales Teilchengewicht des Aktin-Monomers von 62,000.

9. Der Phosphat-Gehalt des gebundenen Nukleosids und die Papierchromatographie zeigen, dass im unpolymerisierten Rohextrakt das Protein-gebundene Nukleosid-Phosphat zu 70–75 % aus ATP, der Rest im wesentlichen aus ADP besteht. An der Polymerisation nehmen nur 70–75 % des Rohproteins teil.

10. G-Aktin, hergestellt aus gereinigtem F-Aktin, enthält ebenfalls nur 70–75 % des Nukleosid-Phosphates als ATP. Es polymerisiert trotzdem praktisch vollständig. Es hängt also von der Vorgeschichte ab, ob ADP-G-Aktin polymerisiert oder nicht.

11. G-Aktin, dessen Polymerisationsfähigkeit durch Röntgenbestrahlung weitgehend zerstört ist, aktiviert die L-Myosin-ATP-ase immer noch in völlig normalem Umfang. Das gleiche gilt für Aktin, das durch isoelektrische Umfällung in ATP-Abwesenheit denaturiert ist. Polymerisationsfähigkeit und Fähigkeit der Aktivierung der L-Myosin-ATP-ase sind also voneinander unabhängig.

12. Gereinigtes F-Aktin bindet in Phosphat- oder ATP-Lösungen ATP und Phosphat reversibel (zusätzlich zu dem festgebundenen ADP). Dagegen findet auch in ATP-Anwesenheit eine Phosphatbindung durch Transphosphorylierung nicht statt.

LITERATUR

- ¹ J. HANSON UND H. E. HUXLEY, *Symposia Soc. Exptl. Biol.*, Vol. IX, Academic Press, New York, 1955, p. 228.
- ² H. E. HUXLEY, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 3 (1957) 631.
- ³ A. F. HUXLEY, *Progr. Biophys.*, 7 (1957) 255.
- ⁴ H. E. HUXLEY UND J. HANSON, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 81 (1959) 403.
- ⁵ H. H. WEBER, *The Motility of Muscle and Cells*, Harvard University Press, Cambridge, Mass., 1958.
- ⁶ H. H. WEBER, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 81 (1959) 409.
- ⁷ R. C. STROHMAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 32 (1959) 436.
- ⁸ H. M. LEVY UND D. E. KOSHLAND Jr., *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 1102.
- ⁹ W. F. H. M. MOMMAERTS, *J. Biol. Chem.*, 198 (1952) 469.
- ¹⁰ W. HASSELBACH, *Biochim. Biophys. Acta*, 25 (1957) 562.
- ¹¹ S. V. PERRY, *Biochem. J.*, 51 (1952) 445.
- ¹² F. B. STRAUB UND G. FEUER, *Biochim. Biophys. Acta*, 4 (1950) 455.
- ¹³ A. MARTONOSI, M. A. GOUVEA UND J. GERGELY, *Abstracts of Biophysical Society*, 1959.
- ¹⁴ A. G. SZENT-GYÖRGYI, *Arch. Biochem. Biophys.*, 31 (1951) 97.
- ¹⁵ M. BÁRÁNY, N. A. BIRÓ, J. MOLNÁR UND F. B. STRAUB, *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, 5 (1954) 369.
- ¹⁶ T. C. TSAO, *Biochim. Biophys. Acta*, 11 (1953) 227.
- ¹⁷ G. FEUER, J. MOLNÁR, E. PETTKO UND F. B. STRAUB, *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, 1 (1948) 150.
- ¹⁸ R. F. STEINER, K. LAKI UND S. SPICER, *J. Polymer. Sci.*, 8 (1952) 23.
- ¹⁹ S. ASAKURA, K. HOTTA, N. IMAI, T. OOI UND F. OOSAWA, *The International Conference on the Chemistry of Muscular Contraction*, Tokyo, October, 1957.
- ²⁰ A. SZENT-GYÖRGYI, *The chemistry of Muscle Contraction*, I. u. 2., 1947, 1951.
- ²¹ G. ULBRECHT, unveröffentlichte Versuche.
- ²² G. ULBRECHT UND M. ULBRECHT, *Biochim. Biophys. Acta*, 25 (1957) 100.
- ²³ F. JAISLE, *Biochem. Z.*, 321 (1951) 451.
- ²⁴ H. PORTZEHL, G. SCHRAMM UND H. H. WEBER, *Z. Naturforsch.*, 5b (1950) 61.
- ²⁵ M. ROCKSTEIN UND P. W. HERRON, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 1500.
- ²⁶ I. R. BENDALL AND C. L. DAVEY, *Biochim. Biophys. Acta*, 26 (1957) 94.
- ²⁷ W. E. COHN UND C. E. CARTER, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 4273.
- ²⁸ K. LAKI UND J. STANDAERT, *Arch. Biochem. Biophys.*, 86 (1960) 16.
- ²⁹ W. F. H. M. MOMMAERTS, *J. Biol. Chem.*, 188 (1951) 559.
- ³⁰ N. GRUBHOFFER, im Druck.