

BBA 46287

DER NUCLEOTIDAUSTAUSCH DES F-ACTIN IN KONTRAHIERTEN,
ERSCHLAFPTEN UND TOTENSTARREN FIBRILLEN IN
SEINER BEDEUTUNG FÜR DEN MOLEKULAREN MECHANISMUS DER
MUSKELKONTRAKTION

MARIANNE APPENHEIMER, DOROTHEE VON CHAK UND HANS H. WEBER

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

(Eingegangen am 17. September, 1971)

SUMMARY

Nucleotide exchange on the F-actin component of muscle fibrils in the states of contraction, relaxation, and rigor. The exchange as argument in the discussion of the contractile mechanism

1. Exchange of the bound nucleotide with added nucleotide is qualitatively the same in solutions of isolated F-actin and in fibrils for the states of contraction, relaxation, and rigor.

(a) Exchange with ATP is always coupled with ATP splitting.

(b) A momentary exchange is always continued by a delayed exchange; the kinetics of the exchanges are different.

(c) Amount and speed of the exchange increase with increasing concentration of added nucleotide but do not depend on the concentration of the free Mg^{2+} .

(d) Exchange with ATP is always significantly greater than the exchange with ADP.

2. The exchange of the bound nucleotide is quantitatively different in the different systems quoted.

(a) The exchange in extracted fibrils is greatest during contraction, significantly smaller during relaxation and significantly smallest during rigor.

(b) If F-actin is isolated according to our method of preparation the exchange of isolated F-actin with ATP is quantitatively equal to the exchange of contracted fibrils and the exchange with ADP is equal to the exchange of fibrils in rigor.

(c) The amount of exchange of extracted fibrils is well reproducible, but the exchange of isolated F-actin is rather different in different laboratories; apparently the amount depends on the treatment during preparation of the F-actin.

3. All results quoted are consistent and also are consistent with the nucleotide exchange observed in living muscle if it is supposed that the exchange takes place only at defectives sites of the double helix some of which exchange immediately and some of which only exchange under the influence of an additional factor (like concentration and type of the nucleotide added). This interpretation does not favour a physiological correlation of nucleotide exchange with muscle contraction.

Abkürzung: EGTA, ethyleneglycol-bis-(β -aminoethyl ether)- N,N' -tetraacetic acid.

(I) EINLEITUNG

Ausser dem Actin ist kein funktionelles Protein bekannt, dessen Komplexe mit ATP und ADP in Abhängigkeit von geringen Änderungen in der Konzentration physiologischer Salze spontan und reversibel polymerisieren. Der F-Actin-G-Actin-F-Actin-Übergang des Actin wurde deshalb immer wieder auf einen Zusammenhang mit der Muskelkontraktion diskutiert (z.B. Refn. 1-5). Dieser Zusammenhang blieb immer zweifelhaft, weil in lebenden Muskeln die notwendigen Änderungen in der Konzentration der Salze nicht vorkommen. Der Verdacht eines Zusammenhanges hat aber zu einem gesteigerten Interesse an solchen Phänomenen geführt, die als Argument für Polymerisation und Depolymerisation des Actin während des Kontraktionszyklus gedeutet werden können.

Als solches Phänomen wurde vielfach die Beobachtung diskutiert, dass die kontraktilen Systeme aus F-Actin und Myosin (F-Actomyosin in Gelen und Fibrillen) auf Zugabe von Triphosphonucleosiden (meist ATP) das actingebundene Nucleotid gegen freies Nucleotid in gewissem Umfang austauschen⁶⁻⁹. Denn es ist allgemein anerkannt, dass das Nucleotid im isolierten F-Actin blockiert ist¹⁰⁻¹⁴. Eine Deutung des Nucleotidaustausches in F-Actomyosin-Systemen als Indikator für eine gewisse (vorübergehende) Depolymerisation der Actinkomponente während der Kontraktion berücksichtigt aber folgende Tatsachen nicht:

(1) Auch in Lösungen von reinem F-Actin wird das gebundene Nucleotid mit ähnlicher Kinetik (unvollständiger "Momentan"-Austausch, anschliessend sehr langsamer "verzögerter" Austausch) gegen freies Nucleotid ausgetauscht wie in Actomyosin-Systemen (KAKOL UND WEBER¹⁵, MOOS *et al.*⁷, MOOS UND EISENBERG⁸, diese Arbeit).

(2) Actomyosin-Systemen tauschen das gebundene Nucleotid nicht nur gegen zugesetztes ATP während einer Kontraktion aus, sondern auch gegen zugesetztes ADP ohne Kontraktion (Ref. 8 und diese Arbeit).

(3) Der Nucleotidaustausch wird um so kleiner und unvollständiger, je besser die natürliche Anordnung der F-Actin-Filamente und Myosin-Filamente erhalten bleibt (Tabelle II), z.B. bei Ersatz künstlicher Actomyosin-Gele durch extrahierte Fibrillen (Ref. 6 und diese Arbeit) oder durch lebende Muskeln¹⁶. Doch sind solche Versuche über den Austausch durch Muskelfibrillen nur gelegentlich und unsystematisch gemacht worden.

Infolgedessen wird in dieser Arbeit untersucht, wie es mit dem Nucleotid-Austausch steht, wenn extrahierte, physiologisch geordnete Fibrillen des Skelettmuskels in eindeutig kontrahiertem, eindeutig erschlafte und eindeutig totenstarrem Zustand verglichen werden. Hierbei wird die Konzentration des ATP, des ADP und der Mg^{2+} systematisch variiert. Die gleichen systematischen Variationen der Zusätze werden ausserdem in Versuchen über den Nucleotidaustausch durch isoliertes F-Actin geprüft.

Die Ergebnisse dieser Prüfung werden als Mittelwerte der Einzelversuche, d.h. als weitgehend absolute Werte dargestellt, die statistisch auf Signifikanz kontrollierbar sind (vergl. IV). Denn die Reproduzierbarkeit des Nucleotidaustausches in allen Zuständen der Fibrillen ist immer gut. Auch die Reproduzierbarkeit der begleitenden F-Actin-Versuche ist ausreichend, wenn das F-Actin immer in gleicher Weise nach unserer Methode (vergl. VI) hergestellt wird.

(II) HERSTELLUNG UND KONTROLLE DER VERSCHIEDENEN ZUSTÄNDE DER FIBRILLEN

Muskelfibrillen sind immer dann erschlafft, wenn (bei einer Ionenstärke etwa 0.1) ATP und Mg^{2+} in physiologischer Konzentration anwesend sind und gleichzeitig die Konzentration der freien Ca^{2+} deutlich unter 10^{-7} M bleibt. Unter gleichen Bedingungen sind die Fibrillen maximal kontrahiert, wenn die Konzentration der freien Ca^{2+} etwa $5 \cdot 10^{-5}$ M ist¹⁷⁻¹⁹. In der Totenstarre befinden sich die Fibrillen, wenn ATP und gewisse verwandte Nucleotide ganz fehlen^{20,21}.

Die angegebenen Bedingungen für Kontraktion und Erschlaffung wurden in Suspensionen wasserglyzerinextrahierter Fibrillen durch "calcium ethyleneglycol-bis-(β -aminoethyl ether)- N,N' -tetraacetate" (Ca-EGTA) hergestellt. Ob unter diesen Bedingungen die Fibrillen tatsächlich maximal kontrahiert oder aber maximal erschlafft sind, wurde (1) chemisch durch Messung der ATPase Aktivität kontrolliert. Es ergab sich, dass bei Anwesenheit von $5 \cdot 10^{-5}$ M freien Ca^{2+} 1 mg Fibrilleneiweiss 0.3–0.4 μ Mol ATP pro Min spaltet und dass diese Spaltung im Calcium-Mangel (etwa 10^{-9} M freies Ca^{2+}) im Mittel auf 0.036 μ Mol ATP pro Min absinkt. Die erste Zahl ist charakteristisch für volle kontraktile Aktivität, die zweite Zahl ist charakteristisch für volle Erschlaffung des Actomyosin-Systems^{17, 22, 23}.

(2) Physikalisch wurde die kontraktile Aktivität in den beiden angegebenen Zuständen kontrolliert mit Hilfe des Volumens der zusammenzentrifugierten Fibrillen. Dieses Volumen ändert sich nicht, wenn den Fibrillen die angegebene Erschlaffungslösung zugesetzt wird, und nimmt um etwa 40 % ab auf Zusatz der Kontraktionslösung (Tabelle I). Diese Volumenabnahme des Anfangsvolumens unter Kontraktionsbedingungen bedeutet nach STRÖBEL²⁴ eine Verkürzung der Fibrillen auf 20–30 % der Standardlänge, d.h. eine maximale Verkürzung. Die fehlende Volumenabnahme unter Erschlaffungsbedingungen bedeutet analog fehlende Verkürzung oder vollständige Erschlaffung.

(3) Bei der Prüfung der Fibrillen auf Totenstarre muss ATP als Austauschpartner vermieden werden. Denn ATP als Austauschpartner würde den Zustand der Totenstarre beseitigen. Dagegen löst ADP im Gegensatz zu ATP die Dauerbindung zwischen Actin und Myosin (die Ursache der Totenstarre) dann nicht auf, wenn die

TABELLE I

KONTRAKTION UND ERSCHLAFUNG DER FIBRILLEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM pCa

Ansatz: $I = 0.115$; pH 7.0; 3 mg Fibrillen pro ml. $2 \cdot 10^{-2}$ M Ca-EGTA-Puffer; $3 \cdot 10^{-4} \rightarrow 1 \cdot 10^{-2}$ M Phosphat-Puffer; $3 \cdot 10^{-3} \rightarrow 1.5 \cdot 10^{-2}$ M Phosphocreatin plus Kinase.

Mg-ATP (M) (zugesetzt)	Volumen der Fibrillen* $\frac{\text{kontrahiert}}{\text{erschlafft}}$			$\frac{\text{Kontrahierte}}{\text{Standart}} \frac{\text{Länge} \times 100 (\%)}{(\text{nach STRÖBEL}^{24})}$
	Bei pCa = 9 (erschlafft)	Bei pCa = 4.3 (verkürzt)		
		Nach 1 Min	Nach 7 Min	
$1 \cdot 10^{-2}$	I	0.62	0.58	20-30
$3 \cdot 10^{-3}$	I	0.66	0.64	20-30
$1 \cdot 10^{-4}$	I	0.85	0.77	?

* Nach Zentrifugation mit $20000 \times g$ für 10 Min.

Konzentration der $\text{Mg}^{2+} < 10^{-5} \text{ M}$ ist (HASSELBACH²¹). Diese Hasselbach-Regel bestätigt sich auch für die Fibrillen unserer Versuche: Nach Auflösung der Fibrillen in 0.6 M KCl bleibt bei Magnesiummangel ($< 10^{-5} \text{ M}$) die hohe Viskosität der "natürlichen" Actomyosin-Lösung selbst in Gegenwart von 10^{-3} M ADP unverändert (Kurve 1 der Fig. 1).

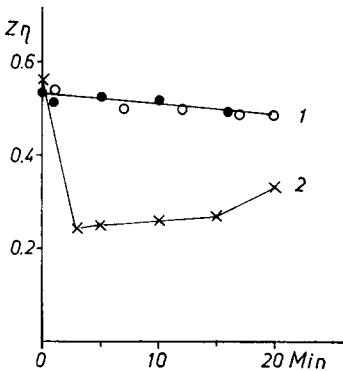


Fig. 1. Viskositätszahl von natürlichem Actomyosin bei Magnesium-Mangel. $l = 0.6$; pH 7; $\text{Mg}^{2+} < 10^{-5} \text{ M}$ (durch $3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ EDTA). Abzisse: Zeit in Min; Ordinate: Viskositätszahl, $Z\eta$ ($= 0.1 [\eta]$; $[\eta]$ = wesentliche Viskosität). Kurve 1, $1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ADP (●) und $5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ADP (○); Kurve 2, $2.5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ATP (×).

Bei gleichem Magnesiummangel setzt $2.5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ATP die Viskosität sofort um den Betrag herab, der für die volle Dissoziation von Actomyosin charakteristisch ist (Kurve 2 der Fig. 1). Da Actomyosin um so leichter dissoziiert, je höher die Ionenstärke ist, kann eine Dissoziation bei der Ionenstärke der Austauschversuche von etwa 0.1 (anstatt von 0.6) mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Also sind die Fibrillen mit ADP als Austauschpartner totenstarr.

(III) DIE QUALITATIVE ÜBEREINSTIMMUNG DES NUCLEOTID-AUSTAUSCHES FÜR ALLE ZUSTANDSFORMEN DES F-ACTIN

Austausch des freien Nucleotid mit dem an F-Actin gebundenen Nucleotid ist qualitativ immer gleichartig und unabhängig davon, ob es sich um reines F-Actin oder aber um F-Actin in erschlafften, kontrahierten oder totenstarrten Fibrillen handelt:

(1) Der Austausch des F-Actin-gebundenen Nucleosiddiphosphates gegen freies Nucleosidtriphosphat ist immer mit der Abspaltung des γ -Phosphats verbunden. Dies gilt für spontanen Austausch^{7,8,15} wie für Austausch, der durch Ultraschall erzwungen ist^{9,15,25-27}. Aus der vorliegenden Arbeit ergibt sich ferner das gleiche auch für F-Actin, das in erschlaffte, kontrahierte und totenstarre Fibrillen eingebaut ist. Denn es werden durch den Austausch gleich viele gezeichnete Atome des ATP auf die Fibrillen übertragen, wenn das zugesetzte ATP einerseits durch ein ^{14}C und andererseits durch zwei —auf β - und γ -Phosphat gleichmässig verteilte— ^{32}P gezeichnet ist (vergl. Fig. 2 mit Einsatz). Also muss beim Austausch ein ^{32}P (das γ - ^{32}P) des ATP abgespalten worden sein.

(2) Immer folgt einem schnellen Austausch in etwa der ersten Minute (Einzelheiten siehe VI), dem "Momentanaustausch" ein sehr langsamer Austausch, der "verzögerte Austausch". Der "verzögerte" Austausch ist anscheinend auch nach 24 Std noch nicht ganz abgeschlossen (Fig. 2 und Einsatz).

Der momentane Austausch ist nicht etwa der steile Anfangsteil einer einheitlichen Zeitaustauschkurve. Denn "momentaner" und "verzögerter" Austausch folgen

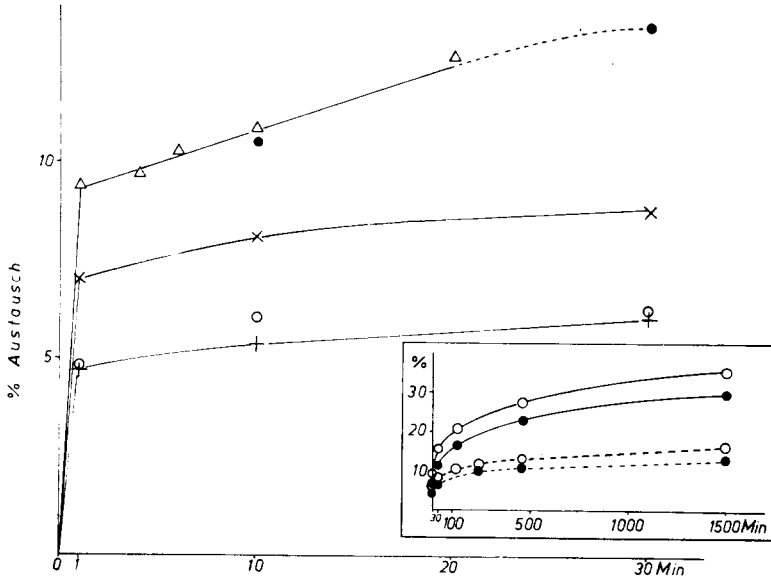


Fig. 2. Zeitaustauschkurven des F-Actin-Nucleotid mit ATP und ADP in Fibrillen und isolierten F-Actin-Präparaten. $I = 0.115$; pH 7. Abzisse: Zeit in Min; Ordinate: Austausch in % des gebundenen Nucleotid (Mittelwerte). Oberste Kurve, durch kontrahierte Fibrillen Δ und durch isoliertes F-Actin (\bullet) (gegen 10^{-3} M ATP); Mittlere Kurve, durch erschlaffte Fibrillen (\times) (gegen 10^{-3} M ATP); Unterste Kurve, durch totenstarre Fibrillen ($+$) und isoliertes F-Actin (\circ) (gegen 10^{-3} M ADP). Einsatz: Austausch mit $1 \cdot 10^{-3}$ M (\bullet) und $3 \cdot 10^{-3}$ M (\circ) Nucleotid durch F-Actin gegen ATP (—) (oberes Kurvenpaar, Einzelversuche) und durch totenstarre Fibrillen gegen ADP (---) (unteres Kurvenpaar, Doppelversuche). Beachte: gleicher Austausch während der ersten 30 Min in der Abbildung (Markierung der Nucleotide durch ^{32}P) und im Einsatz (Markierung durch ^{14}C).

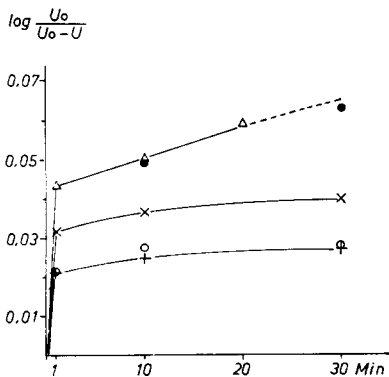


Fig. 3. Die gleichen Versuche und gleichen Symbole wie in Fig. 2, aber statt mit der Ordinate U/U_0 mit der Ordinate $\log U_0/(U_0 - U)$.

einer verschiedenen Kinetik: Der scharfe Knick der Austauschkurve nach der ersten Minute (d.h. nach dem "Momentanaustausch") verschwindet nicht, wenn die Ordinate der Fig. 2 (U/U_0) in die Ordinate $U_0/(U_0-U)$ oder aber die Ordinate $\log U_0/(U_0-U)$ verwandelt wird (Fig. 3) (U_0 , Gesamtmolarität der austauschfähigen Gruppen; U , Molarität der im Versuch zu dem gegebenen Zeitpunkt tatsächlich ausgetauschten Gruppen). Der Knick müsste aber in einem der beiden Fälle verschwinden, wenn der Momentanaustausch der steile Anfangsteil einer einheitlichen Reaktion entweder erster oder zweiter Ordnung wäre*. Der scharfe Knick der Austauschkurve verschwindet auch nicht, wenn für U_0 statt des höchstmöglichen Wertes (Gesamtmolarität des gebundenen Nucleotid) der kleinstmögliche Wert eingesetzt wird, d.h. die Molarität der Gruppen, die tatsächlich im Laufe von 24 Std ausgetauscht werden.

Mehr kann über die Kinetik nicht gesagt werden, weil der Momentanaustausch zu schnell und der verzögerte Austausch zu langsam verläuft, um z.B. die genaue Kinetik der beiden Einzelprozesse zu messen.

(3) Der Austausch gegen ATP und ADP durch F-Actin und Fibrillen steigt immer mit steigender Konzentration des Nucleotid (Figs. 4, 5 und 6).

(4) Der momentane Nucleotidaustausch ist für ATP unter gleichen Bedingungen signifikant grösser als für ADP, das von ATP völlig rein ist** (Fig. 5, vergl. auch Fig. 2). Ob das gleiche auch für den verzögerten Austausch gilt, ist unsicher (Figs. 2 und 6).

(5) Der Nucleotidaustausch ist von der Konzentration der freien Mg^{2+} unabhängig (geprüft zwischen $3 \cdot 10^{-6}$ M und $5 \cdot 10^{-3}$ M Mg^{2+}), falls der Austausch auf das gesamte zugesetzte Nucleotid bezogen wird. Dies zeigt Fig. 4c für erschlaffte Fibrillen. Dagegen wird der Austausch auch von der Konzentration der freien Mg^{2+} abhängig, wenn er nicht auf das gesamte zugesetzte Nucleotid, sondern entweder auf die Konzentration der freien Nucleotid-Ionen oder auf die Konzentration der Mg-Nucleotid-Komplex-Ionen bezogen wird, die im Gleichgewicht mit den angegebenen Konzentrationen der freien Mg^{2+} entstehen (Figs. 4a und 4b). Mit der Abzisse "Mg-Nucleotid-Komplex" liegen die Austauschkurven um so höher, je niedriger die Mg^{2+} -Konzentration ist, während es für die Abzisse "freies Nucleotid" umgekehrt ist. Ausserdem liegen alle Austauschkurven der Fig. 4a und 4b höher als die Austauschkurve 4c, die auf die Konzentration des gesamten zugesetzten Nucleotid bezogen ist. Beides muss so sein. Denn beide Unterschiede von a und b gegenüber c beruhen auf einer Verschiebung der gemessenen Austauschgrößen auf Abzissenwerte, die für den Anteil "freie Nucleotid-Ionen" oder aber "Mg-Nucleotid-Komplex" kleiner sind als für die Abzisse Gesamtnucleotid. Diese Verschiebung ist natürlich für den Mg-Nucleotid-Komplex um so grösser und für freies Nucleotid um so kleiner, je niedriger die Mg^{2+} -Konzentration ist. Für F-Actin ergibt sich sowohl mit ATP wie mit ADP genau das gleiche Verhalten.

Es ist unerwartet, dass das freie Nucleotid und der Nucleotid-Mg-Komplex auf den Austausch gleich wirken. Andererseits ist dieser Befund die Voraussetzung für den Vergleich des Austausches zwischen totenstarren und nicht totenstarren

* Anm.: Eine bimolekulare Kinetik des Austausches ist von vornherein unwahrscheinlich. Denn die Konzentration des zugesetzten Nucleotid übertrifft die Konzentration des Actin-gebundenen Nucleotid um mindestens das 100-fache. Die Konzentration des zugesetzten Nucleotid bleibt also trotz des Austausches praktisch konstant. Auch wird das zugesetzte Nucleotid in allen Versuchen mit reinem F-Actin und in allen Versuchen mit ADP nicht gespalten.

** Anm.: Das käufliche ADP enthielt immer etwa 2 % an ATP (vergl. VI).

Fibrillen; denn Fibrillen sind in Gegenwart von ADP nur totenstarr, wenn die Konzentration des Mg^{2+} 10^{-5} M nicht überschreitet²¹.

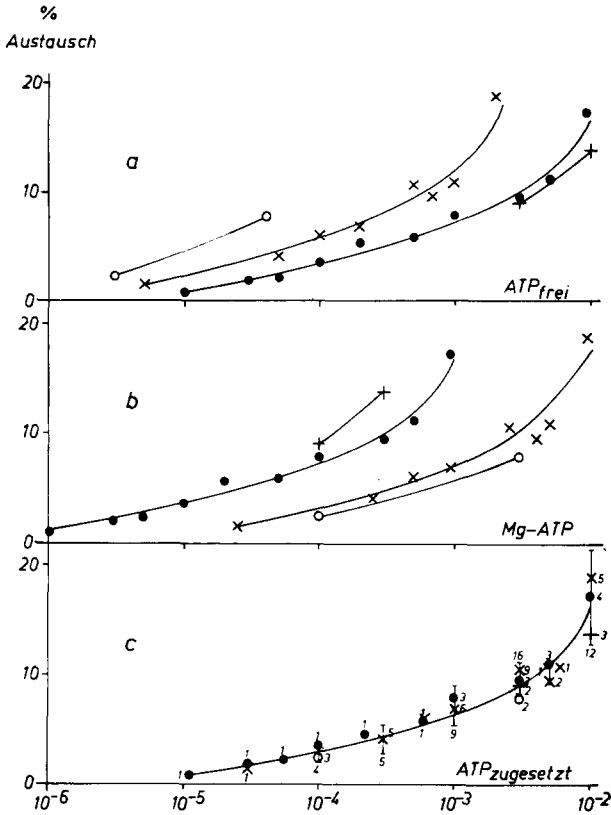


Fig. 4. Abhängigkeit des Austausches erschlaffter Fibrillen von der Konzentration des Mg^{2+} und des ATP (Momentanaustausch). $I = 0.115$; pH 7. Abzisse: (a) berechnet für die freien ATP-Ionen, (b) für die Mg-ATP-Komplex-Ionen, (c) für die Summe beider Ionen (= zugesetztes ATP) der gleichen Versuchsreihe. Ordinate: Austausch des Nucleotid in % des gebundenen Nucleotid. In (a), (b) und (c) sind die gleichen Versuche dargestellt mit den Konzentrationen der freien Mg^{2+} $5 \cdot 10^{-3}$ M (\circ), $5 \cdot 10^{-4}$ M (\times), $1 \cdot 10^{-5}$ M (\bullet) und $3 \cdot 10^{-6}$ M ($+$). Die Zahl der Versuche und die resultierende Standardabweichung sind nur in (c) angegeben.

(IV) DIE QUANTITATIVEN UNTERSCHIEDE ZWISCHEN ISOLIERTEM F-ACTIN, ERSCHLAFTEN, KONTRAHIERTEN UND TOTENSTARREN FIBRILLEN

Die Darstellung der gut reproduzierbaren Resultate als Mittelwerte gestattet deren Signifikanz mit Hilfe des t -Testes statistisch zu prüfen (vergl. VI, E). Die Ergebnisse dieser Prüfung werden im folgenden berücksichtigt.

Momentanaustausch. Die Fig. 5 bringt in drei Kurven den Nucleotidaustausch durch kontrahierte (Kurve 1), erschlaffte (Kurve 2) und totenstarre (Kurve 3) Fibrillen in ihrer Abhängigkeit von der Nucleotid-Konzentration. Alle auf diesen Kurven liegenden gemittelten Messwerte für den Austausch durch Fibrillen (Δ , \times , $+$) und durch isoliertes F-Actin (\bullet , \circ) sind signifikant verschieden (a) im Hinblick auf

die Abhängigkeit des Austausches von der Nucleotid-Konzentration im Verlaufe der gleichen Kurve und (b) im Hinblick auf die Unterschiede zwischen den drei verschiedenen Kurven. Der Austausch und sein Zuwachs mit der Nucleotid-Konzentration sind also signifikant am grössten, wenn die Fibrillen sich kontrahieren und am kleinsten, wenn sie totenstarr sind. Der Austausch des isolierten F-Actin mit ATP deckt sich praktisch mit dem Austausch der kontrahierten Fibrillen, während sich der Austausch des F-Actin mit ADP praktisch mit dem Austausch der totenstarrten Fibrillen deckt.

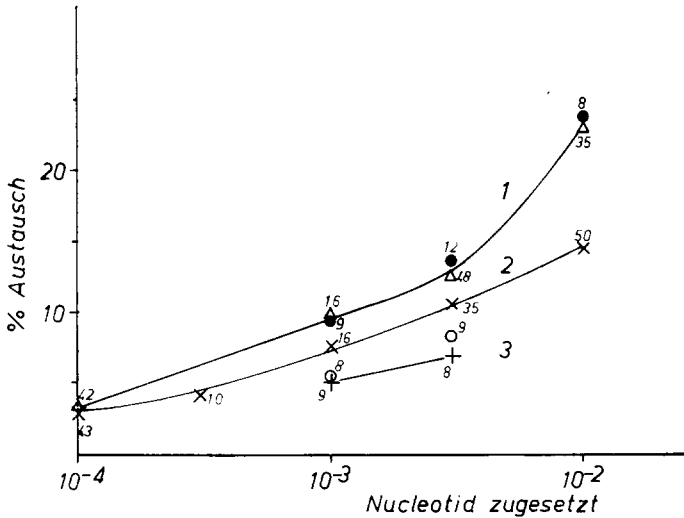


Fig. 5. Abhängigkeit des Nucleotidaustausches von der Art und Konzentration der Nucleotide und vom Funktionszustand der Fibrillen. $I = 0.115$; pH 7. Abzisse: Konzentration des zugesetzten Nucleotid. Ordinate: Austausch gegen ATP oder ADP in % des gebundenen Nucleotid (während der erste Minute). Kurve 1, kontrahierte Fibrillen (Δ) und isoliertes F-Actin (\bullet) mit ATP; Kurve 2, erschlaffte Fibrillen (\times) mit ATP; Kurve 3, totenstarre Fibrillen ($+$) und isoliertes F-Actin (\circ) mit ADP. Die Versuchspunkte sind Mittelwerte. (Die Zahl der Einzelwerte ist für jeden Mittelwert angeschrieben.) Alle Unterschiede (vergl. Text) sind signifikant für $P = 0.01$.

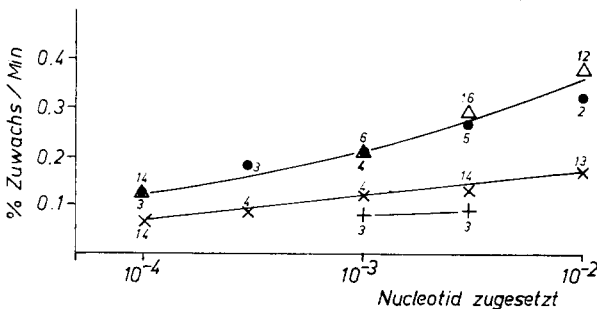


Fig. 6. Geschwindigkeit des verzögerten Austausches unter den gleichen Bedingungen wie in Fig. 5. Abzisse: Nucleotid zugesetzt. Ordinate: Austausch pro Minute zwischen erster und zehnter Minute. Obere Kurve, kontrahierte Fibrillen (Δ) und isoliertes F-Actin (\bullet) unter ATP; mittlere Kurve, erschlaffte Fibrillen (\times) (ATP); untere Kurve, Fibrillen in Totenstarre ($+$) (ADP). Mittelwerte. (Die Zahl der Einzelversuche ist an die Mittelwerte angeschrieben.) Die Differenzen der Mittelwerte sind nicht signifikant für $P = 0.01$.

Es ist überraschend, dass der Nucleotid-Austausch des isolierten F-Actin grösser ist als der Austausch der erschlafften Fibrillen. Denn das F-Actin ist nicht nur in der gereinigten Präparation, sondern auch in der erschlafften Fibrille nicht mit dem Myosin verbunden. Offenbar ist das isolierte F-Actin labiler als das dissoziierte F-Actin innerhalb der Fibrille (vergl. dazu V).

Die Geschwindigkeit des verzögerten Austausches. Sie nimmt im Laufe der Versuchszeit langsam ab. In Fig. 6 wird die Austauschgeschwindigkeit für die ersten 9 Min nach dem Momentanaustausch angegeben—und zwar als Austausch pro Minute für kontrahierte, erschlaffte und totenstarre Fibrillen und für F-Actin mit ATP. Zunächst zeigt der Vergleich der Figs. 5 und 6, dass in der Minute des verzögerten Austausches 50–80mal weniger Nucleotid ausgetauscht wird als in der Minute des Momentanaustausches. Von diesem Unterschied abgesehen verläuft der verzögerte Austausch ebenso wie der Momentanaustausch: (1) Die Austauschgeschwindigkeit ist am grössten für kontrahierte Fibrillen, kleiner für erschlaffte Fibrillen und am kleinsten für totenstarre Fibrillen. (2) Die Austauschgeschwindigkeit ist gleich für kontrahierte Fibrillen einerseits und F-Actin mit ATP andererseits. (3) Die Austauschgeschwindigkeit steigt mit steigender Konzentration des zugesetzten ATP für kontrahierte Fibrillen stärker als für erschlaffte Fibrillen. (4) Die Austauschgeschwindigkeit steigt wenig oder gar nicht mit steigender ADP-Konzentration sowohl in der Totenstarre wie mit F-Actin. Alle diese Analogien sprechen für die Richtigkeit auch der Angaben über den verzögerten Austausch, obwohl diese Angaben infolge der Kleinheit des Austausches und infolge der kleinen Versuchszahlen statistisch nicht gesichert sind. Daher werden in Abschnitt V die Phänomene des Momentanaustausches und des verzögerten Austausches gemeinsam gedeutet.

(V) DIE BEDEUTUNG DES NUCLEOTID-AUSTAUSCHES

Wie schon MOOS *et al.*⁷ und MOOS UND EISENBERG⁸ betont haben und wie in dieser Arbeit bestätigt wird, hat der Nucleotid-Austausch im Actomyosinsystem mit der Kontraktion offenbar nichts zu tun. Denn ein Austausch ähnlicher oder gleicher Grösse tritt auch auf, wenn eine Kontraktion gar nicht stattfindet (1. mit isoliertem F-Actin, 2. mit dem Nucleotid ADP).

Darüber hinaus aber sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit dafür, dass der Austausch im wesentlichen ein Artefact ist: Denn es besteht kein Zweifel, dass der Nucleotid-Austausch in Fibrillen viel niedriger ist als in künstlichen Actomyosin-Gelen (Tabelle II). Wenn aber dieser Austausch eine gesetzmässige Begleiterscheinung der Bindung des Actin an das Myosin wäre, sollte man das Umgekehrte erwarten. Denn in den ungeordneten Flocken des künstlichen Actomyosin ist eine Actin-Myosin-Bindung nur da zu erwarten, wo sich Actin- und Myosin-Filamente berühren (d.h. nur an verhältnismässig wenigen Stellen). Dagegen sollte sich in den kontrahierten oder totenstarren Fibrillen die Assoziation fast über die ganze Länge der parallel geordneten Actin- und Myosin-Filamente erstrecken. Wenn trotzdem in den Fibrillen der Austausch viel kleiner ist als in dem künstlichen System, beweist das, dass in der Fibrille nur ein minimaler Anteil der Actomyosin-Bindungen austauscht. Infolgedessen sprechen die Angaben der Tabelle II dafür, dass der Austausch nur an defekten Stellen des F-Actin stattfindet. Denn in extrahierten Fibrillen (diese Arbeit) und auch in lebenden Fibrillen (MARTONOSI *et al.*¹⁶) ist zu erwarten, dass nur sehr

TABELLE II

ABHÄNGIGKEIT DES NUCLEOTID-AUSTAUSCHES VON DER FEINSTRUKTUR DER ACTOMYOSIN-SYSTEME
Bei niedriger Ionenstärke $I = 0.05-0.1$.

ATP (M)	Nucleotid-Austausch (% des gebundenen Nucleotid)							
	F-Actin		Actomyosin (super- präzipitiert)		Extrahierte Fibrillen (kontrahiert)		Lebende Faser	
	1 Min	10 Min	1 Min	10 Min	1 Min	10 Min	10 Min	
$0.5 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-4}$	5 ~ 13*	5.3 ~ 15*	— ~ 15*	— ~ 25*	3.0 —	3.5 —	— —	
$3 \cdot 10^{-3}$	13	15	~ 25**	~ 45**	12	14.5	~ 0***	

* MOOS UND EISENBERG⁷.

** SZENT GYÖRGYI UND PRIOR⁸.

*** MARTONOSI *et al.* (Ref. 16 und zwar extrapoliert nach Fig. 1).

wenige Defektstellen vorhanden sind oder sich während des Versuches bilden, während durch die eingreifende Isolierung des labilen F-Actin viele Defekte—und ausserdem je nach dem Präparationsverfahren verschieden viele Defekte—entstehen dürften.

Nach dieser Deutung wäre der Momentanaustausch ein Austausch an präformierten defekten Stellen des F-Actin und der verzögerte Austausch ein Austausch an defekten Stellen, die sich erst im Versuch bilden. Damit wäre erklärt, dass beide Arten des Austausches des isolierten F-Actin (bei allen ATP-Konzentrationen) wesentlich grösser sind als der Austausch des F-Actin, das in der erschlafften Fibrille ebenfalls nicht mit dem Myosin verbunden ist (vergl. Figs. 5 und 6). Ebenso wäre damit erklärt, dass im lebenden Muskel (MARTONOSI *et al.*¹⁶) ein Momentanaustausch überhaupt nicht auftritt (Tabelle II), während der verzögerte Austausch erhalten bleibt (Ref. 16, und zwar Fig. 1). Denn im lebenden Muskel ist eine Anhäufung der präformierten Defekte der F-Actin-Filamente nicht zu erwarten, weil etwaige Defekte fortlaufend repariert werden. Diese kontinuierliche Reparatur ist gleichzeitig die Ursache für den verzögerten Austausch, der auch im lebenden Muskel stattfindet¹⁶. Die tatsächlich beobachteten Austauschphänomene können allerdings nicht vollständig erklärt werden allein aus der Gegenüberstellung defekter und normaler Stellen der F-Actin-Filamente. Man braucht zur vollständigen Erklärung noch zusätzlich die Annahme, dass gewisse Actin-Defekte sofort und ohne weiteres zum Austausch führen, während geringere Defekte erst durch die Einwirkung eines zusätzlichen Faktors austauschfähig werden. Diese zusätzlichen Faktoren wären (a) die Art und Konzentration der zugesetzten Nucleotide und (b) der Funktionszustand (kontrahiert, erschlafft, totenstarr) der Fibrillen. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass der Funktionszustand (nach dem Vorschlag von MOOS *et al.*⁷ und MOOS UND EISENBERG⁸) den Austausch weitgehend beeinflusst durch verschiedene Grösse der inneren Spannung der Fibrillen (grosse Spannung bei Kontraktion, fehlende Spannung bei Erschlaffung und Totenstarre). Für den besonders niedrigen Austausch der totenstarrten Fibrillen muss ausserdem die Partnerschaft von ADP statt ATP eine Rolle spielen. Auch ist eine die Struktur

verfestigende Wirkung der starren, d.h. dauernden Verbindung von F-Actin und Myosin nicht unwahrscheinlich.

(VI) TECHNISCHER TEIL

(A) Eiweisspräparate

(1) Gereinigtes Actin wurde aus Aceton-Trockenpulver wie in früheren Arbeiten^{15,27,28} bei 3° als G-Actin extrahiert, partiell polymerisiert^{29,30} und ultrazentrifugiert. Der F-Actin-Niederschlag wurde dann in 0.1 M KCl *plus* Tris (pH 7) durch zweimaliges Homogenisieren und Abzentrifugieren gewaschen.

(2) Extrahierte Fibrillen wurden bei 3° hergestellt nach WEBER UND HASSELBACH³¹ mit folgenden Modifikationen: Um die sarkoplasmatischen Vesikel möglichst weitgehend zu entfernen, wurde (1) der zerkleinerte Muskel mit der Lösung extrahiert, die für die Isolierung der Vesikel üblich ist, d.h. mit 0.1 M KCl *plus* $2 \cdot 10^{-3}$ M EDTA *plus* $5 \cdot 10^{-3}$ M Phosphat-Puffer von pH 7. (2) Aus dem gleichen Grund wurden die Fibrillen nach der Trennung vom Bindegewebe (durch ein Haarsieb 2 mm²) 10mal (bei pH 7) mit einer Lösung von 0.1 M KCl *plus* $5 \cdot 10^{-4}$ M Cystein-Hydrochlorid (Schutz der SH-Gruppen) gewaschen (M. MAKINOSE, persönliche Mitteilung). Die gereinigten Fibrillen wurden in einem Gemisch von Glycerin und 0.1 M KCl-Lösung im Verhältnis 1:1 bei -15° aufbewahrt. Vor dem Versuch wurde das Glycerin mit 0.1 M KCl-Phosphat-Puffer (pH 7) ausgewaschen.

Die Actin- wie die Fibrillen-Präparate wurden auf einer Eiweiss-Konzentration von 3 mg/ml eingestellt. Dass die Konzentration des gereinigten Actin infolgedessen 6mal höher ist als die Actinkonzentration in den Fibrillen, wurde aus technischen Gründen in Kauf genommen: z.B. ist die Abtrennung der angegebenen Fibrillenmenge vom Überstand einfach, während die Abtrennung einer 6mal kleineren Actinmenge infolge des komplizierteren Verfahrens nicht mit genügender Ausbeute durchführbar wäre (vergl. D(4)). Gleichheit der Gesamtkonzentration an Protein in Fibrillen und Actinpräparaten scheint dagegen tragbar, weil die Ergebnisse mit reinem Actin mit den Ergebnissen an Fibrillen nur qualitativ verglichen werden (Abschnitt III).

(B) Nucleotid-Präparate

ATP und ADP stammten von P.L. Biochemical Inc. (U.S.A.) und Böhringer, Mannheim; soweit ATP und ADP mit ¹⁴C gezeichnet waren, wurden sie von Buchler und Co., Frankfurt bezogen. Das ADP wurde säulenchromatographisch von ATP-Spuren (etwa 2 %) gereinigt³², weil schon ATP-Spuren die Totenstarre stören. Die Elution erfolgte durch salzfreie 0.03 M HCl wie schon früher²⁷. Der KCl-Gehalt des ADP (infolge der anschliessenden Neutralisation) wurde bei allen Berechnungen berücksichtigt. Die Vollständigkeit der Beseitigung des ATP wurde (1) säulenchromatographisch und (2) durch unveränderte Viskosität von Actomyosin-Lösungen nach Zusatz des gereinigten ADP bestätigt (z.B. Fig. 1).

ADP und ATP wurden in folgender Weise mit ³²P gezeichnet: Zunächst wurde [γ -³²P]ATP nach GLYNN UND CHAPPELL³³ hergestellt. Dann wurde dieses im γ -Phosphat gezeichnete ATP mit Myokinase und einem Unterschuss an AMP versetzt. Im Reaktionsgleichgewicht entsteht dann [β -³²P]ADP und ein ATP, das im β - und γ -Phosphat gleichmässig durch ³²P gezeichnet ist. Dies wurde nach säulenchromato-

graphischer Trennung von ADP und ATP geprüft (durch Spaltung des ATP mit Myosin).

(C) Bestimmungen

(1) Der Stickstoff des F-Actin wurde mit Biuret, der Stickstoff der Fibrillen immer nach Kjeldahl bestimmt.

(2) Bestimmung der ATPase-Aktivität in den verschiedenen Zuständen der Fibrillen erfolgte nach ROCKSTEIN UND HERRON³⁴.

(3) Viskositätsbestimmungen bei 15° in Viscosimetern mit einer Durchlaufzeit von etwa 50 Sec.

(4) Alle pH-Werte wurden elektrometrisch kontrolliert.

(5) Die Volumina der präzipitierten und superpräzipitierten Fibrillen wurden gravimetrisch bestimmt nach Zentrifugation mit $20\,000 \times g$ für 10 Min.

(6) Gebundene Nucleotide: Nach Entfernung der freien Nucleotide wurde das gebundene Nucleotid durch HClO_4 -Fällung freigesetzt und im Überstand bestimmt.

(a) Gesamtnucleotid im neutralisierten Überstand spektrophotometrisch bei 260 nm.

(b) Der isotonenmarkierte Anteil im sauren Überstand durch Zählung der Stösse in 1 ml über 10 Min im Packard Szintillationszähler im Dioxan-Omnifluor-Gemisch. Die spezifische Aktivität der Stammlösung der ^{14}C -Nucleotide betrug 0.02 C/Mol. Bei der Verwendung der $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]$ - und $[\beta,\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -Nucleotide wurde die spezifische Aktivität durch wechselnde Verdünnung mit unmarkierten Nucleotiden so eingestellt, dass das Ergebnis der Zählungen nie 2000 Stösse unterschritt (trotz der kurzen Halbwertszeit des ^{32}P und der 100fachen Variation der Nucleotidkonzentration, speziell in den Versuchsreihen mit ^{32}P -Nucleotiden).

Der Anteil des gezeichneten Nucleotid am gesamten gebundenen Nucleotid wird in % angegeben.

(D) Versuchsansätze

(1) Alle Versuche fanden bei Zimmertemperatur statt (22–24°). Die Ionenstärke I betrug immer 0.115, die Eiweisskonzentration immer 3 mg/ml, und das pH war immer etwa 7.

(2) Die Konzentrationen der freien Mg^{2+} , der freien ATP- und ADP-Ionen und der Magnesium-Komplexe der Nucleotide wurden mit den Assoziationskonstanten dieser Ionen von MARTELL UND SCHWARZENBACH³⁵ berechnet. Extrem kleine Konzentrationen der freien Mg^{2+} wurden durch Mg-EDTA-Puffer hergestellt (z.B. $2 \cdot 10^{-6}$ M Mg^{2+} in den Versuchen mit totenstarren Fibrillen).

In den Ansätzen mit kontrahierten und erschlafte Fibrillen wurde die ATP-Konzentration durch Zugabe von Phosphokinase und Phosphokreatin konstant gehalten.

(3) Ca-EGTA-Puffer fixierten das pCa auf 9 (Erschlaffung) oder auf 4.3 (Kontraktion).

(4) Beendigung der Austauschperiode: (a) In F-Actin-Lösungen durch Absorption der freien Nucleotiden durch Zugabe von Dowex. Anschliessend wurden die letzten Nucleotid-Spuren aus dem actinhaltigen Überstand durch zweimalige Abtrennung des F-Actin mit $120\,000 \times g$ entfernt. (b) Die Fibrillen wurden am Schluss der Austauschperiode vom nucleotidhaltigen Überstand mit $20\,000 \times g$ abzentrifu-

giert (10 Min lang). Da bereits nach 1–2 Min der Zentrifugation die Fibrillen so dicht gepackt sind, dass ein nennenswerter Austausch nicht mehr stattfinden kann, dauerte der Austausch der Fibrillen tatsächlich nur 1–2 Min länger als angegeben und als die analogen Austauschperioden des F-Actin. Doch spielt diese Zeitdifferenz sogar bei der Messung des Momentanaustausches keine Rolle, weil der Austausch nach der ersten Minute 50–100mal langsamer verläuft als in der ersten Minute.

Die Fibrillen wurden unmittelbar vor der Analyse, ebenso wie das F-Actin, gewaschen—aber 3mal.

(E) Berechnung der Signifikanz der Ergebnisse

Die Signifikanz der Unterschiede im Nucleotidaustausch (1) durch kontrahierte, erschlaffte und totenstarre Fibrillen und (2) in ihrer Abhängigkeit von der Konzentration der Nucleotide wurde berechnet für die zusammenfassende Darstellung der Fig. 5.

Die Berechnung erfolgte mit Hilfe des *t*-Testes ohne Annahme gleicher Varianzen für $P = 0.01$.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Der Austausch des gebundenen Nucleotid gegen zugesetztes Nucleotid ist in kontrahierten, erschlafften und totenstarren Fibrillen sowie im isolierten F-Actin-System qualitativ gleich.

(a) Der Austausch mit zugesetztem ATP verläuft immer unter Abspaltung des γ -Phosphats.

(b) Ein Momentanaustausch ist gefolgt von einem verzögerten Austausch; die Kinetik der beiden Austauschperioden ist verschieden.

(c) Grösse und Geschwindigkeit des Austausches steigen mit wachsender Konzentration des zugesetzten Nucleotid, aber sind unabhängig von der Konzentration der freien Mg^{2+} .

(d) Der Austausch mit ATP ist immer signifikant grösser als mit ADP.

2. Quantitativ ist der Austausch in den angeführten Systemen verschieden:

(a) Er ist in extrahierten Fibrillen am grössten während des kontrahierten Zustandes, signifikant kleiner während der Erschlaffung und signifikant am kleinsten während der Totenstarre.

(b) Wenn das F-Actin nach unserem Verfahren hergestellt wird, gleicht der Austausch des isolierten F-Actin mit ATP quantitativ dem Austausch der kontrahierten Fibrillen und der Austausch des F-Actin mit ADP quantitativ dem Austausch der totenstarren Fibrillen.

(c) Der Austausch in extrahierten Fibrillen ist gut reproduzierbar, der Austausch im isolierten F-Actin-System ist dagegen in verschiedenen Laboratorien verschieden; er hängt offenbar vom Präparationsverfahren ab.

2. Alle Befunde passen untereinander zusammen und passen auch zu dem Austausch im lebenden Muskel unter der Annahme, dass der Austausch sich auf defekte Stellen der F-Actin-Doppelspirale beschränkt und der zusätzlichen Annahme, dass gewisse defekte Stellen ohne weiteres austauschen, während andere defekte Stellen erst durch einen zusätzlichen Faktor (z.B. Konzentration und Art der zugesetzten Nucleotide) austauschfähig werden. Diese Deutung spricht gegen einen

Zusammenhang des Nucleotidaustausches der Actomyosin-Systeme mit dem Kontraktionsvorgang der Muskeln.

DANK

Wir sind Herrn Dozenten Dr. M. Makinose (physiologische Abteilung des Max-Planck-Instituts für medizinische Forschung, Heidelberg) für wertvolle methodische Ratschläge äusserst dankbar. Wir danken ausserdem Frau Inge Plumbohm-Schäfer für sorgfältige und umsichtige Hilfe bei der Ausführung von Versuchen.

LITERATUR

- 1 A. SZENT-GYÖRGYI, *Acta Physiol. Scand.*, 9, Suppl. 25 (1945).
- 2 F. B. STRAUB UND G. FEUER, *Biochim. Biophys. Acta*, 4 (1950) 455.
- 3 W. F. H. M. MOMMAERTS, in *Phosphorus Metabolism*, Vol. 1, John Hopkins Press, Baltimore, Md., 1951, S. 551.
- 4 F. D. CARLSON UND A. SIGER, *J. Gen. Physiol.*, 44 (1960) 33.
- 5 S. ASAKURA, M. TANIGUCHI UND F. OOSAWA, *J. Mol. Biol.*, 7 (1963) 55.
- 6 A. G. SZENT-GYÖRGYI UND G. PRIOR, *J. Mol. Biol.*, 15 (1966) 515.
- 7 C. MOOS, E. EISENBERG UND J. E. ESTES, *Biochim. Biophys. Acta*, 147 (1967) 536.
- 8 C. MOOS UND E. EISENBERG, *Biochim. Biophys. Acta*, 223 (1970) 221.
- 9 M. BÁRÁNY UND F. FINKELMANN, *Biochim. Biophys. Acta*, 78 (1963) 175.
- 10 S. V. PERRY, *Biochem. J.*, 57 (1954) 427.
- 11 W. HASSELBACH, *Biochim. Biophys. Acta*, 25 (1957) 562.
- 12 R. C. STROHMAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 32 (1959) 436.
- 13 A. MARTONOSI, M. A. GOUVEA UND J. GERGELY, *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 1700.
- 14 C. MOOS, *Biochim. Biophys. Acta*, 93 (1964) 85.
- 15 J. KAKOL UND H. H. WEBER, *Z. Naturforsch.*, 16b (1961) 1345.
- 16 A. MARTONOSI, M. A. GOUVEA UND J. GERGELY, *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 1707.
- 17 A. WEBER UND S. WINICUR, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 3198.
- 18 S. EBASHI, *J. Biochem. Tokyo*, 50 (1961) 236.
- 19 H. PORTZEHL, P. C. CALDWELL UND J. C. RÜEGG, *Biochim. Biophys. Acta*, 79 (1964) 581.
- 20 H. PORTZEHL, *Z. Naturforsch.*, 7b (1952) 1.
- 21 W. HASSELBACH, *Biochim. Biophys. Acta*, 20 (1956) 355.
- 22 H. PORTZEHL, P. ZAORALEK UND J. GAUDIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 189 (1969) 429.
- 23 H. PORTZEHL, P. ZAORALEK UND J. GAUDIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 189 (1969) 440.
- 24 G. STRÖBEL, *Z. Naturforsch.*, 7b (1952) 102.
- 25 S. ASAKURA, *Biochim. Biophys. Acta*, 52 (1961) 65.
- 26 S. ASAKURA, M. TANIGUCHI UND F. OOSAWA, *Biochim. Biophys. Acta*, 74 (1963) 140.
- 27 D. T. SEIDEL, D. V. CHAK UND H. H. WEBER, *Biochim. Biophys. Acta*, 140 (1967) 93.
- 28 R. IYENGAR UND H. H. WEBER, *Biochim. Biophys. Acta*, 86 (1964) 543.
- 29 J. GERGELY, M. A. GOUVEA UND M. MARTONOSI, *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 1704.
- 30 W. DRABIKOWSKI UND J. GERGELY, *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 3412.
- 31 A. WEBER UND W. HASSELBACH, *Biochim. Biophys. Acta*, 15 (1954) 237.
- 32 W. E. COHN UND C. E. CARTER, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 273.
- 33 I. M. GLYNN UND J. B. CHAPPELL, *Biochem. J.*, 90 (1964) 147.
- 34 M. ROCKSTEIN UND P. W. HERRON, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 1500.
- 35 A. E. MARTELL UND G. SCHWARZENBACH, *Helv. Chim. Acta*, 39 (1956) 655.

Biochim. Biophys. Acta, 256 (1972) 681–694