

Aucune de ces dernières préparations n'a jamais présenté les moindres propriétés vectorielles vis-à-vis de la lumière polarisée, ni négative ni positive.

M. DUBUSSON et C. FABRY-HAMOIR

Laboratoire de biologie générale de l'Université de Liège, le 15 novembre 1949.

Summary

It is true that after having extracted the myosin, actomyosin, and actin components of a striated muscle, it is possible to obtain still other proteins when Weber's urea solution is used. We could not confirm that those proteins are of a fibrillary nature: their solution never showed negative or positive double refraction of flow.

Sur la polymérisation de la G-actine

Dans un récent travail¹, nous avons signalé que la polymérisation de la G-actine, sous l'influence de sels de K ou de Ca (phénomène décrit pour la première fois par STRAUB²) était accompagnée d'un changement appréciable du point isoélectrique de la protéine, comme le démontrent les différences de vitesses électrocinétiques entre les solutions de G-actine et de F-actine ainsi que la libération d'équivalents acides au moment de la polymérisation.

STRAUB signalait simultanément³ que la G-actine contient toujours environ 1% d'ATP, sous une forme combinée et que, lors de la transformation G-actine-F-actine, cet ATP est transformé en ADP.

Ces résultats étaient intéressants à rapprocher des nôtres: on pouvait penser, *a priori*, que c'est à la libération de H_3PO_4 du groupement prosthétique (ATP) de l'actine qu'est due la libération d'équivalents acides et la modification de la vitesse électrocinétique de la protéine.

Nous avons pu confirmer que les préparations d'actine contiennent, outre une certaine proportion de phosphates, une certaine quantité d'ATP (de 0,6 à 2%, selon les échantillons d'actine: précipitation de la protéine par l'acide trichloracétique et dosage des phosphates, avant et après hydrolyse (7 minutes) par la méthode d'ALLEN, au photomètre). Mais la polymérisation de la G-actine par $CaCl_2$ (0,05 M) ne modifie en rien la distribution de ces phosphates: nous ne pouvons donc confirmer qu'elle s'accompagne de l'hydrolyse, en tout ou en partie, de l'ATP accroché à la G-actine. Ceci exclut la possibilité d'expliquer la libération d'équivalents acides par cette hydrolyse. D'ailleurs, il est aisément de calculer que si 1 g d'actine libère, lors de sa transformation en F-actine, $45 \cdot 10^{-5}$ Equiv. acides¹ – et si celle-ci est due à la transformation ATP—ADP – elle devrait correspondre, au $pH \sim 7,20$, à un taux de 33% d'ATP accroché à l'actine.

L'origine du changement du point isoélectrique de la G-actine au moment de sa polymérisation en F-actine reste donc indéterminée.

M. DUBUSSON et L. MATHIEU

Laboratoire de biologie générale, Faculté des sciences, Université de Liège, le 15 novembre 1949.

¹ M. DUBUSSON, First Int. Congress of Biochemistry, Cambridge, 1949, p. 132, et Bioch. et biophys. acta, sous presse.

² F. B. STRAUB, Stud. Inst. Med. Chem. Univ. Szeged 2, 3 (1942); 3, 23 (1943) et Hung. acta physiol. 1, 150 (1948).

³ F. B. STRAUB, First Int. Congress of Biochemistry, Cambridge, 1949, p. 127.

Summary

It is true that a certain amount of ATP is bound to the G-actin extracted by STRAUB'S method, but we could not confirm that ATP is hydrolysed when G-actin is transformed in F-actin.

The changes of isoelectric point when G-actin is polymerized in F-actin remain thus unexplained.

Über den Chemismus von Zustandsänderungen des Aktomyosins

Einleitung. Aus den Versuchen von H. H. WEBER¹ an Aktomyosinfäden, und von SZENT-GYÖRGYI² auch an Muskelfasern, geht deutlich hervor, daß Aktomyosin³ das kontraktile Element des Muskels ist. Da die Verwendung der Fäden gewisse Schwierigkeiten bietet, benutzen wir eine einfachere Methode, die quantitative, exakt reproduzierbare Messungen von Zustandsänderungen des Aktomyosins (AM) und den Einsatz der für chemische Untersuchungen notwendigen größeren Substanzmengen gestattet. Trotz Verwendung von unorientiertem Gel liefert sie für unsere Fragestellung die gleichen Ergebnisse wie Versuche mit Fadenknäueln (BUCHTHAL⁴).

Mit dieser Methode haben wir Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Ionen, von pH -Verschiebungen, von Adenylsäureabkömmingen und Phosphokreatin auf die «Kontraktion» und «Erschlaffung» des Aktomyosins unternommen (Kontraktion und Erschlaffung werden im folgenden im Sinn einer Volumenverringerung bzw. Vermehrung des Gels verwendet). Um die Beteiligung bestimmter Gruppen im AM bei der Kontraktion zu prüfen, haben wir ferner der Reihe nach SH^- , NH_2^- und $COOH$ -Gruppen blockiert.

Methodik. Eine genau abgemessene Menge Aktomyosingesel wird in kalibrierten Mikroröhrchen (1 cm³ Fassung) nach Zufügen von Magnesiumchlorid, Kaliumchlorid, Adenosintriphosphat (ATP) bzw. Adenylsäure (AS) und der zu untersuchenden Substanzen und Mischen bei 1500 Umdrehungen pro Minute 5 Minuten zentrifugiert; die Säulenhöhe des Gels im Vergleich zu dem Kontrollversuch gibt ein Maß für die erfolgte Zustandsänderung des AM (Abb. 1). Die Streuung der so erhaltenen Werte geht aus Abb. 2 hervor. Es ist gleichgültig, ob man vor dem Zentrifugieren 1/2 oder 10 Minuten wartet, ebenso ob man bei etwa 5° oder Zimmertemperatur arbeitet.

Wirkung von ATP, Magnesium und Kalium. Mit gleichem Ergebnis wie SZENT-GYÖRGYI⁵ erreichen wir eine optimale Kontraktion mit Konzentrationen von ATP bei $2 \cdot 10^{-6}$ mol/cm³, von Magnesium bei $2 \cdot 10^{-6}$ mol/cm³ (Abb. 3) und von Kaliumchlorid in einem Bereich von etwa 0,1 bis 0,05 mol/cm³. Bei etwa 0,2 M KCl vermag sich das AM-Gel auf ATP-Zugabe nicht mehr zu kontrahieren; entsprechend Verdünnen mit Wasser stellt die Kontrahierbarkeit wieder her (Abb. 4). Vielleicht geben diese Befunde eine Erklärungsmöglichkeit für das Vorhandensein von ATP in der ruhenden Muskelzelle⁶.

pH -Abhängigkeit der Kontraktion und Erschlaffung. Einen bemerkenswerten Einfluß auf die Kontraktion haben wir bei pH -Änderungen gesehen. Schon eine Verschiebung des pH im Reaktionsmilieu von 6,9, bei dem die oben geschilderten Grundversuche angestellt wurden, um wenige Zehntel- pH etwa nach 7,3, führte statt

¹ H. H. WEBER, Erg. Physiol. 36, 109 (1933).

² A. SZENT-GYÖRGYI, *Chemistry of Muscular Contraction*, Acad. Press, Inc., Publishers, New York, 1947, S. 73.

³ Identisch mit dem «wasserunlöslichen Myosin» der älteren Literatur.

⁴ F. BUCHTHAL, A. DEUTSCH, G. G. KNAPPEIS und A. MUNCH-PETERSEN, Acta physiol. Scand. 16, 326 (1949).

⁵ A. SZENT-GYÖRGYI, I.c., S. 36.

⁶ F. BUCHTHAL, A. DEUTSCH und G. KNAPPEIS, Nature 153, 774 (1944).

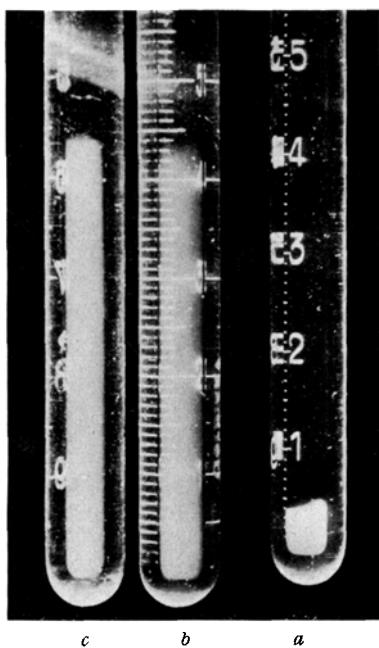


Abb. 1. Kontraktion von Aktomyosin-Gel durch ATP. Inhalt der Röhrchen:

a 0,5 cm³ Aktomyosin-Gel, 0,2 cm³ MgCl₂ (Endkonzentration 2 · 10⁻⁶ Äquiv./cm³), 0,2 cm³ ATP (Endkonzentration 2 · 10⁻⁶ Mol/cm³); p_H 6,9. - b Wie a, an Stelle von ATP Muskeladenylsäure (Endkonzentration 2 · 10⁻⁶ Mol/cm³). - c Wie a, an Stelle von ATP KH₂PO₄ (Endkonzentration 2 · 10⁻⁶ Mol/cm³).

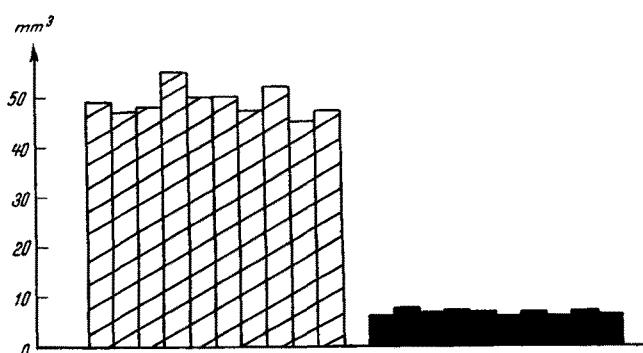


Abb. 2. Streuung der Werte. Schwarze Säulen Versuche mit ATP, schraffierte Säulen Kontrollversuche mit Muskeladenylsäure. Ordinaten: Volumen der Eiweißsäulen in mm³.

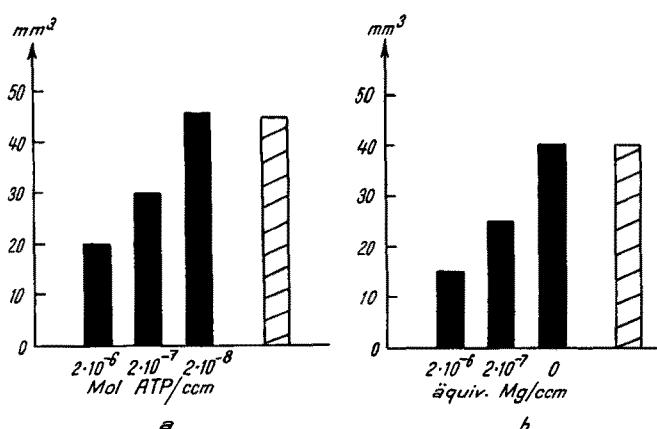


Abb. 3. Einfluß der ATP- und der Mg²⁺-Konzentration auf die Kontraktion. a 2 · 10⁻⁶ Äquiv. Mg/cm³; b 2 · 10⁻⁶ mol ATP/cm³.

zu einer Kontraktion auf ATP-Zugabe zu einer Streckung des Gels; dies ist eine Wirkung der Hydroxylionen, denn Natriumhydroxyd und Kaliumhydroxyd verhalten sich gleich (Abb. 5). Vielleicht steht diese Beobachtung in Parallele zu dem Befund DUBUSSONS¹, der eine Alkalisierung in der Phase der Erschlaffung des Muskels beobachtet hat. ATP kann also das AM nach Alkalisierung von einer Mittelstellung aus zur Erschlaffung bringen, nicht dagegen, wenn das Gel vorher durch ATP kontrahiert war. In diesem Fall ist eine Revision des Vorgangs nur durch Erhöhung der KCl-Konzentration bis zur Lösung des AM-Gels zu erreichen. Darauf folgende Überführung des Sols in Gel durch Verdünnen mit Wasser führt erneut zur Kontrahierbarkeit durch ATP (Abb. 6). Auch diese Vorgänge mögen zu den Verhältnissen im Muskel in Parallele stehen, wo gleichfalls durch K⁺-Verschiebungen² der Übergang von Gel in Sol und umgekehrt bewirkt wird. In unseren Versuchen sind diese Konzentrationsveränderungen allerdings absichtlich übertrieben; im physiologischen Milieu befindet sich das AM an der Grenze zwischen beiden Zuständen.

Übrigens ist das Lösen des kontrahierten Gels bei völligem Fehlen von Ca²⁺ erschwert und wird durch Zusatz von Ca²⁺ erleichtert. Ob dieser Mechanismus bei Entstehung und Beseitigung der Tetanie eine Rolle spielt, ist vorerst noch nicht zu entscheiden.

Nach 10 Minuten dauerndem Stehenlassen des Sols erhält man durch Fällung auch bei p_H 6,9 das unkontrahierte Gel; *kurzdauerndes Verbleiben* in gelöstem Zustand führt dagegen zu teilweise kontrahiertem Gel. Wir deuten diesen Befund mit der unvollständigen Zerstörung des verbliebenen ATP durch die ATP-ase-Wirkung des Aktomyosins. Nach Zusatz von Phosphokreatin ist die Kontraktion auch nach längerem Stehen des Sols noch zu beobachten. Das spricht für eine Resynthese des ATP oder eine Hemmung seines Abbaus.

Chemismus der Kontraktion. Es lag nahe, die Beteiligung von SH-Gruppen bei der Kontraktion anzunehmen, zumal schon SINGHER und BARRON³ bzw. BAILEY und PERRY⁴ auf deren Bedeutung für die ATP-ase-Wirkung, bzw. für die Aktin/Myosin-Bindung hingewiesen hatten. Das zunächst als SH-Reagenz verwendete Jod in Kaliumjodid war wegen sofort eintretender Denaturierung unbrauchbar; Ferricyanid denaturierte nicht, war aber in einer Konzentration von 2 · 10⁻⁶ mol pro cm³ ohne Einfluß auf die Kontraktion, während Quecksilberorganische Verbindungen wie *Salyrgan* (theophyllinfrei) oder *Esidron* in den gleichen Konzentrationen völlig hemmten. Daraus schließen wir, daß SH-Gruppen des ersten Typus (vielleicht benachbarte SH-Gruppen) keine Rolle spielen, während SH-Gruppen des zweiten Typus (vielleicht einzelständige SH-Gruppen) an der Kontraktion wesentlich teilhaben. Durch Cystein kann die Quecksilberhemmung völlig aufgehoben werden (Abb. 7).

Behandlung des AM mit Stickstofflöst bei p_H 6,7 hebt die Kontrahierbarkeit nicht auf. Nach Befunden von NORTHRUP⁵ tritt bei diesem p_H eine Blockierung vor allem der COOH-Gruppen ein; also ist deren Beteiligung an der Kontraktion wohl nicht wahrscheinlich.

Eine Blockierung der Aminogruppen durch Acylierung mittels Essigsäureanhydrid, Benzylesterkohlenstoffchlorid und Phenylisocyanat scheiterte an der eintrtenden Denaturierung des Aktomyosins; Benzaldehyd

¹ M. DUBUSSON, Exper. 3, 213 (1947); Arch. int. Physiol. 50, 203 (1940).

² L. HAHN und G. HEVESY, Acta physiol. Scand. 2, 51 (1941). - T. NOONAN, W. FENN, L. HAEGE, Amer. J. Physiol. 133, 254 (1941).

³ T. P. SINGER und E. S. G. BARRON, Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 56, 120 (1944).

⁴ K. BAILEY und S. V. PERRY, Biochem. et biophys. acta 1, 506 (1947).

⁵ R. M. HERRIOT, M. L. ANSON und J. H. NORTHRUP, J. gen. Physiol. 30, 187 (1946).

der im Gegensatz zu Formaldehyd nicht denaturierte, hemmte bei einer Konzentration von 10^{-6} mol/cm³ unvollständig, bei $2 \cdot 10^{-5}$ mol/cm³ vollständig (Abb. 8). Daß Benzaldehyd mit den Aminogruppen des AM reagiert, geht daraus hervor, daß nach Hinzufügen von Benzaldehyd zu AM und Bindung des überschüssigen

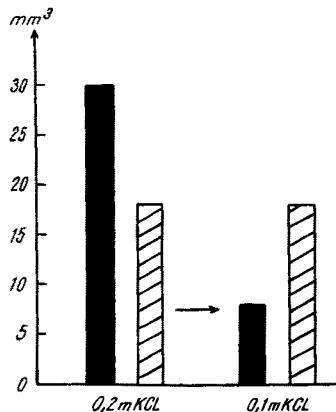


Abb. 4. Einfluß der KCl-Konzentration auf ATP-Wirkung.

Aldehyds mit Blausäure ATP dennoch nicht kontrahierte. Dagegen war ATP wirksam (seine Aminogruppen also intakt) nach Zugabe von blausäurebehandeltem Benzaldehyd; Blockierung der Aminogruppe im ATP verhindert nämlich seine Wirkung auf die Kontraktion. Auf eine Beteiligung von Aminogruppen an der Kontraktion weist auch die vollständige Hemmung durch Benzochinon ($2 \cdot 10^{-7}$ mol/cm³) hin; allerdings können bei der Chinonhemmung auch SH-Gruppen betroffen sein.

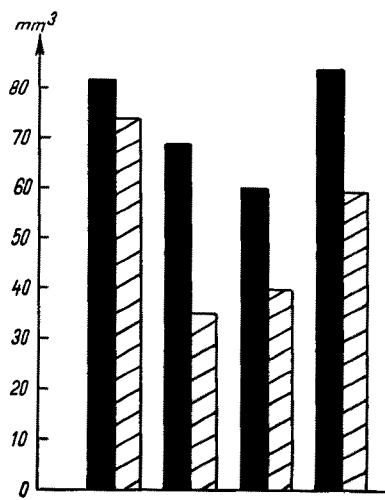


Abb. 5. Einfluß des p_H auf die ATP-Wirkung. Verhalten von 4 verschiedenen Aktomyosinpräparaten bei p_H 7,3.

ATP-ase. Im Zusammenhang mit den Untersuchungen über den Chemismus der Kontraktion haben wir auch die ATP-ase-Wirkung unter denselben Gesichtspunkten geprüft. Nach den Befunden von SZENT-GYÖRGYI¹ aktiviert Magnesium die ATP-ase des Aktomyosins, hemmt dagegen die des Myosins vollständig, die ihrerseits durch Kalzium aktiviert wird: man muß also zwischen der ATP-ase-Wirkung des Gels und des Sols unterscheiden. Beide ATP-ase-Wirkungen sind durch organische

Quecksilberverbindungen und durch Benzaldehyd reversibel zu hemmen; also ist für ihre Wirkung eine Beteiligung von SH- und Aminogruppen anzunehmen. Es ist auffällig, daß die Bedingungen für die Kontraktion denen der ATP-ase-Wirkung des AM, die Bedingungen für die Erschlaffung denen der ATP-ase-Wirkung des

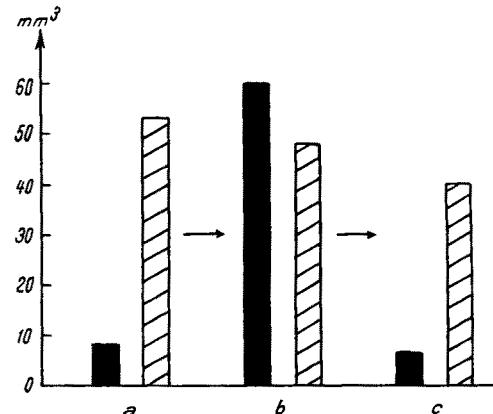


Abb. 6. Erschlaffung des kontrahierten Gels: a Kontraktion (0,05 m KCl, p_H 6,9). b Erschlaffung nach Lösen mittels 2 mol KCl (Endkonzentration 0,25 mol KCl) und Ausfällen des Gels mit Wasser (Endkonzentration 0,08 mol KCl), p_H 7,3. c Wiederkontraktion (0,08 mol KCl, p_H 6,9).

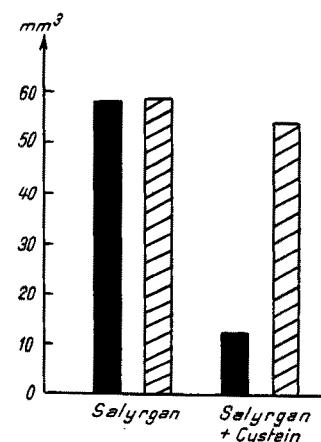


Abb. 7. Hemmung der Kontraktion durch Salyrgan (10^{-6} mol/cm³); Enthemmung durch Cystein ($2 \cdot 10^{-6}$ mol/cm³).

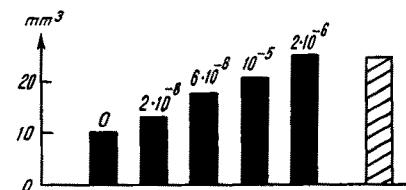


Abb. 8. Hemmung der Kontraktion durch Benzaldehyd (kalt gesättigte neutrale wäßrige Lösung).

Myosins entsprechen. Danach ist an die Möglichkeit einer ursächlichen Verknüpfung beider Vorgänge zu denken.

Wir danken Herrn Dr. H. J. ENENKEL und Frl. I. KÖHLER für die wertvolle Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

Für die Überlassung von ATP haben wir der Fa. Chemiewerk Homburg, von Muskeladenylsäure der Fa. Ernst Bischoff, Ivoryton,

¹ A. SZENT-GYÖRGYI, I.c., und zwar S. 55.

Connecticut, von theophyllinfreiem Salyrgan den Höchster Farbenwerken und von Stickstofflost der Fa. Ciba, Wehr i. Baden verbindlichst zu danken.

G. KUSCHINSKY und F. TURBA

Pharmakologisches Institut der Universität Mainz, den 15. Oktober 1949.

Summary

(1) By means of a simple method the conditions were investigated for contraction and relaxation of actomyosin (AM) under the influence of potassium, magnesium, and calcium ions, of adenosintriphosphate (ATP) or muscle-adenylic-acid and phosphocreatin.

(2) Raising the calcium chloride concentration to 0.2 m and raising the p_{H} from 6.9 to 7.3 hinders the contraction of actomyosin by ATP; in uncontracted AM-gel, ATP leads to a relaxation under these conditions.

(3) Relaxation of the contracted gel can be brought about by dissolving in potassium chloride and precipitating by dilution: calcium furthers this relaxation; afterward ATP leads again to a contraction.

(4) Remainders of ATP from the first contraction lead in this stage again to a partially contracted gel; phosphocreatin reinforces this effect.

(5) Certain SH-groups and amino groups, but not carboxyl groups, are involved in the production of the contraction.

(6) SH- and amino groups are also necessary for the ATP-ase effect. The relation of actomyosin-ATP-ase to contraction, of myosin-ATP-ase to relaxation is pointed out.

sondern auch durch andere «thioloprive» Substanzen gehemmt wurde. Allerdings wählten sie für das Studium dieser Frage Froschmuskelextrakt (Verdünnung 1:66), der 1% Glukose und außerdem die fraglichen Hemmsubstanzen enthielt. Nach MEYERHOF¹ ist aber die Milchsäurebildung aus Glukose in solchen Extrakten ohne Zusatz von Aktivatoren minimal. Die Milchsäure bestimmten die genannten Autoren nach 24 und 48 Stunden Inkubation – sie fanden noch am zweiten Tage erhebliche Milchsäurebildung.

Diese an Extrakten gewonnenen Ergebnisse auf die Verhältnisse im arbeitenden Muskel zu übertragen, schien mir gewagt. Es wurde daher versucht, die Hemmung der Milchsäurebildung nach einer Durchströmung mit den betreffenden Substanzen auch am unverehrten Muskel nachzuweisen.

Die Hinterextremitäten eben getöteter Sommerfrösche (*R. temporaria*) wurden von der Aorta her 2 Minuten lang mit Lösungen der «thiolopriven» und anderer kontrakturerregender Substanzen durchströmt. Die Technik entsprach der von LÄWEN² und TRENDLENBURG³ angegebenen. Nach der Durchströmung wurde die Hinterextremität sofort mit Öffnungsinduktionsstrom 10 Minuten lang gereizt. Die Muskeln gingen dabei in Starre über. Dann wurde die Muskulatur rasch abgeschnitten und bis zur Weiterverarbeitung in flüssiger Luft aufbewahrt. Nach genauer Wägung wurde etwa 1 g derselben im vorgekühlten Mörser mit Glas-pulver zu homogenem Brei verrieben, nach SCHENK entweißt, der vorhandene Zucker mit Kupfer/Kalk-Fällung entfernt und endlich die Milchsäure nach LIEB und ZACHERL⁴ bestimmt.

In der Erwartung, daß sich die von BACQ angegebenen Substanzen ähnlich verhalten würden wie die Monojodessigsäure, wurden noch Pharmaka untersucht, von denen eine Reaktion mit SH-Gruppen nicht anzunehmen ist. Coffein und Chloroform schienen geeignet, da sie unter den angeführten Bedingungen ebenfalls eine Muskelstarre hervorrufen. Von den sogenannten «thiolopriven» Substanzen wurden Chlorpikrin, Sublimat, Allylsenföl und Chloraceton ausgewählt. Als Vergleichsobjekt diente Monojodessigsäure. Die Konzentrationen der Durchströmungslösungen genügten in jedem Falle, eine Kontraktion der Muskeln auszulösen. Alle Lösungen waren mit Froschringer angesetzt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt, jeder Milchsäurewert bedeutet darin einen Einzelversuch:

2 Min. durchströmt mit	Elektr. Reizung	Milchsäure in mg%			
Ringerlösung allein	ungereizt	67	75	88	48
Ringerlösung allein	10'	214	184	201	190
Monojodessigsäure 3% ₀₀	10'	42	51	36	56
Allylsenföl 2% ₀₀	10'	186	205	198	184
Chloraceton 1% ₀₀	10'	196	179	188	210
Chloroform 1% ₀₀	10'	172	195	138	194
Coffein 1% ₀₀	10'	229	212	192	209
Sublimat 1% ₀₀	10'	137	146	170	153
Chlorpikrin 1% ₀₀	10'	277	223	245	234

Die aufgeföhrten Werte für die ungereizte, mit Ringerlösung durchströmte Muskulatur sind von der gleichen

¹ O. MEYERHOF, Biochem. Z. 178, 462 (1926) und ebendort 183, 178 (1927).

² A. LÄWEN, A. e. Phk. 51, 415 (1904).

³ P. TRENDLENBURG, Arch. ext. Pharm. 63, 161 (1910).

⁴ H. LIEB und M. K. ZACHERL, Z. physiol. Chem. 211, 211 (1932).

¹ Z. M. BACQ, Exper. 2, 349 (1946).

² Z. M. BACQ, Bull. Acad. Roy. Med. Belg. 2, 108 (1942).

³ E. LUNDSGAARD, Biochem. Z. 217, 162 (1930).

⁴ Z. M. BACQ und P. ANGENOT, C. r. Soc. biol. Paris 134, 105 (1940).