

Molekulargewichtsbestimmung von Kalbsherzmyosin

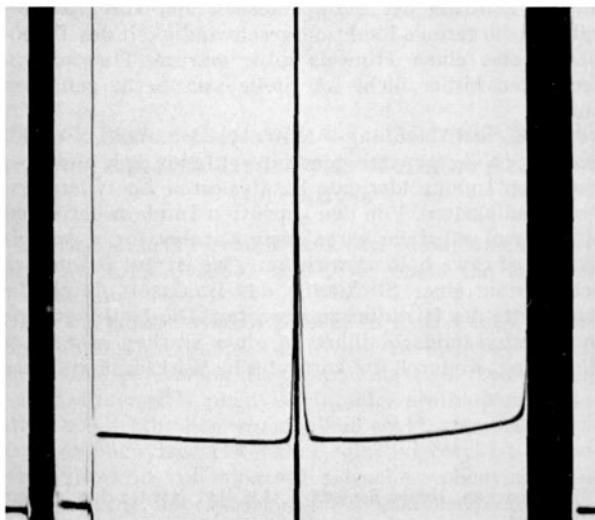
Während das Molekulargewicht des Skelettmuskelmyosins mit grosser Wahrscheinlichkeit im Bereich von 520 000 bis 600 000 liegt¹ und keine Daten bekannt sind, die auf wesentliche Speziesdifferenzen schliessen lassen, liegen wenige Untersuchungen über Herzmuskelmyosine vor. So ist weder bekannt, ob und wieweit Herzmuskelmyosin mit Skelettmuskelmyosin identisch ist, noch ob Herzmuskelmyosine verschiedener Spezies Unterschiede aufweisen. Sicher scheint nur, dass Herzmuskelmyosin eine geringere ATP-ase Aktivität aufweist als Skelettmuskelmyosin² und dass die Kinetik des tryptischen Abbaus verschieden ist, obschon sich die dabei entstehenden Meromyosine nicht unterscheiden lassen³. Während MUELLER et al.⁴ für Hundeherzmyosin ein Molekulargewicht von 530-540 000 ermittelten, publizierten BRAHMS und KAY⁵ einen Wert von 758 000. Mit einer Lichtstreuungsmethode erhielten GERGELY und KOHLER⁶ ein Molekulargewicht von 500 000 ± 10%. Für eine ausführliche Diskussion der Problematik sei auf die Arbeit von BRAHMS und KAY hingewiesen⁷.

Als Grundlage für pharmakologische Arbeiten über die Bindung von Ionen unter dem Einfluss herzwirksamer Glykoside⁸ führten wir Untersuchungen am Herzmuskelmyosin des Kalbes durch. Die wichtigsten Resultate seien hier mitgeteilt. Eine ausführliche Arbeit wird in den *Helvetica physiologica Acta* erscheinen.

Methoden. Myosin wurde aus frisch entnommenen Kalbsherzen nach der Methode von MUELLER et al.⁴ präpariert. Alle Lösungen wurden vor Gebrauch noch einmal bei 160 000 g während 2 h zentrifugiert und unter leichtem Überdruck durch eine G 3 Glasfritte filtriert. Eiweisskonzentrationen wurden mit einer Biuretmethode oder durch Messen der Extinktion bei 279 m μ bestimmt. Die Kalibrierung erfolgte mit einer Standard-Stickstoffbestimmungsmethode. Wir fanden

$$E_{279}^{1\%} = 5.45$$

in guter Übereinstimmung mit Woods et al.⁹.



Sedimentationsverhalten von Kalbsherzmyosin, 6,6 mg/ml in KCl-Phosphatpuffer. Aufnahme 2 h nach Versuchsbeginn. Tourenzahl 56100 UpM; Temperatur 20°C; Schlierenwinkel 70°.

Das partielle spezifische Volumen (\bar{V}) ermittelten wir bei $20^\circ \pm 1^\circ$ mit einer Auftriebsmethode¹⁰. Die Grenzviskositätszahl [η] wurde mit einem Ubbelohde-Viskosimeter mit einer Ausflusszeit von Wasser von 201 ± 1 sec bei $20^\circ \pm 0,1^\circ$ bestimmt¹¹.

Sedimentationskoeffizienten wurden bei 4° und 20° mit einer analytischen Ultrazentrifuge Typ Spinco E mit Phasenplatte und Schlierenoptik gemessen. Die Temperaturkalibrierung erfolgte mit einer RTIC-Einheit nach Werkvorschrift. Diffusionskoeffizienten wurden bei 4059 Umdrehungen und 20° mit einer Ventilzelle im gleichen Instrument gemessen. Die Berechnung erfolgte nach FUJITA - VAN HOLDE¹². Sedimentations- und Diffusionskoeffizienten wurden auf Standardbedingungen (20° und Wasser) umgerechnet und auf Konzentration Null extrapoliert. Die ATP-ase Aktivitäten massen wir bei pH 7,6 und 25° unter folgenden Konzentrationsbedingungen:

$$\text{KCl } 0,25 M, \text{ Tris-HCl Puffer } 0,05 M, \text{ CaCl}_2 5 \text{ mM}, \text{ ATP } 5 \text{ mM}.$$

Die spezifische Aktivität wurde wie folgt definiert: Mikrogramm aus ATP abgespaltenes Phosphat pro 5 min pro mg Eiweiss unter den Ansatzbedingungen.

Resultate. Die wichtigsten Resultate sind in der Tabelle zusammengefasst. Die Berechnung des Molekulargewichtes erfolgte nach der Formel

$$M_{SD} = \frac{RT s_0}{D_0 (1 - \bar{V} \rho)}^{12}$$

Die Figur ist eine Aufnahme aus einem Sedimentationslauf.

Diskussion. Die gefundenen Parameter decken sich innerhalb der zu erwartenden Messfehler mit den Werten von MUELLER et al.⁴ für Hundeherzmyosin und stehen in Widerspruch zu denen von BRAHMS und KAY⁵. Die

Parameter von Kalbsherzmyosin

s_{030W}	$6,09 \cdot 10^{-12} \text{ sec}$
D_{030W}	$1,05 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$
Grenzviskositätszahl	$1,95 \text{ dl g}^{-1}$
Partielles spezifisches Volumen	$0,728 \text{ ml g}^{-1}$
Molekulargewicht aus s , D und \bar{V}	ca. 516 000
Spezifische ATP-ase Aktivität	24

¹ W. W. KIELLEY, Ann. Rev. Biochem. 33, 403 (1964).

² J. GERGELY, Ann. N.Y. Acad. Sci. 72, 538 (1959).

³ H. MUELLER, M. THEINER und R. E. OLSON, J. biol. Chem. 239, 2153 (1964).

⁴ H. MUELLER, J. FRANZEN, R. V. RICE und R. E. OLSON, J. biol. Chem. 239, 1447 (1964).

⁵ J. BRAHMS und C. M. KAY, J. mol. Biol. 5, 132 (1962).

⁶ J. GERGELY und H. KOHLER, Fed. Proc. 16, 185 (1957).

⁷ J. BRAHMS und C. M. KAY, in *Biochemistry of Muscle Contraction* (Ed., J. GERGELY; Little Brown and Comp., Boston 1964), p. 69.

⁸ P. G. WASER, Schw. med. Wschr. 92, 819 (1962).

⁹ E. F. WOODS, S. HIMMELFARB und H. W. HARRINGTON, J. biol. Chem. 238, 2374 (1963).

¹⁰ G. V. SCHULZ und M. HOFFMANN, Makromol. Chem. 23, 220 (1957).

¹¹ E. HUSEMANN und G. V. SCHULZ, J. makromol. Chem. 1, 197 (1943).

¹² K. E. VAN HOLDE, J. phys. Chem. 64, 1582 (1960).

¹³ H. G. ELIAS, in *Ultrazentrifugen-Methoden* (Beckman Instruments GmbH, München 1961), p. 116.

Fehlerrechnung ergibt eine Abweichungsmöglichkeit von $\pm 5\%$, bedingt vor allem durch die Unsicherheit des Diffusionskoeffizienten.

Ausser der niedrigen ATP-ase Aktivität liegen die Resultate auch im Bereich der Werte, die an Skelettmiosin gewonnen wurden¹, so dass offensichtlich erst eine Feinstrukturanalyse etwaige Unterschiede aufdecken kann¹⁴.

Summary. Sedimentation and diffusion coefficients, partial specific volume, intrinsic viscosity, ATP-ase activity and molecular weight of cardiac myosin from calf hearts were determined. The values agree well with the

results of MUELLER et al.⁴ for cardiac myosin of the dog, and are not essentially different from values reported for skeletal myosins¹.

E. JENNY und P. G. WASER

Pharmakologisches Institut, Universität Zürich (Schweiz), 25. Februar 1965.

¹⁴ Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Projekt 3046) in dankenswerter Weise unterstützt.

Geschwindigkeit der imidazolkatalysierten O-Acetylierung von Derivaten und Peptiden des Serins und Threonins

Modelluntersuchungen zur enzymatischen Katalyse haben gezeigt, dass bei Reaktion von *p*-Nitrophenylacetat mit hydroxylgruppenhaltigen Imidazolderivaten, wie z. B. 4-Hydroxymethyl- oder 4-Hydroxyäthyl-imidazol, sowie serin- oder threoninhaltigen Histidinpeptiden, wie z. B. *cis* cyclo-L-his-L-ser oder *cis* cyclo-L-his-L-thr, Acetylierung der OH-Gruppe eintritt¹. Als energiereiches Acyl-derivat, das den Acetylrest auf die OH-Gruppe überträgt, tritt dabei N-Acetyl-imidazol auf²; das rückgebildete Imidazol reagiert erneut mit *p*-Nitrophenylacetat, übt also eine katalytische Funktion aus.

Um Aufschluss zu erhalten, inwieweit die Acetylierungsgeschwindigkeit strukturabhängig ist und ob es sich um intra- oder intermolekulare Acylübertragung handelt, bestimmten wir die o-Acetylierungsgeschwindigkeit der oben genannten Verbindungen und einiger anderer Derivate des Serins und Threonins in Gegenwart und Abwesenheit von Imidazolderivaten in Essigsäure/Acetanhydrid mit der Hydroxamsäurereaktion nach Hestrin³. Bei Reaktion mit Acetanhydrid tritt ebenfalls Acetimidazol auf⁴, das seinen Acetylrest auf die OH-Gruppe überträgt. Die Messung der Abhängigkeit der Acetylierungsgeschwindigkeit von der Konzentration der hydroxylgruppenhaltigen Imidazolderivate sollte außerdem eine Aussage über die Frage erlauben, ob eine intra- oder intermolekulare Katalyse vorliegt.

Derartige Untersuchungen in wasserfreiem Medium sind im Hinblick auf die enzymatische Katalyse von Interesse, da anzunehmen ist, dass Reaktionen an der Fermentoberfläche in praktisch wasserfreier, hydrophober Umgebung ablaufen können, wobei andere kinetische und energetische Verhältnisse herrschen als in wässrigem Milieu.

Messvorgang. 0,1 mM der Verbindung wurde in 5 ml Essigsäure gelöst und 1 ml (10 mM) Acetanhydrid zugesetzt; man liess bei Zimmertemperatur (25°) stehen und entnahm in bestimmten Zeitabständen Proben von 0,5 ml, die mit 2 ml Wasser versetzt wurden, um das Acetanhydrid und das Acetyl-imidazol zu zerstören. Nach 60 min und kurzem Erwärmen wurde im Vacuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 2 ml Wasser gelöst, 0,6 ml alkalische Hydroxylaminlösung (2 ml 3,5N NaOH + 1 ml 4N Hydroxylamin-hydrochlorid) zugesetzt. Nach 15 min bei Zimmertemperatur

gab man 2,5 ml einer 10 prozentigen Eisenchloridlösung zu (10 prozentiges $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in 0,5N HCl) und bestimmte nach 1 min die Extinktion gegen Wasser. Abgezogen wurde die Extinktion einer Lösung, die alle Bestandteile enthielt, aber in umgekehrter Reihenfolge gemischt; gemessen wurde bei 546 nm in 10 mm Küvetten. Zur Bestimmung des E_∞ Wertes wurde die Extinktion derselben Mischung mit den o-Acetyl-derivaten bestimmt. Die Berechnung erfolgte unter Zugrundelegung einer Reaktion erster Ordnung nach

$$kt = 2,3 \lg \frac{E_\infty}{E_\infty - E_t}.$$

Ergebnisse. Die Ergebnisse der Messungen sind in der Tabelle aufgeführt und lassen sich in den folgenden Punkten zusammenfassen:

(1) N-Acetyl-serinamid wird in Essigsäure/Acetanhydrid etwa $2\frac{1}{2}$ mal schneller acetyliert als das entsprechende Threoninderivat. Im Vergleich mit N-Acetyl-serinamid ist die Acetylierungsgeschwindigkeit des *cis* cyclo-asp-ser erniedrigt. Die Reaktionsfähigkeit des Serins wird also durch die benachbarte Asparaginsäure beeinflusst, was im Hinblick auf das Auftreten von -asp-ser im aktiven Zentrum der Serinproteasen von Interesse ist, während die geringe Reaktionsgeschwindigkeit des Threoninderivates einen Hinweis gibt, warum Threonin in Fermenten bisher nicht an Stelle von Serin gefunden wurde.

(2) Dieselbe Abstufung – N-Acetyl-serinamid > cyclo-asp-ser > N-Acetyl-threoninamid – findet sich auch bei den durch Imidazolderivate katalysierten Acetylierungsgeschwindigkeiten. Von den geprüften Imidazolderivaten ist Imidazol selbst der wirksamste Katalysator, α -Acetyl-histidin ist etwa halb so wirksam. Das ist auf Grund der Behinderung eines Stickstoffs des Imidazols durch die Seitenkette des Histidins zu erwarten. Die Methylgruppe im 2-Methyl-imidazol führt zu einer starken sterischen Hinderung, wodurch die katalytische Wirksamkeit dieser

¹ F. SCHNEIDER, Hoppe-Seyler's Z. 338, 131 (1964); dort weitere Literatur.

² TH. BRUICE und G. L. SCHMID, J. Am. chem. Soc. 79, 1663 (1957).

³ S. HESTRIN, J. biol. Chem. 180, 249 (1949).

⁴ G. S. REDDY, LEON MANDELL und I. H. GOLDSTEIN, J. chem. Soc. 1963, 1414.