

Enzymatische Unterschiede zwischen Myosin-ATPasen quergestreifter Kaninchenmuskeln

Myosin aus weissem Skelettmuskel (WM) hat eine bedeutend höhere spezifische ATPase-Aktivität (sA) als das Enzym aus rotem Skelettmuskel (RM) und Herzmuskel (HM). Dies steht in Einklang mit dem Nachweis, dass die Aktivität der Myosin-ATPase eines Muskels positiv mit der maximalen Verkürzungsgeschwindigkeit korreliert ist¹. WM unterscheidet sich von HM und RM nicht in den hydrodynamischen Eigenschaften^{2,3}. Zahlreiche Unterschiede physikochemischer^{4,5}, chemischer⁶⁻⁹ und enzymatischer^{7,8,10} Art sind hingegen bekannt geworden. Nicht endgültig geklärt ist aber die Frage, wie weit RM und HM, die eine praktisch gleiche ATPase-Aktivität besitzen, identisch sind. Die beiden Enzyme stimmen in der alkalischen Inaktivierung¹¹, in ihrem Gehalt an Methylhistidin⁹ und annähernd in der Kinetik des tryptischen Abbaus^{7,12} überein. Hinweise auf mögliche Unterschiede wurden in elektrophoretischen^{4,5} und immunologischen¹³ Untersuchungen gefunden.

In der vorliegenden Arbeit untersuchen wir die Abhängigkeit der durch Ca^{2+} aktivierte Myosin-ATPasen quergestreifter Kaninchenmuskeln von der KCl- und Wasserstoffionenkonzentration. Über methodische Aspekte haben wir schon berichtet¹⁴.

Methoden. Frisch geschlachteten Kaninchen wurden Teile des M. semitendinosus und semimembranosus zur Herstellung von WM, des M. ischio-tibialis¹⁵ und M. soleus zur Herstellung von RM und das Herz zur Präparation von HM entnommen. Die Myosine wurden nach der Vorschrift von MUELLER et al.¹⁶ isoliert. Vor der Bestimmung der ATPase-Aktivität wurden alle Lösungen über Nacht gegen 600 mM KCl dialysiert und darauf bei 105 000 g zentrifugiert. Über die Eigenschaften von WM haben wir schon publiziert¹⁴.

ATPase-Aktivitäten wurden bei pH 6.5 und 7.6 in folgenden zwei Ansatzsystemen bestimmt: a) TM - 37: Tris-Maleatpuffer 150 mM, KCl 37 mM. b) TM - 287: Tris-Maleatpuffer 150 mM, KCl 287 mM. Die Ca^{2+} -Konzentration betrug in allen Ansätzen 10 mM, die ATP-Konzentration 5.5 mM. Versuchstemperatur 25°C, Myosinkonzentrationen 63–420 µg/ml, Ansatzvolumen 16 ml. Jedes Myosin wurde gleichzeitig in allen vier Ansatzsystemen geprüft. Proben wurden alle 5 Min. während 30 Min. entnommen und in 5% Trichloressigsäure enteiweißt. Die spezifische Aktivität ist definiert als µg aus ATP abgespaltenes P_i pro mg Eiweiss pro 5 Min. Phosphat wurde nach FISKE und SUBBAROW¹⁷, Eiweiss mit einer Biuretmethode bestimmt. Extinktion und Entnahmzeit einer Probe wurden einander zugeordnet. Mit Hilfe eines Tischcomputers (Olivetti Programma 101) wurden die zugehörige Regressionsgerade und ihre Steigung bestimmt. Die Steigung der Geraden diente unter Berücksichtigung der im Versuch verwendeten Myosinkonzentration zur Bestimmung der sA und zum direkten Vergleich der Aktivität von Ansätzen mit gleicher Myosinkonzentration.

Resultate. Auf Tabelle I sind die spezifischen Aktivitäten von WM, RM und HM in Abhängigkeit vom Puffersystem und vom pH zusammengestellt. Wir entnehmen ihr, dass die sA von WM immer grösser ist als die von HM und RM. Die sA von HM ist nur in TM-287 signifikant von RM verschieden.

Auf Tabelle II sind die Quotienten der sA der Myosine in zwei Ansatzsystemen mit verschiedener KCl-Konzentration, jedoch gleichem pH, zusammengestellt. Bei pH 6.5 unterscheiden sich alle 3 Myosine signifikant in der Hemmung durch KCl. Bei pH 7.6 unterscheidet sich WM nicht von RM, jedoch von HM, und HM an der Grenze der Signifikanz von RM. Alle 3 Myosine werden bei pH 7.6 stärker durch KCl gehemmt als bei pH 6.5.

Das Verhältnis der sA bei pH 6.5 und 7.6 ist für alle 3 Myosine in einem Ansatzmilieu mit kleinem KCl-Zusatz (37 mM) gleich. In einem System mit hohem KCl-Zusatz (287 mM) unterscheiden sich WM von RM und RM von HM signifikant (Tabelle III).

Diskussion. Die sA von WM ist höher als die von RM und HM^{7,8,10,14}. Die sA von RM und HM ist ähnlich^{4,18} und es kann vom Ansatzmilieu abhängen, ob ein gesicherter Unterschied gefunden wird oder nicht. KCl hemmt die enzymatische Aktivität von WM und HM^{8,14} sowie von RM verschieden, wobei das pH eine zusätzliche Rolle spielt. RM unterscheidet sich bei pH 6.5 deutlich von WM und HM, bei pH 7.6 von WM nicht von HM wenig⁷.

- ¹ M. BÁRÁNY, J. gen. Physiol. 50, 197 (1967).
- ² I. SYROVY, A. GASPAR-GODFROID and G. HAMOIR, Arch. int. Physiol. Biochim. 78, 919 (1970).
- ³ E. JENNY, Helv. physiol. pharmac. Acta 23, 357 (1965).
- ⁴ R. H. LOCKER and C. J. HAGYARD, Arch. Biochem. Biophys. 127, 370 (1968).
- ⁵ W. T. PERRIE and S. V. PERRY, Biochem. J. 119, 31 (1970).
- ⁶ M. TADA, G. BAILIN, K. BÁRÁNY and M. BÁRÁNY, Biochemistry 8, 4842 (1969).
- ⁷ F. A. SRETER, J. C. SEIDEL and J. GERGELY, J. biol. Chem. 241, 5772 (1966).
- ⁸ M. BÁRÁNY, E. GAETJENS, K. BÁRÁNY and E. KARP, Arch. Biochem. Biophys. 106, 280 (1964).
- ⁹ W. M. KUEHL and R. S. ADELSTEIN, Biochem. Biophys. Res. Commun. 39, 956 (1970).
- ¹⁰ M. BÁRÁNY, K. BÁRÁNY, T. RECKARD and A. VOLPE, Arch. Biochem. Biophys. 109, 185 (1965).
- ¹¹ J. C. SEIDEL, J. biol. Chem. 242, 5623 (1967).
- ¹² H. MUELLER, M. THEINER and R. E. OLSON, J. biol. Chem. 239, 2153 (1964).
- ¹³ U. GRÖSCHL-STEWART and D. DONIACH, Immunology 17, 991 (1969).
- ¹⁴ E. JENNY and K. BÜCHI, Schweizer Arch. für Tierheilk. 112, 561 (1970).
- ¹⁵ K. HAAK, Diss. Bern (1903), p. 28.
- ¹⁶ H. MUELLER, J. FRANZEN, R. V. RICE and R. E. OLSON, J. biol. Chem. 239, 1447 (1964).
- ¹⁷ C. H. FISKE and C. Y. SUBBAROW, J. biol. Chem. 66, 375 (1925).

Tabelle I. Die spezifischen Aktivitäten der ATPasen von WM, RM und HM in zwei Ansatzsystemen bei pH 6,5 und 7,6

Ansatz	TM-37 pH 6,5	TM-37 pH 7,6	TM-287 pH 6,5	TM-287 pH 7,6
WM ($n = 6$)	$4,67 \pm 0,36$	$3,51 \pm 0,23$	$3,04 \pm 0,23$	$2,02 \pm 0,25$
HM ($n = 6$)	$1,09 \pm 0,48$	$0,89 \pm 0,22$	$0,95 \pm 0,18$	$0,61 \pm 0,13$
RM ($n = 6$)	$0,94 \pm 0,05$	$0,68 \pm 0,08$	$0,74 \pm 0,03$	$0,41 \pm 0,04$

WM/HM $p < 0,01$ (+), $p < 0,01$ (+), $p < 0,01$ (+), $p < 0,01$ (+). WM/RM $p < 0,01$ (+), $p < 0,01$ (+), $p < 0,01$ (+), $p < 0,01$ (+). HM/RM $p = 0,08$ (—), $p = 0,06$ (—), $p < 0,01$ (+), $p < 0,01$ (+).

Angegeben sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$. Signifikanz (+) wurde angenommen, wenn $p < 0,05$. Statistische Berechnung nach LINDER²⁰.

Tabelle II. Die Hemmung der ATPasen von WM, RM und HM durch Zusatz von KCl

pH	6,5	7,6		
Quotient der sA	TM-37 TM-287	n	TM-37 TM-287	n
WM	1,54 ± 0,16	6	1,76 ± 0,22	7
RM	1,31 ± 0,04	6	1,68 ± 0,17	9
HM	1,15 ± 0,04	6	1,45 ± 0,14	7

WM/RM $p < 0,01$ (+), $p = 0,43$ (—); WM/HM $p = 0,01$ (+), $p = 0,01$ (+); RM/HM $p = 0,02$ (+), $p = 0,05$ (±).

Angegeben sind die Quotienten ($\bar{x} \pm s_x$) der Aktivitäten in zwei Ansätzen mit verschiedener KCl-Konzentration. Die statistischen Berechnungen erfolgten nach LINDER²⁰, p. 106ff. Signifikanz (+) wurde angenommen, wenn $p < 0,05$.

Die spez. Aktivitäten aller 3 Myosine hängen in einem Milieu mit geringem KCl-Zusatz in gleicher Weise vom pH ab¹⁹. Bei höherem KCl-Zusatz ergeben sich signifikante Unterschiede. Die unterschiedliche Empfindlichkeit auf KCl hängt nicht vom Reinheitsgrad oder der Präparationsmethode ab¹⁴. SRETER et al.⁷ konnten keine Inhibitoren oder Inaktivatoren von Myosin-ATPasen nachweisen. Wir glauben deshalb, dass nicht nur WM von HM und RM wesentlich verschieden ist, sondern dass auch zwischen RM und HM keine enzymatische Identität besteht.

Summary. The Ca^{2+} activated myosin-ATPase of white skeletal muscle of the rabbit has a much higher specific activity than the corresponding enzymes from red and cardiac muscle. The pH-dependence of the 3 myosins

Tabelle III. Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der ATPasen von WM, RM und HM vom pH bei zwei verschiedenen KCl-Konzentrationen

Puffer	TM-37	n	TM-287	n
WM	1,33 ± 0,04	6	1,52 ± 0,11	6
RM	1,39 ± 0,14	6	1,74 ± 0,09	6
HM	1,25 ± 0,16	6	1,58 ± 0,09	6

WM/RM $p > 0,05$ (—), $p < 0,01$ (+); WM/HM $p > 0,05$ (—), $p = 0,3$ (—); RM/HM $p > 0,05$ (—), $p = 0,02$ (+).

Angegeben sind die Quotienten pH 6,5:7,6 ($\bar{x} \pm s_x$). Signifikanz (+) wurde angenommen, wenn $p < 0,05$. Statistische Berechnung nach LINDER²⁰.

ATPases is identical. However, they differ significantly in the extent of their inhibition by KCl. We conclude, therefore, that all 3 myosins are enzymatically dissimilar.

K. Büchi und E. Jenny

Institut für Pharmakologie und Biochemie der Universität, Winterthurerstrasse 260, CH-8057 Zürich (Schweiz), 23. Juni 1971.

¹⁸ A. M. KATZ, D. I. REPKE and B. B. RUBIN, Circulation Res. 19, 611 (1966).

¹⁹ R. J. LUCHI and E. M. KRITCHER, Circulation Res. 19, 283 (1966).

²⁰ H. LINDER, *Statistische Methoden*, 4. Aufl. (Birkhäuser Verlag, Basel 1964).

Effects of Cholesterol-Derived Photoproducts on the Incorporation of ^{14}C -Acetate into Human Skin Lipids

Previous studies have demonstrated that either ultraviolet (UV) or sunlight reduces the level of freely extractable human skin cholesterol in vitro¹. The fate of the cholesterol, reflected by these reduced levels, is not fully understood. However, the instability of cholesterol in the presence of air and light is well documented. The formation of cholesterol-derived photo-oxidation products under various experimental conditions have been reported²⁻⁴. Preliminary studies have shown that cholesterol-derived photo-oxidation products are formed in human skin upon exposure to UV-light (unpublished data).

Recently BLACK and RAUSCHKOLB⁵ reported that broad spectrum light (simulated sunlight) inhibited the in vitro incorporation of $1\text{-}^{14}\text{C}$ -acetate into human skin sterols as well as other classes of lipids. The major site of this inhibition was shown to be activation of acetate in the formation of acetyl CoA, the precursor of lipogenesis⁶. As these phenomena, reduced cholesterol levels, formation of cholesterol-derived photo-oxidation products and inhibited lipogenesis, are the result of light irradiation upon human skin, the possibility exists that they are related. The present investigations were undertaken to determine the possible role of cholesterol-derived photo-oxidation products upon skin lipogenesis.

Materials and methods. Cholesterol-derived photo-oxidation products (UV-PP) were produced by UV-irradiation of cholesterol absorbed on thin layer plates. 2 mg

of cholesterol containing a trace amount of cholesterol-4 ^{14}C (sp. act. 61.4 mCi/mmol) in 1.0 ml of chloroform-methanol (2:1, v/v) was applied to silica gel coated thin-layer plates. The plates were irradiated for 40 min with a Burdick QA-450 N mercury arc lamp (1.43×10^6 ergs/sec/cm²). After irradiation the plates were developed in 1, 2-dichloroethane. Polar UV-PP remaining at the origin of the chromatogram were scraped off and extracted 3 times with 5 ml of chloroform-methanol (2:1, v/v). The extracts were pooled and evaporated to dryness. The radioactivity of dry residue, representing UV-PP, was equivalent to 5% of the total radioactivity of the original cholesterol.

¹ E. W. RAUSCHKOLB, G. FARRELL and J. M. KNOX, J. Invest. Derm. 49, 632 (1967).

² W. G. DAUBEN and P. H. PAYOT, J. Am. chem. Soc. 78, 5657 (1956).

³ E. H. MOSBACH, N. NIERENBERG and F. E. KENDALL, J. Am. chem. Soc. 75, 2358 (1953).

⁴ O. WINTERSTEINER and S. BERSTROM, J. biol. Chem. 137, 780 (1941).

⁵ H. S. BLACK and E. W. RAUSCHKOLB, J. Invest. Derm. 56, 387 (1971).

⁶ H. S. BLACK, J. D. SMITH, B. L. HELD and E. B. SMITH, Clin. Res. 19, 358 (1971).