Der Arbeitszyklus geordneter Aktomyosinsysteme (Muskel und Muskelmodelle)*

Von HILDEGARD PORTZEHL

Mit einem Anhang von Karl Brecht

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Tübingen

(Z. Naturforsch. 7b, 1—10 [1952]; eingegangen am 25. Oktober 1951)

1. Das Aktomyosin des Warmblütermuskels befindet sich in Abwesenheit von ATP im Zustand der Starre. Der Elastizitätsmodul (EM) des intakten Warmblütermuskels wie des Fasermodells aus Warmblütermuskeln beträgt dann $4000\text{—}8000\text{ g cm}^{-2} \cdot L \cdot \Delta L^{-1}$. Im Aktomyosinfaden mit seinem geringeren Eiweißgehalt ist der EM niedriger.

2. Durch ATP in physiologischer Konzentration sinkt der EM in allen Systemen auf 0,1 des Starrewertes, falls die Systeme nicht in den Kontraktionszustand geraten. Dieser Elastizitätszustand wird nicht nur für den Muskel, sondern auch für die Modelle als Ruhezustand bezeichnet. Die Fähigkeit des ATP, diesen Zustand hoher Dehnbarkeit herbeizuführen, wird Weichmacherwirkung genannt.

3. Im Kontraktionszustand liegt der EM zwischen den Werten der Starre und des Ruhezustandes — sowohl beim Muskel wie beim Modell.

4. Im Zustand der Starre sind kontrahierte Muskeln wie Modelle unfähig zu erschlaffen. Dagegen erschlaffen Muskeln wahrscheinlich (A. V. Hill) und Modelle mit Sicherheit, sowie die Kontraktionsvorgänge aufhören, wenn ihr elastischer Widerstand auf den „Ruhe“wert herabgesetzt ist ($EM \leq 1000\text{ g cm}^{-2} L \cdot \Delta L^{-1}$).

5. Kontraktion tritt immer ein, wenn ATP gespalten wird. Erschlaffung tritt ein, wenn die ATP-Spaltung aufhört — von selbst im Muskel, durch ATPase-Vergiftung oder ATP-Entfernung in den Modellen. Doch muß im letzteren Falle das Starrwerden der Modelle durch andere Weichmacher verhindert werden.

6. Andere reversible Weichmacher sind anorganische und Nucleosid-Di- und -Triphosphate.

7. Aus diesen Beobachtungen geht hervor, daß die Erschlaffung der thermodynamisch freiwilligen und die Kontraktion der unfreiwilligen Anteil des Arbeitszyklus ist. Die Energie der Kontraktionsphase entstammt offenbar der ATP-Spaltung.

Das kontraktile System des Muskels kann auf 2 Wegen in funktionstüchtigem Zustand isoliert werden: 1. Aus der Muskelfaser werden mit Wasser und Glycerin alle Kristalloide und ein Teil der Kolloide extrahiert. Das was übrig bleibt, ist das Fasermodell^{1, 1a}. 2. Aus gereinigten Aktomyosinlösungen werden Fäden gespritzt und achsenparallel geordnet. Das ist das Fadenmodell^{2, 2a}.

Beide Modelle kontrahieren sich auf Zusatz des Muskelbetriebstoffes Adenosintriphosphat (ATP) mit dem gleichen Verkürzungsgrad und der gleichen eigenartigen Temperaturabhängigkeit wie der lebende Muskel. Das Fasermodell entwickelt dabei die Spannung einer maximalen tetanischen Kontraktion des Skelettmuskels. Die Spannung des Fasermodells

bleibt auf Grund der wesentlich kleineren Konzentration des Aktomyosins beträchtlich hinter diesem Wert zurück. Auch die Doppelbrechung des Fasermodells nimmt bei der Kontraktion ebenso schnell ab wie die Doppelbrechung³ des lebenden Muskels. Beide Modelle zeigen im kontrahierten Zustand den hohen visko-elastischen Effekt^{1, 2}, der auch den kontrahierten Zustand des lebenden Muskels kennzeichnet⁴. Auch das eigenartige „release-recovery“-Phänomen des lebenden Muskels⁴ findet sich nur bei der Kontraktion der Aktomyosinmodelle wieder. Es ist bisher an keinem anderen Objekt gefunden und fehlt selbst beim Muskel und bei Modellen im unkontrahierten Zustand. Schließlich werden auch die elastischen Eigenschaften der intakten Muskeln und der

* Mit Unterstützung des Unitarian Service Committee und des Oberlaender Trust, Philadelphia.

¹ A. Weber, Biochim. Biophysica Acta 7, 214 [1951].

^{1a} A. Weber u. H. H. Weber, Z. Naturforsch. 5b, 124 [1950].

² H. Portzehl, Z. Naturforsch. 6b, 355 [1951].

^{2a} H. Portzehl u. H. H. Weber, Z. Naturforsch. 5b, 124 [1950].

³ G. Ströbel, Z. Naturforsch., im Druck.

⁴ Gasser u. Hill, Proc. Roy. Soc. [London], Ser. B 96, 398 [1924].

beiden Aktomyosinmodelle durch Abwesenheit oder Anwesenheit von ATP in völlig gleichartiger Weise bestimmt.

Also scheint der Fundamentalprozeß der spezifischen Reaktion zwischen Aktomyosin und ATP bei der Kontraktion von Muskel und Modell der gleiche zu sein. So ist also ATP nicht nur die erste *bekannte* Energiequelle der Muskelarbeit, sondern tatsächlich *Kontraktionssubstanz* und *unmittelbare Energiequelle* — entweder durch seine Bindung oder seine Spaltung, oder durch beides. Es war bis jetzt unentschieden, ob diese ATP-Energie während der Kontraktion aufgenommen und sofort verwendet wird^{5–11}, oder ob sie bei der Erschlaffung aufgenommen und für die nächste Kontraktion gespeichert wird^{12–16, 1a}.

Diese alte und grundlegende Streitfrage läßt sich unter den durchsichtigen Bedingungen der Modellkontraktion eindeutig entscheiden.

wenn das ATPat wieder ausgewaschen wird. Das sieht so aus, als wenn zur Erschlaffung außer der Beseitigung des ATPats und seiner Spaltung noch ein besonderer Vorgang nötig wäre. Das könnte z. B. ein Vorgang sein, durch den die Spaltungsenergie des ATPats für die Streckung des kontraktiven Systems nutzbar gemacht wird. Diese Fähigkeit könnte bei der Präparation der Modelle verloren gegangen sein.

Die Unfähigkeit kontrahierter Modelle zu erschlaffen, kann aber auch einen ganz anderen Grund haben. Auch ein kontrahierter Muskel erschlafft nicht mehr, wenn etwa in der Totenstarre oder Halogenacetatstarre sein ATP-Bestand erschöpft ist¹⁷. Hier aber könnte die Unfähigkeit zur Erschlaffung auf der Starre, d. h. auf der geringen Verformbarkeit des Muskels beruhen. Auch die Modelle werden ohne ATP starr^{1, 10, 18, 19}.

III.

Wird der Grad dieser Starre quantitativ charakterisiert durch Angabe des Elastizitätsmoduls (*EM*) der Modelle mit und ohne ATP und werden diese Werte verglichen mit den von Bate-Smith¹⁷ bestimmten *EM* von intakten Muskeln mit und ohne ATP, so ergibt sich eine erstaunliche Übereinstimmung (Tab. 1): Bei Gegenwart der physiologischen ATP-Konzentration ($3\text{--}5 \cdot 10^{-3}\text{ mol.}$) liegt der *EM* des Skelettmuskels wie der Fasermodelle zwischen 100 und $600 \text{ g cm}^{-2} \cdot \text{L} \Delta \text{L}^{-1}$. In Abwesenheit von ATP beträgt er für Muskel wie Fasermodell zwischen 4000 und 8000. ATP in physiologischer Konzentration erniedrigt also den Dehnungswiderstand aller geordneten Aktomyosinsysteme auf den 10. Teil (vgl. auch Tab. 2). Wir nennen dies die Weichmacherwirkung des ATP.

Dieses bedeutende Ausmaß der Weichmacherwirkung setzt voraus, daß das Aktomyosinsystem unter ATP sich nicht in Kontraktion befindet. Denn während der Kontraktion bzw. während des aktiven Zustandes ist sowohl der Dehnungswiderstand des

Abb. 1 und 2. Die Spannung bei Auswaschen des ATP mit Phosphatpuffern $0.02\text{-}m$, p_H 6,6. Abb. 1. Fasermodell. Abb. 2. Fadenmodell. Ord.: Spannung in g/cm^2 . Absz.: Zeit. ····· Kontraktion in $3,4 \cdot 10^{-3}\text{-}m$. ATP (Abb. 1), in $2,4 \cdot 10^{-3}\text{-}m$. ATP (Abb. 2), ——— auswaschen, -o-o- ohne ATP.

II.

Die Abb. 1 und 2 zeigen, daß ATP-kontrahierte Modelle nicht oder kaum zu erschlaffen vermögen,

⁵ A. H. Hill, Proc. Roy. Soc. [London], Ser. B **136**, 420 [1949].

⁶ A. V. Hill, Proc. Roy. Soc. [London], Ser. B **137**, 40 [1950].

⁷ A. V. Hill, Nature [London] **167**, 377 [1951].

⁸ H. H. Weber, Fiat Review (Naturw. u. Medizin in Deutschland 1939–1946), Dieterich'sche Verlagsbuchhandlung Wiesbaden, „Physiologie“, Tl. 3, Abschn. „Muskel“, S. 1.

⁹ A. Weber u. H. H. Weber, Biochim. Biophysica Acta **7**, 339 [1951].

¹⁰ H. H. Weber, Advances of Protein Chemistry VII [1951], noch nicht erschienen.

¹¹ M. Dubuisson, Proc. Roy. Soc. [London], Ser. B **137**, 63 [1950].

¹² Bethe, Pflügers Arch. ges. Physiol. **142**, 291 [1911].

¹³ Wöhlisch, Naturwiss. **28**, 305 [1940].

¹⁴ W. Kuhn u. B. Hargitay, Z. Elektrochem. **55**, 490 [1951].

¹⁵ Mark Pryor, Progress in Biophysics **1**, 216 [1950].

¹⁶ Guth, Ann. New York Acad. Press of Sciences **XLVII**, 715 [1947].

¹⁷ Bate-Smith u. Bendall, J. Physiology **106**, 177 [1947]; **110**, 47 [1949].

¹⁸ Szent Györgyi, Biol. Bull. **96**, 140 [1949].

¹⁹ H. H. Weber, Z. Elektrochem. **55**, 511 [1951].

²⁰ A. V. Hill, Proc. Roy. Soc. [London], Ser. B **136**, 399 [1949].

lebenden Muskels^{4, 20, 21, 21a} wie auch des Fasermodells unter ATP größer als im unerregten Zustand (vgl. Tab. 1 mit 1a und A. Weber²²). Die ATP-Kontraktion des Fasermodells kann auf verschiedene Weise verhindert werden: 1. unvollständig durch Senkung der Temperatur auf $\sim 0^\circ\text{C}$ (Tab. 1, Gruppe 4), 2. vollständiger, wenn zusätzlich durch Vorbehandlung mit Grahamschem Salz²³ die natürlichen Mg^{++} -Spuren des Fasermodells reduziert werden (Tab. 1, Gr. 4), 3. vollständig durch Vergiftung mit Salyrgan (Tab. 1, Gr. 2 u. 3)^{23a}. Das Salyrgan selbst beeinflusst dabei den Dehnungswiderstand praktisch nicht (Tab. 2). Obwohl die EM unter ATP etwas größer sind, wenn die Kontraktion nicht ganz vollständig unterdrückt ist, sind die Werte den Werten unter Salyrgan-ATP doch so ähnlich, daß die Weichmacherwirkung aller ATP-Ansätze auf das ATP und nicht auf die wechselnden Begleitumstände bezogen werden muß.

Das Salyrgan vergiftet die ATP-Kontraktion und die ATP-Spaltung momentan und reversibel. Im Verlauf längerer Zeiträume — länger als 5 Min. bei Zimmertemperatur und länger als 15 Min. bei 0°C — bewirkt das Salyrgan mehr oder minder irreversible Veränderungen: fortschreitende Schädigung der Weichmacherwirkung des ATP und schließlich Unfähigkeit der kontraktile Substanz zur ATP-Kontraktion auch nach Entfernung des Salyrgans (vgl. Tab. 3, Exp. Teil). Infolgedessen dürfte die Weichmacherwirkung des ATP durch die bei 0°C gemessenen sehr niedrigen EM (Gr. 2 der Tab. 1) am zutreffendsten charakterisiert sein.

Der Dehnungswiderstand ATP-haltiger Muskeln⁵ und ATP-haltiger unkontrahierter Modelle (vgl. Gr. 2 mit 3 der Tab. 1) scheint vom Verkürzungszustand

²¹ A. V. Hill, Proc. Roy. Soc. [London], B 137, 320 [1950].

^{21a} F. Buchthal, Kong. dansk. Vidensk. Selsk. Skr., biol. Medd. XVII 3, und zwar S. 84 u. 89 [1942].

²² A. Weber¹. In dieser Arbeit ist die Dehnbarkeit des kontrahierten Modells mit der Dehnbarkeit des ATP-freien starren Modells verglichen. Da das Modell bei der ATP-Kontraktion immer noch weicher ist als das starre Modell, wurde damals und auch in dem Referat von H. H. Weber auf dem Internationalen Physiologenkongress in Kopenhagen (1950) aus dem richtigen Experiment der falsche Schluß gezogen, die Kontraktion erhöhe — im Gegensatz zum Muskel — die Dehnbarkeit. Der richtige Schluß lautet: Der Dehnungswiderstand des Modells während der ATP-Kontraktion beträgt nur 60% des Dehnungswiderstandes während der ATP-Mangelstarre, der Dehnungswiderstand unter ATP bei verhinderter Kontraktion (s. Text) dagegen nur 10%. Also erhöht die Kontraktion den Dehnungswiderstand des ATP-haltigen Modells auf etwa das 6-fache.

einigermaßen unabhängig zu sein. Ohne ATP im Zustand der Starre nimmt der Dehnungswiderstand möglicherweise mit steigender Verkürzung schwach ab (vgl. Gr. 2 mit 3 der Tab. 1). Diese Abnahme ist aber — auch bei Heranziehung weiterer EM-Werte (im ganzen 24) — nicht gesichert.

IV.

Die reversible Weichmacherwirkung scheint eine allgemeine Eigenschaft der Polyorthophosphate zu sein: Pyrophosphat und Triorthophosphat erniedrigen den EM auf gut $\frac{1}{3}$ des Wertes des starren Muskels (Tab. 2). Die Weichmacherwirkung ist also 3-mal geringer und die notwendige Konzentration 3-mal größer als die des ATP. Auch ADP (und wahrscheinlich auch ITP) dürften Weichmacherwirkung besitzen (vgl. Anhang von K. Brecht). Doch ist ihre Wirkung quantitativ noch nicht untersucht.

Während die Blockierung von SH-Gruppen durch Salyrgan die elastischen Eigenschaften geordneter Aktomyosinsysteme nicht deutlich beeinflusst, führt erwartungsgemäß die Reaktion der Aminogruppen mit Benzaldehyd zu einer enormen Veränderung der elastischen Eigenschaften. Der EM der starren Modelle sinkt ebenso stark ab wie auf ATP-Zusatz — aber irreversibel (vgl. Tab. 2).

V.

Auf Grund dieser Befunde kann experimentell entschieden werden, ob die Erschlaffungsunfähigkeit des Aktomyosinsystems nach Auswaschen des ATPs auf dem Ausfall eines unbekannten aktiven Prozesses beruht oder aber einfach auf einer Starre durch Weichmachermangel:

In Abb. 2 steigt die beim Auswaschen etwas abgesunkene Spannung auf neue ATP-Zugabe auf den alten Wert, weil ATP sowohl die Starre beseitigt, wie auch Kontraktion bewirkt. Wird statt dessen nach dem Auswaschen Pyrophosphat zugegeben, so geschieht das Gegenteil: Die beim Auswaschen im Beginn der Erschlaffung erstarrte Modellfaser erschlafft fast vollständig, weil Pyrophosphat nur Weichmacherwirkung hat und keine Kontraktions-substanz ist (Abb. 3). Daß Pyrophosphat nur als

²³ Häufig als Hexamethaphosphat bezeichnet (NaPO_3)₆.

^{23a} In seinem Vortrag auf der Bunsengesellschaft¹⁹ hat H. H. Weber angegeben, ATP + Salyrgan gäbe etwa denselben EM wie in der Starre. Diese Behauptung ist in dieser Form falsch. Sie erklärt sich daraus, daß Aktomyosinsysteme zwar zunächst weich sind, aber im Lauf der Zeit unter Denaturierung hart werden (vgl. exp. Teil, Tab. 3).

Präparat	Zustand	Temperatur (°C)	Ausgangslänge $= \frac{L}{L_0} 100$	$EM \cdot 10^5 = g \cdot cm^{-2} \cdot L \cdot \Delta L^{-1}$		$\frac{EM_{ATP}}{EM_{ohne ATP}}$	Versuchsgruppe
				mit ATP	ohne ATP		
Kaninchen-Psoas ¹⁷	frisch unkontrahiert	~ 20	100	610	—	0,12	1
Kaninchen-Psoas	starr	~ 20	100	—	5000		
Kaninchen-Psoas ¹⁷	frisch unkontrahiert	~ 20	100	900	—	0,18	
Kaninchen-Psoas	starr	~ 20	100	—	4900		
Kaninchen-Psoas ¹⁷	frisch unkontrahiert	~ 20	100	890	—	0,12	
Kaninchen-Psoas	starr	~ 20	100	—	7400		
Frosch-Sartorius ²⁴	frisch unkontrahiert	~ 20	100	100	—		
Frosch-Sartorius	frisch unkontrahiert	~ 20	100	150	—		
Frosch-Sartorius ^{21a}	frisch unkontrahiert	0	100	500	—		
Mittelwert			~ 100	un-kontr. ~ 500	starr ~ 6000	0,14	
Modellfaser	unkontrahiert *	~ 3	94	330	—	0,03	2
Modellfaser	starr*	~ 3	96	—	9800		
Modellfaser	unkontrahiert *	~ 3	95	440	—	0,04	
Modellfaser	unkontrahiert *	~ 3	93	300	—		
Modellfaser	starr*	~ 3	93	—	6900	0,04	
Modellfaser	unkontrahiert *	~ 3	81	250	—		
Modellfaser	starr*	~ 3	81	—	4100	0,06	
Modellfaser	unkontrahiert *	~ 3	74	560	—		
Mittelwert			~ 90	un-kontr. ~ 380	starr ~ 7000	0,06	
Modellfaser	unkontrahiert *	~ 20	54	730	—	0,13	3
Modellfaser	starr*	~ 20	53	—	5860		
Modellfaser	unkontrahiert *	~ 20	47	500	—	0,13	
Modellfaser	starr*	~ 20	47	—	3650		
Modellfaser	unkontrahiert *	~ 20	45	630	—	0,24	
Modellfaser	starr*	~ 20	48	—	2800		
Modellfaser	unkontrahiert *	~ 20	38	600	—	0,10	
Modellfaser	starr*	~ 20	40	—	6000		
Mittelwert			~ 46	un-kontr. ~ 600	starr ~ 4600	0,15	
Modellfaser	schwach kontrah.**	~ 1	87	1700	—	0,19	4
Modellfaser	starr**	~ 1	89	—	9100		
Modellfaser	kaum kontrahiert**	~ 1	72	360	—	0,10	
Modellfaser	starr**	~ 1	82	—	3500		
Modellfaser	kaum kontrahiert**	~ 1	64	1000	—	0,08	
Modellfaser	starr**	~ 1	64	—	13200		
Mittelwert			~ 76	schw. kontr. ~ 1000	starr ~ 8600	0,12	

* Anmerk. für Gruppe 2 und 3: Starr: 10^{-2} -m. Phosphat $pH 7$ + 10^{-3} -m. $MgCl_2$. Unkontrahiert: Ebenso + $3 \cdot 10^{-3}$ -m. ATP + $4 \cdot 10^{-4}$ -m. Salyrgan.

** Anm. für Gruppe 4: Schwach kontrahiert: (10^{-2} -m. Phosphat $pH 7$) + $\sim 7 \cdot 10^{-3}$ -m. ATP + $7 \cdot 10^{-4}$ -m. $MgCl_2$. Kaum kontrahiert: Ebenso, ohne $MgCl_2$, nach Vorbehandlung mit Grahamsalz. Starr: Jeweils ebenso, aber ohne ATP.

Tab. 1. Elastizitätsmoduln von Skelettmuskeln und Fasermodell in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration.

Präparat	Zustand	Temperatur (°C)	Ausgangslänge $= \frac{L}{L_0} 100$	$EM \cdot 10^5 = g \cdot cm^{-2} \cdot L \cdot \Delta L^{-1}$		$\frac{EM_{ATP}}{EM_{ohne ATP}}$	Versuchsgruppe
				mit ATP	ohne ATP		
Modellfaser ¹	kontrahiert *	~ 20	—	4000	—	0,67	5
Modellfaser	starr *	~ 20	—	—	6000		
Modellfaser	kontrahiert *	~ 20	70	1000	—	0,20	
Modellfaser	starr *	~ 20	68	—	5000		
Modellfaser	kontrahiert *	~ 20	68	1100	—	0,22	
Modellfaser	starr *	~ 20	67	—	5000		
Modellfaser	kontrahiert *	~ 20	61	1100	—	0,22	
Modellfaser	starr *	~ 20	57	—	5100		
Modellfaser	kontrahiert *	~ 20	67	2700	—	0,45	
Modellfaser	starr *	~ 20	66	—	6000		
Modellfaser	kontrahiert *	~ 20	67	3200	—	0,53	
Mittelwert			66	kontr. 2200	starr 5400	0,4	
Modellfaser	kontrahiert *	~ 20	68	1100	—	0,2	
Modellfaser	unkontrahiert *	~ 20	67	250	—		

¹ Nach A. Weber, l.c. 1.

* Anmerk: Starr: 10^{-2} -m. Phosphat $pH 7 + 10^{-3}$ -m. $MgCl_2$. Kontrahiert: Ebenso + $3 \cdot 10^{-3}$ -m. ATP. Unkontrahiert: Ebenso + $3 \cdot 10^{-3}$ -m. ATP + $4 \cdot 10^{-4}$ -m. Salyrgan.

Tab. 1 a. Elastizitätsmoduln des Fasermodells in Kontraktion, Starre und Erschlaffung.

Präparat	Substanz	Konzentration molar	Weichmacherwirkung $= \frac{EM_{(plus Subst.)}}{EM_{(ohne Subst.)}}$	Zahl der Versuche
Modellfaser	ATP	$3-6 \cdot 10^{-3}$	0,1	12
Aktomyosinfaden	$Na_4P_2O_7$	$1,8 \cdot 10^{-2}$	0,3	2
Aktomyosinfaden	$Na_5P_3O_{10}$	$1 \cdot 10^{-2}$	0,4	2
Modellfaser	Benzaldehyd	$3 \cdot 10^{-2}$ (gesättigt)	0,16	1
Modellfaser	Salyrgan	$4 \cdot 10^{-4}$	0,8	4

Tab. 2. Weichmacherwirkung einiger Polyphosphate und Gifte.

Weichmacher wirkt und nicht etwa das Aktomyosinsystem zerstört, zeigt der Wiederanstieg der Spannung bei ATP-Zugabe in das pyrophosphathaltige Bad. Wird das Modell — in diesem Fall wieder der Aktomyosinfaden — mit dem Weichmacher Triphosphat ausgewaschen, geschieht das gleiche: Keine Starre, sondern fast völlige Erschlaffung (Abb. 4).

Eine aktive Erschlaffung erscheint nur noch möglich unter der Annahme, das Pyrophosphat oder das Triphosphat liefere die Erschlaffungsenergie durch Bindung an das Aktomyosin. Doch das ist nicht so: Wird das Pyrophosphat zusammen mit dem ATP zugesetzt und seine Konzentration während des ganzen Ver-

suches konstant gehalten, so erscheint und verschwindet die Spannung mit Zugabe und Auswaschen des ATPs in theoretisch beliebiger Wiederholung (Abb. 5). Also nicht die Zugabe des Pyrophosphats verursacht die Erschlaffung, sondern das Verschwinden des ATP, falls nur Pyrophosphat anwesend ist, und verhindert, daß nach Entfernen des ATPs Starre eintritt.

Hiermit ist eindeutig gezeigt, daß die Erschlaffung kein aktiver Prozeß ist, daß sie nichts anderes bedeutet als das Aufhören der ATP-Wirkung. Es ist somit gesichert, daß die Erschlaffung der thermodynamisch freiwillige Teil des Arbeitszyklus des

Abb. 3. Wie Abb. 2 Fasermodell. ↓ bei 35 Min. Zusatz von 0,025-m. Pyrophosphat, ↑ bei 75 Min. Zusatz von $3 \cdot 10^{-3}$ -m. ATP.

Abb. 4. Erschlaffung nach Auswaschen des ATP mit Natriumtriphosphat. Fadenmodell. Ord.: Spannung. Absz.: Zeit. Kontraktion in $2 \cdot 10^{-3}$ -m. ATP, -o-o- ausgewaschen mit 0,04-m. Natriumtriphosphat.

Muskels ist. Dann aber muß die Kontraktion der thermodynamisch unfreiwillige, unter Energieaufnahme verlaufende Teilprozeß des Arbeitszyklus sein.

VI.

Daß dabei wahrscheinlich nicht die ATP-Bindung an das Aktomyosin, sondern die ATP-Spaltung die Energiequelle ist, läßt sich unter anderem^{9, 19, 25} auch im Erschlaffungsversuch zeigen: Wird auf der Höhe der Kontraktion das ATP ausgewaschen, so daß das hochgespannte Modell starr wird, dann Salyrgan als

²⁵ H. H. Weber, Nature [London] 167, 381 [1951].

Abb. 5. Kontraktion und Erschlaffung in Gegenwart von $1,5 \cdot 10^{-2}$ -m. Pyrophosphat. Fadenmodell. Ord.: Spannung. Absz.: Zeit. 1 = Kontraktion mit $1,6 \cdot 10^{-3}$ -m. ATP. 2 = Erschlaffung; bei Verminderung des ATP-Gehalts auf $2,3 \cdot 10^{-5}$ -m. 3 = Kontraktion bei Erhöhung des ATP-Gehalts auf $4,4 \cdot 10^{-3}$ -m.

ATPase-Gift zugefügt und schließlich ATP von neuem zugegeben, so bewirkt jetzt ATP eine Erschlaffung (Abb. 6). Aus der Kontraktionssubstanz ATP ist eine Erschlaffungssubstanz geworden. Wodurch? Weil die ATP-Spaltung vergiftet ist, während die ATP-Bindung mit ihrer Weichmacherwirkung wenigstens zum Teil erhalten bleibt.

Daß Erschlaffung und Weichmacherwirkung unvollständig sind, erklärt sich daraus, daß bei dieser Versuchsanordnung dem Salyrgan Zeit bleibt, auch die Weichmacherwirkung des ATP zu schädigen (vgl. exp. Teil).

Wird dagegen das Salyrgan unmittelbar auf der Höhe der ATP-Kontraktion zugesetzt, so erschlaffen Fasermodell (Abb. 7) wie Fadenmodell (Abb. 8) fast augenblicklich und eben deshalb fast vollständig oder sogar vollständig.

Immer aber tritt nach Salyrganvergiftung erneut Kontraktion ein, sobald durch Cystein entgiftet wird, d. h. das Aktomyosinsystem kontrahiert wieder, sobald die Spaltung wieder in Gang kommt (Abb. 6, 7, 8).

Auch mit dem ATPase-Gift Benzaldehyd, das an den Aminogruppen angreift, läßt sich Erschlaffung erzielen — allerdings irreversibel und daher vieldeutiger (Abb. 9).

VII.

So ergibt sich folgendes für Muskel und Modelle gemeinsame Bild von der Funktion des ATPs und des Aktomyosins im Kontraktionszyklus.

Abb. 6. Erschlaffung des kontrahierten und durch Salycyan vergifteten Fasermodells durch ATP. Ord.: Spannung. Absz.: Zeit. - - - - Kontraktion durch $1,7 \cdot 10^{-3}$ -m. ATP, $\uparrow$ Auswaschen des ATP, $\uparrow$ Zusatz von $6,6 \cdot 10^{-4}$ -m. Salycyan, $\downarrow$ Zusatz von $1,7 \cdot 10^{-3}$ -m. ATP, $\uparrow$ Zusatz von $6,7 \cdot 10^{-2}$ -m. Cystein.

Abb. 7. Fasermodell. Ord.: Spannung. Absz.: Zeit. - - - - Kontraktion durch $1,7 \cdot 10^{-3}$ -m. ATP, - o - o - Erschlaffung durch $1,1 \cdot 10^{-4}$ -m. Salycyan und - + - + - neue Kontraktion durch Entgiftung des Salycyans durch Verdünnung auf ~ 0 und Zugabe von $2 \cdot 10^{-2}$ -m. Cystein.

1. Geordnete Aktomyosinsysteme befinden sich im Zustand der *Starre*, wenn kein ATP zugegen ist. Für den Aktomyosin Gehalt des Warmblütermuskels und des Fasermodells aus Warmblütermuskel ist der Dehnungswiderstand in der *Starre* gekennzeichnet durch einen EM von $4000-8000 \text{ g cm}^{-2} \text{ L} \cdot \Delta \text{L}^{-1}$.

2. Da der Dehnungswiderstand auch von der Aktomyosinkonzentration abhängt, ist der EM in eiweißärmeren Systemen wie dem geordneten Aktomyosinfaden und wahrscheinlich auch im Kaltblütermuskel kleiner. Er beträgt beim Aktomyosinfaden ohne ATP $\sim 550 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{L} \cdot \Delta \text{L}^{-1}$.

3. Im *Starrezustand* sind sowohl der kontrahierte

Abb. 8. Fadenmodell. Ord.: Spannung. Absz.: Zeit. - - - - Kontraktion durch $2,5 \cdot 10^{-3}$ -m. ATP. - o - o - Erschlaffung durch 10^{-4} -m. Salycyan und - + - + - anschließende Kontraktion durch Entgiftung des Salycyans durch Verdünnung auf $2 \cdot 10^{-5}$ -m. und Zugabe von $2 \cdot 10^{-2}$ -m. Cystein.

Abb. 9. Kontraktion in $2 \cdot 10^{-3}$ -m. ATP, $\downarrow$ Erschlaffung durch Benzaldehyd-Emulsion ($0,03$ -m.). Fasermodell. Ord.: Spannung. Absz.: Zeit.

Muskel (z. B. Monojodacetatstarre, Starre nach Taukontraktur²⁶, gegebenenfalls Totenstarre) ebenso wie Faser- und Fadenmodell unfähig zu erschlaffen.

4. Durch die Gegenwart der physiologischen ATP-Konzentration wird der *Starrezustand* in allen Aktomyosinsystemen gleichmäßig und in gleichem Umfang beseitigt. Dies wird daran erkannt, daß der EM auf $\sim 0,1$ des *Starre*-Betrages absinkt, solange die ATP-Gegenwart nicht zu einer Kontraktion führt. Im intakten Warmblütermuskel und im intakten Warmblüterfasermodell sinkt der EM in diesem Fall auf

²⁶ J. Godeaux, Arch. Internat. Physiol. 58, 299 [1950].

300—800 g cm⁻² · L · ΔL⁻¹. Da dieser elastische Zustand der *Ruhezustand* des lebenden Warmblütermuskels ist, scheint es zweckmäßig, ihn auch bei den Modellen so zu bezeichnen.

5. Mit dem Einsetzen der Kontraktion steigt der Dehnungswiderstand des Muskels^{20, 21, 4} und des Fasermodells auf Werte, die zwischen dem Starrezustand und dem Ruhezustand liegen.

6. Bei allen geordneten Aktomyosinsystemen können also die 3 möglichen Funktionszustände — Starre, Ruhe und Kontraktion — in gleicher Weise schon nach dem Dehnungswiderstand unterschieden werden.

7. Wird die ATP-Mangelstarre durch zu kleine ATP-Konzentrationen — etwa im ermüdeten Muskel — oder durch weniger gute Weichmacher — in den Modellen — nur unvollständig aufgehoben, so tritt zwar Erschlaffung ein, aber es bleibt ein *Kontraktionsrückstand*. Für vollständige Erschlaffung scheint der EM auf $\leq 1000 \text{ g cm}^{-2} \cdot \text{L} \cdot \Delta \text{L}^{-1}$ absinken zu müssen.

8. Daraus, daß alle Aktomyosinsysteme genügender Weichheit ($\text{EM} \cdot 10^5 \leq 1000$) reversibel erschlaffen, sobald die Kontraktion aufhört, folgt mit Sicherheit, daß die Erschlaffung kein aktiver Prozeß ist. Dieser Schluß besaß bereits einen sehr hohen Grad von Wahrscheinlichkeit auf Grund der thermodynamischen und mechanischen Beobachtungen von Hill⁵ am lebenden Muskel. Er ist gesichert durch die direkte Beobachtung des Kontraktionszyklus an den Modellen. Der Schluß bedeutet, daß die Erschlaffung der thermodynamisch freiwillige Teil des Kontraktionszyklus ist.

9. Also erfolgt die Energieaufnahme durch das Aktomyosinsystem mit Sicherheit bei der Kontraktion. Mit sehr großer Wahrscheinlichkeit handelt es sich dabei um die Spaltungsenergie des ATP und nicht um die Energie der ATP-Bindung an das Aktomyosin, die höchstens eine Bedeutung als Zwischenstufe einer mehrstufigen Energieübertragung vom ATP auf das Aktomyosin haben könnte. Denn nur ATP und ITP²⁷, die vom Aktomyosin gespalten werden, wirken als Kontraktionssubstanzen, obwohl die anderen Polyorthophosphate ebenfalls gebunden werden, wie ihre Weichmacherwirkung zeigt. Ferner folgen sich Kontraktion und Erschlaffung mit dem Einsetzen und Aussetzen der ATP-Spaltung — im Muskel mit Ruhe und Erregung, in den Modellen mit ATPase-Vergiftung und -Entgiftung. Die ATP-Bindung aber bleibt über Kontraktion und Erschlaf-

fung erhalten, wie die persistierende Weichmacherwirkung zeigt.

VIII.

Verschieden ist beim Aktomyosinsystem des lebenden Muskels einerseits und der beiden Modelle andererseits nicht der fundamentale Mechanismus von Kontraktion, Erschlaffung, Ruhe und Starre, sondern nur die Auslösung dieses Mechanismus: Der lebende Muskel verhindert auch bei ATP-Gegenwart die ATP-Spaltung in der Regel. Er erlaubt sie nur für einen kurzen Augenblick im Anschluß an eine Erregungswelle. Nur deshalb ist die Einzelzuckung die Elementareinheit der Muskeltätigkeit. Und so befindet sich der lebende Muskel überwiegend im Ruhezustand und nie im Zustand der Starre. Die Fähigkeit, die ATP-Spaltung zu verhindern, geht erst mit dem Absterben des Muskels verloren. Und so ist die Starre des intakten Muskels ein Zeichen des Todes.

Die Modelle aber *müssen* ATP spalten, wenn es vorhanden ist. Sie befinden sich deshalb ohne ATP, d. h. in der Regel im Zustand der Starre, unter ATP im Zustand einer Dauerkontraktion, und nur selten wenn die ATP-Spaltung durch besondere Maßnahmen des Experimentators unterdrückt wird (s. VI) im Zustand der Erschlaffung und der Ruhe. Dafür kann — im Gegensatz zum Muskel mit seiner selektiv permeablen Membran — auch das ATP-freie Modell durch unphysiologische Weichmacher in den Zustand der Erschlaffung gebracht werden.

Anhang von Karl Brecht

Wird statt einer einzelnen Modellfaser ein Bündel Wasser-Glycerin-extrahierter Fasern des Frosch-Rectus vertikal am Torsionsmyographen isometrisch eingespannt, so ist es möglich, an diesem Bündel einzelne ATP-Tropfen herablaufen zu lassen. Bei einer [ATP] von $\sim 10^{-2} \text{ mol}$, kontrahiert sich das Faserbündel nicht nur, sondern erschlafft auch nach Ablauf von $\sim 30 \text{ Sek.}$ wieder vollständig. Der Vorgang kann mit einem neuen ATP-Tropfen wiederholt werden. Daß das Faserbündel nach Aufspaltung der jeweiligen ATP-Gabe nicht starr wird, sondern wieder völlig erschlafft, kann im Rahmen der oben berichteten Tatsachen nur 2 Gründe haben: 1. In der feuchten Kammer bleibt das bei der Spaltung gebildete ADP — anders als im Bad — im Faserbündel. 2. ADP ist ein Weichmacher.

Die Anordnung in der feuchten Kammer wurde gewählt, weil K. Brecht und H. Heyck im hiesigen Institut feststellen wollten, ob die Modellkon-

²⁷ S. S. Spicer u. W. J. Bowen, J. biol. Chemistry 188, 741 [1951].

traktion mit elektrischen Erscheinungen verknüpft sei. Elektrische Phänomene konnten nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden.

Experimenteller Teil

1. Präparate: Die Fasermodelle wurden aus dem *Musculus psoas* des Kaninchens nach A. Weber¹ hergestellt. Die Herstellung der Fadenmodelle erfolgte nach dem Verfahren von Portzehl².

2. Kontraktions- und Erschlaffungsversuche. Sie wurden in der Versuchsanordnung vorgenommen — auch mit den Fasermodellen —, die von Portzehl² für das Fadenmodell beschrieben ist.

Um die Zusammensetzung der Lösungen bei Vergiftung und Entgiftung der Präparate oder bei anderen Formen des Überganges von Kontraktion zu Erschlaffung schnell ändern zu können, wurde das Bad auf dem Objektisch des Mikroskops mit einer Durchspülungsvorrichtung versehen. Die vorbereitete neue Lösung floß aus einem Standgefäß auf den Boden des Bades, während ein Absaugrohr an der Oberfläche des Bades die alte Lösung in die Wasserstrahlpumpe saugte, sowie sich der Meniskus hob. Auf diese Weise blieb die Tiefe des Bades und der Auftrieb der Füllung auf die beweglichen Apparateile automatisch konstant. Eichversuche ergaben, daß so ein vollständiger Ersatz des Bades nach Durchspülung von 1 Min. gewährleistet war.

2. Die Messung der Spannungslängendiagramme: Da die Modelle bei Ersatz weichmachender Lösungen durch 0,01-*m*. Phosphatpuffer $p_H \sim 7$ in jedem Kontraktionszustand sofort erstarren, können „weiche“ und „starre“ Spannungslängendiagramme für jeden Grad der Verkürzung desselben Präparates bei gleicher Ausgangslänge miteinander verglichen werden.

Damit die Unterschiede im Spannungslängendiagramm auf das jeweilige chemische Milieu bezogen werden können, müssen alle anderen Einflüsse auf das Diagramm eliminiert werden. Hierzu müssen sie bekannt sein.

Seit langem bekannt ist der Einfluß der Dehnungszeit bzw. der Dehnungsgeschwindigkeit. Die Dehnungszeit wurde streng konstant gehalten, indem die Spannung genau 1 und 2 Min. nach Beginn jedes Dehnungsschrittes abgelesen wurde. Die elastische Nachwirkung vollzog sich dabei im wesentlichen in der 1. Minute. Den Angaben über den *EM* wurden die Werte der 2. Min. zugrunde gelegt.

Der Einfluß der elastischen Nachwirkungen wurde ferner abgeschätzt dadurch, daß auch das Diagramm der elastischen Verkürzung auf dem Rückweg mit aufgenommen wurde. Da aber die Mittelwerte zwischen Hin- und Rückweg sich weniger genau festlegen ließen, wurden nur die 2-Min.-Werte auf dem Hinweg verwendet.

Die Dehnungsgeschwindigkeit war nicht streng konstant, weil der Betrag der Dehnung in Prozenten der Ausgangslänge nicht immer ganz gleich war. Dies ermöglicht im Extremfall einen Fehler der *EM* von $\pm 15\%$ bei Vergleich verschiedener Präparate. Bei dem Vergleich zweier elastischer Zustände desselben Präparates fällt dieser Fehler weg.

Versuch Nr.	Dauer der Salyrgan- einwirkung in Minuten	$EM \cdot 10^5 = g \cdot cm^{-2} \cdot L \cdot \Delta L^{-1}$ in $3 \cdot 10^{-3} - m \cdot ATP$ $+ 4 \cdot 10^{-4} - m \cdot Salyrgan$	
~ 20° C			
1	7	730	
2	7	500	
3	9	630	
4	9	600	
5	10	1260	
6	16	1200	
7	17	1150	
8	20	2260	
9	21	2150	
10	23	2470	
11	27	4250	
12	103	3920	
zwischen 2° und 5° C			
13	6	330	
14	7,5	300	
15	11	250	
nach 2 Salyrganperioden mit einem Intervall von ~ 11 Min. ²⁸			
	Gesamtdauer- der Salyrgan- perioden 1 + 2		
2 a	20 (13 + 7)	850	20° C
13 a	21 (13 + 8)	440	2° C
4 a	24 (17 + 7)	1680	20° C
5 a	25 (16 + 9)	1550	20° C
15 a	25 (17 + 8)	560	4° C

Tab. 3. Der ATP-Einfluß auf die Dehnbarkeit der Modellfaser nach verschieden langer Salyrganwirkung.

Da der *EM* von Muskeln und Aktomyosinsystemen mit zunehmender Dehnung steigt, wurden in der Regel nur 2 kurze Dehnungsschritte vorgenommen, so daß die Gesamtdehnung zwischen 5 und 10% der Ausgangslänge blieb.

Da die Modelle nach der Übertragung aus Glycerin in wäßrige Lösung langsam (in Stunden) denaturieren, wurden in der Regel die elastischen Eigenschaften zweier verschiedener Zustände — a und b — desselben Präparates durch die Messung von insgesamt 3 Diagrammen in der Reihenfolge a b a oder b a b festgelegt. Bei der Kürze der Messungen (2 Punktdiagramme mit Rückweg, Gesamtdauer von 3 Diagrammen ~ 40 Min.) wurden im

²⁸ Nach der ersten Salyrganperiode (13—17 Min.) wird zunächst das Salyrgan mit $6 \cdot 10^{-2}$ -*m*. Cystein + 10^{-2} -*m*. Phosphatpuffer und anschließend das Cystein mit reinem Phosphatpuffer (10^{-2} -*m*. $p_H \sim 7$) ausgewaschen. Nach insgesamt 11 Min. folgt die 2. Salyrganperiode.

übrigen Denaturierungseinflüsse nicht sicher festgestellt.

Dagegen nimmt die Weichmacherwirkung von ATP mit der Dauer der vorangegangenen Salyrganwirkung schnell ab. Tab. 3 zeigt, daß diese Abnahme bei 0°C langsamer verläuft als bei 20°C (vgl. Vers. 1—12 mit 13—15 der Tab. 3). Die Versuchsgruppe 2a bis 15a zeigt, daß dieser Salyrganeinfluß auf die ATP-Weichmacherwirkung nur sehr unvollständig dadurch aufgehoben werden kann, daß das Präparat durch Waschung mit Cystein zwischendurch entgiftet wird: Bei niedriger wie bei hoher Temperatur liegen die gefundenen *EM* in einer 2. Salyrganperiode von 7—9 Min. beträchtlich höher als in der 1. Salyrganperiode gleicher Dauer.

Die Chemikalien waren in der Regel analysenreine Präparate der Firma Merck. ATP-Präparate wurden je nach dem benötigten Reinheitsgrad in dieser Reihenfolge — Firma Henning (Triadenyl), Roehm & Haas (Phi-

ladelphia) und Sigma Chemical Comp. (Saint Louis) — verwendet.

Na-Triphosphat-Präparate verdanken wir der Freundlichkeit von Herrn Prof. Rüdorff und der Sigma Chemical Comp. Ihnen sei auch an dieser Stelle gedankt. Die Elektrotitration ergab, daß die Präparate mit 2 Valenzen pro Mol zwischen p_H 4 und 9 pufferten. Ebenso stimmte der gefundene Phosphorgehalt und der Gehalt an Kristallwasser mit dem für Triphosphat berechneten überein. Das Salyrgan (theophyllinfrei) war eine Spende der Farbwerke Höchst, der hiermit gedankt sei.

Herrn Prof. H. H. Weber danke ich für Anregungen und kritische Beratung bei dieser Arbeit.

Für eifrige und verständnisvolle Unterstützung bei der Ausführung der Versuche bin ich Fräulein Sigrid Bauer sehr dankbar.

Über die enzymatische Spaltung der Desoxyribosenucleinsäure aus Thymus und der Ribosenucleinsäure aus Hefe

Von GERHARD SCHRAMM, WOLFGANG ALBRECHT und KLAUS MUNK

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, Abt. Virusforschung, Tübingen

(Z. Naturforschg. **7b**, 10—18 [1952]; eingegangen am 8. Oktober 1951)

Die Diffusionskonstanten verschiedener Purinderivate werden gemessen. Bei den Nucleotiden, insbesondere bei der Hefeadenylsäure, ergibt sich eine starke p_H -Abhängigkeit der Diffusionskonstanten, die einer Änderung des Molgewichts um das 2,5-fache entsprechen würde. Bei der Spaltung der Ribosenucleinsäure aus Hefe mit kristallisierter Ribonuclease treten zu 82% dialysierbare Bruchstücke auf, deren durchschnittliche Diffusionskonstante in alkalischer Lösung mit der von Hefeadenylsäure übereinstimmt. Wegen des anomalen Verhaltens dieser Bezugssubstanz darf aber hieraus nicht geschlossen werden, daß die Spaltstücke die Größe von Mononucleotiden besitzen. Das Spaltgemisch konnte papierchromatographisch in vier einzelne Fraktionen aufgetrennt werden. Jede Fraktion ergibt bei der alkalischen Hydrolyse Adenylsäure und ein bis drei andere Nucleotide. Die Spaltstücke sind also wahrscheinlich Oligonucleotide vom Polymerisationsgrad 2—4. Bei der Spaltung der Thymonucleinsäure mit kristallisierter Desoxyribonuclease treten zu 90% dialysable Spaltstücke auf, die in ihrer Größe denen der Ribosenucleinsäure entsprechen. Papierchromatographisch ließen sich hier keine definierten Fraktionen nachweisen.

Desoxyribosenucleinsäure (DNS) und Ribosenucleinsäure (RNS) können durch spezifische Enzyme, die Desoxyribonuclease und die Ribonuclease, zu Oligonucleotiden gespalten werden. In beiden Fällen werden Phosphorester-Bindungen gelöst, wobei freie titrierbare Phosphorsäuregruppen entstehen. Eine Abspaltung von anorganischem Phosphat findet nicht statt. Es wäre wichtig, die Größe der Spaltstücke genau zu kennen, um hieraus Rückschlüsse auf die Konstitution der Nucleinsäure zu ziehen. Jedoch stoßen gerade die Molgewichtsbestimmungen mehrwertiger Ionen in der Größenordnung von 1000 auf besondere Schwierigkeiten. Die Anwendung aller Methoden, die auf Messung des Dampfdrucks be-

ruhen, verbietet sich, da wegen der Dissoziation die Zahl der osmotisch wirksamen Teilchen nicht bekannt ist. Es wäre möglich, die Molgewichte aus dem Sedimentationsgleichgewicht in der Ultrazentrifuge zu berechnen; bei der Größe der zu untersuchenden Anionen würden durch die Bindung einiger Kationen die Versuchsergebnisse nicht wesentlich verfälscht. Doch ist der technische Aufwand und der Zeitbedarf bei dieser Methode sehr groß, so daß dieser Weg für Serienbestimmungen nicht in Frage kommt. Wir entschlossen uns, als Maß für die Größe der Nucleotide die Diffusionskonstanten zu bestimmen, da hier die gleichen Überlegungen wie beim Sedimentationsgleichgewicht gültig sind. Es ist aber zu berücksich-