

Über das Aktomyosin des Kaninchenmuskels.

von

K. Balenovic und F. B. Straub.

Aktomyosin ist ein Komplex von Myosin und Aktin. BANGA und SZENT-GYÖRGYI¹ haben einen solchen Komplex aus Kaninchenmuskulatur erhalten, den sie Myosin B benannten. Es wurde von STRAUB² bewiesen, dass dieser Komplex aus Myosin und Aktin besteht. Nach den Angaben der vorangehenden Arbeit können durch Mischen von Myosin mit verschiedenen Mengen von Aktin Aktomyosine erhalten werden, die durch verschieden grosse Viskositätsänderungen auf Zusatz von Adenyltriphosphat (ATP) reagieren. Die Grösse dieser Viskositätserniedrigung wurde als Mass der „Aktivität“ eines Aktomyosins definiert. Die Aktivität von Myosin B, die bei den verschiedenen Präparaten konstant ist, wurde willkürlich 100% Aktivität genannt. STRAUB beobachtete, dass auch Aktomyosine von mehr als 100% Aktivität entstehen können, wenn man mehr Aktin dem Myosin zusetzt.

Wir haben gefunden, dass in einigen Fällen bei der Darstellung des Aktins aus dem Muskel soviel Aktin ausgelöst werden kann, dass dieses das im selben Muskel vorhandenen Myosin mehr als 100% zu aktivieren vermag. Dadurch müssten wir die Möglichkeit in Betracht ziehen, dass das im Muskel vorhandene Aktomyosin, also das eigentliche Kontraktionsprotein, aktiver ist als Myosin B. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass das Aktomyosin des Kaninchenmuskels wahrscheinlich 170% aktiv ist und enthält 1 mg Aktin pro 3 mg Myosin. Ist dem aber so, dann müsste eine weitere Frage beantwortet werden: warum erhält man bei der Extraktion des Muskels mit der WEBER-Lösung ein Aktomyosin (Myosin B) das im Muskel nicht vorkommt?

Da Aktin in saurer oder alkalischer Lösung rasch zer-

stört wird, schien es zweckmässig die Viskositätsmessungen nicht in WEBER-Lösung, sondern bei pH 7 auszuführen. Deshalb haben wir die Viskositätsbestimmungen von BANGA und SZENT-GYÖRGYI,¹ die in WEBER-Lösung ausgeführt wurden, wiederholt. Dieselben Kapillarviscosimeter, die in der vorangehenden Arbeit beschrieben wurden, dienten zu diesen Messungen. Myosin wurde in einer 0,6 m KCl Lösung gelöst, die aber durch Veronal-Azetat auf pH 7,0 gepuffert war. Diese Lösung wurde folgenderweise bereitet: zu 200 ccm der Veronal-Azetat Mischung nach MICHAELIS (die aber Kalium an Stelle von Natrium enthält) wurden 24 ccm n-HCl zugesetzt, dann 271 ccm einer 2 m KCl Lösung und auf 1 Liter aufgefüllt. Die K Ionenkonzentration war dann 0,6 m.

Myosin A und B wurden folgenderweise hergestellt: Kaninchenmuskulatur wurde durch einer eisgekühlten Latapie-Mühle gemahlen und bei 0° mit 3 Volumen WEBER-Lösung unter mechanischen Rühren 20 Minuten lang extrahiert. Zentrifugiert man die Mischung nach dieser Zeit, so erhält man eine Myosin A Lösung. Wird die Mischung nach dem Extrahieren 24 Stunden lang bei 0° stehen gelassen, mit dem gleichen Volumen WEBER-Lösung verdünnt und dann zentrifugiert, so bekommt man eine Lösung von Myosin B. Solche Lösungen wurden durch vorsichtige Zugabe von einer 2 m Azetatpuffer-Lösung auf pH 7 neutralisiert und mit der oben beschriebenen gepufferten KCl Lösung von pH 7 entsprechend verdünnt.

Der Myosingehalt der Myosin B Lösungen wurde in der von BANGA und SZENT-GYÖRGYI angegebenen Weise bestimmt. Bei der Bestimmung des Myosingehaltes von Myosin A Lösungen haben wir aber beobachtet, dass die Trockengewichtsbestimmung in der von BANGA und SZENT-GYÖRGYI angegebenen Weise schwankende Ergebnisse gibt. Bei der Neutralisierung der verdünnten Myosinlösung kann nämlich das pH schwer auf pH 7 eingestellt werden. Wir haben versucht, diese Trockengewichtsbestimmung zu standardisieren. Gibt man zu je 1 ccm einer Myosin A Lösung (in der WEBER-Lösung gelöst) 5 ccm 0,1 m Azetatpufferlösungen von verschiedenen pH, so erhält man Niederschläge von Myosin, deren Menge mit dem pH variiert und einen maximalen Wert bei Zugabe einer pH 4,8 Azetatpufferlösung erreicht. Das pH der Lösung ist

wegen der Alkalinität der Myosinlösung etwas höher. 5,2. Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse dieser Versuche. Myosin I ist ein gereinigtes Myosin, Myosin II ein ungereinigtes Myosin, beide in WEBER-Lösung gelöst.

Tabelle I.

pH der zugegebenen Puffers	Trockengewicht mg/ccm	
	Myosin I.	Myosin II.
3,6	0,7	1,3
4,0	1,1	3,7
4,4	8,0	21,9
4,8	9,1	22,5
5,2	8,4	19,0
5,6	8,6	17,4

Wir haben deshalb die Myosin A Trockengewichte derart bestimmt, dass wir immer 1 ccm des sich in WEBER-Lösung befindenden Myosins mit 0,5 ccm 0,1 m Azetatpuffer von pH 4,8 versetzten. Der Niederschlag wurde auf der Zentrifuge zweimal mit Wasser gewaschen, bei 105° getrocknet und gewogen.

Fig. 1. zeigt die Ergebnisse unserer Viskositätsmessungen. Im Wesentlichen erhält man dasselbe Bild, wie in der Arbeit von BANGA und SZENT-GYÖRGYI. Es gibt nur den Unterschied, dass wir die Viskosität von Myosin A und B in Gegenwart von ATP gleich gefunden haben.

Versuchsvolum in dem Viskosimeter war 4,0 ccm, dazu wurden 0,1 ccm einer 1,4%-ger ATP-Lösung gegeben. Temperatur: 0°.

In die Figur wurde die Viskosität von Myosin A ohne Zugabe von ATP nicht eingezeichnet. Dieser Wert variiert. Wir hatten Präparate die keine Aktivität besaßen (keine Viskositätsänderung auf Zugabe von ATP) und andere die 20% aktiv waren. Meistens findet man aber eine Aktivität von 15% bei Myosin A. Aus verschiedenen Gründen nehmen wir an, dass diese Aktivität durch ein wenig Aktin hervorgerufen wurde, das als Verunreinigung in Myosin A Präparaten vorkommt. Reines Myosin hat demgemäss keine Aktivität.

Den Zusammenhang zwischen Viskosität von Myosin B in Gegenwart von ATP und die durch ATP hervorgerufene Viskositätserniedrigung stellt Fig. 1. der voranstehenden Ar-

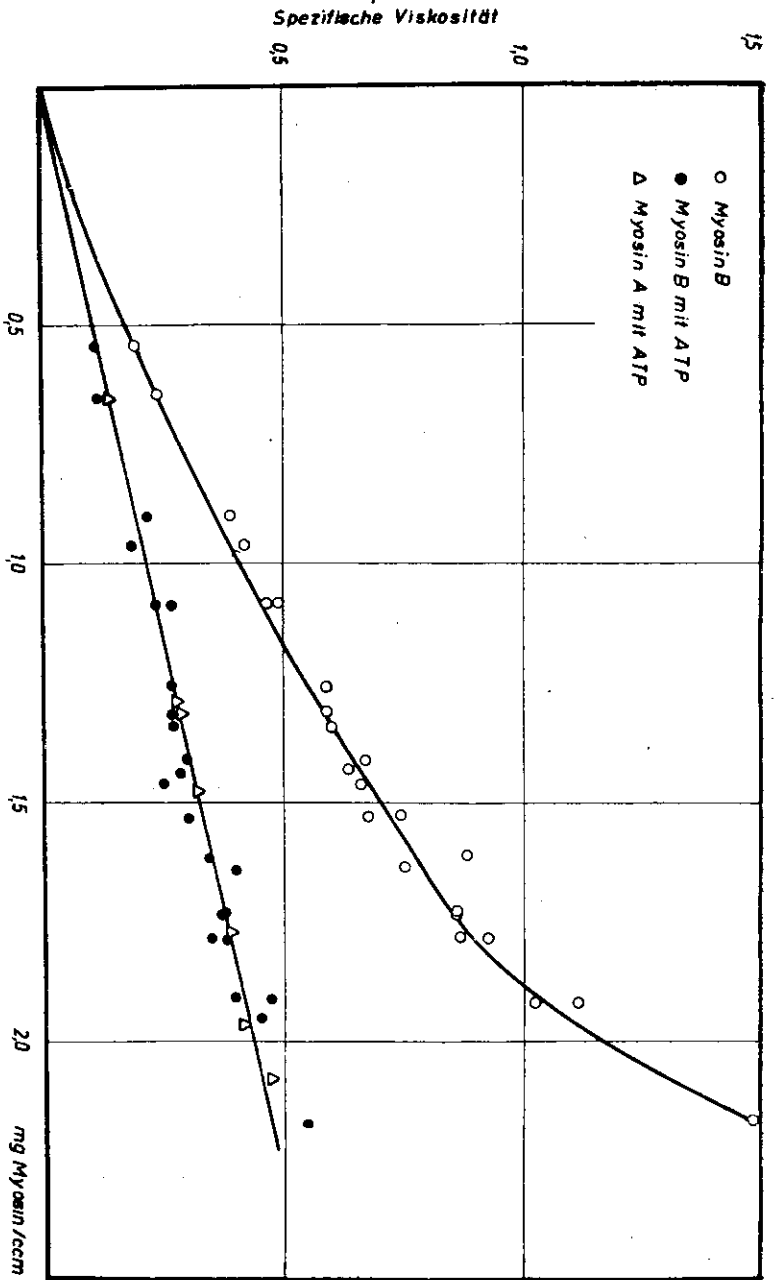


Fig. 1.

beit dar. Auf diesem Grunde wurde die Methode der Auswertung der Aktivität eines unbekanntes Aktomyosins ausgearbeitet. (Näheres s. bei STRAUB².)

Bestimmt man die Aktivität eines Myosin B Präparates, das nach der oben beschriebenen Methode dargestellt wurde, so findet man innerhalb der Fehlengrenzen der Methode immer eine 100% Aktivität. Wurde das Myosin mit dem Muskel nicht 24 sondern 48 Stunden lang stehen gelassen, dann verdünnt und zentrifugiert, so findet man meistens eine 100%, manchmal aber eine kleinere Aktivität. Das Myosin, das nach drei Tagen vom Muskel abgetrennt wird, ist schon immer weniger als 100% aktiv, z. B. in einem Falle nur 60%. Abgesehen von dieser Aenderung der Aktivität nach längerem Stehen, ist es klar, dass in erster Linie nicht eine Zeitfaktor in der Entstehung von Myosin B eine Rolle spielt. Myosin B, wenigstens nach der beschriebenen Methode dargestellt, ist ein wohl definiertes Produkt und reagiert bei Zugabe von ATP mit einer konstanten Viskositätserniedrigung.

Bestimmung des Aktins im Kaninchenmuskel. Bei der Darstellung des Aktins wird die Muskelsubstanz zuerst bei alkalischer Reaktion gehalten und dann mit Azeton behandelt. Beide Operationen können zu unkontrollierbaren Verlusten führen. Deshalb kann man aus Ausbeute bei der Isolierung auf die Menge des Aktins keinen Rückschluss ziehen. Mit der Methode von STRAUB wird durchschnittlich soviel Aktin aus dem Muskel isoliert, wie zur 100% Aktivierung von 30—60% des im Muskel vorhandenen Myosins nötig wäre.

Folgendes Verfahren ist aber für die Bestimmung des im Muskel gebundenen Aktins geeignet: man bestimmt die Menge an Myosin, die durch 1 g Muskel 100% aktiviert werden kann.

Kaninchenmuskel wurde wie üblich mit 3 Volumen WEBER-Lösung 20 Minuten lang extrahiert. Die Mischung wurde zentrifugiert und das Myosin A vom Muskelrückstand abgetrennt. Aus 150 g Muskel (Frischgewicht) erhielten wir somit 340 ccm von Myosin A Lösung und 240 g Rückstand. Die Lösung enthielt 22,5 mg/ccm Myosin.

Nun wurde die Hälfte des Rückstandes (der das Aktin enthält) mit der gesamten Menge Myosin zusammengebracht,

24 Stunden lang bei 0° stehen gelassen, dann mit WEBER Lösung verdünnt und zentrifugiert. Die Aktivität der überstehenden Myosinlösung wurde aus dem ATP Effekt viskosimetrisch bestimmt. Solche Versuche wurden auch derart eingestellt, dass 20, 25, 30, 33, 40, 100 und 200% des Rückstandes mit der gesamten Myosinlösung gemischt wurden. In jedem Falle wurde die Aktivität nach 24 Stunden bestimmt. Die Ergebnisse solcher Experimenten mit verschiedenen Muskelpräparaten sind in der Fig. 2. zusammengestellt. Man sieht, dass ungefähr $\frac{1}{3}$ des Muskelrückstandes genügt, um die ganze Myosinlösung 100% zu aktivieren. Ist mehr Rückstand, also mehr Aktin vorhan-

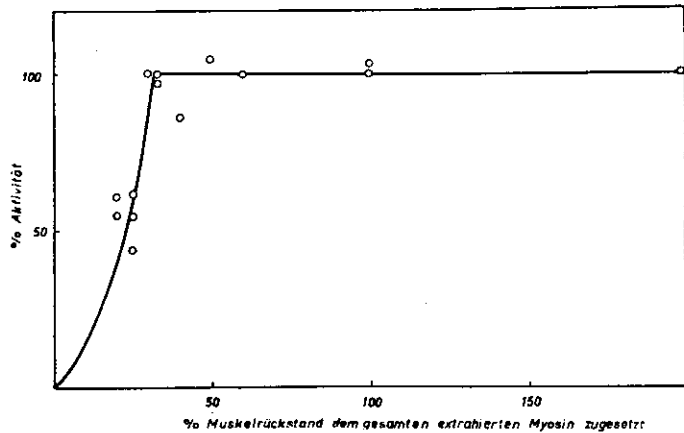


Fig. 2.

den, so tritt keine weitere Aktivierung ein. Dies ist im Gegensatz zur Aktivierung bei pH 7 mit gelöstem Aktin wo die Aktivierung bei weiterem Zusatz von Aktin bis 170% weitergeht.

Bei der zahlenmässigen Auswertung dieser Ergebnisse darf man nicht ausser Achtung lassen, dass ein Teil des Myosins durch die einfache Extraktion mit 3 Volumen WEBER-Lösung im Rückstand zurückbleibt. Die Schwankungen in der Menge des extrahierten Myosins sind für die Streuung der Punkte in Fig. 2. verantwortlich. Ist M die Menge des Myosins pro g Muskel und werden davon M' pro g extrahiert, so bleibt im Rückstand $M - M'$ pro g. Bekommt man mit 33% des Rückstandes noch eben eine 100% aktive Myosinlösung, so bedeutet das, dass das Aktin von 0,33 g Muskel $0,33 (M - M') + M'$ Myosin 100% aktivierte. In einem unserer Versuche aktivier-

ten 33% des Rückstandes noch eben zu 100%. M' war 51 mg/g, M ist bekanntlich 80 mg/g. Das Aktin des 0,33 g Muskels aktivierte also

$$0,33 (80-51) + 51 = 60 \text{ mg Myosin,}$$

1 g Muskel dreimal soviel, also 180 mg. Nach den Angaben von STRAUB braucht man 1 mg Aktin um 6 mg Myosin 100% zu aktivieren. Daraus folgt, dass im Muskel $180/6$ also 30 mg Aktin pro g (Frischgewicht) gibt. In ähnlichen Versuchen fanden wir den Wert 26—30 mg/g Muskel. Zu einer 100% Aktivierung, also zur Entstehung von Myosin B wäre die Hälfte dieser Menge nötig. Nach den Angaben von STRAUB² bekommt man ein 170% aktives Myosin, wenn man Myosin und Aktin in der Proportion, wie sie im Kaninchenmuskel vorkommen, bei pH 7 zusammensetzt. Das ist eben der maximale Wert der Aktivität, der bei pH 7 erreicht werden kann. Demgemäss können wir sagen, dass sich im Muskel nicht ein 100% aktives Aktomyosin (Myosin E) sondern ein maximal aktives Aktomyosin mit 170% Aktivität befindet.*

Es fragt sich nun, warum man aus dem Muskel durch Extraktion mit WEBER-Lösung das 100% aktive Myosin B an Stelle des natürlichen 170% aktiven Aktomyosins erhält. Aus den in dieser Arbeit mitgeteilten Versuchen geht hervor, dass wenn auch das in WEBER-Lösung gelöste Myosin mehrere Tage lang mit dem Muskel in Berührung steht, keine Aktivierung über 100% stattfindet. Folgender Versuch zeigt, dass dabei freies Aktin im Muskel zurückgeblieben ist. Es wurde wie üblich Myosin B bereitet und vom Muskelrückstand abgetrennt. Der so erhaltene Muskelrückstand wurde nun mit soviel Myosin A versetzt, wie ursprünglich im Muskel vorhanden war. In 24 Stunden wurde auch dieses Myosin zu 100% aktiviert.

Myosin B bekommt man demgemäss darum, weil das Myosin unter den Bedingungen der WEBER'schen Lösung nur soviel Aktin aus dem Muskel extrahieren kann, das eben zur 100% Aktivierung nötig ist. Wie in der vorangehenden Arbeit erwähnt, ist Aktin im Muskel festgebunden, seine Auslösung geschieht in der Weise, dass es zu dem in Lösung vorhande-

* Fäden, die aus Myosin B und aus künstlich hergestelltem 160% aktivem Myosin ausgezogen wurden, kontrahierten in Gegenwart von K, Mg und ATP in annähernd gleicher Weise.

nen Myosin fester gebunden wird, als zum Muskelrückstand. Es ist leicht möglich, dass die Bindung zwischen Myosin und Aktin nur bis zu 100% Aktivität fest genug ist, um das Aktin aus seinem Verbands im Muskel loszulösen. Gibt man noch *gelöstes* Aktin zu einem 100% aktiven Aktomyosin, so entsteht ein aktiveres Aktomyosin.

Zusammenfassung.

1. Kaninchenmuskel enthält ungefähr 25—30 mg Aktin pro Gramm Frischgewicht. 12—15% des Gesamtproteins ist also Aktin. Diese Menge des Aktins vermag das anwesende Myosin maximal zu aktivieren (170% Aktivität).

2. Durch die alkalische Salzlösung von WEBER wird ein minder aktives (100%) Aktomyosin extrahiert.

Litteratur.

1. *I. Banga* und *A. Szent-Györgyi*, Studies from the Institute of Medical Chemistry, Szeged, 1, 5 (1942).
2. *F. B. Straub*, *ibid.*, 2, (1943).