

Technisches über Myosinfäden nebst einigen Beobachtungen über ihre Kontraktion.

von

M. Gerendás.

H. H. WEBER¹ zeigte, dass wenn eine genügend konzentrierte Myosinlösung durch eine Kapillare in Wasser eingelassen wird, das ausströmende Myosin in Form eines fadenförmigen Gels erstarrt. Nach WEBER sind diese Fäden elastisch und 100–300% dehnbar.

Ich habe mich bereits früher 2.) 3.) mit den Eigenschaften solcher Fäden beschäftigt und konnte WEBER's Angaben vollauf bestätigen. Bei der Wiederaufnahme des Problemes hatten wir Fäden nötig die ATP. spalteten. Obwohl die Phosphatase-Aktivität des Myosins äusseren Eingriffen gegenüber nicht empfindlich ist und Myosin bei 0° ohne Verlust der Fermentaktivität wiederholt pezipitiert werden kann, fand ich unsere Fäden fermentativ unwirksam. Die Analyse zeigte, dass unser Myosin durch die, im destillierten Wasser anwesenden Metalle, in erster Linie durch das Kupfer inaktiviert wurde. Cu wird durch das Myosin gebunden und angereichert. Aus diesem Grunde wurden die Versuche derart wiederholt, dass für alle Zwecke nur destilliertes Wasser zur Verwendung kam, das aus Glasgefässen zweimal umdestilliert wurde. Diese Fäden, auf die sich alle Angaben dieses Bandes beziehen, sind fermentativ aktiv, kontrahieren mit ATP in Gegenwart von Salzen, sind aber locker, brüchig, unelastisch, können nicht mehr als 10–15% gestreckt werden ohne zu zerreißen.

Wird dem Wasser, in dem man die Fäden zieht, 0,001 mol CuCl₂ zugefügt, so erhält man wieder Fäden, die elastisch, 100–300% streckbar, aber fermentativ unwirksam sind.

Methodisches über die Herstellung von Myosinfäden.

Myosinfäden können am einfachsten derart hergestellt werden, dass man die Myosinlösung in ein Glasrohr aufsaugt dessen eines Ende zur Kapillare ausgezogen ist. Man lässt nun das Myosin in einer flachen Schale in Wasser oder in verdünnte Salzlösung einlaufen und bewegt das Glasrohr hin her. Bei visköseren Lösungen muss noch ein Druck aufgesetzt werden: am einfachsten verbindet man das dicke Ende des Rohres mit einem Gummischlauch, in den man einbläst. Mit einiger Übung

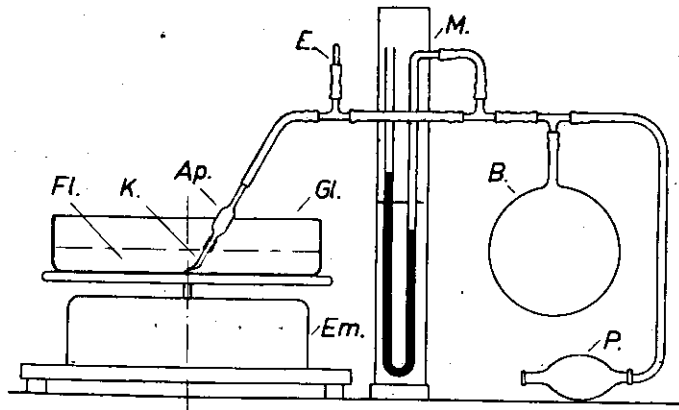


Fig. 1.

kann man in dieser Weise ziemlich gerade und gleichmässige Fäden herstellen. Die Dicke der Fäden hängt vom Diameter der Kapillare, der Viscosität der Lösung, der Auslaufgeschwindigkeit und von der Geschwindigkeit ab, mit der man das Rohr bewegt. Am besten eignen sich für unsere Zwecke Fäden von etwa 0,2—0,3 mm. Diameter.

Für viele Fragen sind aber die, in dieser Weise hergestellten Fäden nicht gleichmässig genug. In solchen Fällen müssen die Fäden mechanisch gezogen werden. Die von uns gebrauchte Einrichtung ist in beistehender Figur 1 abgebildet. Diese besteht aus einem drehbaren Tisch der durch einen Motor (Em) langsam ca 3 Rev. per Min. gedreht wird. Die Geschwindigkeit ist regulierbar. Auf diesen Tisch wird, wohl zentriert, das Wasser oder die verdünnte Salzlösung in einer weiten, flachen Schale (Ge) gelegt. Die Auslaufkapillare (K) wird mit

einem kleinen Reservoir verbunden (Ap), das mit der Myosinlösung gefüllt wird. Der Druck über der Myosinlösung wird mit einer kleinen Gummipumpe (P) hergestellt, am eingeschalteten Manometer (M) kontrolliert und mit Hilfe eines eingeschalteten Gummiballes (B, innere eines Fussballen) stabilisiert. Der Druck konnte durch öffnen bei E aufgehoben werden. Die Kapillare und das Reservoir sind verschiebbar auf einen Querbalken montiert so, dass sie nach einem jeden Umlauf des Tisches verschoben werden können. Der Druck wird erst aufgesetzt und das Fadenziehen begonnen nachdem die Flüssigkeit im Gefäss die Bewegung des Tisches aufgenommen hat. Die Kapillare ist schräge gestellt, es ist aber auch vorteilhaft ihr Ende etwas umzubiegen, um dieses noch mehr in die Auslaufsrchtung zu bringen. Das Ende der Kapillare ist etwa 1—2 cm. vom Boden der Glasschale entfernt. Der Faden setzt sich in Form einer Spirale auf den Boden des Gefässes und kann von diesem, nachdem er genügend erstarrt is, leicht abgetrennt werden.

Je nach Natur des Myosins können Fäden aus 0,5—5% Myosin gezogen werden. Zur Untersuchung der Kontraktion eignen sich Fäden vom 1—2% am besten. Die aus konzentrierteren Myosinlösungen hergestellten Fäden ziehen sich minder gut zusammen, verdünntere Lösungen geben zu lockere Fäden. Myosin B Lösungen über 5% sind zu viskös um überhaupt verarbeitet zu werden.

Material.

Fäden können unmittelbar aus dem 24 stündigen Extract (s. BANGA and SZENT-GYÖRGYI) gezogen werden, wenn der Extrakt mit Salzlösung im Verhältniss von 100:80 verdünnt und zentrifugiert wurde. Eine konzentrierte Myosinlösung lässt sich erhalten, wenn man den Extrakt mit einer geringen Menge von ATP (0,014%) verflüssigt, rasch zentrifugiert, die Flüssigkeit abgiesst und wartet bis diese wieder gelatinisiert d. h. das zugesetzte ATP gespalten ist.

Der 20 Min. Extrakt, wenn frisch zubereitet, gibt überhaupt keine Fäden obwohl es etwa 2% Myosin enthält. Das Myosin fällt flockig aus, oder zerfliesst am Boden des Gefässes. Der Grund hierfür liegt in der Anwesenheit von ATP das in Ge-

genwart der hohen Salzkonzentration verflüssigend wirkt. Um Fäden aus dem 20 Min Extrakt zu erhalten muss man diesen erst über Nacht im Eisschrank stehen lassen, in welcher Zeit das ATP gespalten wird. Aber selbst dann geben die Auszüge meistens keine Fäden, da das Myosin A, aus dem das Myosin dieser Auszüge vorwiegend besteht, viel schwächere Kohäsionskräfte hat, wie das Myosin B des 24 Stündigen Extraktes. Um aus dem 20 Min. Extrakt Fäden zu erhalten muss der Extrakt neutralisiert werden. Ich gebrauchte zur Neutralisierung 5% Essigsäure. Die berechnete Menge der Säure wurde zugesetzt und die Lösung sehr energisch umgerührt. Die Neutralisierung hat keinen Einfluss auf die Kontraktionsfähigkeit der Fäden. Ohne Neutralisierung lassen sich nur sehr dünne Fäden u. zw. bei sehr kleiner Auslaufgeschwindigkeit herstellen.

Die Myosinextrakte sowie die Fäden können bei 0° mehrere Tage bis über eine Woche ohne Verlust an Aktivität bewahrt werden.

Sollten Fäden aus gereinigtem Myosin hergestellt werden, so wurden die Extrakte anlehnend an J. T. EDSALL, mit 5-fachem Vol. Wasser verdünnt und neutralisiert, das Präzipitat abzentrifugiert, mit Wasser gewaschen, dann wieder in Salzlösung gelöst. Das Salz wurde in Form eines feinen Pulvers oder in Form einer konzentrierten Lösung zugesetzt. Zur Homogenisierung liess ich die Lösungen vor Gebrauch einige Stunden stehen und entfernte die Luftbläschen durch Zentrifugieren. Alle Manipulationen wurden bei 0° ausgeführt. Das Myosin kann unter diesen Umständen wiederholt umgefällt werden, ohne seine Aktivität zu verlieren.

Das an der Zentrifuge abgeschiedene Myosin ist zu locker um eine genügend konzentrierte (1—2%) Myosinlösung zu geben. Um eine solche zu erhalten wurde das Präzipitat bei -15° befroren. Nach auftauen lässt sich das Myosin leicht auf ein geringes Volum bringen. Oft genügt es schon das aufgetaute Präzipitat mit einem Glasstabe zu zerschlagen, wonach man das Wasser einfach ablaufen lassen kann. Das Myosin soll aber nicht zulange in gefrorenem Zustande gehalten werden da es sonst körnig wird.

Die Fäden, die aus derart gereinigtem Myosin hergestellt wurden, kontrahieren ebenso als die aus dem primären Extrakt hergestellten. Werden aber die Fäden aus derart gereinigtem

Myosin in destilliertem Wasser hergestellt, so schwellen diese nach einiger Zeit enorm an. Dieses Schwellen kann durch geringe Mengen von Neutralsalzen hintangehalten werden. 0,002 mol KCl oder 0,0001 mol CsCl ist deutlich aktiv. Aus diesen Gründen haben wir Fäden aus präzipitiertem Myosin stets in 0,1 mol KCl und nicht in Wasser hergestellt. Wird die Myosinlösung vor dem Fadenziehen neutralisiert, so wird kein Schwellen beobachtet und der Faden kann besser in Wasser gezogen werden.

Untersuchung der Fäden.

Zur Beobachtung und Messung der Kontraktionerscheinungen bringt man am besten kurze, etwa 3 mm lange Stückchen des Fadens in der betreffenden Lösung auf ein ausgehöhltes Objektglas. Der Faden kann dann unter dem Mikroskop beobachtet und mit dem Okularmikrometer gemessen werden. Wir gebrauchten besonders dicke, tief ausgehöhlte Objektgläser.

Soll die Länge des Stückes gemessen werden, so ist es wichtig dass die Schnittfläche an den Enden scharf sei. Zur Herstellung und Übertragung derartiger Faderstücke eignet sich ein aus Celluloid hergestellter Spatel besonders gut. (Fig.

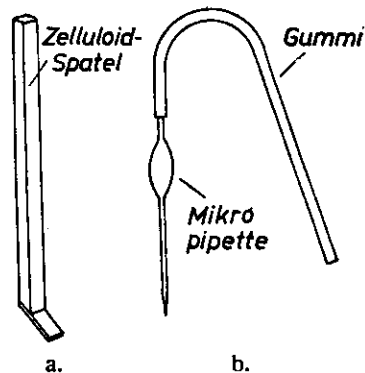


Fig. 2.

2. a.) Das Myosin klebt zum Celluloid nicht. Der etwa 3 mm breite Spatel wird unter den Faden gelegt, etwas aufgehoben, dann streift man mit einem gebogenen, dünnen Glasstäbchen über die Ränder, wobei man den Faden abschneidet. Das abgeschnittene kleine Stückchen liegt am Spatel und kann mit diesem leicht aus der Flüssigkeit gehoben und auf das Objektglas übertragen werden.

Sollte die Kontraktion auf Zugabe von ATP in verschiedenen Salzen verfolgt werden, so wurde die abgemessene Menge der Salzlösung (0,35 ml.) auf das Objektglas gebracht und das ATP (0,05 ml) aus einer kleinen, zur Kapillare ausgezogenen Pipette zugesetzt, (Fig. 2 b.) u. zw. derart, dass die Lösung

in einem dünnen Strahl energisch eingeblasen wurde. Wird dann noch Luft auf die Oberfläche der Flüssigkeit geblasen so wird die Lösung hierdurch energisch durchgerührt, was sehr wichtig ist. Es ist auch wichtig darauf zu achten, dass der Faden nicht an das Glas anhafte und nicht am Rande, sondern frei in der Flüssigkeit liege, also von allen Seiten der Diffusion frei zugänglich sei.

In den Arbeiten vorliegenden Bandes wurde die Kontraktion stets mit % der Verkürzung ausgedrückt. Diese Ausdruckweise ist bequem aber irreführend. Die richtige, aber mehr komplizierte Weise wäre die Kontraktion durch Messen des Volumens des Fadens auszudrücken.

Dies sei mit folgendem Beispiel erleuchtet: nehmen wir an dass wir die Kontraktion zweier Fäden vergleichen. Der eine Faden verkürzt sich (isodiametrisch) um 25, der ander um 66%. Man wäre also geneigt zu denken dass letzterer sich bloss 2,5-mal mehr kontrahierte als ersterer. Wird aber das Volum berechnet, so findet man, dass während der erste Faden sich nur um etwa 40% zusamm zog, letzterer eine Kontraktion von 97% zeigte. Handelte es sich um Fäden, die ursprünglich 1,5% Myosin enthielten so verlor der erste Faden 40% letzterer 98,5% seines Wassers. Während der Myosin gehalt im ersteren Faden von 1,5 auf 2,5 stieg, stieg der Myosin gehalt im letzteren auf 50%. Dieser letztere Faden besteht nun also praktisch genommen aus festem, benetztem Myosin.

Diese Berechnung erklärt auch warum in dem Vessuchen über die in diesem Bande berichtet wird, die maximale Kontraktion nie 66—70% überschritt. 66% Kontraktion wird sehr oft gefunden, aber kaum überschritten. Zugleich verstehen wir warum der kontrahierte Faden undurchsichtig wird.

Doppelbrechung und Kontraktion.

Die Myosinfäden, die in der beschriebenen Weise hergestellt wurden ziehen sich in der entsprechenden Salzlösung auf Zugabe von ATP in allen Richtungen gleichmässig zusammen, d. h. die Kontraktion ist isodiametrisch. Fig. 3. gibt die % Kontraktion eines Myosinfadens in 0,1 M KCl. Wie ersichtlich bleibt Kontraktion in der Querrichtung kaum hinter der Kontraktion der Längsrichtung zurück. (Abszisse: Zeit in Min.)

Dieses von der Muskelfaser abweichende Verhalten der Myosinfäden ist dem Umstande zuzuschreiben, dass die Myosinmicellen im Faden, im Gegensatz zum Muskel, nicht, oder nur ganz schwach geordnet sind. Selbst wenn sich die einzelnen Micellen anisodiametrisch zusammenziehen muss die Kontraktion des Fadens isodiametrisch werden wenn die Micellen nicht geordnet sind. Meistens hat aber der Faden eine sehr geringe Doppelbrechung, also eine ganz schwache Orientierung der Micellen und darum bleibt auch die Kontraktion im Querdurchmesser hinter der Verkürzung meistens etwas zurück (Fig 3).

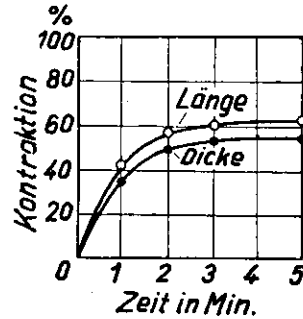


Fig. 3.

Um die Micellen im Faden zu orientieren und somit die Verhältnisse des Muskels, so gut wie möglich, nachzuahmen, muss man den Faden spannen. Dann ordnen sich die Micellen koaxial mit dem Faden. Diese Orientierung kann durch Beobachtung der Doppelbrechung messend verfolgt werden.

Leider aber können unsere, in Wasser gezogenen Fäden nicht oder nur sehr unwesentlich (10—15%) gesteckt werden, da sie zerreißen. Die in gewöhnlichem destillierten Wasser oder CuCl_2 hergestellten Fäden sind dehnbar sind aber inaktiv und geben keine Kontraktion mit ATP (s. Tab. 1.). Bis zu einem gewissen Grade können die in KCl gezogenen Myosin Fäden derart orientiert werden, dass man sie auf ein Objektglas bringt, mit einem Deckglas bedeckt und durch Bewegen des letzteren die Fäden hin und herrollt. Der Faden zerreißt hierbei, aber die entstandenen fadenförmigen Fragmente zeigen eine ausgesprochene Doppelbrechung. Auf Einwirkung von ATP werden diese Fadenstücke kürzer und gleichzeitig um etwa 15—20% dicker. (S. Tab. I.)

Ich bestrebe mich Verhältnisse zu finden unter denen dehnbare und doch aktive Fäden erhalten werden können. Ich versuchte Fäden an Stelle von Wasser, in verschiedenen Salzlösungen oder organischen Lösungsmitteln herzustellen. Nachdem die frisch gezogenen Fäden 5 Min. lang in der betreffenden Lösung verweilt untersuchte ich ihre Dehnbarkeit, dann über-

Tabelle I.

Lösung	Dehnung	Doppelbr. vor der Dehnung	Doppelbr. nach der Dehnung	ATP — Wirkung	
				Länge %	Dicke %
0,1 KCl	10—15%	—	In Spuren	— 62	— 53
0,001 CuCl ₂	200%	0,33.10 ⁻⁴	18,5.10 ⁻⁴	—	—
0,1 KCl gewalzt	—	—	7,5.10 ⁻⁴	— 7	+ 15
25% glycerin	200%	—	15,6.10 ⁻⁴	— 16	+ 20
0,001 ZnSO ₄	200%	In Spuren	11,6.10 ⁻⁴	— 30	+ 55

trug ich sie in 0,1 mol KCl und untersuchte nach weiteren fünf Minuten unter ATP Zugabe (0,18%) ihre Kontraktionsfähigkeit. Zur Untersuchung der Dehnbarkeit gebrauchte ich den in Fig.

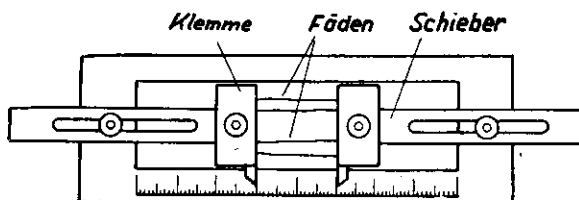


Fig. 4.

4 abgebildeten Apparat. Die Fäden wurden an beiden Ende zwischen zwei Plättchen eingeklemmt. Dann wurden die Schieber auseinander gezogen. An der Skala konnte die Dehnung abgelesen werden, bei der die Fäden rissen.

In Glycerin gezogen, werden die Fäden dehnbar ohne ihre Kontraktilität zu verlieren. Am besten eignet sich 25% Glycerin, die Kontraktilität geht aber auch in reinem Glycerin nicht verloren. In reinem Glycerin steigt aber die Doppelbrechung auf Dehnen nicht.

Die untersuchten Kationen können in drei Gruppen geteilt werden (s. Tab. II.):

1. Die die Aktivität nicht vermindern aber auch die Dehnbarkeit nicht steigern (Li, Na, K, Mg, Mn.)

2. Die die Dehnbarkeit steigern aber die Aktivität vernichten, also das Myosin denaturieren (Cu.)

3. Die die Dehnbarkeit bei gewissen Konzentrationen stei-

Tabelle II.

Lösung	Norm. Konz.	Dehnbarkeit	ATP — Kontraktion % (Länge)
LiCl	0,1	20	52
	0,01	20	60
	0,001	30	58
NaCl	0,1	—	55
	0,01	—	51
	0,001	20	58
KCl	0,1	10	62
	0,01	10	62
	0,001	10	62
CaCl ₂	0,1	10	59
	0,01	20	55
	0,001	20	55
MgCl ₂	0,1	Zerfließt	—
	0,01	15	58
	0,001	20	55
MnSO ₄	0,1	—	43
	0,01	—	50
	0,001	—	00
CuCl ₂	0,1	203	—
	0,01	230	—
	0,001	80	6
ZnSO ₄	0,1	130	10
	0,01	220	38
	0,001	75	40
Al ₂ (SO ₄) ₃	0,1	100	14
	0,01	100	21
	0,001	10	47
FeCl ₃	0,1	40	17
	0,01	95	23
	0,001	30	40
Co(NO ₃) ₂	0,1	30	44
	0,01	30	54
	0,001	20	50
NiSO ₄	0,1	70	42
	0,01	60	44
	0,001	50	40

gern aber die Aktivität nur in geringerer Masse vermindern (Zn, Al, Fe, Co, Ni). Natürlich ist der Unterschied kein absoluter und bei höherer Konzentration wirken auch diese Kationen denaturierend.

Es ist scheinbar unmöglich Ione zu finden, die den Fäden dehnbar machen und die Kontraktionsfähigkeit ganz unbeeinflusst lassen. Die Dehnbarkeit scheint bereits ein Ausdruck der Denaturierung zu sein.

Am günstigen fand ich die Verhältnisse bei 0,001 N ZnSO_4 ,

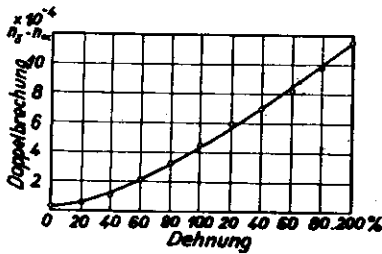


Fig. 5.

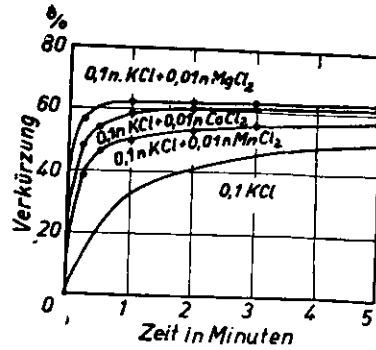


Fig. 6.

In der Fig. 5. wird der Zusammenhang zwischen Dehnung und Doppelbrechung gegeben.

Werden die gestreckten Fäden losgelassen, so ziehen sie sich wieder zusammen, die Dehnung ist also elastisch. Werden aber die Fäden 10 Minuten lang in gedehntem Zustande gehalten, dann losgelassen, so behalten sie ihre Länge. Offenbar entwickeln sich zwischen den benachbarten Micellen neue Verbände. Werden nun die also „gesetzten“ Fäden in 0,1 KCl übertragen, hier 5 Min. lang belassen, dann ATP zugesetzt, so verkürzen sie sich, so wie der Muskel, unter gleichzeitiger Zunahme ihres Querdurchmessers (s. Tab. 1.) Gleichzeitig verschwindet ihre Doppelbrechung.

Anlässlich dieser Versuche untersuchte ich ob die Wirkung von Mg auf die Kontraktion spezifisch sie. Wie durch Szent-Györgyi beschrieben, kann die aktivierende Wirkung von KCl durch MgCl_2 befördert werden. Ich fand, dass Mg in diesen Versuchen durch Mn and Co ersetzt werden kann. Das Ergebnis meiner Versuche ist in beistehender Fig. 6 zusammenge-

fasst. Ohne KCl geben CoCl_2 and MnCl_2 , so wie das MgCl_2 , mit ATP nur eine schwache und langsame Kontraktion.

Zusammenfassung.

Technik der Herstellung und Untersuchung von Myosinfäden wird beschrieben.

Es wird gezeigt, dass Myosinfäden, in üblicher Weise hergestellt, sich isodiametral zusammenziehen. Gesteckte Fäden, in denen die Myosinmicellen koaxial zur Fadenaxe orientiert sind, ziehen sich anisodiametral zusammen: werden gleichzeitig kürzer und dicker.

Ähnlich wie im Muskel verschwindet die Doppelbrechung während der Kontraktion.

Die Wirkung verschiedener Ione auf Dehnbarkeit und Kontraktilität wird untersucht.

Es wird gezeigt dass Mn und Co bei der Kontraktion das Mg ersetzen können.

Litteratur.

1. H. H. Weber: Arch. ges. Physiol. 235, 205, 1934.
2. M. Gerendás and A. Szent-Györgyi: Enzymologia, 9, 117, 1940.
3. M. Gerendás: Ibid. p. 123.