

Über die spezifische Aktivität der durch Ca²⁺ aktivierten Myosin-ATPasen aus Kalbsherz- und Kaninchenskelettmuskel : eine methodische Untersuchung

Autor(en): **Jenny, E. / Büchi, K.**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires**

Band (Jahr): **112 (1970)**

Heft 11

PDF erstellt am: **21.06.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-592737>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern. Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Aus dem Institut für Pharmakologie und Biochemie,
 Vet.-med. Fakultät der Universität Zürich
 (Direktor: Prof. E. Jenny)

Über die spezifische Aktivität der durch Ca^{2+} aktivierten Myosin-ATP-asen aus Kalbsherz- und Kaninchenskelettmuskel: Eine methodische Untersuchung

Von E. Jenny und K. Büchi

1. Einleitung

Bei der Kontraktion und Relaxation quergestreifter Muskeln verschieben sich Aktin- und Myosinflamente gegeneinander [1]. Die Steuerung der gleitenden Filamente, die bei der Kontraktion direkt chemische in mechanische Energie überführen, besorgen die Membran [2], das sarkoplasmatische Retikulum [3] und das Troponin-Tropomyosin-System [4]. Analoge Mechanismen werden in andern Muskeltypen vermutet, sind aber noch nicht einwandfrei bewiesen. Die Frage, worin letztlich auf molekularer Ebene die ungeheuren Unterschiede zwischen einem gemächlichen Schneckenmuskel und einem mit der Tourenzahl eines Ferrarimotors vibrierenden Insektenflugmuskels bestehen, ist schon lange gestellt. Zahlreiche Arbeiten sind dem Ziel gewidmet, offensichtlich vorhandene Unterschiede aufzuspüren und zu spezifizieren. Im Blickfeld stehen momentan die kontraktiven Proteine, da sie am einfachsten zu untersuchen sind.

Aktin und Tropomyosin, Eiweiße der I-Zone, weisen eine geringe Muskelspezifität auf [5, 6, 7]. Über Troponin ist noch nichts bekannt. Wie steht es nun mit dem Myosin, dem wichtigsten Protein der A-Bande? Seit der Arbeit von Bailey [8] wissen wir, daß die spezifische Aktivität von Myosin aus Herz und Skelettmuskel verschieden ist, und vor kurzem gelang Barany [9] der Nachweis einer Korrelation zwischen der ATP-ase-Aktivität einer Vielzahl von Myosinen und der maximalen Verkürzungsgeschwindigkeit ihrer entsprechenden Muskeln. Viele andere Arbeiten haben zusätzliche Unterschiede aufgedeckt, und man neigt heute dazu, nicht mehr vom Myosin, sondern von Myosinen zu sprechen und sie als eine phylogenetisch und ontogenetisch verwandte Familie von «Isoenzymen» aufzufassen. Die wichtigsten Punkte zum Thema: Gleichheit und Ungleichheit der Myosine wollen wir im folgenden kurz streifen.

Physikalisch-chemische Eigenschaften stimmen meist weitgehend überein (für eine Übersicht siehe [10]). Das Molekulargewicht, 100 Jahre nach der Entdeckung des Myosins immer noch ein beliebtes Diskussionsthema der «Muskelmänner», ist nicht mit Sicherheit bekannt, doch ergeben sich bei gleicher Methodik numerisch für alle untersuchten Spezies gleiche Werte [6, 11, 12]. Identisch sind außerdem Staudingerindizes und Virialkoeffizienten [11], Helixanteile [13], Aminosäureanalysen [14] und elektronenoptische Bilder [15–19].

Unterschiede wurden gefunden in der Löslichkeit bei niederen Ionenstärken [20, 21, 22], in der Kinetik des proteolytischen Abbaus [23, 24] und damit auch der Freisetzung von Peptiden [6], in der Zusammensetzung der niedermolekularen Protein-

anteile [25, 26] und der Anzahl SH-Gruppen pro Molekül [14]. Immunologische Verschiedenheiten sind schon lange bekannt [27, 28, 29], doch zweifelt man angesichts der Tatsache, daß noch keine Arbeitsgruppe mit Sicherheit je reines Myosin im Reagensglas hatte, an der Relevanz dieser Befunde.

Wie eingangs erwähnt, sind die spezifischen ATP-ase-Aktivitäten der Myosine äußerst verschieden [8, 9]. Die ATP-asen unterscheiden sich aber auch noch in der Aktivierbarkeit durch SH-Reagenzien, in der Aktivierungsenergie und in der Beständigkeit in alkalischem Milieu [30]. Änderungen des pH [14] und der KCl-Konzentration im Ansatzmilieu [12, 14, 31] beeinflussen die Aktivität von Herz- und Skelettmysin verschieden.

2. Problemstellung

Wie im vorigen Kapitel erwähnt, sind die Eigenschaften eines Muskels unter anderem durch die Art seines Myosins gegeben. Die Bestimmung der spezifischen ATP-ase-Aktivität dürfte heute die einfachste Methode sein, Unterschiede zwischen Myosinen festzustellen. Leider sind aber die Präparationsmethoden und die Ansatzbedingung noch nicht standardisiert und in ihrer Bedeutung wenig untersucht, so daß Vergleiche von Daten verschiedener Autoren fast unmöglich sind. Die vorliegende Arbeit soll zu einer methodischen Klärung beitragen. Wir verglichen die ATP-ase-Aktivitäten von Myosin aus Kalbsherz- und Kaninchenskelettmuskel in Abhängigkeit von zwei Präparationsmethoden und drei Puffersystemen bei pH 6,5 und 7,6. Beide Myosine wurden in einer früheren Arbeit schon untersucht [11]. Sie unterschieden sich in der ATP-ase-Aktivität, aber in keinem der damals gemessenen physikochemischen Parameter. Die Methodenwahl für diese Arbeit ist in der Diskussion begründet.

3. Material und Methoden

3.1. Material

ATP · Na₂ · 3H₂O (Adenosin-5'-triphosphat), low calcium grade, Tris (Trishydroxymethylaminomethan), (Sigma); Maleinsäure (Fluka AG); alle übrigen Chemikalien waren übliche Handelspräparate von analytischem Reinheitsgrad.

3.2. Methoden

Myosin wurde aus Kalbsherzen oder aus vorwiegend weißen Skelettmuskeln von Kaninchen (Hinterschenkel) nach zwei Methoden hergestellt.

3.2.1. Die KCl-Verdünnungsmethode (PM-1)

Wir folgten der Vorschrift von Mueller und Mitarbeitern [32]. Vor den ATP-ase-Bestimmungen wurden alle Lösungen noch über Nacht gegen 0,6 M KCl dialysiert und darauf bei 105 000 g 60 Minuten zentrifugiert.

3.2.2. Die LiCl-(NH₄)₂SO₄-Methode (PM-2)

Wir folgten der Vorschrift von Luchi und Mitarbeitern [12]. Myosin wurde in 2 M LiCl mit (NH₄)₂SO₄ ausgefällt. Wir verwendeten die zwischen 38% und 45%

Sättigung ausfallende Fraktion. Alle Lösungen wurden vor den ATP-ase-Bestimmungen über Nacht gegen 0,6 M KCl dialysiert und nachher 60 Minuten bei 105 000 g zentrifugiert.

3.2.3. Bestimmung der ATP-ase-Aktivitäten

ATP-ase-Aktivitäten wurden unter folgenden drei Ansatzbedingungen bei pH 6,5 und 7,6 bestimmt:

1. TM-37: Tris-Maleat-Puffer 150 mM, $CaCl_2$ 10 mM, ATP 5,5 mM, KCl 37 mM.
2. TM-287: Tris-Maleat-Puffer 150 mM, $CaCl_2$ 10 mM, ATP 5,5 mM, KCl 287 mM.
3. T-287: Tris-HCl-Puffer 50 mM, $CaCl_2$ 10 mM, ATP 5,5 mM, KCl 287 mM.

Das Gesamtvolumen der Ansätze betrug 16 ml, die Temperatur 25°C, die Myosinkonzentration 100–300 $\mu g/ml$. Proben wurden alle 5 Minuten während 30 Minuten zur Phosphatanalyse entnommen und sofort in 5% Trichloressigsäure enteiweißt. Das pH der Ansätze wurde vor und nach dem Versuch gemessen. Betrug der Unterschied mehr als 0,20 pH-Einheiten oder verlief die Phosphatabspaltung über die Versuchszeit nicht linear, wurden die Resultate ausgeschieden. Die spezifische Aktivität (SA) ist definiert als: μg aus ATP abgespaltenes Phosphat pro mg Eiweiß pro 5 Minuten unter den spezifizierten Versuchsbedingungen.

3.2.4. Bestimmung von Phosphat und Eiweiß

Phosphat wurde nach Fiske und SubbaRow bestimmt [33], Eiweiß mit einer Biuretmethode, die mit einer Stickstoffbestimmungsmethode (Kjeldahl) geeicht war.

4. Resultate

Unsere Resultate sind synoptisch in der Tabelle 1 dargestellt. Sofort ersichtlich ist die unter allen Bedingungen erheblich höhere SA des Skelettmiosins. Einige andere apparente Unterschiede haben wir statistisch nachgeprüft.

Tabelle 1 Spezifische Aktivitäten der Myosin-ATP-asen aus Kalbsherz- und Kaninchenskelettmuskel in Abhängigkeit von Präparationsmethode und Ansatzmilieu. Abkürzungen: Siehe 3.2. Die Resultate sind Mittelwerte aus 4 bis 11 Versuchen. Statistische Auswertung: Siehe Text und Tabellen 2 und 3.

		pH 6,5			pH 7,6		
Myosin Kalbsherz	Methode	TM-37	TM-287	T-287	TM-37	TM-287	T-287
	PM-2	1,82		1,66	1,32		0,97
	PM-1	1,51	1,27	1,48	1,15	0,82	0,86
Kaninchenskelett	PM-2	5,35		3,2	3,72		2,25
	PM-1	4,67	2,85	2,92	3,55	1,93	2,10

4.1. Unterschiede der Präparationsmethoden

Eine Analyse der Meßwerte ergab, daß der Unterschied der spezifischen Aktivitäten (nach PM-2 immer > als nach PM-1) nicht vom Ansatzmilieu abhängt. Wir faßten deshalb alle entsprechenden Quotienten für eine

Myosinspezies als Kollektiv auf und fanden als Mittelwert \pm Standardabweichung ($\bar{x} \pm s_x$) für Kaninchenskelettmyosin $1,09 \pm 0,032$ ($n = 15$) und für Kalbsherzmyosin $1,16 \pm 0,04$ ($n = 14$). Der Unterschied zwischen PM-1 und PM-2 ist für beide Myosine signifikant, ebenso der Unterschied zwischen beiden Myosinen ($p > 0,05$). Mit anderen Worten: Die Aussalzmethode (PM-2) führt immer zu höheren spezifischen Aktivitäten als die KCl-Verdünnungsmethode (PM-1). Die Differenz zwischen beiden Methoden ist für Kalbsherzmyosin größer.

4.2 Vergleich der SA in TM-37 zur SA in TM-287

Für diese Analyse verwendeten wir nur Myosine, die nach PM-1 präpariert waren. Zum Vergleich diente uns der Quotient der SA in TM-37 zur SA in TM-287. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Daraus ergibt sich, daß Herzmyosin durch KCl-Zusatz weniger gehemmt wird als Skelettmyosin und daß für beide Myosine die Hemmung bei pH 7,6 stärker ist als bei pH 6,5. Herzmyosin wird bei pH 7,6 relativ zu pH 6,5 etwas stärker gehemmt als Skelettmyosin.

Tabelle 2 Hemmung der Aktivität von Myosin-ATP-asen aus Kalbsherz- und Kaninchenskelettmuskel durch KCl-Zusatz. Angegeben sind die Quotienten der spezifischen Aktivitäten in TM-37 und TM-287 ($\bar{x} \pm s_x$).

Myosin	pH 6,5	n	pH 7,6	n	p
Kalbsherz	$1,19 \pm 0,07$	8	$1,40 \pm 0,03$	7	$< 0,01$
Kaninchenskelett	$1,65 \pm 0,07$	4	$1,84 \pm 0,05$	5	$< 0,01$
p	$< 0,001$		$< 0,001$		

4.3 Vergleich der Aktivitäten in TM-287 und T-287

Ein Blick auf Tabelle 1 läßt vermuten, daß die Aktivitäten in T-287 höher liegen als in TM-287. Wir müssen es aber bei dieser Vermutung bewenden lassen, da diese Resultate aus verschiedenen Versuchsserien stammen und deshalb keiner relevanten Berechnung zugänglich sind.

4.4 Vergleich der Relation der SA bei pH 6,5 zu der SA bei pH 7,6 unter den drei Ansatzbedingungen

Da die beiden Myosine durch KCl-Zusatz bei pH 6,5 und 7,6 verschieden gehemmt werden (siehe 4.2), sind Unterschiede in der Relation der spezifischen Aktivitäten zwischen beiden Wasserstoffionenkonzentrationen zu erwarten. Die Präparation der Myosine erfolgte nach PM-1. Die Resultate sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Wir entnehmen ihr, daß das Verhältnis der SA bei pH 6,5 zur SA bei pH 7,6 für Herz- und Skelettmyosin nur in TM-37 gleich ist. In TM-287 und T-287 ergeben sich schwach bis stark signifikante Unterschiede. Warum der Quotient im TM-287 und T-287 nicht

gleich ist, konnten wir noch nicht klären. Wir vermuten aber, daß der Unterschied auf der Anwesenheit eines Komplexbildners (Maleinsäure) in einem der Puffersysteme beruht.

Tabelle 3 Quotienten der SA bei pH 6,5 zur SA bei pH 7,6 von Kalbsherz- und Kaninchen-skelettmysin in drei verschiedenen Ansatzlösungen (TM-37, TM-287, T-287, siehe 3.2.3). Angegeben sind $\bar{x} \pm s_x$.

Myosin	TM-37	n	TM-287	n	T-287	n
Kalbsherz	$1,31 \pm 0,05$	5	$1,54 \pm 0,04$	7	$1,72 \pm 0,04$	6
Kaninchen-skelett	$1,32 \pm 0,09$	9	$1,48 \pm 0,03$	4	$1,39 \pm 0,06$	6
p	$>0,05$		$<0,05$		$<0,01$	

5. Diskussion

Nach neueren Ansichten hat, um es überspitzt zu formulieren, jeder Muskel sein eigenes Myosin. Die Differenzen zwischen den Myosinen sind unter anderem abhängig von der Tierspezies, dem Muskeltyp und dem Alter des Tieres (vgl. Diskussionsvotum Perry in Ref. [9]). Kaninchen-skelett- und Kalbsherzmuskelmyosin unterscheiden sich demnach in allen drei Kriterien. Unsere Resultate über Kaninchen-skelettmysin müssen vielleicht noch etwas retouchiert werden, da wir nicht ganz sicher sind, nur rein weiße Muskulatur verwendet zu haben. Nach mehreren Autoren unterscheidet sich Myosin aus roter und weißer Skelettmuskulatur erheblich [30, 31]. Schon durchgeführte Versuche ergeben aber, daß dies die hier mitgeteilten Resultate im Grundsätzlichen nicht tangiert [34].

5.1 Die Unterschiede der Präparationsmethoden

Myosine werden heute im wesentlichen nach zwei Methodengruppen präpariert, den KCl-Verdünnungs- und den Aussalzmethode (Beispiele sind PM-1 und PM-2 resp.). Wir verglichen je einen Vertreter beider aus zwei Gründen. Erstens finden sich in der Literatur ganz unterschiedliche Angaben über die zu erreichenden Reinigungen. Luchi und Mitarbeiter [12, 35] erhielten mit einer Aussalzmethode 100% höhere spezifische Aktivitäten, Sreter und Mitarbeiter hingegen fanden praktisch keine Unterschiede [36]. Zweitens wurde in ausgedehnten Arbeiten nachgewiesen, daß Salze, die zur Aussalzung von Myosinen verwendet werden, in bestimmten Konzentrationen niedermolekulare Eiweiße, die sonst äußerst fest am Myosin haften, loslösen können [25, 37, 38]. Wir wollten erstens die Reinigungsgrade vergleichen und zweitens prüfen, ob nach beiden Methoden präparierte Myosine außer der SA noch andere Unterschiede aufweisen, die als «Salzeffekt» angesprochen werden könnten.

Unsere Resultate ergeben im Einklang mit Sreter und Mitarbeitern [36], daß die Aussalzmethode (PM-2) nur zu unwesentlich höheren spezi-

fischen Aktivitäten führt. Dem Unterschied zwischen Herz- und Skelettmyosin messen wir keine große Bedeutung bei. Wir finden deshalb wahrscheinlich nur einen geringen Unterschied zwischen beiden Methoden, weil unsere KCl-Verdünnungsmethode (PM-1) eine Ultrazentrifugation in 0,5 mM ATP bei niederen Myosinkonzentrationen einschließt. Mueller und Mitarbeiter [32] haben aber nachgewiesen, daß dieser Ultrazentrifugationsschritt zu «reinerem» Myosin führt. Die verbleibende Differenz könnte auf zwei Ursachen zurückgeführt werden: Locker und Hagyard [37] bewiesen, daß 40% bis 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ von Myosin ein niedermolekulares Protein ablöst. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dürfte außerdem durch Fällung Magnesiumionen aus den Lösungen entfernen, die als starke Hemmer der ATP-ase bekannt sind [11, 39]. Wesentlich scheint uns die Tatsache, daß nach beiden Methoden präparierte Myosine keine systematischen Unterschiede in der Empfindlichkeit der ATP-ase in zwei Ansatzsystemen bei pH 6,5 und 7,6 erkennen ließen. Beide Methoden führen also zu keinen oder, wenn schon, zu gleichsinnigen Konformationsänderungen der Myosine [35]. Die Resultate verschiedener Autoren lassen sich deshalb, wenigstens was die erwähnten Parameter anbetrifft, vergleichen.

5.2 Die Hemmung der ATP-asen durch KCl

Nach unseren Resultaten werden Herz- und Skelettmyosin durch KCl-Zusatz verschieden stark gehemmt. Außerdem bestehen Unterschiede in der Hemmung bei pH 6,5 und pH 7,6. Im Einklang mit uns fanden Barany und Mitarbeiter [14] bei pH 7,5 eine stärkere Hemmung von Kaninchen-skelettmyosin im Vergleich zu Kaninchenherzmyosin. Nach Luchi und Mitarbeitern [12] soll aber generell Herzmyosin auf KCl empfindlicher sein. Im speziellen wiesen Luchi und Kritcher [35] nach, daß in einem Tris-Maleat-Puffer bei pH 6,5 Hundeherzmyosin stärker als Hundeskelettmyosin durch KCl-Zusatz gehemmt wird. Diese Diskrepanz läßt sich vielleicht mit dem Hinweis von Katz und Mitarbeitern [31] erklären, daß Hundeskelettmuskel (Quadriceps) die Eigenschaften von rotem Skelettmuskel aufweist. Myosine aus roten und weißen Skelettmuskeln unterscheiden sich aber ganz erheblich [30, 31, 40]. Mit der Klärung dieser Frage sind wir beschäftigt [34].

5.3 Vergleich der SA im TM-287 und T-287

Unsere Versuche zeigen, daß in beiden KCl in höheren Konzentrationen enthaltenden Puffersystemen (TM-287 und T-287) die spezifischen Aktivitäten beider Myosine erheblich geringer sind als in TM-37. Aus methodischen Gründen können wir nicht entscheiden, ob zwischen TM-287 und T-287 bei gleichem pH statistische Unterschiede bestehen, doch wäre die Differenz auf jeden Fall minim. Luchi und Kritcher [35] wiesen daraufhin, daß Tris-Maleat (Ionenstärke 0,18) zu einer Konformationsänderung mit einer

erhöhten ATP-ase-Aktivität von Myosinen führt, die nach der Aussalzmethode (PM-2) hergestellt wurden, nicht aber, wenn sie die Reinigung nach ihrer KCl-Verdünnungsmethode durchführten (siehe 5.1). Eine analoge Aktivierung der Myosin-ATP-ase durch eine Konformationsänderung erfolgt nach Zusatz von Äthylenglykol [11, 12, 13, 35]. Für den Befund von Luchi und Kritcher spricht, daß auch unsere nach PM-2 isolierten Myosine in TM-37 bei pH 6,5 und 7,6 eine höhere SA aufweisen. Nicht dazu paßt die ebenfalls höhere SA in T-287. In diesen Ansätzen ist Tris nur in 50-mM-Konzentration vorhanden und kann deshalb nicht zu einer Konformationsänderung führen. KCl selbst hat diesen Effekt auch in noch höheren Konzentrationen nicht [41]. Wir haben deshalb nach unsern Versuchen keinen Grund, die höheren spezifischen Aktivitäten der durch Aussalzen gewonnenen Myosine auf eine Konformationsänderung des Myosins im Ansatzmilieu zurückzuführen. Auf die unseres Erachtens möglichen Gründe haben wir schon hingewiesen (siehe 5.1).

5.4 Vergleich der SA bei pH 6,5 und 7,6

Myosine weisen allgemein Maxima der durch Ca^{2+} aktivierten ATP-asen um pH 6,5 und Minima um pH 7,6 auf [35, 40, 42]. Die beiden pHs wurden deshalb von uns als Referenzpunkte ausgewählt. Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, ist der Quotient: SA bei pH 6,5 zu SA bei pH 7,6 in TM-37 für beide Myosine gleich, in TM-287 und T-287 aber verschieden. Da die Hemmung durch KCl-Zusatz bei pH 7,6 für beide stärker ist (siehe 4.2) als bei pH 6,5, muß der Quotient bei KCl-Zusatz größer werden. Da Herzmyosin nicht absolut, aber relativ bei pH 7,6 stärker gehemmt wird als Skelettmyosin im Vergleich zu pH 6,5, nimmt der Quotient für Herzmyosin stärker zu als für Skelettmyosin.

Die vorliegenden Resultate legen den Schluß nahe, daß rein numerische Werte der spezifischen Aktivität verschiedener Myosine sich schlecht als Vergleichsbasis eignen (siehe Tabelle 3 in Ref. [12]). Dies gilt auch für den Fall, daß die Myosine nach der gleichen Methode präpariert und ihre spezifischen Aktivitäten im gleichen Ansatzmilieu gemessen werden. So lassen sich aus der Tabelle 1 unserer Arbeit für das Verhältnis der SA von Kaninchenskelettmyosin zur SA von Kalbsherzmyosin zehn verschiedene Quotienten angeben, die zwischen 1,93 und 3,15 liegen. Diese Unterschiede beruhen nicht auf methodischen Unzulänglichkeiten, sondern auf den spezifischen Eigenschaften der Myosine selbst. Diese Tatsachen führten denn auch zur Empfehlung von Gergely [43], die Aktivitätsbestimmungen in Gegenwart von EDTA vorzunehmen, da dies zu zuverlässigeren Resultaten führe.

Die Bestimmung der durch Ca^{2+} aktivierten ATP-ase-Aktivität von Myosinen wird trotzdem ihre Bedeutung behalten. Nach unseren Erfahrungen soll man aber folgendes beachten:

1. Eine gute KCl-Verdünnungsmethode mit Einschluß einer Ultrazentrifugation stark verdünnter Myosinlösungen in 0,5 mM ATP eignet sich zur Präparation von Myosinen praktisch gleich gut wie eine Aussalzmethode. Die Empfindlichkeit der Myosine auf Änderung der Wasserstoffionen- und KCl-Konzentration ist für beide Methoden gleich. Die Aussalzmethode führt zu etwas höheren spezifischen Aktivitäten.

2. Zum absoluten Vergleich der SA verschiedener Myosine sollte ein Ansatzmilieu gewählt werden, das kein KCl enthält, zum Beispiel Tris-Maleat. Wegen der Komplexbildung durch Maleinsäure ist der Kalziumionenkonzentration Beachtung zu schenken [12].

3. Da Myosine auf KCl-Zusatz verschieden reagieren, sollten sie sich durch Vergleich ihrer spezifischen Aktivitäten in Ansätzen mit verschiedenen KCl-Konzentrationen differenzieren lassen. Mit der methodischen Ausarbeitung dieser Differenzierung sind wir beschäftigt [34].

Wir danken Frau A. Maurer-Passavant und Frau E. Reinfried für ihre technische Mitarbeit.

Zusammenfassung

Myosine wurden aus Kalbsherz- und Kaninchenskelettmuskel mit einer üblichen KCl-Verdünnungsmethode und mit einer Aussalzmethode (2 M LiCl; $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$, Fraktion zwischen 38% und 45% Sättigung) präpariert und ihre spezifischen Aktivitäten bei pH 6,5 und 7,6 in drei verschiedenen Puffer-Salz-Lösungen gemessen. Die Versuche zeitigten folgende Resultate:

1. Mit der Aussalzmethode gewonnene Myosine haben unter allen geprüften Versuchsbedingungen eine um 10% bis 15% höhere spezifische ATP-ase-Aktivität.

2. Die Abhängigkeit der ATP-ase-Aktivität vom pH und dem KCl-Zusatz läßt keine Beziehung zur Präparationsmethode erkennen.

3. Die Myosin-ATP-ase aus Kaninchenskelettmuskel wird durch KCl-Zusatz bei pH 6,5 und 7,6 stärker gehemmt als das Enzym aus Kalbsherzmuskel. Beide ATP-asen werden bei pH 7,6 stärker gehemmt als bei pH 6,5.

4. Die Relation: spezifische Aktivität bei pH 6,5 zu spezifische Aktivität bei pH 7,6 ist für beide Myosine in einem Ansatzmilieu mit minimaler KCl-Konzentration (37 mM) gleich. In zwei Puffersystemen mit höherer KCl-Konzentration (287 mM) ist der Quotient jedoch verschieden, da Kalbsherzmyosin im Verhältnis zur Aktivität bei pH 6,5 bei pH 7,6 durch KCl-Zusatz stärker gehemmt wird als Kaninchenskelettmyosin.

Résumé

Des myosines ont été préparées à partir de muscles cardiaques du veau et de muscles striés du lapin par la méthode usuelle de la solution diluée de chlorure de potasse et par la méthode de la séparation par un sel (2 moles LiCl; $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$, fraction saturée entre 38 et 45%). Leurs activités spécifiques pour un pH de 6,5 et 7,6

ont été mesurées à l'aide de trois solutions tampon alcalines. Cette expérimentation a donné les résultats suivants:

1. La myosine obtenue à l'aide de la séparation par un sel possédait une activité spécifique de la triphosphatase de l'acide adénosine de 10 à 15% plus élevée, toutes conditions étant égales.

2. Il n'a pas été possible d'établir une relation entre l'activité de la triphosphatase de l'acide adénosine d'une part et le pH et l'adjonction de chlorure de potasse d'autre part, en fonction de la méthode de préparation.

3. La triphosphatase de l'acide adénosine obtenue à partir de muscles striés du lapin est plus fortement inhibée que l'enzyme du muscle cardiaque du veau. Les deux triphosphatases de l'acide adénosine sont plus fortement inhibées lorsque le pH atteint 7,6 que lorsqu'il atteint 6,5.

4. La relation entre l'activité spécifique au pH 6,5 et l'activité spécifique au pH 7,6 est égale pour les deux myosines en milieu de concentration minimale en chlorure de potasse (37 millimoles). En revanche, le quotient est dissemblable dans deux systèmes tampon à plus forte concentration en chlorure de potasse (287 mM), car la myosine cardiaque du veau est plus fortement inhibée par l'adjonction de chlorure de potasse que la myosine du muscle strié du lapin par rapport à l'activité aux pH 6,5 et 7,6.

Riassunto

Miosine vennero preparate da miocardio di vitelli e muscolatura di coniglio con un corrente metodo di diluzione in KCl e con il metodo di desalsificazione (2 M LiCl; $[NH_2] SO_4$, frazione fra il 38% ed il 45% saturazione) e le loro attività specifiche vennero misurate in tre diverse soluzioni tampone, con un pH fra 6,5 e 7,6. Gli esperimenti diedero i seguenti risultati:

1. Le miosine ottenute con il metodo della desalsificazione, fra tutti i metodi, hanno un'attività più elevata del 10-15% di specifiche ATP-asi.

2. La dipendenza dell'attività della ATP-asi è legata al pH ed all'aggiunta di KCl, ma non ha relazione con il metodo di preparazione.

3. La miosina-ATP-asi da muscolo di coniglio viene inibita maggiormente con un pH fra 6,5 e 7,6, di quanto avvenga per l'enzima da miocardio di vitello. Le due ATP-asi vengono maggiormente inibite con un pH 7,6, che con uno 6,5.

4. La relazione: attività specifica con un pH 6,5/attività specifica con un pH 7,6 è eguale per le 2 miosine in un medio con una concentrazione KCl (37 mM). In 2 sistemi tampone con alte concentrazioni (287 mM) il quoziente è diverso, poiché la miosina da miocardio di vitello in rapporto all'attività con un pH fra 6,5 e 7,6, con aggiunta di KCl, è maggiormente inibita che quella da muscolo di coniglio.

Summary

Bovine cardiac myosin and skeletal myosin of the rabbit were prepared with a conventional KCl-dilution method and with a "salting-out" method (LiCl 2 M; $[NH_4]_2SO_4$, 38%-45% saturation). Specific activities of the myosin ATP-ases were determined at pH 6.5 and 7.6 in three different buffer-salt solutions. We obtained the following results:

1. The specific activities of both myosin ATP-ases are higher by 10%-15% under all conditions tested, if they were prepared with the "salting-out" method.

2. The sensitivity of both myosins to pH and KCl is independent of the method used for their isolation.

3. The myosin ATP-ase of rabbit skeletal muscle is more sensitive to KCl at pH 6.5 and 7.6 than the enzyme of bovine cardiac muscle. Both ATP-ases are more inhibited at pH 7.6 than at pH 6.5.

4. The relationship: specific activity at pH 6.5 versus specific activity at pH 7.6 is the same for both ATP-ases in a buffer system with a low addition of KCl (37 mM). In two buffer systems with a high addition of KCl (287 mM) it is different, as the inhibition by KCl of both myosins is not proportionally equal at pH 6.5 and 7.6.

7. Literatur

- [1] Gordon A.M., Huxley A.F. and Julian F.J.: *J. Physiol.* 184, 170 (1966). – [2] Beeler G.W. and Reuter H.: *J. Physiol.* 207, 211 (1970). – [3] Hasselbach W.: *Progr. Biophys. mol. Biol.* 14, 169 (1964). – [4] Schaub M.C. and Perry S.V.: *Biochem. J.* 115, 993 (1969). – [5] Gibbons I.R.: *Annu. Rev. Biochem.* 37, 521 (1968). – [6] Young M.: *Annu. Rev. Biochem.* 38, 913 (1969). – [7] Woods E.F.: *Biochemistry* 8, 4336 (1969). – [8] Bailey K.: *Biochem. J.* 36, 121 (1942). – [9] Barany M.: *J. gen. Physiol.* 50, 197 (1967). – [10] Perry S.V.: *Progr. Biophys. mol. Biol.* 17, 325 (1967). – [11] Jenny E.: *Helv. Physiol. Acta* 23, 357 (1965). – [12] Luchi R.J., Kritcher E.M. and Conn H.K.: *Circulat. Res.* 16, 74 (1965). – [13] Kay C.M., Green W.A. and Oikawa K.: *Arch. Biochem. Biophys.* 108, 89 (1964). – [14] Barany M., Gaetjens E., Barany K. and Karp E.: *Arch. Biochem. Biophys.* 106, 280 (1964). – [15] Huxley H.E.: *J. mol. Biol.* 7, 281 (1963). – [16] Slayter H.S. and Lowey S.: *Proc. natl. Acad. Sci.* 58, 1611 (1967). – [17] Zobel C.R.: *Biochim. biophys. Acta* 140, 222 (1967). – [18] Carney J.A. and Brown A.L.: *J. Cell Biol.* 28, 375 (1966). – [19] Carney J.A. and Brown A.L.: *Circulat. Res.* 17, 336 (1965). – [20] Adelman M.R. and Taylor E.W.: *Biochemistry* 8, 4976 (1969). – [21] Huriaux F., Pechère J.F. et Hamoir G.: *Angiologica* 2, 15 (1965). – [22] Connel J.J.: *Biochim. biophys. Acta* 74, 374 (1963). – [23] Mueller H., Theiner M. and Olson R.: *J. biol. Chem.* 239, 2153 (1964). – [24] Tada M., Bailin G., Barany K. and Barany M.: *Biochemistry* 8, 4820 (1969). – [25] Locker R.H. and Hagyard C.J.: *Arch. Biochem. Biophys.* 127, 370 (1968). – [26] Perrie W.T. and Perry S.V.: *Biochem. J.* 113, 28 P (1969). – [27] Samuels A.: *Arch. Biochem. Biophys.* 92, 497 (1961). – [28] Finck H.: *Biochim. Biophys. Acta* 111, 239 (1965). – [29] Varga E., Köver A., Kovacs T., Jokay I. and Szilagyi T.: *Arch. Biochem. Biophys.* 88, 179 (1960). – [30] Sreter F.A., Seidel J.C. and Gergely J.: *J. biol. Chem.* 241, 5772 (1966). – [31] Katz A.M., Repke D.J. and Rubin B.B.: *Circulat. Res.* 19, 611 (1966). – [32] Mueller H., Franzen J., Rice R.V. and Olson R.E.: *J. biol. Chem.* 239, 1447 (1964). – [33] Fiske C.H. and SubbaRow Y.: *J. biol. Chem.* 66, 375 (1925). – [34] Büchi K.: *Diss. Universität Zürich, in Vorbereitung.* – [35] Luchi R.J. and Kritcher E.M.: *Circulat. Res.* 19, 283 (1966). – [36] Sreter F.A., Nagy B. and Gergely J.: *Abstr. 2nd Internatl. Biophys. Congress, Vienna 1966, p.35.* – [37] Locker R.H. and Hagyard C.J.: *Arch. Biochem. Biophys.* 120, 454 (1967). – [38] Gershman L.C. and Dreizen P.: *Biochemistry* 9, 1677 (1970). – [39] Offer G.W.: *Biochim. biophys. Acta* 89, 566 (1964). – [40] Barany M., Barany K., Reckard T. and Volpe A.: *Arch. Biochem. Biophys.* 109, 185 (1965). – [41] Tonomura Y., Sekiya K. and Imamura K.: *J. biol. Chem.* 237, 3110 (1962). – [42] Mommaerts W.F.H.M. and Green I.: *J. biol. Chem.* 208, 833 (1954). – [43] Gergely J.: In «Herzinsuffizienz» (Ed.: Reindell H., Keul J. und Doll E.), Georg Thieme Verlag Stuttgart 1968, p. 122.

Atti del 4° Simposio Internazionale di Zootecnica. Società italiana per il progresso della Zootecnica. Milano 1970.

Am internationalen Symposium über Tierzucht vom 15.–17. April 1969 in Mailand wurden an die 110 Referate und Mitteilungen vorgetragen, in welchen Fragen der Haustierfütterung und der Produktion menschlicher Nahrung (tierischer Provenienz) behandelt wurden. Diese Vorträge, mit je 3 verschiedensprachigen Zusammenfassungen, sind auf einem Raum von 1053 Seiten wiedergegeben. W. Weber, Bern