

## Vergleichende biochemische Untersuchungen an der Augen-, Skelet- und Herzmuskulatur. I. ATPase

Von M. BOGATZKI, B. DIECKHUES und F. HÖLLWICH

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut (Direktor: Prof. Dr. E. Buddecke) und der Augenklinik (Direktor: Prof. Dr. F. Hollwich) der Universität Münster

(Eingegangen am 6. April 1967)

Es wurde das  $Mg^{++}$ - und  $Na^+/K^+$ -aktivierte ATPase-System von Ciliar-, äußerer Augen-, Herz- und Skelettmuskulatur des Kaninchens vergleichend untersucht. Der Ciliarmuskel ist als glatter Muskel durch eine im Vergleich zu den übrigen untersuchten Muskelgruppen niedrige ATPase-Aktivität des Homogenates bei relativ hoher Aktivität im Sarkoplasma und den Sarkosomen gekennzeichnet und weist im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Muskelgruppen keine  $Na^+/K^+$ -Aktivierbarkeit der ATPase des Sarkoplasmas auf. Die erhobenen Befunde werden im Zusammenhang mit der unterschiedlichen Funktionsweise und den Besonderheiten im Kontraktionsablauf der verschiedenen Muskelgruppen diskutiert.

The  $Mg^{++}$ -  $Na^+$ -  $K^+$ -ATPase was compared in ciliary, outer eye, cardiac and skeletal muscle of the rabbit. Of the muscle types studied, smooth ciliary muscle showed a comparatively low ATPase activity when homogenised, while the sarcoplasm and sarcosomes showed a relatively high activity. Unlike all the other muscle types, ciliary muscle sarcoplasmic ATPase was not activated by  $Na^+/K^+$ . The findings are discussed in relationship to the differences in muscle function and the characteristics of the contraction process in the various muscle groups.

Es wird allgemein angenommen, daß das Zusammenwirken von Actin und Myosin bei Gegenwart von Adenosintri-phosphorsäure<sup>1)</sup> den Grundmechanismus der Muskelkontraktion darstellt und die enzymatische Spaltung von ATP durch das ATPase-Enzymssystem<sup>2)</sup> zur direkten Freisetzung der Kontraktionsenergie führt. Der Muskel folgt damit einem ganz allgemeinen Prinzip, wonach jeder Kontraktionsarbeit, jeder Fortbewegung der Zelle und der Zellteilung der undifferenzierten Zelle als Grundprozeß die Reaktion von ATP mit kontraktilen Protein zugrunde liegt (1—8). In diesem Reaktionssystem erfolgt die Freisetzung der erforderlichen Kontraktionsenergie durch Abspaltung der endständigen Phosphatgruppe von ATP, die zugleich insofern ein Bindeglied zwischen Stoffwechsel und Kontraktionsvorgang darstellt, als sie an glykolytischen und respiratorischen Stoffwechselvorgängen beteiligt und sowohl aus aeroben wie anaeroben Stoffwechselprozessen Energie aufzunehmen und dem Kontraktionsprozess zuzuführen vermag (9). Zwischen dem mechanischen Leistungsvermögen der kontraktilen Strukturen verschiedener Muskeln, ihrem Actomyosingehalt (10) und dem Umfang der enzymatischen ATP-Spaltung wurde dementsprechend eine gute Korrelation gefunden (11).

ATPasen scheinen darüber hinaus bei Vorgängen des aktiven Ionentransportes sowohl ein- wie zweiwertiger Kationen durch Zellgrenzflächen von maßgeblicher Bedeutung zu sein (12), die ihrerseits wiederum den Kontraktionsablauf kontraktiler Strukturen (13) ebenso zu beeinflussen vermögen wie sie die charakteristischen elektrischen Phänomene an den Zellgrenzflächen in den einzelnen Phasen der Muskelarbeit weitgehend bestimmen (14—16).

Auch die Wirksamkeit bestimmter Pharmaka auf die Muskelfunktion und den Mineralstoffwechsel bestimm-

ter Gewebe, wie z. B. die therapeutische Anwendbarkeit der Digitalis und Digitaloide bei Augenerkrankungen, die mit intraokulärer Druckerhöhung einhergehen, wie das Glaukom, wird auf die Wirkung dieser Pharmaka auf die  $Na^+$ - $K^+$ -aktivierte ATPase des Ciliarkörpers zurückgeführt (17). Da eingehendere Angaben über dieses Fermentsystem in der Augenmuskulatur nicht vorliegen, wird nachfolgend über Untersuchungen der enzymatischen Spaltung von ATP durch Augenmuskulatur des Kaninchens im Vergleich zu derjenigen durch Herz- und Skelettmuskulatur berichtet.

### Methodik

Normale ausgewachsene Kaninchen wurden durch Nackenschlag getötet und entblutet. Jeweils 1 g der Oberschenkel- und Herzmuskulatur (linker Ventrikel), die gesamte äußere Augenmuskulatur und der Ciliarmuskel wurden entnommen und in 0,25M Saccharoselösung, der 0,1M EDTA zugesetzt wurde, bei 0—2° mit dem Ultra-Turrax homogenisiert.

In aliquoten Mengen der Gewebshomogenate wurde die actomyosin-gebundene ATPase bei 2000 g abgetrennt. Vom Überstand, in den bei Herz- und Skelettmuskel als Ausgangsmaterial das sarkoplasmatische Reticulum eingeht, wurden die Sarkosomen bei 19600 g isoliert und in 0,25M Saccharoselösung aufgeschwemmt.

$Mg^{++}$ - und  $Mg^{++}$ -  $Na^+/K^+$ -aktivierte ATPase wurde in den einzelnen Fraktionen nach einer modifizierten Methode von Dubois und POTTER (18) aus der Freisetzung an anorganischem Phosphat ( $P_i$ ) aus  $Na_3$ -ATP (Boehringer) als Substrat bestimmt. Die  $Mg^{++}$ -Ionenkonzentration im Bestimmungsansatz für die  $Mg^{++}$ -aktivierte ATPase betrug 0,003M. Die Ansätze zur Bestimmung der  $Na^+/K^+$ -Aktivierung enthielten zusätzlich die für den Skelettmuskel als optimal gefundenen  $Na^+$ - und  $K^+$ -Konzentrationen: 0,003M  $Na_3$ -ATP, 0,013M  $K^+$ , 0,145M  $Na^+$ . Es wurde 30 Min. bei 37° in Triäthanolamin-HCl-Puffer pH 7,4 inkubiert. Die Enzymaktivität wird in  $\mu$ Mol  $P_i$ /Min./mg Protein des Homogenates bzw. der jeweiligen Zellfraktion (37°) angegeben.

Die Bestimmung des Proteingehaltes im Homogenat erfolgte mit einer modifizierten Biuret-Reaktion (19). Die Phosphatbestimmung wurde nach FISKE und SUBBAROW (20) durchgeführt.

Der statistischen Auswertung wurden die Angaben von BURN (21) für die Bestimmung der „mittleren Abweichung des Mittelwertes“

$$\left(\sigma: \pm \sqrt{\frac{d^2}{n-1}}\right)$$

zugrunde gelegt.

<sup>1)</sup> Abkürzungen: ATP = Adenosintri-phosphat; EDTA = Äthylendiamintetraessigsäure;  $P_i$  = anorganisches Phosphat.

<sup>2)</sup> Der Trivialname ATPase wird hier gebraucht für das Enzym ATPphosphohydrolase (EC 3.6.1.4).

## Ergebnisse

Das ATPase-Enzymsystem der Augenmuskulatur, sowohl der äußeren als auch insbesondere des Ciliarmuskels, zeigt ein sehr charakteristisches Verhalten, das in der Gegenüberstellung zur enzymatischen ATP-Spaltung anderer muskulöser Organe besonders deutlich in Erscheinung tritt. Das Ergebnis vergleichender Untersuchungen der ATPasen von Ciliar-, äußerer Augen-, Herz- und Skelettmuskulatur ist in den Tabellen 1—3 zusammengefaßt.

In Tabelle 1 wird neben den Werten der Proteingehalte in den einzelnen Geweben deren Aktivität an  $Mg^{++}$ -aktivierter ATPase im jeweiligen Gewebshomogenat von insgesamt 14 Versuchstieren wiedergegeben. Daraus geht hervor, daß die Augenmuskulatur und insbesondere der Ciliarmuskel durch einen relativ niedrigen Proteingehalt von 12,9 und 10,7% gekennzeichnet ist, insbesondere im Vergleich z. B. der hier untersuchten Herz- und Skelettmuskulatur, die durchschnittliche Eiweißgehalte von rund 16,0 und 17,6% aufwiesen.

Tab. 1

Gewebsproteingehalt und Aktivität der  $Mg^{++}$ -aktivierten ATPase im Homogenat der Ciliar- und äußeren Augenmuskulatur im Vergleich zu derjenigen von Herz- und Skelettmuskulatur

	ATPase-Aktivität ( $\mu\text{Mol P}_i/\text{Min.}/\text{mg}$ Protein 37°)	Proteingehalt (g/100 ml)
Ciliarmuskel	6,29 $\pm$ 1,47	10,7 $\pm$ 3,4
äußere Augenmuskulatur	9,79 $\pm$ 3,83	12,9 $\pm$ 4,5
Herzmuskulatur	6,93 $\pm$ 1,70	16,0 $\pm$ 2,8
Skelettmuskulatur	9,03 $\pm$ 1,93	17,6 $\pm$ 3,9

Im Gewebshomogenat der äußeren Augenmuskulatur wurde eine durchschnittliche spezifische Aktivität des  $Mg^{++}$ -aktivierten ATPase-Enzymsystems von 9,79  $\mu\text{Mol P}_i/\text{Min.}/\text{mg}$  Protein (37°) ermittelt. Die äußere Augenmuskulatur entspricht hierin annähernd dem Verhalten des Skelettmuskels, der eine solche von durchschnittlich 9,03  $\mu\text{Mol P}_i/\text{Min.}/\text{mg}$  Protein (37°) zeigte. Im Herzmuskelhomogenat des Kaninchens lag die enzymatische ATP-Spaltung — im Gegensatz zum Verhalten bei der Ratte (11, 22) — mit durchschnittlich 6,93  $\mu\text{Mol P}_i/\text{Min.}/\text{mg}$  Protein (37°) um rund 23% unter derjenigen des Skelet- und um rund 29% der äußeren Augenmuskulatur.

Der Ciliarmuskel zeigte sich demgegenüber durch eine relativ niedrige  $Mg^{++}$ -aktivierte ATPase-Gesamtaktivität aus. In den vorliegenden Untersuchungen betrug diese im Gewebshomogenat durchschnittlich 6,29  $\mu\text{Mol P}_i/\text{Min.}/\text{mg}$  Protein (37°) und lag damit um rund 35% unter derjenigen der äußeren Augenmuskulatur. In der Sarkoplasmafraktion dieses Muskels wurde — wie Tabelle 2 zeigt — ein durchschnittlicher Wert von 3,55  $\mu\text{Mol P}_i/\text{Min.}/\text{mg}$  Protein (37°) festgestellt. Es erscheint dabei bemerkenswert, daß Zusatz von  $K^+$  und  $Na^+$  — im Gegensatz zu allen übrigen untersuchten Geweben — keine Aktivierung der enzymatischen ATP-Spaltung bewirkte. Während die spezifische ATPase-Aktivität in der Sarkoplasmafraktion der Skelettmuskulatur unter diesen Bedingungen von 1,85 auf 3,68  $\mu\text{Mol P}_i/\text{Min.}/\text{mg}$

Protein (37°), also um rund 98%, in der äußeren Augenmuskulatur von 2,86 auf 3,44  $\mu\text{Mol P}_i/\text{Min.}/\text{mg}$  Protein (37°), d. h. um rund 20% und anschließend im Herzmuskel von durchschnittlich 1,46 auf 1,82  $\mu\text{Mol P}_i/\text{Min.}/\text{mg}$  Protein (37°), somit um rund 25% gesteigert werden konnte, zeigte der Ciliarmuskel mit einer durchschnittlichen ATPase-Aktivität von 3,55  $\mu\text{Mol P}_i/\text{Min.}/\text{mg}$  Protein (37°) unter  $Mg^{++}$ -Aktivierung nach  $Na^+/K^+$ -Zugabe mit 3,50  $\mu\text{Mol P}_i/\text{Min.}/\text{mg}$  Protein (37°) ein praktisch unverändertes Verhalten.

Tab. 2

Enzymatische ATP-Spaltung im Sarkoplasma der Ciliar-, äußeren Augen-, Herz- und Skelettmuskulatur (I.: bei 0,003M  $Mg^{++}$ -Konzentration, II.: bei 0,003M  $Mg^{++}$ -, 0,013M  $K^+$ -, 0,145M  $Na^+$ -Konzentration im Ansatz)

	ATPase-Aktivität in $\mu\text{Mol P}_i/\text{Min.}/\text{mg}$ Protein (37°)	
	I.	II.
Ciliarmuskel	3,55 $\pm$ 1,52	3,50 $\pm$ 1,24
äußere Augenmuskulatur	2,86 $\pm$ 0,94	3,44 $\pm$ 0,78
Herzmuskulatur	1,46 $\pm$ 0,48	1,82 $\pm$ 0,54
Skelettmuskulatur	1,85 $\pm$ 0,65	3,86 $\pm$ 1,42

Wie weiter aus Tabelle 3 hervorgeht, wurde für die sarkosomengebundene ATPase der relativ höchste Wert von 2,49  $\mu\text{Mol P}_i/\text{Min.}/\text{mg}$  Protein (37°) im Ciliarmuskel gefunden bei durchschnittlichen Werten der spezifischen Aktivität von 1,93 und 3,21  $\mu\text{Mol P}_i/\text{Min.}/\text{mg}$  Protein (37°) in Herz- und äußerer Augenmuskulatur.  $Na^+/K^+$ -Zusatz führt lediglich für die sarkosomengebundene ATPase des Skelettmuskels zu einer Aktivierung von durchschnittlich 23%.

Tab. 3

Aktivität der sarkosomengebundenen ATPase von Ciliar-, äußeren Augen-, Herz- und Skelettmuskulatur (I.: bei 0,003M  $Mg^{++}$ -Konzentration, II.: bei 0,003M  $Mg^{++}$ -, 0,013M  $K^+$ -, 0,145M  $Na^+$ -Konzentration im Ansatz)

Gewebsart	ATPase-Aktivität in $\mu\text{Mol P}_i/\text{Min.}/\text{mg}$ Protein (37°)	
	I.	II.
Ciliarmuskel	2,49 $\pm$ 0,75	2,37 $\pm$ 0,42
äußere Augenmuskulatur	2,21 $\pm$ 0,70	2,27 $\pm$ 0,53
Herzmuskulatur	1,93 $\pm$ 0,45	1,90 $\pm$ 0,45
Skelettmuskulatur	1,84 $\pm$ 0,54	2,25 $\pm$ 0,67

Ein wesentliches Ergebnis der angeführten Untersuchungen ist, daß der Ciliarmuskel eine — insbesondere im Vergleich zur äußeren Augenmuskulatur — niedrige ATPase-Gesamtaktivität des Gewebes bei relativ hoher ATPase-Aktivität der Sarkosomen und des Sarkoplasmas aufweist. Im Gegensatz hierzu konnte in der äußeren Augenmuskulatur eine der Skelettmuskulatur vergleichbare Aktivität der ATPasen ermittelt werden.

Es erscheint weiter bemerkenswert, daß das ATPase-System dieses glatten Muskels, im Gegensatz zur äußeren Augen- und insbesondere der Skelettmuskulatur, keine Aktivierbarkeit durch  $Na^+$  und  $K^+$  zeigt.

## Diskussion

Im Hinblick auf die Funktion der Augenmuskeln erscheinen die angeführten Befunde in mehrfacher Hinsicht aufschlußreich. In den erheblichen Unterschieden im Umfange der enzymatischen ATP-Spaltung, ihrer

unterschiedlichen Bindung an das kontraktile Protein und Aktivierbarkeit durch  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  in den einzelnen untersuchten Muskelgruppen treten offensichtlich Stoffwechselmerkmale in Erscheinung, die mit den charakteristischen Besonderheiten in der Funktionsweise dieser Muskeln in ursächlichem Zusammenhang stehen.

Als glatter Muskel ist der Ciliarmuskel im Vergleich zu Herz- und Skelettmuskel durch die Fähigkeit gekennzeichnet, mit sehr viel geringerer Energieleistung den Muskeltonus aufrecht zu erhalten (23). Dementsprechend zeigt der Ciliarmuskel eine vergleichsweise niedrige ATP-Spaltungsrate. Es ist auffallend, daß diese, im Gegensatz zu den übrigen untersuchten Muskelgruppen, praktisch keine Bindung an das kontraktile Protein erkennen läßt. Das ATPase-Enzymssystem ist im Ciliarmuskel vielmehr ausschließlich im Sarkoplasma und den Sarkosomen nachweisbar. Es zeigt hier ein ähnliches Verhalten wie in anderer glatter Muskulatur z. B. Uterus, dessen Actomyosin sich ebenso wie das kontraktile Protein undifferenzierter Zellen z. B. der Thrombocyten, durch eine sehr niedrige ATPase-Aktivität auszeichnet (24–26). Es ist zu vermuten, daß dem verzögerten Kontraktionsablauf bzw. der langsamen Bewegung dieser Zellen eine entsprechend protrahierte ATP-Spaltung und damit Energiefreisetzung zugeordnet ist, während in Herz- und Skelettmuskel beim plötzlichen Übergang aus dem Zustand der Ruhe in den Zustand der Aktivität ATP mit großer Geschwindigkeit gespalten wird (27).

Die Funktion von ATPasen im Kontraktionsablauf scheint nicht auf Veränderungen der molekularen Struktur des kontraktile Proteins der Muskelzelle und die Freisetzung von Kontraktionsenergie beschränkt. Es wird vielmehr angenommen, daß  $\text{Mg}^{++}/\text{K}^+/\text{Na}^+$ -aktivierte ATPase durch Einwirken auf die Mechanismen des aktiven  $\text{Ca}^{++}$ -Transportes, der sog. „ $\text{Ca}^{++}$ -Pumpe“ der sarkoplasmatischen Strukturen, weitgehend den Ablauf auch des Erschlaffungsprozesses der Muskelfaser bestimmt (8, 28). Es ist daher bemerkenswert, daß der Ciliarmuskel, der als glatter Muskel diese sarkoplasmatischen Strukturen nicht besitzt (13), zwar eine relativ hohe ATPase-Aktivität der Sarkoplasmafraktion aufweist, diese aber, im Gegensatz zu allen übrigen untersuchten Muskelgruppen, nicht über eine  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -aktivierte ATPase verfügt. Es ist nahelegend, diese Besonderheiten im Verhalten der ATPase mit den charakteristischen Merkmalen der Funktionsweise der einzelnen Muskeln in Zusammenhang zu bringen. Es erscheint denkbar, daß weitere enzymatische Prozesse, insbesondere diejenigen, die zur Regeneration von ATP aus Pyrophosphat und Adenosin-Phosphoramid (29) und aus ADP durch Creatinphosphokinase und Myokinase entsprechende Merkmale erkennen lassen. Bisherige Untersuchungen weiterer Enzymverteilungsmuster erhärten diese Annahme (30).

Die vorliegende Arbeit wurde mit freundlicher Unterstützung des Landesamtes für Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen und der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

### Literatur

1. ULBRECHT, G. und M. ULBRECHT, Z. Naturforsch. 7b, 434 (1952). — 2. NEEDHAM, D. M., Advances in Enzymol. 13, 151 (1952). — 3. WEBER, H. H. und H. PORTZEHL, Erg. Physiol. 47, 369 (1952). — 4. PERRY, S. V., Physiol. Rev. 36, 1 (1956). — 5. BETTEX-GALLAND, M. und E. F. LUSCHER, Helv. Physiol. pharmacol. Acta 17, C 14 (1959). — 6. HOFFMANN-BERLING, H., Erg. Physiol. 51, 98 (1961). — 7. CAIN, D. F., A. A. INFANTE und R. E. DAVIES, Nature (London) 196, 214 (1962). — 8. HASSELBACH, W., Naturwissenschaften 50, 249 (1963). — 9. LIPMANN, F., Molecular Biology S. 37. Acad. Press New York (1960). — 10. RANNEY, R. E., Federation Proc. 11, 127 (1952). — 11. BOGATZKI, M., Cardiologia 25, 299 (1954). — 12. POST, R. L., C. R. MERRIT, C. R. KINSOLVING und C. D. ALBRIGT, J. biol. Chemistry 235, 1796 (1960). — 13. HASSELBACH, W. und H. H. WEBER, Naturwissenschaften 32, 121 (1965). — 14. SKOU, J. CH., Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 58, 314 (1962). — 15. ROTHSCHUH, K. E. und M. BOGATZKI, Pflügers Arch. ges. Physiol. Menschen Tiere 253, 59 (1950). — 16. BOGATZKI, M., Zschr. exper. Med. 118, 541 (1952). — 17. BONTING, S. J., Amer. J. Ophth. 56, 470 (1963). — 18. DUBOIS, K. P. und V. R. POTTER, J. biol. Chemistry 150, 185 (1943). — 19. BEISENHERZ, G., H. J. BOLTZE, TH. BÜCHER, R. CZOK, K. H. GARBADE, E. MEYER-ARENDE und G. PFLEIDERER, Zschr. Naturforsch. 8b, 555 (1953). — 20. FISKE, C. H. und Y. SUBBAROW, J. biol. Chemistry 76, 375 (1925). — 21. BURN, J. H., Statistische Methoden Berlin 1937. — 22. BOGATZKI, M., Zschr. exper. Med. 119, 628 (1952). — 23. PARNAS, I., Pflügers Arch. ges. Physiol. Menschen Tiere 134, 441 (1910). — 24. CSAPO, A., Acta physiol. Scand. 19, 100 (1949). — 25. REPKE, K. und H. J. PORTIUS, Experientia (Basel) 19, 452 (1963). — 26. HOFFMANN-BERLING, H., Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 19, 453 (1956). — 27. DAVIES, R. E., Nature (London) 199, 1068 (1963). — 28. HASSELBACH, W. und M. MAKINOSE, Biochem. Z. 339, 94 (1963). — 29. WALTZMANN, M. B., T. HUANG und E. J. BALLINTINE, Amer. J. Ophth. 52, 847 (1961). — 30. BOGATZKI, M., B. DIECKHUES und F. HOLLWICH, Noch unveröffentlicht.

Priv. Doz. Dr. med. Marianne Bogatzki  
44 Münster, Waldeyerstraße 15