

Section de physiologie, chimie physiologique et pharmacologie

Autor(en): [s.n.]

Objekttyp: **AssociationNews**

Zeitschrift: **Verhandlungen der Schweizerischen Naturforschenden Gesellschaft. Wissenschaftlicher und administrativer Teil = Actes de la Société Helvétique des Sciences Naturelles. Partie scientifique et administrative = Atti della Società Elvetica di Scienze Naturali**

Band (Jahr): **145 (1965)**

PDF erstellt am: **22.07.2024**

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.

17^o Section de physiologie, chimie physiologique et pharmacologie

Session de la Société suisse de physiologie, chimie physiologique
et pharmacologie

Samedi 25 septembre 1965

Président: Prof. Dr W. WILBRANDT (Berne)

Secrétaire: Dr E. EICHENBERGER (Berne)

Symposium organisé par le Prof. J. M. POSTERNAK (Genève):

*Aspects biophysiques, biochimiques et pharmacologiques
de la contraction du muscle strié*

sous la présidence du Prof. A. VON MURALT (Berne)

1. ALEXANDER VON MURALT – Kurzer Überblick über die Entwicklung unserer Kenntnisse der Entstehung der Muskelkraft.

Mystisch mutet uns heute die noch anfangs des letzten Jahrhunderts vorherrschende Theorie einer «vis vitalis» an, einer Kraft, die als Quelle der Lebensäusserungen und auch ganz besonders als Quelle der Muskelkraft angesehen wurde. Den ersten entscheidenden Schlag gegen solches unexaktes Denken führte der 24jährige Helmholtz (1845) mit einer exakten und mit heutigen Augen gesehen grossartigen Arbeit, in welcher er zeigte, dass bei der Arbeitsleistung im Muskel die extrahierbare wasserlösliche Substanz abnimmt, während dafür die alkohollösliche zunimmt: die Muskelkraft wird auf Kosten chemischer Umsätze und nicht durch die «vis vitalis» entwickelt! Der nächste Schritt war der Nachweis, den wir ebenfalls Helmholtz verdanken, dass bei der Arbeit als Folge dieser chemischen Prozesse auch Wärme gebildet wird. Diese beiden Feststellungen sind noch heute das solide Fundament aller Vorstellungen über die Energie-Umwandlungen bei der Muskelkontraktion.

Ein weiterer Trugschluss war der Gedanke, der Muskel sei eine Wärmemaschine und wandle in gleicher Weise wie die technischen Verbrennungsmaschinen die Verbrennungswärme in Arbeit um. Jeder, der nur etwas von Thermodynamik versteht, weiss, dass ein Wirkungsgrad von 25%, wie ihn der Muskel zeigt, nur mit Temperaturdifferenzen von mindestens 100° im Idealfall in einer thermodynamischen Maschine zu verwirklichen wäre. Fick (1893) und McDougall (1898) haben das Verdienst, den Gedanken der Wärmemaschine ad absurdum geführt zu haben.

Ein neuer grosser Schritt war die Entdeckung des «chemischen Fliessbandes», an dessen «Rändern» die Enzyme als «Arbeiter» stehen. Genau wie beim technischen Fliessband führt jedes Enzym nur einen einzigen Schritt in der Veränderung des «vorbeifliessenden» Moleküles aus. Am Anfang des Fliessbandes wird Glykogen «aufgeladen», und am Ende des Fliessbandes entsteht unter anaeroben «Fabrikationsverfahren» Milchsäure und Energie, im aeroben Prozess Kohlensäure und Wasser und

ausserdem sehr viel mehr Energie pro «Fabrikationseinheit». Fletcher und Hopkins (1907, 1911, 1913) haben den ersten gezielten Vorstoss in diese grossartige chemische Werkstatt des Muskels gemacht. Meyerhof, Embden, Parnas (vgl. Meyerhof 1930) und deren Schüler haben die «Fließbandprozesse» des stufenweisen Abbaues und der Phosphorylierungen erforscht. Die energetische Seite wurde vor allem von Hill (1910–1965!) in meisterhafter Weise bearbeitet. Bei allen diesen Untersuchungen stellte es sich heraus, dass es nicht nur ein «Fließband» gibt, sondern mehrere, bei denen auch rückläufige Arbeitsvorgänge die Moleküle wieder in ihren ursprünglichen Zustand als Energiespeicher zurückführen.

Die Frage nach der eigentlichen Muskelmaschine, in der die mechanische Energie produziert wird, hat die Geister schon sehr früh beschäftigt. Besonders der Wechsel zwischen isotropen (I) und anisotropen, doppelbrechenden Schichten (Q) beim quergestreiften Muskel schien im unmittelbaren Zusammenhang mit der Muskelmaschine zu stehen. Auf Engelmann (1878) geht ein weiterer Trugschluss zurück, dass nämlich die Kontraktion in den anisotropen Schichten (Q) erfolge und die isotropen Schichten (I) sich gar nicht verkürzen sollen. Andrew Huxley (1954, der Vorname ist hier sehr wichtig!) hat mit dem von ihm selbst entwickelten Interferenz-Mikroskop zeigen können, dass das gar nicht stimmt, sondern dass die isotropen Schichten bei der Verkürzung des Muskels verschwinden! Diese Beobachtung ist einer der Grundpfeiler der neuen Vorstellungen von der Muskelkontraktion geworden! Bevor auf diese modernen Vorstellungen eingegangen werden kann, ist ein Wort über die Muskeleiweisse am Platz. Der quergestreifte Muskel enthält Myosin, Aktin und weitere für die Kontraktion nicht unmittelbar massgebende Eiweisse (vgl. H.H. Weber 1934, Weber und Portzehl 1952, Szent-Györgyi 1947). Das Myosin, das zum erstenmal in relativ reiner Form von Edsall präpariert wurde, zeigt prachtvolle Strömungsdoppelbrechung (v. Muralt und Edsall 1930, Boehm und Signer 1931, Needham und Mitarbeiter 1941, Greenstein und Edsall 1940) und ist ein langgestrecktes Fadenmolekül, das zu Fäden versponnen werden kann (vgl. Weber 1934), hohe Eigen- und Stäbchendoppelbrechung besitzt, ein Röntgendiagramm liefert, das mit dem des lebenden Muskels identisch ist und in Lösung anomale Viskosität aufweist (vgl. Weber und Portzehl 1952). Mit dem Aktin kann es sich zu Aktomyosin koppeln, eine der grundlegenden Feststellungen der modernen Muskelchemie, die wir dem genialen Szent-Györgyi verdanken! Bei der Kontraktion nimmt die Doppelbrechung des Muskels ab (v. Muralt 1932, Buchthal und Knappeis 1938), aber die Abnahme hängt bei isometrischen Bedingungen von der Spannung ab (Fischer 1940).

Hugh Huxley und Hanson (1954) haben mit ihren prachtvollen elektronenmikroskopischen Aufnahmen in dieses scheinbar verworrene Bild eine klare neue Auffassung gebracht, der sich alle Beobachtungen fast widerspruchlos einordnen lassen.

Damit sind wir zum Thema des heutigen Kolloquiums gelangt, in welchem die modernen Vorstellungen von der Muskelmaschine und der

Kopplung zwischen Erregungsvorgang und Kontraktion behandelt werden.

Es wäre ein neuer Irrtum, zu glauben, dass in unseren heutigen Auffassungen nicht auch wieder einige Irrtümer mitlaufen, die in kommenden Arbeiten entlarvt werden!

LITERATUR

- Boehm G. und Signer R.*: Helv. chim. Acta 14, 370 (1931).
Buchthal F. und Knappeis G.G.: Skand. Arch. Physiol. 78, 97 (1938).
Engelmann Th. W.: Pflügers Arch. ges. Physiol. 18, 1 (1878).
Fick A.: Pflügers Arch. ges. Physiol. 53, 606 (1893).
Fischer E.: Am. J. Physiol. 131, 156 (1940).
Fletcher W.M. and Hopkins F.G.: J. Physiol. 35, 247 (1907); 43, 286 (1911); 47, 361 (1913).
Greenstein J.P. and Edsall J.T.: J. biol. Chem. 133, 397 (1940).
Helmholtz H.: Müllers Arch. Anat. Physiol. S. 72 (1845).
Hill A.V.: Proc. Roy. Soc. B 159, 297, 319, 585 u. 596 (1964).
Huxley A.F. and Niedergerke R.: Nature (London) 173, 971 (1954).
Huxley H. and Hanson J.: Nature (London) 173, 973 (1954).
McDougall W.: J. Anat. Physiol. 32, 187 (1898).
Meyerhof O.: Die chemischen Vorgänge im Muskel. Springer-Verlag, Berlin/Göttingen/Heidelberg 1930.
v. Muralt A. and Edsall J.T.: J. biol. Chem. 89, 315 (1930).
v. Muralt A.: Pflügers Arch. ges. Physiol. 230, 299 (1932).
Needham J., Shen S.C., Needham D.M. and Lawrence L.S.C.: Nature (London) 147, 766 (1941).
Weber H.H.: Ergebn. Physiol. 36, 109 (1934).
Weber H.H. und Portzehl H.: Ergeb. Physiol. 47, 369 (1952).
Szent-Györgyi A.: Chemistry of Muscular Contraction. New York Acad. Press Inc., 1947.

2. CH. ROUILLER et W.G. FORSSMANN (Genève) – *Notions actuelles sur l'ultrastructure du muscle squelettique et cardiaque.*

La cellule musculaire striée comprend des noyaux, un sarcoplasme, riche en enzymes, des mitochondries ou sarcosomes, sièges de la respiration cellulaire (50), des fibrilles représentant l'appareil contractile, un réticulum sarcoplasmique, impliqué dans le contrôle de la fonction de contraction et de relâchement et, dans certaines activités métaboliques, un sarcolemme doublé d'une membrane basale, jouant un rôle dans l'excitation et la conduction de l'impulsion, et divers organites, particules ou inclusions: glycogène, lipides, ribosomes (1), vésicules de micropinocytose (13), etc.

Seuls sont considérés ici les myofibrilles, le réticulum sarcoplasmique et le sarcolemme.

L'ultrastructure des cellules musculaires striées et ses relations avec la physiologie et la biochimie du muscle ont fait l'objet de nombreux travaux, qui sont analysés dans des revues récentes (8, 28, 41, 53, 64).

I. Les éléments contractiles ou myofibrilles

Les éléments contractiles ou myofibrilles ont un diamètre de 1 à 3μ et une longueur équivalente à celle de la fibre. Ils sont striés transversalement. Les striations se répètent régulièrement de disques Z en disques Z. La portion fibrillaire délimitée par les disques est le sarcomère, dont la longueur est en moyenne de 2 à 3μ et n'excède pas 15μ , à de rares exceptions près (49).

Les myofibrilles contiennent deux types de filaments, dont la disposition et les interrelations déterminent la division du sarcomère en bandes I, A et H.

Les *filaments épais* (ou myofilaments primaires) sont situés dans la bande A et chacun d'eux en occupe toute la longueur. Ils ont un diamètre de 100 à 120 Å et une longueur de 1,5 à 1,6 μ . Ils présentent de nombreux prolongements latéraux perpendiculaires, qui constituent des ponts avec les filaments minces. Sur une distance régulière de 0,15 à 0,2 μ , le milieu du filament épais est dépourvu de prolongements.

Ces filaments contiennent la myosine, car ils sont dissous par KCl et par les traitements sélectifs d'extraction de la myosine (38). D'autre part, les filaments épais peuvent être obtenus à partir de suspensions de molécules naturelles et synthétiques de myosine (45, 47).

Les molécules de *myosine* ont une longueur de 1500 Å environ et un diamètre de 20 à 40 Å. 200 à 400 d'entre elles participent à la formation d'un filament épais. Elles seraient arrangées selon des configurations particulières, grâce auxquelles chaque molécule successive serait déplacée d'environ 72 Å en direction axiale, le long d'une hélice dont le pas est d'environ 435 Å, ce qui donne une structure axiale à hélice sextuple (47). A partir de suspensions dans des milieux à concentration ionique basse de molécules de myosine naturelle ou synthétique, Huxley (45, 47) a obtenu des filaments épais identiques à ceux de la bande A. Les molécules de myosine sont donc capables de s'assembler pour donner des structures fonctionnellement compétentes.

La myosine comprend deux constituants, la *méromyosine lourde* (HMM) et la *méromyosine légère* (LMM). La molécule complète est asymétrique, car elle a l'aspect d'un bâtonnet (LMM) surmonté d'une masse globulaire à l'une de ses extrémités (HMM) (45, 47, 68).

La HMM, qui serait située au niveau des prolongements latéraux des filaments épais, est la fraction active de la myosine, car elle se combine à l'actine et est le siège de l'activité ATP-asiqque.

La LMM se présente sous la forme de particules allongées d'un diamètre de 15 à 20 Å, d'une longueur variable (530 à 1390 Å), dépourvue de régions globulaires. Mises en suspension, les molécules de LMM se groupent en agrégats qui peuvent croître indéfiniment en longueur et en épaisseur, contrairement aux filaments de myosine (45). La LMM serait l'axe inactif, à fonction mécanique passive, de la myosine (34, 45, 47).

Dans les filaments épais, la polarité des molécules de myosine serait inversée de chaque côté du centre, de telle sorte que la masse globulaire

serait toujours tournée vers l'extrémité. Ce filament aurait donc un axe constitué par le LMM et des prolongements latéraux contenant la HMM.

Les *filaments minces* (ou myofilaments secondaires) sont situés dans les bandes I et A, à l'exception de la bande H. Ils ont un diamètre de 60 à 70 Å. Dans la bande I, ils ont une longueur de 1,06 μ , du disque Z à leur extrémité (limite entre A et H). Ces filaments contiennent l'actine, car, après coloration négative, ils présentent une structure qui correspond à celle de l'actine (34, 70) et l'adjonction de KCl n'entraîne pas leur destruction.

L'*actine-F* est constituée par deux cordons de subunités qui s'enroulent l'un autour de l'autre en une hélice dont le pas est de 350 Å (13 subunités par tour: 34, 58) ou de 406 Å (15 subunités par tour: 82). Les subunités ont un diamètre de 55 Å. L'actine se combine à la myosine pour donner des filaments complexes dans lesquels les monomères de HMM sont attachés à l'extérieur de la double hélice des monomères d'actine-G (45). Ces filaments d'actomyosine ont un diamètre de 200 à 300 Å et une période axiale de 366 Å, avec une polarité bien définie: succession de structures en forme de flèches, dont les sommets ont tous la même direction. Ces complexes actine-myosine sont dissociés en présence d'ATP (10^{-3} M).

Les bandes I dont on a extrait la myosine sont capables de capter de grandes quantités d'HMM. Les structures obtenues sont toutes polarisées. Si un disque Z en occupe le centre, les filaments présentent une polarité inverse de chaque côté, ce qui démontre que les filaments minces ne traversent pas sans autre le disque Z, mais qu'ils sont interrompus ou modifiés à ce niveau (45).

L'actine correspond aux 60% des protéines de la bande I, le reste étant probablement fourni par la tropomyosine B (34).

La *striation transversale de la bande I*, dont la période est de 406 Å, n'est certainement pas due à la disposition hélicoïdale de l'actine F, mais plutôt à l'existence d'un matériel de nature indéterminée, localisé entre les filaments, selon des plans transversaux. Un complexe filamentueux actine-tropomyosine B pourrait posséder une répétition axiale de 406 Å, expliquant la fixation régulière d'un autre matériel (34).

La *tropomyosine B* forme probablement le réseau filamentueux du disque Z (35). Précipitée par dialyse, elle forme un réseau à mailles carrées, qui rappelle l'arrangement des filaments dans le disque Z (45). Elle constitue aussi une part de la bande I. La ramification de chaque filament mince en 4 filaments, à la jonction de la bande I avec le disque Z, suggère que deux cordons de tropomyosine accompagnent chaque filament d'actine (35).

Dans les myofibrilles, les filaments épais sont espacés de 450 Å et arrangés en hexagones. Dans les régions où les deux types de filaments sont intriqués (bande A, à l'exclusion de H), chaque filament épais est encerclé, dans les muscles des vertébrés, par 6 filaments minces et chacun de ceux-ci est « partagé » entre 3 filaments épais (44). Dans les muscles du vol des diptères (3), les filaments minces sont relativement plus nombreux et chacun d'eux est partagé entre deux filaments épais.

La théorie du *glissement des filaments* pour expliquer leur contraction musculaire a été avancée en 1954 par H.E.Huxley et Hanson (48) et par A.E.Huxley et Niedergerke (42), qui ont remarqué qu'en dépit des différences de longueur des sarcomères, les filaments conservent, eux, la même longueur. Ces auteurs ont proposé un modèle de glissement des filaments dans lequel les changements de la longueur musculaire résultent du glissement des deux types de filaments les uns sur les autres, sans modification de leur longueur individuelle, constance qui a été confirmée récemment par Page et Huxley (57) qui trouvent une longueur de $1,6 \mu$ pour les filaments épais et de $2,05 \mu$ pour les filaments de la bande I (cette longueur qui comprend le disque Z n'est donc pas celle du filament mince). Quand le sarcomère a une longueur de $2,27 \mu$ ou plus, la bande H est visible; de $2,26 \mu$ à $2,23 \mu$, il n'y a plus de bande H; à $2,22 \mu$ ou au-dessous, une ligne sombre apparaît au centre de la bande A, à cause du chevauchement des filaments minces (47).

Les ponts entre les filaments épais et minces doivent se rompre et se reformer au cours de la contraction, car ils demeurent toujours perpendiculaires aux filaments (44, 45).

Récemment encore, plusieurs auteurs se sont élevés contre la théorie du glissement (10, 29, 72, 76). Selon Gilev (29), il faut distinguer deux phases dans la contraction. Dans la première (de 100 à 79% de la longueur au repos), les filaments glissent les uns par rapport aux autres. Au stade suivant (de 78 à 58%), il y a une spiralisation des filaments en bordure de la bande H et du disque Z. Sjöstrand (72) estime que la théorie du glissement reste valable pour décrire les mouvements des filaments lors d'une tension pendant la relaxation. Dans le raccourcissement isotonique, les filaments de la bande A se dissocieraient en branches plus fines, lesquelles constitueraient un réseau dense par interaction avec les filaments de la bande I.

L'ultrastructure du disque Z a été étudiée récemment par Knappeis et Carlsen (51), Franzini-Armstrong et Porter (27) et par Auber et Couteaux (3). Les filaments minces ne sont pas continus à travers les disques Z. Chez les vertébrés, chacun d'eux donne 4 filaments (filaments Z). L'ensemble est disposé en un réseau à mailles carrées, dont chaque intersection est occupée par un filament et dont le centre est en face d'un filament mince situé de l'autre côté (51). Dans les muscles des diptères, les filaments minces acquièrent au voisinage du disque Z une épaisseur plus grande et une forme aplatie. Dans le disque Z, ils s'associent par trois pour former des tubes qui traversent complètement le disque Z et chacun d'eux met en rapport deux groupes de 3 filaments minces, situés de part et d'autre du disque Z.

II. Le réticulum sarcoplasmique

L'appareil réticulaire, vu déjà en microscopie optique par Retzius (66) en 1881, et par Veratti (80) en 1902, a été décrit pour la première fois au microscope optique par Bennett et Porter (6). L'ensemble des vésicules et des tubules qui sont situées entre les myofibrilles a reçu, par analogie

avec le réticulum endoplasmique, le nom de *reticulum sarcoplasmique* (60, 61, 63). Le réticulum sarcoplasmique est plus ou moins développé, selon le type de muscle considéré. Dans les muscles à contractions rapides et répétées, tels que le cricothyroïdien de la chauve-souris (67), le muscle de la vessie natatoire des poissons téléostéens (21), certains muscles du vol chez les insectes (16, 74, 75), son extension est considérable.

Le réticulum sarcoplasmique comprend deux systèmes, le *système longitudinal* (système L), où prédominent les vésicules et les citernes, et le *système tubulaire transversal* (*système T*), qui correspond à des digitations du sarcolemme à l'intérieur du sarcoplasme (2, 61). Depuis le sarcolemme, ces tubes s'enfoncent en profondeur. Chez les batraciens, ils sont situés au niveau de la membrane Z. Chez les insectes et la plupart des mammifères, ils sont en bordure de la jonction A-I (16, 25, 26, 69, 74, 75). Le système T est alors en contact du système L, avec lequel il forme des images caractéristiques et bien connues, qui sont les diades (9), les triades (18, 61), les pentades, les hexades, etc. (17, 18, 67). Dans la triade, le canal du système T est situé entre les deux extrémités du système réticulaire longitudinal (citernes terminales). Là où les deux constituants réticulaires sont face à face, leurs membranes sont épaissies, des ponts parfois les rejoignent, des membranes plus ou moins nettes apparaissent entre eux, aspects variés qui rappellent les desmosomes ou les synapses (18, 65, 67). Chez les crustacés, le système T possède des ramifications transversales (9).

Grâce au système T, le sarcolemme entre en contact avec la profondeur des fibres musculaires, en particulier avec le système longitudinal. Il servirait à la propagation intracellulaire du potentiel d'action (5, 43), en accord avec les déductions de Hill (39, 40), qui a montré qu'en raison de la lenteur des processus de diffusion, une substance pénétrant depuis la périphérie de la cellule ne peut déclencher la contraction. Girardier et al. (32) ont montré dans le muscle de l'écrevisse qu'une partie de la membrane des tubules est sélectivement perméable aux anions. Ils en déduisent que dans ce muscle la membrane tubulaire ne propage pas de potentiels d'action et que, pour cette raison, les écrevisses marchent à reculons; au moment de l'excitation, une différence de potentiel s'établit entre le sarcolemme et la membrane tubulaire, donnant naissance à un courant local de couplage électromécanique.

Le réticulum sarcoplasmique des muscles striés est capable d'accumuler de grandes quantités d'ions calcium (11, 36, 37, 81). Selon Fahrenbach (18), ce calcium est situé dans le système longitudinal et non pas dans les tubules. Une autre fonction du réticulum sarcoplasmique est la production du facteur de relaxation. On le retrouve, en effet, dans le culot microsomes obtenu à partir d'un homogénat de muscle (7, 15, 54, 55).

Dans le muscle cardiaque, le réticulum sarcoplasmique a une structure voisine de celle du muscle squelettique (22, 56, 77, 78). La continuité du système T avec l'espace extracellulaire a été démontrée en utilisant la ferritine comme traceur de diffusion (30, 31). Par contre, on ne trouve pas dans le cœur de structure spécialisée comparable aux triades (20, 24).

Forssmann et ses collaborateurs (24) pensent avoir démontré la présence de ferritine – lorsque la préparation est incubée en présence de cette substance – dans le système L, observation qui suggère l'existence dans le cœur du rat de communications entre les systèmes T et L. Toutefois des études complémentaires sont en cours pour confirmer cette hypothèse, car il est très difficile parfois de différencier avec certitude le système L du système T. Il faut aussi se souvenir que le système T peut emprunter un trajet longitudinal sur une distance de la longueur d'un sarcomère (20, 56). Néanmoins, la communication du système L avec l'espace extracellulaire, par l'intermédiaire du système T, est en accord avec diverses données physiologiques et biochimiques: le système L n'accumule le calcium qu'en présence d'oxalates (37) et la contraction cardiaque dépend beaucoup plus de la concentration de calcium externe, que ce n'est le cas pour le muscle squelettique (52).

III. Les disques intercalaires (traits scalariformes)

Les disques intercalaires, zones de séparation entre cellules anatomiquement isolées les unes des autres (59, 73, 79), comportent différents segments:

1° Une zone où les membranes des deux cellules apposées sont séparées par un interstice de 200 à 300 Å, sans interposition de membranes basales. L'interstice est ouvert dans l'espace extracellulaire et, en certaines régions, communique avec le réticulum sarcoplasmique (24, 33).

2° Des *desmosomes*, où la membrane possède un épaissement osmio-phile. Les membranes sont trilamellaires et entre les deux cellules se trouve un matériel filamenteux. Ces desmosomes sont morphologiquement identiques à ceux qui mettent en contact les cellules épithéliales (19, 23).

3° Des *nexus*, c'est-à-dire des zones où les deux membranes cellulaires ont fusionné (12). Les deux «Unit membranes» y forment une structure unique, épaissie. Ces nexus possèdent certainement une faible résistance à la diffusion des ions; ils servent de couplage électrique entre cellules, faisant du cœur un «syncytium fonctionnel».

L'interstice du disque intercalaire est élargi lorsque le cœur – ou un fragment de cet organe – est plongé dans une solution hypertonique (4, 14), mais aussi longtemps que les nexus ne sont pas séparés, on n'observe pas de bloc de conduction.

(Institut d'Histologie normale et d'Embryologie générale de l'Université de Genève.)

BIBLIOGRAPHIE

1. Allen E.R. and Pepe F.A.: Am.J.Anat. 116, 115 (1965).
2. Andersson-Cedergren E.: J.Ultrastruct. Research, Suppl. 1 (1959).
3. Auber J. et Couteaux R.: J.Micros.(Paris) 2, 309 (1963).
4. Barr L., Dewey M.M. and Berger W.: J.Gen.Physiol. 48, 797 (1965).
5. Bennett H.S.: Am.J.Phys.Med. 34, 46 (1955).
6. Bennett H.S. and Porter K.R.: Am.J.Anat. 93, 61 (1953).

7. *Berne R.M.*: Biochem.J. 83, 364 (1962).
8. *Bourne G.E.* (ed.): Academic Press, New York, 3 vol. (1960).
9. *Brandt P.W., Girardier L., Reuben J. and Grundfest H.*: J. Cell Biol. 25, 233 (1965).
10. *Carlsen F., Knappes G.G. and Buchthal F.*: J. Biophys. Biochem. Cytol. 11, 95 (1961).
11. *Costantin L.L., Franzini-Armstrong C. and Podolsky R.J.*: Science 147, 158 (1965).
12. *Dewey M.M. and Barr L.*: J. Cell Biol. 23, 553 (1964).
13. *Dreifus J.J., Girardier L. et Forssmann W.G.*: (à paraître).
14. *Dreifus J.J., Girardier L., Pollet M. et Forssmann W.G.*: Helv. Physiol. Pharmac. Acta 23, C18 (1965).
15. *Ebashi S. and Lipmann F.*: J. Cell Biol. 14, 389 (1962).
16. *Edwards G.A., Ruska H. and de Harven E.*: J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 251 (1958).
17. *Fahrenbach W.H.*: J. Cell Biol. 22, 477 (1964).
18. *Fahrenbach W.H.*: Science 147, 1308 (1965).
19. *Farquhar M.G. and Palade G.E.*: J. Cell Biol. 17, 375 (1963).
20. *Fawcett D.W.*: VIII. Int. Anatomenkongress, Wiesbaden 1965. Zus.fass. d. Vortr. Thieme, Stuttgart 1965, S. 37.
21. *Fawcett D.W. and Revel J.P.*: J. Biophys. Biochem. Cytol. 10, Suppl., 89 (1961).
22. *Fawcett D.W. and Selby C.C.*: J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 63 (1958).
23. *Forssmann W.G.*: Frankf. Z. Path. 74, 512 (1965).
24. *Forssmann W.G.*: VIII. Int. Anatomenkongress, Wiesbaden 1965. Zus.fass. d. Vortr. Thieme, Stuttgart 1965, S. 40.
25. *Franzini-Armstrong C.*: Fed. Proc. 23, 887 (1964).
26. *Franzini-Armstrong C. and Porter K.R.*: J. Cell Biol. 22, 675 (1964).
27. *Franzini-Armstrong C. and Porter K.R.*: Z. Zellforsch. 61, 661 (1964).
28. *Gergely J.* (ed.): Little, Brown and Co., Boston (1964).
29. *Gilev V.P.*: J. Cell Biol. 12, 135 (1962).
30. *Girardier L.*: In: Electrophysiology of the heart. *Taccardi, B. and Marchetti, G.* (ed). Pergamon Press, Oxford 1965, p. 53.
31. *Girardier L. et Pollet M.*: Helv. Physiol. Acta 22, C72 (1964).
32. *Girardier L., Reuben J.P., Brandt P.W. and Grundfest H.*: J. Gen. Physiol. 47, 189 (1963).
33. *Hadek R. and Talso P.J.*: J. Cell Biol. 23, 40A (1964).
34. *Hanson J. and Lowy J.*: J. mol. Biol. 6, 46 (1963).
35. *Hanson J. and Lowy J.*: Proc. roy. Soc. (London) B 160, 449 (1964).
36. *Hasselbach W.*: Proc. roy. Soc. (London) B 160, 501 (1964).
37. *Hasselbach W. and Makinose M.*, in: Biochemistry of muscle contraction, *J. Gergely* (ed.), Little, Brown and Co., Boston 1964, p. 247.
38. *Hasselbach W. and Schneider G.*: Biochem. Z. 321, 462 (1951).
39. *Hill A.V.*: Proc. roy. Soc. (London) B 135, 446 (1948).
40. *Hill A.V.*: Proc. roy. Soc. (London) B 136, 399 (1949).
41. *Huxley A.F.*: Ann. Rev. Physiol. 26, 131 (1964).
42. *Huxley A.F. and Niedergerke R.*: Nature 173, 971 (1954).
43. *Huxley A.F. and Taylor R.E.*: J. Physiol. (London) 144, 426 (1958).
44. *Huxley H.E.*: J. biophys. biochem. Cytol. 3, 631 (1957).
45. *Huxley H.E.*: J. mol. Biol. 7, 281 (1963).
46. *Huxley H.E.*: Nature 202, 1067 (1964).
47. *Huxley H.E.*: Proc. roy. Soc. (London) B 160, 442 (1964).
48. *Huxley H.E. and Hanson J.*: Nature 173, 973 (1954).
49. *Huxley H.E. and Hanson J.* in: Structure and Function of Muscle, *Bourne G.H.* (ed.), Academic Press, New York 1960. Vol. I, ch. VII, p. 183.
50. *Klingenberg M.*: Ergebn. Physiol. 55, 131 (1964).

51. *Knappeis G.G. and Carlsen F.:* J. Cell Biol. 13, 323 (1962).
52. *Lüttgau H.C.,* in: Electrophysiology of the heart. *Taccardi B. and Marchetti G.* (ed.), Pergamon Press Oxford 1965, p. 87.
53. *Mommaerts W.F.H.M.:* Amer.J. Med. 35, 606 (1963).
54. *Muscatello U., Andersson-Cedergren E., Azzone G.F. and Decken A. von der.:* J. biophys. biochem. Cytol. 10, Suppl., 201 (1961).
55. *Nagai T., Makinose M. and Hasselbach W.:* Biochim. biophys. Acta 43, 223 (1960).
56. *Nelson D.A. and Benson E.S.:* J. Cell Biol. 16, 297 (1963).
57. *Page S.G. and Huxley H.E.:* J. Cell Biol. 19, 369 (1963).
58. *Peterson R.P.:* J. Cell Biol. 18, 213 (1963).
59. *Poche R. und Lindner E.:* Z. Zellforsch. 43, 104 (1955).
60. *Porter K.R.:* J. biophys. biochem. Cytol. 2, Suppl., 163 (1956).
61. *Porter K.R.:* J. biophys. biochem. Cytol. 10, Suppl., 219 (1961).
62. *Porter K.R. and Franzini-Armstrong C.:* Sci. Amer. 212, No. 3, 73 (1965).
63. *Porter K.R. and Palade G.E.:* J. biophys. biochem. Cytol. 3, 269 (1957).
64. *Price H.M.:* Amer.J. Med. 35, 589 (1963).
65. *Reger J.F.:* J. biophys. biochem. Cytol. 10, Suppl., 111 (1961).
66. *Retzius G.:* Biol. Untersuch. 1, 1 (1881).
67. *Revel J.P.:* J. Cell Biol. 12, 571 (1962).
68. *Rice R.V.,* in: Biochemistry of muscle contraction. *J. Gergely* (ed.), Little, Brown and Co., Boston 1964, p. 41.
69. *Robertson J.D.:* J. biophys. biochem. Cytol. 2, 369 (1956).
70. *Selby C.C. and Bear R.S.:* J. biophys. biochem. Cytol. 2, 71 (1956).
71. *Simpson F.O. and Oertel S.J.:* J. Cell Biol. 12, 91 (1962).
72. *Sjöstrand F.S.:* Nature 201, 45 (1964).
73. *Sjöstrand F.S. and Andersson E.:* Experientia 10, 369 (1954).
74. *Smith D.S.:* J. biophys. biochem. Cytol. 10, Suppl., 123 (1961).
75. *Smith D.S.:* J. biophys. biochem. Cytol. 11, 119 (1961).
76. *Sonnenblick E.H., Spiro D. and Cottrell T.S.:* Proc. Nat. Acad. Sci. 49, 193 (1963).
77. *Spiro D.:* Trans. N.Y. Acad. Sci., Series II, 24, 879 (1962).
78. *Stenger R.J. and Spiro D.:* J. biophys. biochem. Cytol. 9, 325 (1961).
79. *Van Breemen V.L.:* Anat. Rec. 117, 49 (1953).
80. *Verrati E.:* J. biophys. biochem. Cytol. 10, Suppl., 3 (1961).
81. *Walker S.M., Schrodt G.R., Truong X.T. and Wall E.J.:* Amer.J. phys. Med. 44, 26 (1965).
82. *Worthington C.R.:* J. mol. Biol. 1, 398 (1959).

3. J. DÉLÈZE (Lausanne) – *Propagation du potentiel d'action cardiaque et traits scalariformes.*

Les tissus cardiaques se composent de cellules distinctes réunies par des zones de jonction, les traits scalariformes. La propagation du potentiel d'action s'explique par la théorie du câble si la résistance électrique des traits scalariformes est suffisamment petite par rapport à la résistance électrique de la membrane.

L'observation du potentiel de repos et de la résistance électrique équivalente des fibres au voisinage d'une lésion peut fournir une indication sur l'ordre de grandeur de la résistance électrique des traits scalariformes. Si la résistance \times unité de surface des disques intercalaires, membranes

transversales, est du même ordre que celle de la membrane longitudinale, on n'attend aucune variation de la résistance équivalente de la fibre lésée.

Matériel: Préparations *in vitro* de tissu conducteur de moutons ou de chiens.

Méthodes: Le potentiel transmembranaire est capté par une micro-électrode. Une deuxième électrode intracellulaire insérée à courte distance de la première sert à polariser localement la membrane d'une fibre de Purkinje par un courant rectangulaire d'intensité connue. Lorsque la charge de la capacité de la membrane ne varie plus, le déplacement du potentiel de membrane causé par le passage du courant rectangulaire et mesuré près de l'électrode polarisante est proportionnel à la résistance équivalente de la fibre.

L'effet d'une lésion locale sur cette résistance ne peut s'observer qu'à courte distance ($< \lambda; \lambda = 2 \text{ mm}$). L'enregistrement continu du potentiel de repos et de la résistance est possible si les lésions (diamètre 50–150 μ) sont produites par la décharge monochromatique d'un Laser à rubis convergeant au foyer de l'objectif du stéréomicroscope de préparation.

Résultat: Au moment de la lésion, la résistance à la polarisation électrique et le potentiel de repos observés à courte distance diminuent; ils augmentent ensuite rapidement.

Le calcul basé sur la théorie du câble indique une variation du potentiel de polarisation du même ordre de grandeur que celle qui est observée. Ce résultat confirme l'idée d'une faible contribution des traits scalariformes à la résistance interne des fibres.

(Institut de Physiologie de l'Université de Lausanne.)

4. H. C. LÜTTGAU (Bern) – *Die Wirkung der extrazellulären Kalzium-Ionen auf die elektromechanische Kopplung.*

Der vorliegende Beitrag beschäftigt sich mit der Frage, welche Rolle die extrazellulären Ca-Ionen bei der Auslösung der Muskelkontraktion spielen.

In den vorhergehenden Referaten wurde bereits beschrieben, dass eine Erhöhung der Konzentration an intrazellulären Ca-Ionen für die Aktivierung der Aktomyosin-ATP-ase und damit der Kontraktion verantwortlich gemacht wird. Die dafür notwendigen Ca-Ionen stammen nicht aus dem extrazellulären Raum, sondern werden wahrscheinlich aus bestimmten Abschnitten des sarkoplasmatischen Retikulums freigesetzt. Zu dieser Annahme führen u.a. die Beobachtungen, dass der bei einer Erregung nachweisbare Ca-Einstrom pro cm^2 Zelloberfläche für die Aktivierung der ATP-ase um Größenordnungen zu klein ist und dass Kontraktionen noch möglich sind, wenn die Ca-Ionen der physiologischen Lösung durch andere zweiwertige Kationen ersetzt werden.

Die Aufgabe der extrazellulären Ca-Ionen besteht einmal darin, eine Verarmung der intrazellulären Ca-Speicher zu verhindern. Ihre weitere Rolle wird verständlich, wenn man sich vor Augen hält, dass das Aus-

mass und die Dauer einer Kontraktion der Fibrillen im Zellinneren in grossem Umfange von Vorgängen gesteuert wird, die sich an der «Zelloberfläche» abspielen. Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass das extrazelluläre Ca diese Prozesse «stabilisiert» und dass es in dieser Aufgabe durch Mg ersetzt werden kann. Charakteristisch ist der Einfluss auf die «Schwelle». Unter normalen Bedingungen muss man das Membranpotential der Muskelzelle (z. B. durch den Zusatz von K-Ionen) von -90 mV auf -35 mV erniedrigen, um das kontraktile System zu aktivieren. Eine Erhöhung der extrazellulären Ca-Konzentration von $1,8$ mM auf $5,0$ verschiebt die Schwelle von -35 mV auf -18 mV. Diese und weitere Beobachtungen zeigen, dass Ca-Ionen die elektromechanische Kopplung in ähnlicher Weise beeinflussen wie den Na-Carrier-Mechanismus an erregbaren Membranen.

(Physiologisches Institut der Universität, Hallerianum, Bern.)

LITERATUR

Lüttgau H.C.: Fortschritte der Zoologie. 17, 272–311 (1965).

5. L. GIRARDIER (Genève) – *Flux ioniques transmembranaires et couplage électromécanique.*

Il est hors de doute que, physiologiquement, la contraction musculaire est déclenchée par un phénomène électrique membranaire, le potentiel d'action, dont M. Délèze vient d'analyser les mécanismes de propagation.

On désigne sous le terme général de «couplage électromécanique» la chaîne d'événements débutant par le signal électrique et aboutissant à la contraction. C'est l'un des aspects les moins systématiquement étudiés de la physiologie du tissu musculaire et, pourtant, je suis persuadé que, dans un proche avenir, ce sera l'un des chapitres importants, en particulier de la cardiologie, car il devient de plus en plus évident que l'hypodynamie cardiaque est souvent liée à une diminution de l'efficacité du couplage électromécanique.

L'étude de ce couplage se heurte à de nombreuses difficultés. La plus importante provient du fait que, ainsi que nous le verrons, c'est un mécanisme extrêmement polyfactoriel et que, pour compliquer les choses, les mêmes agents interviennent à titres divers à plusieurs étages du processus. Je pense, en particulier, au calcium qui intervient directement dans le mécanisme de contraction, soit à l'étage final, mais est également un facteur important de la stabilité physioco-chimique de la membrane cellulaire et intervient donc indirectement dans le signal, c'est-à-dire dans le premier étage du couplage.

De sorte que le chemin est semé d'embûches et, seules, des analyses soigneuses d'expériences faites dans des conditions rigoureusement contrôlées permettent, ainsi que le Dr Lüttgau vient de le montrer, de faire la part de l'une ou l'autre action. Ce qui est vrai pour le Ca^{++} l'est certainement pour une série d'autres facteurs beaucoup moins étudiés.

De toute façon, il n'est actuellement pas encore possible de présenter une image cohérente du mécanisme du couplage électromécanique. Ce que je me propose de faire, c'est simplement de montrer que, dans ce problème, comme dans beaucoup d'autres en physiologie cellulaire, les études comparatives ont une grande valeur. La comparaison de différents systèmes permet de distinguer entre des caractéristiques spéciales et les propriétés générales et, de plus, on trouve presque toujours des préparations qui montrent plus nettement que d'autres certains détails essentiels du mécanisme étudié.

Situer le problème dans le court laps de temps imparti nécessite une schématisation extrême, mais les détails et les limitations du modèle très embryonnaire que je veux présenter pourront être discutés à la fin de la séance.

Nous considérerons comme admis que la contraction est déclenchée, au dernier échelon, par une brusque augmentation de la concentration intrasarcoplasmique du calcium ionisé. La source de ce calcium devra être localisée et le mécanisme de sa libération déterminé. Cette dernière constitue pour nous le dernier étage du couplage, l'interaction du calcium avec le système actomyosinique appartenant au domaine du Dr Portzehl et du Dr Rüegg.

Ceci dit, nous pouvons essayer de placer les différents aspects du couplage électromécanique dans le contexte morphologique de la cellule musculaire striée. Comme le Professeur Rouiller vous l'a montré, cette cellule possède, à côté des éléments de la machinerie contractile, un complexe de membranes endocellulaires dont l'étude fait l'objet de très nombreux travaux récents. Prenons comme exemple l'un des muscles les plus utilisés, soit la fibre musculaire striée de grenouille. Le complexe de membranes endocellulaires s'y divise en deux systèmes :

1° un système tubulaire transverse qui est constitué par une extension intracellulaire de la membrane plasmique ;

2° un système longitudinal qui représente certainement une adaptation au muscle du reticulum endoplasmique d'autres cellules. Ces deux systèmes sont indépendants et leur seul point de contact est constitué par un appareil de jonction situé, dans ce cas, au niveau de la strie Z.

Il est généralement admis que la fonction du système transverse est de propager le signal vers l'intérieur de la fibre de façon à obtenir une contraction synchrone de l'ensemble des quelque 5000 à 10000 myofibrilles de la cellule. Ce premier étage du couplage est presque certainement de nature électrique, car, ainsi que A. V. Hill l'a montré, la synchronisation de la contraction des myofibrilles est excellente de sorte qu'il faut admettre que l'information atteint chacune d'elles dans un délai extrêmement court, incompatible avec la cinétique de processus physico-chimiques simples telle que la diffusion d'une substance activatrice.

La modalité de l'extension intracellulaire du signal électrique n'est pas connue dans tous ses détails. On peut imaginer que le potentiel d'action se propage le long de la membrane des tubes transverses ; il est plus probable, toutefois, qu'il s'agisse d'une extension électrotonique passive.

La fonction du système longitudinal est complexe. Il semble que la réserve immédiate du calcium nécessaire à la contraction y soit localisée. Les arguments expérimentaux en faveur de cette hypothèse sont encore passablement indirects, mais, pris dans leur ensemble, sont assez convaincants. Ce sont, d'une part, la démonstration par Frank et Lüttgau que la contraction du muscle strié ne dépend pas directement du calcium extracellulaire. D'autre part, Costantin et coll. viennent de montrer que, si l'on supprime le sarcolemme de la fibre (placée dans un bain d'huile de paraffine), il est possible d'obtenir une contraction localisée des myofibrilles au moyen de solutions de chlorure de potassium ou de sodium. La présence de régions bien localisées de contraction a suggéré à l'auteur que les stimuli ioniques agissent par la dépolarisation de parties fonctionnellement intactes du système de membrane interne. Ensuite, Hasselbach et coll. ont observé que des fibres musculaires, plongées dans des solutions d'oxalate, présentent de larges dépôts de matériel électroniquement dense dans les citernes latérales du réticulum sarcoplasmique et très vraisemblablement constitué d'oxalate de Ca^{++} . Enfin, il est bien connu, après les travaux de Weber et coll., Hasselbach et coll., Ebashi et coll., et d'autres, que des préparations de réticulum sarcoplasmique sont capables d'accumuler, *in vitro*, le calcium. Si cette localisation de la réserve immédiate de calcium se révèle être exacte, il devient nécessaire de postuler: a) un mécanisme relayant l'information depuis le système tubulaire transverse jusqu'au réticulum sarcoplasmique. Il n'est pas exclu que ce relais soit également de nature électrique. Fahrenbach a récemment montré qu'au niveau de l'appareil de jonction entre les deux systèmes, il y avait fusion des deux membranes. Toutefois, Hoyle conteste ce point et a publié dans *Science* une micrographie de l'appareil de jonction qui ne montre ni discontinuité ni fusion des deux membranes respectives; b) un mécanisme de libération du calcium à partir du réticulum. La seule information que nous ayons à ce propos provient des expériences de Costantin qui a montré que, pour que des stimuli ioniques soient actifs sur les membranes endocellulaires, la présence de chlore était absolument nécessaire. On peut imaginer que cet ion sert d'échange pour la libération d'un complexe calcique électronégatif à partir d'un pool situé dans le réticulum sarcoplasmique.

J'aimerais montrer maintenant que ces modalités semblent être différentes dans deux autres types de muscle: a) le muscle strié d'écrevisse et b) le myocarde de rat.

Muscle strié d'écrevisse. – La morphologie du complexe de membranes endocellulaires de cette cellule n'est pas très différente de celle de la fibre de grenouille, comme on peut le voir sur ce schéma que nous avons établi en collaboration avec P. Brandt, J. Reuben et H. Grundfest. Dans ce cas, le réticulum n'entoure la myofibrille qu'au niveau de la bande A et les tubes transverses ont un parcours plus sinueux. Les jonctions entre les deux systèmes forment des diades au lieu de triades chez la grenouille. La différence physiologique importante d'avec le muscle de grenouille est la nécessité, pour une contraction normale, de la présence d'ions

chlore dans la solution externe. On peut le démontrer par une série d'expériences convergentes.

1° La présence de l'ion chlore est nécessaire à une contracture itérative.

2° La durée de la contracture est fonction de l'accessibilité du réticulum à la solution externe lorsque celle-ci contient du chlore comme anion principal. On peut, en effet, en polarisant la cellule, dilater considérablement la partie terminale du système tubulaire transverse et, dans ce cas la contracture est réduite au tiers de sa durée normale.

3° La procaine, qui diminue considérablement la vitesse d'échange du chlore³⁶, est capable de bloquer réversiblement la contracture potassique.

4° On peut démontrer morphologiquement que la durée de la contraction est limitée par la vitesse de diffusion des ions chlore hors du système transverse. Il est possible de mettre en évidence, au moyen de précipitations par l'argent, une concentration élevée de chlore intracanaliculaire plusieurs minutes après le début du lavage de la cellule au moyen d'une solution dépourvue de cet ion.

5° Il existe enfin des espèces d'écrevisses dont l'accessibilité du réticulum à la solution externe est normalement élevée du fait que leurs tubes transverses sont courts et de gros calibre. Dans ce cas aussi, on observe des contractures de durée plus courte.

De plus, lors de l'hyperpolarisation de la fibre au moyen de microélectrodes contenant du chlore, on observe une dilatation du système transverse à la partie terminale des canaux. Ceci suggère que cette région de la membrane tubulaire possède une conductance élevée, ce qui a pour effet d'y augmenter la densité du courant d'action. L'extension intracellulaire profonde de l'excitation serait donc favorisée par un mécanisme qui rappelle la conduction saltatoire. Or, la région terminale des tubes transverses est précisément celle qui contient l'appareil de jonction avec le système transverse.

Ainsi ce muscle dont la membrane dans les conditions physiologiques ne propage pas de potentiel d'action – car elle est investie de très nombreuses synapses dont l'activation ne déclenche qu'une réponse locale – possède-t-il apparemment un mécanisme de relais du signal plus simple entre le système transverse et le système longitudinal. En effet, le chlore semble pouvoir atteindre directement le pool calcique intraréticulaire. Ce qui fait penser que, chez la grenouille, ce relais est probablement organisé de façon à limiter au maximum le shunt du courant d'action afin de maintenir une vitesse de propagation élevée.

Muscle cardiaque. – Dans une recherche effectuée en collaboration avec W. Forssmann, J.J. Dreifuss et M. Pollet, on a pu montrer que, dans cette préparation, la morphologie du système de membrane endocellulaire est très différente des deux cas précédents en ce sens qu'ici, le système transverse est, en partie au moins, en continuité directe avec le réticulum sarcoplasmique. Dans ce cas, on s'attend à ce que la source immédiate de calcium intervenant dans la contraction dépende très directement du calcium extracellulaire, ce qui est le cas expérimentalement. Ainsi le cœur est

organisé de telle façon que la concentration calcique dans le réticulum reste essentiellement constante et ne dépende pas d'une source interne d'énergie. Une autre conséquence de la communication directe entre les deux systèmes canaliculaires est que la membrane réticulaire est soumise à un potentiel égal au potentiel de repos. De plus, il existe à travers elle un gradient de concentration calcique considérable puisque la concentration extracellulaire de cet ion est de l'ordre de 1 mM alors que la concentration intrasarcoplasmique doit être de l'ordre de 10^{-7} M. Et ici, j'aimerais souligner les différences considérables qu'il peut exister entre les essais in vitro et la situation physiologique. Les préparations de réticulum sarcoplasmique ne possèdent probablement pas un potentiel de membrane de l'ordre de 70 à 80 mV. Elles correspondent donc plutôt à un système existant dans la cellule dépolarisée, c'est-à-dire dans la phase de libération du calcium. D'autre part, les préparations réticulaires de myocarde n'accumulent le calcium in vitro qu'en présence d'oxalate, donc lorsque l'efflux calcique à travers leur membrane est maintenu à une valeur basse. On peut se demander si, in vivo, le réticulum est capable de pomper du calcium contre un gradient de concentration aussi élevé. Il est possible que ce soit les mitochondries qui, dans ce cas, ramènent la concentration calcique à des valeurs compatibles avec la relaxation puisqu'elles sont, elles aussi, capables de pomper le calcium contre un gradient de concentration, même en l'absence d'oxalate dans le milieu.

(Institut de Physiologie de l'Université de Genève.)

BIBLIOGRAPHIE

1. Costantin L.L. and Podolsky R.J.: Fed.Proc. 24, 2, 649 (1965).
2. Frank G.B.: J.Physiol. (London) 163, 254 (1962).
3. Hoyle G.: Science 149, 3679, 70 (1965).
4. Weber A. and Herz R., in: Biochemistry of Muscle Contraction. Gergely J. (ed.), Little, Brown and Co., Boston 1964, p. 222.

Les autres références sont citées dans le travail de Rouiller et Forssmann dans ce même symposium.

6. J.C.RÜEGG (Heidelberg und Oxford) – Vergleich der funktionellen Eigenschaften der kontraktilen Proteine verschiedener Muskelarten mit besonderer Berücksichtigung fibrillärer Muskeln von Insekten.

Vergleichende biochemische und physiologische Untersuchungen der kontraktilen Aktomyosin-Systeme verschiedener Muskelarten dienen zur Klärung der Frage, inwiefern die Spezialisierung eines Muskels für eine besondere Leistung auf einer Spezialisierung seines Aktomyosin-Systems beruht. Dieses Problem soll hier vor allem am Beispiel des oszillierenden Aktomyosin-Systems von fibrillären Insektenflugmuskeln besprochen werden. Die Adenosintriphosphatase (ATP-ase) dieses Systems wird durch Dehnung auf den dreifachen Wert aktiviert! (Rüegg und Tregear 1965.)

Ein Beispiel sehr langsamer, für Halteleistungen spezialisierter Muskeln sind die tonischen Schliesser von Muskeln, deren Sperreigenschaften und

Halteökonomie von Lowy und Millman (1963) einem besonderen Verhalten des Aktomyosin-Systems und von Rüegg (1964) dem Tropomyosin-System dieser glatten Muskeln zugeschrieben wurden. Die «tonischen» Eigenschaften von Arterienmuskeln sollen auf der Synärese eines besonderen «Tonoaktomyosins» beruhen (Laszt und Hamoir 1961).

1. Besonderheiten von Aktomyosin-Systemen

Arterienaktomyosin (Tonoaktomyosin) ist wie Uterusaktomyosin (Needham und Shoenberg 1964) im Gegensatz zu Aktomyosin aus Skelettmuskeln schon bei physiologischer Ionenstärke in Form von Aktinfilamenten und Myosinaggregaten löslich und vollständig extrahierbar, sofern nur ATP (1 mM) anwesend ist (Rüegg, Strassner und Schirmer 1965). Nach Reinigung, nach Alterung oder nach Erhöhung der H-Ionen-Konzentration auf pH 6 verhält sich aber Arterienaktomyosin wie Skelettmuskelaktomyosin (Schirmer 1965). Es ist dann bei physiologischer Ionenstärke ein unlösliches Gel, das nach Zugabe von Magnesium-ATP kontrahiert.

Das Aktomyosin-System im glatten Arterienmuskel kann *in situ* funktionell isoliert werden, indem die Fasern nach dem Verfahren von Szent-Györgyi (1949) mit 50% Glycerin monatelang in der Kälte extrahiert werden. Es kontrahiert dann in einer Salzlösung nach Zugabe von ATP ebenso wie glyzerinierte Proteinfäden aus Arterienaktomyosin. Der Bedarf an aktivierenden Kalziumionen ist etwa 10^{-6} M (Filo, Bohr und Rüegg 1965) und damit ähnlich wie bei Skelettmuskelaktomyosin-Systemen (A. Weber und Winicur 1961). Der Magnesiumbedarf hingegen ist 5 mM und somit 10–100mal grösser als bei Aktomyosin-Systemen von Skelettmuskeln in Gegenwart von Kalziumionen. Möglicherweise wirkt also die physiologische Magnesiumkonzentration der glatten Muskelzelle limitierend auf die Kontraktilität. Chronische Veränderungen des Magnesiumgehaltes könnten infolgedessen Zustandsänderungen glatter Muskeln bedingen.

Das Aktomyosin der tonischen Sperrmuskeln von Muscheln verhält sich in allen untersuchten Eigenschaften wie das Aktomyosin aus Skelettmuskeln (Rüegg, 1965). Dasselbe gilt bedingt auch für das *Aktomyosin des fibrillären Insektenmuskels* nach seiner Isolierung (v. Brocke 1965). Nur die Aktivierbarkeit der ATP-ase durch Kalziumionen ist hier gering. Beim funktionell isolierten Aktomyosin-System glyzerinextrahierter fibrillärer Muskeln lässt sich aber – wie erwähnt – durch Dehnung eine zusätzliche ATP-ase-Aktivierung erreichen. Im folgenden beschränken wir uns auf die Frage, welcher Zusammenhang besteht zwischen der Dehnungsaktivierbarkeit der ATP-ase-Aktivität der Aktomyosin-Systeme von Flugmuskeln und ihrer speziellen Fähigkeit zur hochfrequenten Oszillation im Insektenflug.

2. Die Oszillation des fibrillären Insektenmuskels

Die Besonderheit des oszillatorischen Verhaltens der fibrillären Flugmuskeln hochentwickelter Insekten geht am besten aus folgendem Ver-

such hervor: Wird ein isolierter, überlebender fibrillärer Flugmuskel an einem auxotonischen Hebelsystem geeigneter Eigenfrequenz fixiert und elektrisch gereizt, so kontrahiert er und beginnt nach kurzer Zeit mit einer der Resonanzfrequenz des Hebelsystems ähnlichen Frequenz zu oszillieren. Die Frequenz ist unabhängig von der Frequenz und Stärke der Reizung, sie ist nicht begleitet von oszillationssynchronen Aktionspotentialen (Pringle 1949, 1954, Darwin und Pringle 1959, Machin und Pringle 1959). Das endoplasmatische Retikulum fibrillärer Muskeln ist nur sehr schwach ausgebildet (Smith 1961). Man fragt sich darum, ob die oszillatorische Tätigkeit überhaupt auf einer Regulation des intrazellulären Kalziumionenspiegels beruht (Smith 1961), wie das bei der Regelung des Kontraktionszyklus von anderen quergestreiften Muskeln (Übersicht bei Hasselbach 1964) der Fall ist. Möglicherweise ist der Oszillationsautomatismus ein von der erregbaren Membran und der Kalziumpumpe des Retikulums unabhängiger Automatismus der kontraktile Maschine selbst.

3. Die funktionelle Isolierung des Oszillationsmechanismus

Um die kontraktile Maschinerie des Flugmuskels durch Inaktivierung von Zellmembran und Retikulum gewissermassen funktionell zu isolieren, haben Jewell und Rüegg (1966) die Muskelfasern von Flugmuskeln grosser tropischer Wasserkäfer (*Lethocerus*, *Hydrocyrius*) monatelang bei -15°C mit 50% Glycerin extrahiert. Die extrahierten Fasern werden sodann in einer physiologischen Kaliumchloridlösung an einem auxotonischen Muskelhebel fixiert. Die einzige Energiequelle in der Lösung ist Magnesium-ATP (5 mM). Liegt nach Zugabe von EGTA (Ethylen-Glykol-bis-(β -Aminoäthyläther)-N, N'-Tetraazetat) die freie Kalziumionen-Konzentration unter 10^{-9} M und infolgedessen weit unter der physiologischen Kalziumionen-Konzentration (vgl. Portzehl, Caldwell und Rüegg 1964) der erschlafften lebenden Muskelzelle, so ist auch die extrahierte Muskelfaser erschlafft. Wird aber die Kalziumionen-Konzentration durch Kalzium-EGTA-Puffer (Weber und Winicur 1961, Portzehl et al. 1964) auf einen konstanten (weil gepufferten) Wert von 10^{-7} – 10^{-6} M erhöht, so kontrahiert die extrahierte Faser des Insektenmuskels und beginnt mit

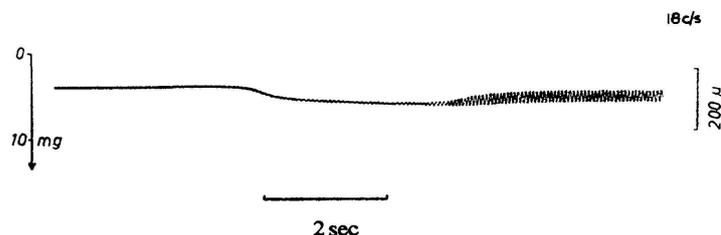


Abbildung 1

Freie Oszillation eines funktionell isolierten Aktomyosin-Systems (glyzerinierte Muskelfaser von *Lethocerus*) im ATP-Bad nach Erhöhung der Kalziumionen-Konzentration auf 10^{-7} M; 0,5 cm lange Faser am auxotonischen Hebelsystem. Ionenstärke $0,1 \mu$, pH 7, $T = 20^{\circ}\text{C}$ (unpubliziertes Experiment von Jewell und Rüegg)

der Eigenfrequenz des Hebelsystems zu oszillieren (Abb. 1), und zwar um so stärker, je höher die Kalziumionen-Konzentration ist. Die Oszillation dauert bis zu 23 Stunden und hört erst dann auf, wenn die Kalziumionen wieder durch EGTA entfernt werden.

Die Oszillation zeigt dieselben Charakteristika wie die Oszillation überlebender Flugmuskeln bei elektrischer Stimulierung und von lebenden Flugmuskeln während des Insektenfluges. Die Oszillationsamplitude beträgt bis zu 1,5% der Muskellänge. Die Frequenz ist unabhängig von der Stärke der Stimulierung, aber ähnlich der Eigenfrequenz des Hebelsystems (bzw. von Flügel und Thorax); sie kann durch Variation der Eigenfrequenz innerhalb gewisser Grenzen (bei Muskeln von Wasserkäfern 2–50 pro Sekunde) variiert werden. Die Versuche zeigen also, dass die glyzerinextrahierte Muskelfaser im ATP-Bad nicht nur den Kontraktionszyklus imitiert (siehe Weber und Portzehl 1952), sondern auch das oszillatorische Verhalten des Insektenmuskels. Unsere in Gegenwart von Kalziumpuffern ausgeführten Versuche zeigen, dass der Oszillationsmechanismus auf einem von Zellmembran und Kalziumpumpe bzw. Retikulum unabhängigen Automatismus der kontraktilen Aktomyosin-Struktur selbst beruht.

4. Die Regelung der Oszillationsbewegung

Da die Muskelfaser mit der Eigenfrequenz des Hebelsystems oszilliert und da die Frequenz durch Variation der Resonanzfrequenz des Hebelsystems verändert werden kann, ist ein spontaner Rhythmus in der Tätigkeit des kontraktilen Systems ausgeschlossen. Während jedes Oszillationszyklus erfolgt die Muskelverlängerung durch die Bewegung des schwingenden Hebels. Diese Elongationsbewegung des Muskels ist dann offenbar Anreiz und Zeitgeber für die anschließende aktive Kontraktionsphase im Oszillationszyklus. Denn jede abrupte Elongation der extrahierten Muskelfaser im ATP-Bad führt nach einer kurzen Latenzzeit zu einer Aktivierung der Faser. Nach einer plötzlichen Dehnung der Faser beispielsweise steigt die Faserspannung kurz an, fällt wieder ab und nimmt dann erneut zu («delayed activation», siehe Jewell und Rüegg 1966). Entdehnung bewirkt ein spiegelbildliches Verhalten. Die verzögerte Aktivierung und Deaktivierung nach plötzlichen Längenänderungen wurde zuerst an überlebenden Muskeln beobachtet (Boettiger 1957). Sie ist charakteristisch für fibrilläre, oszillierende Insektenmuskeln. Durch Elongation glyzerinextrahierter Muskelfasern wird aber das kontraktile Aktomyosin-System nicht nur mechanisch aktiviert, sondern auch enzymatisch; die ATP-ase-Aktivität nimmt, wie wir einleitend hervorhoben, um 200–300% zu (Rüegg und Tregear). In einem konkreten Beispiel wird von einer 1 cm langen einzelnen Muskelfaser pro Minute $150 \cdot 10^{-12}$ M Phosphat freigesetzt. Die Rate der ATP-Spaltung steigt nach Dehnung um 2,5% auf $280 \cdot 10^{-12}$ nach Dehnung um 5% auf $330 \cdot 10^{-12}$ reversibel an. Gleichzeitig steigt die Spannung auf 10 mg.

Die Aktomyosin-Struktur des Insektenmuskels funktioniert also während der Oszillation wie ein Rückkopplungskreis (Abb. 2).

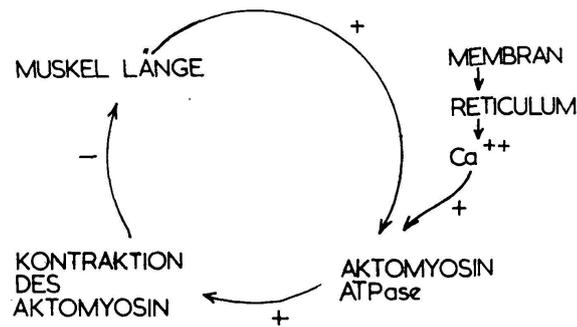


Abbildung 2

Die Regelung der Muskellänge fibrillärer Flugmuskeln bei der Oszillation; Erklärung im Text

Kalziumionen aktivieren die Aktomyosin-ATP-ase; die Spannung der kontraktile Elemente nimmt zu und bewirkt Verkürzung, die gefolgt ist von Deaktivierung der ATP-ase und Erschlaffung des kontraktile Systems. Das auxotonische Hebelsystem schwingt deshalb zurück und dehnt die erschlaffte Muskelfaser über die Ausgangslänge hinaus. Dadurch wird die ATP-ase wieder aktiviert und die bei der ATP-Spaltung frei werdende Energie des energiereichen Phosphats wird dem kontraktile System während der Oszillation gerade im Moment der grössten Elongation zugeführt. Dies bewirkt aktive Kontraktion und damit beginnt der Zyklus wieder von vorn. Die Länge der Muskelfaser wird also durch negative Rückkoppelung kontrolliert. Infolge von Verzögerungsgliedern im Feed-Back wird sie jedoch nicht konstant gehalten, sondern schwingt um eine Mittellage.

5. Energetik der Oszillation

Damit die am auxotonischen Hebel befestigte, frei oszillierende extrahierte Muskelfaser trotz der Dämpfung die Oszillation aufrechterhält, muss sie – wie wir gesehen haben – kurz nach der grössten Elongation aktiv kontrahieren und dabei Arbeit leisten. Die extrahierte Muskelfaser arbeitet auch dann, wenn sie nicht frei oszilliert, sondern in Anwesenheit von ATP-Mg und Kalziumionen mit einer geeigneten Frequenz durch einen Vibrator (Machin und Pringle 1960) sinusförmig gedehnt und entdehnt wird. Wie auch bei der freien Oszillation ist bei dieser getriebenen Oszillation die Aktivierung, d.h. die Spannung kurz *nach* der grössten Elongation am grössten (Abb. 3). Spannungs- und Längenänderung sind also phasenverschoben, und zwar so, als ob das sinusförmig gedehnte Präparat einen negativen viskosen Modulus hätte. Werden während eines Oszillationszyklus Länge und Spannung gleichzeitig registriert, so beschreibt das Längen- und Spannungsdiagramm der glyzerinextrahierten Faser eine Ellipse im Gegenuhrzeigersinn. Die eingeschlossene Fläche entspricht der von der Faser pro Zyklus (am Apparat) geleisteten Arbeit, woraus sich die Leistung errechnen lässt. Der totale Energieumsatz kann

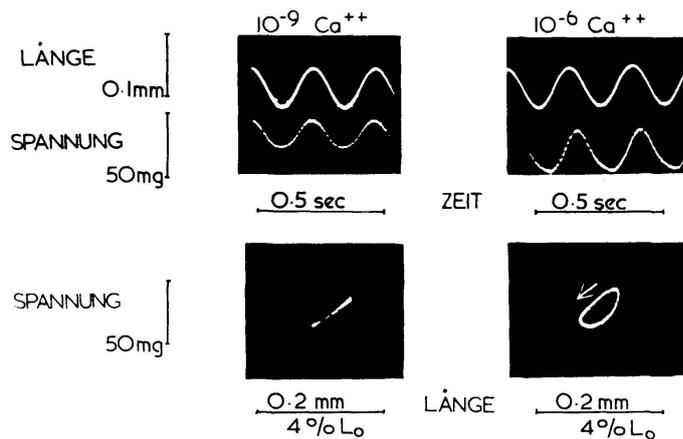


Abbildung 3

Oszillation glyzerinierter Muskelfasern von *Lethocerus*, getrieben durch sinusförmige Dehnungen, nach der Methode von Machin und Pringle (1960)

Oben: Die Phasenverschiebung von Spannungsänderung und Längenänderung des Faserbündels im aktiven Zustand (Kalziumionen-Konzentration des ATP-Bades 10^{-6} M); fehlende Phasenverschiebung im erschlafften Zustand (Kalziumionen-Konzentration unter 10^{-9} M)

Unten: Die zugehörigen Längenspannungsdiagramme bei aufgezwungener Oszillation im inaktiven und aktiven Zustand. Die eingeschlossene Fläche ist die Arbeit der Fasern pro Oszillationszyklus; aus dem ATP-Verbrauch errechnet sich der Energieumsatz (Rüegg und Tregear)

nach Rüegg und Tregear (in Vorbereitung) aus dem ATP-Verbrauch direkt bestimmt werden.

In einem konkreten Fall wird ein Bündel von 9 0,5 cm langen glyzerinierten Muskelfasern in einem 0,1 ml kalziumhaltige ATP-Lösung fassenden röhrenförmigen Durchflussbad suspendiert und mit einer Frequenz von 4/Sekunde und einer Amplitude von 2% der Faserlänge zur sinusförmigen Oszillation getrieben. Das etwas über 0,1 mg schwere Faserbündel leistet pro Stunde etwa 100 μ cal an mechanischer Arbeit und verbraucht 0,16 μ M ATP. Dieser ATP-Verbrauch ist etwa doppelt so gross wie dann, wenn das Präparat bei denselben ionalen Bedingungen isometrisch kontrahiert ist, aber nicht oszilliert und nicht arbeitet. Er ist sogar 4–5mal so gross wie bei der im kalziumfreien Medium erschlafften Faser. Die durch Kalzium induzierte ATP-Spaltung beträgt also etwa 0,04 μ M ATP/Stunde und die durch die oszillatorische Arbeit induzierte Spaltung etwa 0,08 μ M ATP pro Stunde. Die diesen ATP-Umsätzen entsprechenden Energieumsetzungen sind wahrscheinlich A. V. Hill's «Energy of activation» und «Energy of work» analog.

Die Mitochondrien-ATP-ase ist in glyzerinextrahierten Fasern spezifisch durch Azid (10 mM) gehemmt. Die ATP-ase-Aktivität der Fasern ist dann gleich gross wie im Homogenat, und sie hat denselben Temperaturkoeffizienten; daher scheint eine Limitierung der ATP-ase-Aktivität der Fasern durch ungenügende ATP-Versorgung unwahrscheinlich.

Der ATP-Verbrauch wird bestimmt durch Bestimmung des abgespaltenen Phosphats nach der Methode von Marsh oder unter Verwendung von β , γ -markiertem ATP₃₂ (Rüegg und Tregear 1965). Die Leistung der extrahierten Fasern kann bei der getriebenen Oszillation bei konstanten ionalen Bedingungen durch Veränderung der Oszillationsamplitude variiert werden. Die durch die Oszillation bedingte Extra-ATP-ase ist unter diesen Umständen der Leistung des extrahierten Faserbündels ziemlich proportional. Also ist die als Fenn-Effekt bekannte Erhöhung des Energieumsatzes lebender Muskeln durch Arbeitsleistung auch in funktionell isolierten Aktomyosin-Systemen reproduzierbar, bei welchen Adenosintriphosphat die einzige Energiequelle ist. Der Fenn-Effekt des lebenden (Insekten-) Muskels beruht offenbar auf einer direkten Aktivierbarkeit der Aktomyosin-ATP-ase durch mechanische Arbeit.

6. Zum Mechanismus der Oszillation

Nach der Kontraktionstheorie von Perry und Cotterill (1965) wird durch die ATP-ase-Wirkung das ATP am Ort der Aktin-Myosin-Interaktion zwischen den dicken und dünnen Filamenten der Myofibrille (Huxley 1963) entfernt. Bei Entfernung des Weichmachers ATP bilden sich aber bekanntlich Aktin-Myosin-Bindungen (Weber und Portzehl 1952), die bei glyzerinextrahierten Insektenmuskeln elektronenoptisch sichtbar sind (Reedy, Holmes und Tregear 1965). Diese Muskeln werden dann starr und kontrahieren sich dabei um 2% (D. C. S. White, persönliche Mitteilung). Durch die Verkürzung wird die ATP-ase deaktiviert; nachdiffundierender ATP-Weichmacher löst die Kontraktionsbindungen; die Faser erschlafft, und die ATP-ase wird wieder aktiv.

7. Schlussfolgerung

Die generelle Frage eines Zusammenhanges zwischen Muskelspezialisierung und Abwandlung des kontraktiven Aktomyosin-Systems wird am Beispiel des fibrillären Flugmuskels von Insekten besprochen. Bei diesem Muskel liegt die Spezialisierung für hochfrequente Oszillation an einer Spezialisierung des Aktomyosin-Systems, nämlich der Aktivierbarkeit der Aktomyosin-ATP-ase durch Dehnung. Dadurch wird «Kontraktion» und «Erschlaffung» des Oszillationszyklus bei konstantem Kalziumspiegel möglich und durch die Längenänderungen bei der Oszillation selbst gesteuert. Infolgedessen wird die Oszillation von der Kalziumpumpe des endoplasmatischen Retikulums unabhängig. Ihr beträchtlicher Energieumsatz wird eingespart, und die Energiereserven werden frei für die Rekordleistung des oszillierenden kontraktiven Aktomyosin-Systems im Insektenflug.

Summary

The functionally isolated actomyosin-systems (glycerol-extracted fibres) of smooth and striated muscle show ATP-ase activity activated by calcium ions (10^{-6} M) or (in the case of the fibrillar flight muscle of an insect) by stretch and by the performance of oscillatory work.

Zusammenfassung

Die durch Extraktion quergestreifter oder glatter Muskeln mit 50% Glycerin funktionell isolierten kontraktile Aktomyosin-Systeme besitzen eine Aktomyosin-ATP-ase, die durch 10^{-6} M Ca^{2+} aktiviert wird. Im Falle der fibrillären Insektenmuskeln wird die Aktomyosin-ATP-ase bei konstanter Kalziumionen-Konzentration durch Dehnung der Muskelfaser oder durch Leistung oszillatorischer Arbeit zusätzlich aktiviert.

(Institut für Physiologie im Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg, und Department of Zoology, University of Oxford).

LITERATUR

- Boettiger E.G., in: Recent Advances in Invertebrate Physiology. Scheer B.T. (ed.), Univ. of Oregon Publ. (1957), S.117-142.
v. Brocke H.H. (in Vorbereitung).
Darwin W.W. and Pringle J.W.S.: Proc.roy.Soc. 151, 194 (1959).
Filo R.S., Bohr D.F. und Rüegg J.C.: Science 147, 1581 (1965).
Hasselbach W.: Progr.Biophys. 14, 169 (1964).
Huxley H.E.: J.mol.Biol. 7, 281 (1963).
Jewell B. und Rüegg J.C.: Proc.roy.Soc. B (1965), im Druck.
Jewell B., Pringle J.W.S. und Rüegg J.C.: J.Physiol. 173, 8P (1964).
Laszt L. und Hamoir G.: Biochim.biophys.Acta 50, 430 (1961).
Lowy J. und Millman: Phil.Trans. B 246, 105 (1963).
Machin K.E. und Pringle J.W.S.: Proc.roy.Soc. B 151, 204 (1959).
Machin K.E. und Pringle J.W.S.: Proc.roy.Soc. B 152, 311 (1960).
Marsh B.B.: Biochim.biophys.Acta 32, 357 (1959).
Needham D.M. und Shoenberg C.F.: Proc.roy.Soc. B 160, 517 (1964).
Perry S.V. und Cotterill J.: Nature (London) 206, 161 (1965).
Portzehl H., Caldwell P.C. und Rüegg J.C.: Biochim.biophys.Acta 79, 581 (1964).
Pringle J.W.S.: J.Physiol. 108, 226 (1949).
Pringle J.W.S.: J.Physiol. 124, 269 (1954).
Reedy M.C., Holmes K.C. und Tregear R.T.: Nature (London) 207, 1276 (1965).
Rüegg J.C.: Proc.roy.Soc. B 160, 536 (1964).
Rüegg J.C.: Helv.physiol.Acta, Suppl. (1965), im Druck.
Rüegg J.C., Strassner E. und Schirmer R.H.: Biochem.Z. 343, 70 (1965).
Rüegg J.C. und Tregear R.T.: J.Physiol. (1965), im Druck.
Schirmer R.H.: Biochem.Z. 343, 269 (1965).
Smith D.S.: J.biophys.biochem.Cytol. 10, 123 (1961).
Szent-Györgyi A.: Biol.Bull. 96, 140 (1949).
Weber H.H. und Portzehl H.: Advanc.Protein Chem. 7, 162 (1952).
Weber A. und Winicur S.: J.biol.Chem. 236, 3198 (1961).

7. P.G. WASER (Zürich) – *Neue Resultate der Herzglykosidforschung.*

1. Die Wirkung von Herzglykosiden auf die kontraktile Proteine

Nachdem es A. Szent-Györgyi (1951) und Straub (1943) gelungen war, aus dem Skelettmuskel Myosin und Aktin zu isolieren, ihre Eigenschaften zu charakterisieren wie auch künstliche kontraktionsfähige Assoziate (Aktomyosinfäden und -bänder) herzustellen, war es naheliegend, die

kontraktionsfördernde Wirkung der Herzglykoside direkt an solchen Aktomyosinmodellen oder ihren Komponenten zu untersuchen. Dies ist auch zahlreichen Arbeitsgruppen gelungen (Mallov und Robb 1949, 1953; Horvath, Kiraly und Szerb 1949; Kako und Bing 1958).

Wir beschäftigen uns seit 15 Jahren mit dieser Aufgabe, ohne dass wir das Problem der inotropen Wirkung der Herzglykoside damit gelöst hätten (Waser 1962, 1963). Die rasche Entwicklung der experimentellen Technik erlaubt immer genauere Messungen der physikochemischen Eigenschaften, der kontraktilen Proteine sowie die Herstellung reinerer Präparate. Wir wollen daher mit der Besprechung der einzelnen Proteine, so wie wir sie heute kennen, beginnen und Glykosideffekte später diskutieren.

Eine Überprüfung der Reinheit früherer Proteinextrakte aus Skelettmuskel und Herz hat ergeben, dass wohl die von uns verwendeten Aktomyosin- und Myosinlösungen meistens nicht sehr rein waren. Erst neue Extraktionsverfahren unter Kontrolle durch die analytische Ultrazentrifuge erlauben die Herstellung von einheitlichen, gut definierten Proteinlösungen. Während früher neben Verunreinigungen durch Spuren anderer Proteine oft Polymerisate des Myosins zu Dimeren oder Tetrameren gefunden wurden, gilt heute eine Myosinlösung für unsere Zwecke als homogen, wenn in der Ultrazentrifuge nur ein Gipfel auftritt und mit ATP kein Abfall der Viskosität durch Aktinbeimengung (nach Aktomyosin-Spaltung) gefunden wird (Abb. 1).

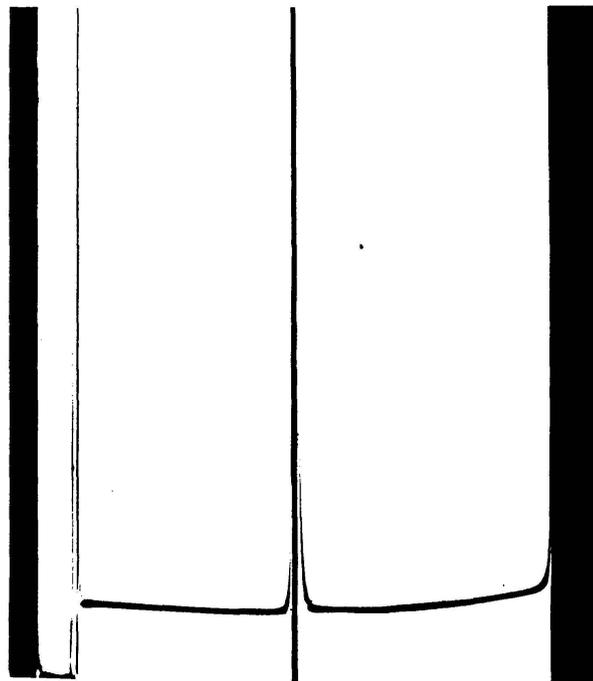


Abbildung 1

Sedimentationsverhalten von Kalbsherzmyosin (6,6 mg/ml in KCl-Phosphatpuffer) in der Ultrazentrifuge. Aufnahme 2 Stunden nach Versuchsbeginn, Tourenzahl 56100 U./min, Temperatur 20 °C, Schlierenwinkel 70° (Jenny, Waser 1965)

Mit diesen Kriterien liessen sich die folgenden Parameter für Kalbsherzmyosin aus Sedimentations- und Diffusionskoeffizient sowie dem partiellen spezifischen Volumen berechnen (Jenny 1965; Jenny und Waser 1965).

- Molekulargewicht 520000 ± 25000
- Achsenverhältnis ca. 50

Für das unhydratisierte Molekül stimmen die berechneten Achsen des Rotationsellipsoides von 24,6 und 1968 Å einigermaßen mit den elektronenoptisch gemessenen Werten von 20–25 Å und 1500–1600 Å überein.

Das Dimerisationsprodukt des Myosins kommt mit einem S_{20w}^0 von ca. 10 durch Seite-zu-Seite-Anlagerung zweier Moleküle zustande. Das Molekulargewicht stimmt mit demjenigen des Myosins aus Hundherzen (500–554000) gut überein. Auch Myosin aus Kaninchenskelettmuskeln hat dieses Molekulargewicht (Abb. 2). Diese Feststellung korrigiert heute die früheren Resultate von Olson und Mitarbeitern (1960, 1961), welche für Herzmyosin nur das halbe Molekulargewicht (226000) fanden und insbesondere bei Hunden mit Herzinsuffizienz ein Molekulargewicht von 690000 beschrieben. Auch dieses Resultat konnte in neueren Versuchen nicht bestätigt werden, so dass das Molekulargewicht unverändert bleibt (Kay und Green 1964; Davis et al. 1964; Conway und Roberts 1965).

Während das Myosin keine nennenswerte *Cholinesterase*wirkung besitzt, ist die *ATP-ase-Aktivität* seit längerer Zeit bekannt (Liubimova und Engelhardt 1939). EDTA und Magnesiumionen beeinflussen die Aktivi-

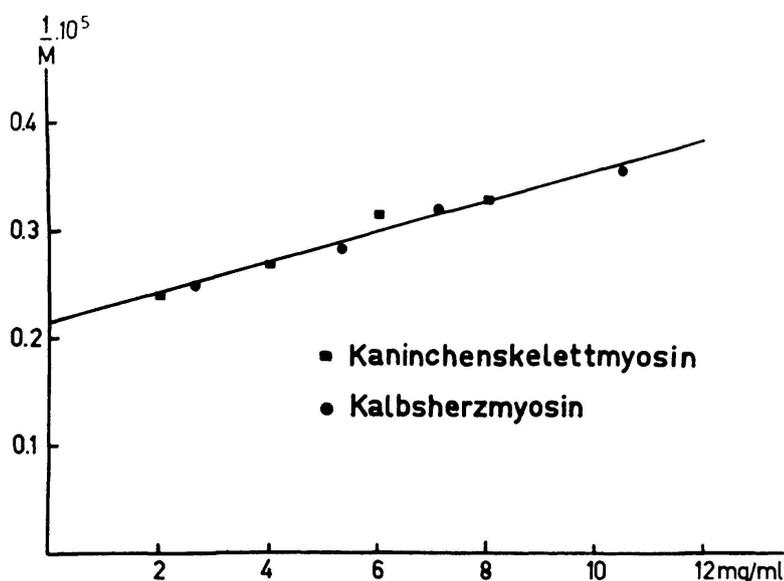
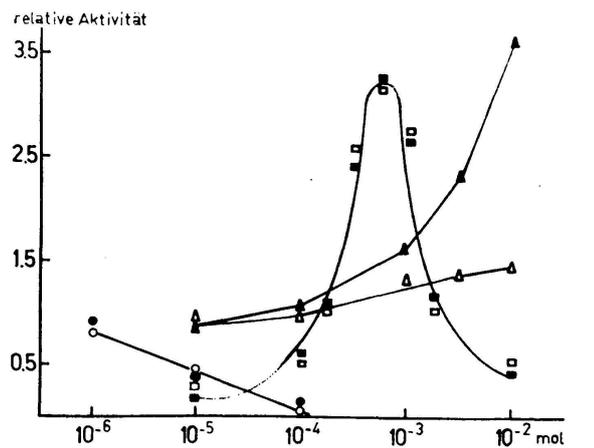


Abbildung 2

Molekulargewichte von Myosin abhängig von Eiweisskonzentration (Messungen im Sedimentationsgleichgewicht bei 4 °C) (Jenny 1965)



	Ca	Mg	EDTA
ATP -ase aus Skelettmysin	▲	●	■
" " " Herzmysin	△	○	□

Abbildung 3

Relative Aktivität der Myosin-ATP-ase, beeinflusst durch Kalzium, Magnesium oder EDTA (Jenny 1965)

tät von Herz- und Skelettmuskelmyosin gleich (Abb. 3). Kalziumionen steigern die Skelettmuskel-ATP-ase um über 200%, die des Herzmuskels jedoch nur um ca. 30%. Durch Äthylenglykol (25%!) wurde die Herzmuskelmyosin-ATP-ase des Kalbes um 80% aktiviert.

Wenn man Herzmyosin mit Skelettmuskelmyosin aus Kaninchen vergleicht, erkennt man, dass sich die Molekulargewichte kaum unterscheiden. Die unterschiedlichen ATP-ase-Aktivitäten und Aktivierung durch Kalzium sind wahrscheinlich auf verschiedene aktive ATP-ase-Zentren zurückzuführen. Die Aktivierung durch Äthylenglykol kommt eventuell durch eine Änderung des Protein-Helix zustande. Auch die Kinetik des tryptischen Abbaus ist verschieden. Immunologische Eigenschaften und Aminosäuresequenz um das aktive Zentrum weisen auf einen verschiedenen Bau hin.

Da die physikalischen Parameter ähnlich sind, Molekulargewichtsbestimmungen und Diffusionskoeffizienten-Messungen jedoch um $\pm 5\%$ genau sind, scheint die Identität beider Myosine noch nicht bewiesen zu sein. Eventuell unterscheiden sie sich in der Tertiärstruktur.

Man muss sich dauernd bewusst sein, dass weder der Hydratationszustand noch die Molekülform dieser Proteine im Herzmuskel bekannt sind und dass daher alle In-vitro-Untersuchungen nie dem physiologischen Zustand im Muskel entsprechen. Für Strukturproteine gilt dies besonders durch ihre ausserordentlich schlechte Löslichkeit bei physiologischen Ionenkonzentrationen. Diese Feststellung ist wichtig, wenn jetzt kurz Glykosideinwirkungen auf die kontraktile Proteine zu diskutieren sind.

Es war schon bekannt und wurde von uns erneut mit reinen Herzmyosinlösungen bestätigt, dass die *Viskosität* durch herzaktive Glykoside, insbesondere $5 \cdot 10^{-6}$ m K-Strophanthosid, nicht verändert wird. Auch Sedimentationskoeffizienten, Molekulargewichte, ATP-ase-Aktivitäten ändern nicht (Jenny 1965; Waser und Volkart 1954).

Die Viskosität von hochgereinigten natürlichen Aktomyosinlösungen wird durch $5 \cdot 10^{-6}$ Strophanthosid nicht verändert (Jenny 1965). Wir waren immer der Meinung, dass Viskositätsänderungen unspezifische Effekte sind, da sie auch durch herzinaktive Glykoside ausgelöst werden (Waser 1956). Andere Autoren haben bei hochgereinigten Myosin- und Aktomyosinlösungen durch Herzglykoside keine Beeinflussung der hydrodynamischen Eigenschaften, der Rotationsdispersion oder der ATP-ase-Aktivität feststellen können (Kay und Green 1964). Es besteht hier eine Kontroverse, welche nur durch weitere Untersuchung der Struktur und Eigenschaften der kontraktilen Proteine mit den modernen Methoden der Proteinchemie gelöst werden kann.

Die *Thixotropie* von Aktomyosinlösungen, das heisst die Vernetzung der fibrillären Proteine in einer Lösung, wird durch Herzglykoside unterschiedlich beeinflusst (Waser 1957). Wir haben vor einigen Jahren mit einem Rotationsviskosimeter festgestellt, dass die Thixotropie durch herzaktive Glykoside vermindert wird, durch inaktive aber erhöht. Worauf dieser Effekt beruht und ob er mit synthetischen, hochgereinigten Aktomyosinlösungen wiederholt werden kann, wissen wir noch nicht. Man könnte sich vorstellen, dass intermolekulare Verbindungen (Wasserstoffbrücken) durch Änderung der Ladung, der Hydratation oder der Konformation (Tertiärstruktur) gelöst werden und dadurch die Thixotropie abnimmt.

Dieses Resultat führte uns dazu, die *Ionenbindung* von Aktomyosin und Myosin unter dem Einfluss verschiedener Glykoside zu untersuchen (Waser 1957, 1963). Wir stellten fest, dass auch hier vor allem durch die herzaktiven Glykoside (10^{-6} m) viel mehr Kalium-, aber auch Kalziumionen an diese Proteine gebunden werden. Auch dieser Befund könnte nur mit einer Strukturänderung des Proteins und Vermehrung der anionischen Bindungsstellen erklärt werden. Wir werden diese Versuche demnächst mit gereinigten Muskelproteinen wiederholen, um festzustellen, ob die Ionenbindung wirklich ihnen selbst oder Beimengungen zuzuschreiben ist.

2. Herzglykoside und Ionentransportsysteme

Dies führt uns zu den heute allgemein bekannten Arbeiten über die Wirkung der Herzglykoside auf Ionentransportsysteme. Nachdem während der letzten 10 Jahre auch hier sehr widersprüchliche Resultate über die Veränderung der Ionenkonzentration in der Muskelzelle und die Beeinflussung der Membranpermeabilität insbesondere für Kalium, Natrium und Kalzium bekannt wurden, hat sich hier die Situation weitgehend geklärt. Schatzmann fand 1953 an Erythrozyten, dass die Austauschpumpe für Natrium und Kalium durch Digitalis gelähmt wird.

Skou (1961), Repke und Portius (1963) und zahlreichen andern Forschern gelang der Nachweis, dass durch herzaktive Glykoside eine Natrium-Kalium-aktivierbare *Ionenpumpe der Membran* gehemmt wird. Die auffällige Parallelität in bezug auf biologische Wirkungen (Speziesunterschiede, Organspezifität, Strukturvariationen der Glykoside, Temperatureffekte, synergistische oder antagonistische Effekte durch Kalzium-, Kalium, Rubidiumionen usw.) und Beeinflussung dieser ATP-ase in vitro führte Repke (1963) dazu, die Transport-ATP-ase der Muskelmembran als wichtigsten Rezeptor der Digitaliswirkung zu betrachten. Die therapeutisch wirksame Digitaliskonzentration 10^{-7} M/l K-Strophanthosid hemmt die Transport-ATP-ase um 15–30%, 10^{-6} bereits 50% und erst 10^{-5} über 80% (Abb. 4). Nach einer Latenzzeit kommt es daher zu einer allmählichen Bremsung der Transport-ATP-ase und damit vor allem zu einer Hemmung des Kaliumeinstromes. Interessant scheint, dass schon eine 30prozentige Blockierung der Membran-ATP-ase eine so starke Wirkung auf die Muskelkontraktion haben kann, da ja bei anderen Fermenten (Cholinesterase, Aminoxydase) eine minimal 80prozentige Hemmung für eine biologische Wirkung notwendig ist. Der Ionenrücktransport zwischen den Kontraktionen ist jedoch bei den therapeutisch wirksamen Digitaliskonzentrationen noch vollständig, aber verlangsamt. Es müsste also die in der Diastole verminderte Ausgleichsgeschwindigkeit und die resultierende verlängerte negative Ionenbilanz für die inotrope Wirkung verantwortlich sein. Es tritt kein Kaliumverlust der Herzmuskelfaser ein – erst nachtoxischen Digitalisdosen wird eine intrazelluläre Kaliumabnahme festgestellt. Ein Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration wurde nicht eindeutig bewiesen.

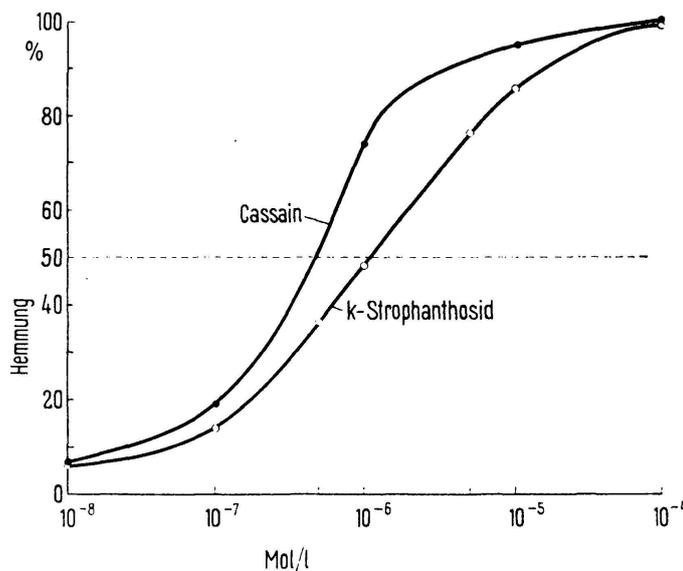


Abbildung 4

Hemmwirkung von K-Strophanthosid oder Cassain in verschiedenen Konzentrationen (Abszisse) auf die Transport-ATP-ase der Zellmembran des Herzmuskels (Repke 1963)

Schon lange bekannt ist die Beobachtung, dass *Kalzium* in mässiger Konzentration synergistisch mit Digitalis wirkt (Clark 1915; Loewy 1918). Dieser Effekt wurde auch für den Ionentransport und an der Transport-ATP-ase festgestellt, wobei intrazelluläres Kalzium den Membrantransport hemmt (Seifen, Rummel und Baldauf, 1962). Moulin und Wildbrandt (1955) nehmen eine Kalziumpumpe in der Membran an, welche in der Diastole das eingetretene Kalzium aus der Muskelzelle herausschafft. Glykoside könnten durch vermehrten Einstrom während der Kontraktionsphase oder Hemmung der Kalziumpumpe in der Ruhepause den Kalziumgehalt erhöhen und damit die Kontraktion verstärken (Wilbrandt 1962). Da das zelluläre Kalzium jedoch nicht einheitlich ist, sondern verschiedenen gebundenen und freien Fraktionen zukommt, ist auch eine Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen diesen Anteilen von Bedeutung. Klaus und Kuschinski (1962) konnten mit therapeutischen Glykosidkonzentrationen an isolierten Meerschweinchenvorhöfen eine deutliche Mehraufnahme von radioaktivem Kalzium bei unverändertem Gesamtkalziumgehalt und damit eine Zunahme der austauschbaren Kalziumfraktion um 10–20% demonstrieren (Abb. 5). Toxische Glykosidkonzentrationen führen zu einer noch grösseren Aufnahme von Kalzium, die zum Teil durch Hemmung des Auswärtstransportes und damit durch Steigerung des Nettogehaltes der Muskelfaser bedingt ist. Die Steigerung der austauschbaren Kalziumfraktion ist anscheinend dosisabhängig und bei drei verschiedenen Digitalisglykosiden auch in

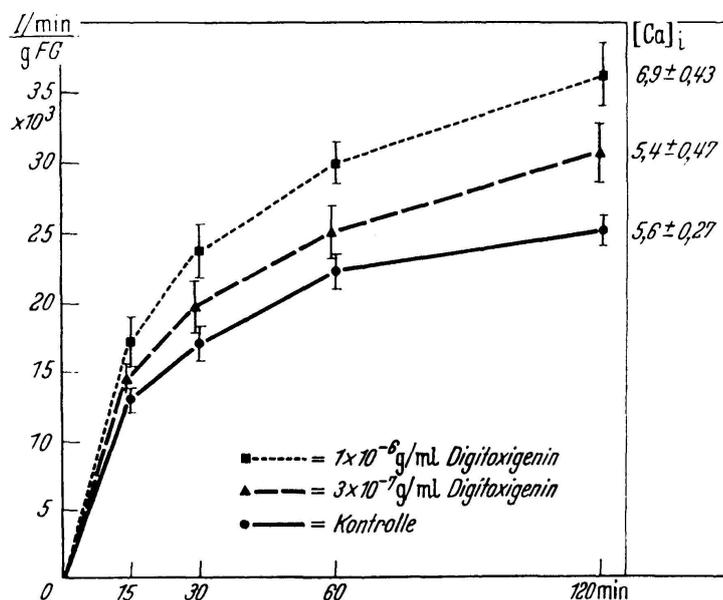


Abbildung 5

^{47}Ca -Aufnahme (Impulse/min/mg Feuchtgewicht) und intrazelluläre Ca-Konzentration (mAequ/l Intrazellulärraum) von Meerschweinchenvorhöfen unter Kontrollbedingungen und dem Einfluss einer therapeutischen ($3 \cdot 10^{-7}$ g/ml) und einer toxischen (10^{-6} g/ml) Digitoxigeninkonzentration (Klaus, Kuschinski 1962)

Korrelation zur positiv inotropen Wirkung (Klaus 1963). Das intrazelluläre Kalzium, welches den Erregungsablauf an der äusseren Zellmembran mit dem Kontraktionsprozess koppelt, wird vor allem durch Ionenpumpen im *endoplasmatischen Retikulum* kontrolliert. Dieses selbst kann aus einem Muskelhomogenat in Bruchstücken als Grana (Kunstprodukte!) isoliert werden, besonders wenn rasch kontrahierende Skelettmuskeln verwendet werden. Im glatten Muskel, der sich langsam kontrahiert, fehlen sie; im Herzen sind sie als *Relaxing factor* von Marsh-Bendall bekannt geworden, weil sie anscheinend durch Kalziumentzug aus dem Sarkoplasma für die Erschlaffung des Muskels verantwortlich sind.

Die neueste Forschungsrichtung beschäftigt sich nun speziell mit der *Kalziumpumpe dieser Grana*, und es sind von Lee und Mitarbeitern (1965) kürzlich sehr wichtige Untersuchungen über die Beeinflussung dieser Grana mit elektrischen Reizimpulsen und Herzglykosiden veröffentlicht worden. An Stelle eines eigentlichen Muskels wurde ein biochemisches System mit isolierten Myofibrillen und gewaschenem Relaxing factor (Grana) aus Skelett- und Herzmuskel von Hunden benutzt. Myofibrillensuspensionen zeigen nach ATP-Zusatz eine sogenannte Synerese, das heisst eine Präzipitation, welche abzentrifugiert werden kann. Diese volumenmässig erfassbare Verdichtung entspricht der Muskelkontraktion. Sie wird durch Zusatz des Relaxing factors gehemmt, ebenso durch Chelatoren für Kalzium. Kalzium scheint für die Synerese wie auch die Muskelkontraktion unbedingt erforderlich zu sein, und die Konzentration der freien Kalziumionen bestimmt die Kontraktionsamplitude. Lee konnte nun zeigen, dass regelmässige elektrische Impulsreizung der Suspension (1,5 V, Frequenz 60/min) die Grana hindert, alles Kalzium aufzunehmen. Es bleibt genügend freies Kalzium in der Suspension, so dass eine Synerese der Myofibrillen eintritt. Diese Umkehr der relaxierenden Wirkung der Muskelgrana durch elektrische Impulse könnte eine In-vitro-Demonstration der *elektromechanischen Koppelung* der Muskelkontraktion sein, bei der die Auslösung einer Kontraktion auch vom Membranaktionspotential aus über das sarkoplasmatische Retikulum zu den Myofibrillen kommt und diese wahrscheinlich über freie Kalziumionen zur Kontraktion bringt.

Herzglykoside (K-Strophanthosid und Digitoxin) beeinflussen interessanterweise die Kalziumpumpe der Grana in Suspension nicht; sie potenzieren aber den Effekt der elektrischen Stimulation, so dass unterschwellige Ströme (0,5 V oder nur 10 Impulse/min) den Relaxing factor so blockieren, dass vollständige Synerese der Myofibrillen eintritt. Für Skelettmuskel war die notwendige Glykosidkonzentration viel höher ($5 \cdot 10^{-6}$ m) als für Herzmuskel (10^{-6} – $5 \cdot 10^{-7}$ M). Obwohl die Natur der strombedingten Prozesse in den Grana noch nicht bekannt ist, müssen diese heute als Wirkungsort der Herzglykoside ernsthaft in Betracht gezogen werden.

Es würde zu weit führen, nun eine Hypothese der Glykosidwirkung aufzustellen, die allen Forschungsergebnissen gerecht wird. Ist es die Hemmung der Membran-ATP-ase, welche über verzögerten Kalium-

rückstrom oder vorübergehende erhöhte Natriumkonzentration die Funktion der Grana oder der Kalziumverteilung beeinflusst? Sind es die Grana, welche verstärkt vor der Muskelkontraktion Kalzium verlieren oder insgesamt weniger Kalzium zurückpumpen können?

Endlich wissen wir heute auch noch nicht, wie Kalziumionen die Muskelkontraktion verstärken und wie Herzglykoside die kontraktile Proteine direkt beeinflussen.

Zusammenfassung

Herzmuskelmyosin (Kalb, Hund) hat dasselbe Molekulargewicht (520000 ± 25000) wie das Myosin des Skelettmuskels (Kaninchen). Die Myosin-ATP-ase wird jedoch durch Kalziumionen weniger aktiviert als im Skelettmuskel. Herzaktive Glykoside vermindern die Thixotropie von Aktomyosinlösungen und erhöhen die Bindung von Kalium- und Kalziumionen an Aktomyosin und Myosin. Zur starken Bindung der Glykoside an Myosin ist Kalzium notwendig. Herzaktive Glykoside hemmen die Transport-ATP-ase für Natrium- und Kaliumionen in der Zellmembran und verzögern damit den Konzentrationsausgleich nach der Depolarisation. Sie antagonisieren auch den Relaxing factor des sarkotubulären Systems und bewirken wahrscheinlich über eine erhöhte Konzentration der freien Kalziumionen im Sarkoplasma eine verstärkte Muskelkontraktion.

(Pharmakologisches Institut der Universität Zürich.)

LITERATUR

- Szent-Györgyi A.*: Chemistry of muscle contraction. Academic Press, New York 1951.
Mallov S. und Robb J.S.: Fed.Proc. 8, 104 (1949); J.Pharmacol. 108, 251 (1953).
Horvath I., Kiraly C. und Szerb J.: Nature 164, 792 (1949).
Kako K. und Bing R.J.: J.clin.Invest. 37, 465 (1958).
Waser P.G.: Schweiz.med.Wschr. 92, 819 (1962).
Waser P.G.: Proc. of the First Intern. Pharmacological Meeting, Vol. 3, p. 173, Pergamon Press, London 1963.
Jenny E.: Helv.physiol.Acta 1965 (eingeschickt).
Jenny E. und Waser P.G.: Experientia 21, 315 (1965).
Ellenbogen E., Iyengar R., Stern H. und Olson R.E.: J.biol.Chem. 235, 2642 (1960).
Olson R.E.: Amer.J.Med. 30, 692 (1961).
Kay C.M. und Green W.A.: Circulation Research, Suppl. II, 14, 15 (1964).
Davis J.O., Carroll W.R., Trapasso M. und Yankopoulos N.A.: J.clin.Invest. 39, 1463 (1960).
Conway G.F. und Roberts J.L.: Amer.J.Physiol. 208, 243 (1965).
Liubimova M.M. und Engelhardt V.A.: Nature 144, 668 (1939).
Waser P.G. und Volkart O.: Helv.physiol.Acta 12, 12 (1954).
Waser P.G.: Cardiologia 29, 214 (1956).
Waser P.G.: Helv.physiol.Acta 15, 125 (1957); 15, C42-C43 (1957).
Schatzmann H.J.: Helv.physiol.Acta 11, 346 (1953).
Skou J.C.: Symposium on membrane transport and metabolism. Czechoslovak Academy of Sciences, Prag 1961, p. 228.
Repke K. und Portius H.J.: Experientia 19, 452 (1963).

- Clark A.J.: Proc.roy.Soc.Med. 5, 1 (1915).
 Loewy O.: Arch.exp.path.Pharmak. 82, 131 (1918).
 Seifen E., Rummel W. und Baldauf J.: Arch.exp.path.Pharmak. 243, 349 (1962).
 Moulin M. und Wilbrandt W.: Experientia 11, 72 (1955).
 Wilbrandt W.: Med.Klinik 57, 2085 (1962).
 Klaus W. und Kuschinski G.: Arch.exp.path.Pharmak. 244, 237 (1962).
 Klaus W.: Arch.exp.path.Pharmak. 246, 226 (1963).
 Lee K.S., Yu D.H. und Struthers J.J.: J.Pharmakol. 148, 277 (1965).
 Straub F.B.: Studies Inst. Med.Chem.Univ.Szeged 2, 3 (1943).

Contributions à la discussion

8. Dr. R. W. STRAUB

Es ist in diesem Zusammenhang vielleicht von Interesse, auf die Untersuchungen von A.F.Huxley und Mitarbeitern hinzuweisen, die sich mit der Bedeutung des sarkoplasmatischen Retikulums für die Aktivierung der Muskelkontraktion befasst haben. In diesen Untersuchungen wurden einzelne, isolierte Muskelfasern durch Mikropipetten, deren Spitzen so geschliffen worden waren, dass sie gut Kontakt mit der Faseroberfläche herstellten, elektrisch gereizt, und die Kontraktion der Muskelfasern unter einem Polarisations- oder Interferenz-Mikroskop photographisch registriert. Dabei zeigten sich, dass an Muskelfasern vom Frosch Kontraktionen ausgelöst werden konnten, wenn die Pipette gegenüber einem I-Streifen, ungefähr auf der Höhe der Z-Linie, lag. Die Kontraktion erfolgte beiderseits der Z-Linie; die Z-Linie selbst bewegte sich dabei nicht. Dieses Verhalten machte es zunächst wahrscheinlich, dass sich die Erregung von der Faseroberfläche entlang der Z-Linie ins Innere der Faser fortpflanzen könnte. In der Folge zeigten elektronenmikroskopische Untersuchungen, dass sich am Froschmuskel Elemente des sarkoplasmatischen Retikulums (Triaden) auf der Höhe der Z-Linien befinden.

Im quergestreiften Muskel von Eidechsen liegen, im Gegensatz dazu, triadenförmige Elemente an der Grenze zwischen A- und I-Streifen. Bei der lokalen Aktivierung konnten an diesem Muskel Kontraktionen ausgelöst werden, wenn die Pipette an der Grenze zwischen A- und I-Streifen lag. Bei der Kontraktion wurde die Z-Linie in der Richtung der Pipette bewegt. Da sich so bei beiden Muskelarten die lokalen Kontraktionen nur an den Stellen auslösen lassen, wo sich Triaden befinden, und die Kontraktionen bei beiden Muskelarten symmetrisch um diese erfolgen, scheint es sehr wahrscheinlich, dass die Triaden, oder Elemente davon, an der Fortleitung der Erregung von der Oberfläche ins Innere der Muskelfasern beteiligt sind.

Bei beiden Muskelarten erstreckte sich die Kontraktion nur über eine kurze Distanz ins Innere der Faser. Ebenso fand sich an beiden Muskelarten, dass mit zunehmender Stärke des Reizstromes die Ausdehnung der Kontraktion gegen das Innere der Faser zunahm. Dieses Verhalten deutet darauf hin, dass die Ausbreitung der Erregung entlang des sarkoplas-

matischen Retikulums nicht dem Alles-oder-nichts-Gesetz folgt, sondern ein graduerter Vorgang ist, der durch eine «elektrotonische» Potentialausbreitung verursacht sein könnte.

9. P. MÜLLER (Bern)

Es wurden *in vitro* simultan die Aktionspotentiale, die isometrische Spannungsentwicklung und der ^{22}K -Gehalt von Schafherz-Muskeltrabekeln registriert. Niedere Konzentrationen von Herzglykosiden (Ouabain $1-5 \cdot 10^{-8}$ M/l) erniedrigten den intrazellulären Kaliumgehalt innerhalb von 3-5 Stunden auf einen neuen Gleichgewichtszustand. Dieser Glykosideffekt war reversibel. Es fand sich eine auffällige zeitliche Parallelität zwischen zellulärem Kaliumgehalt und Kontraktionszunahme. Dieser Befund lässt auf eine enge Beziehung zwischen den beiden Phänomenen schliessen. Die intrazellulär registrierten Aktionspotentiale zeigten über Versuchsperioden bis zu 30 Stunden keine nennenswerten Veränderungen.

10. W. WILBRANDT (Bern)

In bezug auf die Frage, ob und in welcher Weise die pharmakologische Digitaliswirkung mit Transporthemmungen zusammenhängt, scheint mir der gegenwärtige Stand etwa folgender zu sein.

Die Parallelen zwischen inotroper Herzwirkung und Hemmung der Kalium-Natrium-Austausch-Pumpe sind sehr weitgehend. Die Wirkungsschwellen stimmen annähernd überein. Bemerkenswerte Übereinstimmung besteht in der molekularen Strukturabhängigkeit: in der Bedeutung der Anwesenheit des Laktonrings, der Unversehrtheit seiner Doppelbindung (Wirkungsverluste durch Hydrierung) und seiner Stellung (Unwirksamkeit von Allo-Verbindungen), der schwachen, aber nachweisbaren Wirksamkeit einfacher Laktone, der Bedeutung der Stellung der OH-Gruppe an C_3 (Wirkungsverlust durch Epimerisierung) sowie schliesslich in der quantitativen Wirksamkeitsabstufung zwischen individuellen Herzglykosiden. Weiter bestehen Parallelen in Wirkungsbedingungen: Antagonismus mit Kalium, Synergismus mit Kalzium, Temperaturabhängigkeit (keine Wirkung bei tiefer Temperatur) und zeitlicher Wirkungscharakter (langsame Entwicklung der Wirkung).

Ebenso deutliche Parallelen bestehen zwischen Herzwirkung und Wirkung auf die K-Na-abhängige Membran-ATP-ase, die nahe Beziehungen zum Na-K-Austauschtransport hat. Vor allem K. Repke hat sie eingehend studiert. Er ist der Meinung, dass im Enzymprotein der ATP-ase der langgesuchte molekulare Angriffspunkt der Herzglykoside gefunden ist. Es ist aber durchaus denkbar, dass, entsprechend den Vorstellungen von R. Post, die Tätigkeit des «Enzyms» (in Wirklichkeit fragmentierter Membranen, deren Wirksamkeit durch Phospholipase zerstört wird, also an die Anwesenheit intakten Lipoids gebunden ist) von Ionen transporten in den Membranfragmenten abhängt, die ihrerseits glykosidempfindlich sind. In diesem Fall würde Glykosid die enzy-

matische Tätigkeit indirekt durch Transporthemmung und nicht direkt durch Reaktion mit dem Enzymprotein beeinflussen.

Jedenfalls sind aber die Beziehungen zwischen ATP-ase und Transport so eng (quantitative Übereinstimmung in bezug auf alle untersuchten modifizierenden Einwirkungen von Ionen und Hemmstoffen), dass Parallelen zur ATP-ase-Wirkung als Parallelen zur Transporthemmung betrachtet werden dürfen. Repke hat hier neben den oben erwähnten Strukturabhängigkeiten vor allem frappante Parallelen in der Artspezifität aufgedeckt.

Dass die inotrope Wirkung engste Beziehungen zu Transporthemmungen hat, kann danach kaum zweifelhaft erscheinen. Schwierigkeiten macht das Verständnis der Art dieser Beziehungen. Änderungen der intrazellulären Natrium- und Kaliumkonzentrationen können kaum massgeblich sein. Offenbar müssen Beziehungen zum Kalzium bestehen, dessen Bedeutung für Kontraktion und Erschlaffung sich immer klarer abzeichnet und auch aus verschiedenen Darstellungen dieses Symposiums wieder hervorgeht. Die wahrscheinlichste unmittelbare Ursache des inotropen Effekts ist danach eine Erhöhung der Konzentration des ionisierten Kalziums in den Muskelfasern. Eine solche könnte durch Lähmung einer Kalziumpumpe zustande kommen. Eine Hemmung des Kalziumeffluxes durch die Zellmembran nach aussen, wie er zu erwarten wäre, wenn die heute mit Sicherheit nachgewiesene Kalziumpumpe der Zellmembran durch Glykosid gelähmt würde, ist aber in mehreren Untersuchungen nicht gefunden worden. Die von Klaus u.a. beschriebene Erhöhung des «austauschbaren Kalziums» ist offenbar auf intrazelluläre Verschiebungen zurückzuführen. Aber auch die Kalziumpumpe der Erschlaffungsgranula, die mehrfach darauf geprüft wurde, wird offenbar durch Herzglykoside nicht gehemmt.

Wenn Herzglykoside keine unmittelbaren Wirkungen auf Kalziumpumpen besitzen, drängt sich die Frage nach sekundären Wirkungen auf Grund von Beziehungen zwischen Natrium-Kalium-Pumpe und Kalziumkonzentration auf. Repke vermutet, dass die durch Lähmung der Natriumpumpe entstehende Erhöhung der Natriumkonzentration in der Muskelfaser zur Freisetzung von Kalzium aus Bindungen an Phospholipiden führt. Diese Vorstellung würde jedoch eine hochgradige Selektivität solcher Bindungen für Natrium gegenüber Kalium verlangen, da ja die intrazelluläre Kaliumkonzentration wesentlich höher ist als die Natriumkonzentration. Auch andere Möglichkeiten sind erwogen worden. Jedenfalls scheint mir, dass das Hauptproblem gegenwärtig darin besteht, das Verbindungsglied zwischen der durch Herzglykoside gelähmten Kalium-Natrium-Pumpe und der offenbar für die Kontraktilität unmittelbar wirksamen intrazellulären Konzentration des ionisierten Kalziums zu finden.

(Pharmakologisches Institut der Universität Bern.)

11. E. F. LÜSCHER (Bern) – *Das kontraktile System der Blutplättchen.*

Unter dem Einfluss des Gerinnungsfermentes Thrombin sowie einer ganzen Reihe anderer Agenzien, von denen Immunkomplexe besonders

wichtig erscheinen (1), bilden die Blutplättchen dichte Aggregate, die sich aktiv zu kontrahieren vermögen. Diese Eigenschaft ist zurückzuführen auf die Tatsache, dass in den Plättchen beträchtliche Mengen eines kontraktiven Materials vorkommen, das 1959 erstmals von Bettex-Galland und Lüscher (2) beschrieben und später als Thrombosthenin bezeichnet wurde.

Die besonderen Eigenschaften des Thrombosthenins und seine Beziehungen zu andern kontraktiven Proteinen sind kürzlich zusammenfassend dargestellt worden (3), so dass sich eine Besprechung hier auf einige Aspekte, die im Zusammenhang mit dem Gegenstand dieses Symposiums von besonderem Interesse sind, beschränken kann:

Die Beziehungen des Thrombosthenins zum Aktomyosin des quergestreiften Muskels

Thrombosthenin ist ein typischer Vertreter der Aktomyosinfamilie kontraktiver Proteine. Gleich wie Aktomyosin in Aktin und Myosin dissozierbar ist, kann auch das Thrombosthenin in die entsprechenden Komponenten Thrombosthenin A und Thrombosthenin M zerlegt werden. Andererseits ist Thrombosthenin schon bei etwas niedrigeren Ionenstärken löslich als Muskelaktomyosin, und ein weiterer auffallender Unterschied ist seine auch unter optimalen Bedingungen 50–100mal geringere ATP-ase-Aktivität. Vor allem jedoch sind in den intakten Blutplättchen bisher nie irgendwelche Anzeichen für eine geordnete fibrilläre Anordnung der kontraktiven Elemente gefunden worden. Um so bemerkenswerter ist es, dass sich trotzdem experimentell eine enge Verwandtschaft mit dem Aktomyosin des quergestreiften Muskels nachweisen lässt:

Aus menschlichen Blutplättchen wurde Thrombosthenin isoliert und in die Komponenten A und M zerlegt. Gleich wurde vorgegangen mit dem Aktomyosin aus Kaninchenskelettmuskel. Es zeigte sich, dass durch kreuzweises Vermischen der beiden Komponentenpaare Hybriden hergestellt werden können, in denen je eine aus Kaninchenmuskel und aus menschlichen Blutplättchen hergestammende Hälfte enthalten ist. Solche rekombinierte Systeme erweisen sich wieder als aktiv bezüglich ihrer ATP-ase-Aktivität, d. h. Aktin und Thrombosthenin A können sich gegenseitig als Aktivatoren der Myosin-ATP-asen ersetzen (4). Gleiche Verhältnisse finden sich, wenn an Stelle der ATP-ase-Wirkung die sogenannte ATP-Empfindlichkeit, d. h. die Viskositätsveränderung auf ATP-Zusatz in den Lösungen solcher hybrider Rekombinationen geprüft wird (5). Trotz den offenkundigen Unterschieden und vor allem trotz dem Fehlen jeder geordneten Struktur in den Blutplättchen sind die Bausteine des Thrombosthenins offenbar denen des Aktomyosins, die aus der Muskulatur einer anderen Spezies isoliert wurden, so ähnlich, dass sich wiederum ein funktioneller Komplex zu bilden vermag.

Die Auslösung der kontraktiven Aktivität der Blutplättchen

Eingangs ist erwähnt worden, dass verschiedene äussere Faktoren, vor allem das Ferment Thrombin, aber auch Papain und gewisse Schlangen-

gifte (6), imstande sind, die Blutplättchen so zu verändern, dass ihr kontraktiles System eine Aktivierung erfährt. Den gleichen Effekt zeigen gewisse Immunkomplexe und aggregierte, homologe Gammaglobulinpräparate (1, 7). Die primäre Wirkung aller dieser zum Teil sehr verschiedenartigen Substanzen besteht in einer Permeabilitätserhöhung der Plättchenmembran. Dies ist daran erkennbar, dass das erste morphologische Merkmal meist in einer Quellung der Plättchen besteht, dass aber gleichzeitig Inhaltsstoffe der Zelle, so insbesondere Nukleotide, pharmakologisch aktive Amine, aber auch hochmolekulare Substanzen aus dieser austreten. Diese Permeabilitätsstörung, die entsprechend der Funktion der Plättchen in weitaus den meisten Fällen irreversibel bleibt, hat die deshalb zwangsläufig ebenfalls einmalige, Ca^{++} -Ionen-abhängige Aktivierung des kontraktilen Systems im Gefolge. Es handelt sich folglich hier um einen sehr wenig spezialisierten Auslösungsmechanismus für ein primitives Bewegungssystem. Vielleicht geht man nicht fehl mit der Vermutung, dass eine phylogenetisch sehr frühe Form der Erregung solcher Mechanismen realisiert ist, die mit zunehmender Spezialisierung der Zellen schliesslich über komplexere humorale und zelleigene Systeme, wie man letztere wohl z. B. bei beweglichen Einzellern finden kann, zum hochspezialisierten Mechanismus der durch Aktionsströme ausgelösten Depolarisierung und Permeabilitätsänderung der Muskelzellmembran geführt hat.

(Theodor-Kocher-Institut, Universität, Bern.)

LITERATUR

1. Bettex-Galland M., Lüscher E.F., Simon G. und Vassalli P.: Nature 200, 1109 (1963).
2. Bettex-Galland M. und Lüscher E.F.: Nature 184, 276 (1959); Helv. physiol. Acta 17, C14 (1959).
3. Bettex-Galland M. und Lüscher E.F.: Adv. Protein Chem. 20, 1 (1965).
4. Bettex-Galland M., Portzehl H. und Lüscher E.F.: Helv. Chim. Acta 46, 1595 (1963).
5. Bettex-Galland M., Portzehl H. und Lüscher E.F.: Nature 193, 777 (1962).
6. Davey M.G. und Lüscher E.F.: Nature 207, 730 (1965).
7. Bettex-Galland M. und Lüscher E.F.: Path. Microbiol. 27, 533 (1964).

12. H. PORTZEHL (Bern) – Die Regulation der Muskelaktivität durch den intrazellulären Spiegel der freien Kalziumionen.

In einem Teil der voranstehenden Vorträge ist darauf hingewiesen worden,

1. dass für die Kontraktion der kontraktilen Systeme der quergestreiften Muskeln freie Kalziumionen notwendig sind,
2. dass das Ausmass der Kontraktion von der Konzentration der freien Kalziumionen abhängt und
3. dass der intrazelluläre Kalziumionenspiegel während des Kontraktionszyklus, d.h. während Kontraktion und Erschlaffung, verändert wird.

Benutzte Abkürzungen: P_i = anorganisches Phosphat, ATP = Adenosintriphosphat, ADP = Adenosindiphosphat, EGTA = Äthylenglykoldiaminotetraacetat.

Es erscheint mir daher richtig, wenn ich hier auf die Versuche etwas näher eingehe, die zu den oben gemachten Behauptungen geführt haben. Es handelt sich dabei um Versuche, die erstens an isolierten kontraktilen Systemen von quergestreiften Muskeln und zweitens an der lebenden Skelettmuskelfaser der Krabbe *Maia Squinado* ausgeführt wurden.

Ich beginne mit den Versuchen an isolierten kontraktilen Systemen. Solche Systeme lassen sich aus jeder Muskelfaser oder -fibrille isolieren, indem durch Wasser-Glyzerin-Extraktion alle wasserlöslichen Substanzen und damit auch alle Fermente und Substrate des Stoffwechsels entfernt werden. Solche extrahierten Fasern und Fibrillen bestehen zum grössten Teil aus kontraktilen Strukturen und zum kleineren Teil aus Stützgewebe. Ausserdem enthalten sie noch die mengenmässig sehr bescheidenen Strukturen des sarkoplasmatischen Retikulums. Die kontraktilen Strukturen bestehen im wesentlichen aus Myosin, das die dicken Filamente der A-Bande liefert, und dem Aktin, aus welchem die dünnen Filamente der I-Bande aufgebaut sind. Diese reichen noch etwas in die A-Bande hinein. In dieser Überlappungszone können die Myosin- und die Aktinfilamente chemisch miteinander reagieren und einen Komplex bilden, der als Aktomyosin bezeichnet wird. Auf der Reaktion zwischen Myosin und Aktin beruht die Kontraktion des Muskels. Mit geeigneten Mitteln lässt sich das Aktomyosin aus dem Muskel herauslösen, reinigen und aus dem gereinigten Aktomyosin nach einer Art Kunstseidenverfahren Aktomyosinfäden herstellen (vgl. Weber und Portzehl 1954). Dies ist die sauberste Form der Isolierung kontraktiler Systeme. Alle diese isolierten kontraktilen Systeme sind natürlich tot und können daher monatelang im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Wird solchen isolierten kontraktilen Strukturen in einer Lösung eines Kaliumsalzes von etwa physiologischer Konzentration ATP und Mg^{++} , beide ebenfalls in etwa physiologischer Konzentration, zugesetzt, so kontrahieren sie in derselben Weise wie der lebende Muskel. Gleichzeitig wird ATP zu ADP und P_i gespalten. Diese Spaltung liefert die Energie für die Kontraktion¹.

Wie Abb. 1 zeigt, kontrahieren dagegen isolierte kontraktile Systeme unter physiologischen Bedingungen auf Zusatz von ATP und Mg^{++} *nicht*, wenn durch Zusatz von Kalziumpuffer² die freie Kalziumionen-

¹ Cain und Davies konnten 1962 zeigen, dass auch während der Kontraktion des lebenden Muskels ATP gespalten wird und dass auch hier die ATP-Spaltung die einzige unmittelbare Energiequelle des Muskels ist.

² Die Kalziumpuffer sind 1961 von A. Weber in die Physiologie eingeführt worden. Es handelt sich dabei um eine Mischung von Kalziumionen mit organischen Substanzen (z. B. EGTA), die die Kalziumionen mit hoher Affinität reversibel binden. Damit aber nötigen sie dem System, dem sie zugesetzt werden, ihre eigene, wenn gewünscht extrem niedrige Konzentration an freien Kalziumionen in derselben Weise auf, wie gewöhnliche H-Ionenpuffer einem Versuchsansatz ihre eigene, meist sehr niedrige H-Ionen-Konzentrationen aufnötigen.

Konzentration des Milieus auf Werte $\leq 10^{-7}$ M eingestellt ist. Die Kontraktion setzt erst ein, wenn die freie Kalziumionenkonzentration $\geq 10^{-7}$ M wird und erreicht ihr Maximum bei einem freien Kalziumionenspiegel von $\approx 10^{-5}$ M. Wie Abb. 2 zeigt, gilt das gleiche auch für die enzymatische Aktivität der isolierten kontraktile Systeme: Auch die ATP-ase-Aktivität steigt zwischen 10^{-7} M und 10^{-6} M freien Kalziumionen vom Ruhewert auf den Maximalwert der Aktivität an. Dass das Kalzium in dieser Art wirkt, beruht, wie A. Weber 1964 als erste gefunden hat, auf einer Zunahme der Kalziumbindung durch das kontraktile Protein um 1 Mol Kalzium pro 500000 g kontraktiles Protein, wenn die freie Kalziumionenkonzentration von 10^{-7} auf $> 10^{-6}$ M anwächst. Diese Versuche zeigen nicht nur, dass freie Kalziumionen kontraktionsnotwendig sind, sondern auch dass die Kontraktion erst maximal wird, wenn die Schwellenkonzentration um etwas mehr als eine Zehnerpotenz erhöht wird.

Wenn genügend freie Kalziumionen anwesend sind, werden die isolierten Systeme nicht nur aktiv, sondern bleiben auch aktiv, während beim lebenden Muskel auf jede Kontraktion sofort eine Erschlaffung folgt. Auch beim isolierten kontraktile System folgt der Kontraktion eine Erschlaffung – und zwar dann, wenn neben dem isolierten kontraktile

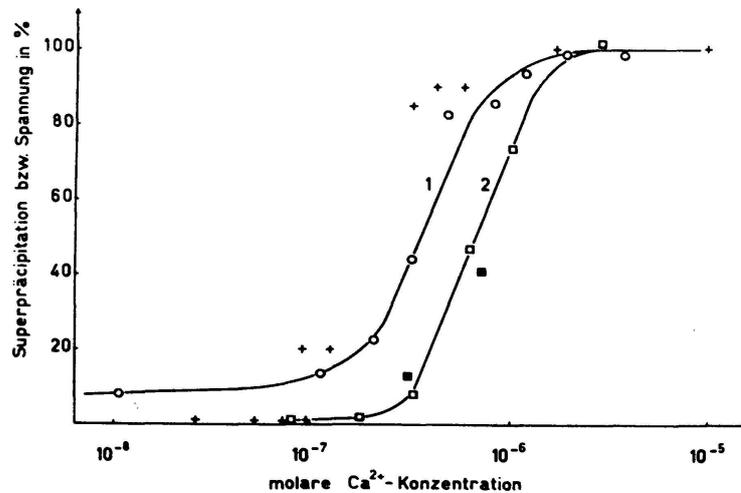


Abbildung 1

Der Kalziumbedarf der mechanischen Aktivität von Fibrillen und Fasern. Ordinate: Superpräzipitation (gleich Mass der Kontraktion) isolierter Fibrillen bzw. Spannung extrahierter Fasern in Prozenten des Maximalwertes. Abszisse: Molarität der freien Kalziumionen. Kurve 1: Superpräzipitation extrahierter Fibrillen von Krabbenmuskeln ○-○ (nach Portzehl et al. 1965) und von Kaninchenmuskeln +-+ (nach A. Weber und Herz 1963). [MgATP] = 2 mM, Ionenstärke = 0,1 μ, pH = 7,0 bei den Krabbenfibrillen und 6,5 bei den Kaninchenfibrillen, Puffer: CaEGTA+EGTA=0,9 bis 5 mM. Kurve 2: Spannungsentwicklung einzelner extrahierter Muskelfasern der Krabbe. [MgATP] = 10 mM, Ionenstärke = 0,08 μ, CaEGTA+EGTA = 2,5 mM, pH = 6,9. ■-■ Verkürzung von lebenden Einzelfasern der Krabbe auf Injektion von CaEGTA+EGTA. Raumtemperatur

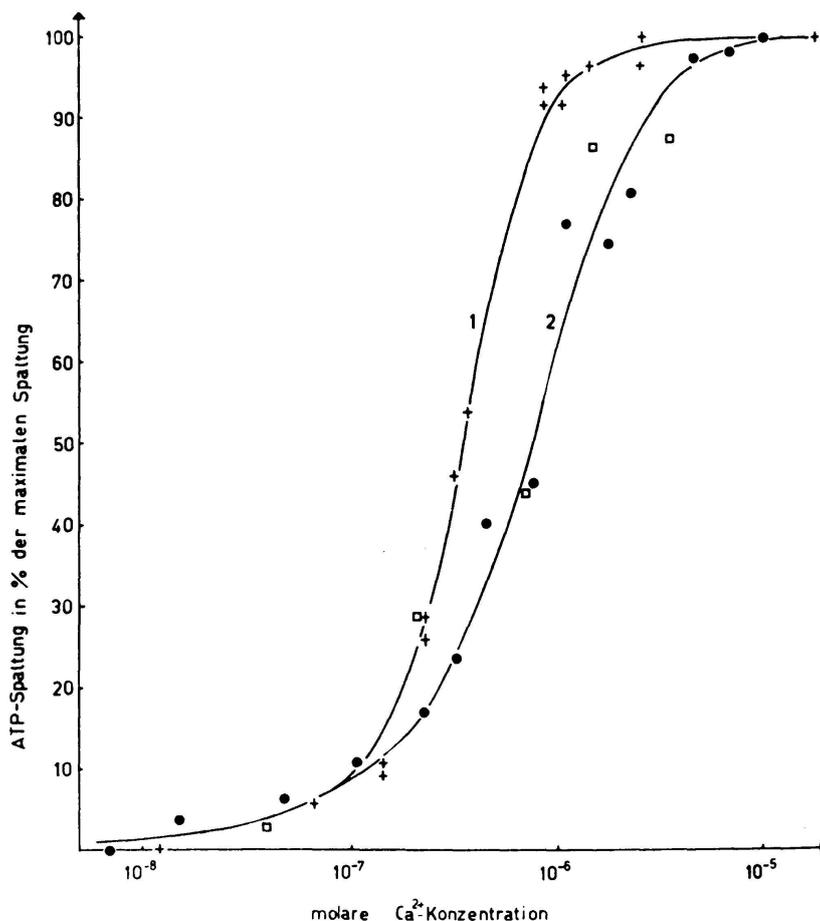


Abbildung 2

Der Kalziumbedarf der enzymatischen Aktivität extrahierter Fibrillen von Skelettmuskeln des Kaninchens und der Krabbe wie vom Herzmuskel des Schafes. Ordinate: ATP-Spaltung in Prozenten der Maximalspaltung. Abszisse: Molare Konzentration der freien Kalziumionen. +-+ Fibrillen aus Kaninchenmuskeln (nach A. Weber und Herz 1963), ●-● Fibrillen aus Krabbenmuskeln (nach Portzehl et al. 1965), □-□ Fibrillen aus Schafsherzmuskeln. [MgATP] = 2 mM, CaEGTA+EGTA = 0,9 bis 5 mM, pH = 7,0 bei Krabben- und Herzfibrillen, pH = 6,5 bei Kaninchenfibrillen, Ionenstärke ~0,1 μ, Raumtemperatur

System die ultramikroskopischen Vesikel des sarkoplasmatischen Retikulums anwesend sind. Wie Abb. 3 zeigt, ist dann trotz Anwesenheit von ATP und Mg⁺⁺ die ATP-Spaltung fast aufgehoben. Werden nun zu einem solchen erschlafften vesikelhaltigen System freie Kalziumionen hinzugefügt, so wird das System für kurze Zeit aktiv – die ATP-Spaltung steigt steil an – und gleich wieder inaktiv – die ATP-Spaltung fällt spontan wieder auf den Ruhewert ab. Zugabe der doppelten Menge an freien Kalziumionen lässt die Aktivitätsperiode doppelt so lang werden. Dieser einfache Versuch spricht dafür, dass die spontane Erschlaffung des kontraktiven Systems darauf beruht, dass die anwesenden Vesikel die

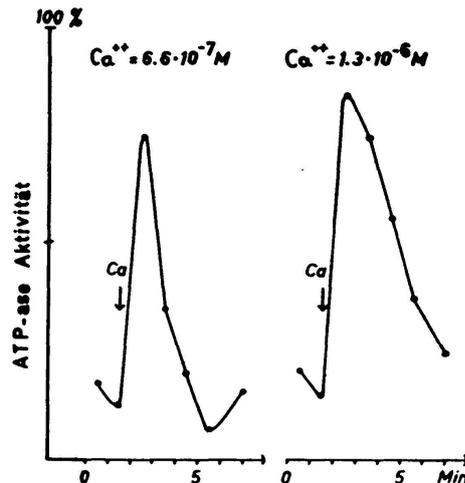


Abbildung 3

Die reversible Aktivierung der Fibrillen-ATP-ase durch Zugabe von Kalziumionen in Anwesenheit von Vesikeln. Ordinate: ATP-Spaltung in Prozenten der ungehemmten Fibrillenspaltung, d. h. der Fibrillenspaltung ohne anwesende Vesikel. Abszisse: Zeit in Minuten. $[Mg^{++}] = [Oxalat] = [ATP] = 5 \text{ mM}$. Über den Kurven: Konzentration der effektiven freien Kalziumionen in Anwesenheit des Oxalates. Kaninchen. (Nach Hasselbach und Makinose 1961)

freien Kalziumionen mit hoher Geschwindigkeit durch Speicherung in ihrem Inneren wieder entfernen. Hasselbach (1964 a) hat dann gezeigt, dass tatsächlich eine genügend konzentrierte Vesikelsuspension die Kalziumionenkonzentration der Lösung von 10^{-5} auf 10^{-9} M erniedrigt. D. h., die Vesikel sind in der Lage, die Konzentration der freien Kalziumionen von maximal aktivierenden Werten bis weit unter die Kontraktionsschwelle von 10^{-7} M zu erniedrigen. Diese Kalziumspeicherung findet nur statt, wenn physiologische Konzentrationen an ATP und Mg^{++} anwesend sind, weil es sich nicht um eine einfache Bindung des Kalziums an die Strukturelemente der Vesikel handelt, sondern um eine durch ATP-Spaltung angetriebene Kalziumpumpe (Hasselbach und Makinose 1961). Diese Kalziumpumpe pumpt die Kalziumionen in die Hohlräume der Vesikel, und die ATP-Spaltung ist dafür die Energiequelle.

Die Akkumulation der freien Kalziumionen «innen» lässt sich beweisen, wenn die Kalziumakkumulation aus Lösungen stattfindet, die zusätzlich $\sim 10^{-3}$ M Oxalat enthalten. Diese Oxalatkonzentration ist so niedrig, dass in der Lösung kein Kalziumoxalat ausfällt. Im Inneren der Vesikel aber entstehen Kalziumoxalat-Niederschläge, weil durch die Tätigkeit der Pumpe die Kalziumionenkonzentration «innen» ausserordentlich (auf das 3000fache der Aussenkonzentration) erhöht wird. Abb. 4 zeigt die elektronenmikroskopische Aufnahme einer Vesikelsuspension (a) vor und (b) nach der Kalziumspeicherung. In Abb. 4b finden sich neben den mit Kalziumoxalat gefüllten und daher schwarz

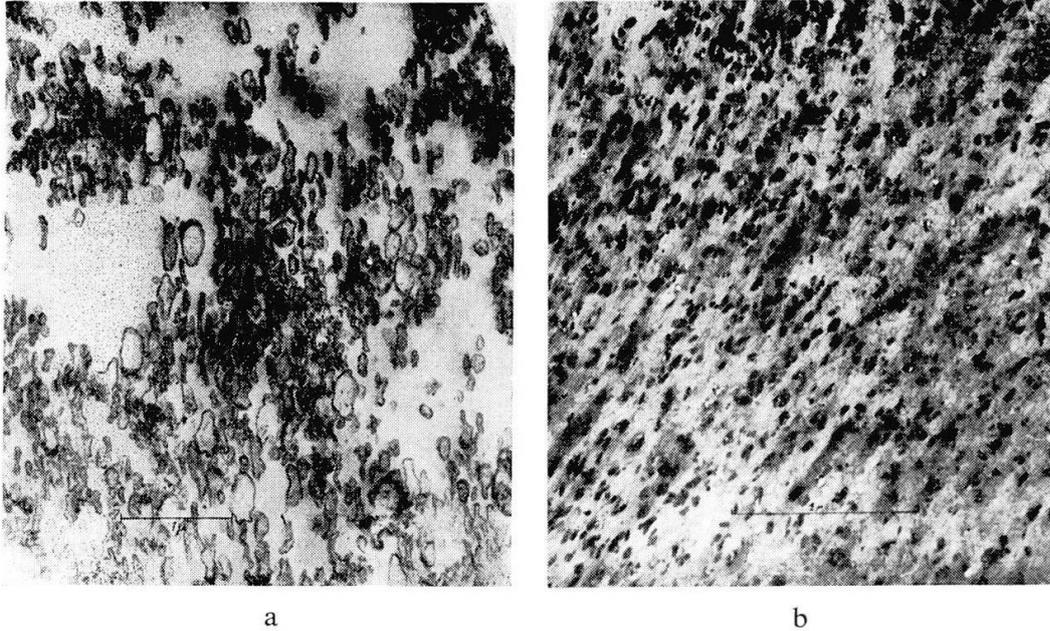


Abbildung 4

Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Vesikelsuspension (a) vor und (b) nach Kalziumspeicherung. Kalziumoxalat-Niederschläge = schwarze Flecken in 4b. Kaninchen, Messstrich = 1 μ (nach Nagai, Makinose und Hasselbach 1960 und Hasselbach 1962)

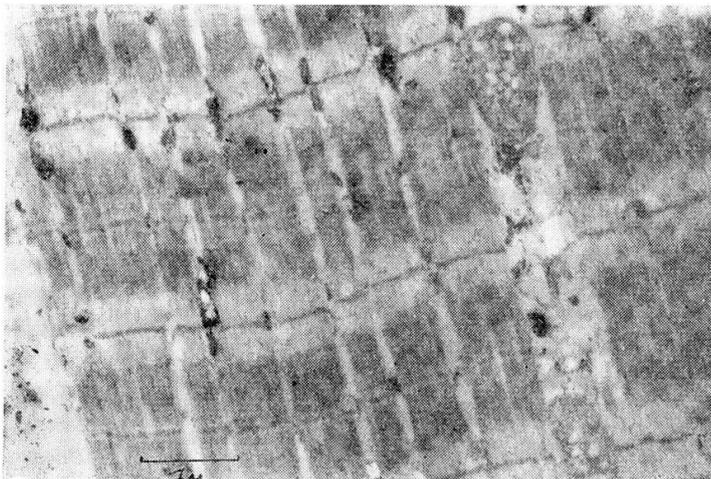


Abbildung 5

Kalziumoxalat-Niederschläge (schwarze Flecken) in der intakten Froschfaser (Sartorius). Fibrillen von oben nach unten verlaufend: breite dunklere Banden = A-Banden, helle Banden mit feiner, sehr dunkler Querlinie = I-Bande mit Z-Scheiben. Kalziumoxalat zwischen den Fibrillen vorwiegend in der Höhe der Z-Scheiben. Messstrich = 1 μ , Vergrößerung 20000fach (nach Hasselbach 1964b)

aussehenden Vesikeln auch noch leere Vesikel. Ausserhalb der Vesikel finden sich nirgends Kalziumoxalat-Niederschläge. Warum nur ein Teil der Vesikel mit Kalziumoxalat gefüllt ist, ergibt die Abb. 5. Hier ist genau der gleiche Versuch nicht mit isolierten Vesikeln gemacht worden, sondern mit Vesikeln, die an ihrem natürlichen Ort in der extrahierten Faser verblieben sind (Hasselbach 1964b). Auf dieser elektronenmikroskopischen Aufnahme finden sich die Kalziumoxalat-Niederschläge nicht überall zwischen den Muskelfibrillen, sondern nur in der Nähe der Z-Scheiben. Dagegen sind alle Vesikel, die zwischen den A-Banden liegen, frei von Kalziumoxalat. Diese Vesikel dürften die leeren Vesikel der Abb. 4b sein. In der Höhe der Z-Scheiben werden die longitudinal angeordneten Vesikel gekreuzt von transversallaufenden Tubuli (vgl. dazu die Abbildungen von Rouiller). Dort wo das Bild besonders klar ist, kann man erkennen, dass nur die beiden Vesikel Kalzium speichern, die gerade oberhalb und unterhalb dieser transversalen Tubuli liegen.

Die zuletzt vorgetragenen Versuche zeigen, dass dem Muskel in gewissen Vesikeln des longitudinalen Anteils des sarkoplasmatischen Retikulums ein System zur Verfügung steht, das den intrazellulären Spiegel der freien Kalziumionen auf Werte $\leq 10^{-7}$ M senken und halten kann und dadurch dafür sorgt, dass der lebende Muskel trotz der Anwesenheit von ATP und Mg^{++} nicht dauernd kontrahiert ist, sondern schnell erschlafft und sich meist im erschlafften Zustand befindet. Dass auch im lebenden Muskel eine Kontraktion nur auftritt, wenn die freie Kalziumionenkonzentration $\geq 10^{-7}$ M ist, konnte von Portzehl, Caldwell und Rüegg 1964 durch Versuche an der lebenden Muskelfaser gezeigt werden. Es wurden die Muskelfasern der Krabbe *Maia Squinado* verwendet, die bei einer Dicke von etwa 1 mm erlauben, mit einer sehr feinen Pipette ein etwa 1 cm langes Stück der Faser mit Kalziumpuffer zu infiltrieren. Dann zeigt sich, dass bei Infiltration von Puffern, die die Kalziumionenkonzentration auf Werte $\leq 10^{-7}$ M festlegen, nichts passiert. Dagegen treten bei Infiltration von Puffern mit freien Kalziumionenkonzentrationen zwischen 10^{-7} und 10^{-6} M Schwellenkontraktionen auf, während eine weitere Steigerung der freien Kalziumionenkonzentration die Kontraktion mehr und mehr anwachsen lässt – ähnlich wie das bei den isolierten Systemen der Fall ist (vgl. in Abb. 1 die Kurve mit den Symbolen ■-■). Die Kontraktion des lebenden Muskels scheint also vom Spiegel der freien Kalziumionen ebenso abzuhängen wie die Kontraktion der isolierten kontraktile Systeme. Das aber macht es sehr wahrscheinlich, dass auch im lebenden Muskel die unmittelbare Auslösung der Kontraktion durch den intrazellulären Spiegel der freien Kalziumionen erfolgt. Die Versuche zeigen weiter, dass auch in der lebenden Skelettmuskelfaser die Vesikel bei der Einstellung des Kalziumruhespiegels eine entscheidende Rolle spielen. Denn aus Abb. 6, die das Verhalten einer Krabbenfaser auf Infiltration einer freien Kalziumionenkonzentration von $\sim 10^{-6}$ M zeigt, ergibt sich, dass der Kontraktion sofort spontan eine Erschlaffung folgt – offenbar, weil die Vesikel mit ihrer Pumpe das injizierte Kalzium entfernen, indem sie es speichern (vgl. Portzehl et al. 1964).

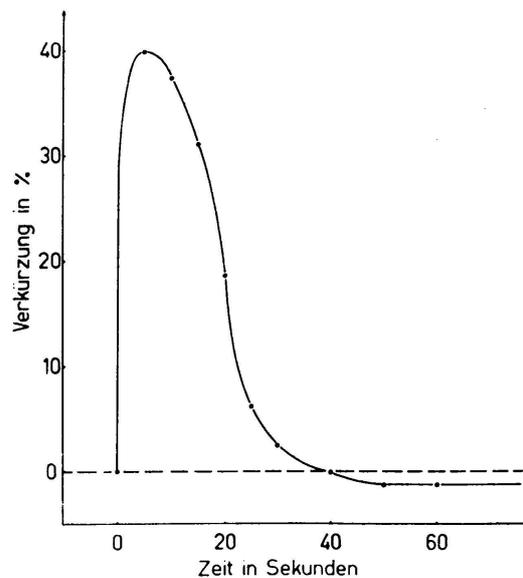


Abbildung 6)

Der zeitliche Verlauf einer isotonischen Kontraktion einer einzelnen Krabbenmuskelfaser auf Injektion von Kalzium-EGTA-Puffer. Ordinate: Verkürzung in Prozenten der Ruhelänge des injizierten Faserstückes. Abszisse: Zeit in Sekunden. Injektion des Kalzium-EGTA-Puffers bei 0 Sekunden. Freie Kalziumionenkonzentration = 10^{-6} M (nach Portzehl et al. 1964)

Zum Schluss bleibt noch die Frage zu beantworten, wie im Moment der Erregung der intrazelluläre Kalziumspiegel erhöht wird, so dass die kontraktile Elemente des Muskels ihre kontraktionsnotwendigen Kalziumionen erhalten. Für den Herzmuskel scheint es jetzt bewiesen zu sein (Reuter mündliche Mitteilung), dass die Kalziumionen im Moment der Erregung in genügender Menge aus dem Extrazellulärraum durch die Membran in den Intrazellulärraum wandern und dadurch die Kontraktion verursachen. Bei den viel dickeren Fasern des Skelettmuskels, bei denen ein Kalziumeinstrom aus dem Extrazellulärraum wegen der Länge des Diffusionsweges nicht in Frage kommt, müssen die Kalziumionen aus den Vesikeln stammen. Die Versuche von A. Huxley und Mitarbeitern (1955, 1958 a und 1958 b, siehe auch Diskussionsbemerkung von *Straub*) machen es sehr wahrscheinlich, dass die Erregung der äusseren Membran auch in die nach aussen offenen transversalen Tubuli weiterläuft bis zu den Kalziumionen speichernden Vesikeln der Triade und dort eine kurzdauernde Permeabilitätssteigerung der Vesikelmembran für Kalziumionen hervorruft. Infolgedessen wandern die gespeicherten Kalziumionen ihrem Konzentrationsgefälle entsprechend für einen Augenblick zu den kontraktilelementen. Nach Bruchteilen einer Sekunde werden sie dann durch die Kalziumpumpe der Vesikel wieder entfernt.

(Physiologisches Institut, Hallerianum, der Universität Bern.)

LITERATUR

- Cain D.F.* und *Davies R.E.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 8, 361 (1962).
Hasselbach W. und *Makinose M.*: *Biochem. Z.* 333, 518 (1961).
Hasselbach W.: *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)* 12, 877 (1962).
Hasselbach W.: *Proc. roy. Soc. B (London)* 160, 501 (1964a).
Hasselbach W.: *Fed. Proc.* 23, 909 (1964b).
Huxley A.F. und *Taylor R.E.*: *J. Physiol. (London)* 130, 49P (1955).
Huxley A.F. und *Straub R.W.*: *J. Physiol. (London)* 143, 40P (1958a).
Huxley A.F. und *Taylor R.E.*: *J. Physiol. (London)* 144, 426 (1958b).
Nagai T., *Makinose M.* und *Hasselbach W.*: *Biochim. biophys. Acta* 43, 223 (1960).
Portzehl H., *Caldwell P.C.* und *Rüegg J.C.*: *Biochim. biophys. Acta* 79, 581 (1964).
Portzehl H., *Zaoralek P.* und *Grieder A.*: *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 286, 44 (1965).
Weber A. und *Winicur S.*: *J. biol. Chem.* 236, 3198 (1961).
Weber A. und *Herz R.*: *J. biol. Chem.* 238, 599 (1963).
Weber A., *Herz R.* und *Reiss I.*: *Proc. roy. Soc. B (London)* 160, 489 (1964).
Weber H.H. und *Portzehl H.*: *Progress Biophys. biophys. Chem.* 4, 60 (1954).