

Diss. Nr. 5437

CREATINKINASE-ISOENZYME UND MYOFIBRILLEN-STRUKTUR

ABHANDLUNG

zur Erlangung

des Titels eines Doktors der Naturwissenschaften

der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN

HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von

THEO WALLIMANN

Dipl. Naturwissenschaftler ETHZ

geboren am 13. Oktober 1946

von Alpnach-Dorf (Kt. Obwalden)

angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. H. M. Eppenberger, Referent

Prof. Dr. H. Ursprung, Korreferent

1975

VORWORT

Diese Arbeit wurde im Herbst 1971 im Labor für Entwicklungsbiologie der ETHZ unter der Leitung von Prof. H. Ursprung und Prof. H. M. Eppenberger begonnen und Ende 1974 am Institut für Zellbiologie der ETHZ bei Prof. H. M. Eppenberger abgeschlossen. Ich möchte an dieser Stelle allen Angehörigen des Institutes, besonders Dr. Hans Eppenberger, Dr. David Turner und Dr. Herbert Lebherz für ihre ständige Hilfsbereitschaft danken.

Meiner Frau, meinen Freunden und Kollegen danke ich für die schönen Stunden während dieser Zeit.

Ganz spezieller Dank gehört Dr. David Turner und Hansjörg Kuhn für die gute Zusammenarbeit: Die Resultate des biochemischen Vergleichs von M-line-Protein mit MM-CPK kamen in Zusammenarbeit mit David Turner zustande, während die Immunferritin-Markierung gemeinsam mit Hansjörg Kuhn durchgeführt wurde.

Sehr dankbar bin ich den Herren Dr. Th. Bächli, Dr. H. Burckhardt, Dr. R. von Fellenberg, Dr. M. Höchli, Dr. F. Kopp, Dr. M. Schaub und Prof. Ruch für die grosszügige Hilfe und Dr. C. Heizmann für die anregenden Diskussionen.

Der Schweizerischen Kommission für Molekularbiologie (SKMB) möchte ich für das gewährte Stipendium danken.

Für die Aufarbeitung des Manuskripts danke ich Frl. Martha Locher, Frau Zahorka und meiner Frau Beatrice. Frau Räber sei gedankt für die zeichnerische Hilfe bei Fig. 28.

ABSTRACT

M-line protein, purified from chicken skeletal muscle according to MORIMOTO and HARRINGTON (1972), is shown to be identical to MM-CPK, the muscle form of creatine kinase. By means of the indirect immunofluorescence and immunoferritin techniques, MM-CPK can be localized within the M-line, a specific region of the myofibrillar contractile apparatus. The MM-CPK tightly and specific bound to the M-line is a small but significant fraction (ca. 7%) of total cellular CPK. Preincubation with anti-MM-CPK antiserum prevents extraction of MM-CPK with concomitant disappearance of a visible M-line at low ionic strength. It is proposed that MM-CPK is an integral part of the myofibrillar structure, based on the known dimensions and properties of MM-CPK and the stoichiometry of its binding to myofibrils, it is further proposed that the transverse m-bridges seen in electron-microscopic sections through the M-line are CPK molecules. The function of CPK at different subcellular locations is discussed; the available evidence suggests that the MM-CPK bound at the M-line is sufficient to regenerate all the ATP hydrolysed during a muscle contraction.

In the chicken M-line bound MM-CPK is found in both twitch and tonic skeletal muscles. Chicken heart contains almost exclusively the BB-CPK isoenzyme. About 3% of the BB-CPK in chicken heart cells is tightly bound to the Z-lines of the myofibrils.

The isoenzyme-specific localisation of CPK to different regions of the myofibril in different tissues is also observed, although with lesser degree of specificity, in in vitro experiments in which washed or extracted myofibrils are incubated with exogenous MM- and BB-CPK.

ZUSAMMENFASSUNG

Das von MORIMOTO and HARRINGTON '72 charakterisierte M-line-Protein, isoliert aus der M-Linie von adulten Hühner-Brustmuskelfibrillen, wurde mit biochemischen und immunologischen Methoden als Muskelform der Creatinkinase (MM-CPK) identifiziert. Beide Proteine können mit Puffer von niedriger Ionenstärke aus Hühner-Skelettmuskelfibrillen extrahiert werden und weisen im Bereich der Streuung der Methoden vergleichbare Molekulargewichte, vergleichbare Aminosäuren-Zusammensetzung und eine vergleichbare spezifische CPK-Aktivität auf. Sie bestehen aus zwei identischen Untereinheiten (Dimeren) und zeigen eine identische elektrophoretische Mobilität in Zellulose-polyacetat-, Polyacrylamid- und SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese-Systemen. Das elektrophoretische Muster der Peptidfragmente nach Bromcyan-Spaltung beider Proteine ist ebenfalls identisch. Die immunologische Identität der beiden Proteine konnte durch OUCHTER-LONY-Doppelimmundiffusions-Teste gezeigt werden. M-line-Protein und MM-CPK weisen dieselbe myofibrilläre Lokalisation auf. Durch indirekte Immunfluoreszenz- und Immunferritin-Technik konnte MM-CPK in der H-Region resp. in der M-Linie von Hühner-Skelettmuskelfibrillen von "fast-twitch"-, "slow-twitch"- und "slow-tonic"-Muskeln des adulten Huhnes lokalisiert werden. Nach mehrmaligem Waschen von Myofibrillen mit Puffer von relativ hoher, physiologischen Bedingungen entsprechender Ionenstärke, blieb mindestens 7% der gesamten CPK-Aktivität eines Hühner-Skelettmuskelgewebes spezifisch in der M-Linie gebunden. Die Spezifität der Bindung wurde durch Anwendung von physiologischen Salzlösungen und Puffern, die Substrate und Kofaktoren der CPK-Reaktion enthielten, geprüft. Die myofibrillär gebundene CPK konnte durch relativ kurze Behandlung der Myofibrillen mit Puffer von niedriger Ionenstärke quantitativ extrahiert werden, wobei gleichzeitig die elektronendichte M-Linien-Struktur verschwand. Durch vorhergehende Inkubation der Myofibrillen mit Anti-MM-CPK-Serum wurde diese Extraktion verhindert, und gleichzeitig blieb die M-Linien-Struktur der Myofibrillen erhalten. Exogen zugegebene MM-CPK konnte wieder zurück an M-Linien-extrahierte Myofibrillen binden.

Die Befunde über das biochemische Verhalten der M-Linien-Proteine und ihrer Lokalisation in der M-Linie können in das von KNAPPEIS and CARLSEN '68 auf Grund von elektronenmikroskopischen Ultrastrukturanalysen vorgeschlagene M-Linien-Modell integriert werden. Auf Grund dieses Modells wird in der vorliegenden Arbeit die Identität von MM-CPK mit den m-Brücken vorgeschlagen, da MM-CPK die für die m-Brücken geforderten Kriterien sowohl in qualitativer als auch in quantitativer Hinsicht erfüllt. Das experimentell gefundene molare Verhältnis von MM-CPK zu Myosin und die molekularen Dimensionen von MM-CPK resp. M-line-Protein stimmen gut mit den Werten für die m-Brücken im M-Linien-Modell überein.

Anhand eines Funktionsmodells eines integrierten CPK-Systems (sarkoplasmatische, mitochondriale und myofibrilläre CPK) wird gezeigt, dass die M-Linien-gebundene MM-CPK (d. s. mindestens 7 % der gesamten CPK-Aktivität) auf Grund des molaren Verhältnisses zu Myosin in den Myofibrillen und der im Vergleich zur Myosin-ATPase-Reaktion ca. 20 - 40 mal schnelleren Umsatzgeschwindigkeit (V_{max}) der MM-CPK-Reaktion durchaus in der Lage wäre, das, während einer Kontraktion durch die Myosin-ATPase hydrolisierte ATP, im myofibrillären Raum direkt zu regenerieren.

Es wird gezeigt, dass MM-CPK als integraler Bestandteil der M-Linien-Struktur von Hühner-Skelettmuskelfibrillen betrachtet werden muss.

Die Funktion der M-Linie resp. der M-Linien-gebundenen CPK sowie der Zusammenhang von M-Linie, Muskeltyp und MM-CPK werden eingehend diskutiert.

In Hühner-Herzmuskelgewebe findet sich ausser einer relativ kleinen Menge von MB-CPK fast ausschliesslich das BB-CPK-Isoenzym und im Gegensatz zu Skelettmyofibrillen in den Herzmyofibrillen weder eine M-Linien-Struktur noch in der M-Linien-Region gebundene MM-CPK. Dagegen waren aber mindestens 3 % der gesamten aktiven CPK-Moleküle des Herzmuskelgewebes spezifisch in der Z-Region von adulten Hühner-Herzmuskelfibrillen gebunden. Die Lokalisation der CPK-Isoenzyme in nativen, adulten Herz- und Skelettmyofibrillen des Huhnes ist "in vivo" insofern spezifisch, als dass MM-CPK in der M-Linie der Skelettmyofibrillen und BB-CPK in der Z-Linien-Region der Herzmyofibrillen gefunden wird.

Die CPK-Isoenzyme wurden auch während der Ontogenese in Myofibrillen von Hühner-Skelettmuskel lokalisiert. Dabei besteht offenbar "in vivo" insofern eine absolute Isoenzympezifität der CPK als in der M-Linie von Skelettmyofibrillen verschiedener Embryonalstadien des Huhnes ausschliesslich MM-CPK, nie aber MB- oder BB-CPK gefunden werden konnte. Letztere konnte in der I-Region resp. Z-Linien-Region lokalisiert werden. Der adaptive Wert der verschiedenen CPK-Isoenzymformen könnte somit neben den katalytischen Unterschieden offenbar darin bestehen, dass die verschiedenen CPK-Isoenzyme mit unterschiedlichen Komponenten des kontraktilen Apparates und damit mit unterschiedlichen Regionen innerhalb der Myofibrillen interagieren können.

Unter bestimmten experimentellen "in vitro"-Bedingungen war die Spezifität der homodimeren CPK-Isoenzyme, ausschliesslich an die M-Linie (MM-CPK) oder ausschliesslich an die Z-Linie (BB-CPK) zu binden, nicht absolut, d. h. auch BB-CPK konnte, wenn auch in vermindertem Ausmass, an die M-Linien-Region von extrahierten Skelettmuskelfibrillen binden. Die Spezifität der Bindung der CPK-Isoenzyme an verschiedene Sarkomer-Regionen konnte aber durch Kurzzeit-Kompetitions-Reinkubationsexperimente gezeigt werden.

1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL	8
2.1 Abkürzungen	8
2.2 Puffer	8
3. METHODEN	9
3.1 Methoden der CPK - Bestimmung	9
3.2 Proteinbestimmung	10
3.3 Polyacrylamid-Disk-Gel-Elektrophorese	10
3.4 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese in SDS (sodium-dodecyl-sulfat)	10
3.5 Bromcyan-Fragmentierung von MM-CPK und M-line-Protein	11
3.6 Reinigung von M-line-Protein	12
3.7 Reinigung von MM-CPK aus Hühner-Brustmuskel	13
3.8 Reinigung von BB-CPK aus Hühner-Brustmuskel	13
3.9 Herstellung von Kaninchen-Anti-Hühner-CPK-Antiseren	14
3.10 Doppel-Immundiffusions-Tests	14
3.11 Immunelektrophorese	15
3.12 Immunotitration bei variabler Antigenkonzentration	15
3.13 Immunotitration bei variabler Antiserumkonzentration	16
3.14 Fluoreszein-iso-thio-cyanat-(FITC)-Konjugat	17
3.15 Ferritin-Konjugat	17
3.16 Herstellung von Myofibrillen aus Hühner-Skelett- und Herzmuskelgewebe	18
3.17 Wasch- und Extraktionsversuche mit Skelett- und Herzmuskel-Myofibrillen	19
3.18 Extraktion der myofibrillären CPK	20
3.19 Inkubationsexperimente	21
3.20 Reinkubationsexperimente	22
3.21 Histochemische Lokalisation von CPK in Gefrier- schnitten von Hühner-Brustmuskelgewebe	23
3.22 Indirekte Immunfluoreszenz-Technik (Nachweis von M- und B-CPK)	24
3.23 Indirekte Immunnferritin-Technik (Nachweis von M- und B-CPK)	25

	SEITE
4. RESULTATE	27
4.1 Reinigung von Hühner-MM-CPK und Spezifität des Kaninchen-Anti-Hühner-MM-CPK-Serums	27
4.2 Reinigung von Hühner-BB-CPK und Spezifität des Kaninchen-Anti-Hühner-BB-CPK-Serums	32
4.3 Reinigung von M-line-Protein und Vergleich von M-line-Protein mit MM-CPK, der Muskelform der CPK	35
4.4 Elektrophoretische Evidenz für die Identität von M-line-Protein und MM-CPK. Weitere elektrophoretische Kriterien für die Homogenität der beiden Proteine	39
4.5 Immunologische Evidenz für die Identität von M-line-Protein und MM-CPK sowie für die Reinheit der beiden Proteine	42
4.6 Waschversuche mit Hühner-Brustmuskelfibrillen	44
4.7 Waschversuche mit Hühner-Herzmuskelfibrillen	48
4.8 Histochemische Lokalisation von CPK	50
4.9 Lokalisation von CPK-Isoenzymen in isolierten Myofibrillen mit der indirekten Immunfluoreszenz- resp. Immunferritin-Technik	52
4.9.1 Lokalisation von CPK-Isoenzymen in Hühner-Skelettmuskelfibrillen	54
4.9.2 Lokalisation von CPK-Isoenzymen in Hühner-Herzmuskelfibrillen	59
4.10 Inkubationsexperimente mit nativen, adulten Myofibrillen und CPK-Isoenzymen	73
4.11 Reinkubationsexperimente mit M-Linien-extrahierten, adulten Skelettmuskelfibrillen und CPK-Isoenzymen	76
4.12 Reinkubationsexperimente mit extrahierten, adulten Herzmuskelfibrillen und CPK-Isoenzymen	79
4.13 Lokalisation von CPK-Isoenzymen in Hühner-Skelettmuskelfibrillen während der Skelettmuskelentwicklung	81
5. DISKUSSION	85
5.1 Diskussion eines M-Linien-Modells	85
5.2 M-Linie, Muskelfasertyp und CPK-Isoenzyme	97
5.3 Physiologische Bedeutung des CPK-Systems unter besonderer Berücksichtigung der myofibrillären CPK	106
5.3.1 Aktin-gebundenes ADP und ATP-Regeneration	107
5.3.2 Regeneration von ATP im myofibrillären Raum, unabhängig von Aktin-gebundenem ADP. Ein Funktionsmodell des CPK-Systems	110
5.3.3 CPK und die Energetik der strukturellen Veränderungen der M-Linie während eines Kontraktionszyklus	122

	SEITE
6. LITERATURVERZEICHNIS	124
7. CURRICULUM VITAE	142
8. PUBLIKATIONEN	143

Fig. 1	Reinheitskriterien von MM-CPK und Spezifität des Anti-MM-CPK-Serums	29
Fig. 2	Immunotitration bei variabler Antigenkonzentration	30
Fig. 3	Immunotitration bei variabler Antiserumkonzentration	31
Fig. 4	Reinheitskriterien von BB-CPK und Spezifität des Anti-BB-CPK-Serums	34
Fig. 5	Vergleich der elektrophoretischen Mobilität von MM-CPK und M-line-Protein in verschiedenen Elektrophorese-Systemen	40
Fig. 6	Vergleich der elektrophoretischen Mobilität von BB-CPK, MM-CPK und M-line-Protein in verschiedenen Elektrophorese-Systemen	41
Fig. 7	Doppel-Immundiffusionstest als Kriterium für die immunologische Identität von M-line-Protein und MM-CPK	43
Fig. 8	Myofibrilläre CPK in Hühner-Brustmuskelfibrillen	46
Fig. 9	Myofibrilläre CPK in Hühner-Herzmuskelfibrillen	49
Fig. 10	Histochemische Lokalisation von CPK in Gefrierdünnschnitten von adultem Hühner-Brustmuskel	51
Fig. 11	Schematische Darstellung der indirekten Immunfluoreszenz- resp. Immunferritin-Technik	53
Fig. 12	Lokalisation von MM-CPK in der H-Region von Hühner-Skelettmuskelfibrillen	62
Fig. 13	Lokalisation von BB-CPK in der I-Region von Hühner-Herzmuskelfibrillen	63
Fig. 14	Native, gewaschene Hühner-Skelettmuskelfibrille	64
Fig. 15	Hühner-Skelettmuskelfibrillen mit extrahierten M-Linien	65

Fig. 16	Nachweis von M-CPK in Hühner-Brustmuskelfibrillen mit der indirekten Immunferritin-Technik	66
Fig. 17	Nachweis von M-CPK in Hühner-Brustmuskelfibrillen mit indirekter Immunferritin-Technik	67
Fig. 18	Nachweis von MM-CPK in der M-Linie von Hühner-Brustmuskelfibrillen mit der indirekten Immunferritin-Technik	68
Fig. 19	Kontrollversuch der indirekten Immunferritin-Markierung von M-CPK in Hühner-Brustmuskelfibrillen	69
Fig. 20	Lokalisierung von M-CPK im T-System von Hühner-Brustmuskelzellen mit der indirekten Immunferritin-Technik	70
Fig. 21	Lokalisation von BB-CPK in Hühner-Herzmuskelfibrillen mit der indirekten Immunferritin-Technik	71
Fig. 22	Lokalisation von BB-CPK in Hühner-Herzmuskelfibrillen mit der indirekten Immunferritin-Technik	72
Fig. 23	Reinkubation von M-Linien-extrahierten Hühner-Skelettmuskelfibrillen mit CPK-Isoenzymen	78
Fig. 24	Reinkubation von extrahierten Hühner-Herzmuskelfibrillen mit CPK-Isoenzymen	80
Fig. 25	Lokalisation von M-CPK in Hühner-Skelettmuskelfibrillen während der Entwicklung des Skelettmuskels	83
Fig. 26	Lokalisation von B-CPK in Hühner-Skelettmuskelfibrillen während der Entwicklung des Skelettmuskels	84
Fig. 27	Modell der M-Linien-Struktur für Myofibrillen im relaxierten Zustand	90
Fig. 28	Schematische Darstellung des Transportes von "energiereichem Phosphat" im Muskel, unter besonderer Berücksichtigung der mitochondrialen, sarkoplasmatisch-"löslichen" und myofibrillären CPK	120

Tabelle I	Vergleich von publizierten Daten über die Eigenschaften von MM-CPK und M-line-Protein aus Hühner-Brustmuskel	37
Tabelle II	Verlauf der CPK-Aktivität während der Reinigung von M-line-Protein nach MORIMOTO and HARRINGTON '72	38
Tabelle III	Extrahierbarkeit von myofibrillärer CPK aus Hühner-Skelettmuskelfibrillen durch verschiedene "Wasch- resp. Extraktionslösungen"	47
Tabelle IV	Lokalisation der CPK-Isoenzyme in isolierten, gewaschenen Myofibrillen eines adulten Huhnes vor und nach zusätzlicher Inkubation mit reiner MM- oder BB-CPK, durch indirekte Immunfluoreszenz-Technik	75
Tabelle V	Zusammenfassung der Evidenz für die Identität von M-line-Protein und MM-CPK	88
Tabelle VI	Vergleich der maximalen Geschwindigkeiten ($V_{\max.}$) der CPK-Reaktion und der Myosin-ATPase-Reaktion	121

1. EINLEITUNG

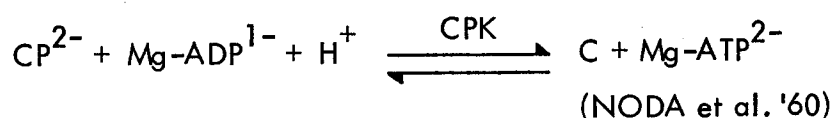
Erreicht ein Nervenimpuls die motorische Endplatte einer Muskelzelle, wird das Aktionspotential über eine Transmittersubstanz (Acetylcholin) durch das invaginierte Sarkolemma, das Transversal-Tubuli-System, ins Zellinnere zu den Myofibrillen geleitet. Dadurch werden die Terminal-Zysternen des sarkoplasmatischen Retikulums depolarisiert, was ein Einströmen von Calcium Ionen in den myofibrillären Raum zur Folge hat. Die Myosin-ATPase der Muskelfibrillen wird bereits bei einer Calciumkonzentration von ca. $5 \cdot 10^{-5}$ M aktiviert. ATP wird hydrolysiert und die Muskelzelle kontrahiert unter Leistung mechanischer Arbeit und der Abgabe von Wärme.

Die kontraktile Einheit des Muskels besteht aus Myosin, Aktin und den mit Aktin assoziierten Regulatorproteinen, Troponinkomplex (TNC, TNT, TNI) und Tropomyosin, sowie einer Anzahl weiterer, mengenmässig nicht ins Gewicht fallender Proteine (alpha-Actinin, C-Protein usw.) mit zum Teil unbekannter Funktion. Die Myosinköpfchen, die aus den "dicken Filamenten" (Myosin) herausragen, können durch Brückenbildung ("cross-bridges") mit den "dünnen Filamenten" (Aktin) interagieren. Durch eine Art zyklischer Ruderbewegung der Myosinköpfchen können die dünnen Filamente relativ zu den dicken Filamenten bewegt werden, was eine Kontraktion resp. Relaxation bewirkt.

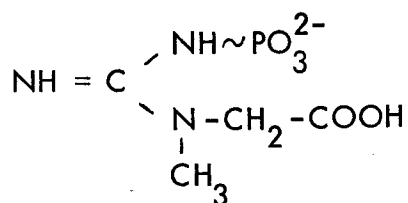
Während einer Muskelkontraktion wird ATP durch die aktinaktivierte Myosin-ATPase gespalten und sofort wieder von Phospho-Creatin (CP) durch eine Trans-

phosphorylierungs-Reaktion unter Freisetzung von Creatin (C) neu phosphoryliert, so dass während einer Muskelkontraktion praktisch keine Abnahme der ATP-Konzentration festgestellt werden kann, es sei denn, man blockiere die Transphosphorylierungs-Reaktion vollständig (WOLEDGE '71). Die energieliefernde Netto-Reaktion ist also eine CP-Spaltung, die aus der Transphosphorylierung der Phosphoryl-Gruppe von CP auf ADP und der anschliessenden Hydrolyse des gebildeten ATP unter Freisetzung von P_i besteht.

In Vertebraten wird die Transphosphorylierungs-Reaktion durch das Enzym CREATINKINASE (CPK; EC 2.7.3.2) katalysiert:



Das von EGGLETON and EGGLETON '28 entdeckte Phosphagen, N-phosphoryl-Creatin oder Phospho-Creatin (CP), ist ein N-phosphoryliertes Guanidin folgender Strukturformel:



Zusätzlich zum Creatinkinase-System wird schon während kurzen Kontraktionen das Enzym, Adenylatkinase (Myokinase; EC 2.7.4.3), als ATP-regenerierendes System aktiviert, wobei zwei Adenosin-di-phosphat Moleküle in je ein Molekül Adenosin-tri-phosphat (ATP) und Adenosin-mono-phosphat (AMP) übergeführt werden. Glycolyse und oxidative Phosphorylierung als ATP-regenerierende Systeme treten, ausser bei sehr lang andauernden Kontraktionen, erst nach einem Kontraktionsereignis in Aktion.

Während den ersten Sekunden einer tetanischen Muskelkontraktion ist die Wärme-
produktion grösser als die durch ATP- und CP-Spaltung freiwerdende chemische
Energie. Da das Auftreten dieser "Kontraktionswärme" bei verschiedenen Kontrak-
tionstypen in ihrem zeitlichen Verlauf gleich ist und auch in ihrem Betrag unab-
hängig von der geleisteten Arbeit ist, wird angenommen, dass sie nicht durch Myosin-
Aktin-Interaktionen erzeugt wird. Unter diesen Umständen muss eine exergonische
Anfangsreaktion, die während den ersten Sekunden eines Tetanus auftritt und erst
einige Zeit nach der Kontraktion (1 - 3 min) durch entsprechende CP-Spaltung
vollständig rückgängig gemacht wird, vorgeschlagen werden (WOLEDGE '71;
CURTIN et al. '73; PAUL and KUSHMERICK '74). Die Energie der CP-Spaltung
reicht aus, um die vom Muskel geleistete Arbeit zu erklären. Sie ist direkt propor-
tional zu dieser Muskelarbeit. Durch Messen der CP-Spaltung nach einer Kontrak-
tion kann der Gesamtenergieverbrauch (Arbeit plus Wärme) eines Kontraktionser-
eignisses bestimmt werden (PAUL and KUSHMERICK '74).

Da im Muskelgewebe im Ruhezustand ein CP-Pool von ca. $22.5 \mu\text{Mol CP/g}$ als
sofort verfügbare, auf ADP ($1.03 \mu\text{Mol ADP/g}$) "transphosphorylierbare Energie"
vorhanden ist, kann durch die CPK-Reaktion die ATP-Konzentration im Muskel-
gewebe ($6.77 \mu\text{Mol ATP/g}$) auch während einer Kontraktion aufrechterhalten wer-
den. (Die angegebenen Konzentrationen wurden durch FITCH et al. '74 in ruhenden
Gastrocnemius-Muskeln von Ratten bestimmt und beziehen sich auf das Muskel-
nassgewicht). Die Glycolyse und die oxidative Phosphorylierung beginnen an-
schliessend ATP zu bilden, welches wiederum dazu dienen kann, das im Creatin-
Pool ($16.2 \mu\text{Mol/g}$) vorliegende Creatin zu phosphorylieren. Die CPK katalysiert
auch diese Reaktion. CP spielt eine bedeutende regulatorische Rolle im Muskelme-
tabolismus. Einerseits werden die glycolytischen Enzyme, Phospho-Fructokinase,

Pyruvatkinase und Glycerin-aldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, durch CP gehemmt (UYEDA and RACKER '65; KEMP '73; OGUCHI et al. '73), andererseits wird die Fructose-1.6-diphosphatase aktiviert (FU and KEMP '73).

CPK ist ein Dimer mit einem Molekulargewicht von ca. 84'000 Daltons. Sie kommt in drei isoenzymatischen Grundformen vor: BB-, BM- und MM-CPK (EPPENBERGER et al. '63; '64; '67; '70; DAWSON et al. '65; ROY et al. '70). Die unterschiedliche Aminosäuren-Zusammensetzung und das Fehlen einer immunologischen Kreuzreaktion von B- und M-CPK lassen den Schluss zu, dass diese von zwei verschiedenen Genen kodiert werden. BB-CPK ("brain type CPK") kommt im Hirn und oft auch im Herzmuskel von Vertebraten vor (BURGER et al. '64; EPPENBERGER et al. '70). BB-CPK wird aber auch in Organen mit glatter Muskulatur wie z.B. Magen, Darm, Harnblase und Niere (DAWSON et al. '68; FITZSIMMONS '71) sowie in Blutplättchen (MELTZER and GUSCHWAN '72) und in Fibroblasten-Zellkulturen (TURNER et al. '74) gefunden. MB-CPK kommt z.T. in "roten" Skelettmuskeln und vor allem im Herz vor, während man MM-CPK ("muscle type CPK") in allen Skelettmuskeltypen und auch in Herzmuskeln von Säugetieren findet (BURGER et al. '64; ROSALKI '65). Im adulten Hühnerskelettmuskel findet man praktisch nur MM-CPK, im adulten Herzmuskel des Huhnes jedoch fast ausschliesslich BB-CPK (DAWSON et al. '65; EPPENBERGER et al. '67; EPPENBERGER et al. '70). Während der Skelettmuskelentwicklung des Huhnes findet eine Isoenzymtransition von der embryonalen Form, BB-CPK, über das Hybridmolekül, BM-CPK, zur adulten Form, MM-CPK, statt (EPPENBERGER et al. '63, '64, '70). Im Laufe der Herzmuskelentwicklung des Huhnes bleibt jedoch BB-CPK ohne Transition bis in das Adultstadium bestehen

(DAWSON et al. '65; EPPENBERGER et al. '67). Geringe Mengen MB-CPK wurden in adultem Hühner-Herzmuskelgewebe gefunden (EPPENBERGER '68; EPPENBERGER et al. '70).

An Gefrierschnitten von Muskelgewebe konnten SHERWIN et al. '69 mit Hilfe der direkten Immunfluoreszenz-Technik zeigen, dass die CPK in grossen Mengen im intermyofibrillären Raum vorkommt. KHAN et al. '70, '71 bestätigen diesen Befund durch histochemische Untersuchungen an Gefrierschnitten mit der "overlay-gel-Methode". Zellfraktionierungsversuche durch differentielle Zentrifugation zeigten ebenfalls, dass der grösste Teil der CPK des Muskelgewebes als "lösliches" Protein im Sarkoplasma (Cytosol) vorliegt (KLEINE '65; OTTAWAY '67). Nur kleinere Anteile des Enzyms wurden in Mitochondrien- und Mikrosomenfraktionen von Herz- und Skelettmuskeln gefunden (JAKOBS et al. '64; FARRELL et al. '72; SCHOLTE '73a, '73b; SCHOLTE et al. '73; JACOBUS and LEHNINGER '73; LAPIN et al. '74) oder im sarkoplasmatischen Retikulum von Herz- und Skelettmuskeln (BASKIN and DEAMER '69) lokalisiert. Die mitochondriale CPK scheint ein weiteres Isoenzym zu sein, das wahrscheinlich auf der nach aussen gerichteten Seite der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist (JACOBUS and LEHNINGER '73).

Obwohl CPK generell als lösliches Enzym betrachtet wurde, haben einige Beobachtungen der letzten Jahre zur Annahme geführt, dass mindestens ein Teil der CPK im Skelett- und Herzmuskel an die Elemente des kontraktiven Apparates gebunden sein könnte. Es wurde behauptet, dass CPK die Myosin-ATPase-Reaktion hemme (YAGI and MASE '62; BOTTS and STONE '68) und mit Myosin

eine Bindung eingehen könne (SZORENYI and DEGTAR '48; YAGI and MASE '62). Hingegen konnte keine Bindung von CPK an Aktin festgestellt werden (ARNOLD and PETTE '70). OTTAWAY '67 konnte aus isolierten, gut gewaschenen Herzmyofibrillen mit Puffer von niedriger Ionenstärke CPK extrahieren.

Die Annahme, dass zwischen dem ATP-hydrolysierenden System und dem ATP-regenerierenden System eine enge strukturelle Beziehung bestehen könnte, veranlasste uns zu genaueren Lokalisationsstudien von CPK. Um Aufschluss sowohl über die intrazelluläre Verteilung der verschiedenen CPK-Isoenzyme in Herz- und Skelettmuskeln des Huhnes zu bekommen als auch darüber, ob eine strukturelle Beziehung der CPK zum kontraktilen Apparat bestehe, wurden spezifische Antikörper gegen B- und M-CPK hergestellt. Mit Hilfe dieser Antikörper konnten die indirekte Immunfluoreszenz- und die indirekte Immunferritin-Technik direkt auf isolierte Myofibrillen von Herz- und Skelettmuskeln angewandt werden.

Die Hauptproteinkomponenten der quergestreiften Muskelfibrillen, Myosin, Aktin, Troponin-komplex und Tropomyosin, sind schon eingehend studiert worden. Die Kenntnis ihrer Interaktionen bilden die Grundlage für das Verständnis des Kontraktionsvorganges in der Muskelzelle. In verschiedenen Laboratorien wurden in jüngster Zeit einige weitere myofibrilläre Proteine von unbekannter Funktion aus Skelettmuskeln isoliert. MORIMOTO and HARRINGTON publizierten 1972 neue Daten über die Reinigung und Charakterisierung eines dimeren Proteins (M-line-Protein) mit einem Molekulargewicht von ca. 88'000 Daltons, welches sie durch Extraktion bei niedriger Ionenstärke aus der M-Linie von Hühner-Brustmuskele-fibrillen isoliert hatten. Beim Vergleich dieser Daten mit den Charakteristika

der MM-CPK aus Hühnerbrustmuskulatur fiel eine grosse Aehnlichkeit der beiden Proteine auf (Tabelle I). In der Folge wurde das M-line-Protein nach der Methode von MORIMOTO and HARRINGTON '72 gereinigt und mit MM-CPK verglichen, welche durch ein völlig verschiedenes Verfahren gereinigt worden war (EPPENBERGER et al. '67).

2. MATERIAL

Bruteier wurden von Geflügel Wolff, 8604 Volketswil, und adulte Hühner von der Hallauer Zuchtfarm, 8215 Hallau, bezogen. Alle Chemikalien waren von "Analyse"-Reinheitsgrad. Hilfsenzyme und Kofaktoren für die Creatinkinase-Reaktion wurden von Boehringer und Sigma bezogen.

2.1 Abkürzungen

ADP	Adenosin-di-phosphat
AMP	Adenosin-mono-phosphat
ATP	Adenosin-tri-phosphat
BME	Beta-mercapto-äthanol
BSA	Rinderserum-albumin
C	Creatin
CP	Phospho-Creatin
CPK	Creatin-phospho-kinase, Creatinkinase*)
DTT	Dithiothreitol (CLEALAND'S REAGENT)
EBT	EDTA-Borsäure-Tris-Puffersystem
EDTA	Aethylendiamin-tetraessigsäure
EGTA	Aethylenglycol-bis-(2-aminoäthyl)-tetraessigsäure
EU	Internationale Enzymeinheiten
FITC	Fluoreszein-iso-thio-cyanat
TCA	Trichlor-essigsäure
TEMED	NNNN-tetramethyl-äthylen-diamin
TRAP	Tri-äthanolamin-hydrochlorid-Puffer
TRIS	Tris-hydroxy-methyl-amino-äthan

*)Creatin, geschrieben mit C, setzt sich auch im deutschen Sprachgebrauch durch (W. F. GANONG '72).

2.2 Puffer

PBS	Phosphat-buffered-saline (0.85 g Na_2HPO_4 , 0.54 g KH_2PO_4 , 8.5 g NaCl ad 1 Liter, pH 7.0)
MOR.1	Waschpuffer von rel. hoher "physiologischer" Ionenstärke (0.1 M KCl, 1 mM DTT, 20 mM Kalium-phosphat-Puffer, pH 7.0)
SOL.A	Waschpuffer von rel. hoher "physiologischer" Ionenstärke (0.1 M KCl, 1 mM DTT, 1 mM EGTA, 5 mM EDTA-Puffer, pH 7.0)
MOR.2	Extraktionspuffer von niedriger Ionenstärke (1 mM DTT, 5 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7.7)

Der pH-Wert der verschiedenen Puffer wurde bei 4 Grad C eingestellt.

3. METHODEN

3.1 Methoden der CPK-Bestimmung

a) CP/ADP-Nachweis-System

Die CPK-Aktivität wurde spektrophotometrisch nach der Methode von EPPENBERGER et al. '67 gemessen. Um die Linearität des gekoppelten CPK-Nachweis-Systems zu garantieren, wurde die Enzymkonzentration durch Verdünnen der Proben unter 0.005 Enzym-Einheiten/1 ml Küvette gehalten ($\Delta OD_{340 \text{ nm}}/\text{min, ml}$, bei 25° C , kleiner als 0.031). Die Menge Enzym, welche die Bildung von $1 \mu\text{M}$ ATP pro Minute bei 25° C katalysierte, wurde als 1 Enzym-Einheit (EU) CPK-Aktivität definiert.

b) C/ATP-Nachweis-System

Die CPK-Aktivität wurde auch nach einer modifizierten Methode von BLETHEN and KAPLAN '67 gemessen. Die Endkonzentration der Reaktionslösung war: Glycin/NaOH 0.1 N, pH 8.6; Mg-Acetat 5 mM, KCl 50 mM, ATP 2.5 mM, Phospho-enol-pyruvat 0.75 mM, NADH 0.45 mM, Lactat-dehydrogenase 9 EU/ml, Pyruvatkinase 4 EU/ml, Creatin 15 mM. Die Enzymkonzentration wurde unter 0.1 EU/1 ml Küvette gehalten ($\Delta OD_{340 \text{ nm}}/\text{min, ml}$, bei 25° C , kleiner als 0.6). Die Menge Enzym, welche die Transphosphorylierung von $1 \mu\text{M}$ ATP pro Minute bei 25° C katalysierte, wurde als 1 EU CPK-Aktivität definiert.

3.2 Proteinbestimmung

Protein wurde entweder nach der Absorptionsmethode (260/280 nm) von LAYNE '57 oder nach der kolorimetrischen Methode von LOWRY et al. '51 bestimmt.

3.3 Polyacrylamid-Disk-Gel-Elektrophorese

Analytische Disk-Gele wurden nach der Methode von DAVIS '64 mit 7.5 % Acrylamid in 0.37 M Tris/Glycin-Puffer, pH 9.5 hergestellt. Die Elektrophorese wurde bei 1-3 mA/7.5 cm und 4° C durchgeführt. Proben von 0.01-0.15 mg Protein wurden in 6 % Saccharose-Puffer und je 1 µMol Natrium-thio-glycolat aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Gele während 1 h mit 1 % Amidoschwarz in 7 % Essigsäure gefärbt und in einer Entfärbelösung, die Methanol, Essigsäure und Wasser im Verhältnis 1:1:8 enthielt, entfärbt.

3.4 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese in SDS (sodium-dodecyl-sulfat)

SDS-Gel-Elektrophoresen wurden nach einer modifizierten Methode von MOORE et al. '71 durchgeführt. Die Endkonzentration in den Gelen war: 7.5-10 % Acrylamid, 0.15 % Bisacrylamid, 0.1 % SDS, 0.021 % Ammoniumperoxydisulfat, 0.12 M Tris, 0.1 M Glycin, 10 µl TEMED/10 ml Gel.

Der Elektrodenpuffer enthielt: 10 mM Tris, 0.33 M Glycin, 0.1 % SDS, pH 7.0. 20 - 100 µg Protein wurden mit ca. 200 µl Proben-Puffer (24 % Glycerin, 0.25 % SDS, 0.3 % DTT, 1 Tropfen 0.5 % Bromphenolblau/ ml) während 10 min bei 95° C verschlossen inkubiert. Anschliessend wurde zu jeder Probe 1 µMol Natrium-thio-glycolat gegeben, um Oxidationsartefakte, verursacht durch Ammoniumperoxidisulfat, zu vermeiden. Die Stromstärke wurde konstant auf 1.5 mA / 7.5 cm gehalten. Die Elektrophoresezeit variierte zwischen 2.5 - 3 Stunden. Die Gele wurden nach der Elektrophorese während 6 Stunden in 5 % Sulfosalicylsäure und 10 % Trichloressigsäure fixiert, anschliessend während 3 Stunden in 0.25 % COOMASSIE Brilliant Blue R (Sigma), 50 % Methanol, 10 % Essigsäure gefärbt und während weiterer 12 Stunden in 0.025 % COOMASSIE Blue, 50 % Methanol, 10 % Essigsäure nachgefärbt. Entfärbt wurde in 10 % Essigsäure, 10 % Methanol. Durch diese Färbemethode gelang es, 0.5 µg Protein pro Bande sichtbar zu machen.

3.5 Bromcyan-Fragmentierung von MM-CPK und M-line-Protein

Je 2 mg MM-CPK und M-line-Protein wurden mit 6 % Trichloressigsäure präzipitiert und in 4 ml 70 %iger Ameisensäure, die 1 % Phenol enthielt, gelöst. Nach Zugabe von ca. 30 mg Bromcyanid wurden die Proben während 18 Stunden bei Zimmertemperatur im Dunkeln unter Stickstoff inkubiert. Anschliessend wurden die Proben mit Wasser auf 50 ml Endvolumen verdünnt und lyophilisiert. Das

Lyophilisat wurde in 1.5 ml Proben-Puffer, der 1 μ Mol Natrium-thio-glycolat enthielt, aufgenommen. Proben davon wurden mit einem Elektrophorese-System nach GILLIVRAY et al. '72 (10 - 15 % Acrylamid, 4 M Harnstoff, 0.1 % SDS) aufgetrennt. Proben-Puffer und Proteinfärbemethode waren gleich wie unter "SDS-Gel-Elektrophorese" beschrieben.

3.6 Reinigung von M-line-Protein

M-line-Protein wurde nach der Methode von MORIMOTO and HARRINGTON '72 gereinigt. Folgende Reinigungsschritte wurden durchgeführt:

- 1) vollständige Extraktion von fein zerkleinertem Hühnerskelettmuskel-Gewebe mit Puffer von relativ hoher, physiologischen Bedingungen entsprechender Ionenstärke (0.1 M KCl in 0.02 M Phosphat-Puffer, pH 7.0), um alle löslichen Proteine zu entfernen. Dieser Vorgang wird in der Folge mit "Waschen" bezeichnet.
- 2) Extraktion des gewaschenen Muskel-Gewebes mit Puffer von niedriger Ionenstärke (5 mM Tris / HCl-Puffer, pH 7.7), im folgenden "Extraktion" genannt.
- 3) Entfernung von Kontaminationen aus dem Extrakt durch eine Säurepräzipitation (mit 0.2 M Essigsäure, pH 5.0), gefolgt von
- 4) einer Behandlung mit DEAE-Zellulose im "Batch-Verfahren". Bevor die DEAE-Zellulose zugegeben wurde, wurde ein Teil des Ueberstandes nach durchgeführter Säurepräzipitation entfernt und separat gegen 50 mM Tris / HCl-Puffer pH 8.6 dialysiert.

3.7 Reinigung von MM-CPK aus Hühner-Brustmuskel

MM-CPK aus Hühner-Brustmuskel wurde nach der Methode von DAWSON and EPPENBERGER '70 durch

- a) Extraktion bei niedriger Ionenstärke
- b) Aethanol-Präzipitation
- c) Magnesiumsulfat-Präzipitation
- d) Fraktionierung durch DEAE-Zellulose-Chromatographie mit Gradienten-
Elution gereinigt.

Als letzter Schritt wurde mit je 10 mg Protein auf einer Sephadex-G-100 Säule (1 cm / 60 cm, Elution mit 0.1 M KCl, 1 mM DTT in 0.05 M Tris / HCl-Puffer, pH 7.8) eine Gelfiltration durchgeführt. Die in einem symmetrischen Peak eluierte CPK war frei von Kontaminationen.

3.8 Reinigung von BB-CPK aus Hühner-Brustmuskel

BB-CPK wurde aus Hühner-Herzmuskel nach der Methode von DAWSON and EPPENBERGER '70 durch

- a) Extraktion mit niedriger Ionenstärke (10 mM KCl)
- b) Aceton-Präzipitation
- c) Magnesiumsulfat-Präzipitation
- d) Ammoniumsulfat-Präzipitation

e) Fraktionierung durch DEAE-Zellulose-Chromatographie mit Gradienten-Elution gereinigt.

Als letzter Schritt wurde wie bei der Reinigung von MM-CPK eine Gelfiltration durch Sephadex-G-100 durchgeführt.

3.9 Herstellung von Kaninchen-Anti-Hühner-CPK-Antiseren

420 µg MM- oder BB-CPK wurden in 0.5 ml 50 mM Tris / HCl-Puffer, pH 8.0, und in 0.5 ml komplettem FREUND'schem Adjuvans suspendiert und subkutan in die Pfoten eines adulten Kaninchens injiziert. Nach drei Wochen erfolgte eine zweite Injektion. Zehn Tage darauf wurden nach Öffnen einer Ohrvene 60 ml Blut entnommen. Nach einer Gerinnungszeit von 1 - 3 Stunden bei Raumtemperatur und 12 Stunden bei 4° C wurde das Blut vom Gerinnsel befreit und während 30 min bei 25'000 g zentrifugiert. Das Serum wurde dekantiert und, in Portionen bei -20° C gelagert, als Anti-BB-CPK-Serum verwendet.

3.10 Doppel-Immundiffusions-Tests

Um die Antiseren bezüglich Reinheit, Spezifität und Titer zu charakterisieren, wurden Doppel-Immundiffusions-Tests nach OUCHTERLONY '67 in 1.5 % Agar-Noble, 0.01 % Merthiolat (Timerosal, Sigma) in PBS durchgeführt. Mit derselben Methode wurden M-line-Protein und MM-CPK immunologisch miteinander

verglichen. Die Diffusionszeit betrug 16 - 48 Stunden. Nach Auswaschen der nicht präzipitierten Proteine während 24 Stunden mit 0.9 % NaCl und Entsalzen der Gele während 2 Stunden mit destilliertem Wasser wurde während 10 min mit 1 % Amidoschwarz in 7 % Essigsäure gefärbt und mit 2 % Essigsäure entfärbt.

3.11 Immunelektrophorese

In konzentrierter Chrom-Schwefelsäure und mit Aether gereinigte Objektträger wurden in 0.1 % Agarose-Schmelze (60° C) getaucht und bei 70° C trocknen gelassen. Anschliessend wurden je 2 ml einer Mischung von 1.5 % Agarose und 0.01 % Timerosal in EBT-Puffer, pH 8.6, auf die Objektträger gegossen.

Die Elektrophorese wurde bei 20 V / cm und 8° C in einer VITATRON-Apparatur durchgeführt. Diffusion, Auswaschen der nicht präzipitierten Proteine, Entsalzen, Färben und Differenzieren wurden, wie unter "Doppel-Immundiffusions-Tests" angegeben, durchgeführt.

3.12 Immunotitration bei variabler Antigenkonzentration

Zu je 0.5 ml des 1 : 3 mit PBS verdünnten Kaninchen-Anti-Hühner-MM-CPK-Serums wurden 5 - 500 µg reine MM-CPK gegeben und das Volumen wurde mit PBS auf total 1 ml eingestellt. Die Proben wurden während 30 min bei Zimmer-

temperatur und anschliessend während 12 Stunden bei 48° C inkubiert. Nach 30 min Zentrifugation bei 12'000 g wurden die Präzipitate je zweimal mit PBS gewaschen und anschliessend in 0.5 ml 1 N NaOH gelöst. Der Proteingehalt wurde photometrisch durch Absorptionsmessung bei 280 nm bestimmt. Unspezifische Präzipitation mit Kontrollserum konnte auf ein zu vernachlässigendes Minimum reduziert werden, wenn die Seren vor der Inkubation während 20 min bei 15'000 g zentrifugiert worden waren.

3.13 Immunotitration bei variabler Antiserumkonzentration

Zu je 50 µl einer Lösung, die 1 mg MM-CPK / ml enthielt, wurden 0.1 - 3.5 ml eines 1 : 3 mit PBS verdünnten Kaninchen-Anti-Hühner-MM-CPK-Serums gegeben. Die vollständige Denaturierung von endogener Kaninchen-Serum-CPK wurde durch vorhergehende Inkubation des Serums bei 50° C während 20 min erreicht. Das Endvolumen aller Proben wurde mit PBS auf 3.5 ml eingestellt. PBS enthielt als reduzierendes Agens zusätzlich 0.1 mMol Beta-Mercapto-äthanol. Die Proben wurden während 30 min bei Zimmertemperatur und anschliessend während 12 Stunden bei 4° C inkubiert. Nach 30 min Zentrifugieren bei 15'000 g wurde die CPK-Aktivität im Ueberstand gemessen.

3.14 Fluoreszein-iso-thio-cyanat-(FITC)-Konjugat

Pferde-Anti-Kaninchen-IgG konjugiert mit Fluoreszein-iso-thio-cyanat (FITC) wurde entweder von ORGANON Technika Oss., NL, gekauft (Proteinkonzentration 12 mg/ml; FITC : Protein Verhältnis 1.8) oder nach der Methode von HOLBOROW an JOHNSON '67 mit FITC konjugiert. Vor Gebrauch wurde das FITC-Konjugat mit 0.1 % BSA in SOL. A 200 mal verdünnt.

3.15 Ferritin-Konjugat

Pferde-Anti-Kaninchen-IgG wurde von Miles-Seravac, Lausanne, CH, gekauft und nach der Methode von BINZ '69 mit mehrmals umkristallisiertem Ferritin durch p, p'-Difluoro-m, m'-dinitro-phenylsulfon (FNPS, Eastman Org. Chem.) in einem Einschnittverfahren konjugiert, anschliessend durch Saccharosegradienten-Zentrifugation gereinigt, sterilfiltriert und bei 4° C aufbewahrt.

Als Geschenk von Dr. Th. Bächli, Institut für Exp. Mikrobiologie, ZH, erhielten wir 2 ml Meerschweinchen-Anti-Kaninchen-IgG, das ebenfalls nach derselben Methode mit Ferritin konjugiert worden war. Vor Gebrauch wurde das Ferritin-Konjugat mit 0.1 % BSA in SOL. A 5 mal verdünnt.

3.16 Herstellung von Myofibrillen aus Hühner-Skelett- und Herzmuskelgewebe (modifiziert nach KUNDRAT and PEPE '71)

Adulte Weisse-Leghorn-Hennen wurden durch Dekapitieren getötet. Beinmuskulatur, M. pectoralis major, M. anterior latissimus dorsi, M. posterior latissimus dorsi und das Herz wurden sofort herausgeschnitten. Fett, Sehnen und Bindegewebe wurden entfernt. Die verschiedenen Muskeln wurden separat in kontraktions-hemmende SOL. A (0.1 M KCl, 1 mM EGTA, 5 mM EDTA-Puffer, pH 7.0, 4° C) eingelegt, mit einer Schere in kleine Stücke geschnitten, mit 20 V/W SOL. A in einem Glas-Teflon-Homogenisator kurz homogenisiert und anschliessend in einem 50 ml SORVALL-Omnimixer-Becher dreimal während je 15 sec bei maximaler Tourenzahl homogenisiert.

Jeweils 50 ml Homogenat wurden während 10 min bei 800 g zentrifugiert. Der Ueberstand, der nebst einer Anzahl kleiner Myofibrillen sehr viele Mitochondrien enthielt, wurde verworfen. Das Sediment wurde dreimal während 15 min mit 20 V/W SOL. A gewaschen und während 15 min bei 1500 g zentrifugiert. Als Waschpuffer wurde auch MOR.1 (0.1 M KCl, 1 mM DTT, 20 mM Phosphat-Puffer, pH 7.0) verwendet. Eventuell vorhandene Bindegewebsfetzen wurden durch Filtration durch feines Nylongewebe entfernt. Nach der Zentrifugation konnten im Sediment durch vorsichtiges Resuspendieren zwei Schichten getrennt werden, wobei die obere, dickere Schicht fast ausschliesslich aus Myofibrillen bestand. Die Myofibrillen konnten ohne sichtbare Veränderung während drei Wochen in 10 V/W 50 % Glycerin in SOL. A bei minus 20° C glycerinisiert werden. Das Glycerin war zuvor mit AMBERLIT-MB-1 deionisiert worden. Für die meisten Experiment-

serien wurden aber frisch hergestellte Myofibrillen verwendet, obwohl glycerinierte Myofibrillen selbst nach monatelangem Aufbewahren bei minus 20° C noch ihre volle Kontraktionsfähigkeit besaßen. Die Myofibrillen wurden entweder bei 4° C im Kühlraum oder unter Eiskühlung präpariert.

3. 17 Wasch- und Extraktionsversuche mit Skelett- und Herzmuskel-Myofibrillen

Die Behandlung von zerkleinertem Muskelgewebe oder von Myofibrillenpräparationen mit relativ hoher, physiologischen Bedingungen entsprechender Ionenstärke (0.1 M KCl), um lösliche Proteine zu entfernen, wird im folgenden "Waschen" genannt, während die Behandlung mit niedriger Ionenstärke (5 mM Tris/ HCl) als "Extraktion" bezeichnet wird.

Frische Hühnerbrust- oder Herzmuskel wurden in 100 V/W SOL.A oder MOR.1 nach der unter "Myofibrillenherstellung" angegebenen Methode homogenisiert und nach folgendem Schema gewaschen, zentrifugiert ^{a)} und extrahiert.

Anzahl Waschungen und Extraktionen	Zentrifugation	Dauer des Waschens oder der Extraktion	Puffer
C	15 min , 800 g	1 h	SOL.A/MOR.1
H 1	15 min , 800 g	1 h	SOL.A/MOR.1
H 2	15 min , 1500 g	30 min	SOL.A/MOR.1
H 3	15 min , 1500 g	30 min	SOL.A/MOR.1
H 4 - H 9	10 min , 5000 g	30 min	SOL.A/MOR.1
L 1	10 min , 5000 g	45 min	MOR. 2
L 2	10 min , 5000 g	45 min	MOR. 2
H 10	10 min , 5000 g	30 min	SOL.A/MOR.1

a) Zentrifugation in 10 ml SORVALL-Zentrifugen-Röhrchen in einem Ausschwingrotor bei 4° C.

- C: Rohextrakt
 H 1 - H 10: Waschen in relativ hoher, "physiologischer" Ionenstärke entweder mit SOL. A (0.1 M KCl, 1 mM DTT, 1 mM EGTA, 5 mM EDTA-Puffer, pH 7.0, 4° C) oder MOR. 1 (0.1 M KCl, 1 mM DTT, 20 mM Phosphat-Puffer, pH 7.0, 4° C)
 L 1 und L 2: Extraktion in niedriger Ionenstärke mit MOR. 2 (1 mM DTT, 5 mM Tris/ HCl-Puffer, pH 7.7, 4° C)
 L 2: nur für Herz-Myofibrillen

Nach jedem Waschen wurde die Total-CPK-Aktivität der Myofibrillensuspension und die CPK-Aktivität des Ueberstandes nach dem Zentrifugieren mit dem C/ATP-Nachweis-System gemessen. Einige Proben wurden vor der Extraktion (L 1) lyophilisiert, und das Trockengewicht des Sediments, das vorwiegend aus Myofibrillen bestand, wurde bestimmt.

Zusätzlich wurde die Extrahierbarkeit von myofibrillärer CPK mit mehreren Puffersystemen bei relativ hoher Ionenstärke und mit verschiedenen physiologischen Lösungen, wie in Tabelle III aufgeführt, getestet.

3. 18 Extraktion der myofibrillären CPK

Hühner-Skelettmuskel-Myofibrillen wurden nach zweimaligem Waschen in MOR. 2-Puffer während 45 min in 20 V/W MOR. 2-Puffer inkubiert, sofort nach der Zentrifugation in SOL. A oder MOR. 1 aufgenommen und entweder direkt für die Immunfluoreszenz und Elektronenmikroskopie weiterverarbeitet oder bei minus 20° C in 10 V/W 50 % Glycerin in SOL. A aufbewahrt.

Um bei Hühner-Herzmuskelfibrillen eine vollständige Extraktion der myofibrillären CPK zu erreichen, wurden diese während zweimal 45 min in MOR. 2-Puffer inkubiert.

3. 19 Inkubationsexperimente

Das Zusammengeben von Myofibrillen, die in rel. hoher, physiologischen Bedingungen entsprechender Ionenstärke (SOL. A oder MOR. 1) gewaschen, nicht aber extrahiert worden sind, mit gereinigten CPK-Isoenzymen in MOR. 1-Puffer wird im folgenden "Inkubation" genannt.

a) Frisch isolierte (native), gewaschene Myofibrillen von Herz- und Brustmuskel des Huhnes und

b) in 50 % Glycerin in SOL. A bei minus 20° C aufbewahrte (glycerinisierte), gewaschene Myofibrillen von Herz- und Brustmuskel des Huhnes

wurden während 1 - 12 Stunden mit je 0.1 - 1 mg/ml MM-CPK und/oder BB-CPK in MOR. 1 inkubiert. Nach der Inkubation, die in 1 ml Plastikröhrchen unter Rotation bei 4° C durchgeführt wurde, wurden die Myofibrillen dreimal mit MOR. 1-Puffer gewaschen, um unspezifisch gebundene CPK zu entfernen. Anschließend wurden die Myofibrillen mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz-Technik separat sowohl für M-CPK wie für B-CPK angefärbt. Als Kontrollen dienten native, gewaschene Myofibrillen, die unter gleichen Bedingungen, aber nur in MOR. 1-Puffer ohne die CPK-Isoenzyme "inkubiert" worden waren. Als Kontrolle für die Immunreaktion dienten unter identischen Bedingungen inkubierte Myofibrillen, die anstatt mit Antiseren mit den entsprechend verdünnten Normalseren behandelt worden waren.

3.20 Reinkubationsexperimente

Das Zusammengeben von Myofibrillen, die nach intensivem Waschen bei rel. hoher, physiologischen Bedingungen entsprechender Ionenstärke (SOL.A oder MOR. 1) zusätzlich mit Puffer von niedriger Ionenstärke (MOR. 2) extrahiert worden sind, mit gereinigten CPK-Isoenzymen in MOR. 1-Puffer wird im folgenden "Reinkubation" genannt.

- a) Native, frisch extrahierte Myofibrillen von Herz- und Brustmuskel des Huhnes und
 - b) nach der Extraktion in 50 % Glycerin in SOL. A bei minus 20° C aufbewahrte (glycerinisierte) Myofibrillen von Herz- und Brustmuskel des Huhnes
- wurden bei rel. hoher Ionenstärke in MOR. 1-Puffer während 1 - 12 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von MM-CPK, BB-CPK oder beiden CPK-Isoenzymen gleichzeitig reinkubiert.

Die drei experimentellen Anordnungen waren:

- a) Langzeit-Reinkubation (12 Stunden) mit rel. hohen Konzentrationen von CPK-Isoenzymen (1 mg/ml in MOR. 1),
- b) Kurzzeit-Reinkubation (1 Stunde) mit rel. niedrigen Konzentrationen von CPK-Isoenzymen (0.1 mg/ml in MOR. 1) und
- c) Kurzzeit-Kompetitions-Reinkubation mit rel. niedrigen Konzentrationen von beiden CPK-Isoenzymen gleichzeitig (je 0.1 mg/ml in MOR. 1) während 1 Stunde.

Nach der Reinkubation, die in 1 ml Plastikröhrchen unter Rotation bei 4° C durchgeführt wurde, wurden die Myofibrillen dreimal mit MOR. 1-Puffer gewaschen, um unspezifisch gebundene CPK zu entfernen. Anschliessend wurden die Myofibrillen mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz-Technik separat sowohl für M-CPK als auch für B-CPK angefärbt. Als Kontrollen dienten extrahierte Myofibrillen, die unter gleichen Bedingungen, aber nur in MOR. 1-Puffer ohne die CPK-Isoenzyme, "reinkubiert" worden waren. Als Kontrollen für die Immunreaktion dienten unter identischen Bedingungen reinkubierte Myofibrillen, die anstatt mit Antiseren mit entsprechend verdünntem Normalserum behandelt worden waren.

3.21 Histochemische Lokalisation von CPK in Gefrierschnitten von Hühner-Brustmuskelgewebe

Sofort nach dem Töten eines Huhnes durch Dekapitieren wurde der Brustmuskel entnommen, in kubische Stücke von ca. 3 - 5 mm Kantenlänge geschnitten, in FREON, das mit flüssigem Stickstoff gekühlt worden war, gefroren und bei minus 70° C aufbewahrt. 5 µm Gefrierschnitte wurden auf Objektträger gelegt, mit einem 10 %igen Gelatine-CPK-Reaktionsgel übergossen und während 10 - 15 min bei 30° C inkubiert. Die Endkonzentration im Reaktionsgel war: 10 % Gelatine, 20 mM Glucose, 6.6 mM MgCl₂, 0.5 mM NADP, 0.75 mM ADP, 0.5 mg/ml Nitroblau-tetrazolium (NBT), 0.2 mg/ml Phenazin-methosulfat (PMS), 4 µg/ml Hexokinase, 0.4 µg/ml 6-Phospho-Gluconsäure-dehydrogenase, 50 mM Phospho-Creatin

(CP), alles in 0.1 M TRAP-Puffer, pH 7.2. Als Kontrolle diente ein Reaktionsgel ohne CP. Nach der Inkubation wurde das Reaktionsgel abgehoben. Die Schnitte wurden kurz mit TRAP-Puffer gespült und unter Immersionsöl im Mikroskop photographiert.

3.22 Indirekte Immunfluoreszenz-Technik (Nachweis von M- und B-CPK)

Je 6 Tropfen einer 1 : 20 W/V Myofibrillensuspension (frisch oder glycerinisiert) wurden in 1 ml Plastikröhrchen in einer Hämatokrit-Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal mit 20 Volumen SOL. A gewaschen und mit 15 Tropfen 1 : 100 verdünntem Anti-M-CPK-Serum oder 1 : 120 verdünntem Anti-B-CPK-Serum während 1 Stunde unter ständigem Rotieren bei 4° C inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit SOL. A und entsprechend kurzem, schonendem Zentrifugieren wurde das Sediment während einer Stunde bei 4° C mit 15 Tropfen eines 1 : 200 verdünnten FITC-Konjugates unter Rotation inkubiert. Anstelle der Anti-CPK-Seren wurde als Kontrolle jeweils entsprechend verdünntes Normalserum, das vor der Immunisierung des Kaninchens gewonnen wurde, verwendet.

Nach zweimaligem Waschen mit SOL. A wurde das Sediment in 5 V/W SOL. A aufgenommen und ein Tropfen der Suspension wurde in einer Lösung von 25 % Glycerin, 0.1 M KCl, 1 mM EGTA in 0.1 M Glycin-Puffer, pH 9.0, auf Objektträger montiert. Als Verdünnungspuffer für die Immunreagentien wurde 0.1 % BSA in SOL. A verwendet. Sowohl als Wasch- wie auch Verdünnungspuffer der Immun-

reagentien konnte PBS oder MOR. 1 verwendet werden. Zur Beobachtung wurde ein Fluoreszenz-Mikroskop des Typs "Zeiss Standard Modell - 18", ausgerüstet mit einer 50 W HBO Quecksilberlampe, einem IV/F Kondensor und folgender Filterkombination: Erregerfilter - LP 455, KP 490, KP 500, Emmissionsfilter - LP 510, LP 528, benützt.

Für die Mikrophotographie wurde Ilford HP4 Film, der mit DIAFIN (Kodak) entwickelt wurde (ca. 33 DIN), verwendet.

3.23 Indirekte Immunferritin-Technik (Nachweis von M- und B-CPK)

Anstelle des FITC-Konjugates der indirekten Immunfluoreszenz-Methode wurden pro 0.1 ml Fibrillensediment 0.7 ml 1 : 5 mit SOL. A oder PBS verdünntes Ferritin-Konjugat verwendet. Die Inkubationsbedingungen waren identisch mit denen der Immunfluoreszenz-Technik. Das mit dem Konjugat behandelte Fibrillensediment wurde aber dreimal mit 10 ml SOL. A sehr gut gewaschen, um das infolge hoher Affinität zu den Myofibrillen unspezifisch gebundene Ferritin-Konjugat sauber auszuwaschen. 0.1 ml gewaschenes Fibrillensediment wurde mit 3 % BSA in MOR. 1 aufgeschlämmt und sedimentiert. Die BSA-Lösung wurde bis knapp über das lockere Sediment abdekantiert. Vorsichtig wurde mit einer Lösung von 1.5 % Glutaraldehyd und 1.5 % Acrolein in MOR. 1 überschichtet, während mindestens 12 Stunden bei 4° C fixiert und zweimal mit MOR. 1 ohne DTT gewaschen. Das Myofibrillen-BSA-Sediment wurde in kleine Blöcke von ca. 0.1 mm Kantenlänge geschnitten und zwei-

mal je 1 Stunde mit 0.1 % Osmiumtetroxid in 0.1 M Phosphat-Puffer, pH 7.0, nachfixiert. Anschliessend wurde zweimal mit Phosphat-Puffer gewaschen und durch eine Alkoholreihe und 100 % Aceton bei 20° C entwässert. Das fixierte und entwässerte Material wurde in Epon/Araldit eingebettet und nach 12 Stunden Inkubation bei 20° C während 12 Stunden bei 60° C polymerisiert. Dünnschnitte wurden mit einem LKB 4800 A Ultramikrotom hergestellt und nach dem Kontrastieren (15 min mit 5 % Uranylacetat und 5 min mit 2.6 % Bleicitrat) in einem Zeiss 9 A oder Siemens ELMISKOP 1 Elektronenmikroskop photographiert.

4. RESULTATE

4.1 Reinigung von Hühner-MM-CPK und Spezifität des Kaninchen-Anti-Hühner-MM-CPK-Serums

Um spezifische Antikörper zu erhalten, ist es unerlässlich, das Antigen in reiner Form herzustellen. MM-CPK wurde nach dem im Methodenteil beschriebenen Verfahren aus Hühner-Skelettmuskelgewebe gereinigt. Die spezifische Aktivität der gereinigten MM-CPK betrug ca. 83 EU/mg Protein (gemessen mit dem C/ATP-Nachweissystem für CPK). Die Homogenität des gereinigten Proteins wurde durch verschiedene biochemische und immunologische Kriterien bestätigt.

Sowohl das Elutionsprofil nach der Sephadex-G-100-Gelfiltration, dem letzten Schritt zur Reinigung von MM-CPK, als auch die nach einer Elektrophorese für Protein gefärbten Polyacrylamid-Gele (Fig. 1A und 6A) zeigen, dass die für die Antikörperherstellung verwendete MM-CPK frei von Kontaminationen war. Nach Elektrophorese von MM-CPK in Polyacrylamid- und SDS-Polyacrylamid-Gelen ist auch bei der hohen aufgetragenen Proteinmenge von 0.1 mg nur eine Proteinbande sichtbar (Fig. 1A, 1B und 6A, 6B). OUCHTERLONY-Doppelimmundiffusions-Tests und Immunelektrophoresen von gereinigter MM-CPK, aber auch von Muskel-Rohextrakten mit Anti-MM-CPK-Serum zeigten eine einzige, scharfe Präzipitinlinie und damit die Monospezifität des Antiserums. Zugleich konnte die CPK-Aktivität in der Präzipitinlinie nachgewiesen werden (Fig. 1C und 1D). Der Verlauf einer typischen Präzipitationskurve einer Immunotitration, die bei konstanter Menge des Antiserums und unterschiedlichen Konzentrationen des Antigens (MM-CPK) durchgeführt wurde, ist in Fig. 2 wiedergegeben. Da im Bereich des

Antikörperüberschusses (linke Seite der Kurve) das Antigen quantitativ ausgefällt wird, konnten durch Subtraktion der jeweils bekannten Proteinmenge des Antigens von der gesamten Proteinmenge des Präzipitates die relativen Proteinanteile von Antikörper und Antigen bestimmt werden. Unter Berücksichtigung der Molekulargewichte (84'000 Daltons für MM-CPK, 160'000 Daltons für IgG) konnte das molare Verhältnis von Antikörper (AB) zu Antigen (AG) im Präzipitat bestimmt werden. Im Bereich der Äquivalenzzone (maximale Präzipitation) liegt dieses Verhältnis für die Anti-MM-CPK/MM-CPK-Reaktion bei ca. 4 - 5 Antikörpermolekülen pro MM-CPK-Molekül. Durch Immunotitration bei einer konstanten Menge des Antigens (MM-CPK) und variabler Konzentration des Antiserums (Fig. 3) konnte die Spezifität des Anti-MM-CPK-Serums dadurch gezeigt werden, dass die MM-CPK quantitativ ausgefällt wurde, indem die CPK-Aktivität aus dem Ueberstand ins Präzipitat überging. Denselben Effekt zeigte eine Immunotitration von CPK in einem Hühner-Brustmuskelextrakt. Andererseits konnte aber durch Anti-MM-CPK-Serum weder gereinigte BB-CPK noch BB-CPK in Hühner-Herzmuskelextrakten präzipitiert werden.

Fig. 1

Reinheitskriterien von MM-CPK und Spezifität des Anti-MM-CPK-Serums

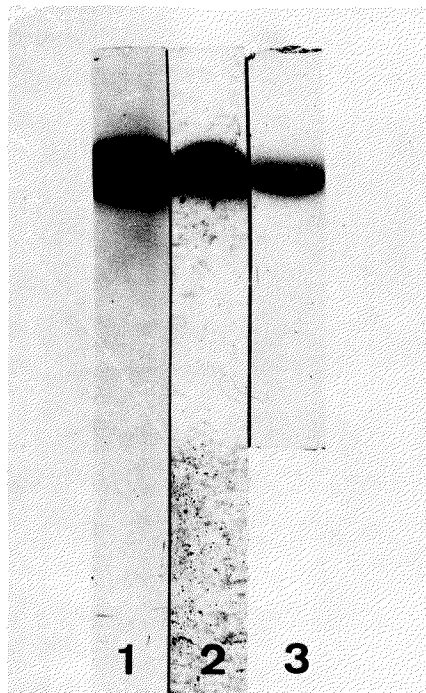
- A) Elektrophorese der gereinigten MM-CPK in 7.5 % Polyacrylamid-Gelen (DAVIES '64), mit Amidoschwarz für Protein gefärbt.
- 1) 120 μ g MM-CPK aufgetragen
 - 2) 50 μ g " "
 - 3) 15 μ g. " "

- B) Elektrophorese der gereinigten MM-CPK mit 0.1 % SDS in 7.5 % Polyacrylamid-Gelen, mit Coomassie brilliant blue R für Protein gefärbt.
- 80 μ g MM-CPK aufgetragen.

- C) Doppel-Immundiffusions-Test nach OUCHTERLONY '67.
- Die zentrale Vertiefung enthielt 125 μ g gereinigte MM-CPK.
- Die äusseren Löcher: 1 unverdünntes, 2 (1 : 2), 3 (1 : 4), 4 (1 : 8), 5 (1 : 16) und 6 (1 : 32) verdünntes Anti-MM-CPK-Serum. Proteinfärbung mit Amidoschwarz.

- D) Immun-Elektrophorese von gereinigter MM-CPK.
- Ca. 10 - 15 μ l einer Lösung von 200 μ g gereinigter MM-CPK/ml wurden nach Einfüllen in die kleinen Löcher während 35 min einer Elektrophorese unterzogen. Anschliessend Diffusion gegen 1 : 2 verdünntes Anti-MM-CPK-Antiserum.
- 1) für Protein gefärbt
 - 2) für CPK-Aktivität gefärbt.

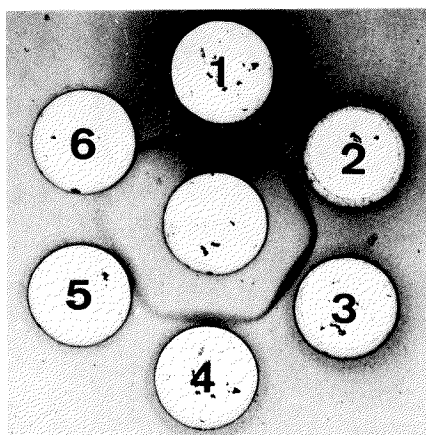
A



B



C



D

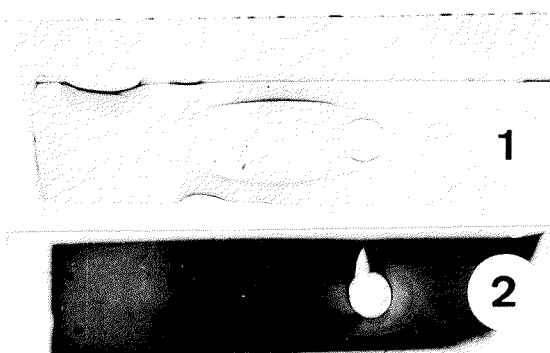


Fig. 2

Immunotitration bei variabler Antigenkonzentration

Verlauf der Protein-Präzipitationskurve (—●—●—●—) bei variabler MM-CPK (AG)- und konstanter Anti-MM-CPK-Serum (AB) Konzentration. Antikörper (AB) zu Antigen (AG) Verhältnis (○—○—○) bei verschiedenen Antigenkonzentrationen. Das optimale Verhältnis im Bereich der Äquivalenzzone beträgt ca. 4 - 5 Antikörpermoleküle pro MM-CPK-Molekül.

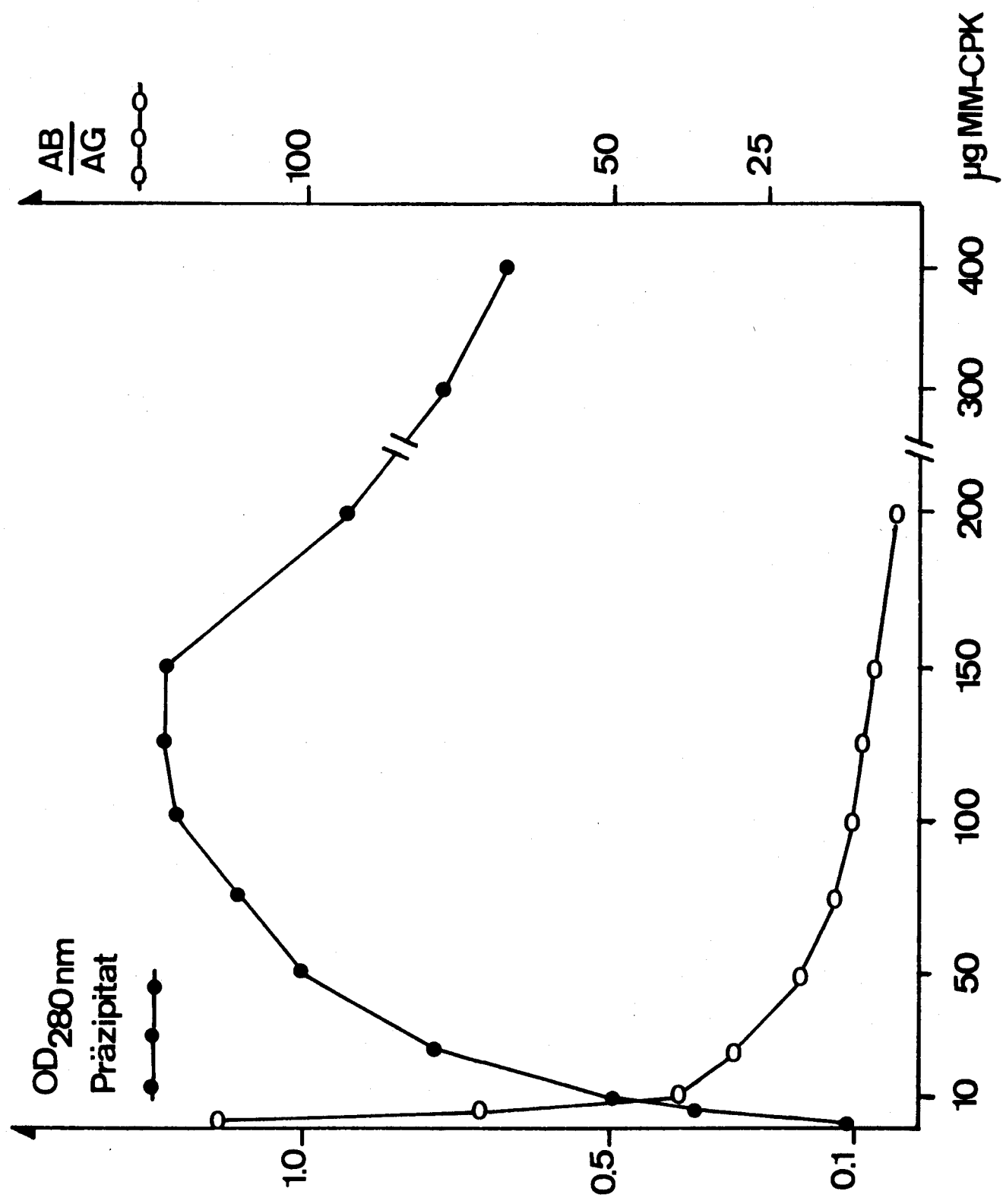
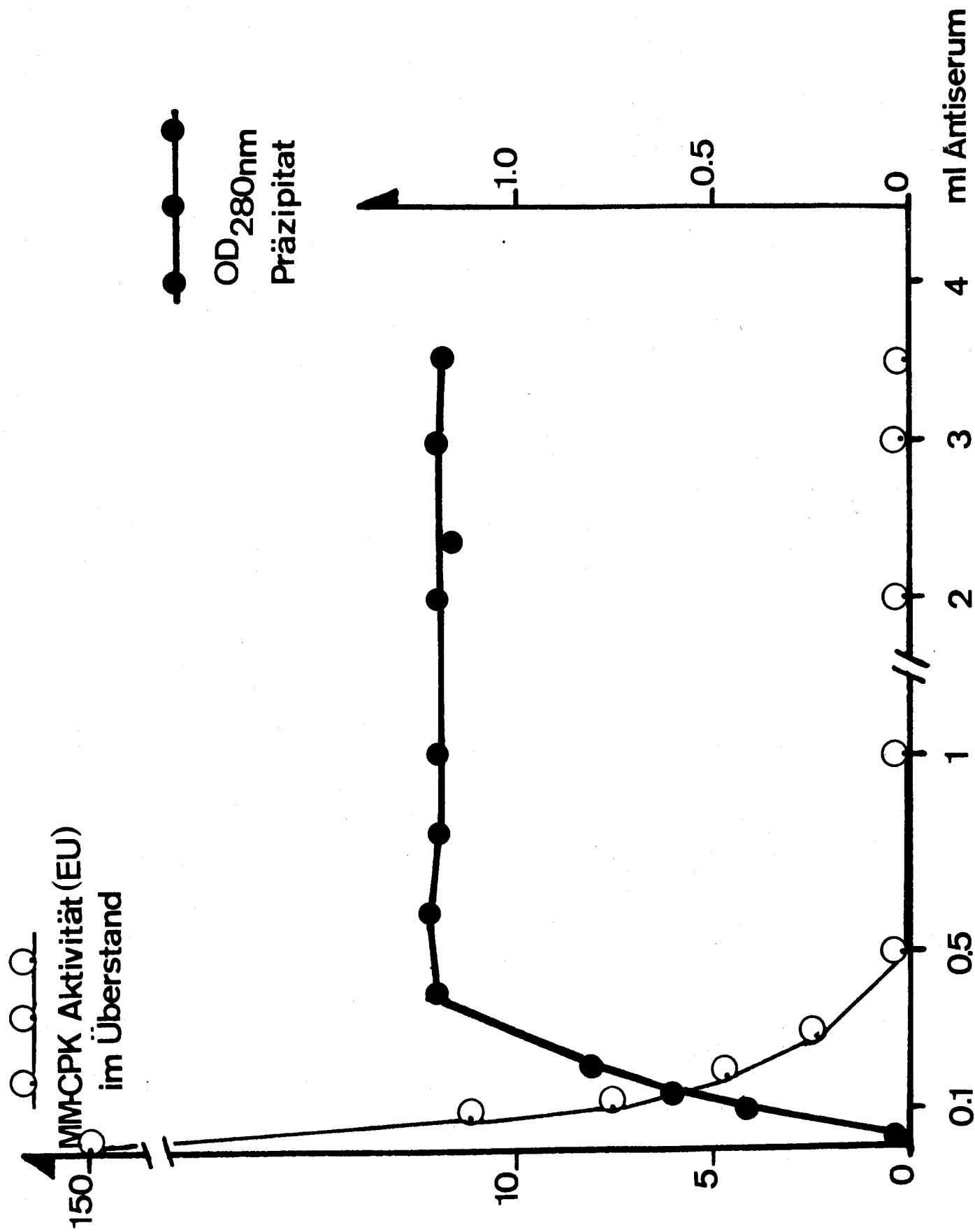


Fig. 3

Immunotitration bei variabler Antiserumkonzentration

Verlauf der Protein-Präzipitationskurve (●—●—●) bei variabler Konzentration des Anti-MM-CPK-Serums. MM-CPK-Aktivität im Ueberstand (○—○—○) bei zunehmender Konzentration von Anti-MM-CPK-Serum.



4.2 Reinigung von Hühner-BB-CPK und Spezifität des Kaninchen-Anti-Hühner-BB-CPK-Serums

BB-CPK wurde nach dem im Methodenteil beschriebenen Verfahren gereinigt. Die spezifische Aktivität der gereinigten BB-CPK betrug ca. 40 EU/mg Protein (gemessen mit dem C/ATP-Nachweissystem für CPK). Die Reinheit von BB-CPK und die Spezifität des Anti-BB-CPK-Serums wurden in ähnlicher Weise wie diejenige der MM-CPK resp. des Anti-MM-CPK-Serums geprüft. Das Elutionsprofil nach Sephadex-G-100-Gelfiltration, dem letzten Schritt zur Reinigung von BB-CPK, und die nach einer Elektrophorese für Protein gefärbten Polyacrylamid-Gele zeigten, dass die für die Antikörperherstellung verwendete BB-CPK ebenfalls frei von Verunreinigungen war (Fig. 4A). OUCHTERLONY-Doppel-Immunodiffusions-Tests und Immunelektrophoresen von gereinigter BB-CPK, aber auch von Hühner-Herzmuskelextrakten, mit Anti-BB-CPK-Serum zeigten eine einzige Präzipitationslinie in der zudem CPK-Aktivität nachgewiesen werden konnte (Fig. 4B und C). EPPENBERGER et al. '67 fanden in Mikrokomplementfixations-Studien keine Kreuzreaktion von Anti-Hühner-MM-CPK-Serum mit Hühner-BB-CPK und nur eine sehr geringe Kreuzreaktion von Anti-Hühner-BB-CPK-Serum mit Hühner-MM-CPK. BULCKE and SHERWIN '69 zeigten, dass Anti-CPK-Seren weniger spezies- als artspezifisch reagieren. Anti-Kaninchen-MM-CPK-Serum reagierte z.B. mit MM-CPK von Kaninchen, Meerschweinchen, Ratte, Affe und Mensch, nicht aber mit MM-CPK von Huhn. Mikrokomplementfixations-Studien nach LEVINE '67 mit den in dieser Arbeit verwendeten Antiseren zeigten ihre absolute Isoenzympezifität, indem keine Kreuzreaktionen der homo-dimeren CPK-Isoenzyme (MM-, BB-CPK) festgestellt werden konnten (unpublizierte Resultate von

L. BURCKHARDT et al. '74). Diese Spezifität konnte auch in verschiedenen Immunotitrationsexperimenten mit Reinenzym, aber auch mit Rohextrakten verschiedener Gewebe bestätigt werden.

Fig. 4

Reinheitskriterien von BB-CPK und Spezifität des Anti-BB-CPK-Serums

A) Elektrophorese der gereinigten BB-CPK in 7.5 % Polyacrylamid-Gelen (DAVIES '64), mit Amidoschwarz für Protein gefärbt. Die Elektrophoresezeit war nur ca. halb so lang wie in Fig. 1 A. Vergl. die relative elektrophoretische Mobilität von BB-CPK und MM-CPK unter identischen Elektrophorese-Bedingungen Fig. 6 A.

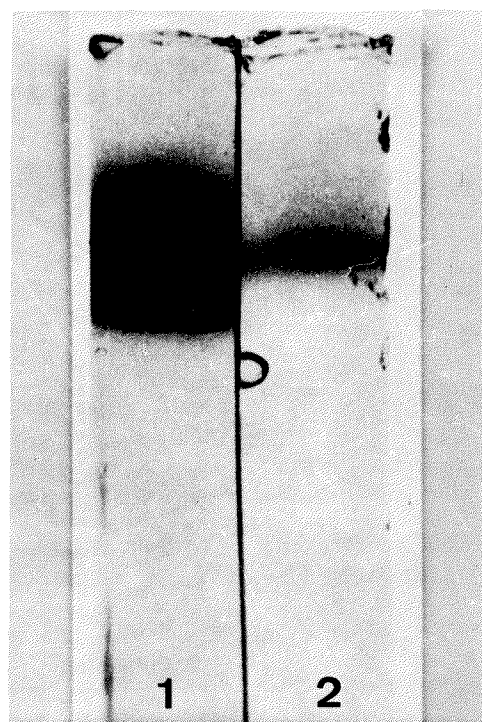
- 1) 130 μ g -
- 2) 13 μ g BB-CPK aufgetragen.

B) Doppel-Immundiffusions-Test nach OUCHTERLONY '67. Die zentrale Vertiefung enthielt 100 μ g BB-CPK. Die äusseren Löcher: 1 unverdünntes, 2 (1 : 2), 3 (1 : 4), 4 (1 : 8), 5 (1 : 16) und 6 (1 : 32) verdünntes Anti-BB-CPK-Serum. Keine Proteinfärbung.

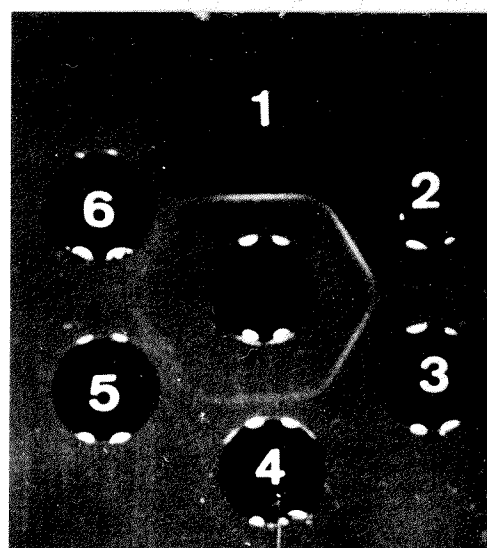
C) Immun-Elektrophorese von gereinigter BB-CPK. Ca. 10 - 15 μ l einer Lösung von 200 μ g gereinigter BB-CPK/ml wurden nach Einfüllen in die kleinen Löcher während 15 min einer Elektrophorese unterzogen. Anschliessend Diffusion gegen 1 : 3 verdünntes Anti-BB-CPK-Serum.

- 1) für Protein gefärbt
- 2) für CPK-Aktivität gefärbt.

A



B



C



4.3 Reinigung von M-line-Protein und Vergleich von M-line-Protein mit MM-CPK, der Muskelform der CPK

Vergleiche der von MORIMOTO and HARRINGTON '72 über M-line-Protein publizierten Daten mit bereits bekannten Daten über Molekulargewicht, Untereinheitenstruktur, Extrahierbarkeit mit Puffer von niedriger Ionenstärke und Aminosäurezusammensetzung von MM-CPK (Tabelle I), führten zur Annahme, dass die beiden Proteine identisch sein könnten. Disk-Gel-Elektrophoresen (Fig. 5A) nach den verschiedenen Reinigungsschritten von M-line-Protein zeigten, dass nach dem Säurepräzipitationsschritt bereits eine einzige Proteinspezies erhalten wurde (Fig. 5A, 3). Während den verschiedenen Reinigungsschritten von M-line-Protein wurde die CPK-Aktivität gemessen (Tabelle II). Mehr als 76 % der total extrahierbaren CPK konnte durch gutes Waschen des zerkleinerten Muskelgewebes mit Puffer von relativ hoher, physiologischen Bedingungen entsprechender Ionenstärke (MOR. 1 ohne DTT) entfernt werden, während ca. 24 % erst bei Extraktion des gewaschenen Muskelgewebe-pellets mit Puffer von niedriger Ionenstärke (MOR. 2 ohne DTT) in Lösung gingen. Bei der weiteren Reinigung von M-line-Protein aus diesem Extrakt durch den Säurepräzipitationsschritt erhöhte sich zugleich die spezifische CPK-Aktivität um das 4.4 fache auf ca. 62 EU/mg. Diese spezifische Aktivität war etwas niedriger als diejenige von gereinigter MM-CPK (ca. 80 EU/mg), was leicht durch das Fehlen von SH-Gruppen schützenden Reagenzien (DTT oder BME) während der Reinigung von M-line-Protein nach MORIMOTO and HARRINGTON '72 erklärt werden kann. Aus dem gleichen Grunde war die CPK-Aktivität in der verdünnten Präparation nach der DEAE-Zellulose-Adsorption instabil, was eine Erniedrigung der spezifischen

Aktivität zur Folge hatte. Neuere Versuche, bei denen in allen Puffern, die für die Reinigung des M-line-Proteins verwendet wurden, 1 mMol DTT zugesetzt worden war, zeigten, dass gereinigtes M-line-Protein eine vergleichbare spezifische CPK-Aktivität wie MM-CPK aufwies. Der Aktivitätsverlust des Säurepräzipitationsschrittes und der DEAE-Zellulose-Adsorption konnte dadurch weitgehend vermieden werden.

TABELLE I

Vergleich von publizierten Daten über die Eigenschaften von MM-CPK und M-line-Protein aus Hühner-Brustmuskel.^{a)}

	MM-CPK	M-line-Protein
Molekulargewicht	83'700 (1)	88'000 (2)
Zusammensetzung der Untereinheiten	2 identische Untereinheiten (1)	2 identische Untereinheiten (2)
Extrahierbarkeit	Extrahierbar bei niedriger Ionenstärke (3,4)	Extrahierbar bei niedriger Ionenstärke (2)
myofibrilläre Lokalisation	mindestens ein Teil der mit niedriger Ionenstärke extrahierbaren CPK ist stark an die Myofibrillen gebunden (3)	spezifisch an die M-Linie der Myofibrillen gebunden (2)
Aminosäurezusammensetzung	*)	
Lys	80.3 ⁺	73.5 ⁺⁺
His	42.0	36.7
Arg	49.4	40.1
Asp	90.1	93.7
Thr	35.8	33.2
Ser	39.5	44.2
Glu	102.5	96.0
Pro	50.6	44.7
Gly	74.1	68.7
Ala	40.7	41.8
Val	60.5	59.5
Met	24.7	21.1
Ile	29.6	36.2
Leu	87.6	81.3
Tyr	19.8	30.0
Phe	40.8	40.4

*) Anzahl Aminosäurereste per 10⁵ g Protein

+) Hydrolyse während 24 Stunden (unkorrigierte Werte)

++) Hydrolyse während 20 Stunden (unkorrigierte Werte)

1) DAWSON et al. '67

2) MORIMOTO and HARRINGTON '72

3) OTTAWAY '67

4) EPPENBERGER '67

a) TURNER, D. C., T. WALLIMANN, and H. M. EPPENBERGER 1973
P.N.A.S. 70:702-705.

TABELLE II

Verlauf der CPK-Aktivität während der Reinigung
von M-line-Protein nach MORIMOTO and
HARRINGTON '72. ^{a)}

Fraktion	Total Protein (mg)	Total CPK Aktivität (EU)	Spezifische CPK Aktivität (EU/mg)
Waschen mit Puffer von rel. hoher Ionenstärke			
1	9620	5500	0.58
2	1370	7490	5.47
3	233	1250	5.36
4	47	234	4.98
Extraktion mit Puffer von niedriger Ionenstärke			
	318	4440	14.0
Säurebehandelter Extrakt			
	40.2	2500	62.2
Nach DEAE-Zellu- lose-Adsorption			
	9.2	196	21.3

^{a)} TURNER, D. C., T. WALLIMANN, and H. M. EPPENBERGER. 1973.
P.N.A.S. 70:702-705.

4.4 Elektrophoretische Evidenz für die Identität von M-line-Protein und MM-CPK.

Weitere elektrophoretische Kriterien für die Homogenität der beiden Proteine

Die nach einem völlig verschiedenen Verfahren gereinigte MM-CPK hat eine identische elektrophoretische Mobilität in Polyacrylamid-Disk-Gel-Elektrophoresen (Fig. 5A) und in Zellulose-polyacetat-Elektrophoresen (Fig. 5B) wie das M-line-Protein. Nach der Elektrophorese von M-line-Protein war eine einzige Proteinbande sichtbar (Fig. 5A, B), die mit den CPK-Aktivitätsbanden von M-line-Protein und MM-CPK übereinstimmte (Fig. 5B). Die identische elektrophoretische Mobilität konnte eindeutig durch Disk-Gel-Elektrophoresen, bei denen eine Mischung der beiden gereinigten Proteine aufgetragen wurde, bewiesen werden (Fig. 6A). Auf dieselbe Weise wurde die identische elektrophoretische Mobilität resp. das Molekulargewicht der zu vergleichenden Proteine auf 0.1 % SDS-Polyacrylamid-Gelen gezeigt (Fig. 6B). Ein weiterer Beweis für die Identität von M-line-Protein und MM-CPK ist die identische elektrophoretische Mobilität der einzelnen, durch vorhergehende Bromcyan-Spaltung der beiden Proteine erhaltenen Peptidfragmente (Fig. 6C).

Fig. 5 *

Vergleich der elektrophoretischen Mobilität von MM-CPK und M-line-Protein in verschiedenen Elektrophorese-Systemen

A) Disk-Gel-Elektrophorese von M-line-Protein während verschiedener Stadien der Reinigung von M-line-Protein (1 - 3) und von gereinigter MM-CPK (4). Alle Gele mit Amidoschwarz für Protein gefärbt.

- 1) Extrakt von Hühnerbrustmuskel mit Puffer von niedriger Ionenstärke (MOR. 2, ohne DTT; 80 µg Protein) nach Waschen mit Puffer von "physiologischer" Ionenstärke (MOR. 1 ohne DTT).
- 2) Neutralisierter Ueberstand nach Behandlung mit Essigsäure (50 µg Protein).
- 3) Ueberstand nach DEAE-Zellulose-Adsorption ("batch"-Verfahren), (15 µg Protein).
- 4) MM-CPK (50 µg).

B) Zellulose-polyacetat-elektrophorese von M-line-Protein und MM-CPK.

- a) 5 µg MM-CPK, gefärbt für MM-CPK-Aktivität.
- b) 2 µg M-line-Protein, gefärbt für MM-CPK-Aktivität.
- c) 2 µg M-line-Protein, gefärbt mit Amidoschwarz für Protein.

Gelman-SEPRAPHOR-III-Streifen wurde in 60 mM Na-Barbital-Puffer (pH 8.6), der 0.06 % 2-Mercapto-äthanol enthielt, äquilibriert. Elektrophoresen von Proben von ca. 2 µl, aufgetragen bei 0, wurden bei 4° C während 150 min bei 250 V durchgeführt. Die CPK-Aktivität wurde nach der spezifischen "Overlay-Gel"-Methode von DAWSON and EPPENBERGER '70 nachgewiesen.

*) TURNER, D. C., T. WALLIMANN, and H. M. EPPENBERGER 1973
P. N. A. S. 70 : 702-705

A



B

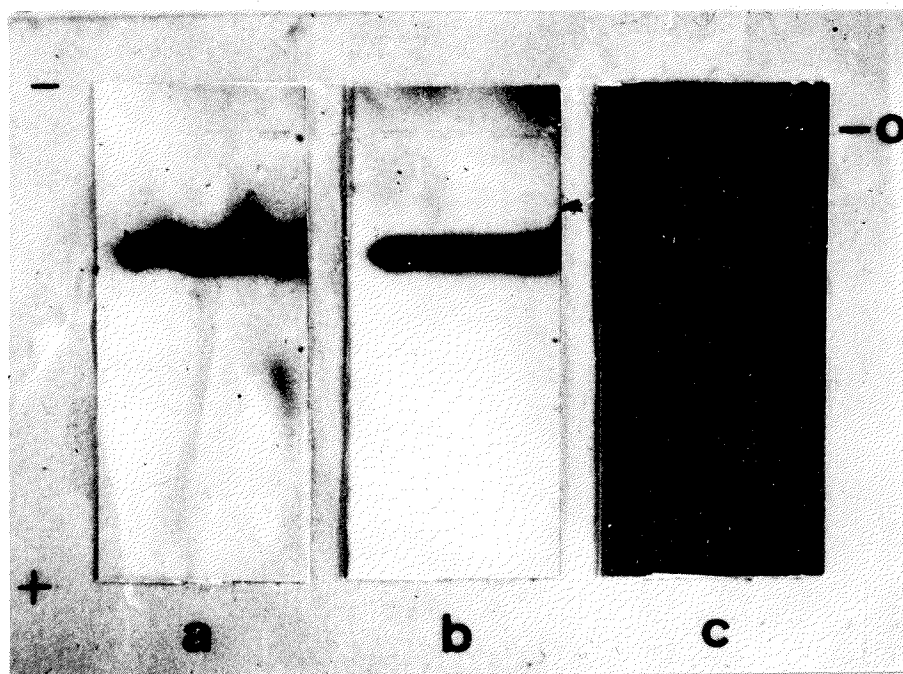


Fig. 6

Vergleich der elektrophoretischen Mobilität von BB-CPK, MM-CPK und M-line-Protein^{a)} in verschiedenen Elektrophorese-Systemen

A) Elektrophoretische Identität von M-line-Protein und MM-CPK und Unterschied in der elektrophoretischen Mobilität der beiden homodimeren CPK-Isoenzyme in einer 7.5 % Polyacrylamid-Disk-Gel-Elektrophorese.

- 1) (30 µg M-line-Protein)
- 2) (50 µg MM-CPK)
- 3) (1 plus 2)
- 4) (25 µg BB-CPK)
- 5) (25 µg BB-CPK plus 20 µg M-line-Protein)
- 6) (4 plus 5)

B) Elektrophoretische Identität und Homogenität der Untereinheiten von M-line-Protein und MM-CPK nach Elektrophorese in 7.5 % Polyacrylamid mit 0.1 % SDS.

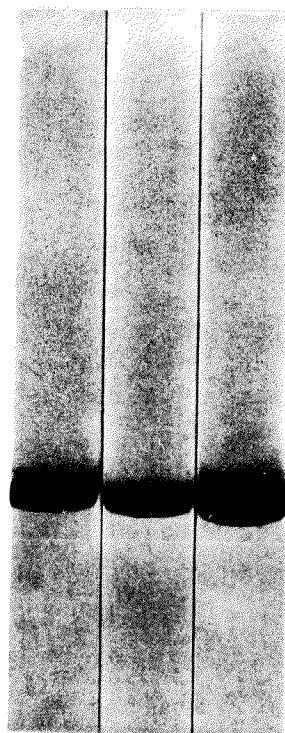
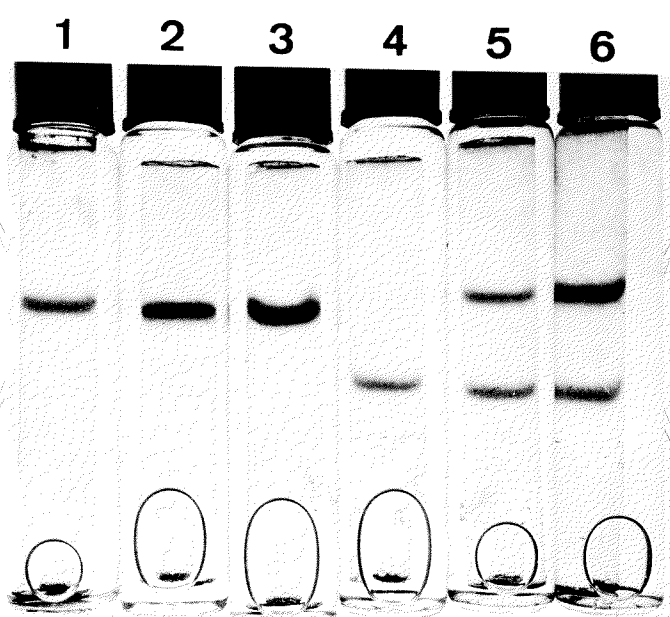
- 1) (60 µg MM-CPK)
- 2) (60 µg M-line-Protein)
- 3) (1 plus 2)

C) Identität der Bromcyan-Peptid-Muster beider Proteine nach Elektrophorese in 10 - 15 % Polyacrylamid, 4 M Harnstoff und 0.1 % SDS.

- 1) (70 µg MM-CPK nach BrCN-Spaltung)
- 2) (70 µg M-line-Protein nach BrCN-Spaltung)
- beide in 15 % Polyacrylamid
- 3) (wie 1)
- 4) (wie 2),
- aber beide in 10 % Polyacrylamid

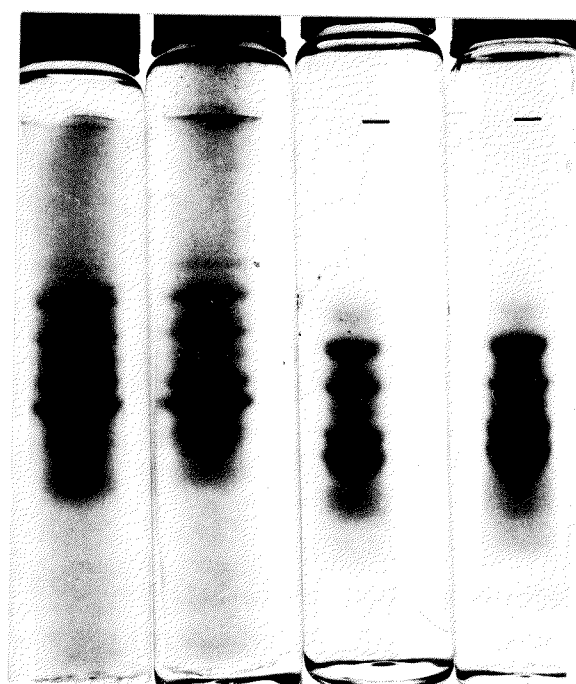
a) Das hier verwendete M-line-Protein war durch alle vier, unter "Reinigung von M-line-Protein" im Methodenteil beschriebenen Reinigungsschritte (incl. Behandlung mit DEAE-Zellulose) gereinigt worden.

A



1 2 3

B



1 2 3 4

C

4.5 Immunologische Evidenz für die Identität von M-line-Protein und MM-CPK sowie für die Reinheit der beiden Proteine

Beide Proteine wurden in Doppel-Immunodiffusions-Tests nach OUCHTERLONY '67 auf ihre Reaktion mit Anti-MM-CPK-Serum geprüft (Fig. 7). Die Präzipitinlinien der Anti-MM-CPK/M-line-Protein-Reaktion fusionierten auf beiden Seiten vollständig mit den Präzipitinlinien der Anti-MM-CPK/MM-CPK-Reaktion, wodurch die immunologische Identität der beiden Proteine bewiesen werden konnte. Ferner konnte in beiden Reaktions-Systemen nur je eine einzige Präzipitinlinie festgestellt werden.

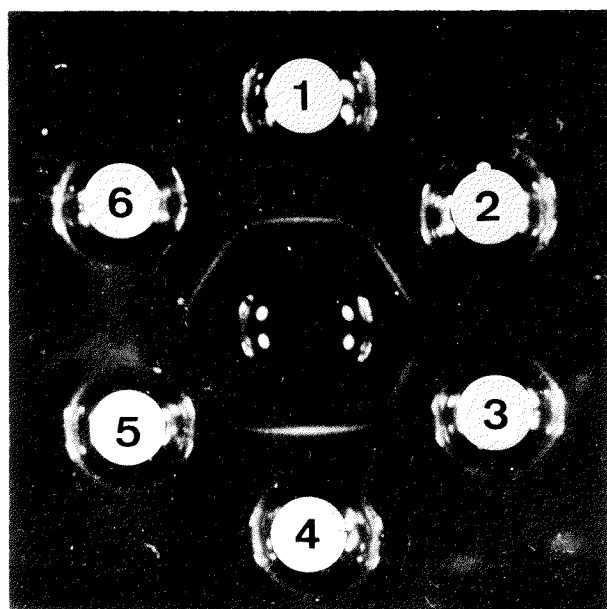
Fig. 7*

Doppel-Immundiffusionstest als Kriterium für die immunologische
Identität von M-line-Protein und MM-CPK

Immunologische Identität von M-line-Protein und MM-CPK in
einem Doppel-Immundiffusionstest. Die zentrale Vertiefung
enthielt Anti-MM-CPK-Serum.

MM-CPK: in den Löchern 1 (12 μg), 3 (6 μg) und 5 (3 μg);
M-line-Protein, gereinigt durch den 0.2 M Essigsäureschritt
bei pH 5.0, : in den Löchern 2, 4 und 6 (je 6 μg).

*) TURNER, D. C., T. WALLIMANN, and H. M. EPPENBERGER (1973)
P. N. A. S. 70: 702-705.



4.6 Waschversuche mit Hühner-Brustmuskelfibrillen

Die ersten zwei Schritte der Methode von MORIMOTO and HARRINGTON '72, aus zerkleinertem Muskelgewebe M-line-Protein zu reinigen, bestehen

- 1) in sehr gutem Waschen desselben mit Puffer von relativ hoher Ionenstärke (0.1 M KCl in 20 mM K-Phosphat-Puffer, pH 7.0), um alle "löslichen" Proteine zu entfernen (im folgenden "Waschen" genannt) und
- 2) in einer Extraktion des M-line-Proteins mit Puffer von niedriger Ionenstärke (5 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7.7) (im folgenden "Extraktion" genannt).

Wie in Tabelle II gezeigt wird, werden ca. 76 % der CPK durch Waschen des zerkleinerten Muskelgewebes entfernt, während der Rest von ca. 24 % im zweiten Schritt bei niedriger Ionenstärke extrahiert wird (TURNER et al. '73). In ähnlichen Experimenten, wo anstatt mit ganzen Stücken von zerkleinertem Muskelgewebe mit Hühner-Brustmuskelfibrillen, die durch differentielle Zentrifugation eines Homogenates von Brustmuskelgewebe gereinigt worden waren, gearbeitet wurde, fand man nach 9-maligem Waschen noch immer ca. 7 % der totalen CPK-Aktivität des Homogenates an das Myofibrillenpellet gebunden (Fig. 8). Diese myofibrillär gebundene CPK konnte durch eine einzige Extraktion mit Puffer von niedriger Ionenstärke quantitativ entfernt werden (Fig. 8 und 12e). Die Extraktion bei niedriger Ionenstärke ist von einem starken Quellen der Myofibrillen begleitet, wobei die M-Linien-Struktur der Myofibrillen extrahiert wird (Fig. 15).

Um die Spezifität der Bindung von CPK an die Myofibrillen zu testen, wurden Waschexperimente mit verschiedenen Puffern und physiologischen Salzlösungen, wie sie für die Kultur von Muskelzellen "in vitro" gebraucht werden, durchgeführt. Allen Puffern wurde zusätzlich 1 mM Dithiothreitol zugegeben. Pufferlösungen,

die Substrate und Kofaktoren der CPK-Reaktion im K_m -Bereich enthielten, wurden ebenfalls getestet. Die Resultate dieser Versuche sind in Tabelle III wiedergegeben. Während die myofibrillär gebundene CPK mit Puffer von niedriger Ionenstärke, MOR. 2 (1 mM DTT in 5 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7.7) quantitativ aus einem gut gewaschenen Myofibrillenpellet extrahiert werden konnte, löste sich nur ein kleiner Teil des myofibrillär gebundenen Enzymes bei der Anwendung von Puffer von relativ hoher Ionenstärke resp. von physiologischen Salzlösungen oder Substraten. Ca. 7 % der totalen CPK-Aktivität von Hühner-Brustmuskelgewebe sind also fest an myofibrilläre Strukturen gebunden. Die 7 % gebundene CPK dürften dabei einen unteren Grenzwert darstellen, weil bei jeder Waschung in Puffer von relativ hoher Ionenstärke auch ein kleiner Teil der myofibrillären CPK in Lösung geht (Fig. 8 und Tabelle III). Bei der differentiellen Zentrifugation zur Herstellung von Myofibrillen musste insofern ein Kompromiss zwischen der Reinheit des Myofibrillenpellets und dem Verlust an kleineren Myofibrillen gemacht werden, indem man die Einbusse an kleinen Myofibrillen während der Waschprozedur in Kauf nahm. Bei Waschexperimenten mit MOR. 1 (0.1 M KCl, 1 mM DTT in 20 mM K-Phosphat-Puffer, pH 7.0) wurden mehrmals Werte von 7 - 10 % -, bei Waschungen mit SOL. A (0.1 M KCl, 1 mM DTT, 1 mM EGTA, 5 mM EDTA-Puffer, pH 7.0) Werte von 5 - 7 % myofibrillär gebundener CPK gefunden.

Fig. 8

Myofibrilläre CPK in Hühner-Brustmuskelfibrillen

Bindungsstudie von CPK an ein Myofibrillenpellet von adultem Hühner-Brustmuskel, das durch differentielle Zentrifugation erhalten wurde (siehe Methoden). Die CPK-Aktivität der Total-Suspension, gemessen nach jeder Waschung (schwarz und weiss), wurde verglichen mit der CPK-Aktivität im Ueberstand nach der Zentrifugation derselben Suspension (schwarz).

- | | |
|-------------|---|
| C | Homogenat 1/100 W/V in Puffer mit rel. hoher Ionenstärke, SOL. A (0.1 M KCl, 1 mM DTT, 1 mM EGTA, 5 mM EDTA-Puffer, pH 7.0). |
| $H_1 - H_9$ | Aufeinanderfolgende Waschungen mit SOL. A; bei den letzten Waschungen konnte nur noch sehr wenig CPK-Aktivität im Ueberstand festgestellt werden. |
| L | Extraktion während 45 min in Puffer von niedriger Ionenstärke, MOR. 2 (1 mM DTT, 5 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7.7). Die gebundene CPK wird quantitativ von den Myofibrillen abgelöst. |
| H_{10} | Letzte Waschung in SOL. A. Nur sehr wenig CPK ist noch gebunden oder frei. |

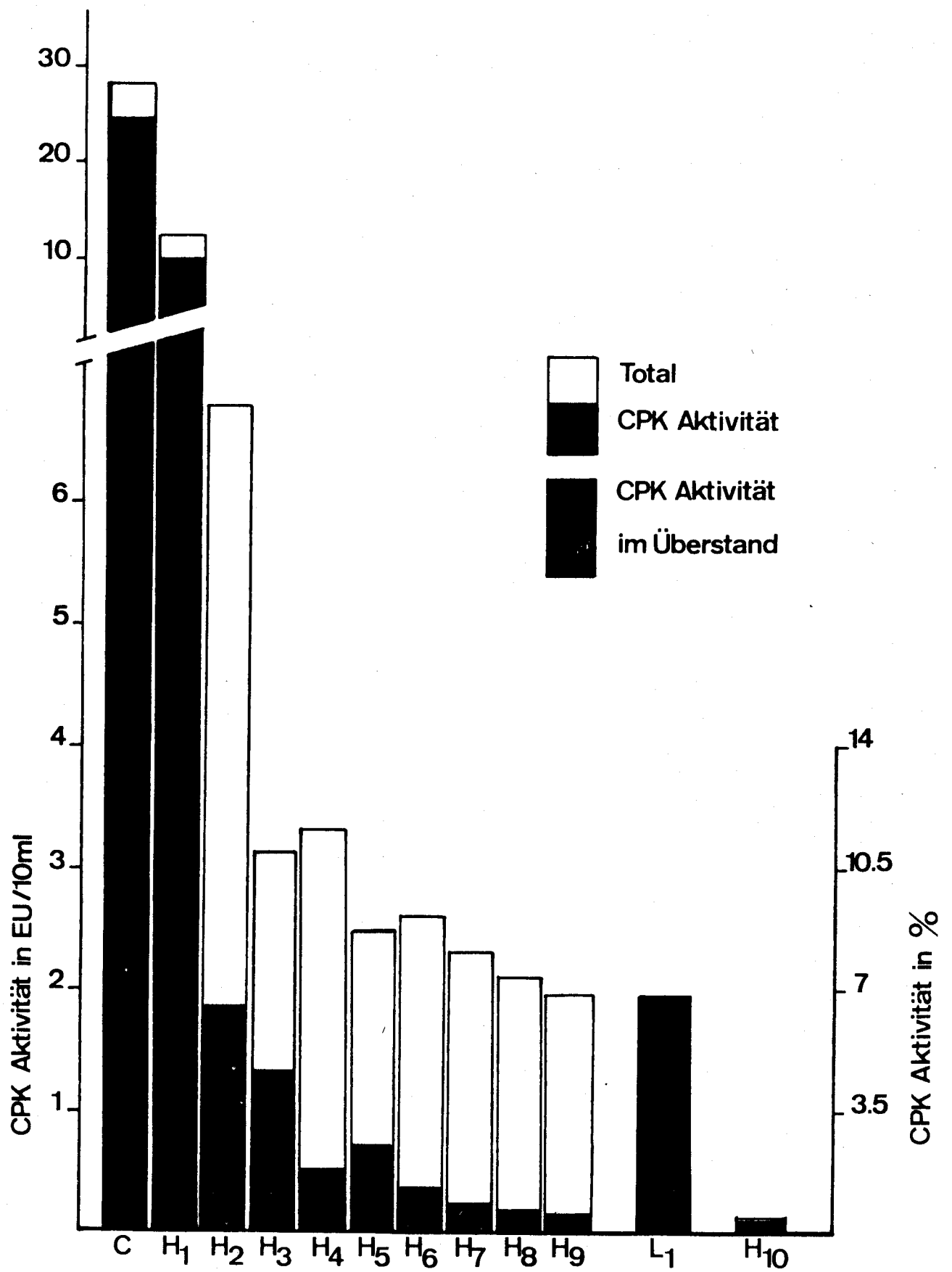


TABELLE III

Extrahierbarkeit von myofibrillärer CPK aus Hühner-Skelettmuskelfibrillen durch verschiedene "Wasch- resp. Extraktionslösungen".^{a)}

	% CPK im Ueberstand (max.)
1) 0.1 M KCl, 1 mM DTT, 1 mM EGTA, 5 mM EDTA-Puffer, pH 7.0, 4° C (SOL.A)	20 ^{b)}
2) 0.1 M KCl, 1 mM DTT, 20 mM K-phosphat-Puffer, pH 7.0, 4° C (MOR.1)	13
3) Gepufferte Salz-Lösung (BSS, Simms)	19
4) Minimal Medium (MEM, Eagle)	15
5) 0.1 M KCl, 6.5 mM Creatin-P, 1.5 mM ADP 0.1 M Tri-äthanolamin-HCl, pH 7.2	30
6) 0.1 M KCl, 15 mM Creatin, 2.5 mM ATP, 0.1 M Glycin, pH 8.6	13
7) 1 mM DTT, 5 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7.7, 4° C (MOR.2)	100 ^{c)}

a) Aliquote Teile eines Myofibrillensediments, das 6 mal mit Puffer 1) (SOL.A) gewaschen wurde, wurden während 90 min in den angegebenen "Wasch- resp. Extraktionslösungen" bei 4 Grad C unter Rotation inkubiert, zentrifugiert. Anschliessend wurde die CPK-Aktivität im Ueberstand gemessen.

b) Kontrollwert: Eine gewisse Menge von gebundener CPK geht selbst nach 6 vorhergehenden Waschungen mit diesem kontraktionshemmenden Waschpuffer (SOL.A) in Lösung.

c) Kontrollwert: praktisch 100 % der myofibrillären CPK wird durch diesen Extraktionspuffer (MOR.2) bei niedriger Ionenstärke extrahiert.

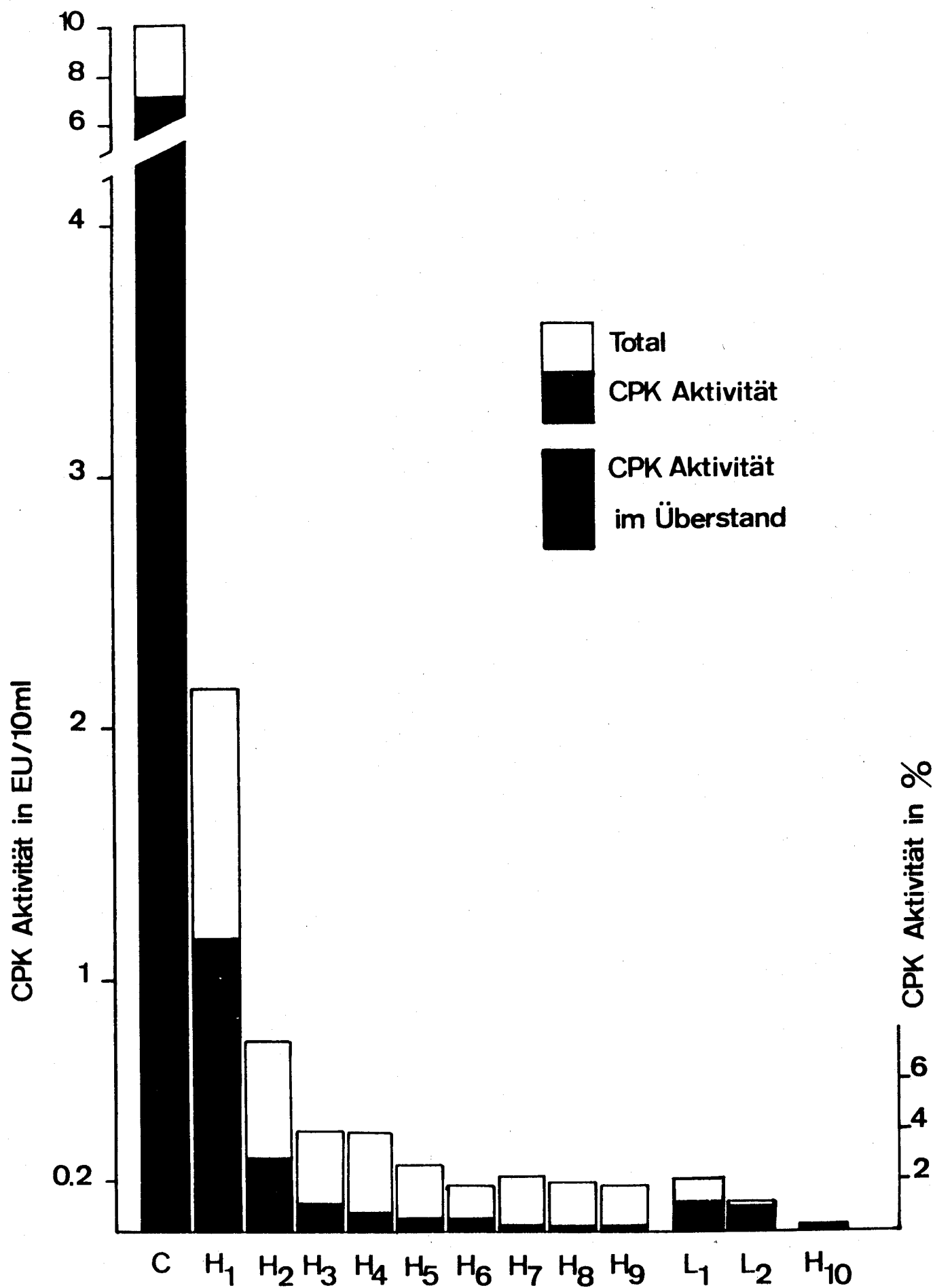
4.7 Waschversuche mit Hühner-Herzmuskelfibrillen

Wenn Herzmyofibrillen mehrere Male mit denselben Puffern wie Skelettmyofibrillen (MOR. 1 oder SOL. A) gewaschen wurden, blieben ca. 3 % der totalen CPK-Aktivität eines Homogenates von Herzmuskelgewebe unter diesen Bedingungen fest an myofibrilläre Strukturen gebunden. Wie bei Skelettmyofibrillen konnte die CPK-Aktivität durch Puffer von niedriger Ionenstärke (MOR. 2) quantitativ extrahiert werden, allerdings erst nach zweimaliger Extraktion während 45 min. Die Total-CPK-Aktivität von Herzmuskelgewebe beträgt etwa ein Drittel derjenigen von Brustmuskelgewebe, d.h. im Herzmuskelgewebe vom Huhn sind ca. 10 mal weniger CPK-Moleküle an die Myofibrillen gebunden als im Skelettmuskelgewebe.

Fig. 9

Myofibrilläre CPK in Hühner-Herzmuskelfibrillen

Bindungsstudie von CPK an ein Myofibrillenpellet von adultem Hühner-Herzmuskel, das durch differentielle Zentrifugation erhalten wurde (siehe Methoden). Bezeichnungen und experimentelles Vorgehen wie in Fig. 8, mit der Ausnahme, dass zwei Extraktionen von 45 min mit Puffer von niedriger Ionenstärke (MOR. 2) nötig waren, um die gebundene CPK von den Myofibrillen abzulösen.



4.8 Histochemische Lokalisation von CPK

Um zu zeigen, dass tatsächlich ein Teil der CPK an die Strukturen der Myofibrillen gebunden ist (Fig. 8 und 9), und um M-line-Protein und MM-CPK bezüglich ihrer Lokalisation in den Myofibrillen zu vergleichen, wurden zuerst histochemische und später immunologische Lokalisationsmethoden angewendet.

Fig. 10 zeigt Formazan als dunkles Reaktionsprodukt (CPK-Nachweisreaktion nach DAWSON and EPPENBERGER '70), in Uebereinstimmung mit den Resultaten von KHAN et al. '71, vorallem im intermyofibrillären Raum ("lösliche" CPK), aber auch im Bereich der Myofibrillen selbst (myofibrilläre CPK).

KHAN et al. '71 führten diese Untersuchungen nur an Querschnitten von Skelettmuskeln durch. In den mikroskopischen Hellfeldaufnahmen von Muskel-längsschnitten ist eine deutliche Querstreifung sichtbar. Mit dieser Methode konnte die Lokalisation der CPK in den Myofibrillen aber nicht genau bestimmt werden, da sich diese bei schockartigem Gefrieren des Muskelgewebes kontrahieren und dabei eine dunkle Kontraktionsbande (C_m) bilden (HAGOPIAN '70). Hierbei verschwindet das übliche quergestreifte Sarkomermuster von relaxierten Fibrillen (A- und I-Region, M- und Z-Linie), das allein eine eindeutige Lokalisation ermöglicht. Immerhin konnte auf Grund der nach der histochemischen CPK-Nachweisreaktion auftretenden Querstreifung (Fig. 10) gezeigt werden, dass ein Teil der CPK an den Myofibrillen von nativem Muskelgewebe lokalisiert ist.

Fig. 10

Histochemische Lokalisation von CPK in Gefrierdünn Schnitten
von adultem Hühner-Brustmuskel

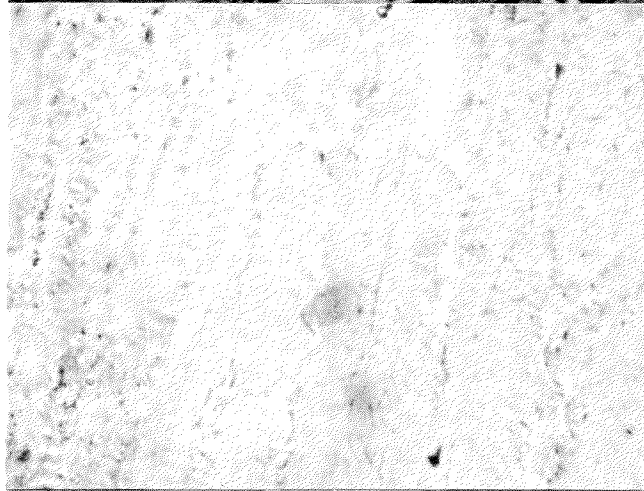
A) 5 μ m Gefrierschnitt (ca. 1200 mal vergrößert), angefärbt nach einer Methode von DAWSON and EPPENBERGER '70 durch Inkubieren unter einem 10 %igen Gelatine-Reaktionsgel mit CP als Substrat, bei Durchlicht-Hellfeldbeleuchtung aufgenommen.

B) Die Kontrolle ohne CP zeigt praktisch keine Querstreifung.

A



B



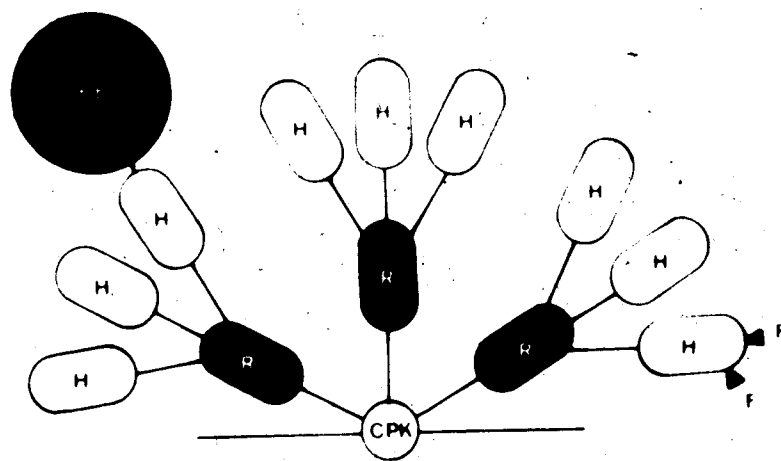
4.9 Lokalisation von CPK-Isoenzymen in isolierten Myofibrillen mit der indirekten Immunfluoreszenz- resp. Immunferritin-Technik

Der kontraktile Apparat von Muskelzellen kann unter gewissen Bedingungen in relaxiertem Zustand isoliert werden, dabei können Nachweismethoden mit Antikörpern, wie bereits von PEPE '66 beschrieben, direkt auf die isolierten Myofibrillen angewendet werden. Aus Gründen der höheren Empfindlichkeit und der grösseren Spezifität wurde die Methode der indirekten Immunfluoreszenz resp. der indirekten Immunferritin-Markierung angewandt. Eine schematische Darstellung dieser Techniken wird in Fig. 11 gezeigt.

Fig. 11

Schematische Darstellung der indirekten Immunfluoreszenz-
resp. Immunferritin-Technik

CPK	Hühner-MM- oder BB-CPK
R	Kaninchen-Anti-Hühner-MM- oder BB-CPK
HF	FITC-Konjugat (Pferde-Anti-Kaninchen-IgG mit FITC, Fluoreszein.iso-thio-cyanat ge- koppelt).
HFE	Ferritin-Konjugat (Pferde-Anti-Kaninchen-IgG mit Ferritin gekoppelt)



4.9.1 Lokalisation von CPK-Isoenzymen in Hühner-Skelettmuskelfibrillen

Der grösste Teil der CPK im Skelettmuskelgewebe des adulten Huhnes kommt als MM-CPK-Isoenzym vor. Zusätzlich konnte eine sehr kleine Menge des MB-CPK-Isoenzymes in diesem Gewebe gefunden werden (DAWSON '65; EPPENBERGER '70).

Wenn Hühner-Brustmuskelfibrillen mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz-Technik für M-CPK gefärbt werden, zeigen sie ein regelmässiges Muster von hell leuchtenden Fluoreszenzbanden, die in der HENSEN'schen H-Region, in der Mitte der anisotropen A-Banden des Skelettmuskelsarkomers lokalisiert werden konnten. Die Fig. 12a (Fluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahme sind überlagert) zeigt deutlich die Lokalisation von M-CPK in der Mitte der dunklen A-Bande, der H-Region, in deren Mitte die M-Linie lokalisiert ist. Elektronenmikroskopische Untersuchungen mit Hilfe der indirekten Immunferitin-Technik zeigten, dass diese M-CPK durchgehend durch die Myofibrillen-Struktur in der M-Linie (M) des Skelettmuskelfibrillen-Sarkomers lokalisiert ist (Fig. 16 - 19). Hühner-Skelettmyofibrillen besitzen im Gegensatz zu den Herzmyofibrillen immer eine gut sichtbare elektronendichte M-Linien-Struktur (Fig. 14 und Fig. 21). Entsprechende Versuche mit Anti-BB-CPK-Serum zeigen niemals eine Reaktion an der M-Linie. Daraus kann man schliessen, dass es sich bei der M-Linien-gebundenen M-CPK ausschliesslich um das MM-CPK-Isoenzym handelt. Fig. 12 zeigt Hühner-Brustmuskelfibrillen, an denen mit der indirekten Immunfluoreszenz-Technik,

- a) nach einmaligem Waschen -
- c) nach neunmaligem Waschen mit Puffer von relativ hoher, physiologischen

Bedingungen entsprechender Ionenstärke - und schliesslich

e) nach Extraktion während 45 min mit Puffer von niedriger Ionenstärke, M-CPK nachgewiesen wurde.

In den bereits besprochenen Waschversuchen mit Brustmuskelfibrillen wurde festgestellt, dass mindestens 7 % der gesamten CPK-Aktivität eines Brustmuskelhomogenates an myofibrilläre Strukturen gebunden vorliegt (Fig. 8). Durch die Lokalisationsversuche konnte nun gezeigt werden, dass es sich bei dieser myofibrillären CPK-Fraktion um spezifisch an die M-Linie von Myofibrillen gebundene MM-CPK handeln muss (Fig. 12a, c und Fig. 16 - 18). Mindestens 7 % der gesamten CPK-Aktivität von Hühner-Brustmuskelgewebe ist also in der M-Linie der Brustmuskelfibrillen gebunden. Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz-Lokalisationsmethode konnte in Übereinstimmung mit den Waschversuchen (Fig. 8) gezeigt werden, dass die M-Linien-gebundene CPK auch nach sehr intensivem Waschen mit Puffer von relativ hoher, physiologischen Bedingungen entsprechender Ionenstärke nicht aus der M-Linie herausgelöst werden kann (Fig. 12c und Tabelle III). Erst durch eine Extraktion der Myofibrillen während 45 min mit 20 Volumen Puffer von niedriger Ionenstärke wird die M-Linien-gebundene MM-CPK quantitativ entfernt (Fig. 8, Fig. 12e und Tabelle III). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass gleichzeitig mit der Extraktion der M-Linien-gebundenen CPK auch die in intensiv gewaschenen Myofibrillen von Skelettmuskelgewebe sehr gut sichtbare M-Linien-Struktur (Fig. 14) vollständig verschwindet (Fig. 15). Durch Präinkubation der Myofibrillen mit Anti-MM-CPK-Serum konnte sowohl die Extraktion der M-Linien-Struktur als auch die Extraktion der M-Linien-gebundenen MM-CPK verhindert werden. Letztere Resultate stimmen mit den von MORIMOTO and

HARRINGTON '72 festgestellten Befunden über das Verhalten von M-line-Protein überein. Sie sind somit als weitere Beweise für die Identität von MM-CPK und M-line-Protein zu werten. Eine relativ kleine, aber signifikante Menge von MM-CPK, spezifisch gebunden in der M-Linien-Struktur von Hühner-Skelettmuskelfibrillen, ist damit nachgewiesen. Diese M-Linien-gebundene MM-CPK kann in Übereinstimmung mit den in der Literatur beschriebenen Daten über M-Linien-Proteine (KNAPPEIS and CARLSEN '68; KUNDRAT and PEPE '71; MORIMOTO and HARRINGTON '72; EATON and PEPE '72; EATON and MOCHAN '73) als integraler Bestandteil der M-Linien-Struktur betrachtet werden.

Unsere Versuche mit Myofibrillen von verschiedenen Skelettmuskeltypen des Huhnes zeigten, dass die M-Linien-gebundene MM-CPK sowohl in schnellen (fast-twitch)-Zuckermuskeln (M. pectoralis major, Fig. 12; M. posterior latissimus dorsi) und langsamen (slow-twitch)-Zuckermuskeln (Beinmuskulatur) als auch im langsam-tonischen (slow-tonic)-Muskel (M. anterior latissimus dorsi) des Huhnes vorkommt. Die Resultate dieser Versuche werden nicht gezeigt, da sowohl die Fluoreszenz- als auch die Phasenkontrastaufnahmen der Myofibrillen dieser verschiedenen Skelettmuskeltypen identisch sind mit den in Fig. 12a-g gezeigten Aufnahmen von Brustmuskelfibrillen.

Adulte Hühner-Brustmuskelfibrillen zeigten eine sehr schwache Reaktion mit Anti-BB-CPK-Serum in der Mitte der I-Region, wo sich die Z-Linie befindet, wenn sie für B-CPK gefärbt wurden (Fig. 26g). Zugleich konnte in Hühner-Brustmuskelfibrillen, die mit Anti-MM-CPK-Serum inkubiert worden waren, oft eine ebenfalls sehr schwache, aber spezifische Fluoreszenz in der Mitte der

I-Region festgestellt werden (Fig. 25c, e; Tabelle IV und TURNER et al. '73).

Auch in elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Brustmuskelfibrillen, die mit der indirekten Immunferritin-Methode zum Nachweis von M-CPK behandelt worden waren, konnte nach dem Dünnschneiden der Myofibrillen eine "lockere" Ferritinmarkierung der I-Region, in der Nähe der Z-Linie des Sarkomers, festgestellt werden (Fig. 16 und 17). Die Z-Linien-Region von Skelettmuskelfibrillen reagiert also schwach sowohl mit Anti-MM-CPK-Serum als auch mit Anti-BB-CPK-Serum. Es kann angenommen werden, dass es sich dabei um sehr kleine Mengen des MB-CPK-Isoenzyms handelt, das mit den beiden homodimer-spezifischen Antiseren (Anti-MM- resp. Anti-BB-CPK-Serum) reagieren kann (Tabelle IV). Tatsächlich können auch in adultem Skelettmuskelgewebe des Huhnes sehr kleine Mengen von MB-CPK gefunden werden.

Aus der Anzahl der Ferritinpunkte in Fig. 16 und 17 könnte man schliessen, dass im Vergleich zur Menge der M-Linien-gebundenen MM-CPK auch in der Z-Linien-Region von Skelettmuskelfibrillen eine relativ grosse Menge MB-CPK vorkommen muss. Um diese Resultate richtig zu interpretieren, muss auf den grundlegenden Unterschied der beiden angewendeten Methoden eingegangen werden. Die indirekte Immunfluoreszenzfärbung wurde an nativen Myofibrillen durchgeführt, welche anschliessend, ohne geschnitten zu werden, als intakte Myofibrillen im Fluoreszenz- resp. Phasenkontrastmikroskop beobachtet wurden. PEPE '68 weist darauf hin, dass diese Methode, angewandt für native Myofibrillen, mindestens semiquantitative Aussagen erlaubt, da die beobachtete Intensität der Fluoreszenz proportional zu der Menge der FITC-markierten Antikörper und somit zur Menge des nachzuweisenden Antigens ist. Kontraktionszustand und Vorbe-

handlung der Myofibrillen können aber aus verständlichen Gründen die Resultate in quantitativer und qualitativer Hinsicht wesentlich beeinflussen. PEPE '68 konnte auf Grund seiner Experimente mit FITC-markierten Anti-Myosin-Antikörpern aber auch zeigen, dass diese relativ schlecht in die Myofibrillen eindringen können und vorallem an der Oberfläche derselben reagieren.

Die indirekte Immunferritinmarkierung wurde ebenfalls an nativen Myofibrillen durchgeführt. Diese wurden aber anschliessend nach den in der Elektronenmikroskopie üblichen Verfahren eingebettet und dünngeschnitten. Eine Myofibrille von ca. 1 μm Durchmesser kann in ca. 20 Längsschnitte von ca. 500 $\text{\AA}$ geschnitten werden. Aus der Verteilung und der Anzahl der Ferritinpunkte in einem solchen Dünnschnitt können aber infolge der erschwerten Permeation der Antikörper in die nativen Myofibrillen keine quantitativen Aussagen gemacht werden. Je nachdem ob der Längsschnitt aus einer peripheren oder zentralen Region der Myofibrille stammt, kann in ein und derselben Region des Sarkomers eine stärkere oder schwächere Ferritinmarkierung festgestellt werden. Zudem muss angenommen werden, dass die Antikörper infolge struktureller Unterschiede im Aufbau der Myofibrillen unterschiedlich gut in verschiedene Regionen (z.B. M- oder Z-Linie) der Myofibrillen eindringen können. Ein quantitativer Vergleich der Intensität der Ferritinmarkierung zweier verschiedener Regionen des Sarkomers ist deshalb nicht aussagekräftig. Die Immunferritin-Technik stellt aber ein qualitativ empfindlicheres Nachweissystem mit besserer Auflösung der Lokalisation dar, während die Immunfluoreszenz-Methode mindestens semiquantitative Aussagen zulässt. Erst ein Vergleich der Resultate nach Anwendung beider Methoden erlaubt eine sowohl quantitativ als auch qualitativ eindeutige Interpretation des Sachverhaltes.

Durch einen derartigen Vergleich der besprochenen Resultate, die mit der indirekten Immunfluoreszenz- und mit der indirekten Immunferritin-Technik erhalten wurden (Fig. 12a, c; Fig. 25c, e; Tabelle IV; Fig. 16 - 19; Fig. 26g), kann mit Sicherheit gesagt werden, dass praktisch alle myofibrillär gebundene M-CPK von Skelettmuskelfibrillen als MM-CPK in der M-Linie gebunden vorliegt, während im Vergleich dazu eine sehr kleine, praktisch zu vernachlässigende Menge von MB-CPK in der Z-Linien-Region gebunden ist.

M-CPK konnte mit der indirekten Immunferritinmarkierung auch im Transversal-Tubulus-System von adultem Hühner-Brustmuskelgewebe lokalisiert werden (Fig. 20).

4.9.2 Lokalisation von CPK-Isoenzymen in Hühner-Herzmuskelfibrillen

Im Herzmuskelgewebe des adulten Huhnes findet sich vorallem das BB-CPK-Isoenzym. Nur eine kleine Menge des BM-CPK-Isoenzym konnte in diesem Gewebe gefunden werden (DAWSON et al. '65; EPPENBERGER et al. '70).

Nach einer Inkubation von Herzmuskelfibrillen mit Anti-BB-CPK-Serum und FITC-Konjugat zeigte sich ein regelmässiges Muster von Fluoreszenzbanden in der Mitte der I-Region, wo sich die Z-Linie befindet (Fig. 13a). Elektronenmikroskopische Untersuchungen mit Hilfe der indirekten Immunferritin-Technik zeigten, dass diese B-CPK durchgehend durch die Myofibrillen-Struktur auf beiden Seiten der dunkel erscheinenden Z-Linie (Z) des Sarkomers von Herzmuskelmyofibrillen lokalisiert ist (Fig. 21 und 22). Entsprechende Versuche mit Anti-MM-CPK-Serum zeigten keine Reaktion an der Z-Linie. Es muss sich bei der

Z-Linien-gebundenen CPK also um das BB-Isoenzym handeln.

In Uebereinstimmung mit SOMMER and JOHNSON '69 wurden in Hühner-Herzmyofibrillen in der H-Region (H) keine elektronenoptisch sichtbare M-Linien-Struktur gefunden (Fig. 21 und 22).

Fig. 13 zeigt Hühner-Herzmyofibrillen, die mit der indirekten Immunfluoreszenz-Technik,

- a) nach einmaligem Waschen -
- c) nach neunmaligem Waschen mit Puffer von relativ hoher, physiologischen Bedingungen entsprechender Ionenstärke - und
- e) nach Extraktion während 90 min mit Puffer von niedriger Ionenstärke, mit Anti-BB-CPK-Serum und FITC-Konjugat inkubiert worden sind.

In den Waschexperimenten mit Hühner-Herzmuskelfibrillen (Fig. 9) wurde eine myofibrillär gebundene Fraktion von CPK von mindestens 3 % der gesamten CPK-Aktivität eines Herzmuskelextraktes gefunden. Aus den Resultaten der Lokalisationsstudien mit der indirekten Immunfluoreszenz - resp. Immunferritin-Technik kann man schliessen, dass es sich dabei um an die Z-Linie gebundene BB-CPK handeln muss. Die gebundene BB-CPK wird auch durch sehr intensives Waschen mit Puffer von relativ hoher, physiologischen Bedingungen entsprechender Ionenstärke nicht aus der Z-Linie herausgelöst (Fig. 13c). Erst eine Extraktion während 90 min mit 20 Volumen Puffer von niedriger Ionenstärke entfernt die Z-Linien-gebundene BB-CPK quantitativ (Fig. 13e). Diese Extraktion der Z-Linien-gebundenen BB-CPK konnte durch vorhergehende Inkubation der Herzmyofibrillen mit Anti-BB-CPK-Serum verhindert werden (vergl. Skelettmuskelfibrillen). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in Herzmyofibrillen des

adulten Huhnes eine kleine aber signifikante Menge von BB-CPK spezifisch auf beiden Seiten der Z-Linie gebunden ist (Fig. 13, 21 und 22).

Bei einem kleinen Prozentsatz von Herzmyofibrillen, die mit der indirekten Immunfluoreszenz-Technik für B-CPK angefärbt wurden, konnten neben der an der Z-Linie auftretenden Fluoreszenz gleichzeitig auch Fluoreszenzbanden in der H-Region festgestellt werden (Fig. 13g, i). Zugleich zeigte ein kleiner Prozentsatz von Herzmuskelfibrillen, wenn sie nach derselben Methode für M-CPK angefärbt wurden, auch deutliche Fluoreszenzbanden in der H-Region (Fig. 13h, k). Die H-Region eines kleinen Prozentsatzes von Herzmyofibrillen reagierte also deutlich sowohl mit Anti-MM-CPK-Serum als auch mit Anti-BB-CPK-Serum. Die einfachste Erklärung wäre, dass es sich bei der in der H-Region gebundenen CPK um das MB-Isoenzym handelt, das mit beiden homodimer-spezifischen Antisera reagieren kann. Tatsächlich wurde MB-CPK, wie bereits erwähnt, in kleinen Mengen in Hühner-Herzmuskelgewebe gefunden. Es gibt Hinweise dafür, dass es sich bei diesem kleinen Prozentsatz von Herzmyofibrillen um solche eines andern Herzmuskelzelltyps handelt (siehe Diskussion, PURKINJE-Zellen).

Da in der Z-Region des Sarkomers kein Myosin vorkommt, muss die Art der Bindung der BB-CPK an diese Struktur in den Herzmyofibrillen verschieden sein von derjenigen der MM-CPK, die an die M-Linie, in der Mitte der dicken Filamente (Myosin) von Skelettmuskelfibrillen, gebunden ist. Im Vergleich zu Skelettmuskelfibrillen besitzen Herzmuskelfibrillen nur ungefähr $\frac{1}{10}$ so viele myofibrillär gebundene, aktive CPK-Moleküle pro Gramm lyophilisierte Myofibrillen, wobei aber bei sehr niedrigen Substratkonzentrationen (CP, ADP) die Aktivität von BB-CPK im Vergleich zu MM-CPK wesentlich höher sein soll (WITTEVEEN '74).

Fig. 12

Lokalisation von MM-CPK in der H-Region von Hühner-Skelettmuskelfibrillen

Die Figur zeigt die Lokalisation von MM-CPK in der Mitte der dunkeln A-Bande von Hühner-Brustmuskelfibrillen, in der H-Region, wo sich die M-Linie befindet. Fluoreszenz- (linke) und entsprechende Phasenkontrastaufnahmen (rechte Kolonne) zeigen:

- a, b) einmal mit SOL. A gewaschene
- c, d) neunmal mit SOL. A gewaschene
- e, f) mit MOR. 2 extrahierte

Myofibrillen nach dem immunologischen Nachweis von M-CPK mit der indirekten Immunfluoreszenz-Technik. Durch wiederholtes Waschen der Myofibrillen mit Puffer von relativ hoher Ionenstärke, SOL. A (0.1 M KCl, 1 mM DTT, 1 mM EGTA, 5 mM EDTA-Puffer, pH 7.0) oder MOR. 1 (0.1 M KCl, 1 mM DTT, 20 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7.0), wird die myofibrillär-gebundene CPK nicht entfernt (a, c), während eine kurze Extraktion (45 min) mit Puffer von niedriger Ionenstärke, MOR. 2 (1 mM DTT, 5 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7.7) das myofibrillär gebundene Enzym quantitativ entfernt (e, vgl. auch Fig. 8).

- a) Fluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahme wurden überlagert;

H: H-Region, wo sich die M-Linie befindet

- a - d) ca. 1'700 mal vergrößert

- e - g) ca. 1'200 mal vergrößert

Als Vergleich zu den extrahierten Fibrillen bei 1'200-facher Vergrößerung (e und f) wird in g) eine nicht-extrahierte Fibrille im gleichen Vergrößerungsmaßstab gezeigt.

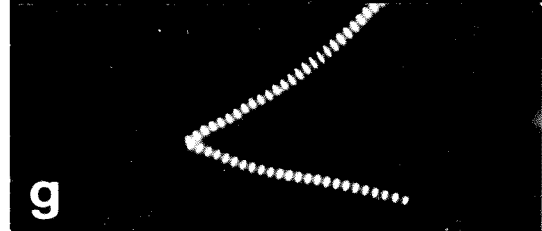
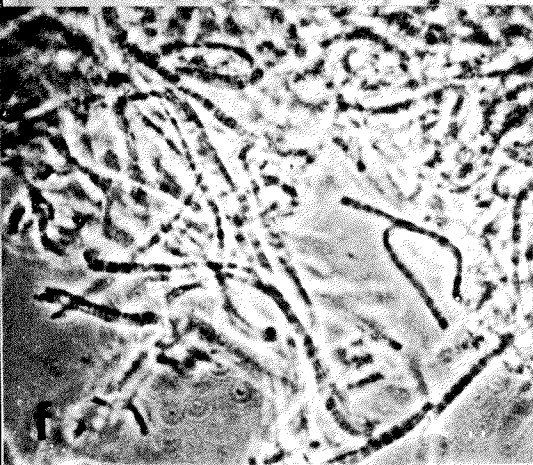
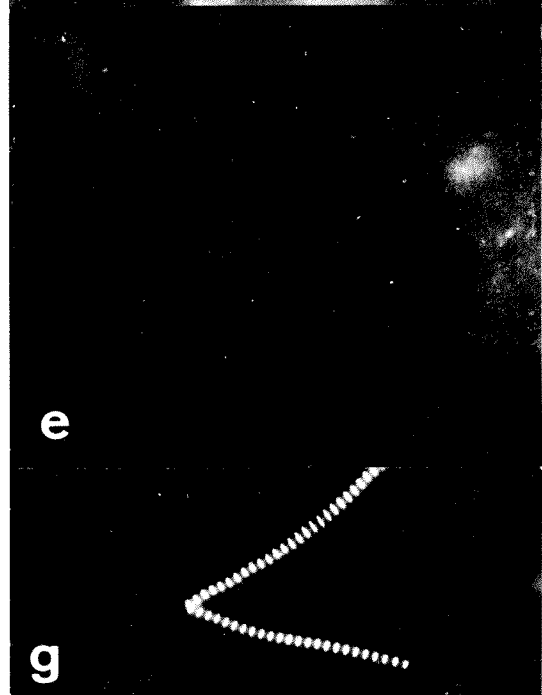
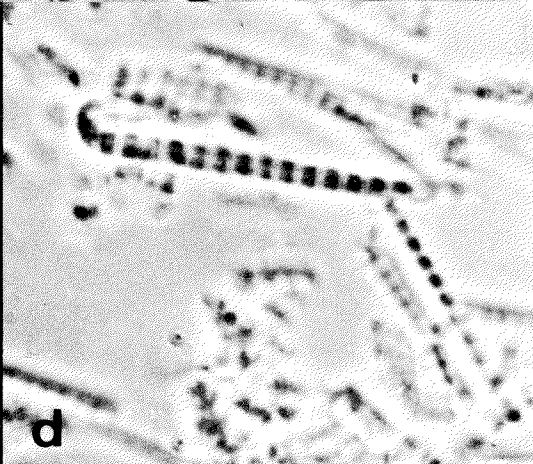
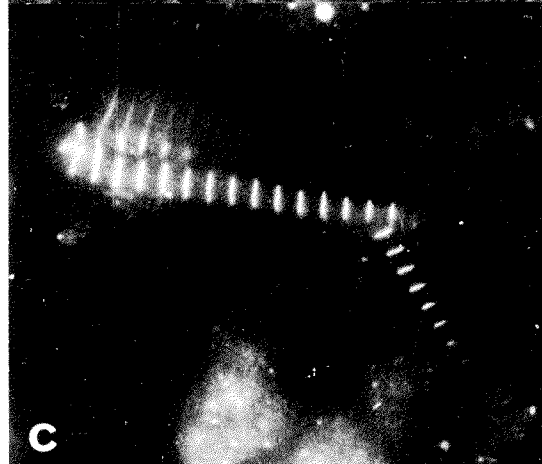
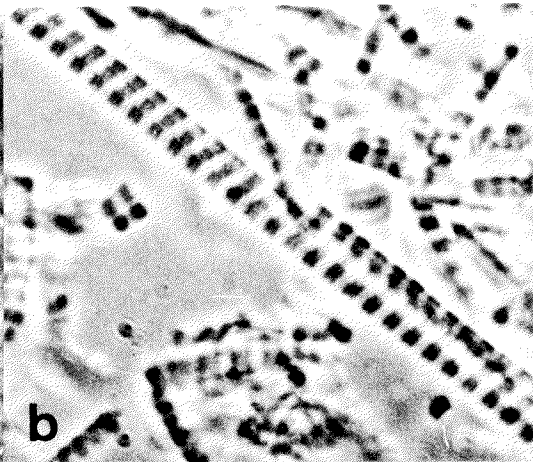
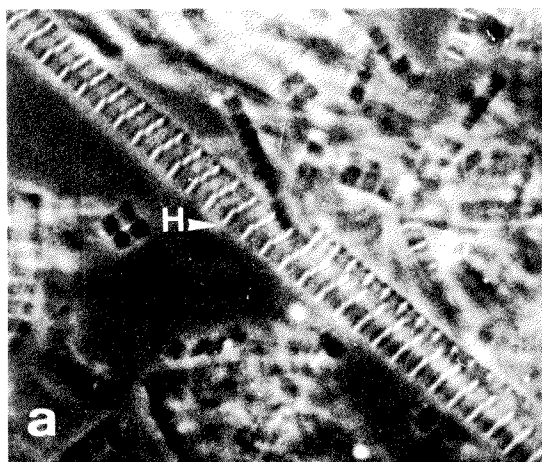


Fig. 13

Lokalisation von BB-CPK in der I-Region von Hühner-Herzmuskelfibrillen

Die Figur zeigt die Lokalisation von BB-CPK, die in regelmässigen Mustern an die I-Region gebunden ist:

a, b) einmal gewaschene

c, d) neunmal gewaschene

e, f) in Puffer von niedriger Ionenstärke während 90 min extrahierte Herzmuskelfibrillen.

Links jeweils die Fluoreszenz- und rechts die entsprechende Phasenkontrastaufnahme. Bedingungen wie in Fig. 12, BB-CPK bleibt auch nach sehr langem Waschen an die I-Region von Herzmyofibrillen gebunden (c, d), während sie ähnlich wie in Fig. 12 e) durch Extraktion bei niedriger Ionenstärke (90 min) quantitativ von den Myofibrillen losgelöst werden kann (e).

I: I-Region des Sarkomers; a) bis f) ca. 1.700 mal vergrössert.

Bei einem kleinen Prozentsatz von Herzmuskelfibrillen war CPK, wie bei Skelettmuskelfibrillen, auch in der H-Region vorhanden. Die in der H-Region gebundene CPK (Pfeile) reagiert sowohl mit Anti-B-CPK (g, i) als auch mit Anti-M-CPK (h, k). Es wird angenommen, dass es sich dabei um MB-CPK handelt (siehe Resultate).

g, i) ca. 1.700 mal vergrössert, h, k) ca. 1.200 mal vergrössert.

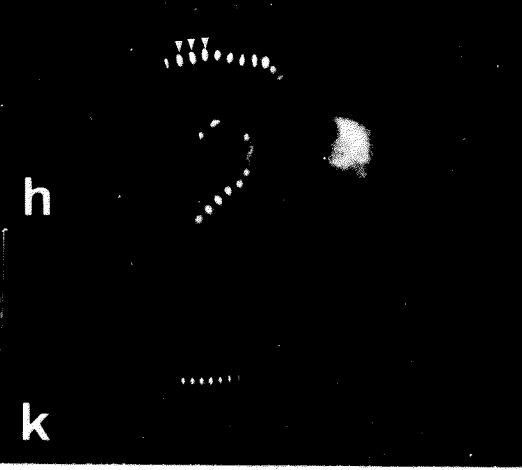
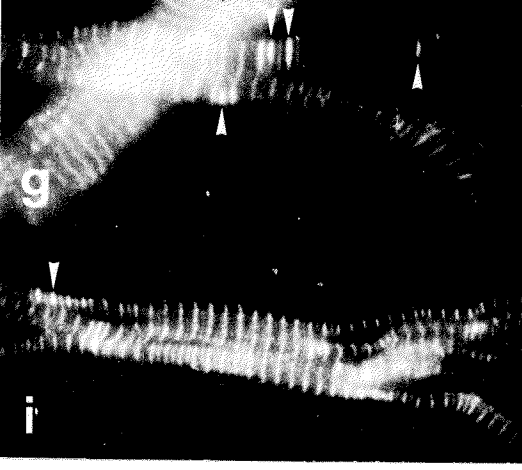
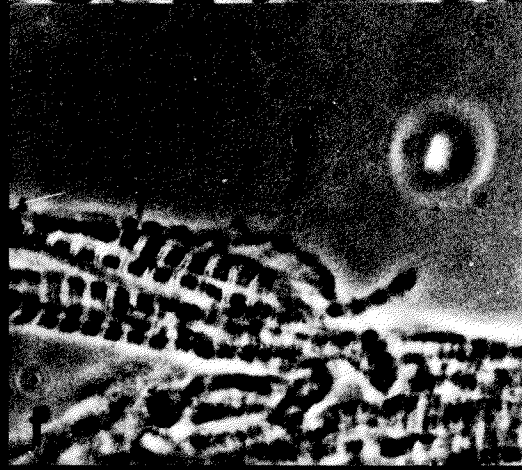
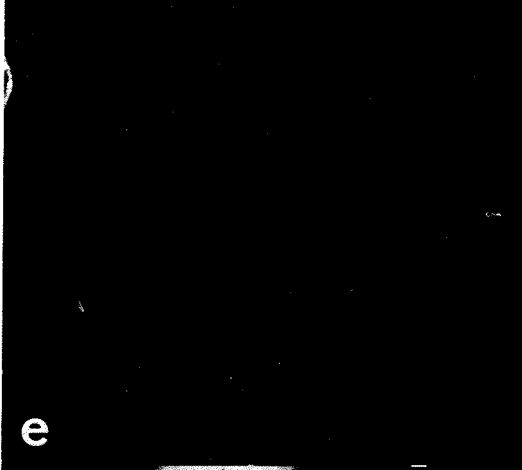
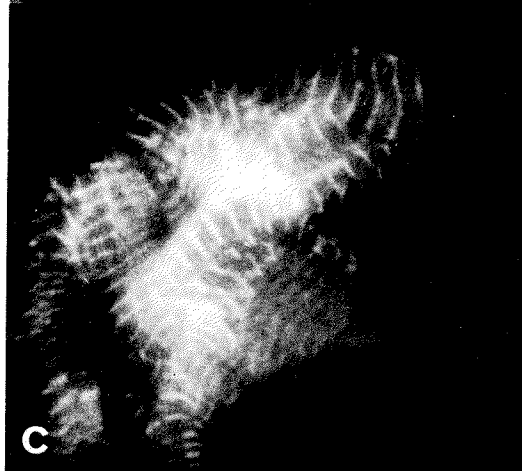
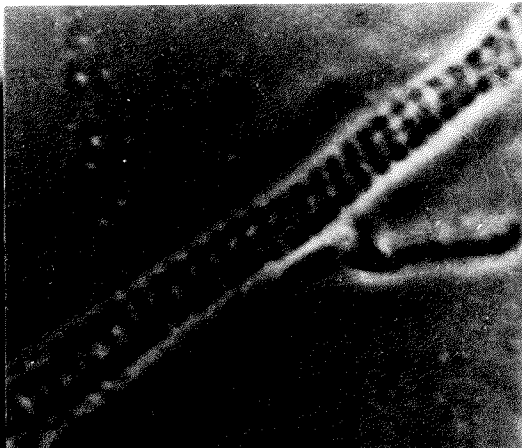
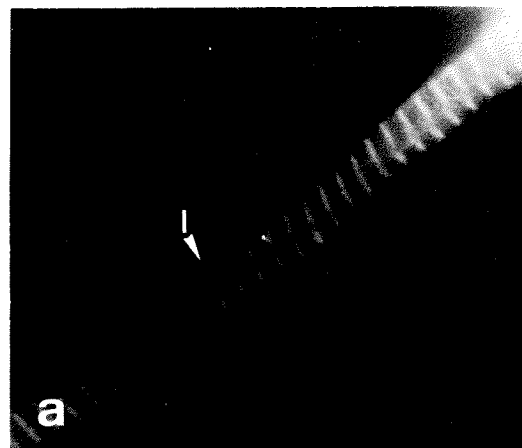


Fig. 14

Native, gewaschene Hühner-Skelettmuskelfibrille

Das elektronenmikroskopische Bild zeigt einen Dünnschnitt einer nativen, gut gewaschenen Hühner-Skelettmuskelfibrille. Die elektronendichte M-Linien-Struktur ist deutlich sichtbar.
M: M-Linie; Z: Z-Linie, ca. 90'000 mal vergrößert (ZEISS EM 9A)

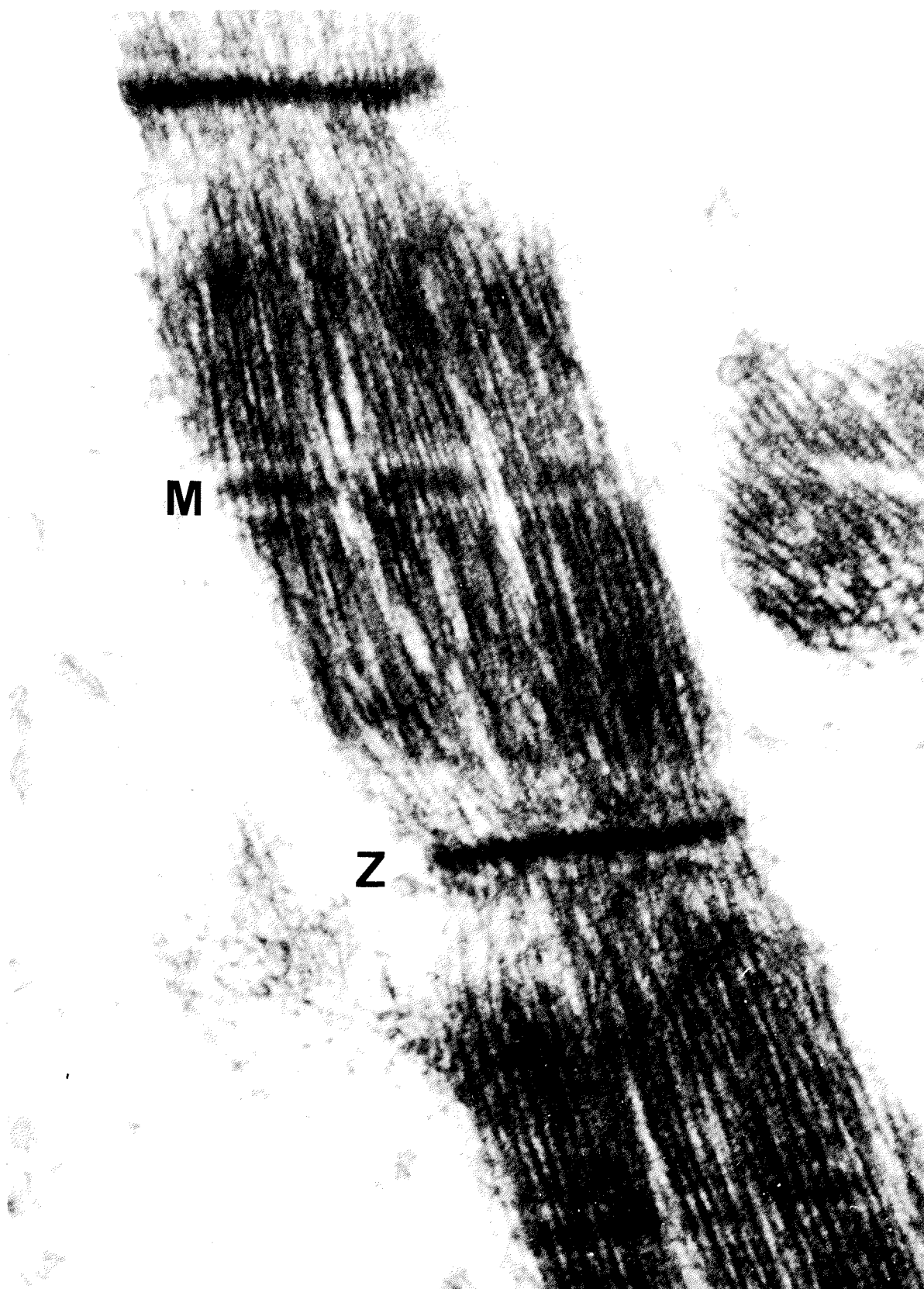


Fig. 15

Hühner-Skelettmuskelfibrillen mit extrahierten M-Linien

Das elektronenmikroskopische Bild zeigt einen Dünnschnitt von teilweise kontrahierten Hühner-Skelettmuskelfibrillen, die während 45 min in Puffer von niedriger Ionenstärke, MOR. 2 (1 mM DTT, 5 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7.7) extrahiert wurden.

Im Vergleich zu Fig. 14 ist deutlich der Verlust der elektronendichten M-Linien-Struktur in der Mitte der hellen H-Region (H) sichtbar.

Durch partielles Ueberlappen der dünnen Filamente (Aktin), als Folge des teilweise kontrahierten Zustandes der Myofibrillen, wird auf beiden Seiten der hellen H-Region eine dunkle Bande sichtbar. Zugleich mit dem Verschwinden der M-Linie wird auch die M-Linien-gebundene MM-CPK extrahiert (Fig. 8 und Fig. 12 e).

H: H-Region; ca. 90'000 mal vergrößert (ZEISS EM 9A).

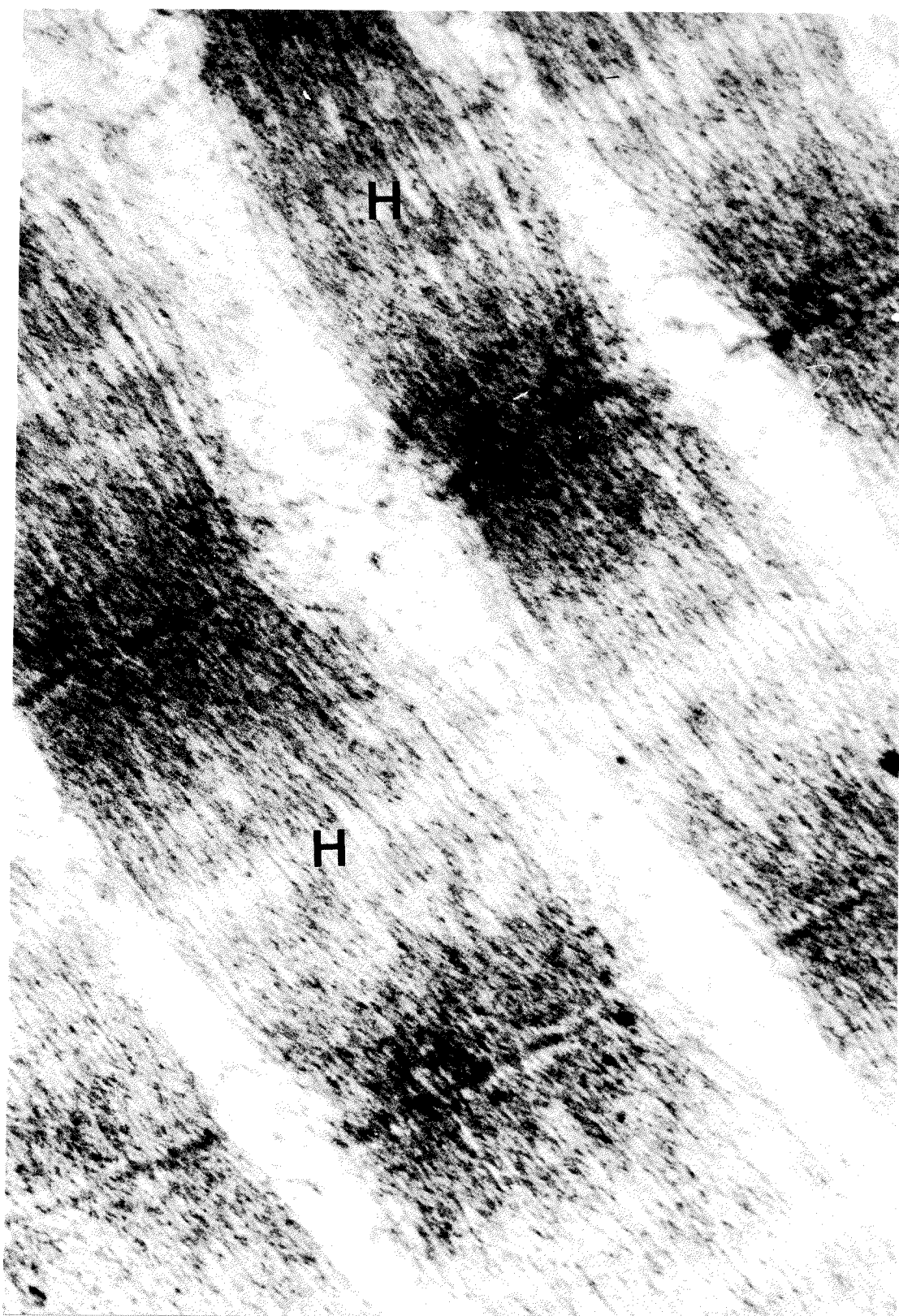


Fig. 16

Nachweis von M-CPK in Hühner-Brustmuskelfibrillen mit der indirekten
Immunferritin-Technik

Die elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt einen Dünnschnitt durch eine Hühner-Brustmuskelfibrille. Die immunologischen Reaktionen zum Nachweis von M-CPK wurden vor dem Dünnschneiden an nativen Myofibrillen durchgeführt. Deutlich ist die relativ dichte Ferritinmarkierung der M-Linie (M) auf einer Breite von ca. 500 Å sichtbar.

ca. 76'000 mal vergrößert (SIEMENS ELMISKOP 1)

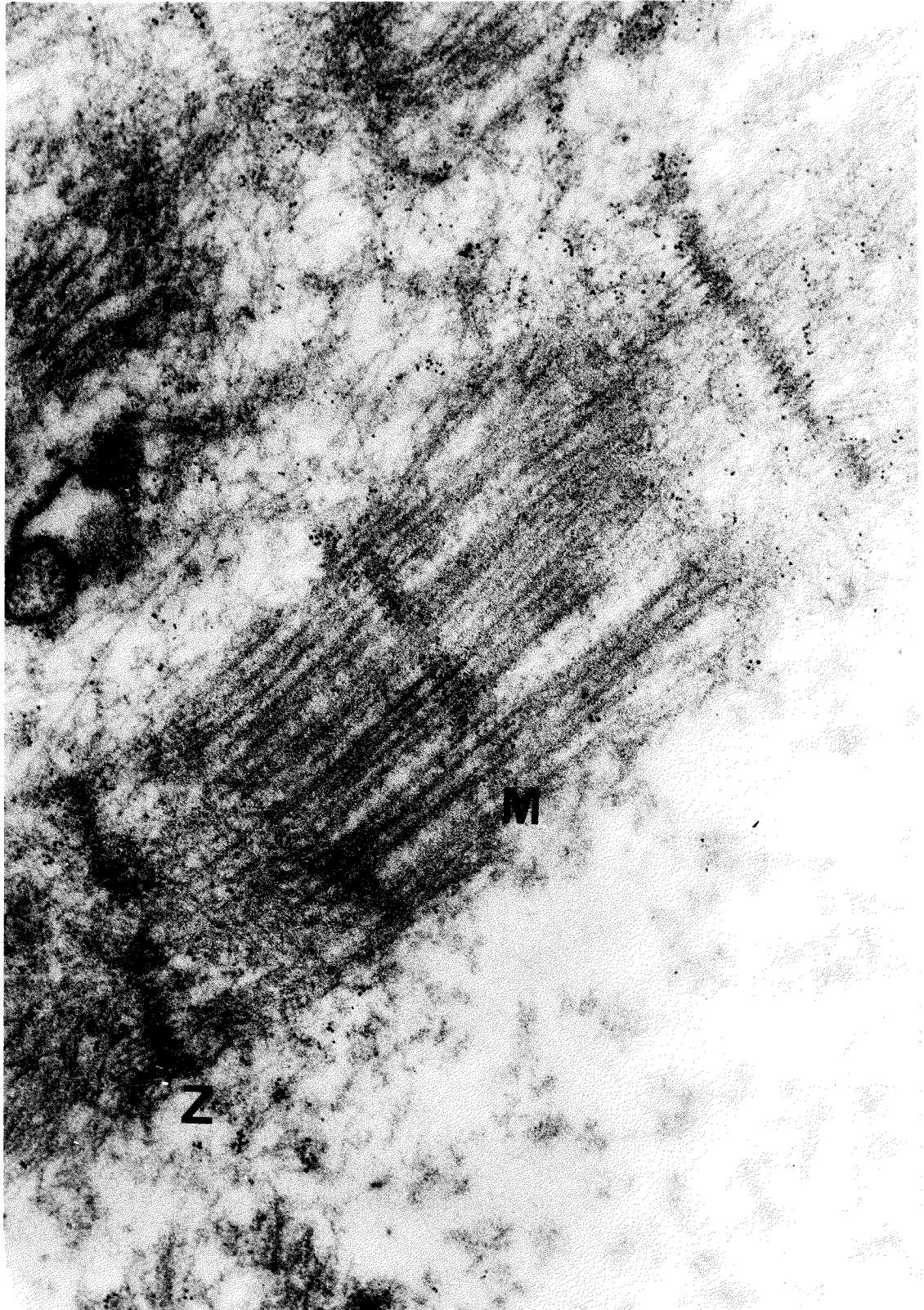
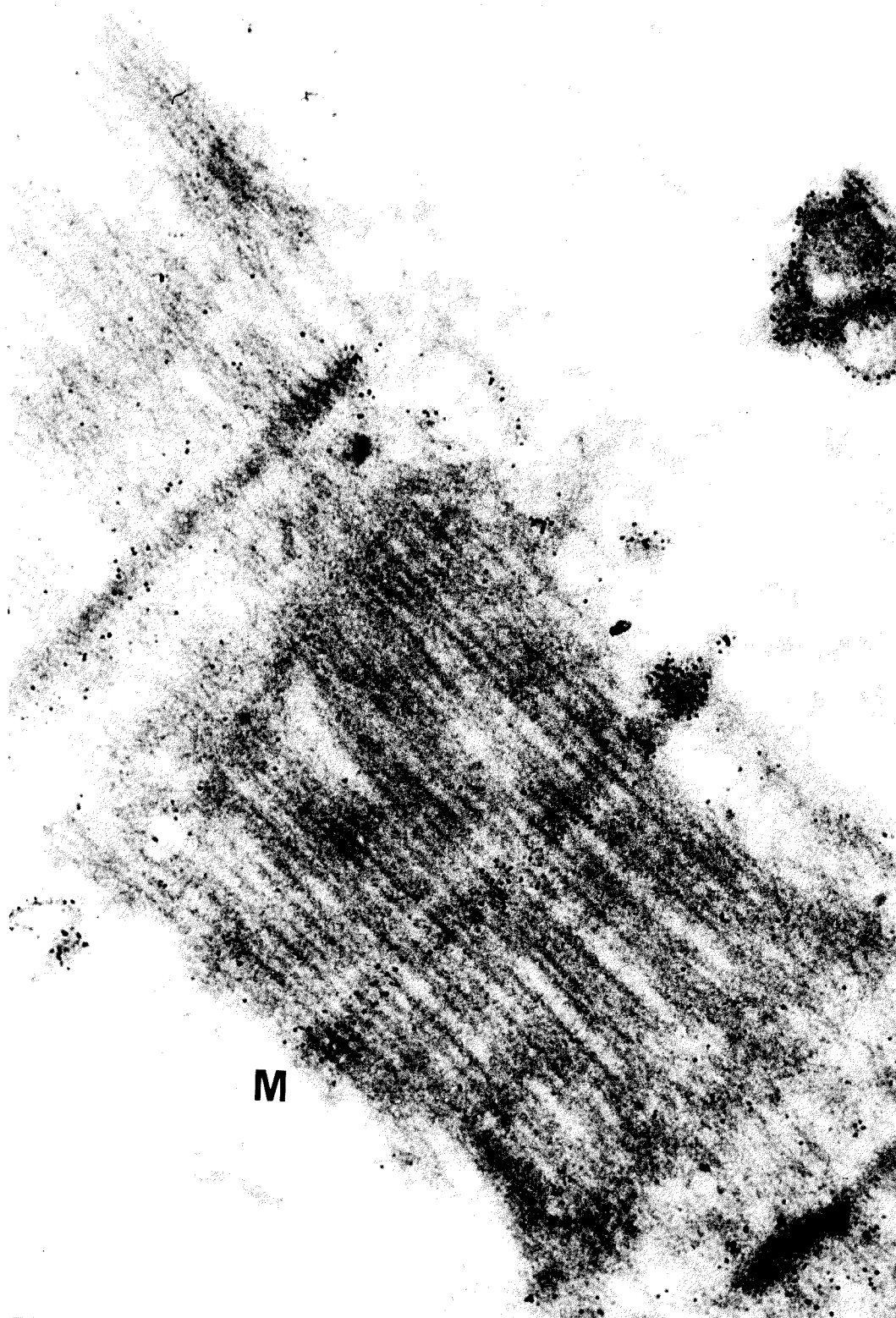


Fig. 17

Nachweis von M-CPK in Hühner-Brustmuskelfibrillen mit indirekter
Immunferritin-Technik

Wie Fig. 16 (ca. 72'000 mal vergrößert, ZEISS EM 9A).
Die Figur zeigt deutlich, dass Antikörper und Ferritinkonjugat
relativ schlecht ins Innere der Myofibrillen eindringen können
und vor allem an der Peripherie derselben reagieren.



M

Fig. 18

Nachweis von MM-CPK in der M-Linie von Hühner-Brustmuskel-
fibrillen mit der indirekten Immunferritin-Technik

Die elektronenmikroskopische Aufnahme (ca. 175'000 mal vergrößert) zeigt einen Ausschnitt von Fig. 17 im Bereich der M-Linie. Schaut man in Richtung der M-Linie, so kann man eine ca. 500 Å breite, relativ dichte Markierung der M-Linie mit schwarzen Ferritinpunkten sehen.



Fig. 19

Kontrollversuch der indirekten Immunnferritin-Markierung von M-CPK
in Hühner-Brustmuskelfibrillen

Die elektronenmikroskopische Aufnahme (ca. 78'000 mal vergrößert) zeigt als Kontrolle einen Dünnschnitt durch eine adulte Hühner-Brustmuskelfibrille, die vor dem Dünnschneiden anstatt mit Anti-MM-CPK-Serum und Ferritinkonjugat mit Normalserum und Ferritinkonjugat behandelt wurde.

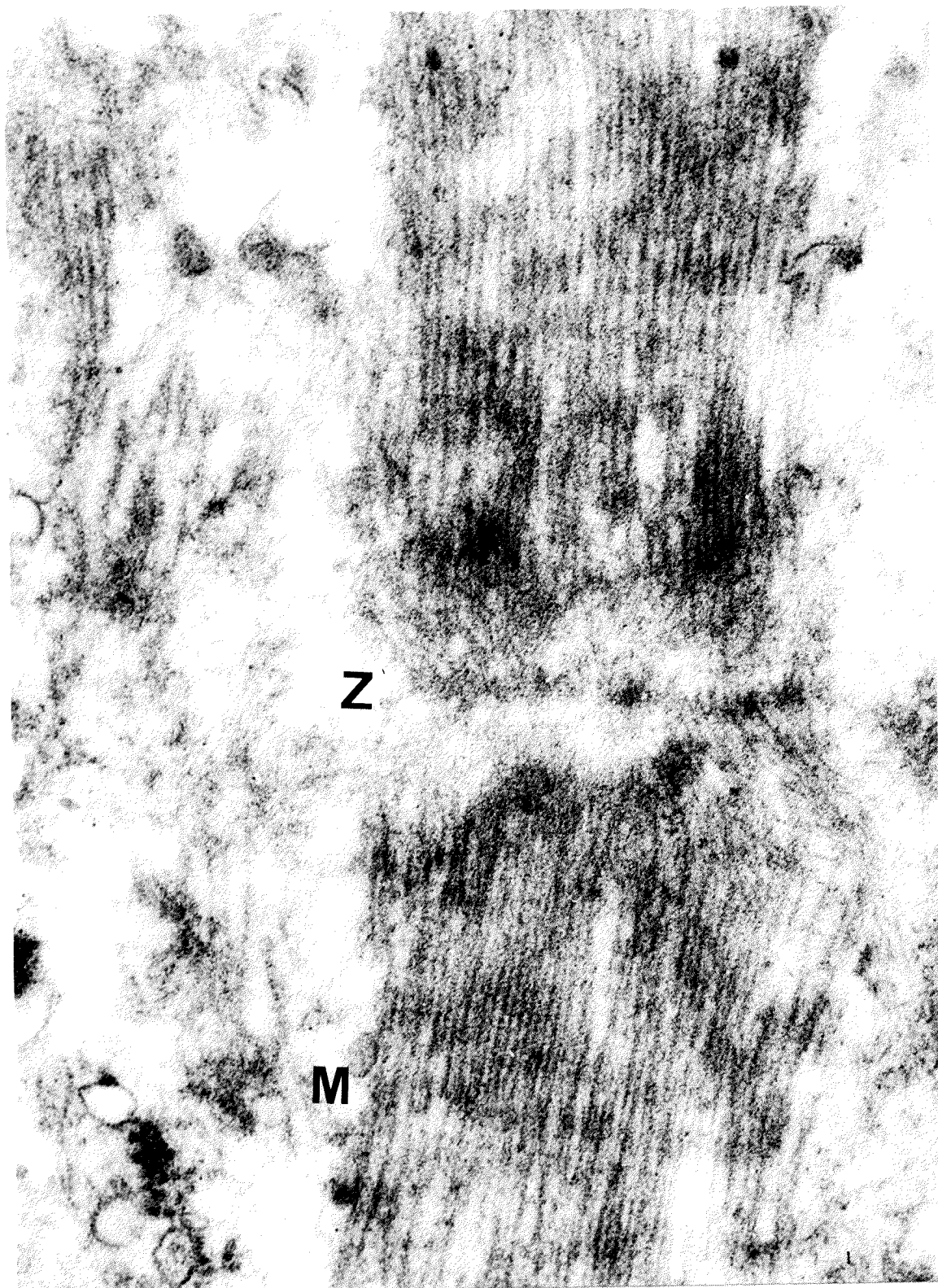


Fig. 20

Lokalisierung von M-CPK im T-System von Hühner-Brustmuskelzellen
mit der indirekten Immunferritin-Technik

Die elektronenmikroskopische Aufnahme (ca. 300'000 mal vergrößert) zeigt die Lokalisation von M-CPK im sog. T-System von adulten Hühner-Brustmuskelzellen. Es fällt eine besonders starke Ferritinmarkierung des Transversal-Tubulus-Systems (TT, Pfeil) auf der Membranaussenseite auf, aber auch die Vesikel der Terminal-Zysternen (TC) des sarkoplasmatischen Retikulums sind auf der Aussenseite des Membran relativ stark markiert.

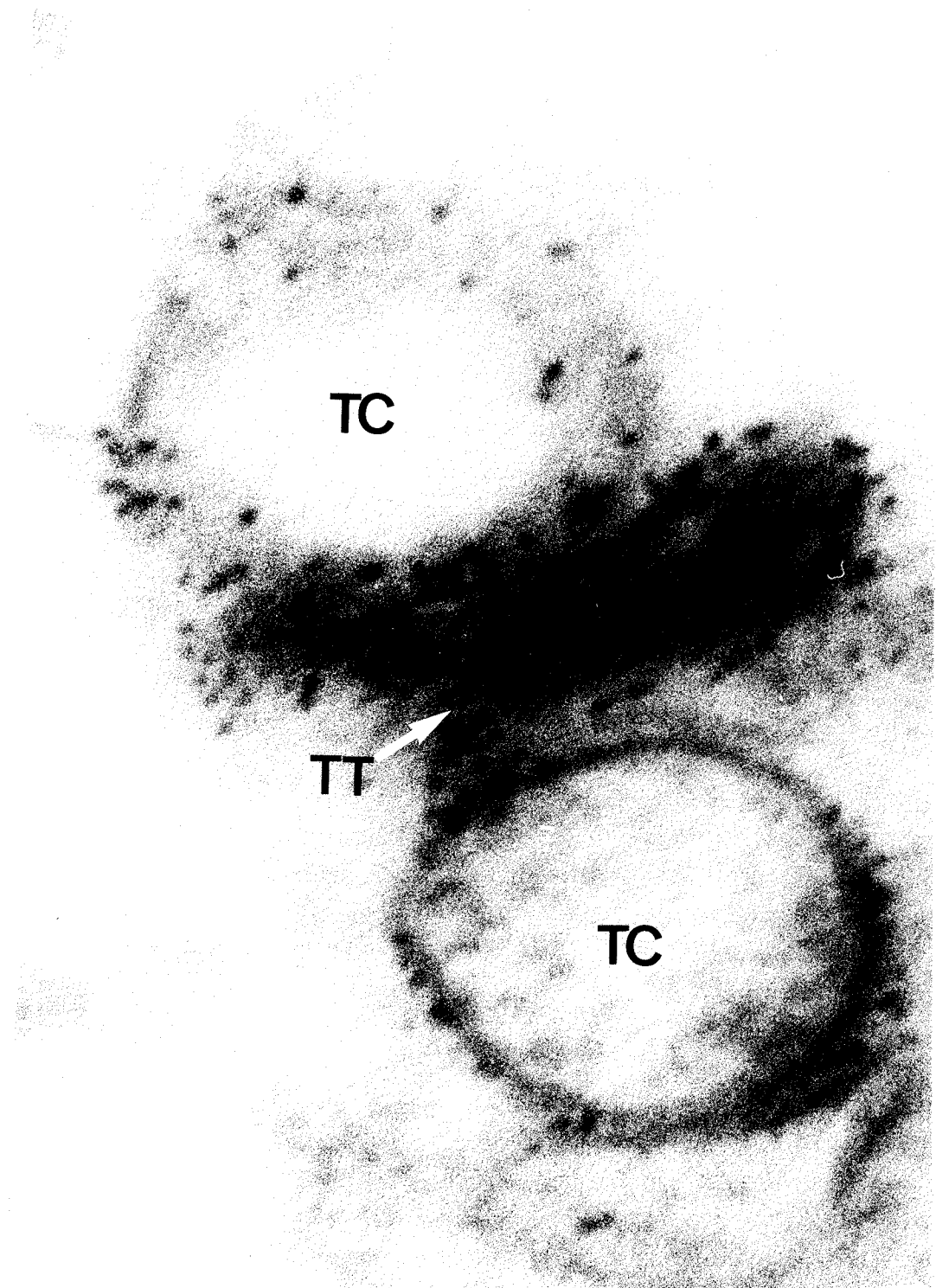


Fig. 21

Lokalisation von BB-CPK in Hühner-Herzmuskelfibrillen mit der
indirekten Immunferritin-Technik

Die elektronenmikroskopische Aufnahme (ca. 81'000 mal vergrößert) zeigt die Lokalisation von BB-CPK in der Z-Linie einer adulten Hühner-Herzmuskelfibrille und am sarkoplasmatischen Retikulum (SR) einer Herzmuskelzelle. Die Immunreaktion wurde vor dem Dünnschneiden der Fibrillen durchgeführt. Es ist durchgehend durch die Fibrillen-Struktur eine relativ dichte Ferritinmarkierung auf beiden Seiten der Z-Linie sichtbar.

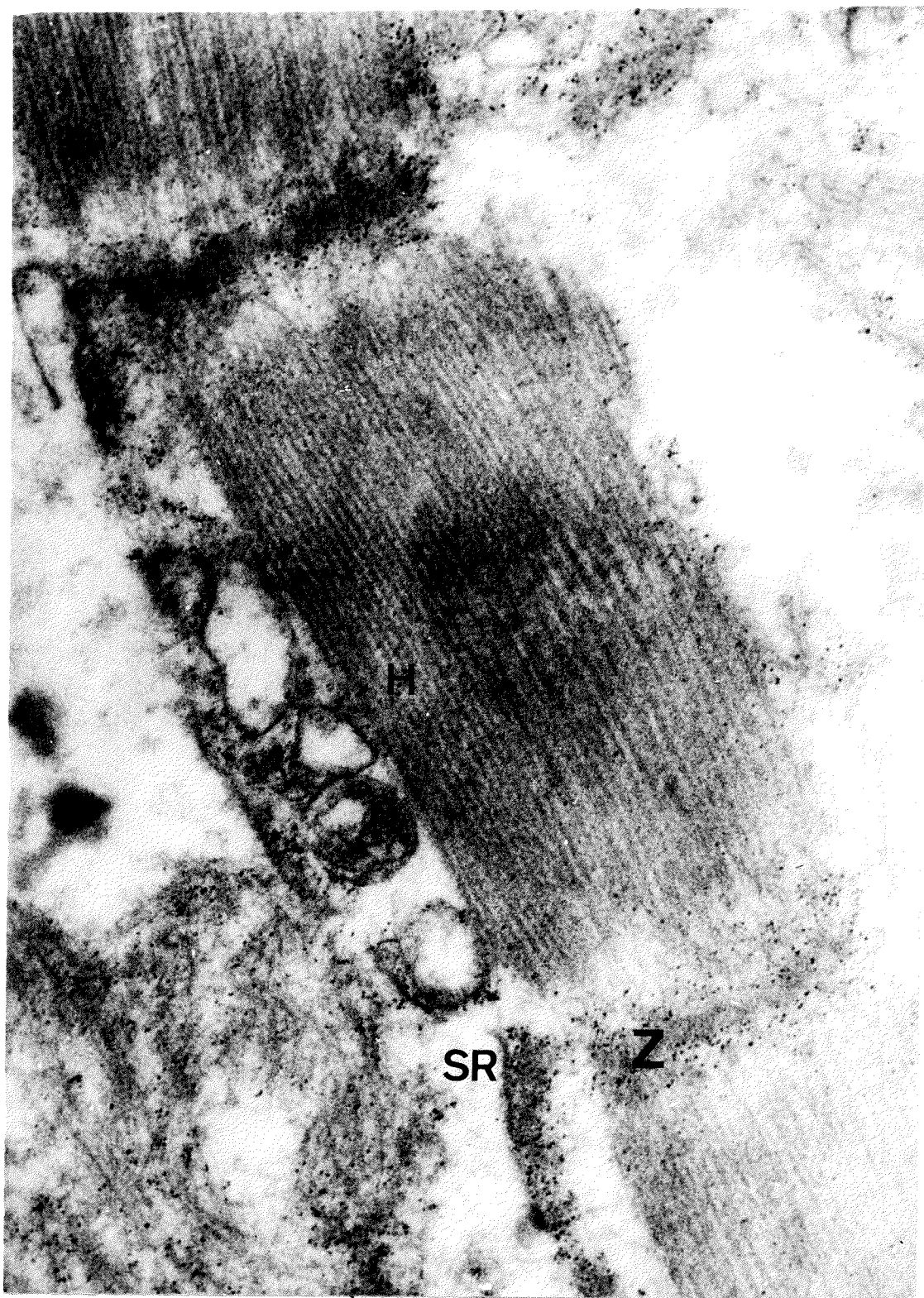


Fig. 22

Lokalisation von BB-CPK in Hühner-Herzmuskelfibrillen mit der
indirekten Immunferritin-Technik

Die elektronenmikroskopische Aufnahme (ca. 162'000 mal vergrößert) zeigt einen Ausschnitt von Fig. 21 im Bereich der Z-Linie. Deutlich ist die dichte Ferritinmarkierung auf beiden Seiten der Z-Linie sichtbar, wo BB-CPK in den Hühner-Herzmyofibrillen lokalisiert ist. Man beachte das Fehlen einer M-Linie in der H-Region (H).

H

Z

4.10 Inkubationsexperimente mit nativen, adulten Myofibrillen und CPK-Isoenzymen

Die Resultate der Inkubationsexperimente werden in Tabelle IV gezeigt. Die Lokalisation von CPK-Isoenzymen in Skelett- und Herzmuskelfibrillen des adulten Huhnes wurde unter 4.9.1 und 4.9.2 eingehend beschrieben. Die Resultate zeigen, dass in den Skelettmuskelfibrillen des adulten Huhnes ausschliesslich MM-CPK in der M-Linie gebunden ist, während in den Herzmuskelfibrillen ausschliesslich BB-CPK in der Z-Linien-Region gebunden ist.

Werden native, adulte Skelettmuskelfibrillen zusätzlich mit MM-CPK inkubiert, findet man neben der im nativen Zustand in der M-Linie gebundenen MM-CPK zusätzlich auch kleinere Mengen von MM-CPK in der Z-Linie (Tabelle IV).

Nach einer Inkubation von nativen, adulten Skelettmuskelfibrillen mit BB-CPK, wird relativ viel BB-CPK an die Z-Linie gebunden, während praktisch keine BB-CPK an die M-Linie bindet (Tabelle IV). Ein Ueberschuss an BB-CPK kann die in den Skelettmuskelfibrillen vorhandene M-Linien-gebundene MM-CPK nicht sichtbar "wegkompetitieren" resp. ersetzen. Sowohl BB-CPK als auch kleinere Mengen von MM-CPK können an die Z-Linie von nativen Myofibrillen binden (Tabelle IV). Die Bindung der beiden homodimeren CPK-Isoenzyme an die Z-Linie scheint unter diesen "in vitro"-Bedingungen nicht absolut isoenzym-spezifisch zu sein, während die M-Region eine deutlich höhere Spezifität für das MM-CPK-Isoenzym aufweist, oder umgekehrt.

Werden native, adulte Herzmuskelfibrillen zusätzlich mit BB-CPK inkubiert, so findet man neben einer kleinen Menge an die H-Region gebundene BB-CPK, viel mehr BB-CPK in der Z-Linie (wie im nativen Zustand) gebunden. Werden

native, adulte Herzmuskelfibrillen aber zusätzlich mit MM-CPK inkubiert, bindet diese MM-CPK vermehrt in der H-Region, aber auch in der Z-Linie. Die Herzmuskelfibrillen besitzen offenbar in der H-Region Bindungsstellen für MM-CPK, ein CPK-Isoenzym, das im Herzmuskelgewebe des Huhnes nie vorkommt. Die in der Z-Linie vorhandene BB-CPK wird auch in Gegenwart eines Ueberschusses von MM-CPK nicht "weg-kompetitiert" resp. ersetzt. In Hühner-Herzmyofibrillen, die im Gegensatz zu den Skelettmyofibrillen keine elektronenoptisch sichtbare M-Linien-Struktur besitzen, zeigt sich nach einer Inkubation mit MM-CPK eine Anhäufung von elektronendichtem Material in der H-Region. Da aber keine mit der geordneten M-Linien-Struktur von Skelettmyofibrillen vergleichbare Struktur gebildet wird, kann auf elektronenmikroskopische Aufnahmen verzichtet werden.

Zusammenfassend muss gesagt werden, dass die offenbar absolute Spezifität der Bindung der homodimeren CPK-Isoenzyme an die M- resp. Z-Linie (siehe Lokalisation von CPK-Isoenzymen in Skelettmuskelfibrillen während der Entwicklung des Skelettmuskels 4.12) mit nativen Myofibrillen "in vitro" nicht mehr absolut gezeigt werden kann.

TABELLE IV

Lokalisation der CPK-Isoenzyme in isolierten, gewaschenen Myofibrillen eines adulten Huhnes vor und nach zusätzlicher Inkubation mit reiner MM- oder BB-CPK, durch indirekte Immunfluoreszenz-Technik.

	Skelettmuskel			Herzmuskel		
	M-Linie		Z-Linie	M-Linien-Region		Z-Linie
	M-CPK ^{b)}	B-CPK ^{b)}		M-CPK	B-CPK	
Nativ (ohne Inkubation)	+++	-	+c)	++ d)	++ d)	-
Inkubation mit reiner MM-CPK (1 mg/ml)	+++		+	++		+
Inkubation mit reiner MM-CPK (1 mg/ml)		+			+	+++

a) In adulten Hühner-Herzmuskelfibrillen ist keine M-Linien-Struktur zu finden (SOMMER '69; Fig. 21 und 22).

b) M-CPK bedeutet Fluoreszenz, die nach einer Reaktion mit Anti-MM-CPK-Serum auftritt; da das Antiserum spezifisch für die Untereinheiten ist, kann Fluoreszenz die Anwesenheit von MM- und /oder MB-CPK bedeuten. In gleicher Weise kann Fluoreszenz, die nach einer Reaktion mit Anti-BB-CPK-Serum auftritt, auf die Anwesenheit von BB- und /oder BM-CPK hinweisen. Aus elektrophoretischen Untersuchungen wissen wir aber, dass Hühner-Skelettmuskel fast ausschließlich MM-CPK und Hühner-Herzmuskel, nebst einer Spur von MB-CPK, praktisch nur BB-CPK besitzen.

c) Schwache Fluoreszenz, wahrscheinlich MB-CPK (siehe Fig. 25 c, 25 e, 26 g und TURNER et al. '73).

d) Selten auftretende, aber dann starke Fluoreszenz, wahrscheinlich MB-CPK (siehe Fig. 13 g-k).

4.11 Reinkubationsexperimente mit M-Linien-extrahierten, adulten Skelettmuskelfibrillen und CPK-Isoenzymen

Die wichtigsten Resultate der Reinkubationsversuche mit M-Linien-extrahierten Skelettmuskelfibrillen und CPK-Isoenzymen werden in Fig. 23 gezeigt. Deutlich ist zu sehen, dass nach einer quantitativen Extraktion der M-Linien-gebundenen MM-CPK aus Hühner-Skelettmuskelfibrillen (Fig. 23b) unter gewissen Bedingungen beide CPK-Isoenzyme, vorallem aber MM-CPK an die M-Linie binden können (Fig. 23c - g).

Bei Langzeit-Reinkubationen (1 mg CPK/ml, während 12 h) mit frisch extrahierten Myofibrillen und mit anschliessend an die Extraktion glycerinisierten Myofibrillen konnte in beiden Fällen sowohl MM-CPK (Fig. 23c, e) als auch BB-CPK (Fig. 23d, f), wenn auch in geringerem Ausmasse, an die M-Linie zurückbinden, während BB-CPK im Vergleich zu MM-CPK vermehrt an die Z-Linie von frisch extrahierten, nicht glycerinisierten Myofibrillen band (Fig. 23d).

In den Kurzzeit-Kompetitionsexperimenten, bei denen die extrahierten Myofibrillen während 1 h mit Konzentrationen von je 0.1 mg MM- und BB-CPK pro ml gleichzeitig inkubiert wurden, konnte eine deutlich höhere Spezifität der Bindung von MM-CPK an die M-Linie einerseits und von BB-CPK an die Z-Linie andererseits gezeigt werden (Fig. 23g, h).

Bei den nach der Extraktion glycerinisierten Myofibrillen hingegen kann diese Isoenzym-Spezifität der Bindung an die M- resp. Z-Linie nicht mehr gezeigt werden, da sich die Myofibrillen offenbar während längerer Glycerinisierung (50 % Glycerin in SOL. A-Puffer) verändern. PEPE '72 wies darauf hin, dass

sich die Reaktivität der myofibrillären Proteine gegenüber verschiedenen Antiseren durch längeres Aufbewahren der präparierten Myofibrillen in Glycerin-Puffer verändern könne.

Dass gereinigte CPK ohne die Anwesenheit der anderen, bei der Extraktion mit Puffer von niedriger Ionenstärke ebenfalls aus der M-Linie von Skelettmuskelfibrillen extrahierten Proteinkomponenten wieder zurück an die M-Linie binden kann, ist ein wichtiger Befund. Da die M-Linien-Struktur bei einer Extraktion während 45 min mit 20 Volumen MOR. 2-Puffer quantitativ entfernt wird (Fig. 15), muss angenommen werden, dass die CPK an die in der H-Region exponierten Stellen der dicken Filamente und somit direkt an Myosin binden kann.

Tatsächlich wurde von HOUK and PUTNAM '73 mit Hilfe von Fluoreszenz-Depolarisations-Studien eine starke Interaktion von MM-CPK mit dem stäbchenförmigen "rod-Teil" des Myosin-Moleküls, der in der H-Region des Sarkomers, wo sich die M-Linie befindet, exponiert ist, festgestellt.

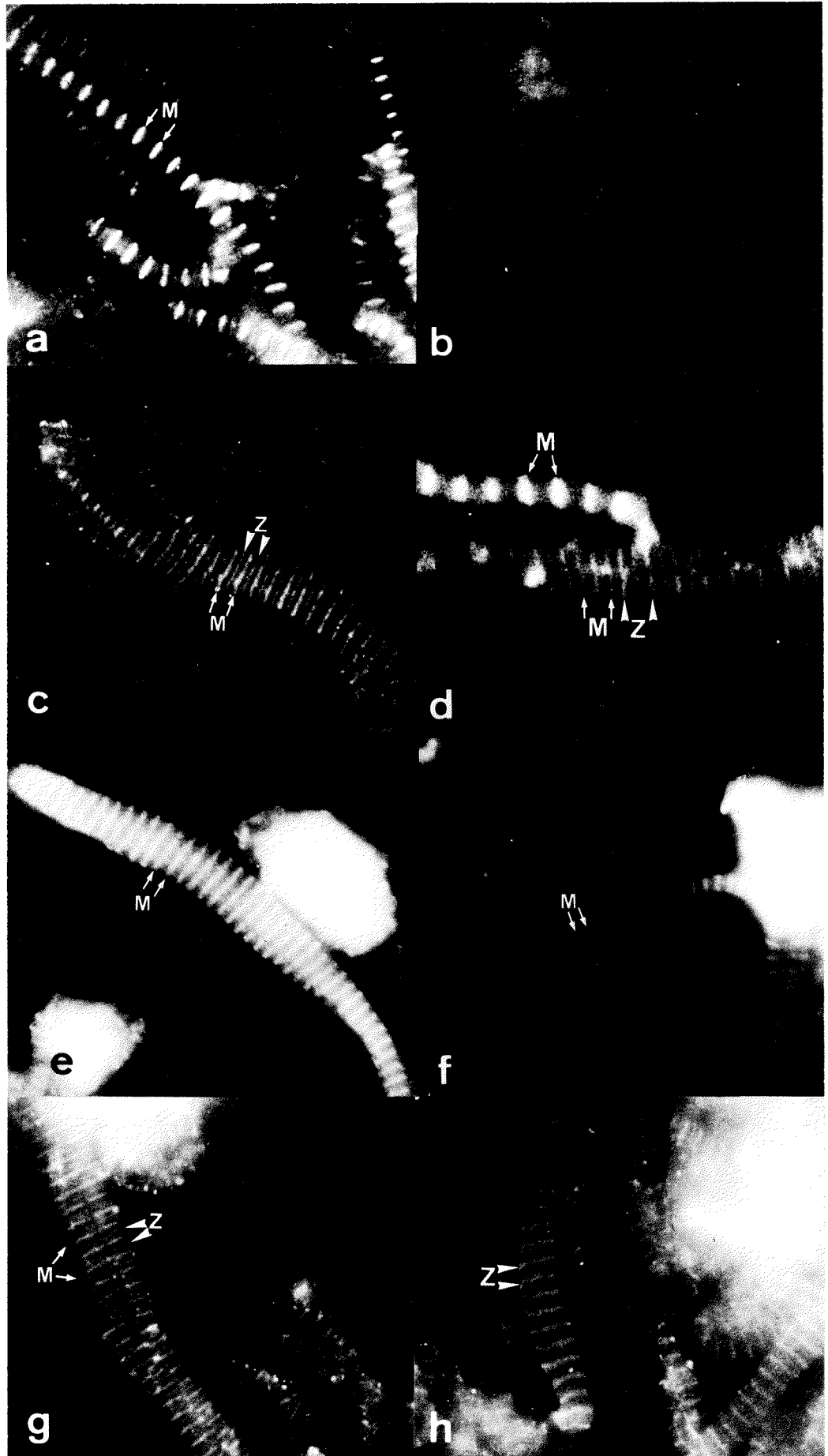
Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Spezifität der beiden homodimeren CPK-Isoenzyme, ausschliesslich an die M-Linie (MM-CPK) oder ausschliesslich an die Z-Linie (BB-CPK) von extrahierten Skelettmuskelfibrillen zu binden, unter den genannten "in vitro"-Bedingungen nicht absolut ist. Durch Kompetitions-Reinkubationsexperimente (Fig. 23g, h) konnte aber deutlich gezeigt werden, dass MM-CPK sowohl an die M-Linie als auch z.T. an die Z-Linie von extrahierten Skelettmyofibrillen zurückbindet, während BB-CPK nur an die Z-Linie binden kann. Nach einer Reinkubation von Skelettmyofibrillen mit MM-CPK konnte aber in keinem Falle eine intakte M-Linien-Struktur festgestellt werden, weil offenbar die anderen M-Linien-Protein fehlten.

Fig. 23

Reinkubation von M-Linien-extrahierten Hühner-Skelettmuskelfibrillen
mit CPK-Isoenzymen

- a) Native, mit SOL. A gewaschene Myofibrillen, mit indirekter Immunfluoreszenz-Technik für M-CPK angefärbt.
Starke Fluoreszenz in der M-Linie, wo MM-CPK lokalisiert ist.
- b) Während 45 min mit Puffer von niedriger Ionenstärke extrahierte Myofibrillen für M-CPK angefärbt.
Die myofibrilläre CPK ist quantitativ extrahiert worden.
- c) Native, frisch extrahierte Myofibrillen, nach einer Langzeit-Reinkubation mit MM-CPK (1 mg MM-CPK/ml, 12 Stunden) für M-CPK angefärbt.
Es tritt immer dasselbe Fluoreszenzmuster auf: stärkere Fluoreszenz in der M-Linie, schwächere Fluoreszenz in der Z-Linie.
- d) Native, frisch extrahierte Myofibrillen, nach Langzeit-Reinkubation mit BB-CPK (1 mg BB-CPK/ml, 12 Stunden) für B-CPK angefärbt.
Zwei verschiedene Fluoreszenzmuster treten auf:
 - 1) stärkere Fluoreszenz an der Z-Linie, schwächere Fluoreszenz an der M-Linie
 - 2) in relativ seltenen Fällen ausschliessliche Fluoreszenz in der M-Linie.
- e) Nach der Extraktion in 50 % Glycerin/SOL. A aufbewahrte (glycerinisierte) Myofibrillen, nach Langzeit-Reinkubation mit MM-CPK (1 mg/ml, 12 Stunden) für M-CPK angefärbt.
Relativ starke Fluoreszenz ausschliesslich in der M-Linie.
- f) Nach der Extraktion glycerinisierte Myofibrillen nach einer Langzeit-Reinkubation mit BB-CPK (1 mg/ml, 12 Stunden) für B-CPK angefärbt.
Relativ schwache Fluoreszenz ausschliesslich in der M-Linie.
- g) Native, frisch extrahierte Myofibrillen nach Kurzzeit-Reinkubation mit BB- und MM-CPK (je 0.1 mg/ml, 1 Stunde) für M-CPK angefärbt.
Stärkere Fluoreszenz in der M-Linie, schwächere Fluoreszenz in der Z-Linie.
- h) Native, frisch extrahierte Myofibrillen nach Kurzzeit-Reinkubation mit MM- und BB-CPK (je 0.1 mg/ml, 1 Stunde) für B-CPK angefärbt.
Relativ schwache Fluoreszenz ausschliesslich in der Z-Linie.

d) ca. 2'200 mal vergrössert, übrige ca. 1'700 mal vergrössert



4.12 Reinkubationsexperimente mit extrahierten, adulten Herzmuskelfibrillen und CPK-Isoenzymen

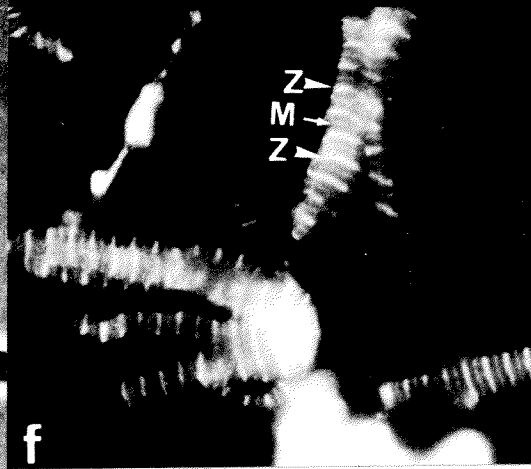
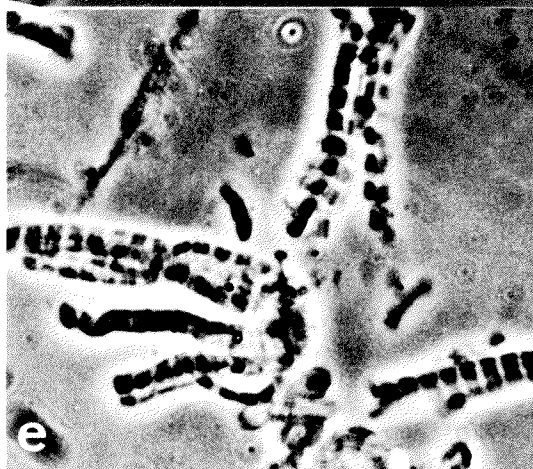
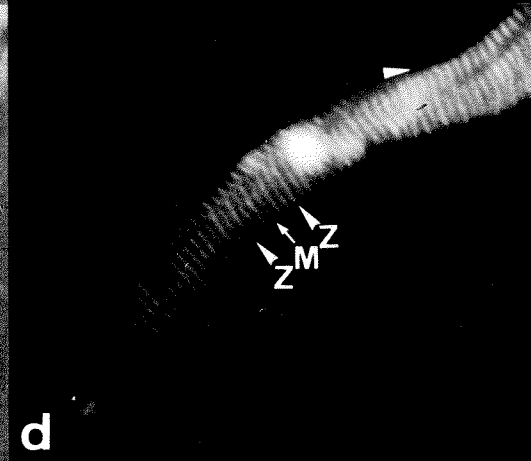
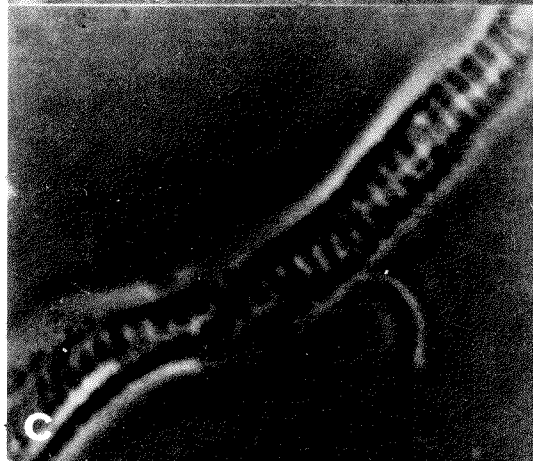
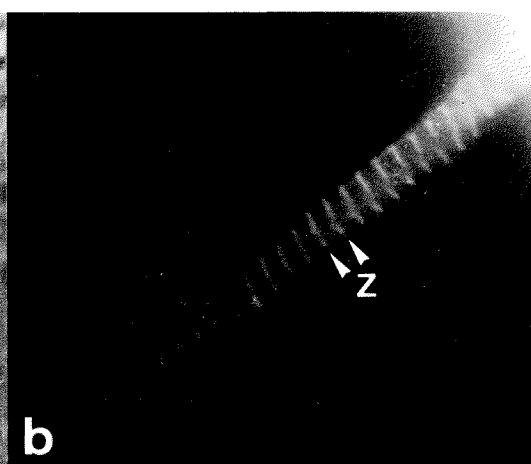
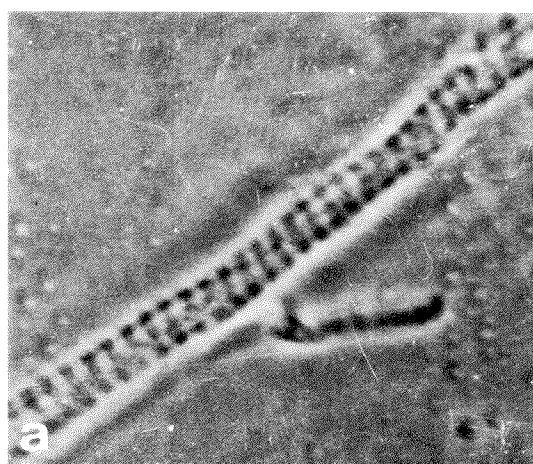
Die Resultate der Reinkubationsversuche mit extrahierten Herzmyofibrillen sind in Fig. 24 wiedergegeben. Deutlich ist zu sehen, dass nach einer quantitativen Extraktion der myofibrillären BB-CPK in Langzeit-Reinkubationsexperimenten (12 h), bei der relativ hohen Enzymkonzentration von 1 mg/ml, sowohl MM-CPK als auch BB-CPK an die H-Region von extrahierten Herzmyofibrillen binden können. BB-CPK bindet aber in vermehrter Masse an die Z-Linie, wo dieses Enzym in nativen Herzmyofibrillen lokalisiert ist, zurück (Fig. 24 f). MM-CPK, das Isoenzym, das im Hühner-Herzmuskel nie vorhanden ist, bindet ungefähr gleichstark an die H-Region wie an die Z-Linie (Fig. 24 d). Wie bei den Reinkubationsversuchen mit M-Linien-extrahierten Skelettmuskelfibrillen, kann eine erhöhte Spezifität von MM-CPK, an die H-Region von Herzmuskelfibrillen zu binden, durch kurze Reinkubationen mit niedrigeren Enzymkonzentrationen gezeigt werden. Das Verhalten, an bestimmte Regionen der Herzmuskelfibrillen zurückzubinden, ist aber unter den angegebenen "in vitro"-Bedingungen nicht absolut isoenzym-spezifisch.

Fig. 24

Reinkubation von extrahierten Hühner-Herzmuskelfibrillen mit CPK-Isoenzymen

- a, b) b) Native, mit SOL. A gewaschene Herz-Myofibrillen mit der indirekten Immunfluoreszenz-Technik für B-CPK angefärbt.
a) entsprechende Phasenkontrastaufnahme.
- c, d) d) Native, extrahierte Herz-Myofibrille, nach einer Langzeit-Reinkubation mit MM-CPK (1 mg/ml, 12 Stunden) für M-CPK angefärbt. Ungefähr gleich starke Fluoreszenz in der H-Region wie in der Z-Linien-Region.
c) entsprechende Phasenkontrastaufnahme.
- e, f) f) Native, extrahierte Herzmuskelfibrillen nach einer Langzeit-Reinkubation mit BB-CPK (1 mg/ml, 12 Stunden) für B-CPK angefärbt. Stärkere Fluoreszenz in der Z-Region, schwächere Fluoreszenz in der H-Region.
e) entsprechende Phasenkontrastaufnahme.

a - f) ca. 1'700 mal vergrößert



4.13 Lokalisation von CPK-Isoenzymen in Hühner-Skelettmuskelfibrillen während der Skelettmuskelentwicklung

Während der Skelettmuskelentwicklung des Huhnes findet, wie in der Einleitung erwähnt, eine Transition von der zuerst ausschliesslich anzutreffenden embryonalen Form der CPK, BB-CPK, über das Hybridmolekül, MB-CPK, zu der adulten Form, MM-CPK, statt. Um zu schauen, ob eine solche Transition auch für die M-Linien-gebundene CPK zutrifft oder nicht, wurden Lokalisationsstudien der CPK-Isoenzyme in Skelettmuskelfibrillen früher Embryonalstadien des Huhnes durchgeführt. Die Resultate sind in Fig. 25 und 26 zusammengestellt.

Von den frühesten Embryonalstadien des Huhnes (4 - 7 Tage) wurden die ersten 25 cranialwärts gelegenen Somiten präpariert, homogenisiert und gewaschen. Die Myofibrillen dieser Somiten wurden mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz-Technik entweder für M- oder B-CPK angefärbt. Von älteren Stadien (11 Tage - adult) wurde die Rückenmuskulatur als ontogenetischer Abkömmling der Somiten präpariert.

Färbt man Skelettmuskelfibrillen verschiedener Embryonalstadien des Huhnes (4 Tage - adult) für MM-CPK an, so findet man diese M-CPK fast ausschliesslich an die M-Linie gebunden (Fig. 25a - h), während nur ganz kleine Mengen davon in der Z-Linien-Region lokalisiert sind (Fig. 25c und e). Es ist erstaunlich, dass Myofibrillen von 4 Tage alten Hühnerembryonen bereits eine so deutliche Fluoreszenz in der M-Linie zeigen, wenn sie für M-CPK angefärbt werden, da in parallel durchgeführten Elektrophoresen von Somitenextrakten solcher Embryonalstadien nur äusserst kleine Mengen von M-CPK gefunden werden konnte. Bei dieser M-Linien-gebundenen M-CPK muss es sich aus-

schliesslich um das MM-CPK-Isoenzym handeln, da Myofibrillen gleichen Alters, die für B-CPK angefärbt wurden, nie Fluoreszenzbanden in der M-Linie zeigten, sondern nur an der I-Region (Fig. 26c, e) resp. an der Z-Linie (Fig. 26g). Es findet also an der M-Linie keine Transition von M-Linien-gebundenen CPK-Isoenzymen statt, da MM-CPK, die in sehr kleinen Mengen schon relativ früh nachgewiesen werden kann, offenbar sehr spezifisch in sich bildende M-Linien-Strukturen von frühen Myofibrillen-Stadien eingebaut wird. Werden die Myofibrillen verschiedener Stadien für B-CPK gefärbt, so findet man in den jüngsten Stadien (4 - 11 Tage), in denen grosse Mengen des BB-CPK-Isoenzyms anzutreffen sind, eine relativ intensive Fluoreszenz, die sich zuerst über die ganze Myofibrille erstreckt (Fig. 26a, c), sich dann allmählich auf die I-Region konzentriert (Fig. 26c, e) und schliesslich in den Myofibrillen von adulten Stadien nur noch als relativ schwache Fluoreszenzbanden in der Z-Linien-Region vorkommt (Fig. 26g).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass "in vivo" eine absolute Spezifität der Bindung von MM-CPK an die M-Linie vorhanden ist, die in den frühesten Stadien der Ontogenese beginnt und bis ins Adultstadium bestehen bleibt. Offensichtlich kann in die während der Ontogenese des Skelettmuskels sich bildenden M-Linien-Strukturen von frühen Myofibrillenstadien nur das MM-CPK-Isoenzym eingebaut werden, nicht aber BB- oder BM-CPK, die ausschliesslich an die I-Region resp. Z-Linien-Region binden können. Es kann somit gesagt werden, dass die Lokalisation der CPK-Isoenzyme in Hühner-Skelettmuskelfibrillen streng isoenzymspezifisch ist.

Fig. 25

Lokalisation von M-CPK in Hühner-Skelettmuskelfibrillen während der
Entwicklung des Skelettmuskels

- a, b) Native, mit SOL. A gewaschene Myofibrillen aus Somiten eines 4 Tage alten Hühnerembryos, mit der indirekten Immunfluoreszenz-Technik für M-CPK angefärbt.
 - a) starke Fluoreszenz in der M-Linie; z. T. sehr schwache Fluoreszenz in der Z-Linie
 - b) entsprechende Phasenkontrastaufnahme

- c, d) Native, gewaschene Myofibrillen von der Rückenmuskulatur als ontogenetischer Abkömmling der Somiten eines 11 Tage alten Hühnerembryos, für M-CPK angefärbt.
 - c) starke Fluoreszenz in der M-Linie; z. T. sehr schwache Fluoreszenz in der Z-Linie
 - d) entsprechende Phasenkontrastaufnahme

- e, f) Native, gewaschene Myofibrillen von der Rückenmuskulatur eines 14 Tage alten Hühnerembryos, für M-CPK angefärbt.
 - e) starke Fluoreszenz in der M-Linie; z. T. sehr schwache Fluoreszenz in der Z-Linie
 - f) entsprechende Phasenkontrastaufnahme

- g, h) Native, gewaschene Myofibrillen von der Rückenmuskulatur eines adulten Huhnes, für M-CPK angefärbt.
 - g) Fluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahme sind überlagert: starke Fluoreszenz in der M-Linie, wo MM-CPK lokalisiert ist
 - h) entsprechende Phasenkontrastaufnahme

a - h) ca. 1'700 mal vergrößert

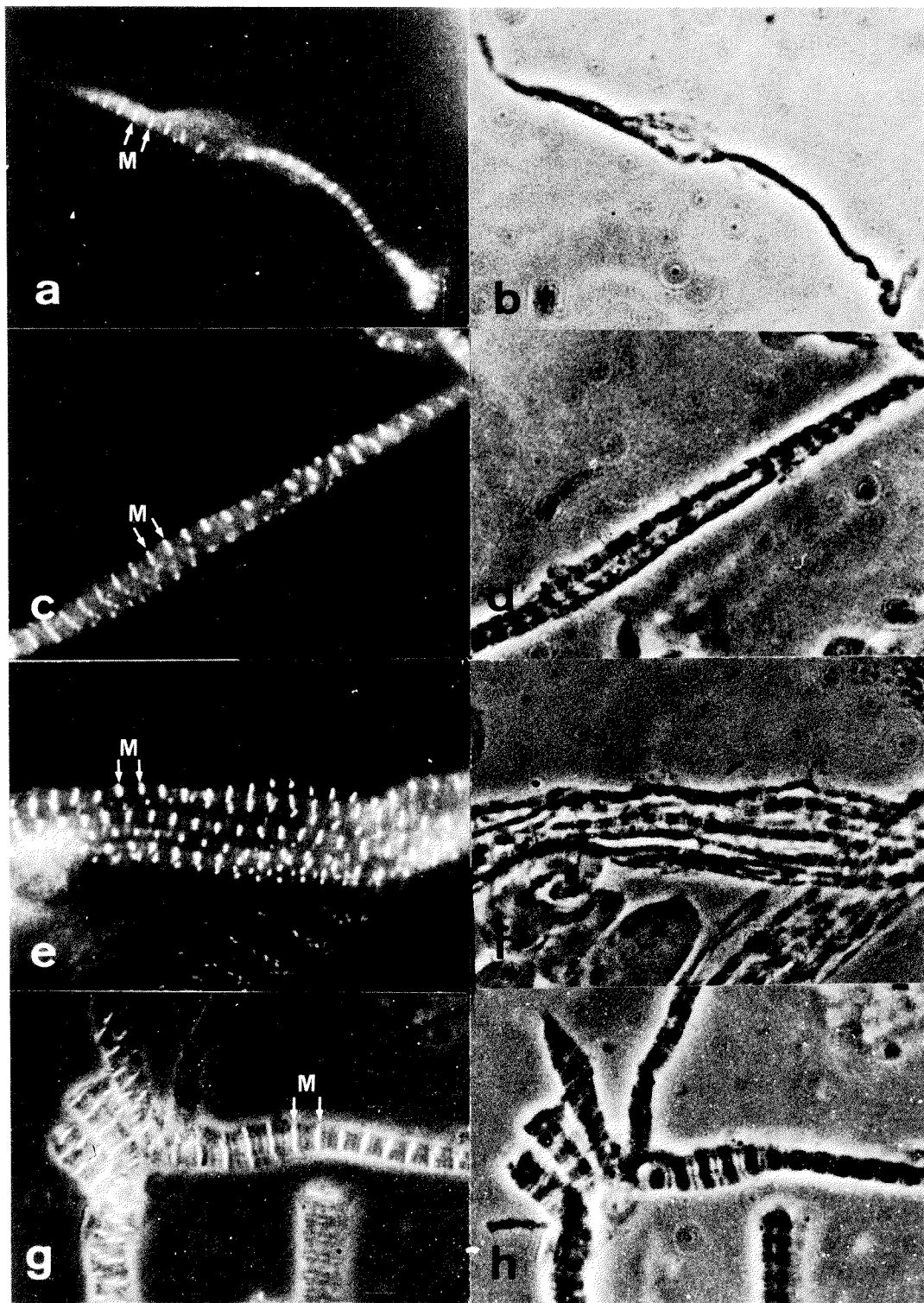


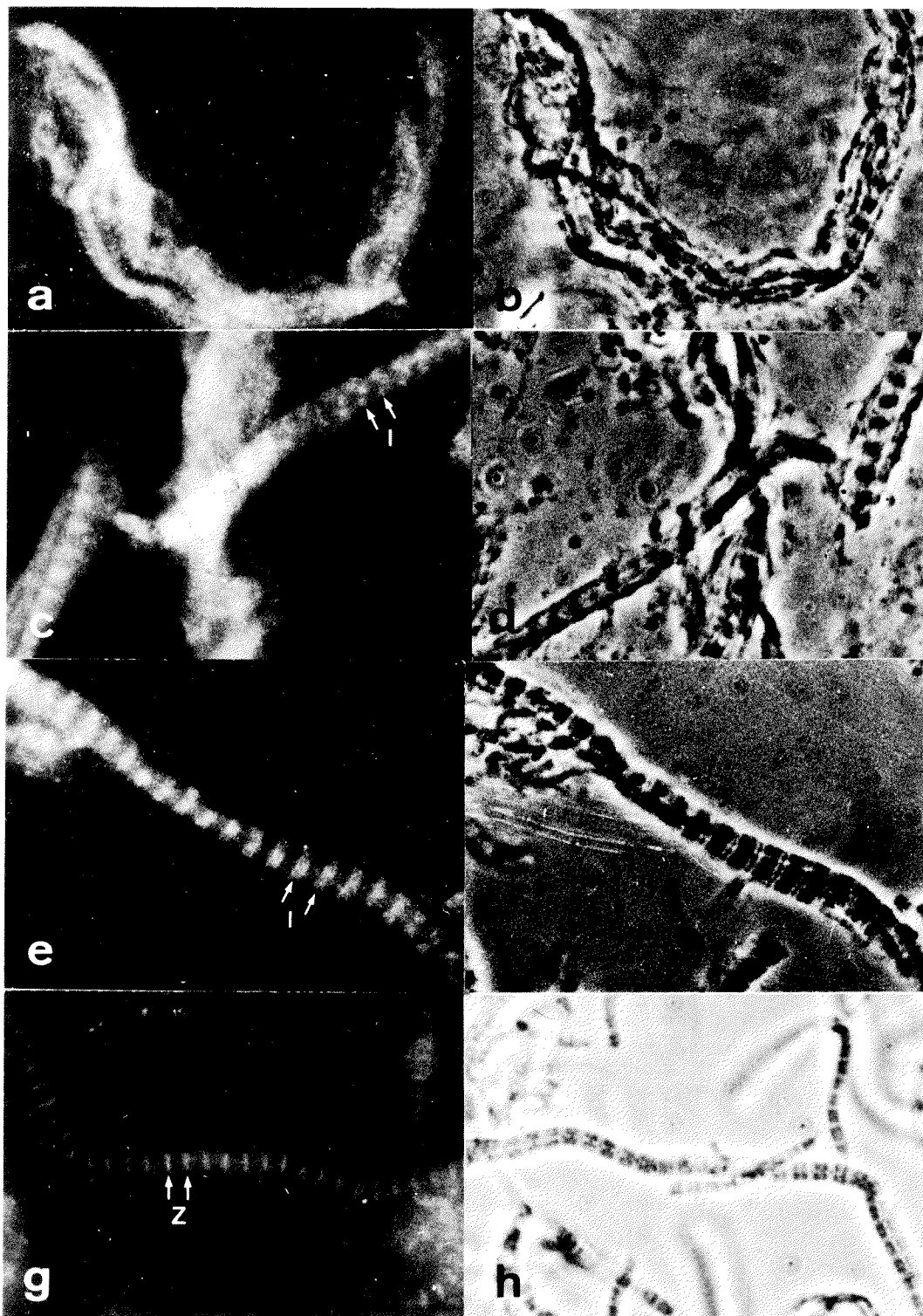
Fig. 26

Lokalisation von B-CPK in Hühner-Skelettmuskelfibrillen während der
Entwicklung des Skelettmuskels

- a, b) Native, in SOL. A gewaschene Myofibrillen von Somiten eines 4 Tage alten Hühnerembryos, mit der indirekten Immunfluoreszenz-Technik für B-CPK angefärbt.
a) Fluoreszenz über die ganze Myofibrille verteilt
b) entsprechende Phasenkontrastaufnahme
- c, d) Native, gewaschene Myofibrillen von der Rückenmuskulatur als ontogenetischer Abkömmling der Somiten eines 11 Tage alten Hühnerembryos, für B-CPK angefärbt.
c) Fluoreszenz über die ganze Myofibrille verteilt mit angedeuteten breiten Fluoreszenzbanden in der I-Region
d) entsprechende Phasenkontrastaufnahme
- e, f) Native, gewaschene Myofibrillen von der Rückenmuskulatur eines 14 Tage alten Hühnerembryos, für B-CPK angefärbt.
e) deutliche Fluoreszenzbanden auf der ganzen Breite der I-Region
f) entsprechende Phasenkontrastaufnahme
- g, h) Native, gewaschene Myofibrillen von der Rückenmuskulatur eines adulten Huhnes, für B-CPK angefärbt.
g) schwache, auf die Z-Linie begrenzte Fluoreszenzbanden
h) entsprechende Phasenkontrastaufnahme

a - f) ca. 1'700 mal vergrößert

g, h) ca. 1'250 mal vergrößert



5. DISKUSSION

5.1 Diskussion eines M-Linien-Modells

Die M-Linie, wie die elektronendichte Struktur in der Mitte der anisotropen A-Bande vieler quergestreifter Muskeln bezeichnet wird, ist in mehreren Laboratorien das Objekt intensiver Forschung. Die sorgfältige Ultrastrukturanalyse dieser Region des Sarkomers, aber auch die Isolation und Charakterisierung von Proteinkomponenten der M-Linie waren die hauptsächlichen Ziele der Untersuchungen auf diesem Gebiet. KNAPPEIS and CARLSEN '68 fanden auf Grund von Ultrastrukturanalysen mit Hilfe der Hochauflösungs-Elektronenmikroskopie zwei bestimmte Proteinkomponenten als wesentliche Elemente der M-Linien-Struktur: m-Filamente und m-Brücken. Die m-Filamente sind ca. $750 \text{ \AA}$ lang, verlaufen parallel zu den dicken Filamenten (Myosin) und sind durch querverlaufende m-Brücken mit den dicken Filamenten verbunden (Fig. 27).

In der Folge beschrieben EATON and PEPE '72 eine Methode zur spezifischen Entfernung der M-Linie aus Hühner-Brustmuskelfibrillen durch Extraktion mit Puffer von niedriger Ionenstärke (5 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8.0), nachdem die Myofibrillen wiederholt in Puffer von relativ hoher, physiologischen Bedingungen entsprechender Ionenstärke (0.1 M KCl, 5 mM EDTA-Puffer, pH 7.0) gewaschen worden waren. Durch diese Prozedur wurden zwei Proteinkomponenten, Protein A und Protein B, isoliert. Das Protein A ist in 0.1 M KCl bei pH 8.0 nur schlecht löslich und besitzt eine ausgesprochen grosse Tendenz zu aggregieren. Das Molekulargewicht seiner Untereinheiten beträgt ca. 100'000 Daltons. Teilweise gereinigte

Fraktionen von Protein A und Protein B bildeten, wenn in vitro zusammengegeben, miteinander Komplexe.

MORIMOTO and HARRINGTON '72, die eine ähnliche Extraktion der M-Linie bei niedriger Ionenstärke (5 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7.7) durchführten, erhielten, wie bereits erwähnt, nach weiteren Reinigungsschritten eine homogene Präparation eines "M-line-Proteins", dessen Untereinheiten ein Molekulargewicht von 43'000 Daltons besitzen. Die Autoren betonten auf Grund ihrer Resultate, dass dieses M-line-Protein ein integraler Bestandteil der M-Linien-Struktur sein muss.

In unserer Arbeit wurde gezeigt, wie dieses M-line-Protein als die Muskelform der CPK, MM-CPK, identifiziert wurde. Kürzlich haben auch EATON and MOCHAN '73 berichtet, dass ihre Proteinkomponente B, nicht aber die Proteinkomponente A, tatsächlich CPK-Aktivität besitzt. Es dürfte nun eindeutig sein, dass die Proteinkomponente B von EATON and PEPE '72 sowie das M-line-Protein von MORIMOTO and HARRINGTON '72 identisch mit der MM-CPK sind. Bevor dieser Befund bekannt war, wurde, wie erwähnt, von verschiedenen Laboratorien gezeigt, dass sowohl Protein B (EATON and PEPE) als auch das M-line-Protein (MORIMOTO and HARRINGTON) Strukturproteine der M-Linie sind. Somit wurde die CPK "inkognito" bereits als integraler Bestandteil der M-Linien-Struktur betrachtet. Allerdings argumentieren EATON and MOCHAN '73, dass das Protein A wahrscheinlich das grundlegende Strukturelement der M-Linie darstelle, da die CPK ein Enzym sei, das zum grössten Teil als lösliches Protein im Cytoplasma vorkomme, und deshalb nicht nur auf die Myofibrillen beschränkt sei. Dazu ist zu sagen, dass eine Einteilung der Proteine in Struktur- und Enzymproteine nicht mehr haltbar erscheint; konnte doch verschiedentlich gezeigt werden, dass Enzymproteine neben ihren katalytischen

Eigenschaften als Bestandteile eines zellulären Systems auch strukturelle Bedeutung haben können. Die Tatsache allein, dass die CPK auch anderswo in den Muskelzellen vorkommt, ist deshalb nicht stichhaltig genug, um sie "a priori" von einer möglichen Bedeutung als Strukturelement des kontraktiven Apparates auszuschliessen. In Tabelle V ist die Evidenz für die Identität von M-line-Protein und MM-CPK zusammengefasst.

Anhand eines Vergleiches der erhaltenen Resultate mit den Befunden verschiedener Laboratorien soll im folgenden am Beispiel eines M-Linien-Modells die strukturelle und funktionelle Bedeutung der CPK als M-Linien-Protein diskutiert werden. Die Befunde über das biochemische Verhalten der M-Linien-Proteine und ihrer Lokalisation in der M-Linie können in das von KNAPPEIS and CARLSEN '68 auf Grund von Ultrastrukturanalysen vorgeschlagene M-Linien-Modell integriert werden. Dieses Modell (Fig. 27) fordert eine Interaktion von m-Brücken und m-Filamenten; zusätzlich müssten die m-Brücken in der Lage sein, an Myosin resp. an die dicken Filamente zu binden. EATON and PEPE '72 zeigten, dass CPK (oder "Protein B", wie sie es genannt haben) fähig ist, mit dem anderen M-Linien-Protein (Protein A) einen Komplex zu bilden. Andererseits wurde von MORIMOTO and HARRINGTON '72 bewiesen, dass CPK (oder das sog. "M-line-Protein") an dicke Filamente (Myosin) bindet und diese vernetzt. Die CPK erfüllt also die für die m-Brücken geforderten Kriterien, während das Protein A (EATON and PEPE) die Bindungskapazität der m-Filamente besitzt. Ferner zeigten HOUK and PUTNAM '73 mit Fluoreszenz-Depolarisationsmethoden, dass CPK, wie man von den m-Brücken erwarten muss, "in vitro" mit dem stäbchenförmigen "Rod"-Teil des Myosinmoleküls interagiert, d.h. an den Teil des Myosinmoleküls bindet, der in der Mitte der dicken Filamente in der H-Region des Sarkomers, wo sich die M-Linie befindet,

TABELLE V

Zusammenfassung der Evidenz für die Identität
von M-line-Protein und MM-CPK.

- Aehnliche Molekulargewichte ^{a)b)}
- Aehnliche Aminosäuren-Zusammensetzung ^{a)c)}
- Zusammensetzung aus zwei identischen Untereinheiten ^{a)b)}
- Aehnliche spezifische Aktivität ^{e)}
- Identische elektrophoretische Mobilität auf:
 - Cellulose-polyacetat ^{e)}
 - Polyacrylamid ^{e)f)}
 - SDS-Polyacrylamid ^{f)}
- Identisches Muster der Brom-Cyan-Fragmente ^{f)}
- Immunologische Identität in OUCHTERLONY-Tests ^{e)f)}
- Gleiche myofibrilläre Lokalisation ^{a)e)f)}
- Aehnliche Extrahierbarkeit mit niedriger Ionenstärke ^{a)d)e)f)}

a) MORIMOTO and HARRINGTON '72

b) DAWSON et al. '67

c) EPPENBERGER et al. '67

d) OTTAWAY '67

e) TURNER et al. '73

f) WALLIMANN et al. '75

exponiert ist. Zusätzlich zu den bekannten Interaktionen zwischen den isolierten Proteinen unterstützen weitere Befunde diese Gleichsetzung von CPK und m-Brücke einerseits, von Protein A und m-Filament andererseits. Die Tendenz von gereinigtem Protein A "in vitro" zu aggregieren (EATON and PEPE '72) ist eine Voraussetzung, dass die ca. 750 Å langen m-Filamente gebildet werden können. Im Gegensatz zu Protein A bildet gereinigte CPK allein keine Aggregate.

Die Dimensionen von m-Brücke und m-Filament konnten "in situ" durch Ultrastrukturanalyse approximativ bestimmt werden (KNAPPEIS and CARLSEN '68).

Die Dimensionen von gereinigtem M-line-Protein wurden mit biochemischen Methoden "in vitro" bestimmt (MORIMOTO and HARRINGTON '72).

Der Zentrum-zu-Zentrum-Abstand der dicken Filamente beträgt in relaxiertem Skelettmuskel ca. 400 - 450 Å (MORIMOTO and HARRINGTON '72). Der Durchmesser dieser dicken Filamente beträgt im Durchschnitt ca. 120 Å (HARRINGTON '72), der Durchmesser der m-Filamente hingegen ca. 60 Å (KNAPPEIS and CARLSEN '68).

Fig. 27 unten zeigt, dass die Distanz zwischen einem m-Filament und einem dicken Filament (Myosin), die der Grösse der m-Brücken-Moleküle entspricht, nach dem M-Linien-Modell von KNAPPEIS and CARLSEN, das für den relaxierten Muskel aufgestellt wurde, ca. 110 - 135 Å betragen muss. Diese Grösse ist in guter Uebereinstimmung mit den von KNAPPEIS and Carlsen '68 für die m-Brücken gefundenen ellipsoiden Dimensionen von ca. 110 mal 40 Å. MORIMOTO and HARRINGTON '72 haben auf Grund von hydrodynamischen Untersuchungen mit gereinigtem M-line-Protein (MM-CPK) ebenfalls eine ellipsoide Dimension von 150 mal 43 Å berechnet, was gut in das KNAPPEIS and CARLSEN-Modell passt (Fig. 27 unten; MM-CPK ist als Dimer gezeichnet). Da dieses Modell zur Aufrechterhaltung einer stabilen

Fig. 27

Modell der M-Linien-Struktur für Myofibrillen im relaxierten Zustand

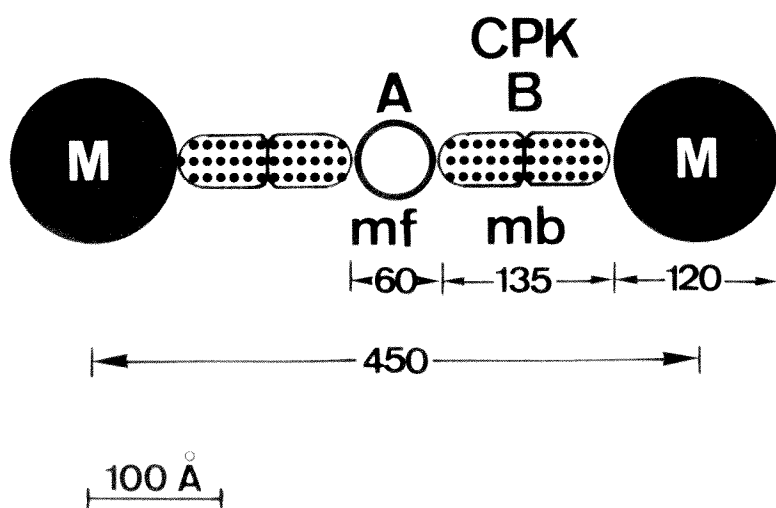
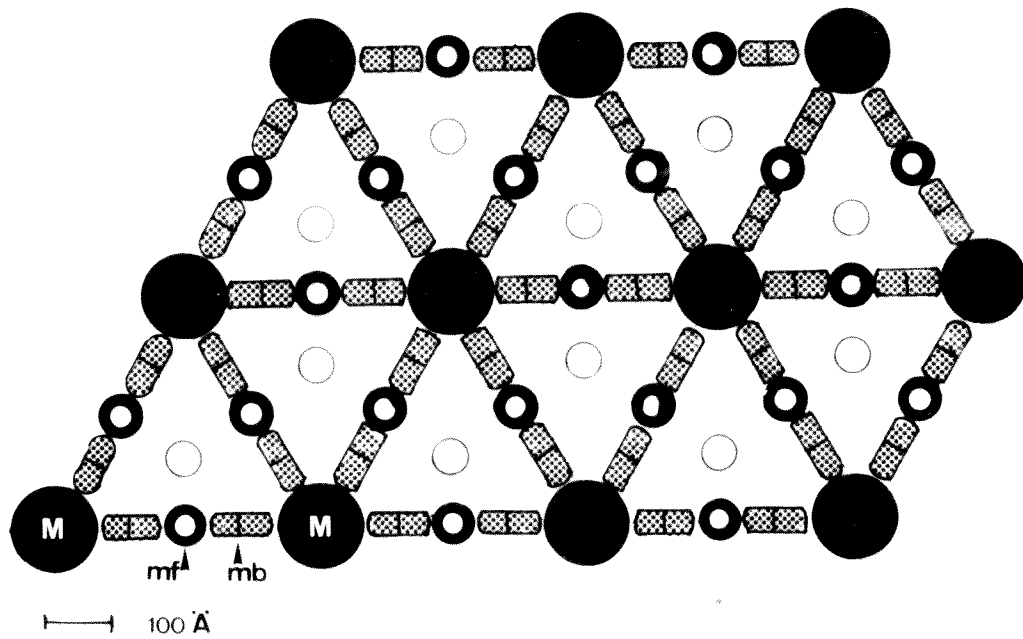
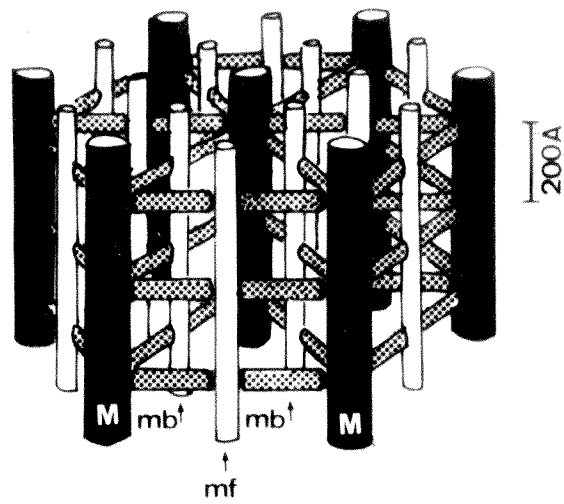
oben: Dreidimensionale, leicht modifizierte Darstellung der M-Linien-Struktur nach KNAPPEIS and CARLSEN '68.

mb: m-Brücke; mf: m-Filament

Die laterale Distanz zwischen den dicken Filamenten (M) ist aus zeichnungstechnischen Gründen 30 % grösser als die wirkliche Distanz, die aus elektronenmikroskopischen Bildern bestimmt wurde, dargestellt.

mitte: Schematische, leicht modifizierte Darstellung eines Querschnittes durch die M-Linie nach KNAPPEIS and CARLSEN '68. Die offenen Kreise stellen die Projektionen der dünnen-(Aktin)-Filamente auf die M-Linien-Ebene dar. Die anderen Bezeichnungen sind gleich wie oben.

unten: Details der schematischen Darstellung eines Querschnittes durch die M-Linie zeigen die Dimensionen der verschiedenen Proteine und die vorgeschlagene Identifikation von Protein A (EATON and PEPE '72) als m-Filament (mf) und von Protein B (EATON and PEPE '72) resp. MM-CPK als m-Brücke (mb).
M: dicke-(Myosin)-Filamente. Creatinkinase (CPK) ist als Dimer dargestellt. Die Berechnung der Dimensionen der verschiedenen Proteinstrukturen wird in der Diskussion beschrieben.



M-Linien-Struktur grundsätzlich ein Zusammenwirken der drei Proteintypen (Protein A, CPK und dicke Filamente (Myosin)) fordert, muss die CPK als Strukturelement des kontraktiven Apparates betrachtet werden.

Die im Modell verlangte Kooperativität der drei Proteintypen in ihren Interaktionen kann sowohl durch die Resultate von Rekonstitutionsexperimenten von STROMER et al. '69 als auch durch eigene Resultate bestätigt werden. STROMER et al. '69 konnten durch Inkubation von M-Linien-extrahierten Skelettmuskelfibrillen mit konzentriertem M-Linien-Extrakt wieder ursprüngliche M-Linien rekonstituieren, während dies mit einer 0 - 40 %igen Ammoniumsulfat-Fraktion desselben Extraktes nicht oder nur schlecht gelang. Diese Fraktion enthielt den grössten Teil der Proteinkomponente A aber keine CPK, weil MM-CPK gewöhnlich erst oberhalb 40 % Ammoniumsulfatsättigung präzipitiert, was hinlänglich beweist, dass sowohl Protein A (m-Filamente) als auch MM-CPK (m-Brücken) für eine vollständige Rekonstitution der M-Linie notwendig sind. Andererseits gelang es uns, gereinigte MM-CPK (m-Brücken) wieder zurück an die M-Linien-Region von extrahierten Skelettmuskelfibrillen zu binden, wobei aber elektronenoptisch betrachtet keine intakte M-Linien-Struktur aufgebaut wurde, weil offenbar die Proteinkomponente A (m-Filamente) fehlten. Die Fähigkeit der CPK, in der M-Region an die dicken Filamente zu binden, wie man es von den m-Brücken erwartet, konnte aber gezeigt werden. Es ist unter diesen Umständen nicht erstaunlich, dass bei Rekonstitutionsexperimenten mit gereinigter CPK tatsächlich weniger CPK an die M-Linie zurückbindet, als man in nativen Fibrillen finden kann (Intensität der Fluoreszenz in Fig. 23 c, e, g schwächer als in Fig. 12 a, c, g).

Das Fehlen der Proteinkomponente A und event. anderer myofibrillärer Komponenten, die bei niedriger Ionenstärke aus der M- und zum Teil auch aus der Z-Linien-Region (STROMER et al. '69) extrahiert werden, könnten auch die kleinere Spezifität der beobachteten Bindung der CPK an die extrahierten Myofibrillen im Vergleich zu den nativen Myofibrillen erklären. Unter gewissen Bedingungen (siehe Resultate) konnte auch BB-CPK, die im adulten Hühner-Skelettmuskel nicht mehr vorkommt, an die M-Region von adulten, M-Linien-extrahierten Myofibrillen von Hühner-Brustmuskel gebunden werden (Fig. 23 d, f).

Quantitative Ueberlegungen betreffend das CPK/Myosin Verhältnis in den Myofibrillen sprechen zusätzlich für das vorgestellte M-Linien-Modell und die postulierte Identität von CPK und m-Brücke. Die ca. 7 % der gesamten CPK-Menge des Skelettmuskels, die an die M-Linie gebunden sind, könnten auf den ersten Blick eine vernachlässigbar kleine, nicht signifikante Menge darstellen. Man muss aber in Betracht ziehen, dass die Gesamtmenge von CPK mit mehr als 3 mg pro Gramm Skelettmuskelgewebe (ca. 40 nMol) beträchtlich ist. Ein Vergleich des vom M-Linien-Modell geforderten mit dem experimentell gefundenen molaren Verhältnis von myofibrillärer MM-CPK zu Myosin zeigt, dass die 7 % der gesamten CPK-Aktivität durchaus in der vom Modell geforderten Größenordnung liegen. Wie Fig. 27 zeigt, ergibt sich in einer Einheitszelle des Modells ein Verhältnis von 3 mal 6, d. h. 18 CPK-Molekülen pro ein dickes Filament (M). Nach HUXLEY '72 finden sich 384 Myosin-Moleküle pro dickes Filament, was ein molares Verhältnis von CPK zu Myosin von 1 : 21 ergibt. Experimentell wurden 0.23 EU CPK-Aktivität pro mg rohe, lyophilisierte Myofibrillen gefunden (d. s. 7 % der Gesamtaktivität von CPK in einem Muskelrohextrakt). Unter Berücksichtigung der spezifischen

Aktivität von ca. 80 EU/mg MM-CPK (gemessen mit dem C/ATP CPK-Nachweissystem, wie im Waschexperiment Fig. 8) und dem Befund, dass der Anteil von Myosin in einem reinen Myofibrillenpräparat ca. 55 % beträgt (LOWEY '72), kann anhand der Molekulargewichte der beiden Proteine (83'000 für MM-CPK; $475'000 \pm 25'000$ für Myosin) ein experimentelles molares Verhältnis von MM-CPK zu Myosin von ca. 0.7 : 21 berechnet werden. Das entspricht nur einer ca. 30 %igen Abweichung von dem theoretisch im M-Linien-Modell geforderten Verhältnis. Zusätzlich ist in Betracht zu ziehen, dass die experimentell gefundenen 7 % der gesamten CPK-Aktivität, die myofibrillär gebunden ist, sicher einen unteren Grenzwert darstellen, weil, wie Fig. 8 und Tabelle III zeigen, auch durch Waschen mit Puffer von rel. hoher, physiologischen Bedingungen entsprechender Ionenstärke ein Teil der myofibrillär gebundenen CPK herausgelöst wird. Zudem ging während der differentiellen Zentrifugation im Waschexperiment (Fig. 8) ein gewisser Prozentsatz an Myofibrillen verloren und das durch die differentielle Zentrifugation erhaltene Myofibrillenpellet war nicht vollständig rein (vergl. Resultate). Die Annahme, dass tatsächlich ca. 8.5 % der gesamten CPK-Menge an die M-Linie gebunden sind und das Myofibrillenpellet einen ca. 85 %igen Reinheitsgrad aufwies, ergibt mit Leichtigkeit das geforderte molare Verhältnis von gebundener MM-CPK zu Myosin von 1 : 21.

Die Lokalisierung der CPK durch die indirekte Immunferritin-Technik zeigt weitere Anhaltspunkte, die das M-Linien-Modell unterstützen. Schaut man bei Fig. 18 in Richtung der M-Linie, kann man eine relativ dichte Ferritinmarkierung der M-Linie in der Breite von ca. 500 Å sehen, wobei deutlich zwei die M-Linie nach aussen begrenzende Linien von Ferritinpunkten gesehen werden können. Dazwischen liegen

einige Ferritinpunkte, die mehr oder weniger gut durch eine mittlere Linie verbunden werden können. Diese Anordnung der CPK-Moleküle in der M-Linie würde einer solchen der m-Brücken entsprechen, die in drei Reihen mit je ca. 200 Å Abstand voneinander angeordnet sind (KNAPPEIS and CARLSEN '68). PEPE '67 postulierte auf Grund von elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Hühner-Brustmuskel, wo er in Längsschnitten durch die M-Linie mehr oder weniger klar angedeutet 3-5 Reihen von m-Brücken findet, eine antiparallele Anordnung der dicken Filamente in der H-Region des Sarkomers. Da die Immuno-ferritin-Technik an ganzen Myofibrillen durchgeführt worden ist und die Präparate erst anschliessend dünn geschnitten wurden, waren infolge geringer Permeation der Antikörper und infolge der relativ kleinen Reaktionsrate der Antikörper im Innern der Myofibrillen keine vollständigen, parallelen Reihen von Ferritinpunkten zu erwarten.

Das in Fig. 27 vorgeschlagene M-Linien-Modell, das darauf beruht, dass zwei auf biochemischem Weg isolierte M-Linien-Proteine zwei Strukturelementen zugeordnet werden, die durch Ultrastrukturanalyse gefunden worden sind, berücksichtigt die Daten, die bis heute über die M-Linie publiziert worden sind. Zwei weitere Resultate müssen allerdings noch erwähnt werden. MASAKI and TAKAITI '72, '74 isolierten aus der M-Linie eine Proteinfraction, die zwei Proteine vom Molekulargewicht 155'000 - 165'000 resp. 94'000 - 99'000 Daltons enthielt. Die Molekulargewichte dieser Proteine wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese bestimmt. EATON and PEPE '72 folgerten, dass das M-Linien-Protein mit dem MW der Untereinheiten von 94'000 - 99'000 Daltons dem von

ihnen gefundenen Protein A, und dasjenige von 155'000 – 165'000 Daltons einem Komplex von Protein A und Protein B (CPK) entspräche. MASAKI and TAKAITI '74 glauben allerdings, dass ihre Komponente I (MW 155'000 – 165'000 Daltons) das "M-Protein" sei. Direkte Beweise dieser Annahmen liegen noch nicht vor und die definitive Zuordnung der in den beiden Laboratorien gefundenen Komponenten ist nicht geklärt. ETLINGER and FISCHMAN '72 entdeckten in Extrakten von Myofibrillen zusätzlich mehrere Proteine im Bereich der Molekulargewichte von ca. 150'000 Daltons, von denen eines oder mehrere von der M-Linien-Region stammen könnten und zusätzlich zu den zwei Elementen (KNAPPEIS and CARLSEN) als amorphes, elektronendichtes Material zwischen den m-Brücken-Strukturen auftreten könnten. Direkte Beweise fehlen auch hier.

Es muss betont werden, dass das vorgeschlagene Modell vorderhand nur für den relaxierten Muskel angenommen werden kann, da in einer maximal kontrahierten Skelettmuskelfibrille die Zentrum-zu-Zentrum-Distanz der dicken Filamente auf ca. 550 Å anwächst (MORIMOTO and HARRINGTON '72). Während eines Kontraktionszyklus würde, unter der Annahme, dass die dicken Filamente und die m-Filamente in derselben hexagonalen Anordnung bleiben, die m-Brücken-Distanz zwischen den dicken Filamenten und den m-Filamenten von ca. 150 Å auf ca. 200 Å anwachsen. Es liegen bis heute keine detaillierten Ultrastrukturanalysen der M-Linie von kontrahierten Skelettmuskelfibrillen vor. Solche Untersuchungen wären infolge des Ueberlappens der dünnen Filamente (Aktin) in der M-Linie (HAGOPIAN '70) sehr schwer zu interpretieren (KNAPPEIS and CARLSEN '68). Ferner sind auch noch keine Resultate von "in vitro" Untersuchungen über die

Interaktionen aller drei Proteine zusammen (Protein A, CPK und Myosin resp. dicke Filamente) publiziert worden. Es ist deshalb noch nicht klar, welcher Mechanismus diese strukturelle Änderung der M-Linie während eines Kontraktionszyklus erlaubt. Wenn MM-CPK als stabilisierende m-Brücke wirkt und während eines Kontraktionszyklus dieselbe Menge CPK in der M-Linie gebunden ist, könnte man sich rein spekulativ eine Art Scharniermechanismus vorstellen, der gleichzeitig mit den lateralen Bewegungen der dicken Filamente aufspringt oder sich schliesst. An diesem Prozess könnten alle drei wichtigen Strukturelemente der M-Linie beteiligt sein. Es ist nicht bekannt, ob die mediolaterale Dilatation der M-Linie (das "Aufspringen des Scharniers") während der Kontraktion einer Myofibrille und die Wiederherstellung der geordneten M-Linien-Struktur während der anschliessenden Relaxation der Myofibrille mit einer zyklischen Energieabgabe resp. Energieaufnahme gekoppelt sind. Wie in der Einleitung erwähnt, muss in den ersten Sekunden eines Tetanus eine noch unbekannte exergonische Anfangsreaktion postuliert werden, die sich als "Kontraktionswärme" äussert und die in ihrem Betrag unabhängig von der geleisteten Arbeit des Muskels ist. Die exergonische Anfangsreaktion könnte eventuell auf diese mediolaterale Dilatation, den "Zerfall" der geordneten M-Linien-Struktur, zurückzuführen sein, wobei die Wiederherstellung der geordneten, auf einem energetisch höheren Niveau stehenden M-Linienstruktur der relaxierten Myofibrille Energie benötigen würde. Die Befunde sehr vieler Experimente von WOLEDGE '71 und anderen, auf die hier nicht eingegangen werden kann, könnten durch die oben gezeigte Möglichkeit erklärt werden.

Vergleichende energetische Studien an Muskelfasern mit und ohne M-Linien-

Struktur könnten in dieser Hinsicht von Bedeutung sein.

Eingehendes Studium der "in vitro"-Interaktionen von reinem Myosin resp. dicken Filamenten, Protein A und CPK werden zeigen, ob das besprochene M-Linien-Modell bestätigt werden kann. Zukünftige elektronenmikroskopische Untersuchungen von "in vitro"-Komplexen aus dicken Filamenten, Protein A und CPK könnten einen wesentlichen Beitrag zur genaueren Aufklärung der M-Linien-Struktur leisten.

5.2 M-Linie, Muskelfasertyp und CPK-Isoenzyme

In Skelettmuskeln von Vertebraten wie auch von Invertebraten kommen verschiedene Fasertypen vor. Oft besteht ein Muskel aus zwei oder mehr Fasertypen. Die Klassifikation von Muskeln in "rote" und "weisse" Muskeln ist daher in den meisten Fällen unvollständig und ungenau. Ultrastruktur und Innervation, Kontraktionszeit, glycolytische "Kapazität" und oxidative "Kapazität" sind Kriterien, nach denen verschiedene Muskeln resp. Muskelfasern in Kategorien eingeteilt werden können.

Die quergestreiften "twitch"-Skelettmuskelfasern von Vertebraten lassen sich in folgende Kategorien einteilen:

- 1) "fast-twitch-glycolytic", im allgemeinen weisse Muskelfasern,
- 2) "fast-twitch-oxidative-glycolytic", im allgemeinen rote Muskelfasern, und
- 3) "slow-twitch-oxidative", im allgemeinen intermediäre Muskelfasern (PETER et al. 72)

Diese "Zuck"-Skelettmuskelfasern werden durch je eine motorische Endplatte inner-

viert und antworten auf einen einzigen nervösen Reiz mit einer schnellen oder langsameren "Zuck"-Kontraktion. Die quergestreiften Myofibrillen dieser "Zuck"-Muskelfasern besitzen u. a. immer eine gut ausgebildete M-Linien-Struktur (HESS '66; CHENG and BREININ '66; CHENG et al. '68).

Die "slow-tonic"-Muskelfasern sind hingegen multipel innerviert und antworten erst auf mehrere, aufeinanderfolgende nervöse Reize durch eine langsame, tonische Kontraktion. Diese quergestreiften, langsam-tonischen Muskelfasern kommen nur bei Nicht-Säugetieren z. B. Frosch, Fisch und Huhn als Skelettmuskelfasern vor (HESS '66; CHENG and BREININ '66; KORNELIUSSEN and NICOLAYSEN '73). Bei Säugetieren findet man die langsam-tonischen Muskelfasern nur noch in gewissen Extraokularmuskeln und in den Muskelspindeln einiger Skelettmuskeln (CHENG '66; CHENG-MINODA et al. '68; Ovalle '72). Während die quergestreiften Myofibrillen der langsam-tonischen Muskelfasern meistens keine M-Linie besitzen (PAGE '65; CHENG and BREININ '66; MILLER '67; KORNELIUSSEN and NICOLAYSEN '73), findet man aber in den Myofibrillen langsam-tonischer Muskelfasern von Huhn (*M. anterior latissimus dorsi*) und Katze (*M. superior obliquus*) eine deutlich sichtbare M-Linie (HESS '66). KORNELIUSSEN and NICOLAYSEN finden in gewissen langsam-tonischen Muskeln des Fisches, *Myxine glutinosa*, ebenfalls eine M-Linie (*M. parietalis*), in anderen langsam-tonischen Muskeln desselben Fisches aber keine M-Linie (*M. craniovelaris*).

Das Vorhandensein oder Fehlen einer M-Linie ist also kein absolut zuverlässiges Kriterium um generell zwischen langsam-tonischen Muskeln und "Zuck"-Muskeln unterscheiden zu können. Die Tatsache, dass einige, durch multiple Innervation

charakterisierte langsam-tonische Muskelfasern, eine M-Linie besitzen, andere aber nicht, könnte nach CHENG-MINODA et al. '68 als Speziesdifferenz erklärt werden. Eine bessere Erklärung dieser Diskrepanz ist folgende: multiple Innervation als morphologisch physiologisches Kriterium der langsam-tonischen Muskelfasern charakterisiert mehr als einen langsam-tonischen Fasertyp, wobei der eine eine M-Linie besitzt, der andere aber nicht. Diese Erklärung wird durch die Ergebnisse von KORNELIUSSEN and NICOLAYSEN '73 unterstützt (siehe oben). Ebenso zeigen Ergebnisse von Untersuchungen an Muskelspindeln, die als sensorische Streckrezeptoren im Skelettmuskelgewebe sowohl von Vertebraten als auch von Invertebraten vorkommen, dass es grundsätzlich zwei Typen von langsam-tonischen Fasern ("nuclear-bag"-Fasern) gibt (MILBURN '73).

Der Herzmuskel, bezüglich Innervation und Reizleitung weder mit quergestreifter noch glatter Muskulatur vergleichbar (KATZ '70), bezüglich Reizantwort (Kontraktion) zwischen glatter und quergestreifter Muskulatur stehend, ist biochemisch am ehesten mit dem "roten", oxidativen, mitochondrienreichen Skelettmuskel zu vergleichen (NAKAMURA et al '71). SYROVY '72 fand eine sehr ähnliche Myosin-ATPase-Aktivität von gereinigtem Myosin aus Herzmuskel und dem M. anterior latissimus dorsi (langsam-tonischer Muskel) des Huhnes, während der M. posterior latissimus dorsi (schneller "Zuck"-Muskel) sich in dieser Hinsicht deutlich von den beiden ersten unterschied. Das elektrophoretische Muster der leichten Ketten des Myosins von Herzmuskel und M. anterior latissimus dorsi war ebenfalls identisch (zwei Banden), während dasjenige von M. posterior latissimus dorsi verschieden war (drei Banden). Hühner-Herzmuskelfibrillen, in dieser Hinsicht also dem langsamen,

tonischen Muskeltyp näherstehend, besitzen, wie diese auch, keine elektronenoptisch sichtbare M-Linie (SOMMER and JOHNSON '69). Ebenfalls keine M-Linie wurde in Herzmuskeln von Crevetten, Frosch, Flussneunauge, Fink und Kolibri u. a. gefunden (STALEY and BENSON '68; KOMURO '69; BOZNER and KNIERIEM '70; JEWETT et al. '71), während die Herzmyofibrillen von Säugetieren immer eine deutliche M-Linie zeigen (NIEMEYER and FORSSMANN '71).

Wie wir zeigen konnten, besitzen Hühner-Herzmyofibrillen Z-Linien-gebundene BB-CPK. Sie funktionieren offensichtlich ohne M-Linien-gebundene CPK und ohne M-Linien-Struktur überhaupt. Hühner-Skelettmyofibrillen ("fast-twitch", "slow-twitch" und "slow-tonic") besitzen alle eine elektronenoptisch sichtbare M-Linie und zugleich M-Linien-gebundene MM-CPK. Sie funktionieren offensichtlich aber auch ohne Z-Linien-gebundene CPK. Weder M- und Z-Linien-gebundene CPK noch das Vorhandensein einer M-Linie können generell als absolut notwendig für die Muskelfunktion bezeichnet werden. Das Auftreten von verschiedenen CPK-Isoenzymen und deren unterschiedliche Lokalisation, sowie das Vorhandensein oder Fehlen einer M-Linien-Struktur können aber einen wesentlichen Bestandteil der Unterschiede von Herz- und Skelettmuskel des Huhnes darstellen. Die Myofibrillen von schnellen "Zuck"-Muskeln ("fast-twitch" M. pectoralis major oder M. posterior latissimus dorsi) und langsamen "Zuck"-Muskeln (Beinmuskulatur) wie auch von langsam-tonischen Muskeln ("slow-tonic" M. anterior latissimus dorsi) des Huhnes besitzen eine M-Linie. Zugleich wird in all diesen Muskeltypen M-Linien-gebundene CPK gefunden. Die meisten Herzmuskelfibrillen des Huhnes hingegen besitzen keine M-Linie,

und dementsprechend wurde auch keine in der M-Region gebundene CPK gefunden. Beim kleinen Prozentsatz von Herzmuskelfibrillen, wo MB-CPK in der M-Region lokalisiert werden konnte (Fig. 13), muss es sich um Myofibrillen eines anderen Herzmuskel-Zelltyps handeln. Tatsächlich findet SCOTT '71 in Hühnerherzen sog. PURKINJE-Muskelzellen, die grösser sind als die normalen Herzmuskelzellen und in einer einzigen Zellschicht unter dem Endokard liegen. Die Myofibrillen dieses Zelltyps besitzen eine, wenn auch z. T. nur schwach angedeutete M-Linie. Im Falle der Herzmuskel- und Skelettmuskeltypen des Huhnes ist also das Vorhandensein resp. Fehlen einer elektronenoptisch sichtbaren M-Linie streng korreliert mit dem Auftreten resp. Fehlen von M-Linien-gebundener M-CPK (MM-CPK in den Myofibrillen aller Skelettmuskeltypen, MB-CPK in den Myofibrillen des PURKINJE-Herzmuskel-Zelltyps). Diese Tatsachen können als weiterer Beweis dafür betrachtet werden, dass M-CPK ein integraler Bestandteil der M-Linien-Struktur ist.

Es stellt sich die Frage, ob das Vorhandensein einer M-Linie bei allen Vertebraten generell mit dem Auftreten von M-Linien-gebundener M-CPK korreliert ist.

Genauere Lokalisationsstudien von CPK-Isoenzymen sind von uns nur mit verschiedenen Muskeln des Huhnes gemacht worden, wo die Korrelation offensichtlich ist. Es bestehen aber Resultate von elektrophoretischen Untersuchungen über das Vorkommen von CPK-Isoenzymen in den Geweben verschiedener Tiere (EPPENBERGER et al. '70). Daraus kann entnommen werden, dass im Herzmuskel von Säugetieren (Ratte, Kaninchen, Mensch usw.), im Gegensatz zum Hühner-Herzmuskel, immer MM-CPK das vorherrschende CPK-Isoenzym ist. Wie bereits erwähnt, besitzen die Herzmuskelfibrillen von Säugetieren immer eine M-Linie.

Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, dass ein Teil der MM-CPK auch an die M-Linie gebunden ist. Aus diesen vergleichenden Literaturstudien geht hervor, dass in Muskelgeweben, deren Myofibrillen eine M-Linie besitzen, elektrophoretisch auch M-CPK nachgewiesen werden kann.

Um vollständige Information betreffend M-Linie, M-Linien-gebundene CPK und Muskeltyp zu erhalten, müssen weitere Versuche mit Herz- und Extraokularmuskeln von Säugern sowie mit langsam-tonischen und schnellen "Zuck"-Muskefasern von Froschmuskeln durchgeführt werden.

Bei Invertebraten findet man anstelle der CPK ein homologes Enzym, die Arginkinase (APK). In allen Arthropoden und Crustaceen und in vielen Mollusken kommt diese APK als Monomer mit einem Molekulargewicht von ca. 40'000 Daltons vor (VIRDEN and WATTS '65; BLETHEN and KAPLAN '68; WALLIMANN and EPPENBERGER '73). Die Struktur der M-Linie der Myofibrillen von Invertebraten muss von derjenigen der Myofibrillen von Vertebraten erheblich abweichen, weil das Verhältnis von dünnen zu dicken Filamenten bei Invertebraten 3 : 1 bis 7 : 1 beträgt, bei Vertebraten hingegen immer 2 : 1. Daraus ergibt sich, dass auch die geometrische Anordnung der dünnen Filamente bezüglich der hexagonalen Gitterachsen der dicken Filamente verschieden ist (HOYLE '69). Es stellt sich deshalb die grundsätzliche Frage, ob die M-Linien-Struktur von Invertebraten, wenn vorhanden, überhaupt mit derjenigen von Vertebraten verglichen werden kann.

Viele Muskelfasern in Invertebraten, besonders diejenigen mit langer Sarkomerlänge, gleichen den langsam-tonischen ("slow-tonic") Fasern von Froschmuskeln und besitzen ebenfalls keine M-Linie. So wurde in den Riesenmuskelfasern der Entenmuschel, *Balanus nubilus* (HOYLE et al. '73), in den quergestreiften Muskelfasern des Pfeilschwanzkrebses, *Limulus polyphemus* (DEWEY et al. '73), keine M-Linie gefunden. In den tonischen und phasischen Muskeln der Heuschrecke, *Schistocera gregaria* (COCHRANE et al. '72), im Femoral-Muskel der Schabe, *Leucophaea maderae fabricius* (HAGOPIAN '66), in Bein- und Flugmuskeln des Lepidopteren, *Achalarus lyciades* (REGER and COOPER '67), und in den Flugmuskeln von verschiedenen Libellen (SMITH '66) und von *Drosophila* (GOODE '72) ist ebenfalls keine M-Linie sichtbar. In diesen Fällen sind wohl Brücken zwischen den dicken Filamenten vorhanden, aber sie sind nicht in einer M-Linie konzentriert, sondern auf die ganze Länge der A-Bande des Sarkomers verteilt. Eine deutlich sichtbare M-Linie ist aber in den Flugmuskelfibrillen der Blattlaus, *Megoura viciae* (SMITH '65), und der Schmeissfliege, *Phormia regina* (CHILDRESS et al. '70), zu finden. Eine doppelte M-Linie wurde von HOYLE '73 in weissen, rosa und roten Muskeln der Schwimmbeine von *Portunus sanguinolentus* (Crustacea) gefunden. Die Frage, ob in den seltenen Fällen, wo bei Invertebraten eine M-Linie gefunden wird, APK anstelle von CPK vorliegt, und ob ein Zusammenhang zwischen den verschiedenen Formen der APK (Monomer, Dimer) und dem Auftreten einer M-Linie besteht, ist noch ungeklärt.

Es muss an dieser Stelle betont werden, dass es speziell in sehr dünnen Muskelschnitten schwierig sein kann, eindeutig zu entscheiden, ob eine M-Linie vorhanden ist oder nicht. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen von relativ

dicken Muskelschnitten können aber diesbezüglich eindeutige Aussagen gemacht werden (FAHRENBACH '67).

Es stellt sich die Frage, ob Phänomene wie die ontogenetische Transition von einem Isoenzym zu einem anderen (z.B. von BB-CPK zu MM-CPK während der Skelettmuskelentwicklung des Huhnes; TURNER and EPPENBERGER '74; TURNER et al. '74) oder die stadien- und gewebespezifische Verteilung sowie die verschiedene Lokalisation von Isoenzymen von signifikanter physiologischer Bedeutung sein müssen (MM-CPK, lokalisiert in der M-Linie der Skelettmuskelfibrillen; BB-CPK, lokalisiert in der Z-Linie der Herzmuskelfibrillen des Huhnes). WITTEVEEN et al. '74 fanden mit einem empfindlichen CPK-Nachweis-System bei sehr niedrigen Substratkonzentrationen (CP, ADP) katalytische Unterschiede zwischen den drei CPK-Isoenzymformen, wobei unter diesen Bedingungen BB-CPK eine wesentlich höhere Aktivität aufwies als MM-CPK. Der adaptive Wert der verschiedenen CPK-Isoenzymformen scheint nebst den gefundenen katalytischen Unterschieden aber vielmehr darin zu bestehen, dass die verschiedenen CPK-Isoenzyme mit unterschiedlichen Komponenten des kontraktiven Apparates und somit mit unterschiedlichen Regionen der Myofibrillen interagieren können. Tatsächlich lässt sich durch die angeführten Lokalisations-, Inkubations- und Reinkubationsexperimente mit nativen, resp. extrahierten Myofibrillen ein unterschiedliches Bindungsvermögen der CPK-Isoenzyme bezüglich der M- und Z-Linie von Skelett- und Herzmuskel zeigen. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist die Lokalisation der CPK-Isoenzyme in nativem, adultem Herz- und Skelettmuskel des Huhnes in der Art spezifisch, dass MM-CPK an der M-Linie der Skelettmuskelfibrillen und BB-CPK an der Z-Linie der Herzmuskelfibrillen lokalisiert

sind. Zudem fand sich während der ganzen Skelettmuskelentwicklung des Huhnes mit der parallel verlaufenden CPK-Isoenzymtransition nie B-CPK in der M-Linie von Skelettmuskelfibrillen, obwohl zu Beginn der Ontogenese des Huhnes sowohl BB- wie BM-CPK in relativ grossen Konzentrationen vorkommen. Es scheint also, dass nur das MM-CPK-Isoenzym spezifisch an die M-Linie von sich entwickelnden Myofibrillen binden kann. Es ist aber unwahrscheinlich, dass MM-CPK in den frühesten Stadien der Myofibrillenbildung für den Aufbau der hexagonalen Anordnung der dicken Filamente notwendig ist; denn ETLINGER and FISCHMAN '72 fanden in den frühesten Stadien von sich organisierende Myofibrillen bereits hexagonal angeordnete Bündel von dicken Filamenten, ohne nachweisbare M-Linien-Struktur. Zudem gibt es, wie bereits erwähnt, funktionstüchtige adulte Muskeln, deren Myofibrillen wohl hexagonal angeordnete Filamente, aber keine M-Linie aufweisen (z.B. Hühner-Herzmyofibrillen). Es scheint daher, dass die M-Linien-gebundene MM-CPK und die anderen M-Linien-Komponenten als "Strukturproteine" eher dazu dienen, dass sie neben ihrer katalytischen Funktion helfen, die Integrität bereits gebildeter hexagonaler Strukturen der dicken Filamente aufrechtzuerhalten.

Ein CPK-Isoenzym (MM-CPK), das sich infolge einer höheren Affinität zu Strukturen des kontraktilen Apparates (M-Linie) an einer physiologisch "günstigen" Position in der Myofibrille "einnisten" kann, wird somit sekundär für die Gesamtaktivität eines Muskels bedeutende katalytische Vorteile bringen und dadurch wesentlich zur physiologischen Charakteristik eines Muskeltyps beitragen. Unter diesem Gesichtspunkt gewinnt die M-Linien-gebundene CPK und der diskutierte Zusammenhang von M-Linien-Struktur und Muskeltyp an physiologischer Bedeutung.

5.3 Physiologische Bedeutung des CPK-Systems^{a)} unter besonderer Berücksichtigung der myofibrillären CPK

Die im folgenden diskutierten Modelle befassen sich mit der Frage der Effizienz der ATP-Regeneration durch das CPK-System und mit den Möglichkeiten, wie die myofibrilläre CPK in der M- oder Z-Linie diese Effizienz erhöhen könnte. In dem allgemein akzeptierten "sliding filament model for contraction of striated muscle" von HUXLEY '65 wird gefordert, dass die dünnen Filamente (Aktin) gegenüber den dicken Filamenten (Myosin) unbehindert verschiebbar sind und die "Myosinköpfe" der dicken Filamente in einer Art Ruderbewegung durch Bilden und Lösen von Myosin-Aktin-Brücken eine Kontraktion bewirken können. Postuliert man eine enge Funktionsbeziehung des ATP-hydrolysierenden und des ATP-regenerierenden Systems, so könnte die Lokalisation der CPK an der M- oder Z-Linie des Sarkomers auf den ersten Blick befremden, weil diese Stellen nicht mit dem Ort (A-Banden), wo ATP hydrolysiert wird, übereinstimmen. Es ist aber leicht verständlich, dass in den dynamischen A-Banden, wo die dünnen und die dicken Filamente überlappen resp. verschiebbar sein müssen, "kein Platz" für zusätzliche Elemente des ATP-regenerierenden Systems vorhanden sein kann. Eine mögliche funktionelle Beziehung zwischen dem ATP-hydrolysierenden System und dem ATP-regenerierenden System könnte grundsätzlich auch in einem effizienteren Austausch von Substraten und Produkten der beiden Systeme im myofibrillären Raum bestehen, ohne dass diese am gleichen Ort in der Myofibrille lokalisiert sein müssten. ADP ist nämlich zugleich Produkt der Myosin-ATPase-Reaktion und Substrat der CPK-Reaktion.

a) siehe Fig. 28

5.3.1 Aktin-gebundenes ADP und ATP-Regeneration.

Es ist generell akzeptiert, dass Adenin-nukleotide an Aktin gebunden sind (MARTONOSI et al. '60 a, b). Ein Mol globuläres Aktin, G-Aktin, bindet ein Mol Adenosin-nukleotid und ein Mol divalente Kationen (Mg, Ca). Das Adenin-nukleotid kann sowohl ADP wie ATP sein. Wenn n • G-Aktin-ATP zu F-Aktin-ADP polymerisiert, wird das gebundene ATP dephosphoryliert (SZENT-GYÖRGYI and SZENTKIRALYI '60). Im F-Aktin-Polymer oder in den durch F-Aktin, Troponin und Tropomyosin gebildeten dünnen Filamenten der Myofibrillen wird somit immer nur gebundenes ADP gefunden (MARTONOSI et al. '60 a, b; GERGELY et al. '60). Aktin kann unter entsprechenden "in vitro" Bedingungen (Ionenstärke, Adenin-nukleotide) reversibel polymerisiert resp. depolymerisiert werden. Von den ca. 1.03 $\mu\text{Mol ADP/g}$ ruhendem Muskel (FITCH et al. '74) sind nach SERAYDARIAN et al. '62 und MCGILVERY and MURRAY '74 ungefähr 50 - 60 % an Aktin gebunden. BARANY and BARANY '72 zeigten, dass in isoliertem, ruhendem, besonders reichlich mit Sauerstoff versorgtem Froschmuskel der ADP-Gehalt in der Grössenordnung des an Aktin gebundenen ADP liegen kann. Unter diesen Bedingungen ist also praktisch alles, in einer Muskelzelle im Ruhezustand vorhandene ADP, an Aktin gebunden, während ATP das an Myosin gebundene Nukleotid ist. Der Befund, dass ADP an F-Aktin gebunden vorliegt, hat zu Untersuchungen geführt, ob dieses Aktin-gebundene ADP direkt durch die CPK Reaktion zu ATP rephosphoryliert werden könne oder nicht. Die Befunde von STROHMAN '58; YAGI and NODA '60; YAGI and MASE '62, wonach das an Aktin gebundene ADP durch die CPK-Reaktion in Anwesenheit von CP direkt zu ATP rephosphoryliert werden könne, wurden in Uebereinstimmung mit den Resultaten von PERRY '54 durch Experimente von MOOS '64 und WEST et al. '67 widerlegt. Diese Au-

toren konnten den beobachteten Effekt durch kleine Mengen von freiem, nicht an Aktin gebundenem ADP, das auch nach längerer Glycerinisierung von Myofibrillen und nach Behandlung mit Deoxycholat noch in den Myofibrillen anzutreffen ist, erklären. Eine direkte Rephosphorylierung des Aktin-gebundenen ADP zu ATP durch die CPK-Reaktion scheint also grundsätzlich nicht möglich zu sein.

HAGOPIAN '70 zeigte in einer elektronenmikroskopischen Studie, dass am Ende einer vollständigen Kontraktion von Hühner-Brustmuskelfibrillen ca. $0.35 \mu\text{m}$ der $1 \mu\text{m}$ langen Aktinfilamente von beiden Seiten her durch die M-Linien-Struktur stossen, die optisch hell erscheinende H-Region bei diesem Ueberlappen verwischen und eine um die M-Linie symmetrische, dunkel erscheinende Kontraktionsbande von $0.7 \mu\text{m}$ bilden. Rund ein Drittel der Länge der Aktinfilamente berührt also bei einer Kontraktion die M-Linie direkt, welche in der in Fig. 27 als Projektion der Aktinfilamente bezeichneten Position durchstossen wird. Bei diesem Prozess wird jedes Aktinfilament, sterisch durch die umgebende M-Linien-Struktur genau in den Zwischenräumen der hexagonalen Anordnung gehalten, von je dreimal sechs CPK-Molekülen umgeben. KNAPPEIS and CARLSEN '68 wiesen nun allerdings darauf hin, dass die M-Linien-Struktur während einer Kontraktion infolge der bereits besprochenen mediolateralen Dilatation "desorganisiert" wird. Aus dem besagten muss eine erste Modellvorstellung, nämlich dass die mit ADP "beladenen" dünnen Filamente während des "Durchstossens" der M-Linie (HAGOPIAN '70), also dort, wo im Skelettmuskel CPK lokalisiert ist, nach einer Kontraktion "regeneriert" werden könnten, um "beladen" mit ATP nach der Relaxation für eine weitere Kontraktion bereit zu sein, fallengelassen werden. Eine andere Variante dieses Modells, bei dem das Aktin-gebundene ADP nicht direkt rephosphoryliert würde, sondern gegen freies ATP ausgetauscht werden

könnte (SZENT-GYÖRGYI and PRIOR '66), muss im folgenden in Betracht gezogen werden. Nach dieser Variante könnten die mit ADP "beladenen" dünnen Filamente während einer Kontraktion an der M-Linie ADP gegen ATP, das durch die in der M-Linie lokalisierte CPK regeneriert wurde, austauschen. Anschliessend könnte während der Relaxation das ATP an Myosin abgegeben und wiederum gegen das durch die Myosin-ATPase-Reaktion gebildete ADP ausgetauscht werden. Dadurch wäre eine sinnvolle funktionelle Beziehung zwischen dem ATP-hydrolysierenden - und dem ATP-regenerierenden System gegeben. Ein solcher zyklischer Mechanismus würde aber verlangen, dass der Betrag und der zeitliche Verlauf des Adenin-nukleotid-Austausches direkt von der Kontraktionsaktivität (ATP-Verbrauch) des Muskels abhängig sein müsste. Tatsächlich wird in "in vitro"-Versuchssystemen der Austausch von F-Aktin-gebundenem ADP gegen freies ATP in Anwesenheit von Myosin unter Kontraktionsbedingungen wesentlich stimuliert (SZENT-GYÖRGYI and PRIOR '66; MOOS et al. '67). Der zeitliche Verlauf des Austausches ist aber nicht korreliert mit der Bildung eines Aktomyosinkomplexes oder mit der Superpräzipitation eines Aktomyosinpräparates (MOOS et al. '67). Ein Austausch ähnlicher Grössenordnung tritt auch auf, wenn eine Kontraktion gar nicht stattfindet, z.B. mit ADP als freiem Austauschpartner (MOOS et al. '67). APPENHEIMER et al. '72 zeigten, dass der beobachtete Nukleotid-Austausch in nativen Myofibrillen viel geringer ist, als in künstlichen Aktomyosin-Präparationen. Wenn der Austausch eine gesetzmässige Begleiterscheinung der Bindung von Aktin an Myosin resp. einer Kontraktion wäre, so würde man das Umgekehrte erwarten. BARANY et al. '66 konnten zeigen, dass auch Adenin-nukleotid-freies F-Aktin mit Myosin interagieren kann, indem es sowohl die Myosin-ATPase wie die Superpräzipitation aktiviert. MARTONOSI et al. '60b zeigten in "in vivo"-Versuchen, dass offenbar kein Zu-

sammenhang zwischen dem Austausch von F-Aktin-gebundenem ADP und der Kontraktion besteht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das an Aktin gebundene ADP weder direkt durch die CPK-Reaktion zu ATP rephosphoryliert (regeneriert) werden kann, noch dass ein zyklischer Nukleotidaustausch an den dünnen Filamenten stattfindet, der im Zusammenhang mit der Kontraktionsaktivität (ATP-Hydrolyse) und der ATP-Regeneration (CPK-System) einer Muskelzelle steht. Aus diesem Grunde müssen die beiden im Zusammenhang mit der Rephosphorylierung des Aktin-gebundenen ADP diskutierten Varianten des Modells als widerlegt gelten. Die physiologische Bedeutung der Aktin-gebundenen Adenin-nukleotide bleibt somit weiterhin ungeklärt. Denn auch die Theorie, dass die Polymerisation von G-Aktin zu F-Aktin nur durch die bei der Hydrolyse des G-Aktin-gebundenen ATP freiwerdende Energie ermöglicht werde, konnte von COOKE and MURDOCH '73 durch Polymerisationsstudien mit einem nicht hydrolysierbaren ATP-Analogon (AMP-PNP) widerlegt werden. Die von vielen Autoren vorgeschlagene Stabilisierungs- und Reparaturfunktion der Aktin-gebundenen Adenin-nukleotide scheint somit in Frage gestellt zu sein.

5.3.2 Regeneration von ATP im myofibrillären Raum, unabhängig von Aktin-gebundenem ADP. Ein Funktionsmodell des CPK-Systems^{a)}

Im folgenden wird versucht, die physiologische Bedeutung des CPK-Systems, besonders der myofibrillären CPK, im Hinblick auf die Energiebereitstellung und die

a) siehe Fig. 28

ATP-Regeneration in der Muskelzelle, unabhängig vom Aktin-gebundenen ADP, zu diskutieren. Um über das in Fig. 28 vorgeschlagene Funktionsmodell sprechen zu können, müssen zuerst die Art und Weise aufgezeigt werden, nach welcher die Konzentrationsveränderungen von "energiereichem Phosphat" während der Kontraktionsaktivität eines Muskels ablaufen. Die von FITCH et al. '74 in ruhendem Skelettmuskel von Ratten bestimmten Konzentrationen von C, CP und Adenin-nukleotiden sind von folgender Grössenordnung: 22.5 $\mu\text{Mol CP/g}$, 16.2 $\mu\text{Mol C/g}$, 6.77 $\mu\text{Mol ATP/g}$ und 1.03 $\mu\text{Mol ADP/g}$. Weniger als 10 % der in ruhendem Muskel vorliegenden ATP-Menge ist mit Myosin assoziiert (PERRY '52; BARANY and BARANY '72), während ca. 0.6 $\mu\text{Mol ADP/g}$ an Aktin gebunden ist (SERAYDARIAN et al. '62; McGILVERY and MURRAY '74). Das Verhältnis des Gesamtgehaltes an Creatin (CP und C) zum Gesamtgehalt an Adenin-nukleotiden beträgt also ca. 5:1, dasjenige von CP zu ATP ("energiereiche Phosphate") ca. 4:1. HILL '62 und '64 versuchte Adenin-nukleotide resp. CP mit Hilfe von Isotopen- und Phosphatpräzipitations-Techniken im Skelettmuskel zu lokalisieren und fand sowohl Adenin-nukleotide als auch CP in der A-I-Grenzregion von Myofibrillen. Es konnte aber nicht gezeigt werden, ob diese Verbindungen in der Myofibrillen-Matrix selbst oder nur im intermyofibrillären Raum lokalisiert sind. Die Lokalisation von niedermolekularen, löslichen Verbindungen ist schwierig, und der Autor konnte eine Vielzahl von möglichen, durch die angewandten Methoden bedingten Artefakte nicht ausschliessen. Die Interpretation dieser Resultate wird daher äusserst schwierig.

An Froschmuskeln, die mit relativ niedrigen Konzentrationen von Jodacetat behandelt wurden (vollständige Blockierung der Glycolyse, nicht aber der CPK) konnte durch CARLSON and SIGER '60 gezeigt werden, dass während einer

Kontraktion PC verbraucht wird, während die ATP Konzentration noch über längere Zeit konstant bleibt. Die Aktivität des CPK-Systems und die Konzentration an CP sind im Muskelgewebe gross genug, um längere Zeit eine unveränderte ATP Konzentration aufrechtzuerhalten und grössere Abweichungen vom Gleichgewicht zu vermeiden. Wenn das CPK-System hingegen durch 2,4-Dinitrofluorobenzol gehemmt wird, kann eine Veränderung in der ATP Konzentration festgestellt werden (INFANTE and DAVIES '65). Nach dem Blockieren des CPK-Systems kann in isolierten Froschmuskeln während wiederholten Kontraktionen noch mindestens die Hälfte der totalen Menge von ATP hydrolysiert werden (INFANTE and DAVIES '65). Neben der ATP-Hydrolyse treten unter diesen extremen Bedingungen die folgenden Reaktionen auf: die vermehrte ATP-Regeneration durch die Myokinase-Reaktion, die Desaminierung von AMP zu IMP und die Bildung von Hexosemonophosphat (KUSHMERICK and DAVIES '69). Es gibt aber bis heute noch keinen Hinweis darauf, ob und in welchem Ausmass extramitochondriales, freies ATP unter Normalbedingungen "in vivo" direkt für eine Muskelkontraktion gebraucht werden kann (McGILVERY and MURRAY '74). Die Veränderungen der von McGILVERY and MURRAY '74 berechneten Gleichgewichtskonzentrationen von CP, ATP, ADP und AMP, die während einer intensiven Muskelbeanspruchung auftreten können, zeigen, dass ca. 70 - 80 % der CP-Reserven abgebaut werden können, ohne dass die ATP-Konzentration beeinflusst wird. Diese Befunde wurden "in vivo" durch Untersuchungen an Herzmuskeln bestätigt. Durch NAEGLE '70 wurden Daten verschiedener Autoren zusammengestellt, die zeigen, dass z.B. im hypoxischen Herzmuskel die Tonus- und Kontraktilitätsverminderung mit der CP-Abnahme parallel verläuft. Schon eine Minute nach Atemstillstand ist CP durch das rhythmische Weiterschlagen des Herzmuskels zu ca. 90 % abgebaut. Parallel dazu verläuft die Abnahme

der Kontraktilität, obwohl ATP noch in praktisch unverminderter Konzentration vorliegt (KAMMERMEIER und DOERING '61). Nach ca. 15 min Atemstillstand ist dann auch ATP durch das rhythmische Weiterschlagen des Herzens zu mehr als 80 % abgebaut. Wenn zu diesem Zeitpunkt die Sauerstoffversorgung wieder hergestellt wird, kehrt die CP-Konzentration sehr schnell zur Norm zurück und in gleichem Masse erholt sich der Muskel funktionell, indem Tonus und Kontraktilität gesteigert werden, obwohl die ATP-Konzentration erst 40 - 50 % des Normwertes erreicht hat (KAMMERMEIER '64). Es treten also im Muskel trotz normaler ATP-Konzentration Kontraktionsstörungen auf, wenn CP fehlt. Andererseits wird die Funktionsfähigkeit trotz erheblich verminderter ATP-Konzentration durch Normalisieren des CP-Gehaltes wieder hergestellt. Offenbar ist die Verschiebbarkeit von ATP "in vivo" erheblich behindert, und es kann zuwenig ATP vom cytoplasmatischen Raum oder von den Mitochondrien in die Myofibrillen diffundieren, um die volle Kontraktilität aufrechtzuerhalten. Diese scheint vielmehr vom CP-Gehalt und dem Mitwirken des CPK-Systems abhängig zu sein (NAEGLE '68a). Einen Beweis dafür, dass die Verschiebbarkeit der Adenin-nukleotide "in vivo" nicht einfachen Diffusionsgesetzen gehorcht, erbrachte JOEBIS '59, der zwischen dem Einsetzen der Kontraktion und dem Ansprechen der Atmungskette eine Verzögerung von 60 - 250 msec fand. Vom gleichen Autor wurde die Zeit, die ein frei diffundierendes ADP Molekül brauchen würde, um die ca. 0.1 bis 0.2 μm lange Strecke von den Myofibrillen bis zu den Mitochondrien zurückzulegen, auf maximal 5 msec geschätzt. Ferner wurde von RAMIREZ '69 durch Messungen des Red/Ox-Zustandes der Atmungskette im rhythmisch tätigen Herzmuskel ein Dämpfungseffekt gefunden, wonach der rhythmisch diskontinuierliche Energiestrom an den Myofibrillen (rhythmischer ATP-Verbrauch resp. ADP-Produktion) an der Atmungskette

um rund 90 % gedämpft erscheint. Sowohl der besprochene Verzögerungseffekt des Adenin-nukleotid-Transportes wie auch der Dämpfungseffekt des Energieflusses zwischen den Mitochondrien und den Myofibrillen lässt sich nach NAEGLE '70 durch die Beteiligung des CPK-Systems an der Energiebereitstellung und am Energietransport erklären. Die beiden Effekte konnten durch NAEGLE '68b unter Berücksichtigung des CPK-Systems mit der entsprechenden Kinetik der ADP-Rephosphorylierung und der Umsatzgeschwindigkeit der CPK-Reaktion in beiden Richtungen mathematisch quantitativ erfasst werden. Die theoretischen und experimentellen Befunde stimmen gut überein (NAEGLE '70). Die Beteiligung der CPK-Reaktion am Energietransport erklärt auch den Befund, wonach sowohl die CP-Konzentration als auch die CPK-Aktivität die Kontraktilität eines Muskels entscheidend beeinflussen. CP ist durch Vermittlung der CPK-Reaktion ein notwendiges Bindeglied für die Energieversorgung der Myofibrillen. Unter diesem Gesichtspunkte gewinnt die myofibrillär lokalisierte CPK an Gewicht.

Eine myofibrilläre Lokalisation der CPK im Bereich der M- oder Z-Linien-Struktur von Skelett- resp. Herzmuskelfibrillen könnte gegenüber einem Vorkommen von CPK ausschliesslich im Sarkoplasma bedeutende physiologische Vorteile haben. Ein als "lösliches Enzym" im intermyofibrillären Raum anwesendes CPK-Molekül hätte zwar den Vorteil, während jedem Kontraktionsstadium einer Myofibrille näher an den in der äusseren Peripherie lokalisierten "Myosinköpfchen" der dicken Filamente zu liegen; CPK-Moleküle, die im Zentrum der im Querschnitt scheibenförmigen M-Region gebunden sind, wären aber näher an den "Myosinköpfchen", die auf beiden Seiten der M-Linie in den A-Banden, im Innern der Myofibrillen lokalisiert sind. Die M- oder Z-Linien-gebundenen CPK-Moleküle im Innern der scheibenförmigen M- resp. Z-Linien-Region würden auch in einer physiologisch

günstigeren Position lokalisiert sein, weil Verschiebbarkeit und Diffusionsgeschwindigkeit von kleinmolekularen Verbindungen (Substrate und Produkte der ATPase- resp. der CPK-Reaktion) längs der Myosin-Aktin-Filamente grösser sind als senkrecht zu diesen. Zudem werden bei einer annähernd volumenkonstanten Kontraktion der Myofibrillen diese kleineren Moleküle im Flüssigkeitsstrom den Filamenten entlang von beiden Seiten gegen die M- resp. Z-Linie "gepresst", wobei die dort lokalisierte CPK auch im Innern der Myofibrillen eine schnelle Regeneration von ATP ermöglichen würde. Die dünnen Filamente würden während eines Kontraktionszyklus als eine Art Kolben die intramyofibrilläre flüssige Phase mit den niedermolekularen Verbindungen (ATP, ADP, C, CP u.a.) in den Zwischenräumen der hexagonal angeordneten dicken Filamente parallel zu diesen verschieben. Die Folge davon wäre eine gute Durchmischung von löslichen Molekülen längs der Filament-Strukturen, vorbei am ATP-hydrolysierenden System (A-Bande) und am ATP-regenerierenden System (M- oder Z-Linie).

Eine Rephosphorylierung von ADP durch die sarkoplasmatisch "lösliche" CPK im intermyofibrillären Raum hätte den Nachteil, dass andauernd sowohl ADP und ATP wie auch CP und C senkrecht zu den Filamentstrukturen der Myofibrillen transportiert werden müssten, wobei ATP einen zweifach kleineren Diffusionskoeffizienten aufweist und in vierfach kleinerer Konzentration als CP vorliegt (NAEGLE '68a, '70). Wie bereits besprochen, ist für ATP die Bewegungsfreiheit in der Muskelzelle wesentlich eingeschränkt, während das in grossen Mengen vorhandenen CP relativ leicht diffundieren kann. Diese Befunde stimmen mit den Resultaten von PERRY '54 überein, die zeigen, dass in Anwesenheit von CPK und kleinsten Mengen von freiem ADP bereits 3 μMol CP ausreichen, um native Myofibrillen zur Kontrak-

tion zu bringen, während für dieselbe Wirkung mehr als 60 μMol ATP benötigt werden.

Diese und die folgenden Befunde können unter besonderer Berücksichtigung der myofibrillären CPK in ein Funktionsmodell des CPK-Systems integriert werden (Fig. 28). Anhand dieses Modells soll die Bedeutung des CPK-Systems bezüglich der Energiebereitstellung und des Energietransportes während einer Muskelkontraktion diskutiert werden. Das Neue an dem in Anlehnung an NAEGLE '70 und JACOBUS and LEHNINGER '73 aufgestellten Modell ist die Kompartimentierung und Funktionsteilung der CPK. Dabei spielen der pH-Wert und das ATP/ADP-Verhältnis als Regulatoren der Reaktionen von Glycolyse, oxidativer Phosphorylierung und CPK eine besondere Rolle. Während der Kontraktion eines Muskels wird im myofibrillären Raum durch die Myosin-ATPase MgATP^{2-} gespalten (5), wobei H^+ , MgADP^{1-} und P_i^{2-} freigesetzt werden. Dadurch entsteht eine lokale "Uebersäuerung" im myofibrillären Raum (JACOBUS and LEHNINGER '73). Da das Gleichgewicht der CPK-Reaktion: $\text{MgADP}^{1-} + \text{CP}^{2-} + \text{H}^+ \xrightleftharpoons{\text{CPK}} \text{MgATP}^{2-} + \text{C}$ seinerseits ebenfalls vom pH-Wert des umgebenden Milieus abhängt, wird dieses Gleichgewicht nach rechts verlagert (NODA et al. '60). Die in Fig. 28 unter (4) angegebene myofibrilläre CPK würde das durch die Myosin-ATPase gebildete ADP mit Hilfe von CP rephosphorylieren. CP ist in hoher Konzentration im sarkoplasmatischen Raum vorhanden und diffundiert relativ gut in den myofibrillären Raum (NAEGLE '70, PERRY '54). Eine Verschiebung des Gleichgewichtes der CPK-Reaktion nach rechts wird sowohl durch das von der Myosin-ATPase gebildete ADP als auch durch die freigesetzten Protonen begünstigt.

Die in Fig. 28 unter (2) angegebene mitochondriale CPK mit einer ca. 10 mal höheren Affinität für ATP und einem niedrigeren pH-Optimum als die sarkoplasmatische

CPK (3) dürfte aber vorallem in Richtung der CP-Bildung aktiv sein (JACOBUS and LEHNINGER '73). Während der oxidativen Phosphorylierung von ADP absorbieren Mitochondrien Protonen aus dem umgebenden Milieu, so dass ihre äussere Oberfläche und das umgebende Sarkoplasma unter respiratorischen "steady-state"-Bedingungen relativ alkalisch wird, was das Gleichgewicht der CPK-Reaktion im sarkoplasmatischen Raum (3) ebenfalls in Richtung der CP-Bereitstellung verschiebt (WINKLER et al. '68; JACOBUS and LEHNINGER '73).

Zwischen das myofibrilläre CPK-System (4) und das mitochondriale CPK-System (2) wäre die in Fig. 28 unter (3) dargestellte sarkoplasmatisch "lösliche" CPK eingeschaltet, deren Reaktion in beiden Richtungen durch das jeweilige ATP/ADP-Verhältnis und den im Sarkoplasma herrschenden pH-Wert gesteuert wird. Die CPK-Reaktion ist über diese beiden Parameter zusätzlich mit der Glycolyse gekoppelt, welche ihrerseits ebenfalls durch das ATP/ADP-Verhältnis, den pH-Wert und durch die CP-Konzentration beeinflusst wird (UYEDA and RACKER '65; NAEGLE '70; KEMP '73; OGOUCHI et al. '73 und MCGILVERY and MURRAY '74). Das sarkoplasmatische CPK-System (3) hätte also die Aufgabe, als eine Art "Puffer-System" Schwankungen in der Respirationsrate der Mitochondrien sowie Schwankungen des CP-Pools auszugleichen, um eine konstante Versorgung der kontraktilen Einheit mit "energiereichem Phosphat" in Form von CP zu gewährleisten. Dabei kann durch die enge Kopplung mit der Glycolyse genügend ATP nachgeliefert werden. Eine Erhöhung des pH-Wertes und der Konzentrationen von ADP und AMP im sarkoplasmatischen Raum, verursacht durch eine starke respiratorische Tätigkeit der Mitochondrien einerseits und durch die Transphosphorylierung des $\sim$ P von CP auf ADP im myofibrillären Raum andererseits (beides trifft während einer Muskelkontraktion zu), stimuliert die Glycolyse (NAEGLE '70; MCGILVERY and MURRAY '74). Da-

durch kann bei einer Dauerbelastung des Muskels die Versorgung desselben mit "energiereichem Phosphat" garantiert werden. Die hohe Kapazität der besprochenen "Pufferwirkung" des CPK-Systems (Verzögerungs- und Dämpfungseffekt, Aufrechterhalten der ATP-Konzentration usw.) ist durch die hohe Konzentration und Aktivität des Enzyms selber (ca. 4 mg CPK/g Skelettmuskelgewebe) wie durch das Verhältnis des Gesamtgehaltes von Creatin zu Adenin-nukleotiden von ca. 5:1 gegeben (FITCH et al. '74).

Die berechtigte Annahme, dass der gesamte sarkoplasmatische Adenin-nukleotid-Pool der im Sarkoplasma vorliegenden CPK zugänglich ist (McGILVERY and MURRAY '74; NAEGLE '70), hat zur Folge, dass sich eine Aenderung des Gleichgewichtes an einem Ort der Zelle, etwa durch ATP-Entnahme resp. ADP-Produktion an den Myofibrillen, über die Gleichgewichtsreaktionen des CPK-Systemes in allen Richtungen des sarkoplasmatischen Raumes ausbreitet, was eine, allerdings gedämpfte, Veränderung der respiratorischen Aktivität der Mitochondrien bewirkt. Grössere und andauernde Aenderungen des Gleichgewichtes bewirken zusätzlich eine Veränderung der glycolytischen Aktivität. Der Energietransport ist nach dieser Vorstellung nicht mehr mit einem Transport von Adenin-nukleotiden (ATP, ADP und AMP) verbunden, deren Verschiebbarkeit in der Muskelzelle wie erwähnt relativ stark behindert ist, sondern wird mittels hoher Konzentrationen von CP und C über die Gleichgewichtsreaktionen des CPK-Systems (3) bewerkstelligt. Durch eine solche Vorstellung kann auch erklärt werden, warum im Muskelgewebe verglichen zu C und CP eine fünffach kleinere Menge von Adenin-nukleotiden vorhanden ist.

Nach dem Modell in Fig. 28 würde alle für die Muskelkontraktion notwendige Energie, unter Vermeidung eines für die übrigen ATP-verbrauchenden Aktivitäten

der Zelle ungünstigen ATP/ADP-Verhältnisses, in Form von CP bereitgestellt.

Das $\sim P$ des in hohen Konzentrationen zur Verfügung stehenden, leicht in den myofibrillären Raum diffundierenden CP würde in diesem Raum durch die Reaktion der myofibrillären CPK (M- oder Z-Linien-gebundene CPK) (4) auf das im intramyofibrillären Raum anwesende ADP transphosphoryliert. Der CP-Pool würde sowohl durch die sarkoplasmatische CPK (3) über die Glycolyse als auch durch die mitochondriale CPK (2) über die oxidative Phosphorylierung aufrechterhalten. Nur unter extremen Bedingungen (Blockieren der CPK-Reaktion, aussergewöhnliche Belastung eines Muskels) könnte das im sarkoplasmatischen Raum vorliegende ATP direkt für eine Kontraktion verwendet werden (6) (INFANTE and DAVIES '65; NAEGLE '70; Woledge '71).

Wenn ausschliesslich die myofibrilläre CPK (4) das für die Muskelkontraktion benötigte ATP durch Transphosphorylierung des $\sim P$ von CP auf ADP bereitstellen soll, muss die Reaktion der myofibrillären CPK im Skelettmuskel bei dem angegebenen molaren Verhältnis von myofibrillärer CPK zu Myosin, das im Skelettmuskel 1:20 beträgt, mit einer 20 mal schnelleren Umsatzgeschwindigkeit als die Myosin-ATPase-Reaktion ablaufen. Wie Tabelle VI zeigt, ist die "in vitro" unter identischen Bedingungen gemessene maximale Umsatzgeschwindigkeit ($V_{\max}$) der Myosin-ATPase (Mol gespaltenes ATP pro Mol Myosin) sowohl in einem Aktomyosin-System als auch in nativen Myofibrillen tatsächlich 25 - 35 mal kleiner als die Umsatzgeschwindigkeit ($V_{\max}$) der CPK-Reaktion. Wenn "in vivo" eine ähnliche Grössenordnung der "in vitro" gemessenen maximalen Umsatzgeschwindigkeiten angenommen wird, bedeutet das, dass die M-Linien-gebundene MM-CPK im Skelettmuskel (ca. 8 % der Gesamtaktivität der CPK) durchaus genügen kann, um alles ATP, das während der Kontraktion eines Muskels

Fig. 28

Schematische Darstellung des Transportes von "energiereichem Phosphat" im Muskel, unter besonderer Berücksichtigung der mitochondrialen, sarkoplasmatisch-"löslichen" und myofibrillären CPK

- 1) ADP - ATP Transportmechanismus (WINKLER et al. '68)
- 2) mitochondriale CPK (FARRELL et al. '72; JACOBUS and LEHNINGER '73)
- 3) sarkoplasmatisch-"lösliche" CPK (KUBY et al. '54; EPPENBERGER et al. '63, '64, '67, '70; NAEGLE '70)
- 4) myofibrilläre CPK (TURNER et al. '73; WALLIMANN et al. '74, '75)
- 5) Myosin-ATPase (MOOS '72; BENDALL '72)
- 6) unter gewissen Bedingungen direkt für die Muskelkontraktion verfügbares, sarkoplasmatisches ATP (INFANTE and DAVIES '65; McGILVERY and MURRAY '74)

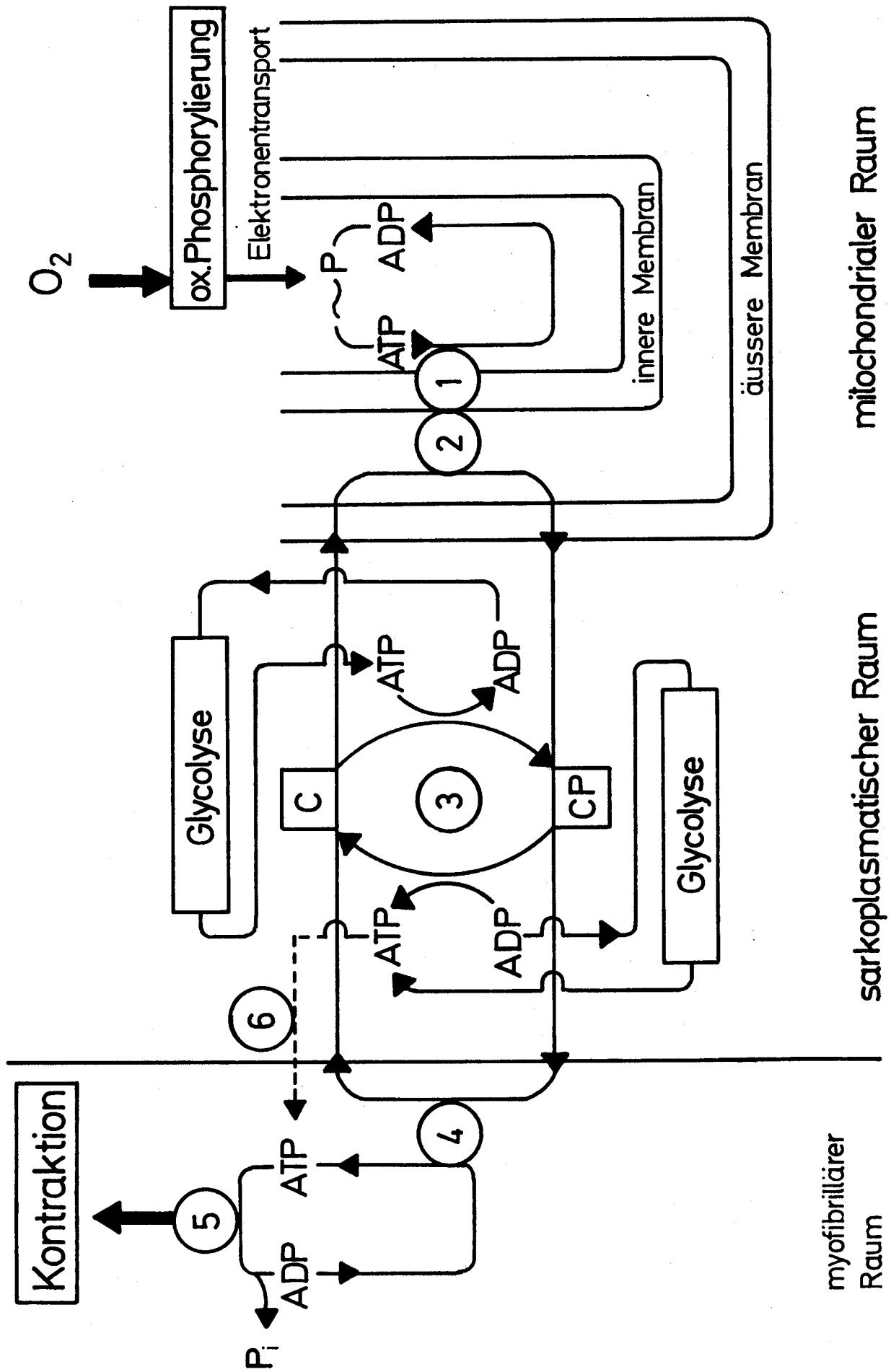
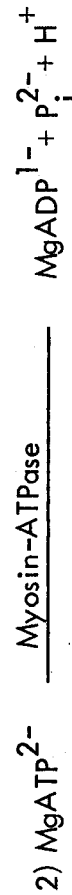
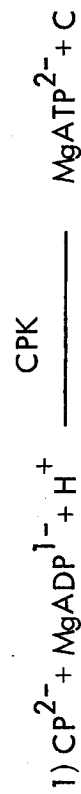


TABELLE VI

Vergleich der maximalen Geschwindigkeiten ($V_{\max}$) der CPK-Reaktion und der Myosin-ATPase-Reaktion.

$V_{\max}$ (CPK) 1)	$V_{\max}$ (Myosin-ATPase) 2)	$V_{\max}$ (CPK) $V_{\max}$ (M-ATPase)
70'000 ^{a)}	2850 ^{c)}	25
134'000 ^{b)}	3943 ^{d)}	34



- a) Mol ATP (gebildet)/Mol CPK, min.; bei 25° C, pH 7.0; pH-Stat-Methode (KUBY et al. '54)
b) wie a), aber bei 35° C
c) Mol ATP (hydrolysiert)/Mol Myosin (aktinaktivierte Myosin-ATPase), min.; bei 25° C, pH 7.0; pH-Stat-Methode (MOOS '72)
d) Mol ATP (hydrolysiert)/Mol Myosin (Mg-aktivierte-myofibrilläre Myosin-ATPase), min.; bei 35° C, pH 7.2; P_i und C Bestimmung (BENDALL '72)
a - d) Präparationen aus Kaninchenmuskel

hydrolysiert wird, direkt im myofibrillären Raum wieder zu regenerieren.

Die von uns gefundene Menge der in der M-Linie von Hühner-Skelettmuskelfibrillen gebundenen MM-CPK (m-Brücken) passt also quantitativ nicht nur sehr gut in das M-Linien-Modell von KNAPPEIS and CARLSEN '68 und PEPE '67 (Fig. 27), sondern es scheint, dass auch ihre enzymatische Kapazität für eine direkte ATP-Regeneration im Skelettmuskel ausreicht (Fig. 28, Tabelle VI). Somit würde die myofibrillär gebundene CPK eine wesentliche Rolle in der Energiebereitstellung für die Muskelkontraktion spielen, indem die CPK-Reaktion im myofibrillären Raum unter den entsprechenden pH-Bedingungen und dem ATP/ADP-Verhältnis während einer Kontraktion in Richtung der ATP-Bereitstellung (Regeneration) abläuft. Die myofibrillär gebundene CPK kann somit als wesentliches Element, an physiologisch günstiger Position, die Effizienz der Energiebereitstellung in muskeltyp-spezifischer Art erhöhen. Dabei ermöglicht die besprochene Interaktion von MM-CPK mit anderen Proteinen der M-Linie den Aufbau einer spezialisierten Struktur- und Funktionseinheit, der M-Linie, die charakteristisch für alle schnellen (fast-twitch) Zuckmuskeln ist.

5.3.3 CPK und die Energetik der strukturellen Veränderungen der M-Linie während eines Kontraktionszyklus.

KNAPPEIS and CARLSEN '68 betonten die strukturelle Bedeutung der m-Brücken (CPK), die als Bestandteile der M-Linien-Struktur zur Aufrechterhaltung der hexagonalen Anordnung der dicken Filamente beitragen, um eine räumlich optimale Interaktion der dicken und dünnen Filamente zu ermöglichen. Im ersten Teil

der Diskussion wurde die mediolaterale Dilatation der M-Linie, die während einer Kontraktion auftritt, besprochen und auf einen möglichen Zusammenhang dieser Dilatation mit der in der Einleitung erwähnten, unbekannten exergonischen Reaktion, die zu Beginn einer Muskelkontraktion auftritt, hingewiesen. Ob die M-Linien-gebundene CPK auch eine Funktion bei der Energiebereitstellung dieses zyklischen Prozesses (Aufspringen der geordneten M-Linien-Struktur zu Beginn einer Kontraktion unter Energieabgabe, Wiederherstellung der geordneten M-Linien-Struktur nach einer Kontraktion unter Energieaufnahme) übernimmt, bleibt noch zu beweisen. Diese Theorie ist attraktiv und verdient es, durch gezielte Experimente auf ihre Stichhaltigkeit geprüft zu werden. Viele Befunde verschiedener Arbeitsgruppen (KUSHMERICK and DAVIES '69; WOLEDGE '71; PAUL and KUSHMERICK '74), die sich mit Muskelenergetik und Kalorimetrie beschäftigen, könnten mit der Dynamik der M-Linien-Struktur erklärt werden. Die Lokalisation der CPK in der M-Linie würde in diesem Falle genau mit dem Ort übereinstimmen, wo die besprochene zyklische Energieumwandlung stattfindet.

Um die vielen hier aufgezeigten Fragen zu klären, sind noch etliche Experimente nach dem Motto von NIELS BOHR nötig: "Evidence obtained under different experimental conditions cannot be comprehended within a single picture, but must be regarded as complementary in the sense that only the totality of the phenomena exhausts the possible information about the subject."

6. LITERATURVERZEICHNIS

APPENHEIMER, M., D. VON CHAK, and H.H. WEBER. 1972.

Der Nucleotidaustausch des F-Actin in kontrahierten, erschlafften und totenstarren Fibrillen in seiner Bedeutung für den molekularen Mechanismus der Muskelkontraktion.

Biochem. Biophys. Acta 256: 681 - 694.

ARNOLD, H., and D. PETTE. 1970.

Binding of aldolase and TDH to F-actin and modification of catalytic properties of aldolase.

Europ. J. Biochem. 15: 360 - 366.

BASKIN, R.J., and D.W. DEAMER. 1970.

A membrane-bound creatine phosphokinase in fragmental sarcoplasmic reticulum.

J. Biol. Chem. 245: 1345 - 1347.

BARANY, M., A.F. TUCCI, and T.W. CONOVER. 1966.

The removal of the bound ADP of F-actin.

J. Mol. Biol. 19: 483 - 502.

BARANY, M., and K. BARANY. 1972.

A proposal for the mechanism of contraction in intact frog muscle.

Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology 37: 157 - 168.

BENDALL, J.R. 1972.

The steady state kinetic constants of the Mg-activated myofibrillar ATPase.

FEBS LETTERS 22: 330 - 334.

BINZ, H. 1969.

Konjugation von Ferritin mit Anti-Kaninchen-saccharase-IgG.

Path. Microbiol. 34: 305 - 315.

BLETHEN, S.L., and N.O. KAPLAN. 1967.

Purification of arginine kinase from lobster and a study of some factors affecting its reactivation.

Biochemistry 6: 1413 - 1421.

- BLETHEN, S.L., and N.O. KAPLAN. 1968.
Characteristics of arthropod arginine kinase.
Biochemistry 7: 2123 - 2135.
- BOTTS, J., and M. STONE. 1968.
Kinetics of coupled enzymes: Creatine kinase and myosin A.
Biochemistry 7: 2688 - 2696.
- BOZNER, A., and H.J. KNIERIEM. 1970.
Beitrag zur Ultrastruktur der Herz- und Skelettmuskulatur des
Flussneuauges.
Biologia (Bratislava) 25: 159 - 168.
- BULCKE, J.A., and A.L. SHERWIN. 1969.
Organ specificity of CPK muscle isoenzyme.
Immunochem. 6: 681 - 687; (Pergamon Press).
- BURGER, A., R. RICHTERICH, and H. AEBI. 1964.
Die Heterogenität der Kreatin-kinase.
Biochem. Z. 339: 305 - 314.
- CARLSON, F.D., and A.J. SIGER. 1960.
The mechanochemistry of muscular contraction.
J. gen. Physiol. 44: 33 - 59.
- CHANCE, B., and C.M. CONNELLY. 1957.
A method for the estimation of the increase in concentration of
ADP in muscle sarcosomes following a contraction.
Nature (Lond.) 179: 1235 - 1237.
- CHENG, K., and M. BREININ. 1966.
A comparison of the fine structure of extracular and interosseus
muscles in the monkey.
Investigative Ophthalmology 5: 535 - 549.
- CHENG-MINODA, K., J. DAVIDOWITZ, A. LIEBOWITZ, and G.M. BREININ. 1968.
Fine structure of extraocular muscle in rabbit.
J. Cell Biol. 39: 193 - 197.

- CHILDRESS, C.C., B. SACKTOR, I.W. GROSSMANN, and E. BUEDING. 1970.
Isolation, ultrastructure and biochemical characterisation of
glycogen in insect flight muscle.
J. Cell Biol. 45: 83 - 90.
- COCHRANE, D.G., H.T. ELDER, and P.N.R. USHERWOOD. 1972.
Physiol. and ultrastructure of phasic and tonic skeletal muscle
fibers in the locust *Schistocera gregaria*.
J. Cell Sci. 10: 419 - 442.
- COOKE, R., and L. MURDOCH. 1973.
Interaction of actin with analogs of adenosine triphosphate.
Biochem. 12: 3927 - 3932.
- CURTIN, N.A., C. GILBERT, K.M. KRETZSCHMAR, and D.R. WILKIE. 1973.
The effect of the performance of work on total energy output
and metabolism during muscular contraction.
J. of Physiol. (London). 238: 455 - 472.
- DAVIS, B.J. 1964.
Disk-electrophoresis, method an application.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 121: 404 - 427.
- DAWSON, D.M., H.M. EPPENBERGER, and N.O. KAPLAN. 1965.
Creatine kinase: evidence for a dimeric structure.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 21: 346 - 353.
- DAWSON, D.M., H.M. EPPENBERGER, and N.O. KAPLAN. 1967.
The comparative enzymology of creatine kinases.
II. Physical and chemical properties.
J. Biol. Chem. 242: 210 - 217.
- DAWSON, D.M., H.M. EPPENBERGER, and M.E. EPPENBERGER. 1968.
Multiple molecular forms of creatine kinase.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 151: 616 - 626.
- DAWSON, D.M., and H.M. EPPENBERGER. 1970.
Creatine kinase.
Methods Enzymol. 17A: 995 - 1002.

- DEWEY, M.M., R.J.C. LEVINE, and D. COLFLESH. 1973.
Structure of limulus striated muscle.
J. Cell Biol. 58: 574 - 593.
- DIETERT, S.E. 1965.
The demonstration of different types of muscle fibers in human extraocular muscle by electron microscopy and cholinesterase staining.
Investigative Ophthalmology 4: 51 - 63.
- EATON, B.L., and F.A. PEPE. 1972.
M-band protein: two components isolated from chicken breast muscle.
J. Cell Biol. 55: 681 - 695.
- EATON, B.L., and B.S. MOCHAN. 1973.
The M-band: a structural protein plus creatine kinase.
J. Cell Biol. 59: 86a.
- EGGLETON, P., and G.P. EGGLETON. 1928.
Further observations of phosphagens.
J. Physiol. 65: 15 - 24.
- EPPENBERGER, H.M., R. von FELLEBERG, R. RICHTERICH, and H. AEBI. 1963.
Die Ontogenese von zytoplasmatischen Enzymen beim Hühnerembryo.
Enzymol. biol. clin. 2: 139 - 174.
- EPPENBERGER, H.M., M.E. EPPENBERGER, R. RICHTERICH, and H. AEBI. 1964.
The ontogeny of creatine kinase isozymes.
Develop. Biol. 10: 1 - 16.
- EPPENBERGER, H.M., D.M. DAWSON, and N.O. KAPLAN. 1967.
The comparative enzymology of creatine kinases.
I. Isolation and characterization from chicken and rabbit tissues.
J. Biol. Chem. 242: 204 - 209.
- EPPENBERGER, M.E., H.M. EPPENBERGER, and N.O. KAPLAN. 1967.
Evolution of creatine kinase.
Nature 214: 239 - 241.

- EPPENBERGER, H.M. 1968.
in: Homologous enzymes and biochemical evolution,
ed. THOAI, N., and J. ROCHE (Gordon and Breach, New York),
pp 231 - 242.
- EPPENBERGER, H.M., M.E. EPPENBERGER, and A. SCHOLL. 1970.
Comparative aspects of creatine kinase isoenzymes.
FEBS Symp. 18: 269 - 279.
- EPPENBERGER, H.M., T. WALLIMANN, H.J. KUHN, and D.C. TURNER. 1974.
The localisation of CPK isoenzymes in muscle cells: physiological
significance.
Proc. Third Intern. Isoenzyme Conference, Academic Press, (New York),
(in press).
- ETLINGER, G.D., and D.A. FISCHMAN. 1972.
M and Z band components and the assembly of myofibrils.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 37: 511 - 522.
- FAHRENBACH, W.H. 1967.
The fine structure of fast and slow crustacean muscles.
J. Cell Biol. 35: 69 - 79.
- FARRELL, E.C., N. BABA, G.P. BRIERLEY, and H.D. GRUEMER. 1972.
On the creatine phosphokinase of heart muscle mitochondria.
Laboratory Investigation 27: 209 - 213.
- FITCH, C.D., M. JELLINEK, and E.J. MUELLER. 1974.
Experimental depletion of creatine and phosphocreatine from skeletal
muscle.
J. Biol. Chem. 249: 1060 - 1063.
- FITZSIMMONS, J.A.E. 1971.
Studies on the creatine kinase of the invertebrate *Marphysa*
sanguinea.
Ph. D. thesis. Univ. Queensland, Australia.
- FU, J.Y., and R.G. KEMP. 1973.
Activation of muscle fructose-1,6,-diphosphatase by creatine-
phosphate and citrate.
J. Biol. Chem. 248: 1124 - 1125.

- GANONG, W.F. 1972.
Medizinische Physiologie. Uebersetzung von AUERSWALD,
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- GERGELY, J., M.A. GOUVEA, and A. MARTONOSI. 1960.
Studies on actin II.
J. Biol. Chem. 235: 1704 - 1706.
- GOODE, M.D. 1972.
Ultrastructure and contractile properties of isolated myofibrils
and myofilaments from *Drosophila* flight muscle.
Trans. Amer. Microscop. Soc. 91: 182 - 194.
- HAGOPIAN, M. 1966.
The myofilament arrangement in the femoral muscle of the cockroach
Leucophaea maderae fabricius.
J. Cell Biol. 28: 545 - 562.
- HAGOPIAN, M. 1970.
Contraction bands at short sarcomere length in chick muscle.
J. Cell Biol. 47: 790 - 796.
- HARRINGTON, W.F. 1972.
Muscle proteins and muscle contraction.
in: Current Topics in Biochemistry, ed. ANFINSEN, C.B.,
R.F. GOLDBERGER, and A.N. SCHECHTER. NIH Lectures in Biomed.
Sci., Academic Press, (New York), pp. 135 - 185.
- HESS, A. 1967.
The structure of vertebrate slow and twitch muscle fibers.
Investigative Ophthalmology 6: 217 - 228.
- HILL, D.K. 1962.
The location of creatine phosphate in frog's striated muscle.
J. Physiol. 164: 31 - 50.
- HILL, D.K. 1964.
The location of adenine nucleotide in the striated muscle of the toad.
J. Cell Biol. 20: 435 - 458.

- HOLBOROW, E.J., and G.D. JOHNSON. 1967.
Immunfluorescence.
in: Handbook of exp. Immunol., ed. D.M. WEIR. Blackwell Scientific Publications, (Oxford and Edinburgh), pp. 571 - 596.
- HOUK, T.W., and S.V. PUTNAM. 1973.
Location of the creatine phosphokinase binding site of myosin.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 55: 1271 - 1277.
- HOYLE, G. 1969.
Comparative aspects of muscle.
Ann. Rev. Physiol. 31: 43 - 83.
- HOYLE, G. 1973.
Correlation of physiological and ultrastructural studies on specialized muscles.
J. Exp. Zool. 185: 97 - 110.
- HOYLE, G.H., P.A. McNEILL, and A.I. SELVERSTONE. 1973.
Ultrastructure of barnacle, *Balanus nubilus*, giant muscle fibers.
J. Cell Biol. 56: 74 - 91.
- HUXLEY, H.E. 1969.
The mechanism of muscular contraction.
Science 164: 1356 - 1366.
- HUXLEY, H.E. 1972.
Molecular basis of contraction in cross-striated muscles.
in: The structure and function of muscle, ed. G.H. BOURNE, Academic Press, (New York), Vol. 1: 301 - 387.
- INFANTE, A.A., and R.E. DAVIES. 1965.
The effect of 2,4-dinitrofluorobenzene on the activity of striated muscle.
J. Biol. Chem. 240: 3996 - 4001.
- JACOBS, H., W.H. HELDT, and M. KLINGENBERG. 1964.
High activity of creatine kinase in mitochondria from muscle and brain. Evidence for a separate mitochondrial isoenzyme of creatine kinase.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 16: 516 - 521.

- JACOBUS, E.E., and A. LEHNINGER. 1973.
Creatine kinase of rat heart mitochondria.
J. Biol. Chem. 248: 4803 - 4810.
- JEWETT, P.H., J.R. SOMMER, and E.A. JOHNSON. 1971.
Cardiac muscle: Its ultrastructure in the finch and hummingbird.
J. Cell Biol. 49: 50 - 65.
- JOEBIS, F.F. 1959.
Early kinetics of the cytochrome b response to muscular contraction.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 81: 505 - 509.
- KAMMERMEIER, H., und H.J. DOERING. 1961.
Parallele Veränderungen des CP-Gehaltes und des Grundtonus der Myokardfasern bei Asphyxie und Wiederbelebung.
Pflüger Arch. ges. Physiol. 274: 14.
- KAMMERMEIER, H. 1964.
Verhalten von Adeninnukleotiden und CP im Herzmuskel bei funktioneller Erholung nach längerer Asphyxie.
Verh. dtsh. Ges. Kreisl. Forsch. 30: 206 - 211.
- KATZ, A.M. 1970.
Contractile proteins of the heart.
Physiol. Reviews 50: 63 - 157.
- KEMP, R.G. 1973.
Inhibition of muscle pyruvate kinase by creatine-phosphate.
J. Biol. Chem. 248: 3963 - 3967.
- KHAN, M.A., P.G. HOLT, G.O. KNIGHT, and B.A. KAKULAS. 1971.
Incubation film technique for the histochemical localization of creatine kinase.
Histochemie 26: 120 - 125.
- KLEINE, T.O. 1965.
Localization of creatine kinase in microsomes and mitochondria of human heart and skeletal muscle and cerebral cortex.
Nature 207: 1393 - 1394.

- KNAPPEIS, G.G., and F. CARLSEN. 1968.
The ultrastructure of the M-line in skeletal muscle.
J. Cell Biol. 38: 202 - 211.
- KOMURO, T. 1969.
The fine structure of the crayfish cardiac muscle.
J. of Electron Microscopy 18: 291 - 297.
- KORNELIUSSEN, H., and K. NICOLAYSEN. 1973.
Ultrastructure of four types of striated muscle fibers in the atlantic hagfish (*Myxine glutinosa*, L.)
Z. Zellforsch. 143: 273 - 290.
- KUBY, S.A., L. NODA, and H. LARDY. 1954
Adenosinetriphosphate-creatine transphosphorylase.
J. Biol. Chem. 210: 65 - 82.
- KUBY, S.A., L. NODA, and H.A. LARDY. 1954.
ATP-creatine transphosphorylase. I. Isolation of the crystalline enzyme from rabbit muscle.
J. Biol. Chem. 209: 191 - 201.
- KUNDRAT, E., and F.A. PEPE. 1971.
The M-band: studies with fluorescent antibody staining.
J. Cell Biol. 48: 340 - 347.
- KUSHMERICK, M.J., and R.E. DAVIES. 1969.
The chemical energetics of muscle contraction.
2. The chemistry, efficiency and power of maximal working sartorius muscle.
Proc. Roy. Soc. B. 174: 315 - 354.
- LAPIN, E., H.S. MAKER, and G.M. LEHRER. 1974.
Multiple disk gel bands of mitochondrial creatine- and adenylate kinases.
J. of Neurochemistry 22: 11 - 14.
- LAYNE, E. 1957.
Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins.
in: Meth. Enzymol, Academic Press, (New York), Vol. III: 447 - 454.

- LEVINE, L. 1967.
Micro-complement-fixation.
in: Handbook of Experimental Immunology, ed. WEIR, D.M.,
Blackwell Scientific Publications, (Oxford and Edinburgh),
pp. 707 - 719.
- LOWEY, S. 1972.
Protein assemblies in muscle.
in: Protein-protein interaction, ed. R. JAENICKE, and
E. HELMREICH.
Springer Verlag, (Heidelberg), pp. 317 - 342.
- LOWRY, O.H., N.G. ROSEBROUGH, A.L. FARR, and R.J. RANDALL. 1951.
Protein measurements with the Folin-phenol-reagent.
J. Biol. Chem. 193: 265 - 275.
- MARTONOSI, A., M.A. GOUVEA, and J. GERGELY. 1960a.
Studies on actin I.
J. Biol. Chem. 235: 1700 - 1703.
- MARTONOSI, A., M.A. GOUVEA, and J. GERGELY. 1960b.
Studies on actin III.
J. Biol. Chem. 235: 1707 - 1710.
- MASAKI, T., O. TAKAITI, and S. EBASHI. 1968.
"M-substance" a new protein constituting the M-line of myofibrils.
J. Biochem. (Tokyo) 64: 909 - 910.
- MASAKI, T., and O. TAKAITI. 1972.
Purification of M-line protein.
J. Biochem. (Tokyo) 71: 355 - 357.
- MASAKI, T., and O. TAKAITI. 1974.
M-Protein.
J. Biochem. (Tokyo) 75: 367 - 380.
- McGILLIVRAY, A.J., A. CAMERON, R.J. KRANZE, D. RICKWOOD and
J. PAUL. 1972.
Non-histone proteins of chromatin.
Biochem. Biophys. Acta 277: 384 - 402.

- McGILVER, R.W., and TH.W. MURRAY. 1974.
Calculated equilibria of phosphocreatine and adenosine phosphates during utilisation of high energy phosphate by muscle.
J. Biol. Chem. 249: 5845 - 5850.
- MELTZER, H.Y., and A. GUSCHWAN. 1972.
Brain type CPK in rat platelets.
Life Sci. 11: 121 - 130.
- MILBURN, A. 1973.
The early development of muscle spindles in the rat.
J. Cell Sci. 12: 175 - 195.
- MILLER, J.E. 1967.
Cellular organisation of rhesus monkey muscle.
Investigative Ophthalmology 4: 18 - 30.
- MOORE, C.H., F. FARRON, D. BOHNERT, and C. WEISSMANN. 1971.
Possible origin of a minor virus specific protein (A₁) in Q-beta particles.
Nature, New Biology, 232: 204 - 206.
- MOOS, C. 1964.
Can creatine kinase phosphorylate the myofibril-bound nucleotide of muscle?
Biochem. Biophys. Acta 93: 85 - 97.
- MOOS, C., E. EISENBERG, and J.E. ESTES. 1967.
Bound-nucleotide exchange in actin and actomyosin.
Biochem. Biophys. Acta 147: 536 - 545.
- MORIMOTO, K., and W.F. HARRINGTON. 1972.
Isolation and physical properties of an M-line protein from skeletal muscle.
J. Biol. Chem. 247: 3052 - 3061.
- MORIMOTO, K., and W.F. HARRINGTON. 1973.
Isolation and composition of thick filaments from rabbit skeletal muscle.
J. Mol. Biol. 17: 165 - 175.

NAEGLE, S. 1968a.

Die Abhängigkeit der CP- und ATP-Diffusion vom CPK-Gleichgewicht und deren Bedeutung für den Energietransport in der Muskelzelle.

Diss. Univ. Würzburg, BRD, 1968.

NAEGLE, S. 1968b.

Der Energiestoffwechsel des Herzmuskels als Analogrechenproblem. Habil. Schrift Univ. Würzburg. 1968.

NAEGLE, S. 1970.

Die Bedeutung von Creatinphosphat und Adenosintriphosphat im Hinblick auf Energiebereitstellung, -transport und -verwertung in normalen und insuffizienten Herzmuskeln.

Klin. Wochenschrift 48: 332 - 431.

NAKAMURA, A., F. SRETER, and J. GERGELY. 1971.

Comparative studies of light meromyosin polycrystals derived from red, white and cardiac muscle myosin.

J. Cell Biol. 49: 883 - 898.

NIEMEYER, G., and W.G. FORSSMANN. 1971.

Comparison of glycerol treatment in frog skeletal muscle and mammalian heart.

J. Cell Biol. 50: 288 - 299.

NODA, L., T. NIHEI, and M.F. MORALES. 1960.

The enzymatic activity of creatine kinase.

J. Biol. Chem. 235: 2830 - 2834.

OGUCHI, M., E. GERTH, B. FITZGERALD, and J.H. PARK. 1973.

Regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by phosphocreatine and adenosine triphosphate.

J. Biol. Chem. 248: 5571 - 5576.

OTTAWAY, J.H. 1967.

Evidence for binding of cytoplasmic creatine kinase to structural elements in heart muscle.

Nature 215: 521 - 522.

OUCHTERLONY, O. 1967.

Immunodiffusion.

in: Handbook of exp. Immunol., ed. D.M. WEIR,
Blackwell Scientific Publications, (Oxford and Edinburgh),
pp. 655 - 706.

OVALLE, W.K. 1972.

Fine structure of rat intrafusal muscle fibers.
J. Cell Biol. 52: 382 - 396.

PAGE, S.G. 1965.

A comparison of the fine structures of frog slow and twitch
muscle fibers.
J. Cell Biol. 26: 477 - 497.

PAUL, R.J., and M.J. KUSHMERICK. 1974.

Chemical energy balance: phosphocreatine splitting and recovery
O₂ consumption.
Third Europ. Continental Muscle Meeting, Budapest, Hungary.

PEPE, F. 1966.

Some aspects of the structural organisation of the myofibrils as
revealed by antibody-staining methods.
J. Cell Biol. 28: 505 - 525.

PEPE, F. 1967.

The myosin filament.
J. Mol. Biol. 27: 203 - 225.

PEPE, F.A. 1968.

in: International review of cytology, ed. BOURNE and DANIELLI,
Academic Press, 24: pp. 193 - 231.

PEPE, F. 1972.

Structure of the myosin filament of striated muscle.
in: Progress in Biophysics and Molecular Biology, ed. BUTLER, J.A.V.,
and D. NOBLE. 22: 75 - 96.

PERRY, S.V. 1952.

The bound nucleotide of the isolated myofibril.
Biochem. J. 51: 495 - 499.

PERRY, S.V. 1954.

Creatine phosphokinase and the enzymic and contractile properties of the isolated myofibril.

Biochem. J. 57: 427 - 433.

PETER, J.B., R.J. BARNARD, V.R. EDGERTON, C.A. GILLESPIE, and K.E. STEMPEL. 1972.

Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits.

Biochemistry 11: 2627 - 2633.

RAMIREZ, J. 1969.

Oxidation-reduction changes of cytochromes following stimulation of amphibian cardiac muscle.

J. Physiol. (London) 147: 14 - 32.

REGER, J.F., and D.P. COOPER. 1967.

A comparative study on the fine structure of the basalar muscle of the wing and the tibial extensor muscle of the leg of the lepidopteran *Achalarus Lyciades*.

J. Cell Biol. 33: 531 - 542.

ROSALKI, S.B. 1965.

Creatine-phosphokinase Isoenzymes.

Nature 207: 414.

ROY, B.P., J.F. LAWS, and A.R. THOMSON. 1970.

Preparation and properties of creatine kinase from the breast muscle of normal and dystrophic chicken.

Biochem. J. 120: 177 - 185.

SCHOLTE, H.R. 1973a.

On the triple localisation of creatine kinase in heart and skeletal muscle cells of the rat: evidence for the existence of myofibrillar and mitochondrial isoenzymes.

Biochem. Biophys. Acta 305: 413 - 427.

SCHOLTE, H.R. 1973b.

The separation and enzymatic characterisation of inner and outer membranes of rat-heart mitochondria.

Biochem. Biophys. Acta 330: 283 - 293.

- SCHOLTE, H.R., P.J. WEIJERS, and E.M. WIT-PEETERS. 1973.
The localisation of mitochondrial creatine kinase, and its use for the determination of the sidedness of submitochondrial particles. *Biochem. Biophys. Acta* 291: 764 - 773.
- SCOTT, T.M. 1971.
The ultrastructure of ordinary and Purkinje cells of the fowl heart. *J. Anat.* 110: 259 - 273.
- SERAYDARIAN, K., W.F.H.M. MOMMAERTS, and A. WALLNER. 1962.
The amount and compartmentalisation of adenosine diphosphate in muscle. *Biochem. Biophys. Acta* 65: 443 - 460.
- SHERWIN, A.L., G. KARPATI, and J.A. BULCKE. 1969.
Immunohistochemical localization of creatine phospho-kinase in skeletal muscle. *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.* 64: 171 - 175.
- SMITH, D.S. 1965.
The organisation of flight muscle in an aphid, *Megoura viciae*. *J. Cell Biol.* 27: 379 - 393.
- SMITH, D.S. 1965.
The organisation of flight muscle fibers in the odonata. *J. Cell Biol.* 28: 109 - 126.
- SOMMER, J.R., and A. JOHNSON. 1969.
The ultrastructure of frog and chicken cardiac muscle. *Z. Zellforsch.* 98: 437 - 468.
- STALEY, N.A., and E. BENSON. 1968.
The ultrastructure of frog ventricular cardiac muscle and its relationship to mechanisms of excitation-contraction coupling. *J. Cell Biol.* 38: 99 - 114.
- STROHMAN, R.C. 1959.
Studies on the enzymic interactions of the bound nucleotide of the muscle protein actin. *Biochem. Biophys. Acta* 32: 436 - 449.

- STROMER, M.H., D.J. HARTSHORNE, H. MUELLER, and N. RICE. 1969.
The effect of various protein fractions on Z- and M-line reconstitution.
J. Cell Biol. 40: 167 - 178.
- SZORENYI, E.T., and R.G. DEGTYAR. 1948.
Phosphocreatineadenosinediphosphatetransferase of muscle and its correlation with actomyosin.
Ukrain. Biokhim. Zhur. 20: 234 - 240.
- SZENT-GYÖRGYI, A.G., and E. SZENTKIRALYI. 1960.
Reversibility of actin depolymerisation in presence of KCl.
Biol. Bulletin 119: 290.
- SZENT-GYÖRGYI, A.G., and G. PRIOR. 1966.
Exchange of adenosine diphosphate bound to actin in superprecipitated actomyosin and contracted myofibrils.
J. Mol. Biol. 15: 515 - 538.
- TURNER, D.C., T. WALLIMANN, and H.M. EPPENBERGER. 1973.
A protein that binds specifically to the M-line of skeletal muscle is identified as the muscle form of creatine kinase.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70: 702 - 705.
- TURNER, D.C. 1974.
Isoenzyme transitions of creatine kinase and aldolase during muscle differentiation in vitro.
Proc. Third Intern. Isoenzyme Conference, Academic Press, New York (in press).
- TURNER, D.C., and H.M. EPPENBERGER. 1974.
Developmental changes in creatine kinase and aldolase isoenzymes and their possible function in association with contractile elements.
Enzyme 15: 224 - 238.
- TURNER, D.C., V. MAIER, and H.M. EPPENBERGER. 1974.
Creatine kinase and aldolase isoenzyme transition in cultures of chick skeletal muscle cells.
Develop. Biol. 37: 63 - 89.

- UYEDA, K., and E. RACKER. 1965.
Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism.
J. Biol. Chem. 240: 4682 - 4693.
- VIRDEN, R., and D.C. WATTS. 1964.
Distribution of guanidine-ATP-phosphotransferases in animals from several phyla.
Comparative Biochem. Physiol. 13: 161 - 177.
- VIRDEN, R., D.C. WATTS, and E. BALDWIN. 1965.
Adenosine 5-Triphosphate-Arginine Phosphotransferase from lobster muscle: purification and properties.
Biochem. J. 94: 536 - 544.
- WALLIMANN, T. and H.M. EPPENBERGER. 1973.
Properties of arginine kinase from *Drosophila melanogaster*.
Europ. J. Biochem. 38: 180 - 184.
- WALLIMANN, T., D.C. TURNER, and H.M. EPPENBERGER. 1974.
Creatine kinase and M-line structure.
Proc. 9th FEBS Meeting Budapest. (in press).
- WALLIMANN, T., D.C. TURNER, H.J. KUHN, and H.M. EPPENBERGER. 1975.
Creatine kinase isoenzymes and myofibrillar structure.
(in preparation).
- WEST, J.J., B. NAGY, and J. GERGELY. 1967.
Free adenosine diphosphate as an intermediary in the phosphorylation by creatine phosphate of adenosine diphosphate bound to actin.
J. Biol. Chem. 242: 1140 - 1145.
- WINKLER, H.H., F.L. BYGRAVE, and A.L. LEHNINGER. 1968.
Characterisation of the atractyloside-sensitive adenine nucleotide transport system in rat liver mitochondria.
J. Biol. Chem. 243: 20 - 28.
- WITTEVEEN, S.A.G.J., B.E. SOBEL, and M. De LUCA. 1974.
Kinetic properties of the isoenzymes of human creatine phosphokinase.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71: 1384 - 1387.

WOLEDGE, R.C. 1971.

Heat production and chemical change in muscle.
Progr. Biophys. Mol. Biol. 22: 39 - 75.

YAGI, K., and L. NODA. 1960.

Phosphate transfer to myofibrils by ATP-creatine transphosphorylase.
Biochem. Biophys. Acta 43: 249 - 259.

YAGI, K., and R. MASE. 1962.

Coupled reaction of creatine kinase and myosin A-adenosine triphosphatase.
J. Biol. Chem. 237: 397 - 403.

7. CURRICULUM VITAE

NAME	Theo A. Wallimann-Züger
GEBURTSDATUM	13. Oktober 1946
GEBURTSORT	Luzern
HEIMATORT	Alpnach OW
WOHNORT	Windisch AG, Dorfstrasse 22
ZIVILSTAND	verheiratet

SCHULEN

Primarschule	Sept. 1953 - Sept. 1959 in Alpnach OW
Gymnasium der Kantonsschule Obwalden, Sarnen	Sept. 1959 - Sept. 1967 Matura Typus A
Eidgenössisch Technische Hochschule Zürich	Sept. 1967 - Sept. 1971 Diplom der Abteilung XA als Naturwissenschaftler ETHZ
Eidgenössisch Technische Hochschule Zürich	seit Sept. 1971 Assistent / Doktorand am Institut für Entwicklungsbiologie / Zellbiologie bei Prof. H. Ursprung und Prof. H. M. Eppenberger

STIPENDIEN

Zweijahresstipendium von der Schweizerischen Kommission für Molekularbiologie (SKMB)

ab März 1975 Forschungsstipendium des Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung.

8. PUBLIKATIONEN

1) Origin of leg musculature during Drosophila Metamorphosis

H. Ursprung, M. Conscience-Egli, D. J. Fox, and T. Wallimann
Proc. Nat. Acad. Sci. USA Vol. 69 : 2812-2813 (1972)

2) A protein that binds specifically to the M-line of skeletal muscle is identified as the muscle form of creatine kinase

D. C. Turner, T. Wallimann, and H. M. Eppenberger
Proc. Nat. Acad. Sci. USA Vol. 70 : 702-705 (1973)

3) Properties of arginine kinase from Drosophila Melanogaster

T. Wallimann and H. M. Eppenberger
Europ. J. of Biochemistry 38 : 180-184 (1973)

4) Localisation of creatine kinase isoenzymes in muscle cells:

Physiological significance

Proc. of the Third Intern. Isoenzyme Conference (1974).
Academic Press New York (im Druck)
H. M. Eppenberger, T. Wallimann, H. J. Kuhn, and D. C. Turner

5) Creatine kinase and M-line-structure

9th European FEBS-Meeting, Budapest, Hungary (1974)
T. Wallimann, D. C. Turner, and H. M. Eppenberger

6) Differentiation in cultures derived from embryonic chicken muscle.

Phosphorylase histochemistry and indirect fluorescent antibody staining of creatine kinase

D. C. Turner, R. Gmür, H. Lebherz, M. Stähli, T. Wallimann, and H. M. Eppenberger (eingesandt an Develop. Biol. 1974)

7) Creatine kinase isoenzymes and myofibrillar structure

T. Wallimann, D. C. Turner, H. J. Kuhn, and H. M. Eppenberger
(in Vorbereitung)