

N<sup>o</sup> 26. **R. Eigenmann**, Basel. — Biochemische Untersuchungen der Flugmuskelentwicklung von *Antheraea pernyi* Guér. (*Lep.*). (Mit 3 Textabbildungen und einer Tabelle.)

Zoologische Anstalt der Universität Basel.

## 1. EINLEITUNG

Physiologische Untersuchungen von NÜESCH (1962) zeigten, dass der Insektenmuskel relativ früh in der Imaginalentwicklung auf gesetzte Reize hin zu reagieren vermag. Diese Resultate waren der Anlass, die Muskelentwicklung in der Puppe etwas näher zu untersuchen und zwar auf histologischer wie auch auf biochemischer Grundlage. Die folgende Arbeit beabsichtigt, einige Resultate der Biochemie der Flugmuskelentwicklung, vor allem die Frage nach dem Auftreten des kontraktiven Muskelproteins Aktomyosin zu umschreiben und mit den wichtigsten histologischen Differenzierungen zu vergleichen.

## 2. MATERIAL UND METHODE

Als Untersuchungsobjekt diente mir *Antheraea pernyi*, das chinesische Nachtpfauenaug, das sich leicht auf Eichenlaub züchten lässt. Die Entwicklungszeit von der Diapausenpuppe zur geschlechtsreifen Imago beträgt 21 Tage.

Zur Extraktion von Aktomyosin wird nach Angaben von PORTZEHL eine 0,6 m KCl-Lösung verwendet, die mit 0,02 m NaHCO<sub>3</sub> auf pH 7 eingestellt ist. Die aus dem Thorax von *A. pernyi* herauspräparierten Muskeln werden sofort in die auf 0° C bereitgehaltene Extraktionslösung gegeben. Für einen Versuch werden mindestens 0,2 g Muskelsubstanz benötigt. Diese Menge liefern zwei Imagines, bei jüngern Stadien braucht es bis 15 Tiere. Das Verhältnis Muskelsubstanz zu Extraktionslösung ist 1 zu 12. Die Muskeln werden im Tissue Grinder in der Extraktionslösung zermalmt, bis die Myofibrillen sowohl in der Länge als auch in ihrem Durchmesser zertrümmert sind (2—4 Min.).

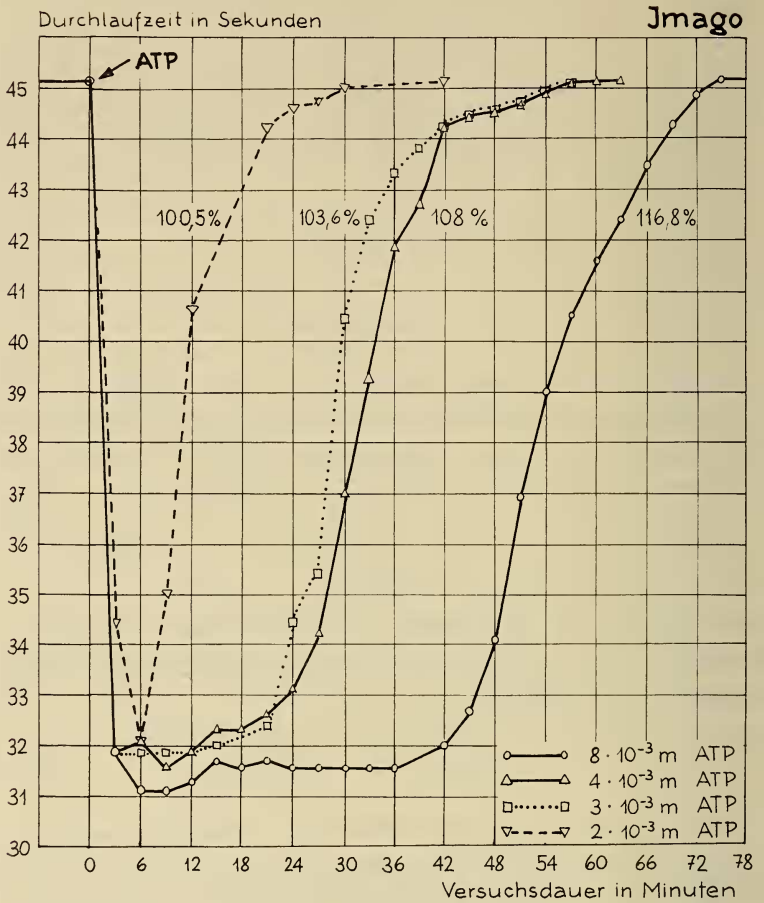


ABB. 1.

Viskositätserniedrigung auf Zusatz von ATP verschiedener Konzentration zum gleichen Muskelextrakt.

Während der 18-stündigen, bei 0° C ausgeführten Extraktion soll der Extrakt etwa jede Stunde leicht geschüttelt werden. Nach der Extraktion wird das Muskelhomogenat bei 0° C und 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und die überstehende, die löslichen Proteine enthaltende Flüssigkeit von den sedimentierten, unlöslichen Überresten und sonstigen Verunreinigungen (wie Fettkörper usw.) abdekantiert. Der Extrakt ist damit für die viskosimetrischen Messungen bereit.

## 3. VISKOSIMETRISCHE MESSUNGEN

Die interessanteste Eigenschaft des Aktomyosin ist sein Verhalten gegenüber Adenosintriphosphat (ATP). Gibt man ATP zu einer Lösung von Aktomyosin von geeigneter Ionenstärke, nimmt ihre Viskosität sehr rasch ab. Dieser erreichte Wert bleibt bei geeigneter ATP-Konzentration 20—30 Minuten erhalten. Darauf steigt die Viskosität wieder allmählich zum ursprünglichen Wert auf. Diese Reaktion ist so spezifisch, dass sie zum qualitativen Nachweis des Aktomyosin verwendet werden kann. ATP bewirkt offenbar eine Spaltung des Komplexes in seine Komponenten Myosin und Aktin. Das Myosin aber spaltet das ATP, sodass dessen Wirkung je nach verabreichter Quantität verschieden rasch abnimmt.

Auf Grund dieses Verhaltens untersuchte ich den Verlauf der Viskositätsänderung von Muskelextrakten vor und nach Zusatz von ATP. Zur Messung diente ein Viskosimeter nach SCHACHMANN mit einem relativ grossen Kapillarendurchmesser von ca 1 mm (Methode nach PORTZEHL et al. 1950 und persönlichen Mitteilungen von Frau Dr. PORTZEHL).

Abbildung 1 zeigt den brüsken Abfall der Viskosität auf Zugabe von ATP, der sich in stark verkürzter Durchlaufzeit durch das Viskosimeter ausdrückt. Diese Werte ermöglichen die Berechnung der Viskositätszahl  $Z_\eta$  vor und nach Zusatz von ATP zum Extrakt.

Aus diesen beiden Viskositätszahlen  $Z_\eta$  und  $Z_{\eta_{ATP}}$  kann ein weiterer Wert berechnet werden: die Empfindlichkeit des Extraktes gegenüber ATP. Sie gibt an, um wieviel % die Viskosität vor ATP-Zusatz grösser ist als nachher. Die Berechnung der ATP-Empfindlichkeit erfolgt nach der Formel:

$$\text{ATP-Empf. in \%} = \frac{Z_\eta - Z_{\eta_{ATP}}}{Z_{\eta_{ATP}}} \cdot 100 \quad (4)$$

## 4. RESULTATE

Die Untersuchung von Muskelextrakten aus Puppen verschiedenen Alters ergibt die folgenden Werte der ATP-Empfindlichkeiten, die in Tabelle 1 zusammengestellt sind. Für den fertigen

Muskel wurde im Mittel etwa 104% erhalten. Je jüngere Stadien aus der im ganzen 21 Tage dauernden Imaginalentwicklung untersucht werden, umso geringer ist die Empfindlichkeit des Extraktes auf ATP.

TABELLE 1.

Viscositätszahlen vor ( $Z_{\eta}$ ) und nach ( $Z_{\eta_{ATP}}$ ) ATP-Zusatz und ATP-Empfindlichkeit vom 8. Entwicklungstag nach Diapause bis zur Imago (siehe Text).

Stadium	Anzahl	Variation		Mittel
Imago	8	$Z_{\eta}$	0,6739 - 1,0764	104,19 %
		$Z_{\eta_{ATP}}$	0,3178 - 0,5451	
		Empf. %	88,75 - 116,80	
15	3	$Z_{\eta}$	0,5497 - 0,7636	85,06 %
		$Z_{\eta_{ATP}}$	0,299 - 0,4094	
		Empf. %	84,0 - 86,6	
12	2	$Z_{\eta}$	0,5658 - 0,5658	58,4 %
		$Z_{\eta_{ATP}}$	0,345 - 0,3703	
		Empf. %	52,8 - 64,0	
9	6	$Z_{\eta}$	0,4646 - 0,7958	12,9 %
		$Z_{\eta_{ATP}}$	0,3967 - 0,7107	
		Empf. %	10,62 - 22,9	
8	3	$Z_{\eta}$	0,6555 - 0,8924	0 %
		$Z_{\eta_{ATP}}$	0,6555 - 0,8924	
		Empf. %	0	

Ein Vergleich der durch die viskosimetrischen Messungen erhaltenen ATP-Empfindlichkeiten lässt deutlich den schnellen Anstieg von 0% am 8. Entwicklungstag bis 87% am 15. Tag erkennen (Abbildung 2). In dieser Zeit müssen sich also im sich entwickelnden Muskel die Vorgänge abspielen, die aus einer mehr oder weniger undifferenzierten Anlage einen vollentwickelten und funktionstüchtigen Muskel hervorgehen lassen. Vergleichen wir die ATP-Empfindlichkeiten mit den wichtigsten Schritten der histologischen Differenzierung, so kann man festhalten, dass das Auftreten erster definierbarer Myofibrillen am 9. Tag mit dem erst-

maligen Nachweis von Aktomyosin zusammenfällt. Diese Myofibrillen weisen jedoch noch keine Querstreifung auf; diese kann erst am 10. Entwicklungstag nachgewiesen werden.

Die ATP-Empfindlichkeiten sind unabhängig von der zum Extrakt gegebenen Konzentration der ATP-Lösung, wie dem in

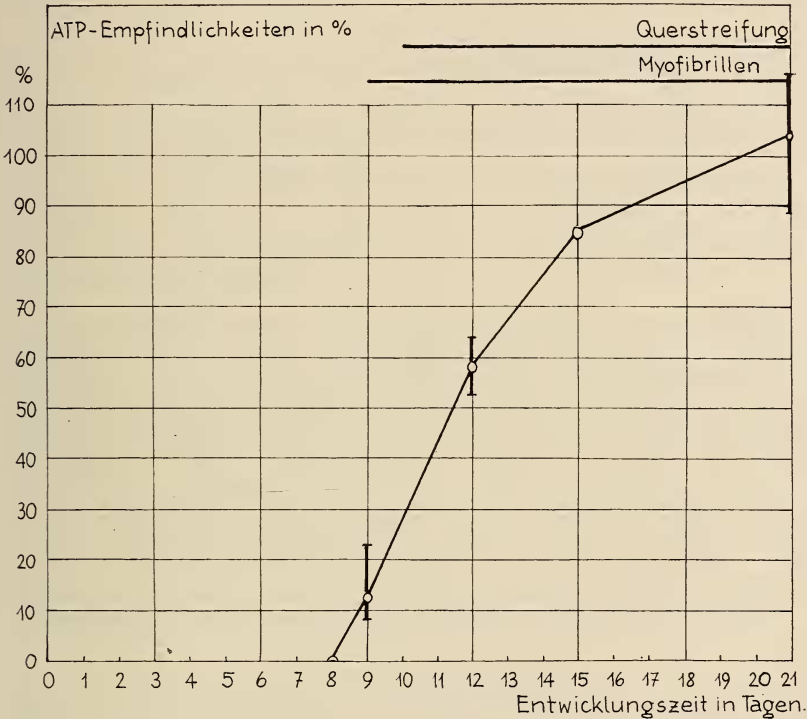


ABB. 2.

Zunahme der ATP-Empfindlichkeit im Verlauf der Entwicklung, verglichen mit dem Auftreten von Myofibrillen und Querstreifung.

Abbildung 1 dargestellten Versuch entnommen werden kann. Dem Muskelextrakt wurden  $8 \cdot 10^{-3}$ ,  $4 \cdot 10^{-3}$ ,  $3 \cdot 10^{-3}$  und  $2 \cdot 10^{-3}$  m ATP-Lösungen beigelegt. Die ATP-Empfindlichkeiten bleiben ungefähr dieselben, d.h. sie bleiben im Variationsbereich (88,75—116,8%) der für Imagines erhaltenen Werte. Der einzige Unterschied besteht in der Zeit, die gebraucht wird, bis die ATP-Mengen gespalten sind und die Viskositäten wieder auf den ursprünglichen Wert ansteigen.

Aus den ATP-Empfindlichkeiten kann wohl der Schluss gezogen werden, dass die Aktomyosinmengen im Verlaufe der Entwicklung zunehmen, jedoch kann die Menge nicht quantitativ nachgewiesen werden. Es besteht aber die Möglichkeit, wenigstens den Gesamteiweissgehalt der Muskeln quantitativ zu erfassen, indem der Stickstoffgehalt bestimmt wird. Die Stickstoffbestimmungen wurden

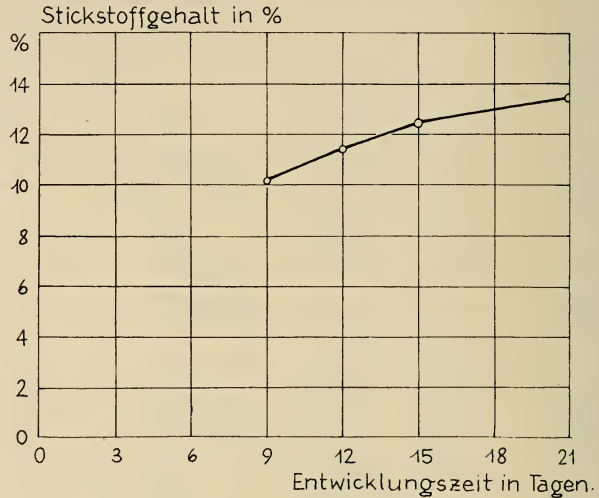


ABB. 3.

Zunahme des Gesamtstickstoffgehaltes im Verlaufe der Entwicklung.

mit Hilfe eines Nitrogen-Analyzers nach der Micro-Dumas-Methode ausgeführt. Die aus dem Thorax präparierten Muskeln werden zwei Tage lang bei 90° C im Hochvakuum getrocknet, um nachher nach genauer Einwaage im Nitrogen-Analyzer gasvolumetrisch auf den Stickstoffgehalt getestet zu werden. In Abbildung 3 sind die Mittelwerte aus je zwei Messungen angegeben. Es dürfte sehr schwierig sein, unterhalb des 9. Entwicklungstages noch genaue N-Bestimmungen durchführen zu können, da es mir fast unmöglich erscheint, die sehr kleinen und durchsichtigen Muskelfäserchen noch präparatorisch vom sehr ausgedehnten Fettkörper zu trennen. Aus diesem Grunde setzen die Messungen erst am 9. Tag ein.

Aus den gleichen Gründen beginnt auch die Bestimmung des Wassergehaltes erst mit dem 9. Entwicklungstag. Der Wassergehalt

der Muskeln von *A. pernyi* nimmt im Verlaufe der Entwicklung ab, beträgt er doch im Stadium 9 83,4%, und erreicht im imaginalen Muskel nur mehr 72%.

## 5. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Die Viskositätsveränderungen des Muskelextraktes von *A. pernyi* verhalten sich auf ATP-Zusatz in gleicher Weise, wie dies NEEDHAM (1941) für Myosinlösungen und SZENT-GYÖRGYI (1942a, b, 1943) für Aktomyosinlösungen festgestellt haben. Daraus darf geschlossen werden, dass im Muskelextrakt neben anderen löslichen Proteinen (Myoglobin, Tropomyosin) auch Aktomyosin vorhanden ist, denn die Viskositätserniedrigungen auf ATP-Zusatz sind für Aktomyosin spezifisch.

Ein Vergleich der ATP-Empfindlichkeiten mit Kaninchenmuskeln (Portzehl et al. 1950) zeigt, dass ziemlich gute Übereinstimmung zwischen Säugermuskeln und Insektenmuskeln (*A. pernyi*) vorhanden ist. Dies überrascht nicht, nachdem auch das histologische Bild der Muskeln im grossen und ganzen dasselbe ist.

Es ist mir ein Bedürfnis, Frau Dr. H. PORTZEHL an dieser Stelle für ihre Anregungen und Hinweise recht herzlich zu danken. Mein Dank richtet sich auch an meinen verehrten Lehrer Prof. Dr. H. Nüesch.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

1. Aktomyosin wird im Verlaufe der Muskelentwicklung von *Antheraea pernyi* qualitativ nachgewiesen. Das kontraktile Muskelprotein tritt erstmals am 9. Entwicklungstag in nachweisbaren Mengen auf, gleichzeitig mit dem ersten Erscheinen von Myofibrillen und kurz vor ihrer Querstreifung.
2. Der Stickstoffgehalt im Verlaufe der Muskelentwicklung wird bestimmt. Er beträgt bei Imagines 13,4%, bei Puppen am 9. Entwicklungstag 10,1% des Trockengewichtes der Muskeln.
3. Der Wassergehalt der Muskeln beträgt bei einer 9-tägigen Puppe 83,4% und fällt im Verlaufe der Entwicklung auf 72% bei der Imago ab.

## RÉSUMÉ

L'apparition de l'actomyosine au cours du développement des muscles thoraciques dans la pupa d'*Antheraea pernyi* a été étudiée qualitativement.

Cette protéine contractile est décelable au 9<sup>e</sup> jour du développement de l'adulte au moment où apparaissent les myofibrilles et avant que celles-ci soient striées. La teneur en azote qui représente 13,4% du poids sec du muscle chez l'imago n'est que 10,1% chez les pupes au 9<sup>e</sup> jour. La teneur en eau est de 83,4% chez les pupes au 9<sup>e</sup> jour, elle tombe à 72% chez l'imago.

## SUMMARY

The apparition of actinomysin during the development of the thoracic muscles in the pupa of *Antheraea pernyi* has been studied qualitatively.

This contractile protein can be found on the 9th day of imaginal development when myofibrils first appear and before the latter become striated. The proportion of nitrogen representing 13,4% of the dry muscle weight in the imago, is only 10,1% in 9 day old pupa. The amount of water is 83,4% in 9 day old pupa, and drops to 72% in the imago.

## LITERATUR

- LEUTHARDT, F., 1963. *Lehrbuch der physiologischen Chemie*. 15. Auflage, Berlin.
- NEEDHAM, D. M., NEEDHAM, J., SHEN, S. C., and LAWRENCE, A.S.C., 1941. *Myosin birefringence and Adenylphosphate*. *Nature*, 147: 766-768.
- NÜESCH, H., 1962. *Zur Entwicklung der Muskelfunktion*. *Verhandl. Naturforsch. Ges. Basel*, 73: 352-353.
- PORTZEHL, H., SCHRAMM, G., und WEBER, H. H., 1950. *Actomyosin und seine Komponenten*. *Z. Naturforsch.* 5b: 61-74.
- SZENT-GYÖRGYI, A., 1942a. *The contraction of myosin threads*. *Stud. Inst. med. Chem. Univ. Szeged*, 1:17-26.
- 1942b. *The reversibility of the contraction of Myosin threads*. *Stud. Inst. med. Chem. Univ. Szeged*, 2: 25-26.
- 1943. *Observations on Actomyosin*. *Stud. Inst. med. Chem. Univ. Szeged*, 3: 86-92.