

Unmittelbar nach der Arbeit war das zu KP phosphorylierte Kreatin auf 33–38% vom totalen Kreatin gesunken. Dagegen waren die Menge der Gesamtnukleotide und ebenso der ATP/ADP-Wert höher als nach Ruhe (Tabelle I). Nach 18 Min. war bereits dasselbe KP erreicht, wie es normalerweise nach Ruhe in jungen Ratten gefunden wird. Die Versuche zeigen, dass durch diese Art der Arbeit das KP zwar erniedrigt wird, das ATP aber auf Kosten des KP seine normale Konzentration beibehält.

Untersuchungen über den Einfluss des Alterns auf den Gehalt von Adeninnukleotiden in der Skelettmuskulatur von Säugern liegen in geringer Zahl vor und sind zum Teil widersprechend. HORVATH¹⁰ fand keinen Unterschied zwischen jungen und alten Ratten im ATP-Gehalt der Muskulatur. ROCKSTEIN und BRANDT¹¹ sowie MITOLO¹² bestätigen dies. Untersuchungen von FROLKIS¹³ hingegen ergaben Hinweise auf eine Abnahme im Alter.

Aufgrund der vorliegenden Befunde darf gefolgert werden, dass in der Skelettmuskulatur die Restitution von KP im Alter mit der Abnahme des ATP unter gleichzeitiger Zunahme des ADP korreliert ist.

Summary. The content of phosphocreatine and of the adenine nucleotides, ATP, ADP and AMP in the white skeletal muscle of rats of different ages has been determined.

There is an age-dependent relation between the quantity of phosphocreatine and the ratio of ATP/ADP. Young

rats contain relatively much phosphocreatine (up to 57%) and a high ATP/ADP ratio (mean 6.7) while old rats show less phosphocreatine (40.8%) and also a low ATP/ADP ratio (mean 2.2).

M. ERMINI^{14,15}, I. SZELÉNYI¹⁶ und P. MOSER¹⁷

*Institut für experimentelle Gerontologie,
Nonnenweg 7, CH-4000 Basel (Schweiz),
5. Oktober 1971.*

¹¹ M. ROCKSTEIN und K. P. BRANDT, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 107, 177 (1961).

¹² M. MITOLO, *G. Geront.*, Suppl. 33, 63 (1964).

¹³ V. V. FROLKIS, *Proc. 8th Int. Congress Geront.*, Washington 1969, Vol. 1, p. 147.

¹⁴ M. ERMINI dankt der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften für eine Verlängerung seines Stipendiums und I. SZELÉNYI dankt für ein USA Forschungs-Stipendium an das Institut für experimentelle Gerontologie in Basel. Herrn Prof. F. VERZÁR sind wir für die Leitung dieser und weiterer Arbeiten zu Dank verbunden.

¹⁵ Istituto di Gerontologia Sperimentale, I.N.R.C.A., Via Birarelli 8, I-60100 Ancona (Italia).

¹⁶ Institute of Pathophysiology, Hoegyes Endre-u 7/9, Budapest IX (Ungarn).

¹⁷ Institut für experimentelle Gerontologie, Nonnenweg 7, CH-4000 Basel (Schweiz).

Aktivität der Aldolase und der Succinatdehydrogenase (SDH) in der weissen und roten Skelettmuskulatur junger und alter Ratten

Im Rahmen unserer Untersuchungen über den Einfluss des Alterns auf den Energiehaushalt der Skelettmuskulatur von Ratten fanden wir eine Altersabnahme des Kreatinphosphates (KP)¹. Die Ursache dafür scheint in einer Verschiebung des Gleichgewichtes von ATP zu ADP zu Gunsten des ADP zu liegen². Es ergab sich deshalb die Frage, welcher der ATP-liefernden Prozesse im Muskel mit dem Alter so weit verändert ist, dass nicht mehr genug ATP resynthetisiert werden kann.

Glycolyse und Krebs-Zyklus sind die beiden Prozesse des anaeroben und aeroben Abbaus der Glucose im Muskel, bei welchen das während der Kontraktion anfallende ADP zu ATP resynthetisiert wird. Wir wählten deshalb zur Prüfung je ein Enzym dieser Prozesse. Es wurden Aktivitätsbestimmungen in Muskelextrakten von jungen und alten Ratten gemacht. Für die anaerobe Glycolyse ist FDP-Aldolase (E.C. 4.1.2.b Fructosediphosphat-Aldolase) und für den aeroben «Krebs-Zyklus» die SDH (E.C. 1.3.99.1) (Succinatdehydrogenase) gewählt worden.

Methoden. Für die Aldolase-Extraktion wurden 9 junge (4–7 Monate) und 11 alte (22–29 Monate) Wistar-Ratten aus der Alterszucht des Institutes verwendet und für die SDH-Extraktion 9 junge (3–7 Monate) und 16 alte (20–30 Monate) Ratten. Bei den jungen wurde an 5 Tieren, bei den alten an 9 Tieren gleichzeitig sowohl Aldolase als auch SDH bestimmt (Tabelle I und II, siehe Vergleich der Präparationsnummern). Für die Extraktion der beiden Enzyme wurden die Tiere 40–45 Min nach i.p. Injektion von 2,5 mg/100 g Nembutal, im Schlaf durch Herzschnitt und Ausbluten getötet. Weisse (M. rectus fem.; M. gluteus max. peripherer Teil) und rote Muskelstücke (M. piriformis; M. vastus intermedius; M. gluta-

eus max. zentraler Teil) wurden präpariert, gewogen und sogleich in eisgekühlte 0,14M KCl-Lösung übergeführt.

Bei einigen Tieren wurde zum Vergleich auch die SDH-Aktivität in Mitochondrien-Suspensionen der Leber bestimmt (Tabelle II). Die Gewebstücke wurden während 1 Min. im Ultraturax homogenisiert und die Suspension 10 Min. bei 800 × g zentrifugiert. Der Niederschlag (Kerne, Zellen, Myofibrillen) wurde verworfen; der Überstand 30 Min. bei 8000 × g zentrifugiert. Hierbei wurden die Mitochondrien sedimentiert. Die Menge beträgt 1.1% bei weisser und 1.6% bei roter Muskulatur vom Gesamthomogenat. Der Niederschlag wurde in 0.14M KCl resuspendiert und zur Messung der SDH-Aktivität verwendet. – Im Überstand wurde die Aldolase-Aktivität bestimmt. Alle präparativen Arbeiten wurden bei 2°C ausgeführt.

Die Aktivität der Aldolase wurde nach SIBLEY und LEHNINGER⁴ gemessen, wobei die aus FDP entstehenden Triosen nach Reaktion mit Dinitrophenylhydrazin (DNPH) bei 540 nm spektrophotometrisch bestimmt werden.

Die Aktivität der Succinatdehydrogenase (SDH) wurde nach der Methode von LESTER und SMITH⁵ bestimmt. Es wurde dabei die Menge des reduzierten Neotetrazoliumchlorids (NTC) spektrophotometrisch bei 505 nm gemessen.

¹ M. ERMINI, *Gerontologia* 16, 65 (1970).

² M. ERMINI, I. SZELÉNYI und P. MOSER, *Experientia* 28, (1972).

³ M. ERMINI, *Experientia* 26, 173 (1970).

⁴ J. A. SIBLEY und A. L. LEHNINGER, *J. biol. Chem.* 177, 859 (1949).

⁵ R. L. LESTER und A. S. SMITH, *Biochim. biophys. Acta* 47, 475 (1961).

Tabelle I. Spezifische Aktivität der FDP-Aldolase in weisser und roter Skelettmuskulatur junger (a) und alter (b) Ratten. Die spezifische Aktivität ist ausgedrückt in μmol Triosen/mg Protein/10 Min/38°C

	Alter	Sex	Körpergewicht (g)	Spez. Aktivität der Aldolase Weisse Musk.	Rote Musk.
a) Junge Ratten (4-7 Monate)	4	♀	253	250	193
	4	♀	323	208	130
	6	♀	300	95	107
	6	♀	270	150	117
	6	♂	450	149	—
	7	♂	450	111	102
	7	♂	480	349	195
	7	♂	575	157	155
	7	♂	529	149	155
	Mittelwerte			180	144
	± Standardabweichung			± 78.7	± 36.4
				$0.05 < p < 0.10$	
b) Alte Ratten (22-29 Monate)	22	♂	510	150	104
	22	♂	500	172	137
	23	♂	485	228	086
	24	♀	230	—	102
	24	♀	380	181	090
	23	♀	280	145	094
	26	♀	433	187	122
	26	♀	530	149	083
	28	♀	226	192	107
	27	♂	460	176	105
	29	♀	260	159	154
	Mittelwerte			174	111
	± Standardabweichung			± 25.2	± 22.2
				$p < 0.001$	

Der Proteingehalt der Extrakte wurde nach LOWRY et al.⁶ bestimmt. Die Aktivität der Aldolase wurde in μmol Triosen/mg Protein/10 Min. bei 38°C, diejenige der SDH in μg red. NTC/mg Protein/10 Min. 38°C ausgedrückt. In der Tabelle I sind die Werte der Aldolase-Aktivität angegeben.

In beiden Altersgruppen ist die Aktivität der Aldolase in der roten Muskulatur geringer als in der weissen. Dies entspricht dem Unterschied zwischen weissen und roten Muskeln: in der weissen Muskulatur überwiegt der anaerobe, in der roten der aerobe Glukose-Abbau. Die Aldolase-Aktivität ändert sich im Alter nicht in der weissen Muskulatur, dagegen wird in der roten Muskulatur eine Aktivitätsabnahme von 23% gefunden (Tabelle I).

Dementsprechend findet man in der roten Muskulatur eine höhere SDH-Aktivität. In Tabelle 2 sind die Werte der Aktivität von SDH angegeben. Ausser in den Muskeln wurde diese auch in der Leber gemessen. Die Tabelle zeigt, dass die SDH-Aktivität im Alter in weissen 34% und in roten Muskeln 52% vermindert ist. Auch die Leber zeigt eine Abnahme von 44%.

Aus den vorliegenden Versuchen kann geschlossen werden, dass die Glycolyse-Aktivität in der weissen Muskulatur im Alter nicht verändert ist. Hingegen ist der oxydative Abbau der Glukose und damit der Prozess für die ATP-Resynthese durch die Aktivitätsverminderung der SDH verringert.

⁶ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL, J. biol. Chem. 193, 265 (1951).

Tabelle II. Spezifische Aktivität der Succinatdehydrogenase (SDH) in weisser und roter Skelettmuskulatur und Leber junger (a) und alter (b) Ratten

	Alter (Monate)	Sex	Körpergewicht (g)	Spez. Akt. SDH		
				Weisse Musk.	Rote Musk.	Leber
a) Junge Ratten (3–7 Monate)	3	♀	215	7.63	—	—
	3	♀	390	3.59	14.40	—
	4	♀	250	3.08	6.89	11.86
	5	♀	250	2.22	5.23	9.71
	5	♂	420	16.53	16.20	9.92
	5	♀	294	6.90	18.92	4.80
	5	♀	323	4.47	9.58	2.72
	7	♂	450	—	9.75	—
	7	♂	480	0.92	7.26	—
	Mittelwerte			4.59	11.27	7.65
	± Standardabweichung			± 1.98	± 5.52	± 2.65
b) Alte Ratten (20–30 Monate)	20	♂	300	3.53	1.81	7.14
	22	♂	510	1.98	4.00	—
	22	♀	500	1.78	8.81	—
	23	♀	257	3.00	6.89	5.37
	23	♂	485	—	6.79	—
	23	♂	560	3.82	3.47	—
	23	♂	760	—	5.37	—
	23	♂	400	1.94	5.57	—
	24	♀	380	5.19	8.46	—
	24	♀	350	3.00	4.67	—
	24	♀	230	—	1.59	4.56
	26	♂	455	3.28	9.39	2.60
	26	♀	433	2.22	6.55	1.84
	28	♀	226	1.84	3.93	1.88
	29	♀	255	1.81	6.42	3.54
	30	♀	200	2.71	2.46	8.12
	Mittelwerte			2.97	5.33	4.30
	± Standardabweichung			± 1.07	± 2.22	± 2.22

Die spez. Aktivität ist ausgedrückt in μg NTC red./mg Protein/10 Min, 38°C.

Im Anschluss an die früheren Befunde über die Abnahme des ATP-Gehaltes im Alter⁴ und der wahrscheinlich dadurch bedingten Reduktion der KP-Reserven⁵ kann angenommen werden, dass diese Störung durch die Änderung der ATP-Resynthese bedingt ist.

Summary. The activity of aldolase and succinatdehydrogenase (SDH) in white and red skeletal muscle of young (3–7 months) and old (20–30 months) rats has been determined. In addition also the SDH of liver was measured. The activity of aldolase is higher in white than in red muscles, while SDH shows a higher activity in red than in

white muscles. The activity of aldolase is not influenced by ageing in white muscles, but decreased in red muscles by 23%. In old animals the activity of SDH is 34% less in white and 52% less in red muscles. In liver the activity is 44% less. The significance of these changes for the energy metabolism of skeletal muscle is discussed.

M. ERMINI und I. SZELÉNYI

*Institut für experimentelle Gerontologie,
Nonnenweg 7, CH-4000 Basel (Schweiz),
5. Oktober 1971.*

The Presence of Isocitrate Lyase and Malate Synthase Activity in Germinating *Ginkgo biloba* seeds^{1,2}

The glyoxylate cycle has been found operative in bacteria³, algae⁴, fungi⁵, conifers⁶ and angiosperms⁷. This cycle provides a mechanism for the conversion of fats into sugar. In the attempt to demonstrate that this metabolic pathway is very strictly associated with high levels of lipids in the tissue and that the cycle might be considered an ancestral mechanism of utilization of fats, we investigated the lipid content of *Ginkgo biloba* seeds, at 0 time of germination. Subsequently we studied the presence of the two key enzymes of the cycle, the isocitrate lyase (EC 4.1.3.1) and malate synthase (EC 4.1.3.2) in seedlings 8 cm long.

Moreover, the fatty acids composition of the triglyceride fractions is investigated and compared to the composition of species where the cycle has been found to be operative, in order to provide a possible correlation between the enzymes assayed and the material they are utilizing as substrate.

It is interesting to underline that the *G. biloba* tree belongs to a division of the Ginkgophyta which goes back to the carboniferous and the *G. biloba* is the only living Ginkgophyta⁸.

Experimental. Culture of *G. biloba*. At 0 time of germination, the seeds deprived of the sarcotesta and sclerotesta were used for lipid determinations. For the enzyme assay, the seeds without sarcotesta but with sclerotesta, were cultivated in a chamber at constant temperature of 25°C in the dark on moistened sand. The proper quantity of water was added to insure complete imbibition and normal germination. At the desired time of germination, the material was collected and used for enzyme determinations.

Lipids extraction and determination. For the extraction of lipid material, we adopted the method of FOLCH et al.⁹. A small aliquot of lipid extract was withdrawn and evaporated in an oven at 60°C for 20 h to obtain the weight of total lipids. For the separation of the lipid classes, we used the thin-layer chromatography as described by MALINS and MANGOLD¹⁰. The triglyceride and phospholipid fractions were assayed after scraping from the plate by the methods of CARLSON¹¹ and MARTIN et al.¹², respectively. The fatty acid composition of triglyceride fractions were obtained by gas chromatographic analysis.

Enzymes extraction and determination. The enzymatic extracts were prepared by the method of FIRENZUOLI et al.⁶. Isocitrate lyase and malate synthase were assayed at 25°C with continuous optical method¹³ slightly modified by us⁶.

Protein determination. The total proteins of the enzyme extract were determined by the biuret method according to BEISENHERZ et al.¹⁴.

Results and discussion. In Table I (a) are reported the levels of total lipids and of 2 fractions more representative and obtained by thin-layer chromatography. It is evident that the seeds at 0 time of germination are mostly rich of triglyceride.

The activities of 2 key-enzymes of glyoxylate cycle in seedlings 8 cm long are reported in Table I (b). The highest values are those of the isocitrate lyase. Table II shows the fatty acid compositions of the triglyceride fraction. Evidently, the saturated fatty acids are quantitatively less represented, unsaturated fatty acids are predominant. The most abundant unsaturated fatty acids are linoleic and oleic acids; these values of *G. biloba* compared with those of the 2 species show that always C18:1 and C18:2 are predominant fatty acids and also linoleic is the most represented one; the ratio C18:1/C18:2, studied in all species, is almost constant. These data may indicate the

¹ A preliminary report on the same subject was read at Xth International Meeting, 3–5 May, 1971, Giornate Biochimiche Latine.

² Research supported by a grant from the Italian Consiglio Nazionale delle Ricerche, and from the Ministero della Pubblica Istruzione.

³ H. L. KORNBERG, *Nature*, Lond. 179, 988 (1957).

⁴ W. G. HAIG and H. BEEVERS, *Arch. Biochem. Biophys.* 107, 152 (1964).

⁵ J. A. OLSON, *J. biol. Chem.* 234, 5 (1959).

⁶ A. M. FIRENZUOLI, P. VANNI, E. MASTRONUZZI, A. ZANOBINI and V. BACCARI, *Plant Physiol.* 43, 1125 (1968).

⁷ Y. YAMAMOTO and H. BEEVERS, *Plant Physiol.* 35, 102 (1960).

⁸ H. C. BOLD, *The Plant Kingdom* (Eds. W. D. McELROY and C. P. SWANSON; Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs 1964), p. 3.

⁹ J. FOLCH, M. LEES and G. M. SLOANE-STANLEY, *J. biol. Chem.* 226, 497 (1957).

¹⁰ D. C. MALINS and H. K. MANGOLD, *J. biol. Chem.* 226, 576 (1960).

¹¹ L. A. CARLSON, *J. Atheroscl. Res.* 3, 334 (1963).

¹² J. B. MARTIN and D. M. DOTY, *Methods of Biochemical Analysis* (Interscience Publishers J. Wiley and Sons, New York 1956), vol. 3, p. 1.

¹³ G. H. DIXON and H. L. KORNBERG, *Biochem. J.* 72, 3 (1959).

¹⁴ G. BEISENHERZ, H. J. BOLTZE, Th. BÜCHER, R. CZOK, K. H. GARBADÉ, E. MEYER ARENDT and G. PFLEIDERER, *Z. Naturforsch.* 8b, 555 (1953).