

Postmortale Veränderungen in den myofibrillären Eiweißkomponenten und der myofibrillären Adenosintriophatasenaktivität der Skelettmuskulatur

I. Tierexperimentelle Untersuchungen

Ervin Vándor und László Józsa

Zentralinstitut für Traumatologie, Postfach 21, H-1430 Budapest, Ungarn

The Post Mortem Alterations of Myofibrillar Proteins and Adenosintriophatase Activities of the Skeletal Muscles

Summary. Immediately after the death of rabbits and at different times within 48 hours, we took out a part of the psoas muscle, from which we made myofibrillar preparations. The carcasses providing the muscle samples were held at two different temperatures. One group was held for 48 hours at 25 C°, imitating room temperature. The other group was held for 12 hours at 25 C° and 12 hours at 10 C°, imitating daily temperature changes. Each myofibrillar sample was subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. In addition we determined the Ca⁺⁺ activated and the EGTA inhibited ATPase specific activity of the myofibrils. We found that within 48 hours the myofibrillar proteins were subjected to some characteristic proteolytic changes, which were dependant on the environmental temperature. The most interesting change was found in carcasses held constantly at 25 C° for 48 hours, where the EGTA inhibited ATPase activity was increased to about seven times its initial value, reflecting impairment of the troponin complex.

Zusammenfassung. Der Psoas-Muskel von Kaninchen wurde unmittelbar nach dem Tode, dann zu verschiedenen Zeitpunkten bis einschließlich 48 Stunden post mortem entnommen. Die Kadaver wurden 48 Stunden lang bei einer Umgebungstemperatur von 25 C°, oder – 12 stündlich wechselnd – von 25 C° und 10 C° gelagert. Die aus den Muskeln gewonnenen Myofibrillen-Proben wurden mit SDS-polyacrylamid-Gelelektrophorese in ihre Eiweißkomponenten gespalten, bzw. es wurde ihre Ca⁺⁺-aktivierte und EGTA-gehemmte myofibrilläre ATP-ase-Aktivität gemessen. Es wurde festgestellt, daß die myofibrillären Eiweißkomponenten einige charakteristische proteolytische Veränderungen abhängig von der Umgebungstemperatur hatten. Nach 48 Stunden bei 25 C° wird der Troponinkomplex in erster Linie geschädigt, wodurch die spezifische Aktivität der EGTA-gehemmten ATP-ase auf ungefähr das siebenfache anwächst.

Key words: Skelettmuskulatur, myofibrilläre Eiweißkomponenten – Adenosin-triphosphatase – postmortale Veränderungen

Über das licht- und elektronenmikroskopische Bild der postmortalen morphologischen Veränderungen in der Skelettmuskulatur wissen wir verhältnismäßig viel. Weiterhin sind postmortale Reizbarkeit, sowie ihre differentialdiagnostischen Folgerungen bekannte Faktoren in der gerichtsmmedizinischen Praxis. Über die Veränderungen, die in der Zusammensetzung der myofibrillären Eiweißkomponenten der quergestreiften Muskeln auftreten, ihren postmortalen Abbau, besitzen wir demgegenüber keine Angaben. Bei unseren Untersuchungen haben wir die postmortalen Veränderungen der myofibrillären Eiweiße der Skelettmuskulatur erst in Tierexperimenten unter standardisierten Bedingungen, dann an Leichen untersucht.

Bei unseren Vorversuchen fanden wir, daß die Veränderungen innerhalb von 48 Stunden nach dem Tode charakteristisch sind und mit zeitlicher Gesetzmäßigkeit auftreten. Diese Publikation befaßt sich aufgrund der Tierexperimente mit den postmortalen Veränderungen der myofibrillären Eiweißkomponenten der myofibrillären Adenosin-Triphosphatase (ATP-ase).

Material und Methodik

Probenentnahme aus dem Muskel. Zu unseren Versuchen benutzten wir 3–4 kg schwere, männliche Kaninchen. Die Tiere wurden mit Genickschlag getötet und *nicht* ausgeblutet. Unmittelbar nach dem Töten der Tiere wurde ihr Bauch aufgeschnitten und die Därme zur Seite geschoben, ein Viertel des M. psoas entnommen und nach der unten beschriebenen Methode sofort aufgearbeitet. Innerhalb von 2–3 Minuten nach dem Tode der Tiere wurden die Proben schon aufgearbeitet. Diese frischen Muskelproben dienten als Kontrolle der entsprechenden Parameter der Psoasmuskeltückchen, die zu späteren Zeitpunkten aus demselben Kaninchen entnommen wurden. Nach Entnahme der frischen Muskelproben wurden die Därme in mit physiologischer Salzlösung durchtränkte Gaze gewickelt und an ihren ursprünglichen Platz gebracht. Aus einem Kaninchen konnten so mit erneuter Eröffnung des Bauches noch zu drei weiteren Zeitpunkten Psoasmuster entnommen werden. Die Zeitpunkte der Probenentnahmen waren 2, 5, 7, 9, 24 und 48 Stunden. Die Kadaver hielten wir bei verschiedenen Temperaturen. Eine Gruppe wurde 48 Stunden lang in einer Umgebung von 25 °C gelagert, was gleichmäßiger Zimmertemperatur entspricht. Die andere Gruppe wurde 12 Stunden lang bei 25 °C, dann 12 Stunden bei 10 °C, und wieder 12 Stunden bei 25 °C und dann 12 Stunden bei 10 °C gehalten. In dieser Gruppe mit geringerer Durchschnittstemperatur wollten wir ein Modell der täglichen Temperaturschwankungen aufstellen. Die Temperatur der Kadaver, bzw. die Geschwindigkeit ihres Wärmeaustausches mit der Umgebung haben wir nicht gemessen.

Myofibrillum-Herstellung. Die Aufarbeitung der Muskeln auf Myofibrillum geschah nach der Methode von Perry [1] mit geringen Modifikationen [2]. Der Eiweißgehalt der entsprechend verdünnten Myofibrillummuster wurde mit der Biuretreaktion nach Gornall [3] bestimmt.

Messung der myofibrillären ATP-ase. Die Messungen erfolgten nach der Methode von Perry und Grey [4] mit geringen Modifikationen [2]. Der freiwerdende anorganische Phosphor wurde nach der Methode von Lohmann und Jendrasik [5] bestimmt. Die spezifische Aktivität des Enzyms wurde in der Einheit $\mu\text{M P} / \text{mg Eiweiß} / \text{Minute}$ angegeben. Die Messungen wurden mit dreimaliger Wiederholung durchgeführt, woraus der Mittelwert und die Standarddeviation berechnet wurden. Die Messung der mit Ethylen-Glykol-bis (2 aminoäthyläther)-N, N-Tetraessigsäure (EGTA) gehemmten myofibrillären ATP-ase geschah nach [2].

Untersuchung der myofibrillären Eiweißkomponenten mit SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die Solubilisierung der Myofibrillummuster wurde nach Pinset-Härström und Ehrlich [6] mit 5 Minuten langem Erhitzen bei 100 °C in 1% Natrium Laurylsulphat (SDS) 1% β -Merkaptoäthanol 50 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7,1) durchgeführt, um die weitere Proteolyse aus-

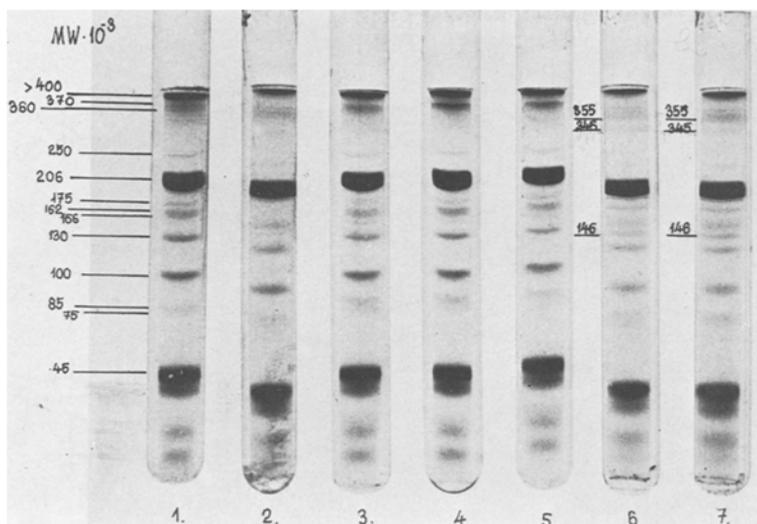


Abb. 1. Trennung der myofibrillären Eiweiße in SDS-Polyacrylamidgel, Konzentration des Gels ist 4%. Auf dem 1., 2., 3., 4., 5., 6. und 7. Gel sind die myofibrillären Eiweiße der frisch, sowie der 2, 5, 7, 9, 24 und 48 Stunden nach dem Tode entnommenen Psoasmuskeln zu sehen. In den ersten 12 Stunden betrug die Umgebungstemperatur der Kadaver 25 °C (2., 3., 4. und 5. Gel). 24 und 48 Stunden nach dem Tode sind in den Myofibrillen drei neue Komponenten zu finden, unabhängig davon, ob die Kadaver bei 25 °C oder alle 12 Stunden abwechselnd bei 25 °C und 10 °C gelagert wurden (6. und 7. Gel). Die Molekulargewichte der myofibrillären Eiweiße der frischen Muskeln und der neu aufgetretenen Eiweiße sind auf der linken Seite der Gele angegeben

zuschließen. Jedes Muster wurde auf je eine Gelsäule mit 4% und mit 10% Acrylamidgehalt gebracht. Der Eiweißgehalt der Muster auf den Gelsäulen betrug 25–55 µg. Die Gelelektrophorese wurde im wesentlichen nach Weber und Osborn [7] mit geringen Modifikationen [2] durchgeführt. Zur genauen Trennung der Eiweiße mit höherem Molekulargewicht als Aktin wurde 4%-iges Gel benutzt. Die Komponenten mit kleinerem Molekulargewicht als Aktin wurden in 10%-igem Gel getrennt. Die Identifizierung der myofibrillären Proteine geschah aufgrund ihres aus der Mobilität berechneten Molekulargewichtes mit Hilfe von Referenzeiweißen nach der Methode von Weber und Osborn [7].

Ergebnisse

Die mit Gel von 4% Acrylamidgehalt gespaltenen Eiweißkomponenten der Muskelmuster, die nach dem Tode zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen wurden, sind auf Abb. 1 zu sehen.

Das erste Gel ist das der aus frischem Muskel hergestellten myofibrillären Eiweiße. Hier sind die auch von Sender [8] nachgewiesenen Eiweiße zu finden, das U-1 mit einem Molekulargewicht von mehr als 400 000 Dalton, die schwere Kette von Myosin mit einem Molekulargewicht von 206 000, die U-2 und U-3 Eiweiße mit einem Molekulargewicht von 175 000 und 156 000, das α -Actinin mit dem Molekulargewicht von 100 000 und das Actin mit dem Molekulargewicht von 45 000. Die Eiweiße mit kleinerem Molekulargewicht als Actin bilden schon diffuse Streifen. Zu ihrer genauen Trennung und Auswertung wurde 10%-iges Gel benutzt. Außer diesen Eiweißen konnten noch 7 weitere mit den Molekulargewichten von 370 000, 360 000, 250 000, 162 000, 130 000, 85 000 und 75 000 nachgewiesen werden.

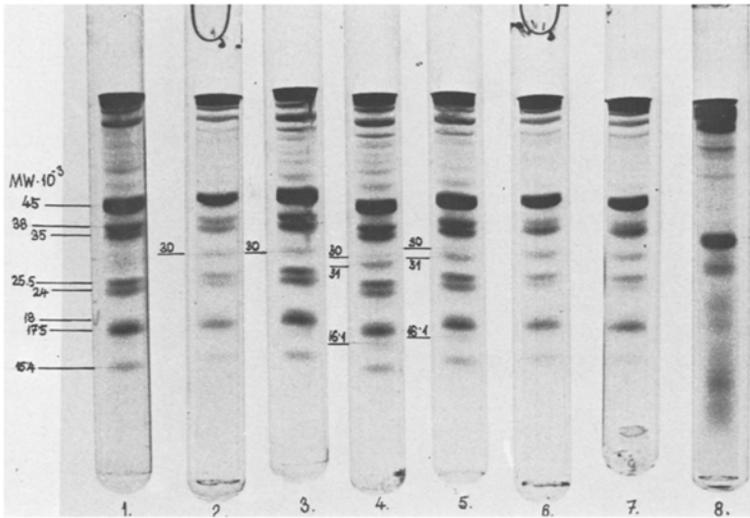


Abb. 2. Trennung der myofibrillären Eiweiße in SDS-Polyakrylamidgel, Konzentration des Geles ist 10%. Auf dem 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7. und 8. Gel sind die myofibrillären Eiweiße der frisch, sowie der 2, 5, 7, 9, 24 und 48 Stunden nach dem Tode entnommenen Psoasmuskeln zu sehen. In den ersten 12 Stunden wurden die Kadaver bei 25 °C gelagert. In dieser Zeitspanne erschienen neue Eiweiße (2., 3., 4. und 5. Gel). 24 Stunden nach dem Tode verschwanden zwei neue Eiweiße unabhängig davon, ob die Kadaver bei 25 °C gelagert wurden, oder je 12 Stunden lang bei 25 °C und bei 10 °C (7. Gel). Die myofibrillären Eiweiße der 48 Stunden lang abwechselnd bei 25 °C und 10 °C gelagerten Kadaver stimmen mit den 24 stündigen überein (7. Gel). Bei den 48 Stunden lang bei 25 °C gelagerten Kadavern kann eine starke Proteolyse beobachtet werden (8. Gel). Die Molekulargewichte der myofibrillären Eiweiße der frischen Muskeln und der neu aufgetretenen Eiweiße sind auf der linken Seite der Gele angegeben

Die myofibrillären Eiweiße der 2, 5, 7, 9 Stunden nach dem Tode entnommenen Muskeln sind in diesem Bereich über einem Molekulargewicht von 45 000 Dalton unverändert.

In den Myofibrillen der 24 und 48 Stunden nach dem Tode entnommenen Muskeln erscheinen, vermutlich infolge der Proteolyse drei neue Komponenten: mit einem Molekulargewicht von 355 000, 345 000 und 146 000. Gleichzeitig wurde der α -Actinin-Streifen schwächer. Diese Veränderungen waren gleichermaßen für die bei niedrigeren als auch für die bei höheren Temperaturen gelagerten Muskeln charakteristisch.

Die myofibrillären Komponenten der Muskeln, die in 10%-igem Gel gespalten wurden, sind auf Abb. 2. zu sehen.

Auf dem ersten Gel sind die aus frischem Muskel gewonnenen myofibrillären Eiweiße zu sehen. Hier sind die von Potter [9] beschriebenen, bekannten Eiweiße zu sehen: Actin mit dem Molekulargewicht von 45 000, Troponin T mit dem Molekulargewicht von 38 000, Tropomyosin mit dem Molekulargewicht von 35 000, Myosin leichte Kette-1 (LC-1) mit dem Molekulargewicht von 25 500, Troponin I mit dem Molekulargewicht von 24 000, Troponin C mit dem Molekulargewicht von 18 000, Myosin LC-2 mit dem Molekulargewicht von 17 500 und Myosin LC-3 mit dem Molekulargewicht von 15 400. In den Muskeln, die 2 Stunden nach dem Tode

Tabelle 1.

Zeitpunkt der Musterentnahme	Körper- temperatur		Temperatur		Körper- temperatur	EGTA
	25 C°	Ca ⁺⁺	25 C° und 10 C°	25 C° und 10 C°		
frisch / n=6 /	0.437 ± 0.043				0.038 ± 0.011	
24 Stunden / n=4 /		0.526 ± 0.042	0.566 ± 0.040		0.043 ± 0.009	0.040 ± 0.015
48 Stunden / n=4 /		0.444 ± 0.033	0.452 ± 0.043		0.287 ± 0.018	0.051 ± 0.020

Zeichenerklärung: Ca⁺⁺ = Mittelwert ± S.D. der spezifischen Aktivität der Ca⁺⁺ aktivierten myofibrillären ATP-ase; EGTA = Mittelwert ± S. D. der spezifischen Aktivität der EGTA gehemmten myofibrillären ATP-ase; 25 C° = 48 Stunden lang bei einer Temperatur von 25 C° gelagerte Kadaver; 25 C° und 10 C° = 48 Stunden lang abwechselnd je 12 Stunden bei 25 C° und bei 10 C° gelagerte Kadaver; n = Zahl der Tiere

entnommen wurden, ist außerdem auch ein Eiweiß mit dem Molekulargewicht von 30 000 zu finden. In den 5 und 7 Stunden nach dem Tode entnommenen Muskeln erscheinen außerdem zwei weitere Abbauprodukte mit dem Molekulargewicht von 31 000 und 16 100. Aus den 24 stündigen Kadavern – sowohl den bei niedrigerer als auch bei höherer Temperatur gelagerten – verschwinden wahrscheinlich infolge weiterer Proteolyse die Produkte mit dem Molekulargewicht von 31 000 und von 16 100. Die Myofibrillum-Eiweiße der 48 Stunden lang abwechselnd bei 25 C° und 10 C° gelagerten Kadaver zeigen dasselbe Bild. Anders ist die Lage bei den Kadavern, die 48 Stunden lang bei 25 C° gelagert wurden. Hier sind die Eiweiße unter dem Actin infolge der Proteolyse verwaschener. Die aus den diffusen Streifen bestimmten Molekulargewichte weichen in geringem Maße von den vorherigen ab. Das Troponin T ist kaum zu sehen, das Molekulargewicht des Tropomyosin ist mit 36 000, das des Myosin LC-1 mit 26 500 und das des Troponin I mit 23 500 im Verhältnis zu den vorherigen gering verschoben. Die Stelle des Troponin C kann nicht identifiziert werden. Myosin LC-2 und LC-3 sind mit einem Molekulargewicht von ungefähr 17 100 und 15 200 zu identifizieren. Außerdem erscheinen noch zwei Abbauprodukte mit Molekulargewichten von 14 000 und 11 000 Dalton. Die Schädigung des Troponin-Komplexes weist auf die Schädigung der Regulierbarkeit des myofibrillären ATP-ase Enzyms hin.

Die Veränderungen der durch Ca⁺⁺-aktivierten und EGTA-gehemmten spezifischen Aktivität des myofibrillären ATP-ase Enzyms sind in Tabelle 1 zu sehen.

Zwischen den spezifischen Aktivitäten der Ca⁺⁺-aktivierten myofibrillären ATP-ase in den frisch und den 24 und 48 Stunden nach dem Tode entnommenen Muskeln besteht kein wesentlicher Unterschied. Diese Werte wurden auch nicht von den verschiedenen Umgebungstemperaturen beeinflusst. Die spezifischen Aktivitäten der EGTA-gehemmten myofibrillären ATP-ase sind auch gleich, mit Ausnahme der Kadaver, die 48 Stunden lang bei 25 C° gelagert wurden. Bei letzteren ist nämlich die EGTA-Hemmung stark gesenkt, da die Aktivität der ATP-ase in Anwesenheit von EGTA ungefähr auf das siebenfache des Ausgangswertes ansteigt. Das bedeutet, daß die Regulierbarkeit des Enzyms stark geschädigt ist. Das entspricht gleichfalls dem Bild, das man bei den mit 10 %-igem Gel getrennten myofibrillären Eiweißen erhalten hat, und zwar bei den 48 Stunden lang bei 25 C° gelagerte Kadavern.

Diskussion

Innerhalb von 48 Stunden nach dem Tode machen die myofibrillären Eiweiße der Psoasmuskulatur in den Kadavern charakteristische Veränderungen durch, die auch von der Temperatur beeinflusst werden. Die spezifische Aktivität der Ca⁺⁺-aktivierten myofibrillären ATP-ase ändert sich praktisch nicht, während die EGTA-gehemmte spezifische Aktivität stark ansteigt, was eine Schädigung der Regulierbarkeit des Enzyms bedeutet.

Die spezifische Aktivität der Ca⁺⁺-aktivierten ATP-ase ändert sich in 48 Stunden nicht, auch nicht bei den ständig bei 25 C° gelagerten Kadavern. Unsere Messungen der Ca⁺⁺ ATP-ase unterstützen die Untersuchungen von Penny [10], nach denen die spezifische Aktivität der myofibrillären Ca⁺⁺-aktivierten ATP-ase in Muskeln, die aus Kaninchen entnommen und 24 Stunden lang bis 15–18 C° gelagert wurden, unverändert ist. Die entnommenen Muskeln mußten erst wenigstens 4 Stunden lang bei

37 C° gelagert werden, damit die spezifische Aktivität zu sinken begann. Günther [11], der die im Schlachthof aus Rindern entnommenen Muskeln bei 0 C° lagerte, machte die Erfahrung, daß die spezifische Aktivität der Ca⁺⁺-aktivierten ATP-ase erst nach einer Lagerung von 5 Tagen zu sinken begann, und die Aktivität erst nach sieben Tagen auf die Hälfte sank. Die Aktivität der EGTA-gehemmten ATP-ase wurde aber von keinem Autor gemessen.

Die Proteolyse kann schon in den Myofibrillen der zwei Stunden nach dem Tode entnommenen Psoasmuskeln nachgewiesen werden. Dann erscheint nämlich ein Eiweiß mit dem Molekulargewicht von 30 000 Dalton, das in den Präparaten aus frischen Muskeln nicht vorhanden ist. Das ist wahrscheinlich dasselbe wie das von Drabikowsky et al. [12] behandelte Eiweiß, das nach ihrer Meinung eines der ersten proteolytischen Abbauprodukte des Tropomyosin T ist. 7 und 9 Stunden nach dem Tode erscheinen neben diesem Produkt mit dem Molekulargewicht von 30 000 noch zwei Abbauprodukte mit dem Molekulargewicht von 31 000 und 16 100. Ihr Ursprung ist unbekannt, vermutlich handelt es sich um proteolytische Abbauprodukte. 24 Stunden nach dem Tode sind auch in dem Bereich mit höherem Molekulargewicht Veränderungen wahrzunehmen, es erscheinen drei neue Produkte mit dem Molekulargewicht von 355 000, 345 000 und 146 000. Gleichzeitig wird der α -Actinin-Streifen schwächer. Zur gleichen Zeit verschwinden die Produkte mit dem Molekulargewicht von 31 000 und 16 100, das von 30 000 bleibt noch. Die 24-stündigen postmortalen Veränderungen stimmen sowohl bei den bei niedriger als auch bei höherer Temperatur gelagerten Kadavern überein. In dieselben Eiweißkomponenten können die Myofibrillen gespalten werden, die aus den 48 Stunden lang abwechselnd 12 Stunden bei 25 C°, dann 12 Stunden bei 10 C° gelagerten Kadavern gewonnen wurden. In den 48 Stunden lang ständig in einer Umgebung von 25 C° gelagerten Kadavern traten aber demgegenüber sowohl aufgrund der Elektrophorese in 10%-igem Gel, als auch der Messungen der Enzymaktivität wesentliche Veränderungen ein.

Die mit der Elektrophorese gespaltenen myofibrillären Eiweiße weisen auf die Schädigung des Troponinkomplexes und durch ihn auf das Sinken der Regulierbarkeit des Enzymes hin. Das Sinken der EGTA-Hemmung spiegelt dasselbe wieder, denn in Anwesenheit von EGTA steigt die spezifische Aktivität der ATP-ase auf das siebenfache des Ausgangswertes. Bei diesen 48 Stunden lang bei 25 C° gelagerten Kadavern scheinen auf dem 10%-igen Acrylamidgel auch die leichten Ketten des Myosin verwaschen. Es ist die Frage, ob das wirklich auf die Schädigung des Myosin hinweist, oder die proteolytischen Produkte anderer Eiweiße diese Verwaschenheit verursachen. Da wir in der Aktivität der Ca⁺⁺-aktivierten ATP-ase im Verhältnis zum Ausgangswert keinen Unterschied gefunden haben, kann man annehmen, daß diese Verwaschenheit durch die Proteolyse anderer Eiweiße verursacht wird. Unsere Annahme wird durch die Untersuchung von Günther [11] unterstützt, der Myosin mit Sephadex Gelfiltration aus frischen, 5 und 7 Tage alten Muskeln differenziert hat und fand, daß der Abbau des Myosins und das Sinken der Ca⁺⁺-aktivierten ATP-ase parallel verlaufen. Außerdem fanden wir bei den 24 und 48 stündigen Kadavern eine Verblässung des α -Actininstreifens, da sich das α -Actinin vermutlich in der Nähe der Z Membran und der I Filamente befindet, kann es sein, daß das eine Auflockerung der Myofibrillumstruktur bedeutet

Literatur

1. Perry, S.V.: The Bound Nucleotide of the Isolated Myofibril. *Biochem. J.* 51, 495–499 (1952)
2. Vándor, E.: Az izom myofibriláris adozintrifoszfátáz aktivitása és myofibriláris fehérjéi mélyhűtéssel tárolt izmokban. (ungarisch) *Kísérl. Orvostud.* (in press)
3. Colowick, S.F., Kaplan, N.O.: *Methods in Enzymology*. Volume III. pp 450–451. New York: Academic Press Inc. 1957
4. Perry, S. V., Grey, T.C.: A Study of the Effects of Substrate Concentration and Certain Relaxing Factors on the Magnesium-Activated Myofibrilar Adenosine Triphosphatase. *Biochem. J.* 64, 184–192 (1956)
5. Kovach, A.: A Kísérleti Orvostudomány Vizsgáló Módszerei. II. Budapest: Akadémiai Kiadó 1954
6. Pinset-Härström, I., Ehrlich, E.: A Specific Method for the Preparation of Pure Myosin. *FEBS Letters* 34, 227–231 (1973)
7. Weber, K., Osborn, M.: The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 224, 4406–4412 (1969)
8. Sender, P. M.: Muscle Fibrils: Solubilization and Gel Electrophoresis. *FEBS Letters* 17, 106–110 (1971)
9. Potter, J.D.: The Content of Troponin, Tropomyosin, Actin and Myosin in Rabbit Skeletal Muscle Myofibrils. *Arch. Biochem. Biophys.* 162, 436–441 (1974)
10. Penny, I.F.: The Effect of Post-Mortem Conditions on the Extractability and Adenosine Triphosphatase Activity of Myofibrilar Proteins of Rabbit Muscle. *J. Food. Technol.* 2, 325–338 (1967)
11. Günther, H.O.: Probleme bei der Herstellung und Lagerung von Rindfleischkonserven. *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* 156, 211–223 (1974)
12. Drabikowski, W., Nowak, E., Barylko, B., Dabrowska, R.: Troponin-its Composition and Interaction with Tropomyosin and F-Actin. *Cold Spring Harbor Symp.* 37, 245–249 (1973)

Eingegangen am 23. Juni 1977