

Chemische und enzymatische Reaktionen an der Membran von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen und ihre Folgen für Stoffwechsel und Permeabilität

Von R. Brossmer (Vortr.), W. Brandeis und K. Kramps^[*]

Um den Zusammenhang zwischen chemischer Struktur und biologischer Funktion bei den Membranen tierischer Zellen zu untersuchen, wurden sie mit Substanzen modifiziert, deren Wechselwirkung mit Gruppen der Zelloberfläche definiert werden kann. Danach wurden die Folgen für Stoffwechsel und Permeabilität geprüft.

Als Modell dienten Zellen des Ehrlichschen Mäuse-Ascites-Tumors. Die Ergebnisse scheinen auch für andere Zellarten zu gelten.

Die Behandlung der Zellen mit Perjodat (10^{-4} M bis 10^{-2} M, 15 min, 37°C) führt in Abhängigkeit von der Konzentration zu einer nachhaltigen Störung von Stoffwechsel und Permeabilität. So beträgt die Glykolyse bei 10^{-4} M Perjodat 70%, bei $5 \cdot 10^{-4}$ M etwa 50%, bei 10^{-3} M aber nur noch höchstens 5% der Werte von Kontrollzellen. Ähnliches gilt für die Atmung.

Um eine Wirkung auf die Membranfunktion nachzuweisen, wurde der Efflux von Kalium und Protein in Abhängigkeit von der Perjodatkonzentration untersucht. Dabei zeigte sich, daß die Membran für nieder- und hochmolekulare Substanzen zunehmend durchlässiger wird. Die chemisch definierte Wirkung von Perjodat auf Glykoproteine und Glykolipide der Zellmembran führt demnach zu einer massiven Schrankenstörung. Dafür spricht auch, daß normalerweise nicht permeierende Farbstoffe, z.B. Trypanblau und Naphthalin-grün V, jetzt intracellulär erscheinen. — In Langzeitversuchen erweist sich die durch Perjodat^[1] hervorgerufene Hemmung des Stoffwechsels als teilweise reversibel. So erreicht die Glykolyse nach 5 Std. wieder 45% der Kontrolle und bleibt dann konstant. Die Verminderung des Stoffwechsels beruht demnach auf einer reversiblen und einer irreversiblen Störung, wobei aber der Influx von Farbstoff nach 5 Std. gegenüber dem am Beginn unverändert ist, d.h. die Membran bleibt geschädigt. Die Transplantierbarkeit der Zellen ist erst nach Inkubation mit 10^{-2} M Perjodat aufgehoben. Behandlung mit 0,1 M Perjodat (1 Std., 20°C) senkt die Wanderungsgeschwindigkeit der Zellen im elektrischen Feld um 10–15%. Neuraminidase vermag jetzt nur noch wenig Sialinsäure abzuspalten (im Gegensatz zur starken Wirkung des Enzyms auf Kontrollzellen).

Während die Behandlung der Asciteszellen mit β -Phenyl-äthanol (0,1%, 15 min, 37°C) nur zu einer geringen Verminderung des Stoffwechsels führt, sinken bei 0,5% die anaerobe Glykolyse auf 3% und die Atmung auf 18% der Kontrolle. Bei 0,25% β -Phenyläthanol ist die Hemmung vollständig reversibel.

Für eine beträchtliche Störung der Permeabilität sprechen folgende Befunde: 1. Efflux von Kalium. 2. Efflux von Protein. 3. Influx von Farbstoff. Die Zellen lassen sich nicht mehr transplantieren (0,5% β -Phenyläthanol, 15 min, 37°C). Die elektrophoretische Beweglichkeit ist dagegen unverändert.

Weder Subtilisin noch Lysozym beeinflussen Stoffwechsel und Wanderungsgeschwindigkeit; dagegen senkt alkalische Phosphatase Atmung und Glykolyse um etwa 30%. Die Wanderungsgeschwindigkeit nimmt hier um 10–15% zu.

Durch Succinylierung der Aminogruppen läßt sich die Zellmembran chemisch modifizieren. Dadurch verschwinden nicht nur positive Ladungen, sondern es werden zusätzlich negative Ladungen an der Zelloberfläche verankert. Dies führt auch tatsächlich zu einer um 20% erhöhten Beweglichkeit im elektrischen Feld. Derart modifizierte Zellen sind morphologisch intakt, haben aber andere Eigenschaften.

[*] Priv.-Doz. Dr. R. Brossmer, W. Brandeis und K. Kramps
Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung,
Abteilung Chemie
69 Heidelberg, Jahnstraße 29

[1] Konzentration: 10^{-3} M.

Neuraminidase spaltet etwa $\frac{1}{3}$ weniger Sialinsäure als von nicht behandelten Zellen ab; der Stoffwechsel ist stark gehemmt.

Über Rezeptoren an der Oberfläche menschlicher Thrombocyten

Von R. Brossmer (Vortr.) und H. Patscheke^[*]

Einmal gewaschene und dadurch von ihrem komplizierten Milieu befreite Thrombocyten sind ein gutes Modell, denn sie sind morphologisch und funktionell intakt. Auf der Suche nach den Rezeptoren für die physiologisch und pathologisch wichtige Aggregation hat sich folgendes ergeben:

Calcium aggregiert Blutplättchen bereits ohne weitere Zusätze. Dabei macht es keinen Unterschied, ob die Reaktion in Pufferlösung oder im Plasma (mit Heparin) stattfindet. Mit fallender Temperatur nimmt die Aggregation zu und erreicht bei $15\text{--}20^{\circ}\text{C}$ ein Maximum. Man benötigt dafür $5 \cdot 10^{-4}$ M Ca^{2+} , d.h. $\frac{1}{5}$ seiner physiologischen Konzentration im Plasma, aber auch noch $5 \cdot 10^{-5}$ M Ca^{2+} aggregieren beträchtlich. Oberhalb $3 \cdot 10^{-3}$ M Ca^{2+} ist eine Aggregation nicht mehr auflösbar; es kommt darüber hinaus zur Desaggregation. Für Magnesium ($5 \cdot 10^{-4}$ M) gilt qualitativ das gleiche, jedoch beträgt die Aggregation nur etwa 40% der durch Calcium bewirkten. Die durch Calcium und Magnesium induzierbaren Aggregationen sind bei höherer Temperatur reversibel. Dieser Zyklus läßt sich mehrmals — lediglich durch Änderung der Temperatur — wiederholen. Adenosindiphosphat ist nicht beteiligt. Man kann daher Calcium und Magnesium als die einfachsten aggregierenden Stoffe betrachten^[1]. Die Wechselwirkung mit den Zellen beruht auf einfachen physikalisch-chemischen Phänomenen.

Der Receptor auf der Thrombocytenoberfläche läßt sich durch alkalische Phosphatase abspalten; es handelt sich um $106\text{--}107$ Phosphatgruppen pro Thrombocyt. Auch alle anderen calcium-abhängigen Aggregationen, darunter die physiologisch bedeutsame durch Adenosindiphosphat, werden durch dieses Enzym blockiert. Im Gegensatz dazu aggregieren positiv geladene Polymere^[2] auch in Gegenwart des Enzyms unbeeinträchtigt. Hier wirken chemisch andere Gruppen als Rezeptoren, die durch Neuraminidase teilweise abgespalten werden. Dabei bleibt jedoch die Wirkung aller calcium-abhängigen Substanzen unbeeinflusst. Wir haben demnach für die Aggregation zwei Arten von Rezeptoren nachgewiesen: 1. Phosphatgruppen, die als Metallchelate eine spezifische Rolle spielen und 2. Sialinsäuremoleküle.

[*] Priv.-Doz. Dr. R. Brossmer und H. Patscheke
Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung,
Abteilung Chemie
69 Heidelberg, Jahnstraße 29

[1] R. Brossmer u. H. Patscheke, Verhandlungen 1. Internat. Symposium über Stoffwechsel und Membranpermeabilität von Erythrocyten und Thrombocyten, Wien 1968, im Druck.

[2] R. Brossmer u. Th. Pfeleiderer, Naturwissenschaften 53, 464 (1966); Th. Pfeleiderer u. R. Brossmer, Thrombosis Diathesis haemorrhag. (Stuttgart) 18, 674 (1967); 19, 459 (1968).

Untersuchungen über die Primärwirkung des Phalloidins

Von M. Frimmer (Vortr.), H. Glossmann, J. Gries und D. Hegner^[*]

Bei der Knollenblätterpilzvergiftung spielen das schnell wirkende Phalloidin und das langsamer wirkende α -Amanitin die entscheidende Rolle. Da Phalloidin fast ausschließlich an der Leber angreift, kann seine Wirkungsweise am besten an der isoliert perfundierten Leber untersucht werden. Das früheste meßbare Ereignis (nach 5 min) ist ein schnell einsetzender Ausstrom von Kalium und ein entsprechender Einstrom von Natrium. Andere Stoffwechselveränderungen

(Energie- und Kohlenhydrat-Stoffwechsel, Freisetzung strukturgebundener Enzyme usw.) werden demgegenüber erst mit einiger Verzögerung meßbar. Das Gift wird von der Leber bei Körpertemperatur innerhalb weniger Minuten, unter 10 °C aber außerordentlich langsam aufgenommen. Bei unphysiologisch tiefen Temperaturen bleiben auch Kaliumabgabe und Schwellung der Leber aus oder werden zumindest stark gehemmt.

Isolierte Leberzell-Plasmamembranen binden das ³H-markierte Gift besser als andere subzelluläre Fraktionen aus Leber. Während der ersten Minuten der Vergiftung findet man eine Anreicherung des markierten Phalloidins in der äußeren Zellmembran, während es sich später über die gesamte Zelle verteilt, wobei der Hauptanteil in inneren Membranen (endoplasmatisches Reticulum) gebunden wird. Untersuchungen an isolierten Leberzellmembranen ergaben je nach Versuchsbedingungen entweder eine Hemmung oder eine Aktivierung der kationenabhängigen ATPasen. Eine Beeinflussung des aktiven Kationentransports durch Phalloidin ist deshalb wahrscheinlich.

Elektronenoptische Aufnahmen an isolierten Leberzellmembranen nach in-vitro-Inkubation mit Phalloidin zeigen Veränderungen der Membranstruktur, so daß bei Beginn der Vergiftung eine Primärwirkung an der äußeren Protoplasma-membran der Leberzelle anzunehmen ist. Mit zunehmender Anreicherung des Giftes an inneren Zellmembranen kommt es zu den bereits bekannten, auch morphologisch faßbaren Schädigungen der Leberzelle, jedoch wird die rasche Änderung der Permeabilität der Leberzell-Plasmamembran als das entscheidende Primärereignis der Phalloidinvergiftung angesehen.

[*] Prof. Dr. M. Frimmer, Dr. H. Glossmann, Dr. J. Gries und Priv.-Doz. Dr. D. Hegner
Institut für Pharmakologie und Toxikologie an der
veterinärmedizinischen Fakultät der Universität
63 Gießen, Frankfurter Straße 94

Embryonale Entwicklung der Enzyme des Fructosestoffwechsels

Von F. Heinz (Vortr.) und F. Weiner [*]

Die embryonale und postnatale Entwicklung der Enzyme des Fructosestoffwechsels wurde in der Leber von Ratten und Hühnern untersucht. Die Aktivitäten folgender Enzyme wurden gemessen: Sorbit-Dehydrogenase, Fructokinase, Aldolase mit den Substraten Fructose-1,6-diphosphat und Fructose-1-phosphat, Aldehyd-Dehydrogenase (Substrat D-Glycerinaldehyd) und Triokinase. Weiter wurden die Aktivitäten der NAD- und NADP-spezifischen Alkohol-Dehydrogenasen, die D-Glycerinaldehyd zu Glycerin reduzieren und deren Bedeutung für den Fructosestoffwechsel umstritten ist, gemessen. Der Vergleich zwischen Ratte und Huhn ergab, daß sich die Enzymaktivitäten während der embryonalen und postnatalen Entwicklung in ähnlicher Weise verändern.

Die Enzyme lassen sich in drei Gruppen einteilen:

1. Enzyme, die sich erst nach der Geburt in der Leber nachweisen lassen; einziges Beispiel ist Fructokinase.
2. Enzyme, die während der embryonalen und postnatalen Entwicklung ihr Isoenzymmuster ändern, z. B. Aldolase. Der Quotient der unter optimalen Bedingungen gemessenen Spaltungsgeschwindigkeit von Fructose-1,6-diphosphat und Fructose-1-phosphat ändert sich bei der Ratte von 10 beim Embryo auf 2,6 beim adulten Tier, beim Huhn dagegen nur von 3,8 auf 2,3.
3. Enzyme, die embryonal bereits nachzuweisen sind und deren Aktivität vom embryonalen bis zum adulten Zustand stetig ansteigt. Beispiele sind die Sorbit-Dehydrogenasen, die Alkohol-Dehydrogenasen, die Triokinase und auch die Aldehyd-Dehydrogenase, die bereits embryonal in hoher Aktivität in der Leber von Ratte und Huhn nachzuweisen ist und sich während der weiteren Entwicklung nur wenig verändert.

Unsere Versuche zeigen, daß die Biosynthese der Enzyme des Fructosestoffwechsels nicht durch ein einziges Genom gesteuert wird. Versuche, eine schnellere postnatale Zunahme der Enzymaktivitäten durch Fructose zu erreichen, verliefen ergebnislos.

[*] Dr. F. Heinz und F. Weiner
Institut für Klinische Biochemie und
Physiologische Chemie der Medizinischen Hochschule
3 Hannover, Osterfeldstraße 5

Gewebshyaluronidase und Wundheilung

Von W. Heller (Vortr.) und F. K. Mörl[*]

Bei mehr als fünfzig strumaoperierten Männern und Frauen untersuchten wir das Verhalten der Gewebshyaluronidase und das des proteingebundenen Jods bis zu sieben bzw. neun Tagen nach der Operation. Der Gehalt an proteingebundenem Jod ist ein wohldefiniertes Maß für den Thyroxinspiegel im Blut. Bei der Gewebshyaluronidase (Mittelwertskurven) fällt die Abnahme am Operationstag auf, die aber noch im Bereich der Norm liegt; das Minimum (weit unter dem Normbereich) wird erst am dritten Tag erreicht. Um den Zusammenhang zwischen Gewebshyaluronidase und proteingebundenem Jod exakt verfolgen zu können, müssen die Kurven für jeden Patienten gesondert betrachtet werden. Bei sämtlichen Strumaoperierten nimmt die Menge des proteingebundenen Jods postoperativ zu, während die der Gewebshyaluronidase abfällt. Im Idealfall sind beide Kurven nahezu gegenläufig. So treten bei fast allen Patienten die entsprechenden Maxima und Minima gleichzeitig auf. Die Höhe der Extremwerte hängt jedoch von der Art der Struma ab. Dies wird besonders deutlich bei Hyperthyreosen; allerdings zeigen auch euthyreote Patienten den beschriebenen Verlauf der beiden Kurven, der jedoch nicht so auffällig ist.

Obwohl ein signifikanter Zusammenhang zwischen Gewebshyaluronidase und proteingebundenem Jod besteht, wird offenkundig, daß es nur ein indirekter sein kann, da zwar die Gewebshyaluronidase durch einen Proteinaseinhibitor beeinflussbar ist, nicht aber das proteingebundene Jod. Es gelang uns auf diese Weise, einen Anstieg der Gewebshyaluronidase zu erreichen, der völlig unabhängig vom Spiegel des proteingebundenen Jods im Blut ist.

Die Gabe des Proteinaseinhibitors bewirkt somit einen günstigen therapeutischen Effekt, da ein extremer Abfall der Gewebshyaluronidase für die Wundheilung nicht wünschenswert ist. Der positive Einfluß des Thyroxins bei der Wundheilung ist bekannt, was auch durch in-vitro-Versuche bestätigt wurde und erklärt, weshalb die Wunden nach der Strumaoperation so rasch verheilen.

[*] Dr. W. Heller und Doz. Dr. F. K. Mörl
Chirurgische Klinik und Poliklinik der Universität
74 Tübingen, Calwerstraße 7

Zur Evolution allosterischer Enzyme

Von A. W. Holldorf[*]

An zahlreichen Enzymen sind in den letzten Jahren allosterische Kontrollen nachgewiesen worden. Diese wurden vorwiegend in vitro analysiert. Über die Bedeutung allosterischer Effekte in vivo liegen bisher nur wenige Beobachtungen an Mikroorganismen vor. Hier lassen sich bei Mutanten, in denen einige Enzyme ihre allosterischen Eigenschaften verloren, ihre katalytischen Fähigkeiten aber noch beibehalten haben, charakteristische Stoffwechselveränderungen nachweisen. Indirekte Aussagen über die Bedeutung allosterischer Mechanismen in vivo ergeben sich aus dem Vergleich der in vitro wirksamen Konzentrationen allosterischer Effektoren und den in vivo vorliegenden Konzentrationen an diesen Metaboliten.