

ÜBER DIE URSACHE DER SPECIESUNTERSCHIEDE IN DER DIGITALISEMPFINDLICHKEIT*

K. REPKE, M. EST† und H. J. PORTIUS

Institut für Biochemie, Deutsche Akademie der Wissenschaften zu Berlin,
Berlin-Buch, Deutschland (DDR).

(Received 23 March 1965; accepted 27 May 1965)

Abstract—The $\text{Na}^+ + \text{K}^+ + \text{Mg}^{2+}$ —dependent adenosine triphosphate phosphohydrolase system (transport ATPase) from the heart muscle of dog, cat, man (fetus), pigeon, guinea-pig, frog, rat and toad was studied. The transport ATPases of the eight species are equally strongly inhibited by calcium ions, they show, however, great variations of the susceptibility to inhibition by the cardiotonic drugs ouabain, digitoxin, cassaine and prednisolone-3,20-bis-guanyldrazone. The species variations in the inhibitory activity of these cardiotonics are not due to accidental variables or to preparative artefacts, but represent characteristics of the transport ATPases of the various animal species. The cardiotonics compared one with another, differ in the relative strength of the inhibitory effect on the enzymatic systems of various species. The complementarity between the surface of the steroid or terpenoid component of the cardiotonics on the one hand and the surface in the neighbourhood of the K^+ —centre of the transport ATPase on the other hand is presumed to be the decisive factor for the inhibitory activity of the compounds, because it appears to determine essentially the affinity between the cardiotonic and the enzyme system. Thus, the species variations in the susceptibility of the transport ATPase to inhibition might be caused by species differences in the topography of the neighbourhood of the K^+ —centre at the outer surface of the cell membrane.

The observations on the enzyme level are examined whether they offer an explanation for the species differences of the susceptibility to the therapeutic or toxic actions of ouabain, digitoxin, cassaine or prednisolone-bis-guanyldrazone. The species dependency of their effects on the enzyme system, the contractility and the intact animal is compared. The results favour the conclusion that the species variations in the susceptibility of the heart muscle and the intact animal to cardiotonics are largely based on corresponding variations in the susceptibility of the different transport ATPases to inhibition by these compounds.

SEIT der Entdeckung der relativen Digitalisresistenz‡ der Kröte durch Vulpian¹ (1855) hat es viele Arbeiten gegeben, die sich mit der Ursache der großen Unterschiede in der Digitalisempfindlichkeit der verschiedenen Tierarten beschäftigten (Literaturübersicht²). Aus den Ergebnissen unserer Untersuchungen mit Digitoxin an Mensch und Tier²⁻⁵ haben wir geschlossen, daß die Speciesunterschiede in der Digitalisemp-

*17. Mitteilung der Untersuchungen mit Herzsteroiden. 15. und 16. Mitteilung: K. REPKE und L. T. SAMUELS in *Biochemistry* 3, 685 und 689 (1964).

† Stipendiat des Fonds Boris Kidrič, jetzige Adresse: Farmakološki Inštitut, Ljubljana-5 (Jugoslawien).

‡ Mit Digitalis werden hier die cardiotonischen Steroide des Cardenolid- und Bufadienolid-Typs einschließlich ihrer Glykoside bezeichnet. Abkürzungen: ADP=Adenosindiphosphat; ATP=Adenosintriphosphat; ATPase=Adenosintriphosphat-Phosphohydrolase; Transport-ATPase= $\text{Na}^+ + \text{K}^+ + \text{Mg}^{2+}$ —abhängige ATPase; $[\text{H}_{50}]$ =Hemmstoff-Konzentration, bei der eine 50%ige Hemmung der Transport-ATPase erreicht wird. M=Mole/l.

findlichkeit nicht auf Differenzen im Stoffwechsel-Schicksal der Digitalisverbindungen zurückgehen, sondern offenbar von der Ansprechbarkeit der Digitalisrezeptoren bestimmt werden.⁴

Als Digitalisrezeptor konnten wir in der Folge das $\text{Na}^+ + \text{K}^+ + \text{Mg}^{2+}$ -abhängige Adenosintriphosphat-Phosphohydrolase-System der Zellmembran identifizieren.^{6,7} Dieses Fermentsystem bewirkt den aktiven Transport von Na^+ und K^+ durch die Zellmembran (Übersicht⁸) und wird daher im folgenden kurz als Transport-ATPase bezeichnet. Ein besonderes Charakteristikum des Transportsystems ist seine spezifische Hemmbarkeit durch cardiotonisch wirksame Digitalisverbindungen,⁹⁻¹² die wir zum Ausgangspunkt einer Hypothese über den biochemischen Wirkungsmodus von Digitalis genommen haben.¹¹ Der Schluß auf die Identität der Transport-ATPase mit einem Digitalisrezeptor gründete sich unter anderem auf unsere Feststellung, daß das Fermentsystem der *Erythrozyten*membran die zu fordernden Speciesunterschiede in der Hemmbarkeit durch Digitalis aufweist.^{13*} Auf Grund verschiedener Beobachtungen haben wir vermutet, daß der entscheidende Faktor für die Speciesunterschiede die Assoziationstendenz von Digitalismolekül und Digitalisrezeptor sein kann.^{2,5} Diese Vermutung ließ sich prüfen seit wir die Transport-ATPase auch in der Zellmembran des *Herzmuskels* gefunden haben.¹³⁻¹⁷

In der vorliegenden Arbeit berichten wir über die Ergebnisse mit Enzympräparaten aus dem Herzmuskel von Hund, Katze, menschlichem Fetus, Taube, Meerschweinchen, Frosch, Ratte und Kröte.[†] Als Digitalisvertreter haben wir *Ouabain* und *Digitoxin* gewählt, weil für diese beiden Herzglykoside ausreichend Vergleichsdaten über die physiologische Wirksamkeit bei den betreffenden Tierarten vorliegen. Wegen seiner Beziehung zum Wirkungsmechanismus von Digitalis (Übersicht¹¹) haben wir daneben auch *Calcium* auf seine Wirksamkeit als Hemmstoff für die verschiedenen Fermentpräparate untersucht. Weiter wurde *Cassain* in die Untersuchung einbezogen, nachdem wir gefunden hatten, daß die Erythrophleum-Alkaloide digitalis-ähnliche Hemmstoffe sind.^{10,12‡} Schließlich wurden noch einige Versuche mit *Prednisolon-3,20-bis-guanylhyaazon* angestellt, das eine digitalisartige Wirkung entfaltet.¹⁸⁻²⁰

Unsere Ergebnisse erlauben den Schluß, daß die Digitalisempfindlichkeit der verschiedenen Species durch die Dissoziationskonstante des Komplexes zwischen Digitalismolekül und Transport-ATPase beschrieben werden kann.

MATERIALIEN UND METHODEN

Materialien. Die benutzten Chemikalien waren bis auf die Bromide sämtlich p.a.-Ware. ATP wurde als Dinatriumsalz von den Firmen Reanal (Budapest) oder Dr. G. Henning (Berlin-West) erhalten. Bei den Versuchen haben wir ausschließlich das Tris-Salz der Adenosintriphosphorsäure benutzt, das wir durch Kationenaustausch an Wofatit CP 300 herstellten.¹⁷ Für die Bereitung aller wäßrigen Lösungen haben wir bidestilliertes Wasser benutzt, das aus einer Ganzglasapparatur stammte. Die bei der Fermentpräparation notwendigen Zentrifugationen wurden in Kunststoffbechern mit einer Kühlzentrifuge bei 0° ausgeführt. Die Niederschläge wurden mit Hilfe

* Dieser Befund ist inzwischen von H. Grobecker, U. Piechowsky und K. Greeff (Med. exp. 9, 273 (1963) bestätigt worden.

† Ein Teil der Beobachtungen ist schon kurz mitgeteilt worden.¹¹

‡ Die Hemmwirkung der Erythrophleum-Alkaloide ist inzwischen auch von S. L. Bonting, N. M. Hawkins and M. R. Canady (Biochem. Pharmacol. 13, 13 (1964) gefunden worden.

von "Plümpern" suspendiert,²¹ die sich zur raschen Herstellung homogener Suspensionen sehr bewährt haben. Die benutzten Chargen von Digitoxin, Ouabain und Cassain-bisulfat hatten sich bei papier- oder dünnschichtchromatographischer Reinheitsprüfung von 0,1 μMol als völlig oder praktisch einheitlich erwiesen.

Fermentpräparationen. Die menschlichen Feten (3.–6. Monat) wurden 2–13h nach Ausstoßung erhalten; der Zeitpunkt ihres Todes war zumeist nicht bekannt. Bei den übrigen Versuchen wurden gesunde, ausgewachsene Tiere beiderlei Geschlechts benutzt. Um ausreichende Mengen Herzmuskulatur (wenigstens 2g, in der Regel aber 10–20g) zu erhalten, wurden 2–3 Katzen, 5 Tauben, 10–15 Meerschweinchen, 15–20 Ratten oder 50–100 Frösche beziehungsweise Kröten für jede Fermentpräparation geopfert. Die Herzen wurden in Hexobarbital-Narkose (Hund, Katze) oder nach Dekapitieren (übrige Tierarten) so schnell wie möglich exzidiert und in 10mM Tris/HCl-Puffer pH 8,1 (Methode A) oder 0,15M NaCl-Lösung (Methoden B und C) auf 0° abgekühlt. Alle weiteren Arbeitsgänge wurden bei 0° durchgeführt. Für die Enzympräparation wurde ausschließlich die von anhängenden Geweben sorgfältig befreite Kammermuskulatur benutzt. Zwischen Thoraxeröffnung und Gewebshomogenisieren (siehe unten) verstrichen höchstens 15min; nur bei Frosch und Kröte wurden etwa 45min benötigt. Bei der Isolierung der Membranfraktion wurden im wesentlichen folgende 3 Methoden benutzt.

Methode A gleicht mit Ausnahme der nachfolgend beschriebenen Abweichungen dem Verfahren, das Kono und Colowick²² für die Isolierung von Zellmembranen aus dem Skelettmuskel der Ratte beschrieben haben. Die mit der Schere zerkleinerte Ventrikelmuskulatur wurde in 10mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,1) mit einem Messerhomogenisator (E. Bühler, Tübingen) homogenisiert (30sec bei höchster Tourenzahl). Nach Entfernung gröberer Partikel mit Hilfe eines feinmaschigen Perlonsiebs wurden die Muskelfibrillen des Homogenats zweimal mit 0,4M LiBr in 10mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,1) 4 beziehungsweise 3h lang extrahiert. Eine dritte Extraktion wurde mit 1M KCl-Lösung über Nacht (12–15h) durchgeführt. Nach Abtrennen der Granafraction durch Differentialzentrifugation in 25%iger KBr-Lösung wurde die erhaltene Membranfraktion durch viermaliges Waschen mit 150mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,1 oder 7,9) von Kalium befreit. Der letzte Niederschlag wurde in einem kleinen Volumen des Puffers (pH 7,9) suspendiert und mittels eines feinen Perlonsiebs von nicht pipettierfähigen Partikeln befreit. Das so gewonnene Fermentpräparat wurde bei 0° aufbewahrt.

Das beschriebene Verfahren lieferte nur beim Meerschweinchen-Myokard befriedigende Ergebnisse. Zwecks schonenderer Extraktion wurde die LiBr-Konzentration bei Katze, Taube und menschlichem Fetus auf 0,36M und bei der Kröte auf 0,3M vermindert, zugleich wurde bei Katze und Kröte das pH auf 7,9 reduziert. Weiterhin wurde die Dauer der LiBr-Extraktion bei Taube und Hund auf $2 \times 2,5\text{h}$ und bei Katze, Kröte und menschlichem Fetus auf $2 \times 2\text{h}$ herabgesetzt. Schließlich haben wir bei allen Species außer Meerschweinchen die Zahl der Waschungen der Membranfraktion von 4 auf 2 oder 1 reduziert, da bei den Waschungen teilweise ein untragbarer Aktivitätsverlust auftrat.

Methode B entspricht dem Verfahren, das McCollester²³ für die Isolierung von Zellmembranen aus dem Skelettmuskel der Ratte angegeben hat; es wurde probiert, nachdem auch die oben beschriebenen Modifikationen der Methode A nicht bei allen

Species zu befriedigenden Resultaten geführt hatten. Das Calcium, das vor dem Homogenisieren (15sec im Bühler-Gerät) zugesetzt war, suchten wir anschließend möglichst vollständig zu entfernen, indem wir bei der "Wasser"-Extraktion 5mM EDTA zusetzten. Das Verfahren insgesamt führte jedoch wegen unvollständiger Extraktion der Fibrillen nicht immer zu brauchbaren Fermentpräparaten.

Methode C sucht die Vorteile der Methoden B und A zu kombinieren. Zunächst verfahren wir so wie von McColester²³ beschrieben, reduzierten jedoch bei Katze, Hund und Ratte die Anzahl der "Wasser"-Extraktionen und ließen beim Frosch die Extraktion ganz weg. Darauf folgten je eine Extraktion mit 0,3 oder 0,36M LiBr (3–4h) und mit 1M KCl (12–15h). Abtrennung der Granafraktion sowie Waschung und Aufbewahrung der Membranfraktion wie unter A beschrieben. Das kombinierte Verfahren brachte im allgemeinen ein günstigeres Verhältnis zwischen den Aktivitäten der gesuchten Transport-ATPase (IV) und der unspezifischen ATPasen (I sowie II minus I; vergleiche Tabelle 1).

Bestimmung der ATPase-Aktivitäten. Im Regelfall wurden die von Mg^{2+} —, von $Mg^{2+} + Na^{+}$ — und von $Mg^{2+} + Na^{+} + K^{+}$ —abhängigen Aktivitäten in Parallelversuchen bestimmt (I, II oder III in Tabelle 1). Soweit nicht anders angegeben enthielten die jeweils doppelt ausgeführten Ansätze in einem Endvolumen von 2,5ml 9mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,4 bei 37°), 2mM $MgCl_2$ und 2mM TrisATP sowie teilweise zusätzlich 5mM KCl und/oder 135 mM NaCl. Bei den Versuchen mit Ca^{2+} als Hemmstoff war die Mg^{2+} — Konzentration auf 4mM erhöht, um die Bildung von CaATP zu verhindern. Die Enzymmengen waren so bemessen, daß unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht mehr als maximal 1/4 der eingesetzten Menge an ATP gespalten wurde. Digitoxin wurde in Propylenglykol gelöst zupipettiert (10 μ l/Ansatz); die übrigen Hemmstoffe wurden in wäßriger Lösung angewandt.

Die bis auf ATP kompletten Ansätze wurden zunächst 15min bei Zimmertemperatur vorinkubiert. Nach anschließendem Starten der Reaktion durch Zusatz von ATP wurde unter leichtem Schütteln 60 min bei 37° in Luftatmosphäre inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zupipettieren von 1,5ml 0,4M Trichloressigsäure unterbrochen. Die durch Zentrifugieren erhaltene eiweißfreie Lösung wurde (nach annähernder Neutralisation mit NaOH) für die Bestimmung des anorganischen Phosphats benutzt, die nach dem bei Lohmann und Langen²⁴ angegebenen Verfahren erfolgte. Die in den Versuchsansätzen gemessenen P-Werte wurden um die Blindwerte (Ansätze mit ATP ohne Ferment und mit Ferment ohne ATP) reduziert. Die Eiweißmengen wurden mit einem Biuret-Verfahren²⁵ bestimmt.

Die mit Digitalis hemmbare Transport-Aktivität (IV) wurde durch Abzug der $Mg^{2+} + Na^{+}$ —abhängigen Aktivität (II) von der $Mg^{2+} + Na^{+} + K^{+}$ —abhängigen Aktivität (III) erhalten. Da die Anwesenheit von K^{+} als Verunreinigung nicht ausgeschlossen war, wurde eine dann mögliche Transport-Aktivität in II immer durch Zusatz von 10^{-3} oder 10^{-4} M Ouabain unterdrückt. Die angegebenen Transport-Aktivitäten sind also durchweg mit den durch Digitalis hemmbaren Aktivitäten identisch. —Die für eine 50%ige Hemmung der Transport-ATPase erforderlichen Hemmstoff-Konzentrationen wurden aus den Meßwerten graphisch bestimmt (vergleiche Abbildung). Den entsprechenden Angaben in Tabelle 2 liegen in der Regel drei Konzentration/Hemmungskurven zugrunde, die mit mindestens 2 verschiedenen Enzympräparaten gewonnen waren.

TABELLE I. DIE ATPASE-AKTIVITÄTEN DER MEMBRANFRAKTION DES HERZMUSKELS VON 8 SPECIES. *

Membranfraktion aus dem Herzmuskel von	Präpara- tions- methode	Inkuba- tionstem- peratur (°C)	Mittlere Eiweißmenge pro Ansatz (mg)	Aktivität (µMole P/mg Eiweiß Stunde)		Transport- Aktivität (IV) III—II	Verhältnis der Akti- vitäten IV/II
				Mg ²⁺ (I)	Mg ²⁺ + Na ⁺ (II)	Mg ²⁺ + Na ⁺ + K ⁺ (III)	
Hund	A	37	0,30	2,11	2,36	4,00	1,64
	C	37	0,45	1,06	1,19	2,65	1,46
Katze	A	37	0,15	2,90	4,12	6,10	1,98
	C	37	0,40	0,76	1,02	1,93	0,91
Menschlicher Fetus (3.—6. Monat)	A §	37	1,50	0,06	n.u.	0,17	0,11†
	A §	37	0,50	0,55	n.u.	1,70	1,15†
Taube	A	37	0,60	0,44	0,51	1,05	0,54
Meerschweinchen	A	37	0,30	0,95	1,10	3,60	7,50
Frosch (<i>Rana temporaria</i> L.)	C	37	0,50	0,42	0,48	1,07	0,59
	C	20	0,80	0,38	0,44	0,70	0,26
Albinoratte	B	37	0,30	3,40	1,81	3,67	1,86
	C	37	0,35	1,44	1,56	2,12	0,56
Kröte (<i>Bufo bufo</i> L.)	A	37	1,10	0,36	0,40	0,73	0,33
	A	20	1,20	0,34	0,38	0,49	0,11

* Angegeben ist der Durchschnitt der Aktivitäten, die innerhalb der ersten 3 Tage nach Fermentdarstellung gemessen wurden; es sind Mittelwerte von mindestens 2, meist aber von 3 und mehr Präparationen.

§ Die Aktivitäten der untersuchten 4 Präparate waren teilweise so unterschiedlich, daß sie sich nur in 2 Gruppen zusammenfassen ließen. Die Differenzen könnten darauf zurückgehen, daß der Zeitraum zwischen dem Tod der Feten und der Darstellung des Enzyms sehr unterschiedlich waren.

† Transport-Aktivität hier III-I, da II nicht bestimmt wurde. Nach dem Ergebnis der Hemmung von III durch 100 µM Ouabain kann II-I nur weniger als 10% von I betragen haben.

n.u. = nicht untersucht.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

A. Differenzierung der ATPase-Aktivitäten.

Die Transport-ATPase, die durch ihre Abhängigkeit von Na^+ und K^+ sowie durch ihre Hemmbarkeit mit Digitalisverbindungen gekennzeichnet ist, ließ sich nicht isoliert darstellen. In den Enzympräparaten sind vielmehr noch andere ATPasen enthalten, die diese Eigenschaften nicht besitzen. Die Aktivität der Transport-ATPase (IV) wird daher im Differenzverfahren bestimmt (Tabelle 1). Die Mg^{2+} -abhängige (I) und die $\text{Mg}^{2+} + \text{Na}^+$ -abhängige (II minus I) ATPase könnten möglicherweise zum Teil bei der mechanischen Desintegration der Zellen aus der Transport-ATPase durch Entkoppeln der $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -Abhängigkeit entstanden sein (vergleiche²⁶). Andererseits spricht manches dafür, daß auch die Begleit-ATPasen in der Zelle präformiert vorliegen und in den verschiedenen Zellelementen (vor allem Zellmembran und sarkoplasmatisches Retikulum) unterschiedlich vertreten sind. Das abweichende Verhältnis der einzelnen ATPase-Aktivitäten, das in den Fermentpräparaten nach Verwendung differierender Methoden gefunden wird (Tabelle 1), würde dann auf einer unterschiedlichen Anreicherung der verschiedenen Zellpartikel in den Präparaten beruhen. — Die Aktivität der $\text{Mg}^{2+} + \text{Na}^+$ -abhängigen ATPase (II minus I in Tabelle 1) ist bei den einzelnen Species recht unterschiedlich. Sie variiert auch bei den verschiedenen Präparaten und ist bei Hund und Meerschweinchen nicht immer nachweisbar.

B. Inhibitor-Empfindlichkeit als Charakteristikum der Transport-ATPase verschiedener Herkunft.

Die Transport-ATPase der verschiedenen Species zeigt teilweise sehr große Unterschiede in ihrer Hemmbarkeit durch Ouabain, Digitoxin, Cassain oder Prednisolon-3, 20-bis-guanylhydrazon (Tabelle 2). Im Hinblick auf die Fragestellung dieser Arbeit hatten wir zu prüfen, ob diese Unterschiede Charakteristika der verschiedenen Transport-ATPasen sind. — Bei entsprechend angelegten Versuchen haben wir gefunden, daß die Effektivität der Inhibitoren nicht von der Methodik der Enzympräparation (A, B oder C), von der Menge des mit den Präparaten eingesetzten Eiweißes und der Aktivität der Präparate abhängig ist. Insbesondere wurde gesichert, daß die Hemmwirksamkeit des Ouabains durch die Aktivitätsrelation zwischen der Transport-ATPase einerseits und der Mg^{2+} -abhängigen und der $\text{Mg}^{2+} + \text{Na}^+$ -abhängigen ATPase andererseits unbeeinflusst bleibt. Die Speciesunterschiede in der Hemmbarkeit der Transport-ATPasen sind auch nicht durch Differenzen in der zeitlichen Entwicklung der Hemmung vorgetäuscht. Bei Vergleichsuntersuchungen an dem Enzym von 5 Species wurde gefunden, daß der Hemmeffekt in jedem Fall nach einstündiger Inkubation bei 37° den Endwert erreicht hat (Tabelle 3). Bei 20° allerdings hat sich die Hemmwirkung binnen 60 min an der Transport-ATPase der Kröte noch nicht voll entfaltet (Tabelle 3). Die hierbei gefundenen Hemmprozente sind trotzdem in Tabelle 2 aufgeführt, da die zum Vergleich herangezogenen physiologischen Wirksamkeiten (Tabelle 4) unter ähnlichen Bedingungen bestimmt wurden. — Für die untersuchten 5 Hemmstoffe wurde gefunden, daß die Form der Kurven unabhängig von der Herkunft (Species) der Transport-ATPase ist (vergleiche Abbildung). Das Aussehen der Kurven spricht gegen das Vorliegen eines mutual depletion system.²⁷ Die Konzentration, die zu einer 50%igen Hemmung des Ferments erforderlich ist

TABELLE 2. EMPFINDLICHKEIT DER TRANSPORT-ATPASE VON 8 SPECIES GEGENÜBER DER HEMMUNG DURCH OUABAIN, DIGITOXIN, CASSAIN, PREDNISOLON-3,20-BIS-GUANYLHYDRAZON ODER CALCIUM.

Transport-ATPase des Herzmuskels von	Tempe- ratur (°C)	Ouabain [H ₅₀] [*] μM (±S)	Empfind- lichkeit†	Digitoxin [H ₅₀] [*] μM (±S)	Empfind- lichkeit†	Cassain [H ₅₀] [*] μM (±S)	Empfind- lichkeit†	Prednisolon-bis- guanylhydrazon [H ₅₀] [*] μM (±S)	Empfind- lichkeit†	Calcium [H ₅₀] [*] mM (±S)	Empfind- lichkeit†
Hund	37	0,06 (±0,01)	10,0	0,05 (±0,01)	14,0	0,24 (±0,10)	2,1	n.u.	—	0,93 (±0,31)	1,02
Katze	37	0,13 (±0,07)	4,6	0,07 (±0,02)	10,0	0,12 (±0,05)	4,2	10 (±1)	0,025	0,68 (±0,13)	1,40
Menschlicher Fetus (3.—6. Monat)	37	0,31 (±0,14)	1,9	0,22 (±0,02)	3,2	n.u.	—	n.u.	—	n.u.	—
Taube	37	0,40 (±0,02)	1,5	0,10 (±0,02)	7,0	1,60	0,31	10	0,025	0,95	1,0
Meerschweinchen	37	0,60 (±0,08)	1,0	0,70 (±0,07)	1,0	0,50 (±0,04)	1,0	0,25 (±0,01)	1,0	0,95 (±0,34)	1,0
Frosch (<i>Rana temporaria</i> L.)	37	0,15 (±0,03)	4,0	0,13	5,4	0,38	1,3	n.u.	—	0,75	1,26
	20	0,72 (±0,12)	0,83	0,24	2,9	0,68	0,74	n.u.	—	0,32	2,97
Albinoratte	37	59 (±29)	0,01	31 (±6)	0,023	29	0,017	29 (±9)	0,009	0,50	1,90
Kröte (<i>Bufo bufo</i> L.)	37	100 (±5)	0,006	n.u.	—	30 (±6)	0,017	40	0,006	0,85 (±0,10)	1,12
	20	1800 (±910)	0,0003	n.u.	—	100 \approx ~20% Hem- mung	0,001 §	n.u.	—	0,85 (±0,15)	1,12

* Hemmstoff-Konzentration, die für die halbe Maximalhemmung erforderlich ist. S gibt die Streuung der Mittelwerte an. Wenn eine Angabe über S fehlt, liegen den [H₅₀] nur Einzelkurven zugrunde.

† Die relative Hemmstoff-Empfindlichkeit ist aus den reziproken Werten der [H₅₀] errechnet, wobei für Meerschweinchen willkürlich 1,0 gesetzt ist.

§ Hierbei sind Cassainkonzentrationen in Beziehung gesetzt, die für eine 20%ige Hemmung des Fermentsystems von Meerschweinchen und Kröte erforderlich sind.

n.u. = nicht untersucht.

[H₅₀], konnte also zur Charakterisierung der Inhibitor-Empfindlichkeit des Enzyms benutzt werden (Tabelle 2).

Schließlich war die Möglichkeit zu prüfen, ob die Digitalis-Empfindlichkeit durch die Isolierungsverfahren wesentlich verändert wird. Zu diesem Zweck haben wir den

TABELLE 3. GRÖSSE DES HEMMEFFEKTS VON K-STROPHANTHOSID ODER OUABAIN AUF DIE TRANSPORT-ATPASE VON 5 SPECIES IN ABHÄNGIGKEIT VON INKUBATIONSDAUER UND INKUBATIONSTEMPERATUR.

Transport-ATPase des Herzmuskels von	Tempe- ratur (°C)	Geprüfte Digitalisverbindung	Hemmeffekt nach 60 min (%)	90 min (%)
Meerschweinchen	37	1 µM k-Strophanthosid	50	52
Katze	37	0,1 µM Ouabain	46	47
Taube	37	1 µM Ouabain	71	77
Albinoratte	37	100 µM Ouabain	68	66
Kröte (<i>Bufo bufo</i> L.)	37	100 µM Ouabain	52	54
	20	100 µM Ouabain	30	54
		1000 µM Ouabain	54	100

Digitalis-Effekt auf die isolierte Transport-ATPase und den Kationentransport im Herzmuskel verglichen. Beide System müßten durch gleiche Digitaliskonzentrationen in annähernd gleichem Umfang gehemmt werden, wenn das Fermentsystem durch die Isolierungsprozeduren in der Digitalisempfindlichkeit nicht wesentlich verändert wird. Der Vergleich läßt sich nicht so exakt wie erwünscht durchführen, da keine

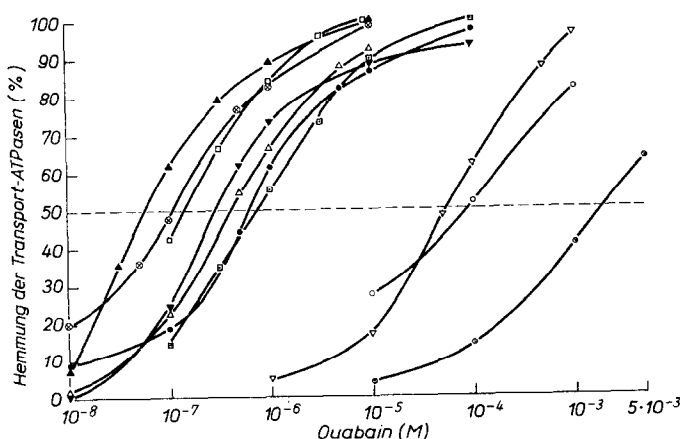


ABB. 1. Beziehung zwischen Ouabain-Konzentration und prozentualer Hemmung der Transport-ATPase aus dem Herzmuskel von 8 Species.

Enzymsysteme von: Hund (▲—▲), Katze (⊗—⊗), menschlichem Fetus (▼—▼), Taube (△—△), Meerschweinchen (●—●), Frosch bei 37° (□—□) oder bei 20° (□—□), Ratte (▽—▽) und Kröte bei 37° (○—○) oder bei 20° (○—○).

Angaben über die prozentuale Hemmung des aktiven Kationentransports durch bestimmte Digitaliskonzentrationen vorliegen.

Katze. 1,37 μM Ouabain (5mM K^+) hemmt innerhalb 60 min die Transport-ATPase des Herzmuskels zu 85%. Die gleiche Ouabain-Konzentration (4,8mM K^+) bewirkt am Papillarmuskel innerhalb 90 min neben einer Kontraktur eine beträchtliche Verminderung von $[\text{K}^+]_i$ und eine entsprechende Zunahme von $[\text{Na}]_i$ (Lee *et al.*²⁸), das heißt eine hochgradige Hemmung des aktiven Kationentransports.

Meerschweinchen. 1,0 μM Ouabain (5mM K^+) hemmt die Transport-ATPase innerhalb 60 min zu 60%. Die gleiche Ouabainkonzentration (5,9mM K^+) ruft am isolierten Ventrikel innerhalb 50 min neben einem positiv-inotropen Effekt eine deutliche Hemmung der (aktiven) K^+ -Aufnahme hervor.²⁹

Ratte. 33 μM Ouabain (5mM K^+) hemmen die Transport-ATPase innerhalb 60 min zu 40%. Die gleiche Ouabainkonzentration (5,6mM K^+) bewirkt am isolierten Ventrikel innerhalb 60 min neben einem positiv-inotropen Effekt³⁰ eine Hemmung des Kationentransport.³¹

Für die verglichenen Species mit unterschiedlicher Digitalisempfindlichkeit läßt sich also feststellen, daß durch die benutzten Ouabainkonzentrationen in jedem Fall sowohl das Enzym- wie das Transportsystem des Herzmuskels gehemmt wird. Die angeführten Beobachtungen insgesamt lassen den Schluß zu, daß die Größe des Hemmeffekts von Digitalis auf die Transport-ATPase nicht wesentlich durch die Prozeduren verändert wird, die zur Darstellung der Enzympräparate benutzt wurden.

C. Vergleich der enzyminhibitorischen und physiologischen Wirksamkeiten der verschiedenen Cardiotonika.

1. *Digitalisverbindungen.* Die Konzentrationen, die auf den Herzmuskel einen positiv-inotropen oder kontrakturierenden Effekt ausüben, entfalten gleichzeitig einen mäßigen oder starken Hemmeffekt sowohl auf den aktiven Transport von Na^+ und K^+ durch die Zellmembran^{11,32} als auch auf die Transport-ATPase.^{7,11} Der Hemmeffekt läßt sich in eine Hypothese über den biochemischen Wirkungsmodus von Digitalis integrieren.¹¹ Auf Grund dieser Zusammenhänge ist ein Vergleich zwischen den enzyminhibitorischen und physiologischen Wirksamkeiten der untersuchten Digitalisverbindungen bei den verschiedenen Species gerechtfertigt. Dieser Vergleich wurde sowohl mit Ouabain wie mit Digitoxin durchgeführt. Wir beschränken uns im wesentlichen auf die Wiedergabe der Beobachtungen mit Ouabain, da die Vergleichsdaten für Digitoxin weniger vollständig sind und im übrigen mit Digitoxin das gleiche Ergebnis wie mit Ouabain erreicht wird.

Enzym und isoliertes Herz. Die absoluten Konzentrationen, die für die Erzeugung der 50%igen Fermenthemmung, des positiv-inotropen oder des kontrakturierenden Effekts erforderlich sind, variieren in Abhängigkeit von der untersuchten Species teilweise sehr, maximal um drei Zehnerpotenzen. Vergleicht man die Speciesunterschiede in der Ouabainempfindlichkeit, dann ergibt sich für die drei Effekte im wesentlichen die gleiche Reihenfolge und teilweise auch annähernd die gleiche Relation (Tabelle 4). Die vorhandenen, verhältnismäßig geringen Abweichungen dürften sich aus folgendem erklären. Die positiv-inotrop oder kontrakturierend wirkenden Digitaliskonzentrationen sind keine fixen Größen; auch wenn die Bedingungen, insbesondere die Schlagfrequenz und die Beobachtungszeit, konstant gehalten werden, lassen sich nur Konzentrationsbereiche angeben. Die benutzten, aus der

TABELLE 4. SPECIESDIFFERENZEN DER OUBAIN-EMPFINDLICHKEIT VON TRANSPORT-ATPase, ISOLIERTEM HERZEN UND INTAKTEM TIER.

Species	Transport-ATPase		Isoliertes Herz		Intaktes Tier	
	Hemneffekt		Positiv-inotroper Effekt		Kontrakteffekt	
	[H ₅₀] (μM)	Empfindlichkeit*	Konzentration† (μM)	Empfindlichkeit*	Konzentration† (μM)	Empfindlichkeit*
Hund	0,06	10,0	0,069 ^a	8,7	0,16 ^f	2,1
Katze	0,13	4,6	0,069 ^a 0,027 ^b	8,7 22,2	0,69 ^b	2,9
Menschlicher Fetus (3.-6. Monat)	0,31	1,9	0,69 ^a	0,87		
Taube	0,40	1,5			0,25 ^g	1,3
Meerschweinchen	0,60	1,0	0,6 ^c	1,0	2,0 ^c	1,0
Frosch (<i>Rana temporaria</i> L.)	0,15 0,72	4,0 0,83			27 ^e	0,89 [†]
Albinoratte	59	0,01	30 ^d	0,02	300 ^d	0,007
Kröte (<i>Bufo bufo</i> L.)	100 1800	0,006 0,0003			2500 ^e	68,8 ^{**i}

* Reziproke Werte der Konzentrationen oder Dosen, wobei für Meerschweinchen willkürlich 1,0 gesetzt ist.

† Es sind die für einen submaximalen Effekt erforderlichen Konzentrationen angegeben, da sich hierüber mehr Angaben finden ließen.

§ Letaleffekt binnen 24 Stunden nach Injektion in den Lymphsack von Frosch oder Kröte, sonst binnen 30 Minuten bei intravenöser Infusion.

†† Rana pipiens.

** Bufo variegatus.

^a A. LOUBATIERES, *Arch. int. Pharmacodyn.* **85**, 49 (1951).^b R. D. TANZ and C. F. KERBY, *J. Pharmacol. exp. Ther.* **131**, 56 (1961).^c H. LÜLLMANN and W. HOLLAND, *J. Pharmacol. exp. Ther.* **137**, 186 (1962).^d G. GERSMEYER and W. C. HOLLAND, *Pharmacologist* **4**, 164 (1962).^e R. V. ISEKUTZ, *Arch. ges. Physiol.* **198**, 429 (1923).^f H. M. RAUEN, *Biochemisches Taschenbuch*, Seite 1035. Springer Verlag (1956).^g E. ROTHLIN und B. BIRCHER, *Ergebn. inn. Med. Kinderheilk.*, Neue Folge **5**, 457 (1954).^h W. SCHAUMANN, *Experientia* **18**, 470 (1962).ⁱ K. K. CHEN, C. C. HARGREAVES and W. T. WINCHESTER, *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.* **27**, 307 (1938).^j T. KINUKAWA, *J. exper. Med.* **22**, 314 (1933).Bei der Umrechnung der Konzentrations- oder Dosisangaben aus Gewichtseinheiten in Molaritäten wurde das Molekulargewicht von Ouabain $\times 8H_2O$ zugrunde gelegt, sofern nicht der Wassergehalt des Ouabains angegeben wurde.

Literatur entnommenen Konzentrationen wurden zudem unter ungleichen Bedingungen bestimmt und haben nach allem nur Orientierungswert.

Aus einer Durchsicht der Vergleichsdaten für Ouabain (Tabelle 4 und Abbildung) und für Digitoxin (nicht demonstriert) geht hervor, daß bei den untersuchten Species die Transport-ATPase durch positiv-inotrop wirkende Konzentrationen um etwa 30–60% und durch kontrakturierend wirkende Konzentrationen um etwa 70–90% gehemmt wird. Diese speciesunabhängige Übereinstimmung zwischen dem Grade der Enzymhemmung und der Größe des physiologischen Effekts läßt schließen, daß im Herzmuskel der einzelnen Species annähernd das gleiche Verhältnis zwischen der maximalen Aktivität der Transport-ATPase und dem physiologischen Beanspruchungsgrad des Enzymsystems vorliegt.* Wenn nämlich beispielsweise das Enzym bei einer Species geschwindigkeitsbestimmend für die Transportgröße wäre und bei einer anderen Species in 1000 fachem Überschuß vorläge, dann müßten entweder wenige Prozent oder 99,9 Prozent Enzymhemmung für die Erzielung des gleichen physiologischen Effekts erforderlich sein. Die großen Speciesdifferenzen in der Digitalisempfindlichkeit können also nicht auf entsprechenden Unterschieden in dem relativen Enzymüberschuß beruhen.

Enzym und intaktes Tier. Die $[H_{50}]$ sowie die Letaldosen von Ouabain (Tabelle 4) und Digitoxin weisen zum Teil beträchtliche, speciesabhängige Unterschiede auf. Die Digitaliswirksamkeiten auf der Enzymebene und am intakten Tier zeigen unter den einzelnen Species meist die gleiche Reihenfolge und teilweise auch vergleichbare Relationen. Die Abweichung bei der Kröte dürfte sich daraus erklären, daß die Letaldosis hier im 24-Stundenversuch, bei den zum Vergleich herangezogenen anderen Species aber im 30-Minutenversuch bestimmt wurde. Die für die Kröte angegebene Letaldosis Ouabain ist offenbar relativ zu niedrig, weil Ouabain wie andere polare Glykoside² von der Kröte nur äußerst langsam ausgeschieden wird und daher bei eintägiger Einwirkung schon in verhältnismäßig niedriger Dosis tödlich wirkt.

2. *Erythrophleum-Alkaloide.* Cassain und Coumingin wirken digitalisartig auf die Kontraktilität des Herzmuskels³³ und hemmen wie die Digitalisverbindungen den aktiven K^+ -Transport.³⁴ Da danach die Erythrophleum-Alkaloide wie Digitalis¹¹ ihre Wirkung über die Hemmung des aktiven Kationentransports entfalten können, ist es gerechtfertigt, die enzyminhibitorischen und physiologischen Wirksamkeiten der Alkaloide bei den einzelnen Species miteinander zu vergleichen.

Beurteilt nach den mittleren Letaldosen verhält sich die Empfindlichkeit gegenüber Coumingin bei Katze, Meerschweinchen und Ratte wie 1,0:1,0:0,03.³⁵ Eine ähnliche Empfindlichkeitsskala wird für Cassain an der Transport-ATPase gefunden (Tabelle 2). Nach den minimal tödlichen Dosen von Coumingin verhält sich die Empfindlichkeit von Frosch (*Rana pipiens*) und Kröte (*Bufo valliceps*) wie 1,0:0,017.³⁶ An der Transport-ATPase von *R. temporaria* und *B. bufo* wird mit Cassain bei 37° ein Empfindlichkeitsverhältnis von 1,0:0,013 gefunden. Auf beiden Vergleichsebenen ist also die Kröte weit weniger alkaloidempfindlich als der Frosch.

3. *Prednisolon-bis-guanylhydrazon.* Die Bisguanylhydrazone gewisser 3,20-Diketosteroide entfalten digitalisartige Wirkungen. Diese betreffen den Letaleffekt am intakten Tier,¹⁸ die positiv-inotrope und kontrakturierende Wirkung auf den

*Der gleiche Schluß kann aus den im vorangehenden Abschnitt gebrachten Vergleichsdaten abgeleitet werden.

Herzmuskel,^{18,37,38} die Hemmung des aktiven Kationentransports^{20,38} und die Hemmung der Transport-ATPase.^{12,20} Für Prednisolon-bis-guanyldiazon ist darüber hinaus festgestellt, daß die Größe sowohl der inotropen Wirkung auf den Herzmuskel²⁰ als auch des inhibitorischen Effekts auf die Transport-ATPase³⁹ durch Erhöhung der K^+ -Konzentration im Medium stark vermindert wird. Die Konzentrationen, des Prednisolon-Derivats, die positiv-inotrop oder kontrakturierend auf den Meerschweinchen-Vorhof wirken (0,1 oder $1,0\mu M$),⁻⁴⁰ hemmen die Transport-ATPase des Meerschweinchen-Herzmuskels zu 20 beziehungsweise 80%.

Nach allem können die Bis-guanyldiazone wie Digitalis¹¹ ihre Wirkung über die Hemmung des aktiven Kationentransports entfalten. Dies rechtfertigt einen Vergleich ihrer enzyminhibitorischen und physiologischen Wirksamkeiten bei den einzelnen Species. Bei der Bestimmung sowohl der Letaldosis am intakten Tier³⁷ als auch der $[H_{50}]$ an der Transport-ATPase (Tabelle 2) zeigt sich, daß Katze und Ratte im Vergleich zum Meerschweinchen viel weniger gegen Prednisolon-bis-guanyldiazon empfindlich sind. Die Empfindlichkeit des isolierten Vorhofs von Meerschweinchen und Ratte gegenüber Progesteron-bis-guanyldiazon verhält sich wie 1,0:0,006.³⁸ Für die beiden Transport-ATPasen wird mit dem Prednisolon-Derivat ein ähnliches Empfindlichkeitsverhältnis gefunden (Tabelle 2). Während das Fermentsystem der Katze gegen die Digitalisverbindungen und das Erythrophleum-Alkaloid empfindlicher als das des Meerschweinchens ist, verhält sich die Empfindlichkeit gegen Prednisolon-bis-guanyldiazon gerade umgekehrt. Sowohl auf der Enzymebene (Tabelle 2) als auch am isolierten Herzpräparat und intakten Tier⁴⁰ ist dieses Guanyldiazon bei der Katze um mehr als eine Zehnerpotenz weniger wirksam als beim Meerschweinchen.

4. *Calciumionen.* Ca^{2+} entfaltet eine digitalisartige Wirkung auf die Kontraktilität.³² Der Effekt kann dadurch zustande kommen, daß Ca^{2+} durch Bindung an Actomyosin die Synthese der Myofibrillen bewirkt.⁴¹ Außerdem hemmt Ca^{2+} den aktiven Kationentransport⁴² und die Transport-ATPase⁸ (Tabelle 2). Die Ca^{2+} -Wirkung auf die Kontraktilität, deren schneller Anteil sich offenbar an der Zellmembran entfaltet,⁴³ tritt weitaus früher als die Digitaliswirkung ein.³¹ Auch die Hemmung der Transport-ATPase der Zellmembran durch Ca^{2+} geht viel schneller als die durch Digitalis vor sich.⁶

Da nach allem die Möglichkeit besteht, daß an der Ca^{2+} -Wirkung auf die Kontraktilität auch dessen Hemmeffekt auf die Transport-ATPase beteiligt ist, scheint es nicht unberechtigt zu sein, die beiden Effekte in bezug auf die Speciesabhängigkeit der Ca^{2+} -Wirksamkeit zu betrachten. Beim Herzmuskel von Hund,⁴³ Meerschweinchen,⁴⁴ Ratte,³¹ Frosch und Kröte⁴⁵ sind zur Erzielung des positiv-inotropen Effekts annähernd gleiche Ca^{2+} -Konzentrationen erforderlich. In Parallele dazu zeigt auch der Hemmeffekt des Ca^{2+} auf die Transport-ATPase keine Speciesabhängigkeit (Tabelle 2). Das Enzymsystem scheint merklich Ca^{2+} -empfindlicher als der Herzmuskel zu sein, jedoch lassen sich die an beiden Objekten wirksamen Ca^{2+} -Konzentrationen nicht ohne weiteres vergleichen. Da Ca^{2+} nur von der Innenseite der Zellmembran hemmend auf den Kationentransport⁴⁶ und die Transport-ATPase (Abschnitt E 1) wirkt, hängt der Effekt am Herzmuskel von der Ca^{2+} -Aufnahme in die Zelle ab. Die Ca^{2+} -Aufnahme geht jedoch zeitlich mit der Ca^{2+} -Wirkung auf die Kontraktilität nicht parallel,⁴⁷ so daß die Ca^{2+} -Konzentration im Medium nicht mit der Wirkkonzentration identisch ist.

D. Zur Ursache der Speciesdifferenzen in der Empfindlichkeit gegen die untersuchten Cardiotonika.

Die Ergebnisse des Vergleichs zwischen den enzyminhibitorischen und physiologischen Wirksamkeiten von Digitalisverbindungen, Erythrophleum-Alkaloiden und Di-ketosteroid-bis-guanylhyaazonen begünstigen den Schluß, daß die Empfindlichkeit der verschiedenen Species gegen diese Cardiotonika von der Empfindlichkeit der jeweiligen Transport-ATPase als Rezeptorenzym⁶ abhängt. Bevor aber ein solcher Schluß gezogen werden kann, müssen alternative Erklärungsmöglichkeiten betrachtet werden.

1. *Entgiftung von Digitalis.* Bei vergleichenden Untersuchungen über die Biotransformation von Digitoxin durch 8 verschiedene Species fanden wir, daß die Entgiftungsgeschwindigkeit zwar die Wirkungsdauer, aber nicht die akute Wirksamkeit des Glykosids bestimmt.⁵ Auch bei den Aglykonen besteht keine Beziehung zwischen den Geschwindigkeiten der Biotransformation zu inaktiven Metaboliten⁴⁸ und der akuten Empfindlichkeit der untersuchten 10 Species.

2. *Aufnahme von Digitalis in den Herzmuskel.* Die Verteilungsstudien mit Digitoxin bei Mensch und Tier lassen keine artspezifischen Unterschiede in der Glykosidaufnahme des Herzens erkennen.² Für die *intrazelluläre* Verteilung von Digitoxin sind Speciesdifferenzen angenommen worden, welche die unterschiedliche Empfindlichkeit von Meerschweinchen und Ratte erklären sollen (Übersicht¹³). Der Angriffspunkt der Digitalisverbindungen liegt nun aber an der Außenseite der Zellmembran (vergleiche⁶). Die interessierende Effektivkonzentration ist danach die Digitaliskonzentration im *Extrazellulär*raum. Bei Versuchen mit isolierten Herzmuskel-Präparaten, die in einem größeren Badvolumen suspendiert sind, dürfte daher die Effektivkonzentration mit der Digitaliskonzentration im Nährmedium praktisch identisch sein, worauf die unter B und C angestellten Vergleiche beruhen.

3. *Digitaliseffekt und Kationengradient.* Die Empfindlichkeit des Transports gegenüber Digitalis scheint Kahn⁴⁹ unabhängig von der Species und der Gewebsart zu sein und nur von dem vorliegenden elektrochemischen Gradienten abzuhängen. Bei den betreffenden Hemmversuchen mit Digitalis an Erythrozyten wurde aber offenbar nur der hemmbare Umfang des Transports festgestellt. Die roten Blutzellen von Mensch, Meerschweinchen und Ratte sowie die Herzmuskel-Zellen von Hund, Katze, Mensch, Meerschweinchen, Frosch und Ratte zeichnen sich durch einen hohen K^+ - und einen niedrigen Na^+ -Gehalt aus. Unabhängig von der Übereinstimmung der Kationengradienten sind bei den genannten Species teilweise sehr große Unterschiede in der Digitalisempfindlichkeit des Kationentransports und der Transport-ATPase vorhanden (vergleiche⁵⁰ sowie Abschnitt B und Tabelle 2).

4. *Schlußfolgerungen.* Keine der diskutierten Alternativen bietet eine Erklärung für die Speciesdifferenzen in der Digitalisempfindlichkeit. Die betreffenden Faktoren scheinen auch für das Zustandekommen der Speciesunterschiede in der biologischen Wirksamkeit von Cassain und Prednisolon-bis-guanylhyaazon keine wesentliche Bedeutung zu haben, weil die an der Transport-ATPase erhobenen Befunde schon allein eine ausreichende Erklärung bieten. Die vorliegenden Beobachtungen insgesamt begünstigen daher stark den Schluß, daß die großen Speciesdifferenzen in der

Empfindlichkeit gegen die Cardiotonika auf entsprechende Unterschiede in der Hemmbarkeit der Transport-ATPase zurückgehen.

E. Chemismus der Speciesunterschiede in der Hemmbarkeit der Transport-ATPasen.

1. *Bindung an die aktiven Fermentzentren.* Die Hemmung der Transport-ATPase durch Calcium geht anscheinend darauf zurück, daß Ca^{2+} die Bindung von Natriumionen an das Na^+ -Zentrum des Fermentsystems verhindert,⁵¹ wonach Ca^{2+} an der Innenseite der Zellmembran angreift (vergleiche⁴⁶). Der angenommene Wirkungsmodus wird auch durch die Feststellung nahegelegt, daß der Hemmeffekt des Calciums durch Erhöhung der Na^+ -Konzentration vermindert wird.⁵² Bemerkenswerterweise wird die Hemmwirksamkeit der Calciumionen bei den einzelnen Species nur unwesentlich different gefunden, was wohl in einem rein ionischen Bindungs- und Hemmungsmechanismus begründet liegen dürfte.

Die Hemmwirksamkeit der *Digitalisverbindungen* und *Erythrophleum-Alkaloide* hängt von ihrer Affinität zum Fermentsystem ab.⁷ Nach unserer Vorstellung bildet der stark elektronegative Carbonylsauerstoff in der Seitenkette mit dem phosphorylierten Enzym am K^+ -Zentrum eine Wasserstoff-Brücke. Die Hemmwirkung dieser Verbindungen beruht offenbar darauf, daß sie infolge der Anheftung an das K^+ -Zentrum des Fermentsystems den Zutritt von K^+ und dadurch die K^+ -aktivierte Phosphorolyse hindern.¹² Durch Erhöhung der K^+ -Konzentration wird deren Hemmwirksamkeit beim Ferment des Meerschweinchens reduziert.⁵² Der K^+ -Antagonismus gegen die Hemmwirkung von Ouabain findet sich nun auch bei dem mehr oder minder leicht hemmbaren Enzymsystem von 3 anderen untersuchten Species (Tabelle 5), so daß er als mögliche Ursache der Speciesunterschiede ausgeschlossen scheint.

Prednisolon-3,30-bis-guanylhyaazon muß wie andere Amidinderivate⁵³ eine starke Base sein und daher bei physiologischem pH als Guanylhyaazonium-Kation vorliegen. Wegen des resultierenden starken Elektronenunterschusses können die Guanylhyaazonium-Reste nicht wie die Seitenketten der Digitalisverbindungen und

TABELLE 5. GRÖSSE DES HEMMEFFEKTS VON OUABAIN AUF DIE TRANSPORT-ATPASE VON 4 SPECIES IN ABHÄNGIGKEIT VON DER K^+ - KONZENTRATION.*

Transport-ATPase des Herzmuskels von	Ouabain (μM)	K^+ (mM)	Hemmung (%)	K^+ (mM)	Hemmung (%)
Meerschweinchen	0,50	2,5	43	25	24
	1,00	2,5	54	25	40
Hund	0,05	2,5	45	130	21
	0,10	2,5	64	130	31
Menschlicher Fetus (3.-6. Monat)	0,10	5	26	25	18
	0,50	5	67	25	54
Kröte (<i>Bufo bufo</i> L.)	100	5	25	130	22
	1000	5	53	130	40

* Als Inkubationstemperatur war mit Ausnahme des Krötenferments (27°) überall 37° benutzt worden. Die Na^+ -Konzentration war stets 136 mM.

Erythrophleum-Alkaloide¹² als Elektronendonatoren für eine H-Brückenbindung dienen. Der Hemmeffekt des Steroidderivats könnte auf einer Konkurrenz des Guanyldiazonium-Kations (Wirkgruppe) mit K^+ um das anionische K^+ -Zentrum des Fermentsystems beruhen. Die diskutierte ionische Bindung kann dann kaum die beträchtlichen Speciesunterschiede in der Hemmwirksamkeit erklären, die auch beim Prednisolonderivat gefunden werden (Tabelle 2).

2. *Bindung an die Umgebung des K^+ -Zentrums.* Die angeführten Beobachtungen und Überlegungen legen den Schluß nahe, daß die Bindung der Cardiotonika an das K^+ -Zentrum am Zustandekommen der Speciesunterschiede in der Hemmbarkeit der Transport-ATPase nicht beteiligt ist. Die betreffende Einpunkt-Anheftung der Hemmstoffe wird nach unserer Vorstellung durch eine H-Brücke beziehungsweise eine ionische Bindung hergestellt, die bekanntlich leicht beweglich oder dissoziierbar sind und daher ohne Stabilisierung durch andere Bindungskräfte nur eine sehr kurze Lebensdauer haben würden. Für die Stabilisierung ist offenbar die jeweilige Steroid- oder Diterpenoid-Komponente (Haftgruppe) der Hemmstoffe entscheidend, denn von deren Konstitution zeigt sich in hohem Grade der Hemmeffekt der verschiedenen Derivate auf die Transport-ATPase *einer* Species abhängig.¹² Zwischen der Steroidkomponente und der Umgebung des K^+ -Zentrums kann sich eine Bindung vor allem durch die London'schen Dispersionskräfte herstellen. Diese Bindung entwickelt sich nur über eine kurze Distanz und ist als einzelne Bindung sehr schwach.⁵⁴ Die London'schen Kräfte können daher die Einpunkt-Anheftung eines Hemmstoffs nur dann wesentlich stabilisieren, wenn die Beschaffenheit der Oberflächen von Hemmstoff und Umgebung des K^+ -Zentrums die Ausbildung einer Vielzahl von Bindungen erlaubt (Vielpunktanheftung). Mit anderen Worten: die Stabilität des Hemmstoff-Enzymkomplexes wird bestimmt von dem Ausmaß der Komplementarität zwischen den Oberflächen von Hemmstoff (Haftgruppe) und Umgebung des K^+ -Zentrums. Eine differente Komplementarität würde dann die großen Unterschiede im Hemmeffekt erklären, die einerseits an *einem* Enzymsystem bei Variation der Konstitution der Haftgruppe¹² und andererseits mit *einem* Hemmstoff bei Variation der Herkunft (Species) des Fermentsystems angetroffen werden.

Diese Deutung der Speciesdifferenzen findet eine Unterstützung in der Feststellung, daß die 4 Hemmstoffe, untereinander verglichen, bei den verschiedenen Species teilweise beträchtliche Differenzen in der relativen Hemmwirksamkeit zeigen (Tabelle 2). Zum Beispiel beträgt die Hemmrelation zwischen dem Enzymsystem von Meer-schweinchen und Taube beim Ouabain 1,0:0,7, beim Digitoxin 1,0:0,14, beim Cassain 1,0:3,2 und beim Prednisolon-Derivat 1,0:40,0. Nach allem ist der Schluß nicht unbegründet, daß die Speciesdifferenzen in der Hemmbarkeit der Transport-ATPase durch *einen* Hemmstoff auf Unterschieden in der Komplementarität zwischen der Umgebung des K^+ -Zentrums und dem betreffenden Hemmstoff beruhen.

Albert⁵⁴ hat schon 1951 vermutet, daß die selektive Toxizität von biologisch aktiven Substanzen auf ausgeprägten biochemischen Differenzen zwischen den verschiedenen Species beruhen müsse. In dem hier untersuchten Fall konnte vielleicht zum ersten Mal wahrscheinlich gemacht werden, daß die Speciesvariabilität in der Wirksamkeit einer biologisch aktiven Substanz auf Speciesunterschiede in der Oberflächengestalt eines Rezeptorenzyms zurückgehen kann.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird das $\text{Na}^+ + \text{K}^+ + \text{Mg}^{2+}$ -abhängige Adenosintri-phosphat-Phosphohydrolase-System (Transport-ATPase) aus dem Herzmuskel von Hund, Katze, Mensch (Fetus), Taube, Meerschweinchen, Frosch, Ratte und Kröte untersucht. Die Transport-ATPasen der acht Species werden durch Calciumionen gleichmäßig stark gehemmt, sie zeigen jedoch große Empfindlichkeitsunterschiede in der Hemmbarkeit durch die Cardiotonika Ouabain, Digitoxin, Cassain und Prednisolon-3,20-bis-guanyldiazon. Die Speciesdifferenzen in der hemmenden Wirksamkeit dieser Cardiotonika gehen nicht auf zufällige Variable oder präparative Artefakte zurück, sondern stellen Charakteristika der Transport-ATPasen der verschiedenen Tierarten dar. Die Cardiotonika, untereinander verglichen, unterscheiden sich in der relativen Stärke der Hemmwirkung auf die Enzymsysteme von verschiedenen Species. Die Komplementarität zwischen der Oberfläche der Steroid- oder Diterpenoid-Komponente der Cardiotonika einerseits und der Oberfläche in der Umgebung des K^+ -Zentrums der Transport-ATPase andererseits wird als entscheidender Faktor für die inhibitorische Wirksamkeit der Verbindungen angesehen, weil sie offenbar im wesentlichen die Affinität zwischen dem Cardiotonium und dem Enzymsystem bestimmt. Die Speciesdifferenzen in der Empfindlichkeit der Transport-ATPase gegen eine Hemmung könnten daher durch Speciesdifferenzen in der Topographie der Umgebung des K^+ -Zentrums an der äußeren Oberfläche der Zellmembran verursacht sein.

Die Beobachtungen auf der Enzymebene werden daraufhin geprüft, ob sie eine Erklärung für die Speciesdifferenzen in der Empfindlichkeit gegen die therapeutischen und toxischen Wirkungen von Ouabain, Digitoxin, Cassain oder Prednisolon-bis-guanyldiazon bieten. Zu diesem Zweck wird die Speciesabhängigkeit ihrer Effekte auf das Enzymsystem, die Kontraktilität und das intakte Tier verglichen. Letztere Daten sind aus der Literatur entnommen. Darüber hinaus werden drei andere Erklärungsmöglichkeiten erwogen. Das Ergebnis begünstigt stark den Schluß, daß die großen Speciesdifferenzen in der Empfindlichkeit des Herzmuskels und des intakten Tiers gegen die Cardiotonika hauptsächlich auf entsprechenden Unterschieden in der Empfindlichkeit der verschiedenen Transport-ATPasen gegen eine Hemmung durch diese Verbindungen beruhen.

Danksagungen—Den Herren Dr. G. Henning (Berlin-West), Dr. J. Klaffenbach (Berlin-West) und Prof. G. Kroneberg (Leverkusen) sind wir für die großzügige Überlassung von ATP, Cassain beziehungsweise Prednisolon-3,20-bis-guanyldiazon sehr zu Dank verpflichtet.

Frau S. Neumann-Atzlenbach und Frau Ch. Schlegel danken wir für verständnisvolle technische Mitarbeit.

LITERATUR

1. E. F. A. VULPIAN, *Gaz. méd. Paris* 1855, p. 559.
2. I. HERRMANN, H. J. PORTIUS und K. REPKE, *Archs exp. Path. Pharmac.* **247**, 1 (1964).
3. K. REPKE, *Archs exp. Path. Pharmac.* **233**, 271 (1958); **237**, 34 u. 155 (1959).
4. H. J. PORTIUS, I. HERRMANN und K. REPKE, *Archs exp. Path. Pharmac.* **241**, 534 (1961).
5. I. HERRMANN und K. REPKE, *Archs exp. Path. Pharmac.* **247**, 19 (1964).

6. K. REPKE und H. J. PORTIUS, *Experientia* **19**, 452 (1963).
7. K. REPKE, *Proc. 2nd Int. Pharm. Meeting. Prague 1963* Vol. 4, p. 65. Pergamon Press, Oxford (1965).
8. J. C. SKOU, *Progress in Biophysics*, Vol. 14, p. 133. Pergamon Press, Oxford (1964).
9. K. REPKE und H. J. PORTIUS, *Archs exp. Path. Pharmac.* **241**, 535 (1961).
10. K. REPKE und H. J. PORTIUS, *Archs exp. Path. Pharmac.* **245**, 59 (1963).
11. K. REPKE, *Klin. Wschr.* **42**, 157 (1964).
12. H. J. PORTIUS und K. REPKE, *Arzneimittelforsch.* **14**, 1073 (1964).
13. K. REPKE, *Proc. 1st Int. Pharm. Meeting Stockholm 1961*, Vol. 3, p. 66. Pergamon Press, Oxford (1963).
14. H. J. PORTIUS und K. REPKE, *Archs exp. Path. Pharmac.* **243**, 335 (1962).
15. H. J. PORTIUS und K. REPKE, *Archs exp. Path. Pharmac.* **245**, 62 (1963).
16. H. J. PORTIUS und K. REPKE, *Mber. Dt. Akad. Wiss.* **5**, 193 (1963).
17. H. J. PORTIUS und K. REPKE, *Acta biol. med. germ.* **11**, 829 (1963).
18. G. KRONEBERG, K. H. MEYER, E. SCHRAUFSTÄTTER, S. SCHÜTZ und K. STOEPEL, *Naturwiss.* **51**, 192 (1964).
19. A. EHMER, K. JAHR, G. KUSCHINSKY, H. LÜLLMANN, H. REUTER und U. WOLLERT, *Archs exp. Path. Pharmac.* **247**, 342 (1964).
20. K. GREEFF, H. DRANSFELD, K. MENG und D. SCHWARZMANN, *Archs exp. Path. Pharmac.* **247**, 341 (1964).
21. G. BEISENHERZ, H. J. BOLTZE, TH. BÜCHER, R. CZOK, K. A. GARDADE, E. MEYER-ARENDT und G. PFLEIDERER: *Zschr. Naturforsch.* **8b**, 555 (1953).
22. T. KONO und S. P. COLOWICK, *Archs biochem. Biophys.* **93**, 520 (1961).
23. D. L. MCCOLLESTER, *Biochim. biophys. Acta* **57**, 427 (1962).
24. K. LOHMANN und P. LANGEN, *Biochem. Z.* **328**, 1 (1956).
25. A. G. GORNALL, C. J. BARDAWILL and M. M. DAVID, *J. biol. Chem.* **177**, 751 (1949).
26. M. R. HOKIN, *Biochim. biophys. Acta* **77**, 108 (1963).
27. J. L. WEBB, *Enzyme and Metabolic Inhibitors*, Vol. I, Academic Press, New York and London (1963).
28. K. S. LEE, D. H. YU, D. I. LEE and R. BURSTEIN, *J. Pharmac. exp. Ther.* **132**, 139 (1961).
29. J. B. KAHN, E. EAKIN and D. E. LEVI, *Am. J. Physiol.* **203**, 1130 (1962).
30. M. REITER, *Archs exp. Path. Pharmac.* **227**, 300 (1956).
31. M. REITER, *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* **267**, 158 (1958).
32. G. GRUPP and A. CHARLES, *J. Pharmac. exp. Ther.* **143**, 356 (1964).
33. H. M. MALING and O. KRAYER, *J. Pharmac. exp. Ther.* **86**, 66 (1946).
34. J. B. KAHN, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **110**, 412 (1962).
35. K. K. CHEN and C. L. ROSE, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **49**, 351 (1942).
36. K. K. CHEN, C. C. HARGREAVES and W. T. WINCHESTER, *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.* **27**, 307 (1938).
37. G. KRONEBERG, K. STOEPEL, S. SCHÜTZ, K. H. MEYER und E. SCHRAUFSTÄTTER, *Archs exp. Path. Pharmac.* **247**, 339 (1964).
38. A. EHMER, K. JAHR, G. KUSCHINSKY, H. LÜLLMANN, H. REUTER und U. WOLLERT, *Archs exp. Path. Pharmac.* **248**, 521 (1964).
39. H. J. PORTIUS und K. REPKE, unveröffentlichte Beobachtung.
40. G. KRONEBERG und K. STOEPEL, *Archs exp. Path. Pharmac.* **249**, 393 (1964).
41. A. WEBER, R. HERZ and I. REISS, *Fed. Proc.* **22**, 228 (1963).
42. R. L. KLEIN and W. C. HOLLAND, *Am. J. Physiol.* **196**, 1292 (1959).
43. E. SEIFEN, W. FLACKE und M. H. ALPER, *Am. J. Physiol.* **207**, 716 (1964).
44. H. HODITZ, *Archs exp. Path. Pharmac.* **244**, 531 (1963).
45. B. v. ISSEKUTZ, *Archs ges. Physiol.* **198**, 429 (1923).
46. J. F. HOFFMANN, *Circulation* **26**, 1201 (1962).
47. A. FARAH and P. N. WITT, *Proc. 1st Int. Pharm. Meeting Stockholm 1961*, Vol. 3, p. 137. Pergamon Press, Oxford (1963).
48. I. HERRMANN und K. REPKE, *Archs exp. Path. Pharmac.* **248**, 351 (1964).
49. J. B. KAHN, *Proc. 1st Int. Pharm. Meeting Stockholm 1961*, Vol. 3, p. 111. Pergamon Press, Oxford (1963).
50. H. J. PORTIUS und K. REPKE, *Folia haematol.*, im Druck (1965).

51. J. JÄRNEFELT and L. V. VON STEDINGK, *Acta physiol. scand.* **57**, 328 (1963).
52. K. REPKE, *II. Conferentia Hungarica Pro Therapia Et Investigatione In Pharmacologia*, Budapest 1962, pp. 300. Publishing House of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest (1964).
53. F. N. FASTIER, *Pharmacol. Rev.* **14**, 37 (1962).
54. A. ALBERT, *Selective Toxicity with Special Reference to Chemotherapy*. Methuen, London (1951)