

## DIE WIRKUNG VON g-STROPHANTIN AUF DEN GLYZINTRANSPORT IN EHRLICH-ASCITES-TUMORZELLEN\*

J. BITTNER UND E. HEINZ

*Institut für vegetative Physiologie der Universität Frankfurt/Main (Deutschland)*

(Eingegangen am 5. Oktober, 1962)

### SUMMARY

*The influence of g-strophantin on the glycine transport in Ehrlich ascites tumor cells*

It has been shown that the transport of glycine is inhibited by g-strophantin (Ouabain). This inhibition is accompanied by a reduction of the cellular potassium level but appears to be independent of this reduction. The glycine transport is inhibited by 50 % at  $2.5 \cdot 10^{-4}$  M g-strophantin. The inhibition is very weak in the beginning, but contrary to the inhibition by 2,4-dinitrophenol, it starts immediately. After 10 min it is about 50 % and it reaches its maximum of more than 80 % after several hours. Cellular respiration is not affected by  $1 \cdot 10^{-3}$  M g-strophantin. During the inhibition the influx of glycine is reduced and its efflux is increased. The inhibition of the influx by g-strophantin does not seem to be competitive. The increase in efflux is apparently not due to an increase of the passive permeability of the cellular membrane, since the uptake of thiourea and of D-ribose, which appear to enter these cells passively, is not accelerated by g-strophantin.

### EINLEITUNG

Bereits 1953 berichtete SCHATZMANN<sup>1</sup>, dass Herzglycoside die Aufnahme von Kalium durch Erythrozyten, die zuvor in der Kälte an Kalium verarmt worden waren, hemmen. Später wurde gefunden, dass die Akkumulation von Kalium in den Erythrozyten ATP benötigt<sup>2</sup>. In Erythrozytenmembranen wurde schliesslich eine durch Natrium und Kalium aktivierbare ATPase nachgewiesen<sup>3</sup>, deren Aktivität ähnlich wie die der Ionenpumpen durch g-Strophantin gehemmt wird. Die hemmende Wirkung der Herzglycoside wurde inzwischen auch bei anderen Gewebszellen, die Alkali-Ionen aktiv transportieren, bestätigt. Auch die Wirkung der Herzglycoside auf Transportsysteme für andere Ionen ist untersucht worden. So hemmt Strophantidin an der Magenschleimhaut von *Rana catesbeiana*<sup>4</sup> die Sekretion von H- und Cl-Ionen. Dagegen schien g-Strophantin in weiten Konzentrationsbereichen die Aufnahme von Aminosäuren in Ehrlich-Asciteszellen nicht zu beeinflussen<sup>5</sup>. Nach neueren Versuchen, über die in der vorliegenden Arbeit berichtet wird, vermag jedoch g-Strophantin in höherer Dosis und bei genügend langer Einwirkungszeit auch dieses Transportsystem zu hemmen.

\* This work was supported by the National Science Foundation (NSF-G-10812) and (NSF-G-22107) and reported in part on the Tagung der Deut. Ges. Physiol. Chem., Wien, Sept. 1962.

## METHODIK

Weisse männliche Mäuse, 20–24 g schwer, wurden mit 0.2 ml Ascites geimpft. Nach 8 Tagen wurde bei den in Äthernarkose getöteten Tieren die Ascitesflüssigkeit mit einer Spritze der intakten Peritonealhöhle direkt entnommen und mit 0.5 mg Heparin pro 100 ml Ascites und 5 ml isotonem Puffer vermischt. Nach Filtration durch Perlóngewebe wurde bei Zimmertemperatur zentrifugiert. Am Boden des Zentrifugen-glaes sichtbare Erythrozyten wurden durch eine Glaskapillare abgesaugt. Die Zellen wurden resuspendiert in Krebs–Ringer-Bicarbonat-Puffer (KRB-Puffer), dem zur Verhinderung der Zellflockung 1 % ungereinigtes Albumin zugesetzt worden war<sup>6</sup>. Nach Inkubation einer Asciteszellsuspension von 1:3 in KRB-Puffer mit 15 mM Kalium wurden g-Strophantin-enthaltende KRB-Pufferlösungen zugegeben, wobei sich das Verhältnis von Zellen zum Medium auf 1:9 veränderte. Ausserdem wurden Glyzin und Thioharnstoff (Merck), D-Ribose (Hoffmann-La Roche, Grenzach), [<sup>1</sup>-<sup>14</sup>C]-Glyzin (Amersham, England) sowie [<sup>14</sup>C]Thioharnstoff (Kernreaktor, Karlsruhe) als Zusätze verwendet. Nach Beendigung der Inkubation bei 37° wurde der Transport durch die Zellmembran durch rasches Abkühlen (15 Sek in einem Eisbad von –5°) gestoppt und die Suspensionen in einer Kühlzentrifuge bei 2000 × g 7 Min lang zentrifugiert. Die vom Überstand befreiten Zellen wurden feucht gewogen. Zur Trockengewichtsbestimmung wurden die Zellen gefroren und im Vakuum über Silicagel getrocknet. Zur Extraktion der löslichen Bestandteile wurden die trockenen Zellen in 2/3 gesättigter Pikrinsäure suspendiert und in Glasröhrchen mit eingeschliffenem Stempel zermahlen. Der Überstand wurde bei der gleichen Pikrinsäurekonzentration enteiweisst. Die Radioaktivität von Medium und Zellextrakt wurde mit Hilfe eines Methandurchflusszählers (Frieske u. Hoepfner, Erlangen) ermittelt. Das Gesamtglyzin wurde nach der Methode von KRUEGER<sup>7</sup> und die D-Ribose nach ROE<sup>8</sup> bestimmt. Die Kaliumkonzentrationen wurden am Flammenphotometer Eppendorf (Netheler u. Hinz, Hamburg) gemessen. Die Messergebnisse wurden nach früher entwickelten Gleichungen<sup>9, 10</sup> ausgewertet.

## ERGEBNISSE

g-Strophantin in hohen Dosen hemmt bei Asciteszellen nach genügend langer Einwirkungszeit nicht nur den Kaliumtransport, wie bereits von MAIZELS *et al.*<sup>11</sup> gefunden worden ist, sondern auch deutlich den aktiven Glyzintransport (Tabelle I). Der aktive Glyzintransport ist bereits zu 50 % gehemmt, während der Kaliumgehalt der Zellen noch über 100 mequiv/l beträgt. Da das Glykokoll bei dieser Kaliumkonzentration noch normal transportiert wird, scheint das g-Strophantin auf den Glyzintransport nicht über den Kaliumtransport zu wirken.

*Die Abhängigkeit der Wirkung von der Einwirkungszeit und Konzentration des Glycosids*

Bereits wenige Minuten nach Zusatz von g-Strophantin sinkt der Influx des Glyzins (Tabelle II; 1,2). In 1 wurde g-Strophantin nicht, in 2 gleichzeitig mit dem Glyzin zugesetzt. Die Inkubation dauerte in allen Fällen 2 Min.

Fig. 1 zeigt, dass g-Strophantin die steady-state Verteilung des Glyzins nach 10 Min um etwa 50 % senkt. Auch die Nettoaufnahme des Glyzins (Tabelle III) wird durch g-Strophantin nach 10 Min um etwa 50 % gehemmt.

TABELLE I

## ERNIEDRIGUNG DER GLYZIN-AKKUMULATION DURCH g-STROPHANTIN

Nach Vorbehandlung der Asciteszellsuspensionen mit g-Strophantin für 60 Min wurde Glyzin ( $1.9 \text{ mM}$ ) zugesetzt. Nach weiteren 60 Min wurde dann der Glyzinverteilungsquotient für [ $\text{I}^{14}\text{C}$ ]-Glyzin errechnet ( $R_a = \frac{\text{Impulse/ml Zellwasser}}{\text{Impulse/ml Medium}}$ ).  $[K^+]c$  = Kaliumgehalt pro Liter Zellwasser.

Nr.	g-Strophantin (M)	$R_a(\text{Gly})$	$[K^+]c$ (mequiv/l)
1	—	17.86	152.72
2	$5.0 \cdot 10^{-5}$	12.49	128.05
3	$1.0 \cdot 10^{-4}$	8.14	119.95
4	$5.0 \cdot 10^{-4}$	5.11	79.50

TABELLE II

## BEGINN DER HEMMUNG DER GLYZIN-AKKUMULATION NACH DER ZUGABE VON g-STROPHANTIN

Nach der Vorinkubation wurde 2 Min mit Glyzin ( $2.96 \text{ mM}$ ) inkubiert und der relative Influx für [ $\text{I}^{14}\text{C}$ ]Glyzin sowie der Kaliumgehalt der Zellen bestimmt. Es wurde  $6.47 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  g-Strophantin zugesetzt.

Nr.	Vorinkubation mit g-Strophantin (Min)	rel. Influx (Gly) (ml/gTG $\times$ 2 Min)	$[K^+]c$ (mequiv/l)
1	—	16.93	144.11
2	0	13.72	135.16
3	6	11.62	130.47
4	12	10.59	118.92
5	18	10.25	119.70
6	24	9.30	114.60
7	30	8.81	117.99

TABELLE III

## ZUNAHME DER HEMMUNG DER GLYZIN-AKKUMULATION MIT DER ZEIT

Nach Vorbehandlung der Zellsuspensionen mit g-Strophantin ( $7.20 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ) für 170-0 Min vor der Glyzinzugabe wurde die Inkubation mit Glyzin ( $2.24 \text{ mM}$ ) für 10 Min durchgeführt. Danach wurde der Verteilungsquotient für [ $\text{I}^{14}\text{C}$ ]Glyzin und der Kaliumgehalt pro Liter Zellwasser bestimmt.

Einwirkungszeit von g-Strophantin (Min)	$R_a(\text{Gly})$	Wirkung von g-Strophantin (%)
—	17.50	—
10	8.61	50.8
15	7.63	56.4
30	5.97	65.9
45	4.89	72.1
60	4.42	74.7
120	3.09	82.3
180	2.91	83.4

Die Atmung der Zellen wird durch  $1.0 \cdot 10^{-3}$  M g-Strophantin nicht beeinträchtigt (Tabelle IV).

Die Konzentration für 50 % Hemmung des Glyzintransports liegt bei  $2.5 \cdot 10^{-4}$  M (Fig. 2) und ist demnach höher als bei Erythrozyten<sup>3</sup> und anderen Geweben<sup>12</sup>.

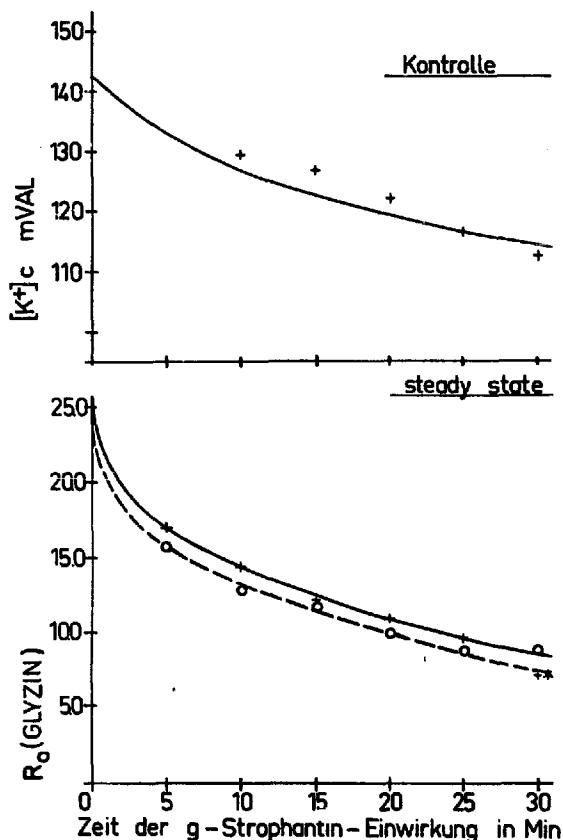


Fig. 1. Die Zellsuspensionen wurden mit 2.7 mM Glyzin 20 Min vorinkubiert, um annähernd einen steady state für Glyzin zu erreichen. Danach wurde im 5-Min-Abstand 30-5 Min vor Beendigung des Versuchs g-Strophantin ( $7.6 \cdot 10^{-4}$  M) zugegeben. Es wurde dann eine Erniedrigung des ursprünglich eingestellten steady state gemessen (ausgedrückt als Verteilungsquotient von Glyzin,  $R_d$ ). +—+, Gesamtglyzin, O—O, [<sup>14</sup>C]Glyzin.

### Hemmung und unidirektionale Fluxe des Glyzins

Eine Auswertung der zeitlichen Aufnahmekurve (Fig. 3) nach der früher beschriebenen Methode<sup>9, 10</sup> ergibt, dass g-Strophantin den Influx für Glyzin vermindert und den Efflux erhöht (Tabelle V). Beide Wirkungen vermindern die Akkumulation von Glyzin in den Zellen. Nach früheren Untersuchungen spricht die Erniedrigung des Influx' für eine Hemmung des energieabhängigen Transportvorgangs<sup>9, 10</sup>.

### Typ der Hemmung des Glyzininflux'

Der Glyzininflux folgt der Michaelis-Menten-Gleichung<sup>9, 10</sup>. Die Aufnahmerate der Glyzinaktivität während der ersten 2 Min entspricht etwa dem Glyzininflux, da der Efflux in diesem Stadium noch nicht nennenswert ins Gewicht fällt. Die Auswertung nach Lineweaver und Burk von 2 Experimenten, von denen eins in Fig. 4 wiedergegeben ist, lassen g-Strophantin als nicht-kompetitiven Hemmstoff erscheinen.

### Untersuchung der passiven Durchlässigkeit der Zellmembran

Das Detergens Tween 22 erhöht bereits in geringen Konzentrationen die passive Durchlässigkeit der Zellmembran (unveröffentlichte Befunde). Da auch die Herzglycoside auf Grund ihrer Struktur Detergens-Eigenschaften besitzen, ist auszuschliessen, dass die geschilderte Hemmung der Glykokollaufnahme—insbesondere die Erhöhung des Efflux'—durch g-Strophanthin auf einer derartigen Detergenswir-

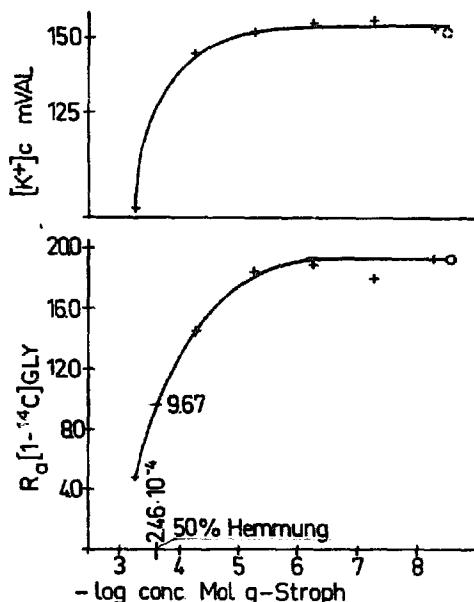


Fig. 2. Asciteszellsuspensionen wurden 30 Min mit verschiedenen Konzentrationen von g-Strophanthin ( $7.35 \cdot 10^{-4}$  bis  $7.35 \cdot 10^{-8}$  M) und inaktivem Glyzin (3.09 mM) vorinkubiert. Danach wurde die Inkubation für 15 Min unter dem Zusatz von [ $1-^{14}\text{C}$ ]Glyzin durchgeführt. Es erfolgte die Messung des Verteilungsquotienten für [ $1-^{14}\text{C}$ ]Glyzin und des Kalium-Gehaltes der Zellen. (Bei einer Vorinkubation mit g-Strophanthin über 120 Min wurde die Dosis für 50 % Hemmung nicht erniedrigt.) ○, Kontrolle.

TABELLE IV  
DIE ATMUNG IN GEGENWART VON g-STROPHANTIN

Nr.	g-Strophanthin (M)	$\mu\text{Mol O}_2/\text{gTG} \times h$
1	—	-326.46
2	$1 \cdot 10^{-3}$	-323.39

TABELLE V  
DIE WIRKUNG VON g-STROPHANTIN AUF DEN UNIDIREKTIONALEN INFLUX (KIN)  
UND DEN EFFLUX (KEX) VON GLYZIN

Experiment Nr.	g-Strophanthin (M)	$R_a$ (Gly) (steady state)	$[K^+]_c$ (mequiv/l)	$k_{in}$	$k_{ex}$
1	—	21.07	131.55	6.66	0.32
	$6.94 \cdot 10^{-4}$	6.91	96.92	3.67	0.53
2	—	18.21	130.27	8.63	0.474
	$7.40 \cdot 10^{-4}$	4.14	77.07	5.05	1.22

kung beruht, zumal da g-Strophantin in höheren Konzentrationen als bisher verwendet wurde. Eine unspezifische Erhöhung der passiven Durchlässigkeit der Zellmembran würde sich voraussichtlich auch auf den Durchtritt von nicht-aktiv transportierten hydrophilen Stoffen auswirken. Daher untersuchten wir die Wirkung des g-Strophantins auf die Penetration von Thioharnstoff, der anscheinend von der Zellmembran nicht aktiv transportiert wird. Thioharnstoff wird von normalen Zellen

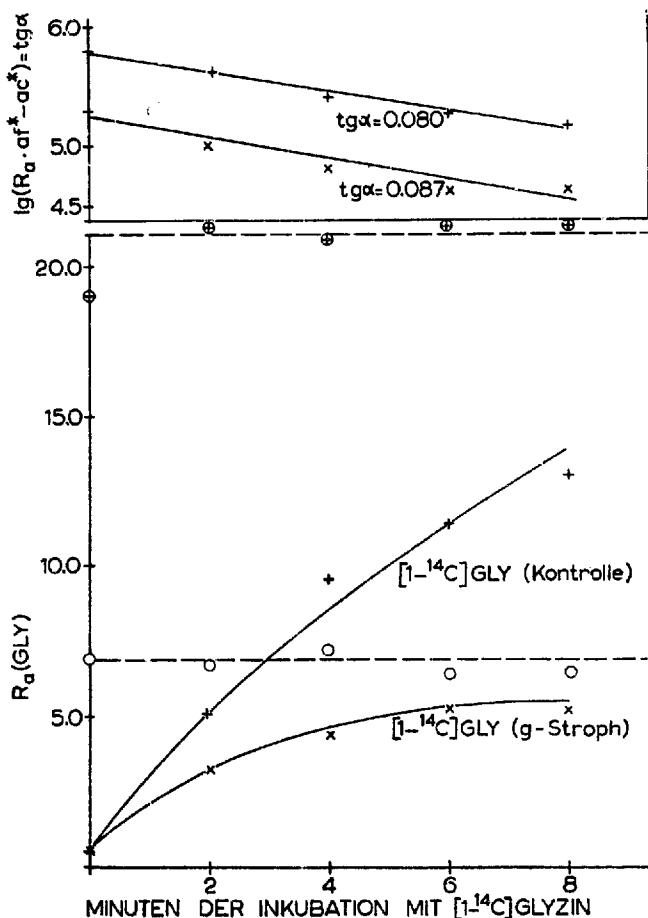


Fig. 3. Vorinkubation mit inaktivem Glyzin (2.4 mM) und mit und ohne Zusatz von g-Strophantin ( $6.94 \cdot 10^{-4}$  M) zur Erreichung eines steady state für Glyzin. Danach wurde 8-o Min vor Versuchsende [ $1-^{14}\text{C}$ ]Glyzin zugegeben.  $\oplus$  und  $\circ$ ,  $R_a$  für Gesamtglyzin.

#### TABELLE VI

##### AUFGNAHME VON [ $^{14}\text{C}$ ]THIOHARNSTOFF IN GEGENWART VON g-STROPHANTIN

Nach Vorbehandlung mit g-Strophantin ( $7.3 \cdot 10^{-4}$  M) und ohne g-Strophantin 30 Min bei  $37^\circ$  wurde die Thioharnstoffaufnahme aus einer 2.37 mM Lösung bei  $20^\circ$  gemessen.

Inkubation (Min)	$R_a(^{14}\text{C})\text{Thioharnstoff}$	
	—	Mit g-Strophantin
1	0.60	0.61
3	0.98	0.99
5	1.13	1.10
7	1.12	1.09

bei  $37^\circ$  fast ebenso schnell aufgenommen wie Harnstoff und erreicht bereits nach einer Minute das Verteilungsgleichgewicht. Bei  $20^\circ$  wird das Verteilungsgleichgewicht jedoch erst nach etwa 5 Min Inkubation erreicht. Tabelle VI zeigt, dass die Aufnahmgeschwindigkeit von Thioharnstoff bei  $20^\circ$  durch g-Strophantin nicht signifikant verändert wird.

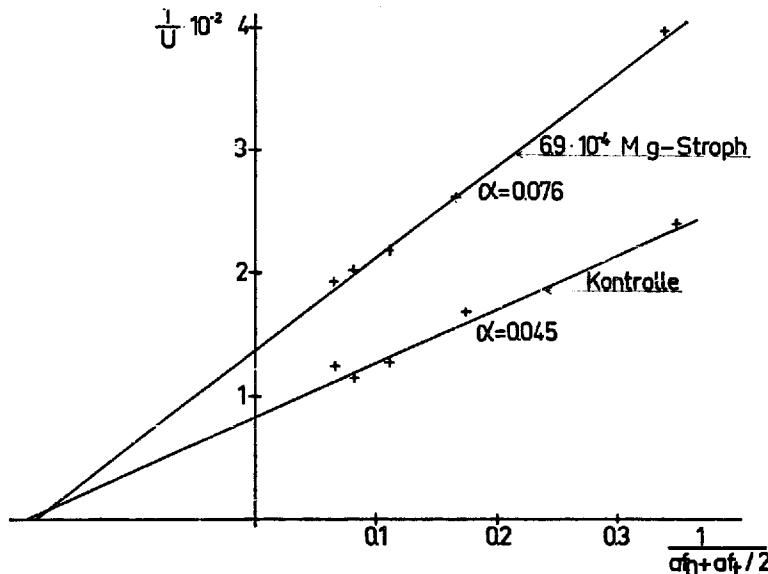


Fig. 4. Nach einer Vorinkubation von 30 Min mit und ohne g-Strophantin wurde der Glyzininflux nach 2 Min gemessen. Es wurden etwa 3–16 mM Glyzin zugesetzt.

Die D-Ribose tritt anscheinend durch erleichterte Diffusion in die Zelle ein. Das Verteilungsgleichgewicht wird bei  $20^\circ$  erst nach etwa 15 Min erreicht. Tabelle VII zeigt, dass auch die Aufnahme von D-Ribose durch Zusatz von g-Strophantin in Konzentrationen, die den Glyzintransport deutlich hemmen, nicht beeinflusst wird. Die Ergebnisse mit Thioharnstoff und D-Ribose sprechen dafür, dass g-Strophantin die passive Permeabilität der Zellmembran für freie und erleichterte Diffusion nicht nennenswert verändert. Die Erhöhung des Glyzinefflux' durch g-Strophantin scheint demnach nicht auf einer unspezifischen Vergrösserung der Membranpermeabilität zu beruhen.

#### TABELLE VII

##### AUFNAHME VON D-RIBOSE IN GEGENWART VON g STROPHANTIN

Nach Vorbehandlung mit g-Strophantin ( $7.46 \cdot 10^{-4}$  M) und ohne g-Strophantin bei  $37^\circ$  wurde bei  $20^\circ$  37.1 mM D-Ribose zugesetzt und 20 Min inkubiert. Die Kaliumbestimmung in den Zellen ergab dass nur etwa 75 % der D-Ribose extrahiert worden war.

Inkubation (Min)	$R_a$ (D-Ribose)	
	—	Mit g-Strophantin
5	0.38	0.41
10	0.59	0.60
15	0.73	0.74
20	0.74	0.73

## DISKUSSION

In früheren Versuchen ist gezeigt worden, dass g-Strophantin in Konzentrationen, die in anderen Systemen den Alkali-Ionentransport bereits deutlich hemmen, die Aufnahme von Aminosäuren durch Ehrlich-Ascites-Tumorzellen nicht nennenswert beeinflusst<sup>5</sup>. In neueren Versuchen fanden wir dagegen, dass g-Strophantin in höherer Konzentration und bei genügend langer Einwirkungszeit den Glyzintransport hemmt. Vermutlich folgt die Hemmung des Glyzintransports nicht sekundär aus der Veränderung des Zell-Kaliums, denn der Glyzintransport ist bereits beträchtlich gehemmt, bevor das zelluläre Kalium unter 100 mequiv/l abgesunken ist. Bei dieser Kaliumkonzentration sollte nach unseren früheren Ergebnissen<sup>13</sup> der Glyzintransport noch normal funktionieren. Die Strophantinwirkung setzt zwar unverzüglich ein, ist aber zunächst schwach und erreicht ihr Maximum erst nach mehreren Stunden. Im Gegensatz dazu ist das Stoffwechselgift 2,4-Dinitrophenol ( $7.5 \cdot 10^{-4}$  M) in den ersten 10 Min auf den Glyzintransport völlig unwirksam (unveröffentlichte Befunde). Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass das Dinitrophenol erst hemmt, nachdem die Reserven der Zelle an energiereichen Phosphaten entsprechend vermindert sind, während das Strophantin am Transportmechanismus direkt angreift. Der Beweis dieser Annahme erfordert jedoch eine genaue Untersuchung der Permeabilität der Zellmembran für die beiden Hemmstoffe. Das g-Strophantin scheint den Influx zu erniedrigen und den Efflux zu erhöhen. Eine kinetische Analyse spricht für einen nicht-kompetitiven Typ sowohl der g-Strophantin- als auch der 2,4-Dinitrophenolhemmung. Das g-Strophantin scheint den energieabhängigen aktiven Transport oder ein für diesen Vorgang essentielles Enzym zu hemmen, ohne die passive Permeabilität der Zellmembran nennenswert zu verändern. Dafür spricht, dass weder die Permeabilität für Thioharnstoff, der passiv in die Zelle eindringt, noch die für D-Ribose, die wahrscheinlich auf dem Wege erleichterter Diffusion in die Zelle hineinkommt, durch g-Strophantin erhöht wird. Obwohl die vorliegenden Befunde einen direkten Angriff des g-Strophantins am Transportmechanismus für Glyzin vermuten lassen, sagen sie noch nichts über den genauen Mechanismus der Hemmwirkung aus. Ebenso wenig ist zu entscheiden, ob das g-Strophantin — ähnlich wie bei den Alkalitransporten — über die Inaktivierung einer am Glyzintransport massgeblich beteiligten ATPase wirkt.

## ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde eine Hemmung des Glyzintransports durch g-Strophantin nachgewiesen. Sie geht einher mit einer Verminderung des Zell-Kaliums, ist aber anscheinend von dieser unabhängig. Die Konzentration für 50 % Hemmung des Glyzintransports liegt bei  $2.5 \cdot 10^{-4}$  M. Die Hemmung setzt anfangs schwach, aber im Gegensatz zu der durch 2,4-Dinitrophenol unverzüglich ein. Sie erreicht nach 10 Min etwa 50 % und nach mehreren Stunden ein Maximum von über 80 %. Die Zellatmung wird durch  $1 \cdot 10^{-3}$  M g-Strophantin nicht beeinträchtigt.

Bei der Hemmung ist der Influx vermindert und der Efflux erhöht. Die Hemmung des Influx' durch g-Strophantin scheint nicht kompetitiv zu sein. Die Erhöhung des Efflux' beruht wahrscheinlich nicht auf einer unspezifischen Erhöhung der passiven Durchlässigkeit der Zellmembran, da die Aufnahme der passiv transportierten Substrate Thioharnstoff und D-Ribose in Asciteszellen durch g-Strophantin nicht beschleunigt wird.

## DANK

Bei den Untersuchungen leistete B. PFEIFFER wertvolle technische Mitarbeit.

## LITERATUR

- <sup>1</sup> H. J. SCHATZMANN, *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*, 11 (1953) 346.
- <sup>2</sup> J. F. HOFFMANN, *Federation Proc.*, 19 (1960) 127.
- <sup>3</sup> R. L. POST, C. R. MERRIT, C. R. KINSOLVING AND C. D. ALBRIGHT, *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 1796.
- <sup>4</sup> J. L. COOPERSTEIN, *Gen. Physiol.*, 42 (1959) 1233.
- <sup>5</sup> C. M. PAYNE AND E. HEINZ, *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 1080.
- <sup>6</sup> M. MAIZELS, M. REMINGTON AND R. TRUSCOE, *J. Physiol. (London)*, 140 (1958) 48.
- <sup>7</sup> R. KRUEGER, *Helv. Chim. Acta*, 32 (1949) 238.
- <sup>8</sup> J. H. ROE, *J. Biol. Chem.*, 173 (1948) 507.
- <sup>9</sup> E. HEINZ, *J. Biol. Chem.*, 211 (1954) 781.
- <sup>10</sup> E. HEINZ, *J. Biol. Chem.*, 225 (1957) 305.
- <sup>11</sup> M. MAIZELS, M. REMINGTON AND R. TRUSCOE, *J. Physiol. (London)*, 140 (1958) 61.
- <sup>12</sup> J. C. SKOU, *Biochim. Biophys. Acta*, 35 (1962) 314.
- <sup>13</sup> E. HEINZ, *Colloq. Ges. Physiol. Chem.*, 12 (1961) 182.

*Biochim. Biophys. Acta*, 74 (1963) 392-400