

## Über den Einfluss von Alkali-Ionen auf den Glycintransport in EHRLICH-Ascites-Tumorzellen\*

CHRISTENSEN und Mitarbeiter<sup>2</sup> berichteten, dass die Anreicherung von Glycin in EHRLICH'schen Mäuse-Ascites-Tumorzellen von der Konzentration des extracellulären Kaliums abhängt. Sie wird sowohl bei starker Verminderung als auch bei Erhöhung der Kaliumkonzentration über den normalen Bereich hinaus gehemmt. Später fanden die Autoren die Glycinaufnahme dieser Zellen auch bei Verminderung des intracellulären Kaliums gestört<sup>3</sup>. Sie schlossen daraus, dass der Glycintransport in diese Zellen eine Funktion des Verteilungsverhältnisses von intra- und extracellulärem Kalium sei und stellten eine Hypothese auf, nach der der aktive Glycintransport direkt energetisch mit dem passiven Ausstrom des Kaliums gekoppelt sein sollte.

Bei unseren Untersuchungen gingen wir von der Vorstellung aus, dass zwei gegenläufige Stoffbewegungen theoretisch auf verschiedene Art und Weise gekoppelt sein können. Eine echte energetische Kopplung, bei der das Energiegefälle der Kaliumverteilung direkt für die Glycinanreicherung verwertet werden soll, ist nur dadurch möglich, dass das Glycin auf der Innenseite der transportierenden Membran durch die in hoher Konzentration vorliegenden Kalium-Ionen vom transportierenden System kompetitiv verdrängt wird. Dies würde den Glycin-Efflux erniedrigen und somit die Netto-Glycinaufnahme erhöhen, während der Glycin-Influx primär nicht beeinflusst würde. Diese Verdrängung muss ferner reziprok sein, indem nicht nur der Rückstrom des Glycins durch Kalium, sondern umgekehrt auch der Ausstrom des Kaliums durch Glycin in entsprechend hoher Konzentration gehemmt wird; d.h. der Efflux des Kaliums muss durch Erhöhung des intracellulären Glycins unterdrückt werden.

Unsere mit der früher beschriebenen Methode<sup>4,5</sup> durchgeführten Versuche ergaben aber, dass der Kalium-Efflux von der intracellulären Glycinkonzentration in weiten Grenzen nicht beeinträchtigt wird<sup>1</sup>. Dieser Befund spricht gegen die angenommene energetische Kopplung zwischen Kalium-Ausstrom und Glycintransport.

Eine andere Art der Kopplung zwischen den beiden Vorgängen ist auf die Weise denkbar, dass der Ausstrom des Kaliums die Reaktivierung des Transportmechanismus' für Glycin beschleunigt. Dies könnte u.a. dadurch geschehen, dass das Kalium sich beim Ausstrom mit dem inaktiven, unbeladenen Glycin-Carrier verbindet, ähnlich wie es beim Preloading-Effekt zwischen Glycin und verwandten Aminosäuren angenommen wird<sup>4,5</sup>; oder aber das Kalium würde auf eine andere Weise fördernd eine für den Glycintransport essentielle Reaktion beeinflussen. Diese Art der Kopplung durch Reaktivierung des Transportmechanismus' ist aber offensichtlich nicht energetisch, sondern katalytisch, denn hierbei muss die Energie für die Anreicherung des Glycins aus einer anderen Quelle als derjenigen der Kaliumverteilung stammen. Im Gegensatz zur energetischen Kopplung sind hier Konkurrenzerscheinungen zwischen Kalium und Glycin beim Ausstrom nicht notwendig, jedoch sollte man erwarten, dass der einseitsgerichtete Influx des Glycins durch Verminderung des intracellulären Kaliums herabgesetzt würde. Wir untersuchten dies an Zellen, die durch Vorbehandlung in einem Medium mit 1.2 mM Kalium einen grossen Teil ihres Kaliums verloren und durch Natrium ersetzt hatten. Das Ergebnis war

\* Ein Teil der Ergebnisse wurde bereits in vorläufiger Form mitgeteilt<sup>1</sup>.

negativ, denn wie Tabelle I zeigt, ist der Influx des Glycins bei beträchtlicher Verminderung des intracellulären Kaliums gegenüber der Kontrolle praktisch unverändert. Dieser Befund ist mit der Annahme einer wirksamen katalytischen Kopplung zwischen Kalium-Ausstrom und Glycintransport schwer vereinbar.

TABELLE I

GLYCIN-INFLUX BEI VARIERTEM INTRACELLULÄREM NATRIUM UND KALIUM

$[Na^+](mM)$	$[K^+](mM)$	Glycin-Influx ( $ml/g \cdot 2 \text{ min}$ )
61	168	9.7
87	182	10.1
167	74	9.8
174	71	9.7

Wir untersuchten ferner den Einfluss des extracellulären Kaliums auf die Glycinaufnahme. Wie nach den Befunden von CHRISTENSEN und Mitarbeitern zu erwarten war, fanden wir den Influx des Glycins bei Verminderung des extracellulären Kaliums von 5 mM auf 0.5 mM um etwa 20 % gehemmt. Erhöhung des extracellulären Kaliums hemmte den Glycin-Influx dagegen nur wenig und erst dann signifikant, wenn die Kaliumkonzentration im Medium 50 mM überschritt.

Da in den bisherigen Experimenten das extracelluläre Kalium auf Kosten des Natriums erhöht worden war, musste untersucht werden, ob die Erhöhung des Kaliums oder die Verminderung des Natriums im Medium die primäre Ursache der Hemmung des Glycin-Influx' sei. Wir variierten daher in den folgenden Experimenten die Konzentration nur je einer Ionensorte, wobei die Osmolarität durch Cholin-Ionen aufrechterhalten wurde. Unter diesen Bedingungen war eine hemmende Wirkung hoher Kaliumkonzentrationen auf den Glycin-Influx kaum noch nachweisbar. Versuche, in denen bei konstantem Kalium das Natrium variiert wurde, ergaben dagegen eine starke Abhängigkeit des Glycin-Influx' vom extracellulären Natrium. Um die Endkonzentration des extracellulären Natriums so weit wie möglich herabzusetzen, wurden die Zellen in einigen Versuchen vor der Inkubation mit Glycin an Natrium verarmt. In allen Fällen nimmt der Glycin-Influx mit dem Natriumgehalt des Puffers ab. Da bei Extrapolation der in Fig. 1 dargestellten Kurve der Influx bei völliger

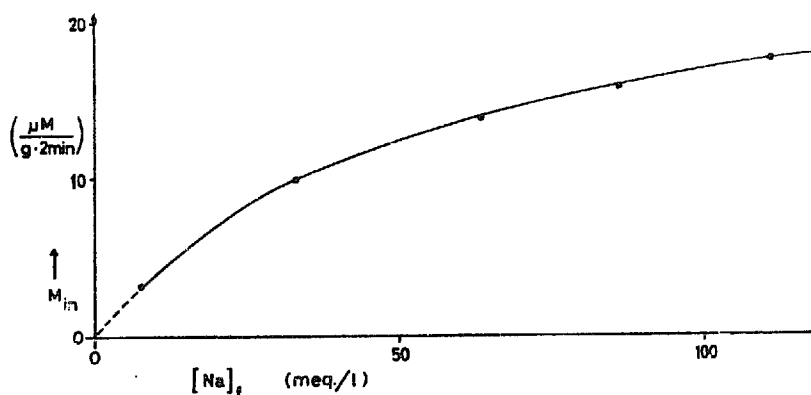


Fig. 1. Influx von  $[^{14}C]$ Glycin in EHRlich-Ascites-Tumorzellen bei variiertem extracellulären Natrium  $[Na]_e$ .  $[K]_e$  konstant. Temperatur:  $37^\circ$ ; Inkubationsmedium: Krebs-Ringer-Phosphatpuffer, mit Zusatz von Rinderalbumin; Inkubationszeit: 2 Min.

Abwesenheit des Natriums dem Wert null zustrebt, scheint das extracelluläre Natrium für den Glycintransport essentiell zu sein. Diese Beobachtung erinnert an die Befunde anderer Autoren über die Natriumabhängigkeit der Zuckeraufnahme durch die Darmschleimhaut<sup>6-11</sup>. Inwieweit auch das intracelluläre Natrium für den Glycintransport von Bedeutung ist, lässt sich zur Zeit noch nicht übersehen.

Unsere Befunde bestätigen also nicht die oben Zitierte und von HEMPLING<sup>12</sup> schon kritisierte Hypothese über einen Austauschmechanismus für Kalium und Glycin. Sie sprechen dagegen für einen unmittelbaren Zusammenhang zwischen extracellulärem Natrium und Glycintransport. Über die Natur dieses Zusammenhangs lassen sich zur Zeit nur Vermutungen anstellen. Eine Komplexbildung zwischen Natrium und Aminosäuren ist unter den vorliegenden Bedingungen wenig wahrscheinlich. Dagegen könnte das Natrium eine für den Glycintransport entscheidende Reaktion aktivieren.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden durch einen Grant (NSF-10812) der National Science Foundation (U.S.A.) unterstützt.

*Institut für vegetative  
Physiologie der Universität Frankfurt a. Main,  
Frankfurt a. Main (Deutschland)*

H. KROMPHARDT  
H. GROBECKER  
K. RING  
E. HEINZ

- <sup>1</sup> E. HEINZ, *Biochemie des aktiven Transports*, Springer-Verlag, Heidelberg, 1961, S. 167.
- <sup>2</sup> H. N. CHRISTENSEN, T. R. RIGGS, H. FISCHER UND J. M. PALATINE, *J. Biol. Chem.*, 198 (1952) 1.
- <sup>3</sup> T. R. RIGGS, L. M. WALKER UND H. N. CHRISTENSEN, *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 1479.
- <sup>4</sup> E. HEINZ, *J. Biol. Chem.*, 211 (1954) 781.
- <sup>5</sup> E. HEINZ UND M. WALSH, *J. Biol. Chem.*, 233 (1957) 1488.
- <sup>6</sup> E. RIKLIS UND J. H. QUASTEL, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 36 (1958) 347.
- <sup>7</sup> T. Z. CSÁKY UND M. THALE, *J. Physiol. London*, 151 (1960) 59.
- <sup>8</sup> T. Z. CSÁKY UND L. ZOLLIFFER, *Am. J. Physiol.*, 198 (1960) 1056.
- <sup>9</sup> R. K. CRANE, D. MILLER UND J. BIHLER, *Symp. on Membrane Transport and Metabolism, Prag, 1960*, p. 286.
- <sup>10</sup> J. BIHLER UND R. K. CRANE, *Biochim. Biophys. Acta*, 59 (1962) 78.
- <sup>11</sup> J. BIHLER, K. A. HAWKINS UND R. K. CRANE, *Biochim. Biophys. Acta*, 59 (1962) 94.
- <sup>12</sup> H. G. HEMPLING UND D. HARE, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 2498.

Eingegangen den 25 Februar, 1963

*Biochim. Biophys. Acta*, 74 (1963) 549-551

SC 2279

### **Effects of ultrasonics on the size and shape of L-myosin and the meromyosins**

Recent advances in understanding the structure of L-myosin have resulted mainly from the discovery of meromyosins<sup>1</sup>. In addition to these enzymic subunits of L-myosin, much interest has been centered on its chemical subunits, for example, those obtained in guanidine hydrochloride<sup>2</sup>. This communication deals with the physical degradation of L-myosin and the meromyosins exposed to ultrasonic vibration.

L-Myosin, heavy meromyosin, and light meromyosin, 6-8 mg/ml, in 0.6 M KCl (pH 7.0) were vibrated at 20 kcycles at 2-10°. The effects of vibration on the myosins were followed in the Spinco analytical ultracentrifuge at 20°, and by viscometry.

*Biochim. Biophys. Acta*, 74 (1963) 551-554