

Untersuchungen über den Einfluss verschiedener Kationen auf die ATP-Spaltung durch die Zytoplasmafraktion vom Plexus chorioideus des Rindes

In der Zytoplasmafraktion aus Homogenaten des Plexus chorioideus (Pl. chor.) des Rindes beschrieben wir eine Mg^{++} -abhängige, nicht Na^+ - K^+ -stimulierbare, digitalisunempfindliche Adenosintriphosphatase (ATPase, ATP-Phosphohydrolase, E.C.3.6.1.3), auf deren Existenz bereits BONTING et al.¹ und VATES et al.² nach Untersuchungen an Gesamthomogenaten geschlossen hatten. Die Enzymaktivität unserer Fraktion war bemerkenswert hoch (VOTH^{3,4}). Wir prüften nun den Einfluss von Na^+ , K^+ , Li^+ , Rb^+ , Cs^+ , Co^{++} , Mn^{++} , Zn^{++} und Fe^{+++} auf die Mg^{++} -abhängige ATPase.

Methodik. Die Pl. chor. der Seitenventrikel von Rindern wurden etwa 30 min nach Tötung der Tiere entnommen, in 0,25 M Saccharose von 2–4 °C gewaschen und homogenisiert. Nach Abtrennen des Zelldebris, der Kern- und Mitochondrienfraktion durch Zentrifugieren (15 min bei 2000 g, 30 min bei 25000 g) bestimmten wir im Überstand den Eiweißgehalt mit dem Phenolreagenz (LOWRY et al.⁵) und der Biuret-Methode (GORNALL et al.⁶). Zum Ausschluss einer Verunreinigung durch erythrozytäre ATPasen wurde die Benzidinreaktion verwendet. Inkubationsbedingungen: Tris-ATP 5 mM, $MgCl_2$ 5 mM, Tris-HCl-Puffer 40 mM pH 7,0, $T = 35^\circ C$. Die Bedingung der Proportionalität zwischen Zeit und Substratumsatz sowie Enzymmenge und Substratumsatz wurde geprüft. Eiweißmenge in den Ansätzen: 100 $\mu g/ml$. Die Kationen wurden einheitlich als Chloride zugesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Substrates gestartet und mit 20% Trichloressigsäure beendet. Nachweis des aus ATP freigesetzten anorganischen Phosphates im Filtrat. Substrat: das Dinatriumsalz der Adenosin-5'-triphosphorsäure wurde in Aqua bidest. gelöst, nach Passage durch in 1 N-HCl vorgewaschenem Dowex 50 (4 · 200–400 mesh, p.A., Gegenion H^+) der ATP-Gehalt spektrophotometrisch bestimmt. Aufbewahrung der Substratlösung bei $-20^\circ C$.

Bestimmung der Enzymaktivität: die Messung der Enzymaktivität erfolgte durch den Nachweis des aus ATP freigesetzten anorganischen Phosphates (P_i) nach LOHMANN und JENDRASSIK⁷. Als Reduktionsmittel wurde Methyl-p-aminophenolsulfat verwendet.

Befunde. Während die Zeit-Umsatz-Kurve bis zu 30 min linear verlief und damit einer Reaktion scheinbar nullter Ordnung entsprach, bestand eine Proportionalität zwischen Enzymmenge und gemessener Aktivität, die linear war, deren graphische Darstellung jedoch nicht

durch den Nullpunkt ging, sondern die Ordinate im negativen Bereich schnitt. Da entsprechend die spezifische Aktivität des Enzyms je nach Eiweißkonzentration im Ansatz wechselte, mussten die Untersuchungen bei einer konstanten Eiweißkonzentration durchgeführt werden, um vergleichbare Ergebnisse zu zeigen.

Die Untersuchung der einwertigen Kationen Na^+ , K^+ , Li^+ und Rb^+ ergab keine signifikante Beeinflussung der Enzymaktivität in niedrigen Konzentrationen, in höheren war eine leichte Hemmung der ATP-Hydrolyse zu beobachten (Figur 1). Frühere Untersuchungen (VOTH³)

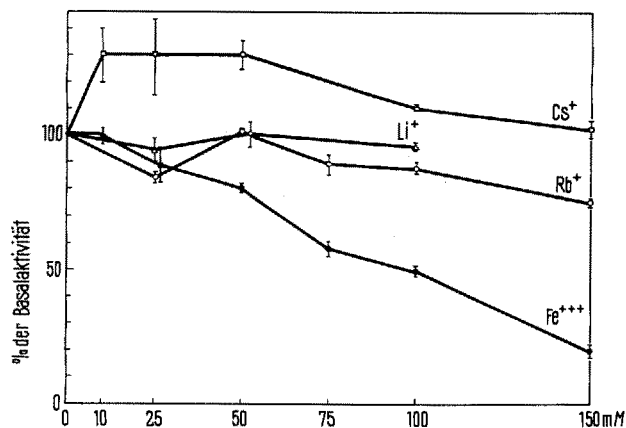


Fig. 1. Der Effekt dreier einwertiger Kationen sowie von Fe^{+++} auf die ATPase-Aktivität, wiedergegeben in Prozenten der Basalaktivität. Während die monovalenten Kationen nur in hohen Konzentrationen einen leichten inhibitorischen Einfluss zeigen, hemmt Fe^{+++} deutlich.

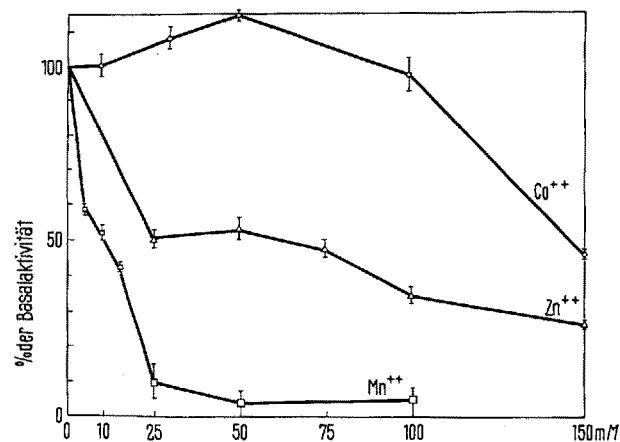


Fig. 2. Der Einfluss von Mn^{++} , Zn^{++} und Co^{++} auf die Mg^{++} -abhängige ATPase-Aktivität. Mn^{++} erweist sich wirksamster Hemmer.

K^+ und Na^+ haben ebenso wie andere monovalente Kationen in Konzentrationen zwischen 10 und 150 mM keinen Einfluss auf die Mg^{++} -abhängige ATPase. Die angegebenen Werte unterscheiden sich sämtlich nicht signifikant von der Basalaktivität

Kationen	K^+	Na^+
Konzentration (mM)	ATPase (% der Basalaktivität)	
0	100	100
10	113,7 \pm 13,3	104,0 \pm 12,5
25	106,5 \pm 8,2	—
50	115,5 \pm 9,5	93,0 \pm 8,7
100	104,5 \pm 10,6	114,0 \pm 8,7
150	111,7 \pm 13,2	—

¹ S. L. BONTING, N. M. HAWKINS und M. R. CANADY, Biochem. Pharmac. 13, 13 (1964).

² Th. S. VATES JR., S. L. BONTING und W. W. OPPELT, Am. J. Physiol. 206, 1165 (1964).

³ D. VOTH, Enzymol. biol. clin. 6, im Druck (1966).

⁴ D. VOTH, Brain Res., im Druck (1966).

⁵ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR und R. J. RANDALL, J. biol. Chem. 193, 265 (1951).

⁶ A. G. GORNALL, C. J. BARDAWILL und M. M. DAVID, J. biol. Chem. 177, 751 (1949).

⁷ K. LOHMANN und L. JENDRASSIK, Biochem. Z. 178, 419 (1926).

hatten bereits gezeigt, dass die gleichzeitige Anwesenheit von Na^+ und K^+ auf die Enzymaktivität keinen Einfluss hat, eine Na^+ - K^+ -stimulierbare ATPase in der Zytoplasmafraktion mithin nicht nachweisbar ist. Wir prüften nun den Einfluss jedes Kations allein (Tabelle), um eventuell Hinweise auf die Existenz einer Na^+ -stimulierbaren ATPase, wie sie in Hirnmikrosomen nachgewiesen wurde (JÄRNEFELT⁸, VOTH⁴), zu gewinnen. Beide Kationen haben jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Enzymaktivität. Fe^{+++} hemmt die ATPase deutlich (Figur 1). Unter den bivalenten Kationen zeigt Mn^{++} eine sehr starke (Figur 2), Zn^{++} und Co^{++} eine schwächere Hemmwirkung. Mn^{++} erweist sich als wirksamster Hemmer der Mg^{++} -aktivierbaren ATPase, es folgen Zn^{++} , Fe^{+++} und Co^{++} .

Diskussion. Am auffälligsten unter den Befunden ist die starke Hemmwirkung von Mn^{++} . Wie unsere früheren Untersuchungen (VOTH³) zeigten, vermag Mn^{++} das obligate Mg^{++} nicht völlig zu ersetzen. Enthalten Ansätze statt der optimalen Mg^{++} -Konzentration von 5 mM die gleiche Menge Mn^{++} , so wird die ATP-Hydrolyse auf 75% reduziert. Steigern wir in Mg^{++} -Anwesenheit die Mn^{++} -Konzentration, so scheint Mn^{++} das Mg^{++} -Ion zu verdrängen, es kommt zu einer rasch zunehmenden Hemmung der ATP-Spaltung. Zusätzlich spielt die Erhöhung der Ionenstärke eine Rolle.

Monovalente anorganische Kationen zeigen nur in hohen Konzentrationen einen schwachen inhibitorischen Effekt. Dies entspricht dem Verhalten zytoplasmatischer ATPasen auch anderer Gewebe ebenso wie das Fehlen der Na^+ - K^+ -stimulierbaren Enzymaktivität.

Summary. The cytoplasm fraction of the bovine choroid plexus epithelial cells was found to contain a considerable ATPase activity. The influence of Na^+ , K^+ , Li^+ , Rb^+ , Cs^+ , Co^{++} , Mn^{++} , Zn^{++} and Fe^{+++} on the activity of the Mg^{++} -dependent enzyme has been studied. The monovalent cations do not influence the enzymic activity, whereas the effect of the bi- and trivalent cations is characterized by an inhibition of the ATPase.

D. VOTH und M. KOHLHARDT

Neurochirurgische Klinik und II. Medizinische Klinik,
Johannes Gutenberg Universität, 65 Mainz
(Deutschland), 23. Juni 1966.

⁸ J. JÄRNEFELT, Biochim. biophys. Acta 48, 104 (1961).

Actin aus Kalbsherzmuskel

Herzaktive Glykoside beeinflussen nach HORVATH et al.¹ die Polymerisation von g-Actin zu f-Actin. WOLLENBERGER² wies nach, dass der Effekt unspezifisch ist und auch herzinaktiven Glykosiden zukommt. Nach beiden Arbeiten ist das Polymerisationsverhalten präparationsabhängig sehr unterschiedlich. WOLLENBERGER konnte einen Glykosideinfluss nur dann nachweisen, wenn das Actinpräparat aus Herzen stammte, die nach dem Tode der Versuchstiere einige Zeit im Körper liegen geblieben waren.

Neue Untersuchungen haben gezeigt, dass nach älteren Methoden präpariertes Actin inhomogen und häufig mit Tropomyosin kontaminiert ist^{3,4}. Wir untersuchten deshalb, ob auch die Polymerisation von reinem g-Actin durch Glykoside beeinflusst wird, in der Hoffnung, im positiven Falle Aufschluss über den noch unklaren Mechanismus der g-Actin \rightarrow f-Actin Transformation zu erhalten.

g-Actin wurde aus Kalbsherzen rein dargestellt, seine wichtigsten Eigenschaften bestimmt und mit denen von g-Actin aus Muskeln anderer Tierarten verglichen. Daraufhin massen wir Polymerisationsgeschwindigkeit, Viskosität und Thixotropie von Actinlösungen mit und ohne Zusatz von g-Strophantin (Ouabain) und k-Strophantin (Strophosid).

Methode. Die Actinpräparation erfolgte aus frischen Kalbsherzen nach der Methode von KATZ und HALL⁵. Eiweisskonzentrationen wurden mit einer Biuretmethode bestimmt. Viskositäten massen wir mit einem Ubbelohde Kapillarrisosimeter, Polymerisationsgeschwindigkeiten und Thixotropiekonstanten mit einem achtstufigen Wells-Brookfield Mikrorotationsviskosimeter. Der Polymerisationsvorgang wurde durch Zugabe von KCl und MgCl_2 (Endkonzentrationen: 0,1 M KCl, 0,001 MgCl_2) gestartet.

Tabelle I. Eigenschaften von Kalbsherzactin

S_o^{20w}	$3,4 \cdot 10^{-13} \text{ sec}$
S_o^{20w} (10^{-3} M EDTA)	$\sim 4,7 \cdot 10^{-18} \text{ sec}$
Grenzviskositätszahl (4°)	0,07 dl g ⁻¹
Myosinbindungsvermögen (Actin:Myosin)	1:4
SH-Gruppen pro Molekül (berechnet auf $M = 60000$)	5,8

Tabelle II. Aminosäureanalyse von Kalbsherzactin (Anzahl Aminosäuren pro Molekül Actin)

Aminosäure	Anzahl	Aminosäure	Anzahl
Cystin	28	Alanin	47
Histidin	7	Cystein	5-6
Arginin	21	Valin	32
Asparaginsäure	56	Methionin	19
Threonin	32	Isoleucin	36
Serin	29	Leucin	43
Glutaminsäure	61	Tyrosin	20
Prolin	26	Phenylalanin	16
Glykokoll	37	Tryptophan	-

¹ I. HORVÁTH, C. KIRALY und J. SZERB, Nature 164, 792 (1949).

² A. WOLLENBERGER, Experientia 10, 311 (1954).

³ A. G. SZENT-GYÖRGYI, J. biol. Chem. 192, 361 (1951).

⁴ W. DRABIKOWSKI und J. GERGELY, in Biochemistry of Muscle Contraction (Ed. J. GERGELY; Little Brown and Company, Boston 1964), p. 125.

⁵ A. M. KATZ und E. J. HALL, Circulation Res. 13, 187 (1963).