

Präparation und ATPase-Aktivität reninhaltiger Granula

Die Reninaktivität der Niere ist in spezifischen Granula myo-epithelialer Zellen des juxtaglomerulären Apparates lokalisiert^{1,2}. Zwar sind früher durch Ultrazentrifugation schon Fraktionen mit reninhaltigen Granula gewonnen worden^{3,4}, doch fehlen z. Z. noch Daten zur biochemischen Charakterisierung dieser Zellpartikel. Im folgenden werden Verfahren zur Gewinnung angereicherter Granulafractionen beschrieben und erste Ergebnisse über die ATPase-Aktivität der Präparate mitgeteilt.

Methodik. Die Präparation der reninhaltigen Granula aus eisgekühlter frischer Nierenrinde vom Schwein erfolgte bei 2–4°C in 0,3M Saccharose und 0,2M Tris-Puffer (pH 7,6). Das Ausgangshomogenat wurde bei 800g, der erhaltene Überstand nacheinander bei 13000, 10000 und 8000g zentrifugiert und jeweils das untere Sediment nach Resuspension weiter verwendet. Der letzte Rückstand war in Farbe und Konsistenz einheitlich. Die pressorische Aktivität der Endfraktion entsprach im Mittel aus 19 Versuchen $14\,500 \pm 1500$ ng Angiotensin/mg Protein.

Aliquote Anteile der frischen Präparation wurden unter Schütteln nach den Angaben in der Tabelle inkubiert. Die Messung der ATPase-Aktivität erfolgte durch colorimetrische Bestimmung des anorganischen Phosphats⁵, das bei der Inkubation mit Adenosin-tri-phosphat (ATP) freigesetzt wurde. Die Bestimmung der pressorischen Aktivität erfolgte nach BOUCHER⁶, die Eiweissbestimmung mit dem Folin-Phenol-Reagenz, die Bestimmung der Monoaminoxidase (MAO)-Aktivität manometrisch im Warburg-Apparat⁷.

Ergebnisse. Nach der Figur 1⁸ enthielten die Endfraktionen neben rund 50% Mitochondrien vor allem reninhaltige Granula, vereinzelt auch Lipofuscingrana; Zellmembranfragmente waren in der Endfraktion nicht zu sehen. Dem elektronenoptisch ermittelten Mitochondriengehalt entsprach auch die MAO-Aktivität. Die Ultrastruktur der reninhaltigen Grana stimmte bei stärkerer Vergrößerung durchaus mit der nach in-vivo-Fixierung überein⁹.

Die geschilderte Granafraktion aus Schweinenieren spaltet ATP. Die Spaltungsrate betrug bei 33°C und pH 7,6 24,00 nmol Pi/mg Protein/min (Tabelle). N-Äthylmaleinimid (NEM), dem Präparat 5 min vor ATP in einer Konzentration von 1×10^{-4} M zugesetzt, reduzierte die ATPase-Aktivität auf rund 65% des Kontrollwertes (Tabelle). Die NEM-sensitive ATPase spaltete 8,5 nmol Pi/mg Protein/min. NEM-Konzentrationen von 1×10^{-3} und 5×10^{-4} (letztere bei pH 7,6 und pH 8) wie auch Vorinkubation mit *p*-Chlormercuribenzoat (PCMB) führten zu keiner signifikant stärkeren Verminderung der Enzymaktivität. Inkubierte man vor der NEM-Zugabe 5 min lang mit 5×10^{-3} M ATP, so blieb die sonst NEM-

sensitive ATPase auch in Gegenwart von NEM aktiv (Tabelle). Nach Vorinkubation mit Ouabain war die ATP-Spaltung gegenüber den Kontrollen ohne Ouabain nicht signifikant verändert. In einem Versuch wurde

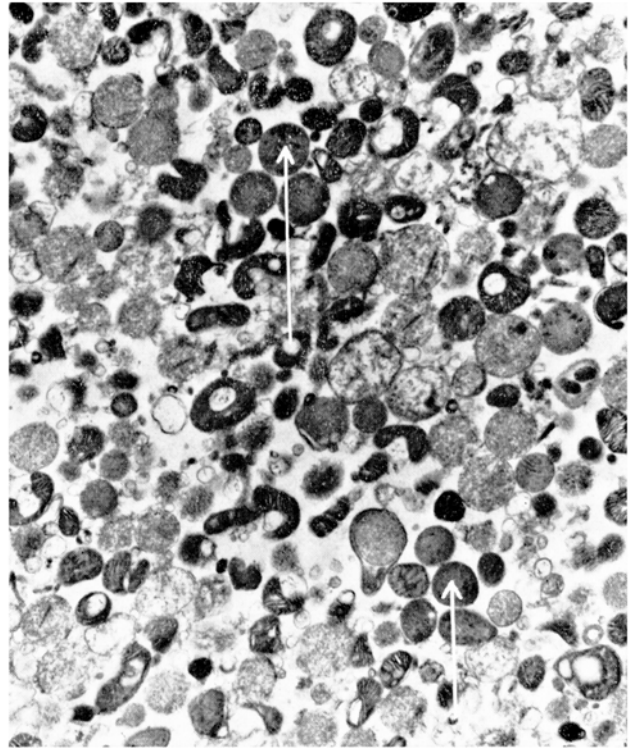


Fig. 1. Elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme einer Renin-granula-haltigen Präparation aus Schweinenieren. Fixation mit Osmiumtetroxyd, Einbettung in Epon 812, Nachkontrastierung mit Bleihydroxyd und Uranylacetat. Endvergrößerung 20000fach. Pfeil: Reninhaltige Granula. Ausserdem Mitochondrien und (vereinzelt) Lipofuscingranula.

Wirkung von NEM, PCMB und Ouabain auf die ATPase-Aktivität der Präparation

Inkubation mit	Endkonzentration	ATP-Spaltung (nmol Pi/mg Protein/min)	
ATP (Kontrollen)	5×10^{-3} M	$24,0 \pm 2,7$	<i>n</i> 17
NEM + ATP ^a	1×10^{-3} M (0,9–3,3 μ M/mg Protein)	$16,5 \pm 1,1$	<i>n</i> 8
NEM + ATP ^a	1×10^{-4} M	$15,5 \pm 1,9$	<i>n</i> 14
ATP + NEM ^b	(0,18–0,33 μ M/mg Protein)	$27,5 \pm 2,8$	<i>n</i> 4
PCMB + ATP	9×10^{-3} M (0,2–0,3 μ M/mg Protein)	$17,4 \pm 1,2$	<i>n</i> 4
Ouabain + ATP ^c	$8,5 \times 10^{-3}$ M (0,2–0,28 μ M/mg Protein)	$22,8 \pm 1,9$	<i>n</i> 4

20 min bei 33°C, 0,12M Saccharose, 5×10^{-3} M MgCl₂, 0,2M Tris (pH 7,6) und 5×10^{-3} M ATP (pH 7,0); wenn nicht anders vermerkt 13 mVal/l Na und 5 mVal/l K. ^a NEM + ATP, 5 min Vorinkubation mit NEM. ^b ATP + NEM, 5 min Vorinkubation mit ATP. ^c Ouabain + ATP, 5 min Vorinkubation mit Ouabain (bei 0,04–0,05 mVal/l Na und K bzw. 40 mVal/l Na); anschliessend 60 min. Inkubation bei 13 mVal/l Na und 5 mVal/l K.

¹ W. F. COOK, J. Physiol., Lond. 194, 73P (1968).

² P. M. HARTROFT, L. E. SUTHERLAND and W. S. HARTROFT, Can. med. Ass. J. 90, 163 (1964).

³ S. CHANDRA, F. R. SKELTON and L. L. BERNARDIS, Lab. Invest. 73, 1192 (1964).

⁴ W. F. COOK, in *Hormones and the Kidney* (Ed. P. C. WILLIAMS; Academic Press, New York 1963), p. 247.

⁵ M. ROCKSTEIN and P. W. HERRON, Analyt. Chem. 23, 1500 (1951).

⁶ R. BOUCHER, J. MENARD and J. GENEST, Can. J. Physiol. Pharmac. 45, 5 (1967).

⁷ W. HARDEGG, E. HEILBRONN, Biochim. biophys. Acta 51, 553 (1961).

⁸ Die elektronenmikroskopische Kontrolle von 4 Präparationen verdanken wir Frau Prof. Dr. H. NEMETSCHKE.

⁹ L. BARAJAS and H. LATTA, Circ. Res. 27, Suppl. II – 15 (1967).

ADP anstatt ATP als Substrat verwendet; die Spaltungsrate betrug dabei rund 30% der in Gegenwart von ATP.

Die ATPase-Aktivität der Mitochondrien, im Saccharose-Dichtegradienten aus der Endfraktion gewonnen, betrug in 2 Versuchen $10,8 \pm 1,2$ nmol Pi/mg Protein/min; sie war ohne NEM, in Gegenwart von 1×10^{-4} M NEM und bei NEM-Zugabe nach ATP-Vorinkubation nicht signifikant verschieden.

Diskussion. Die beschriebene Präparation liefert eine Endfraktion, deren pressorische Aktivität, nach BOUCHER ermittelt und auf Eiweiss bezogen, rund 12mal grösser ist als die pressorische Aktivität des Ausgangshomogenats. Da die reninhaltigen Granula als solche in der Endfraktion ungleich stärker angereichert sind als die pressorische Aktivität, ist anzunehmen, dass während der Präparation Reninverluste auftreten.

Etwas 35% der gefundenen ATPase-Aktivität waren durch NEM hemmbar. Diese NEM-Hemmung konnte durch Vorinkubation mit ATP aufgehoben werden. Sol-

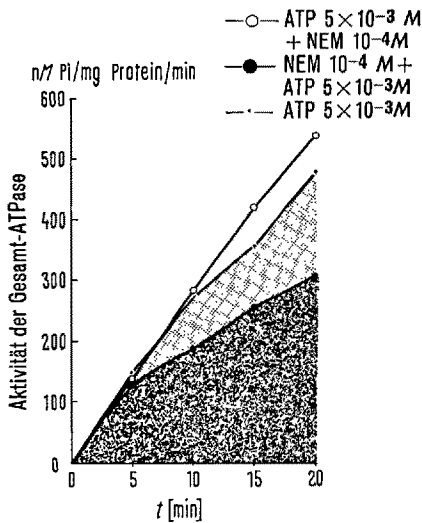


Fig. 2. Zeitverlauf der Wirkung von NEM auf die ATPase-Aktivität der Präparation und die Schutzwirkung von ATP. ATP, Gesamtaktivität; NEM + ATP, 5 min Vorinkubation mit NEM; ATP + NEM, 5 min Vorinkubation mit ATP. Spaltungszeit 20 min.

che Eigenschaften sind für Transport-ATPasen charakteristisch^{10,11}.

Für die Annahme, dass die NEM-sensitive ATPase-Aktivität eine Eigenschaft der Reningranula und nicht anderer Bestandteile der Endfraktion ist, sprechen folgende Argumente. 1. Die im vorliegenden beschriebene, vermutlich Reningranula-ständige Transport-ATPase ist im Gegensatz zu mikrosomalen oder Zellmembran-ständigen Transport-ATPasen nicht Ouabain-empfindlich¹². 2. Die mitochondriale ATPase ist nicht NEM-empfindlich¹³. Dies trifft nach Kontrollversuchen auch für Mitochondrien zu, die aus unseren Präparaten über einen Saccharose-Gradienten gewonnen worden waren.

Die NEM-insensitive ATPase-Aktivität unserer Endfraktion könnte ausser in Mitochondrien auch in den Reningranula lokalisiert sein. Tatsächlich wurden am Nierenschnitt histochemisch saure Phosphatasen in den Granula des juxtaglomerulären Apparates nachgewiesen¹⁴. Schliesslich weist auch die renale Lysosomenfraktion bei pH 5 β -Glycerophosphat- und ATP-spaltende Aktivität auf¹⁵. Im Gegensatz zu den lysosomalen Phosphatasen stieg die ATP-spaltende Aktivität unserer Präparation jedoch bis zum Bereich von pH 8 an.

Summary. In a preparation of renin-containing granules from pig kidneys a NEM-sensitive ouabain-insensitive transport ATPase-activity is described.

D. SCHMIDT, G. SOELL,
K.-P. KARSUNKY und R. TAUGNER

*I. Physiologisches Institut der Universität Heidelberg,
Postfach 1347, D-69 Heidelberg 1 (Deutschland),
31. Juli 1970.*

¹⁰ J. CH. SKOU and C. HILBERG, *Biochim. biophys. Acta* **110**, 359 (1965).

¹¹ W. HASSELBACH and K. SERAYDARIAN, *Biochem. Z.* **345**, 159 (1966).

¹² L. J. OPIT, H. POTTER, J. S. CHARNOCK, *Biochim. biophys. Acta* **120**, 159 (1966).

¹³ M. CHIGA and G. W. E. PLAUT, *J. biol. Chem.* **234**, 3059 (1959).

¹⁴ E. R. FISHER, *Science* **152**, 1752 (1966).

¹⁵ K. OGINO, M. MATSUNAGA, N. SAITO, J. KIRA and M. TAKAYASU, *Japan. Circul. J.* **31**, 1 (1967).

The Effect of Insulin on the Glycolysis and Glycogen Content of Beating Rat Heart Cells in the Primary Culture

The fact that insulin accelerates glucose uptake in skeletal and cardiac muscle is generally accepted¹. We studied the effect of insulin at the primary culture prepared from chicken embryo heart and newborn rats²⁻⁴. The beating rat heart cells were prepared according to a modification of the method used by HARARY and FARLEY⁵.

Since the culture contains several types of cells, the proportion of which changes with the age of culture⁶, we confined ourselves to only a short time for the 3 days in culture. The cultures were incubated with semisynthetic medium⁷ without (control group) and with insulin (10 mU insulin per ml medium) 20 h after isolation of the cells. After an incubation period of 24 h or 4 h the glucose uptake, the lactate production and lactate C-14-production from C-14-glucose were determined⁸⁻¹⁰. The

pathway glucose to lactate was very active. The large percentage of glucose C-14-uptake appeared as lactate-C-14 ($62.8 \pm 3.26\%$, $n = 26$). Insulin increased the lactate-C-14-production from U-C-14-glucose (Table).

Incorporation of radioactivity from U-C-14 labelled glucose into lactate within 4 h

	dpm $\times 10^4$ / μ mol of produced lactate	dpm $\times 10^4$ / μ mol of produced lactate + Insulin
Control	4.85	5.83
\bar{x}	0.212	0.166
$s_{\bar{x}}$	8	10
n		
	$p < 1\%$	