

Chemische und enzymatische Reaktionen an der Membran von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen und ihre Folgen für Stoffwechsel und Permeabilität

Von R. Brossmer (Vortr.), W. Brandeis und K. Kramps^[*]

Um den Zusammenhang zwischen chemischer Struktur und biologischer Funktion bei den Membranen tierischer Zellen zu untersuchen, wurden sie mit Substanzen modifiziert, deren Wechselwirkung mit Gruppen der Zelloberfläche definiert werden kann. Danach wurden die Folgen für Stoffwechsel und Permeabilität geprüft.

Als Modell dienten Zellen des Ehrlichschen Mäuse-Ascites-Tumors. Die Ergebnisse scheinen auch für andere Zellarten zu gelten.

Die Behandlung der Zellen mit Perjodat (10^{-4} M bis 10^{-2} M, 15 min, 37°C) führt in Abhängigkeit von der Konzentration zu einer nachhaltigen Störung von Stoffwechsel und Permeabilität. So beträgt die Glykolyse bei 10^{-4} M Perjodat 70%, bei $5 \cdot 10^{-4}$ M etwa 50%, bei 10^{-3} M aber nur noch höchstens 5% der Werte von Kontrollzellen. Ähnliches gilt für die Atmung.

Um eine Wirkung auf die Membranfunktion nachzuweisen, wurde der Efflux von Kalium und Protein in Abhängigkeit von der Perjodatkonzentration untersucht. Dabei zeigte sich, daß die Membran für nieder- und hochmolekulare Substanzen zunehmend durchlässiger wird. Die chemisch definierte Wirkung von Perjodat auf Glykoproteine und Glykolipide der Zellmembran führt demnach zu einer massiven Schrankenstörung. Dafür spricht auch, daß normalerweise nicht permeierende Farbstoffe, z.B. Trypanblau und Naphthalin-grün V, jetzt intracellulär erscheinen. — In Langzeitversuchen erweist sich die durch Perjodat^[1] hervorgerufene Hemmung des Stoffwechsels als teilweise reversibel. So erreicht die Glykolyse nach 5 Std. wieder 45% der Kontrolle und bleibt dann konstant. Die Verminderung des Stoffwechsels beruht demnach auf einer reversiblen und einer irreversiblen Störung, wobei aber der Influx von Farbstoff nach 5 Std. gegenüber dem am Beginn unverändert ist, d.h. die Membran bleibt geschädigt. Die Transplantierbarkeit der Zellen ist erst nach Inkubation mit 10^{-2} M Perjodat aufgehoben. Behandlung mit 0,1 M Perjodat (1 Std., 20°C) senkt die Wanderungsgeschwindigkeit der Zellen im elektrischen Feld um 10–15%. Neuraminidase vermag jetzt nur noch wenig Sialinsäure abzuspalten (im Gegensatz zur starken Wirkung des Enzyms auf Kontrollzellen).

Während die Behandlung der Asciteszellen mit β -Phenyl-äthanol (0,1%, 15 min, 37°C) nur zu einer geringen Verminderung des Stoffwechsels führt, sinken bei 0,5% die anaerobe Glykolyse auf 3% und die Atmung auf 18% der Kontrolle. Bei 0,25% β -Phenyläthanol ist die Hemmung vollständig reversibel.

Für eine beträchtliche Störung der Permeabilität sprechen folgende Befunde: 1. Efflux von Kalium. 2. Efflux von Protein. 3. Influx von Farbstoff. Die Zellen lassen sich nicht mehr transplantieren (0,5% β -Phenyläthanol, 15 min, 37°C). Die elektrophoretische Beweglichkeit ist dagegen unverändert.

Weder Subtilisin noch Lysozym beeinflussen Stoffwechsel und Wanderungsgeschwindigkeit; dagegen senkt alkalische Phosphatase Atmung und Glykolyse um etwa 30%. Die Wanderungsgeschwindigkeit nimmt hier um 10–15% zu.

Durch Succinylierung der Aminogruppen läßt sich die Zellmembran chemisch modifizieren. Dadurch verschwinden nicht nur positive Ladungen, sondern es werden zusätzlich negative Ladungen an der Zelloberfläche verankert. Dies führt auch tatsächlich zu einer um 20% erhöhten Beweglichkeit im elektrischen Feld. Derart modifizierte Zellen sind morphologisch intakt, haben aber andere Eigenschaften.

[*] Priv.-Doz. Dr. R. Brossmer, W. Brandeis und K. Kramps
Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung,
Abteilung Chemie
69 Heidelberg, Jahnstraße 29

[1] Konzentration: 10^{-3} M.

Neuraminidase spaltet etwa $\frac{1}{3}$ weniger Sialinsäure als von nicht behandelten Zellen ab; der Stoffwechsel ist stark gehemmt.

Über Rezeptoren an der Oberfläche menschlicher Thrombocyten

Von R. Brossmer (Vortr.) und H. Patscheke^[*]

Einmal gewaschene und dadurch von ihrem komplizierten Milieu befreite Thrombocyten sind ein gutes Modell, denn sie sind morphologisch und funktionell intakt. Auf der Suche nach den Rezeptoren für die physiologisch und pathologisch wichtige Aggregation hat sich folgendes ergeben:

Calcium aggregiert Blutplättchen bereits ohne weitere Zusätze. Dabei macht es keinen Unterschied, ob die Reaktion in Pufferlösung oder im Plasma (mit Heparin) stattfindet. Mit fallender Temperatur nimmt die Aggregation zu und erreicht bei $15\text{--}20^{\circ}\text{C}$ ein Maximum. Man benötigt dafür $5 \cdot 10^{-4}$ M Ca^{2+} , d.h. $\frac{1}{5}$ seiner physiologischen Konzentration im Plasma, aber auch noch $5 \cdot 10^{-5}$ M Ca^{2+} aggregieren beträchtlich. Oberhalb $3 \cdot 10^{-3}$ M Ca^{2+} ist eine Aggregation nicht mehr auflösbar; es kommt darüber hinaus zur Desaggregation. Für Magnesium ($5 \cdot 10^{-4}$ M) gilt qualitativ das gleiche, jedoch beträgt die Aggregation nur etwa 40% der durch Calcium bewirkten. Die durch Calcium und Magnesium induzierbaren Aggregationen sind bei höherer Temperatur reversibel. Dieser Zyklus läßt sich mehrmals — lediglich durch Änderung der Temperatur — wiederholen. Adenosindiphosphat ist nicht beteiligt. Man kann daher Calcium und Magnesium als die einfachsten aggregierenden Stoffe betrachten^[1]. Die Wechselwirkung mit den Zellen beruht auf einfachen physikalisch-chemischen Phänomenen.

Der Receptor auf der Thrombocytenoberfläche läßt sich durch alkalische Phosphatase abspalten; es handelt sich um $106\text{--}107$ Phosphatgruppen pro Thrombocyt. Auch alle anderen calcium-abhängigen Aggregationen, darunter die physiologisch bedeutsame durch Adenosindiphosphat, werden durch dieses Enzym blockiert. Im Gegensatz dazu aggregieren positiv geladene Polymere^[2] auch in Gegenwart des Enzyms unbeeinträchtigt. Hier wirken chemisch andere Gruppen als Rezeptoren, die durch Neuraminidase teilweise abgespalten werden. Dabei bleibt jedoch die Wirkung aller calcium-abhängigen Substanzen unbeeinflusst. Wir haben demnach für die Aggregation zwei Arten von Rezeptoren nachgewiesen: 1. Phosphatgruppen, die als Metallchelate eine spezifische Rolle spielen und 2. Sialinsäuremoleküle.

[*] Priv.-Doz. Dr. R. Brossmer und H. Patscheke
Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung,
Abteilung Chemie
69 Heidelberg, Jahnstraße 29

[1] R. Brossmer u. H. Patscheke, Verhandlungen 1. Internat. Symposium über Stoffwechsel und Membranpermeabilität von Erythrocyten und Thrombocyten, Wien 1968, im Druck.

[2] R. Brossmer u. Th. Pfeleiderer, Naturwissenschaften 53, 464 (1966); Th. Pfeleiderer u. R. Brossmer, Thrombosis Diathesis haemorrhag. (Stuttgart) 18, 674 (1967); 19, 459 (1968).

Untersuchungen über die Primärwirkung des Phalloidins

Von M. Frimmer (Vortr.), H. Glossmann, J. Gries und D. Hegner^[*]

Bei der Knollenblätterpilzvergiftung spielen das schnell wirkende Phalloidin und das langsamer wirkende α -Amanitin die entscheidende Rolle. Da Phalloidin fast ausschließlich an der Leber angreift, kann seine Wirkungsweise am besten an der isoliert perfundierten Leber untersucht werden. Das früheste meßbare Ereignis (nach 5 min) ist ein schnell einsetzender Ausstrom von Kalium und ein entsprechender Einstrom von Natrium. Andere Stoffwechselveränderungen