

Die Konzentration phosphorylierter Produkte des Intermediärstoffwechsels in verschiedenen Organen des gesunden Meerschweinchens.

Von

O. F. Schwarz, O. Gabriel und O. Hoffmann-Ostenhof.

Aus dem I. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

(Eingelangt am 10. Juni 1953. Vorgelegt in der Sitzung am 25. Juni 1953.)

Mit der Absicht, die erhaltenen Werte als Grundlage für spätere Untersuchungen über pathologische Veränderungen des Phosphatstoffwechsels bei Meerschweinchen zu benutzen, wurde es unternommen, Normalwerte verschiedener phosphorylierter Stoffwechselprodukte in Herz, Leber, Hirn und Niere zu bestimmen.

Einleitung.

Während über die Konzentration verschiedener phosphorylierter Produkte des Intermediärstoffwechsels in Geweben der Ratte bereits ausführlichere Untersuchungen vorliegen¹, ist das entsprechende Material über das Meerschweinchen noch ziemlich spärlich², obwohl sich gerade das Meerschweinchen häufig recht gut zum Studium pathologischer Stoffwechselveränderungen eignet.

Da wir die Absicht haben, den Einfluß verschiedener Toxine auf den Phosphatstoffwechsel des Meerschweinchens zu untersuchen, haben wir uns vorerst die Aufgabe gestellt, die Normalwerte einiger Phosphat-

¹ F. Muntwyler, S. Seifter und D. M. Harkness, *J. Biol. Chem.* **184**, 181 (1950). — S. Rapoport, F. Lera und G. M. Guest, *ibid.* **149**, 57 (1943). — J. Sachs, *ibid.* **181**, 655 (1949). — S. A. Singal, S. J. Hazan, V. P. Sydenstricker und J. M. Littlejohn, *ibid.* **200**, 875 (1953). — R. M. Johnson und S. Albert, *ibid.* **200**, 325 (1953).

² A. H. Ennor und L. A. Stocken, *Biochemic. J.* **42**, 549 (1948). — M. Dubuisson, *Arch. intern. Physiol.* **52**, 439 (1942). — M. Sposito und G. Wara, *Rass. Fisiopatol. clin. terap.* **14**, 251 (1942). — G. B. Pinchot und W. L. Bloom, *J. Biol. Chem.* **184**, 9 (1949).

fraktionen in Leber, Niere, Hirn und Herz des gesunden Meerschweinchens zu bestimmen. In Homogenaten der genannten Organe wurden die Konzentrationen von säurelöslichem Phosphat, Lipoidphosphat, Nucleinphosphat und Proteinphosphat festgestellt; weiters wurde das säurelösliche Phosphat einer weiteren Fraktionierung nach der Barium-Alkohol-Methode unterzogen. In einer anderen Versuchsanordnung wurden quantitative Untersuchungen über die Verteilung der verschiedenen Phosphatfraktionen in Mitochondrialpräparaten (*Cyclophorase*-Präparaten nach *Green*³) aus den genannten Organen durchgeführt und ebenso auch die Verteilung verschiedener Phosphatfraktionen in den isotonen Waschflüssigkeiten, die bei der Herstellung der Mitochondrialpräparationen anfallen, bestimmt.

Methodik.

I. Fraktionierung von Gesamthomogenaten.

Meerschweinchen mit einem Durchschnittsgewicht von 300 g wurden durch Genickschlag getötet, sofort die einzelnen Organe entnommen und in flüssige Luft eingetragen. Nach Wägung wurde mit eiskalter 10%iger Trichloressigsäure im Homogenisator nach *Potter*⁴ unter Eiskühlung homogenisiert. Das erhaltene Homogenat wurde in einem Schliffzentrifugenröhrchen, das durch direkten Anschluß an einen Kühler die nachfolgende Extraktion der Lipide ermöglicht, zentrifugiert, mit eiskalter 5%iger Trichloressigsäure gewaschen, wieder zentrifugiert und die überstehenden Flüssigkeiten vereinigt. Alle diese Operationen müssen sehr rasch und unter Kühlung vorgenommen werden.

Das Sediment wurde nach einer Angabe von *Schneider*⁵ in Phospholipide, Nucleinsäuren und Phosphoprotein aufgetrennt.

Aus der überstehenden Flüssigkeit wurde ein aliquoter Teil entnommen und in diesem die Konzentration des Orthophosphats einschließlich des Phosphokreatins in der Apparatur nach *Zeller*⁶ bestimmt. In einem weiteren Teil wurde das sogenannte „7-Minutenphosphat“ dadurch gemessen, daß die Probe 7 Min. lang mit 1 n Salzsäure hydrolysiert und darauf das Orthophosphat bestimmt wurde. Aus der Differenz zwischen der ursprünglichen Konzentration an Orthophosphat und der Orthophosphatkonzentration nach der Hydrolyse ergab sich das 7-Minutenphosphat. Ein dritter Anteil wurde nach *Le Page*⁷ der Analyse auf Totalphosphat unterzogen.

Der größere Anteil der überstehenden Flüssigkeit wurde aber dazu verwendet, um die einzelnen darin enthaltenen phosphorylierten Zwischenprodukte nach der von *Le Page*⁷ beschriebenen Methode auf Grundlage der verschiedenen Löslichkeit der Bariumsalze und der verschiedenen Fällbar-

³ *D. E. Green, W. F. Loomis* und *V. Auerbach*, *J. Biol. Chem.* **172**, 389 (1948).

⁴ *V. R. Potter* und *C. A. Elvehjem*, *J. Biol. Chem.* **114**, 495 (1936).

⁵ *W. C. Schneider*, *J. Biol. Chem.* **161**, 293 (1946).

⁶ *A. E. Zeller*, *Helv. Chim. Acta* **32**, 2512 (1949).

⁷ *G. A. Le Page*, in „Manometric Techniques and Tissue Metabolism“, herausgegeben von *W. W. Umbreit, R. H. Umbreit* und *J. F. Stauffer*, 2. Aufl., Minneapolis 1949, S. 185.

keit in Alkohol in Gruppen aufzutrennen. Hierbei mußte nach zwei verschiedenen Verfahren vorgegangen werden: die Methode, die bei Herz, Niere und Hirn die verlässlichsten Ergebnisse lieferte, war bei der Leber wegen ihres hohen Polysaccharidgehaltes nicht gangbar.

Verfahren A (Herz, Niere, Hirn): 5 ml des Trichloressigsäureauszuges wurden mit 1 ml einer 25%igen Bariumacetatlösung versetzt, auf pH 8,2 gebracht, 15 Min. im Kühlschrank belassen und darauf zentrifugiert. Es mußte streng darauf geachtet werden, daß der eingestellte pH-Wert während der Kühlperiode erhalten blieb. Der Niederschlag wurde in zirka 2 ml 0,1 n Salzsäure gelöst, der Lösung ein Tropfen Bariumacetatlösung zugesetzt, sie wieder auf pH 8,2 gebracht und wie vorher 15 Min. lang gekühlt. Der dabei entstandene Niederschlag wurde wiederum abzentrifugiert, darauf mit 2 n Schwefelsäure bis zur völligen Ausfällung der Ba-Ionen versetzt, das ausgefallene Bariumsulfat durch Zentrifugieren entfernt und mit Wasser gewaschen. Die überstehenden Flüssigkeiten wurden vereinigt und auf 10 ml aufgefüllt. Diese Lösung wird als die *bariumunlösliche Fraktion* bezeichnet; in ihr wurden die Konzentrationen des anorganischen Phosphats, des 7-Minutenphosphats und des Totalphosphats bestimmt.

Die nach der Ausfällung mit Bariumacetat erhaltenen überstehenden Flüssigkeiten wurden wiederum auf pH 8,2 gebracht, dann mit dem Vierfachen ihres Volumens Äthanol versetzt und $\frac{1}{2}$ Std. im Kühlschrank stehen gelassen, wobei auf die Konstanz des pH-Wertes geachtet wurde. Der entstandene Niederschlag wurde darauf abzentrifugiert, sodann in zirka 2 ml 1 n Salzsäure gelöst, das Barium mit 2 n Schwefelsäure entfernt und der Bariumsulfatniederschlag mit Wasser gewaschen. Die überstehenden Flüssigkeiten wurden vereinigt und auf 10 ml aufgefüllt. Diese Lösung wird als die *bariumlösliche, alkoholunlösliche Fraktion* bezeichnet; in ihr wurden 7-Minutenphosphat und Totalphosphat bestimmt.

Die bei der Alkoholfällung abgetrennte Lösung wurde direkt nach dem Eindampfen der Phosphatbestimmung zugeführt und ist in den Tabellen als *bariumlösliche, alkohollösliche Fraktion* verzeichnet.

Verfahren B (Leber): 5 ml des Trichloressigsäureauszuges wurden auf pH 8,2 gebracht, darauf zuerst 1 ml 25%iger Bariumacetatlösung versetzt, dann das Vierfache des Volumens an 95%igem Äthanol zugegeben und $\frac{1}{2}$ Std. im Kühlschrank stehengelassen. Der entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert; die überstehende Lösung wird mit I bezeichnet. Der Niederschlag wurde in 1 n Salzsäure gelöst, ein Tropfen Bariumacetatlösung hinzugesetzt, das Gemisch auf pH 8,2 gebracht und darauf 15 Min. im Kühlschrank stehengelassen. Der jetzt entstandene Niederschlag wurde wiederum abzentrifugiert; die überstehende Lösung wird mit II bezeichnet. Der Niederschlag wurde in 1 n Salzsäure gelöst, ein Tropfen Bariumacetat zugefügt und dann abzentrifugiert. Der so erhaltene Niederschlag enthält die *bariumunlösliche Fraktion*; er wurde wie im Verfahren A weiterverarbeitet. Die überstehende Lösung wird als III bezeichnet.

Die Lösungen II und III wurden vereinigt, auf pH 8,2 gebracht, mit dem Vierfachen ihres Volumens an 95%igem Äthanol versetzt, $\frac{1}{2}$ Std. im Kühlschrank stehengelassen und der entstandene Niederschlag abzentrifugiert. Der Niederschlag enthält die *bariumlösliche, alkoholunlösliche Fraktion*; er wurde wie im Verfahren A weiterverarbeitet. Die überstehende Lösung wird als IV bezeichnet.

Die Lösungen I und IV wurden vereinigt und stellen die *bariumlösliche, alkohollösliche Fraktion* dar.

II. Fraktionierung in den Mitochondrialpräparationen und in der überstehenden Flüssigkeit.

Meerschweinchen mit einem Durchschnittsgewicht von 300 g wurden durch Genickschlag getötet, sofort die einzelnen Organe entnommen, in Eiswasser aus *Aqua destillata* eingetragen, mit Filtrierpapier getrocknet, gewogen und pro Gramm Organ mit der 5fachen Menge 0,9%iger eiskalter Kaliumchloridlösung im Homogenisator nach *Potter*⁴ homogenisiert. Aus dem erhaltenen Homogenat wurde durch Verdünnen mit derselben Kaliumchloridlösung 1 : 6 eine Suspension hergestellt. In 1 ml dieser Suspension bestimmte man das Totalphosphat des Homogenats. Der Rest der Suspension wurde zur Herstellung von Cyclophorasepräparationen nach *Green*³ (R_3) benützt. Die Waschflüssigkeiten wurden vereinigt und auf ein bestimmtes Volumen gebracht. Davon wurden 5 ml mit 5 ml 10%iger Trichloressigsäure entweißt und nach Abzentrifugieren in der überstehenden Flüssigkeit die Konzentration von anorganischem Phosphat, 7-Minutenphosphat und Totalphosphat bestimmt.

Die R_3 -Fraktion wurde mit 5%iger kalter Trichloressigsäure homogenisiert, zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit auf 10 ml gebracht und darin Orthophosphat, 7-Minutenphosphat und Totalphosphat bestimmt. Die Orthophosphatfraktion wird in Übereinstimmung mit *Teplý*⁸ als „Gelphosphat“ bezeichnet. Im extrahierten Sediment wurde das Totalphosphat bestimmt.

Ergebnisse.

Die in unseren Meßreihen erhaltenen Ergebnisse sind in den Tabellen 1 und 2 dargestellt.

Diskussion.

Bevor wir in die Diskussion unserer Ergebnisse eingehen, wollen wir kurz einen Überblick über die Inhaltsstoffe der einzelnen Fraktionen geben, die wir mit unseren Methoden erhalten haben. Nach Angaben von *Le Page*⁷ und *Greenberg*⁹ enthalten von den einzelnen Fraktionen, die wir in Tabelle 1 anführen, die *bariumunlösliche Fraktion* anorganisches Phosphat (als solches bestimmt), Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP), Fructose-1,6-diphosphat (FDP), die Phosphoglycerinsäuren und Phytinsäure. Durch die Bestimmung des 7-Minutenphosphats werden zwei Phosphatreste des ATP, einer des ADP, sowie etwa ein halber Phosphatrest von FDP erfaßt. Die *bariumlösliche, alkoholunlösliche Fraktion* enthält Phosphokreatin, Glucose-1-phosphat, Glucose-6-phosphat, Phosphoenolbrenztraubensäure, Triosephosphat, Adenylsäure, die Phosphopyridinnucleotide (DPN und TPN), Pentosephosphat und Inosinsäure. Durch die Bestimmung des 7-Minutenphosphats werden

⁸ *L. J. Teplý*, Arch. Biochemistry **24**, 383 (1949). — *D. E. Green*, *W. A. Atchley*, *J. Nordmann* und *L. J. Teplý*, ibid. **24**, 359 (1949). — Vgl. auch *D. E. Green*, Biol. Rev. Cambridge, Phil. Soc. **26**, 410 (1951).

⁹ *D. M. Greenberg*, in „Phosphorus Metabolism“, herausgegeben von *W. D. McElroy* und *B. Glass*, Bd. II, Baltimore 1952, S. 3.

Tabelle 1. Phosphatfraktionen in verschiedenen Geweben des Meerschweinchens.

Die Werte stellen $\mu\text{g P}$ pro g Frischgewebe dar. Die angegebenen Werte sind arithmetische Mittelwerte aus den erhaltenen Meßwerten; der mittlere Fehler der Mittelwerte wurde aus der Formel

$$\bar{M} = \pm \sqrt{\frac{\sum f^2}{n(n-1)}}$$

berechnet. In der Klammer ist die Anzahl der Versuche angegeben.

Fraktion	Leber	Niere	Hirn	Herz
<i>Trichloressigsäurelösliche Fraktion.</i>				
<i>Fraktionen vor der Barium-Alkoholfällung:</i>				
Anorganisches Phosphat + Kreatinphosphat	181 ± 6 (9)	190 ± 9 (9)	313 ± 7 (7)	221 ± 12 (7)
7-Minutenphosphat ..	149 ± 12 (7)	75 ± 4 (8)	86 ± 10 (5)	173 ± 8 (6)
Totalphosphat	1227 ± 35 (3)	1084 ± 77 (3)	1219 ± 124 (4)	1335 ± 15 (2)
<i>Bariumunlösliche Fraktion:</i>				
Anorganisches Phosphat	175 ± 14 (5)	168 ± 10 (8)	296 ± 9 (7)	193 ± 15 (6)
7-Minutenphosphat ..	100 ± 11 (4)	58 ± 5 (7)	47 ± 10 (4)	125 ± 15 (6)
Totalphosphat	752 ± 32 (3)	666 ± 53 (5)	846 ± 71 (3)	970 ± 32 (4)
<i>Bariumlösliche, alkoholunlösliche Fraktion:</i>				
7-Minutenphosphat ..	18 ± 2 (2)	19 ± 6 (2)	—	37 (1)
Totalphosphat	381 ± 17 (3)	477 ± 34 (4)	483 (1)	340 ± 12 (3)
<i>Bariumlösliche, alkohollösliche Fraktion:</i>				
Totalphosphat	332 ± 50 (4)	190 ± 33 (4)	326 ± 28 (3)	347 ± 32 (3)
<i>Trichloressigsäureunlösliche Fraktion.</i>				
Lipoidphosphat	745 ± 23 (5)	695 ± 84 (6)	595 ± 30 (7)	906 ± 83 (5)
Nucleinphosphat	569 ± 38 (8)	551 ± 31 (5)	300 ± 36 (5)	329 ± 28 (8)
Proteinphosphat	385 ± 12 (7)	385 ± 53 (4)	270 ± 18 (5)	210 ± 25 (9)
Summe (berechnet) ...	1699	1631	1165	1445

Tabelle 2. Phosphatfraktionen in Mitochondrialpräparationen und in der überstehenden Flüssigkeit, die bei der Herstellung solcher Präparationen anfällt.

Bezüglich der Zahlenwerte gilt das bei Tabelle 1 Gesagte.

Fraktion	Leber	Niere	Hirn	Herz
<i>Mitochondrialpräparationen</i> (Cyclophorasesystem, R ₃ -Gel).				
<i>Trichloressigsäurelösliche Fraktion:</i>				
Gelphosphat	73 ± 5 (6)	90 ± 4 (5)	125 ± 12 (3)	89 ± 3 (3)
7-Minutenphosphat . .	30 ± 3 (2)	27 (1)	39 ± 3 (2)	48 ± 7 (3)
Totalphosphat	282 ± 19 (4)	266 ± 12 (4)	—	—
Totalphosphat in der trichloressigsäureunlöslichen Fraktion.	1337 ± 24 (4)	1274 ± 81 (4)	—	—
<i>Überstehende Flüssigkeit.</i>				
Orthophosphat	155 ± 11 (6)	182 ± 14 (5)	315 ± 17 (4)	272 ± 45 (3)
7-Minutenphosphat . . .	152 ± 16 (6)	85 ± 9 (5)	70 ± 8 (4)	264 ± 55 (3)
Totalphosphat	1548 ± 224 (4)	1423 ± 82 (4)	—	—
<i>Vollhomogenat.</i>				
Totalphosphat, bestimmt	3242 ± 211 (4)	2847 ± 42 (4)	—	—
Totalphosphat, errechnet	3167	2960	—	—

hier der Phosphatrest von Phosphokreatin und Glucose-1-phosphat komplett sowie die Phosphatreste der Phosphoenolbrenztraubensäure und des Triosephosphats etwa zur Hälfte erfaßt. In der bariumlöslichen, *alkohollöslichen Fraktion* wurden bisher nur 1,2-Propandiolphosphat und Aminoäthylphosphat nachgewiesen.

Die von *Schneider*⁵ vorgeschlagene Methodik zur Bestimmung von Lipoidphosphat, Nucleinphosphat und Proteinphosphat in der trichloressigsäureunlöslichen Fraktion gibt ein gutes Bild über die Verteilung des Phosphats in dieser Fraktion.

Auf eine gesonderte Bestimmung des Kreatinphosphats wurde verzichtet, weil durch die angewandte Methodik zumindest teilweise ein Abbau des Kreatinphosphats erfolgt¹⁰. Ebenso wurde auch keine

¹⁰ *H. McIlwain, L. Buchel und J. D. Cheshire, Biochemic. J.* **48**, 12 (1951). — Vgl. auch *H. Weil-Malherbe*, in „Die Chemie und der Stoffwechsel

weitere Auftrennung der einzelnen Fraktionen versucht, da sie für unsere Absichten nicht unbedingt erforderlich war.

Die Versuche, die in Tabelle 2 referiert werden, wurden hauptsächlich zu dem Zweck unternommen, um über die Verteilung des energiereich gebundenen Phosphats zwischen den Mitochondrialpräparationen und den überstehenden Flüssigkeiten Aufschluß zu erhalten. Außerdem interessierte uns die als „Gelphosphat“ bezeichnete Fraktion, da diese Fraktion nach Ansicht von *Teplý*⁸ in einem Zusammenhang mit den Vorgängen der Atmungskettenphosphorylierung (oxydativen Phosphorylierung) steht und es deshalb möglich erscheint, aus einer unter pathologischen Bedingung erfolgenden Mengenänderung dieser Fraktion in irgendeinem Organ auf eine dort stattfindende Veränderung — wahrscheinlich meist Hemmung — der Atmungsketten-phosphorylierung zu schließen¹¹.

Die Durchführung dieser zweiten Versuchsserie versetzt uns aber auch in die Lage, eine gewisse Kontrolle der Richtigkeit unserer Werte vorzunehmen. Tabelle 3 ist eine entsprechende Zusammenstellung von Werten für das Totalphosphat, die mit beiden Methoden erhalten wurden.

Tabelle 3. Zusammenstellung einiger in den Tabellen 1 und 2 angeführten Werte für Phosphatfraktionen aus Leber und Niere.

Fraktion	Leber	Niere
Totalphosphat in der trichloressigsäurelöslichen Fraktion....	1127	1084
Lipoidphosphat	745	695
Nucleinphosphat	569	551
Proteinphosphat	385	385
Summe, berechnet	2926	2715
Totalphosphat in der überstehenden Flüssigkeit	1548	1423
Totalphosphat in den Mitochondrialpräparationen	1619	1540
Summe, berechnet	3167	2960
Totalphosphat im Vollhomogenat (Summe, bestimmt)	3242	2847

Aus Tabelle 3 ersehen wir, daß die durch Addition errechneten (in der Tabelle fett gedruckten) Werte für das Totalphosphat, die mit beiden Methoden erhalten wurden, untereinander und auch mit den experimentell bestimmten Totalphosphatwerten im Vollhomogenat befriedigend übereinstimmen.

Eine gewisse Übereinstimmung wird auch erhalten, wenn wir die Summen der Werte des anorganischen Phosphats und des 7-Minuten-des Nervengewebes“, 3. Coll. Ges. physiol. Chem. Mosbach, Berlin 1952, S. 41.

¹¹ Vgl. aber *R. K. Crane* und *F. Lipmann*, *J. Biol. Chem.* **201**, 235, 245 (1953).

Tabelle 4. Zusammenstellung der Summen aus den Werten für anorganisches Phosphat und 7-Minutenphosphat in Leber, Niere, Hirn und Herz.

Fraktion	Leber	Niere	Hirn	Herz
Summe aus den Werten für das anorganische Phosphat und das 7-Minutenphosphat vor der Barium-Alkohol-Fällung	330	265	399	394
Dieselbe Summe, berechnet aus den entsprechenden Werten für die beiden Fraktionen der Barium-Alkohol-Fällung	293	245	343	355
Summe aus den Werten für das anorganische Phosphat und das 7-Minutenphosphat in den überstehenden Flüssigkeiten bei Herstellung der Mitochondrialpräparationen.....	307	267	385	536
Summe aus den Werten für das Gelphosphat und das 7-Minutenphosphat in den Mitochondrialpräparationen.....	103	117	164	137

phosphats aus den Tabellen 1 und 2 gegenüberstellen, wie das in Tabelle 4 vorgenommen wird.

Die Werte der Tabelle 4 lassen aber auch auf die interessante Tatsache schließen, daß das Gelphosphat, das durch Extraktion mit 5%iger Trichloressigsäure aus den Mitochondrialpräparationen (Cyclophorasegel) erhalten wird, bei der Trichloressigsäureextraktion der Gesamthomogenate wider Erwarten nicht in die trichloressigsäurelösliche Fraktion geht, wenn das Gewebe sofort mit Trichloressigsäure behandelt wird.

Ein näheres Eingehen auf die Verschiedenheiten der Phosphatfraktionen in den einzelnen Organen erscheint im derzeitigen Stadium der Untersuchungen noch als verfrüht. Wir möchten aber hier auf eine Erscheinung hinweisen, die bereits von *McIlwain*¹⁰ beobachtet wurde, und vielleicht allgemeineres Interesse besitzt. Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, zeigen die 7-Minutenphosphatfraktionen aus dem Hirn vergleichsweise sehr niedrige Werte. Der Grund dafür ist, daß die von uns gewählte Methode des Dekapitierens extreme konvulsive Reizungen im Hirn auslöst, die verschiedene schnell verlaufende chemische Prozesse und darunter auch den weitgehenden Abbau des energiereichen Phosphats zu Orthophosphat zur Folge haben. Diese Erscheinung kann dadurch vermieden werden, daß man die Tiere nicht durch Dekapitieren, sondern durch Eintauchen in flüssige Luft *in toto* tötet. Zur Durchführung dieser Methodik standen uns aber nicht die entsprechenden Möglichkeiten zur Verfügung.

Wir danken den Herren Doz. Dr. *W. Zischka* und Dr. *H. Eibl* für die tatkräftige Mithilfe.