

## Aktivität und subzelluläre Lokalisation der Adenylzyklase im Flugmuskel von — *Locusta migratoria* —

Activity and Subcellular Localization of the Enzyme Adenyl Cyclase in the Flight-muscle of *Locusta migratoria*

R. K. Achazi

Zoologisches Institut, Universität Münster

(Z. Naturforsch. 29 c, 451—452 [1974]; eingegangen am 7. März/21. März 1974)

*Locusta migratoria*, Flight-muscle, Adenyl Cyclase

In the flight-muscle of *Locusta migratoria* the adenyl cyclase shows the specific activity of  $27.4 \pm 8.3$  pmol cAMP/mg protein·min. Among the fraction obtained by differential centrifugation approximately 85% of the activity recovered is located in the myofibrillar fraction, and 11% in the mitochondrial fraction.

Wanderheuschrecken (*Locusta migratoria*) veratmen während eines längeren Fluges in den ersten dreißig Minuten vor allem Kohlenhydrate, später Fette<sup>1</sup>. In ihren Flugmuskeln können sowohl die Enzyme des Fett- als auch die des Kohlenhydrat-abbaues nachgewiesen werden. Außerdem sinkt während des Fluges ihr Gehalt an Glykogen, Trehalose und Glukose<sup>2</sup>. Humorale, vielleicht auch nervöse Faktoren dürften dafür verantwortlich sein, welcher der beiden energieliefernden Abbauwege während einer bestimmten Flugperiode beschritten wird. Aus den Corpora cardiaca der Wanderheuschrecke konnten zwei Peptidfraktionen gewonnen werden, von denen eine die Phosphorylase des Fettkörpers, die andere die der Malpighischen Gefäße aktiviert<sup>3</sup>. Bei

*Locusta* ist das Phosphorylasesystem des Flugmuskels nicht so eingehend untersucht wie bei *Phormia*. Dort ähnelt es dem der Wirbeltiere, doch fehlt der Nachweis, daß es durch das zyklische Nukleotid cAMP (Adenosin-3':5'-monophosphat) aktiviert werden kann<sup>4</sup>. In unserer Arbeitsgruppe konnte nach elektrischer Stimulation des Bauchmarks von *Locusta*, die eine Kontraktion der Flugmuskulatur bewirkt, in dieser sowohl ein Anstieg der Phosphorylaseaktivität, als auch des cAMP-Gehaltes gemessen werden<sup>5</sup>. Ob ein Zusammenhang zwischen cAMP-Gehalt und Phosphorylaseaktivität besteht, ist in diesem Falle noch nicht geklärt, doch wurde der Einfluß dieses Nukleotids auf andere Funktionen bei Insekten nachgewiesen<sup>6,7</sup>. Die Bildung von cAMP aus ATP (Adenosintriphosphat) wird durch das Enzym Adenylzyklase katalysiert. Bisher liegen noch keine Daten über die Adenylzyklase im Insektenmuskel vor.

Die indirekten Flugmuskeln von geschlechtsreifen Heuschrecken unserer Laborzucht wurden im 10-fachen Volumen eines Extraktionsmediums (142,5 mM KCl, 10,0 mM Hepes, 2,0 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, pH 7,8) im Glashomogenisator mit losesitzendem Teflonpistill mit 10 vorsichtigen Stößen homogenisiert. Aus dem Vollhomogenat wurden durch differentielle Zentrifugation die Myofibrillen-(WKF-Tischzentrifuge, 1 min Höchstgeschwindigkeit, Zimmertemperatur), die Kern- (1500  $\times$  g, 20 min, 0 °C), die Mitochondrien- (10 000  $\times$  g, 20 min, 0 °C), und die Mikrosomenfraktion (100 000  $\times$  g, 2 h, 2 °C) isoliert. Aliquote des Vollhomogenats, der gewaschenen Fraktionen und des 100 000

	Spezifische Aktivität [pMole cAMP mg Protein · min]	Gesamt-aktivität [pMole cAMP min]	Gesamt-aktivität [%]
Vollhomogenat	$27.4 \pm 8.3$	$1279,7 \pm 171,2$	100
WKF-Sediment (Myofibrillen, Zellmembran)	$30,4 \pm 4,9$	$600,2 \pm 236,5$	47,2
1500 $\times$ g Sediment (Kerne)	$2,9 \pm 0,4$	$16,2 \pm 7,0$	1,2
10000 $\times$ g Sediment (Mitochondrien)	$95,2 \pm 43,0$	$77,0 \pm 4,8$	6,1
100000 $\times$ g Sediment (Mikrosomen)	$5,6 \pm 4,9$	$8,5 \pm 8,0$	0,7
100000 $\times$ g Überstand (lösliche Proteine)	0	0	0

Tab. Aktivität und subzelluläre Lokalisation der Adenylzyklase im Flugmuskel von *Locusta migratoria* (Mittelwerte aus drei Doppelbestimmungen mit Standardabweichung).

Abkürzungen: EDTA, Äthylendiamintetraessigsäure; EGTA, Äthylenglycol-bis-(2-aminoäthyläther)-N,N'-tetraessigsäure; Hepes, N-2-hydroxyäthylpiperazin-N'-2-äthansulfonsäure; TCE, Trichloressigsäure; Tris, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan.

Sonderdruckanforderungen an Dr. R. K. Achazi, Universität Münster, Zoologisches Institut, D-4400 Münster, Hindenburgplatz 55.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

$\times g$  Überstandes wurden bei 25 °C in 40 mM Tris, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaF, 10 mM Theophyllin, 1 mM EGTA, pH 7,8 inkubiert und die Reaktion mit ATP (Endkonzentration 2,5 mM) gestartet. 0,5, 5,5, 10,5 min nach Reaktionsbeginn wurden jeweils eine Aliquot entnommen und die Proteine bei 80 °C denaturiert. Das gebildete cAMP wurde im Bindungstest nach Gilman<sup>8</sup> bestimmt und auf die TCE-unlöslichen Proteine bezogen. Der Zusatz von EGTA zum Inkubationsmedium erwies sich als notwendig, da sonst die Konkurrenzreaktion der Muskel-ATPasen den Substratgehalt soweit veränderte, daß die Aktivität der Adenylzyklase nicht meßbar war.

Die Adenylzyklaseaktivität im Flugmuskel von *Locusta* ist viermal höher als in der Arterienmuskulatur der Ratte<sup>9</sup>, aber bis zwanzigmal niedriger als im Rattengehirn<sup>10</sup>. Weit höhere Aktivitäten konnten wir in der Molluskenmuskulatur messen. Vollhomogenate des vorderen Byssusretraktors von *Mytilus edulis* können pro Minute 1270 ± 380 pMole cAMP/mg Protein synthetisieren. Dieser hohen Enzymaktivität entspricht die hohe cAMP-Akkumulation dieses glatten Muskels während der Serotonin-induzierten Erschlaffung<sup>2</sup>.

Nach differentieller Zentrifugation wird in den Zellfraktionen nur etwa 55% der Gesamtaktivität wiedergefunden. 85% davon sedimentieren mit den Fibrillen, 2% mit den Mitochondrien. In der Fibril-

lenfraktion, die auch die Zellmembranen enthalten sollte, können im Phasenkontrast noch Kerne erkannt werden. Da aber in der Kernfraktion selbst, in der Mikrosomenfraktion und im 100 000  $\times g$  Überstand nur eine geringe bzw. keine Aktivität nachweisbar ist, sollte die Adenylzyklase nur mit der Zellmembran, den Muskelfibrillen und den Mitochondrien assoziiert sein. Wie die Adenylzyklase sedimentiert auch die strukturgebundene Phosphodiesterase, das Enzym, das cAMP zu AMP (Adenosinmonophosphat) hydrolysiert, mit den Myofibrillen. Dieses, verglichen mit der Adenylzyklase, stabile Enzym kann selbst in Lösungen von gereinigtem und Triton-X-100 behandeltem Aktomyosin nachgewiesen werden<sup>12</sup>. Die Enzymverteilung im Insektenmuskel unterscheidet sich demnach sehr stark von der im Wirbeltiermuskel. Beim Kaninchen z. B. sedimentiert die Adenylzyklase mit den Mitochondrien und den Mikrosomen<sup>13</sup>.

Der Nachweis der Adenylzyklase und die Erhöhung des cAMP-Gehaltes bei Kontraktion des Flugmuskels<sup>5</sup> lassen den Schluß zu, daß dieses Nukleotid auch im Flugmuskel von *Locusta* die Funktion eines „sekundären messengers“ übernehmen könnte. Es muß aber offen bleiben, ob es den Kohlenhydratstoffwechsel oder, der engen Assoziation wegen, den kontraktilen Apparat beeinflußt.

<sup>1</sup> A. Krogh u. T. Weis-Fogh, J. Exp. Biol. **28**, 342 [1951].

<sup>2</sup> E. Zebe, Ergebnisse der Biologie **24**, 247 [1961].

<sup>3</sup> W. Mordue u. G. J. Goldworthy, Gen. Comp. Endocr. **12**, 360 [1969].

<sup>4</sup> C. C. Childress u. B. Sacktor, J. Biol. Chem. **245**, 2927 [1970].

<sup>5</sup> C. Bockbreder, Diplomarbeit, Münster 1974.

<sup>6</sup> S. H. P. Maddrell, D. E. M. Pilcher u. B. O. C. Gardiner, J. Exp. Biol. **54**, 779 [1971].

<sup>7</sup> M. J. Berridge u. W. T. Prince, Adv. Insect Physiol. **9**, 1 [1972].

<sup>8</sup> A. G. Gilman, Proc. Nat. Acad. Sci. **67**, 305 [1970].

<sup>9</sup> L. Triner, Y. Vulliemoz, M. Verosky, D. V. Habif u. G. G. Nahas, Life Sciences **11/I**, 817 [1972].

<sup>10</sup> B. Weis, J. Neurochem. **18**, 469 [1972].

<sup>11</sup> R. K. Achazi, Drug Res. (Arzneim. Forsch.) **23**, 624 [1973].

<sup>12</sup> H. Volmer, persönliche Mitteilung.

<sup>13</sup> M. Rabinowitz, L. Desalles, J. Meisler u. L. Lorand, Biochim. Biophys. Acta **97**, 29 [1965].