

Der Einfluß glykolytischer Fermente auf den Stoffwechsel von Tumorzellen

V. Mitt.: Proteolytische Aktivierung von Fructose-1.6-diphosphatase mit Trypsin

Von E. HEISE und CH. KLEITKE

Robert-Rössle-Klinik des Institutes für Medizin und Biologie der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin

(Z. Naturforschg. 17 b, 284—285 [1962]; eingeg. am 9. November 1961)

Im Jahre 1955 konnten LANGDON und WEAKLEY¹ feststellen, daß die Aktivität der Glucose-6-phosphatase (G-6-Pase) in Diabetesleber höher ist als in normalen Leberzellen. Dieser Befund konnte 1959 durch SEGAL und WASHKO² bestätigt werden. Sie fanden, daß beim Übergang der normalen Leber in die alloxandiabetische Leber eine Aktivierung der G-6-Pase innerhalb sehr kurzer Zeit eintritt. Diese relativ rasche Aktivitätssteigerung läßt die Vermutung zu, daß eine Aktivierung des Ferments in der Zelle selbst ohne eine verstärkte Enzymsynthese erfolgen kann. WEBER und ASHMORE³ stellten dagegen eine ständige Abnahme der Aktivitäten von G-6-Pase und Fructose-1.6-diphosphatase (FDPase) bei der Ausbildung von Hepatomen fest. Wie wir bereits ausführten⁴, kann wahlweise eine Maskierung bzw. Demaskierung der beiden Phosphatasen, je nach der Stoffwechselsituation (Diabetes und Tumor), angenommen werden. Eine gewisse Bestätigung für dieses Verhalten liefern die Versuche von FREEDLAND und WAISMAN⁵, die durch proteolytische Behandlung mit Papain eine Steigerung der FDPase-Aktivität erzielen konnten. Wir haben deshalb versucht, die Bedingungen für eine proteolytische Aktivierung von FDPase-haltigen Extrakten aus Rinderleber durch Trypsin näher zu charakterisieren.

Material und Methoden

Die Anreicherung der FDPase erfolgte aus Rinderleber, wobei die Leber im Verhältnis 1 : 4 mit Milchsäurepuffer (0,005-m. $p_H=3,5$) im Teflon-Homogenisator 90 sec lang homogenisiert wurde. Die erforderliche Trypsinmenge lösten wir, in 0,05-m. Boratpuffer ($p_H=8,2$) auf. Da die optimale Temperatur für die Trypsinwirksamkeit bei 40 °C liegt, inkubierten wir unsere Proben bei dieser Temperatur und stoppten die Trypsinwirkung durch Zusatz von Trasylol. Anschließend kamen die Proben in ein Eisbad.

Durch 50 K.I.-Einheiten Trasylol wird die proteolytische Aktivität von 100 γ kristallisiertem Trypsin zu 95% gehemmt⁶. Bei Anwendung von jeweils 1 ml

Homogenat wurde die Puffer- und Trasylolmenge so variiert, daß sich ein Endvolumen von 4 ml ergab. Bei zugesetzten Trypsinmengen bis zu 1 mg genügen zum Stoppen 0,5 ml (500 K.I.-Einheiten) Trasylol. Bei größeren Trypsinmengen erhöht man die Trasylolmenge entsprechend, wobei man gleichzeitig weniger Boratpuffer verwendet. Das Gesamtvolumen unserer Inkubationsproben von 4 ml setzt sich zusammen aus

1,0 ml Homogenat
2,5 ml Trypsinlösung
0,5 ml Trasylol.

Um den zeitlichen Einfluß des Trypsins auf die FDPase festzustellen, variierten wir die Inkubationszeit zwischen 5 und 60 Minuten. Nach der Inkubation bestimmten wir die FDPase-Aktivität sowohl im Homogenat als auch in den mit Trypsin behandelten Proben nach POGELL und MCGILVERY⁷. Die Phosphatbestimmung erfolgte nach FISKE und SUBBAROW⁸.

V Versuchsergebnisse und Diskussion

Die Versuchsergebnisse sind in Abb. 1 und Abb. 2 dargestellt. Aus den Abbn. ist zu ersehen, daß die Ak-

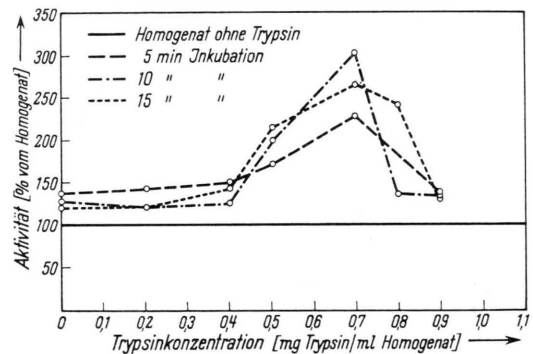


Abb. 1. Der Einfluß von Trypsin auf die FDPase-Aktivität bei verschiedenen Zeiten.

tivierung der FDPase in Abhängigkeit von der Trypsinkonzentration ein Maximum durchläuft. Die Inkubationsdauer hat nur geringen Einfluß auf die Höhe des Maximums, dagegen deutlichen Einfluß auf die Lage des Maximums, bezogen auf die Trypsinkonzentration. Es zeigte sich, daß bei Inkubationszeiten von 5, 10 und 15 Min. das Aktivierungsmaximum bei 0,7 mg Trypsin/ml Homogenat liegt und sich mit steigender Inkubationszeit (20 und 30 Min.) über 0,6 mg Trypsin/ml Homogenat nach 0,5 mg Trypsin/ml Homogenat bei 40 Min. Inkubationsdauer verschiebt. Diese

¹ R. G. LANGDON u. D. R. WEAKLEY, J. biol. Chemistry **214**, 167 [1955].

² H. L. SEGAL u. M. E. WASHKO, J. biol. Chemistry **234**, 1937 [1959].

³ G. WEBER u. J. ASHMORE, Exp Cell Res. **14**, 226 [1958].

⁴ E. HEISE, M. GÖRLICH u. W. LÜHRS, Z. Naturforschg. **16b**, 747 [1961].

⁵ R. A. FREEDLAND u. H. A. WAISMAN, Cancer Res. **20**, 1317 [1960].

⁶ Indikationsschrift: „Trasylol“, Trypsin-Kallikrein-Inaktivator, Bayer-Leverkusen.

⁷ B. M. POGELL u. R. W. MCGILVERY, J. biol. Chemistry **208**, 149 [1954].

⁸ S. H. FISKE u. Y. SUBBAROW, Methods in Enzymol., Amer. Press, 1957/III, 843.

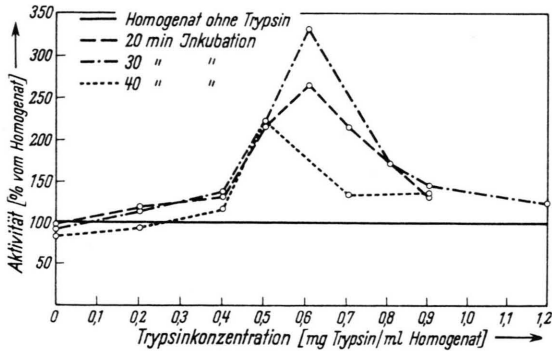


Abb. 2. Der Einfluß von Trypsin auf die FDPase-Aktivität bei verschiedenen Zeiten.

zeitliche Abhängigkeit der Maximumlage ist zurückzuführen auf eine verstärkte Trypsinwirkung mit fortschreitender Zeit.

Ableitung der Rezeptorpotentiale und Nervenimpulse einzelner Cuticula-Senillen bei Insekten

VON ULRICH THURM

Zoologisches Institut der Universität München

(Z. Naturforsch. 17 b, 285—286 [1962]; eingeg. am 3. Februar 1962)

Die in der Cuticula der Insekten lokalisierten Rezeptoren bieten besonders günstige Voraussetzungen für Analysen der Tätigkeit einzelner Sinneszellen. Die räumlich gut getrennten Sensillen sind durch den hohen elektrischen Widerstand der Cuticula auch elektrisch gegeneinander isoliert. Auf Grund dieser Voraussetzungen wurde eine Methode entwickelt, um Rezeptorpotentiale und Nervenimpulse gleichzeitig vom einzelnen Sensillum an seiner Basis abzuleiten. Eine präparative Isolierung des Rezeptors und eine Verletzung des Tieres erübrigen sich. Ein Zellindividuum läßt sich auf diese Weise über mehrere Tage beobachten. Die Ableitung der Aktionspotentiale wird unabhängig von der Reizgebung vorgenommen, im Unterschied zu dem Verfahren von WOLBARSH¹.

Diese Methode wurde an den mechanorezeptorischen Borstensensillen ausgearbeitet, die an den Gelenken der Insekten stehen. Das Objekt war das Cervical-Borstenfeld in der Halsregion der Honigbiene^{2,3}. Man darf annehmen, daß auch bei nicht-mechanorezeptorischen Sensillen die Aktionspotentiale nach derselben, nur wenig abgewandelten Methodik abgeleitet werden können. Speziell für Chemorezeptoren entwickelte MORITA⁴ eine verwandte, jedoch sehr diffizile Methode.

Als differente und indifferente Elektroden dienen zur Ableitung von Rezeptorpotentialen und Impulsen mit

Es muß angenommen werden, daß die Maximumkurven dadurch zustandekommen, daß bei niedrigen Trypsinkonzentrationen die Aktivierung des Enzyms, bei hohen Trypsinkonzentrationen dagegen der proteolytische Abbau des Enzyms und die damit verbundene Zerstörung seiner Aktivität überwiegen.

Im Vergleich zu den Untersuchungen von FREEDLAND und WAISMAN⁵ konnten wir mit Trypsin eine weit höhere Aktivierung erreichen, als die von den genannten Autoren mit Papain gefundene. Diese Versuchsergebnisse sprechen dafür, daß durch eine tryptische Verdauung Proteine oder Polypeptide aus dem Enzymmolekül abgespalten werden, die die Rolle von Maskierungsstoffen zu spielen scheinen. Ein Vergleich der Ergebnisse der FDPase-Aktivierung mittels Papain und Trypsin läßt den Schluß zu, daß es sich bei der Abspaltung von Maskierungsstoffen um eine unspezifische proteolytische Reaktion handelt. Weitere Versuche über Isolierung und Identifizierung derartiger Maskierungsstoffe sind in Vorbereitung.

Ringer-Lösung gefüllte Glaskapillaren; ihr Potential wird durch chlorierte Silberdrähte abgegriffen. Der Spitzendurchmesser der differentiellen Elektrode beträgt 3–8 μ , bei der indifferenten Elektrode etwa 50 μ . Von

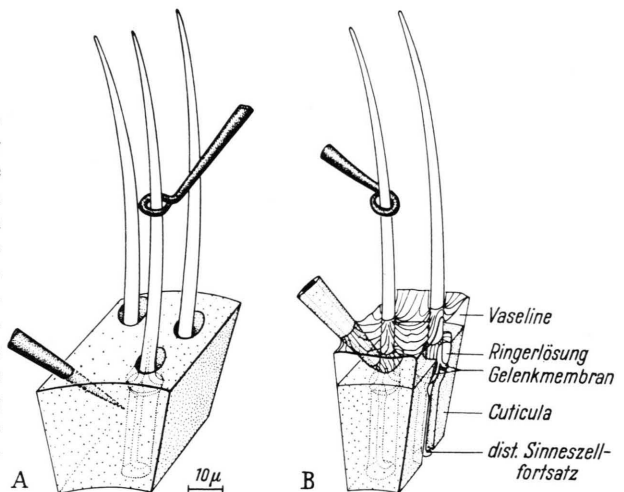


Abb. 1. A: Die Ableitung der Nervenimpulse mit einer Wollram-Nadelelektrode. B: Die Ableitung der Rezeptorpotentiale und der Impulse durch eine mit Ringer-Lösung gefüllte Glaskapillare. Eine Drahtöse dient zur Abbiegung der beobachteten Sensille.

der Gelenkmembran einer Sinnesborste sind die Aktionspotentiale des zugeordneten Rezeptorelements in folgender Weise gut ableitbar: Nachdem eine kleine Menge einer auf das Borstenfeld aufgetragenen Detergentium-Lösung („Pril“ in dest. Wasser) eingetrock-

¹ M. C. WOLBARSH, J. gen. Physiol. 44, 105 [1961].

² E. REHM, Verh. dtsch. Zool. Ges. 44, 112 [1950].

³ M. LINDAUER u. J. O. NEDEL, Z. vergleich. Physiol. 42, 334 [1959].

⁴ H. MORITA, J. cellular. comparat. Physiol. 54, 189 [1959].