

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.  
Vol. 14, 1976, pp. 339–344

## Untersuchungen über den Mechanismus der Aktivierung der Lymphocytenmembran-ATPasen<sup>1)</sup> durch Concanavalin A

Von R. Averdunk, J. Müller und B. Wenzel<sup>2)</sup>

*Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Freien Universität Berlin*

(Eingegangen am 19. Januar/1. April 1976)

**Zusammenfassung:** Die Ouabain-empfindliche und -unempfindliche ATPase von intakten Lymphocyten, der mikrosomalen Fraktion und einer gereinigten Plasmamembranfraktion werden durch Concanavalin A aktiviert. Bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen wurde die Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>-, Mg<sup>++</sup>-Abhängigkeit der Plasmamembran-ATPasen definiert. Bei niedriger K<sup>+</sup>-Konzentration wurde das Enzym etwas stärker aktiviert als bei hoher. Die Untersuchungen machen es unwahrscheinlich, schließen es aber nicht aus, daß Concanavalin A einen allosterischen Effekt auf die ATPasen hat.

### *Studies on the mechanism of activation of lymphocyte membrane ATP-ases by concanavalin A*

**Summary:** The ouabain-sensitive and ouabain-intensitive ATP-ases of intact lymphocytes, and of the lymphocyte microsomal fraction and a purified plasma membrane fraction, are all activated by concanavalin A. The Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, and Mg<sup>+</sup>-dependence of the plasma membrane ATP-ases were defined at different substrate concentrations. Enzyme activation was rather greater at lower K<sup>+</sup> concentrations. From these studies it appears improbable, but not impossible, that concanavalin A exerts an allosteric effect on the ATP-ases.

### Einführung

Zur Transformation von Lymphocyten durch Mitogene wie Concanavalin A reicht die Reaktion des Mitogens mit den Rezeptoren der Plasmamembranen aus. Eine Aufnahme in die Zelle ist nicht erforderlich (1). Durch die Interaktion zwischen Rezeptor und Mitogen werden frühe (d. h. innerhalb einer halben Stunde ablaufende) Veränderungen an der Zellmembran, wie die Erhöhung der Kationen-Transportraten (2–4) des Phospholipidstoffwechsels (5–6) und der Glycoproteinsynthese (7) ausgelöst.

Die veränderten Transportraten von Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> gehen mit einer Zunahme der Ouabain-Bindungsgeschwindigkeit, der Ouabain-Bindungsstellen, sowie der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase Aktivität einher (8, 9). Die Veränderungen des Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Transportes sind von besonderem Interesse, weil ein direkter Einfluß der intrazellulären Kationenkonzentrationen auf andere bei der Lymphocytenstimulation beobachteten Stoffwechselvorgänge, wie die erhöhte Protein- und RNA-Synthese angenommen wird (2–4).

Obwohl die Aktivierbarkeit der Lymphocyten-ATPasen durch Mitogene in mehreren Laboratorien nachgewiesen wurde (8, 10–12) ist die Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>- oder Mg<sup>++</sup>-Abhängigkeit dieses Enzyms noch nicht näher definiert worden.

Es soll in dieser Arbeit deshalb untersucht werden, ob der durch Concanavalin A verursachte Aktivitätsanstieg der ATPasen auf eine veränderte Affinität gegen Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> oder Mg<sup>+</sup> oder das Substrat ATP beruht.

### Material und Methoden

#### Lymphocytenpräparation

Periphere Lymphocyten von Menschen wurden aus frischem heparinisierem Blut durch Dextran sedimentation (5 g/l Dextran 250 in 0,15 mol/l NaCl), an die eine Zentrifugation über einen Ficoll-Ronpacon-Gradienten (9,55 g Ficoll, 20 ml Roncacon, 130 ml H<sub>2</sub>O) angeschlossen wurde, gewonnen. Schaflymphocyten wurden aus den Lymphknoten frisch geschlachteter Hammel gewonnen.

#### Präparate der mikrosomalen Fraktion

Die gereinigten Lymphocyten wurden in der Arthesischen Bombe bei 400 psi aufgebrochen. Die Kerne und noch intakten Zellen bei 500 × g, die Mitochondrien und lysosomalen Fraktionen mit 10 000 × g abzentrifugiert und die mikrosomale Fraktion durch 2stündige Zentrifugation bei 100 000 × g erhalten. Die

<sup>1)</sup> ATPase = ATP-Phosphohydrolase (EC 3.6.1.3).

<sup>2)</sup> Robert-Koch-Institut des Bundesgesundheitsamtes, Abt. Biochemie, D-1000 Berlin 65, Nordufer 20.

Fraktion wurde direkt (ohne einzufrieren) zur Enzymbestimmung verwendet.

#### Präparation der Plasma-Membranen

Lymphocyten aus Hammellymphknoten wurden in 0,1 mmol/l Tris-HCl (pH = 7,4) 30 min bei 4°C gerührt, anschließend im Dounce-Homogenisator homogenisiert und die Lösung mit Rohrzucker auf 0,25 mol/l eingestellt. Die Kerne (und einige intakte Zellen) wurden mit 500 × g (30 min), die mitochondriale und lysosomale Fraktion mit 7000 × g (10 min) abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit Rohrzucker auf 1,23 mol/l gebracht und über eine 1,31 mol/l Rohrzuckerlösung geschichtet und mit 0,8 mol/l Rohrzuckerlösung überschichtet. Nach 16stündiger Zentrifugation bei 4°C in einem Rotor SW 25,2 bei 200 000 × g in einer Beckmann Ultrazentrifuge wurde die Schicht zwischen 1,23 mol/l und 0,8 mol/l Rohrzucker als Plasmamembran-Fraktion verwendet (15).

#### Bestimmungen

Die ATPase wurde bei 37°C bestimmt, dabei 50–200 µg Protein eingesetzt. Als Puffer diente Tris-HCl 10 mmol/l, pH = 7,4. Es wurde [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP der Fa. NEN (spez. Aktivität 14,5 Ci/mmol) verwendet. Die Reaktion wurde mit 240 g/l Trichloressigsäure gestoppt, das Protein abzentrifugiert. Das im Überstand vorliegende  $^{32}$ P<sub>i</sub> wurde mit Ammoniummolybdat umgesetzt, mit Isobutanol extrahiert und in Scintillationsflüssigkeit eingesetzt (8). In den Experimenten, in denen die Na-ATPase bestimmt wurde, wurde Tris-ATP verwendet.

Die 5'-Nucleotidase wurde nach *Michell et al.* (13) bestimmt. Das entstehende Pi wurde nach *Fiske* (14) gemessen. Die Adenylcyclase wurde wie bei *Mehdi* (15) angegeben, bestimmt, dabei das aus ATP entstehende cycl. AMP mit den Proteinbindungssassay der Fa. Boehringer gemessen.

Die Succinatdehydrogenase wurde mit der Methode von *Earl et al.* (16) bestimmt. Die Glucose-6-phosphatase wurde durch Modifikation der Methode von *Hübscher et al.* (17) bestimmt, wobei die entstehende Glucose mit der Glucoseoxidase-Methode (18) gemessen wurde.

RNA und DNA wurden quantitativ mit der Methode nach *Liss* (19), Protein nach *Lowry* (20) und Cholesterin nach *Röschlau et al.* (21) bestimmt.

#### Ergebnisse

Mißt man die ATPase-Aktivität intakter Lymphocyten, nachdem diese mit Concanavalin A präinkubiert wurden, so findet sich eine dosisabhängige Zunahme der Phosphatfreisetzung durch die Zellen. Eine gesteigerte Aktivität wurde bei menschlichen und Schaflymphocyten gefunden. Die Zunahme beträgt das 3 bis 4fache im Vergleich zu den Kontrollen. Da das ATP durch die ATPase in der Zelle und, wie *Pomier et al.* (12) zeigten, durch eine Exo-ATPase auf der Zelloberfläche gespalten wird, kann angenommen werden, daß das ATP durch eine erhöhte Membranpermeabilität bzw. Pinocytose oder durch die Stimulation der Exo-ATPasen vermehrt gespalten wird. Da die erhöhte ATP-Spaltung somit auch von anderen Faktoren als einer Aktivierung der ATPase abhängen könnte, wurde in den nächsten Experimenten die mikrosomale Fraktion der stimulierten Zellen verwendet (Abb. 1).

In der mikrosomalen Fraktion von Lymphocyten, die mit Concanavalin A vorbehandelt wurden, kommt es zu einer Aktivierung der Ouabain-unempfindlichen und der Ouabain-empfindlichen ATPase. Eine Aktivierung der ATPase läßt sich bei Human- und bei Hammellymphocyten nachweisen. Es besteht eine deutliche Dosisabhängigkeit. Eine maximale Stimulation findet sich bei der mikrosomalen Fraktion aus Humanlymphocyten bei

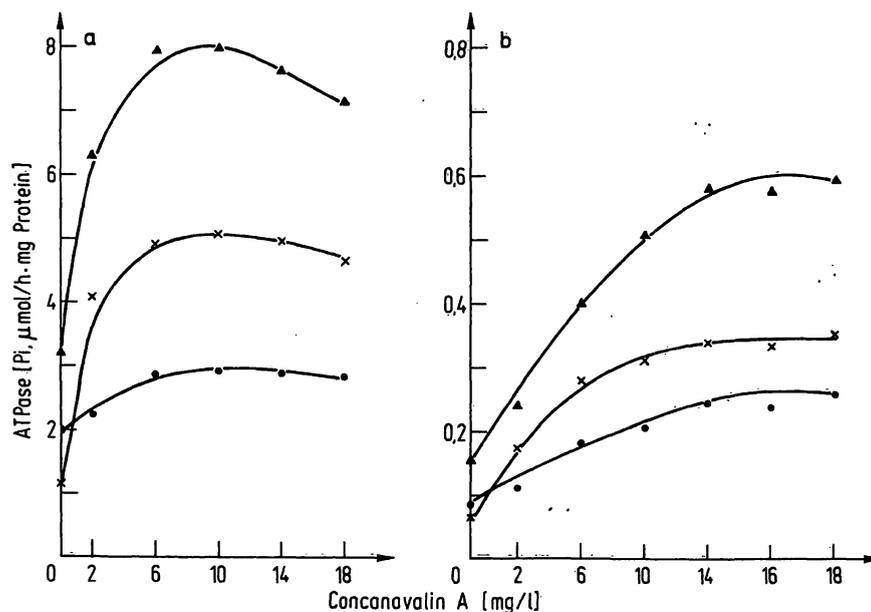


Abb. 1. Die Lymphocyten a) vom Menschen, b) vom Hammel wurden in einer Zellkonzentration von  $10^{10}/\text{l}$  mit verschiedenen Concanavalin A-Konzentrationen im normalen Eagle-Medium bei 37°C 90 min vorinkubiert. Die mikrosomale Fraktion dieser Zellen wurden dann (in Gegenwart von unterschiedlichen Concanavalin A-Mengen) zur Bestimmung der ATPase-Aktivität in einem Puffer mit 100 mmol/l NaCl, 5 mmol/l KCl, 1 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 250 µmol/l ATP inkubiert. Den Kurven liegen die Mittelwerte von 2 Experimenten zugrunde. (VK = ± 5,4%) ●—● = Ouabain-unempfindlich ▲—▲ = Gesamtaktivität x—x = Ouabain-empfindlich

Tab. 1. ATPase-Aktivität der mikrosomalen Fraktion in Gegenwart von Concanavalin A.

Die mikrosomale Fraktion von Lymphocyten wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von Concanavalin A mit 0,5 mmol/l und ohne Ouabain versetzt, Inkubationspuffer enthielt 100 mmol/l Na<sup>+</sup>, 5 mmol/l K<sup>+</sup>, 250 µmol/l ATP, 1 mmol/l Mg Cl<sub>2</sub> Tris-HCl-Puffer pH 7,4. Den Experimenten mit den mikrosomalen Fraktionen der Lymphocyten vom Menschen liegen 3 Versuchsserien mit der gleichen mikrosomalen Fraktion zugrunde. Der VK betrug nicht mehr als ± 5%. Den Ergebnissen der Experimente mit den Schaf-Lymphocytenfraktionen liegen 3 Untersuchungen mit unterschiedlichen mikrosomalen Präparationen zugrunde (n = 6).

Concanavalin A mg/l	Mikrosomale Fraktion aus Human-Lymphocyten			aus Hammel-Lymphocyten		
	ATPase [P <sub>i</sub> , µmol/h · mg Protein] gesamt	Ouabain empfindlich	Ouabain unempfindlich	ATPase [P <sub>i</sub> , µmol/h · mg Protein] gesamt	Ouabain empfindlich	Ouabain unempfindlich
0	3,02	0,94	2,08	0,29 ± 0,021	0,11 ± 0,024	0,18 ± 0,020
2	4,67	2,34	2,33	0,63 ± 0,034	0,40 ± 0,031	0,23 ± 0,021
4	5,41	3,26	2,35	0,74 ± 0,044	0,43 ± 0,036	0,31 ± 0,036
8	5,19	2,81	2,38	0,70 ± 0,038	0,41 ± 0,034	0,29 ± 0,029
16	4,96	2,55	2,41	0,59 ± 0,036	0,32 ± 0,031	0,27 ± 0,028

Tab. 2. Charakterisierung der Lymphocytenfraktionen.

	Protein [mg]	DNA [mg]	RNA [mg]	Cholesterin [mg]	ATPase [P <sub>i</sub> , µmol/h · mg Protein] Ges.	ATPase Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> Mg <sup>2+</sup>	5'-Nucleotidase [P <sub>i</sub> , µmol/h · mg Protein]	Adenylcyclase [pmol/h · mg Protein] ohne NaF	Adenylcyclase mit 10 mmol/l NaF	Succinat-Dehydrogenase [µmol/h · mg Protein]	Glucose-6-phosphatase [µmol/h · mg Protein]	
Homogenat	315,3	26,4	12,3	9,8	0,22	0,08	0,14	0,83	0,096	0,25	0,06	0,63
800 × g Pellet	49,3	20,2	2,2	2,2	0,24	0,05	0,19	0,32	n. g.	n. g.	0,11	0,49
700 × g Pellet	7,2	2,3	2,3	2,4	0,24	0,10	0,14	4,0	0,31	1,22	0,31	0,53
Mikrosomale Fraktion	8,4	0,46	0,92	2,6	0,37	0,15	0,22	5,9	n. g.	n. g.	0,11	0,47
Plasma Membranen	4,1	0,1	0,1	0,9	2,81	1,6	1,21	12,6	0,67	1,93	—	0,21

n. g. nicht gemessen

6–15 mg/l Concanavalin A, bei den Hammellymphocyten bei 15–20 mg/l. Stimuliert wird in erster Linie die Ouabain-empfindliche ATPase. Besonders bei den Hammellymphocyten kommt es auch zu einer Aktivierung der Ouabain-unempfindlichen ATPase. Stimulationen gleicher Größenordnung wurden auch von anderen Autoren (10–12) gefunden.

Als nächstes untersuchten wir, ob Concanavalin A auch aktivierend auf die mikrosomale Fraktion von Lymphocyten, die nicht mit Concanavalin A vorbehandelt wurden, wirkt. Das Mitogen wurde in diesen Versuchen, also der mikrosomalen Fraktion und nicht den intakten Zellen, vor der Bestimmung der ATPase zugesetzt. Aus der Tabelle 1 geht hervor, daß sowohl bei den Human- als auch bei den Hammellymphocyten die ATPasen der mikrosomalen Fraktion durch Concanavalin A aktiviert wird. Die Aktivierung ist deutlich niedriger als sie (Abb. 1) bei den Fraktionen gefunden wurde, die von den Zellen stammten, welche mit Concanavalin A vorbehandelt wurden. Es wird sowohl die Mg<sup>2+</sup>-ATPase als auch die Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase aktiviert, bei den Präpara-

tionen aus Hammellymphocyten reagiert die Ouabain-unempfindliche ATPase ausgeprägter als bei den Humanlymphocyten.

Die mikrosomale Fraktion war stark mit anderen subzellulären Fraktionen kontaminiert (Tab. 2). Es läßt sich nur eine geringe Anreicherung der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase gegenüber dem Homogenat demonstrieren. Deshalb wurde eine möglichst reine Plasmamembranfraktion hergestellt und charakterisiert (Tab. 2). In der Plasmamembranfraktion liegen nur noch geringe Kontaminationen mit Kernmaterial vor; DNA ist nicht nachweisbar. Die ATPase und 5'-Nucleotidase ist deutlich (etwa 10fach) angereichert gegenüber dem Homogenat und der mikrosomalen Fraktion. Ebenso findet sich eine deutliche Anreicherung der membranständigen Adenylcyclase. Beimengungen von endoplasmatischem Retikulum sind gering, wie die Glucose-6-phosphatase-Bestimmung zeigt. Succinatdehydrogenase konnte in den Fraktionen nicht mehr nachgewiesen werden, d. h. es finden sich keine wesentlichen Beimengungen von Mitochondrien.

Die weiteren Experimente wurden mit dieser Membranfraktion aus Hammellymphocyten unternommen. Wir verwendeten die Hammellymphocytenmembranen, weil so große Mengen aus menschlichem Material nicht zur Verfügung standen. Diese Plasmamembranfraktionen wurden 3x in 0,1 mmol/l Tris-HCl-Puffer gewaschen. Es ist daher anzunehmen, daß nur noch geringe Mengen von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  oder  $\text{Mg}^{++}$  in den Fraktionen vorlagen. Sie waren flammenfotometrisch oder durch Atomabsorptionsspektrometrie nicht nachweisbar. Durch Concanavalin A (15 mg/l) wird die  $\text{Mg}^{++}$ - und  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ -abhängige ATPase bei 250  $\mu\text{mol/l}$  ATP und 100 mmol/l  $\text{Mg}^{++}$  aktiviert. Es finden sich keine Unterschiede in dem Grad der Stimulation in Abhängigkeit von der  $\text{Mg}^{++}$ -Konzentration (Tab. 3).

Bestimmt man die ATPase-Aktivität bei 250  $\mu\text{mol/l}$  ATP in Abhängigkeit von der  $\text{K}^+$ -Konzentration (Abb. 2), so findet sich, daß niedrige  $\text{K}^+$ -Konzentrationen die ATPase-Aktivität erhöhen, während durch hohe Konzentrationen eine Hemmung des Enzyms eintritt. Bei niedrigeren ATP-Konzentrationen (2,5  $\mu\text{mol/l}$ ) findet man schon bei niedrigen  $\text{K}^+$ -Konzentrationen eine Hemmung des Enzymsystems. Die Hemmung ist schon bei 0,1 mmol/l  $\text{K}^+$  nachweisbar (Abb. 3). Es zeigt sich, (Abb. 2 und 3), daß Concanavalin A das Verhalten der Membran-ATPase nicht grundsätzlich verändert. Sowohl die  $\text{K}^+$ -Hemmung bei hohen als auch niedrigen  $\text{K}^+$ -Konzentrationen sind deutlich nachweisbar. Jedoch scheint die prozentuale Aktivierung des Enzyms bei niedrigem  $\text{K}^+$  etwas höher zu sein, als bei hohem  $\text{K}^+$  (Abb. 2).

Das Verhalten der  $\text{Na}^+$ -abhängigen ATPase von Lymphocytenmembranen geht aus Abbildung 4 hervor. Niedrige  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen (bis 100 mmol/l) aktivieren die  $\text{Na}^+$ -abhängige ATPase, höhere Konzentrationen hemmen sie geringfügig. Der  $\text{Na}^+$ -Effekt ist besonders bei niedrigen ATP-Konzentrationen nachweisbar. Deshalb wurde in diesen Versuchen 2,5  $\mu\text{mol/l}$  ATP verwendet. Concanavalin A stimuliert das  $\text{Na}^+$ -abhängige Enzym wesentlich geringer als die  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase. Im Prinzip ist der Kurvenverlauf dem des unbehandelten Enzyms aber gleich.

Tab. 3.  $\text{Mg}^{++}$ -Abhängigkeit der Lymphocyten-ATPasen.

Die Plasma-Membran-Fraktion wurde für 30 min bei 37°C mit oder ohne Concanavalin A bei verschiedenen  $\text{Mg}^{++}$ -Konzentrationen inkubiert. ATP-Konzentration 250  $\mu\text{mol/l}$ . Zur Bestimmung der  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase  $\text{K}^+ = 10$  mmol/l  $\text{Na}^+ = 100$  mmol/l. Zur Bestimmung der  $\text{Na}^+$ -ATPase  $\text{Na}^+ = 100$  mmol/l.

$\text{Mg}^{++}$ [ $\mu\text{mol/l}$ ]	+ Ouabain		+ $\text{Na}^+\text{K}^+$		+ Na	
	- Con A	+ Con A	- Con A	+ Con A	- Con A	+ Con A
50	0,62	0,79	1,17	2,29	0,53	
100	1,18	1,67	1,40	3,24	0,94	
150	1,25	1,89	1,49	3,57	1,02	
200	1,28	1,76	1,41	3,59	1,09	

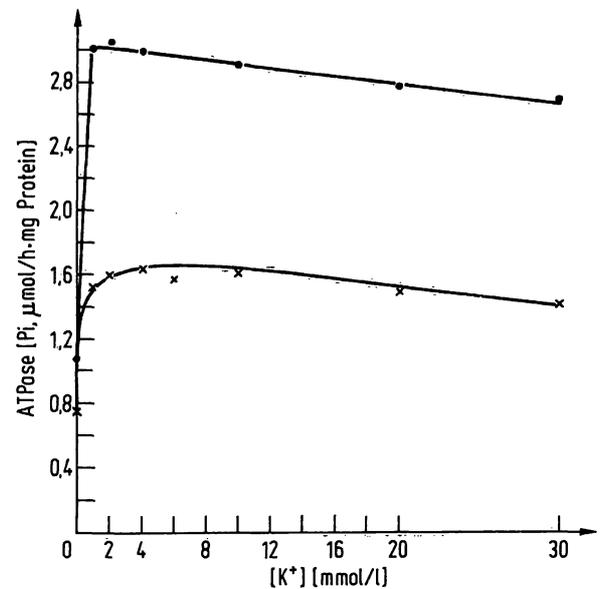


Abb. 2. Die Plasmamembranen von Hammellymphocyten wurden mit und ohne Concanavalin A 30 min bei 37 °C bei verschiedenen  $\text{K}^+$ -Konzentrationen nach einer Vorinkubation von 90 min mit 12 mg/l (●—●) und ohne (x—x) Concanavalin A inkubiert.  $\text{Na}^+ = 100$  mmol/l,  $\text{Mg}^{++} = 1$  mmol/l. ATP 250  $\mu\text{mol/l}$ , Membran 142  $\mu\text{g}$  Protein/Ansatz. Mittelwert von 2 Experimenten der gleichen Membranpräparation. (VK =  $\pm 3,2\%$ )

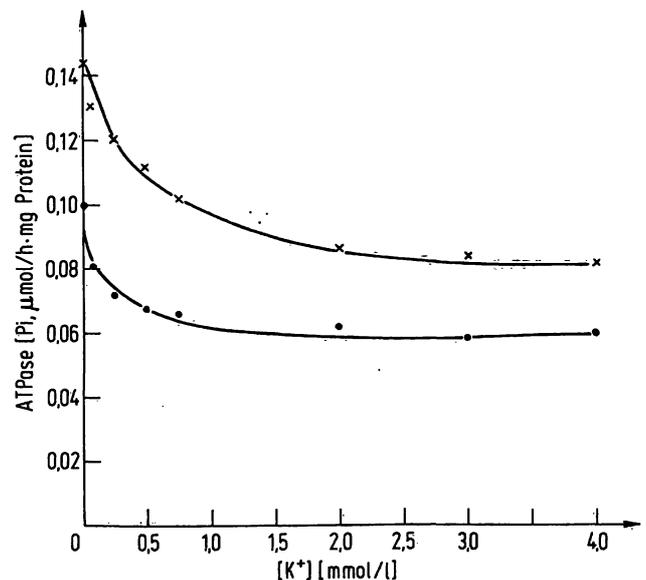


Abb. 3. Die Plasmamembranen wurden mit 16 mg/l (x—x) und ohne (●—●) Concanavalin A nach einer Vorinkubationszeit von 90 min zur Bestimmung der ATPase-Aktivität 30 min bei 37 °C bei verschiedenen  $\text{K}^+$ -Konzentrationen inkubiert.  $\text{Na}^+ = 100$  mmol/l,  $\text{Mg}^{++} = 30$  mmol/l pH = 7,4 mit Tris-HCl, ATP 2,5  $\mu\text{mol/l}$ , Membranmenge 50  $\mu\text{g}$  Protein/Ansatz. Mittelwert von 2 Experimenten der gleichen Membranpräparation. (VK =  $\pm 4,2\%$ )

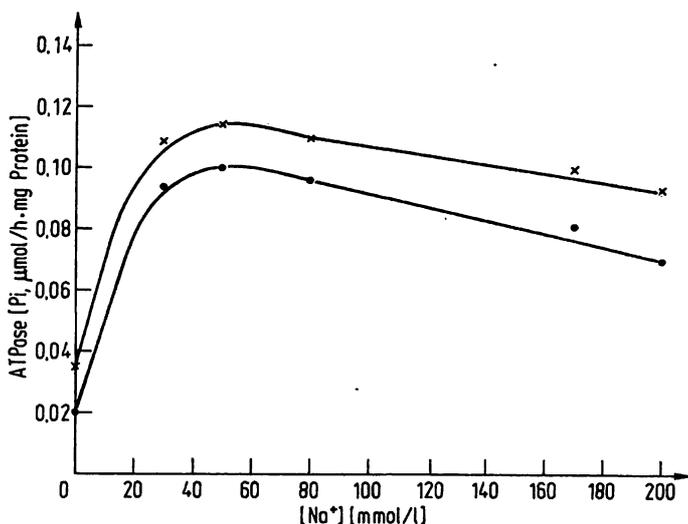


Abb. 4. Die Plasmamembranen wurden nach einer Vorinkubation mit 15 mg/l (x—x) und ohne (●—●) Concanavalin A zur ATPase-Bestimmung 30 min bei 37 °C bei verschiedenen Na<sup>+</sup>-Konzentrationen inkubiert (ohne K<sup>+</sup>). Mg<sup>2+</sup> = 30 mmol/l, ATP = 2,5 µmol/l, pH 7,4 Membranmenge 63 µg Protein/Ansatz. Mittelwert von 2 Experimenten der gleichen Membranpräparation. (VK = ± 4,4%)

## Diskussion

In vieler Hinsicht, wie z. B. der K<sup>+</sup>-Abhängigkeit bei hoher und niedriger Substratkonzentration, zeigt das hier getestete System der Lymphocytenmembran-ATPase ähnliche Eigenschaften, wie sie in anderen Systemen beschrieben wurden (22–25). Die spezifische Aktivität der Lymphocyten-ATPase ist recht gering. Die Membranen von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen zeigen eine doppelt so hohe (25), die von Hammelerythrocyten (mit hohem K<sup>+</sup>-Gehalt) ein hundertstel der Aktivität (26). Diese Daten korrelieren gut mit den Ergebnissen der Ouabain-Bindung. Bei Schafererythrocyten wurden 120 (27), bei Ehrlich-Ascites Tumorzellen  $8 \times 10^5$  (28), bei Humanerythrocyten 450 (8) spez. Bindungsstellen pro Zelle gefunden.

Der Vergleich der Hammelerythrocyten-ATPase mit niedrigem K<sup>+</sup>-Gehalt mit der Lymphocyten-ATPase ist deswegen sehr interessant, weil das Erythrocytenenzym durch einen spezifischen Antikörper (Anti L) ähnlich aktiviert wird, wie die Lymphocyten-ATPase durch Concanavalin A (8, 10, 26, 27, 29). Durch den Antikörper wird die Na<sup>+</sup>-abhängige ATP-Hydrolyse erhöht (26) oder in einem anderen System (29) die K<sup>+</sup>-Hemmung der ATPase verändert.

Bei den Lymphocyten geht die erhöhte K<sup>+</sup>- und Na<sup>+</sup>-Transportrate nach Mitogenzusatz mit einer erhöhten ATPase-Aktivität einher (8, 10, 12).

Es bestehen für diese Aktivierungen folgende Möglichkeiten:

1. Durch den Mitogeneinfluß werden schnell neue Transportsysteme synthetisiert. Diese Möglichkeit konnte schon früher ausgeschlossen werden, da nach Zusatz von Puromycin und Actinomycin noch eine erhöhte Na<sup>+</sup>-Transportrate nachzuweisen war (4). Außerdem läßt sich, wie hier gezeigt wird, eine Aktivierung der Membran-ATPasen auch an isolierten Zellmembranen nachweisen, wo eine Neusynthese dieses Enzyms äußerst unwahrscheinlich ist.
2. Durch das Mitogen werden stumme Enzymeinheiten der Zellmembran demaskiert und aktiviert, dadurch eine Zunahme der Anzahl aktiver ATPasen bewirkt. Diese Möglichkeit wurde durch Ouabain-Bindungsstudien aufgezeigt (8, 9).
3. Das Mitogen hat einen direkten Effekt auf die ATPase durch eine z. B. allosterische Wirkung auf das Enzym selber, oder die Membranphospholipide oder auf eine Teilreaktion wie die Dephosphorylierung (30).
4. Durch das Mitogen wird die passive Permeabilität der Zellmembran für Ionen verändert, sodaß es über eine veränderte intrazelluläre Ionenkonzentration zu einer Aktivierung der ATPase kommt. An der isolierten Zellmembran wäre eine erleichterte Permeabilität der Kationen und damit bessere Diffusion in die Membranesikel und damit an die K<sup>+</sup>-, Na<sup>+</sup>- oder Mg<sup>2+</sup>-Bindungsstellen des Enzyms vorstellbar.

Diese Arbeit wurde mit dem Ziel vorgenommen, die 3. Möglichkeit, nämlich den allosterischen Effekt zu untersuchen.

An intakten Zellen wird die Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>-ATPase durch extrazelluläres Na<sup>+</sup> gehemmt und extrazelluläres K<sup>+</sup> aktiviert, während das intrazelluläre Na<sup>+</sup> aktiviert und K<sup>+</sup> hemmt. Die Empfindlichkeit der stimulierten ATPase auf Veränderungen der beiden Kationen ist von besonderem Interesse, weil zu erwarten war, daß bei einem allosterischen Effekt des Mitogens auf dieses Enzym sich die Na<sup>+</sup>- oder K<sup>+</sup>-Empfindlichkeit ändern würde. Eine solche Affinitätsveränderung konnte aber nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die etwas stärkere Aktivierung bei niedrigen Kaliumkonzentrationen reicht nicht aus, zumal es zu einer Aktivierung des ATPase-Systems auch ohne Kalium kommt (Abb. 4). Dies schließt eine Veränderung des Enzyms hinsichtlich der Kaliumaffinität allerdings nicht völlig aus, weil noch geringe Mengen von K<sup>+</sup> an der Membran gebunden vorliegen können, obwohl diese 3mal in Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-freiem Medium auf der Ultrazentrifuge gewaschen wurde.

Bei den Arbeiten an isolierten Plasmamembranen ist zu bedenken, daß die Liganden nicht so ausgerichtet sind, wie bei den intakten Zellen, die für die Regulation des Enzymsystems so wichtige Ausrichtung der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Bindungsstellen also gestört ist. Dies kann bedeuten,

daß allosterische Effekte durch veränderte  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -Konzentrationen sich bei den Plasmamembranen nicht so zeigen, wie an intakten Zellen.

Eine Aktivierung der ATPase wurde bei sämtlich verwendeten ATP-Konzentrationen (250; 25; 2,5  $\mu\text{mol/l}$ ) gefunden. Der Grad der Aktivierung unterscheidet sich bei den einzelnen ATP-Konzentrationen nicht signifikant. Eine Hill-Analyse konnte nicht durchgeführt werden, weil nur bei den 3 verschiedenen Substratkonzentrationen getestet wurde. Auch eine Veränderung der  $\text{Mg}^{++}$ -Konzentrationen im Medium zeigte keinen Einfluß auf den Grad der Aktivierung der ATPasen durch Concanavalin A.

Die Ergebnisse machen es unwahrscheinlich, daß Concanavalin A einen allosterischen Effekt auf die ATPasen der isolierten Plasmamembranfraktion hat. Die Aktivierung muß also durch eine Demaskierung stummer Enzymeinheiten oder Veränderung an der Zellmembran vor sich gehen. Für eine Aktivierung innerhalb des ATPase-Enzymkomplexes spricht auch, daß die *p*-Nitrophenylphosphatase durch Concanavalin A aktiviert wird (30).

Die Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Av 2/2) unterstützt.

## Literatur

- Greaves, M. F. & Bauminger, S. (1972), *Nature* 235, 67–69.
- Quastel, M. R. & Kaplan, I. J. (1970), *Nature* 219, 198–199.
- Quastel, M. R. & Kaplan, I. J. (1970), *Exp. Cell Res.* 63, 230–233.
- Averdunk, R. (1972), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 353, 79–87.
- Resch, K. & Ferber, E. (1972), *Eur. J. Biochem.* 27, 153–161.
- Ferber, E. & Resch, K. (1973), *Biochim. Biophys. Acta* 296, 335–349.
- Hayden, G. A., Crowley, G. M. & Jamuson, G. A. (1970), *J. Biol. Chem.* 245, 5827–5832.
- Averdunk, R. & Lauf, P. K. (1975), *Exp. Cell Res.* 93, 331–342.
- Quastel, M. R. & Kaplan, I. G. (1975), *Exp. Cell Res.* 93, 612–619.
- Averdunk, R. & Lauf, P. K. (1973), *J. Gen. Physiol.* 62, 654.
- Novogrodsky, A. (1972), *Biochim. Biophys. Acta* 266, 343 bis 349.
- Pomier, G., Riport, G., Azonlay, E. & Depuds, R. (1975), *Biochim. Biophys. Acta* 389, 483–494.
- Michell, R. H. & Hawthorne, J. N. (1965), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 21, 333–338.
- Fiske, Ch. & Subbarow, Y. (1925), *J. Biol. Chem.* 66, 375–384.
- Mehdi, Q. & Nussey, St. (1975), *Biochem. J.* 145, 105–110.
- Earl, D. C. N. & Korner, A. (1965), *Biochem. J.* 94, 721–734.
- Hübscher, G. & West, G. R. (1965), *Nature* 205, 799–801.
- Ammon, J. (1970), *Schweiz. Med. Wochenschr.* 100, 1317–1320.
- Liss, E., Palme, G. & Oeff, K. (1968), *Z. Krebsforschung.* 71, 89–96.
- Lawry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951), *J. Biol. Chem.* 193, 265–269 (1951).
- Röschlau, P., Bernt, E. & Gruber, W. (1974), *diese Z.* 12, 403–407.
- Blostein, R. (1970), *J. Biol. Chem.* 245, 270–275.
- Post, R. L., Sen, A. K. & Rosenthal (1965), *J. Biol. Chem.* 240, 1437–1445 (1965).
- Baker, P. F. & Willis, J. S. (1969), *Biochim. Biophys. Acta* 183, 646–649.
- Colombini, M. & Johnstone, R. M. (1973), *Biochim. Biophys. Acta* 323, 69–86.
- Blostein, R., Lauf, P. K. & Tosteson, D. C. (1971), *Biochim. Biophys. Acta* 249, 623–627.
- Joiner, C. H. & Lauf, P. K. (1975), *J. Membran Biol.* 21, 99–112.
- Averdunk, R., Ostapovicz, B. & Günther, Th. (1975), *diese Z.* 13, 361–366.
- Ellory, I. C. & Charleton, S. (1974), *Biochim. Biophys. Acta* 363, 397–403.
- Averdunk, R., Müller, J. & Wenzel, B. (1976), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 357, 673–681.

Priv. Doz. Dr. R. Averdunk  
Hindenburgdamm 30  
D-1000 Berlin 45