

# Die Aufnahme und Abgabe von Kalziumionen durch sarkoplasmatische Vesikel des Kaninchenskelettmuskels unter dem Einfluss von Äthanol

Autor(en): **Jenny, E.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires**

Band (Jahr): **112 (1970)**

Heft 9

PDF erstellt am: **21.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-591678>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Aus dem Institut für Pharmakologie und Biochemie,  
Veterinärmed. Fakultät der Universität Zürich  
(Direktor: Prof. Dr. med. E. Jenny)

## Die Aufnahme und Abgabe von Kalziumionen durch sarkoplasmatische Vesikel des Kaninchenskelettmuskels unter dem Einfluß von Äthanol<sup>1</sup>

Von E. Jenny

### 1. Einleitung

Das sarkoplasmatische Retikulum (SR) nimmt in der Exzitations-Kontraktions-Kupplung eine zentrale Stelle ein [1, 2]. Sein Einfluß auf die Muskelrelaxation ist gut bekannt [3, 4, 5], und biochemische Aspekte der Kalziumaufnahme wurden von vielen Autoren bearbeitet [6, 7, 8]. Der jeweilige Stand der Forschung ist in zahlreichen Übersichtsarbeiten [9, 10, 11] dargelegt.

Leider aber sind wir über den Mechanismus der Freisetzung von Kalziumionen nach einer Membrandepolarisation noch völlig im ungewissen. Es ist deshalb auch unmöglich, die In-vivo-Wirkung von Pharmaka auf das SR in vollem Umfang abzuklären. In-vitro-Experimente zeigen klar, daß Pharmaka verschiedenster chemischer Strukturen die Kalziumaufnahme hemmen, zum Beispiel Amytal [5, 12], Salyrgan [4, 13], Dinitrophenol [12, 14], Atebrin [5, 12], Thioharnstoff [12], Parachloromercuribenzoat [12, 14], Deoxycholsäure [15], Chinidin [16], Koffein [17] und einige Psychopharmaka [18]. Ebenso ist bekannt, daß elektrische Stromstöße, Herzglykoside und andere Steroide den passiven Ausstrom von Kalziumionen fördern [19, 20].

Viele Forscher haben versucht, über künstlich gesetzte Modifikationen der Membran Einblick in den molekularen Funktionsmechanismus des SR zu gewinnen. Hasselbach und Mitarb. [21] sowie Diehl und Mitarb. [22] untersuchten die Funktion des SR nach Ultraschallbehandlung und fanden dabei eine Entkopplung der Kalziumspeicherung von der ATP-ase-Aktivität. Inesi und Mitarb. [23] behandelten die Membranen mit Aceton, Äther, verschiedenen Alkoholen und Halothan. Sie entdeckten, daß vor allem Äther die Speicherung von Kalziumionen aufhebt, ohne die ATP-ase zu beeinträchtigen. Graesner und Mitarb. [24] sowie Fiehn und Hasselbach [25] haben diesen Äthereffekt näher untersucht und stellten fest, daß kleine Ätherkonzentrationen, die die Kalziumpumpe «entkoppeln», vor allem Cholesterin aus den Membranen herauslösen. Höhere Ätherkonzentrationen, die die ATP-ase inaktivieren, entziehen den Membranen neutrale Lipide und Phospholipide.

---

<sup>1</sup> Herrn Prof. Dr. K. Ammann, mit den besten Wünschen zu seinem 65. Geburtstag.

Wir führten mit dieser Arbeit die eben besprochenen Versuche weiter und setzten uns das Ziel, ein Lösungsmittel zu finden, das unter Umständen die Kalziumaufnahme nur teilweise hemmt. Außerdem wollten wir die Kalziumempfindlichkeit der ATP-ase von SR studieren, das kein Kalzium mehr speichert. Wir berichten im folgenden über Resultate, die wir nach Zusatz von 5% Äthanol zu SR aus Kaninchenskelettmuskel erhalten haben.

## 2. Material und Methoden

2.1. *Material*: Adenosin-5'-triphosphat (ATP), low calcium grade (Sigma); Ca-45 radioaktives Kalzium (EIR, Schweiz); Butyl-PBD, PBBO (Ciba); Aerosil-200 (De gussa); EGTA, Äthylenglykoldiaminotetraacetat (Fluka AG). Die übrigen Reagentien waren übliche Handelspräparate vom besten Reinheitsgrad.

2.2. *Präparation des sarkoplasmatischen Retikulums (sarkoplasmatische Vesikel)*: SR wurde aus der Hinterschenkelmuskulatur von Kaninchen nach der Methode von Nagai und Mitarb. [26] präpariert. Das Präparat wurde mit einem Teflon-Homogenisator in 100 mM KCl, 1 mM K-Oxalat, pH 7, suspendiert und bei 4° aufbewahrt.

2.3. *Bestimmung der Kalziumaufnahme*: Das Inkubationsmilieu enthielt 100 mM Tris-Maleatpuffer, pH 7, 70 mM KCl, 6 mM Mg-ATP, 5 mM K-Oxalat und 0,1 mM CaCl<sub>2</sub> (Ca-45 1 mC/mM). Die Vesikeleiweißkonzentration betrug zwischen 25 und 50 µg/ml. Gesamtvolumen 10 ml, Versuchstemperatur 22°. Der Ansatz wurde während des Versuches mit einem Magnetrührer sanft durchgemischt. Aliquote Proben wurden zu den in den Abbildungen angegebenen Zeitpunkten entnommen.

2.4. *Messung der passiven Kalziumfreigabe*: SR wurde mit radioaktivem Kalzium unter den in Abschnitt 2.3. beschriebenen Versuchsbedingungen gefüllt. Die Kalziumkonzentration wurde dazu auf 0,15 mM, die Eiweißkonzentration auf 300 µg/ml erhöht. Nach einer Inkubation von 10 Minuten wurde das Gemisch bei 4° eine Stunde bei 35000 g zentrifugiert und der Niederschlag darauf mit einem Teflonhomogenisator in 100 mM KCl, 0,1 mM K-Oxalat, pH 7, suspendiert. Unmittelbar darauf wurde die Kalziumfreigabe bei 22° in folgendem Ansatzmilieu geprüft: 100 mM Tris-Maleat-Puffer, pH 7, 70 mM KCl, 1 mM K-Oxalat und 100 µg/ml Vesikeleiweiß. Die Lösung wurde mit einem Magnetrührer dauernd bewegt. Proben entnahmen wir zu den in den Abbildungen angegebenen Versuchszeiten. Der nach einer Minute erhaltene Wert wurde als Nullwert eingesetzt.

2.5. *Messung der Radioaktivität*: Die zu messenden Proben wurden durch Millipore-Filter (0,22 µm) gepreßt, und 0,1 ml des Filtrates gaben wir in 10 ml der Szintillationsmischung. Der Szintillator hatte folgende Zusammensetzung: Butyl-PBD 10 g, PBBO 0,1 g, Toluol 400 ml, Methanol 600 ml, Aerosil-200 3 g. Alle Proben wurden in einem Packard-Tricarb-Spektrometer-3375 ausgezählt (Zählfehler < 1,5%).

2.6. *Übrige Messungen*: Eiweißkonzentrationen wurden mit einer Biuretmethode gemessen. Die ATP-ase-Aktivität bestimmten wir unter den in Abschnitt 2.3. angegebenen Versuchsbedingungen, wobei die Proteinkonzentration 500 µg/ml betrug. Die Kalziumkonzentrationen sind den Abbildungen zu entnehmen. Die Äthanolkonzentration betrug in den entsprechenden Versuchen 5% (v/v). Phosphat wurde nach Fiske und Subbarow bestimmt.

## 3. Resultate

Die Aufnahmegeschwindigkeit und die Speicherkapazität von Kalziumionen durch das SR werden durch entsprechende Vorinkubation des Ansatzes mit Äthanol (5% v/v) herabgesetzt. Die Hemmung steht in Beziehung

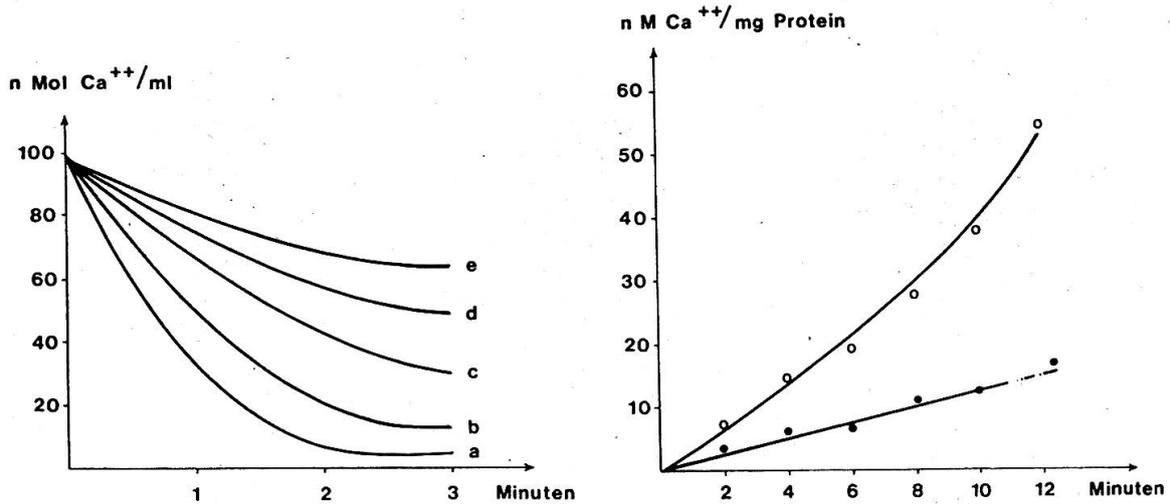


Abb. 1 Die Aufnahme und Speicherung von Kalziumionen durch sarkoplasmatische Vesikel in Abhängigkeit von der Vorinkubationszeit in 5% Äthanol. Ansatzbedingungen siehe Abschnitt 2.3. Eiweißkonzentration 50  $\mu$ g/ml. Ordinate: Freie Kalziumionenkonzentration im Versuchsansatz.

a = Kontrolle ohne Äthanol; b, c, d und e = 10, 20, 30, 40 Minuten Vorinkubation des Ansatzes bei 22° in 5% Äthanol ohne Mg-ATP.

Abb. 2 Steigerung des passiven Effluxes von Kalziumionen aus sarkoplasmatischen Vesikel durch Äthanol.

. . . . Kontrolle ohne Äthanol (siehe 2.4).

o - o - o Efflux nach Zusatz von 5% Äthanol (v/v).

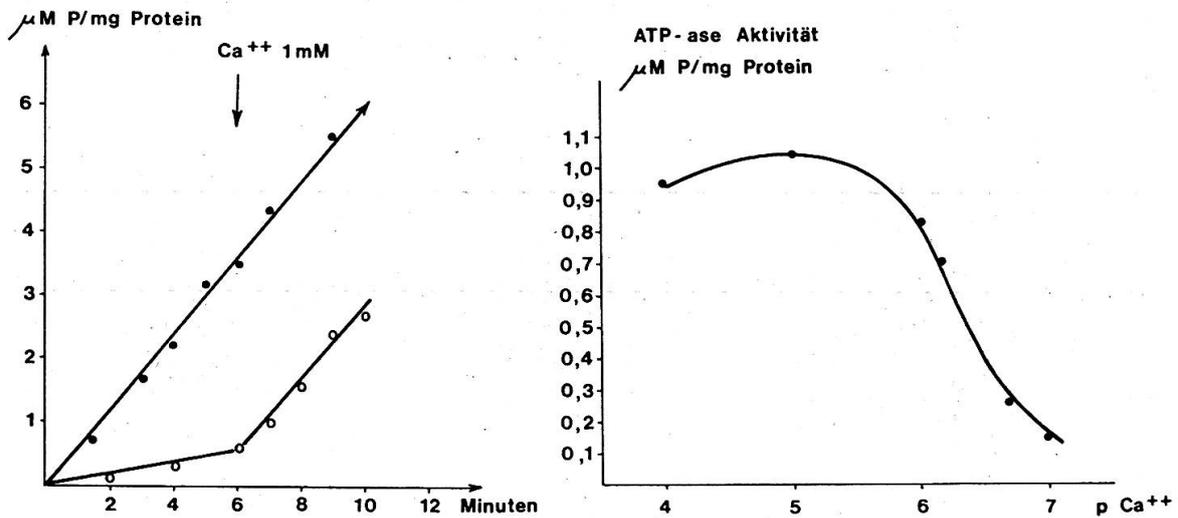


Abb. 3 ATP-ase Aktivität sarkoplasmatischer Vesikel ohne und mit Zusatz von Äthanol.

o - o - o Kontrolle.

. . . . Vorinkubation des Ansatzes ohne Mg-ATP in 5% Äthanol während 40 Minuten.

Abb. 4 Spezifische Aktivität der ATP-ase sarkoplasmatischer Vesikel, die nach Alkoholbehandlung keine Kalziumionen mehr speichern können. Direkte Abhängigkeit der Aktivität von pCa<sup>++</sup> in der Außenflüssigkeit.

zur Dauer der Vorinkubation (Abb. 1). Das Maß der Reduktion ist von Versuch zu Versuch verschieden und hängt nicht nur von der Inkubationszeit, sondern auch vom Alter des SR-Präparates, der Temperatur und dem pH ab. Alterung, Erhöhung der Temperatur und Verschiebung des pH nach alkalischen Werten steigern die Empfindlichkeit. Die zu diesen Aussagen führenden Versuchsserien sind in dieser Arbeit nicht aufgeführt.

Die apparente Hemmung der Aufnahmegeschwindigkeit und der Speicherung kann verschiedene Ursachen haben. Normalerweise ist unter optimalen Bedingungen der aktive Influx etwa 650mal stärker als der passive Efflux [11, 19]. Hemmung des Influxes, Steigerung des Effluxes oder eine Kombination beider Möglichkeiten könnten die Äthanolwirkung erklären. Wir haben im folgenden die Wirkung von Äthanol auf den passiven Efflux und die ATP-ase-Aktivität untersucht.

Aus Abb. 2 geht hervor, daß Äthanol den passiven Efflux gespeicherter Kalziumionen steigert. Unter den gewählten Versuchsbedingungen beträgt der Efflux unter Äthanol etwa das Sechsfache. Die Extra-ATP-ase wird durch Äthanol nicht gehemmt. Ihre Aktivität ist gleich wie unter maximaler Stimulation durch Kalziumionen und beträgt etwa das Sechsfache der Basis-ATP-ase (Abb. 3).

Unter Verwendung von Ca-EGTA-Puffern [27]<sup>1</sup> haben wir die Empfindlichkeit der ATP-ase von SR, das nach entsprechender Vorinkubation mit Äthanol kein Kalzium mehr speicherte, geprüft. Wie aus Abb. 4 hervorgeht, setzt die ATP-ase-Aktivität bei einem  $pCa^{++}$  von 7 ein und erreicht bei einem  $pCa^{++}$  von 5 ihr Maximum. Die Aktivität der ATP-ase blieb bei den eingestellten Kalziumionenkonzentrationen über mindestens zehn Minuten konstant, so daß keine wesentliche Speicherung vorliegen kann.

#### 4. Diskussion

Unsere Untersuchungen ergeben, daß durch Inkubation von SR in 5% Äthanol enthaltendem Milieu die apparente Aufnahmegeschwindigkeit und die Speicherung von Kalziumionen vermindert werden können. Da beide Parameter Resultanten zweier gegenläufiger Prozesse, des aktiven Influxes und des passiven Effluxes, sind, erhebt sich die Frage, ob durch Äthanol der Influx vermindert oder der Efflux vermehrt wird oder ob gar eine Kombination zweier Effekte vorliegt.

Auf Grund unserer Resultate können wir noch keine endgültige Antwort geben. Wir stellen einerseits fest, daß Äthanol den passiven Efflux steigert, andererseits aber die spezifische ATP-ase-Aktivität nicht beeinträchtigt. Mit anderen Worten wird unter Äthanol-Einfluß weniger Kalzium pro Zeiteinheit in die Vesikel aufgenommen, obschon die ATP-ase auf vollen Touren läuft, ein Geschehen, das man «Entkopplung» nennen kann. Es bleibt aber

<sup>1</sup> Ich möchte an dieser Stelle Frau Prof. H. Portzehl für ihre Hilfe bei der Herstellung der Kalziumpuffer herzlich danken.

zu klären, ob tatsächlich die Pumpenleistung abnimmt oder ob bei normaler Effektivität der Pumpe nur vermehrt Kalziumionen über ein «Alkohol-leck» die Vesikel wieder verlassen. Nur im ersten Falle wären wir berechtigt, von einer echten Entkopplung zu sprechen.

Theoretisch scheint die Lösung einfach zu sein, da man bloß den Influx und den Efflux sowie die ATP-ase-Aktivität mit und ohne Äthanol gegeneinander zu «verrechnen» braucht, um das gewünschte Resultat zu erhalten. Tatsächlich ist aber die Kinetik des Kalziumtransportes recht kompliziert und in hohem Maße vom Ionenmilieu abhängig [8, 17, 28]. Außerdem werden die Membranen durch Äthanol in verschiedenen Versuchsansätzen unterschiedlich verändert, so daß es sehr schwierig ist, vergleichbare Bedingungen zu erhalten. Zusätzlich erhebt sich die Frage, ob die Kalziumempfindlichkeit der mit Äthanol behandelten SR-ATP-ase nicht auch modifiziert wird. Portzehl und Mitarb. [27] stellten fest, daß die enzymatische Aktivität isolierter Myofibrillen aus *Maia Squinado* bei einem  $pCa^{++}$  von 7 einsetzt und bei einem  $pCa^{++}$  von 5 ihren maximalen Wert erreicht. Diese Aktivität läuft genau parallel der mit Äthanol behandelten Extra-ATP-ase des SR (Abb. 4). Andererseits fanden Makinose und The [28], daß bei ihrer Versuchsanordnung die Extra-ATP-ase erst bei einer  $Ca^{++}$ -Konzentration in der Außenflüssigkeit von  $2 \cdot 10^{-9}$  M «abstellt».

Aus unseren Versuchen können wir bisher also nur schließen, daß der erhöhte passive Efflux eine, aber nicht, daß er die einzige Wirkung des Äthanols auf das SR ist.

### 5. Zusammenfassung

Die Aufnahmegeschwindigkeit und die maximale Speicherkapazität von Kalziumionen durch sarkoplasmatische Vesikel aus Kaninchenskelettmuskel werden durch Vorinkubation in Äthanol (5% v/v) vermindert. Die  $Ca^{++}$ -aktivierte ATP-ase behält dabei aber ihre volle Aktivität. Diese apparente «Entkopplung» der Kalziumpumpe reflektiert eine Änderung im Verhältnis zwischen Kalziumaufnahme und Kalziumabgabe. Letztere wird durch Äthanol gesteigert. Unsere Resultate geben aber noch keine genügende Erklärung des Äthanoleffektes. Die ATP-ase sarkoplasmatischer Vesikel, die keine Kalziumionen mehr speichert, wird durch Kalziumionen im Bereich von  $pCa^{++}$  7 bis  $pCa^{++}$  5 aktiviert.

### Résumé

La rapidité d'absorption et la capacité d'emmagasinage maximales de ions calciques par les tubes sarcoplasmiques des muscles striés du lapin sont abaissées par une pré-incubation dans l'éthanol (5% v/v). Le ferment de l'acide triphosphorique activé par  $Ca^{++}$  conserve toute son activité. Cette dissociation apparente de l'équilibre calcique reflète une modification dans le degré d'absorption et d'élimination du calcium. Cette dernière est augmentée par l'éthanol. Les résultats obtenus ne permettent pas

de donner une explication suffisante du mode d'action de l'éthanol. La triphosphatase des tubes sarcoplasmiques est activée par des ions calciques au niveau de  $pCa^{++} 7$  à  $pCa^{++} 5$  lorsque les tubes n'emmagasinent plus de ions de calcium.

### Riassunto

La velocità di assorbimento di membrane sarcoplasmatiche di muscolatura scheletrica di coniglio viene diminuita (5% v/v) con una preincubazione in etanolo. La ATP-asi attivata con ioni di Ca mantiene la sua piena attività. L'apparente «sganciamento» della pompa Ca riflette una differenza nel rapporto fra assorbimento ed eliminazione del calcio. L'eliminazione viene attivata con etanolo. I risultati non danno una sufficiente chiara risposta dell'effetto dell'etanolo. La ATP-asi di membrane sarcoplasmatiche, che non alimentano più ioni di Ca, viene attivata dai ioni di Ca nel campo di  $pCa^{++} 7$  fino a  $pCa^{++} 5$ .

### Summary

The rate of uptake and the maximum storage capacity of calcium ions in the sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle are reduced after a preincubation in ethanol (5% v/v). The specific activity of the  $Ca^{++}$  activated ATP-ase is not lowered. This apparent "uncoupling" of the calcium storing enzyme system must be the consequence of a change in the relationship between calcium uptake and release. We found that ethanol is enhancing the latter one but our results don't yet give a full explanation of the facts. The ATP-ase of sarcoplasmic reticulum having completely lost its storage capacity is activated by calcium ions in the range of a  $pCa^{++}$  of 7 to a  $pCa^{++}$  of 5.

### Literatur

- [1] Porter K.R. and Palade G.E.: Studies on the endoplasmic reticulum III. Its form and distribution in striated muscle cells. *J. biophys. biochem. Cytol.* 3, 269 (1957). – [2] Peachey L.D.: The sarcoplasmic reticulum and transverse tubules of the frog's sartorius. *J. Cell Biol.* 25, 209 (1965). – [3] Ebashi S.: A granule bound relaxation factor in skeletal muscle. *Arch. biochem. Biophys.* 76, 410 (1958). – [4] Hasselbach W. und Makinose M.: Die Calciumpumpe der «Erschlaffungsgrana» des Muskels und ihre Abhängigkeit von der ATP-Spaltung. *Biochem. Z.* 333, 518 (1961). – [5] Muscatello N., Anderson-Cedergren E. and Azzone G.F.: The mechanism of muscle-fibre relaxation, adenosine-triphosphatase and relaxing activity of the sarcotubular system. *Biochem. biophys. Acta* 63, 55 (1962). – [6] Hasselbach W. und Makinose M.: Über den Mechanismus des Calciumtransportes durch die Membranen des sarkoplasmatischen Retikulum. *Biochem. Z.* 339, 94 (1963). – [7] Martonosi A. and Feretos R.: Sarcoplasmic reticulum I. The uptake of  $Ca^{++}$  by sarcoplasmic reticulum fragments. *J. biol. Chem.* 239, 648 (1964). – [8] Weber A., Herz R. and Reiss J.: Study of the kinetics of calcium transport by isolated fragmented sarcoplasmic reticulum. *Biochem. Z.* 345, 329 (1966). – [9] Huxley A.F.: Local activation of muscle. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 81, 446 (1959). – [10] Porter K.R.: The sarcoplasmic reticulum. Its recent history and present status. *J. biophysic. Biochem. Cytol.* 10, 219 (1961). – [11] Hasselbach W.: Relaxing factor and the relaxation of muscle. *Progr. Biophys. Mol. Biol.* 14, 169 (1964). – [12] Carsten M. and Mommaerts W.F.H.M.: The accumulation of calcium ions by sarcotubular vesicles. *J. gen. Physiol.* 48, 183 (1964). – [13] Martonosi A. and Feretos R.: Sarcoplasmic reticulum II. Correlation between adenosine triphosphatase activity and  $Ca^{++}$  uptake. *J. biol. Chem.* 239, 656 (1964). – [14] Kloot N.G. van der: Inhibition of active  $Ca^{++}$  uptake by fragments of the sarcoplasmic reticulum of lobster muscle. *Comp.*

Biochem. Physiol. 17, 75 (1966). – [15] Ebashi S. and Lipmann F.: Adenosine triphosphate linked concentration of calcium ions in a particulate fraction of rabbit muscle. J. Cell Biol. 14, 389 (1962). – [16] Gertz E. W. and Briggs F. N.: Effect of Quinidine on calcium accumulation by isolated sarcoplasmic reticulum of skeletal and cardiac muscle. J. gen. Physiol. 52, 955 (1968). – [17] Weber A.: Mechanism of the action of Caffeine on sarcoplasmic reticulum. J. gen. Physiol. 52, 760 (1968). – [18] Balzer H. and Makinose M.: The inhibition of the sarcoplasmic calcium pump produced by agents which react with its lipid component: Reserpine, Prenylamine, Chlompromazine, Imipramine. Arch. Pharm. exp. Path. 259, 151 (1968). – [19] Turina M. and Jenny E.: Studies on the in vitro uptake and release of  $\text{Ca}^{++}$  in sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. Cardiologia 53, 193 (1968). – [20] Hirzel H. O.: Die Beeinflussung der Calciumpumpe des sarkoplasmatischen Reticulums aus Kaninchen-Skelettmuskulatur durch Steroidhormone, Ergocalciferol und  $\alpha$ -Tocopherol. Dissertation Universität Zürich (1969). – [21] Hasselbach W., Seraydarian K., Makinose M., Uchida K. and Mommaerts W. F. H. M.: Attempt to detach calcium transport mechanism from the structure of the sarcotubular vesicles. Fed. Proc. (USA) 24, 599 (1965). – [22] Diehl F., Makinose M. and Hasselbach W.: Calcium uptake and ATP-ase activity in sarcoplasmic reticulum. Fed. Proc. (USA) 24, 440 (1965). – [23] Inesi G., Goodman J. and Watanabe E.: Studies of the mechanism of calcium uptake by fragments of sarcoplasmic membranes. Effect of organic solvents. Proc. Western Pharm. Soc. 10, 39 (1967). – [24] Graesner M. L., Cassens R. G., Hoekstra W. G. and Briskey E. J.: Effects of diethyl ether and thymol on the ultrastructural and biochemical properties of purified sarcoplasmic reticulum fragments from skeletal muscle. Biochem. biophys. Acta 193, 73 (1969). – [25] Fiehn W. and Hasselbach W.: Effect of diethyl ether upon the function of the vesicles of sarcoplasmic reticulum. Eur. J. Biochem. 9, 574 (1969). – [26] Nagai T., Makinose M. and Hasselbach W.: Der physiologische Erschlaffungsfaktor und die Muskelgrana. Biochem. biophys. Acta 43, 223 (1960). – [27] Portzehl H., Zaoralek P. and Grieder A.: Der Calciumspiegel in lebenden und isolierten Muskelfibrillen von Maia Squinado und seine Regulierung durch die sarkoplasmatischen Vesikel. Pflügers Archiv 286, 44 (1965). – [28] Makinose M. and The R.: Calcium-Akkumulation und Nucleosid-Triphosphat-Spaltung durch Vesikel des sarcoplasmatischen Reticulum. Biochem. Z. 343, 383 (1965).