J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 14, 1976, pp. 365–371

Wirkungen des „Ca-Ionophors“ X-537 A auf den Elektrolytgehalt und Stoffwechsel von Yoshida-Ascites-Tumorzellen: Ein Modell zur Analyse des Mg-Mangels

Von T. Günther und R. Averdunk

Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik und Institut für klinische Chemie und klinische Biochemie,
Freie Universität Berlin

(Eingegangen am 4. Februar/20. April 1976)

Zusammenfassung: X-537 A, ein Ionophor für zweiwertige Kationen, bewirkt einen schnellen Ersatz von extrazellulärem Na^+ gegen intrazelluläres K^+ . Durch hohe extrazelluläre K^+ -Konzentrationen läßt sich der K^+ -Verlust verhindern. In Ca^{2+} -haltigen Inkubationslösungen nimmt der Ca^{2+} -Gehalt der Tumorzellen zu. Der Mg^{2+} -Gehalt wird durch X-537 A nicht beeinflusst. Der Gehalt an cycl. AMP steigt.

In allen verwendeten Inkubationsmedien nimmt unter X-537 A die Biosynthese in der Reihenfolge: RNA > DNA > Protein bei konstant bleibender ATP-Konzentration ab.

Die Wirkungen von X-537 A auf den Elektrolyt- und cycl. AMP-Gehalt sowie auf den Stoffwechsel von DNA, RNA und Protein bei Yoshida Ascites Tumorzellen entsprechen den bei diesen Zellen im Mg-Mangel beobachteten Änderungen. Diese Wirkungen werden durch die Änderung der intrazellulären Ca^{2+} - und/oder K^+ -Konzentration verursacht.

Action of the "Ca-ionophore" X-537A on the electrolyte content and metabolism of Yoshida ascites tumour cells: A model for the analysis of Mg deficiency

Summary: X-537 A, an ionophore for divalent cations, causes a rapid replacement of extracellular Na^+ by intracellular K^+ in Yoshida ascites tumour cells. The loss of K^+ is prevented by high extracellular concentrations of K^+ . In incubation solutions containing Ca^{2+} , the Ca^{2+} content of the tumour cells increases in the presence of X-537 A, but the Mg^{2+} content is not affected. The intracellular level of cyclic AMP is also increased.

In all the incubation media used, the presence of X-537 A resulted in a decrease in biosynthesis in the order RNA > DNA > protein, at constant ATP concentration. The observed changes in the content of electrolytes and cyclic AMP, and on the metabolism of DNA, RNA and protein in Yoshida ascites tumour cells in response to X-537 A, correspond to those observed during Mg deficiency in these cells. These changes are caused by changes in the intracellular concentrations of Ca^{2+} and/or K^+ .

Einführung

Im Mg-Mangel treten Änderungen des intrazellulären Na^+ -, K^+ -, Ca^{2+} -, Mg^{2+} - und cycl. AMP-Gehaltes auf. Gleichzeitig wird die Biosynthese von RNA, DNA und Protein gehemmt (1, 2). Die Beziehungen und die Kausalität zwischen diesen Veränderungen sind unklar. Im einzelnen ist ungeklärt, ob sich primär die Ca^{2+} -Ionenkonzentration in der Zelle erhöht und der K^+ -Verlust hierauf beruht (3) oder ob er unabhängig davon erfolgt. Es ist weiter zu klären, welches der intrazellulären Ionen durch seine geänderte intrazelluläre Konzentration die Änderungen im cycl. AMP-Gehalt und im Stoffwechsel hervorruft, oder ob primär der Gehalt an cycl. AMP

geändert wird und sich die Änderungen im Ionengehalt und Stoffwechsel sekundär einstellen.

Zusätzlich können im Mg-Mangel, der sich besonders bei gleichzeitigem Wachstum entwickelt, Veränderungen an den Ribosomen und in der Proteinbiosynthese eintreten (4, 5).

Zur Charakterisierung dieser komplexen Mechanismen können Ionophore beitragen, die die Permeabilität der Zellmembran für zweiwertige Kationen (mehr oder weniger) spezifisch erhöhen. Dadurch sollten sich innerhalb kurzer Zeit Änderungen im Kationengehalt ohne Sekundäreffekte ergeben. Wir untersuchten deshalb die

Wirkungen von X-537 A, einem Monocarboxypolyäther (6), auf den Elektrolytgehalt und Stoffwechsel von Yoshida-Ascites-Tumorzellen.

Material und Methoden

Yoshida-Ascites-Tumorzellen wurden von Mäusen 8 Tage nach intraperitonealer Inokulation gewonnen, zweimal in *Eagle*-Medium (7) und einmal in Inkubationsmedium gewaschen und in Inkubationsmedium aufgenommen. Die Zellkonzentration lag bei den Versuchen zwischen $1-5 \times 10^{10}/l$. Die Zellen wurden mit dem Coulter Counter Modell B gezählt.

Die Inkubation erfolgte bei 37°C in *Eagle*-Medium (mit Glucose [1 g/l], Vitaminen und Aminosäuren), dessen Kationenzusammensetzung nach Tabelle 1 variiert wurde. Die Inkubationsdauer und die Konzentrationen von X-537 A sind in den Legenden und Abbildungen enthalten. X-537 A wurde im jeweiligen Medium gelöst.

Kationengehalt

Zur Abtrennung vom Medium wurden die Zellen durch Phthalsäuredibutylester zentrifugiert und gefriergetrocknet. Anhaftende extrazelluläre Flüssigkeit wurde mit [^{14}C]Inulin bestimmt. Die Zellen wurden mit Trichloressigsäure [1 kg/l] aufgeschlossen, mit bidest. Wasser 1:10 verdünnt und das ausgefallene Protein abzentrifugiert. Nach entsprechender Verdünnung wurden Na^+ und K^+ flammenphotometrisch, Ca^{2+} und Mg^{2+} mittels Atomabsorptionsspektrometrie bestimmt.

$^{24}Na^+$ -Influx

Die Zellen ($1 \times 10^{10}/l$) wurden 30 min bei 37°C in Normalmedium (III) vorinkubiert. Danach wurde 10 $\mu mol/l$ bzw. 30 $\mu mol/l$ X-537 A zugesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 mCi/l $^{24}NaCl$ gestartet. Zu den angegebenen Zeiten wurde ein aliquoter Teil durch Zentrifugieren durch Phthalsäuredibutylester abgetrennt und seine Radioaktivität und Proteingehalt gemessen. Der Influx von $^{45}Ca^{2+}$ und $^{28}Mg^{2+}$ wurde analog gemessen.

$^{45}Ca^{2+}$ -Efflux

Die Zellen ($5 \times 10^9/l$) wurden 5 Stunden in Normalmedium (III) bei 37°C mit 3 mCi/l $^{45}CaCl_2$ beladen, danach 3 mal im gleichen Medium bei 4°C gewaschen und in Normalmedium (III) bei 37°C mit 10 $\mu mol/l$ bzw. 30 $\mu mol/l$ X-537 A in einer Zelldichte von $1 \times 10^{10}/l$ reinkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurde je 1 ml der Suspension auf der Mikrozentrifuge (Eppendorf) zentrifugiert. In 0,1 ml des Überstandes wurde die Radioaktivität gemessen. Der Efflux von $^{24}Na^+$ und $^{28}Mg^{2+}$ wurde analog bestimmt.

Syntheserate von DNA, RNA und Protein

Die Zellen wurden in 2,5 ml Medium I–IV (Tab. 1) mit je 0,5 mCi/l [^{14}C]Leucin, [^{14}C]Isoleucin und je 1 mCi/l [3H]Thymidin und [3H]Uridin inkubiert, danach abzentrifugiert und die Synthese mit 100 g/l Trichloressigsäure gestoppt. Die Auftrennung und Aktivitätsmessung der RNA, DNA und Protein wurde bereits ausführlich beschrieben (1). Die Bestimmung von RNA erfolgte nach I. c. (8), die von DNA nach I. c. (9) und die von Protein nach Lowry et al. (10).

Tab. 1. Kationengehalt der Inkubationsmedien.

Medium	Na^+	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}
	[mmol/l]			
I	140	4	10	0
II	70	70	10	1
III	140	4	2,5	1
IV	140	4	0	1

Radioaktivitätsmessung

Die Aktivität von $^{24}Na^+$ und $^{28}Mg^{2+}$ in den Überständen und Zellen wurden direkt im Autogamma (Fa. Berthold) gemessen. Die Aktivitäten von $^{45}Ca^{2+}$, ^{14}C und 3H wurden im Liquid-scintillationszähler (Fa. Beckman) in 10 ml Bray'scher Lösung bestimmt (1).

Energiestoffwechsel

Der O_2 -Verbrauch wurde manometrisch bei 37°C mit 0,2 ml 200 g/l KOH im Einsatz gemessen. Es wurden je 2×10^7 Zellen in 2,0 ml der Medien I–III suspendiert. Anaerobe Bedingungen wurden durch Begasen mit gereinigtem N_2 hergestellt. Die Glykolyserate wurde anhand des Glucoseverbrauchs und der Lactat-Bildung ermittelt. Glucose wurde mit Glucoseoxidase, Lactat und ATP im UV-Test (Boehringer, Mannheim) gemessen.

cycl. AMP

Zur Bestimmung von cycl. AMP wurden die abzentrifugierten Zellen 5 min auf 100°C erhitzt, mit 1 ml 0,15 mol/l NaCl-Lösung versetzt, zum vollständigen Zellaufschluß mit Ultraschall behandelt (Sonifier B 12, Fa. Branson) und zentrifugiert. In 50 μl des Überstandes wurde cycl. AMP mit dem Test-Kit der Fa. Boehringer bestimmt. Die Fehler bei dieser Bestimmung und die Werte nach Zumischung bekannter cycl. AMP-Mengen wurden ausführlich beschrieben (2).

Ergebnisse

Intrazellulärer Kationengehalt

Abbildung 1 zeigt das Verhalten der intrazellulären Na^+ - und K^+ -Konzentrationen in einem physiologischen Salzmedium, dessen Ca^{2+} -Konzentration variiert wurde. Der intrazelluläre Na^+ -Gehalt nimmt mit steigender Ca^{2+} -Konzentration zu. Das gleiche wurde auch an Leberzellen gefunden und ausführlich diskutiert (11). Zugabe von X-537 A bewirkt einen weiteren Anstieg der intrazellulären Na^+ -Konzentration. Bei hohem Ca^{2+} -Gehalt (20 mmol/l) im Medium ist die Wirkung von X-537 A viel geringer. (Daher wurde in den nachfolgenden Versuchen maximal 10 mmol/l Ca^{2+} verwendet.) Die intrazelluläre K^+ -Konzentration verhielt sich reziprok zum intrazellulären Na^+ -Gehalt. Die Ergebnisse zeigen, daß unter X-537 A intrazelluläres K^+ im gleichen Maß durch Na^+ ersetzt wurde. Im Ca^{2+} -freien Medium wurde K^+ im gleichen Maß durch Na^+ ersetzt. Der Mg^{2+} -Gehalt blieb immer konstant. Daraus folgt, daß das „Ca-Ionophor“ X-537 A nicht spezifisch für zweiwertige Kationen ist, sondern in physiologischen Salzlösungen vorzugsweise mit Na^+ reagiert und einen Austausch von Na^+ gegen K^+ bewirkt. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß in Ca^{2+} -haltigen Medien X-537 A neben dieser Wirkung auch primär den intrazellulären Ca^{2+} -Gehalt erhöht und dadurch auch sekundär eine Abnahme der K^+ - und Zunahme der Na^+ -Konzentration hervorruft (3). Um zwischen den Wirkungen einzelner Ionenarten differenzieren zu können, haben wir Inkubationsmedien (I–IV, Tab. 1) mit verschiedenen Na^+ , K^+ , Ca^{2+} und Mg^{2+} Konzentrationen verwendet.

In Na^+ -reichen, K^+ -armen physiologischen Salz-Medien mit 0 (IV), 2, 5 (III) und 10 mmol/l Ca^{2+} (I) nimmt durch X-537 A der Na^+ -Gehalt der Zellen stark zu und

Abb. 1. Einfluß von X-537 A auf die intrazelluläre Konzentration von Na^+ (a) und K^+ (b) in Yoshida-Ascitestumorzellen. Die Zellen wurden 60 Minuten bei 37°C in Eagle-Medium mit 0; 2,5; 5; 10 und 20 mmol/l Ca^{2+} inkubiert. Mittelwerte aus zwei Versuchen. $[\text{Ca}^{2+}]_e$ = Calciumkonzentration extrazellulär. ICF = Intrazelluläre Flüssigkeit.

Abb. 2. Intrazellulärer Gehalt von Na^+ (●), K^+ (○), Ca^{2+} (□) und Mg^{2+} (×) von Yoshida-Ascitestumorzellen in Abhängigkeit von der Ionophor-Konzentration. 30 Minuten Inkubation in Medium I, II und III. Mittelwerte aus 3 Versuchen. FG = Feuchtgewicht

der K^+ -Gehalt reziprok ab. Im Mg^{2+} -freien Medium mit 10 mmol/l Ca^{2+} (Medium I) ist in Übereinstimmung mit Abbildung 1 der intrazelluläre Na^+ -Gehalt höher und der K^+ -Gehalt niedriger als von Zellen, die im Normal-Medium III inkubiert wurden (Abb. 2). Im Medium II mit

70 mmol/l K^+ und 70 mmol/l Na^+ ist die Wirkung von X-537 A auf den Na^+ - und K^+ -Gehalt erheblich vermindert. Die intrazellulären Na^+ - und K^+ -Konzentrationen liegen im Medium II auch bei 30 $\mu\text{mol/l}$ X-537 A im Normalbereich.

Abb. 3a. Influx von $^{24}\text{Na}^+$ in Yoshida-Ascitestumorzellen. Nach 30 Minuten Vorinkubation in normalem Eagle Medium (III) wurde 10 $\mu\text{mol/l}$ X-537A (●), 30 $\mu\text{mol/l}$ X-537A (○) und anschließend 10 mCi/l $^{24}\text{NaCl}$ zugegeben. Kontrolle ohne X-537A (X). Mittelwerte aus zwei Versuchen.

Abb. 3b. Efflux von $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Nach Vorbeladung mit $^{45}\text{Ca}^{2+}$ in normalem Eagle-Medium (III) wurden die Yoshida-Ascitestumorzellen in gekühltem Eagle Medium gewaschen und in Radionuclidfreiem Medium (III) ohne (X), mit 10 $\mu\text{mol/l}$ X-537A (●) und 30 $\mu\text{mol/l}$ X-537A (○) reinkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurde die Radioaktivität in 0,1 ml des Überstandes gemessen. Mittelwerte aus 2 Versuchen.

Der Mg^{2+} -Gehalt ist bei hoher Ca^{2+} -Konzentration wahrscheinlich durch Kompetition um membrangebundene Liganden niedriger und wurde durch X-537A nicht beeinflusst. Der Ca^{2+} -Gehalt der Zellen nimmt proportional zur Ca^{2+} -Konzentration des Mediums zu. In welchem Maße sich diese Zunahme auf eine Bindung außen an die Zellmembran und auf eine Zunahme des intrazellulären Ca^{2+} -Gehalts verteilt, ist nicht meßbar. Tumorzellen sind zwar permeabel für Ca^{2+} , in Gegenwart von Glucose kommt es aber hier mit 0,2 mmol/l Ca^{2+} im Medium bei Ehrlich-Ascitestumorzellen zu keiner Nettoaufnahme von Ca^{2+} (12). Der Einfluß höherer extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen auf die intrazelluläre Na^+ - und K^+ -Konzentration (Abb. 1) läßt den Schluß zu, daß unter diesen Bedingungen etwas Ca^{2+} in die Zellen gelangt. Durch 10 und 30 $\mu\text{mol/l}$ X-537A wird der Ca^{2+} -Gehalt noch weiter – um etwa 40% – erhöht. Ob diese Zunahme im Cytoplasma oder in den Mitochondrien erfolgt, bleibt offen.

Die Änderungen der Na^+ , K^+ und Ca^{2+} -Verteilung sind, wie sich aus der Zeitabhängigkeit des intrazellulären Gehalts (nicht dargestellt) und der Fluxes (Abb. 3) ergibt, nach 15–30 min im steady state. Der Mg^{2+} -Flux wird in Übereinstimmung mit dem konstantbleibenden Mg^{2+} -Gehalt nicht signifikant beeinflusst.

Die Änderungen der Ionengehalte sind durch Änderungen der Membranpermeabilität bedingt. Eine allgemeine Zellschädigung oder Absterben der Zellen durch

X-537A ist auszuschließen, denn die Zahl der mit Trypanblau färbbaren Zellen ist bis zu einer Versuchszeit von 60 min zu vernachlässigen (Abb. 4).

Wirkungen auf den Stoffwechsel

Die höchsten Syntheseraten von DNA, RNA und Protein wurden im Normalmedium mit 2,5 mmol/l Ca^{2+} gemessen (Medium III). Im Medium I und IV betrugen die Einbau-raten etwa 90%, im Medium II jeweils nur 70% davon. Zugabe von 10 $\mu\text{mol/l}$ und 30 $\mu\text{mol/l}$ X-537A führt unabhängig vom Medium zur gleichen prozentualen Hemmung. Die Hemmung der RNA-Synthese war in

Abb. 4. Anteil der mit Trypanblau anfärbbaren Tumorzellen in Abhängigkeit von der Inkubation ohne (X), mit 10 $\mu\text{mol/l}$ X-537A (●) und 30 $\mu\text{mol/l}$ X-537A (○). Methode s. l. c. (1). Mittelwerte aus 2 Versuchen.

Abb. 5. Hemmung der Synthese von RNA, DNA und Protein durch X-537 A. Yoshida-Ascitestumorzellen wurden in Medium I (Δ), II ($\square$), III ($\circ$) und IV (∇) bei 37°C inkubiert. Nach 30 und 60 Minuten wurden aliquote Teile der Ansätze entnommen und die spezifischen Aktivitäten von RNA, DNA und Protein bestimmt. Die spezifischen Radioaktivitäten ohne X-537 A Zusatz wurden gleich 100% gesetzt. Mittelwerte aus 3 Versuchen.

Abb. 6. Einfluß von X-537 A auf die Atmung von Yoshida-Ascitestumorzellen. Inkubation in Medium I (Δ), II ($\square$), III ($\circ$). Mittelwerte aus 2 Versuchen.

Δ , $\square$, $\circ$ ohne X-537 A
 $\blacktriangle$, $\blacksquare$, $\bullet$ 10 $\mu\text{mol/l}$ X-537 A
 $\blacktriangle$, $\blacksquare$, $\bullet$ 30 $\mu\text{mol/l}$ X-537 A

allen Medien am geringsten, die der Proteinsynthese am stärksten (Abb. 5).

Die Abnahme der Syntheserate kann nicht durch fehlende Energiebereitstellung erklärt werden, denn der ATP-Gehalt der Zellen wurde durch die Wirkung von X-537 A nicht geändert, wohl aber die Atmung (Abb. 6). Mit 10 $\mu\text{mol/l}$ X-537 A stieg der O_2 -Verbrauch vorübergehend bis zu etwa 40 min an und nimmt bei weiterer Inkubation stark ab. Mit 30 $\mu\text{mol/l}$ X-537 A nimmt der

O_2 -Verbrauch sofort stark ab. Die anaerobe Glykolyse wird durch X-537 A nicht gehemmt. Die Tumorzellen können daher ihren ATP-Bedarf bei gehemmter Atmung durch vermehrte Glykolyse decken.

Der Gehalt an cycl. AMP nahm in allen Medien unter der Wirkung von 10 $\mu\text{mol/l}$ X-537 A um 60% und unter 30 $\mu\text{mol/l}$ X-537 A um 75% zu. Die Wirkungen von X-537 A auf Atmung, Glykolyse und ATP-Gehalt waren ebenfalls in allen Inkubationsmedien gleich.

Diskussion

Die Wirkungen von X-537 A auf den zellulären Kationengehalt zeigen, daß X-537 A nicht spezifisch mit zweiwertigen Kationen reagiert. Das gleiche Ergebnis wurde auch am Froschmuskel gefunden (13).

Unter X-537 A nimmt in Ca^{2+} -haltigen Medien auch der Ca^{2+} -Gehalt der Zellen zu. Da die extrazelluläre $[\text{Ca}^{2+}]$ konstant bleibt, wird unter der Wirkung von X-537 A entweder mehr Ca^{2+} in der Membran gebunden oder wahrscheinlicher mehr Ca^{2+} in die Zelle transportiert.

Ca^{2+} hat eine höhere Affinität zu X-537 A als Mg^{2+} (6). (Die Affinität von Kationen zum Ionophor und die Spezifität der Bindung hängen jedoch von der Polarität des Mediums ab, wie der Vergleich der Komplexbildungskonstanten für verschiedene ein- und zweiwertige Kationen in verschiedenen Lösungen (25 mmol/l Tricinpuffer, pH 9 (6) bzw. Ethanol (14) zeigt.) Somit läßt sich erklären, daß unter den gewählten Versuchsbedingungen der Mg^{2+} -Gehalt der Zellen nicht geändert wurde. Eine Auslösung der Effekte durch eine Abnahme der intrazellulären Mg^{2+} -Konzentration läßt sich daher ausschließen.

Für die Hemmung der DNA, RNA und Proteinsynthese und den Anstieg des cycl. AMP kommen die Abnahme des K^+ - sowie die Zunahme der Na^+ - und Ca^{2+} -Konzentration in Frage.

Die gleichstarke Wirkung von X-537 A im Medium mit 70 mmol/l Na^+ , 70 mmol/l K^+ und 10 mmol/l Ca^{2+} , wobei die intrazellulären Na^+ - und K^+ -Konzentrationen im physiologischen, normalen Bereich bleiben, zeigt, daß die Wirkungen in diesem Medium nicht durch Na^+ oder K^+ , sondern nur durch Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zustande kommen. Im Normalmedium (III) bzw. Ca^{2+} -freien Medium (IV), wo sich in der Zelle Na^+ und K^+ ändern, Ca^{2+} aber nur wenig oder überhaupt nicht zunimmt, kann man die Wirkungen auf die Abnahme des K^+ oder Zunahme des Na^+ zurückführen.

Eine Wirkung des Ca^{2+} ist aber in diesem Fall nicht auszuschließen. Man muß bedenken, daß vom zellulären Ca^{2+} -Gehalt der größte Teil an die Membran und inner-

halb der Zelle an Mitochondrien gebunden ist. Die wirk-same intrazelluläre Ca^{2+} -Ionenkonzentration in der Zelle liegt im Bereich von 10^{-6} mol/l. Diese Fraktion des Ca^{2+} -Gehaltes ist nicht direkt meßbar. Hinzu kommt die Möglichkeit, daß X-537 A in der Zelle an Mitochondrien gebundenes Ca^{2+} freisetzen könnte und damit die wirk-same Ca^{2+} -Ionenkonzentration ohne Änderung des Gesamtgehaltes erhöht. Eine derartige Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Ionenkonzentration wäre auch mög-lich bei gleichzeitiger Abnahme des Gesamt- Ca^{2+} -Gehaltes, wenn bei erniedrigter extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration weniger Ca^{2+} außen an der Zellmembran gebunden ist.

Vielleicht ist die starke Abnahme des O_2 -Verbrauchs ebenfalls darauf zurückzuführen, daß X-537 A in die Mitochondrienmembran gelangt. Dies würde auch er-klären, warum die Hemmung der Atmung während der Versuchszeit ständig zunimmt.

Bis auf die Hemmung der Atmung sind die Effekte von X-537 A identisch mit der Wirkung des Mg-Mangels. Die Übereinstimmung erstreckt sich auf die Änderung des Na^+ -, K^+ -, Ca^{2+} - und cycl. AMP-Gehaltes sowie auf die Synthesehemmung gemäß der Reihe RNA, DNA, Pro-tein. Aus diesen Ergebnissen kann abgeleitet werden, daß die Effekte des Mg-Mangels in isolierten Zellen primär durch eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} - und Na^+ -Konzentration oder Abnahme der intrazellulären K^+ -Konzentration hervorgerufen werden.

Eine Verminderung der intrazellulären K^+ -Konzentra-tion durch Amphotericin B führte bei Tumorzellen zu einer analogen Hemmung der RNA-, DNA- und Proteinsynthese, die durch Zugabe von 100 mmol/l K^+ zum Teil aufgehoben wurde (15). Hieraus folgt, daß K^+ wirksam war. Der Angriffspunkt läßt sich weiter charakterisieren. Bei spezifisch an K^+ verarmten Zellen von *E. coli* war die Purin- und Pyrimidinsynthese gehemmt (16). Die Proteinsynthese wird bei K^+ -Mangel wahrscheinlich auf der Stufe der Initiation gehemmt (17).

Die prozentuale Hemmung der Proteinsynthese ist jedoch größer als die prozentuale Abnahme der K^+ -Konzentra-tion. Das gleiche wurde im Mg-Mangel gefunden (1). Es könnte daher noch ein weiterer Effektor an der Hem-mung der Proteinsynthese beteiligt sein. Ein verringerter Aminosäuretransport als Ursache für die stärkere Hem-mung der Proteinsynthese ist bei Mg-arm gewachsenen (2) und X-537 A behandelten Tumorzellen (nicht darge-stellt) unwahrscheinlich. In Frage kommen daher Na^+ , Ca^{2+} und cycl. AMP, deren intrazelluläre Gehalte zuge-nommen haben.

Eine Hemmung der RNA, DNA und Proteinsynthese durch cycl. AMP ist nicht wahrscheinlich. Cycl. AMP hemmt zwar die Thymidinkinaseaktivität und die DNA-Synthese (18, 19), die Proteinsyntheserate wird aber nicht erniedrigt (19).

Für die Wirkung einer alleinigen Erhöhung des Ca^{2+} -Gehaltes kann eine spezifische Wirkung von Ca^{2+} -Ionen und eine Kompetition von Ca^{2+} mit Mg^{2+} disku-tiert werden. Ob die Ca^{2+} -Ionenaktivität am Wirkungsort in der Zelle unter X-537 A den hierfür notwendigen Wert erreicht, bleibt offen.

Eine Hemmung der DNA-, RNA- und Proteinsynthese wurde auch bei Hühnerembryofibroblasten gefunden, die unter Mg-Mangel gezüchtet wurden (20). Diese Hem-mung war aber nicht spezifisch für Mg-Mangel, denn ein verminderter Serumgehalt im Medium hemmte in gleicher Weise wie Mg-Mangel.

Da in diesen Versuchen der intrazelluläre K^+ - und Ca^{2+} -Gehalt nicht berücksichtigt wurde, ist nicht entschieden, ob die Hemmung der DNA, RNA und Proteinsynthese immer durch eine Änderung der intrazellulären K^+ , Na^+ und Ca^{2+} -Gehalte erfolgt, oder ob – allerdings weniger wahrscheinlich – auch andere Mechanismen (z. B. auch eine direkte Wirkung von X-537 A) zur gleichen Hem-mung der DNA-, RNA- und Proteinsynthese führen.

Die Glykolyse von Tumorzellen ist je nach Art der K^+ -Verarmung verschieden. Durch Inkubation in kaltem K^+ -freiem Medium an K^+ -verarmte Zellen haben bei Rein-kubation in körperwarmem, K^+ -freiem Medium eine niedrige Glykolyserate (21), da unter diesen Bedingungen kein ATP-abhängiger Na^+ - K^+ -Transport abläuft. Durch X-537 A an K^+ -verarmte Zellen in K^+ -haltigem Medium haben dagegen einen erhöhten Na^+ - K^+ -turnover (Abb. 3 a).

Im intakten Tier treten im Mg-Mangel qualitativ gleiche Veränderungen im Elektrolyt- und cycl. AMP-Gehalt ein (22–24) wie in isolierten Zellen. Beim intakten Tier nimmt im Mg-Mangel die Catecholaminausscheidung im Harn – besonders unter Streß – zu (in Vorbereitung). Daraus folgt, daß beim intakten Tier neben der beschrie-benen primären Wirkung von Ca^{2+} - und K^+ -Ionen noch eine Wirkung von Catecholaminen hinzukommen kann. Catecholamine erhöhen schon allein die Permeabilität von K^+ und Ca^{2+} (25) und könnten demnach primäre Wirkungen des Mg-Mangels, nämlich die Änderungen des intracellulären Na^+ -, K^+ -, Ca^{2+} - und cycl. AMP-Gehaltes, noch verstärken.

Ähnliche Beziehungen zwischen Catecholaminen, Ca^{2+} und K^+ sind auch von der Regulation der Phosphorylase bekannt, wo Ca^{2+} -Ionen allein ohne Catecholamine und cycl. AMP das Phosphorylase-System aktivieren (26, 27) und andererseits die Wirkung von Adrenalin auf die Adenylcyclase von Ca^{2+} und K^+ abhängt (28).

Danksagung

Wir danken Herrn L. Quandt und Frau Ch. Krause für hervor-ragende technische Assistenz und der Fa. Hoffmann-La Roche für die freundliche Überlassung von X-537 A.

Literatur

1. Günther, T. & Averdunk, R. (1970), *diese Z.* 8, 621–625.
2. Averdunk, R., Ostapovic, B. & Günther, T. (1975), *diese Z.* 13, 361–366.
3. van Rossum, G. D. V. (1970). *Nature* 225, 638–639.
4. Günther, T. & Mariß, P. (1968). *Z. Naturforsch.* 23b, 334–338.
5. Schwartz, R., Woodcock, N. A., Blakely, J. D., Wang, F. L. & Khairallah, E. A. (1970). *J. Nutr.* 100, 123–128.
6. Pressman, B. C. (1973). *Federation Proc.* 32, 1698–1703.
7. Eagle, H., Piez, K. A., Fleischman, R. & Oyama, V. I. (1959). *J. Biol. Chem.* 234, 592–597.
8. Schneider, W. C. (1957). *Methods Enzymol.* III, 680–684.
9. Burton, K. (1956). *Biochem. J.* 62, 315–323.
10. Lowry, O. H., Rosebrough, N., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
11. Kolb, H.-A. & Adam, G. (1976). *J. Membrane Biol.* 26, 121–151.
12. Cittadini, A. Scarpa, A. & Chance, B. (1973). *Biochim. Biophys. Acta* 291, 246–259.
13. Devore, D. I. & Nastuk, W. L. (1975). *Nature* 253, 644–646.
14. Cornelius, G., Gärtner, W. & Haynes, D. H. (1974). *Biochemistry* 13, 3052–3057.
15. Lubin, M. (1967). *Nature* 213, 451–453.
16. Cohen, S. S. (1972). *Advances Enzyme Regul.* 10, 207–223.
17. Christman, J. K. (1973). *Biochim. Biophys. Acta* 294, 138–152.
18. Miura, Y., Hamazaki, T. & Fukui, N. (1973). *Advances Enzyme Regul.* 11, 105–115.
19. Wicks, W. D., v. Wijk, R. & McKibbin, J. B. (1973). *Advances Enzyme Regul.* 11, 117–135.
20. Rubin, H. (1975). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 3551–3555.
21. Greenhouse, W. V. V. & Coe, E. L. (1973). *Biochim. Biophys. Acta* 329, 183–195.
22. Günther, T. (1970), *diese Z.* 8, 65–68.
23. Günther, T., Schmalbeck, J. & Merker, H. J. (1972), *diese Z.* 10, 425–429.
24. Günther, T., Schmalbeck, J. & Merker, H. J. (1973), *diese Z.* 11, 233–236.
25. Friedmann, N. & Park, C. R. (1968). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 61, 504–508.
26. Drummond, G. I., Harwood, J. P. & Powell, C. A. (1969). *J. Biol. Chem.* 244, 4235–4240.
27. Ryman, B. E. & Whelan, W. J. (1971). *Advances in Enzymology* 34, 285–443.
28. Namm, D. H. (1969). *Federation Proc.* 27, 351.

Prof. Dr. Th. Günther
Arnimallee 22
D-1000 Berlin 33