

Über eine ATP:Thiamindiphosphat-Phosphotransferase-Aktivität im Nervengewebe*

Ein Beitrag zum Mechanismus der nervösen Reizleitung

Von

Theodor Eckert und Walter Möbus

Aus dem Pharmazeutischen Institut der Universität Frankfurt am Main

(Der Schriftleitung zugegangen am 21. August 1964)

Zwischen dem Axoplasma und der Außenseite eines Nerven besteht im Ruhezustand ein durch ungleiche Ionenverteilung hervorgerufenes Membranpotential, das in der ersten Erregungsphase durch den schnellen Einstrom von Na^{\oplus} -Ionen durch die Nervenmembran umgekehrt wird (Aktionspotential)¹. Nach den Vorstellungen von Hodgkin, Huxley und Katz² erfolgt dieser Na^{\oplus} -Einstrom über ein spezielles Na^{\oplus} -Ionen-Transportsystem. v. Muralt³ konnte nachweisen, daß Thiamin in direktem Zusammenhang mit der Aktivierung dieses Transportsystems steht.

So äußert sich beispielsweise die Verdrängung des Thiamins durch Neopyrithiamin in ähnlicher Weise wie die Verminderung der Na^{\oplus} -Ionen-Konzentration auf der Außenseite der Nervenmembran⁴. Der enzymatische Abbau des Thiamins durch Thiaminasen führt zu einer Unterbrechung der Reizleitung⁵. Außerdem vermag Thiamin die Nervenmembran an den Ranvierschen Knoten in ähnlicher Weise zu passieren wie anorganische Ionen⁶. TTP und TDP bilden mit Na^{\oplus} -Ionen Komplexe; vermutlich kommt dem TTP oder dem TDP Carrier-Funktion in der ersten Erregungsphase zu⁷. Die Tatsache, daß die Komplexstabilität der Na-TTP-Komplexe wesentlich größer ist als die der Na-TDP-Komplexe, führt zu der Vorstellung, daß insbesondere TTP Träger für das durch die Membran einströmende Natrium ist. Deshalb schien es interessant, eine Zellfraktion des Nervengewebes, die Membrananteile enthält, auf das Vorhandensein eines transphosphorylierenden Enzyms zu untersuchen, das die Bildung von TTP katalysiert.

Als Ausgangsmaterial für die Herstellung des Enzympräparates diente Rückenmark von Schweinen. Die Reizleitung in den markhaltigen Nervenfasern des Rückenmarks erfolgt in weitgehender Übereinstimmung mit den peripheren Nerven saltatorisch. Um eine Zellfraktion zu erhalten, in der Teile der Nervenmembran enthalten sind, wurde das Homogenat des Rückenmarks durch 45 Min. dauerndes Zentrifugieren bei $15000 \times g$ von groben Zelltrümmern, Zellkernen und

* Verwendete Abkürzungen: ATP = Adenosintriphosphat; TTP = Thiamin-triphosphat, TDP = Thiamindiphosphat, TMP = Thiaminmonophosphat.

¹ A. L. Hodgkin, A. F. Huxley u. B. Katz, Arch. Sci. physiol. **3**, 129 [1949].

² A. L. Hodgkin u. A. F. Huxley, J. Physiology **117**, 500 [1952]; A. L. Hodgkin u. B. Katz, ebenda **108**, 37 [1949].

³ A. v. Muralt, Neue Ergebnisse der Nervenphysiologie, S. 181, Springer-Verlag, Heidelberg 1958.

⁴ H. A. Kunz, Helv. physiol. pharmacol. Acta **14**, 411 [1956].

⁵ A. v. Muralt u. Y. Zottermann, Helv. physiol. pharmacol. Acta **10**, 279 [1952].

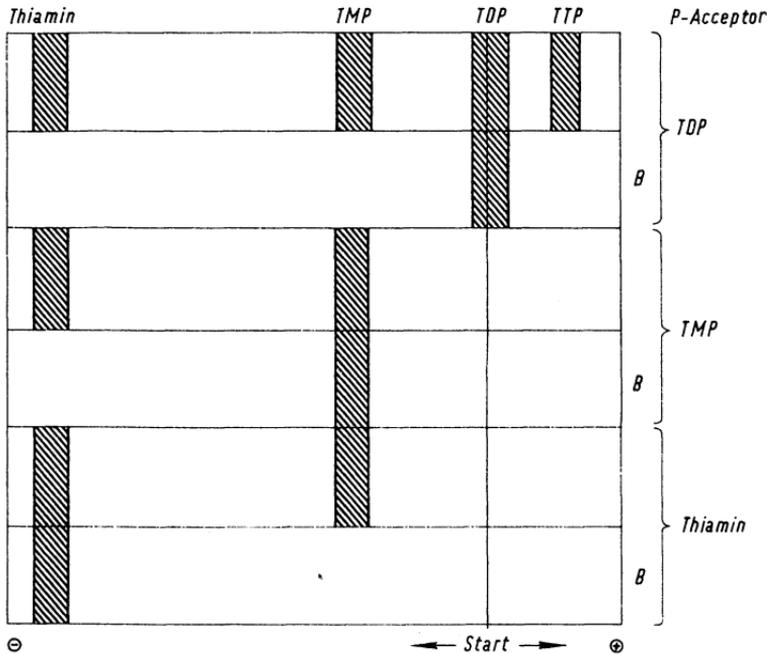
⁶ Ch. Chen u. Th. Liao, J. Vitaminol. [Kyoto] **6**, 1 [1960].

⁷ H. Hoffmann, Th. Eckert u. W. Möbus, diese Z. **335**, 156 [1964].

Mitochondrien befreit. Aus dem Überstand wurde ein Acetontrockenpulver hergestellt. In einer auf ähnliche Weise hergestellten Zellfraktion eines Nervengewebes konnten Hanzon und Toschi⁸ elektronenmikroskopisch Bruchstücke einer zerstörten Membran nachweisen.

Bei der Inkubation des so erhaltenen Enzympräparates mit ATP und Thiamin bzw. mit dessen Phosphorsäureestern zeigte sich vor allem, daß wegen der hohen Phosphatase-Aktivität ein großer Überschuß an ATP nötig war, um einen Abbau von bereits synthetisierten Thiaminphosphaten zu verzögern. Als Blindversuch für jede Reaktion diente jeweils ein gleicher Ansatz, der sofort eingefroren und erst unmittelbar vor dem Auftragen auf die Elektrophorese wieder aufgetaut wurde. Dabei ließ sich in keinem Fall ein gegenüber dem jeweils eingesetzten Substrat höher phosphorylierter Ester nachweisen. Die normalerweise als Blindversuch übliche Inkubation ohne ATP konnte als Vergleichsversuch nicht herangezogen werden, da bei solchen Ansätzen durch die hohe Phosphatase-Aktivität während der Inkubation ein zu starker Abbau der als Substrat eingesetzten Thiaminphosphate erfolgte.

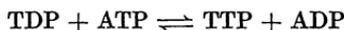
Nach der Inkubation wurden die Produkte papierelektrophoretisch getrennt. Durch Überführung in die entsprechenden Thiochromderivate konnten sie unter dem UV-Licht sichtbar gemacht und durch Vergleich mit authent. Proben identifiziert werden (Abbildung).



Elektrophoretische Trennung der Thiaminphosphate (Pyridin-Acetat-Puffer pH 5,7, 2 Stdn., 40 V/cm) nach Inkubation (20 Stdn., 37°, pH 7,2); B = Blindversuch (eingefroren). Die Inkubationsansätze hatten folgende Zusammensetzung: Thiamin bzw. Thiaminphosphat: $2 \cdot 10^{-3}m$; ATP: $2 \cdot 10^{-2}m$; $MgCl_2$: $5 \cdot 10^{-3}m$; Saccharose: 0,25m; Triäthanolamin-HCl-Puffer: 0,05m. Jeweils 200 μ l Inkubationsansatz enthielten 20 mg Aceton-Trockenpulver.

⁸ V. Hanzon u. G. Toschi, Exp. Cell Res. 16, 256 [1959].

Wie die Abbildung zeigt, tritt bei Einsatz von TDP als Phosphatacceptor nach der Inkubation stets TTP als Phosphorylierungsprodukt auf. Daraus ist zu schließen, daß in der beschriebenen Zellfraktion des Nervengewebes wahrscheinlich eine ATP:TDP-Phosphotransferase vorhanden ist, die folgende Reaktion katalysiert:



Es ist denkbar, daß dieser Syntheseschritt die erste Phase der axonalen Reizleitung einleitet. Im Zusammenhang mit den oben erwähnten Ergebnissen³⁻⁸ kann man annehmen, daß das TTP auf der Membran-Außenseite entsteht und mit den dort vorhandenen Na⁺-Ionen einen Komplex bildet. Dieser Na⁺-TTP-Komplex könnte dann die Membran passieren. Das TTP, dem nach diesen Vorstellungen in der ersten Erregungsphase Carrier-Funktion zukommt, dürfte auf der Innenseite der Membran entphosphoryliert werden, wobei wegen der schwächeren Komplexbildungsfähigkeit des entstehenden TDP bzw. TMP die Na⁺-Ionen wieder frei werden (Aktionspotential). Diese Vorstellung gründet sich vor allem auf die bei allen Versuchen zu beobachtende hohe Aktivität Thiaminphosphorsäureester-entphosphorylierender Enzyme. Die Entphosphorylierung von TTP und TDP konnte auch Gurtner⁹ bei der Reizung eines Nerven beobachten.

Wurde in dem Inkubationsansatz Thiamin als Phosphatacceptor verwendet, so trat stets eine Phosphorylierung zu TMP ein. Dagegen gelang es trotz vielfältiger Variation der Versuchsbedingungen nicht, mit dem verwendeten Enzympräparat eine Synthese von TDP nachzuweisen, wenn Thiamin oder TMP oder ein Gemisch beider Stoffe als Phosphatacceptor eingesetzt wurden.

Dieser Befund macht die Spezifität des die TTP-Bildung katalysierenden Enzyms deutlich. Es ist jedoch möglich, daß andere Zellfraktionen des Nervengewebes die Synthese von TDP aus Thiamin oder TMP zu katalysieren vermögen.

Zusammenfassung

Bei der Inkubation von Thiamindiphosphat (TDP) und ATP mit einer Zellfraktion des Rückenmarks vom Schwein wurde eine Synthese von Thiamintriphosphat (TTP) festgestellt und dadurch das Vorhandensein einer ATP:TDP-Phosphotransferase wahrscheinlich gemacht. Es wird vermutet, daß die Synthese von TTP den ersten Schritt im Mechanismus der nervösen Reizleitung darstellt und daß TTP in der ersten Erregungsphase eine Trägerfunktion für Na⁺-Ionen haben könnte.

Die Synthese von Thiaminmonophosphat (TMP) aus Thiamin konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Dagegen wurde die Bildung von TDP aus Thiamin oder TMP mit dieser Zellfraktion nicht beobachtet.

Summary

A cell fraction from pig spinal cord synthesises thiamine triphosphate (TTP) when incubated with thiamine diphosphate (TDP) and ATP, thus indicating the presence of an ATP:TDP-phosphotransferase. It is proposed that the synthesis of TTP is the first step in the mechanism of nervous conduction and that TTP possibly acts as a Na⁺-carrier during the initial excitation phase.

The synthesis of thiamine monophosphate (TMP) from thiamine was also shown, but TDP synthesis from thiamine or TMP was not observed in this cell fraction.

Doz. Dr. Th. Eckert, Pharmazeutisches Institut der Universität, 6 Frankfurt am Main, Georg-Voigt-Straße 14.

⁹ H. P. Gurtner, *Helv. physiol. pharmacol. Acta* 15, C 66 [1957].