

Kontinuierliche Messung der Kaliumaufnahme von Zellsuspensionen mit einer ionenspezifischen Elektrode

Continual Measurement of the Potassium Uptake of Cellsuspensions with an Ionselective Electrode

F. SCHNEEWEISS und R. L'ORANGE

Institut für Physikalische Chemie der Kernforschungsanlage Jülich

(Z. Naturforsch. 26 b, 624—625 [1971]; eingegangen am 10. Januar 1971)

Sowohl die zeitabhängige als auch die stationäre Verteilung von Alkali-Ionen beiderseits der Zellmembranen von suspendierten Zellen sind bisher flammenphotometrisch oder mit Hilfe radioaktiver Isotopen untersucht worden¹⁻⁸.

Beide Methoden erfordern eine Abtrennung der Zellen von der extrazellulären Flüssigkeit und mindestens einen Waschvorgang. Mit einer neuartigen Elektrode (ORION Research Inc. Cambridge, Mass. USA, model 92-19), die eine Selektivität von 5000 : 1 für K^{\oplus} : Na^{\oplus} besitzt⁹, konnten wir die Kaliumaufnahme von Zellen durch Messung in der Suspension kontinuierlich verfolgen.

Nach Einstellung eines stabilen Potentials in der gerührten Bakteriensuspension wurde durch Zugabe von Glucose (Endkonzentration 0,5%) der K^{\oplus} -Transport angeregt. Innerhalb einiger Sek. (bei $[K^{\oplus}] < 0,1 \text{ mM/l}$) oder momentan (bei $[K^{\oplus}] > 0,1 \text{ mM/l}$) begann die Elektrode eine Abnahme von extrazellulärem K^{\oplus} anzuzeigen. Durch Titration mit einer KCl-Lösung wurde der K^{\oplus} -Verbrauch der Bakterien kompensiert. Ein Schreiber registrierte den sägezahnförmigen Verlauf des Elektrodenpotentials, der sich als Folge der diskontinuierlichen Titration ergibt. Die Stufenabstände liefern die Zeitintervalle für die jeweils von den Zellen aufgenommene K^{\oplus} -Menge. Wir erprobten diese neuartige Methode an Bakterien vom Stamm *E. coli* B 163.

Die Anfangsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Außenkonzentrationen an K^{\oplus} gehorchen einer sogenannten Sättigungskinetik, wie sie bei konstanter Zahl von „Besetzungsstellen“ zu erwarten ist, analog zur Enzymkinetik nach Michaelis-Menten oder auch zur Langmuir'schen Adsorptionsisotherme. Aus Abb. 2 läßt sich eine maximale Anfangsgeschwindigkeit $V_m \approx 0,14 \frac{\text{mM } K^{\oplus}}{\text{gTS min}}$ und eine scheinbare Michaelis-

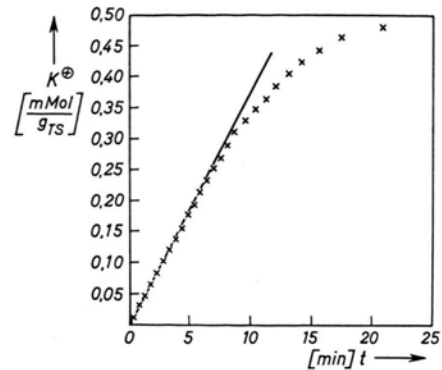


Abb. 1. Aufnahme von K^{\oplus} -Ionen in *E. coli* B 163 bei einer Außenkonzentration von 0,5 mM K^{\oplus} . Linearer Teil = Anfangsgeschwindigkeit, gTS = g Trockensubstanz.

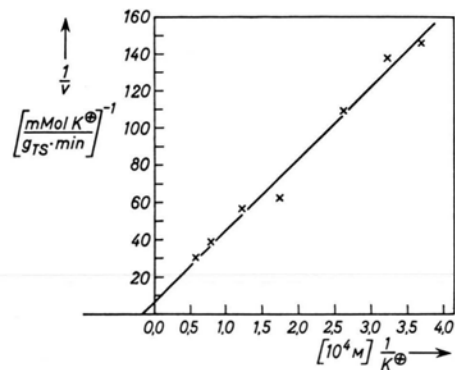


Abb. 2. Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeiten der K^{\oplus} -Aufnahme von der Außenkonzentration an K^{\oplus} -Ionen bei *E. coli* B 163.

Konstante $K_m \approx 0,6 \text{ mM } K^{\oplus}$ entnehmen⁷. Dieses Ergebnis wäre sowohl mit einer Carrierhypothese^{3,5} als auch mit der Sorptionstheorie des Ionentransports^{8,10,11} vereinbar.

Die potentiometrische Methode vermeidet Fehlerquellen bei der Probenaufbereitung und erlaubt (durch die kontinuierliche Messung) auch die Verfolgung rascher Vorgänge, ist also insbesondere für kinetische Messungen gut geeignet. Eine schnelle Kompensation der Kaliumverarmung im Außenmedium gestattet es, auch bei Kaliumgehalten des Mediums zu messen, die wesentlich kleiner als die im Endeffekt von den Zellen aufgenommene Menge sind.

Sonderdruckanforderungen an Dipl.-Ing. F. SCHNEEWEISS, Inst. f. Physikal. Chemie d. Kernforschungsanlage, D-5170 Jülich, Postfach 365.

¹ S. G. SCHULTZ u. A. K. SOLOMON, J. gen. Physiol. 45, 355 [1961].

² S. G. SCHULTZ, W. EPSTEIN u. A. K. SOLOMON, J. gen. Physiol. 47, 329 [1963].

³ W. EPSTEIN u. S. G. SCHULTZ, J. gen. Physiol. 49, 221 [1965].

⁴ W. EPSTEIN u. S. G. SCHULTZ, J. gen. Physiol. 49, 469 [1966].

⁵ B. LUBOCHINSKY, J. MEURY u. J. STOLKOWSKI, Bull. Soc. Chim. biol. 48, 873 [1966].

⁶ TH. GÜNTHER u. F. DORN, Z. Naturforsch. 21 b, 1082 [1966].

⁷ R. DAMADIAN, J. Bacteriol. 95, 113 [1968].

⁸ R. DAMADIAN, Science [Washington] 165, 79 [1969].

⁹ M. S. FRANT u. J. W. ROSS, Science [Washington] 167, 987 [1970].

¹⁰ G. N. LING u. M. OCHSENFELD, Physiol. Chem. and Physics 2, 189 [1970].

¹¹ G. N. LING, A Physical Theory of the Living State, Blaisdell, New York 1962.

Experimentelles

Die Bakterien *E. coli* B 163 wurden zuvor durch 1-stdg. Inkubieren bei 37 °C in bezug auf K⁺-Ionen und Energiesubstrat ausgehungert. Inkubations- und Waschlösung: 50 mM Na₂HPO₄ mit 0,23 mM HCl auf pH 9,0 eingestellt. Zur Messung wurde das zentrifugierte Zellsediment in folgender Pufferlösung suspendiert: 30,0 mM Na₂HPO₄ + 35,4 mM NaH₂PO₄, pH 6,7–6,8, K⁺-Untergrund < 2 · 10⁻³ mM (flammenphotometrisch), KCl-Zugabe je nach Versuchsbedingung. Der Bakterienstamm ist auxotroph für His, Leu und Met; bezüglich Nährmedium und Züchtung siehe ¹².

Die Bakterien befanden sich bei Entnahme aus dem Nährmedium ca. 1 h in der stationären Wachstumsphase, pH 6,4, Extinktion ($\lambda_{\max} = 418$ nm) der zehnfach verdünnten Suspension 0,30, Zellzahl ca. 2 · 10⁹/ml (zur Messung beibehalten), Volumen der Proben 50 ml, Trockengewicht von 6 gleich vorbehandelten Proben 41,8 ± 1,2 mg, 12 h bei 80 °C im Vakuum getrocknet. Beim Versuch zu Abb. 1 verstrichen 6 h mehr zwischen Inkubation und Messung als bei der Versuchsserie zu Abb. 2. Temperatur der Versuche 25–26 °C.

¹² R. L'ORANGE u. F. SCHNEEWEISS, Biophysik 7, 40 [1970].

Effect of Triton X-100 on the Galactosyltransferase Activity of Chick Embryo Cells

M. B. PRADAL, P. LOUISOT, and R. GOT

UER Médicale Lyon-Sud, BP 12, 69 Oullins, France

(Z. Naturforsch. 26 b, 625–626 [1971]; received April 3, 1971)

An *in vivo* pilot study indicated that galactose can be incorporated into glycoproteins of chick embryo cells. We therefore attempted to develop a non-cellular system, capable of incorporating, *in vitro*, this carbohydrate from UDP-galactose.

All steps of the enzyme preparation were performed between 0° and 5°. Decapitated 8 day-old embryos were suspended in 0.25 M sucrose buffered with 5 × 10⁻² M Tris-HCl pH 7. The suspension was homogenized with 20 strokes in a Potter-Elvehjem homogenizer. The crude homogenate was centrifuged at 15.000 × g for 15 min to remove cell debris, nuclei and mitochondria. The upper 4/5 of the post-mitochondrial supernatant, so obtained, were centrifuged at 195.000 × g for 1 hour, resulting in the separation of a microsomal pellet from the cell sap. The microsomes were incubated with UDP-galactose (1-³H, New England Nuclear) for 40 min at 37°, the optimum temperature. The macromolecules were precipitated with a final concentration of 10% trichloroacetic acid, filtered (Whatman Glass Paper, type GF/B) and washed on the filter with a 4/1 methylal-methanol mixture. Radioactivity, measured by liquid scintillation spectrometry, was related to the content of protein as determined by the Lowry method.

The conditions for assay are given in Table I.

The activity of galactosyltransferase was detectable only when Mn²⁺ and Triton X-100 were added to assay mixture. Maximal activity is obtained with 2 mM Mn²⁺, when incubated at pH 7, the optimum pH.

The *K_m*, with respect to UDP-galactose was determined by varying the UDP-gal-³H concentration in the

System	cpm incorporated into 1 mg protein
complete	2.200
– Triton	60
– Mn ²⁺	150
– Mn ²⁺ + Mg ²⁺	120
– Triton + desoxycholate (0.4%)	0

Table I. The Assay System for the Galactosyltransferase from chick embryo cells. (The complete assay system contained in 280 μ l : 10 μ l Mn²⁺ 55 mM, 20 μ l 1.5% Triton X-100, 200 μ l of microsomes (0.5 mg protein) in 0.05 M Tris buffer pH 7 and 50 μ l UDP-galactose-1-³H (0.01 μ mole, approximately 2.2 × 10⁵ cpm).)

incubation mixture. The data gave a *K_m* of 1.8 × 10⁻⁵ M.

In order to evaluate the effect of Triton X-100, the variation in transferase activity was determined as a function of detergent and protein concentrations. As can be seen from Fig. 1, the efficiency of the action of Triton X-100 appeared to be dependent not only on the concentration of detergent but also on the detergent/protein ratio. Maximal activity is obtained with a Triton X-100 concentration of 2.5 ml/l for 1 mg protein.

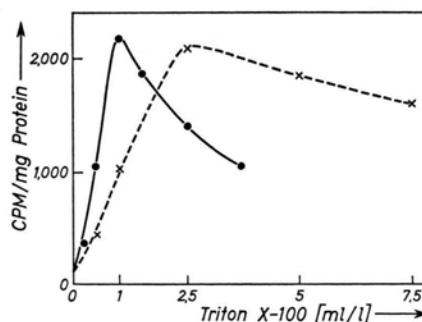


Fig. 1. Effect of Triton X-100 on galactosyltransferase from chick embryo cells. Protein concentration in incubation mixture: ●—● 0.4 mg; ×—× 1 mg.

Reprints request to RENÉ GOT, U.E.R. Medecine Lyon-Sud, B.P. Nr. 12, 69-Oullins (France).

Similar results were obtained with the respiratory chain enzymes of a heart muscle preparation¹ or with mannosyltransferase from *Aspergillus niger*². Recently, the kinetic properties of three glycosyltransferases found in the synaptosome rich fraction obtained from

embryonic chick brain were described³. All the three enzymes showed an absolute requirement for detergent, but optimal detergent/protein ratio was not determined.

¹ D. SOLTYSIAK and Z. KANIUGA, *European J. Biochem.* **14**, 70 [1970].

² R. LETOUBLON, M. RICHARD, P. LOUISOT, and R. GOT, *European J. Biochem.* **18**, 194 [1971].

³ H. DEN, B. KAUFMAN, and S. ROSEMAN, *J. Biol. Chemistry* **245**, 6607 [1970].

Cross-Bridges Between Intramacronuclear Microtubules and Inner Nuclear Membrane

WERNER W. FRANKE

Department of Cell Biology, Institute of Biology II,
University of Freiburg i. Br., Germany

(*Z. Naturforsch.* **26 b**, 626–627 [1971]; received March 19, 1971)

During macronuclear division of ciliates, intranuclear microtubules are observed which seemingly play a functional role in the division mechanism^{1–7}. Such microtubules can often be seen in a close association with the inner nuclear membrane. The question is if (and if so, how) these intramacronuclear microtubules are truly structurally connected with the membrane. Such a linkage has been previously suggested as being effected by a basal insertion of the tubules at the inner surface of the nuclear envelope^{2,7}. As a consequence of the section thickness, which is usually more than the microtubular width, this type of basal anchoring is hard to demonstrate clearly. In the present study it is shown that such intramacronuclear microtubules in *Tetrahymena pyriformis* can be connected to the inner nuclear membrane by characteristic lateral "cross-bridges" (Figs. 1–5) with a mean width of 50 Å. Sometimes C-shaped side-arm profiles were also found (Figs. 2 and 3). In sections showing the microtubules lengthwise, i. e. paralleling the inner nuclear membrane, the bridges often appeared not to be arranged perpendicularly but rather construct a lower angle with the membrane (c. f. Figs. 4 and 5). The lengths of the cross-bridges varied from 80 to 250 Å. The microtubules of the present study were found to be rather wide with diameters up to 300 Å. The mode of connection described in this note fits into the concept that cross-bridging to microtubules is a general capacity of biomembranes⁸ and leads to the impression that certain proteins of the nuclear membrane, the microtubules (and possibly also of the chromosomes) behave as an integrated self-assembly system during nuclear divisions in which the nuclear envelope remains intact. The particular situation of the *Tetra-*

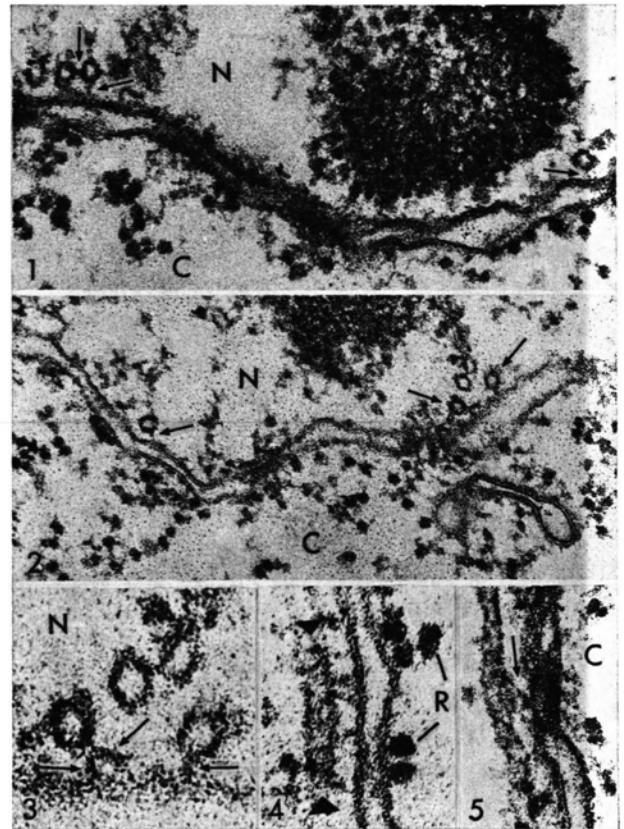


Fig. 1–5. Microtubulus within the macronucleus of *Tetrahymena pyriformis* GL; N, nucleoplasm; C, cytoplasm; R, ribosomes. Microtubules can be cross-bridged with each other (Fig. 1, arrow in upper left) as well as with the inner nuclear membrane (Fig. 1 and 2). Sometimes pair of cross-links (C-shaped) are recognized beside the single bridges (Fig. 3, arrows). In longitudinal section the microtubules (denoted by black triangles in Fig. 4) show the side-arms as being perpendicularly oriented (Fig. 4) or as arranged under a lower angle (Fig. 5). Fig. 1: 100,000:1; Fig. 2, 72,000:1; Fig. 3, 210,000:1; Fig. 4, 140,000:1; Fig. 5, 110,000:1.

Reprint requests to Dr. W. W. FRANKE, Institut f. Biologie II d. Universität, D-7800 Freiburg, Schänzlestr. 9–15.

¹ I. B. RAIKOV, in: *Research in Protozoology*, vol. 3, (T. T. CHEN ed.), Pergamon Press, Oxford 1969.

² H. FALK et al., *J. Protozool.* **15**, 776 [1968].

³ J. ITO et al., *Exp. Cell Res.* **53**, 85 [1968].

⁴ A. JURAND and G. SELMAN, *J. gen. Microbiol.* **60**, 357 [1970].

⁵ S. TAMURA et al., *Exp. Cell Res.* **55**, 351 [1969].

⁶ W. D. SULLIVAN et al., *J. Cell Biol.* **47**, 206a [1970].

⁷ F. WUNDERLICH and V. SPETH, *Protoplasma* **70**, 139 [1970].

⁸ W. W. FRANKE, *Cyto biologie*, in press.

hymema macronucleus thus strongly resembles the intranuclear spindle of the green alga *Blastophyssa* where WILSON⁹ documented cross-bridges between the
⁹ H. J. WILSON, J. Cell Biol. **40**, 854 [1968].

inner nuclear membrane and microtubules of the mitotic spindle. So the present observation provides a structural homology between the macronuclear division of ciliates and a "true" mitotic division.

BESPRECHUNGEN

VTH International Congress on X-Ray Optics and Microanalysis. Von V. G. MÖLLENSTEDT and K. H. GAUKLER. Springer-Verlag, Berlin 1968. 612 S. m. 558 Figuren; Preis geb. DM 198,—.

Das vorliegende Buch, das als Fortschrittsbericht über den 5. Internationalen Kongreß für Röntgenoptik und Mikroanalyse (Tübingen 1968) konzipiert ist, hat eine Zusammenstellung von insgesamt 101 Einzelbeiträgen zum Inhalt, die in englischer (67 Artikel), deutscher (19 Artikel) und französischer Sprache (15 Artikel) abgefaßt sind. Der Inhalt des Bandes ist in 7 Themengruppen gegliedert, welche sich a) mit den Grundlagen der Röntgenoptik, b) mit den physikalischen Grundlagen der Elektronenstrahl-Mikroanalyse, c) der quantitativen Mikroanalyse, d) der Geräteentwicklung und der Raster-Elektronenmikroskopie, e) der Mikrodiffraktion im Sinne der Kossel-Technik, f) den metallurgischen und mineralogischen Anwendungen und g) mit der Anwendung in der Biologie befassen.

Das Buch wendet sich hauptsächlich an den Wissenschaftler, der mit den Problembereichen der Röntgenoptik, Elektronenstrahl-Mikroanalyse und Raster-Elektronenmikroskopie bereits vertraut ist. Es bietet einen breiten und doch detaillierten Überblick über den gegenwärtigen Stand der Forschung und instrumentellen Technik (bis Ende 1968) in den genannten Gebieten. Naturgemäß wird dabei die europäische Entwicklung stark betont. Die Bedeutung und das Verdienstvolle dieses Bandes liegen vor allem darin, daß sein Erscheinen einem ernsthaften Mangel an interdisziplinärer, wissenschaftlicher Kommunikation entgegenwirkt und es dem einzelnen Interessenten ermöglicht, sich schnell und umfassend über Original-Arbeiten zu orientieren, welche sonst, nur schwer zugänglich, in der speziellen Fachliteratur zahlreicher Wissenschaftszweige verstreut sind, für welche vor allem die Elektronenstrahl-Mikroanalyse in den vergangenen Jahren eine entscheidende, wenn nicht gar existenznotwendige Bedeutung gewonnen hat. Die Nützlichkeit dieses Buches wäre sicher noch erhöht worden, wenn mehr und ausführlichere Überblicksartikel in den Hauptsachgebieten hätten aufgenommen werden können. Das Werk zeichnet sich durch eine vorzügliche verlegerische und drucktechnische Qualität aus, die vor allem den zahlreichen fotografischen Abbildungen sehr zugute kommt, aber leider sich auch im Verkaufspreis bemerkbar macht.

D. STÖFFLER, Tübingen.

„Nerv, Muskel und Synapse“, Einführung in die Elektrophysiologie. Von BERNHARD KATZ. Übersetzung: FR.-W. BENTRUP und ROLAND HENGSTENBERG, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart 1970. 164 S., zahlreiche Abb.; Preis DM 10,80.

Auf dem deutschen Büchermarkt ist jetzt eine Übersetzung der Abhandlung von Nobelpreisträger B. KATZ über „Nerve, Muscle and Synapse“ erschienen. Eine vergleichbare Darstellung über Grundlagen der Elektrophysiologie fehlte bisher in unserem Schrifttum. In diesem Taschenbuch wird die Methode der Nachrichtenübertragung im tierischen Organismus in knapper, relativ leicht verständlicher Form dargestellt. Ausgehend von morphologischen Strukturen werden physiko-chemische Phänomene, ihre Meßmöglichkeiten sowie ihre Bedeutung für die Informationsleitung besprochen. So lernt der Ungeübte Begriffe wie „Aktionspotential, Ionenleitfähigkeit und Voltage-clamp“ kennen und mit ihnen umzugehen. Er wird dabei aber nicht nur über gesicherte Fakten informiert, sondern auch gleichzeitig mit der Problematik des Sachgebietes konfrontiert. Es ist dabei sowohl dem Autor als auch den Übersetzern gelungen, relativ komplizierte Sachverhalte in einfacher und knapper Form darzustellen. Die Einflechtung historischer Daten ist dabei mühelos gelungen. Eine Vielzahl von Abbildungen erleichtert das Verständnis und erlaubt auch dem Ungeübten, sich elektro-physiologische Grundlagen zu erarbeiten. Das abschließende Literaturverzeichnis leistet dabei gute Dienste.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß dieses kleine Taschenbuch jedem empfohlen werden kann, der sich mit Problemen der Elektrophysiologie bzw. der Nachrichtenübermittlung im tierischen Organismus beschäftigt.
 D. HEUSER, Tübingen.

Animal Electroencephalography. Von W. R. KLEMM. Academic Press, New York 1969, 292 S. mit zahlr. Abb.; Preis geb. 135 s.

Für Veterinärmediziner, Biologen und Verhaltensforscher — nicht zuletzt aber auch für die an neurophysiologischen Problemen Interessierten — werden auf den 292 Seiten des Buches die neuesten Erkenntnisse über die Elektroencephalographie präzise und sehr anschaulich dargestellt. Der Text wird komplettiert durch 156 instruktive Abbildungen und 448 wertvolle Literaturhinweise. Die sieben Kapitel, in die das Buch gegliedert ist (Physiologie, Technik der Ablei-

tung bzw. der Registrierung, Artefakte, Auswertung, Modulation durch physiologische und pathologische Faktoren), sind — auch in sich — systematisch angeordnet und für den mit der Materie noch nicht sehr Vertrauten verständlich geschrieben. Im Anhang werden spezielle Begriffe definiert. Außerdem ist eine Übersetzung von termini technici ins Englische, Französische, Deutsche, Italienische und Spanische angeschlossen. Durch die Beratung der im Vorwort genannten Experten gewinnt das didaktisch gut geschriebene, lesenswerte Buch zusätzlich. Eigentlich wird der Titel des Buches ‚Elektroencephalographie bei Tieren‘ mehrfach dadurch gesprengt, daß auch dem menschlichen EEG Beachtung geschenkt wird.

KL. VETTER, Tübingen.

Advances in Teratology. Von D. H. M. WOOLLAM. Logos Press, London 1970, 238 S. m. zahlr. Abbn.; Preis geb. 100 s.

Die ersten drei Aufsätze handeln von menschlichen Verbildungen, hervorgegangen einmal durch nahe Blutsverwandtschaft der Eltern (ADAMS). Diese Kinder haben im ganzen ein geringeres Geburtsgewicht, zeigen gelegentlich Verbildungen und sind praemorbid, zum anderen von Verbildungen bei intrauterinen Infekten, Röteln (DESMOND, WILSON et al.) sowie durch die Zytomegalie-Infektion (HANSHAW). Diese Erkrankungen mit Defektbildungen an verschiedenen Organen dürften aber nicht als *con-genital*, sondern allenfalls

als intrauterin erworben *con-natal* bezeichnet werden (Ref.). Das Zytomegalie-Kapitel gibt eine ausgezeichnete Übersicht mit reichlichem Schrifttum. In dem vierten Abschnitt wird die Reihe der Abhandlungen auf experimenteller Basis eröffnet. Die experimentellen Strahlenschäden behandelt JACOBSEN an Mäusen. Er gibt eine sehr gute Übersicht und Einführung mit besonderer Berücksichtigung der quantitativen Analysen jahreszeitlicher Einflüsse und des Schwelleneffekts nach kleinen Dosen. Einen kritischen Überblick über den embryonalen Sauerstoffmangel hat C. GRABOWSKI gegeben: „Einen physiologischen Versuch zur Analyse teratologischer Mechanismen.“ Seine Ergebnisse basieren vorzüglich auf Untersuchungen am Hühnerembryo mit O₂-Mangel, auf dem Studium des Ödemsyndroms nach Einwirkung von DMSO (Dimethylsulphoxide). Dieses Ödemsyndrom gibt es auch nach entsprechenden Agenzien beim Säuger. Eine lesenswerte prospektive Zusammenfassung schließt diese Abhandlung. Ausgehend von physiologischen Beobachtungen über den Zelluntergang bei Entwicklungsumwandlungen untersuchen MENKES, SANDOR und ILIES den Zelltod aus der Embryopathologie des Menschen im Experiment. Die sehr klaren Darlegungen sind durch ausgezeichnete Abbildungen ergänzt. Den Abschluß dieses Bandes bilden allgemein-gehaltene Gedankengänge von L. AXELROD über Verbildungen nach Drogen (Medikamenten) sowie über spontane Teratogenese bei den „subhumanen“ Primaten.

B. OSTERTAG, Tübingen.