

Gesellschaft für physiologische Chemie

4. Colloquium am 17./18. April 1958 in Mosbach/Baden

Obwohl die Veranstaltung schon länger zurückliegt, lassen wir hier noch einige Referate der von ausländischen Gästen gehaltenen Vorträge folgen — unter nachdrücklichem Hinweis auf das inzwischen erschienene Buch, welches sämtliche Vorträge im Wortlaut enthält, „Biologie und Wirkung der Fermente“ (Verlag Springer, 176 S., 32 Abb., geh. DM 19.60) und zur Ergänzung unseres Übersichtsberichtes in „Nachrichten aus Chemie und Technik“ 1, 72 (1958).

R. BONNICHSEN, Stockholm: *The Mode of Operation of Dehydrogenases with Special Reference to Alkohol Dehydrogenase.*

Wenn sich Diphosphopyridinnucleotid (DPN) mit einem Diphosphopyridinnucleotid-benötigenden Enzym verbindet, z. B. Alkoholdehydrogenase, so wird das Ultraviolet-Absorptionsspektrum geändert. Die Änderungen erlauben es, die Gleichgewichte und die Kinetik zu studieren, woraus folgende Schlüsse gezogen werden:

a) Die Pyridin- und die Adenin-Reste sind an das Enzym gebunden.

b) Zwei Moleküle Diphosphopyridinnucleotid verbinden sich mit einer Molekel Alkoholdehydrogenase, vermutlich über zwei der sieben freien HS-Gruppen.

c) Die Oxydationsgeschwindigkeit des Alkohols wird durch die Dissoziation von DPNH aus dem Enzym begrenzt. DPNH und DPN konkurrieren um die Bindung mit Alkoholdehydrogenase.

d) Die Gleichgewichtskonstante für die Reaktion von DPNH, Acetaldehyd und Wasserstoff-Ionen mit Diphosphopyridinnucleotid und Äthylalkohol hängt von der Enzymkonzentration ab und kann um das 200fache schwanken. Dies ist eine Folge der größeren Affinität von DPNH zu Alkoholdehydrogenase verglichen mit Diphosphopyridinnucleotid.

e) Von $p_{\text{H}} 6-p_{\text{H}} 8$ ist nur ein Proton an der Redox-Reaktion beteiligt, bei $p_{\text{H}} > 8$ zwei Protonen. Dies zeigt, daß eine mit Säure dissoziierbare Gruppe an der Reduktion des Diphosphopyridinnucleotids oberhalb $p_{\text{H}} 8$ beteiligt ist.

f) Weil die Komplexzerlegungen die begrenzenden Faktoren sind, wird bei verschiedenen Alkoholen, die eine $\text{C}-\text{CH}_2-\text{OH}$ -Gruppe enthalten, gefunden, daß sie dieselbe Maximalgeschwindigkeit haben.

g) Die Beobachtungen über die Alkoholdehydrogenase-Kinetik stimmen mit in-vivo-Experimenten über die Alkoholverbrennung überein. Da die Michaelis-Konstante sehr hoch ist, ist der Alkohol-Abbau, wie erwartet, unabhängig von der Konzentration. Extrapoliert man von Pferdeleber-Alkoholdehydrogenase-Werten, so muß die Konzentration von Alkoholdehydrogenase in menschlicher Leber, die für die Verbrennung von 7 g Alkohol in der Stunde erforderlich ist, ungefähr 0,1% betragen.

Weitere Entwicklungen werden möglich sein, wenn mehr reines Diphosphopyridinnucleotid, andere vermutete Inhibitoren und bessere spektrophotometrische Methoden verfügbar sind. Besonders wertvoll werden verfeinerte Techniken zur Erforschung der Feinstruktur der Enzyme, der Aminosäure-Zusammensetzung, Lage und Eigenschaften der SH-Gruppen usw. sein.

P. DESNUELLE, Marseille: *Activation et Spécificité des Endopeptidases Digestives.*

Das vergleichende Studium der Endgruppen von Chymotrypsinogen, Chymotrypsin, Trypsinogen und Trypsin gibt einerseits Hinweise darauf, durch welchen Prozeß die inaktiven „Vorstufen“ (Proteine) in Enzyme übergehen können, andererseits kann es Aufschlüsse über die Peptidstruktur einer Reihe von Proteinen geben, die biologisch aktiv sind und die man leicht in genügend reinem Zustand erhält. Diese Untersuchungen wurden im Hinblick auf Amino-Endgruppen kürzlich nach der Methode von Sanger (Dinitrofluorbenzol) und Edman-Fraenkel-Conrat (Iodothiocyanat) aufgenommen. Auch wurde auf Carboxyl-Endgruppen geprüft.

Das Chymotrypsinogen scheint weder eine Amino-Endgruppe, noch eine Carboxyl-Endgruppe zu besitzen. Es besteht wahrscheinlich aus einer oder mehreren cyclischen Ketten. Das kristallisierte α -Chymotrypsin scheint zu enthalten: ein Hauptprotein, das man rein erhält, wenn man es als Diisopropylphospho- α -Chymotrypsin auskristallisiert. Dieses Protein enthält 2 Amino-Endgruppen (Isoleucin und Alanin) und 2 Carboxyl-Endgruppen

(Tyrosin und Leucin). Während der Umsetzung von Chymotrypsinogen in α -Chymotrypsin werden also mindestens zwei Peptid-Bindungen aufgebrochen.

Trypsinogen und Trypsin haben beide eine freie NH_2 -Endgruppe; die Endaminosäure ist Valin beim Trypsinogen und Isoleucin beim Trypsin. Es ist demnach möglich, daß die beiden Proteine eine offene Kette besitzen. Die Carboxyl-Endgruppe wurde noch nicht nachgewiesen. Bei der Aktivierung wird beim Trypsinogen eine Isoleucin-Bindung geöffnet. Das oder die auf Kosten des Amino-Endes gebildeten Peptide werden eliminiert.

Man kennt jetzt die Bindungen in den Ketten A und B des Insulins, die von Pepsin, Trypsin und von Chymotrypsin gespalten werden. Die Spezifität ist in guter Übereinstimmung mit der für einfache Peptide; im Fall von Trypsin die Bindungen Arginin-X oder Lysin-X und beim Chymotrypsin die Bindungen Phenylalanin-X oder Tyrosin-X. Das Verhalten des Pepsins ist komplizierter. Das Problem der Spezifität der Endopeptidasen ist noch weit von einer restlosen Lösung entfernt. Dennoch reicht ihre Spezifität aus, um aus enzymatischen Hydrolysaten Peptide jener Kettenlänge zu isolieren, die für die vollständige Strukturaufklärung der Proteinketten notwendig sind.

E. C. SLATER, Cambridge: *Structurally bound enzymes.*

Battelli und Stern haben bereits 1912 gefunden, daß die Zellatmung an eine unlösliche Zellfraktion gebunden ist. Keilin untersuchte die Cytochromoxydase-Aktivität (Herzmuskelpräparate); Claude und Mitarbeiter zeigten, daß Lebermitochondrien die gesamte Cytochromoxydase und Succinodehydrogenase der Zelle enthalten. Green und Lehninger fanden, daß alle Reaktionen der aeroben Oxydation von Pyruvat zu Kohlendioxyd und Wasser in den Mitochondrien ablaufen können. Die Granula des Herzmuskelns, die Sarcosome, die den Mitochondrien der Leber entsprechen, werden im Sarcoplasma gefunden, wo sie in regelmäßigen Reihen zwischen den Myofibrillen angeordnet sind. Das Herzmuskelpräparat von Keilin und Hartree, welches die Atemkette enthält, aber frei von den Enzymen des Tricarbonsäurezyklus und von phosphorylierenden Enzymen ist, wird durch Zerreissen der Sarcosom-Membran bei hypotonischen Bedingungen erhalten. Man nimmt an, daß die Atemkette in der Membran des intakten Sarcosoms enthalten ist.

Die Komponenten der Atemkette sind sehr fest an die Partikeln der Herzmuskelpräparate gebunden. So kann man aus dem Fehlen jeglicher Anzeichen von Dissoziation der Komponenten des Bernsteinsäureoxydase-Systems bei hohen Verdünnungen schließen, daß die Dissoziationskonstanten von Cytochrom c $4 \cdot 10^{-5} \text{ m}$ nicht überschreiten. Es ist ein Aktivator notwendig, um optimale Aktivität bei hohen Verdünnungen zu erhalten. Zahlreiche verschiedene Substanzen mit Aktivatorwirkung sind bekannt, viele von ihnen bilden Metallochelate.

Den größten Teil unserer Kenntnisse über die Atemkette verdanken wir nicht physikalischen Trennungen ihrer Komponenten, sondern der Isolierung verschiedener Reaktionsabschnitte mit Hilfe spezifischer Inhibitoren und künstlicher Wasserstoff-Donatoren oder -acceptoren sowie direkten spektroskopischen Untersuchungen. Das Bernsteinsäureoxydase-System besteht aus Succinodehydrogenase, Cytochrom b, einem Zwischenfaktor, Cytochrom c, Cytochrom a und Cytochrom a₂, die in dieser Reihenfolge den Wasserstoff von Succinat zum Sauerstoff übertragen. Das System zur Oxydation des reduzierten Diphosphopyridinnucleotids besteht aus den gleichen Komponenten, nur ersetzt Flavoprotein hier Succinodehydrogenase und Cytochrom b.

Unklar ist noch, wie die einzelnen Komponenten des Enzymsystems, die fest an unlösliche Partikeln gebunden sind, miteinander reagieren können. In mancher Hinsicht scheint es, als ob die Komponenten eine gewisse Bewegungsfreiheit innerhalb der Teilchen besitzen und durch bimolekulare Zusammenstöße reagieren. Jedoch ist die Reaktion des Systems zwischen den verschiedenen Teilchen gering. Das konstante Reaktionsverhältnis einiger Komponenten der Atemkette wurde großenteils gemessen. Graphische Methoden zur Berechnung der Verhältnisse der Reaktionskonstanten eines Enzyms aus der Veränderung von K_m mit der Geschwindigkeit bei unendlich kleinen Substratkonzentrationen sind beschrieben worden. Bei oxydierenden Enzymen kann bei unendlicher Verdünnung die Reaktionsgeschwindigkeit durch Wechsel der Art und Konzentration des Wasserstoff-Acceptors geändert werden.

[VB 538]