

Zur Biochemie der Threonin-Desaminase aus Hefe

VON PROF. DR. H. HOLZER, DR. M. BOLL UND PROF. DR. C. CENNAMO[*]

BIOCHEMISCHES INSTITUT DER UNIVERSITÄT FREIBURG IM BREISGAU

Herrn Prof. Dr. Otto Warburg zum 80. Geburtstag gewidmet

Es wird ein optischer Test nach Warburg für die Aktivitätsmessung des Enzyms Threonin-Desaminase ($\text{Threonin} \rightarrow \alpha\text{-Ketobutyrat} + \text{NH}_4^+$) beschrieben. Einige Eigenschaften des Enzyms aus Hefe wurden mit Hilfe dieses Tests studiert. Pyridoxalphosphat und Pyridoxaminphosphat stabilisieren das Enzym im Rohextrakt. Valin, Leucin und Isoleucin, sowie in geringerem Umfang Threonin, NH_4^+ und K^+ , schützen das mit Puffer verdünnte Enzym vor der Inaktivierung. Das Enzym wird durch Isoleucin gehemmt. Das Ausmaß der Hemmung ist pH-abhängig. Isoleucin bewirkt demnach in Hefe, ebenso wie von Umbarger für *Escherichia coli* beschrieben, durch einen Rückkoppelungsmechanismus („feed-back-Mechanismus“) eine Steuerung der Biosynthese von Isoleucin aus Threonin nach Maßgabe des Verbrauchs von Isoleucin bei der Proteinsynthese. NH_4^+ reprimiert die Biosynthese von Threonin-Desaminase. Dieser Mechanismus regelt, nach Maßgabe des NH_4^+ -Bedarfs der wachsenden Zellen, die durch Threonin-Desaminase katalysierte NH_4^+ -Bildung aus Threonin.

1. Einleitung

Otto Warburg hat die wichtigsten Methoden zur Isolierung und Aktivitätsmessung von Enzymen entdeckt und ausgearbeitet [1]. In den letzten drei Jahrzehnten wurden mit diesen Methoden viele Enzyme charakterisiert und die wichtigsten Stoffwechselwege aufgeklärt.

Im allgemeinen findet man für jedes Enzym in ein und demselben lebenden Material eine konstant bleibende Aktivität. Enzymaktivitätsmessungen in Mikroorganismen haben jedoch gezeigt, daß als „Anpassung“ an Veränderungen des Milieus charakteristische Änderungen von Enzymaktivitäten auftreten. Beispielsweise findet man in Hefezellen nach Zusatz von Lactose zum Nährmedium eine Zunahme der β -Galactosidase-Aktivität. Dieser „Anpassungsvorgang“ ermöglicht es den Hefezellen, Lactose zu Galactose und Glucose zu hydrolysieren und damit als Energie und Baustoffe lieferndes Substrat zu verwerten. Bei der Analyse derartiger Anpassungsvorgänge hat man sowohl die Aktivierung und Hemmung vorhandener Enzyme, wie die Beschleunigung und Verlangsamung der Synthese von Enzymen beobachtet. Im ersteren Falle spricht man von „feed-back-Mechanismen“, im letzteren von „Induktion“ bzw. „Repression“ der Enzymsynthese (Zusammenfassung siehe z. B. [2]). In der vorliegenden Arbeit werden derartige Aktivitätsänderungen von Threonin-Desaminase [**]

aus Hefe beschrieben. Sie dienen der Regulation des NH_4^+ -Stoffwechsels durch Anpassung an eine veränderte Zusammensetzung des Nährmediums.

2. Stellung der Threonin-Desaminase im Stoffwechsel

Threonin-Desaminase katalysiert bei Anwesenheit von Pyridoxalphosphat die irreversible Überführung von Threonin in α -Ketobutyrat und NH_4^+ . Wie Abb. 1 zeigt, eröffnet diese Reaktion den von Threonin ausgehenden

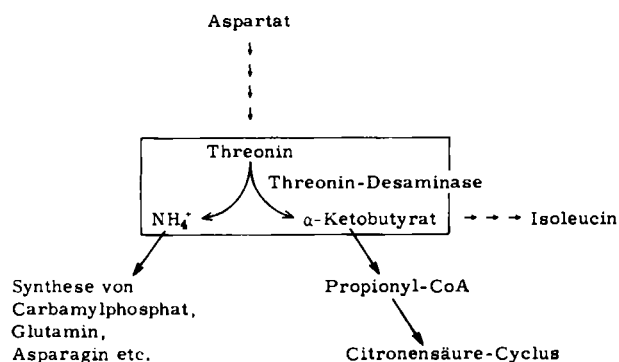


Abb. 1. Stellung der Threonin-Desaminase im Stoffwechsel.

[*] Ständige Adresse: Istituto di Fisiologia Umana, Università di Modena (Italien).

[1] O. Warburg: Wasserstoff übertragende Fermente. Verlag Dr. Werner Saenger GmbH., Berlin 1948.

[2] H. Holzer, Naturwissenschaften 50, 260 (1963).

[**] Im „Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry 1961“ wird das Enzym unter Nummer 4.2.1.16 als „L-Threonin-Hydrolyase (desaminierend)“ mit dem Trivialnamen „Threonin-Dehydratase“ bezeichnet.

Weg der Biosynthese von Isoleucin. α -Ketobutyrat ist jedoch nicht nur ein Zwischenprodukt der Isoleucin-Synthese, sondern kann auch zur Energiegewinnung oxydativ abgebaut werden. Der erste Schritt dieses Weges ist die oxydative Decarboxylierung zu Propionyl-

CoA [*]. Dieses wird dann weiter über Succinyl-CoA im Citronensäure-Cyclus abgebaut. Nicht nur α -Ketobutyrate, sondern auch NH_4^+ als zweites Produkt der Threonin-Desaminase-Reaktion wird als Baustein für Synthesereaktionen benützt. Mit ATP und CO_2 entsteht Carbamylphosphat, α -Ketoglutarate wird zu Glutaminsäure aminiert, aus Glutaminsäure oder Asparaginsäure werden Glutamin bzw. Asparagin gebildet, und Desamido-DPN wird mit NH_4^+ zu DPN amidiert. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wird, spielt die von Threonin-Desaminase katalysierte NH_4^+ -Gewinnung aus Threonin immer dann eine besondere Rolle, wenn NH_4^+ im Nährmedium fehlt und daher aus anderen Stickstoffquellen geliefert werden muß. Als Stickstoffquelle für Threonin- und damit NH_4^+ - können alle Aminosäuren dienen, die durch direkte oder indirekte Transaminierung mit Oxalacetat Aspartat liefern. Da die C-Atome des Threonins wieder zum Aufbau von Aspartat benutzt werden können, ergibt sich der in Abb. 2 wiedergegebene Cyclus. Unter welchen Bedingungen dieser

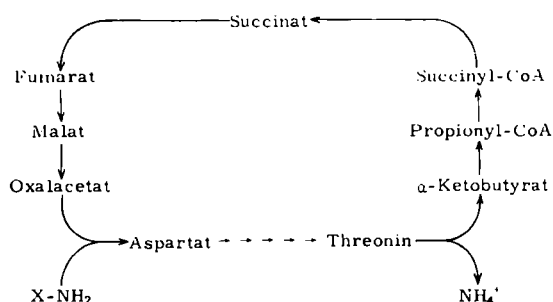


Abb. 2. NH_4^+ -Produktion aus Aminostickstoff ($\text{X}-\text{NH}_2$) im „Threonin-Cyclus“.

Amino-Stickstoff in NH_4^+ überführende „Threonin-Cyclus“ biologisch bedeutsam ist, muß noch geprüft werden.

Das in Abb. 1 wiedergegebene Schema gilt für Hefe, *Escherichia coli* und viele andere Mikroorganismen. Im Säugetier ist die Überführung von Aspartat in Threonin und von α -Ketobutyrate in Isoleucin nicht möglich. Threonin und Isoleucin sind daher für das Säugetier „essentielle Aminosäuren“. Wahrscheinlich spielt jedoch Threonin-Desaminase auch im Säugetier eine wesentliche Rolle, da die Energiegewinnung aus Threonin durch Abbau über den Citronensäure-Cyclus und die Gewinnung von NH_4^+ aus Threonin von Bedeutung sind. Hierfür sprechen charakteristische Veränderungen der Threonin-Desaminase-Aktivität, die in der Leber von Ratten bei unterschiedlicher Ernährung gemessen wurden (siehe z. B. [3]).

3. Test

Die Aktivität der Threonin-Desaminase ist bisher durch Colorimetrie des 2,4-Dinitrophenylhydrazons von α -Ketobuttersäure bestimmt worden. Dieser Test gestattet keine kontinuierliche Verfolgung der Enzymaktivität,

[*] Abkürzungen: DPN — Diphosphopyridinnucleotid; DPNH — reduziertes Diphosphopyridinnucleotid; LDH — Lactat-Dehydrogenase; PALP = Pyridoxal-5-phosphorsäureester; PAMP = Pyridoxamin-5-phosphorsäureester; CoA = Coenzym A; ATP = Adenosin-triphosphat; EDTA = Äthylendiamintetraacetat.

[3] V. R. Potter u. T. Ono, Cold Spring Harbor Symp. quantitat. Biol. 26, 355 (1961).

da einzelne Proben entnommen und analysiert werden müssen. Wir haben das Prinzip des optischen Tests nach Warburg [4] zur Verfolgung der Reaktion benutzt. Da käufliche kristallisierte Lactat-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel nicht nur Pyruvat, sondern auch α -Ketobutyrate mit DPNH hydriert, kann mit diesem Hilfsenzym die Bildung von α -Ketobutyrate aus Threonin im optischen Test verfolgt werden. Die dem Test zugrunde liegenden Reaktionsgleichungen sind:

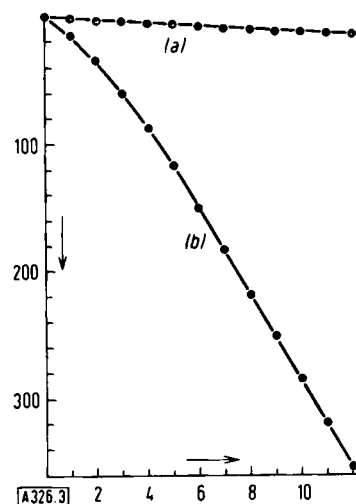
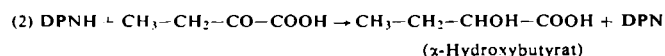
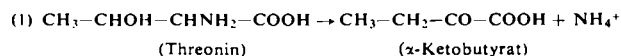


Abb. 3. Standardtest für Threonin-Desaminase. Wellenlänge 366 mμ, d = 1 cm, Gesamtvolumen 3,00 ml, 22 °C. In die Küvette werden in der angegebenen Reihenfolge pipettiert: 2,74 ml 0,1 M Triäthanolamin/HCl-Puffer (pH = 7,9) + 0,1 ml 10 mg/ml DPNH + 0,02 ml Suspension von 5 mg kristallisierter LDH in 1 ml 2,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Boehringer) + 0,02 ml 0,01 M PALP + 0,1 ml 0,5 M L-Threonin. Mindestens 1 min warten bis die Extinktionsänderung durch Bildung der Schiff-Base zwischen Threonin und PALP abgelaufen ist, dann Start mit 0,02 ml Rohextrakt mit ca. 0,3 mg Protein. Zur Gewinnung des Rohextraktes wurde die im Kulturmedium mit DL-Threonin als Stickstoffquelle gezüchtete Hefe (*Saccharomyces cerevisiae* R 59 Ephrussi) abzentrifugiert und gewaschen, anschließend mit dem 3-fachen Gewicht Aluminiumoxydpulver (ALCOA A 305) zerrieben und dann mit dem 3-fachen Volumen 0,05 M Phosphatpuffer (pH = 7,6; 10^{-3} M EDTA enthaltend) extrahiert und 1 Stunde bei 34000 g zentrifugiert (vgl. [5]). Wenn nicht anders angegeben, wurde ein mit $1 \cdot 10^{-3}$ – $2 \cdot 10^{-3}$ M PALP stabilisierter Rohextrakt verwendet.

Kurve (a): ohne Threonin. Kurve (b): mit Threonin.
Ordinate: Abnahme der Extinktion bei 366 mμ ($-\Delta E \cdot 1000$).
Abszisse: Zeit [min].

Die Kinetik eines derartigen Tests ist in Abb. 3 wiedergegeben. Nach dem Zusatz von Threonin-Desaminase in Form eines Rohextraktes aus Hefe findet im Ansatz ohne Threonin nur eine minimale Oxydation von DPNH statt (Kurve a), während im Ansatz mit Threonin DPNH mit zunehmender Geschwindigkeit oxydiert wird (Kurve b). Nach ca. 6 min ist die konstante Endgeschwindigkeit erreicht. Eine „Anlaufzeit“ bis zur Erreichung der von der Threonin-Desaminase-Aktivität limitierten konstanten Endgeschwindigkeit wird deshalb benötigt, weil zuerst eine gewisse Menge von α -Ketobutyrate akkumuliert werden muß, bis die Lactat-Dehydrogenase-Reaktion mit der

[4] O. Warburg u. W. Christian, Biochem. Z. 287, 291 (1936).

[5] H. Holzer u. G. Hierholzer, Biochim. biophysica Acta, 77, 329 (1963).

notwendigen Geschwindigkeit ablaufen kann. Diese „Anlaufzeit“ ist relativ lang, da Lactat-Dehydrogenase nur eine geringe Affinität zu α -Ketobutyrat hat. Sie kann durch Erhöhung der zugesetzten Menge an Lactat-Dehydrogenase verkürzt werden (vgl. Abb. 4). Routinemäßig arbeiten wir mit 0,1 mg Lactat-Dehydrogenase pro Test und registrieren als Threonin-Desaminase-Aktivität die nach ca. 10 min erreichte konstante Endgeschwindigkeit. Abb. 5 zeigt, daß die Endgeschwindigkeit proportional zur eingesetzten Menge an Enzymextrakt ist.

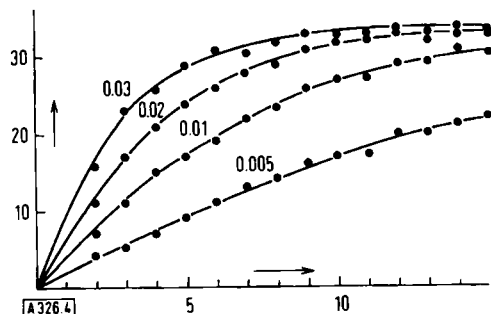


Abb. 4. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration an Lactat-Dehydrogenase. Einzelheiten siehe Legende zu Abb. 3. Die Zahlen an den Kurven geben an, wieviel ml LDH-Suspension eingesetzt wurden.

Ordinate: $\frac{\Delta E \cdot 1000}{\text{min} \cdot (0,02 \text{ ml Rohextrakt})}$
Abszisse: Zeit [min].

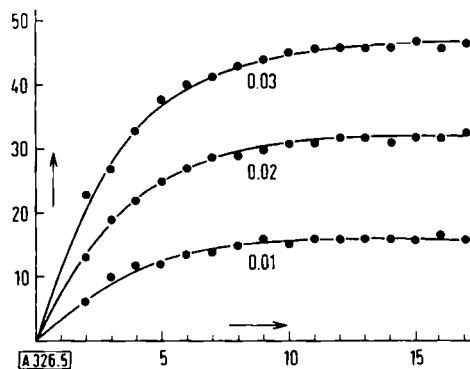


Abb. 5. Reaktionsgeschwindigkeit im Standardtest (vgl. Abb. 3) bei Einsatz verschiedener Mengen Rohextrakt. Die Zahlen an den Kurven geben das Volumen [ml] des Rohextraktes an.

Ordinate: $(\Delta E \cdot 1000)/\text{min}$.
Abszisse: Zeit [min].

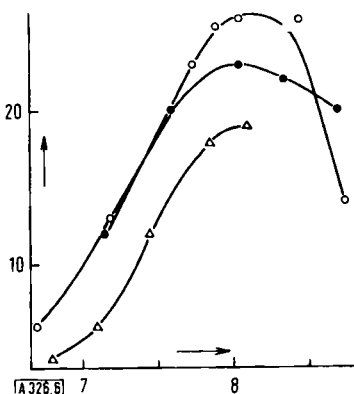


Abb. 6. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom pH.
○ = 0,1 M Triäthanolamin/HCl-Puffer.
● = 0,1 M Tris(hydroxymethylamino)-methan/HCl-Puffer.
Δ = 0,1 M Sörensen-Phosphat-Puffer. Sonst wie Legende zu Abb. 3.

Ordinate: $\frac{\Delta E \cdot 1000}{\text{min} \cdot (0,02 \text{ ml Rohextrakt})}$
Abszisse: pH.

Abb. 6 gibt die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom pH in verschiedenen Puffern wieder. Wir arbeiten routinemäßig (vgl. Legende zu Abb. 3) mit Triäthanolamin-Puffer, pH = 7,9.

4. Stabilisierung des Enzyms im Rohextrakt

Kurve 1 in Abb. 7 zeigt, daß ein Rohextrakt aus Hefe bei 0 °C in 12 Stunden etwa die Hälfte der Threonin-Desaminase-Aktivität verliert. Durch Zusatz von Pyridoxal-phosphat wird der Aktivitäts-Abfall verhindert (Kurve 3). Wir haben nach 54-stündigem Aufbewahren des mit

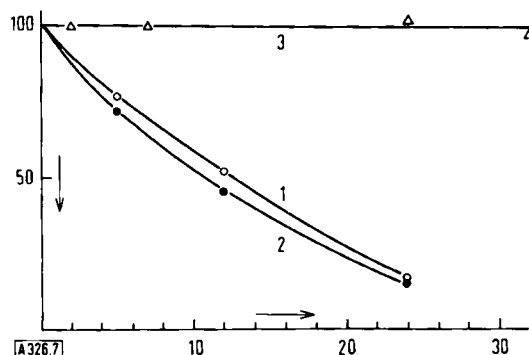


Abb. 7. Stabilisierung des Rohextraktes durch PALP.

Aktivitätstest vgl. Abb. 3.

Kurve 1: ohne Zusatz.

Kurve 2: mit $4,4 \cdot 10^{-2} \text{ M } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Kurve 3: mit 10^{-3} M PALP .

Ordinate: Aktivität [% der Ausgangsaktivität].

Abszisse: Dauer der Aufbewahrung des Rohextraktes bei 0 °C [Std.].

10^{-3} Mol Pyridoxalphosphat pro Liter versetzten Rohextraktes noch 88 % der Aktivität des frischen Extraktes gemessen. Tabelle 1 zeigt, daß auch 10^{-5} Mol Pyridoxalphosphat pro Liter noch eine deutliche Stabilisierung bewirken. Pyridoxaminphosphat stabilisiert das Enzym ebenfalls; die nicht phosphorylierten Vitamin-B₆-Derivate sind jedoch wirkungslos. Das Substrat des Enzyms, L-Threonin, schützt ebensowenig wie andere Aminosäuren. Ammoniumsulfat stabilisiert nur in unbiologisch

Tabelle 1. Stabilisierung des Hefe-Rohextraktes durch verschiedene Zusätze. Aktivitätstest vgl. Abb. 3.

Zugesetzte Substanz	Konzentration [Mol/l]	Aktivität nach 22–24 Std. bei 0 °C in Prozent der Anfangsaktivität
—	—	12
PALP	$1 \cdot 10^{-3}$	100
	$5 \cdot 10^{-4}$	92
	10^{-4}	80
	$2 \cdot 10^{-5}$	55
PAMP	$2 \cdot 10^{-3}$	72
	10^{-4}	48
Pyridoxal	$2 \cdot 10^{-3}$	12
Pyridoxol	$2 \cdot 10^{-3}$	20
L-Threonin	10^{-1}	< 3
L-Valin	$2 \cdot 10^{-2}$	< 3
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10^{-1}	16
	1	52

hoher Konzentration (vgl. auch Kurve 2 in Abb. 7). Die Aktivitätsabnahme ist irreversibel: setzt man dem 24 Stunden ohne Stabilisator aufbewahrten Rohextrakt nachträglich Pyridoxalphosphat oder Pyridoxaminphosphat zu, so tritt keine Reaktivierung ein. In einem Liter Hefe findet man etwa 10^{-5} Mol Pyridoxalphosphat oder Pyridoxaminphosphat [6, 7]. Es ist daher möglich, daß die in unseren Versuchen beobachtete Stabilisierung des Enzyms durch Pyridoxalphosphat und Pyridoxaminphosphat auch Bedeutung für die lebende Zelle hat.

5. Inaktivierung des Enzyms nach Verdünnung

Wird der durch Zerreiben von Hefezellen mit Aluminiumoxydpulver gewonnene konzentrierte Rohextrakt mit Pufferlösungen verdünnt, so beobachtet man eine sehr rasche Abnahme der Enzymaktivität. Verdünnt man beispielsweise 0,02 ml Rohextrakt, wie dies bei der Durchführung des optischen Testes routinemäßig geschieht, mit 0,1 M Triäthanolamin-Puffer (pH = 7,9) auf 3 ml, so nimmt die Aktivität von 33 auf 2 Einheiten [*], also auf weniger als 10%, ab, wenn man den Ansatz 15 min bei 22°C stehen läßt (vgl. Tabelle 2). Pyridoxalphosphat, das zwar, wie im vorigen Abschnitt gezeigt wurde, das im Rohextrakt konzentrierte Enzym vor der Inaktivierung schützt, hat auf die rasche Inaktivierung des verdünnten Enzyms keinen Einfluß. Dagegen schützt L-Threonin. In noch kleineren Konzentrationen schützen L-Isoleucin, L-Valin und L-Leucin. Bei Anwendung höherer Konzentrationen an

Tabelle 2. Schutz des Enzyms gegen Inaktivierung nach Verdünnung des Hefe-Rohextraktes. Rohextrakt wurde mit 0,1 M Triäthanolamin-Puffer (pH = 7,9), der die angegebenen Zusätze enthielt, 1:150 verdünnt und 15 min bei 22°C inkubiert. Hierauf wurde die Aktivitätsmessung (siehe Legende zu Abb. 3) durch Zusatz von LDH (in $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Suspension), DPNH, PALP und Threonin gestartet.

Zusatz vor der Inkubation	Aktivität [$\Delta E \times 1000 / \text{min} \times$ 0,02 ml Rohextrakt]
—	2
PALP $3 \cdot 10^{-4}$ M	< 1
L-Threonin $1,7 \cdot 10^{-2}$ M	28
D-Threonin $1,7 \cdot 10^{-2}$ M	2
L-Valin $1,7 \cdot 10^{-2}$ M	29
L-Serin $1,7 \cdot 10^{-2}$ M	2
L-Glutamat $1,7 \cdot 10^{-2}$ M	1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $1,47 \cdot 10^{-2}$ M	25
NH_4Cl $2,94 \cdot 10^{-2}$ M	23
KCl $2,94 \cdot 10^{-2}$ M	15
NaCl $2,94 \cdot 10^{-2}$ M	2
ohne Inkubation	33

[6] H. Holzer, U. Gerlach, G. Jacobi u. M. Gnoth, Biochem. Z. 329, 529 (1958).

[7] G. Schreiber, M. Eckstein, A. Oeser u. H. Holzer, unveröffentlichte Versuche.

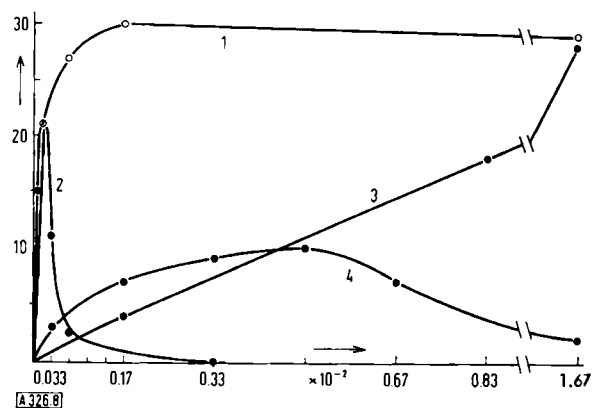


Abb. 8. Schutzwirkung verschiedener Aminosäuren gegen die Inaktivierung des Enzyms nach Verdünnung des Hefe-Rohextraktes. Einzelheiten siehe Legende zu Tabelle 2.

Kurve 1: Zusatz von L-Valin.

Kurve 2: Zusatz von L-Isoleucin.

Kurve 3: Zusatz von L-Threonin.

Kurve 4: Zusatz von L-Leucin.

$\Delta E \cdot 1000$

Ordinate: min. (0,02 ml Rohextrakt)

Abszisse: Endkonzentration des Zusatzes in der Küvette nach der Verdünnung des Rohextraktes [Mol/l].

Isoleucin und Leucin wird die Schutzwirkung durch die im folgenden Abschnitt beschriebene Hemmung der Enzymaktivität überlagert (vgl. Abb. 8). L-Serin und L-Glutamat sind ebenso wie D-Threonin wirkungslos (Tabelle 2). Dagegen kann man auch mit hohen Konzentrationen an Ammoniumsulfat die Inaktivierung verhindern (vgl. Abb. 9.) Das Sulfat-Anion spielt hierbei keine Rolle, da Ammoniumchlorid dieselbe Wirkung hat (Tabelle 2). Der Effekt ist nicht spezifisch für Ammonium: Kaliumchlorid schützt ebenfalls. Natriumchlorid ist wirkungslos.

Die in Tabelle 2 und den Abbildungen 8 und 9 wiedergegebenen Effekte spielen wahrscheinlich in der lebenden Zelle keine Rolle, da sie erst nach Verdünnung der Enzym-Lösung wirksam werden. Sie sind jedoch im Zusammenhang mit der Analyse der Wirkungsweise und insbesondere der Biosynthese des Enzyms interessant.

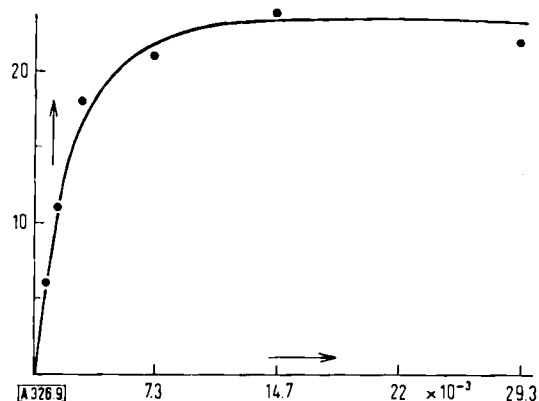


Abb. 9. Schutzwirkung von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gegen die Inaktivierung des Enzyms nach Verdünnung. Einzelheiten siehe Legende zu Tabelle 2.

$\Delta E \cdot 1000$

Ordinate: min. (0,02 ml Rohextrakt)

Abszisse: Endkonzentration an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in der Küvette nach der Verdünnung des Rohextraktes [Mol/l].

[*] Die Einheit ist definiert als $\frac{\Delta E \cdot 1000}{\text{min. (0,02 ml Rohextrakt)}}$.

Außer der von vielen anderen Beispielen bekannten Stabilisierung eines Enzyms durch Substrate und Coenzyme, stabilisieren in unserem Falle Aminosäuren (L-Valin, L-Isoleucin und L-Leucin), die nicht als Substrate der Reaktion dienen, jedoch die Biosynthese des Enzyms (in *Salmonella typhimurium* und *Escherichia coli*) durch „multivalente Repression“ hemmen [8]. Generell muß festgehalten werden, daß Enzyme in hoher Verdünnung, wie sie im allgemeinen beim Test vorliegt, ein völlig anderes Verhalten zeigen können als in konzentrierter Lösung, wie sie in lebenden Zellen vorliegt.

Die in diesem und dem vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Maßnahmen zum Schutz des Enzyms vor der Inaktivierung haben uns eine Anreicherung des Enzyms ermöglicht [9]. Da jedoch charakteristische Eigenschaften des Enzyms durch die Fraktionierungsoperationen geändert werden, wird in der vorliegenden Arbeit, die sich mit der Bedeutung des Enzyms für intakte Zellen beschäftigt, nur über Versuche mit Rohextrakten berichtet. Wie weit bereits bei der Bereitung des Rohextraktes Eigenschaften des Enzyms verändert werden, können wir nicht sagen. Es deutet manches darauf hin, daß die Bemerkung von Racker [10] „First purify, then think. Don't waste pure thinking time on dirty enzymes“ nur beschränkt gilt, da man durch das Studium eines gereinigten Enzyms zwar einiges, aber nicht alles, über das Verhalten des Enzyms in der lebenden Zelle erfahren kann.

6. Hemmung der Enzymaktivität durch L-Isoleucin

Umbarger [11] fand 1956, daß die Threonin-Desaminase-Reaktion in Extrakten aus *Escherichia coli* durch kleine Konzentrationen an Isoleucin gehemmt wird. Da Isoleucin das Endprodukt einer Synthesekette ist, die von Threonin ausgeht (vgl. Abb. 1), liegt hier ein für die Zellökonomie „nützlicher“ Regelmechanismus vor. Steht genügend Isoleucin, das für die Synthese von Protein benötigt wird, zu Verfügung, so wird die Nachlieferung von Isoleucin auf der Stufe der Threonin-Desaminierung gehemmt. Sinkt die Konzentration an Isoleucin durch Verbrauch bei der Proteinsynthese ab, so wird die Hemmung der Isoleucin aus Threonin synthetisierenden Enzymkette verringert. Die Isoleucin-Konzentration, und damit das Ausmaß der Hemmung, spielen sich so ein, daß der Nachschub an Isoleucin dem Verbrauch an Isoleucin entspricht. Es handelt sich um einen Rückkoppelungsmechanismus (feed-back-Mechanismus), wie er ähnlich bei der Steuerung von Verstärkerröhren in der Radiotechnik benützt wird.

Tabelle 3 zeigt, daß auch Threonin-Desaminase aus Hefe durch kleine Konzentrationen an L-Isoleucin gehemmt wird. Die Hemmung ist weitgehend spezifisch: alle anderen bisher von uns untersuchten Aminosäuren hemmen

Tabelle 3. Hemmung der Threonin-Desaminase-Aktivität durch verschiedene Aminosäuren. Aktivitätstest vgl. Abb. 3.

Zugesetzte Aminosäure	Endkonzentration [Mol/l] · 10 ³	$\Delta E \times 1000/\text{min} \times (0,02 \text{ ml Rohextrakt})$	Hemmung [%]
—	—	14	0
L-Isoleucin	10	0	100
	1,7	0	100
	0,67	1,5	93
	0,3	7	50
	0,17	12	15
	0,03	14,5	<5
D-Isoleucin	10	14	<5
L-Leucin	10	4	71
	0,67	14	<5
L-Valin	10	14	<5
L-Serin	10	14,5	<5
L-Aspartat	10	14	<5

wenig oder sind wirkungslos. Die Hemmung der Enzymaktivität durch L-Isoleucin ist stark vom pH abhängig (vgl. Abb. 10). 3×10^{-4} Mol Isoleucin pro Liter hemmen bei pH = 7 vollständig, bei pH = 7,9 nur noch zu etwa 50 % und bei pH = 8,7 gar nicht mehr. Eventuell spielt die pH-Abhängigkeit der Isoleucin-Hemmung bei der Regulation des Stoffwechsels in der lebenden Zelle eine Rolle.

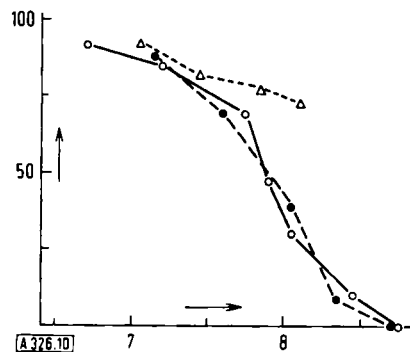


Abb. 10. Abhängigkeit der Aktivitätshemmung durch Isoleucin vom pH. 15 min nach Start der Reaktion mit Rohextrakt wurde $1 \mu\text{Mol}$ Isoleucin pro Küvette (Endkonzentration $3,3 \cdot 10^{-4}$ M) zugesetzt und nach weiteren 15 min die konstante Endgeschwindigkeit registriert.

○ = 0,1 M Triäthanolamin/HCl-Puffer.

● = 0,1 M Tris(hydroxymethylamino)-methan-Puffer

△ = 0,1 M Sörensen-Phosphat-Puffer.

Ordinate: Hemmung [%] der Enzymaktivität in einem Kontrollansatz ohne Isoleucin.

Abszisse: pH.

7. Repression der Enzymsynthese durch NH_4^+

Wir haben geprüft, ob NH_4^+ ebenso wie Isoleucin das Enzym hemmt. Dies ist nicht der Fall [*]. Jedoch beeinflusst auch die NH_4^+ -Konzentration das Ausmaß der Threonin-Desaminase-Reaktion in lebenden Zellen. Diese Regelung kommt durch eine Beeinflussung der Geschwindigkeit der Enzymsynthese zustande. Züchtet man Hefezellen in Nährmedien, die verschiedene Stickstoffquellen enthalten, so findet man, wie Tabelle 4 zeigt, verschiedene Aktivitäten an Threonin-Desaminase. Man

[*] Über eine Aktivierung durch NH_4^+ („Reaktionsprodukt-Aktivierung“) werden wir an anderer Stelle berichten.

[8] M. Freundlich, R. O. Burns u. H. E. Umbarger, Proc. nat. Acad. Sci. USA 48, 1804 (1962).

[9] C. Cennamo, M. Boll u. H. Holzer, unveröffentlichte Versuche.

[10] E. Racker, Nachr. Chem. Techn. 9, 348 (1961).

[11] H. E. Umbarger, Science (Washington) 123, 848 (1956).

Tabelle 4. Spezifische Aktivität von Threonin-Desaminase nach Wachstum der Hefe auf Nährmedien mit verschiedenen Stickstoffquellen [12].

Stickstoff- quelle	Aktivität [$\Delta E \times$ 1000/min \times ml Roh- extrakt]	mg Pro- tein/ml Roh- extrakt	Spezifische Aktivität [$\Delta E \times$ 1000/min \times mg Protein]	Spezifische Aktivität [% des Wertes mit NH_4^+ als Stickstoff- quelle]
NH_4^+	170	6,4	26	100
NH_4^+ + DL-Threonin	130	5,4	24	92
DL-Threonin	400	5,5	73	280
DL-Serin	530	6,9	77	295
DL-Isoleucin	400	7,0	57	220

sieht, daß das Enzym immer, wenn NH_4^+ im Nährmedium vorhanden ist, in kleiner spezifischer Aktivität (und daher Konzentration) vorliegt. Wenn Aminosäuren die einzige Stickstoffquelle sind, ist die Konzentration des Enzyms hoch. Da Threonin-Desaminase NH_4^+ aus dem Aminostickstoff von Aminosäuren liefert (vgl. Abb. 2), ist dieser Effekt für die Ausnützung der Stickstoffquelle im Nährmedium durch die Zellen vorteilhaft: Ist NH_4^+ im Medium bereits vorhanden, so wird das Enzym nicht benötigt. Sind Aminosäuren die einzige Stickstoffquelle, so sorgt das Enzym für Lieferung des insbesondere zur Carbamylphosphatbildung notwendigen NH_4^+ .

Versuche mit Bakterien, insbesondere mit *Escherichia coli*, haben gezeigt, daß derartige, durch veränderte Milieubedingungen bewirkte Änderungen von Enzymaktivitäten durch „Induktion“ oder „Repression“ der Enzymsynthese zustande kommen. Bei der Induktion wird die Synthese durch gewisse im Nährmedium enthaltene Substanzen in Gang gesetzt, bei der Repression wird sie gehemmt (Zusammenfassung siehe z. B. [13, 14]). Die in Tabelle 4 wiedergegebenen Daten machen wahrscheinlich, daß auch die Geschwindigkeit der Threonin-Desaminase-Synthese in Hefe einer derartigen Steuerung unterliegt. Nimmt man an, daß NH_4^+ die Synthese des Enzyms reprimiert, so kann man verstehen, weshalb das Enzym nach Kultivierung der Zellen im NH_4^+ -haltigen Nährmedium nur mit geringer spezifischer Aktivität, das heißt in geringer Konzentration, vorliegt. Man kann auch verstehen, weshalb es nach Anzucht der Zellen mit anderen Stickstoffquellen als NH_4^+ in hoher Aktivität vorliegt. In diesem Falle fehlt die Repression der Enzymsynthese durch NH_4^+ (man spricht von „Derepression“). Besonders aufschlußreich ist der Versuch, bei dem NH_4^+ und die Aminosäure Threonin gleichzeitig im Nährmedium vorhanden waren (Tabelle 4). Da man hier ebenso niedrige Threonin-Desaminase-Aktivität findet, wie bei der Anzucht mit NH_4^+ allein, wird nicht durch Aminosäuren die vermehrte Synthese des Enzyms induziert, sondern durch NH_4^+ die Synthese des Enzyms reprimiert.

[12] H. Holzer, M. Boll u. C. Cennamo, Vortrag bei der gemeinsamen Tagung der deutschen, französischen und schweizerischen Biochemiker in Straßburg (September 1963).

[13] F. Jacob u. J. Monod, Cold Spring Harbor Symp. quantitat. Biol. 26, 193 (1961).

[14] H. J. Vogel, Cold Spring Harbor Symp. quantitat. Biol. 26, 163 (1961).

Die Desaminierung von Threonin ist nicht nur zur Gewinnung von NH_4^+ , sondern auch zur Produktion von α -Ketobutyrat für die Synthese von Isoleucin notwendig. Es ist daher verständlich, daß die Synthese des Enzyms durch NH_4^+ nicht vollständig unterdrückt wird. Nach Aufzucht von Hefe in einem NH_4^+ -haltigen Medium ist die Aktivität des Enzyms etwa $1/3$ derjenigen nach Kultur mit Aminosäuren als Stickstoffquelle. Es ist daher zu vermuten, daß $1/3$ der Enzymaktivität genügt, um das für die Isoleucin-Synthese notwendige α -Ketobutyrat aus Threonin zu liefern.

8. Diskussion

Die früher von uns [15] in Hefe nachgewiesene DPN-abhängige Glutaminsäure-Dehydrogenase liefert ebenso wie Threonin-Desaminase aus Aminostickstoff NH_4^+ :



Wir fanden für die Steuerung der Aktivität dieses Enzyms gleichartige Verhältnisse wie bei der Threonin-Desaminase: die Synthese des Enzyms wird durch NH_4^+ reprimiert [5, 16]. Bei der Anzucht von Hefe in einem NH_4^+ -haltigen Nährmedium beträgt die Aktivität der DPN-Glutaminsäure-Dehydrogenase, im Vergleich zur Aufzucht im Nährmedium mit Aminosäuren als Stickstoffquelle, weniger als 5%. Sehr wahrscheinlich ist demnach die biologische Aufgabe der DPN-abhängigen Glutaminsäure-Dehydrogenase in Hefe ganz vorwiegend die Lieferung von NH_4^+ aus Glutaminsäure. Wird NH_4^+ nicht benötigt, so wird auch das Enzym nicht benötigt. Da Glutaminsäure ebenso wie Aspartat (und damit Threonin) die Aminogruppe durch Transaminierung von allen anderen Aminosäuren erhalten kann, dient die Glutaminsäure-Dehydrogenase-Reaktion ebenso wie die Threonin-Desaminase-Reaktion der Versorgung der wachsenden Zelle mit NH_4^+ auf Kosten von Aminostickstoff. In Abb. 11 ist die Stellung des NH_4^+ im Stoffwechsel zusammenfassend skizziert. NH_4^+ wird aus dem Aminostickstoff von Aspartat und Glutaminsäure oder den damit durch Transaminierung im Gleichgewicht stehenden anderen Aminosäuren geliefert und als Baustein für die Synthese von Carbamylphosphat, Glutaminsäure,

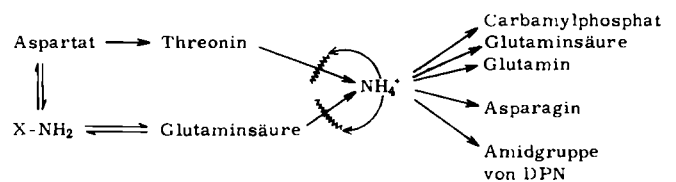


Abb. 11. Regulation des NH_4^+ -Haushaltes in Hefezellen durch Repression der Synthese von Threonin-Desaminase und DPN-Glutamat-Dehydrogenase.

Glutamin und anderen Zellinhaltsstoffen benötigt. Der Bedarf an NH_4^+ steuert die Produktion dadurch, daß bei erhöhter NH_4^+ -Konzentration die Synthese der NH_4^+ -liefernden Enzyme reprimiert wird.

Die Hemmung von Threonin-Desaminase durch Isoleucin tritt sehr rasch ein. Wir haben beobachtet, daß die Hemmung in weniger als 1 min voll ausgebildet ist. Im

[15] H. Holzer u. S. Schneider, Biochem. Z. 329, 361 (1957).

[16] G. Hierholzer u. H. Holzer, Biochem. Z., im Druck.

Gegensatz dazu kann sich die Repression der Enzymsynthese durch NH_4^+ nur mit der Geschwindigkeit auf den Enzymgehalt der Zellen auswirken, mit der die „Verdünnung“ des Enzyms durch Zellvermehrung stattfindet. Es handelt sich bei der Hefe um Zeiträume in der Größenordnung von Stunden [16]. Da von der Aufrechterhaltung des L-Isoleucin-Spiegels die Proteinsynthese abhängt, ist verständlich, daß die Isoleucin-Synthese durch einen sehr schnell reagierenden Mechanismus reguliert wird. Veränderungen des NH_4^+ -Gehaltes im Nährmedium werden unter natürlichen Bedingungen nicht rasch erfolgen. Es ist daher ausreichend, wenn die Anpassung an einen veränderten NH_4^+ -Gehalt durch einen langsam ansprechenden Mechanismus, nämlich durch Steuerung der Ge-

schwindigkeit der Enzymsynthese, stattfindet. Aktivitätshemmung („feed back“) ist demnach ein Mittel der raschen „Feinkontrolle“ des Stoffwechsels, Repression der Enzymsynthese ist ein Mittel der „auf lange Sicht“ wirkenden „Grobkontrolle“ [17].

Herrn Prof. Dr. O. Wiss (Hoffmann-La Roche, Basel) danken wir für Pyridoxalphosphat und Pyridoxaminphosphat. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Bundesministerium für Wissenschaftliche Forschung danken wir für Unterstützung unserer Arbeiten.

Eingegangen am 15. August 1963 [A 326]

[17] H. A. Krebs, Tagung der Nobelpreisträger in Lindau (Bodensee); J. M. Ashwort u. H. L. Kornberg, Biochim. biophysica Acta 73, 519 (1963).

Reversibilität der Energieumwandlungen in der Atmungskette [*]

VON DOZ. DR. M. KLINGENBERG

PHYSIOLOGISCH-CHEMISCHES INSTITUT DER UNIVERSITÄT MARBURG

Otto Warburg zum 80. Geburtstag

Die Umwandlung von Verbrennungsenergie in Phosphatbindungsenergie bei der oxydativen Phosphorylierung ist reversibel. Daher können Redoxreaktionen in der Atmungskette gegen das Gefälle des Redoxpotentials ablaufen, wenn Energie zugeführt wird. Diese Energie kann entweder aus dem ATP oder direkt aus energiereichen Zwischenverbindungen der oxydativen Phosphorylierung entnommen werden. – Im Mittelpunkt der vorliegenden Ausführungen steht das Postulat eines aus der Reversibilität resultierenden Gleichgewichtes in der Atmungskette. Damit wird eine einheitliche Betrachtungsweise für verschiedene Erscheinungen der oxydativen Phosphorylierung geboten. Dieses Gleichgewicht kann sich über mehrere Komponenten der Atmungskette erstrecken. Die Atmung entspricht einem Fließgleichgewicht in der Atmungskette, das mit zunehmender Atmungsgeschwindigkeit immer stärker vom statischen Gleichgewicht abweicht. Die Atmung kann somit durch das Phosphorylierungspotential des ATP reguliert werden. – Der stationäre Reduktionszustand der Atmungsketten-Komponenten kann als Funktion sowohl des Phosphorylierungspotentials als auch der von beiden Enden auf die Atmungskette einwirkenden Redoxpotentiale gedeutet werden. Die Atmungskette reagiert auf die beiden Extremfälle einer minimalen oder maximalen Differenz der Redoxpotentiale mit charakteristischen Mustern der Reduktionszustände ihrer Komponenten. Die durch das Phosphorylierungspotential überbrückten Redoxpotentialdifferenzen können an einem Phosphorylierungsschritt beispielsweise 280 mV betragen. – Auch in kinetischer Hinsicht sind die Bedingungen eines Gleichgewichtes in der Atmungskette erfüllt: die Geschwindigkeiten der Rückreaktion der Elektronen- oder Wasserstoffübertragung sind von gleicher Größenordnung wie diejenigen der Vorwärtsreaktion.

1. Einleitung

Die Vereinigung des Substratwasserstoffs mit Sauerstoff über die Atmungskette – die frühzeitig von Otto Warburg untersucht wurde – ist im tierischen Stoffwechsel die Reaktionsfolge mit dem größten Energiegefälle. Es ist daher zu verstehen, daß diese Reaktionsfolge meist als irreversibel galt. Diese Ansicht beruhte vermutlich

darauf, daß der Gesamtprozeß der zellulären „Verbrennung“ als Analogie zur Knallgas-Verbrennung gesehen wurde. Da in der Atmungskette die Oxydationsenergie in die Energie der Phosphorsäureanhydrid-Bindung des Adenosin-triphosphats (ATP) [**] umgewandelt wird, muß eine Umkehrung der Substratverbrennung aber prinzipiell – bei Umkehrung der Energieumwandlung – möglich sein. Voraussetzung hierfür ist eine feste „Koppelung“ zwischen den Redoxreaktionen und den Reaktionen der Energieüberführung in ATP. Tatsächlich konnte unter dieser Voraussetzung Reversibilität für den

[*] Nach Vorträgen am Institute for Enzyme Research, University of Wisconsin, Madison, und an der Johnson Foundation, University of Pennsylvania, Philadelphia, im April 1962.

(Fußnote [**] siehe Seite 901)