

auch ein höheres Phosphorylierungspotential. In Mitochondrien mit gehemmter Atmung dagegen rücken die Redoxpotentiale verhältnismäßig nahe zusammen infolge des Ausschlusses von Sauerstoff und dem Überschuß an oxydierenden Substraten, so daß die Atmungskette bereits mit einem geringeren Phosphorylierungspotential überspannt werden kann.

8. Schlußfolgerungen

Auf Grund der Reversibilität kann die Energieausbeute der oxydativen Phosphorylierung im Prinzip sehr hoch sein. Dieses gilt jedoch nach unseren bisherigen Kenntnissen nur für die Spanne zwischen Substrat und Cytochrom a, die bei $\Delta E \approx 520$ bis 600 mV prinzipiell bereits durch zwei Phosphorylierungsschritte überbrückt werden kann. Die Reversibilität des dritten Phosphorylierungsschrittes, der bei der Sauerstoffaktivierung durch die Cytochromoxydase liegen sollte, ist bisher nicht nachgewiesen worden. Es ist denkbar, daß dieser Schritt, bei dem eine besonders große Redoxpotential-Differenz (ΔE ca. 420 bis 520 mV) zu überbrücken ist, auch unter einem extremen Phosphorylierungspotential nicht reversibel wird. In diesem Sinne werden die Effekte der Reversibilität der oxydativen Phosphorylierung, z. B. die Atmungskontrolle, nur durch die beiden ersten Phosphorylierungsschritte verursacht.

Die Reversibilität ist nicht nur für die zellphysiologische Wirksamkeit und Energieausbeute der oxydativen Phos-

phorylierung wichtig. Ihr Studium bietet auch einen neuen Weg zur Erforschung des Mechanismus der Energieübertragung und der damit assoziierten Redoxreaktionen in der Atmungskette. Die bisher noch nicht identifizierte Zwischenform der Energie, welche bei der Umwandlung der Redox- in die Phosphatbindungsenergie auftreten muß, kann vom ATP her statt vom Elektronentransport gebildet werden. Außerdem lassen sich durch das Studium der Reversibilität die Bedingungen ermitteln, unter denen sich diese Zwischenform in größerer Menge ansammeln sollte. Damit bietet die Untersuchung der Reversibilität auch ein Hilfsmittel zur Aufklärung des Mechanismus der oxydativen Phosphorylierung, das bereits vielfach angewendet wird.

Eine weitere, hier nicht näher erörterte physiologische Bedeutung hat die Reversibilität möglicherweise bei dem „aktiven“ Transport, bei dem mit Hilfe von „Redoxpumpen“ ein cyclischer, durch ATP getriebener Elektronentransport und damit eine den „aktiven“ Transport bewirkende Ladungsverschiebung eintritt [50]. Es ist außerdem diskutiert worden, ob die Umkehrung der Sauerstoffaufnahme eine Rolle bei der photosynthetischen Sauerstoff-Bildung spielt [51].

Diese Untersuchungen wurden durch den Fonds der Chemischen Industrie und durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Eingegangen am 22. August 1963 [A 328]

[50] R. E. Davies, Symp. Soc. exp. Biol. 8, 453 (1954).

[51] B. Chance, J. biol. Chemistry 236, 1549 (1961).

Nicht-hormonale Kontrolle des Glucosestoffwechsels in normalen und malignen Geweben

VON DOZ. DR. DR. H. TIEDEMANN

HEILIGENBERG-INSTITUT, HEILIGENBERG, KREIS ÜBERLINGEN/BODENSEE

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

Die Steuerung des Glucose-Abbaues sowie der Gluconeogenese hängt von enzymatischen Rückkopplungsreaktionen ab. Bei der Kontrolle der Glykolyse sind die beiden ersten, durch die Enzyme Hexokinase und Phosphofructokinase katalysierten Reaktionsschritte von besonderer Bedeutung.

Alle Organismen sind mehr oder weniger zur Anpassung an verschiedene Lebensbedingungen befähigt. Die Anpassung wird durch Umstellungen des Stoffwechsels ermöglicht. In den letzten Jahren wurde der Glucose-Stoffwechsel unter diesem Gesichtspunkt eingehend untersucht. Er kann hormonal kontrolliert werden, hängt aber, wie Lynen [1] und Johnson [2] erstmals gezeigt ha-

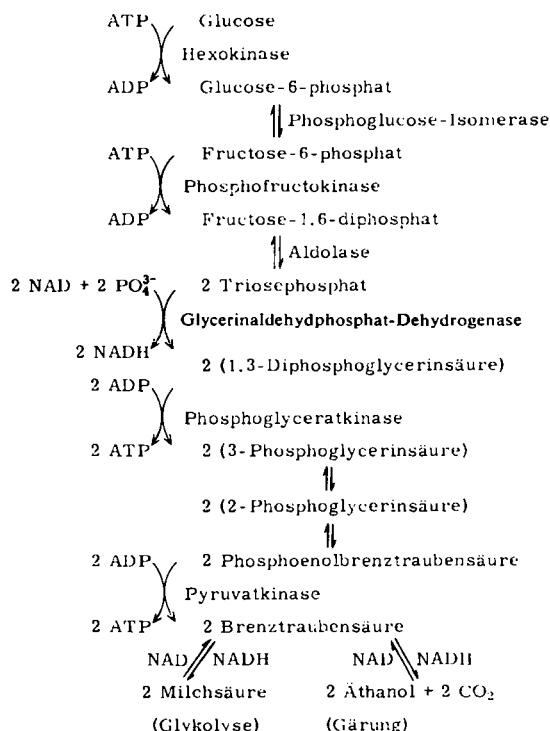
ben, auch von anderen Teilprozessen des Stoffwechsels, und zwar von der Atmung und der damit gekoppelten oxydativen Phosphorylierung, ab. Die mit dieser Kontrolle verbundenen Regelvorgänge, insbesondere die Steuerung durch die Hexokinase- und Phosphofructokinase-Reaktion sollen in dieser Arbeit beschrieben werden.

[1] F. Lynen, Liebigs Ann. Chem. 546, 120 (1941).

[2] M. J. Johnson, Science (New York) 94, 200 (1941).

1. Die Reaktionsschritte der Glykolyse

Die Reaktionsschritte der Glykolyse und der Gärung (Schema 1) wurden vor allem von *Embden*, *Meyerhof*, *Warburg* und *Cori* aufgeklärt. Für die Steuerung der Glykolyse sind jene Schritte besonders wichtig, welche die Geschwindigkeit begrenzen (Schrittmacher nach *H. A. Krebs* [3]) oder an Verzweigungspunkten des Stoffwechsels liegen. Diese Schritte sollen deshalb etwas eingehender besprochen werden.



Schema 1. Glykolyse (und Gärung).

a) Hexokinase

Der Glucoseabbau wird durch die Hexokinase-Reaktion eingeleitet, bei welcher der endständige Phosphat-Rest von einem Mg-ATP-Komplex [*] in die 6-Stellung der Glucose übertragen wird. Der Reaktionsverlauf ist im einzelnen noch nicht bekannt. Ein Phosphoenzym tritt als Zwischenverbindung wahrscheinlich nicht auf [4-6].

[3] *H. A. Krebs*, *Endeavour* 16, 125 (1957).

[*] Folgende Abkürzungen werden in dieser Arbeit verwendet:

ADP = Adenosindiphosphat
AMP = Adenosinmonophosphat
ATP = Adenosintriphosphat
DNP = 2,4-Dinitrophenol
FDP = Fructose-1,6-diphosphat
F-6-P = Fructose-6-phosphat
G-6-P = Glucose-6-phosphat
NAD = Nicotin-adenin-dinucleotid
NADH = reduziertes NAD
NADP = Nicotin-adenin-dinucleotid-phosphat
NADPH = reduziertes NADP.

[4] *K. A. Trayser u. S. P. Colowick*, *Arch. Biochem. Biophysics* 94, 161 (1961).

[5] *H. J. Fromm u. V. Zewe*, *J. biol. Chemistry* 237, 3027 (1962).

[6] *G. G. Hammen u. D. Kochavi*, *J. Amer. chem. Soc.* 84, 2069, 2073 (1962).

In mehreren Geweben (z. B. Leber, Skelettmuskel) befindet sich die Hexokinase vorwiegend im Cytoplasma. In den Zellen der Hirnrinde, die sehr viel Hexokinase enthält, ist sie dagegen zu 75 bis 90 % an Mitochondrien gebunden [7,8] und kann von diesen durch Behandlung mit Lipase und mit Desoxycholsäure nicht abgelöst werden. In Ascites-Tumorzellen macht die an Mitochondrien gebundene Hexokinase etwa die Hälfte der insgesamt in diesen Zellen vorhandenen Hexokinase-Aktivität aus [9-11]. Wie sich die partikular gebundenen und die nicht partikular gebundenen Hexokininasen strukturell unterscheiden, ist noch nicht bekannt. Es könnte sich um Isozyme handeln, d. h. um Enzyme mit gleicher Substratspezifität, aber unterschiedlichem Molekülbau. Isozyme der Hefe-Hexokinase sind ebenfalls gefunden worden [12].

Die Spezifität der Hexokinase ist nicht sehr groß. Von Hefe-Hexokinase und Hexokininasen aus verschiedenen tierischen Geweben werden außer D-Glucose auch D-Fructose (wahrscheinlich als D-Fructofuranose), D-Mannose, D-2-Desoxyglucose, D-2-Glucosamin und D-Glucoson phosphoryliert [13-18]. Zwischen Zuckerpaaren, die als Substrat dienen (z. B. D-Glucose/D-Mannose), besteht kompetitive Hemmung. Die Substrat-Enzym-Affinitätskonstante (Michaelis-Menten-Konstante) *K_M* ist für solche Paare gleich der Hemmkonstanten *K_i*. Offenbar besteht also eine Konkurrenz dieser Substrate um das gleiche aktive Zentrum desselben Enzyms.

N-Acetyl-D-glucosamin-Derivate werden nicht phosphoryliert, besitzen aber eine hohe Affinität zur Hexokinase und sind daher wirksame kompetitive Hemmstoffe [19]. Ähnliches gilt für 6-Desoxy-D-glucose [17] und 6-Desoxy-6-fluor-D-glucose [20].

Sowohl die partikular gebundenen als auch die löslichen Hexokininasen aus tierischen Geweben werden im Gegensatz zur kristallisierten Hefe-Hexokinase [7] durch das Produkt der Hexokinase-Reaktion, D-Glucose-6-phosphat (G-6-P), nicht-kompetitiv gehemmt: 4·10⁻⁴ Mol G-6-P/l hemmen zu 50 % [9, 21]. D-Mannose-6-phosphat und 2-Desoxy-D-glucose-6-phosphat hemmen das Enzym nicht. Diese Befunde lassen sich ebenso wie die Ergebnisse weiterer Versuche mit nicht-kompetitiv hemmenden Hexose-6-phosphaten an Hirn-Hexokinase schematisch so zusammenfassen, daß als Substrate nur

[7] *R. K. Crane u. A. Sols*, *J. biol. Chemistry* 203, 273 (1953).

[8] *M. K. Johnson*, *Biochem. J.* 77, 610 (1960).

[9] *R. B. McComb u. W. D. Yushok*, *Biochim. biophysica Acta* 34, 515 (1959).

[10] *F. B. Straub*, *Ber. Akad. Wiss. USSR* 95, 1021 (1954).

[11] *G. Acs, T. Gasco, G. Grosz, S. Molnar, O. v. Stephanek u. F. Straub*, *Acta physiol. Acad. Sci. hung.* 8, 269 (1955).

[12] *K. A. Trayser u. S. P. Colowick*, *Arch. Biochem. Biophysics* 94, 177 (1961).

[13] *A. Sols, G. de la Fuente, C. Villar-Palasi u. C. Asensio*, *Biochim. biophysica Acta* 30, 92 (1958).

[14] *J. H. Johnstone u. I. L. S. Mitchell*, *Biochem. J.* 55, XVII (1953).

[15] *R. P. Harpur u. J. H. Quastel*, *Nature (London)* 164, 693 (1949).

[16] *M. T. Hudson u. G. E. Woodward*, *Biochim. biophysica Acta* 28, 127 (1958).

[17] *R. K. Crane u. A. Sols*, *J. biol. Chemistry* 210, 581 (1954).

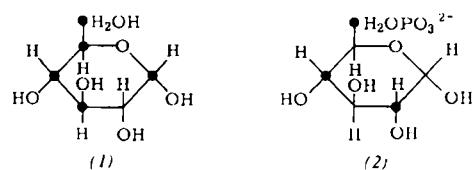
[18] *M. W. Stein, G. T. Cori u. C. F. Cori*, *J. biol. Chemistry* 186, 763 (1950).

[19] *F. Maley u. H. A. Lardy*, *J. biol. Chemistry* 214, 765 (1955).

[20] *E. R. Blackley u. P. O. Boyer*, *Biochim. biophysica Acta* 16, 576 (1955).

[21] *R. K. Crane u. A. Sols*, *J. biol. Chemistry* 210, 597 (1954).

solche Zucker dienen können, deren Struktur an den mit • bezeichneten C-Atomen der Formel (1) entspricht. Für nicht-kompetitive Inhibitoren gilt entsprechend Formel (2) [22].



ADP hemmt Hexokinase kompetitiv. Bei einem ATP/ADP-Quotienten von 1 ist die Aktivität der Hirn-Hexokinase um ca. 40 % geringer. Ein so hohes ATP/ADP-Verhältnis wird unter physiologischen Bedingungen aber kaum erreicht.

Die „Aktivierung“ der Hexokinase durch Gewebeextrakte ist mindestens zum Teil durch deren Gehalt an Phosphoglucomutase und Phosphofructokinase bedingt, die das hemmende G-6-P fortschaffen [23,24].

b) Phosphoglucomutase

Als nächstes Enzym in der Glykolysekette folgt Phosphoglucomutase. Sie isomerisiert G-6-P zu Fructose-6-phosphat (F-6-P) und wird durch 6-Phosphogluconäure gehemmt, die beim Abbau von G-6-P über den Pentosephosphat-Cyclus entsteht [25,26]. Da Phosphoglucomutase aber in allen bisher untersuchten Geweben in großem Überschuss vorkommt, ist es fraglich, ob diese Hemmung unter physiologischen Bedingungen eine Rolle spielt (siehe S. 914).

2-Desoxy-6-phospho-D-glucose kann nicht isomerisiert werden und wird daher nicht weiter umgesetzt. Sie hemmt die Phosphoglucomutase aber kompetitiv [27].

Viele Gewebe besitzen außer Phosphoglucomutase ein Enzym, das D-Mannose-6-phosphat in F-6-P umwandelt und D-Mannose so in den allgemeinen Glykolyseweg einschleust. Bienen fehlt dieses Enzym. Daher ist Mannose für Bienen giftig [28]: Mannose-6-phosphat wird akkumuliert und hemmt die Phosphoglucomutase [29].

c) Phosphofructokinase

Das zweite phosphorylierende Enzym, die Phosphofructokinase, konnte bisher noch nicht in kristallisierter Form isoliert werden. Das Enzym benötigt ebenso wie Hexokinase Mg^{2+} [30]. Partiell gereinigte Phosphofructokinase aus Kaninchenmuskel oder aus Leber wird durch ADP, AMP, 3',5'-AMP (cyclische 3',5'-Adenylsäure)

[22] A. Sols u. R. K. Crane, J. biol. Chemistry 206, 925 (1953).

[23] C. Long u. A. R. Thomson, Biochem. J. 61, 465 (1955).

[24] M. Kerly u. D. H. Leaback, Biochem. J. 67, 250 (1957).

[25] E. Noltmann u. F. E. Bruns, Biochem. Z. 331, 436 (1959).

[26] V. R. Potter u. H. Niemeyer: Ciba Foundation Symposium on the Regulation of Cell Metabolism. Churchill Ltd., London 1958.

[27] A. N. Wick, D. R. Drury, H. J. Nakada u. J. B. Wolfe, J. biol. Chemistry 224, 963 (1957).

[28] K. v. Frisch, Naturwissenschaften 18, 169 (1930).

[29] A. Sols, E. Cadenas u. F. Alvarado, Science (Washington) 131, 297 (1960).

[30] L. Berger, M. W. Stein, S. P. Colowick u. C. F. Cori, J. gen. Physiol. 29, 379 (1946).

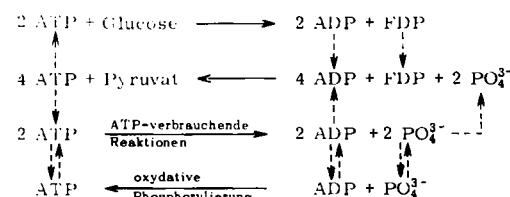
und Orthophosphat aktiviert [31, 31a]. Durch Erhöhung der ATP-Konzentration wird das Enzym dagegen gehemmt, wenn die Substrat-(F-6-P)-Konzentration niedrig ist. Wahrscheinlich spielen diese Effekte bei der physiologischen Steuerung der Phosphofructokinase-Aktivität in Homogenaten und Zellen eine Rolle (siehe unten).

Die Hemmung durch ATP hängt von der Mg^{2+} -Konzentration ab [32]. Durch Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration kann die Hemmung aufgehoben werden. Bei hoher Mg^{2+} -Konzentration liegt ATP als Mg-ATP-Komplex [33] vor, der nicht hemmt.

d) Weitere Schritte

Bei der Phosphofructokinase-Reaktion entstehendes Fructose-1,6-diphosphat (FDP) wird durch Aldolase in reversibler Reaktion in zwei Triosephosphate gespalten. Intermediär entsteht eine Enzym-Dihydroxyacetophosphat-Verbindung, die wahrscheinlich die Struktur einer Schiffsschen Base hat. Vermutlich reagiert die ε-Aminogruppe eines Lysin-Restes mit der Carbonylgruppe des Dihydroxyacetophosphates [34].

Bei der nun folgenden Oxydation wird anorganisches Phosphat aufgenommen unter Bildung von 1,3-Diphosphoglycerinsäure. Den Wasserstoff übernimmt Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD). Die Reaktion wird von dem Enzym Glyceraldehydphosphat-Dehydrogenase katalysiert und verläuft in zwei Stufen. Es folgen die dephosphorylierenden Reaktionsschritte, bei denen durch Phosphoglyceratkinese [35] und durch Pyruvatkinase die Phosphatreste auf ADP unter Rückbildung von ATP übertragen werden.



Schema 2. Phosphatkreislauf bei Glykolyse und oxydative Phosphorylierung.

Beim Abbau von einem Mol Glucose werden insgesamt 2 Mol ATP und 2 Mol Orthophosphat verbraucht und 4 Mol ATP aus ADP neu gebildet (Schema 2). Würden keine weiteren Reaktionen ablaufen, welche die überschüssigen 2 Mol ATP in ADP und Orthophosphat zurückverwandeln, so käme die Glykolyse schließlich durch Mangel an ADP und Orthophosphat zum Stillstand. In allen Zellen sind aber Enzyme vorhanden, die ATP spalten. Die dabei freiwerdende Energie kann zum Teil für Synthesen, Bewegungsenergie und Erzeugung von elektrischen Potentialen nutzbar gemacht werden [36].

[31] J. V. Passoneau u. O. H. Lowry, Fed. Proc. 21, 87 (1962).

[31a] T. E. Mansour u. J. M. Mansour, J. biol. Chemistry 273, 629 (1962).

[32] H. A. Lardy u. R. E. Parks: Enzymes, Units of Biological Structure and Function. Academic Press, New York 1956, S. 584.

[33] J. Raaflaub u. I. Leupin, Helv. chim. Acta 39, 832 (1956).

[34] B. L. Horecker, T. Cheng, E. Grazi, C. Y. Lai, P. Rowley u. O. Tschola, Fed. Proc. 21, 1023 (1962).

[35] Th. Bücher, Biochim. biophysica Acta 1, 292 (1947).

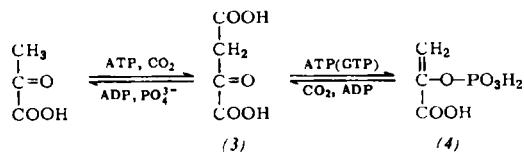
[36] H. A. Krebs u. H. L. Kornberg, Ergebn. Physiol., Biol., Chemie exp. Pharmakol. 49, 212 (1957).

Die aus Glucose schließlich entstehende Brenztraubensäure wird bei der Glykolyse durch Milchsäure-Dehydrogenase zu Milchsäure reduziert. Als Wasserstoffdonatoren können sowohl NADH als auch NADPH dienen [37]. Das in mehreren Geweben sehr aktive Enzym ist an der Regulation des NAD/NADH- und des NADP/NADPH-Quotienten beteiligt. Tierische Gewebe enthalten mehrere (bis zu 5) Isozyme der Milchsäure-Dehydrogenase, die möglicherweise in verschiedenen Zellstrukturen lokalisiert sind [38–40].

Auf eine Besonderheit des Glucose-Stoffwechsels im Insektenflugmuskel sei hier noch hingewiesen [41,42]. Insektenflugmuskel, der einen besonders hohen Energiebedarf hat, enthält im Cytoplasma eine sehr aktive α -Glycerophosphat-Dehydrogenase, aber nur wenig Milchsäure-Dehydrogenase. Dihydroxyacetonphosphat wird daher zum Teil zu α -Glycerophosphat reduziert und dieses in den Sarkosomen durch eine sehr aktive Oxydase wieder zu Dihydroxyacetonphosphat oxydiert.

2. Gluconeogenese

Die Reaktionsschritte der Glykolyse sind umkehrbar [43–47]. Da die Glykolyse jedoch exergonisch, d.h. unter Freigabe von Energie verläuft, ist die Synthese von Glucose durch direkte Umkehrung der Glykolyse nur in geringem Umfang möglich. Für die Synthese besonders ungünstig liegen die Gleichgewichte der Pyruvatkinase-, Phosphofructokinase- und Hexokinase-Reaktion. Diese Reaktionen können aber, vor allem in der Leber und der Nierenrinde, überbrückt werden: Brenztraubensäure kann zu Oxalessigsäure (3) carboxyliert werden [48], aus der dann in einer durch Phosphoenol-



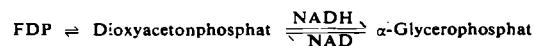
pyruvat-Carboxykinase katalysierten Reaktion Phosphoenolpyruvat (4) entsteht [49].

Die Bildung von Oxalessigsäure aus Brenztraubensäure ist wahrscheinlich der begrenzende Reaktionsschritt für die Gluconeogenese. Das carboxylierende Enzym be-

- [37] H. Holzer u. I. Schneider, Biochem. Z. 330, 240 (1958).
- [38] Th. Wieland u. G. Pfleiderer, Angew. Chemie 74, 261 (1962); Angew. Chem. internat. Edit. 1, 169 (1962).
- [39] C. L. Markert u. F. Möller, Proc. nat. Acad. Sci. USA 45, 753 (1959); C. L. Markert u. H. Ursprung, Developmental Biol. 5, 363 (1962).
- [40] N. O. Kaplan u. M. M. Ciotti, Ann. N.Y. Acad. Sci. 94, 701 (1961).
- [41] E. Zebe, A. Delbrück u. Th. Bücher, Ber. Ges. Physiol. exp. Pharmakol. 189, 115 (1957).
- [42] E. Zebe, Ergeb. Biol. 24, 247 (1961).
- [43] H. A. Lardy u. I. A. Ziegler, J. biol. Chemistry 159, 343 (1945).
- [44] Y. J. Topper u. A. B. Hastings, J. biol. Chemistry 179, 1255 (1949).
- [45] S. Mendicino u. M. F. Utter, Fed. Proc. 17, 274 (1958).
- [46] E. O. Weinmann, E. H. Strisoner u. I. L. Chaikoff, Physiol. Rev. 37, 252 (1957).
- [47] I. Krimsky, J. biol. Chemistry 234, 232 (1959).
- [48] M. F. Utter u. D. B. Keech, J. biol. Chemistry 235, PC 17 (1960).
- [49] M. F. Utter u. K. Kurahashi, J. biol. Chemistry 207, 821 (1954).

nötigt katalytische Mengen Acetyl-CoA [48]. Dieses wird gebildet, wenn die Brenztraubensäure-Konzentration hoch ist und Brenztraubensäure über den Citronensäure-Cyclus verbrannt wird. Damit wird dann das carboxylierende Enzym als Schrittmacher der Gluconeogenese aktiviert. Durch die teilweise Verbrennung von Pyruvat wird außerdem für die Gluconeogenese erforderliches ATP bereitgestellt.

Zur Überbrückung der Phosphofructokinase- und der Hexokinase-Reaktion können die Phosphat-Reste aus FDP durch spezifische Phosphatasen abgespalten werden, die vor allem in der Leber vorkommen. Durch Untersuchungen von Krebs [50] ist bekannt geworden, wie die Aktivität der Fructosediphosphatase gesteuert wird: Das Enzym wird durch FDP ($> 0,5 \mu\text{Mol/ml}$) und durch AMP gehemmt. Eine Verringerung der FDP- und der AMP-Konzentration und damit eine Aktivierung des Enzyms kann bei hoher Lactat-Konzentration auf folgendem Wege zustandekommen: Bei der Oxydation von Lactat zu Pyruvat wird NAD zu NADH reduziert. Das überschüssige NADH reduziert Dihydroxyacetonphosphat zu α -Glycerophosphat. Da Dihydroxyacetonphosphat mit FDP im Gleichgewicht steht, wird auch die FDP-Konzentration verringert und damit die Fructosediphosphatase aktiviert.



Außerdem wird bei hoher Lactat- und Pyruvat-Konzentration die Atmung beträchtlich (um ca. 50 %) gesteigert. Durch die mit der Atmung gekoppelte oxydative Phosphorylierung wird gleichzeitig die ADP- und AMP-Konzentration verringert. Das Absinken der AMP-Konzentration hat wiederum eine Aktivierung der Fructosediphosphatase zur Folge.

Durch die von Krebs untersuchten Steuerungsmechanismen wird die Aktivität der Fructosediphosphatase verändert, die Enzymmenge ändert sich nicht. Wenn Versuchstiere aber über längere Zeit kohlenhydratfrei ernährt werden und daher auf die Neubildung von Glucose zur Deckung ihres Glucose-Bedarfs angewiesen sind, nimmt auch die Enzymmenge [51] zu. Diese „Enzymadaptation“ wird hormonal gesteuert.

3. Das Zusammenwirken verschiedener Zellfraktionen beim Glucoseabbau durch Gärung und Glykolyse

a) Steuerung der Gärung und Glykolyse durch ADP und Orthophosphat

Hefemazerationssäfte, die keine Zellstrukturen mehr enthalten, zeigen eine ganz andere Gärungsform als intakte Hefezellen [52]: Von je 2 Mol Glucose wird nur eines vollständig zu Alkohol und CO_2 abgebaut. Ein Molekül bleibt als Fructosediphosphat liegen, da im

- [50] H. A. Krebs, Vortrag, Nobelpreisträgertagung Lindau, 1963.
- [51] L. C. Mokrasch, W. D. Davidson u. R. W. McGilvery, J. biol. Chemistry 222, 179 (1956); R. A. Freedland u. A. E. Harper, ibid. 228, 743 (1957).
- [52] A. Harden u. W. Young, Proc. chem. Soc. (London) 21, 189 (1905); Proc. Roy. Soc. 80, 299 (1908).

Hefemazerationssaft ATP-spaltende Enzyme weitgehend fehlen und dadurch ein ADP-Mangel auftritt [53]. Intakte Hefe vergärt Glucose dagegen vollständig, da sie über genügend ATP-spaltende Enzyme verfügt.

In den Geweben höherer Organismen erfordert der Abbau von Glucose und FDP ebenfalls ein Zusammenwirken verschiedener Zellfraktionen. Homogenate aus Tumorzellen bauen FDP nach dem hochtourigen Abzentrifugieren aller Strukturbestandteile nur langsam zu Milchsäure ab. Im Überstand fehlen, ähnlich wie beim Hefemazerationssaft, die ATP-spaltenden Enzyme, so daß für die dephosphorylierenden Reaktionsschritte zu wenig ADP vorhanden ist [54, 54a].

Durch eine Erhöhung der ADP- (und AMP-) Konzentration kann aber nicht nur der Abbau von FDP zu Milchsäure [55, 56, 69] sondern auch die vollständige Glykolyse mit Glucose als Substrat beschleunigt werden [56]. Mit Leucocyten-Homogenaten [57] und einem System aus gereinigten Enzymen [58, 59] wurde ein ähnliches Ergebnis erzielt. Eine Erhöhung der ADP- und AMP-Konzentration, ohne gleichzeitige Erhöhung der ATP-Konzentration, kann bei diesen Versuchen entweder durch Zufügen von AMP + Myokinase (ATP + AMP \rightleftharpoons 2 ADP) oder aber durch Zufügen von Lebermitochondrien + DNP zum Überstand erreicht werden [60]. Im zweiten Fall kommt es infolge Entkoppelung der oxydativen Phosphorylierung zu einer vermehrten Spaltung von ATP zu ADP und Orthophosphat. Auch 3'.5'-AMP ($3 \cdot 10^{-3}$ Mol/l) steigert den Glucoseabbau um über 100 %. Ob es auch unter physiologischen Bedingungen an der Kontrolle der Glykolyse beteiligt ist, läßt sich noch nicht sagen.

Da die Gleichgewichte der Hexokinase- und der Phosphofructokinase-Reaktion gänzlich auf Seiten der Produkte G-6-P und FDP liegen, kann sich eine Beschleunigung des FDP-Abbaues und die damit verbundene Erniedrigung der FDP-Konzentration auf die Geschwindigkeit des Glucose-Abbaues nicht unmittelbar auswirken. An seiner Beschleunigung muß vielmehr auch eine Aktivierung der ersten, phosphorylierenden Reaktionen beteiligt sein.

Dem entspricht die Veränderung der G-6-P- und der F-6-P-Konzentration. Im hochtourig zentrifugierten Überstand von Ascites-Tumorzellen [60a] sinken diese Konzentrationen bei erhöhter ADP-, 3'.5'-AMP- und

[53] O. Warburg: Wasserstoffübertragende Fermente. Verlag Dr. W. Saenger, Berlin 1948, S. 47.

[54] G. A. LePage u. W. C. Schneider, J. biol. Chemistry 176, 1021 (1948).

[54a] Ein Anstau von FDP wird beim Abbau von Glucose durch Tumorerüberstand nicht beobachtet, da der Tumorerüberstand – im Gegensatz zu Hefemazerationssaft – nur wenig Hexokinase enthält (s. unten).

[55] R. W. Van Korff, Biochim. biophysica Acta 31, 467 (1959).

[56] H. Tiedemann u. J. Born, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem., im Druck.

[57] W. S. Beck, J. biol. Chemistry 232, 251 (1958).

[58] R. Wu u. E. Racker, Fed. Proc. 16, 274 (1957).

[59] S. Gatt, Fed. Proc. 16, 184 (1957).

[60] H. Tiedemann u. J. Born, Biochim. biophysica Acta, im Druck.

[60a] Ascites-Tumorzellen sind für diese Untersuchungen besonders geeignet, weil sie weder Glykogen, noch G-6-P-ase oder FDP-ase enthalten. Aktivitätsänderungen dieser Enzymsysteme können die Ergebnisse also nicht beeinflussen.

AMP-Konzentration bis auf 1/10 der Ausgangswerte ab, obwohl infolge der gesteigerten Glucosephosphorylierung mehr G-6-P und F-6-P gebildet werden [60]. Offenbar wird also die Phosphofructokinase aktiviert, was mit den schon erwähnten Befunden am partiell gereinigten Enzym übereinstimmt [31]. Die Hexokinase-Aktivität kann wiederum durch eine Änderung der G-6-P-Konzentration kontrolliert werden. Tierische Hexokinase wird, wie schon erwähnt, durch G-6-P nicht-kompetitiv gehemmt. Ein Absinken der G-6-P-Konzentration kann also eine Erhöhung der Hexokinase-Aktivität zur Folge haben.

Wie die Adenin-Nucleotide eine Änderung der Phosphofructokinase-Aktivität herbeiführen, ist im einzelnen noch nicht bekannt. Vielleicht wird ähnlich wie bei der Succinat-Dehydrogenase [61] oder der Glutamat-Dehydrogenase [62] die Molekülkonfiguration des Enzyms verändert.

Ein weiterer Kontrollfaktor der Glykolyse ist Orthophosphat. Seit den Untersuchungen von Warburg [63] ist bekannt, daß in der Oxydationsreaktion der Glykolyse, d.h. für die Bildung von 1.3-Diphosphoglycerinsäure, Orthophosphat benötigt wird. Es wird für diese Reaktion aber erst bei Konzentrationen unter 0,5 μ Mol/ml begrenzend.

Wie sich später zeigte, kontrolliert Orthophosphat in einem größeren Konzentrationsbereich (ca. 1 bis 8 μ Mol/ml) außerdem die Aktivität des Hexokinase-Phosphofructokinase-Systems. Die Aktivität von Tumor- und Gehirn-Hexokinase steigt an, wenn die Orthophosphat-Konzentration erhöht wird [64, 65]. Dabei wird wahrscheinlich die Hemmung der Hexokinase durch G-6-P zum Teil aufgehoben. Der Umsatz von 2-Desoxyglucose, deren 6-Phosphorsäureester Hexokinase nicht hemmt, ist von der Orthophosphat-Konzentration unabhängig.

Die Aktivierung der Hexokinase durch Orthophosphat hängt davon ab, ob intakte Mitochondrien oder angereicherte Mitochondrien-Hexokinase untersucht werden. Bei Versuchen mit intakten Mitochondrien wird die Aktivität der Hexokinase stärker gesteigert als bei Versuchen mit dem gereinigten Enzym [64], da möglicherweise die in den Mitochondrien enthaltene Phosphofructokinase gleichzeitig durch Orthophosphat aktiviert wird oder die Mitochondrienstruktur den Phosphat-Effekt beeinflußt.

b) Die Aktivität des Hexokinase-Phosphofructokinase-Systems als begrenzender Faktor der Glykolyse

Fügt man zu struktursfreiem Überstand aus Ascites-Tumorzellen Mitochondrien verschiedenen Ursprungs hinzu, so üben diese auf die Glykolyse eine verschiedenartige Wirkung aus [66–71]. Hier interessiert vor allem die Steigerung der Glykolyse durch Mitochondrien aus

[61] T. Kimura, J. Hauber u. T. P. Singer, Biochim. biophys. Res. Commun. 11, 83 (1963).

[62] C. Frieden, J. biol. Chemistry 234, 809, 815 (1959); K. L. Yielding u. G. M. Tomkins, Proc. nat. Acad. Sci. USA 47, 983 (1961).

[63] O. Warburg u. W. Christian, Biochem. Z. 303, 40 (1939).

[64] H. Tiedemann u. J. Born, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 321, 205 (1960).

[65] H. Tiedemann u. J. Born, Z. Naturforsch. 14b, 477 (1959).

[66] A. C. Aisenberg, B. Reinafarje u. V. R. Potter, J. biol. Chemistry 224, 1099 (1957).

der Hirnrinde sowie durch Tumor-Mitochondrien. Da Hirn- und Tumor-Mitochondrien Hexokinase enthalten, war zu vermuten, daß die Glykolyse-Steigerung darauf beruht. Tatsächlich konnte durch Zugabe von gereinigter Mitochondrien- oder Hefe-Hexokinase eine Steigerung der Glykolyse herbeigeführt werden [60, 72]. Die G-6-P- und F-6-P-Konzentration steigt dabei an, da mehr G-6-P gebildet wird, die Aktivität der G-6-P umsetzenden Enzyme (Isomerase und Phosphofructokinase) aber konstant bleibt. Der Glucose-Umsatz von Gesamt-homogenaten aus Ascites-Tumorzellen kann durch Hexokinase ebenfalls gesteigert werden. Offenbar wird die Glykolyse also durch die Aktivität der Hexokinase begrenzt.

Die Bestimmung der Hexokinase-Aktivität in normalen und malignen Geweben zeigte, daß sie geringer ist als die Aktivität aller anderen Glykolyse-Enzyme [73–78] (gilt nicht für Hirnrinde). Da die Aktivität der Hexokinase aber von der G-6-P-, Adeninnucleotid- und Orthophosphat-Konzentration abhängt, lassen Hexokinase-Bestimmungen allein keine Schlüsse auf die Enzymaktivität unter verschiedenen Stoffwechselbedingungen zu.

In vielen Tumoren ist die Aktivität des Hexokinase-Phosphofructokinase-Systems relativ hoch. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die 1924 von Warburg [79] entdeckte starke Glykolyse in Tumoren [79a].

In normaler Leber ist die Aktivität der Hexokinase sehr gering. Da Leber viel Glucose-6-Phosphatase enthält, wäre es denkbar, daß durch die Hexokinase-Reaktion gebildetes G-6-P gleich wieder gespalten wird und dadurch eine geringe Hexokinase-Aktivität vorgetäuscht wird. Dann sollte auch die Hexokinase-Aktivität im Tumorhomogenat nach Zufügen von Leberhomogenat scheinbar abnehmen. Tatsächlich tritt aber eine Steigerung des Glucose-Verbrauchs ein [83, 84], da der Phosphofructokinase-Gehalt im kombinierten Tumor- und Leberhomogenat erhöht ist und dadurch die hemmende G-6-P-Konzentration erniedrigt wird [83]. Eine Hemmung der Leber-G-6-P-ase durch Tumorhomogenat konnte ausgeschlossen werden.

[67] A. C. Aisenberg u. V. R. Potter, *J. biol. Chemistry* 224, 1115 (1957).

[68] A. C. Aisenberg, *J. biol. Chemistry* 234, 441 (1959).

[69] H. Tiedemann u. J. Born, *Z. Naturforsch.* 13b, 268 (1958).

[70] H. Tiedemann: *Proceedings of the Fourth International Congress of Biochemistry*. Pergamon Press, London 1959, Bd. 15, S. 75.

[71] N. Fain u. A. E. Wilhelmi, *Biochim. biophysica Acta* 64, 508 (1962).

[72] E. G. Brunngraber u. L. G. Abood, *J. biol. Chemistry* 235, 1847 (1960).

[73] W. S. Beck, *J. biol. Chemistry* 216, 333 (1955).

[74] M. Blecher u. A. White, *J. biol. Chemistry* 235, 282 (1960).

[75] M. V. Buell, O. H. Lowry, N. R. Roberts, M. W. Chang u. J. I. Kapphahn, *J. biol. Chemistry* 232, 979 (1958).

[76] E. Racker, R. Wu u. I. B. Alpers: *Amino Acids, Proteins and Cancer Biochemistry*. Academic Press, New York 1960, S. 175.

[77] D. Burk, J. Laszlo, J. Hunter, K. Wight u. M. W. Woods, *J. nat. Cancer Inst.* 24, 57 (1960); D. Burk, *Klin. Wschr.* 35, 1102 (1957).

[78] S. A. Neifakh u. M. P. Fomina, *Biokhimia* 22, 476 (1957).

[79] O. Warburg: *Über den Stoffwechsel der Tumoren*. Springer Verlag, Berlin 1926.

[79a] Die früher als Ursache der Tumor-Glykolyse angesehene Anhäufung von NAD im Cytoplasma infolge verminderter Bindung an Tumor-Mitochondrien konnte in neueren Versuchen nicht bestätigt werden [80].

[80] P. Borst u. J. P. Colpa-Boonstra, *Biochim. biophysica Acta* 56, 216 (1962).

Das Morris-Hepatom, das sich wahrscheinlich direkt vom Leberparenchym ableitet, und das nur eine sehr geringe Hexokinase-Aktivität besitzt [81], weist keine aerobe Glykolyse auf. Durch Zusatz von Hexokinase zu Homogenaten des Morris-Hepatoms kann die Glykolyse in Gang gesetzt werden [82].

c) Die Pasteur-Reaktion

Beim Übergang von anaeroben zu aeroben Bedingungen wird der Glucose-Verbrauch in Hefe und in tierischen Zellen stark verlangsamt. Diese Hemmung des Glucose-Abbaus wird nach ihrem Entdecker Pasteur-Reaktion genannt. Das Ausmaß der Hemmung ist in einzelnen Geweben verschieden. In mehreren Tumoren sinkt die Glykolyse beim Übergang von anaeroben zu aeroben Bedingungen etwa auf die Hälfte. Im Gehirn ist die aerobe Glykolyse *in vivo* [85] und *in vitro* [86] sehr gering. Da die Hexokinase-Aktivität im Gehirn aber besonders hoch ist [76], muß die Hirn-Hexokinase aerob weitgehend gehemmt sein. Vielleicht hängt dies mit der vorzugsweisen Lokalisation der Hirn-Hexokinase in den Mitochondrien zusammen.

Energetisch betrachtet ist die Hemmung der Zuckerspaltung unter aeroben Bedingungen durchaus sinnvoll. Da pro Mol veratmeter Glucose 36 Mol ATP gebildet werden, pro Mol glykolytisch abgebauter Glucose aber nur 2 Mol, können Zellen ihren Energiebedarf aerob bei einem sehr viel geringeren Glucose-Umsatz decken.

Durch Entkoppelung der oxydativen Phosphorylierung mit DNP wird die Pasteur-Reaktion vollständig aufgehoben [87–90]. In Gegenwart von DNP steigt die Glykolyse sogar über den anaeroben Wert an. Die Pasteur-Reaktion wird also durch die mit der Atmung gekoppelte oxydative Phosphorylierung und nicht durch die Atmung als solche ausgelöst. Dieses Ergebnis stützt eine schon vorher von Lynen [1] und Johnson [2] aufgestellte Hypothese, die sich sehr bewährt hat. Sie besagt, daß die Pasteur-Reaktion durch eine Konkurrenz zwischen der Glykolyse (oder Gärung) und den phosphorylierenden Reaktionen der Atmung um Orthophosphat und Adenin-Nucleotide zustandekommt.

Die Bestimmung der Metabolit- und Nucleotid-Konzentrationen ermöglicht Rückschlüsse auf den Mechanismus der Pasteur-Reaktion. Betrachtet man die in Tabelle 1 angegebenen Metabolit-Konzentrationen in Ehrlich-Ascites-Tumorzellen unter verschiedenen Stoffwechsel-

[81] H. P. Morris, H. Sidransky, A. P. Wagner u. H. M. Dyer, *Cancer Res.* 20, 1252 (1960).

[82] Chen Lin, I. C. Elwood, A. Rosado, H. P. Morris u. S. Weinhouse, *Nature (London)* 195, 153 (1962).

[83] H. Tiedemann u. J. Born, unveröffentlicht.

[84] Siehe auch C. S. Vestling, A. K. Mylroie, U. Irish u. N. H. Grant, *J. biol. Chemistry* 185, 789 (1950).

[85] O. Warburg, K. Posener u. E. Negelein, *Biochem. Z.* 152, 309 (1924).

[86] H. McIlwain: *Biochemistry of the Central Nervous System*. Churchill Ltd., London 1959, S. 53 (dort weitere Literatur).

[87] F. Lynen u. R. Koenigsberger, *Liebigs Ann. Chem.* 573, 60 (1951).

[88] O. Meyerhof u. S. Fiala, *Biochim. biophysica Acta* 6, 1 (1950).

[89] I. D. Judah u. H. G. Williams-Ashman, *Biochem. J.* 48, 33 (1951).

[90] C. Terner, *Biochem. J.* 56, 471 (1954).

selbedingungen, so fällt vor allem auf, daß die G-6-P- und F-6-P-Konzentrationen unter anaeroben Bedingungen und nach der Entkoppelung der oxydativen Phosphorylierung mit DNP absinken. Ähnlich verhalten sich die G-6-P- und F-6-P-Konzentrationen in Hefe [91]. Das Absinken der F-6-P-Konzentration weist auf eine Aktivierung der Phosphofructokinase hin [91a]. Durch die Verringerung der G-6-P-Konzentration, die mit der

gen in einzelnen Zellräumen. Da diese, insbesondere Mitochondrien und cytoplasmatischer Raum [97], durch Permeabilitätsbarriren voneinander getrennt sind, können die Konzentrationsänderungen hier recht verschieden sein. Für die Stoffwechselkontrolle ist aber gerade die Änderung der Konzentration von freiem, nicht an Enzyme gebundenem ADP am Ort der Enzymreaktion maßgebend. Eine unterschiedliche Verteilung

Tabelle 1. Metabolit- und Coenzym-Konzentrationen in intakten Ascites-Tumorzellen unter verschiedenen Versuchsbedingungen [64]. DNP = 2,4-Dinitrophenol.

	Milchsäurebildung QM [mm ³ Milchs.]	G-6-P	F-6-P	FDP	ATP	ADP	PO ₄ ³⁻
aerob	25,0	0,47	0,15	0,21	2,32	0,23	4,0
anaerob	39,0	0,29	0,10	0,90	2,20	0,28	3,7
aerob + DNP	51,0	0,25	0,07	0,19	2,32	0,42	5,0
aerob } ohne Glucose	—	—	—	—	2,76	0,34	5,75
aerob + DNP }	—	—	—	—	0,60	1,16	10,8

F-6-P-Konzentration im Gleichgewicht steht, könnte dann auch die Hemmung der Hexokinase durch G-6-P abgeschwächt werden [91b]. In intaktem Rattenherzmuskel wurde anaerob ebenfalls ein Absinken der G-6-P-Konzentration festgestellt [92, 93]. Dagegen steigt die G-6-P-Konzentration im Frosch-Sartorius an. In diesem Fall stammt das G-6-P aber vor allem aus Glykogen und bleibt vielleicht in einem Zellraum lokalisiert, in dem es nicht auf die Hexokinase wirken kann [94].

Hefe-Hexokinase wird durch G-6-P nicht gehemmt. Die Hexokinase-Aktivität in Hefe muß also auf andere, noch unbekannte Weise kontrolliert werden.

Da das Hexokinase-Phosphofructokinase-System durch ADP, AMP und Orthophosphat aktiviert wird, liegt die Vermutung nahe, daß die Aktivierung dieses Systems unter anaeroben Bedingungen durch einen Anstieg der ADP-, AMP- und Orthophosphat-Konzentration bedingt ist. In Hefe und Skelettmuskel kann dieser Anstieg beim Übergang von aeroben zu anaeroben Bedingungen tatsächlich beobachtet werden [91, 94, 95]. In Ascites-Tumorzellen tritt er nur nach Entkoppelung der oxydativen Phosphorylierung ein [64, 96] (siehe Tabelle 1).

Konzentrationsbestimmungen in ganzen Zellen geben jedoch keinen Aufschluß über Konzentrationsänderungen

[91] F. Lynen, Proceedings of the International Symposium on Enzyme Chemistry. Pergamon Press, London 1957, S. 25.

[91a] Ursache einer Enzym-Aktivierung beim Übergang von aeroben zu anaeroben Bedingungen könnte sowohl die Änderung der Enzym-Substrat-Affinitätskonstanten K_M als auch die Änderung der Zersfallskonstanten des Enzym-Substrat-Komplexes sein. Die bisherigen Versuche sprechen mehr für eine Änderung von K_M [31a, 64].

[91b] Die Hemmung der Mitochondrien-Hexokinase aus Ascites-Tumorzellen unter aeroben Bedingungen errechnet sich zu 50 %, wenn man die Voraussetzung macht, daß die G-6-P-Konzentration in der ganzen Zelle gleich groß ist. Das Ausmaß der Hemmung dürfte aber auch von der räumlichen Zuordnung der Hexokinase zur Phosphofructokinase in den Zellen abhängen.

[92] E. A. Newsholme u. P. J. Randle, Biochem. J. 80, 655 (1961).

[93] D. M. Regen, W. W. Davis u. H. E. Morgan, Fed. Proc. 20, 83 (1961).

[94] P. Özand, H. T. Narahara u. C. F. Cori, J. biol. Chemistry 237, 3037 (1962).

[95] G. Michal u. W. Lamprecht, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 324, 170 (1961).

[96] S. Gatt u. E. Racker, J. biol. Chemistry 234, 1024 (1959).

von Nucleotiden, Orthophosphat und Metaboliten auf die Zellräume könnte die oben genannten Effekte sowohl verstärken als auch abschwächen.

Theoretisch wäre es möglich, das Verhältnis von freiem cytoplasmatischem ATP/ADP indirekt zu ermitteln, durch Bestimmung des stationären Gleichgewichtes der Metabolite einer ATP/ADP-abhängigen Reaktion wie der Phosphoglyceratkinase-Reaktion

$$(K = [1,3-DPG] \times [ADP] / [3-PG] \times [ATP]),$$

die in Ascites-Tumorzellen wesentlich schneller abläuft, als die vorangehenden oder darauf folgenden Reaktionsschritte [76, 97a]. Mit Ascites-Zellen wurden solche Untersuchungen noch nicht ausgeführt.

Bestimmungen des ATP/ADP-Spiegels im ruhenden und kontrahierten Muskel aus den Gleichgewichten der Kreatin kinase- und Phosphoglyceratkinase-Reaktionen ergaben, daß sich die Nucleotide in verschiedenen Zellräumen funktionell unterscheiden und daß eine ATP-Fraktion vorhanden ist, die bei der Kontraktion nicht gespalten wird. In anderen Geweben wurde dieses inaktive „Speicher-ATP“ nicht gefunden [99].

Während Konzentrationsbestimmungen an ganzen Zellen also keine sicheren Schlüsse auf die Beteiligung von ADP an der Pasteur-Reaktion ermöglichen, brachten andere Versuche weitere Anhaltspunkte dafür. Die Glykolyse schonend hergestellter Tumorhomogenate, welche die Pasteur-Reaktion noch teilweise geben [64, 100], wird sowohl durch ADP (oder AMP + Myokinase) als auch durch Entkoppelung der oxydativen Phosphorylierung mit DNP gesteigert. Werden ADP (oder AMP + Myokinase) und DNP den Homogenaten gleichzeitig zugefügt, so summieren sich ihre Wirkungen nicht. Offenbar liegt also der Beschleunigung der Glykolyse in

[97] F. A. Hommes, Fed. Proc. 21, 142 (1962).

[97a] Ein ähnliches Prinzip ist von Lynen, Holzer und Bücher zur Bestimmung des NAD/NADH-Spiegels in Zellen angewendet worden [98, 98a].

[98] H. Holzer, G. Schulz u. F. Lynen, Biochem. Z. 328, 252 (1956).

[98a] Th. Bücher u. M. Klingenberg, Angew. Chem. 70, 552 (1958).

[99] H. S. Hohorst, M. Reim u. H. Bartels, Biochem. biophys. Res. Commun. 7, 142 (1962).

[100] P. Emmelot u. C. J. Bos, Biochim. biophysica Acta 49, 596 (1961).

beiden Fällen ein ähnlicher Mechanismus zugrunde [56, 100a].

Die Frage, ob ATP-Mangel im Cytoplasma die Pasteur-Reaktion auslösen kann, wurde wiederholt diskutiert. Erhöht man aber in Homogenaten die ATP-Konzentration in dem für gelöste Moleküle frei zugänglichen Raum (in intakten Zellen entspricht dieser dem cytoplasmatischen Raum), so tritt die Pasteur-Reaktion weiterhin ein [56]. Demnach kann ATP-Mangel im löslichen Raum nicht die Ursache der Pasteur-Reaktion sein. Dagegen schließen die Versuche nicht aus, daß die Affinität der Hexokinase für ATP im gesamten untersuchten ATP-Konzentrationsbereich (1×10^{-3} bis 5×10^{-3} Mol/l) unter anaeroben Bedingungen höher ist als unter aeroben. – Auch die vom Redox-Zustand abhängige Strukturänderung der Mitochondrien [101–103] (Kontraktion unter aeroben Bedingungen) könnte vielleicht die Zugänglichkeit der Mitochondri-Hexokinase für ATP modifizieren. – Wie erwähnt, steigert Orthophosphat die Glykolyse von Homogenaten durch Einwirkung auf das Hexokinase-Phosphofructokinase-System. In intakten Ascites-Tumorzellen [64, 104] und in Hefe ist die Glykolysesteigerung geringer, da Phosphat nur langsam in die Zellen eindringen kann. Dagegen kann in *E. coli* die Glykolyse durch Zufügen von Phosphat zum Außenmedium bis auf den unter anaeroben Bedingungen erreichten Wert gesteigert werden [105], da die Permeationsgeschwindigkeit von Orthophosphat bei *E. coli* wahrscheinlich größer ist. Eine Erniedrigung der G-6-P-Konzentration, wie sie für die Pasteur-Reaktion charakteristisch ist, findet man in Ascites-Tumorzellen bei erhöhter Phosphatkonzentration nicht. Wieweit Orthophosphat neben ADP und AMP an der Pasteur-Reaktion in Ascites-Tumorzellen beteiligt ist, läßt sich vorerst schwer abschätzen.

Die Abhängigkeit der Hexokinase-Reaktion vom Phosphatkonzentration kann für die Steuerung des Glucose-Umsatzes im Gehirn von Bedeutung werden. Wenn in bestimmten Stoffwechselsituationen mit gesteigertem Energiebedarf, z. B. nach Reizung des Gehirns, der Phosphatkonzentration ansteigt [106, 107], kann gleichzeitig die Hexokinase-Aktivität und damit auch der Glucose-Umsatz ansteigen. So kann dieser also dem jeweiligen Energiebedarf angepaßt werden, ehe noch eine hormonale Kontrolle wirksam wird.

Die Veränderung der FDP-Konzentration in intakten Ascites-Tumorzellen unter verschiedenen Stoffwechselbedingungen (Tabelle I) bedarf noch einer Erklärung. Unter anaeroben Bedingungen steigt die FDP-Konzentration ähnlich wie in Hefe [91] um über 200% an, im Gegensatz zur G-6-P-Konzentration, die unter anaeroben Bedingungen erniedrigt ist. Nach Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung steigt die FDP-Konzentration dagegen nicht an. Die FDP-Konzentration hängt also direkt von der Atmung ab. Da sich unter anaeroben Bedingungen das NAD/NADH-Verhältnis zu Gunsten von NADH verschiebt, könnte das Gleichgewicht der Triosephosphat-Dehydrierung in Richtung auf die Triosephosphate verschoben sein, die ihrerseits wieder mit FDP im Gleichgewicht stehen.

Schließlich sei die Frage erörtert, ob ein gesteigerter Abbau von Glucose über den Pentosephosphat-Cyclus die Glykolyse unter aeroben Bedingungen hemmen kann. Beim Abbau von

[100a] Man könnte gegen die Versuche mit ADP einwenden, daß dieses vor allem indirekt durch eine Strukturänderung der Mitochondrien wirkt, da Schwellung und Kontraktion der Mitochondrien von der ADP-Konzentration abhängen [101–103]. Doch konnte mit ADP, wie erwähnt, auch im struktursfreien Überstand eine Glykolyse-Steigerung sowie eine Erniedrigung der G-6-P-Konzentration erzielt werden.

[101] A. L. Lehninger, Biochim. biophysica Acta 48, 324 (1961).
[102] B. Chance u. L. Packer, Biochem. J. 68, 295 (1958).

[103] L. Packer, J. biol. Chemistry 236, 214 (1961).

[104] R. Wu u. E. Racker, J. biol. Chemistry 234, 1036 (1959).

[105] H. Holzer, Cold Spring Harbor Sympos. quantitat. Biol. 26, 277 (1961).

[106] P. I. Heald, Biochem. J. 63, 242 (1956).

[107] R. M. C. Dawson u. D. Richter, Amer. J. Physiol. 160, 203 (1950).

G-6-P über den Pentosephosphat-Cyclus entsteht zunächst 6-Phosphogluconsäure, welche die Phosphohexose-Isomerase hemmt [25, 26]. Diese Hemmung sollte einen Anstieg der G-6-P-Konzentration relativ zur F-6-P-Konzentration zur Folge haben. Wir fanden aber, daß G-6-P und F-6-P in intakten Zellen, Homogenaten und im Überstand unter allen Bedingungen (Aerobiose, Anaerobiose, Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung) im Gleichgewicht stehen. Aus unseren Versuchen errechnet sich eine Gleichgewichtskonstante $K = [G-6-P]/[F-6-P] = 2,9$ bis $3,3$, in guter Übereinstimmung mit der Konstanten für das isolierte Enzym $K = 3,06$ [108]. Die in allen Geweben in großem Überschuß vorhandene Phosphohexose-Isomerase wird also für die Glykolyse in keinem Falle begrenzend. Für eine Glykolyse-Hemmung durch Produkte des Pentosephosphat-Cyclus ergibt sich somit kein Anhaltspunkt.

d) Der Crabtree-Effekt

Eine weitere Reaktion, die bei vorhandener Koppelung von Atmung und Glykolyse eintritt, ist der 1929 entdeckte Crabtree-Effekt. *Crabtree* [109] fand, daß die endogene Atmung nach Zugabe von Glucose zum Medium, also beim Einsetzen der aeroben Glykolyse, gehemmt wird (um ca. 50%).

Nachdem der Effekt auch in Ascites-Tumorzellen nachgewiesen worden war [110–112], begannen zahlreiche Untersuchungen zur Aufklärung des Mechanismus. 2,4-Dinitrophenol hebt den Crabtree-Effekt auf [113]. Er hängt also, wie die Pasteur-Reaktion, von der oxydativen Phosphorylierung ab.

Durch die Untersuchungen von *Lehninger* [114] und *Lardy* [115] ist bekannt, daß die Geschwindigkeit der oxydativen Prozesse in den Mitochondrien durch Orthophosphat und ADP kontrolliert wird. Durch Erhöhung der Orthophosphat- oder ADP-Konzentration wird die Atmung gesteigert, durch Erniedrigung dieser Konzentrationen wird sie gehemmt. In glykolysernden Ascites-Tumorzellen ist sowohl die Orthophosphat- als auch die ADP-Konzentration gegenüber der in endogen atmenden Zellen herabgesetzt (Tabelle I). Diese Konzentrationsänderung von Orthophosphat [104, 116–118] oder ADP [119] könnte also die Hemmung der Atmung beim Crabtree-Effekt verursachen. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß der Crabtree-Effekt vom Phosphatkonzentration des Mediums abhängt

[108] Sh. E. Kahana, O. H. Lowry, D. W. Schulz, J. V. Passoneau u. E. J. Crawford, J. biol. Chemistry 235, 2178 (1960).

[109] H. G. Crabtree, Biochem. J. 23, 536 (1929).

[110] E. Kun, P. Talalay u. H. G. Williams-Ashman, Cancer Res. 11, 855 (1951).

[111] H. Tiedemann, Z. ges. exp. Med. 119, 272 (1952).

[112] N. V. El'tsina u. I. F. Seits, Ber. Akad. Wiss. USSR 77, 653 (1951).

[113] K. H. Ibsen, E. L. Coe u. R. W. McKee, Biochim. biophysica Acta 30, 384 (1958).

[114] M. Friedkin u. A. L. Lehninger, J. biol. Chemistry 174, 757 (1948).

[115] H. A. Lardy u. H. Wellmann, J. biol. Chemistry 195, 215 (1952).

[116] M. Brin u. R. W. McKee, Cancer Res. 16, 364 (1956).

[117] B. Hess u. B. Chance, J. biol. Chemistry 234, 3031 (1959).

[118] G. Acs u. F. B. Straub, Ber. Akad. Wiss. USSR 95, 1021 (1954).

[119] B. Chance u. B. Hess, Ann. N.Y. Acad. Sci. 63, 1008 (1956).

[104, 116–122]. Er ist bei hoher Orthophosphat-Konzentration weniger stark ausgeprägt.

2-Desoxyglucose kann den Crabtree-Effekt in Tumorzellen und Hefe ebenfalls auslösen [113, 120]. Da sie durch Hexokinase phosphoryliert, dann aber nicht weiter umgesetzt wird, häuft sich 2-Desoxyglucose-6-phosphat in den Zellen an, und die Orthophosphat-Konzentration nimmt ab [121].

Mit der Platinelektrode und dem Doppelstrahlphotometer verfolgten *Chance* und Mitarbeiter die Veränderung der Atmung sowie des Redox-Zustandes von Cytochrom b nach Zugabe von Glucose oder Desoxyglucose zu intakten Ascites-Tumorzellen [119]. Sofort nach Zugabe der Glucose steigt die Atmung zunächst stark an, und nimmt nach etwa 40 sec wieder ab. Infolge der schnellen Glucose-Phosphorylierung kommt es zunächst zu einem Abfall der ATP- und einem Ansteigen der ADP-Konzentration, bis ATP durch die Glykolyse und die gesteigerte Atmung wieder rückgebildet wird. Der vorübergehende Anstieg des ADP-Spiegels ist wahrscheinlich die Ursache der vorübergehenden Atmungssteigerung. Auch Zugabe von ADP ruft die Atmungssteigerung hervor [123]. Für die Hauptreaktionen der Glykolyse und der oxydativen Phosphorylierung wurden von *Chance* und Mitarbeitern Differentialgleichungen aufgestellt [124, 125], deren Lösung mit dem Digitalrechner in enger Näherung den Verlauf der Atmung sowie die Änderungen der ATP- und ADP-Konzentrationen ergibt, wie man sie nach Zufügen von Glucose zu Ascites-Tumorzellen beobachtet.

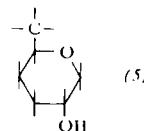
Die G-6-P-Konzentration durchläuft nach Zugabe von Glucose zunächst ein hohes Maximum und dann ein Minimum, ehe sie sich auf einen stationären Wert einstellt [126]. Dieses Verhalten ist für rückgekoppelte Reaktionsfolgen charakteristisch. Für die Rückkoppelung sind sehr wahrscheinlich sowohl die Hemmung der Hexokinase durch G-6-P als auch die schon erwähnten Änderungen der ATP- und ADP-Konzentrationen verantwortlich.

4. Aktiver Transport der Glucose

Mehrere Zucker, zu denen neben Glucose auch Galaktose und 6-Desoxyglucose gehören, können gegen ein Konzentrationsgefälle in die Zellen transportiert werden. Dieser aktive Zuckertransport wurde vor allem am Dünndarm genauer untersucht. Es ist zweifelhaft, ob die früher geäußerte Hypothese über eine Koppelung des aktiven Zuckertransports mit einer Phosphorylierung und darauffolgenden Dephosphorylierung in der Zellwand

[120] L. Kiesow, Z. Naturforsch. 15b, 171 (1960).
[121] L. Kiesow, Z. Naturforsch. 16b, 32 (1961).
[122] F. Seelich u. K. Letnansky, Naturwissenschaften 44, 450 (1957).
[123] B. Chance, Proceedings of the International Symposium on Enzyme Chemistry. Pergamon Press, London 1957, S. 7.
[124] B. Chance, D. Garfinkel, J. S. Higgins u. B. Hess, J. biol. Chemistry 235, 2426 (1960).
[125] B. Chance, Fed. Proc. 21, 75 (1962).
[126] K. H. Lomberg-Holm, Biochim. biophysica Acta 35, 464 (1959).

zutrifft, vor allem, weil auch solche Zucker gegen ein Konzentrationsgefälle akkumuliert werden, die am C-1 oder C-6 keine Hydroxylgruppe tragen und infolgedessen nicht phosphoryliert werden können. Die minimalen Strukturerfordernisse für den aktiven Zuckertransport im Hamster-Darm zeigt die Formel (5). Am C-2 muß



eine Hydroxylgruppe stehen [127]. Im Außenmedium muß Na^+ vorhanden sein. Möglicherweise sind Na^+ -Transport und Zuckertransport gekoppelt [128].

Außer an Darmpräparaten wurde der Zuckertransport im Herz- und Skelettmuskel eingehend untersucht. Unter anaeroben Bedingungen ist nicht nur der Glucose-Umsatz, sondern auch der Glucose-Transport beschleunigt [94, 129]. Der Glucose-Transport wird aber für den Glucose-Umsatz sehr wahrscheinlich nicht begrenzend. Das gleiche gilt für Ascites-Tumorzellen sowie für isolierte Zellen aus Lymphknoten [130–132]. In Lymphknotenzellen sind für Glucose unter aeroben und anaeroben Bedingungen nur etwa 40 % des intrazellulären Wassers als Lösungsraum verfügbar. Die Autoren halten es für möglich, daß der Transport von Glucose innerhalb der Zelle unter bestimmten Bedingungen für den Zuckerverbrauch begrenzend werden kann [132].

5. Glucose-Stoffwechsel und Syntheseleistung der Zellen

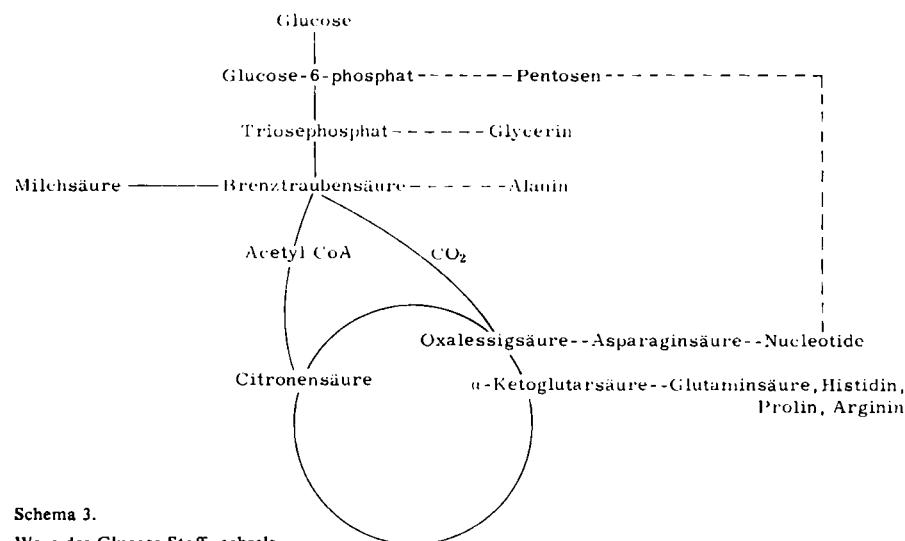
Der Glucose-Stoffwechsel hat in den Zellen und Geweben verschiedene Funktionen zu erfüllen. Bei der vollständigen Oxydation der Glucose wird, wie erwähnt, Energie für eine Vielzahl von synthetischen Vorgängen gewonnen. In malignen Tumoren, die nach *Warburg* eine starke Glykolyse haben [79], wird auch die glykolytisch gewonnene Energie zur Proteinsynthese verwendet und ist hierfür sogar besonders wirksam [133–135].

Der Abbau von Glucose dient aber nicht nur der Produktion von Energie, sondern auch der Bereitstellung von Zwischenprodukten für Synthesen. Diese Zusammenhänge sind im Schema 3 dargestellt.

Beispielsweise entsteht aus Brenztraubensäure und CO_2 Oxalessigsäure. Diese muß als Starter für den Citronensäure-Cyclus immer neu gebildet werden, wenn aus dem Cyclus Zwischenprodukte für Synthesen entnommen werden. Tumorzellen bauen daher in Gegenwart von

[127] R. K. Crane, Fed. Proc. 21, 891 (1962).
[128] E. Riklis u. J. H. Quastel, Canad. J. Biochem. Physiol. 36, 347 (1958).
[129] A. Sols, Ann. Rev. Biochem. 30, 213 (1961) (dort weitere Literatur).
[130] R. K. Crane, R. A. Field u. C. F. Cori, J. biol. Chemistry 224, 649 (1957).
[131] M. W. Nirenberg u. J. F. Hogg, J. Amer. chem. Soc. 80, 4407 (1958).
[132] E. Helmreich u. H. N. Eisen, J. biol. Chemistry 234, 1958 (1959).
[133] J. H. Quastel, Nature (London) 183, 281 (1959).
[134] M. W. Woods, K. E. Sanford, D. Burk u. W. R. Earle, J. nat. Cancer Inst. 23, 1079 (1959).
[135] H. Tiedemann u. J. Born, Z. Naturforsch. 15b, 380 (1960).

Glucose wesentlich mehr $^{14}\text{CO}_2$ in die Metabolite des Citronensäure-Cyclus sowie in Aminosäuren und Nucleotide ein, als in Abwesenheit von Glucose [135].



Schema 3.
Wege des Glucose-Stoffwechsels.

Durch die beschriebenen Steuerungsmechanismen, die durch eine hormonale Steuerung ergänzt werden, kann der Glucosestoffwechsel den sich ändernden Stoffwech-

selsituationen angepaßt werden, um verschiedene Funktionen im Energiestoffwechsel der Zelle oder für die synthetischen Leistungen der Zelle zu erfüllen.

Die in dieser Arbeit erwähnten eigenen Untersuchungen wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt. Wir möchten dafür auch an dieser Stelle danken.

Eingegangen am 22. Juli 1963 [A 324]

ZUSCHRIFTEN

Photoreaktivierung mit Wasserstoffperoxyd

Von Prof. Dr. A. Wacker und
Andrea Gerstenberger

Institut für Therapeutische Biochemie
der Universität Frankfurt am Main

Herrn Professor Otto Warburg in Verehrung
zum 80. Geburtstag gewidmet

Die meisten biologischen Strahlenschäden durch UV-Licht können durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht behoben werden (Photoreaktivierung). Hierzu ist ein Enzym (Enzymkomplex?) notwendig [1]. Wir konnten zeigen, daß die letale Wirkung des UV-Lichtes auf die Zelle überwiegend, wenn nicht ausschließlich, ihre Ursache in der strahlenchemischen Dimerisierung des Thymins in der DNS hat [2]. Bei der Photoreaktivierung wird Thymin-Dimeres in der DNS wieder zu Thymin gespalten [2].

Wie Tabelle 1 zeigt, können durch UV-Licht inaktivierte Bakterien durch Behandlung mit H_2O_2 und sichtbarem Licht nahezu vollständig reaktiviert werden, und zwar mit einer Dosis H_2O_2 , die, allein gegeben, die Bakterienzellen inaktiviert. Bestraht man eine wäßrige Lösung von Thymin-Dimerem in Gegenwart von 3 % Wasserstoffperoxyd mit sichtbarem Licht, so beobachtet man eine Aufspaltung des Thymin-Dimeren.

Daraus und aus weiteren Befunden (keine strahlenchemische Umwandlung von Thymin-Dimerem mit H_2O_2 in Eis und keine Photoreaktivierung in gefrorenem Zustand sowie Aufspaltung von Thymin-Dimerem in Gegenwart von H_2O_2 mit Hitze und Wärmereaktivierung UV-inaktivierter Bakterien-

Tabelle 1. % Überlebende von *E. coli* B nach Behandlung mit verschiedenen Agentien [a].

Bakterien behandelt mit:

UV-Licht	Energie [erg/mm ²]	H_2O_2	Menge [μg/ml]	sichtbarem Licht [b]	Energie [erg/mm ²]	Überlebende [%]
—	—	—	—	[c]	—	100
+	10	—	—	—	—	59
—	—	+	3	[c]	—	66
+	10	+	3	—	—	80
+	10	—	—	+	$5 \cdot 10^5$	80
+	10	+	3	+	$5 \cdot 10^4$	87
+	10	+	3	+	$5 \cdot 10^5$	99

[a] Die Bakterien wurden am Ende des log. Wachstums im Nährmedium (A. Wacker, M. Ebert u. H. Kolm, Z. Naturforsch. 13b, 141 (1958)) nach Verdünnung 1:1000000 den Agentien ausgesetzt. Agar-Zusammensetzung: Difco-Trypton 1 %, Difco-Hefe-Extrakt 0,1 %, NaCl 0,25 %, CaCl₂ 0,02 %, Difco-Agar 1,5 %.

[b] Tageslichtlampe HPR 125 W.

[c] Tageslicht.

zellen) schließen wir, daß die Photoreaktivierung möglicherweise mit der Bildung von H_2O_2 und sauerstoff-haltigen Radikalen zusammenhängt, die durch Enzyme der biologischen Oxydation bei Bestrahlung mit sichtbarem Licht gebildet werden.

Eingegangen am 13. September 1963 [Z 579]

[1] J. Jagger in: *Radiation Protection and Recovery*. Pergamon Press, London 1960, S. 352ff.

[2] A. Wacker in: *Progress in Nucleic Acid Research*. Bd. 1, Academic Press, New York-London, 1963, S. 369ff.