

Wir verglichen drei allosterisch kontrollierte Enzyme der Biosynthese von Pyrimidinnucleotiden aus mehreren Organismen: Aspartat-Transcarbamylase mit Cytidin-5'-triphosphat als negativem Effektor, Desoxycytidin-5'-monophosphat-Desaminase mit Thymidin-5'-triphosphat als negativem sowie Desoxycytidin-5'-triphosphat als positivem Effektor und Thymidin-Kinase mit Thymidin-5'-triphosphat als negativem Effektor. Unter möglichst optimalen Bedingungen wurden die Aktivitäten dieser Enzyme und ihre Beeinflussung durch die Effektoren in zellfreien Extraktten von Mikroorganismen, niederen Pflanzen und Tieren sowie von Geweben höherer Pflanzen und Tiere ermittelt; daneben wurden (soweit analytisch möglich) die intrazellulären Konzentrationen der Effektoren bestimmt.

Es zeigte sich, daß Desoxycytidin-5'-monophosphat-Desaminase und Thymidin-Kinase aus allen Organismen, die diese Enzyme enthalten, durch die Effektoren in jeweils annähernd gleichen Konzentrationen beeinflußt werden, die in der Größenordnung der intrazellulären Konzentrationen der entsprechenden Nucleotide liegen. Bei Aspartat-Transcarbamylase dagegen beobachtet man dieses Verhalten nur bei einigen Mikroorganismen; bei allen anderen Organismen wirken die Effektoren erst in Konzentrationen, die 10- bis 1000-mal größer als die intrazellulären Konzentrationen an Cytidin-5'-triphosphat sind.

Nach diesen Ergebnissen kann der allosterischen Kontrolle von Desoxycytidin-5'-monophosphat-Desaminase und Thymidin-Kinase bei allen Organismen, von Aspartat-Transcarbamylase wahrscheinlich nur bei Mikroorganismen, eine biologische Bedeutung zukommen. Es ist wahrscheinlich, daß die Kontrolle von Aspartat-Transcarbamylase durch Allosterie im Laufe der Evolution weitgehend verlorengegangen und durch andere Kontrollen ersetzt wurde, während sie sich bei den beiden anderen Enzymen bei allen Organismen erhalten hat.

[\*] Priv.-Doz. Dr. A. W. Holldorf  
Biochemisches Institut der Universität  
78 Freiburg, Hermann-Herder-Straße 7

#### Allosterische Eigenschaften der Hefepyruvat-Kinase

Von H.-J. Wieker, K.-J. Johannes (Vortr.) und B. Hess [\*]

In früheren Arbeiten wiesen Hess et al.<sup>[1]</sup> die starke Kooperativität der Hefepyruvat-Kinase gegenüber dem Substrat Phosphoenolpyruvat nach und zeigten, daß Fructose-1,6-diphosphat ein allosterischer Aktivator ist, Adenosintriphosphat (ATP) ein allosterischer Inhibitor.

Die aus dem Modell von Monod, Wyman und Changeux<sup>[2]</sup>, dessen Forderungen von der Hefepyruvat-Kinase erfüllt werden<sup>[1]</sup>, resultierenden Zustands- und Bindungsfunktionen und die das Enzym charakterisierenden Konstanten wurden aus weiteren Untersuchungen der Kinetik im stationären Zustand unter dem Einfluß von Fructose-1,6-diphosphat und ATP nach der Methode von Blangy, Buc und Monod<sup>[3]</sup> bestimmt. Für die Liganden Phosphoenolpyruvat, Fructose-1,6-diphosphat und ATP wurde die Zahl n der Bindungsstellen pro Enzym-Molekül zu zwei ermittelt, d.h. die Hefepyruvat-Kinase besteht aus zwei identischen Protomeren.

Es liegt ein Gleichgewicht zwischen einem aktiven (R) und einem inaktiven (T) Zustand des Enzyms mit einer Gleichgewichtskonstanten  $[T]/[R] = L_0 = 1,5 \cdot 10^3$  vor. Die Dissoziationskonstanten für die Liganden vom R-Zustand (K<sub>R</sub>) und T-Zustand (K<sub>T</sub>) betragen für Phosphoenolpyruvat: K<sub>R</sub> =  $2 \cdot 10^{-4}$  M, K<sub>T</sub> =  $3,5 \cdot 10^{-2}$  M, non-exclusive binding coefficient c =  $6 \cdot 10^{-3}$ ; für Fructose-1,6-diphosphat: K<sub>R</sub> =  $1 \cdot 10^{-4}$  M; für ATP: K<sub>T</sub> =  $2 \cdot 10^{-3}$  M. Aus diesen Konstanten ist zu ersehen, daß die Hefepyruvat-Kinase in Abwesenheit von Liganden überwiegend im T-Zustand vorliegt, ATP diesen Zustand fixiert und die beiden anderen Substanzen das Gleichgewicht weitgehend vom T-Zustand zum R-Zustand verschieben.

Die Untersuchungen über die Bindung des zweiten Substrats ADP, das nur bei Phosphoenolpyruvat-Konzentrationen unter  $5 \cdot 10^{-3}$  M Kooperativität zeigt<sup>[1]</sup>, sind noch nicht abgeschlossen. Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf, daß die Bindung von ADP an den Enzym-Phosphoenolpyruvat-Komplex bevorzugt ist gegenüber der Bindung an das freie Enzym.

[\*] Dr. H.-J. Wieker, Dipl.-Phys. K.-J. Johannes und Prof. Dr. B. Hess  
Max-Planck-Institut für Ernährungphysiologie  
46 Dortmund, Rheinlanddamm 201

[1] R. Haeckel, B. Hess, W. Lauterborn u. K. H. Wüster, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 349, 699 (1968).

[2] J. Monod, J. Wyman u. J.-P. Changeux, J. molecular Biol. 12, 88 (1965).

[3] D. Blangy, H. Buc u. J. Monod, J. molecular Biol. 31, 13 (1968).

#### Biogenese der Mitochondrien. Syntheseweg mitochondrialer Phospholipide

Von B. Kadenbach [\*]

Isolierte Mitochondrien vermögen Phosphatide nur in der Außenmembran zu synthetisieren<sup>[1]</sup>. Die Herkunft der Phosphatide der Innenmembran, die etwa 80% der gesamten Phosphatide enthält, ist unbekannt. Einbauversuche mit  $^{32}\text{PO}_4^{3-}$  an isolierten Rattenlebermitochondrien ergaben sehr verschiedene Einbaugeschwindigkeiten (mmol  $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ /mol Phosphatid-Phosphat in 10 min) für die untersuchten Phosphatide: Phosphatidyl-cholin: 0,08, -äthanolamin: 0,29, -serin: 4,9, -inosit: 0,3, Lysophosphatidyl-cholin: 2,4. Diese Einbaugeschwindigkeiten (mit Ausnahme der von Lysophosphatidyl-cholin) sind niedriger als die maximalen Einbaugeschwindigkeiten nach Injektion von  $^{32}\text{PO}_4^{3-}$  in vivo (8, 40, 29, 20 bzw. 2,1).

Mit Digitonin<sup>[2]</sup> wurden die Außenmembran, die Intracristae-Proteine, die Innenmembran und die Matrix in vitro markierter Mitochondrien isoliert und die Phosphatide durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie getrennt. Die löslichen Fraktionen wurden durch einstündiges Zentrifugieren bei 400000 x g gewonnen. Sie enthielten beträchtliche Mengen an markierten Phosphatiden (nmol Phosphatid-Phosphat/mg Protein): Außenmembran: 660, Intracristae-Raum: 195, Innenmembran: 345, Matrix: 35. Die spezifische Radioaktivität war für Phosphatidyl-cholin, Phosphatidyl-äthanolamin und Phosphatidyl-serin + Phosphatidyl-inositol in der Außenmembran am größten. Nur Lysophosphatidyl-cholin zeigte die höchste Aktivität im Intracristae-Raum. Entsprechend war auch ihr prozentualer Anteil dort am größten (2,2 gegenüber 0,6–0,9).

Kinetische Studien des Einbaus von  $^{32}\text{PO}_4^{3-}$  in vivo zeigten eine schnelle Markierung von Phosphatidyl-äthanolamin in der Mikrosomenfraktion. Erst mit einer Verzögerung von etwa 10 min wird das mitochondriale Phosphatidyl-äthanolamin markiert. Phosphatidyl-cholin wird in beiden Partikeln erst nach einer weiteren Verzögerung von 10 min markiert; wie oben wird es in den Mikrosomen schneller markiert als in den Mitochondrien. In vivo werden auch Phosphatidyl-äthanolamin und Phosphatidyl-serin zuerst in der löslichen und dann in der unlöslichen Mitochondrienfraktion markiert. In einem weiteren Experiment konnte die Übertragung von markierten Phosphatiden von den Mikrosomen in die Mitochondrien direkt in vitro gezeigt werden. Dieser Vorgang ist energie- und zeitabhängig, wie bereits für den Protein-Übergang gezeigt wurde<sup>[3]</sup>. Die Ergebnisse werden dahingehend interpretiert, daß der Hauptanteil der mitochondrialen Phosphatide am endoplasmatischen Reticulum synthetisiert wird und zusammen mit neu-synthetisiertem Protein als Molekülkomplex in die Mitochondrien transportiert wird.

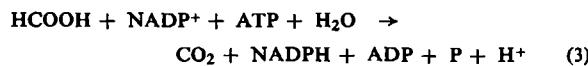
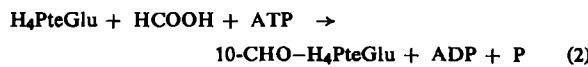
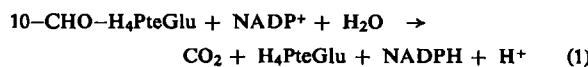
[\*] Dr. B. Kadenbach  
Institut für physiologische Chemie und  
physikalische Biochemie der Universität  
8 München, Goethestraße 33

- [1] W. Kaiser u. F. L. Bygrave, European J. Biochem. 4, 582 (1968); W. Stoffel u. H. G. Schiefer, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 349, 1017 (1968).  
 [2] C. Schnaitmann u. J. W. Greenawalt, J. Cell Biol. 38, 158 (1968).  
 [3] B. Kadenbach, Biochim. biophysica Acta 134, 430 (1966).

### Physiologische Bedeutung und Regulation von 10-Formyl-tetrahydrofolat:NADP-Oxidoreduktase

Von C. Kutzbach<sup>[\*]</sup>

Das zuerst in Schweineleber gefundene Enzym 10-Formyl-tetrahydrofolat:NADP-Oxidoreduktase<sup>[1]</sup> katalysiert Reaktion (1). Eine starke Produkthemmung durch Tetrahydrofolsäure erschwert quantitative Tests. Durch Kopplung mit einem Überschuß von Formiat:Tetrahydrofolat-Ligase (E.C.6.3.4.3.) aus *Clostridium cylindrosporum* läßt sich die Hemmung aufheben (Gl. (2)).



PteGlu = Pteroyl-L-glutaminsäure („Folsäure“)

Auf diesem Prinzip wurden ein spektrophotometrischer (NADPH) und ein radioaktiver ( $10\text{-}^{14}\text{CHO}\text{--H}_4\text{PteGlu}$  oder  $^{14}\text{C}$ -Formiat  $\rightarrow$   $^{14}\text{CO}_2$ ) Test aufgebaut, in dem nach Gl. (3) mit einer katalytischen Menge Folate Formiat zu  $\text{CO}_2$  oxidiert wird. In gleicher Weise kann auch die physiologische Formiatoxidation ablaufen; größtenteils gleiche Aktivitäten (1–5 mIE/mg) der Enzyme für Gl. (1) und (2) finden sich im Cytosol von Leber und Niere beim Kaninchen und bei der Ratte. In anderen Organen und in Hühnerleber war die Aktivität geringer oder nicht nachweisbar. In Abwesenheit von  $\text{NADP}^+$  oder in Anwesenheit von 0,1 M Hydroxylamin katalysiert die Oxidoreduktase eine Hydrolyse von 10-Formyl- $\text{H}_4\text{PteGlu}$  zu  $\text{H}_4\text{PteGlu}$  und Formiat mit höchstens 30% der Geschwindigkeit der Oxidation. Dies deutet auf eine aktive Formyl-Verbindung als Zwischenstufe, jedoch konnte kein Formhydroxamat nachgewiesen werden.

Die  $K_m$ -Werte betragen 3,5  $\mu\text{M}$  für NADP und 8,2  $\mu\text{M}$  für  $(-)$ -10-CHO- $\text{H}_4\text{PteGlu}$ . Mit der nur zu 50% umgesetzten  $(\pm)$ -Mischung ergaben sich die gleichen Werte und gleiche  $V_{max}$ : Die inaktive  $(+)$ -Form verursacht also keine Hemmung. Dagegen hemmen beide Isomeren des Produktes stark, so daß die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Verwendung von  $(\pm)$ - $\text{H}_4\text{PteGlu}$  statt  $\text{CHO}\text{--H}_4\text{PteGlu}$  im gekoppelten Test nur ca. 30% beträgt. Die Hemmkonstanten ( $K_i$ ) wurden größtenteils zu 12  $\mu\text{M}$  [ $(+)$ -Form] und 0,5  $\mu\text{M}$  [ $(-)$ -Form] erhalten. Der Hemmtyp ist näherungsweise, jedoch nicht strikt, kompetitiv. Die Hemmung ist spezifisch für  $\text{H}_4\text{PteGlu}$ : 5-CHO- $\text{H}_4\text{PteGlu}$ , 5-CH<sub>3</sub>- $\text{H}_4\text{PteGlu}$ , Folsäure, Aminopterin und hydriertes Aminopterin zeigten keine Hemmung bis 5·10<sup>-4</sup> M. Die starke und spezifische Produkthemmung spricht für eine Regulation der Gewebskonzentration an unsubstituierter Tetrahydrofolsäure durch dieses Enzym.

[\*] Dr. C. Kutzbach  
Max-Planck-Institut für Ernährungsphysiologie  
46 Dortmund, Rheinlanddamm 201

[1] C. Kutzbach u. E. L. R. Stokstad, Biochem. biophys. Res. Commun. 30, 111 (1968).

### Transport von Doppel- und Tripelsträngen der Ribopolynucleotidreihe durch Zellmembranen

Von P. L. Schell<sup>[\*]</sup>

Im Anschluß an frühere Arbeiten, in denen die Aufnahme von homologer, radioaktiver RNS durch Ehrlich-Ascites-Tumorzellen beschrieben wurde, konnte jetzt gezeigt werden, daß Poly-A-U und PolyA-U<sub>2</sub>, beide doppelt markiert, stärker von den Zellen aufgenommen werden als RNS oder Poly-A oder Poly-U allein. Die Zellen wurden in Suspension mit Hanks Medium inkubiert, welches das entsprechende Polynucleotid enthielt. Sie wurden dann von anhaftendem Medium befreit und die Radioaktivität entweder in den Zellen oder im zurückgewonnenen Polynucleotid gemessen. Auffallend ist, daß diese Einschleusung schon bei 0 °C ca. 50% der Maximalaufnahme erreichen kann, daß das Eindringen anfänglich sehr rasch vorstatten geht und daß die Kurve nach 30 min ein Plateau bildet. Dabei bleibt das Verhältnis 1:1 der beiden Partner beim Doppelstrang und 1:2 beim Tripelstrang konstant.

Das hochmolekulare Material konnte nicht vor oder während des Eindringens abgebaut werden und in Form von kleinen Bruchstücken in die Zelle gelangt sein, denn das Material läßt sich mit Phenol aus den Zellen extrahieren und läuft auf einer Sephadexsäule G 150 in gleicher Weise wie das Vergleichsmaterial. Die Inkorporation von markierten Bruchstücken in zelleigene RNS wird durch Actinomycin gehemmt. Diese Möglichkeit wurde durch Zugabe von <sup>14</sup>C-AMP simuliert. Neben eingeschleusten <sup>3</sup>H-Poly-A-U<sub>2</sub> wurde kaum [<sup>14</sup>C-A]-markierte RNS gefunden. Das Vorhandensein eines definierten Doppel- oder Tripelstranges ist für die erleichterte Aufnahme notwendig. Nach der Methode der kontinuierlichen Variation der Konzentrationen von Poly-A und Poly-U wurden mehrere Medien hergestellt. Die Aufnahme eines jeden Partners durch die Zellen aus diesen Medien ist maximal, wenn das Verhältnis A:U gleich 1:2 ist. Der Verlust der Hyperchromizität, d.h. der Fähigkeit zur Bildung von H-Brücken durch schrittweise N-Oxidation des Poly-A, führt parallel auch zur Verringerung der Aufnahme. Eine Trennung in die Einzelstränge während des Eindringens in die Zellmembran findet nicht statt. Wenn nämlich während der Einschleusung von Poly-[<sup>14</sup>C-A]-[<sup>3</sup>H-U<sub>2</sub>] jeweils ein molarer Überschuß von nicht markiertem Poly-A, Poly-U oder Poly-A-U zugegeben würde, dann hätte jede – auch reversible – Dissoziation des Tripelstranges eine Isotopverdünnung des jeweiligen Partners zur Folge gehabt, eine Errscheinung, die in unseren Versuchen nicht beobachtet wurde.

[\*] Dr. P. L. Schell  
Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin  
34 Göttingen, Hermann-Rein-Straße 3

### Über den Angriffspunkt des Cortisols im Zellkern

Von M. Beato, J. Homoki und C. E. Sekeris (Vortr.)<sup>[\*]</sup>

Die parenterale Zufuhr von Cortisol führt in den Leberzellkernen der Ratten zu einer raschen Stimulierung der RNS-Polymeraseaktivität und zu einer Erhöhung der Matrizenaktivität des Chromatins für die RNS-Synthese. Die gleichen Effekte konnten wir nach der Inkubation von Cortisol mit Leberzellkernen beobachten. Daraus schließen wir, daß der primäre Angriffspunkt des Hormons in den Zellkernen zu suchen ist. Um diesen Angriffspunkt näher zu lokalisieren, haben wir die Vorgänge bei der Erhöhung der Matrizenaktivität des Chromatins *in vitro* studiert. Chromatin besteht hauptsächlich aus DNS, RNS und Protein. Da <sup>3</sup>H-Cortisol ausschließlich an Kernprotein gebunden wird, haben wir *in vitro* den Einfluß des Hormons auf die Kernproteine untersucht.

[\*] Dr. M. Beato, Dr. J. Homoki und Doz. Dr. C. E. Sekeris  
Institut für Physiologische Chemie der Universität  
355 Marburg, Lahnberge