

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.^[1] 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^[2], dessen Forderungen von der Hefepyruvat-Kinase erfüllt werden^[1], 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^[3] 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_R) und T-Zustand (K_T) betragen für Phosphoenolpyruvat: K_R = $2 \cdot 10^{-4}$ M, K_T = $3,5 \cdot 10^{-2}$ M, non-exclusive binding coefficient c = $6 \cdot 10^{-3}$; für Fructose-1,6-diphosphat: K_R = $1 \cdot 10^{-4}$ M; für ATP: K_T = $2 \cdot 10^{-3}$ 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^[1], 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^[1]. 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^[2] 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^[3]. 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