

Einige Aspekte des aktiven Aminosäuretransports^[**]

Von Klaus Ring^[*]

*Unter aktivem Transport versteht man die Erscheinung, daß Substanzen entgegen dem Aktivitätsgradienten transportiert werden. In der Zelle liefern Stoffwechselvorgänge die Energie für den aktiven Transport durch die Membran. Aminosäuren werden dabei an ein Trägersystem in der Membran gekoppelt. Aus *E. coli* konnten jetzt einige Proteine isoliert werden, die Bestandteile von Trägersystemen für Aminosäuren sind.*

1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, einige Aspekte des Aminosäuretransports durch biologische Membranen zu schildern (s. hierzu^[1]). Aminosäuren sind aufgrund vielfältiger Beteiligungen am Zellstoffwechsel sehr wichtige Metabolite. Ihre Permeationseigenschaften durch Membranen werden durch ihren überwiegend hydrophilen Charakter bestimmt, so daß für ihren Transport Kopplungen mit Trägersystemen angenommen werden müssen. Ein weiteres Merkmal ist die strukturelle Variabilität ihrer Seitenketten, die viele spezifische Trägersysteme erforderlich macht, da Transportvorgänge häufig mit ähnlicher Spezifität ablaufen wie enzymatische Reaktionen.

Der große Bedarf teilungsfähiger Zellen an Aminosäuren für Proteinsynthese und Intermediärstoffwechsel bedingt einen engen Zusammenhang zwischen Transport und Stoffwechsel, der in der häufig beachtlichen Leistungsfähigkeit der Transportsysteme sowie in ihrer vielfältigen Regulierbarkeit zum Ausdruck kommt.

Der Schwerpunkt der Untersuchungen des aktiven Transportes hat sich in den letzten Jahren von einer durch die Physiologie geprägten Fragestellung in den biochemischen Bereich verschoben. Durch die Kombination enzymologischer, physikochemischer und genetischer Arbeitstechniken läßt sich die Chemie des aktiven Transports bereits etwas besser verstehen. *Skou*^[2] entdeckte das erste Enzym, welches als Bestandteil eines aktiven Transportsystems angesehen werden konnte; *Kaback* und *Stadtman*^[3] gelang die Präparation reiner Membranen aus *E. coli*, welche Aminosäuren und Zucker aktiv transportieren können; schließlich wurden in mehreren Laboratorien aus

Mikroorganismen Proteine isoliert, die als Bestandteile von Transportsystemen anzusehen sind.

Beim gegenwärtigen Stand der „Transportforschung“ ist es nicht mehr möglich, auch nur über ein Teilgebiet, wie den aktiven Aminosäuretransport, in einem kurzen Aufsatz einen vollständigen Überblick zu geben. Daher soll der Stoff, zwangsläufig etwas willkürlich, auf die biochemisch interessanten neueren Aspekte beschränkt werden. Dazu gehören neben enzymologischen und präparativen Gesichtspunkten auch Fragen der Regulation, die wegen des hohen Energieaufwandes beim Aminosäuretransport für die Ökonomie der Zelle wichtig sein können (Gesamtübersichten s.^[4-19]).

2. Vorgänge bei der Permeation

Die Beschreibung der Permeationsvorgänge soll hier auf das für ein Verständnis der folgenden Abschnitte Notwendigste beschränkt werden. (Eingehende Darstellungen s. 11, 6, 7, 10, 12, 13, 19.) Für die Permeation von Metaboliten durch biologische Membranen gibt es drei Möglichkeiten, denen physiologisch jedoch sehr unterschiedliche Bedeutungen zukommen.

- [4] E. F. Gale, Advances Protein Chem. 8, 285 (1953).
- [5] G. Cohen u. J. Monod, Bacteriological Rev. 21, 169 (1957).
- [6] W. Wilbrandt u. Th. Rosenberg, Pharmacol. Rev. 13, 109 (1961).
- [7] H. N. Christensen: Biological Transport. Benjamin, New York 1962.
- [8] A. Kepes u. G. Cohen in I. C. Gunsalus u. R. Y. Stanier: The Bacteria. Academic Press, New York 1962, Bd. 4, S. 179.
- [9] E. Heinz in: Biochemie des aktiven Transportes. 12. Colloquium der Gesellschaft für Physiologische Chemie. Springer, Berlin 1961, S. 167.
- [10] E. Heinz, Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. exp. Pathol. 245, 10 (1963).
- [11] H. J. Quastel, Proc. Roy. Soc. (London), Ser. B 163, 169 (1965).
- [12] P. Mitchell, Advances Enzymol. related Areas molecular Biol. 29, 33 (1967).
- [13] P. Mitchell in M. Florkin u. E. H. Stotz: Comprehensive Biochemistry. Elsevier, Amsterdam 1967, Bd. 22, S. 167.
- [14] L. E. Hokin u. M. R. Hokin, Annu. Rev. Biochem. 32, 553 (1963).
- [15] T. Z. Csaky, Annu. Rev. Physiol. 27, 415 (1965).
- [16] E. Heinz, Annu. Rev. Physiol. 29, 21 (1967).
- [17] R. W. Albers, Annu. Rev. Biochem. 36, 727 (1967).
- [18] A. Rothstein, Annu. Rev. Physiol. 30, 15 (1968).
- [19] W. D. Stein: The Movement of Molecules across Cell Membranes. Academic Press, New York 1967.

[*] Priv.-Doz. Dr. K. Ring
Chemisch-Physiologisches Institut der Universität
6 Frankfurt/Main,
Ludwig-Rehn-Straße 14, Theodor-Stern-Haus

[**] Die in der Arbeit erwähnten eigenen Arbeiten wurden durch Sach- und Personalbeihilfen der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

[1] Transportphänomene an künstlichen Membranen s. P. Läuger, Angew. Chem. 81, 56 (1969); Angew. Chem. internat. Edit. 8, 42 (1969).

[2] J. C. Skou, Biochim. biophysica Acta 23, 394 (1957).

[3] H. R. Kaback u. E. R. Stadtman, Proc. nat. Acad. Sci. USA 55, 920 (1966).

2.1. Freie Diffusion

Die freie Diffusion ist nur für wenige niedermolekulare Metabolite wie Aminosäuren annähernd realisiert (s. jedoch [19], S. 106, für Nichtelektrolyte). Aufgrund ihres hydrophilen Charakters als Elektrolyte sind sie auf wassergefüllte Kanäle in der Membran angewiesen, deren Größe nach oben jedoch limitiert ist. Für den Taurintransport in Ehrlich-Ascites-Tumorzellen (EMAT-Zellen) hat Kromphardt die Beteiligung einer derartigen Diffusionskomponente eindeutig feststellen können [20].

Für den Fluß durch sehr enge Poren wird ein Spezialfall freier Diffusion angenommen, bei dem sich die Teilchen nacheinander in einer linearen Kette bewegen („Gänsemarsch“) und ihre Plätze in dieser Kette nicht vertauschen können [21–23]. Diese „single-file“-Diffusion ist kinetisch von der üblichen freien Diffusion unterscheidbar. Eines ihrer Merkmale ist die Sättigung des Flusses mit steigender Teilchenkonzentration. Wie weit die „single-file“-Diffusion Bedeutung für die Permeation von Aminosäuren durch biologische Membranen hat, ist unbekannt.

2.2. Erleichterte Diffusion

Auch die erleichterte Diffusion („facilitated diffusion“) ist ein „passiver“ Fluß, dessen Triebkraft allein aus dem Konzentrationsgefälle (oder elektrochemischen Potentialgefälle) der Teilchen zwischen beiden Membranseiten ableitbar ist. Anders als die freie Diffusion zeichnet sich die erleichterte Diffusion durch hohe Spezifität aus. Der Teilchenfluß ist mit steigender Teilchenkonzentration vor der Membran zu sättigen. Ein Teilphänomen erleichterter Diffusion ist der Gegenstromeffekt („counterflow“ [6]): Manche Substanzen können ihre Flüsse gegenseitig beschleunigen, wenn sie sich auf den entgegengesetzten Seiten der Membran befinden.

Die Abweichungen von der als freie Diffusion zu kennzeichnenden passiven Permeation ließen sich sehr gut durch die angenommene Mitwirkung eines Trägers („carrier“) erklären. Danach bildet an oder in der Membran ein spezifisches, möglicherweise impermeables Trägermolekül mit seinem Transportsubstrat einen Komplex. Der Komplex löst sich in der Membran und vermag durch Diffusion, Rotation, Pendeln, Kontraktion und Expansion oder dergleichen die Membran zu durchdringen und sein Substrat an der anderen Seite abzugeben.

Wichtiges Merkmal der erleichterten Diffusion ist, daß sie ohne erkennbare chemische Veränderung der beteiligten Partner abläuft. Die einzigen chemischen Reaktionen sind Assoziation und Dissoziation zwischen Träger und Substrat. Die erleichterte Diffusion kann

- [20] H. Kromphardt, Biochem. Z. 339, 446 (1963).
- [21] A. L. Hodgkin u. R. D. Keynes, J. Physiology 128, 61 (1955).
- [22] K. Heckmann, Z. physik. Chem. N. F. 44, 184 (1965).
- [23] K. Heckmann, Z. physik. Chem. N. F. 46, 1 (1965).

diskontinuierlich oder kontinuierlich ablaufen: im ersten Fall finden Assoziation und Dissoziation nur an den Membranaußenseiten statt, im zweiten Fall auch während des Durchtritts durch die Membran [24]. Der zweite Typ ist etwa beim O₂-Transport durch Hämoglobin realisiert.

Die erleichterte Diffusion scheint für die Aufnahme einiger Aminosäuren in Mikroorganismen eine erhebliche Rolle zu spielen. Brock und Moo-Penn [25] fanden, daß bei *Streptococcus faecium* extrazelluläres Serin, Glycin und Threonin – essentielle Aminosäuren für diese Zellen – durch ein spezifisches System gegen ihre Konzentrationsgradienten ins Zellinnere transportiert werden, ohne daß hierfür unmittelbar Energie erforderlich ist. Die Ursache liegt in einer obligaten Kopplung dieser einwärtsgerichteten Flüsse mit dem Efflux von Alanin, welches in der Zelle in großen Mengen synthetisiert wird. Das Konzentrationsgefälle für Alanin von innen nach außen wird hier also dafür genutzt, extrazelluläre Aminosäuren gegen ihre Konzentrationsgefälle in die Zelle hineinzupumpen.

Kaback und Stadtman [26] zeigten, daß die Glycinakkumulation durch isolierte Membranpräparationen von *E. coli* zwar als Bruttovorgang energieabhängig ist, der eigentliche Transport (Translokation) über die osmotische Barriere jedoch durch erleichterte Diffusion, also energieunabhängig, erfolgt.

2.3. Aktiver Transport

Beim aktiven oder Bergauf-Transport finden sich die gleichen kinetischen Merkmale wie bei der erleichterten Diffusion: Sättigung des Flusses bei hoher Substratkonzentration, häufig hohe Spezifität, kompetitive Hemmbarkeit, Austauschdiffusion und Gegenbeschleunigung („preloading effect“ [27–30]). Daher wird auch hier allgemein ein Trägermechanismus angenommen. Der wesentliche Unterschied zur erleichterten Diffusion besteht darin, daß beim aktiven Transport der Teilchenfluß mit der freien Energie einer in der Transportregion ablaufenden chemischen Reaktion unmittelbar gekoppelt ist. Die freiwerdende Energie wird in Pumparbeit umgewandelt und damit die Anreicherung des Teilchens gegen sein osmotisches oder elektrochemisches Gefälle ermöglicht.

Der aktive Transport führt im allgemeinen zur Einstellung eines Fließgleichgewichts („steady state“), in welchem die Verteilung des Substrats zwischen Intrazellulär- und Extrazellularraum konstant ist. Die Anreicherung wird durch die Leistungsfähigkeit des transportierenden Systems, die Größe des Effluxes (freie Diffusion

[24] R. Blumenthal u. A. Katchalsky, Biochim. biophysica Acta 173, 357 (1969).

[25] Th. D. Brock u. G. Moo-Penn, Arch. Biochem. Biophys. 98, 183 (1962).

[26] H. R. Kaback u. E. R. Stadtman, J. biol. Chemistry 243, 1390 (1968).

[27] E. Heinz, J. biol. Chemistry 211, 781 (1954).

[28] E. Heinz, J. biol. Chemistry 225, 305 (1957).

[29] E. Heinz u. P. M. Walsh, J. biol. Chemistry 233, 1488 (1958).

[30] E. Heinz u. R. P. Durbin, J. gen. Physiol. 41, 101 (1957).

und/oder Austauschdiffusion) sowie durch die Abbaugeschwindigkeit des Substrates im Zellinneren bestimmt. Fälle von mehr als tausendfacher Anreicherung sind nicht selten. Johnstone und Scholefield^[31] haben angegeben, daß in EMAT-Zellen unter bestimmten Bedingungen etwa 50 % des zellulären ATP für die Glycinakkumulation aufgewendet werden kann. Quastel^[11] hat auf den außerordentlichen Selektionsvorteil aufmerksam gemacht, den Zellen mit leistungsfähigen aktiven Transportsystemen gegenüber Zellen mit geringerer Transportkapazität bei ihrer Entwicklung haben können. Beispielsweise sind Tumorzellen, die zu den transportaktivsten tierischen Zellen gehören, in der Lage, benachbarten Geweben wichtige Nahrungsstoffe zu entziehen.

Wie zuerst Heinz^[27-29] für den Glycintransport bei EMAT-Zellen feststellte, enthält der Gesamtfluß dieser Aminosäure einen erheblichen Anteil an Austauschdiffusion. Im stationären Zustand werden mehr als 90 % des intrazellulären Glycins innerhalb von fünf Minuten gegen extrazelluläres Glycin ausgetauscht^[28]. Die Austauschflüsse sind etwa fünfmal schneller als der Nettotransport^[32]; das bedeutet, daß etwa 80 % des Bruttoflusses auf die Austauschdiffusion entfallen. Die Ursache wird darin gesehen, daß der beladene Träger in der Membran beweglicher (löslicher) ist als der unbeladene^[16, 29, 30]. Die Austauschdiffusion als Bestandteil eines aktiven Trägersystems ist wie die erleichterte Diffusion energieunabhängig; beide lassen sich auf den gleichen Reaktionstyp zurückführen.

Zur Veranschaulichung der beim Aminosäuretransport zu erwartenden Einzelreaktionen soll zunächst das Trägermodell von Heinz und Walsh^[29] dienen (Abb.1).

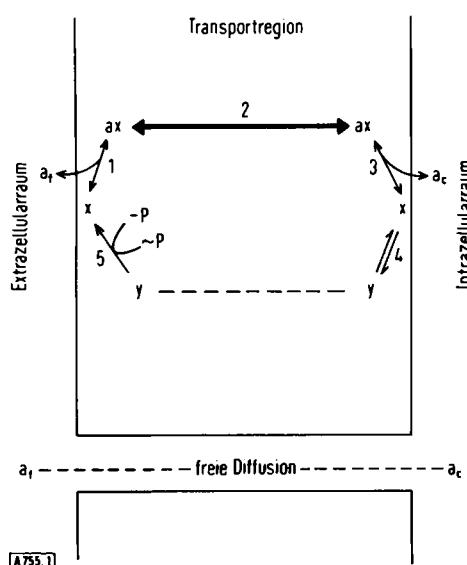


Abb. 1. Modell für den Aminosäuretransport in Ehrlich-Ascites-Tumorzellen, nach Heinz und Walsh^[29]. a_f und a_c : extra- bzw. intrazelluläres Transportsubstrat; x: aktiver, y: inaktiver Träger; ax: Komplex zwischen Träger und Substrat; $\sim P$ und $-P$: Substrat bzw. Produkt einer mit dem Transport gekoppelten exergonischen Reaktion. Erläuterungen s. Text.

[31] R. M. Johnstone u. P. G. Scholefield, *Advances Cancer Res.* 9, (1965), zit. nach [11].

[32] E. Heinz u. H. A. Mariani, *J. biol. Chemistry* 228, 97 (1957).

Die Aminosäure a verbindet sich vorübergehend mit dem für sie spezifischen Träger x zu ax (formal einem Enzym-Substrat-Komplex vergleichbar), der sie durch die Membran schleust. Auf der Innenseite der Membran dissoziert ax in $a_c + x$. Dabei wird angenommen, daß Bindung und Abspaltung von a im Verhältnis zur Verschiebung von ax schnell sind. Zur Austauschdiffusion dienen die Reaktionen 1–3, die reversibel sein müssen. Die Anreicherung im Zellinneren gelingt dadurch, daß x nach der Dissoziation von ax zu y inaktiviert wird. Die Affinität zu a geht dadurch vollständig oder zumindest partiell verloren. Nach Diffusion an die Außenseite der Membran wird y durch die energieabhängige Reaktion 5 wieder zu x aktiviert. Die Diffusion von y oder Reaktion 5 sind nach den kinetischen Befunden geschwindigkeitsbestimmend.

Dieses Modell erfüllt alle Anforderungen, die sich aus den Untersuchungen des Aminosäuretransports an EMAT-Zellen ergeben haben und scheint auch auf einige mikrobielle Systeme anwendbar zu sein^[33], wenn auch nicht unbegrenzt. So fehlt bei einigen der von uns an *Streptomyces hydrogenans* untersuchten Aminosäure-Transportsystemen die Austauschdiffusionskomponente^[34].

Auch das von Kepes^[35] ursprünglich für den β-Galaktosidtransport in *E. coli* aufgestellte und später von Koch^[36, 37] erweiterte Transportmodell (Permease-Modell) verwendet einen Träger. Zum Unterschied vom oben zitierten Trägermodell und dem mit diesem nahezu identischen „Permease“-Modell von Cohen und Monod^[5] enthält das Modell von Kepes zwei katalytische Komponenten, eine spezifische Permease (P) und einen weniger spezifischen Transporter (T) (Abb.2)

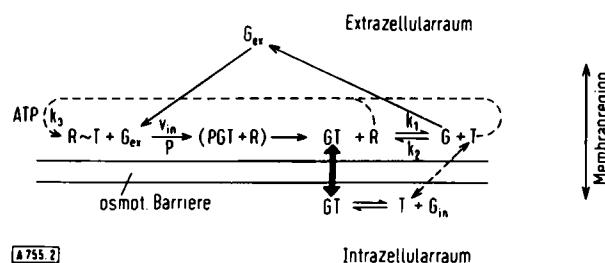


Abb. 2. Modell für den β-Galaktosidtransport in *E. coli* (Permease-Modell) nach Kepes^[35]. P = Permease, T = Transporter, G = Substrat, R ~ T = aktivierter Transporter. Erläuterungen s. Text.

P ist an der Außenseite der Membran fest gebunden und katalysiert die Bindung des Substrates (G) an den Transporter. Der Komplex GT durchdringt die Membran und dissoziert an ihrer Innenseite in T und G. Auch hier ist die eigentliche Translokation reversibel. Der aktive Transport erfordert die Beteiligung von ATP am Aufbau des aktivierte Transporters T~R. Befunde an *E. coli*^[36] sowie genetische Untersuchungen über den Zuckertransport bei *Staphylococcus*

[33] K. Ring u. E. Heinz, *Biochem. Z.* 344, 446 (1966).

[34] K. Ring, Habilitationsschrift, Universität Frankfurt/M. 1967; W. Groß u. K. Ring, unveröffentlicht.

[35] A. Kepes, *Biochim. biophysica Acta* 40, 70 (1960).

[36] A. L. Koch, *Biochim. biophysica Acta* 79, 177 (1964).

[37] A. L. Koch, *J. theoret. Biol.* 14, 103 (1967).

aureus^[38] haben Anhaltspunkte für ein derartiges Zwei-Komponenten-System mit einem multifunktionalen Träger erbracht. Es scheint jedoch ebenfalls nur begrenzt anwendbar zu sein. So ist die Austauschdiffusion von Aminosäuren bei vielen Mikroorganismen streng spezifisch, ein Befund, der entweder neben der Permease einen ebenfalls spezifischen Transporter oder aber die Existenz einer zweiten Permease – an der Membraninnenseite – voraussetzt^[*].

3. Enzyme als Bestandteile von Transportsystemen

In welcher Weise der aktive Aminosäuretransport mit dem Energiestoffwechsel verbunden wird („chemo-osmotische Kopplung“), ist zur Zeit noch völlig offen, obwohl in den letzten Jahren mehrere Enzymsysteme, die energietransferierende Reaktionen katalysieren, mit dem aktiven Stofftransport in direkten Zusammenhang gebracht werden konnten. Eines dieser Systeme, die von Skou^[2, 40] entdeckte Membran-ATPase, ist Bestandteil des Transportsystems für K⁺ und Na⁺ in tierischen Zellen. Ihre Reaktionssequenz umfaßt einen Phosphattransfer von ATP auf ein Membranprotein und dessen anschließende Entphosphorylierung. Der erste Schritt erfordert Na⁺, der zweite K⁺. Das Enzym ist durch Strophantin hemmbar (Übersicht s. [12, 16–18, 40]). Auch in Bakterienmembranen wurden ATPasen nachgewiesen; sie unterscheiden sich jedoch in ihrer Kationenabhängigkeit und Empfindlichkeit gegenüber Strophantin erheblich von Enzympräparationen tierischer Herkunft^[41–52]. Wieweit ATPasen am Aminosäuretransport unmittelbar, d.h. unabhängig von einem Symportermechanismus (s. Abschnitt 4), beteiligt sind, ist zur Zeit nicht zu übersehen.

Kundig et al.^[53] isolierten ein am aktiven Zuckertransport beteiligtes Phototransferasesystem aus *E. coli*, welches aus zwei Enzymen (I und II) und einem niedermolekularen, hitze-

[38] J. B. Egan u. M. L. Morse, Biochim. biophysica Acta 109, 172 (1965).

[*] S. hierzu Diskussion nach [39].

[39] W. Wilbrandt, s. [9], dort S. 112.

[40] J. C. Skou, Physiol. Rev. 45, 596 (1965).

[41] A. Abrams, P. McNamara u. F. B. Johnson, J. biol. Chemistry 235, 3659 (1960).

[42] G. Drapeau u. R. Macleod, J. Bacteriol. 85, 1413 (1963).

[43] M. Hayashi u. R. Uchida, Biochim. biophysica Acta 110, 207 (1965).

[44] Th. Günther u. F. Dorn, Z. Naturforsch. 21b, 1076 (1966).

[45] J. C. M. Hafkenscheid u. S. L. Bonting, Biochim. biophysica Acta 151, 204 (1968).

[46] G. A. Scarborough, M. K. Rumley u. E. P. Kennedy, Proc. nat. Acad. Sci. USA 60, 951 (1968).

[47] A. Abrams u. C. Baron, Biochemistry 7, 501 (1968).

[48] R. Gross u. N. W. Coles, J. Bacteriol. 95, 1322 (1968).

[49] M. Erecinska u. E. Kuligowska, Acta microbiol. Polon. 17, 299 (1968).

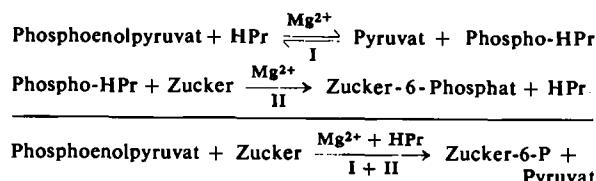
[50] E. Munoz, M. S. Nachbar, M. T. Scor u. M. R. J. Salton, Biochem. biophysic. Res. Commun. 32, 539 (1968).

[51] E. Munoz, M. R. J. Salton, M. H. Ng u. M. T. Schor, Europ. J. Biochem. 7, 490 (1969).

[52] F. M. Harold, J. R. Baarda, C. Baron u. A. Adams, J. biol. Chemistry 244, 2261 (1969).

[53] W. Kundig, S. Ghosh u. S. Roseman, Proc. nat. Acad. Sci. USA 52, 1067 (1964).

stabilen Protein, HPr, besteht. Das membrangebundene Enzym II ist entscheidend für die Substratspezifität der Reaktion. Als Energiedonor dient Phosphoenolpyruvat:



In letzter Zeit sind zahlreiche überzeugende Befunde erbracht worden, daß dieses Energietransfersystem integraler Bestandteil einer Reihe zuckertransportierender Systeme in verschiedenen Mikroorganismen ist^[54–60]. Im Gegensatz zu den früheren Vorstellungen wird in diesen Fällen das Substrat beim Transport durch kovalente Bindungen verändert. Ein gleichfalls das Transportsubstrat phosphorylierendes System als Bestandteil einer energieabhängigen Zucker-, „Permease“ beschrieb van Steveninck^[61, 62] bei Hefe. Energiedonor bei diesem System ist Polyphosphat.

Die beschriebenen Modelle scheinen auf den Kationen- oder Zuckertransport beschränkt zu sein. Hinweise auf die Beteiligung vergleichbarer Reaktionen am aktiven Aminosäuretransport gibt es nicht; insbesondere fehlen bisher Beweise, daß Aminosäuren während der Translokation wenigstens vorübergehend kovalente Bindungen eingehen.

4. Ionenabhängigkeit des Aminosäuretransports

Interessante Wechselbeziehungen zwischen Aminosäuretransport und einwertigen Kationen haben sich insbesondere bei tierischen Zellen ergeben. Die Aufnahme von Aminosäuren in verschiedene Zellarten kann durch das Ionenmilieu im extrazellulären Raum beeinflußt werden. Der Transport von Aminosäuren in tierische Zellen (EMAT-Zellen, Erythrocyten, Mucosazellen, Pancreaszellen u.a.) hängt, wie auch der Zuckertransport in manche Gewebe, von der extrazellulären Na⁺-Konzentration ab^[9, 63–68]. In EMAT-

[54] R. D. Simoni, M. Levinthal, F. D. Kundig, W. Kundig, B. Anderson, P. E. Hartmann u. S. Roseman, Proc. nat. Acad. Sci. USA 58, 1963 (1967).

[55] E. P. Kennedy u. G. A. Scarborough, Proc. nat. Acad. Sci. USA 58, 225 (1967).

[56] W. Hengstenberg, J. B. Egan u. M. L. Morse, J. biol. Chemistry 243, 1881 (1968).

[57] H. R. Kaback, J. biol. Chemistry 243, 3711 (1968).

[58] P. Laue u. R. E. MacDonald, Biochim. biophysica Acta 165, 410 (1968).

[59] T. E. Hanson u. R. L. Anderson, Proc. nat. Acad. Sci. USA 61, 269 (1968).

[60] S. Tanaka u. E. C. C. Lin, Proc. nat. Acad. Sci. USA 57, 913 (1967).

[61] J. van Steveninck, Biochim. biophysica Acta 163, 386 (1968).

[62] J. van Steveninck, Arch. Biochem. Biophysics 130, 244 (1969).

[63] H. Kromphardt, H. Grobecker, K. Ring u. E. Heinz, Biochim. biophysica Acta 74, 549 (1963).

[64] E. Riklis u. H. J. Quastel, Canad. J. Biochem. 36, 347 (1958).

[65] T. Z. Csaky, Federat. Proc. 22, 3 (1963).

[66] H. N. Christensen in E. E. Bittar: Membrane Metabolism and Ion Transport. Interscience, New York, in Druck.

[67] R. K. Crane, Federat. Proc. 24, 1000 (1965).

[68] R. K. Crane, G. Forstner u. A. Eichholz, Biochim. biophysica Acta 109, 467 (1965).

Zellen erfordert die maximale Anreicherung von Glycin eine Na^+ -Konzentration von etwa 130 mmol/l.

Zur Klärung der Wirkung von Na^+ - auf den Aminosäure- und Zuckertransport sind zahlreiche kinetische und elektrophysiologische Untersuchungen durchgeführt worden (Literaturübersicht und Diskussionen s. [11, 12, 15, 16, 18, 19]). Nach der heute am häufigsten vertretenen Hypothese [67, 68] wird eine Kopplung des Aminosäure- (oder Zucker-) Influxes mit dem Na^+ -Influx angenommen. Beide Transportsubstrate benutzen einen gemeinsamen Träger und überqueren die Membran in einem ternären Komplex („Symporter“ in der Nomenklatur von Mitchell [12]). Im Zellinneren dissoziieren Na^+ und Aminosäure (bzw. Zucker) vom Trägermolekül ab. Durch die Na^+ -Pumpe („Membran-ATPase“) wird das eingedrungene Na^+ aus der Zelle herausbefördert, so daß bei ausreichender Pumpenkapazität die intrazelluläre Na^+ -Konzentration im Verhältnis zur extrazellulären niedrig ist. Damit wird über die Zellmembran ein Gradient für Na^+ von außen nach innen aufrechterhalten, der die treibende Kraft für den gemeinsamen Influx von Na^+ und Aminosäure darstellt. Die Anreicherung der Aminosäure ist dementsprechend eine Funktion des Na^+ -Gradienten.

Kinetisch wird durch die hohe physiologische Außenkonzentration von Na^+ die Michaelis-Konstante K_m für die Aminosäure vermindert; im Zellinneren, bei niedriger Na^+ -Konzentration, wirkt sich die durch die einwärtsgerichtete K^+ -Pumpe aufgebaute hohe K^+ -Konzentration auf K_m vergrößernd aus, so daß der Träger einen Teil seiner Affinität zur Aminosäure verliert. Damit stammt eine weitere Triebkraft für den einwärtsgerichteten Fluß der Aminosäure aus der asymmetrischen Verteilung des K^+ .

Nach dieser Hypothese ist der Na^+ -abhängige Aminosäuretransport in die genannten Zellen kein echter aktiver „Primärtransport“, sondern muß als erleichterte Diffusion betrachtet werden. Durch seine Abhängigkeit vom aktiven K^+ - und Na^+ -Transport ist er durch alle Inhibitoren der Kationenpumpe, beispielsweise Strophanthin, hemmbar.

Eine ähnliche Na^+ -Abhängigkeit fanden Kleber und Aurich [69] für den aktiven Carnitintransport in *Pseudomonas aeruginosa*; neben Na^+ wirken auch K^+ und Mg^{2+} aktivierend. Überraschend war, daß g-Strophanthin den Carnitin-Transport hemmt. Aufgrund dieser Befunde nehmen die Autoren an, daß eine K^+ - Na^+ -stimulierbare, strophantinsensitive Membran-ATPase am Transport von Carnitin teilnimmt. Möglicherweise ist auch hier ein Symporter-Mechanismus vorhanden.

Auch einige halophile Mikroorganismen benötigen für ihren Aminosäuretransport Natriumionen [70–73]; im Gegensatz zu den oben geschilderten Fällen wirken sie jedoch ausschließlich in Kombination mit Chlorid. Hohe Salzkonzentrationen sind ferner zur Aufrechterhaltung der außerordentlich labilen Struktur dieser Organismen sowie zur Aktivierung einiger enzymatischer Reaktionen erforderlich. Es ist daher nicht sehr wahrscheinlich, daß die Abhängigkeit der Aminosäureaufnahme von NaCl sich hier ebenfalls mit einer Symporter-Hypothese erklären läßt.

Einwertige Kationen vermögen jedoch auch noch in anderer Weise den aktiven Aminosäuretransport zu beeinflussen. Groß [74] fand, daß der aktive Glutamattransport in *Streptomyces hydrogenans* durch K^+ und Rb^+ signifikant aktiviert wird. Die Interpretation der Befunde wurde dadurch etwas erschwert, daß auch enzymatische Reaktionen durch diese Ionen aktiviert werden. Da jedoch mit der intrazellulären Konzentration des Glutamats auch die des K^+ ansteigt, ist anzunehmen, daß K^+ mit dem anionischen Glutamat in die Zelle eintritt. Diese Befunde bestätigen ältere Untersuchungen von Gale [4], Davies et al. [75] sowie Eddy und Indge [76], wonach die Glutamataufnahme in manche Mikroorganismen mit einem Gewinn an intrazellulärem K^+ verbunden ist.

Demgegenüber ist die Aufnahme neutraler Aminosäuren bei *Strept. hydrogenans* unabhängig von einwertigen Kationen, sofern deren Konzentration ca. $5 \cdot 10^{-2}$ mol/l nicht übersteigt [77, 78]. Höhere Konzentrationen hemmen den Aminosäuretransport. Die Hemmung ist reversibel, unspezifisch, kompetitiv und beruht nicht auf einem osmotischen Effekt. Wahrscheinlich behindern einwertige Kationen in höherer Konzentration die Bindung der neutralen Aminosäuren an das Transportsystem dadurch, daß sie in Konkurrenz mit den NH_3^+ -Gruppen der Aminosäuren die anionischen Bindungsstellen am Trägermolekül besetzen [78].

Christensen und Handlogton [79] fanden, daß der Transport basischer Aminosäuren in EMAT-Zellen durch neutrale Aminosäuren in Kombination mit Natriumionen gehemmt wird. Die Ergebnisse werden dahingehend interpretiert, daß neutrale Aminosäuren den Bindungsort für basische Aminosäuren am Trägermolekül besetzen und deren Transport dann zu hemmen vermögen, wenn ein Begleitkation, wie Na^+ , die Bindungsstelle für die distale kationische Gruppe der basischen Aminosäure einnimmt.

5. Regulation des Aminosäuretransports

Die Regulation des aktiven Aminosäuretransports ist von besonderer physiologischer Bedeutung. Sie erfolgt offenbar in gleicher oder zumindest sehr ähnlicher Weise wie die Steuerung enzymatischer Prozesse. Dabei sind zwei voneinander unabhängige Regelkreise

[74] W. Groß, noch unveröffentlicht.

[75] R. Davies, J. P. Foljes, E. F. Gale u. L. C. Bigger, Biochem. J. 54, 430 (1953).

[76] A. A. Eddy u. K. J. Indge, Biochem. J. 85, 35 P (1962).

[77] K. Ring, Z. klin. Chem. klin. Biochem. 3, 13 (1965).

[78] K. Ring, noch unveröffentlicht.

[79] H. N. Christensen u. M. E. Handlogton, FEBS-Letters 3, 14 (1969).

zu unterscheiden, von denen der eine über die Veränderung der *Konzentration*, der andere über die Veränderung des *Aktivitätszustandes* des Transportsystems zu wirken scheint. Der erste Regelkreis wirkt auf genetischer Ebene: Ein Transportsubstrat kann die Neusynthese des Transportsystems spezifisch induzieren oder, bei Überangebot im Nährmedium, gegebenenfalls reprimieren. Eine derartige Anpassung erfordert eine Anlaufzeit (lag-Periode). Der zweite Regelkreis wirkt momentan und läßt sich im Sinne einer Rückkopplung interpretieren, bei welcher das transportierte Substrat oder eines seiner Stoffwechselprodukte vom Zellinneren aus den aktiven Transport weiterer Moleküle hemmt oder steigert. Für alle vier Möglichkeiten sind Beispiele gefunden worden, bisher jedoch fast ausschließlich bei Mikroorganismen.

5.1. Induktion und Repression

In den vergangenen Jahren sind viele mikrobielle Transportsysteme beschrieben worden, die genetisch reguliert werden. Dazu gehören vor allem Aufnahmesysteme für die zahlreichen metabolisch nutzbaren Kohlenhydrate und andere Metabolite des Energiestoffwechsels. Ohne Zweifel ist die Eigenschaft der Bakterienzelle, Aufnahmesysteme für so verschiedene physiologische Energiedonoren induzieren zu können, mit einem Selektionsvorteil verbunden. So wird nur das Transportsystem aufgebaut, das die Zelle im Augenblick benötigt. Die Leistungsfähigkeit eines einzigen Systems reicht aus, um den gesamten Bedarf der Zelle an Kohlenhydrat zu decken^[80].

Demgegenüber sind bisher nur wenige induzierbare Transportsysteme für Aminosäuren bekannt geworden. Das hat zunächst auch nicht überrascht, da in der Induzierbarkeit des Aminosäuretransports nicht unbedingt ein Selektionsvorteil zu sehen ist^[80]. Es ist zu bedenken, daß die Zellen im allgemeinen in der Lage sind, entsprechend dem Milieu ihren Bedarf an den etwa zwanzig Aminosäuren entweder durch Aufnahme aus dem Nährmedium oder durch eigene Synthese zu decken. Die energetisch aufwendigere Biosynthese ist bei einigen Synthese-Sequenzen bekanntlich mit einer Rückkopplungs-Steuerung ausgestattet, deren Regelkreis am rationellsten arbeiten wird, wenn die in der Außenlösung vorhandenen Aminosäuren sehr schnell ins Zellinnere aufgenommen werden, um dort gegebenenfalls ihre Steuerfunktion auszuüben. Das setzt aber voraus, daß diese Transportsysteme unabhängig von der Außenkonzentration ihrer Substrate in maximaler Konzentration permanent vorhanden sind.

Dennoch scheinen einige Zellspezies über induzierbare Kapazitätsreserven zu verfügen, die dann von Vorteil sein können, wenn das Nährmedium höhere Konzentrationen einer einzigen oder nur weniger Aminosäuren enthält. Die Zelle wird hierdurch in die Lage versetzt, ihren Stickstoffbedarf weitgehend oder voll-

[80] A. Kepes in J. F. Hoffman: The Cellular Functions of Membrane Transport. Prentice Hall, Englewood Cliffs, N. J., 1964, S. 155.

ständig aus dem exogenen Aminosäurestickstoff decken zu können.

Das erste induzierbare Aufnahmesystem für Aminosäuren fanden Boezi und DeMoss^[81] bei der Untersuchung der Tryptophanaufnahme durch eine tryptophanauotrophe Mutante, *E. coli* T₃A. Ein weiteres induzierbares Tryptophan-Transportsystem beschrieben Rosenfeld und Feigelson^[82] bei *Ps. acidovorans*. Beide Transportsysteme sind energieabhängig; ihre Spezifität ist auf Tryptophan und strukturell verwandte Derivate beschränkt. Maximale Induktion des Coli-Systems erfordert 500 µg Tryptophan/ml Nährmedium und steigert den Transport auf das Zehnfache; „nichtinduzierte“ Zellen haben bereits eine gut meßbare Transportkapazität.

Bei *Ps. acidovorans* wird der Tryptophantransport durch 5 mmol/l L-Tryptophan in asparaginhaltigem Mineralmedium induziert; maximale Induktion erfordert etwa eine sechsstündige Inkubation. Gleichzeitig mit dem Transport, aber nicht mit diesem im strengen Sinne koordiniert, werden zwei tryptophanabbauende Enzyme induziert. Die Schlüsselposition bei der Induktion scheint nicht das Transportsubstrat selbst, Tryptophan, einzunehmen, sondern sein Abbauprodukt Kynurenin; dieses vermag ebenfalls den Tryptophantransport – neben einem eigenen Transportsystem – zu induzieren. Vermutlich induziert Tryptophan nicht direkt, sondern erst nach endogener Umwandlung in Kynurenin. Damit bestünde ein enger Zusammenhang zwischen Stoffwechselaktivität und Transportinduktion.

Ein derartiger Zusammenhang ist auch bei der Induktion des Citrullintransports in *Streptococcus faecalis* festzustellen^[83]. Dieser Mikroorganismus wandelt Arginin in Citrullin und dieses weiter in Ornithin um. In Mineralmedium gewachsene Zellen sind für Citrullin relativ schlecht permeabel; durch Zusatz von Arginin zum Nährmedium wird die Permeabilität für Citrullin vervierfacht. Diese Transportsteigerung ist selektiv; die Konzentration der Citrullinase wird nicht beeinflußt. Maximale Induktion erfordert eine relativ lange Inkubation und ist nach 12–16 Stunden beendet. Vermutlich ist auch hier nicht die zugesetzte Aminosäure, Arginin, der Induktor, sondern sein in der Zelle akkumuliertes Abbauprodukt Citrullin.

Ein induzierbares aktives Transportsystem für L-Glutamat in Mycobakterien beschrieben Lyon et al.^[84]. Induktor ist das Transportsubstrat, L-Glutamat. Maximale Induktion erfordert die relativ hohe Induktorkonzentration von $2 \cdot 10^{-2}$ mol/l. Auch hier ist eine basale Transportaktivität in „uninduzierten“ Zellen vorhanden; Induktion steigert diesen Transport um etwa das Dreifache.

Auch für den induzierbaren oxidativen Abbau von L-Hydroxyprolin zu α-Ketoglutarat in *Ps. putida* wurde

[81] J. A. Boezi u. R. D. DeMoss, Biochim. biophysica Acta 49, 471 (1961).

[82] H. Rosenfeld u. P. Feigelson, J. Bacteriol. 97, 705 (1969).

[83] W. R. Bibb u. W. R. Straughn, J. Bacteriol. 87, 815 (1964).

[84] R. H. Lyon, P. Rogers, W. H. Hall u. H. Lichstein, J. Bacteriol. 94, 92 (1967).

festgestellt [85], daß Hydroxyprolin zusammen mit den abbauenden Enzymen auch sein Transportsystem induziert. Wie weit die Induktion der Enzyme und der „Permease“ koordiniert ist, bedarf noch der Klärung.

Der von uns benutzte Mikroorganismus *Streptomyces hydrogenans* hat, wie erstmals Hübener [86] mitteilte, ein induzierbares Transportsystem für neutrale Aminosäuren. Weitere Untersuchungen [87, 88] dienten der kinetischen Charakterisierung des induzierten Systems. Die Induktion erfolgte in einem Mineralmedium mit Succinat und Glucose als Energiequellen und NH₄Cl als Stickstoffdonor. Trotz der Abwesenheit von Aminosäuren bilden die Zellen in diesem Medium eine teilweise beträchtliche Transportkapazität für neutrale Aminosäuren aus. Die Zugabe einiger neutraler Aminosäuren zum Nährmedium steigert den Transport auf das maximal Zehnfache. Gute Induktoren sind Glycin und Alanin sowie α -Aminoisobuttersäure (AIB), eine dem Glycin und Alanin strukturale Analogie, hingegen nicht metabolisierbare Aminosäure. Dieser Befund ist für die Interpretation der Experimente von Bedeutung, da er zeigt, daß das Transportsubstrat selbst Induktor ist und nicht eines seiner Stoffwechselprodukte.

Maximale Induktion erfordert eine Induktorkonzentration von etwa 10⁻¹ mol/l. Dieser Wert erscheint zunächst sehr hoch, wird jedoch verständlicher, wenn man ihn mit der intrazellulären Alanin- und Glycinkonzentration vergleicht. Neben Glutamat ist Alanin Hauptbestandteil des Aminosäurepools in diesem Organismus; seine Konzentration im Zellwasser beträgt etwa 10 mmol/l, die des Glycins etwa die Hälfte. Es ist leicht einzusehen, daß eine Induktion nur bei Induktorkonzentrationen feststellbar sein kann, die über diesen Werten liegen.

Die physiologische Funktion einer derartigen Regulation ist in Abschnitt 5 diskutiert worden. Hier sei die Frage gestellt, ob nicht auch die basale Transportkapazität in uninduzierten Zellen bereits das Produkt einer unvollständigen Induktion ist, die permanent durch die intrazellulären Aminosäuren ausgelöst wird. Für diese Annahme spricht die Beobachtung, daß die basale Transportaktivität von der Qualität des Wachstums abhängen scheint und stark schwankt, und daß bei induzierten und nicht-induzierten Zellen die Michaelis-Konstanten der Transportsysteme α -Aminoisobuttersäure voneinander nicht unterscheidbar sind (s. u.).

Die Induktion wird durch Chloramphenicol, Actinomycin C, Proflavin und Mitomycin gehemmt, ein Beweis dafür, daß funktionsfähige DNA sowie RNA- und Proteinsynthese erforderlich sind. Durch Zugabe nicht induzierender Aminosäuren wie Asparagin wird die Induktion stark gefördert [88]. Die Funktion dieser Aminosäuren ist noch unklar.

[85] R. M. Gryder u. E. Adams, J. Bacteriol. 97, 292 (1969).
[86] H.-J. Hübener s. [9].

[87] K. Ring, H.-J. Hübener u. E. Heinz, Proceedings der gemeinsamen Tagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik, der Österreichischen Gesellschaft für reine und angewandte Biophysik und der Schweizerischen Gesellschaft für Strahlenbiologie, Wien 1964, S. 35.

[88] K. Ring, Biochim. biophysica Acta 183, 375 (1969).

Nach kinetischen Untersuchungen steigert die Induktion die Maximalgeschwindigkeit des Influxes, ohne die Affinität zwischen Transportsystem und Substrat zu verändern. Neben dem Influx werden auch die Anreicherung im stationären Zustand sowie der Efflux gesteigert. In Tabelle 1 sind die kinetischen Parameter

Tabelle 1. Kinetische Parameter des α -Aminoisobuttersäuretransports induzierter und „nicht-induzierter“ Zellen von *Streptomyces hydrogenans* (aus [88]). Die „nicht-induzierten“ Zellen waren 13 Std. in Mineralmedium, die induzierten in Mineralmedium mit Zusatz von 2 · 10⁻¹ mol/l DL-Alanin gezüchtet.

Parameter	„nicht-induziert“	induziert
Influxkonstante (k_{in}) (ml · g ⁻¹ · min ⁻¹)	10.20	37.82
Effluxkonstante (k_{ex}) (ml · g ⁻¹ · min ⁻¹)	0.136	0.244
Influx (v_{in}) (μmol · g ⁻¹ · min ⁻¹)	25.2	81.0
Verteilungsquotient (1 min) (R_a , 1 min) [a]	28.0	90.0
Verteilungsquotient (stat. Zust.) (R_{a0})	300.0	620.0
„Michaelis-Konstante“ (mol/l)	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$2.73 \cdot 10^{-5}$

[a] Der Verteilungsquotient (R_a) ist gegeben durch das Verhältnis der intrazellulären Aminosäurekonzentration (a_c) zur extrazellulären (a_p): $R_a = a_c/a_p$. Die Aufnahmegeschwindigkeit für AIB, du/dt , läßt sich mit folgender Beziehung beschreiben: $du/dt = \Phi_{max}^{in} a_p/(a_p + K_m) - k_{ex} \cdot a_c$, in der Φ_{max}^{in} der maximale Influx ist. Im stationären Zustand („steady state“) ist $R_a = k_{in}/k_{ex}$.

eines derartigen Experiments zusammengefaßt. Da hiernach beide unidirektionale Flüsse, Influx und Efflux, zunehmen, könnte zunächst vermutet werden, daß die Influxsteigerung auf einer erhöhten Beweglichkeit des Trägers in der Membran beruht. Für diesen Fall wäre jedoch die Abhängigkeit von der Proteinsynthese unverständlich.

Die Befunde lassen sich zwangloser deuten, wenn angenommen wird, daß die induzierten Zellen über eine größere Anzahl aktiver Trägermoleküle in der Membran verfügen. Der Anstieg beider Fluxkonstanten, k_{in} und k_{ex} , bedeutet dabei, daß das induzierte Protein von beiden Seiten der Membran her für das Substrat zugänglich sein muß.

Versucht man, die Ergebnisse auf der Basis des in Abbildung 2 dargestellten Permeasemodells zu interpretieren, ergeben sich Schwierigkeiten, wenn man die „Permease“ als den einzigen induzierbaren Bestandteil des Gesamtsystems betrachtet, da sie asymmetrisch in der Membran und zum „Transporter“ angeordnet ist. Die Befunde sind aber mit dem Trägermodell in Abbildung 1 vereinbar, sofern der Träger als induzierbar angenommen wird. Dennoch ergibt sich eine Schwierigkeit bei der Beurteilung der kinetischen Daten, da k_{in} stärker als k_{ex} zunimmt. Eine plausible mechanistische Erklärung fehlt noch.

Eine entgegengesetzte Regulation des Transports neutraler Aminosäuren wurde von Inui und Akedo [89] bei *E. coli* K10 beobachtet und als Repression interpretiert. Ein Überschuß an einer einzigen Aminosäure, z.B. Leucin, in der Nährösung beeinträchtigt die Aufnahme der gleichen sowie strukturell verwandter

[89] Y. Inui u. H. Akedo, Biochim. biophysica Acta 94, 143 (1965).

Aminosäuren. In ruhenden Zellen bei Inkubation in stickstofffreier Lösung oder bei Gegenwart von Chloramphenicol entwickelt sich keine Hemmung; Mitomycin C hat dagegen keinen Einfluß. Die Hemmung ist spezifisch für den Aminosäuretransport: α -Methylglykosidtransport sowie Na^+ - und K^+ -Verteilung bleiben konstant. Kinetische Untersuchungen haben gezeigt, daß insbesondere der Influx beeinträchtigt ist: Im stationären Zustand ist die Verteilung der Aminosäure zwischen Intra- und Extrazellularraum auf 1/10 des Normalwertes herabgesetzt, wobei der Efflux nur um das Dreifache zugenommen hat. Demnach ist es unwahrscheinlich, daß während der Vorinkubation ein effluxspezifisches Transportsystem induziert worden ist.

5.2. Rückkopplungs-Regulation

Eine von der genetischen Regulation unabhängige Steuerung des aktiven Aminosäuretransports, die im Sinne einer Rückkopplungs-Steuerung auf der Ebene des Transportsystems wirkt, wurde vor wenigen Jahren erstmals beschrieben. Wie wir bei *Streptomyces hydrogenans* fanden, unterliegen alle aminosäuretransportierenden Systeme der Kontrolle durch zwei entgegengesetzt arbeitende Regelkreise, von denen einer die aktive Aminosäureaufnahme hemmt, der andere steigert [33, 90–93]. Beide Wirkungen lassen sich bei der Aufnahme ^{14}C -markierter α -Aminoisobuttersäure (AIB) durch unterschiedlich vorbehandelte Zellen zeigen: Durch einstündige Vorbeladung der Zellen mit unmarkierter AIB nimmt die Aufnahme ab, durch einstündige Vorbeladung mit L-Glutamat nimmt sie zu. Diese Vorinkubationen beeinflussen sowohl die Anfangsgeschwindigkeit der Aufnahme als auch die Verteilung der Test-Aminosäure im stationären Zustand.

5.2.1. Transporthemmung

Die Hemmung des AIB-Influxes ist eine Funktion der intrazellulären Konzentration des Inhibitors AIB. Mit zunehmender Innenkonzentration an AIB wird die Hemmung größer, bis ein Maximalwert erreicht ist; die maximale Hemmung durch Beladung mit AIB schwankt je nach Zellmaterial zwischen 40 und 70%. Es wird jedoch nur der Fluß von außen nach innen erniedrigt, wenn die AIB-Konzentration auf der Gegenseite der Membran („Transkonzentration“) erhöht wird; der Efflux markierter AIB nimmt mit steigender Transkonzentration zu. Während der letzte Befund im Sinne des Vorbeladungs [27–30] oder Gegenbeschleunigungs-Effektes [6] mit dem oben beschriebenen Trägermodell zwanglos erklärt werden kann, sind zur Erklärung der Influxhemmung zusätzliche Annahmen erforderlich (s.u.).

[90] E. Heinz, K. Ring u. W. Groß, Federat. Proc. 26, 393 (1967).

[91] K. Ring, W. Groß u. E. Heinz, Ber. Bunsenges. physik. Chem. 71, 893 (1967).

[92] K. Ring, W. Groß u. E. Heinz, Arch. Biochem. Biophysics 137, 243 (1970).

[93] W. Groß, K. Ring u. E. Heinz, Arch. Biochem. Biophysics 137, 253 (1970).

Kinetisch ist die Influxhemmung („Transhemmung“) als nicht-kompetitive Hemmung charakterisiert, da die scheinbare Michaelis-Konstante unverändert bleibt, während die Maximalgeschwindigkeit des Influxes abnimmt. Weitere kinetische Befunde zeigen, daß durch Vorbeladung nur der Influx verändert wird, der Efflux hingegen konstant bleibt. Daraus ist zu schließen, daß der Transinhibitor nicht die Beweglichkeit des Träger-Substrat-Komplexes in der Membran beeinflußt.

Ferner hat sich gezeigt, daß die Transhemmung unmittelbar und mit maximaler Wirkung einsetzt, sobald der Inhibitor ins Zellinnere gelangt. Die Hemmung ist reversibel und nach Auswaschen des Inhibitors durch erneute Vorbeladung wiederholbar. Die vorbeladene Aminosäure setzt also vom Zellinneren aus die Aktivität ihres Transportsystems herab.

Die Transporthemmung durch Beladen mit AIB ist nicht sehr spezifisch; sämtliche untersuchten Transportsysteme für Aminosäuren (Glutaminsäure, Asparaginsäure, Methionin, Phenylalanin, Leucin, Prolin, Lysin, Arginin, Tryptophan, Histidin) sind partiell gehemmt. Die Hemmung scheint jedoch auf den Transport der Aminosäuren beschränkt zu sein; weder der Transport von Kalium noch der von Sorbose werden durch Beladung mit AIB verändert.

Für die bisher geschilderten Experimente wurde stets AIB als Inhibitor verwendet, da diese Aminosäure auch nach längerer Inkubation durch *Streptomyces hydrogenans* nicht metabolisiert wird. Andere Aminosäuren, die normale Bestandteile des zellulären Aminosäurepools sind, wirken gleichfalls als Transinhibitoren. Alle bisher untersuchten neutralen Aminosäuren sowie Arginin und Lysin vermögen den aktiven Aminosäuretransport vom Zellinneren aus zu hemmen (Tabelle 2); andere Aminosäuren, wie Aspartat oder Glutamat, sind offenbar ohne Einfluß.

Tabelle 2. Transhemmung des $[^{14}\text{C}]$ -AIB-Influxes durch Aminosäuren. Messung der AIB-Aufnahme nach Vorbeladung der Zellen bei -2°C (20 min) mit den angegebenen Aminosäuren (20 mmol/l) und anschließendem Zentrifugieren und Resuspendieren in aminosäurefreiem Puffer.

Vorbeladen mit	Hemmung (%)
—	0
AIB	55.1
Cycloleucin [a]	87.3
Glycin	19.3
L-Alanin	56
L-Valin	50
L-Leucin	48.5
L-Isoleucin	46.7
L-Methionin	18
L-Lysin	17
L-Arginin	38
L-Aspartat	3

[a] 1-Aminocyclopantan-1-carbonsäure.

Die in Tabelle 2 aufgeführten Aminosäuren wurden durch Kälteschockbehandlung in die Zellen eingeführt. Die Permeabilität von *Streptomyces hydrogenans* wird bei Temperaturen um 0°C stark erhöht [94, 95], so daß kleinere Moleküle wie Amino-

[94] K. Ring, Biochem. biophysic. Res. Commun. 19, 576 (1965).

[95] K. Ring, Biochim. biophysica Acta 94, 598 (1965).

säuren die Membran rasch passieren können (s. auch [96–99]). Da die Permeabilitätsänderung reversibel ist, kann sie benutzt werden, um Moleküle rasch und unter Ausschaltung stoffwechselabhängiger Prozesse ins Zellinnere zu bringen oder um Zellinhaltstoffe zu entfernen. Dieses Verfahren ist damit im Effekt der revertierten Hämolyse von Erythrocyten vergleichbar [100, 101]. Im Zusammenhang mit der Transhemmung bot es die einzige Möglichkeit, die Transinhibitorqualität rasch metabolisierbarer Aminosäuren zu prüfen. Ein weiterer Vorteil ergab sich daraus, daß die „eingeschockten“ Aminosäuren stets auf die gleiche Konzentration gebracht werden können und somit ein quantitativer Vergleich ihrer Inhibitorqualitäten möglich wird. Voraussetzung ist allerdings, daß die Aminosäuren beim Kälteschock zwischen Intra- und Extrazellularraum vollständig äquilibriert werden. Diese Methode wurde auch dazu benutzt, das normale Nährmedium für *Str. hydrogenans*, eine Caseinhydrolysat und Hefeextrakt enthaltende Nährbouillon, in die Zellen einzuschicken, und ihre Auswirkung auf den AIB-Transport zu testen. Dabei zeigte sich eine bis zu 40-proz. Hemmung.

Die Befunde lassen sich dahingehend interpretieren, daß bestimmte Aminosäuren aus dem zellulären Pool als Effektoren den Aminosäuretransport im Sinne einer Rückkopplungs-Regulation steuern. Es ist anzunehmen, daß der Inhibitor im Bereich der Transportsysteme eine limitierende Reaktion kontrolliert, die in die energetische Kopplung zwischen Transport- und Energietstoffwechsel eingeschaltet ist [92]. Auf das Trägermodell in Abbildung 1 bezogen, wäre dies Schritt 5 des Kreisprozesses. Es muß angenommen werden, daß diese Reaktion allen Transportsystemen für Aminosäuren gemeinsam ist.

Als physiologische Schlüsselsubstanz in diesem Regelkreis könnte Alanin fungieren, welches einerseits intrazellulär in genügender Konzentration vorhanden ist, andererseits über sehr gute Inhibitorqualitäten verfügt.

Auch bei *Bac. subtilis* scheint der Aminosäuretransport ähnlich gesteuert zu sein [101a].

Mit den hier geschilderten Beobachtungen stimmen Befunde von Wiley und Matchett [102] gut überein, wonach der aktive Tryptophantransport in *N. crassa* durch die intrazelluläre Tryptophankonzentration reguliert wird. Die Transporthemmung ist indessen spezifischer als bei *Strept. hydrogenans*, da sie auf die durch das Tryptophansystem transportierten Amino-

säuren beschränkt ist. Unabhängig von uns kommen Wiley und Matchett ebenfalls zu der Hypothese, daß die Hemmung Ausdruck einer Rückkopplungs-Kontrolle durch das intrazellulär akkumulierte Transportsubstrat ist.

Ähnliche Rückkopplungs-Regulationen beschrieben Benko et al. [103, 104]. In diesen Fällen hemmt jedoch nicht das Transportsubstrat, sondern eines seiner Stoffwechselprodukte den Transport. Bei *Penicillium* und *Aspergillus spec.* wird der aktive Methionintransport durch eines seiner schwefelhaltigen Abbauprodukte gehemmt [103]. Im Zustand der Hemmung ist die scheinbare Michaelis-Konstante für Methionin um etwa zwei Zehnerpotenzen erhöht; V_{max} hingegen ist nur unwesentlich verändert. Ferner werden Anhaltpunkte dafür erbracht [104], daß eine zweite, unspezifische Aminosäuren-Permease ebenfalls einer Rückkopplungs-Regulation unterliegt; Effektor scheint NH_4^+ zu sein.

Spezifische Transporthemmungen durch Abbauprodukte anderer Metabolite betreffen die Aufnahme von Sulfat in *E. coli* [105], *Penicillium chrysogenum* [106, 107] und *Salm. typhimurium* [108], die Aufnahme von Glucose in Muskelzellen [109] und *E. coli* [110, 111] sowie von Monosacchariden in Bäckerhefe [112] und den Nucleotidtransport in *Bac. subtilis* [113].

5.2.2. Transportstimulierung

Durch einstündige Vorinkubation der *Streptomyces-hydrogenans*-Zellen mit L-Glutamat wird der AIB-Transport gesteigert („Transstimulierung“ [93]). Im Gegensatz zur Transhemmung ist die Transstimulierung nicht unmittelbar nach dem Eindringen des Effektors in die Zelle feststellbar, sondern erst nach etwa 15–20 Minuten. In der Zeit-Aufnahme-Kurve von Glutamat durch *Strept. hydrogenans* kommt dies darin zum Ausdruck, daß zu diesem Zeitpunkt die Nettoaufnahme wieder zunimmt, d.h. die Kurve steiler wird und schließlich einem neuen stationären Zustand zustrebt [114]. Wie die Transhemmung ist die Transstimulierung unspezifisch in Bezug auf die Transportsysteme für Aminosäuren, jedoch auf diese be-

[96] J. Farrell u. A. H. Rose in A. H. Rose: Thermobiology. Academic Press, New York 1967, S. 147.

[97] C. P. Novoiny u. E. Englesberg, Biochim. biophysica Acta 117, 217 (1966).

[98] J. R. Piperno u. D. L. Oxender, J. biol. Chemistry 243, 5914 (1968).

[99] W. W. Kay u. A. F. Gronlund, J. Bacteriol. 97, 282 (1969).

[100] F. B. Straub, Acta physiol. Acad. Sci. hung. 4, 235 (1953).

[101] G. Gardos u. F. B. Straub, Acta physiol. Acad. Sci. hung. 12, 1 (1956).

[101a] K. Ring u. W. Groß, noch unveröffentlicht.

[102] W. R. Wiley u. W. H. Matchett, J. Bacteriol. 95, 959 (1968).

[103] P. V. Benko, T. C. Wood u. I. H. Segel, Arch. Biochem. Biophysics 122, 783 (1967).

[104] P. V. Benko, T. C. Wood u. I. H. Segel, Arch. Biochem. Biophysics 129, 498 (1969).

[105] R. Ellis, Biochem. J. 93, 19 P (1964).

[106] L. A. Yamamoto u. I. H. Segel, Federat. Proc. 24, 353 (1965).

[107] L. A. Yamamoto u. I. H. Segel, Arch. Biochem. Biophysics 114, 523 (1966).

[108] J. Dreyfuss u. A. B. Pardee, J. Bacteriol. 91, 2275 (1966).

[109] P. J. Randle in A. Kleinzeller u. A. Kotyk: Membrane Transport and Metabolism, Symp. Prag. Academic Press, New York 1960, S. 288.

[110] P. Hoffe, E. Englesberg u. F. Lamy, Biochim. biophysica Acta 79, 337 (1964).

[111] M. J. Morgan u. H. L. Kornberg, FEBS-Letters 3, 53 (1969).

[112] F. Azam u. A. Kotyk, FEBS-Letters 2, 333 (1969).

[113] R. D. Berlin u. E. R. Stadtman, J. biol. Chemistry 241, 2679 (1966).

[114] W. Groß, K. Ring u. E. Heinz, noch unveröffentlicht.

schränkt. Potentielle Stimulatoren sind ausschließlich metabolisierbare Aminosäuren wie L-Glutamat, L-Lysin, L-Prolin und L-Aspartat.

Kinetische Untersuchungen schließen aus, daß die Transstimulierung – auch hier der Hemmung analog – die Beweglichkeit des Träger-Substrat-Komplexes in der Membran beeinflußt. Auch ein Einfluß auf die Affinität des Transportsystems zum Substrat war nicht feststellbar. Ferner konnte ein Vorbeladungs- oder Gegenstrom-Effekt als mögliche Ursache der Flußsteigerung ausgeschlossen werden.

Die Verzögerungsphase weist auf eine der Stimulierung vorausgehende metabolische Umwandlung der Aminosäure hin. Aufgrund der einheitlichen Wirkung so verschiedener Aminosäuren wie Glutamat, Leucin oder Lysin sollte man vermuten, daß der Stimulator einer ihrer gemeinsamen Metaboliten ist. Alle Versuche, ihn zu identifizieren, verliefen erfolglos. Die zur Zeit einfachste Erklärung bietet die Hypothese, daß die Stimulierung durch die Aminoacyl-t-RNA-Derivate erfolgt, also in enger Beziehung zur Proteinsynthese steht. Für diese Annahme sprechen neuere Befunde, nach denen zur Transstimulierung RNA erforderlich zu sein scheint. Längere Vorinkubation der Zellen mit Hemmstoffen der RNA-Synthese verhindert eine Transstimulierung; diese Wirkung ist nicht mit Hemmstoffen der DNA- oder Proteinsynthese festzustellen.

Beide Rückkopplungs-Systeme scheinen eine rasche Anpassung des Aminosäuretransports an den unterschiedlichen Bedarf der Zellen während des Wachstums zu gewährleisten.

Eine andere Möglichkeit der Zelle, ihren Aminosäuretransport den Bedürfnissen für eine optimale Versorgung anzupassen, wurde kürzlich bei *N. crassa* beschrieben^[115]. In jungen, rasch wachsenden Zellen herrscht ein relativ spezifisches Transportsystem vor; bei älteren Kulturen hingegen scheint zur Aufnahme vorwiegend ein zweites, sehr wenig spezifisches System zu dienen. Seine physiologische Funktion scheint darin zu bestehen, Reste an exogenen Aminosäuren dem Zellstoffwechsel zuzuführen.

6. Beziehung zwischen Aminosäuretransport und Proteinsynthese

In den letzten Jahren ist bei aminosäuretransportierenden Systemen sowohl tierischer als auch mikrobieller Herkunft eine auffallende Sensitivität gegenüber Hemmstoffen der Protein- und RNA-Synthese gefunden worden^[82, 102, 104, 116–121]. Die Hemmstoffe

[115] M. L. Pall, Biochim. biophysica Acta 173, 113 (1969).

[116] L. E. Elsas u. L. E. Rosenberg, Proc. nat. Acad. Sci. USA 57, 371 (1967).

[117] M. Grenson, M. Crabeel, J. M. Wiame u. J. Bechet, Biochem. Biophysic. Res. Commun. 30, 414 (1968).

[118] J. T. Holden u. N. M. Utech, Biochim. biophysica Acta 135, 351 (1967).

[119] W. Groß u. K. Ring, FEBS-Letters 4, 319 (1969).

[120] L. F. Adamson, S. C. Langellutig u. C. S. Anast, Biochim. biophysica Acta 115, 355 (1966).

wirken jedoch nicht sofort, sondern führen zu einem allmählichen Verlust an Transportaktivität. Das spektakulärste Beispiel hierfür bietet der Tryptophantransport bei *Neurospora crassa*; bereits 15 Minuten nach Zugabe von Cycloheximid (4-[2-(3,5-Dimethyl-2-oxocyclohexyl)-2-hydroxyäthyl]piperidin-2,6-dion) sind 50% der Transportaktivität verlorengegangen, während das tryptophanabbauende Enzym Kynureninase nicht beeinflußt wird^[102]. Offensichtlich muß zur Aufrechterhaltung der Transportfunktion die Proteinsynthese intakt sein.

Zur Erklärung der Hemmung wurden bislang zwei Hypothesen aufgestellt. Elsas und Rosenberg^[116] sowie Holden und Utech^[118] führten die Hemmbarkeit des Transportes auf eine besonders hohe Turnovergeschwindigkeit^[*] eines Transportproteins zurück. Abbau und Resynthese befinden sich in ungehemmten Zellen im Gleichgewicht. Die Zugabe eines Hemmstoffes der RNA- oder Proteinsynthese stört dieses Gleichgewicht, so daß der relativ schnelle Abbau durch Resynthese nicht mehr kompensiert werden kann. Grenson et al.^[117] sind dagegen der Auffassung, daß die Transporthemmung indirekt und eine Folge des Anstiegs des intrazellulären Aminosäurepools durch den unkompenzierten Proteinabbau ist; die Hemmung wird damit in erster Linie als Rückkopplungs-Hemmung interpretiert.

Da auch bei *Streptomyces hydrogenans* der Aminosäuretransport durch Chloramphenicol, Actinomycin und verwandte Inhibitoren gehemmt werden kann, andererseits durch Rückkopplungs-Steuerung reguliert wird, haben wir die Anwendbarkeit der zweiten Hypothese auf dieses System untersucht^[119]. Dabei kam zustatten, daß durch Kälteschockbehandlung der zelluläre Aminosäurepool sehr rasch entfernt werden kann. Durch Auswaschen der Zellen nach dieser Methode wird die Transporthemmung nur um 10–20% gesenkt, obwohl die Rückkopplungs-Hemmung durch Vorbeladung mit AIB unter diesen Bedingungen vollständig reversibel ist^[92]. Ferner konnte festgestellt werden, daß der Transport in chloramphenicolgehemmte Zellen durch Beladung mit AIB prozentual fast ebenso gehemmt werden kann wie in chloramphenicol-freie Zellen. Da die Rückkopplungs-Hemmung bei *Streptomyces hydrogenans* von der intrazellulären Konzentration des Transinhibitors abhängt und bereits bei etwa 30 mmol/l maximal ist, könnte AIB neben den durch Chloramphenicol-Einwirkung freiwerdenden beträchtlichen Mengen an Aminosäuren keine zusätzliche Hemmung verursachen. Somit ist dieser Befund mit der Hypothese von Grenson et al.^[117] nicht vereinbar. Schließlich haben kinetische Messungen gezeigt, daß Influx und Efflux von AIB unter Chloramphenicol-Einfluß einheitlich um den gleichen Faktor abnehmen – ein Befund, der nur mit der ersten Hypothese vereinbar ist. Wir nehmen daher an, daß bei *Streptomyces hydrogenans* ein am Träger-

[121] C. Yamada, A. J. Clark u. M. E. Swendseid, Science (Washington) 158, 129 (1967).

[*] Unter „Turnover“ versteht man Abbau und gleichzeitige Resynthese.

transport beteiligtes Protein einen viel höheren Turnover als die übrigen Proteine hat.

Die physiologische Bedeutung dieser Sonderstellung bedarf noch der Klärung. Möglicherweise ist auch hier ein Zusammenhang mit der Steuerung des Transportes vorhanden.

7. Isolierung von Transportproteinen

In den letzten Jahren sind zahlreiche Versuche unternommen worden, Membranbestandteile zu markieren und zu isolieren, die an der Translokation kleiner Teilchen wie Aminosäuren, Zucker oder Ionen durch die Zellmembran beteiligt sind. Wegen der bedeutenden Fortschritte und der allgemeinen Bedeutung für die Transportforschung soll auf die wichtigsten Versuche näher eingegangen werden, obwohl sie nur zum Teil Transportsysteme für Aminosäuren betreffen. Vom Sonderfall des Phosphotransferasesystems (Abschnitt 3)^[53] soll dabei abgesehen werden.

Für den aktiven Aminosäuretransport gilt bislang immer noch die Annahme, daß das Transportsubstrat unverändert über die Membran gelangt und nur das transportierende Agens Substrat einer enzymatischen Reaktion ist. Die Translokation des Substrates ist damit von der energieabhängigen Reaktion nicht unmittelbar betroffen. Diese Annahmen stehen im Einklang mit den Untersuchungen über erleichterte Diffusion und Austauschdiffusion. Sie machen indessen die Schwierigkeiten deutlich, die einer Isolierung des Translokators entgegenstehen: Voraussetzung ist nur, daß es sich um ein Protein handeln muß, welches eine Aminosäure reversibel zu binden vermag. Meßbare enzymatische Aktivitäten sind primär nicht zu erwarten.

Die erfolgreichen Isolierungsversuche sind mit wenigen Ausnahmen an Mikroorganismen durchgeführt worden. Das erste Transportprotein, einen Bestandteil des Glucose-Transportsystems, gewann Rogers^[122] aus *E. coli* A durch Extraktion mit warmem Puffer bei pH = 7.3, unter Bedingungen, bei denen der Glucosetransport in diese Zellen als instabil bekannt ist. Das Transportprotein wurde noch nicht näher charakterisiert.

Die in der Folgezeit angewendeten präparativen Verfahren gehen von zwei Voraussetzungen aus:

1. Spezifische Markierung der Transportproteine mit ¹⁴C oder ³H; Voraussetzung: Das Transportsystem muß induzierbar sein.

2. Solubilisierung der Proteine durch osmotischen Schock in der Kälte; Voraussetzung: Labile Bindung der Proteine an der Zelloberfläche.

Mit der ersten Methode isolierten und reinigten Fox und Kennedy^[123] ein „M-Protein“ (Membranprotein), welches Bestandteil des aktiven Transportsystems für β-Galaktoside bei *E. coli* ist. Dieses System ist induzierbar, wird durch das y-Gen des Lactose-Operons codiert und, zusammen mit den beiden übrigen Genen für die β-Galaktosidase und β-Galaktosid-Transacetylase, vom Regulatorgen i gesteuert. Für die Isolierung verwendeten die Autoren azid-vergiftete Zellen, die das Transportsubstrat nicht mehr akkumulieren können;

[122] D. Rogers, J. Bacteriol. 88, 279 (1964).

[123] C. F. Fox u. E. P. Kennedy, Proc. nat. Acad. Sci. USA 54, 891 (1965).

ein Teilchenfluß durch erleichterte Diffusion ist hingegen möglich.

Aus früheren Beobachtungen war bekannt, daß am β-Galaktosidtransport Thiolgruppen beteiligt sind, die durch Bindung eines Transportsubstrates, etwa Thiodigalaktosid (TDG), vor Alkylierung geschützt werden können. Unter derartigem Substratschutz wurden zunächst bei induzierten und nicht-induzierten Zellen sämtliche zugänglichen SH-Gruppen, die nicht am Galaktosidtransport beteiligt sind, durch Reaktion mit *N*-Äthylmaleimid (NEM) blockiert. In der zweiten Phase des Experiments wurde TDG entfernt und die nunmehr freiliegenden transportspezifischen SH-Gruppen mit radioaktiv markiertem NEM alkyliert, wobei die induzierten Zellen [¹⁴C]-NEM, die nicht-induzierten Kontrollen [³H]-NEM erhielten. Nach der Reaktion wurden gleiche Teile beider Ansätze gemischt und die Zellen aufgeschlossen und fraktioniert.

Unter diesen Bedingungen sind alle zugänglichen, reaktionsfähigen Proteine doppelt markiert, da induzierte und nicht-induzierte Zellen gleiche Proteine synthetisieren, mit Ausnahme derjenigen, die durch das Lactose-Operon kontrolliert werden. Diese sind in nicht-induzierten Zellen praktisch nicht, in induzierten Zellen hingegen in hoher Konzentration vorhanden. Bei Fraktionierung der Proteine und Untersuchung ihres ³H- und ¹⁴C-Anteils sollte ein induziertes Protein durch ein erhöhtes Verhältnis ¹⁴C/³H zu erkennen sein, so weit es NEM-sensitiv ist [*].

Mit dieser Technik wurde eine Proteinfraktion gefunden und isoliert, welche aus der Plasmamembran stammt und keine enzymatische Aktivität hat. Dieses M-Protein ist in der Zellmembran durch nicht-ionische Bindungen fixiert; durch Triton X-100, ein nicht-ionisches Detergens, wird es leicht herausgelöst. Abschätzungen über den Gehalt der Zellen an M-Protein ergaben, daß *E. coli* ML 308 etwa 9000 reaktionsfähige Funktionseinheiten des M-Proteins enthält, wenn man voraussetzt, daß durch ein gebundenes Molekül TDG eine SH-Gruppe des M-Proteins geschützt wird^[124]. Untersuchungen zahlreicher Mutanten haben sichergestellt^[124], daß das M-Protein das Produkt des y-Gens aus dem Lac-Operon ist und damit vom gleichen Gen codiert wird wie die bis dahin ausschließlich funktionell und genetisch charakterisierte „β-Galaktosid-Permease“.

Welche Funktion das M-Protein innerhalb des Transportsystems ausübt, kann jedoch noch nicht gesagt werden; nach dem Permeasemodell von Kepes kann es „Permease“ oder „Transporter“ sein, also erkennendes und auswählendes oder transportierendes Agens. Auszuschließen ist allein eine Beteiligung an der energetischen Kopplung zwischen Stoffwechsel und Transport, da der „aktive“ Anteil des Transportes durch Azid blockiert war.

Inzwischen konnte das M-Protein weiter bis zur elektrophoretischen Einheitlichkeit gereinigt und sein Molekulargewicht zu 31000 bestimmt werden^[125].

Trotz der großen Bedeutung, die diese Arbeiten für die Permeabilitätsforschung haben, darf nicht übersehen werden, daß durch die Markierung mit NEM die Proteinmoleküle irreversibel inaktiviert werden. Mit einer anderen Markierungstechnik, die der Isolierung des gleichen Proteins von *E. coli* dienen sollte, konnten Kolber und Stein^[126] diesen Nachteil vermeiden. Sie benutzten ebenfalls eine Doppelmarkierungstechnik: Nach Züchtung induzierter Zellen in Gegenwart von [¹⁴C]-Phenylalanin und nicht-induzierter Zellen in Gegenwart von [³H]-Phenylalanin wurden beide Ansätze miteinander gemischt, die Zellen aufgeschlossen und aus dem Aufschluß eine Membran- und eine lösliche Fraktion gewonnen. Nach chromatographischer Trennung wur-

[*] β-Galaktosidase und Transacetylase werden durch NEM nicht markiert.

[124] C. F. Fox, J. R. Carter u. E. P. Kennedy, Proc. nat. Acad. Sci. USA 57, 698 (1967).

[125] T. H. D. Jones u. E. P. Kennedy, Federat. Proc. 27, 644 (1968).

[126] A. R. Kolber u. W. D. Stein, Nature (London) 209, 691 (1966).

den die eluierten Proteine auf ihren Gehalt an ^{14}C und ^3H untersucht. Wie erwartet wurden insgesamt drei Proteine mit einem hohen $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Verhältnis isoliert, von denen zwei als β -Galaktosidase und Transacetylase identifiziert wurden. Die dritte Proteinfraktion hatte keine meßbare Enzymaktivität. Entsprechende Experimente mit Mutanten ohne Permease oder Galaktosidase zeigten, daß die dritte Fraktion als y-Genprodukt angesehen werden kann, also ein Transportprotein enthält. Obwohl dieses Protein mit dem M-Protein identisch sein sollte, wurde es jedoch nicht wie dieses in der Membranfraktion gefunden, sondern im löslichen Überstand nach Zentrifugieren. Diese erhebliche und unerwartete Diskrepanz konnte noch nicht geklärt werden.

Die gleiche Doppelmarkierungstechnik verwendeten *Haskovec* und *Kotyk*^[127], um den Träger des Galaktosetransportes aus Bäckerhefe zu isolieren. Dieses Transportsystem ist ebenfalls induzierbar; es unterscheidet sich von den bisher in diesem Abschnitt behandelten prinzipiell darin, daß es nur Ausgleichstransport (erleichterte Diffusion) zu katalysieren vermag. Damit gehört es zu den einfachsten Trägersystemen überhaupt und dürfte sich für derartige Untersuchungen besonders eignen.

Eine grundsätzlich andere Isolierungstechnik geht von einer Beobachtung von *Neu* und *Heppel*^[128] aus, wonach bestimmte gramnegative Bakterien durch osmotischen Schock in der Kälte Enzyme und Proteine an die Schockflüssigkeit abgeben, ohne dabei ihre Lebensfähigkeit einzubüßen. Diese Proteine scheinen aus der Zelloberfläche zu stammen. Es lag daher nahe, diese Untersuchungen auf Transportproteine auszudehnen. Dabei stellte sich heraus, daß bei manchen Mikroorganismen einige Transportsysteme besonders schocksensitiv sind, während andere praktisch nicht beeinflußt werden können.

Kundig et al.^[129] fanden mit dieser Methode, daß *E. coli* W 2244 durch Schock 50–85% der Transportkapazität für bestimmte Zucker einbüßte und gleichzeitig 50–80% des „Heat stable Protein“, HPr, einen Teil des phosphoenolpyruvat-abhängigen Phosphotransferasesystems, verlor. Die ursprüngliche Transportkapazität konnte jedoch wiederhergestellt werden, wenn die geschockten Zellen mit isoliertem und gereinigtem HPr inkubiert wurden.

Zur gleichen Zeit wurde im Laboratorium von *Pardee* gefunden, daß ein am aktiven Sulfattransport in *Salmonella typhimurium* beteiligtes Protein durch osmotischen Schock zu etwa 80% in Lösung gebracht werden kann^[130]. Sphaeroplasten geben dieses sulfatbindende Protein bereits ohne Schockbehandlung leicht ab – ein Hinweis auf seine schwache Bindung und seine Lokalisation an der Zelloberfläche^[131]. Das Molekulargewicht des hochgereinigten Proteins beträgt 34000; es ist frei von Lipid, Kohlenhydraten und Phosphor. Im Gegensatz zum M-Protein enthält es keine Thiolgruppen^[132]. Pro Molekül Protein wird ein Sulfation gebunden (aber kein Calcium^[133]). Seine Bindung ist sehr fest; die Dissoziationskonstante des Sulfat-Komplexes beträgt $0.1 \cdot 10^{-6}$. Die Fixierung des Sulfats hängt stark von der Ionenstärke der Lösung ab; die Bindung ist reversibel und unabhängig von ATP. Eine Umsetzung des gebundenen Sulfats in ein Derivat war nicht feststellbar. Dementsprechend weist das Protein keine Enzymaktivität auf und ist auch nicht mit dem HPr identisch. Die zahlreichen Gemeinsamkeiten zwischen dem isolierten Protein und dem in-vivo-Transportsystem lassen darauf schließen, daß es ein Bestandteil dieses Systems

[127] C. Haskovec u. A. Kotyk, *Europ. J. Biochem.* 9, 343 (1969).

[128] H. C. Neu u. L. A. Heppel, *J. biol. Chemistry* 240, 3685 (1965).

[129] W. Kundig, F. D. Kundig, B. Anderson u. S. Roseman, *J. biol. Chemistry* 241, 3243 (1966).

[130] A. B. Pardee u. L. S. Prestidge, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 55, 189 (1966).

[131] A. B. Pardee, L. S. Prestidge, M. B. Whipple u. J. Dreyfuss, *J. biol. Chemistry* 241, 3962 (1966).

[132] A. B. Pardee, *J. gen. Physiol.* 52, 279 (1968).

[133] A. B. Pardee, *J. biol. Chemistry* 241, 5886 (1966).

ist. Dazu gehören gleiche Bindungsspezifitäten für verschiedene Anionen, gleiches Auftreten nach Derepression, also gleiche genetische Regulierbarkeit; beide Systeme sind schocksensitiv, und schließlich gehen beide durch die gleiche Mutation verloren^[131]. Kürzlich wurde das Protein kristallin dargestellt^[132, 134].

Oxender et al.^[135, 136] benutzten die Schockmethode, um aus *E. coli* K 12 eine leucinbindende Membrankomponente darzustellen und zu charakterisieren, nachdem sie festgestellt hatten, daß auch der aktive Leucin- und Valintransport, der über ein gemeinsames System erfolgt, schocksensitiv ist. Der aktive Prolin- und Alanintransport erwies sich demgegenüber als schockresistent. Der leucinbindende Faktor wurde in der Schockflüssigkeit nachgewiesen, als Protein klassifiziert, chromatographisch hochgereinigt und schließlich auch kristallin dargestellt. Zur weiteren Charakterisierung diente diese Präparation.

Das Protein erwies sich in der Ultrazentrifuge, bei der Polyacrylamid-Disc-Elektrophorese und im Immun-diffusionstest nach *Ouchterlony* als homogen. Sein Molekulargewicht beträgt nach Messungen in der Ultrazentrifuge 24000, nach Gelfiltration 36000, nach Aminosäureanalyse 34000. Die durch Gleichgewichtsdialyse festgestellten Bindungseigenschaften für Aminosäuren und Derivate entsprechen denen des in-vivo-Transportsystems. Das Optimum der Bindung liegt zwischen pH = 4 und pH = 9; die Ionenstärke ist zwischen 0.004 und 0.8 mol/l praktisch ohne Einfluß. Hinweise auf die Anwesenheit von Metallen ließen sich nicht finden. Wie nach der Aminosäureanalyse erwartet werden konnte, wird N-Äthyl-maleimid (NEM) vom Protein nicht gebunden und beeinflußt auch nicht die Bindung des Leucins. Wie bei den bisher besprochenen Transportproteinen konnte auch hier keine Enzymaktivität gefunden werden. Interessant ist der Befund, daß die Bindung des Substrates an das isolierte Protein durch ein spezifisches Antiserum stark gehemmt wird, der Transport in intakte Zellen dagegen nicht. Offenbar ist das Protein nicht *unmittelbar* an der Membranoberfläche lokalisiert, so daß es in intakten Zellen vor dem Antikörper geschützt ist.

Nach Züchten der Zellen in aminosäurerreichem Milieu ist das Protein in der Schockflüssigkeit nicht nachzuweisen; unter diesen Bedingungen ist der Leucintransport reprimiert. Zwischen der Transportkapazität für Leucin nach Züchten unter verschiedenen Bedingungen und der Konzentration des leucinbindenden Proteins in der Schockflüssigkeit besteht eine direkte Korrelation. Alle diese Befunde ergeben starke Evidenzen, daß das isolierte Protein ein essentieller Bestandteil des Leucin-Transportsystems in *E. coli* ist.

Nahezu gleiche Evidenzen wurden fast zur gleichen Zeit durch *Anraku* erbracht^[137–139], der neben einem galaktosebindenden ein leucinbindendes Protein aus

[134] A. B. Pardee, *Science (Washington)* 156, 1627 (1967).

[135] J. R. Piperno u. D. L. Oxender, *J. biol. Chemistry* 241, 5732 (1966).

[136] W. R. Penrose, G. E. Nichoalds, J. R. Piperno u. D. L. Oxender, *J. biol. Chemistry* 243, 5921 (1968).

[137] Y. Anraku, *J. biol. Chemistry* 243, 3116 (1968).

[138] Y. Anraku, *J. biol. Chemistry* 243, 3123 (1968).

[139] Y. Anraku, *J. biol. Chemistry* 243, 3128 (1968).

E. coli K 12 isoliert hat. Im Gegensatz zu Penrose et al.^[136] fand Anraku nach Chromatographie über DEAE-Cellulose zwei leucinbindende Fraktionen, von denen die kleinere allerdings nicht weiter charakterisiert worden ist. Die chemischen und physikalischen Eigenschaften der leucinbindenden Proteine aus *Oxenders* und *Anrakus* Laboratorium stimmten weitgehend überein. Die beiden Proteine besitzen sehr ähnliche Affinitäten zu ihren Substraten Leucin und Isoleucin und eine hohe Bindungsspezifität. Wie Anraku zusätzlich feststellte^[138], hemmen neben Jodessigsäure und NEM auch andere Agentien wie Zn²⁺ oder EDTA die Bindung des Leucins nicht wesentlich, obwohl sie als starke Inhibitoren des aktiven Leucintransports bekannt sind. Die isolierten leucinbindenden Proteine scheinen demnach nicht zum energieübertragenden Teil des aktiven Leucintransports zu gehören. Damit kann ihnen nach den Modellvorstellungen wiederum nur Erkennungs- und/oder Translokationsfunktion zukommen.

Die wichtigste zusätzliche Information durch Anraku ist die Feststellung, daß der durch osmotischen Schock beeinträchtigte Leucintransport regeneriert werden kann, wenn den Zellen das gereinigte leucinbindende Protein sowie ein zweites, noch nicht näher charakterisiertes Protein aus der Schockflüssigkeit zugesetzt wird^[139]. Das gleiche gilt für den Galaktosetransport. Die „Erholung“ hängt vom Energiestoffwechsel ab; sie bedeutet einen echten Kapazitätsanstieg des aktiven Transportes. Die Bindungsfähigkeit der geschockten Zellen für gereinigtes Protein zeigt Sättigungsverhalten. Ein weiteres schocklabiles Transportsystem für die aktive Aufnahme von Arginin untersuchten Wilson und Holden^[140, 141] bei *E. coli* W. Arginin wird durch ein

[140] O. H. Wilson u. J. T. Holden, J. biol. Chemistry 244, 2737 (1969).

[141] O. H. Wilson u. J. T. Holden, J. biol. Chemistry 244, 2743 (1969).

spezifisches System aktiv transportiert und im Zellinneren auf mehreren Wegen sehr rasch metabolisiert. Osmotische Schockbehandlung beeinträchtigt sowohl den aktiven Arginintransport als auch den durch die Arginin-Decarboxylase eingeleiteten Abbau. Die Proteine der Schockflüssigkeit wurden chromatographisch fraktioniert; unter ihnen befanden sich vier, die Arginin in stärkerem Maße zu binden vermochten. Die Fraktionen I und III haben die höchste spezifische Affinität für Arginin, welches etwa 20-mal besser als Lysin gebunden wird. Die Dissoziationskonstanten beider Komplexe sind gleich und liegen zwischen $0.5 \cdot 10^{-6}$ und $1 \cdot 10^{-6}$. Beide Fraktionen zeigen gegenüber Arginin keine enzymatische Aktivität.

Wie in Anrakus Experimenten kann die durch Schock verminderte Transportkapazität der Zellen – zumindest zum größten Teil – wiederhergestellt werden. Die Rekonstitution ist konzentrationsabhängig; Fraktion I scheint sich mehr auf die Anfangsgeschwindigkeit der Aufnahme, Fraktion II eher auf die Verteilung im stationären Zustand auszuwirken. Die übrigen argininbindenden Fraktionen haben auf die Rekonstitution des Transportes keinen Einfluß. Im übrigen ist die Rekonstitution durch die Fraktion I und III spezifisch für Arginin, da weder der Leucin- noch der Lysintransport regeneriert wird.

Obwohl auch in diesem Fall alle Befunde dafür sprechen, daß die isolierten Proteine Teile eines Transportsystems sind, ist ihre Rolle innerhalb des Gesamtsystems noch unklar. Wie bei den übrigen regenerierbaren Systemen ist die Tatsache besonders interessant, daß eine bestimmte Membranfunktion durch relativ milde physikalische Behandlung der Zellen verlorengeht, aber sehr einfach wiederherzustellen ist, offenbar ohne daß dazu eine größere Umorganisation oder gar Neusynthese der Membran erforderlich ist.

Eingegangen am 12. August 1969 [A 755]

ZUSCHRIFTEN

3,7,11-Cyclotridecatrien-1-on und 11-Vinyl-3,7-cycloundecadien-1-on

Von Heinz Breil und Günther Wilke [*]

Butadien wird von „nacktem Nickel“ (bei 20–100 °C) zu 1,5,9-Cyclododecatrien (1) cyclotrimerisiert^[1, 2]. Bis(1,5-cyclooctadien)nickel(0) (2) bildet mit flüssigem Butadien unter Rückfluß (unterhalb 0 °C) einen kristallisiert isolierbaren Komplex C₁₂H₁₈ · Ni (3), in dem eine C₁₂H₁₈-Kette über zwei endständige π-Allylreste an das Nickelatom gebunden ist^[1, 2]. (3) reagiert mit Elektronendonoren wie Phosphinen (PR₃) im Molverhältnis 1 : 1 unter C–C-Verknüpfung zu 1,5,9-Cyclododecatrien-phosphin-nickel(0) (4) und mit überschüssigem Phosphin zu (1) und Ni(PR₃)_n mit n = 2–4^[1, 2]. Bei –40 bis –60 °C ergibt (3) mit Kohlenmonoxid unter Einschiebung 11-Vinyl-3,7-cycloundecadien-1-on^[1, 2] (7a).

Wir haben jetzt gefunden, daß (3) sich mit Isocyaniden (5) ebenfalls unter Einschiebung zu Iminen (6a) bzw. (6c) des Vinylcycloundecadienons (7a) bzw. des Cyclotridecatrienons

(7c) umsetzt; gleichzeitig entstehen Tetrakis(isocyanid)-nickel(0)-Komplexe (8).

Man läßt dazu auf den leicht zugänglichen^[3] Komplex (2) flüssiges Butadien einwirken, bis alle Kristalle verschwunden sind. Das tiefrote, flüssige Reaktionsprodukt wird bei 0 °C mit Isocyanid (Ni : (5) = 1 : 5) versetzt, ausfallendes (8) abfiltriert und das Isomerengemisch aus (6a) und (6c) isoliert. Die Ausbeuten an (6) erreichen 40 bis 70% (bezogen auf (2)).

Die Isomeren (6) lassen sich mit 30-proz. CH₃COOH / 3.5 N H₂SO₄ (1 : 1) verseifen und gehen dabei in die vier Ketone (7a–d) über, die durch Destillation weitgehend getrennt wurden. Anhand der IR-, ¹H-NMR- und Massenspektren konnten wir (7a), 11-Äthyliden-3,7-cycloundecadien-1-on (7b) und 3,7,11-Cyclotridecatrien-1-on (7c) identifizieren. (7b) entsteht offenbar bei der sauren Verseifung von (6) aus (7a). (7d) ist vermutlich ein Isomeres von (7c) mit einer *cis*-Doppelbindung. Die Isomerengeverteilung (GC-Analyse) variiert mit dem verwendeten Isocyanid: tert-C₄H₉NC bzw. C₆H₁₁NC: (7a) : (7b) : (7c) : (7d) = 2 : 1 : 90 : 7 bzw. 42 : 41 : 13 : 4 — d.h., die sperrige tert-Butylgruppe bewirkt, daß bevorzugt die endständigen C-