

Aus diesem Gemisch kann das Nona-äthylenglykol durch Molekulardestillation abgetrennt werden. Eine erneute Äthersynthese führt zu einem Gemisch, das nur Vielfache des Polymerisationsgrades neun enthält<sup>[100]</sup> und durch präparative Gelchromatographie die Isolierung bis  $m = 45$  erlaubt.

- [108] *H. W. Osterhoudt u. L. N. Ray*, *J. Polymer Sci.*, Part C 21, 5 (1968).
- [109] *R. Beau, M. Le Page u. A. J. DeVries*, *Appl. Polymer Sympos.* 8, 137 (1969).
- [110] *W. B. Smith, J. A. May u. C. W. Kim*, *J. Polymer Sci.*, Part A-2 4, 365 (1966).
- [111] *N. Nakajima*, *J. Polymer Sci.*, Part C 21, 153 (1968).
- [112] *R. Salovey u. M. Y. Hellman*, *J. Polymer Sci.*, Part A-2 5, 333 (1967).
- [113] *L. Wild u. R. Giuliana*, *J. Polymer Sci.*, Part A-2 5, 1087 (1967).
- [114] *A. Auano u. P. Mercier*, *J. Polymer Sci.*, Part C 21, 309 (1968).
- [115] *W. Ring u. W. Holtrup*, *Makromolekulare Chem.* 103, 83, (1967).
- [116] *J. V. Dawkins, R. Denyer u. J. W. Maddock*, *Polymer* 10, 154 (1969).
- [117] *C. L. Rohn*, *J. Polymer Sci.*, Part A-2 5, 547 (1967).
- [118] *L. Segal*, *J. Polymer Sci.*, Part C 21, 267 (1968).
- [119] *T. Muller u. W. J. Alexander*, *J. Polymer Sci.*, Part C 21, 283 (1968).
- [120] *G. Delmas*, *J. appl. Polymer Sci.* 12, 839 (1968).
- [121] *B. H. Miles*, *Amer. chem. Soc. Div. Org. Coatings and Plast. Chem.* 24/2, 273 (1965).
- [122] *F. Larsen*, *6. Int. Gelpermeationschromatographie (GPC)-Seminar*, Seminar Proc., S. 111, Miami Beach, Florida 1968.
- [123] *E. J. Quinn, H. W. Osterhoudt, J. S. Heckles u. D. C. Ziegler*, *Analyst. Chem.* 40, 547 (1968).
- [124] *F. Billmeyer u. J. Katz*, *Macromolecules* 2, 105 (1969).

Die gelchromatographische Trennung von Polymeren gelingt, wenn ein geeignetes Lösungsmittel für das Polymere vorhanden ist, in welchem zugleich die stationäre Phase ausreichend quillt. Bei Gelen mit permanenter Porosität sind auch in Fällungsmitteln noch Poren vorhanden; Störungen durch Adsorption werden dann häufiger beobachtet. In Tabelle 3 sind Arbeitsbedingungen für einige Polymere zusammengestellt.

*Die Deutsche Forschungsgemeinschaft hat die zitierten eigenen Untersuchungen dankenswerterweise finanziell unterstützt. Meinen Mitarbeitern, insbesondere den Herren Dr. Bömer, Dr. Coupek, Dr. Platt, Dr. Ullner, Dr. Winau und Dr. Wirth, danke ich für die gute Zusammenarbeit. Herrn Professor Dr. Kern danke ich für die Förderung der Arbeit.*

Eingegangen am 21. Oktober 1969 [A 777]

- [125] *J. R. Overton, J. Rash u. L. D. Moore*, *6. Int. GPC-Seminar*, Seminar Proc., S. 422, Miami Beach, Florida 1968.
- [126] *R. M. Scream u. R. W. Seemann*, *Appl. Polymer Sympos.* 8, 81 (1969).
- [127] *T. C. Kendrick*, *J. Polymer Sci.*, Part A-2 7, 297 (1969).
- [128] *M. T. Shaw u. F. Rodriguez*, *J. appl. Polymer Sci.* 11, 991 (1967).
- [129] *K. J. Bombaugh, W. A. Dark u. R. N. King*, *J. Polymer Sci.*, Part C 21, 131 (1968).
- [130] *L. A. Prince u. H. E. Stapelfeldt*, *6. Int. Gelpermeationschromatographie (GPC)-Seminar*, Seminar Proc., S. 78, Miami Beach, Florida 1968.
- [131] *W. Dark, R. Levangie u. K. J. Bombaugh*, *6. Int. Gelpermeationschromatographie (GPC)-Seminar*, Seminar Proc. S. 414, Miami Beach, Florida 1968.

## Regulation der Glutamin-Synthetase durch enzymatisch katalysierte Strukturmodifikation<sup>[\*\*]</sup>

Von Bennett M. Shapiro<sup>[\*]</sup>

*Der Stoffwechsel des Glutamins in Escherichia coli wird sehr sinnvoll reguliert. Wesentlich für diesen Vorgang ist eine Modifikation der Glutamin-Synthetase durch kovalente Verknüpfung mit einem Adenylylrest und dessen Abspaltung. Adenylylierung und Desadenylylierung der Glutamin-Synthetase werden durch verschiedene Enzyme katalysiert, die einer reziproken Kontrolle durch die Stickstoffversorgung der Zelle unterliegen. Durch die Strukturänderungen der Glutamin-Synthetase werden die katalytischen Eigenschaften des Enzyms in hohem Maße den wechselnden Bedürfnissen der Zelle angepaßt, so daß im Stickstoff-Stoffwechsel die Homöostase aufrechterhalten bleibt.*

### 1. Einleitung

Glutamin dient in Mikroorganismen als Stickstoffquelle für die Synthese zahlreicher Stoffwechselprodukte und nimmt damit eine Schlüsselstellung im Zell-

stoffwechsel ein. Die Amidgruppe des Glutamins ist die bevorzugte Stickstoffquelle bei der Biosynthese von Tryptophan (Trp), Histidin (His), Cytidin-5'-triphosphat (CTP), Adenosin-5'-monophosphat (AMP), Glucosamin-6-phosphat (GA-6-P) und Carbamylphosphat (CP) (Abb. 1). Die  $\alpha$ -Aminogruppe des Glutamins kann für die Synthese anderer Aminosäuren durch

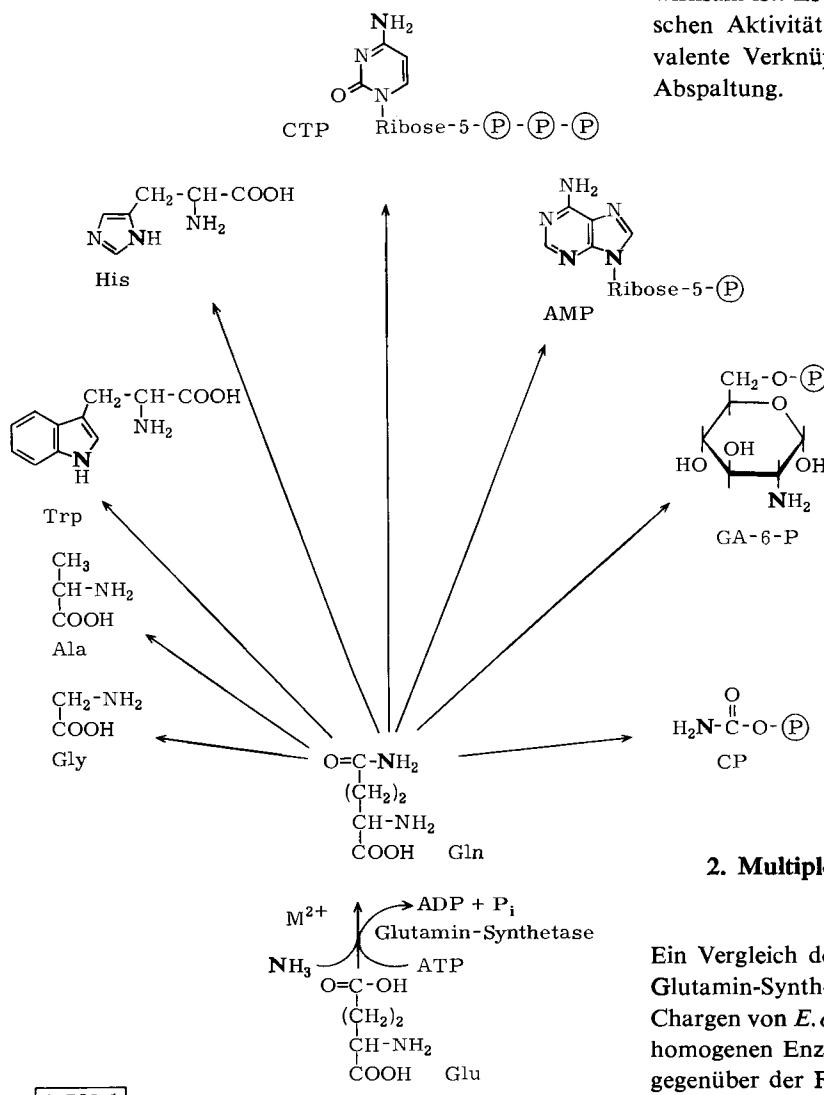
[\*] Dr. B. M. Shapiro  
Laboratory of Biochemistry, National Heart Institute,  
National Institutes of Health,  
Bethesda, Maryland 20014 (USA)

[\*\*] Nach einem Vortrag auf der Wintertagung der Gesellschaft für Biologische Chemie, Freiburg, 7.-9. Januar 1969.

glutaminspezifische Transaminierungsreaktionen verwendet werden (Übersicht siehe [1]).

Die Bildung von Glutamin (Gln) aus Glutaminsäure (Glu), Ammoniak und ATP wird durch die Glutamin-Synthetase katalysiert (Abb. 1). Dieses Enzym steht am Beginn eines sehr stark verzweigten Stoffwechselweges und ist damit besonders als Angriffspunkt zellulärer Regulationsvorgänge geeignet. Untersuchungen an der Glutamin-Synthetase aus *Escherichia coli* haben ergeben, daß dieses bakterielle Enzym auf mindestens vier Wegen reguliert wird. Dies sind erstens Repression und Derepression der Synthese des Enzyms in Abhängigkeit von Art und Menge der Stickstoffquelle, die dem Organismus für sein Wachstum zur Verfügung steht. Zweitens unterliegt die Aktivität der Glutamin-Synthetase einer kumulativen Feedback-Hemmung durch die zahlreichen Endprodukte des Glutaminstoffwechsels (vgl. Abb. 1). Drittens wird die Aktivität der Glutamin-Synthetase durch Konzentrationsänderungen von Adenosin-5'-triphosphat (ATP), anderen Nucleosid-5'-di- und -triphosphaten sowie divalenten Kationen beeinflußt. Diese drei ersten Möglichkeiten der Regulation sind in einer früheren Übersicht [1] diskutiert worden und werden deshalb hier nicht behandelt.

In diesem Aufsatz wird über eine neue Art der Regulation berichtet, die bei der Biosynthese des Glutamins wirksam ist: Es ist dies die Veränderung der katalytischen Aktivität der Glutamin-Synthetase durch kovalente Verknüpfung mit Adenylylresten und deren Abspaltung.



A 783.1

Abb. 1. Biosynthese und Stoffwechselprodukte des Glutamins (Gln).  $\text{P}_i$  = „anorganisches“ Phosphat.  $M^{2+}$  = zweiwertiges Metallion.

lärer Regulationsvorgänge geeignet. Untersuchungen an der Glutamin-Synthetase aus *Escherichia coli* haben ergeben, daß dieses bakterielle Enzym auf mindestens vier Wegen reguliert wird. Dies sind erstens Repression und Derepression der Synthese des Enzyms in Abhängigkeit von Art und Menge der Stickstoffquelle, die dem Organismus für sein Wachstum zur Verfügung steht. Zweitens unterliegt die Aktivität der Glutamin-Synthetase einer kumulativen Feedback-Hemmung durch die zahlreichen Endprodukte des Glutaminstoffwechsels (vgl. Abb. 1). Drittens wird die Aktivität der Glutamin-Synthetase durch Konzentrationsänderungen von Adenosin-5'-triphosphat (ATP), anderen Nucleosid-5'-di- und -triphosphaten sowie divalenten Kationen beeinflußt. Diese drei ersten Möglichkeiten der Regulation sind in einer früheren Übersicht [1] diskutiert worden und werden deshalb hier nicht behandelt.

## 2. Multiple Formen der Glutamin-Synthetase

Ein Vergleich der Eigenschaften von hochgereinigten Glutamin-Synthetase-Präparationen aus verschiedenen Chargen von *E. coli* ergab, daß sich diese offensichtlich homogenen Enzympräparate in ihrer Empfindlichkeit gegenüber der Feedback-Hemmung durch die in Abbildung 1 aufgeführten Substanzen beträchtlich unterscheiden (Abb. 2). Die Unterschiede im Verhalten der beiden Präparationen können weder durch Strukturänderungen während der Präparation noch durch Unterschiede in der Lagerung oder in der sonstigen Behandlung des Enzyms erklärt werden. Auch waren alle Versuche erfolglos, das Enzym von einer Form in die andere umzuwandeln, und zwar durch Behandlungen, die zu einer Änderung der Tertiär- oder Quartärstruktur führen.

Die beiden Präparationen waren aus Zellen isoliert worden, die man unter verschiedenen Kulturbedingungen gezüchtet hatte. Diese Tatsache veranlaßte eine Untersuchung der Zusammenhänge zwischen den Wachstumsbedingungen der Zellen und den Eigenschaften der aus ihnen isolierten und gereinigten Glutamin-Synthetase. Diese Experimente führten zur Aufdeckung von zwei molekularen Formen der Glutamin-Synthetase aus *E. coli*, deren Bildung von der Stickstoffquelle abhängt.

[1] E. R. Stadtman, B. M. Shapiro, H. S. Kingdon, C. A. Woolfolk u. J. S. Hubbard, *Advan. Enzyme Regulation* 6, 257 (1968).

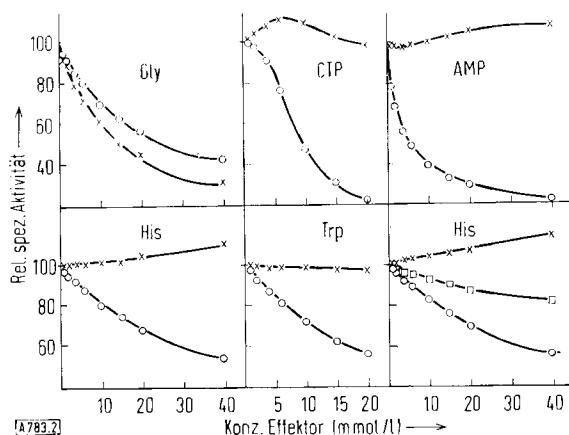


Abb. 2. Einfluß von Produkten des Glutaminstoffwechsels auf die Aktivität zweier gereinigter Präparationen der Glutamin-Synthetase. Präparation I ( $\times - \times$ ) stammt aus Zellen, die auf begrenzenden Mengen an  $\text{NH}_4^+$  gewachsen waren; Präparation II ( $\circ - \circ$ ) stammt aus Zellen, die auf relativ hohen Mengen an Glutamat gewachsen waren. Die Enzymaktivität wurde durch die  $\gamma$ -Glutamyl-Transferreaktion, die von der Glutamin-Synthetase katalysiert wird, bestimmt (Einzelheiten siehe [3]).

stoffversorgung des Organismus während des Wachstums abhängt [2, 3]. Während der logarithmischen Wachstumsphase von *E. coli* haben Konzentration und Art der zur Verfügung stehenden Stickstoffquelle nur einen geringen Einfluß auf die Eigenschaften der erhaltenen Glutamin-Synthetase (Tabelle 1). Haben die Zel-

Tabelle 1. Einfluß von Effektoren auf die  $\gamma$ -Glutamyl-Transferase-Aktivität der Glutamin-Synthetase in Abhängigkeit von der Stickstoffquelle ( $\text{NH}_4^+$  limitierend oder Glutamat) und dem Alter der Kultur (nach [3]).

Effektor (mmol/l)	Rel. Aktivität [a]			
	Zellen der log. Phase		Zellen der stat. Phase	
	$\text{NH}_4^+$ lim.	Glu	$\text{NH}_4^+$ lim.	Glu
ohne	100	100	100	100
AMP, 40	131	131	115	20
L-Trp, 20	101	102	92	50
L-His, 40	115	113	107	53
CTP, 8	83	105	97	51
Gly, 40	36	32	34	47

[a] Relative spezifische Aktivitäten bei der durch Glutamin-Synthetase katalysierten  $\gamma$ -Glutamyl-Transferreaktion. *E. coli* W wurde in einem Medium gezüchtet, das 11 mmol/l Glucose und entweder 6 mmol/l  $\text{NH}_4\text{Cl}$  oder 19 mmol/l Glutamat enthielt. Die Zellen wurden 24 Std. nach Zugabe des Inoculums (Zellen der stationären Phase) oder in der späten logarithmischen Phase (mit  $\text{NH}_4^+$ : 5.5 Std. nach Zugabe des Inoculums; mit Glutamat: 11 Std. nach Zugabe des Inoculums) geerntet.

len aber die stationäre Wachstumsphase erreicht, ergeben sich wesentliche Unterschiede in den Enzymaktivitäten, je nachdem, ob  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in begrenzender Konzentration oder Glutamat als Stickstoffquelle diente [3].

Das Enzym aus Zellen, die auf Glutamat gezüchtet werden, ist sehr empfindlich gegen eine Hemmung durch AMP, CTP, L-Tryptophan und L-Histidin. Dagegen läßt sich das Enzym aus Zellen, die auf  $\text{NH}_4\text{Cl}$  gezüchtet werden, durch diese Substanzen nicht hemmen, wird aber stärker als das andere Enzym durch Glycin und Alanin gehemmt. Weder die Art der Koh-

[2] B. M. Shapiro, H. S. Kingdon u. E. R. Stadtman, Proc. Natl. Acad. Sci. US 58, 642 (1967).

[3] H. S. Kingdon u. E. R. Stadtman, Biochem. Biophys. Res. Commun. 27, 470 (1967); J. Bacteriol. 94, 949 (1967).

lenstoffquelle (Glycerin oder Glucose) noch die Stärke der Belüftung der Kulturen haben einen Einfluß auf die Eigenschaften der Glutamin-Synthetase.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Wachstumsbedingungen die Eigenschaften der Glutamin-Synthetase, die in den Zellen gefunden wird, wesentlich bestimmen. Eine unmittelbare Abhängigkeit der beobachteten Effekte von den Ernährungsbedingungen läßt sich jedoch noch nicht feststellen. Es ist auch denkbar, daß der Eintritt in die stationäre Wachstumsphase je nach den Wachstumsbedingungen auf unterschiedliche Stoffwechselvorgänge zurückzuführen ist. Im Medium mit  $\text{NH}_4^+$  als Stickstoffquelle beruht das Aufhören des Wachstums sicher auf einer Erschöpfung der verfügbaren Stickstoffquelle. Im glutamat-haltigen Medium kann der Eintritt der stationären Phase jedoch entweder durch eine Erschöpfung der Energiequellen oder durch unbekannte Faktoren ausgelöst werden. Es ist kürzlich gezeigt worden [5], daß nach Erreichen der stationären Phase bei Wachstum auf  $\text{NH}_4^+$ -haltigem Medium keine Ammoniumionen mehr im Medium vorhanden sind. Beim Wachstum auf dem glutamat-haltigen Medium sind dagegen nach Erreichen der stationären Wachstumsphase noch recht hohe Konzentrationen an Ammoniumionen nachweisbar. Nach diesen Beobachtungen scheint die Verfügbarkeit von Stickstoffquellen der entscheidende Faktor zu sein, durch den die Art der in *E. coli* gebildeten Glutamin-Synthetase bestimmt wird.

Im folgenden wird versucht, die strukturellen Grundlagen der unterschiedlichen katalytischen Eigenschaften der Enzympräparationen aus verschiedenen gezüchteten Zellen durch Vergleich dieser Präparationen zu analysieren.

Enzympräparation I stammt aus Zellen, die auf einem Medium mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  als limitierender Stickstoffquelle, Enzympräparation II aus Zellen, die auf Glutamat als Stickstoffquelle gezüchtet wurden. Die beobachteten Unterschiede zwischen den beiden Enzympräparationen bleiben während der Enzymreinigung erhalten. Präparation I katalysiert die Bildung von Glutamin

Tabelle 2. Einige Eigenschaften der Präparationen I und II (nach [7]).

Enzym-präparation	Spez. Aktivität [a] mit		Einfluß von AMP auf die Transferase-Aktivität [b]
	$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Mn}^{2+}$	
I	60.1	2.0	10 % Aktivierung
II	12.8	8.1	74 % Hemmung

[a] Spezifische Aktivität im biosynthetischen Test =  $\mu\text{mol P}_i \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ; dies entspricht der Anzahl  $\mu\text{mol}$  an synthetisiertem Glutamin (Abb. 1).  $\text{P}_i$  = „anorganisches“ Phosphat.

[b] AMP = 40 mmol/l.

besonders stark mit  $\text{Mg}^{2+}$  als Aktivator, während Präparation II mit  $\text{Mn}^{2+}$  besonders aktiv ist. Darüber hinaus ist die biosynthetische Aktivität der Präparation I ( $+\text{Mg}^{2+}$ ) wesentlich größer als die der Präparation II ( $+\text{Mn}^{2+}$ ). Schließlich ist, wie in Tabelle 2 und in Abbildung 2 gezeigt, Präparation II wesentlich empfindlicher gegen eine Feedback-Hemmung durch die Produkte des Glutaminstoffwechsels als Präparation I.

### 3. Strukturelle Grundlagen für die Unterschiede der Enzyme

Die Präparationen I und II werden nach der gleichen Methode aus Zellen von *E. coli* gereinigt [2]. Beide Enzyme haben das gleiche Molekulargewicht [4] und verhalten sich in der analytischen Ultrazentrifuge oder bei der Disc-Gel-Elektrophorese wie eine einzige Spezies [2, 4, 5]. Ebenso finden sich keine wesentlichen Unterschiede in ihrer Aminosäurezusammensetzung [2].

Beide Präparationen zeigen bei elektronenmikroskopischer Untersuchung (Abb. 3) die gleiche charakteristische Struktur aus zwei Sechsecken [6]. Ein wesentlicher

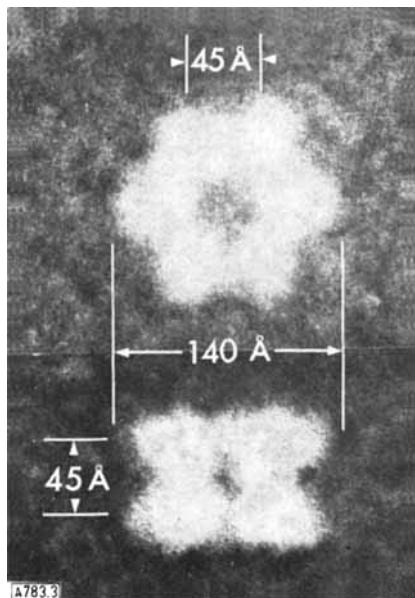


Abb. 3. Elektronenmikroskopische Aufnahme der Glutamin-Synthetase aus *E. coli* (aufgenommen von R. C. Valentine). Oben: Aufsicht, unten: Seitenansicht des Enzymmoleküls. Die zwölf Untereinheiten sind in zwei übereinanderliegenden Sechsecken angeordnet. Aus dieser Aufnahme konnten wir das Molekulargewicht der Untereinheiten (48500) berechnen, was gut mit Daten aus hydrodynamischen Messungen übereinstimmt (nach [6]).

Unterschied zeigt sich jedoch beim Vergleich der UV-Spektren (Abb. 4). Präparation II absorbiert unterhalb 280 nm stärker als Präparation I. Das Differenzspektrum ist charakteristisch für Nucleotidderivate. Die Isolierung und Charakterisierung des in Präparation II gebundenen Nucleotids hat ergeben, daß es sich um AMP handelt.

Wie Tabelle 3 zeigt, finden sich in Präparation I 1.2 Äquivalente an gebundenem AMP, in Präparation II etwa 9.0 Äquivalente [2]. Das AMP ist kovalent gebunden. Es kann nicht durch Behandlung mit Aktivkohle, durch Fällungen mit Ammoniumsulfat oder durch Hydrolyse mit verdünnten Säuren oder Laugen entfernt werden [2]. Leicht abspaltbar ist es dagegen mit Phosphodiesterase aus Schlangengift, was auf eine

Phosphodiesterbindung hinweist. Das Spaltprodukt wurde durch enzymatische Analyse als AMP identifiziert [2].

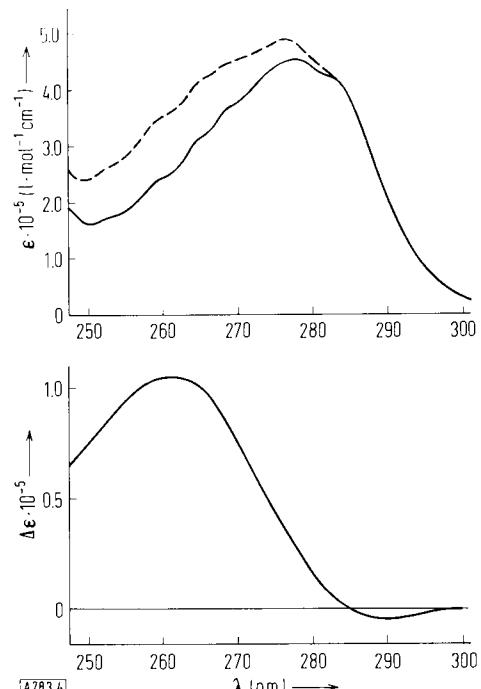


Abb. 4. Oben: UV-Spektren der Präparationen I (—) und II (---). Unten: Differenzspektrum der beiden Formen (nach [2]).

Tabelle 3. Chemische Eigenschaften zweier Präparationen der Glutamin-Synthetase mit unterschiedlichem Grad der Adenylylierung (nach [2]).

	Präp. I	Präp. II
	(mol/mol Enzym)	
Gesamtmenge an organischem Phosphat	1.2	9.0
Gesamtmenge an Pentosen	1.0	6.0
Gesamtmenge an Adenin-nucleotid [a]	1.2	8.6
Menge an Adenin-nucleotid, freigesetzt durch Phosphodiesterase [b]	0.6	9.0

[a] Berechnet aus der Absorption bei 260 nm und bei 280 nm [7].

[b] Berechnet aus der Absorption des Überstandes bei 260 nm, der nach Ausfällen des Proteins mit Perchlorsäure erhalten wird [2]. Das Produkt wurde ferner durch spezifische enzymatische Reaktionen mit Adenosin-5'-monophosphat-Desaminase und Adenosin-Desaminase charakterisiert.

#### 4. Adenylylierung der Glutamin-Synthetase in vitro

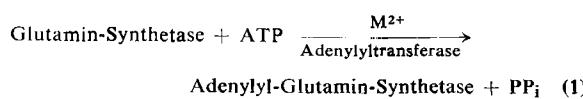
Das Vorkommen von Glutamin-Synthetasen, die sich in ihren katalytischen Eigenschaften in Abhängigkeit von der Zahl der gebundenen Adenylyreste unterscheiden, könnte in vivo eine sehr wirksame Möglichkeit zur Regulation der Biosynthese von Glutamin sein. Daß tatsächlich eine derartige Regulation existiert, ergibt sich aus der Beobachtung, daß die Zellen während des logarithmischen Wachstums mit Glutamin als Stickstoffquelle eine weitgehend nichtadenylierte Form der Glutamin-Synthetase (Präparation I) enthalten, während das Enzym in Zellen nach Erreichen der stationären Wachstumsphase adenyliert wird (Präparation II). Diese Beobachtungen lassen vermuten, daß in *E. coli* ein Enzym vorhanden ist, das die Adenylylierung der Glutamin-Synthetase kataly-

[4] B. M. Shapiro u. A. Ginsburg, *Biochemistry* 7, 2153 (1968).

[5] K. Liess, F. Varricchio, D. Mecke u. H. Holzer, *Europ. J. Biochem.* 4, 193 (1968).

[6] R. C. Valentine, B. M. Shapiro u. E. R. Stadtman, *Biochemistry* 7, 2143 (1968).

siert. Ein solches Enzym ist in Extrakten von *E. coli* gefunden worden. Es katalysiert die Übertragung des Adenylylrestes von ATP auf die Glutamin-Synthetase [Gl. (1)]:



Die Reaktion wird durch Glutamin stimuliert und durch Glutamat sowie  $\alpha$ -Ketoglutarat gehemmt [7]. Dieses Enzym kann in zwei Testsystemen gemessen werden: einmal durch Bestimmung der Inkorporation von Radioaktivität aus  $^{14}\text{C}$ -markiertem ATP in die Glutamin-Synthetase, wodurch die Anzahl Äquivalente an eingebautem AMP bestimmt wird, zum anderen durch Vergleich der UV-Absorption des Enzyms bei 260 nm und bei 290 nm [7, 8]. Beide Methoden führen zum gleichen Resultat: Glutamin-Synthetase kann mit maximal zwölf Äquivalenten AMP adenyliert werden. Dabei wird zugrundegelegt, daß das Enzym ein Molekulargewicht von 600000 hat. Es ist aus zwölf Untereinheiten (Molekulargewicht je 50000) aufgebaut [8], von denen jede einen Adenylylrest aufnehmen kann [9]. Das Enzym, das die kovalente Bindung von AMP an die Glutamin-Synthetase katalysiert, wird als ATP:Glutamin-Synthetase-Adenylyltransferase bezeichnet [7].

Es fragt sich nun, ob die Anzahl der Adenylylgruppen, die in der Glutamin-Synthetase vorhanden sind, den einzigen Strukturunterschied bildet, der für die unterschiedlichen katalytischen Eigenschaften der Präparationen I und II verantwortlich ist. Wenn dies der Fall ist, dann sollte die Adenylylierung von Präparation I zu Präparation II folgende Änderungen der katalytischen Eigenschaften bewirken: 1. eine Abnahme der biosynthetischen Aktivität mit  $\text{Mg}^{2+}$  als aktivierendem Kation; 2. eine Zunahme der biosynthetischen Aktivität mit  $\text{Mn}^{2+}$  als aktivierendem Kation, und 3. eine Zunahme der Empfindlichkeit des Enzyms gegenüber der Feedback-Hemmung durch jedes Stoffwechselprodukt des Glutamins.

Abbildung 5 zeigt, daß diese Veränderungen tatsächlich als Ergebnis einer zunehmenden Adenylylierung der Glutamin-Synthetase beobachtet werden. Sowohl die erwarteten Änderungen in der Spezifität der Aktivierung durch zweiwertige Kationen als auch die gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber der Hemmung durch AMP, die sich in einer Abnahme der Enzymaktivität in Gegenwart von hohen Konzentrationen an AMP äußert, werden beobachtet. Ebenso hat sich zeigen lassen [7], daß durch Entfernung der Adenylylreste mit Phosphodiesterase aus Schlangengift eine Umwandlung der Glutamin-Synthetase mit den Eigenschaften von Präparation II in ein Enzym mit den Ei-

[7] H. S. Kingdon, B. M. Shapiro u. E. R. Stadtman, Proc. Natl. Acad. Sci. US 58, 1703 (1967).

[8] E. R. Stadtman, B. M. Shapiro, A. Ginsburg, H. S. Kingdon u. M. D. Denton, Brookhaven Symp. in Biol. 21, 378 (1968).

[\*] Sehr wahrscheinlich handelt es sich um identische Untereinheiten [9].

[9] C. A. Woolfolk, B. M. Shapiro u. E. R. Stadtman, Arch. Biochem. Biophys. 118, 736 (1966).

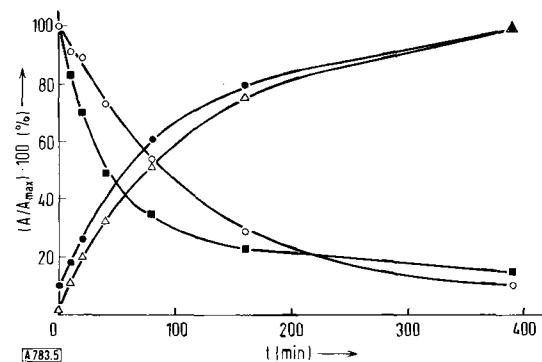


Abb. 5. Änderungen einiger katalytischer Eigenschaften der Glutamin-Synthetase während der Adenylylierung. Die Werte sind in Prozent der maximalen Änderung ausgedrückt, die in Abhängigkeit von der Dauer der Adenylylierungsreaktion beobachtet wird. △-△ kovalente Bindung von Adenylylresten; O-O  $\text{Mg}^{2+}$ -spezifische biosynthetische Aktivität; ●-●  $\text{Mn}^{2+}$ -spezifische biosynthetische Aktivität; ■-■ spezifische Aktivität in Gegenwart von 40 mmol/l AMP (weist auf Änderungen der Hemmbarkeit des Enzyms durch AMP hin) (nach [7]).

genschaften von Präparation I möglich ist. Aus diesen Experimenten geht hervor, daß für die unterschiedlichen katalytischen Eigenschaften der Präparationen I und II der Glutamin-Synthetase die unterschiedlichen Mengen an kovalent gebundenem AMP verantwortlich sind.

Holzer, Mecke und Mitarbeiter haben kürzlich über das Vorkommen eines Enzyms in zellfreien Extrakten von *E. coli* berichtet, das eine ATP-abhängige, durch Glutamin stimulierte Inaktivierung der Glutamin-Synthetase katalysiert [10]. Sie verfolgten die Inaktivierung der Glutamin-Synthetase durch Messung der Abnahme der biosynthetischen Aktivität des Enzyms in Gegenwart von  $\text{Mg}^{2+}$ . Diese Aktivitätsänderung ist aber nur einer der Vorgänge, die mit der Adenylylierungsreaktion einhergehen. Dies führte uns zur Annahme, daß die Inaktivierung und die Adenylylierungsreaktion der gleichen Vorgang sind [7]. Wulff et al. wiesen dies fast gleichzeitig nach [11]. Das von ihnen untersuchte Enzym bindet während der Inaktivierung einen Adenylylrest aus dem ATP an die Glutamin-Synthetase. Sie bezeichneten das Enzym als „Glutamin-Synthetase-inaktivierendes Enzym“. Wir ziehen den Namen „ATP:Glutamin-Synthetase-Adenylyltransferase“ vor, da der Verlust der  $\text{Mg}^{2+}$ -abhängigen katalytischen Aktivität der Glutamin-Synthetase nur eine von mehreren Veränderungen ist, die durch kovalente Bindung der Adenylylreste an das Enzym ausgelöst werden.

## 5. Eigenschaften der ATP:Glutamin-Synthetase-Adenylyltransferase

Die Adenylyltransferase ist durch Ammoniumsulfatfällungen sowie durch Chromatographie an DEAE-Celulose und an Hydroxylapatit etwa 200-fach gereinigt worden. Das in dieser Weise angereicherte Enzym ist

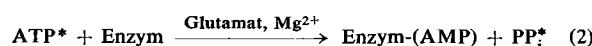
[10] D. Mecke, K. Wulff, K. Liess u. H. Holzer, Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 452 (1966).

[11] K. Wulff, D. Mecke u. H. Holzer, Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 740 (1967).

nicht vollständig rein, wie die Agar-Gel-Elektrophorese zeigt [12]. Es wird durch Thiole, Glutamat, Glutamin und Phosphat stabilisiert [13]. In einem Saccharose-Dichtegradienten wurde das Molekulargewicht zu 120000 bestimmt [12].

ATP ist das einzige Nucleotid, das in der Modifizierungsreaktion [Gl. (1)] als Nucleotyldonor wirken kann [7, 14]. Andere Nucleotide wirken hemmend: CTP ist kompetitiver Hemmstoff [14], UTP ein nichtkompetitiver Hemmstoff zum ATP [13]. Die Adenylylierungsreaktion benötigt zweiwertige Kationen. Am wirksamsten ist  $Mg^{2+}$ ;  $Mn^{2+}$  hat nur etwa 30 % der Aktivität von  $Mg^{2+}$  [14].

Die Adenylyltransferase katalysiert die in Gl. (2) angegebene Austauschreaktion:



In Gegenwart von Glutamat und  $Mg^{2+}$  wird  $^{32}P$  zwischen anorganischem Pyrophosphat und ATP ausgetauscht [15]. Es läßt sich auch zeigen, daß die Adenylyltransferase (bei 25 °C in Gegenwart von  $Mg^{2+}$ ) einen Komplex mit ATP bildet. Dieser Komplex kann frei von freiem ATP durch rasche Gelfiltration bei 4 °C isoliert werden [13]. Durch Vergleich der Komplexe, die entweder mit  $^{14}C$ -ATP oder  $\gamma^{32}P$ -ATP gebildet werden, ergibt sich, daß 50–70 % des Nucleotids im Komplex noch als intaktes ATP vorliegen [13]. Der Pyrophosphatrest aus dem ATP wird bei der anschließenden Inkubation mit nichtadenyliertem Glutamin-Synthetase oder mit L-Glutamat freigesetzt. Bei der Freisetzung von Pyrophosphat durch Inkubation mit Glutamin-Synthetase wird diese adenyliert [13]. Die Art der Bindung zwischen Adenylyltransferase und Nucleotid ist noch unbekannt.

Die Adenylyltransferase zeigt eine Spezifität für ihre beiden Substrate, sowohl für das als Substrat dienende Enzym, die Glutamin-Synthetase, als auch für das Nucleotid ATP. Die Glutamin-Synthetase von *Bacillus subtilis*, die in ihrer Struktur dem Enzym von *E. coli* sehr ähnlich ist, ist kein Substrat für die Adenylyltransferase aus *E. coli*, auch hat die Glutamin-Synthetase aus *B. subtilis* keinen hemmenden Effekt auf die Adenylylierung der Glutamin-Synthetase aus *E. coli* [16].

## 6. Die Natur der Adenylyl-Glutamin-Synthetase-Bindung

Die Adenylyl-Glutamin-Synthetase-Bindung ist sehr stabil. Sie widersteht einer mehrstündigen Behandlung mit 0.3 M HCl oder 0.3 M NaOH bei 37 °C [2]. Diese

[12] E. Ebner, Dissertation, Universität Freiburg 1970; H. Holzer, *Advan. Enzymol.* 32, 297 (1969).

[13] S. B. Hennig, A. Ginsburg u. M. D. Denton, unveröffentlicht.

[14] C. Gancedo, E. Ebner, F. Schutt u. D. Mecke, Meeting European Biochemical Societies, Prag 1968; FEBS-Abstr., 5. Meeting, 199 (1968).

[15] M. D. Denton u. A. Ginsburg, *Fed. Proc.* 27, 783 (1968).

[16] T. Deuel, S. B. Hennig u. A. Ginsburg, unveröffentlicht.

Stabilität gegen Säure oder Alkali fehlt den gut bekannten Bindungen mit Serin oder Threonin, die in Glyko- oder Phosphoproteinen vorkommen. Um zu ermitteln, welcher Aminosäurerest an der stabilen Bindung zwischen Protein und Nucleotid beteiligt ist, wurde  $^{14}C$ -markierte Adenylyl-Glutamin-Synthetase proteolytisch gespalten. Nach sehr intensiver Proteolyse mit Pepsin und Pronase ließ sich aus dem Peptidgemisch mit hoher Ausbeute ein Decapeptid isolieren, das den Adenylylrest trägt [17]. Besonders interessant ist das Fehlen von Serin, Threonin sowie basischen Aminosäuren in diesem Peptid. Von den anwesenden Aminosäuren kommt nur Tyrosin für die Bildung einer stabilen Phosphodiesterbindung in Frage. Die Peptid-Adenylyl-Bindung widersteht einer fünfstündigen Hydrolyse durch 1 N  $NH_4OH$  bei 105 °C. Nach dieser Behandlung lassen sich noch 50 % des Peptids unverändert wiedergewinnen [17]. Die saure Hydrolyse wird dadurch kompliziert, daß die N-glykosidische Bindung zwischen Ribose und Adenin vor der Hydrolyse der Peptid-Phosphoribose-Bindung gespalten wird. Von Tyrosinphosphatresten ist bekannt, daß sie sehr resistent gegen Säuren und Basen sind [18]. Vom O-Phosphotyrosin werden durch Erhitzen bei 37 °C mit 1 N HCl oder 1 N NaOH in 48 Stunden nur sehr geringe Mengen Orthophosphat abgespalten.

Tyrosin zeigt in freier Form und im Peptidverband in alkalischer Lösung ein charakteristisches UV-Absorptionsspektrum, das durch die Ionisation der phenolischen Gruppe bedingt wird. Diese charakteristische Absorption fehlt, wenn die phenolische Gruppe blockiert ist. Um zu prüfen, ob der Adenylylrest im vorliegenden Fall tatsächlich durch eine Phosphodiesterbindung über einen Tyrosinrest mit dem Peptid verknüpft ist, wurden die UV-Absorptionsspektren des Peptids in alkalischer Lösung vor und nach Entfernung des Adenylylrestes durch Phosphodiesterase aus Schlangengift verglichen. Abbildung 6 zeigt das Differenzspektrum zwischen dem adenylierten und dem desadenylierten Peptid bei pH = 13. Das Maximum bei 293 nm ist charakteristisch für eine ionisierte phenolische Hydroxygruppe. Eine quantitative Auswertung ergibt, daß diese Gruppen in stöchiometrischer Menge zu den durch die Phosphodiesterase freigesetzten Adenylylresten entstehen [17]. Aus der hohen Stabilität sowie aus dem spektroskopischen Verhalten des adenosin-5'-monophosphat-bindenden Peptides wird geschlossen, daß es sich bei dieser neuen Art einer kovalenten Protein-Effektor-Bindung um eine Phosphodiesterbindung an einem Tyrosinrest handelt.

Das Decapeptid hat einen relativ hohen Prolinegehalt (2–3 Prolinreste pro Decapeptid). Dies ist wahrscheinlich die Ursache dafür, daß der weitere Abbau des Decapeptids mit anderen proteolytisch wirkenden Enzymen Schwierigkeiten bereitet [17]. Auch kann man annehmen, daß der hohe Prolinegehalt eine Region des Glutamin-Synthetase-Moleküls mit wenig Sekundärstruktur bedingt. Eine solche Region erscheint beson-

[17] B. M. Shapiro u. E. R. Stadtman, *J. Biol. Chem.* 243, 3769 (1968).

[18] R. H. A. Plimmer, *Biochem. J.* 35, 461 (1961).

ders geeignet als Position für den reaktiven Tyrosinrest, der Adenylyreste aufnehmen und abgeben kann.

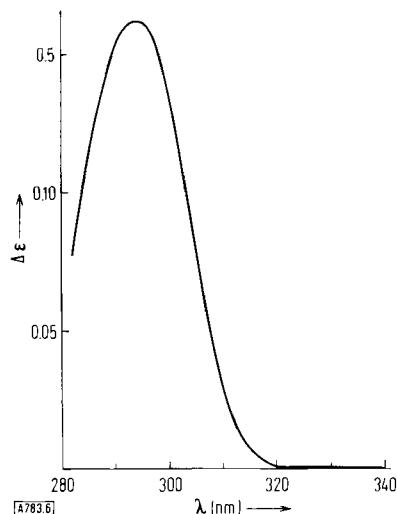


Abb. 6. Differenzspektrum zwischen adenylierten und nicht adenylierten Peptidpräparationen. Ein Adenylylpeptid wurde nach Behandlung der Glutamin-Synthetase mit Pepsin und Pronase isoliert [17]. Ein Teil des Peptides wurde mit Phosphodiesterase aus Schlangengift behandelt, um den Adenylylrest aus der kovalenten Bindung zu befreien; der andere Teil des Peptides diente als Kontrolle. Beide Proben wurden auf pH = 13 gebracht und ihre Spektren verglichen. Die Phosphodiesterase-Behandlung bewirkte die Freisetzung einer Hydroxygruppe eines Tyrosins, welches in alkalischer Lösung in ionisierter Form vorliegt (nach [17]).

## 7. Wirkung der Adenylylierung auf die Wechselwirkung zwischen den Untereinheiten

Wie oben erwähnt, enthält die vollständig adenylierte Glutamin-Synthetase zwölf Äquivalente AMP kovalent an das Enzymmolekül gebunden. Das Enzym besteht aus zwölf Untereinheiten, von denen jede einen Adenylylrest tragen kann. Dieser Aufbau ermöglicht das Vorkommen von Enzymmolekülen mit null bis zwölf Adenylylresten. Bei zwei oder mehr Adenylylresten pro Molekül Enzym werden dadurch multiple Formen des Enzyms möglich, deren Verhalten von der Stellung der Adenylylreste zueinander abhängen könnte. Insgesamt sind 384 Formen der Glutamin-Synthetase möglich [19].

Kommen solche Hybridformen des Enzyms – mit adenylierten und nichtadenylierten Untereinheiten in einem Molekül – nun tatsächlich vor? Wichtig ist auch die Frage, ob Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten die Stabilität und die katalytischen Eigenschaften des Enzyms beeinflussen. Um dieser Frage nachzugehen, wurden Enzyme mit verschiedenem Adenylylierungsgrad (0 bis 12 Adenylylreste pro Molekül Enzym) hergestellt und untersucht.

Enzyme mit unterschiedlichem Adenylylierungsgrad wurden erhalten: 1. durch Isolierung des Enzyms aus Zellen nach Wachstum mit unterschiedlicher Stickstoffversorgung, 2. durch Inkubation von nichtadenyliertem Glutamin-Synthetase mit ATP:Glutamin-Synthetase-Adenylyltransferase, um eine fortschreitende

[19] M. S. Raff, persönliche Mitteilung.

Adenylylierung der Glutamin-Synthetase zu erzielen und 3. durch Behandlung von adenyliertem Glutamin-Synthetase mit Phosphodiesterase aus Schlangengift, um eine fortschreitende Desadenylylierung zu erreichen.

Die so erhaltenen partiell adenylierten Formen des Enzyms wurden mit Gemischen vollständig adenyliertem und vollständig desadenyliertem Glutamin-Synthetase verglichen, die den gleichen Durchschnittsgehalt an Adenylylresten pro mol Enzym aufwiesen.

Auf zwei voneinander unabhängigen Wegen ist es gelungen, Hinweise auf Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten zu erbringen und zu zeigen, daß diese für die Regulation der Glutamin-Synthetase bedeutsam sein können. Zunächst wurde eine sorgfältige Analyse der biosynthetischen Aktivitäten von Hybridformen der Glutamin-Synthetase mit  $Mg^{2+}$  und  $Mn^{2+}$  als Aktivatoren unter Bedingungen der Substratsättigung durchgeführt. Unter optimalen Testbedingungen werden die nichtadenylierten Untereinheiten durch  $Mg^{2+}$  spezifisch aktiviert. Das pH-Optimum liegt hierfür bei pH = 7.5 bis 7.6. Die adenylierten Untereinheiten benötigen dagegen  $Mn^{2+}$  und ein pH-Optimum bei 6.5 bis 6.6. Diese Spezifität der Wirkung der zweiwertigen Kationen entspricht der von Kingdon et al. beobachteten [7]. Unter optimalen Testbedingungen besteht jedoch keine lineare, sondern eine sigmoidale Abhängigkeit zwischen der Spezifität der zweiwertigen Kationen und dem Grad der Adenylylierung. Man beobachtet bei der Entfernung und beim Einfügen von Adenylylresten an beiden Grenzen der Adenylylierung (d.h. bei vollständig adenyliertem und bei vollständig desadenyliertem Enzym) relativ starke Veränderungen der katalytischen Aktivitäten in Abhängigkeit von  $Mg^{2+}$  oder  $Mn^{2+}$ . Bei Präparaten mit drei bis acht Adenylylresten pro mol Glutamin-Synthetase beeinflußt die Änderung der Zahl der gebundenen Adenylylreste die katalytischen Eigenschaften nur wenig. Dieses nicht-lineare Verhalten des Enzyms führt zum Schluß [20], daß heterologe Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten (genauer: zwischen adenylierten und nichtadenylierten Untereinheiten) einen Einfluß auf die katalytischen Leistungen des Enzyms haben.

Eine zweite Serie experimenteller Daten, die auf die Existenz von Hybridformen hinweist, ergibt sich aus der Messung der thermischen Inaktivierung des Enzyms. In Gegenwart von Harnstoff werden adenylierte und nichtadenylierte Formen bei genauer Kontrolle von pH-Wert und Temperatur unterschiedlich inaktiviert [21].

Ciardi und Stadtman [21] fanden Bedingungen, unter denen nur die adenylierte Form inaktiviert wird, während die nichtadenylierte Form stabil ist. Mischungen beider Formen verhalten sich unter diesen Bedingungen wie zu erwarten: alles adenylierte Enzym wird inaktiviert, während das nichtadenylierte Enzym katalytisch aktiv bleibt. Natürlich vorkommende potentielle Hybridformen dagegen werden in

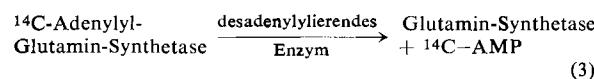
[20] A. Ginsburg, J. Yeh, S. B. Hennig u. M. D. Denton, *Biochemistry* 9, 633 (1970).

[21] J. Ciardi u. E. R. Stadtman, persönliche Mitteilung.

einem anderen Ausmaß inaktiviert als Mischungen mit der gleichen mittleren Anzahl an Adenylyresten. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, daß es zwischen den Untereinheiten der Hybridmoleküle zu Wechselwirkungen kommt, die Änderungen der physikalischen Eigenschaften des Moleküls der Glutamin-Synthetase zur Folge haben. Ausmaß und Bedeutung der Hybridbildung bei diesem Enzym werden derzeit untersucht [21].

## 8. Das Glutamin-Synthetase-desadenylylierende Enzym

Die erwähnten Wachstumsversuche (siehe Abschnitt 2) ergaben, daß während des Wachstums von *E. coli* mit Glutamat als Stickstoffquelle die Glutamin-Synthetase adenylyliert wird, wenn die Kultur die stationäre Wachstumsphase erreicht. In ähnlicher Weise wurde gezeigt [3, 22], daß in Zellen von *E. coli* beim Übergang von einem Medium mit Glutamat als Stickstoffquelle zu einem Medium mit wenig  $\text{NH}_4^+$  als Stickstoffquelle die Glutamin-Synthetase von der adenylylierten in die nichtadenylylierte Form übergeht. Dies führte uns zur Annahme eines desadenylylierenden Enzyms in *E. coli*, das in Abhängigkeit von Veränderungen der Wachstumsbedingungen Adenylyreste von der Glutamin-Synthetase abzuspalten vermag. Zum Nachweis dieses Enzyms diente  $^{14}\text{C}$ -markierte adenylylierte Glutamin-Synthetase als Substrat, die mit Adenylyltransferase hergestellt worden war (siehe Abschnitt 4). Die Enzymaktivität ließ sich durch Messung der freigesetzten Radioaktivität [23] entsprechend Gl. (3) erfassen:



Ein Enzym, das diese Reaktion katalysiert, wurde in zellfreien Extrakten von *E. coli* gefunden. Das Enzym hat die unter dem Aspekt der zellulären Regulation (siehe Abschnitt 9) gesehen interessante Eigenschaft, daß es etwa zwanzigfach durch  $\alpha$ -Ketoglutarat aktiviert und durch Glutamin gehemmt wird. Im Laufe der Abspaltung der Adenylyreste von der Glutamin-Synthetase gehen ihre Eigenschaften von denen der Präparation II (siehe Abschnitt 2) in die der Präparation I über [23]. Das Glutamin-Synthetase-desadenylylierende Enzym aus *E. coli* führt zu den gleichen Veränderungen. Das Vorkommen dieses Enzyms ist wenig später von Battig et al. bestätigt worden [24].

Das Glutamin-Synthetase-desadenylylierende Enzym ist etwa zwanzigfach durch Fraktionierung mit Protopinsulfat und mit Ammoniumsulfat sowie durch Adsorption an Aluminiumhydroxid-Gel C- $\gamma$  und anschlie-

[22] L. Heilmeyer, D. Mecke u. H. Holzer, *Europ. J. Biochem.* 2, 399 (1967).

[23] B. M. Shapiro u. E. R. Stadtman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 30, 32 (1968).

[24] F. Battig, L. Heilmeyer u. H. Holzer, *Meeting European Biochemical Societies, Prag 1968; FEBS-Abstr.*, 5. Meeting, 194 (1968).

Bende Elution gereinigt worden [25]. Bei der Gelchromatographie, die die Makromoleküle nach ihrer Größe trennt, erhält man aus der teilweise gereinigten Präparation zwei Komponenten ( $P_1$  und  $P_{II}$ ), die beide für die enzymatische Aktivität erforderlich sind [25]. Nach Anderson haben sie Molekulargewichte von etwa 150000 bzw. etwa 50000. Die kleinere Komponente  $P_{II}$  ist recht stabil, während  $P_1$  für weitere Reinigungs-schritte nicht beständig genug ist [26].

Die Desadenylylierung der Glutamin-Synthetase wird durch eine Vielfalt von Effektoren stimuliert [25]. Ohne  $\alpha$ -Ketoglutarat im Reaktionsgemisch nimmt die Aktivität etwa fünfzehnfach ab (Tabelle 4). Auch Nucleo-

Tabelle 4. Faktoren, die für die Desadenylylierungsreaktion in einem System aus *E. coli* erforderlich sind. Das verwendete Enzym war eine 40fach gereinigte Mischung der Komponenten  $P_1$  und  $P_{II}$ . (Genaue experimentelle Bedingungen siehe [25].)

Reaktionsgemisch	Aktivität (Einheiten)
komplettes System	4.6
komplettes System ohne $\alpha$ -Ketoglutarat	0.3
komplettes System ohne UTP	0.7
komplettes System ohne ATP	3.5
komplettes System ohne UTP und ATP	0.1
komplettes System ohne $\text{MnCl}_2$	0.0
komplettes System ohne Phosphat	2.0
komplettes System ohne Dithiothreit	4.1

tide haben einen Effekt auf das Enzym; durch synergistische Effekte von UTP und ATP wird es etwa um das Fünfzehnfache stimuliert. Ferner sind für die Desadenylylierung zweiwertige Kationen erforderlich. Dabei ist  $\text{Mn}^{2+}$  am wirksamsten. Für den gleichen Effekt ist  $\text{Mg}^{2+}$  in zehnfacher Konzentration erforderlich, während  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Ba}^{2+}$  ohne Wirkung sind. Einige zweiwertige Anionen wirken gleichfalls stimulierend: Hydrogenphosphat und -arsenat erhöhen die Aktivität des Enzyms jeweils auf das Zweifache. Die Stimulation durch  $\alpha$ -Ketoglutarat erfolgt bereits durch relativ geringe Konzentrationen ( $K_m = 2.0 \text{ mM}$ ). Weder Glutamat noch andere  $\alpha$ -Ketosäuren können es bei dieser Aktivierung ersetzen. Im Gegensatz dazu wird die Reaktion durch Glutamin gehemmt [25]. Etwa 50 % Hemmung werden von einer  $0.35 \text{ mM}$  Glutamin-Konzentration erzielt.

Das desadenylylierende Enzym wird somit durch  $\alpha$ -Ketoglutarat stimuliert und durch Glutamin gehemmt, während die ATP:Glutamin-Synthetase-Adenylyltransferase durch Glutamin stimuliert und durch  $\alpha$ -Ketoglutarat gehemmt wird. Mögliche Bedeutungen dieser reziproken Effektorwirkungen werden in Abschnitt 9 diskutiert.

Eine der auffälligsten Eigenschaften der Desadenylylierungsreaktion ist ihre spezifische Aktivierung durch Nucleotidfraktionen [25]. Dabei ist ein Gemisch von ATP und UTP am wirksamsten (Tabelle 4). Diese Abhängigkeit wurde während der Reinigung des Enzyms aufgedeckt, denn bei Entfernung der Nucleinsäuren aus der Präparation trat stets ein Verlust der desadenylylierenden Aktivität ein. Später wurde dann gezeigt,

[25] B. M. Shapiro, *Biochemistry* 8, 659 (1969).

[26] W. Anderson, persönliche Mitteilung.

daß mehrere Polynucleotidfraktionen das etwa zwanzigfach gereinigte desadenylierende Enzym stimulieren können. Dabei sind Präparationen von ribosomaler RNA am wirksamsten, wenn sie zusammen mit UTP zugefügt werden [24]. Wird RNA zu einem maximal durch ein ATP-UTP-Gemisch stimulierten desadenylierenden Enzym gegeben, so kommt es zu einer Hemmung [25]. In allen Fällen lassen sich die stimulierenden Effekte der RNA durch Behandlung mit RNase aufheben. Von den untersuchten Mononucleotiden sind ATP und UTP am wirksamsten; sie zeigen synergistische Wirkungen (Abb. 7). UTP allein

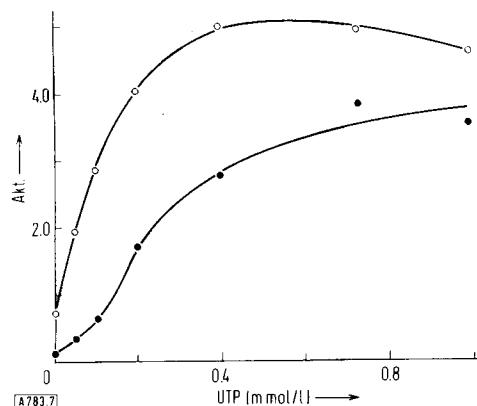


Abb. 7. Stimulierung der Desadenylierung durch UTP allein (● — ●) und durch UTP in Gegenwart von ATP (○ — ○) (nach [25]).

aktiviert das desadenylierende Enzym, wobei eine sigmoide Konzentrationsabhängigkeit besteht. In Gegenwart von sättigenden Konzentrationen an ATP verändert sich dagegen die Sättigungskurve für UTP wesentlich. Unter diesen Bedingungen tritt die Wirkung bereits mit viel geringeren UTP-Konzentrationen ein [24]. Wie erwähnt kann der Effekt von ATP auf die durch UTP stimulierte Desadenylierung der Glutamin-Synthetase auch durch Polynucleotidpräparationen erreicht werden. Nucleosid-5'-mono- oder -diphosphate haben weder allein noch im Gemisch mit ATP oder UTP einen wesentlichen Einfluß auf die Reaktion. Eine Stimulierung der Aktivität des desadenylierenden Enzyms in rohen Extrakten durch Nucleosid-5'-triphosphate ist gleichfalls von Heilmeyer et al. [27] beschrieben worden.

Die komplexe Abhängigkeit des desadenylierenden Enzyms von mehreren Faktoren ist zunächst recht verwunderlich. Man könnte annehmen, daß sie erforderlich ist, um den Adenylylrest vor der Abspaltung vom Protein in eine günstige Position zu bringen. Dies könnte ein Prozess sein, der energieabhängig ist und deshalb ATP oder UTP benötigt. Auch ist denkbar, daß für derartige Strukturänderungen an der Glutamin-Synthetase deren Effektoren (zweiwertige Kationen und eventuell auch  $\alpha$ -Ketoglutarat und Orthophosphat) notwendig sind. Diese Überlegungen dürften jedoch nicht zutreffen, da die Hydrolyse der Adenylyl-Glutamin-Synthetase auch durch die Phospho-

diesterase aus Schlangengift möglich ist, die für ihre Aktivität lediglich zweiwertige Kationen benötigt. Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, daß es sich beim Desadenylierungssystem aus *E. coli*, das aus zwei makromolekularen Komponenten besteht und noch mehrere Effektoren benötigt, um ein sehr wirksames Kontrollsysteem für die Desadenylierung der Glutamin-Synthetase handelt.

Durch ein solches System könnte eine sehr wirkungsvolle Regulation der Synthese von Glutamin und anderen stickstoffhaltigen Metaboliten während des Wachstums und der Entwicklung im Organismus ausgeübt werden. Obwohl die physiologische Bedeutung einiger Effektoren, insbesondere der Nucleotide, noch unklar ist, kann man sich leicht die Bedeutung der kontrollierenden Effekte von  $\alpha$ -Ketoglutarat und von Glutamin auf das System vorstellen.

## 9. Physiologische Regulation des Stickstoff-Stoffwechsels durch Adenylylierung

Der Bedarf an stickstoffhaltigen Metaboliten schwankt wahrscheinlich während des Lebenszyklus eines Organismus. Dabei dürfte der Bedarf besonders von der Synthese spezifischer Biopolymerer (Proteine, Nucleinsäuren, Zellwandmaterial, Membranen) abhängen. Ebenso kann sich die Stickstoffversorgung unter wechselnden Umweltbedingungen ändern. Um möglichst unter allen Bedingungen ein maximales Wachstum zu ermöglichen, muß die Zelle sich sehr wirksam an derartige Änderungen in der Versorgung und im Bedarf an Stickstoff anpassen können.

Zur Analyse der Regulationsmöglichkeiten ist es besonders günstig, von den beiden Extremen der Stickstoffversorgung – Stickstoffverarmung und Stickstoffüberschüß – auszugehen. Bei Stickstoffverarmung kommt es zu einer Abnahme der stickstoffhaltigen Metabolite in der Zelle. Die wichtigsten von diesen sind das Glutamin und seine Metabolite (Abb. 1), da sie begrenzende Intermediärprodukte in der Stickstoffverwertung sind. Diese Veränderungen dürften mit einer Zunahme der Konzentration an  $\alpha$ -Ketoglutarat einhergehen, dem Kohlenstoffsskelett des Glutamins. Man kann deshalb annehmen, daß der Quotient der Stickstoffsättigung, definiert als (Glutamin + aus Glutamin gebildete Produkte)/ $\alpha$ -Ketoglutarat, niedrig ist.

Im Gegensatz hierzu dürfte es bei Stickstoffüberschüß auch zu einer reichlichen Versorgung mit stickstoffhaltigen Metaboliten kommen. Sind sie im Überschüß vorhanden, so bewirken sie eine Verringerung ihrer Neusynthese. Dies kann durch eine der zahlreichen Arten der Rückkopplung geschehen, die in den biosynthetischen Reaktionswegen wirksam sind (Übersicht siehe [28]). Die verringerte Neusynthese stickstoffhaltiger Metabolite erhöht wiederum die relative Glutamin-Konzentration. Der Anstieg der Konzentrationen von Glutamin und seinen Metaboliten führt zu

[27] L. Heilmeyer, F. Battig u. H. Holzer, *Europ. J. Biochem.* 9, 259 (1969).

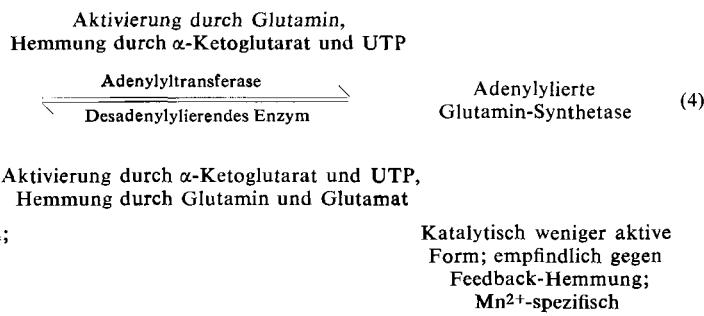
[28] E. R. Stadtman, *Advan. Enzymol.* 28, 41 (1966).

einem relativen Anstieg der Stickstoffsättigung entsprechend der obigen Definition. Obwohl es recht schwierig ist, die zu erwartenden absoluten Konzentrationsänderungen eines einzelnen Metaboliten nach einer Störung des Gleichgewichtes in einem stark verzweigten Stoffwechselweg zu erfassen, ist die Betrachtung des Quotienten der Stickstoffsättigung recht nützlich, da hierbei die Bedeutung von Änderungen der relativen Konzentrationen verschiedener Metabolite als Antwort auf Veränderungen der Stickstoffversorgung und des Stickstoffbedarfs ersichtlich wird.

In *E. coli* findet sich nun ein System für die Regulation des Stickstoff-Stoffwechsels, das bereits auf sehr geringe Änderungen des Quotienten der Stickstoffsättigung anspricht. Dieses System besteht aus drei Enzymen, durch die die Biosynthese des Glutamins reguliert wird. Es sind dies 1. die Glutamin-Synthetase, 2. die ATP:Glutamin-Synthetase-Adenylyltransferase und 3. das Glutamin-Synthetase-desadenylylierende Enzym. Gl. (4) enthält die adenylierte Form und die nicht-adenylierte Form der Glutamin-Synthetase, ihre wesentlichen Eigenschaften, die Enzyme, die beide Formen ineinander überführen, und die beteiligten Effektoren.

Im Gegensatz dazu kommt es bei hohen Quotienten der Stickstoffsättigung, also bei reichlichem Vorhandensein stickstoffhaltiger Metabolite, zu einer Hemmung des desadenylylierenden Enzyms und zu einer Aktivierung der ATP:Glutamin-Synthetase-Adenylyltransferase. Das Ergebnis dieser reziproken enzymatischen Kontrolle ist eine Umwandlung der Glutamin-Synthetase in die adenylierte Form, die katalytisch weniger aktiv, aber empfindlicher gegenüber der Hemmung durch die Produkte des Glutaminstoffwechsels ist. In dieser Form wird die Aktivität der Glutamin-Synthetase unter dem Einfluß der angehäuften Metabolite weiter gesenkt, was eine Erniedrigung des Glutaminspiegels in der Zelle zur Folge hat.

Besonders einleuchtend ist die Rolle des aus den drei Enzymen bestehenden Regulationssystems in der Zelle für die Aufrechterhaltung der Homöostase im Stickstoff-Stoffwechsel. Jede Abweichung vom „normalen“ Quotienten der Stickstoffsättigung ist von Aktivitätsänderungen der drei Enzyme begleitet, wodurch versucht wird, den vorher vorhandenen Zustand wieder einzustellen. Einen nachgeordneten Effekt haben diese komplizierten Regulationen auf die Erhaltung des ATP-Bestandes in der Zelle. Sowohl die Glutamin-



Aus dieser Gleichung wird ersichtlich, daß bei Stickstoffmangel mit einem entsprechend niedrigen Quotienten der Stickstoffsättigung eine Aktivierung des desadenylylierenden Enzyms sowie eine Hemmung der ATP:Glutamin-Synthetase-Adenylyltransferase durch die relativen Konzentrationen an Glutamin und an  $\alpha$ -Ketoglutarat verursacht werden. Dies führt zur Bildung einer nur schwach adenylierten Form der Glutamin-Synthetase, die katalytisch aktiver und weniger empfindlich gegenüber der Feedback-Hemmung ist. Unter diesen Bedingungen wird Ammoniak sehr wirkungsvoll in stickstoffhaltige Metabolite überführt.

synthese als auch die Adenylylierung der Glutamin-Synthetase verbrauchen ATP. Ohne wirkungsvolle reziproke Kontrolle wäre das Adenylylierungs-Desadenylylierungs-System eine Verschwendug von ATPase-Aktivität. Ungeklärt ist noch die Bedeutung der Nucleotideffekte auf die Adenylylierungs- und Desadenylylierungsvorgänge. Eine mögliche Beziehung zwischen der Synthese von Glutamin und dem Stoffwechsel der Polynucleotide liegt in den Effekten von Ribonucleinsäuren auf das desadenylylierende System.

Eingegangen am 17. Oktober 1969 [A 783]  
Übersetzt von Dr. Ursula Friebe und  
Doz. Dr. A. W. Hollendorf, Freiburg