

- [57] W. H. Ramsay, Mon. Not. Roy. Astron. Soc. 108, 406 (1948).
 [58] W. H. Ramsay, Mon. Not. Roy. Astron. Soc. Geophys. Suppl. 5, 409 (1949).
 [59] F. Birch, J. Geophys. Res. 57, 227 (1952).
 [60] L. Knopoff u. G. J. F. MacDonald, Geophys. J. Roy. Astron. Soc. 3, 68 (1960).
 [61] B. Mason, Nature 211, 616 (1966).
 [62] A. E. Ringwood, Geochim. Cosmochim. Acta 25, 1 (1961).
 [63] D. L. Anderson u. C. Sammis, Phys. Earth Planet. Interiors 3, 41 (1970).
 [64] D. H. Green u. A. E. Ringwood, Earth Planet. Sci. Lett. 3, 151 (1967).

- [65] C. B. Sclur, Phys. Earth Planet. Interiors 3, 333 (1970).
 [66] Th. Ernst, G. Mages u. R. G. Schwab, Fortschr. Mineral. 49, Bh. 1, 91 (1971).
 [67] Th. Ernst u. R. G. Schwab, Ref. zum DFG-Rundgespräch „Experimentelle Erfahrungen und Fortschritte auf dem Gebiet der Hochdruck-Forschung“, Bochum 1972.
 [68] A. Newhaus, Geol. Jahrb. Beih. 80, 57 (1969).
 [69] Th. Ernst u. R. G. Schwab, 24th Int. Geol. Congr. 1972, Section 14, S. 28.
 [70] J. Verhoogen, Phil. Trans. Roy. Soc. London Ser. A 1088 (n 1088) (1965).

Die enzymatische Ribonucleotid-Reduktion: Biosyntheseweg der Desoxyribonucleotide

Von Hartmut Follmann^[*]

Ribonucleotid-Reduktasen sind Enzyme, die in teilungsfähigen Zellen die für die DNA-Verdopplung benötigten Desoxyribonucleotide synthetisieren. Sie besitzen damit eine Schlüsselfunktion für das Wachstum von Mikroorganismen sowie aller pflanzlichen und tierischen Gewebe. Die Enzyme reduzieren alle vier Purin- und Pyrimidinribonucleotide (als 5'-Di- oder -Triphosphate) unter direkter Substitution der 2'-Hydroxygruppe durch Wasserstoff. Physiologische Reduktionsmittel sind die Mercaptogruppen der Thioredoxine, einer Gruppe kleiner Proteine, die aus der oxidierten Form durch NADPH-abhängige Thioredoxin-Reduktasen regeneriert werden. Man kennt zwei Typen von Ribonucleotid-Reduktasen (I und II), die die Wasserstoffübertragung mit Hilfe proteingebundener Eisen-Ionen oder des 5'-Desoxyadenosylcobalamins (Coenzym B₁₂) katalysieren; in beiden Fällen sind ferner Radikale nachweisbar. Zur Regulation der Enzyme dienen Effektornucleotide. Möglicherweise liegt ein homöostatischer Mechanismus vor, der die Versorgung der Zelle mit DNA-Vorläufern sicherstellt.

1. Desoxyribonucleotide als Bausteine der DNA

Bevor in einem Bakterium oder wachsendem Gewebe bei der Zellteilung neue Desoxyribonucleinsäure (DNA), der makromolekulare Träger der genetischen Information in den Chromosomen, synthetisiert werden kann, müssen ihre monomeren Bausteine als Substrate der replizierenden Enzyme in der Zelle verfügbar sein. Diese Bedingung klingt selbstverständlich, aber unter den zahlreichen Prozessen der Nucleinsäure-Synthese^[1] (Abb. 1) ist gerade die Bildung der vier Desoxyribonucleotide (Schritt b) erstaunlich wenig bekannt, ganz im Gegensatz zur sehr gut untersuchten Biosynthese der Purin- und Pyrimidinribonucleotide (Schritt a). Ebenso ist die Polymerisation der Desoxyribonucleotide (Schritt c) in vivo noch nicht in allen wichtigen Einzelheiten geklärt: Als unmittelbare Vorläufer der DNA gelten zwar allgemein die 5'-Triphosphate des Desoxyadenosins, Desoxycytidins, Desoxyguanosins und Thyminidins – dATP, dCTP, dGTP bzw. dTTP^[**] – aber eine

enzymatische Polymerisation der entsprechenden 5'-Diphosphate ist ebenfalls bekannt^[2], und eine DNA-Replikation auf der Stufe noch andersartig aktivierter 5'-Monophosphate wird in Betracht gezogen^[3].

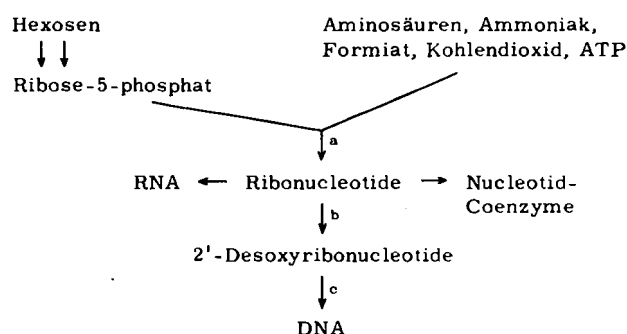


Abb. 1. Abhängigkeit der DNA-Replikation (Schritt c) von der Purin- und Pyrimidin-Biosynthese (Schritt a) und der Ribonucleotid-Reduktion (Schritt b) im Verlauf der de-novo-Nucleinsäure-Biosynthese.

[*] Prof. Dr. H. Follmann
 Fachbereich Chemie der Universität
 Arbeitsgruppe Biochemie
 355 Marburg/Lahn, Lahnberge

[**] Die 5'-Phosphate der Ribonucleoside Adenosin (A), Cytidin (C), Guanosin (G) und Uridin (U) sowie der Desoxyribonucleoside Desoxyadenosin (dA), Desoxycytidin (dC), Desoxyguanosin (dG) und Thyminidin (dT) sind in üblicher Weise als -DP (Diphosphat) oder -TP (Triphosphat) abgekürzt; (d)N ist ein unspezifiziertes (Desoxy)Ribonucleosid. DNA: Desoxyribonucleinsäure. RNA: Ribonucleinsäure. FAD: Flavinadeninindinucleotid. NADPH bzw. NADP: reduziertes bzw. oxidiertes Nicotinamidadenindinucleotidphosphat. Zur Struktur dieser Verbindungen vgl. W. Saenger, Angew. Chem. 85, 680 (1973); Angew. Chem. internat. Edit. 12, 591 (1973).

Alle diese Desoxyribonucleotide sind in der Zelle nur in verschwindend kleiner stationärer Konzentration vorhanden. Durch direkte Analyse lassen sie sich neben den chemisch ähnlichen, in 10- bis 100fach höherer Menge vorkommenden Ribonucleotiden kaum erfassen. Erst kürzlich lernte man^[4, 5], mit Hilfe der DNA-Polymerase I und synthetischen Polynucleotid-Matrizen in vitro die in einem Gewebeextrakt enthalte-

nen Desoxyribonucleosidtriphosphate in Mengen von weniger als 1 pmol quantitativ zu bestimmen. In Zellkulturen der Maus^[6,7], des Hamsters^[8,9] und in Ascites-Tumorzellen^[10] fanden sich Pools der Größenordnung 10–100 pmol dNTP pro 10⁶ Zellen, die auf Zellkern und Cytoplasma verteilt sind^[11]. Sie zeigen beträchtliche wachstumsabhängige Schwankungen^[9,108], doch können sie die DNA-Replikation stets nur etwa 1–5 min lang unterhalten. Nur Eizellen wie die des Frosches *Xenopus laevis* scheinen besser mit DNA-Vorläufern ausgestattet zu sein, denn der hier gefundene Pool von 12 pmol dNTP pro Zelle^[12] reicht für die Synthese der DNA von mehr als 2000 neuen Zellkernen.

Zur Auffüllung der Desoxyribonucleotid-Pools kommen zwei Wege in Frage: Die Wiederverwertung aus dem katabolen Stoffwechsel stammender oder von außen zugeführter DNA-Bruchstücke wie Thymidin oder die völlige Neusynthese^[13]. Der erste Weg („salvage pathway“) ist für auxotrophe Mikroorganismen essentiell; er benötigt eine Reihe von induzierbaren Enzymen wie Nucleosiddesoxyribosyl-Transferasen, Nucleosid-Phosphorylasen und Nucleosid-Kinasen, die die Basen, Zucker und Phosphatreste der Nucleotide voneinander trennen und neu kombinieren können.

Da alle anderen Organismen ohne Zufuhr von Desoxyribonucleotiden DNA synthetisieren und auch die in der Nahrung vorhandenen Nucleinsäuren kaum verwerten, muß man bei ihnen allen die Fähigkeit zur de-novo-Synthese voraussetzen. Dabei stammt der Pentoseanteil der Nucleinsäuren aus dem oxidativen und nicht-oxidativen Kohlenhydrat-Stoffwechsel der Zelle, wie sich beispielsweise bei der Kultur von *Escherichia coli* auf ¹⁸O-markierter Glucose oder Fructose am Isotopengehalt der RNA und DNA zeigen läßt^[14]. Auf keinem dieser Wege wird freie 2-Desoxyribose gebildet und dann in Desoxyribonucleotide eingebaut; das im Prinzip zu ihrer Synthese aus Glyceraldehyd-3-phosphat und Acetaldehyd befähigte Enzym Desoxyribose-Aldolase^[15] katalysiert in vivo wohl nur den Abbau von 2-Desoxyribose-5-phosphat^[16]. Die Biosynthese aller Nucleotide führt vielmehr von Ribose-5-phosphat unter Aufbau der heterocyclischen Basen (Abb. 1) zu Ribonucleotiden, aus denen erst in einer Folgereaktion – unter Erhaltung der N-Glykosidbindung zwischen Zucker und Base – die Desoxyribonucleotide entstehen. Diesen Zusammenhang demonstrierte erstmals Reichard 1950 an der Verwertung von ¹⁵N-haltigem Cytidin (nicht aber Cytosin) für RNA und DNA im Stoffwechsel der lebenden Ratte^[17]. Ebenso ließ sich die Umwandlung ¹⁴C-markierter Ribonucleoside in Desoxyribonucleotide zuerst in Mikroorganismen-Kulturen^[18] und später in zellfreien Extrakten (z. B. aus *E. coli*^[19]) nachweisen.

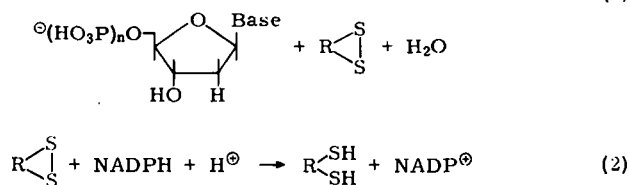
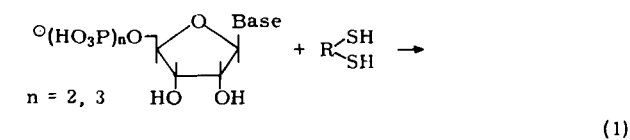
Enzyme, die Ribonucleosid-5'-phosphate unter Ersatz der 2'-Hydroxygruppe durch Wasserstoff zu 2'-Desoxyribonucleotiden reduzieren, heißen Ribonucleotid-Reduktasen^[20]. Reduktionsmittel sind in allen bekannten Fällen Dithiole, die dabei ins Disulfid übergehen und in einer weiteren Enzymreaktion regeneriert werden. Diese Reaktionen sind nur selten zusammenhängend beschrieben worden^[1,13,21,22]. Dieser Fortschrittsbericht befaßt sich mit unseren gegenwärtigen Kenntnissen vom Vorkommen und von der Struktur der Ribonucleotid-Reduktasen, ihrem Reaktionsmechanismus und ihren ungewöhnlichen Regulationsphänomenen. Zahlreiche Arbeiten der letzten Jahre zeigen, daß diese bislang wenig beachteten Enzyme von überragender Bedeutung für die Entwicklung aller Lebewesen sind.

2. Die Ribonucleotid-Reduktasen

2.1. Vorkommen, Isolierung und Nachweis

Ribonucleotid-Reduktasen sind als induzierbare, auf das Engste mit der Vermehrung von Zellen zusammenhängende Enzyme am besten in rasch wachsenden Zellkulturen und Geweben zu finden; ihr Nachweis in ruhenden Geweben macht große Schwierigkeiten. Bakteriophagen, Mikroorganismen in der exponentiellen Wachstumsphase, keimende Pflanzensamen, embryonale oder sich regenerierende tierische Organe und Tumoren sind typische Materialien für die Isolierung von Ribonucleotid-Reduktasen (Tabelle 1). Die Mehrzahl der bekannten Enzyme stammt aus Bakterien und Säugetiergeweben, während beispielsweise die Ribonucleotid-Reduktion in Pflanzen noch sehr wenig untersucht ist. Die seit langem in den Arbeitskreisen von Reichard (Stockholm), Blakley (Iowa City) und Moore (Houston) studierten Reduktasen von *Escherichia coli*, *Lactobacillus leichmannii* und aus Novikoff-Tumoren zeigen einige für alle Enzyme typische Eigenschaften, aber insgesamt weist die Desoxyribonucleotid-Synthese in den meisten Organismen viele artspezifische Eigenheiten auf.

Unsere bis vor kurzem noch sehr begrenzte Kenntnis der Ribonucleotid-Reduktion zeugt von den Schwierigkeiten im Umgang mit den beteiligten Enzymen. Sie kommen stets nur in geringer Menge vor und sind häufig instabile Proteine, so daß ihre Reinigung mit klassischen Methoden (z. B. aus Hefe^[32] oder Weizen^[33]) nicht leicht gelingt. Eine erfolgreiche Anwendung der Affinitätschromatographie mit trägerfixiertem Coenzym B₁₂^[51] oder dATP^[52] zur Reinigung der Ribonucleotid-Reduktasen aus *L. leichmannii*, *E. coli* und dem Bakteriophagen T4 verspricht hier Fortschritte. Ribonucleotid-Reduktasen sind jedoch auch wesentlich mühsamer quantitativ zu bestimmen als die meisten anderen Enzyme. Für die von ihnen katalysierte einfache Reaktion (1) gibt es nämlich keinen raschen Routinetest. Bei der gebräuchlichsten Methode verwendet man ein radioaktives Substrat wie [³H]CDP und bestimmt nach einer papier-, säulen-^[53,118] oder dünnschichtchromatographischen Abtrennung^[54] das gebildete markierte Desoxyribonucleotid; besonders in Rohextrakten wird dieser Test durch andere nucleotid-umsetzende Enzyme gestört. Weniger empfindlich ist der kolorimetrische Desoxyribosetest mit Diphenylamin, wozu das gebildete Desoxyribonucleotid zuerst sauer hydrolysiert werden muß^[55].



Eine auch für kinetische Messungen geeignete Methode simuliert das physiologische Geschehen, indem sie Reaktion (1) mit der Regeneration des Dithiols Thioredoxin durch Thioredoxin-Reduktase [Reaktion (2)] koppelt und den NADPH-Verbrauch spektrometrisch verfolgt^[56]; dieser Enzymtest er-

Tabelle 1. Ribonucleotid-Reduktase-Aktivität in Extrakten mehrerer Organismen und Gewebe.

Herkunft	Typ [a]	Substrate	Cofaktoren	Lit.
Prokaryonten				
<i>Escherichia coli</i>	I	NDP	Fe, ATP, Mg	[19]
Bakteriophage T4 auf <i>E. coli</i>	I	NDP	Fe, ATP (Mg)	[23, 24]
<i>Lactobacillus leichmannii</i>	II	NTP	Coenzym B ₁₂	[25]
<i>Clostridium sticklandii</i>	II		Coenzym B ₁₂	[26]
<i>Rhizobium meliloti</i>	II	NDP, NTP	Coenzym B ₁₂	[27]
<i>Corynebacterium nephridii</i>	II	NDP	Coenzym B ₁₂	[28]
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	II		Coenzym B ₁₂	[28]
<i>Micrococcus denitrificans</i>	II		Coenzym B ₁₂	[28]
<i>Bacillus megaterium</i>	II		Coenzym B ₁₂	[29]
<i>Thermus X-1 (aquaticus)</i>	II	NTP	Coenzym B ₁₂	[30, 28]
Eukaryonten				
<i>Euglena gracilis</i> , <i>Astasia longa</i> (Algen)	II	NTP	Coenzym B ₁₂	[28, 31] ^a
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Hefe)	I	NDP	Mg, ATP	[32]
Weizenkeimlinge	I	NDP	Fe, ATP	[33]
Sojabohne, Ackerbohne	I	NDP		[34]
Seeigelleier (<i>Arbacia punctulata</i>)	I	NDP	Mg, ATP	[35]
Seidenfalterpuppen (<i>Hyalophora cecropia</i>)	I			[36]
Hühnerembryo	I			[37]
Rattenembryo	I	NDP		[38]
Thymusdrüse (Kalb)	I			[39, 68]
Niere (Maus)	I			[40]
L-Zellen (Maus)	I			[41]
Regenerierende Leber (Ratte)	I	NDP	Fe, ATP, Mg	[42, 43]
Knochenmark bei perniziöser Anämie (Mensch)	I			[44]
Knochenmark bei Reticulocytose (Kaninchen)	I	NDP	Fe, ATP, Mg	[45]
Leukämievirus-infizierte Milz (Maus)	I	NDP	Mg	[46]
Embryonales Gehirn (Huhn, Ratte, Mensch)	I	NDP	Mg	[47]
Ehrlich-Asciteszellen	I	NDP		[39, 118]
Novikoff-Ascitestumor (Ratte)	I	NDP	Fe, ATP, Mg	[48]
Yaba-Tumovirus (Rhesusaffe)	I	NDP		[49]
Walker-, Morris- u. a. Rattentumoren	I	NDP		[50]

[a] Siehe dazu Abschnitt 2.2.1 und 2.2.2.

fordert aber gereinigte Enzyme und Thioedoxin passender Spezifität. Schließlich können die coenzym-B₁₂-abhängigen Ribonucleotid-Reduktasen (Enzyme vom Typ II in Tabelle 1) an der Freisetzung von Tritium aus [5'-³H]-5'-Desoxyadenosylcobalamin (Coenzym B₁₂, s.u.) während der Reduktion bestimmt werden. Das entstehende radioaktive Wasser wird dazu aus der Reaktionslösung absublimiert^[26, 57].

2.2. Spezifität der Enzyme

Alle gereinigten Ribonucleotid-Reduktasen katalysieren die Reduktion der vier natürlichen Ribonucleotide – und auch solcher mit unnatürlichen Basen – durch das gleiche Enzymprotein; es gibt keine Anhaltspunkte dafür, daß die anderen Systeme mehrere, für einzelne Nucleotide spezifische Enzyme enthalten. Ferner gleichen sich alle Ribonucleotid-Reduktasen darin, daß sie in vitro niedermolekulare Dithiole wie Dithioerythrit oder reduzierte Liponsäure als Reduktionsmittel akzeptieren und die 5'-Di- oder -Triphosphate der Ribonucleoside als Substrate benötigen. Eine Reduktion auf der 5'-Monophosphatstufe scheint nicht vorzukommen, kann allerdings in ungereinigten Extrakten durch Nucleotid-Kinasen vorgetauscht werden. Darüberhinaus aber muß man die Ribonucleotid-Reduktasen nach Cofaktorbedürfnis und Proteinnatur in zwei sehr verschiedene Gruppen ordnen.

2.2.1. Ribonucleosiddiphosphat-Reduktasen (EC 1.17.4.1)

Enzyme vom Typ I (Tabelle 1) – repräsentiert durch das aus *E. coli* – finden sich bei Mikroorganismen, Pflanzen und

Tieren bis hin zum Menschen. Soweit bekannt, reduzieren sie stets die Diphosphate ADP, CDP, GDP und UDP. Charakteristisch für diese Gruppe ist, daß sie die Redoxreaktion (Wasserstoff-Übertragung) zwischen Dithiol und Ribose nicht mit Hilfe eines der klassischen Coenzyme katalysieren, sondern proteingebundene Eisen-Ionen enthalten, die für die Enzym-Aktivität essentiell sind. Die Existenz eines solchen Enzyms wird daher oft an einer Stimulierung der Ribonucleotid-Reduktion durch niedrige Konzentrationen von Eisensalzen oder an einer Inhibierung durch Eisen-Komplexbildner erkannt. Besonders spezifisch hemmen Hydroxyharnstoff^[58] oder 1-Formylisochinolin-thiosemicarbazon^[59] die Enzymreaktion; allerdings ist diese Hemmung nur teilweise reversibel und führt wahrscheinlich auch zu weiteren Veränderungen an den Proteinen. Viele dieser Enzyme benötigen ferner Magnesium-Ionen und ATP (als Effektor, nicht als Energiequelle) zur Aktivität. Es läßt sich noch nicht erkennen, ob dies für alle Reduktasen vom Typ I gilt.

2.2.2. Ribonucleosidtriphosphat-Reduktasen (EC 1.17.4.2)

Der Typ II (Tabelle 1) umfaßt Enzyme, an deren Wasserstoff-Übertragung 5'-Desoxyadenosylcobalamin beteiligt ist. Diese Coenzymform des Vitamins B₁₂ katalysiert über die 5'-Methylengruppe des Adenosylrestes (vgl. Abb. 3) mehrere enzymatische Wasserstoff-Verschiebungen^[60]; ihre Beteiligung an der Ribonucleotid-Reduktion wurde in einem zellfreien Extrakt von *Lactobacillus* zuerst von Blakley und Barker erkannt^[25]. Anstelle der Triphosphate ATP, CTP, GTP und UTP können einige Enzyme offenbar auch Diphosphate als Substrate umset-

zen. Durch Metall-Ionen werden sie wenig beeinflusst. Mit Ausnahme der niederen Alge *Euglena* scheinen die coenzym-B₁₂-abhängigen Ribonucleotid-Reduktasen nur in Prokaryonten (Organismen ohne Zellkern) vorzukommen. Mit dem sehr empfindlichen Test mit radioaktivem Coenzym ist ihre Verbreitung in vielen Mikroorganismen untersucht worden^[28], doch gibt es hier selbst bei nahe verwandten Arten kein gesetzmäßiges Vorkommen. Viele vergebliche Versuche hat man darauf verwandt, die Teilnahme B₁₂-abhängiger Reduktasen an der DNA-Synthese von Säugern, insbesondere bei der unregulierten DNA-Bildung in den Megaloblasten des Knochenmarks bei perniziöser Anämie, zu zeigen, doch ist die Wirkung von Vitamin B₁₂ in diesen Systemen mit Sicherheit nicht mit der Ribonucleotid-Reduktion in Verbindung zu bringen^[44].

2.3. Proteinstruktur

Nur wenige der in Tabelle 1 verzeichneten Ribonucleotid-Reduktasen wurden weit genug gereinigt, um Details ihrer Proteinstruktur und der Bindung von Substraten und Effektoren zu analysieren. Ein Blick auf Tabelle 2 erlaubt noch keine weitgehenden Vergleiche. Immerhin fällt auf, daß mehrere eisenabhängige Reduktasen große Proteine mit zwei ungleichen, für sich allein inaktiven Komponenten sind, die man als eine regulatorische und eine katalytische Untereinheit auffassen kann. So besitzt von den getrennten, reinen Untereinheiten des Enzyms aus *E. coli*^[61] Protein B1 mindestens vier verschiedenartige Nucleotidbindungsstellen^[65], während B2 zwei Eisen-Atome, aber keine Nucleotide bindet. Ihr enzymatisch aktiver 1:1-Komplex bildet sich in Gegenwart von Magnesium-Ionen und des positiven Effektors dTTP: Bindung

tisch inaktiven Apoproteins mit Eisen(II)-ascorbat wieder zu einem voll funktionsfähigen B2 rekonstituieren^[67].

Das UV-Absorptionsspektrum des Metalloproteins wie das Mößbauer-Spektrum (gemessen am [⁵⁷Fe]-Protein B2)^[67] deuten auf eine nahe strukturelle Verwandtschaft mit den Hämyerithrin hin; in diesen sauerstoff-transportierenden Proteinen meeresbewohnender Würmer und Armfüßer liegen zwei „high-spin“-Eisen(III)-Ionen in einem antiferromagnetisch gekoppelten (d. h. insgesamt diamagnetischen) zweikernigen Komplex vor, dessen Proteinliganden allerdings unbekannt sind. Die Funktion des Eisens im B2 ist offenbar weder Sauerstoff- noch Elektronentransport, sondern es dient zur Erzeugung und Stabilisierung eines ebenfalls in der Untereinheit B2 nachweisbaren organischen Radikals, das seinerseits wahrscheinlich an der Reduktion beteiligt ist (s. Abschnitt 3.1). Das T4-Phagenenzym^[62] ist dem von *E. coli* in all diesen Eigenschaften sehr ähnlich.

Die coenzym-B₁₂-abhängigen Reduktasen scheinen etwas einfacher gebaut zu sein. Das relativ kleine *Lactobacillus*-Enzym vereinigt alle katalytischen und regulatorischen Bindungsstellen – mindestens vier für Substrat, Coenzym und Effektoren – in einer einzigen Polypeptidkette von nicht außergewöhnlicher Länge^[64]. Ihre Aminosäureanalyse und erste Versuche zur Darstellung größerer Proteinfragmente wurden beschrieben; kinetische und mechanistische Untersuchungen sind an diesem Enzym besonders weit fortgeschritten.

2.4. Subzelluläre Lokalisation

Die Lokalisation der Ribonucleotid-Reduktasen in der Zelle ist noch nicht systematisch untersucht worden. Im allgemeinen

Tabelle 2. Proteinstruktur gereinigter Ribonucleotid-Reduktasen.

Herkunft und Reinigungsgrad	Mol.-Gew. und/oder Sedimentationskonstante	Eigenschaften	Lit.
<i>Escherichia coli</i> (homogen)	245000 9.7–10.1 S	Durch Chromatographie trennbar in B1 (Mol.-Gew. 160000, 2 Peptidketten) und B2 (Mol.-Gew. 78000, 2 Peptidketten); B1 bindet Nucleotide, B2 enthält 2 Atome Fe (Lichtabs. 360, 410 nm); B1: B2-Komplex durch Mg stabilisiert; in dATP-Gegenwart inaktives Dimeres	[61]
Phage T4 (homogen)	225000	1 Protein mit 2 Atomen Fe (Lichtabs. 360, 410 nm), wenig durch Mg stabilisiert; denaturierende Elektrophorese ergibt 2 Peptidkettenpaare vom Mol.-Gew. 80000 bzw. 35000	[62]
Rattenleber (300 ×) Knochenmark (50 ×)	6.6 S	Aggregiert und inaktiviert in dATP-Gegenwart Durch Chromatographie trennbar in 2 ungleiche Proteine S1 und S2, getrennt inaktiv	[42] [45]
Novikoff-Tumor (150 ×) <i>L. leichmannii</i> (homogen)	76000	2 ungleiche Proteine P1 und P2 1 Polypeptidkette (ca. 690 Aminosäuren), nicht dissoziier- oder aggregierbar	[63] [64]
<i>Thermus X-1</i>	80000	Aktivitätsmaximum bei 70 °C, stabil bis 80 °C; Effektorenwirkung nur bei hoher Temperatur (Konformationsänderung?)	[30]

des Inhibitors dATP führt zu einem inaktiven, aggregierten Protein. Aminosäureanalyse und andere Eigenschaften dieses Enzymsystems wurden beschrieben^[66].

Von besonderem Interesse ist an diesen Proteinen natürlich die Bindungsart der Eisen-Atome. Im *E.-coli*-Protein B2 sind sie gegen Reduktions- und Oxidationsmittel inert und auch nicht (wie in anderen „Nicht-Häm-Eisen“-Verbindungen) an anorganischen Schwefel gebunden, lassen sich durch vorsichtige Dialyse gegen 8-Hydroxychinolin-5-sulfonat und Imidazol aus dem Protein entfernen und durch Behandeln des enzyma-

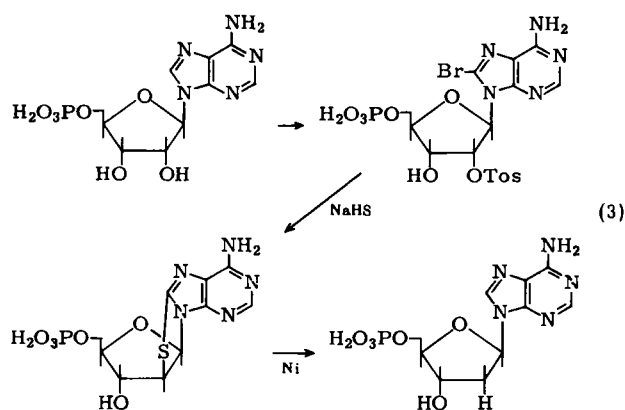
hält man sie für cytoplasmatische Enzyme, denn in Zellkernen, Mitochondrien und Mikrosomen der Rattenleber^[42] oder der Novikoff-Tumore^[68] ist nur geringe oder keine Reduktase-Aktivität festzustellen. Neuerdings haben sich Anhaltspunkte dafür ergeben, daß in diesen Geweben Ribonucleotid-Reduktase zusammen mit weiteren Enzymen der DNA-Biosynthese – Thymidylat-Synthetase, Thymidylat-Kinase und DNA-Polymerase II – als ein Enzymkomplex vorkommt^[68, 69]. Diese Enzym-Aktivitäten sedimentierten in der Ultrazentrifuge mit einer postmikrosomalen Membranfraktion unbekannter Her-

kunft und waren nach Zerstörung der Membranfragmente als Partikeln von 8.5–12 nm Größe elektronenoptisch sichtbar. Die Membrankomponente scheint für Aktivität und Zusammenhang der Enzyme nicht essentiell zu sein. Ähnliches Material mit hoher Reduktase-Aktivität war auch aus Thymus, Milz und HeLa-Zellen zu isolieren.

3. Wirkungsweise und Regulation

3.1. Die Reduktion der Hydroxygruppe

Wie wird eine der beiden sekundären Hydroxygruppen der Ribose bei pH = 7 und Körpertemperatur selektiv zur Methylengruppe reduziert? Als nicht-enzymatische Parallelen lassen sich Desoxygenierungen bei hoher Temperatur oder katalyti-



sche Hydrierungen für Nucleotid-Moleküle kaum anführen, und die einzige bekannte chemische Überführung eines Ribonucleotids (AMP) in das entsprechende Desoxyribonucleotid durch Verknüpfung der 2'-Hydroxygruppe und der Adeninbase und anschließende Entschwefelung des intermediären 8,2'-Anhydroadenosinethioäthers [Reaktion (3)]^[70] verläuft auch keineswegs unter physiologischen Bedingungen. Die hohe Spezifität der Enzymreaktion für Ribonucleotide mit ungestörter 2',3'-cis-Diolgruppierung^[81] läßt sich mit einer mehrfachen Fixierung der Substrate am Protein über die Phosphat-Ionen,

die Nucleobase und die 3'-Hydroxygruppe deuten (vgl. Abb. 4), aber die Aufklärung der Redoxreaktion selbst erweist sich für den Chemiker und Enzymologen als ein gleichermaßen schwieriges wie interessantes Problem.

Das Schicksal der beteiligten Atome und Gruppen ist in den Enzymen aus *E. coli* und *L. leichmannii* mit isotonen-substituierten Modellnucleotiden und spektroskopischen Techniken so gründlich studiert worden, daß man trotz der sehr unterschiedlichen Proteinstruktur und Cofaktoren an eine prinzipiell ähnliche Wirkungsweise dieser beiden bakteriellen Reduktasen denken kann. Es darf als sicher gelten, daß die 2'-Hydroxygruppe auf direktem Wege ohne Durchlaufen von Zwischenstufen reduziert wird [(Abb. 2 (a)]. Die im folgenden genannten Experimente schließen Reaktionsfolgen wie Dehydratisierung-Hydrierung (b) oder Oxidation-Reduktion (c) aus, und auch eine Aktivierung der Hydroxygruppe durch Phosphorylierung (d) ist nicht nachzuweisen, da synthetisches Cytidin-2'-phosphat-5'-diphosphat kein Reduktase-Substrat ist^[71]. In beiden Systemen tritt nur ein neues Wasserstoff-Atom unter Konfigurationserhaltung (Retention) am asymmetrischen C^{2'} in das Molekül ein. Dies folgt aus chemischen^[72, 73] und kernresonanzspektroskopischen Analysen^[74, 75] der erhaltenen monodeutierten (oder -tritierten) 2'-Desoxyribonucleotide, wenn die enzymatische Reduktion in ²H₂O oder ³H₂O und folglich mit deuteriertem oder tritiertem Dithiol R(S*H)₂ als Reduktionsmittel ausgeführt wird. Die Zuordnung der enzymatisch gebildeten Produkte wurde auch durch unabhängige Synthese der beiden epimeren [2'-(α- oder β-)Deuterio]-2'-desoxycytidine gesichert^[76]. Diese Ergebnisse sind nur mit dem direkten Weg (a) vereinbar und widerlegen zugleich eine – am Furanosering ohnehin unwahrscheinliche – unter Inversion verlaufende S_N2-Substitution der Hydroxygruppe.

Das coenzym-B₁₂-abhängige Enzym Diol-Dehydrase aus *Aerobacter aerogenes* katalysiert eine der Ribonucleotid-Reduktion verwandt erscheinende Oxidoreduktion von Propandiol zu Propionaldehyd, die unter Sauerstoff-Wanderung über eine Epoxid-Zwischenstufe verläuft [Reaktion (4)]^[77]. Durch Umsetzung spezifisch ¹⁸O-markierter Adenosintriphosphate^[78] mit *Lactobacillus*-Ribonucleotid-Reduktase haben wir bewiesen, daß in diesem System keine intramolekulare Wanderung der Sauerstoffatome 2' und 3' erfolgt, sondern O² völlig aus

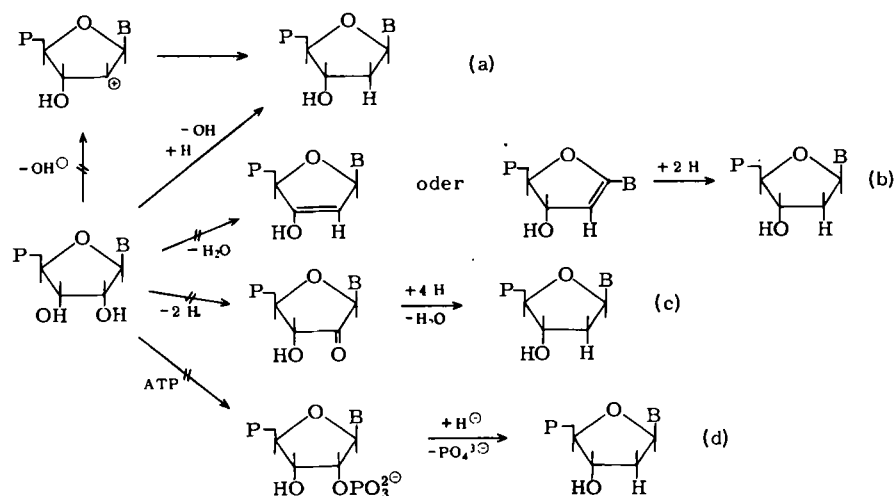
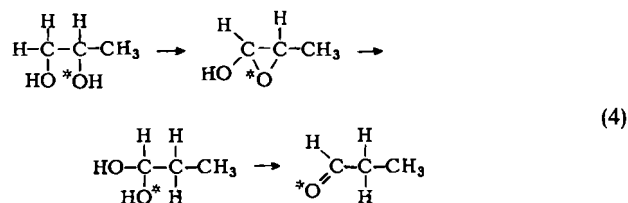


Abb. 2. Mögliche Reaktionswege für den Austausch der Ribose-2'-hydroxygruppe gegen Wasserstoff: a) Direkte Substitution, b) Dehydratisierung-Hydrierung, c) Oxidation-Reduktion, d) Aktivierung durch ATP. P = Phosphatrest, B = Nucleobase.

dem Molekül verschwindet und O^{2-} in $[3'-^{18}O]ATP$ von der Reduktion unberührt bleibt. Inkubiert man jedoch $[2'-^{18}O]ATP$ mit Enzym und Coenzym ohne Reduktionsmittel, so erfolgt auch keine Äquilibrierung des Isotopengehaltes an



O^{2-} mit $H_2^{16}O$, d. h. eine klassische S_N1 -Reaktion unter Ionisierung an $C^{2'}$ findet auf Weg (a) ebenfalls nicht statt^[79]. Das bis auf O^{2-} übereinstimmende Isotopenmuster der RNA und DNA von *E. coli* in ^{18}O -haltigem Medium^[14] zeigt, daß auch hier der $2'$ -Sauerstoff in ganz analoger Weise reaktiv entfernt wird.

Nucleotide, in denen die freie $2'$ -OH-Gruppe durch einen Phosphatrest^[71], durch einen Methoxy-^[81], Amino-, Azido- oder Chlorsubstituenten^[80] oder durch eine OH-Gruppe in der *arabino*-Konfiguration ersetzt ist^[81], werden durch Ribonucleotid-Reduktase nicht umgesetzt; aber auch $3'$ -Xylonucleotide, $3'$ -Desoxy-^[82, 83] und $3'$ -O-Methylribonucleotide werden nicht reduziert^[81]. Da die meisten dieser Verbindungen auch keine wirkungsvollen Inhibitoren sind, nehmen wir an, daß die $3'$ -Hydroxygruppe eine Bindungsstelle zum Enzym ist und Substrat-Bindung (an $3'$ -OH) sowie Substrat-Reduktion (an $2'$ -OH) konzertiert ablaufen. Alle diese Befunde lassen sich formal mit einer S_N1 -Reaktion vergleichen, bei der sich der Austausch der Hydroxygruppe in einem vorfixierten Komplex mit mehreren Reaktionspartnern (Enzymgruppen und reduzierendem Agens) unter Konfigurationserhaltung vollzieht.

Weit weniger Klarheit herrscht über die Wasserstoff-Übertragung zwischen Thioredoxin oder einem anderen Dithiol und der Ribose- $2'$ -Position. Es mehren sich experimentelle Hinweise dafür, daß in diesem Prozeß radikalische Zwischenstufen auftreten, die durch die Cofaktoren – Eisen-Atome bei *E. coli*, $5'$ -Desoxyadenosylcobalamin bei *L. leichmannii* – stabilisiert sind. So beobachtet man im Metalloprotein B2 ein organisches Radikal, das durch eine Lichtabsorption bei 410 nm und ein ESR-Signal bei $g = 2.0047$ charakterisiert ist und dessen Zerstörung (z. B. durch Hydroxylamin) ein Verlust der Enzym-Aktivität genau parallel geht^[67].

Noch direkter ist eine wasserstoff-übertragende Funktion des Coenzym im *Lactobacillus*-Reduktasesystem nachzuweisen. Seit längerem weiß man, daß dieses Enzym in Gegenwart von Dithiolen und eines Effektors wie dGTP einen Tritiumaustausch zwischen synthetischem $[5'-^3H]-5'$ -Desoxyadenosylcobalamin und Wasser – der als Aktivitätstest genutzt wird – oder umgekehrt zwischen 3H_2O und unmarkiertem Coenzym katalysiert und daß dieser Tritiumaustausch sowie die Substratreduktion durch Proteinreagentien wie *N*-Bromsuccinimid in gleicher Weise gehemmt werden^[26, 57].

Das reaktive Zwischenprodukt, in dem drei Wasserstoff-Atome an $C^{5'}$ des Coenzym gleichwertig sein müssen, ließ sich kürzlich mit Techniken schneller Reaktionen auffinden^[84, 85]; mit einer Halbwertszeit im Bereich 10–100 ms beobachtet man

eine Änderung des Coenzympektrums (mit dreiwertigem Kobalt als Zentralatom) zu einem Spektrum des reduzierten Cob(II)alamins und das Auftreten eines ESR-Signals bei $g = 2.119$, das mit einem enzymfixierten Komplex der Radikale $[>\dot{C}o^{2+}<]$ und $[5'$ -Desoxyadenosyl-] zu vereinbaren ist. In Substratgegenwart nimmt die Konzentration dieser Zwischenstufe rasch wieder ab. In langsamer, irreversibler Reaktion bilden sich daneben $5'$ -Desoxyadenosin und Aquocob(II)alamin, wobei andere ESR-Signale auftreten^[86]. Man darf annehmen, daß das durch homolytische, reversible Spaltung der $Co-C$ -Bindung im Coenzym entstehende Desoxyadenosyl-Radikal im Zusammenwirken mit einer oder mehreren Thiolgruppen sowohl für den Wasserstoff-Austausch als auch für die Reduktion der Ribose verantwortlich ist (Abb. 3).

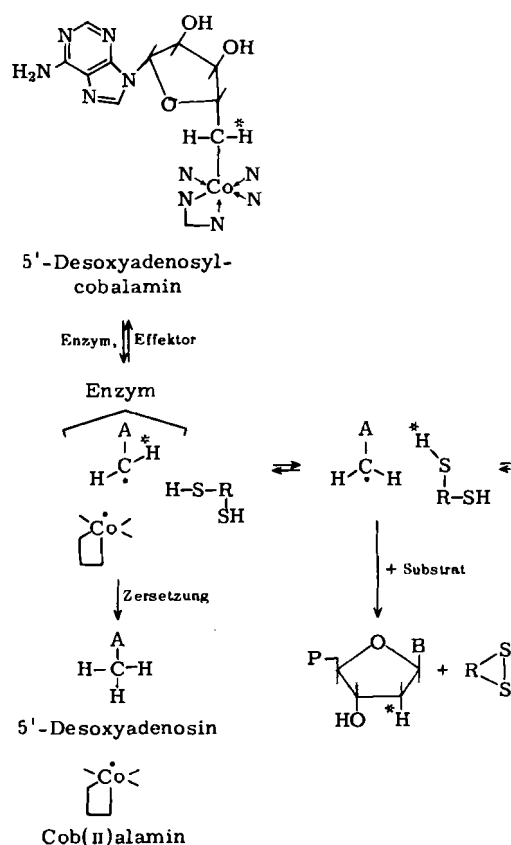


Abb. 3. Struktur und Funktion von $5'$ -Desoxyadenosylcobalamin (Coenzym B_{12}) bei der Ribonucleotid-Reduktase aus *L. leichmannii* (modifiziert nach [84]). Der Übergang eines Wasserstoffisotops (*) von markiertem Coenzym auf Wasser oder vom Wasser auf das Coenzym oder das Substrat wird deutlich. A = Adenosin – $C^{5'}$, B = Nucleobase, P = Phosphatreste, R = Thioredoxin oder Dithiol. Corrinringsystem und unterer axialer Ligand des Kobalts sind nur angedeutet.

Es dürfte schwierig sein, in solchen Enzym-Radikal-Thiol-Komplexen die Art des Wasserstoff-Transfers als letzten Schritt der Substrat-Reduktion getrennt zu analysieren. Ein einem Nucleotid-Radikal zuzuschreibendes ESR-Signal ließ sich bisher nicht beobachten. Es muß daher offenbleiben, ob die Hydroxygruppe letztlich durch ein Wasserstoff-Atom oder ein Hydrid-Ion ersetzt wird. Zur Beantwortung dieser Frage bedarf es auch genauerer Kenntnis der Aminosäureseitenketten im katalytischen Zentrum der Proteine, denn die Hydroxygruppe könnte beispielsweise von dort spezifisch protoniert und als Wasser übernommen werden. (Bisher wurde lediglich

die Beteiligung von Cysteinresten an der Aktivität beider bakterieller Reduktasen wahrscheinlich gemacht^[66, 87].)

Alle Beobachtungen zusammengekommen lassen einen hochgeordneten Übergangszustand aus Substrat, Aminosäuregruppen des Enzyms und einer reduzierenden Spezies aus Cofaktoren und SH-Gruppen erwarten, den ich als Momentaufnahme in Abbildung 4 zu beschreiben versuche. Die dynamische

beobachtet wird^[89]; selbst ganz unnatürliche und langsam reagierende Nucleotide wie (*N*-Ribofuranosylbenzimidazol)-5'-triphosphat unterliegen der Stimulation^[81].

Über die Wirkungsweise der Effektoren ist – wie in den meisten derartigen Fällen – wenig bekannt. Einige Beobachtungen weisen auf Konformationsänderungen am Protein hin, wie sie das Modell einer allosterischen Regulation vor-

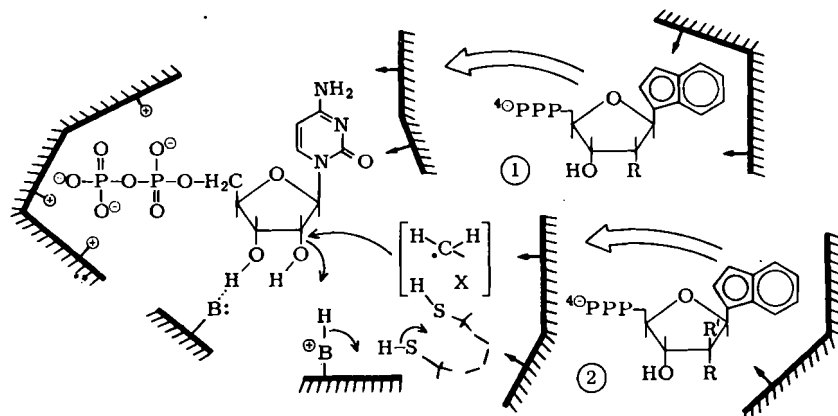


Abb. 4. Hypothetisches Modell des aktiven Zentrums einer Ribonucleotid-Reduktase. Das Substrat (Cytidindiphosphat) wird am Protein über die terminalen Phosphatreste sowie die 3'-Hydroxygruppe fixiert; die Güte der Bindung an der Nucleobase hängt von einem allosterischen Effektor ① ab. Die Reduktion an C² wird durch andere Effektoren ② stimuliert, die die Bindung des wasserstoff-liefernden Systems optimieren. X ist der Eisenkomplex bzw. das Cob(II)alamin-Radikal der Typ-I- bzw. Typ-II-Reduktasen. Pfeile am Protein symbolisieren Wechselwirkungen unbekannter Natur. B = basischer Aminosäurerest, P = Phosphate. R, R' = H oder OH.

Situation wird jedoch in Wirklichkeit durch die Bindung allosterischer Effektoren am Enzym noch wesentlich schwerer durchschaubar.

3.2. Regulation der Enzym-Aktivität

Die Beeinflussung des Substratsatzes durch Effektoren oder Modifizierer ist für Ribonucleotid-Reduktasen so charakteristisch, daß ihre Beschreibung viele Seiten füllt^[30, 57, 62, 65, 81 – 83, 88 – 91]. In erster Linie greifen Desoxyribonucleosidtriphosphate und ATP, aber auch modifizierte Nucleotide^[81 – 83] beschleunigend oder hemmend in die Enzymkatalyse ein, wobei sowohl K_m-Werte als auch Geschwindigkeitskonstanten der Substrate verändert werden. Tabelle 3 zeigt, daß es unter den Typ-I-Enzymen in dieser Hinsicht Ähnlichkeiten, aber auch große artspezifische Unterschiede gibt. Anders ist das Wirkungsmuster im Fall der *Lactobacillus*-Reduktase (Tabelle

Tabelle 4. Relative Reaktionsgeschwindigkeiten der Ribonucleotid-Reduktion durch *Lactobacillus*-Reduktase [81, 89].

Effektor	GTP	ATP	UTP	CTP	ITP [a]	BzTP [b]
ohne	100	20	14	36	6	0.2
dGTP	86	103				2
dCTP			37	31		
dATP		15		102		
dTTP					38	
araATP		11		36		

[a] Inosintriphosphat.

[b] (*N*-Ribofuranosylbenzimidazol)-5'-triphosphat.

sieht^[30, 42, 65, 66]. Man kann sich vorstellen, daß hierbei das katalytische Zentrum einer Reduktase besonders optimal oder weniger gut geordnet wird (Abb. 4). Umfangreiche Bindungsstudien^[21, 65] belegen, daß es zwei Klassen von regulatorischen

Tabelle 3. Wirkung von Nucleosidtriphosphaten auf die Ribonucleotid-Reduktion: Stimulierung (+) und Hemmung (–).

Effektor	<i>E. coli</i> [65, 90]				T4-Phage [62]				Novikoff-Tumor [88]			
	UDP	CDP	GDP	ADP	UDP	CDP	GDP	ADP	UDP	CDP	GDP	ADP
dTTP	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	+	+
dCTP					+	+						
dGTP			+	+			+	+	–	–	–	+
dATP	–	–	–	–	+	+	–		–	–	–	–
ATP	+	+			+	+			+	+	+	

4), bei der neben geringfügiger Produkthemmung eine ausgeprägte spezifische Stimulierung der Reduktion von ATP durch dGTP, von CTP durch dATP und von UTP durch dCTP

Zentren an den *E. coli*-Untereinheiten gibt, die einerseits die Substratspezifität und andererseits die Gesamtaktivität des Enzyms steuern.

Auch die *Lactobacillus*-Reduktase reagiert auf zwei Gruppen von Effekternucleotiden, von denen eine wiederum die Substratspezifität und die andere die Enzym-Coenzym-Wechselwirkung einschließlich des Tritiumaustausches betrifft^[81]. Eine regulierende Wirkung der Coenzymkonzentration auf Substrat- und Effektorbindung wird ebenfalls beobachtet^[89]. Die starke Basenspezifität all dieser Effekte läßt in den katalytischen wie regulatorischen Zentren erhebliche Bindungsanteile durch die Amino- und Ketosubstituenten der Nucleobasen erwarten, die noch kaum analysiert sind.

Es liegt nahe, aus den in Tabelle 3 und 4 zusammengestellten Regulationsphänomenen einen homöostatischen Mechanismus zu konstruieren, der eine ausgewogene Versorgung der Zelle mit allen vier Desoxyribonucleotiden sicherstellt: Häuft sich ein einzelnes Nucleotid während der DNA-Synthese an, so stimuliert es die Produktion der anderen; wird dagegen keine DNA mehr gebildet, dann hemmt eine Anhäufung bestimmter Nucleotide auch die weitere Ribonucleotid-Reduktion. Detaillierte derartige Modelle wurden vorgeschlagen^[88-91].

dUDP) entstehen müssen, ehe sie eine Kontrolle durch Rückkopplung („Feedback“) ausüben können^[13]. Veränderungen der Desoxyribonucleotid-Pools in Gewebekulturen unter dem Einfluß von Thymidin und anderen Nucleosiden im Medium sprechen für die allosterische Regulation auch in intakten Zellen^[117].

4. Das wasserstoff-liefernde Thioredoxinsystem

Der zur Ribonucleotid-Reduktion benötigte Wasserstoff stammt letztlich aus dem für synthetische Zwecke verfügbaren NADPH-Pool der Zelle, doch wird er nur unter Zwischenschaltung eines spezifischen „Redoxins“ verwendet. Das Thioredoxinsystem – zuerst in *E. coli* aufgefunden – besteht, wie bereits erwähnt (Abschnitt 2.1), aus dem kleinen Protein Thioredoxin, dessen Cysteinreste reversibel zwischen Dithiol- und Disulfidform wechseln, und aus dem Flavoenzym Thioredoxin-Reduktase, das für die Rück-Reduktion des oxidierten Thioredoxins sorgt. Unter Einbeziehung der (wahrscheinlichen) Vorgänge an Enzymen und Coenzymen ergibt sich damit ein vielstufiger

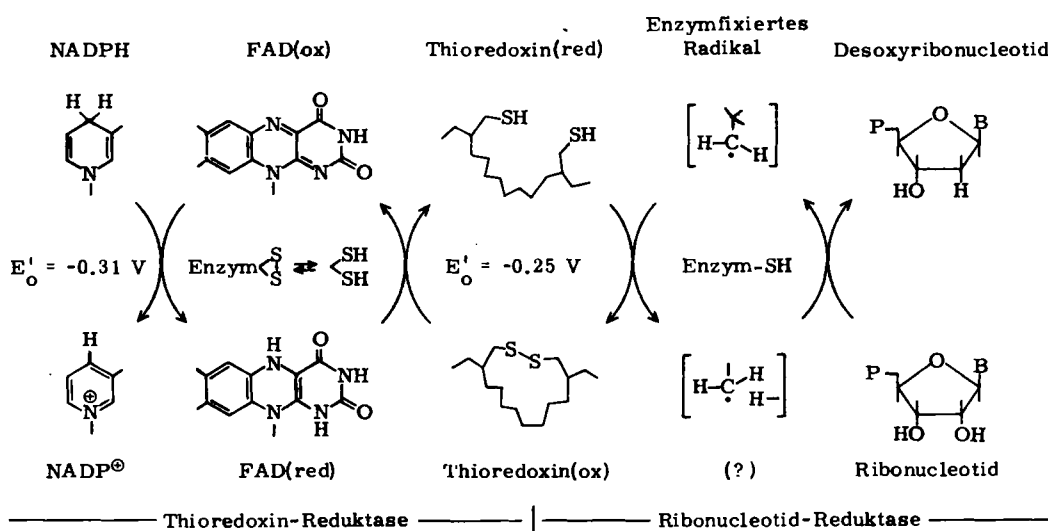


Abb. 5. Zwischenstufen der Wasserstoff-Übertragung von NADPH auf Ribonucleotide durch Thioredoxin-Reduktase und Ribonucleotid-Reduktase. In der vorletzten Stufe ist die Struktur des 5'-Desoxyadenosylrestes (Typ-II-Reduktasen) angedeutet (vgl. Abb. 3). P = Phosphatreste, B = Nucleobase.

In welchem Ausmaß diese Regulation in vivo tatsächlich verwirklicht ist, läßt sich freilich aus dem Verhalten der isolierten Ribonucleotid-Reduktasen bei zum Teil unphysiologischen Konzentrationsverhältnissen schwer beurteilen. Eine andere Unbekannte ist die Geschwindigkeit und Kontrolle der Biosynthesewege, auf denen Effekternucleotide (insbesondere dTTP) erst aus den primären Reduktionsprodukten (z. B.

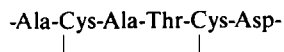
Wasserstoff- und Elektronentransport von NADPH bis zur Ribose (Abb. 5).

Thioredoxine sind hitzestabile, aus etwa 100 Aminosäuren aufgebaute Polypeptide mit einem Molekulargewicht um 12000, die aus dem Phagen T4, aus Bakterien, Hefe und Leber isoliert worden sind (Tabelle 5). Sie besitzen selbst keine Enzym-Aktivität, sondern enthalten als aktives Zentrum

Tabelle 5. Molekulargewichte und andere Eigenschaften von Thioredoxin und Thioredoxin-Reduktasen.

Herkunft	Thioredoxin	Thioredoxin-Reduktase	Lit.
<i>Escherichia coli</i>	11 657, 108 Aminosäuren, 2 Cys	66000-73000, 2 Peptidketten, 2 FAD	[92, 99, 101, 104]
T4-Phage	87 Aminosäuren, 2 Cys	nicht nachgewiesen	[93]
<i>Lactobacillus leichmannii</i>	12000	55000	[94]
Hefe	12600, ca. 120 Aminosäuren, 4 Cys	75000, 2 Untereinheiten, 2 FAD	[95, 102, 119]
Rattenleber	noch nicht bis zur Homogenität gereinigt		[96, 100]
Kalbsleber	12000, 103 Aminosäuren, 4 Cys		[97]
Novikoff-Tumor	12 100, 109 Aminosäuren, 6 Cys	66 700	[98]

zwei Cysteine, die durch zwei andere Aminosäuren voneinander getrennt sind; in *E. coli* und Hefe^[101, 102] hat dieser Bereich jeweils die Sequenz -Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys-, beim T4-Phagen heißt sie -Lys-Cys-Val-Tyr-Cys-Asp-^[93]. Die Oxidation zum Disulfid unter Bildung eines 14gliedrigen Ringes ist von beträchtlichen lokalen Konformationsänderungen begleitet, die von der wechselnden Tryptophan-Fluoreszenz der Moleküle direkt angezeigt werden^[103]. Die NADPH-spezifischen Thioredoxin-Reduktasen, deren Existenz ebenfalls in mehreren Geweben nachgewiesen wurde (Tabelle 5), enthalten – ähnlich wie Glutathion-Reduktase – FAD als prosthetische Gruppe; daneben nimmt im *E.-coli*-Enzym wiederum eine Disulfidgruppierung der Sequenz



am Redoxvorgang teil^[104].

Thioredoxine, Thioredoxin-Reduktasen und Ribonucleotid-Reduktasen verschiedener Arten sind in heterologen Mischungen von wechselnder Aktivität, ohne daß sich bisher eine Systematik ihrer Austauschbarkeit erkennen ließe. Das leicht zugängliche *E.-coli*-Thioredoxin hat sich als Wasserstoffdonor für die *Lactobacillus*- und Hefe-Ribonucleotid-Reduktasen bewährt^[105, 32], aber ist für die Reduktasen des T4-Phagen und des Weizens inaktiv^[62, 33]. Während die *E.-coli*-Ribonucleotid-Reduktase alle bekannten Thioredoxine akzeptiert, ist die Thioredoxin-Reduktase des gleichen Bakteriums streng spezifisch für das eigene oxidierte Thioredoxin und das des T4-Phagen^[93–95, 98].

Ribonucleotid- und Thioredoxin-Reduktion stehen mit anderen Stoffwechselwegen der Zelle kaum in Zusammenhang. Lediglich eine Beteiligung des Thioredoxinsystems an der Reduktion von Methioninsulfoxid und Sulfat in Hefe wurde nachgewiesen^[106], und in anaeroben Mikroorganismen könnten Nitrat-Reduktion und Ribonucleotid-Reduktion ein gemeinsames wasserstoff-lieferndes System haben^[128]. Die Ribonucleotid-Reduktion nach Abbildung 5 ist nicht reversibel; nach dem eingangs Gesagten ist ein allgemeiner Biosyntheseweg von Desoxyribonucleotiden zu Ribonucleotiden auch nicht zu erwarten. Eine enzymatische Hydroxylierung von Thymidin oder 2'-Desoxyuridin zu Ribothymidin bzw. Uridin kommt jedoch vor, und zwar als erster Schritt der oxidativen Umwandlung von Thymidin in Uracil^[107]. Eine aus dem Schimmelpilz *Neurospora crassa* isolierte Pyrimidin-2'-desoxyribonucleosid-2'-Hydroxylase katalysiert diese Reaktion mit Sauerstoff, Ketoglutarat, Eisen(II)-Ionen und Ascorbat als Substraten und Cofaktoren.

5. Ribonucleotid-Reduktion und Wachstum

Ribonucleotid-Reduktase ist in trockenen Weizenkörnern oder in unbefruchteten Seeigeleiern nicht nachzuweisen, aber binnen weniger Stunden nach dem Beginn der Keimung bzw. nach der Befruchtung zeigen Extrakte dieser Gewebe die Fähigkeit zur Ribonucleotid-Reduktion^[33, 35]. Entfernt man Ratten einen Teil der Leber, so steigt zwischen 20 und 50 h nach der Operation die Ribonucleotid-Reduktase-Aktivität des sich regenerierenden Gewebes auf das 20fache des normalen Wertes^[42, 43], und gleichzeitig nehmen die Desoxyribonucleotid-

Pools stark zu^[108]. Im Gehirn von Hühner- und Rattenembryonen fällt ein ausgeprägtes Maximum dieser Enzym-Aktivität zeitlich ungefähr mit der stärksten Vermehrung von Neuroblasten zusammen^[47].

Noch deutlicher wird die Schlüsselfunktion der Ribonucleotid-Reduktase für das Zellwachstum, wenn man ihre Aktivität (oder die Größe der dNTP-Pools) während des Teilungszyklus in Kulturen synchronisierter Zellen verfolgt und mit der DNA-Synthese vergleicht. In L-Zellen der Maus^[41] und – besonders gut sichtbar (Abb. 6) – in Hefezellen^[109] erreicht die Ribonucleotid-Reduktase ihren Gipfel kurz vor der stärksten DNA-Produktion während der S-Phase (das ist die Synthesephase zwischen zwei Zellteilungen). Die Menge der in synchronisierten Säugerzellen (Maus, Hamster)^[6–9] vorhandenen vier Desoxyribonucleotide steigt ebenfalls erst während der S-Phase etwa 10fach an und fällt in der frühen G2-Phase, während oder kurz nach dem DNA-Synthesemaximum wieder ab.

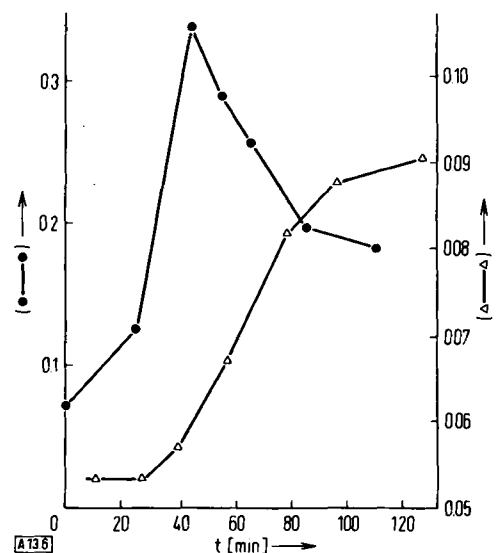


Abb. 6. Ribonucleotid-Reduktase-Aktivität (● – ●) und DNA-Produktion (▲ – ▲) in synchronisierten Hefezellen (nach [109]). Linke Ordinate: nmol umgesetztes Substrat pro mg Protein pro min; rechte Ordinate: mg DNA pro 100 ml Kultur; Abszisse: Inkubationszeit der Hefekultur.

Die Wirkung von Hemmstoffen der Proteinbiosynthese wie Actinomycin^[43], Puromycin^[35] oder Cycloheximid^[41, 109] in vielen dieser Gewebe macht es überaus wahrscheinlich, daß die Zu- und Abnahme der Ribonucleotid-Reduktion tatsächlich auf Induktion bzw. Fehlen der Enzymsynthese beruht. Der frühe Zeitpunkt des Auftretens von Ribonucleotid-Reduktasen in wachsenden Zellen ist mit dem stufenweisen Start von mRNA-, Protein- und DNA-Produktion^[110] gut zu vereinbaren. Keine derart ausgeprägten wachstumsabhängigen Schwankungen wurden dagegen für vor- und nachgeschaltete Enzyme wie Thioredoxin-Reduktase^[100] und DNA-Polymerase^[35, 41] beobachtet.

Für das Bakterium *Escherichia coli* ist Ribonucleotid-Reduktase ebenso essentiell wie für eukaryotische Zellen. Kürzlich wurden zwei Mutanten E101^[111] und LD195^[112] isoliert, in denen die Proteine B1 bzw. B2 der Reduktase nur einen kleinen Bruchteil der Aktivität des Wildtyps aufweisen und temperaturempfindlich sind. Damit wurde der Genlocus *dnaF* (einer von sieben für die DNA-Synthese verantwortlichen) als Strukturgen für Ribonucleotid-Reduktase identifiziert. Die-

se Bakterien können sich bei 37–42°C nur noch vermehren, wenn man ihnen Desoxyribonucleoside im Medium anbietet, und werden außerdem durch Hydroxyharnstoff^[58] 20mal stärker im Wachstum gehemmt als der Wildtyp. Ebenso kann Coenzym B₁₂ für die Typ-II-Reduktasen limitierend sein: Das Knöllchenbakterium *Rhizobium meliloti* zeigt Wachstumsstörungen und verringerten DNA-Gehalt der Zellen, wenn ihm Kobalt, das zentrale Metall-Atom des Desoxyadenosylcobalamins, fehlt^[113].

Ihre bedeutsame Mitwirkung bei DNA-Synthese und Zellvermehrung macht die Ribonucleotid-Reduktasen (und ihre Hemmung) schließlich zu einem aktuellen Studienobjekt in virusinfizierten und in Tumorgeweben. T4-Phagen enthalten drei Gene *nrda*, B und C, als deren Produkte in der Wirtszelle phagen-spezifische Ribonucleotid-Reduktase und Thioredoxin (aber keine Thioredoxin-Reduktase) gebildet werden, die mit den Bakterienproteinen nur entfernte Ähnlichkeit haben^[23, 24, 62, 114]. In polyomavirus-infizierten Nierenzellen^[40], in Yabavirus-Tumoren^[49] und in der mit Leukämieviren infizierten Maus^[46] stellt man zwar erhöhte spezifische Reduktase-Aktivitäten fest, aber i. a. keine qualitativen Unterschiede gegenüber normalen Säugerenzymen. Ob pflanzliche und tierische pathogene Viren und insbesondere die onkogenen RNA-Viren spezifische Ribonucleotid-Reduktasen besitzen, läßt sich demnach nicht mit Sicherheit sagen, solange nicht reine Enzyme aus normalen und infizierten Geweben verfügbar sind. In Rattentumoren und gesunder Rattenleber haben sich ebenfalls noch keine offensichtlichen Unterschiede der Reduktasesysteme ergeben. Dennoch verdient die Ribonucleotid-Reduktion in Tumoren schon im Hinblick auf diagnostische und chemotherapeutische Zwecke große Beachtung, seit *Elford* einen eklatanten Zusammenhang der Wachstumsgeschwindigkeit zahlreicher Rattenhepatome und dieser Enzym-Aktivität nachweisen konnte^[50]: Die sehr rasch wuchernden Novikoff- und Walker-Tumoren zeigen bis 500mal höhere Reduktase-Aktivität als die am langsamsten wachsenden Tumoren. Zusammenhänge werden denkbar zwischen der cytotoxischen Wirkung von Hydroxyharnstoff und Arabinonucleosiden für maligne und normale Gewebe in vivo und ihrem inhibierenden Effekt auf Ribonucleotid-Reduktasen in vitro^[36, 58, 81, 115]; durch beide Substanzen wird am stärksten die DNA-Synthese, weniger die RNA- und Proteinsynthese gehemmt. Andererseits darf man nicht übersehen, daß am Nucleinsäure-Stoffwechsel einer Zelle zwei Dutzend Nucleotide und nicht viel weniger Enzyme teilnehmen, so daß die Rolle eines einzelnen Enzyms zwar wichtig, aber kaum alleinbestimmend für ein komplexes Geschehen wie die DNA-Replikation sein kann.

6. Ausblick

Zahlreiche chemisch und biologisch interessante Aspekte der Ribonucleotid-Reduktion bedürfen der weiteren Aufklärung: Reaktionsmechanismus, Struktur der aktiven Zentren und Wirkungsweise der Effektor-Moleküle am Protein, Initiation und Repression der Enzym-Biosynthese. Wenn auch heute über die auslösenden Faktoren der Enzym-Induktion noch völlige Unklarheit herrscht, so sind doch für die Zukunft regulierende Eingriffe in normales wie pathologisches Zellwachstum über diese Schlüsselenzyme denkbar. Die Existenz zweier ganz verschiedener Ribonucleotid-Reduktasesysteme

zur Katalyse einer grundlegenden Stoffwechselreaktion ist bemerkenswert. Eine umfassende Charakterisierung von Ribonucleotid-Reduktion und Thioredoxinsystem in weiteren Organismen unterschiedlicher Entwicklungshöhe scheint uns vordringlich, um die Verbreitung der Enzymtypen und Regulationsmuster deutlich zu machen. Nicht zuletzt sind hieraus neue Kenntnisse über die Evolution und Phylogenie der Lebewesen zu erwarten, denn es fällt auf, daß die meisten Modelle zur Entstehung des Lebens den Übergang von Ribonucleotiden oder RNA zu DNA als selbstvermehrungsfähigem Material – ein nicht-enzymatisch kaum vorstellbarer Schritt – gar nicht in Rechnung setzen^[116]. Schließlich ist die Suche nach neuen, möglicherweise einfacher zu handhabenden Ribonucleotid-Reduktasen vom Standpunkt der präparativen Nucleotidchemie aus interessant, weil sie den Zugang zu modifizierten Desoxyribonucleotiden aus den viel besser zugänglichen Ribonucleotiden erleichtern könnten. Das in letzter Zeit rasch zunehmende Interesse an der Ribonucleotid-Reduktion verspricht Antwort auf einige dieser Fragen.

Die in diesem Bericht erwähnten eigenen Arbeiten werden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert. Ich danke auch Harry Hogenkamp und Ray Blakley (Iowa City) für ihre großzügige Unterstützung und zahlreichen anderen Kollegen für die freundliche Mitteilung neuerer Forschungsergebnisse.

Eingegangen am 18. Januar 1974 [A 13]

- [1] S. C. Hartmann u. S. Kit in D. M. Greenberg: Metabolic Pathways. Academic Press, New York 1970, 3. Aufl., Bd. 4, Kap. 19 u. 20.
- [2] W. T. Hsieh, J. Mol. Biol. 66, 195 (1972).
- [3] R. Werner, Nature New Biol. 233, 99 (1971).
- [4] A. W. Solter u. R. E. Handschumacher, Biochim. Biophys. Acta 174, 585 (1969).
- [5] L. Skoog, Eur. J. Biochem. 17, 202 (1970).
- [6] B. A. Nordenskjöld, L. Skoog, N. L. Brown u. P. Reichard, J. Biol. Chem. 245, 5360 (1970).
- [7] R. L. P. Adams, S. Berryman u. A. Thomson, Biochim. Biophys. Acta 240, 455 (1971).
- [8] K. L. Skoog, B. A. Nordenskjöld u. K. G. Bjursell, Eur. J. Biochem. 33, 428 (1973).
- [9] R. A. Walters, R. A. Tobey u. R. L. Ratliff, Biochim. Biophys. Acta 319, 336 (1973).
- [10] E. Liss, S. Brammer u. H. Schmidt, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 682 (1973).
- [11] K. L. Skoog u. G. Bjursell, J. Biol. Chem. 249 (1974), im Druck. Eine Anreicherung im Zellkern während der S-Phase führt dort zu einer dNTP-Konzentration von etwa 10^{-3} mol/l.
- [12] H. R. Woodland u. R. Q. W. Pestell, Biochem. J. 127, 597 (1972).
- [13] R. L. Blakley u. E. Vitols, Annu. Rev. Biochem. 37, 201 (1968).
- [14] R. Caprioli u. D. Rittenberg, Biochemistry 8, 3375 (1969).
- [15] E. Racker, J. Biol. Chem. 196, 347 (1952).
- [16] K. Hammer-Jespersen, A. Munch-Petersen, P. Nygaard u. M. Schwartz, Eur. J. Biochem. 19, 533 (1971).
- [17] E. Hammursten, P. Reichard u. E. Saluste, J. Biol. Chem. 183, 105 (1950).
- [18] I. A. Rose u. B. S. Schweigert, J. Biol. Chem. 202, 635 (1953).
- [19] P. Reichard, A. Baldesten u. L. Ruthberg, J. Biol. Chem. 236, 1150 (1961).
- [20] Die kürzlich in Enzyme Nomenclature 1972 (Elsevier, Amsterdam) getroffene Klassifizierung als 2'-Desoxyribonucleotid:oxid. Thioredoxin-2'-Oxidoreduktasen (EC 1.17.4) erscheint wenig glücklich, da die ihr zugrundeliegende Gegenreaktion der Ribonucleotid-Reduktion nicht existiert; außerdem handelt es sich nicht, wie dort vermerkt, um Eisen-Schwefel-Proteine.
- [21] P. Reichard, Eur. J. Biochem. 3, 259 (1968).
- [22] A. Larsson u. P. Reichard, Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 7, 303 (1967).
- [23] O. Berglund u. O. Karlström, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 62, 829 (1969).

- [24] Y. C. Yeh, E. J. Dubovi u. I. Tessman, *Virology* 37, 615 (1969).
- [25] R. L. Blakley u. H. A. Barker, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 16, 391 (1964).
- [26] R. H. Abeles u. W. S. Beck, *J. Biol. Chem.* 242, 3589 (1967).
- [27] J. R. Cowles u. H. J. Evans, *Arch. Biochem. Biophys.* 127, 770 (1968).
- [28] F. K. Gleason u. H. P. C. Hogenkamp, *Biochim. Biophys. Acta* 277, 466 (1972).
- [29] S. Yan u. J. T. Wachsman, *Mol. Cell. Biochem.* 1, 101 (1973).
- [30] G. N. Sando u. H. P. C. Hogenkamp, *Biochemistry* 12, 3316 (1973).
- [31] F. K. Gleason u. H. P. C. Hogenkamp, *J. Biol. Chem.* 245, 4894 (1970).
- [32] E. Vitols, V. A. Bauer u. E. C. Stanbrough, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41, 71 (1970).
- [33] H. Müller, R. Wühl, I. Kuntz u. H. Follmann, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 354, 1299 (1973).
- [34] J. R. Cowles u. J. G. Guevara sowie B. Horemann, unveröffentlicht.
- [35] J. M. Noronha, G. H. Sheys u. J. M. Buchanan, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69, 2006 (1972).
- [36] M. Swindlehurst, S. J. Berry u. W. Firshein, *Biochim. Biophys. Acta* 228, 313 (1971).
- [37] P. Reichard, *J. Biol. Chem.* 236, 2511 (1961).
- [38] S. Murphee, E. C. Moore u. P. T. Beall, *Cancer Res.* 28, 860 (1968).
- [39] R. Abrams, L. Libenson u. M. Edmonds, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 3, 272 (1960).
- [40] J. Kura u. R. Weil, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 57, 63 (1967).
- [41] M. K. Turner, R. Abrams u. L. Lieberman, *J. Biol. Chem.* 243, 3725 (1968).
- [42] A. Larsson, *Eur. J. Biochem.* 11, 113 (1969); *Biochim. Biophys. Acta* 324, 449 (1973).
- [43] C. D. King u. J. L. vanLanker, *Arch. Biochem. Biophys.* 129, 603 (1969).
- [44] S. Fujioka u. R. Silber, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 35, 759 (1969).
- [45] S. Hopper, *J. Biol. Chem.* 247, 3336 (1972).
- [46] S. Fujioka u. R. Silber, *J. Biol. Chem.* 245, 1688 (1970).
- [47] S. A. Millard, *J. Biol. Chem.* 247, 2395 (1972).
- [48] E. C. Moore u. R. B. Hurlbert, *Biochim. Biophys. Acta* 40, 371 (1960); 55, 651 (1962).
- [49] H. L. Gordon u. R. J. Fiel, *Cancer Res.* 29, 1350 (1969).
- [50] H. L. Elford, M. Freese, E. Passamani u. H. P. Morris, *J. Biol. Chem.* 245, 5228 (1970).
- [51] R. H. Yamada u. H. P. C. Hogenkamp, *J. Biol. Chem.* 247, 6266 (1972).
- [52] O. Berglund u. F. Eckstein, *Eur. J. Biochem.* 28, 492 (1972).
- [53] P. Reichard, *Acta Chem. Scand.* 12, 2048 (1958).
- [54] A. W. Schrecker, D. W. Jacobsen u. J. Kirchner, *Anal. Biochem.* 26, 474 (1968).
- [55] R. L. Blakley, *J. Biol. Chem.* 241, 176 (1966).
- [56] A. Holmgren, P. Reichard u. L. Thelander, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 54, 830 (1965).
- [57] H. P. C. Hogenkamp, R. K. Ghambeer, C. Brownson, R. L. Blakley u. E. Vitols, *J. Biol. Chem.* 243, 799 (1968).
- [58] a) I. H. Krakoff, N. C. Brown u. P. Reichard, *Cancer Res.* 28, 1559 (1968); b) E. C. Moore, *ibid.* 29, 291 (1969).
- [59] E. C. Moore, M. S. Zedeck, K. C. Agrawal u. A. C. Sartorelli, *Biochemistry* 9, 4492 (1970).
- [60] Beispielsweise bei den Reaktionen der Glutamat-Mutase, Methylmalonyl-CoA-Mutase und Diol-Dehydrase; siehe H. P. C. Hogenkamp, *Annu. Rev. Biochem.* 37, 225 (1968).
- [61] N. C. Brown, Z. N. Canellakis, B. Lundin, P. Reichard u. L. Thelander, *Eur. J. Biochem.* 9, 561 (1969).
- [62] O. Berglund, *J. Biol. Chem.* 247, 7270, 7276 (1972).
- [63] E. C. Moore, *Methods Enzymol.* 12a, 155 (1967) und unveröffentlichte Ergebnisse.
- [64] D. Panagou, M. D. Orr, J. R. Dunstone u. R. L. Blakley, *Biochemistry* 11, 2378 (1972).
- [65] N. C. Brown u. P. Reichard, *J. Mol. Biol.* 46, 25, 39 (1969).
- [66] L. Thelander, *J. Biol. Chem.* 248, 4591 (1973).
- [67] C. L. Atkin, L. Thelander, P. Reichard u. G. Lang, *J. Biol. Chem.* 243, 7464 (1973).
- [68] H. L. Elford, unveröffentlicht.
- [69] E. Baril, B. Baril, R. B. Luftig u. H. Elford, unveröffentlicht.
- [70] M. Ikehara u. S. Uesugi, *Tetrahedron Lett.* 1970, 713.
- [71] J. P. Verheyden u. J. G. Moffatt, *J. Amer. Chem. Soc.* 86, 1236 (1964).
- [72] A. Larsson, *Biochemistry* 4, 1984 (1965).
- [73] S. David u. C. Ronzeau, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43, 46 (1971).
- [74] L. J. Durham, A. Larsson u. P. Reichard, *Eur. J. Biochem.* 1, 92 (1967).
- [75] T. J. Batterham, R. K. Ghambeer, R. L. Blakley u. C. Brownson, *Biochemistry* 6, 1203 (1967).
- [76] B. Fraser-Reid u. B. Radatus, *J. Amer. Chem. Soc.* 93, 6342 (1971).
- [77] J. Retey, A. Umani-Ronchi, J. Seibl u. D. Arigoni, *Experientia* 22, 502 (1966).
- [78] H. Follmann u. H. P. C. Hogenkamp, *J. Amer. Chem. Soc.* 92, 671 (1970).
- [79] H. Follmann u. H. P. C. Hogenkamp, *Biochemistry* 8, 4372 (1969).
- [80] F. Eckstein u. L. Thelander, unveröffentlichte Versuche.
- [81] H. Follmann u. H. P. C. Hogenkamp, *Biochemistry* 10, 186 (1971).
- [82] R. L. Suhadolnik, S. I. Finkel u. B. M. Chassy, *J. Biol. Chem.* 243, 3532 (1968).
- [83] B. M. Chassy u. R. L. Suhadolnik, *J. Biol. Chem.* 243, 3538 (1968).
- [84] Y. Tamao u. R. L. Blakley, *Biochemistry* 12, 24 (1973).
- [85] W. B. Orme-Johnson, H. Beinert u. R. L. Blakley, *J. Biol. Chem.* 249, 2338 (1974).
- [86] J. A. Hamilton, Y. Tamao, R. L. Blakley u. R. E. Coffinan, *Biochemistry* 11, 4696 (1972), u. dort zit. Lit.
- [87] E. Vitols, H. P. C. Hogenkamp, C. Brownson, R. L. Blakley u. J. Connellan, *Biochem. J.* 104, 58c (1967).
- [88] E. C. Moore u. R. B. Hurlbert, *J. Biol. Chem.* 241, 4802 (1966).
- [89] E. Vitols, C. Brownson, W. Gardiner u. R. L. Blakley, *J. Biol. Chem.* 242, 3035 (1967).
- [90] A. Larsson u. P. Reichard, *J. Biol. Chem.* 241, 2540 (1966).
- [91] W. Beck, *J. Biol. Chem.* 242, 3148 (1967).
- [92] T. C. Laurent, E. C. Moore u. P. Reichard, *J. Biol. Chem.* 239, 3436, 3445 (1964).
- [93] B. M. Sjöberg u. A. Holmgren, *J. Biol. Chem.* 247, 8063 (1972).
- [94] M. D. Orr u. E. Vitols, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 25, 109 (1966).
- [95] P. G. Ponqué, A. Baldesten u. P. Reichard, *J. Biol. Chem.* 245, 2363 (1970).
- [96] G. Larson u. A. Larsson, *Eur. J. Biochem.* 26, 119 (1972).
- [97] N. E. Engström, A. Holmgren, A. Larsson u. S. Söderhäll, *J. Biol. Chem.* 205 (1974).
- [98] E. C. Herrmann u. E. C. Moore, *J. Biol. Chem.* 248, 1219 (1973).
- [99] L. Thelander, *J. Biol. Chem.* 242, 825 (1967).
- [100] A. Larsson, *Eur. J. Biochem.* 35, 346 (1973).
- [101] A. Holmgren, *Eur. J. Biochem.* 6, 475 (1968).
- [102] D. E. Hull, A. Baldesten, A. Holmgren u. P. Reichard, *Eur. J. Biochem.* 23, 328 (1971).
- [103] A. Holmgren, *J. Biol. Chem.* 248, 4106 (1973).
- [104] S. Ronchi u. C. H. Williams, *J. Biol. Chem.* 247, 2083 (1972).
- [105] W. S. Beck, M. Goulian, A. Larsson u. P. Reichard, *J. Biol. Chem.* 241, 2177 (1966).
- [106] G. P. Ponqué, A. Baldesten u. P. Reichard, *J. Biol. Chem.* 245, 2371 (1970).
- [107] C. K. Liu, P. M. Shaffer, R. S. Slaughter, P. M. McCroskey u. M. T. Abbott, *Biochemistry* 11, 2172 (1972).
- [108] S. S. Söderhäll, A. Larsson u. K. L. Skoog, *Eur. J. Biochem.* 33, 36 (1973).
- [109] M. Lowdon u. E. Vitols, *Arch. Biochem. Biophys.* 158, 177 (1973).
- [110] Beispielsweise in keimenden Weizenkörnern: M. Dobrzanska, T. Tomaszewski, Z. Grzelczak, E. Rejman u. J. Buchowicz, *Nature* 244, 607 (1973).
- [111] J. A. Fuchs, H. O. Karlström, H. R. Warner u. P. Reichard, *Nature New Biol.* 238, 69 (1972).
- [112] J. A. Fuchs, J. Neuhard u. H. O. Karlström, *Eur. J. Biochem.* 32, 451, 457 (1973).
- [113] J. R. Cowles, H. J. Evans u. S. A. Russell, *J. Bacteriol.* 97, 1460 (1969).
- [114] Y. C. Yeh u. I. Tessman, *J. Biol. Chem.* 247, 3252 (1972).
- [115] Siehe z.B. D. B. Smith u. H. Y. Chu, *Cancer Res.* 32, 1651 (1972), und dort zit. Lit.
- [116] Vgl. H. Kuhn, *Angew. Chem.* 84, 838 (1972); *Angew. Chem. internat. Edit.* 11, 798 (1972).
- [117] G. Bjursell u. P. Reichard, *J. Biol. Chem.* 248, 3904 (1973).
- [118] J. G. Cory, F. A. Russell u. M. M. Mansell, *Anal. Biochem.* 55, 449 (1973).
- [119] M. L. Speranza, S. Ronchi u. L. Minchiotti, *Biochim. Biophys. Acta* 327, 274 (1973).