

Der Pyruvatdehydrogenase-Multienzymkomplex

Von Ferdinand Hucho^[*]

Die drei Enzyme Pyruvat-Dehydrogenase, Dihydrolipoamid-Transacetylase und Dihydrolipoamid-Dehydrogenase bilden den Pyruvatdehydrogenase-Multienzymkomplex von *E. coli*; beim Säugetier-Komplex treten noch eine Kinase und eine Phosphatase hinzu. Multienzymkomplexe sind strukturelle, funktionelle und regulatorische Einheiten. Sie ermöglichen es dem Organismus, ökonomischer als mit einzelnen Enzymen zu arbeiten. Möglicherweise steht der Pyruvatdehydrogenase-Multienzymkomplex an der Schaltstelle zwischen Energiestoffwechsel und Gluconeogenese.

1. Einleitung

Multienzymkomplexe sind Proteine, in denen mehrere Enzyme in konstanten Mengenverhältnissen – nicht-kovalent miteinander verbunden – ein stabiles, hochgeordnetes Assoziat bilden. Häufig katalysieren die Teilenzyme der Komplexe aufeinanderfolgende Schritte einer Stoffwechselsequenz. Die Multienzymkomplexe nehmen eine Zwischenstellung ein zwischen kooperierenden, aber strukturell voneinander unabhängigen, „löslichen“ Enzymen einerseits und membrangebundenen unlöslichen Enzymsystemen andererseits (Abb. 1). Sie können daher als Modell für beide Gruppen dienen. Typische Beispiele für die Gruppe der strukturell voneinander unabhängigen löslichen Enzymsysteme sind die Enzyme der Glykolyse oder des Citronensäurezyklus, für die unlöslichen die Atmungskettenproteine der Mitochondrien- oder die Photosyntheseproteine der Chloroplastenmembran. Beispiele für Multienzymkomplexe sind die α -Ketosäure-Dehydrogenasen, die Fett säure-Synthetase und die Enzymkomplexe, die sich an der Synthese aromatischer Aminosäuren beteiligen.

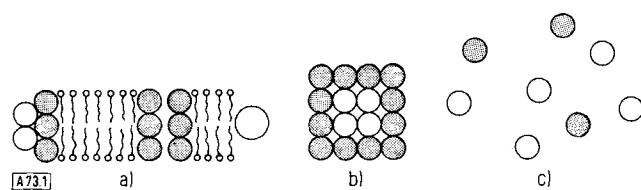


Abb. 1. Multienzymkomplexe (b) als Zustand zwischen membrangebundenen (a) und „löslichen“ Enzymen (c).

Der Übergang zwischen den drei Gruppen von Enzymsystemen ist möglicherweise fließend. Wenn auch die Zahl der bisher entdeckten Multienzymkomplexe begrenzt ist, darf man doch vermuten, daß auch manche der „löslichen Enzyme“ nicht völlig ungeordnet in der Zelle vorliegen, sondern mit anderen Enzymen Komplexe bilden^[1, 2]. Weniger stabile Komplexe werden wahrscheinlich durch die klassischen Proteinreinigungsmethoden zerstört. Umgekehrt kann nicht ausgeschlossen werden, daß in der Zelle getrennt vorliegende Enzyme bei der Isolierung aggregieren und der gereinigte Multienzymkomplex ein Artefakt ist (siehe Abschnitt 5.1).

Multienzymkomplexe sind strukturelle, funktionelle und wahrscheinlich auch regulatorische Einheiten aus mehreren Enzymen. Ihre Erforschung kann vor allem folgende Fragen beantworten helfen:

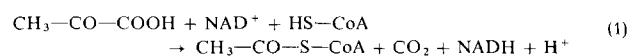
[*] Univ.-Doz. Dr. F. Hucho
Fachbereich Biologie der Universität
775 Konstanz, Postfach 733

1. Wie werden Strukturen höherer Ordnung aus Proteinmolekülen aufgebaut?

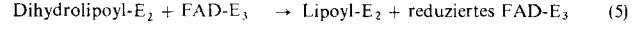
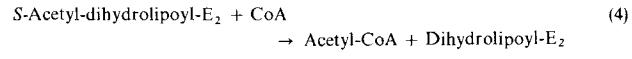
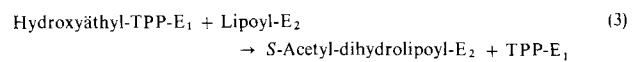
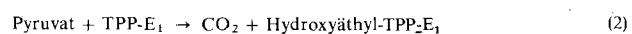
2. Wie kooperieren Enzyme, die aufeinanderfolgende Schritte eines Stoffwechselweges katalysieren?

3. Wie wird die Aktivität eines aus mehreren Enzymen aufgebauten Systems in der Zelle reguliert?

Unter diesen Aspekten soll hier die Pyruvat-Dehydrogenase besprochen werden. An der Oxidation der Brenztraubensäure im Mitochondrion sind unmittelbar drei Enzyme beteiligt (Abb. 2): Die Pyruvat-Dehydrogenase (E_1), die Dihydrolipoamid-Transacetylase (E_2) und die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (E_3), ein Flavoprotein^[3]^[*]. Sie katalysieren die Reaktion



die in mehreren Schritten verläuft (siehe Abschnitt 3.1–3.3)^[4]:

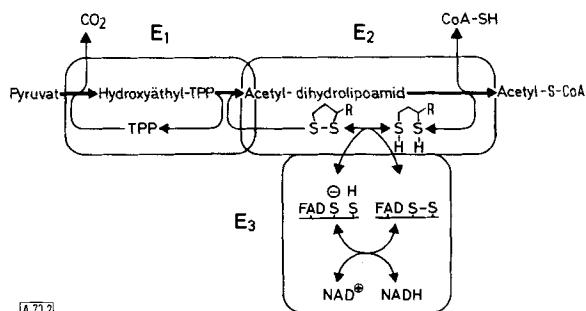


Die drei Enzyme, zu denen in höheren Organismen noch zwei weitere hinzutreten (siehe Abschnitt 4.5), bilden den Pyruvatdehydrogenase-Multienzymkomplex. Das Ziel dieser Übersicht ist es darzustellen, daß E_1 , E_2 und E_3 im Multienzymkomplex gemäß den hier aufgestellten Kriterien eine strukturelle, funktionelle und regulatorische Einheit bilden.

Pyruvatdehydrogenase-Multienzymkomplexe sind aus zahlreichen Organismen isoliert worden, so z. B. aus *Escherichia coli*^[5, 6], *Azotobacter*^[7], *Streptococcus*^[8], *Neurospora crassa*^[9, 10], Hefe^[11–13], Kartoffeln^[14], Taubenbrustmuskeln^[15–18], Haut-Fibroblasten^[19] und mehreren Säugetierorganen^[20–24] (Tabelle 1). Diese Übersicht beschränkt sich auf das *E. coli*- und das Säugetierenzym, da diese besonders gut untersucht wurden.

[*] Abkürzungen:

E_1 :	Pyruvat-Dehydrogenase (EC 1.2.4.1)
E_2 :	Dihydrolipoamid-Transacetylase (EC 2.3.1.12)
E_3 :	Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (EC 1.6.4.3)
TPP:	Thiaminpyrophosphat
CoA:	Coenzym A
FAD:	Flavinadenindinucleotid
NAD^+ , NADH :	Nicotinamidadenindinucleotid, oxidierte bzw. reduzierte Form



[A73.2]

Abb. 2. Schematische Darstellung des Pyruvatdehydrogenase-Multienzymkomplexes (Erklärung siehe Text). E₁ = Pyruvat-Dehydrogenase, E₂ = Dihydrolipoamid-Trasacetylase, E₃ = Dihydrolipoamid-Dehydrogenase. Formeln unter „Acetyl-dihydrolipoamid“: Lipoamid und Dihydrolipoamid; R = (CH₂)₄—CONH—.

Tabelle 1. Eigenschaften von Pyruvatdehydrogenase-Multienzymkomplexen.

Organismus	Polypeptidketten						Mol.-Gew. des Komplexes	Elektronenmikroskopie Durchmesser [Å] des Komplexes von E ₂	Geometrie von E ₂	Lit.
	E ₁ Zahl	Mol.-Gew.	E ₂ Zahl	Mol.-Gew.	E ₃ Zahl	Mol.-Gew.				
Säugetier [a]	≈ 60	41000	60	52000	10–12	55000	7.6 × 10 ⁶	400–450	210	Pentagon-dodekaeder
	β 60	36000								[45, 46, 74]
Hefe [b]	?	100000	?	80000	?	61000	5 × 10 ⁶ – 7.4 × 10 ⁶	350	220	Pentagon-dodekaeder
<i>Neurospora crassa</i> [c]										Pentagon-dodekaeder
<i>E. coli</i> [d]	16	96000	16	80000	16	54000	3.75 × 10 ⁶	300–430		[9, 10]
	24	100000	24	78000	12	56000	4.6 × 10 ⁶			[27, 28]
<i>Azotobacter</i> [e]										[26]
										[7]

[a] Komplex enthält zusätzlich zu E₁, E₂, E₃ eine Kinase und eine Phosphatase (Interkonvertierung).

[b] Interkonvertierung nicht nachweisbar.

[c] Interkonvertierung für Stamm L74 nachgewiesen.

[d] Keine Interkonvertierung.

[e] Komplex enthält möglicherweise Phosphotransacetylase.

2. Zusammensetzung und Struktur des Pyruvatdehydrogenase-Multienzymkomplexes

2.1. Der Multienzymkomplex aus *Escherichia coli*

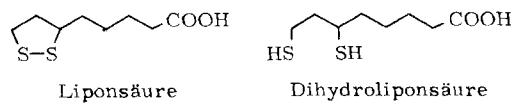
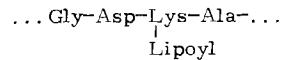
Multienzymkomplexe enthalten ihrer Definition gemäß die beteiligten Enzyme in definierten und konstanten Proportionen. Die Zahlenverhältnisse werden durch die Geometrie des Komplexes bestimmt. Will man umgekehrt eine Vorstellung vom geometrischen Aufbau des Komplexes gewinnen, muß man den Anteil der Teilenzyme und die Anzahl der Untereinheiten bestimmen. Die vom Genom gesteuerte Synthesegegeschwindigkeit der verschiedenen Polypeptidketten muß an die geometrischen Erfordernisse des Komplexes angepaßt sein, will die Zelle nicht „überschüssige“ Polypeptidketten produzieren. Für die Frage nach der genetischen Kontrolle der Teilenzymsynthese ist die Kenntnis der Stöchiometrie des Komplexes also ebenso wichtig wie für die Frage nach Struktur und Funktion. Die Untersuchungsbefunde geben hier noch kein einheitliches Bild:

Zunächst wurde postuliert, daß der Komplex aus *E. coli* die Polypeptidketten der drei Teilenzyme im Verhältnis 1:1:1 enthält, und zwar 24 Polypeptidketten jedes Enzyms^[25]. Eine spätere Analyse ergab jedoch das Verhältnis 1:1:0.5^[26], d. h. auf je zwei Polypeptidketten von E₁ und E₂ wurde nur eine Polypeptidkette des Flavoproteins E₃ gefunden. Das Molekulargewicht des Gesamtkomplexes wird mit 4.6×10^6 Dalton angegeben^[26]. Andere Autoren wiederum bestätigten das Verhältnis 1:1:1, fanden jedoch nur je 16 Polypeptidketten und daher als Molekulargewicht des Komplexes nur 3.75×10^6

Dalton^[27, 28][*]. Messungen der Röntgen-Kleinwinkelstreuung bestätigen diesen Wert^[29]. Vielleicht beruht die Diskrepanz auf der Verwendung verschiedener Bakterienstämme.

Die nativen Enzyme E₁^[26, 30] und E₃^[26, 31, 32] sind Dimere. Die Molekulargewichte der Polypeptidketten der Teilenzyme E₁, E₂ und E₃ betragen 100000, 80000 bzw. 56000 Dalton^[26–28, 30, 31]. Der Multienzymkomplex enthält außer den drei Enzymen sechs Cofaktoren: TPP, Mg²⁺, Liponsäure, Coenzym A, FAD und NAD⁺^[25, 34]. Einer davon, die Liponsäure, ist über die ε-Aminogruppe eines Lysinrestes von E₂ kovalent an das Protein gebunden^[35, 36]. Diese Amidbindung bildet sich enzymatisch in Gegenwart eines aus *E. coli* und *Streptococcus* isolierten Enzyms unter ATP-Verbrauch^[37]. Ein weiteres Enzym, eine Lipoamidase^[38, 39], bewirkt die hydrolytische Ab-

spaltung der Liponsäure aus dem Protein. Die Aminosäuresequenz in der Nachbarschaft der Liponsäure^[40] unterscheidet sich offenbar von der Liponsäurebindungsstelle des sonst recht ähnlichen α-Ketoglutarsäuredehydrogenase-Multienzymkomplexes.



Biochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen, vor allem aus dem Arbeitskreis von Reed an der Universität von Texas, haben gezeigt, daß der Multienzymkomplex eine geordnete symmetrische Struktur besitzt. Die Information für diese Struktur ist in der Primärstruktur der Teilenzyme niedergelegt, denn zerlegt man den Komplex und vereinigt die gereinigten Enzyme E₁, E₂ und E₃, so bilden sie in vitro spontan, d. h. ohne Mithilfe eines weiteren biologischen Faktors der Zelle, einen aktiven Komplex mit praktisch unveränderter Struktur und Aktivität^[5, 33, 41]. E₂ läßt sich darüber hinaus reversibel in seine Untereinheiten zerlegen^[42]. Derartige Rekonstitutionsexperimente sind wichtig für das Verständnis der Vorgänge bei der Bildung komplizierter Zellstrukturen aus einfachen Bausteinen. Sie zeigen, daß nicht nur die Sekundär- und Tertiärstruktur durch die Primärstruktur des Proteins

[*] Dieser „Kernkomplex“ ist jedoch imstande, in vitro weitere E₁-Moleküle zu binden. Die Bindung ist möglicherweise unspezifisch, und die so gebundenen Moleküle nehmen an der Katalyse nicht teil [28].

determiniert werden, sondern auch die Quartärstruktur und Strukturen höherer Ordnung wie die Multienzymkomplexe.

E_1 und E_3 assoziieren nicht miteinander, beide werden jedoch von E_2 gebunden^[51]. Die Dihydrolipoamid-Transacetylase (E_2) scheint außer ihrer katalytischen auch eine strukturgebende Funktion auszuüben. Sie bildet den Kern des Komplexes, der von den Untereinheiten von E_1 und E_3 umgeben ist.

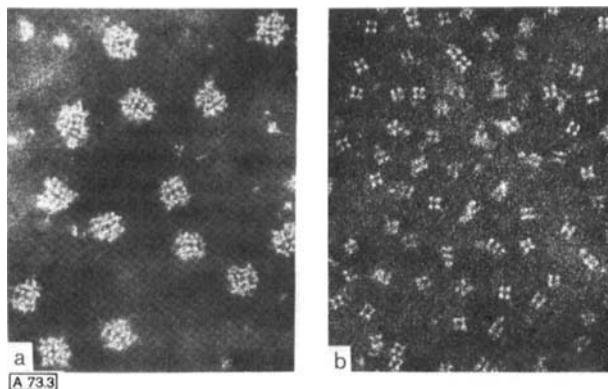


Abb. 3. Elektronenmikroskopische Aufnahmen a) des Pyruvatdehydrogenase-Multienzymkomplexes und b) der Dihydrolipoamid-Transacetylase (E_2) aus *E. coli*. Vergrößerung 20000fach [43].

Dieser Kern hat, wie die eindrucksvollen elektronenmikroskopischen Bilder von *Reed* und *Oliver* zeigen^[43], eine kubische Symmetrie (Abb. 3). *Henning* schlägt deshalb ein Modell vor, in welchem sich die 16 E_2 -Untereinheiten des von ihm isolierten Komplexes paarweise an den acht Ecken eines Würfels befinden^[27].

Über die Anordnung von E_1 und E_3 auf der Oberfläche des Würfels geben die elektronenmikroskopischen Bilder keine klare Auskunft. Man könnte sich jedoch vorstellen, daß jede Untereinheit der Transacetylase (E_2) je eine Polypeptidkette von E_1 und E_2 bindet, so daß jede Ecke des Würfels von zwei Elementarkomplexen – bestehend aus je einer Untereinheit von E_1 , E_2 und E_3 – gebildet wird. Der Durchmesser des Gesamtkomplexes wurde aufgrund der elektronenmikroskopischen Bilder auf etwa 300 Å^[43] geschätzt. Die Untersuchung mit der Röntgen-Kleinwinkelstreuung ergab dagegen einen maximalen Durchmesser von 430 Å^[29, 29a].

2.2. Der Multienzymkomplex aus Säugetieren

Der Säugetier-Pyruvatdehydrogenase-Multienzymkomplex, zuerst isoliert aus dem Schweineherzmuskel^[20, 21], ist heute in hochreiner Form in größeren Quantitäten zugänglich^[24]. Er besteht wie das *E. coli*-Enzym aus den drei Enzymen Pyruvat-Dehydrogenase (E_1), Dihydrolipoamid-Transacetylase (E_2) und Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (E_3), die beim Zusammengießen spontan zum ursprünglichen aktiven Multienzymkomplex reassoziieren^[44, 45]. Sein Molekulargewicht beträgt mindestens 7.6×10^6 Dalton^[45], wobei man berücksichtigen muß, daß man eventuell einen Teil der Untereinheiten bei der Isolierung und Reinigung des Enzyms verliert.

Den Kern des Komplexes bildet auch hier die Transacetylase (E_2), die aus 60 wahrscheinlich gleichen Polypeptidketten mit einem Molekulargewicht von 52000 Dalton besteht^[46]. Jede dieser Untereinheiten enthält kovalent gebunden ein Molekül Liponsäure.

Geht man wie beim *E. coli*-Komplex von einem 1:1:1-Verhältnis der drei Teilenzyme aus und nimmt im gleichen Verhältnis die beiden regulatorischen Enzyme Pyruvatdehydrogenase-Kinase und -Phosphatase hinzu (siehe Abschnitt 4.5), so kommt man auf ein Molekulargewicht von 16×10^6 Dalton. Es gibt jedoch noch keine Anhaltspunkte dafür, daß diese Annahmen realistisch sind. Die Stöchiometrie des Komplexes ist noch ungeklärt. Seine Größe ähnelt derjenigen der Ribosomen, ist also für Zellpartikel nicht ungewöhnlich. *Reed* schätzt, daß sich in jedem Mitochondrion der Rinderniere ca. 15 Moleküle dieses Komplexes befinden. *Srere* hat gezeigt, daß die Konzentration derartiger Moleküle in der Zelle in der Größenordnung von 10^{-5} mol/l liegt^[47].

Die Pyruvat-Dehydrogenase (E_1) hat ein Molekulargewicht von 154000 Dalton und besteht aus je zwei Untereinheiten mit dem Molekulargewicht 41000 und 36000 Dalton ($\alpha_2\beta_2$)^[46]. Es gibt Hinweise, daß die beiden Untereinheiten verschiedene Funktionen ausüben (siehe Abschnitt 3.1). Der Komplex enthält wahrscheinlich 60 Moleküle vom Typ $\alpha\beta$, also je ein Molekül pro Untereinheit von E_2 .

Das Flavoprotein E_3 hat ein Molekulargewicht von 110000 Dalton und besteht aus zwei wahrscheinlich gleichen Polypeptidketten, die jede ein Molekül FAD enthalten^[48, 49]. Der gereinigte Komplex enthält nur ca. 10–12 Polypeptidketten des Flavoproteins^[24]. Die Sequenz der Polypeptidketten in der Nachbarschaft der für die Katalyse wichtigen SH-Gruppen ist bekannt^[49a, 49b].

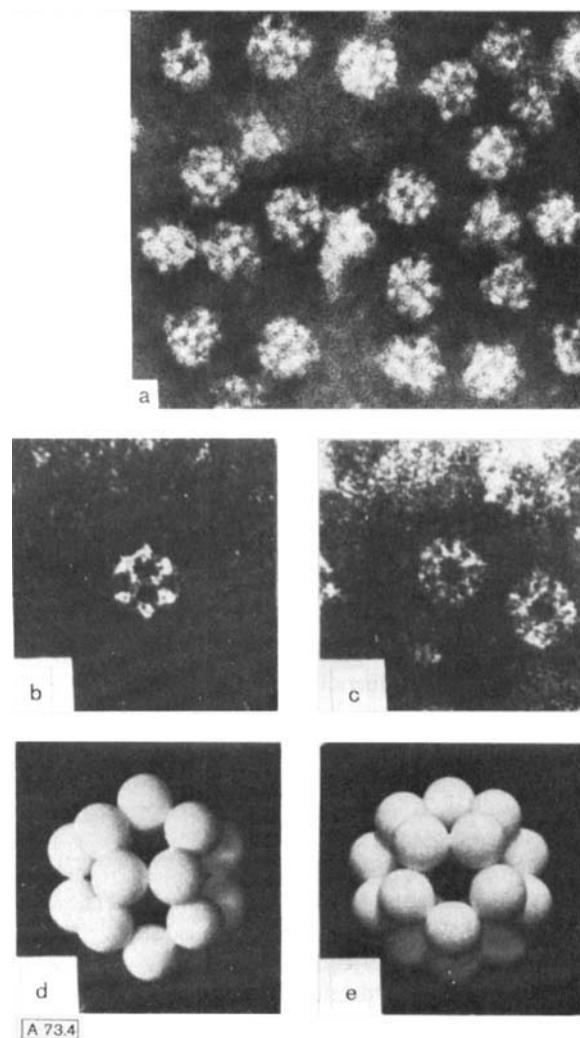


Abb. 4. Elektronenmikroskopische Aufnahmen a) des Säugetier-Pyruvate Dehydrogenase-Multienzymkomplexes und b), c) der Dihydrolipoamid-Transacetylase (E_2) [43]. d) und e) sind Modelle, die Abb. 4b) bzw. 4c) als Pentagondodekaeder interpretieren [43]. Vergrößerungen ca. 20000fach. a) stellten freundlicherweise Dr. E. Junger und Prof. Dr. H. Reinauer, Düsseldorf, zur Verfügung.

Wie bereits erwähnt, enthält der Säugetierkomplex eine Kinase und eine Phosphatase^[50, 51], deren Funktionen in Abschnitt 4.5 diskutiert werden. Die Kinase (Molekulargewicht 100000 Dalton^[24]) ist relativ fest an die Transacetylase (E_2) gebunden. Die Phosphatase (Molekulargewicht ebenfalls 100000^[24]) steht mit dem Komplex in einem Assoziations-Dissociationsgleichgewicht; ihre Bindungsstelle im Komplex ist unbekannt. Von beiden regulatorischen Enzymen kommen nur wenige Moleküle im Komplex vor, vielleicht nur etwa fünf. Möglicherweise enthält der native Komplex mehr Kinase- und Phosphatase-Moleküle, die bei der Reinigung verlorengehen (siehe Abschnitt 4.5)^[52, 53].

Wie beim *E. coli*-Enzym übt auch beim Säugetierkomplex die Transacetylase (E_2) sowohl eine katalytische als auch eine strukturgebende Funktion aus. Sie bildet den Kern des Komplexes, auf dessen Oberfläche die anderen Enzyme angeordnet sind. Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, daß ihre Symmetrie sich wesentlich von der der *E. coli*-Transacetylase unterscheidet (Abb. 4b–4d). Die Bilder zeigen nicht wie dort einen Würfel, sondern lassen sich eher als Pentagondodekaeder interpretieren^[43, 54]. Der Durchmesser wird mit 210 Å^[43] oder 230–240 Å^[54] angegeben. Der Durchmesser des Gesamtkomplexes beträgt ca. 400–450 Å^[43, 54]. Die elektronenmikroskopischen Bilder des Gesamtkomplexes weisen auf eine ikosaedrische Struktur hin (Abb. 4a)^[54].

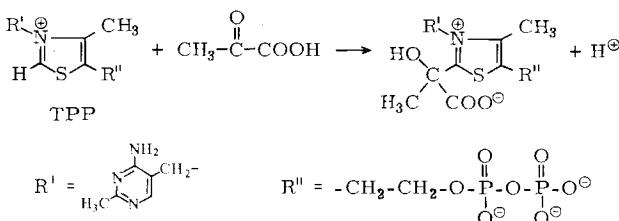
3. Mechanismus der enzymatischen Katalyse

Es soll hier nicht die umfangreiche Literatur über die Wirkungsweise der an der Pyruvatoxidation beteiligten Coenzyme referiert werden; stattdessen sei auf spezielle Übersichtsartikel über TPP^[55, 56], FAD^[57–62], NAD⁺^[63–65], Coenzym A^[66] und Liponsäure^[67] verwiesen. Über die Rolle der Proteine – mit Ausnahme von E_3 – bei der Katalyse der Reaktionen (2)–(5) ist nur wenig bekannt. Es werden daher hier nur einige wichtige Gesichtspunkte erwähnt, und darüber hinaus wird auf ungelöste Probleme aufmerksam gemacht.

3.1. Pyruvat-Dehydrogenase (E_1)

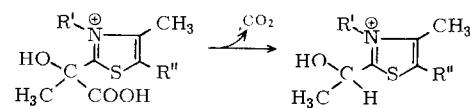
Die Pyruvat-Dehydrogenase (E_1) ist nicht wie der irreführende, aber weithin benutzte Name Pyruvat-Decarboxylase aneutet, nur eine Decarboxylase, sondern zählt zu Recht zu den Dehydrogenasen. Denn die Reaktionen (2) und (3) laufen auch mit nicht proteingebundener Liponsäure ab^[67]. Auch Hexacyanoferrat(III) kann als Elektronenacceptor bei der Oxidation von Pyruvat zu Acetat durch E_1 , d. h. nach Abtrennung von E_2 und E_3 , dienen^[68]. Die Reaktionsgeschwindigkeit beträgt jedoch nur ca. 1 % von der des Gesamtkomplexes.

Die Decarboxylierung des Pyruvats wird durch seine Anlagerung an die 2-Position des Thiazolringes von TPP eingeleitet.



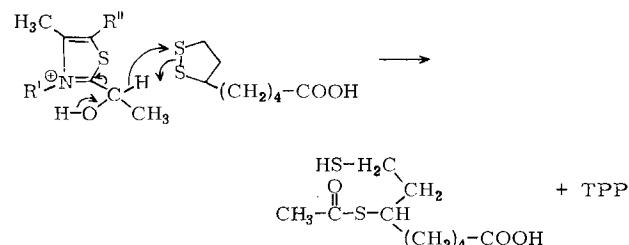
Die Abspaltung von CO_2 führt zu Hydroxyäthyl-TPP^[55, 56], einer Zwischenstufe, die Holzer isolierte und in Analogie zur

„aktiven Essigsäure“ (Acetylcoenzym A) als „aktiven Acetaldehyd“ bezeichnete^[120, 69].



Die Reaktion beruht auf der Acidität des Wasserstoffs in 2-Position im Thiazolring von TPP^[55, 70]. Cofaktor der enzymatischen Reaktion ist Magnesium, das auch den entsprechenden nichtenzymatischen Wasserstoffisotopenaustausch mit Wasser beschleunigt^[71].

Der nächste Schritt ist die Oxidation der Hydroxyäthylgruppe und der Transfer des entstehenden Acetylrestes auf die Liponsäure von E_2 . Auch diese Dehydrogenase- und Transferaseaktivität ist in E_1 lokalisiert^[67, 68]. Als Acceptor für den Acetylrest kann bei Abwesenheit von E_2 freie Liponsäure oder in Anwesenheit eines Elektronenacceptors wie Hexacyanoferrat(III) Wasser dienen. Die Reaktion verläuft etwa wie im Formelschema angegeben.

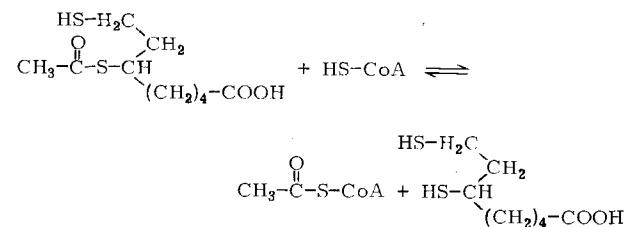


Die Acetylgruppe befindet sich an der sekundären SH-Gruppe der Dihydroliponsäure^[72]. Der vorgeschlagene Reaktionsverlauf wird durch die Hemmbarkeit der Reaktion durch Arsenit gestützt^[73], da Arsenit das Enzym nur in Gegenwart von Pyruvat und Coenzym A inaktiviert. Dabei entsteht Dihydroliponsäure, die mit Arsenit ein cyclisches Thioarsenit bildet.

Es gibt Hinweise darauf, daß die Decarboxylasereaktion einerseits und die Dehydrogenase-Transferasereaktion andererseits beim Enzym aus Säugetierorganen durch verschiedene Untereinheiten von E_1 katalysiert werden^[74]. Beim *E. coli*-Enzym sind beide katalytischen Aktivitäten wahrscheinlich auf einer Polypeptidkette lokalisiert, die etwa doppelt so lang ist wie die α - oder die β -Kette des Säugetierenzyms. Brompyruvat^[75] und Quecksilberverbindungen^[76] inaktivieren E_1 .

3.2. Dihydrolipoamid-Transacetylase (E_2)

Die Liponsäure ist kovalent über eine Amidbindung mit der Transacetylase E_2 verbunden. E_2 katalysiert den nächsten Schritt der Reaktion, den Transfer der Acetylgruppe von der Dihydroliponsäure auf Coenzym A.

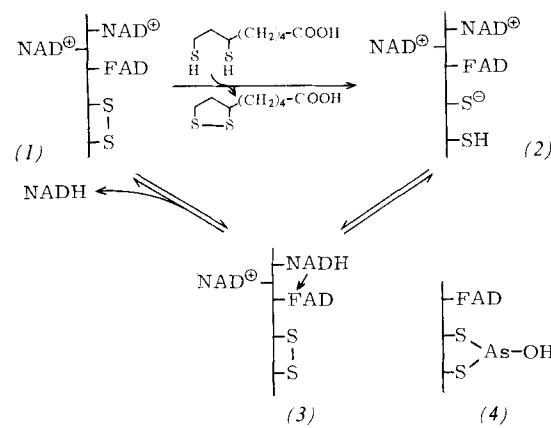


Die Reaktion ist umkehrbar; die Umkehrung wurde zu einem Test für E_2 in Abwesenheit von E_1 und E_3 verwendet^[6]. Acetyl-CoA hemmt die Reaktion. Über die Wirkungsweise

und über die katalytische Rolle des Proteins gibt es nur wenige Untersuchungen^[77].

3.3. Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (E₃)

Die Funktion der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (E₃) im Multienzymkomplex ist es, E₂ zu regenerieren und dadurch den nächsten Reaktionszyklus zu ermöglichen. Dies geschieht durch Transfer von zwei Elektronen von der Dihydroliponsäure auf NAD⁺. An der Reaktion sind zwei Moleküle NAD⁺, ein Molekül FAD und eine Disulfidgruppe des Proteins beteiligt (1). Letztere wird intermediär reduziert und stabilisiert das FAD in einem Redoxzustand (2), der einem Flavosemichinon entspricht^[78, 79]. Die Struktur dieses Zustandes konnte noch nicht geklärt werden, jedoch scheidet das von Massey früher postulierte Diradikal^[78] als Möglichkeit aus. (2) besitzt zwar eine für Radikale charakteristische Absorption bei 530 nm, ist aber ESR-inaktiv und diamagnetisch. Die langwellige Absorption spricht gegen eine kovalente Verknüpfung des Proteinschwefels mit der 4a-Position des Flavins^[80], aber auch eine ionische oder eine Charge-transfer-Wechselwirkung lassen sich nicht eindeutig nachweisen.



Gesichert ist dagegen die Beteiligung der Disulfidgruppe. Die Reduktion des Enzyms mit NADH erhöht die Anzahl der SH-Gruppen pro Polypeptidkette um zwei^[81, 82, 60]. Arsenit hemmt in Gegenwart von NADH die enzymatische Aktivität durch Bildung der cyclischen Verbindung (4). Die Hemmung kann durch 2,2-Dimercaptopropanol (BAL) aufgehoben werden^[78, 81].

Behandelt man das Enzym mit dem Sulfidgruppenreagens 4-(Chloromerkurio)benzolsulfonat, so verschwindet die charakteristische Absorption bei 530 nm^[83]. Die Beteiligung einer SH-Gruppe an der Zwischenstufe (2) ist damit bewiesen, und es gilt auch als gesichert, daß das Enzym nur durch zwei Reduktionsäquivalente reduziert wird. Die Bildung einer durch vier Äquivalente vollständig reduzierten Form des Enzyms ist nicht umkehrbar; diese Form ist daher katalytisch inaktiv. Sie wird nach Ansicht von Massey durch das zweite an das Enzym gebundene NAD⁺-Molekül verhindert, denn dieses ist essentieller Cofaktor bei der Oxidation von NADH durch die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (E₃)^[78]. Zu den Details der Reaktionskinetik sei auf Spezialabhandlungen verwiesen^[84, 85].

Die Disulfidgruppe ist intramolekular, d. h. sie verbindet nicht die beiden Polypeptidketten des dimeren Enzyms. Diese werden durch hydrophobe Wechselwirkung und nicht durch kovalente Bindung zusammengehalten^[86], denn es gelingt z. B.,

sie durch Verdünnung des Proteins voneinander zu trennen^[87] und dabei zu inaktivieren. Diese Polypeptidketten sind inaktiv.

3.4. Kooperation der Enzyme im Multienzymkomplex

Die im folgenden formulierten Fragen können experimentell praktisch noch nicht beantwortet werden. Es ist noch weitgehend ungeklärt, wie die zahlreichen Komponenten eines so komplexen Systems kooperieren. Geht man z. B. von der Liponsäure aus, so stellt sich folgendes Problem: Die Liponsäure ist kovalent mit E₂ verknüpft, also räumlich fixiert. Sie muß aber während eines Reaktionszyklus mit Hydroxyäthyl-TPP (E₁), Coenzym A (E₂) und der Disulfidgruppe oder dem FAD der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (E₃) in Wechselwirkung treten. Mit anderen Worten: Dasselbe Lipoamidmolekül ist gleichzeitig – oder zumindest innerhalb einer sehr kurzen Zeit – Cosubstrat für drei Enzyme. Betrachtet man die beteiligten Proteine als starre Moleküle, so stellt das fast unerfüllbare Anforderungen an die räumliche Ordnung des Systems. Die drei aktiven Zentren der beteiligten Enzyme müßten ein einziges großes aktives Zentrum bilden, in dem sich sechs Cofaktoren befinden (TPP, Mg²⁺, Liponsäure, CoA—SH, FAD, NAD⁺, von letzterem wahrscheinlich zwei Moleküle pro Polypeptidkette), denn außer Acetyl-CoA verläßt keine Zwischenstufe der Reaktionssequenz das Protein und kann daher auch nicht von einem aktiven Zentrum zum nächsten diffundieren.

Auf der Suche nach Auswegen aus diesem Dilemma weist Reed darauf hin, daß die reaktive Gruppe der Liponsäure, auch wenn das Coenzym kovalent am Enzym haftet, eine gewisse Flexibilität dadurch erhält, daß sie über einen „langen Arm“ mit dem Protein verbunden ist. Dieser ist zusammen mit dem Lysinrest, an dessen ε-Aminogruppe die Liponsäure als Amid gebunden ist, etwa 14 Å lang und könnte vielleicht zwischen den prosthetischen Gruppen von E₁ und E₃ hin- und herschwingen^[11]. Allerdings wurde der Abstand zwischen TPP und FAD aufgrund von Fluoreszenz-Energiestraffermessungen auf 30–60 Å geschätzt^[87a].

Lazdunski^[88] schlägt vor, daß die Polypeptidketten des Komplexes ihre Konformation nach Art eines Flip-flop-Mechanismus ändern und dadurch die funktionellen Gruppen und die Coenzyme während des Reaktionszyklus solche räumlichen Positionen einnehmen, daß sie sukzessiv miteinander und mit dem Substrat reagieren können. Derartige Konformationsänderungen sollten mit biophysikalischen Methoden nachzuweisen sein, so daß diese Hypothese in absehbarer Zeit geprüft werden kann.

Eine Flexibilität der beteiligten Proteine muß man besonders dort postulieren, wo die Teilenzyme (und ihre Coenzyme) nicht im Verhältnis 1:1:1 vorliegen. So enthält der aus Säugetierorganen isolierte Komplex nur relativ wenige Moleküle E₃(FAD). Jedes dieser Moleküle muß möglicherweise mehrere Dihydrolipoamidmoleküle reoxidieren.

Das gleiche Problem bietet die Inaktivierung des Säugetier-Pyruvatdehydrogenase-Komplexes durch die Pyruvatdehydrogenase-Kinase (siehe Abschnitt 4.5). Auch dieses Enzym ist Teil des Multienzymkomplexes, wird relativ fest von E₂ gebunden und phosphoryliert von hier aus mindestens zwei Serin-OH-Gruppen pro Polypeptidkette von E₁. Da sich nur wenige – vielleicht nur fünf – Kinaseenzyme im isolierten Komplex befinden, muß jedes dieser Moleküle mehrere E₁-Ketten phosphorylieren, ohne sich z. B. durch Diffusion diesen nacheinander nähern zu können. Auch hier muß man Konfor-

mationsänderungen aufgrund der Flexibilität der beteiligten Moleküle annehmen, für die es jedoch noch keinerlei experimentelle Hinweise gibt. Die Pyruvatdehydrogenase-Phosphatase, die den Komplex durch Dephosphorylierung reaktiviert, stellt dieses Problem nicht, da sie relativ locker in einem Assoziations-Dissoziationsgleichgewicht mit dem Multienzymkomplex steht.

Eine wesentliche Rolle für die Kooperation der Teilenzyme im Komplex spielt wahrscheinlich die Dihydrolipoamid-Transacetylase (E_2). An ihrer Oberfläche werden E_1 und E_3 offenbar in sterisch günstige Position zueinander gebracht. Es gibt weniger aufwendige Systeme, bei denen der Acetylrest ohne Mitwirkung der Liponsäure direkt auf Coenzym A transferiert wird, z. B. die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase aus *Clostridium acidi-urici*^[89], und auch die Pyruvat-Oxidase aus *E. coli* katalysiert die oxidative Decarboxylierung des Pyruvats ohne Beteiligung von Liponsäure^[90, 91], d. h. nur mit den Cofaktoren TPP, Mg^{2+} und FAD. Dieser Weg wird im Falle des Multienzymkomplexes nicht beschritten, denn blockiert man die Liponsäure^[73] oder E_2 als Ganzes^[3], so läuft die Reaktion nicht ab. Es liegen noch keine experimentellen Daten vor, mit deren Hilfe man die Vorteile des beim Pyruvatdehydrogenase-Multienzymkomplex beschrifteten Weges erkennen könnte.

4. Regulation der enzymatischen Aktivität

4.1. Der Pyruvatstoffwechsel

Der Stoffwechsel eines Organismus kann durch intrazelluläre und durch extrazelluläre Vorgänge reguliert werden. Extrazellulär ist z. B. die hormonale Regulation. Zur intrazellulären Regulation zählen folgende drei Klassen:

1. Regulation der Enzymmenge auf chromosomaler Ebene durch Induktion und Repression der Enzymsynthese,

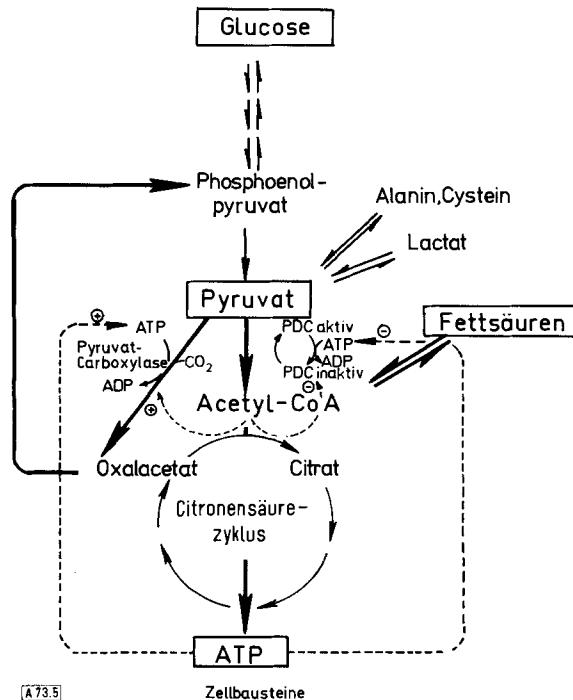


Abb. 5. Vereinfachtes Schema des Pyruvatstoffwechsels. Die gestrichelten Pfeile geben die Aktivierung \oplus oder die Hemmung \ominus der Pyruvat-Carboxylase und des Pyruvatdehydrogenase-Multienzymkomplexes (PDC) durch Acetyl-CoA und ATP an.

2. Regulation der Enzymaktivität durch die „feed back“- oder „feed forward“-Wirkung von Metaboliten auf Enzyme. (Hierzu gehören auch die einfache Produkthemmung, Substrataktivierung und ähnliche Vorgänge).

3. Regulation der Enzymaktivität durch enzymatisch katalysierte Aktivierung und Inaktivierung von Enzymen (Interkonvertierung).

Alle diese Vorgänge sind an der Regulation der Pyruvat-Dehydrogenase beteiligt; über die extrazellulären Faktoren ist am wenigsten bekannt.

Die Komplexität der Kontrolle der enzymatischen Aktivität ergibt sich aus der Stellung der Pyruvat-Dehydrogenase im Stoffwechsel (Abb. 5). Das Enzym befindet sich an der Kreuzung mehrerer Stoffwechselwege. Pyruvat entsteht bei der Glykolyse aus Glucose, aus Lactat sowie aus Aminosäuren wie Alanin oder Cystein. Zugleich ist es Ausgangspunkt für zwei wichtige Stoffwechselwege:

1. Pyruvat kann oxidativ abgebaut werden zu Acetyl-CoA, wobei NADH und schließlich über den Citronensäurezyklus und durch oxidative Phosphorylierung ATP gebildet wird.

2. Pyruvat kann aber auch zu Oxalacetat carboxyliert werden und somit Ausgangspunkt der Gluconeogenese sein. Schlüsselenzym für den ersten Weg ist der Pyruvatdehydrogenase-Multienzymkomplex, für den zweiten Weg die Pyruvat-Carboxylase.

4.2. Regulation auf chromosomaler Ebene

Die Synthese des Multienzymkomplexes in *E. coli* unterliegt der genetischen Regulation^[92]. Sie ist zwar von 3',5'-cyclischem AMP unabhängig^[93], aber durch das Substrat des Komplexes, Pyruvat, induzierbar^[94]. Je nach Induktor kann die synthetisierte Enzymmenge um den Faktor zehn variieren. Darüber hinaus gelang es, konstitutive Mutanten zu isolieren, die etwa um den Faktor zwei mehr Pyruvatdehydrogenase-Komplex produzieren als bei der „voll induzierten“ Synthese gefunden wurden^[95]. Dem Strukturgen für die Pyruvatdehydrogenase-Komponente wird für die Synthese des Gesamtkomplexes besondere Bedeutung zugeschrieben. Das Gen für die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (E_3) ist bisher nicht gefunden worden, die der beiden anderen Teilenzyme des Komplexes liegen dicht beisammen (ace-Locus)^[92].

Auch bei Säugetieren gibt es Hinweise auf eine genetische Steuerung der Enzymsynthese^[96–98].

4.3. Regulation durch Hormone

Inkubiert man Fettgewebe normal ernährter Ratten in Gegenwart von Lactat mit Insulin, so beobachtet man eine deutliche Steigerung der Pyruvatdehydrogenase-Aktivität^[99–101]. Insulin wirkt also an mindestens zwei Punkten stimulierend auf die Umwandlung von Glucose in Fettsäure: Es steigert nicht nur den Glucosetransport in die Zelle, sondern auch die Oxidation des Pyruvats. Welche chemischen Reaktionen dieser zweiten Wirkung zugrundeliegen, ist noch unklar, jedoch beruht zumindest ein Teil des Effektes darauf, daß das Verhältnis von phosphoryliertem, inaktivem zu dephosphoryliertem, aktivem Pyruvatdehydrogenase-Komplex geändert wird^[102–105]. Vielleicht vermitteln Calcium-Ionen den Hormoneffekt^[106], da sie als Effektoren der Phosphatase^[107, 108] deren Affinität für das phosphorylierte Enzym erhöhen^[106].

Darüber hinaus fand Cuatrecasas, daß Insulin auch die Gesamt-enzymkonzentration erhöht^[109].

4.4 Regulation durch „feed back“ und „feed forward“. — Produkthemmung

Der Angriffspunkt der meisten Faktoren, die die Aktivität des Pyruvatdehydrogenase-Multienzymkomplexes regulieren, ist E_1 . Das erscheint logisch, da E_1 den ersten, praktisch irreversiblen und wahrscheinlich auch geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktionssequenz katalysiert. Aktivierend auf das *E. coli*-Enzym wirken die Intermediärprodukte der Glykolyse, am stärksten Fructose-1,6-diphosphat, aber auch Fructose-6-phosphat, Glycerinaldehyd-3-phosphat, Phosphoenolpyruvat^[110], Dihydroxyacetophosphat und Glucose-6-phosphat^[111]. Acetyl-CoA inhibiert^[110, 112] mit negativer Kooperativität, während für das Substrat Pyruvat positive Kooperativität gefunden wurde^[113]. GTP^[114], aber nicht ATP^[111, 115] und andere Nucleotide hemmen den Pyruvatdehydrogenase-Komplex aus *E. coli*^[114].

Neben der „feed back“-Hemmung durch Acetyl-CoA und der „feed forward“-Aktivierung durch Glykolyseprodukte wurde eine starke Produkthemmung des *E. coli*-Enzyms durch NADH beschrieben^[112]. NADH hemmt E_3 , und es scheint, daß der Komplex sehr viel empfindlicher gegenüber NADH als Acetyl-CoA ist.

Tabelle 2. Kinetische Parameter des Säugetier-Pyruvatdehydrogenase-Multienzymkomplexes. Angaben über Mg^{2+} siehe Tabelle 3.

Substanz	Michaelis- oder Inhibitor-Konstante [mol/l]	Bindungsstelle	Bemerkungen
Pyruvat	$K_m = 4 \times 10^{-5}$ (Niere u. Herz)	E_1	Substrat
	$K_i = 9 \times 10^{-4}$ (Niere)	?	hemmt die Interkonvertierung
	$K_i = 8 \times 10^{-5}$ (Herz)	?	
Coenzym A	$K_m = 3 \times 10^{-6}$	E_2	Substrat
Acetyl-CoA	$K_i = 5 \times 10^{-6}$	E_2	kompetitiver Inhibitor (nicht kompetitiv gegenüber Pyruvat)
NAD ⁺	$K_m = 2.5 \times 10^{-5}$	E_3	Substrat
NADH	$K_i = 2 \times 10^{-6}$	E_3	kompetitiver Inhibitor
Nucleotide	$K_{in(ADP)} = 2 \times 10^{-5}$ $K_{in(ATP)} = 1 \times 10^{-4}$	Kinase	Substrat der Kinase
		Kinase	kompetitiver Inhibitor

Tabelle 3. Vergleich der Michaelis-Konstanten der Mg^{2+} erfordern Enzyme des Pyruvatdehydrogenase-Multienzymkomplexes mit der physiologischen Mg^{2+} -Konzentration.

Enzym	K_m [mol/l]	Lit.
Phosphatase (in Phosphat-Puffer)	2×10^{-2}	[139]
(in Imidazol-Puffer)	3×10^{-3}	[107]
Kinase	2×10^{-5}	[107]
Pyruvatdehydrogenase-Multienzymkomplex	5×10^{-6}	[74]
Physiologische Mg^{2+} -Konzentration (freies Mg^{2+})	1×10^{-3}	[143]

Auch der Multienzymkomplex aus Säugetierorganen unterliegt der „feed back“- oder Produkthemmung durch zahlreiche Metaboliten^[116–123] (siehe Tabelle 2 und 3). Für die Regulation der Enzymaktivität scheint hier jedoch – anders als beim *E. coli*-Enzym – der Quotient NADH/NAD⁺ von größerer Bedeutung zu sein als der Quotient Acetyl-CoA/CoA in der Zelle^[118]. Kurzkettige Acyl-CoA-Ester sind stärkere Inhibitoren

als längerketige^[119]. Alle Zwischenstufen des Citronensäurezyklus hemmen die Pyruvatoxidation^[120–122], Citrat z. B. durch Beeinflussung der Interkonvertierung^[123].

ATP hemmt den Pyruvatdehydrogenase-Komplex aus Säugetierorganen durch Umwandlung von E_1 in eine phosphorylierte inaktive Form (siehe Abschnitt 4.5).

4.5. Interkonvertierung^[*]

Die Aktivität des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes aus Säugetierorganen wird durch zwei Enzyme reguliert, die ebenfalls Teile des Multienzymkomplexes sind. Eine Kinase inaktiviert den Komplex durch Phosphorylierung in Gegenwart von ATP, und die Reaktivierung wird durch eine Phosphatase bewirkt, die das System dephosphoryliert^[50]. Die Pyruvat-Dehydrogenase zählt somit zu den interkonvertierbaren Enzymen. Diese Interkonvertierung wurde in allen untersuchten Säugetierorganen gefunden: in der Niere^[50], im Herzmuskel^[51, 127], in der Leber^[50, 51], im Hirn^[128, 129] und im Fettgewebe^[130, 131]. Bei Rind, Schwein und Ratte wurden dabei keine prinzipiellen Unterschiede festgestellt^[129]. Die Phosphatasen und Kinasen der Organe und Organismen sind austauschbar. Das *E. coli*-Enzym zeigt diese Interkonvertierung nicht, während sie zumindest in einem Stamm von *Neurospora* auftritt^[10]. Es ist noch unklar, ob ein Zusammenhang zwischen der Evolutionsstufe und dem Vorhandensein dieses Regulationsmechanismus besteht.

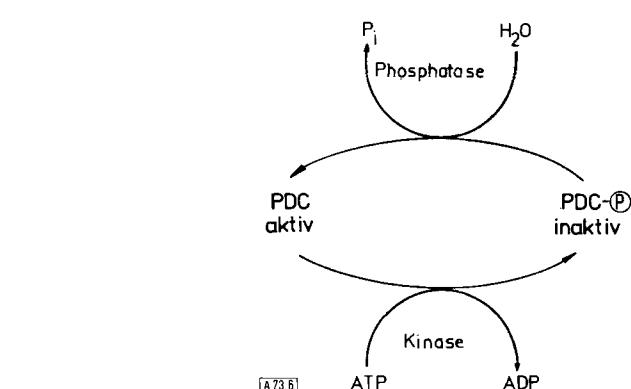
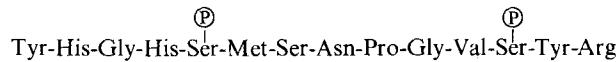


Abb. 6. Schema der Interkonvertierung des Pyruvatdehydrogenase-Multienzymkomplexes (PDC) aus Säugetierorganen. Eine Kinase phosphoryliert und inaktiviert das Enzym, eine Phosphatase dephosphoryliert und reaktiviert es.

[*] Unter Interkonvertierung versteht man in der Enzymlologie die Modifizierung eines Enzyms, das dabei seine Aktivität oder seine regulatorischen Eigenschaften wesentlich verändert. Der Begriff wird im engeren Sinne besonders dann verwendet, wenn die Modifizierung enzymatisch katalysiert wird und zur Bildung oder Lösung kovalenter Bindungen am Enzym führt. Die Bedeutung der enzymatisch katalysierten chemischen Modifikation von Enzymen als Regulationsmechanismus wurde erst in neuerer Zeit erkannt (Überblick siehe [124–126]).

Die Interkonvertierung wurde am gereinigten Enzym in vitro entdeckt^[50, 51], konnte jedoch auch im lebenden Organ nachgewiesen werden^[132-135].

Der Ort der Phosphorylierung durch die Kinase ist die Pyruvat-Dehydrogenase (E_1)^[50]. Durch tryptischen Abbau wurde ein Tetradecapeptid isoliert, das zwei phosphorylierte Serinreste enthält und folgende Sequenz hat^[136, 137]:



Von den beiden verschiedenen Polypeptidketten der Pyruvat-Dehydrogenase (E_1) wird nur diejenige mit dem höheren Molekulargewicht, die α -Kette, phosphoryliert^[136].

Die Kinase ist fest mit der Dihydrolipoamid-Transacetylase (E_2) verknüpft^[24, 51]. Der Ort der Bindung der Phosphatase ist unbekannt. Sie ist viel lockerer gebunden als die Kinase, so daß sich zwischen ihr und dem Komplex ein Assoziations-Dissoziationsgleichgewicht bildet^[24, 106, 138].

Es wurde noch nicht geklärt, warum die Phosphorylierung der Pyruvat-Dehydrogenase (E_1) zu ihrer Inaktivierung führt.

Die Inaktivierung und Reaktivierung durch Pyruvatdehydrogenase-Kinase und -Phosphatase steht unter metabolischer Kontrolle. Besonders zwei Stoffklassen sollen in diesem Zusammenhang diskutiert werden: Die α -Ketosäuren als Substrate oder Substratanaloga der Pyruvat-Dehydrogenase^[107] und die Adeninnucleotide, z. B. ATP, als Endprodukt der durch den Multienzymkomplex eingeleiteten Stoffwechselsequenz^[139].

α -Ketosäuren: Brenztraubensäure und in schwächerem Maße α -Oxobuttersäure sowie Phenylbrenztraubensäure schützen die Pyruvat-Dehydrogenase vor Phosphorylierung und Inaktivierung durch die Pyruvatdehydrogenase-Kinase^[51, 107]. Dieser Schutzeffekt des Pyruvats ist beim Herzenzym erheblich stärker ($K_i = 0.08 \text{ mmol/l}$) als beim Nierenzym ($K_i = 0.9 \text{ mmol/l}$)^[107]. Kinetische Untersuchungen haben ergeben, daß es eine regulatorische Bindungsstelle für α -Ketosäuren gibt, die wahrscheinlich weder mit der Substratbindungsstelle von E_1 noch mit der ATP-Bindungsstelle der Pyruvatdehydrogenase-Kinase übereinstimmt^[107, 140].

Der Schutzeffekt des Pyruvats kann physiologisch sinnvoll sein: Krebs hat gezeigt, daß die Reduktionsäquivalente, die für die Gluconeogenese erforderlich sind, durch Oxidation von Pyruvat in den Mitochondrien erzeugt werden müssen, wenn nicht Lactat die Ausgangssubstanz für die Gluconeogenese ist^[141, 142]. Nach Belastung des Organismus kann die Pyruvatkonzentration in vivo bis zu 0.5 mmol/l ansteigen. Unter diesen Bedingungen ist die Gluconeogenese über Oxalacetat nur möglich, wenn ein Teil des Pyruvats oxidiert wird, um den Organismus mit dem hierzu nötigen NADH zu versorgen. Pyruvat selbst ermöglicht dies, indem es die Pyruvat-Dehydrogenase vor Inaktivierung durch die Kinase schützt.

Im Herzen andererseits ist ohnehin jeder Faktor willkommen, der die Zellatmung begünstigt. Hier ist der Schutzeffekt des Pyruvats noch viel ausgeprägter als in der Niere, so daß die Oxidation des Pyruvats nicht durch entstehendes ATP blockiert werden kann.

Adeninnucleotide: ATP als Substrat der Kinase ist für die Interkonvertierung essentiell. ADP ist ein relativ schwacher kompetitiver Inhibitor der Kinase, während AMP, cyclisches AMP und zahlreiche andere Nucleotide keinen signifikanten Einfluß auf die Regulation besitzen^[107]. Die Michaelis-Konstante für ATP ist niedrig, so daß in allen metabolischen Zuständen der Zelle die ATP-Konzentration zur Sättigung

der Kinase ausreicht. Andererseits fallen ADP und erst recht AMP wegen ihres geringen Hemmeffekts als regulatorische Variable für die Kinase aus. Die genannten Nucleotide haben auch auf die Pyruvatdehydrogenase-Phosphatase keinen nennenswerten direkten Einfluß, so daß unklar ist, auf welche Weise die Interkonvertierung den Erfordernissen der Zelle entsprechend zur Regulation der Pyruvatdehydrogenase-Aktivität eingesetzt werden kann. Ohne Wechselwirkung mit metabolischen Variablen ist der Phosphorylierungs-Dephosphorylierungszyklus eine Vergeudung von ATP, da die Kinase und die Phosphatase zusammen die Wirkung einer ATPase ausüben. (Die auf diese Weise verbrauchte ATP-Menge ist allerdings nicht sehr bedeutend.)

Ein Ausweg bietet sich an, wenn man die Magnesium-Ionen in die Betrachtung einbezieht^[139]. Ein Vergleich der Michaelis-Konstanten der Teilenzyme des Komplexes für Mg^{2+} (Tabelle 3)^[139] zeigt, daß nur die Phosphatase im physiologischen Konzentrationsbereich nicht mit Magnesium-Ionen gesättigt ist. Eine Variation dieser Konzentration in vivo sollte also die Phosphataseaktivität beeinflussen.

Modell-Experimente in vitro haben gezeigt, daß eine solche Variation durch Schwankungen in der Zusammensetzung des Adeninnucleotidpools erzeugt werden könnte. Etwa 90 % des Magnesiums der Zelle ist durch Zellbausteine komplexbunden, ein Drittel davon allein durch die Adeninnucleotide^[143]. ATP wiederum komplexiert Mg^{2+} etwa zehnmal stärker als ADP, so daß die Zusammensetzung des Adeninnucleotidpools – das Verhältnis der Konzentrationen von ATP, ADP und AMP – die Konzentration an freien, d. h. nicht komplex gebundenen Magnesium-Ionen in der Zelle beeinflussen kann^[144]. Bei hohem Energie-Potential („energy charge“^[145]), d. h. wenn sehr viel mehr ATP als AMP vorliegt, ist mehr Magnesium gebunden als bei niedrigem. Die Konzentration an freien Magnesium-Ionen in der Zelle beeinflußt aber, wie oben gezeigt, die Phosphataseaktivität und damit die Aktivität des gesamten Multienzymkomplexes. Das Energie-Potential der Zelle schwankt nur innerhalb relativ enger Grenzen; diese Schwankungen reichen aber aus^[139], um die Aktivität des Pyruvatdehydrogenase-Multienzymkomplexes über den hier skizzierten Mechanismus erheblich zu variieren (Abb. 7). Analoge Überle-

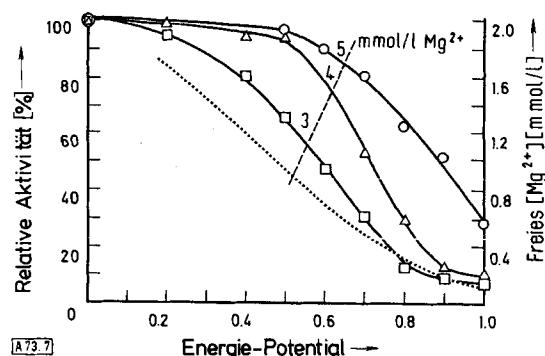


Abb. 7. Abhängigkeit der Aktivität des Säugetier-Pyruvatdehydrogenase-Multienzymkomplexes vom Energie-Potential („energy charge“) und der Mg^{2+} -Konzentration. Die Kurven beschreiben Experimente bei einer Gesamtkonzentration an Mg^{2+} von 3, 4 und 5 mmol/l. Die punktierte Kurve zeigt die Konzentration an freiem, d. h. nicht komplex gebundenem Mg^{2+} bei einer Gesamtkonzentration von 4 mmol/l. Beim Energie-Potential 1 enthält der Adeninnucleotidpool nur ATP, beim Energie-Potential 0 nur AMP. ATP bindet Mg^{2+} ca. zehnmal stärker als AMP. Die Aktivität des Enzyms sinkt mit steigendem Energie-Potential, weil die für die Reaktivierung durch die Phosphatase notwendigen Mg^{2+} -Ionen durch ATP komplexiert werden. Das Energie-Potential ist definiert als

$$\frac{1}{2} \left(\frac{[ADP] + 2[ATP]}{[AMP] + [ADP] + [ATP]} \right)$$

gungen gelten vielleicht auch für Calcium, dem möglicherweise eine zentrale Rolle zukommt.

Atkinson hat gezeigt, daß weitere metabolische Effektoren die Energiepotential-Abhängigkeit eines Enzyms erheblich verstärken können^[145]. Während Versuche mit intakten Mitochondrien die Bedeutung des Energie-Potentials (des ATP/ADP-Quotienten) für die Aktivität des Komplexes bestätigen, wurden Zweifel daran geäußert, daß *in vivo* tatsächlich zweiwertige Ionen diesen Effekt vermitteln^[146]. Versuche von Schuster und Olson und kürzlich auch von Chiang und Sacktor mit Herzmitochondrien bestätigen jedoch unser Modell^[147-149].

4.6. Zusammenfassung der Regulationsmechanismen

Die bisherigen Untersuchungen der Regulation durch Interkonvertierung lassen den Schluß zu, daß sie bei einem energieverbrauchenden Organ wie dem Herzen stärker in Richtung auf eine Aktivierung der Pyruvat-Dehydrogenase wirkt, bei einem gluconeogenetischen Organ wie der Niere dagegen eher in Richtung auf eine Inaktivierung^[51]. Darauf weist die höhere Phosphatase- und die niedrigere Kinaseaktivität des gereinigten Herzenzymes ebenso hin wie die Tatsache, daß der Schutzefekt des Pyruvats gegen Inaktivierung hier wesentlich stärker ist als bei der Niere^[107]. Allerdings ist noch völlig unklar, ob es sich hierbei um einen quantitativen oder einen qualitativen Unterschied handelt, d. h. ob der Herz-Multienzymkomplex mehr oder aktiver Kinasemoleküle enthält.

Reed hat darauf hingewiesen^[50], daß zwischen der Pyruvat-Dehydrogenase und der Pyruvat-Carboxylase eine interessante reziproke Beziehung besteht: Die Inhibitoren des einen Enzyms – ATP und Coenzym A – sind essentielle Cofaktoren des anderen. Es ist durchaus denkbar, daß die Konzentration dieser Metaboliten einen Einfluß darauf ausübt, ob Pyruvat über den Citronensäurezyklus für den Energiestoffwechsel oder über Oxalacetat für die Gluconeogenese verwendet wird (siehe Abb. 5). Allerdings reichen die vorliegenden Daten bei weitem nicht aus, um die zahlreichen auf den Pyruvatdehydrogenase-Multienzymkomplex einwirkenden Regulationsmechanismen quantitativ zu erfassen und ihre Bedeutung für die Aktivität des Enzyms *in vivo* abzuschätzen. Viele der hier geschilderten Experimente sind mit dem gereinigten Enzym im Reagensglas durchgeführt worden und warten noch auf ihre Bestätigung durch Versuche mit lebenden Organismen. Die Interpretation, daß hier die Schaltstelle zwischen Energiestoffwechsel und Gluconeogenese vorliegt, bleibt bis auf weiteres Spekulation. Auch die Beziehung zum Fettsäurestoffwechsel ist noch weitgehend unklar. Diese Übersicht soll daher über eine Zusammenfassung der wichtigsten kinetischen Daten (Tabelle 2 und 3) und die Andeutungen in Abb. 5 nicht hinausgehen.

Man könnte weiterhin spekulieren, ob durch die drei hier beschriebenen Ebenen der Regulation (Abschnitt 4.1) eine Arbeitsteilung angestrebt wird, etwa in dem Sinne, daß jede Ebene für eine bestimmte Zeitskala verantwortlich ist. Die chromosomale Ebene reguliert die Enzymaktivität langsam, im Zeitraum von Stunden und Tagen; die Regulation durch feed-back erfolgt schnell, innerhalb von Sekunden oder gar Millisekunden. Die Interkonvertierung füllt die Lücke im Minutenbereich, so daß die Geschwindigkeit der Pyruvatoxidation sowohl an kurzfristige als auch an langfristige Änderungen der Anforderungen an den Stoffwechsel angepaßt werden kann.

5. Schlußbemerkungen

5.1. Der Multienzymkomplex – ein Artefakt?

In der Einleitung wurde auf die Möglichkeit hingewiesen, daß sich bei der Isolierung des Enzyms mehrere Proteine zu einem Multienzymkomplex zusammenlagern könnten, d. h. daß der Multienzymkomplex vielleicht ein Präparationsartefakt ist. Dafür spricht, daß es bis heute trotz seiner Größe nicht gelungen ist, den Pyruvatdehydrogenase-Komplex elektronenmikroskopisch im Mitochondrion nachzuweisen. Folgende Argumente sprechen jedoch gegen diese Hypothese:

1. Die Assoziation der beteiligten Enzyme ist hochspezifisch. Es können z. B. keine Hybridkomplexe mit den Teilenzymen des ansonsten sehr ähnlichen α -Ketoglutaräure-Komplexes gebildet werden (wenn man einmal von E_3 , dem Flavoprotein, absieht, das in beiden Komplexen gleich ist).
2. Die elektronenmikroskopischen Bilder des gereinigten Komplexes und der Teilenzyme zeigen, daß die Geometrie der Komplexe organismus-spezifisch ist. (Da die aus ihnen gewonnenen Daten mit Messungen der Röntgen-Kleinwinkelstreuung übereinstimmen, repräsentieren sie auch keine Artefakte der Fixierung oder Färbung.) Hybride aus Komplexen verschiedener Organismen werden nicht gebildet.
3. Die Aktivität der Enzyme im Komplex ist größer als im isolierten Zustand. So stimuliert z. B. E_2 die Phosphorylierung von E_1 durch die Pyruvatdehydrogenase-Kinase erheblich^[107]. Die Kinase ist ferner mit E_2 assoziiert, ihr Substrat aber ist E_1 . Beides macht die Komplexbildung auch *in vivo* wahrscheinlich.

Der endgültige Beweis für das Vorhandensein des Komplexes *in vivo* steht jedoch noch aus.

5.2. Biologische Bedeutung eines Multienzymkomplexes

Bringt es Vorteile für den Stoffwechsel mit sich, wenn sich mehrere Enzyme zu Multienzymkomplexen zusammenlagern? Diese Frage kann hier nur unter zwei Gesichtspunkten gestreift werden.

1. Ein Multienzymkomplex katalysiert mehrere Reaktionsschritte, ohne daß Zwischenstufen das Enzym verlassen und zum nächsten Enzym der Stoffwechselsequenz diffundieren müssen. Das kann kinetisch ein Vorteil sein, verhindert aber auch, daß andere Enzyme um eine der Zwischenstufen konkurrieren und sie „abzweigen“. Der Komplex „kanalisiert“ das Substrat in eine bestimmte Richtung.

2. Das Zusammenlagern gleicher Polypeptidketten zu oligomeren Enzymen ist ein weitverbreitetes Prinzip. Fast alle allosterisch regulierbaren Enzyme sind aus mehreren Polypeptidketten aufgebaut. Der Multienzymkomplex ist vielleicht nur eine Weiterentwicklung dieses Prinzips. Die Bedeutung von „Protein-Protein-Wechselwirkungen“ für die Regulation von Enzymaktivitäten läßt sich an vielen Beispielen belegen, und auch beim Pyruvatdehydrogenase-Komplex finden sich erste Hinweise dafür (siehe Abschnitt 5.1, Absatz 3).

Läßt man sich durch diese beiden Gesichtspunkte möglicherweise vom Sinn des Multienzymkomplexes überzeugen, so bleibt doch die Größe des Gebildes vorerst noch ein Rätsel. Warum sind anstatt je einer gleich 18 (*E. coli*) oder gar bis zu 60 (Säuger) Polypeptidketten der Teilenzyme in einem Komplex enthalten? Bringt die daraus resultierende Geometrie die aktiven Zentren der Enzyme in eine besonders günstige

sterische Anordnung? Für die Beantwortung dieser Fragen reichen die vorliegenden experimentellen Daten nicht aus.

Eingegangen am 2. April 1974,
in gekürzter Form am 21. Januar 1975 [A 73]

- [1] L. J. Reed u. D. J. Cox, *Ann. Rev. Biochem.* 35, 57 (1966).
 [2] H. Sund u. K. Weber, *Angew. Chem.* 78, 217 (1966); *Angew. Chem. internat. Edit.* 5, 231 (1966).
 [3] M. Koike, L. J. Reed u. W. R. Carroll, *J. Biol. Chem.* 238, 30 (1963).
 [4] I. E. Gunsalus in W. B. McElroy u. H. B. Glass: *The Mechanism of Enzyme Action*. John Hopkins Press, Baltimore 1954, S. 545.
 [5] M. Koike, L. J. Reed u. W. R. Carroll, *J. Biol. Chem.* 235, 1924 (1960).
 [6] L. J. Reed u. C. R. Willms in W. A. Wood: *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York 1966, Bd. IX, S. 247.
 [7] T. W. Brestens, J. Krul, P. C. Scheepens u. C. Veeger, *FEBS-Lett.* 22, 305 (1972).
 [8] L. J. Reed, F. R. Leach u. M. Koike, *J. Biol. Chem.* 232, 123 (1958).
 [9] R. W. Harding, D. F. Caroline u. R. P. Wagner, *Arch. Biochem. Biophys.* 138, 653 (1970).
 [10] O. H. Wieland, U. Hartmann u. E. A. Siess, *FEBS-Lett.* 27, 240 (1972).
 [11] U. Wais, U. Gillmann u. J. Ullrich, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 354, 206 (1973).
 [12] U. Wais, U. Gillmann u. J. Ullrich, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 354, 1378 (1973).
 [13] E. Junger, H. Reinauer, U. Wais u. J. Ullrich, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 354, 1655 (1973).
 [14] M. Crompton u. G. G. Lattes, *Arch. Biochem. Biophys.* 143, 143 (1971).
 [15] V. Jagannathan u. R. S. Schweet, *J. Biol. Chem.* 196, 551 (1952).
 [16] R. S. Schweet, B. Katchman, R. M. Bock u. V. Jagannathan, *J. Biol. Chem.* 196, 563 (1952).
 [17] A. A. Glemza, L. S. Zilber u. S. E. Severin, *Biokhimiya* 31, 1033 (1966).
 [18] S. E. Severin, L. S. Hylouca u. V. S. Gomazkova, Abstracts, 8th International Congress of Biochemistry, Interlaken 1970, S. 117.
 [19] J. P. Bross u. S. Cederbaum, Abstracts, 9th International Congress of Biochemistry, Stockholm 1973, S. 361.
 [20] P. Scriba u. H. Holzer, *Biochem. Z.* 334, 473 (1961).
 [21] T. Hayakawa, H. Muta, M. Hirashima, S. Ide, K. Okabe u. M. Koike, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 17, 51 (1964).
 [22] T. Hayakawa, M. Hirashima, S. Ide, M. Hamada, K. Okabe u. M. Koike, *J. Biol. Chem.* 241, 4694 (1966).
 [23] E. Ishikawa, R. M. Oliver u. L. J. Reed, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 56, 534 (1966).
 [24] T. C. Linn, J. W. Pelley, F. H. Pettit, F. Hucho, D. D. Randall u. L. J. Reed, *Arch. Biochem. Biophys.* 148, 327 (1972).
 [25] L. J. Reed u. D. J. Cox in P. D. Boyer: *The Enzymes*. Academic Press, New York 1970, S. 213.
 [26] M. H. Eley, G. Namihiira, L. Hamilton, P. Munk u. L. J. Reed, *Arch. Biochem. Biophys.* 152, 655 (1972).
 [27] O. Vogel, B. Hoehn u. U. Henning, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69, 1615 (1972).
 [28] O. Vogel, B. Hoehn u. U. Henning, *Eur. J. Biochem.* 30, 354 (1972).
 [29] H. Durchschlag, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 354, 205 (1973).
 [29a] H. Durchschlag, *Biophys. Struct. Mechanism* 1, 153, 169 (1975).
 [30] O. Vogel u. U. Henning, *Eur. J. Biochem.* 18, 103 (1971).
 [31] R. N. Perham u. J. O. Thomas, *FEBS-Lett.* 15, 8 (1971).
 [32] O. Vogel, H. Beikind, H. Müller u. U. Henning, *Eur. J. Biochem.* 20, 169 (1971).
 [33] C. R. Willms, R. M. Oliver, H. R. Henney, B. B. Mukherjee u. L. J. Reed, *J. Biol. Chem.* 242, 889 (1967).
 [34] J. C. Gunsalus, *Fed. Proc.* 13, 715 (1954).
 [35] M. Koike u. L. J. Reed, *J. Biol. Chem.* 235, 1931 (1960).
 [36] H. Nawa, W. T. Brady, M. Koike u. L. J. Reed, *J. Amer. Chem. Soc.* 82, 896 (1960).
 [37] L. J. Reed, M. Koike, M. E. Levitch u. F. R. Leach, *J. Biol. Chem.* 232, 143 (1958).
 [38] K. Suzuki u. L. J. Reed, *J. Biol. Chem.* 238, 4021 (1963).
 [39] G. R. Seaman u. M. D. Naschke, *J. Biol. Chem.* 213, 705 (1955).
 [40] K. Daigo u. L. J. Reed, *J. Amer. Chem. Soc.* 84, 606 (1962).
 [41] H. Fernandez-Moran, L. J. Reed, M. Koike u. C. R. Willms, *Science* 145, 930 (1964).
 [42] E. R. Schwartz u. L. J. Reed, *J. Biol. Chem.* 244, 6074 (1969).
 [43] L. J. Reed u. R. M. Oliver, *Brookhaven Symp. Biol.* 21, 397 (1968).
 [44] T. Hayakawa u. M. Koike, *J. Biol. Chem.* 242, 1356 (1967).
 [45] T. Hayakawa, T. Kanazaki, T. Kitamura, Y. Fukuyoshi, Y. Sakurai, K. Koike, T. Stenatsu u. M. Koike, *J. Biol. Chem.* 244, 3660 (1969).
 [46] C. R. Barrera, G. Namihiira, L. Hamilton, P. Munk, M. E. Eley, T. C. Linn u. L. J. Reed, *Arch. Biochem. Biophys.* 148, 343 (1972).
 [47] P. A. Sere, *Science* 158, 936 (1967).
 [48] V. Massey, T. Hofmann u. G. Palmer, *J. Biol. Chem.* 237, 3820 (1962).
 [49] J. Visser u. C. Veeger, *Biochim. Biophys. Acta* 159, 265 (1968).
 [49a] J. P. Brown u. R. N. Perham, *Biochem. J.* 138, 505 (1974).
 [49b] R. G. Matthews, L. D. Arscott u. C. H. Williams, *Biochim. Biophys. Acta* 370, 26 (1974).
 [50] T. C. Linn, F. H. Pettit u. L. J. Reed, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 62, 234 (1969).
 [51] T. C. Linn, F. H. Pettit, F. Hucho u. L. J. Reed, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 64, 227 (1969).
 [52] T. E. Roche, J. W. Pelley, D. D. Randall, M. W. Burgett u. L. J. Reed, *Fed. Proc.* 30, 1175 (1971).
 [53] H. Reinauer, persönliche Mitteilung.
 [54] E. Junger u. H. Reinauer, *Biochim. Biophys. Acta* 250, 478 (1971).
 [55] R. Breslow, *J. Amer. Chem. Soc.* 80, 3719 (1958).
 [56] A. Schellenberger, *Angew. Chem.* 79, 1050 (1967); *Angew. Chem. internat. Edit.* 6, 1024 (1967).
 [57] P. Hemmerich, C. Veeger u. H. C. S. Wood, *Angew. Chem.* 77, 699 (1965); *Angew. Chem. internat. Edit.* 4, 671 (1965).
 [58] G. R. Penzer u. G. K. Radda, *Quart. Rev. Chem. Soc.* 21, 43 (1967).
 [59] P. Hemmerich, G. Nagelschneider u. C. Veeger, *FEBS-Lett.* 8, 69 (1970).
 [60] E. C. Slater, *Flavins and Flavoproteins*. Elsevier, Amsterdam 1966.
 [61] K. Yagi: *Flavins and Flavoproteins*. University of Tokyo Press, Tokyo 1968.
 [62] H. Kamin: *Flavins and Flavoproteins*. University Park Press, Baltimore 1971.
 [63] H. Sund in T. P. Singer: *Biological Oxidations*. Interscience, New York 1968, S. 603.
 [64] K. A. Schellenberg in H. Sund: *Pyridine Nucleotide-Dependent Dehydrogenases*. Springer, Berlin 1970, S. 15.
 [65] K. Wallenfels in H. Sund: *Pyridine Nucleotide-Dependent Dehydrogenases*. Springer, Berlin 1970, S. 31.
 [66] P. Goldman u. P. R. Vagelos in M. Florkin u. E. H. Stotz: *Comprehensive Biochemistry*. Elsevier, Amsterdam 1964, Bd. 15, S. 71.
 [67] L. J. Reed in M. Florkin u. E. H. Stotz: *Comprehensive Biochemistry*. Elsevier, Amsterdam 1966, Bd. 14, S. 99.
 [68] M. L. Das, M. Koike u. L. J. Reed, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 47, 753 (1961).
 [69] H. Holzer u. K. Beaucamp, *Angew. Chem.* 71, 776 (1959).
 [70] J. Ullrich u. A. Mannschreck, *Biochim. Biophys. Acta* 115, 46 (1966).
 [71] A. Schellenberg, A. Kolbe u. G. Hübner, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 341, 22 (1965).
 [72] J. C. Gunsalus, L. S. Barton u. W. Gruber, *J. Amer. Chem. Soc.* 78, 1763 (1956).
 [73] O. K. Reiss, *J. Biol. Chem.* 233, 789 (1958).
 [74] T. E. Roche u. L. J. Reed, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 48, 840 (1972).
 [75] M. E. Maldonado, K.-J. Ok u. P. A. Frey, *J. Biol. Chem.* 247, 2711 (1972).
 [76] E. R. Schwartz u. L. J. Reed, *J. Biol. Chem.* 245, 183 (1970).
 [77] E. R. Schwartz u. L. J. Reed, *J. Biol. Chem.* 243, 639 (1968).
 [78] V. Massey u. C. Veeger, *Biochim. Biophys. Acta* 48, 33 (1961).
 [79] V. Massey in P. D. Boyer, H. Lardy u. K. Myrbäck: *The Enzymes*. Academic Press, New York 1963, Bd. 7, S. 275.
 [80] W. H. Walker u. P. Hemmerich, *Eur. J. Biochem.* 13, 258 (1970).
 [81] R. L. Scarsl, J. M. Peeters u. D. R. Sanadi, *J. Biol. Chem.* 236, 2317 (1961).
 [82] G. Palmer u. V. Massey, *Biochim. Biophys. Acta* 58, 349 (1962).
 [83] Zitiert in [67], S. 114.
 [84] J. Visser, H. Voethberg u. C. Veeger in H. Sund: *Pyridine Nucleotide-Dependent Dehydrogenases*. Springer, Berlin 1970, S. 359.
 [85] H. van Muiswinkel-Voethberg u. C. Veeger, *Eur. J. Biochem.* 33, 285 (1973).
 [86] J. F. Kalse u. C. Veeger, *Biochim. Biophys. Acta* 159, 244 (1968).
 [87] H. van Muiswinkel-Voethberg, J. Visser u. C. Veeger, *Eur. J. Biochem.* 33, 265 (1973).
 [87a] O. A. Moe, D. A. Lerner u. G. G. Hammes, *Biochemistry* 13, 2552 (1974).
 [88] M. Lazdunski, *Curr. Top. Cell. Regul.* 6, 267 (1972).
 [89] K. Uyeda u. J. C. Rabinowitz, *J. Biol. Chem.* 246, 3111 (1971).
 [90] F. R. Williams u. L. P. Hager, *Arch. Biochem. Biophys.* 116, 168 (1966).
 [91] C. O. Cunningham u. L. P. Hager, *J. Biol. Chem.* 246, 1583 (1971).
 [92] U. Henning, G. Dennert, R. Hertel u. W. S. Skipp, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 31, 227 (1966).
 [93] M. Engel-Rae u. U. Henning, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 53, 812 (1973).
 [94] J. Dietrich u. U. Henning, *Eur. J. Biochem.* 14, 258 (1970).
 [95] J. E. Flatgaard, B. Hoehn u. U. Henning, *Arch. Biochem. Biophys.* 143, 461 (1971).
 [96] H. Reinauer, G. Grassow u. S. Hollmann, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 349, 969 (1968).
 [97] H. Reinauer u. S. Hollmann, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 350, 40 (1969).
 [98] H. Reinauer, W. Janssen u. S. Hollmann, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 352, 125 (1971).
 [99] R. L. Jungas, *Fed. Proc.* 29, 891 (1970).

- [100] R. L. Jungas, Endocrinology 86, 1368 (1970).
- [101] R. M. Denton, H. G. Coore, B. R. Martin u. P. J. Randle, Nature New Biol. 231, 115 (1971).
- [102] L. Weiss, G. Löffler, A. Schirrmann u. O. Wieland, FEBS-Lett. 15, 229 (1971).
- [103] O. Wieland, E. Siess, H. J. v. Funcke, C. Patzelt, A. Schirrmann, G. Löffler u. L. Weiss in O. Wieland, E. Helmreich u. H. Holzer: Metabolic Interconversion of Enzymes. Springer, Berlin 1972.
- [104] O. Wieland, C. Patzelt u. G. Löffler, Eur. J. Biochem. 26, 426 (1972).
- [105] C. Patzelt, G. Löffler u. O. Wieland, Eur. J. Biochem. 33, 117 (1973).
- [106] R. M. Denton u. P. J. Randle, Abstracts, 9th International Congress of Biochemistry, Stockholm 1973, S. 351.
- [107] F. Hucho, D. D. Randall, T. E. Roche, M. W. Burgett, J. W. Pelley u. L. J. Reed, Arch. Biochem. Biophys. 151, 238 (1972).
- [108] H. G. Coore, R. M. Denton, B. R. Martin u. P. J. Randle, Biochem. J. 125, 115 (1971).
- [109] V. Sica u. P. Cuatrecasas, Biochemistry 12, 2282 (1973).
- [110] E. R. Schwartz, L. O. Old u. L. J. Reed, Biochem. Biophys. Res. Commun. 31, 495 (1968).
- [111] L. C. Scheu u. D. E. Atkinson, J. Biol. Chem. 245, 5974 (1970).
- [112] R. G. Hansen u. U. Henning, Biochim. Biophys. Acta 122, 355 (1966).
- [113] H. Bisswanger u. U. Henning, Eur. J. Biochem. 24, 376 (1971).
- [114] E. R. Schwartz u. L. J. Reed, Biochemistry 9, 1435 (1970).
- [115] L. C. Shen, L. Fall, G. M. Walton u. D. E. Atkinson, Biochemistry 7, 4041 (1968).
- [116] P. B. Garland u. P. J. Randle, Biochem. J. 91, 6c (1964).
- [117] F. Hucho, unveröffentlichtes Ergebnis.
- [118] J. Bremer, Eur. J. Biochem. 8, 535 (1969).
- [119] J. D. Erfle u. F. Somer, Biochim. Biophys. Acta 178, 441 (1969).
- [120] R. J. Haslam u. H. A. Krebs, Biochem. J. 86, 432 (1963).
- [121] T. König u. G. Szabados, Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. 2, 253 (1967).
- [122] C. K. Silert u. D. B. Martin, Biochem. Biophys. Res. Commun. 31, 818 (1968).
- [123] W. M. Taylor u. M. L. Halperin, J. Biol. Chem. 248, 6080 (1973).
- [124] H. Holzer u. W. Durtze, Annu. Rev. Biochem. 40, 345 (1971).
- [125] A. Sols u. C. Gancedo in E. Kun u. S. Grisolia: Biochemical Regulatory Mechanisms in Eukaryotic Cells. Wiley, New York 1972.
- [126] O. Wieland, E. Helmreich u. H. Holzer: Metabolic Interconversion of Enzymes. Springer, Berlin 1972.
- [127] O. Wieland u. B. von Jagow-Westermann, FEBS-Lett. 3, 271 (1969).
- [128] O. Wieland, B. von Jagow-Westermann u. B. Stukowski, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 350, 329 (1969).
- [129] M. W. Burgett, PhD-Thesis, University of Texas, Austin, Texas 1972.
- [130] R. L. Jungas, Metabolism 20, 43 (1971).
- [131] H. G. Coore, R. M. Denton, B. R. Martin u. P. J. Randle, Biochem. J. 125, 115 (1971).
- [132] A. Corsi, M. Zatti, M. Midrio u. A. L. Granata, FEBS-Lett. 11, 65 (1970).
- [133] H. D. Söling, B. Willms u. G. Janson, FEBS-Lett. 11, 324 (1970).
- [134] H. D. Söling, G. Bernhard u. G. Janson, FEBS-Lett. 13, 201 (1971).
- [135] C. Patzelt, G. Löffler u. O. Wieland, Eur. J. Biochem. 33, 117 (1973).
- [136] L. J. Reed, T. C. Linn, F. Hucho, G. Namihira, B. R. Barrera, T. E. Roche, J. W. Pelley u. D. D. Randall in O. Wieland, E. Helmreich u. H. Holzer: Metabolic Interconversion of Enzymes. Springer, Berlin 1972, S. 281.
- [137] E. T. Hutcheson, PhD-Thesis, University of Texas, Austin, Texas 1971.
- [138] F. Hucho, unveröffentlichte Beobachtung.
- [139] F. Hucho, Eur. J. Biochem. 46, 499 (1974).
- [140] B. Hoffmann u. F. Hucho, FEBS-Lett. 43, 116 (1974).
- [141] H. A. Krebs, B. M. Notton u. R. Hems, Biochem. J. 101, 607 (1966).
- [142] H. A. Krebs, T. Gascoyne u. B. M. Notton, Biochem. J. 102, 275 (1967).
- [143] D. Veloso, R. W. Guynn, M. Oskarsson u. R. Veech, J. Biol. Chem. 248, 4811 (1973).
- [144] J. McD. Blair, Eur. J. Biochem. 13, 384 (1970).
- [145] D. E. Atkinson, Biochemistry 7, 4030 (1968).
- [146] E. J. Walajtys, D. P. Gottesman u. J. R. Williamson, J. Biol. Chem. 249, 1857 (1974).
- [147] S. M. Schuster u. M. S. Olson, J. Biol. Chem. 249, 7151 (1974).
- [148] S. M. Schuster u. M. S. Olson, J. Biol. Chem. 249, 7159 (1974).
- [149] P. C. Chiang u. B. Sacktor, J. Biol. Chem. 250, 3399 (1975).

ZUSCHRIFTEN

Zuschriften sind kurze vorläufige Berichte über Forschungsergebnisse aus allen Gebieten der Chemie. Vom Inhalt der Arbeiten muß zu erwarten sein, daß er aufgrund seiner Bedeutung, Neuartigkeit oder weiten Anwendbarkeit bei sehr vielen Chemikern allgemeine Beachtung finden wird. Autoren von Zuschriften werden gebeten, bei Einsendung ihrer Manuskripte der Redaktion mitzuteilen, welche Gründe in diesem Sinne für eine vordringliche Veröffentlichung sprechen. Die gleichen Gründe sollen im Manuskript deutlich zum Ausdruck kommen. Manuskripte, von denen sich bei eingehender Beratung in der Redaktion und mit auswärtigen Gutachtern herausstellt, daß sie diesen Voraussetzungen nicht entsprechen, werden den Autoren mit der Bitte zurückgesandt, sie in einer Spezialzeitschrift erscheinen zu lassen, die sich direkt an den Fachmann des behandelten Gebietes wendet.

Synthese von tert.-alkyl-substituierten Glycinen^[1]

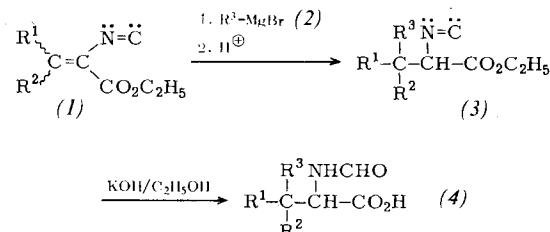
Von Ulrich Schöllkopf und Rolf Meyer^[*]

Die α -metallierten Isocyanide^[2] haben bereits viele neuartige Zugänge zu Aminosäuren eröffnet^[3, 4]. Wir möchten nun über eine Synthese von tert.-alkyl-substituierten Glycinen [Typ (4)]

[*] Prof. Dr. U. Schöllkopf und Dipl.-Chem. R. Meyer
Organisch-Chemisches Institut der Universität
34 Göttingen, Windausweg 2

berichten. Diese Verbindungen werden u. a. in der Molekularbiologie herangezogen, um z. B. den Erkennungsbe- reich von tRNA-Synthetasen abzugrenzen^[5].

Zur Synthese wird an die β -substituierten α -Isocyan-acrylsäureäthylester (1)^[6] ein Grignard-Reagens (2) angelagert. Nach Hydrolyse erhält man α -tert.-alkyl-substituierte α -Isocyan-essigsäureäthylester (3), die sich (hier wie sonst^[4]) in guten Ausbeuten in Aminosäure-Derivate (4) umwandeln lassen. Soweit bisher geprüft, sind beim Additionsschritt (1) \rightarrow (3) die Ausbeuten mit Methylmagnesiumhalogenid [$R^3 = CH_3$ in (2)] unbefriedigend – vermutlich deshalb, weil dieses relativ kleine Reagens bevorzugt an die Estercarbonylgruppe addiert.



Allgemeine Arbeitsvorschrift:

Alle Versuche wurden unter Stickstoff durchgeführt. Zur Lösung von 40 mmol (2) (dargestellt in situ aus Alkybromid und Magnesium) in 50 ml Äther (nicht aber Tetrahydrofuran^[7]) tropfte man unter Röhren (Magnetrührer) in 30 min bei -5°C die Lösung von 20 mmol (1)^[6] in 20 ml Petroläther und 20 ml Äther. Das Additionsprodukt fiel dabei als brauner „Teer“ aus und durfte nicht durch Zugabe von weiterem Lösungsmittel in Lösung gebracht werden, weil sich sonst kein (3) isolieren ließ.