

ÜBER DAS VERHALTEN VON NUCLEOTIDEN IN EMBRYONEN BEI AEROBIOSE UND ANAEROBIOSE

HEINZ TIEDEMANN

Heiligenberg Institut, Abt. O. Mangold, Heiligenberg, Kr. Ueberlingen, Bodensee (Deutschland)

Versuche mit Molch- und Hühnerembryonen zeigten, dass Sauerstoffmangel eine Störung der frühen Embryonalentwicklung verursacht und zu Missbildungen führt. BÜCHNER und Mitarbeiter¹ untersuchten eingehend die Abhängigkeit der entstehenden Missbildungen von dem Zeitpunkt, zu welchem der Sauerstoffmangel einsetzt. Nach Versuchen von MANGOLD UND WAECHTER² sind auch die einzelnen Körpermasse äusserlich normal erscheinender Molchlarven, welche in einem sauerstoffarmen Medium aufgezogen wurden, in verschieden hohem Grade reduziert.

Vom Beginn der Furchung bis zum Ende der Neurulation mit Blausäure behandelte Keime zeigten ähnliche Missbildungen wie unter O_2 -Mangel gehaltene. Die Molchkeime vertrugen höchstens eine Blausäurekonzentration von $0.5 \cdot 10^{-4}$ Mol/Liter. Bei dieser Konzentration überlebten 44% der Versuchskeime. Die übrigen starben im Gastrula- und Neurulastadium, welches sie mit Verzögerung erreichten, ab. Die Atmung dieser Stadien wurde durch $0.5 \cdot 10^{-4}$ M HCN um ca. 30% gehemmt³.

Wie andere Embryonen haben auch Molchkeime eine anaerobe Glykolyse⁴. Die durch Glykolyse gewonnene Energie reicht jedoch in keinem Stadium aus, um die normalerweise durch Atmung gewonnene Energie zu ersetzen⁵.

Es ist anzunehmen, dass die Entwicklungshemmung bei Anaerobiose durch Störungen des Stoffwechsels verursacht wird. Ein Einblick in diese Stoffwechselveränderungen konnte durch Bestimmung der Konzentrationen der Nucleosidpolyphosphate und des anorganischen Phosphates unter aeroben und anaeroben Bedingungen gewonnen werden. Für die Versuche wurden Gastrula- und Neurulastadien des Alpenmolches verwendet. Es zeigte sich, dass die Keime ausser Adenosinphosphaten auch noch andere Nucleosidphosphate in relativ grosser Menge enthalten. Diese Verbindungen wurden dann aus Hühnerembryonen isoliert und ihre Konstitution ermittelt.

BESCHREIBUNG DER METHODEN

Die Gewinnung der Nucleotide erfolgte nach der Methode von LE PAGE⁶. Das Extraktionsverfahren musste jedoch für die Aufarbeitung von Molch- und Froschkeimen etwas modifiziert werden.

200 Keime wurden mit Wasser bzw. HCN-Lösung gewaschen und mit 6 ml einer auf -10° gekühlten Mischung von Wasser/94% Alkohol/20% Trichloressigsäure = 1/1/1 im Potter-Elvehjem-Homogenisator homogenisiert. Nach dem Zentrifugieren ($15'$: $25,000 \times g$) wurde der Rückstand unter Kühlung noch zweimal mit je 1 ml der Trichloressigsäure-Alkohol-Wasser-Mischung homogenisiert. Kontrollversuche zeigten, dass die Extraktion dann praktisch vollständig war. Durch die Zugabe von Alkohol zum Extraktionsgemisch konnte eine schwer zentrifugierbare Trübung des Extraktes vermieden werden.

Zu den vereinigten Extraktionslösungen wurden $\frac{1}{10}$ Volumen 50% Bariumacetatlösung und 2.5 ml Alkohol hinzugefügt und dann vorsichtig mit 2 N NaOH und 0.1 N NaOH (CO_2 -frei) neutralisiert (Indikator Phenolphthalein).

Literatur S. 393.

In einigen Versuchen wurden 4 Volumen 94% Alkohol zugesetzt. Es fällt dann auch Adenylsäure als Bariumsalz aus.

Der Niederschlag blieb einige Stunden bei 0° stehen, wurde nach dem Abzentrifugieren zweimal mit 1% Ba-Acetat in 50% Alkohol (bzw. 90% Alkohol), einmal mit 50% Alkohol (90% Alkohol) gewaschen und bei 0° in 0.4 ml 0.2 N HCl gelöst. Das Barium wurde dann als Sulfat gefällt (0.6 ml 0.2 N H₂SO₄), zentrifugiert, mit 0.4 ml Wasser nachgewaschen und die Überstände mit 0.1 ml 2 N NaOH neutralisiert. In der so erhaltenen Lösung wurde ATP* mit Myosin oder Hexokinase (s. unten) sowie das anorganische Phosphat bestimmt.

Eine einwandfreie papierchromatographische Trennung der Nucleotide konnte erst erreicht werden, wenn die Ba-Salze umgefällt wurden. Die Bariumsalze von je 200 Keimen wurden in 1.0–1.5 ml 0.1 N HCl gelöst (0°, pH 1–2), vom nicht Gelösten abzentrifugiert und mit 0.5 ml 0.1 N HCl nachgewaschen.

Nach Zusatz von Alkohol wurden die vereinigten Lösungen neutralisiert, die ausgefällten Ba-Salze nach mehrstündigem Stehen bei 0° abzentrifugiert, mit Alkohol und Äther gewaschen und in HCl gelöst (0.3 ml 0.1 N + 1 Tropfen 1 N HCl; pH 1–2). Die Entfernung des Barium aus der zentrifugierten Lösung erfolgte durch tropfenweise Zugabe von 0.05 N Na₂SO₄-Lösung bis keine Fällung mehr entstand.

Aliquote Teile der Lösung (entsprechend 100 Keimen) wurden direkt oder nach Zugabe von 0.1 N NH₄OH bis pH ~ 4 auf das Papier (s. Chromatographische Trennung der Nucleotide) aufgetragen und in einem kalten Luftstrom getrocknet.

Phosphorbestimmung

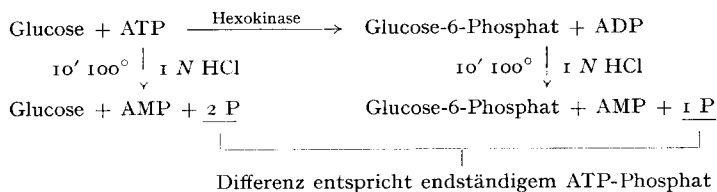
Die Phosphorbestimmung erfolgte zuerst nach dem Verfahren von FISKE UND SUBBAROW in der von LOHMANN⁷ angegebenen Modifikation. Später wandten wir jedoch zumeist die Methode von BERENBLUM UND CHAIN⁸ an, da diese empfindlicher ist.

Fermentchemische ATP-Bestimmung

ATP wurde (1) mit Myosin und (2) mit Hexokinase bestimmt.

Bei der ersten Methode wird die endständige ATP-Phosphatgruppe durch Myosin abgespalten. Man bestimmt dann die Zunahme des anorganischen Phosphors gegenüber der nicht mit Myosin incubierten Kontrolle. $\text{ATP} \xrightarrow{\text{Myosin}} \text{ADP} + \text{P}$.

Bei der zweiten Methode wird die endständige ATP-Phosphatgruppe unter Bildung von Glucose-6-Phosphat auf Glucose übertragen. Man bestimmt in aliquoten Teilen des Versuchsansatzes (s. unten) den säurelabilen Phosphor ($\Delta 10'$ P) vor und nach der Bebrütung mit Hexokinase. Die Abnahme des säurelabilen Phosphors entspricht einer ATP-Phosphatgruppe, da das gebildete Glucose-6-Phosphat bei der Säurehydrolyse nicht gespalten wird.



Versuchsansätze für die Bestimmung mit Myosin

(a) 0.4 ml Glykokollpuffer pH 8.6; 0.1 ml 0.1 M CaCl₂; 0.1 ml Myosin; 0.5 ml Substrat. Mit Wasser auf 2 ml aufgefüllt. Nach dem Incubieren bei 35° wurden 0.5 ml 25% Trichloressigsäure zugegeben und das Phosphat bestimmt (Wert P_a).

(b) Die Bestimmung wurde wie unter (a) beschrieben ausgeführt. Das Substrat wurde jedoch erst nach der Trichloressigsäure hinzugefügt und dann das Phosphat bestimmt (Wert P_b).

Die Blindwerte enthielten 0.5 ml Wasser an Stelle von Substrat. P_a–P_b ergibt den Wert für die endständige Phosphatgruppe der Nucleosidtriphosphate.

Versuchsansätze für die Bestimmung mit Hexokinase

(a) 1.0 ml Veronalpuffer pH 7.9; 0.2 ml 0.1 M MgCl₂; 0.2 ml M-Glucose; 0.1 ml Hexokinase; 0.5 ml Substrat, mit Wasser auf 2.0 ml aufgefüllt. Bei 35° incubiert, dann 0.5 ml 5 N HCl zugegeben, 10' auf 100° erhitzt und auf Zimmertemperatur abgekühlt. Nach Zugabe von 0.5 ml 20% Trichloressigsäure wurde das Phosphat bestimmt (Wert P_a).

* Abkürzungen: ATP = Adenosintriphosphat, ADP = Adenosindiphosphat, UTP = Uridin-triphosphat, UDP = Uridindiphosphat, GTP = Guanosintriphosphat, GDP = Guanosindiphosphat, NTP = Nucleosidtriphosphat.

(b) wie (a). Das Substrat wurde jedoch unmittelbar vor der 5 *N* HCl zugegeben und dann 10' auf 100° erhitzt (Wert P_b).

P_b-P_a ergibt den Wert für die endständige Phosphatgruppe der Nucleosidtriphosphate. Hexokinase wurde aus frischer Bäckerhefe nach dem Verfahren von BERGER, SLEIN, COLOWICK UND CORI⁸ bis Schritt 5 hergestellt. Das Präparat entsprach hinsichtlich seiner Reinheit demjenigen, welches von anderen Autoren zur ATP-Bestimmung verwendet wurde¹⁰. Für die Überlassung von Myosin haben wir Herrn Professor Dr. H. H. WEBER und Herrn Dr. HASSELBACH vielmals zu danken.

Chromatographische Trennung der Nucleotide

Von mehreren geprüften Lösungsmittelsystemen war für die Papierchromatographie isoButtersäure/conc. Ammoniak/Wasser = 66/1/33 am besten geeignet (16 Std. aufsteigend; 20° C)¹¹. Das Papier (Schleicher & Schüll 2043 b) wurde vor dem Gebrauch einmal mit 0.5 % Äthylendiamintetraacetat und 5 mal mit Wasser gewaschen.

Ein Teil der Chromatogramme wurde nach dem Trocknen und Abschneiden eines 3 cm breiten Streifens vom unteren Rand mehrmals entwickelt. Dadurch konnte die Trennung der einzelnen Substanzen verbessert werden.

Die Nucleotide wurden auf dem Papier durch das Photoprintverfahren¹² nachgewiesen (Philips TUV 6 W Lampe + Schott UG 5 Filter, 2 mm; Agfastat-Dokumentenpapier). Der Abstand Lichtquelle-Chromatogramm betrug 120 cm, die Belichtungszeit 6 Min.

Bei einigen Versuchen wurde eine grössere Menge Lösung strichförmig aufgetragen. Nach dem Entwickeln der Chromatogramme wurden die Nucleotide enthaltenden Papierstreifen ausgeschnitten und 5 mal mit je 2 ml Wasser eluiert, die Eluate auf ein kleines Volumen eingengt und die Absorptionsspektren aufgenommen (Zeiss Q II Spektrograph). Als Blindwert diente das Eluat eines gleichgrossen Papierstreifens aus einem Bezirk, welcher keine Nucleotide enthielt, aber in der Nähe der absorbierenden Fronten lag.

Die Trennung der verschiedenen Nucleotide durch Ionenaustauscherchromatographie erfolgte nach der Methode von HURLBERT, SCHMITZ, BRUMM UND POTTER¹³. Die Austauschersäule war von einem Mantel umgeben, durch welchen Wasser von 20° C geleitet wurde. Das Eluat wurde in 10 ml Fraktionen aufgefangen und die Absorption bei 260 m μ gemessen.

Um die getrennten Nucleotide zu charakterisieren, wurden die Absorptionsspektren der einzelnen Verbindungen bei verschiedenen pH-Werten aufgenommen.

Die Bestimmung des säurelabilen Phosphates erfolgte direkt im Eluat (1 ml Eluat + 0.2 ml 10 *N* HCl).

Zur weiteren Analyse wurden die Fraktionen im Vakuum zur Trockne eingedampft und das Ammoniumformat durch Sublimation bei 10⁻³ bis 10⁻⁴ Torr. entfernt. Das Sublimationsgefäss enthielt NaOH und CaCl₂ (1:2). Die isolierten Substanzen wurden mit 1 *N* HCl (0.1 ml je Fraktion) 1 Std. im geschlossenen Röhrchen auf 100° erhitzt¹⁴. Es entstehen freie Purine und Pyrimidinnucleotide neben geringen Mengen von Pyrimidinnucleosiden. Purine und Pyrimidinnucleotide wurden papierchromatographisch identifiziert (Lösungsmittelsystem: *n*-Butanol/96 % Äthylalkohol/5 *N* HCl = 9/6/6; aufsteigend¹⁵). Vergleichssubstanzen: Adenin, Guanin, 5'-Uridylsäure.

Berechnung der ATP-, UTP- und GTP-Konzentrationen

Die in der graphischen Darstellung eines Ionenaustauscherchromatogramms (s. Fig. 2) von den verschiedenen Nucleotiden eingenommenen Flächeninhalte sind den Nucleotidkonzentrationen proportional und können der Konzentrationsberechnung zu Grunde gelegt werden, wenn ein Gipfel einer einheitlichen oder zumindest annähernd einheitlichen Substanz entspricht. Die Berechnung wurde mit folgenden molaren Absorptionskoeffizienten, welche bei 260 m μ und der Wasserstoffionenkonzentration der Eluate gelten, vorgenommen: ATP: $a_M = 14.5 \cdot 10^3$; UTP: $a_M = 9.9 \cdot 10^3$; GTP: $a_M = 11.8 \cdot 10^3$ ^{16,17}.

Nachweis ATP, UTP und GTP spaltender Fermente

Je 200 nicht enthüllte Keime wurden mit 4 ml Puffer (Glykokoll-Puffer pH 8.6, Jonenstärke $\mu = 0.3$) bei 0° homogenisiert. Das Homogenat wurde ohne weitere Fraktionierung verwendet.

Versuchsansätze

0.4–0.8 ml Homogenat, 0.1 ml 0.05 *M* MgCl₂ oder CaCl₂, 1.5 ml Puffer, 0.1 ml Substrat (5 mg/ml). Gesamtvolumen 2.5 ml. Nach einstündiger Incubation bei 25° wurden 0.5 ml 30 % Trichloressigsäure hinzugefügt, zentrifugiert (25,000 \times g) und in der Lösung das anorganische Phosphat bestimmt. Zum Blindwert wurde erst Trichloressigsäure und dann Substrat zugegeben.

Bestimmung des Trockengewichts

1 ml Tritonkeime (\sim 330 enthüllte Gastrulen) bei 105° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, hat ein Trockengewicht von 298 mg, 1 ml Hühnerembryonen-Homogenat (aus 9 Tage alten Embryonen) ein Trockengewicht von 100 mg.

Vergleichssubstanzen

Herrn Dr. H. SCHMITZ möchte ich für die Überlassung von chromatographisch reinem ATP, den Pabst Laboratorien für UTP und GTP vielmals danken.

ERGEBNISSE

Fermentchemische Bestimmung der Nucleosidtriphosphate sowie des anorganischen Phosphates unter aeroben und anaeroben Bedingungen

Die Konzentration der Nucleosidtriphosphate sowie die des anorganischen Phosphates wurde in Gastrula-Neurulastadien von *Triton alpestris* unter aeroben und anaeroben Bedingungen bestimmt. Für die Bestimmung der Nucleosidtriphosphate verwendeten wir Myosin und Hexokinase. (s. METHODEN).

Zur Herstellung anaerober Bedingungen wurden die Keime mit 10^{-3} N und 10^{-4} N HCN behandelt. Die Atmung dieser Stadien wird durch 10^{-3} N HCN um etwa 90%, durch 10^{-4} N HCN um etwa 50% gehemmt.

Vorversuche hatten ergeben, dass Behandlung mit 10^{-3} N HCN bis zu einer Zeitdauer von etwa 8 Stunden die Keime nicht tötet. Nach der Entfernung der HCN-Lösung entwickeln sich die Keime weiter, sind aber, entsprechend der Dauer der HCN-Behandlung, gegenüber den Kontrollen in der Entwicklung zurück geblieben[§]. Unter diesen Versuchsbedingungen genügt also die anaerob gewonnene Energie, um die Keime am Leben zu erhalten. Sie reicht aber für die normale Weiterentwicklung nicht aus. Bei länger dauernder HCN-Behandlung sterben die Keime ab.

Tabelle I enthält die Ergebnisse der NTP- und Phosphatbestimmungen. Die Konzentration der Nucleosidtriphosphate ist anaerob um 45%–65% erniedrigt. Die Konzentration des anorganischen Phosphates ist dagegen durchschnittlich um 75% erhöht. Die beiden fermentchemischen Bestimmungsmethoden sind für ATP nicht spezifisch, sondern erfassen auch andere Nucleosidtriphosphate.

TABELLE I
ANORGANISCHES PHOSPHAT UND NTP-PHOSPHAT UNTER AEROBEN UND ANAEROBEN BEDINGUNGEN (γ P/100 GASTRULEN)

Anorganisches Phosphat aerob	Anorganisches Phosphat anaerob*	NTP-Phosphat (Myosin)** aerob	NTP-Phosphat (Myosin) anaerob*	NTP-Phosphat (Hexokinase)** aerob	NTP-Phosphat (Hexokinase) anaerob*
12.4	21.0	5.9	2.9	6.5	3.2
15.3	24.8	8.0	4.4	6.6	2.8
18.4	35.9	9.3	4.0	7.8	2.6
12.8	22.3	7.4	3.8		
Mittelwert					
14.7	26.0	7.6	3.8	7.0	2.9

* Keime 6–8 Std. mit 10^{-3} M HCN behandelt.

** Die NTP-Bestimmungen mit Myosin und mit Hexokinase wurden mit verschiedenen Versuchsansätzen vorgenommen.

KLEINZELLER¹⁸ hat 1942 mitgeteilt, dass Inosintriphosphat durch Myosin gespalten wird. Praktisch hatte dies für die ATP-Bestimmung nur geringe Bedeutung, weil ITP nur in sehr niedriger Konzentration in Geweben vorkommt. Neuere Versuche zeigten, dass auch UTP durch Myosin gespalten wird¹⁹. Unter unseren Versuchsbedingungen (s. METHODEN) wird aus UTP sogar schneller Phosphat

§ Ob Missbildungen entstehen, wurde nicht untersucht.

Literatur S. 393.

freigesetzt als aus ATP²⁰. Dies ist bei allen ATP-Bestimmungen zu beachten, weil UTP in verschiedenen Geweben gefunden wurde^{13, 21, 22} (vgl. unten). Durch Actomyosin wird ebenfalls aus GTP und UTP Phosphat abgespalten (WEBER UND HASSELBACH²³).

Bei der Bestimmung mit Hexokinase reagierten andere Nucleosidtriphosphate ebenfalls. Dies ist wahrscheinlich auf eine Verunreinigung der verwendeten Hexokinase mit Nucleosiddiphosphokinase zurückzuführen, denn BERG UND JOKLIK²⁴ fanden, dass sehr reines UTP Glucose in Gegenwart von Hexokinase nur sehr langsam phosphoryliert. Nucleosiddiphosphokinase katalysiert die Reaktion $UTP (GTP) + ADP \rightleftharpoons UDP (GDP) + ATP$. Da durch die Hexokinase-reaktion ADP wieder zurückgebildet wird, genügen katalytische Mengen von ADP, um alles vorhandene UTP (GTP) in UDP (GDP) überzuführen.

Trennung der Nucleotide durch Papierchromatographie und Ionenaustauscherchromatographie

Beim Übergang von aeroben zu anaeroben Bedingungen nimmt der ATP-Gehalt ab.

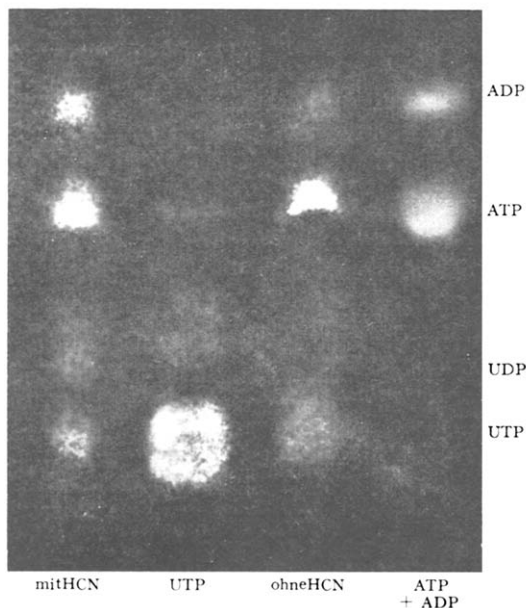


Fig. 1. Papierchromatographische Trennung der Nucleotide. Bei dem anaeroben Versuch wurden Gastrulae 5 Std. mit 10^{-3} M HCN incubiert.

Durch papierchromatographische Analyse (s. METHODEN) der Nucleotide konnte ermittelt werden, welche Verbindungen bei der ATP-Spaltung entstehen. Ausserdem zeigte sich, dass die Keime ausser Adennucleotiden auch noch andere Nucleosidphosphate enthalten.

Fig. 1 zeigt die Reproduktion eines Papierchromatogramms. Bei dem aeroben Versuch tritt ATP als stärkster Fleck hervor, ADP und AMP (letzteres ist auf dem abgebildeten Chromatogramm nicht mehr sichtbar) sind in geringerer Konzentration ebenfalls vorhanden. Ausser diesen Verbindungen sind auf dem Chromatogramm noch andere Nucleotide zu erkennen. Unter dem ATP ist ein Fleck sichtbar, welcher den gleichen R_F -Wert wie UTP und GTP hat. (Diese Substanzen überdecken sich im Chromatogramm.)

Das Absorptionsmaximum von ATP, welches aus dem Chromatogramm eluiert worden war, lag bei $259-260\text{ m}\mu$ (pH 7) bzw. $257-258\text{ m}\mu$ (pH 2) in Übereinstimmung mit den in der Literatur angegebenen Werten. Die in UTP-GTP Höhe liegende Substanz hatte bei $262\text{ m}\mu$ (pH 7) bzw. $261.5-261.0\text{ m}\mu$ (pH 11) ein Maximum. Diese Werte entsprechen den in der Literatur für UTP angegebenen^{24a}. Die Substanz wird also hauptsächlich aus UTP bestehen. Ihre Konzentration beträgt etwa $1/3$ der ATP-Konzentration.

Bei den anaeroben Versuchen (10^{-3} M und 10^{-4} M HCN) traten dem Adenosindiphosphat und Uridindiphosphat* entsprechende Flecken stärker hervor. Die Konzentration an Adenylsäure hatte anaerob dagegen nicht zugenommen.

Um das Vorkommen von anderen Triphosphaten ausser ATP in Embryonen weiter zu sichern, wurden die im säurelöslichen Extrakt enthaltenen Nucleotide durch

* Uridindiphosphat und Guanosindiphosphat werden in den Chromatogrammen nicht getrennt.

Chromatographie an Dowex-I nach der Methode von HURLBERT, SCHMITZ, BRUMM UND POTTER¹³ getrennt. Da Molchembryonen nicht in genügender Menge zur Verfügung standen, wurden die Versuche mit 8–9 Tage alten Hühnerembryonen ausgeführt. In Fig. 2 ist ein Chromatogramm wiedergegeben. Die Hühnerembryonen enthalten ausser ATP auch UTP und GTP in relativ grossen Mengen. Die Konzentrationen betragen ATP: 0.6 μ Mol/ml Embryonen; UTP: 0.2 μ Mol/ml; GTP: 0.075 μ Mol/ml. Die Gesamtkonzentration der Nucleosidtriphosphate in Hühnerembryonen beträgt ca. 0.9 μ Mol/ml (9 μ Mol/g Trockengewicht).

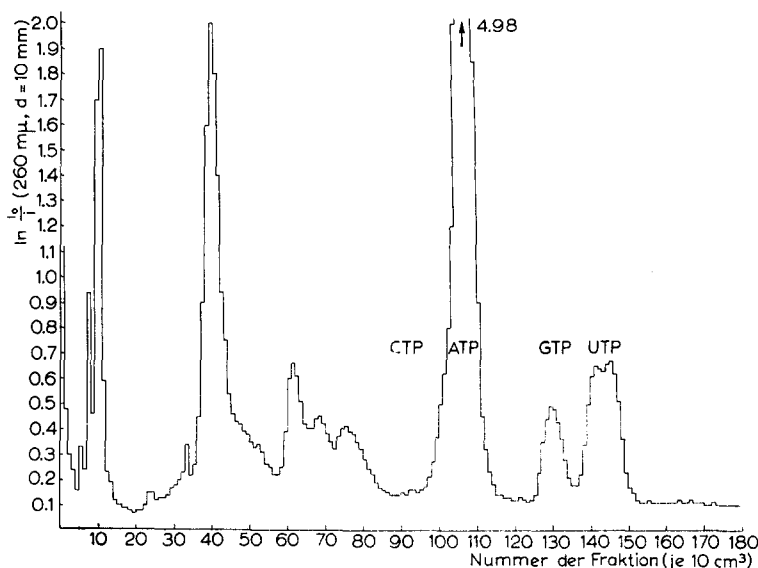


Fig. 2. Chromatographie der säurelöslichen Fraktion 9 Tage alter Hühnerembryonen an Dowex-I (15 Embryonen \sim 2.6 g Trockensubstanz).

Im Gegensatz zu Embryonen enthält Leber von Hühnern und von Kälbern nur geringe Mengen UTP und GTP. In Rattenleber fanden HURLBERT, SCHMITZ, BRUMM UND POTTER¹³ ebenfalls relativ wenig UTP und GTP. Auch im Verhältnis zu ATP enthält Leber weniger UTP und GTP als Embryonen.

$$\frac{\text{ATP}}{\text{UTP} + \text{GTP}} \sim \frac{10}{1}$$

In Embryonen ist der ATP-Gehalt im Vergleich zur ADP- und AMP-Konzentration höher als in Leber.

Zur Identifizierung der Fraktionen wurde das Absorptionsspektrum bei pH 2, pH 7 und pH 11 gemessen und das Gesamtphosphat sowie das säurelabile Phosphat bestimmt. Wenn ein Triphosphat vorliegt, muss das Verhältnis von säurelabilem Phosphat: Gesamtphosphat 2:3 betragen. Ausserdem wurden die nach Säurehydrolyse entstehenden Basen und Nucleotide papierchromatographisch identifiziert. Tabelle II enthält ein Beispiel.

Spaltung von ATP, UTP und GTP durch Homogenate aus Molchkeimen

Molchkeime wurden homogenisiert und die Abspaltung von Phosphat aus ATP, UTP und GTP durch die Homogenate unter gleichen Bedingungen (Glykokollpuffer: Jonenstärke $\mu = 0.3$, pH 8.6; s. Versuchsteil) in Gegenwart von MgCl_2 und CaCl_2 untersucht. Das Vorkommen von ATP-spaltenden Fermenten in Keimen von *Rana pipiens* wurde in eingehenden Versuchen schon von BARTH UND JAEGER nachgewiesen²⁵. Wir fanden, dass ausser ATP auch UTP und GTP durch die Homogenate gespalten werden.

TABELLE II

ANALYTISCHE DATEN VERSCHIEDENER CHROMATOGRAPHISCH GETRENNTER FRAKTIONEN

Fraktion	105 (ATP)	126 (GTP)	147 (UTP)
Gesamt P (γ)	66.4	35.6	52.4
Säurelabiler P (γ)	44.2	24.0	34.6
Absorptionsmaximum (m μ)	257 (pH 2)	258 (pH 2)	262 (pH 7)
Nach Hydrolyse mit 1 N HCl entstehende Verbindung	Adenin	Guanin	Uridylsäure
(In geringer Menge vorhandene Verunreinigung)	(Uridylsäure)		(Substanz mit $R_F = 0.54$)

Durch 1 ml Homogenat (aus ~ 25 Gastrulen) wurden in 60 Min. bei 25° in Gegenwart von $MgCl_2$ durchschnittlich 11 γ anorganisches Phosphat freigesetzt. In den $CaCl_2$ enthaltenden Versuchsansätzen war die ATP-Spaltung unter unseren Versuchsbedingungen durchschnittlich um 50% geringer. In den Keimen wird die ATP-Spaltung also durch Mg^{++} aktiviert. Eine von KIELLEY UND MEYERHOF aus Muskel isolierte Myosin-freie und an hochtourig abzentrifugierbare Teilchen gebundene ATPase wird ebenfalls durch Mg^{++} aktiviert²⁶.

Durch Homogenate von Schwanzknospenstadien wurde in der gleichen Zeit mehr ATP gespalten als durch Gastrula-Homogenate. Die Aktivität der ATP-spaltenden Fermente nimmt also mit dem Alter der Keime zu.

UTP wird in Gegenwart von $MgCl_2$ nur etwa halb so schnell und GTP nur 1/3 so schnell wie ATP gespalten (Gastrulastadien).

Bei Versuchen mit Zusatz von $CaCl_2$ wurde UTP im Gegensatz zu ATP (s. oben) schneller, GTP etwas langsamer ($\sim 20\%$) als in Gegenwart von $MgCl_2$ abgebaut.

BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Die Konzentration der Nucleosidtriphosphate nimmt in Molchkeimen nach 6–8 std. Anaerobiose um 45–65% ab. Dabei ist nicht nur die ATP-Konzentration, sondern auch der Gehalt an anderen Nucleosidtriphosphaten (UTP) verringert. Die anaerobe Glykolyse reicht also nicht aus, um ebensoviel NTP zu bilden, wie normalerweise durch oxydative Phosphorylierung entsteht*.

Die Abnahme des gesamten säurelabilen Phosphates ($\Delta 10' P$) beträgt nach Versuchen von BARTH UND JAEGER²⁷ an *Rana pipiens* nur etwa 35%, ist also geringer als die Abnahme der Triphosphatkonzentration. Da anaerob aber die Konzentration der Diphosphate erhöht ist und bei der Bestimmung des säurelabilen Phosphats ($\Delta 10' P$) eine Phosphatgruppe der Diphosphate miterfasst wird, entspricht die Abnahme des $\Delta 10' P$ nicht der tatsächlichen Erniedrigung der NTP-Konzentration.

Das anorganische Phosphat nimmt anaerob um etwa 75% zu. Es wurde mehr Phosphat gebildet, als nur durch Abspaltung aus den Triphosphaten entstehen würde. Wahrscheinlich wird also auch noch aus anderen, bisher nicht näher bestimmten Verbindungen Phosphat freigesetzt. Unter anaeroben Bedingungen nimmt vermutlich

* UTP und GTP entstehen wahrscheinlich nicht direkt durch oxydative Phosphorylierung, sondern durch Umphosphorylierung aus ATP (POTTER und Mitarbeiter^{26a}).

auch die Konzentration des in den Keimen vorhandenen Kreatinphosphates²⁸ ab. Da Kreatinphosphat jedoch in saurer, molybdathaltiger Lösung instabil ist, wurde es sowohl aerob als auch anaerob als anorganisches Phosphat mitbestimmt. Eine Spaltung von Kreatinphosphat bei den anaeroben Versuchen ergibt deshalb keine Zunahme der anorganischen Phosphatwerte*.

Die Entwicklung kommt anaerob im Gastrulastadium vollständig zum Stillstand. Es fragt sich, welche Zusammenhänge zwischen der Entwicklungshemmung und der Erniedrigung der NTP-Konzentration bestehen. Durch Versuche von WEBER UND HOFFMANN-BERLING²⁹ ist bekannt, dass ATP nicht nur bei der Muskelkontraktion, sondern allgemein bei Zellbewegungen als energieübertragende Substanz wirksam ist. Über die Funktion von Nucleosidtriphosphaten bei den komplizierten Gestaltungsbewegungen embryonaler Keime liegen noch keine Untersuchungen vor, doch ist es nach den oben erwähnten Ergebnissen sehr wahrscheinlich, dass ATP hier mitwirkt. ATP ist ausserdem wahrscheinlich auch für die Erhaltung der Zellstruktur erforderlich.

Unter anaeroben Bedingungen bleiben mindestens 30–40% des ursprünglich vorhandenen NTP ungespalten. Unter den gleichen Bedingungen ist aber der Einbau von ¹⁴CO₂ in Proteine und Nucleinsäuren fast vollständig gehemmt³⁰. Es ist also fraglich, ob die Verringerung der NTP-Konzentration die unmittelbare Ursache für die Unterbrechung der Synthesereaktionen ist, oder ob deren Hemmung primär durch eine Änderung des Verhältnisses von verschiedenen Formen anderer Co-Fermente (z.B. TPN/TPNH₂; Flavin/Flavin H₂; CoEnzym A/Acetyl Co-Enzym A) verursacht wird.

Es wäre auch möglich, dass nur durch oxydative Phosphorylierung in Mitochondrien gebildetes ATP für bestimmte Synthesen verwendet werden kann. Dann wäre für diese Synthesen nur die Umsatzgeschwindigkeit des ATP in den Mitochondrien und nicht das jeweils in der gesamten Zelle vorhandene ATP massgebend. Da es schwierig ist, die Umsatzrate des ATP *in vivo* zu bestimmen, liegen hierüber jedoch noch keine Versuche vor. Ausserdem ist in Betracht zu ziehen, dass die Konzentrationsänderung der Nucleosidtriphosphate in den Granulae grösser sein könnte als in der gesamten Zelle.

Die relativ grosse UTP-Konzentration in Embryonen ist im Hinblick auf die in letzter Zeit nachgewiesenen Co-Fermentfunktionen von Uracilverbindungen, welche aus UTP gebildet werden können³¹, von Interesse. GTP, welches in Embryonen ebenfalls in relativ grosser Menge vorhanden ist, kann ATP bei Glykolyisereaktionen ersetzen³². Versuche von SCHMITZ UND SAUKKONEN³³ mit markierter Glucose und markiertem Glykokoll sprechen dafür, dass die Triphosphate ausserdem Intermediärprodukte der Nucleinsäuresynthese sind.

Herrn J. BORN danke ich für die geschickte Hilfe bei der Ausführung der fermentchemischen und chromatographischen Analysen.

Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft ausgeführt.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Molch- und Hühnerembryonen enthalten ausser ATP auch relativ grosse Mengen anderer Nucleosidtriphosphate (UTP und GTP).

* Hierzu wäre die Bestimmung des "wahren anorganischen Phosphates" erforderlich.

2. Wie Versuche mit Gastrulastadien des Alpenmolches zeigten, nimmt beim Übergang von aeroben zu anaeroben Bedingungen die Konzentration der Nucleosidtriphosphate um 45–65 % ab, während die Konzentration der Nucleosiddiphosphate und des anorganischen Phosphates zunimmt.

3. Durch Homogenate aus Molch- und *Xenopus*-Gastrulastadien wird ausser ATP auch GTP und UTP gespalten. $MgCl_2$ und $CaCl_2$ beeinflussen die Spaltung der einzelnen Nucleosidtriphosphate in verschiedener Weise.

SUMMARY

1. Salamander and hen embryos contain, in addition to ATP, relatively large quantities of other nucleoside triphosphates (UTP and GTP).

2. As experiments with gastrula stages of alpine salamanders show, the concentration of nucleoside triphosphate decreases by 45–65 % in the transition from aerobic to anaerobic conditions, while the concentration of nucleoside diphosphates and inorganic phosphates increases.

3. Not only ATP, but also GTP and UTP are split by means of homogenates of Salamander and *Xenopus* gastrula stages. $MgCl_2$ and $CaCl_2$ influence the cleavage of single nucleoside triphosphates in various ways.

LITERATUR

- ¹ F. BÜCHNER, *Klin. Wochschr.*, 26 (1948) 38; *Münch. med. Wochschr.*, 97 (1955) 1673 (dort weitere Literatur).
- ² O. MANGOLD UND H. WAECHTER, *Naturwiss.*, 40 (1953) 328; 40 (1953) 595.
- ³ H. TIEDEMANN UND H. TIEDEMANN, *Z. Naturforsch.*, 9b (1954) 371.
- ⁴ O. WARBURG, *Über den Stoffwechsel der Tumoren*, Berlin, 1926.
- ⁵ H. TIEDEMANN UND H. TIEDEMANN, *Z. Naturforsch.*, (im Druck).
- ⁶ G. A. LEPAGE, in W. W. UMBREIT, R. H. BURRIS UND J. STAUFFER, *Manometric Techniques and Tissue Metabolism*, Burgess Publishing Co., Minneapolis, 1947 S. 186.
- ⁷ K. LOHMANN, *Biochem. Z.*, 178 (1926) 419.
- ⁸ J. BERENBLUM UND E. CHAIN, *Biochem. J.*, 32 (1938) 295.
- ⁹ L. BERGER, M. W. SLEIN, S. P. COLOWICK UND C. F. CORI, *J. Gen. Physiol.*, 29 (1946) 379.
- ¹⁰ S. L. ROWLES UND L. A. STOCKEN, *Biochem. J.*, 47 (1950) 489.
- ¹¹ Pabst Laboratories Circular Nr. OR-7.
- ¹² R. MARKHAM UND J. D. SMITH, *Nature*, 163 (1949) 250.
- ¹³ R. B. HURLBERT, H. SCHMITZ, A. F. BRUMM UND V. R. POTTER, *J. Biol. Chem.*, 209 (1954) 23.
- ¹⁴ J. D. SMITH UND R. MARKHAM, *Biochem. J.*, 46 (1950) 509.
- ¹⁵ J. E. EDSTRÖM, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 528, zit. nach G. R. WYATT in E. CHARGAFF UND J. N. DAVIDSON, *The Nucleic Acids*, Academic Press, Inc., New York, 1955, S. 255.
- ¹⁶ J. M. PLOESER UND H. S. LORING, *J. Biol. Chem.*, 178 (1949) 431.
- ¹⁷ E. VOLKIN UND W. E. COHN, in DAVID GLICK, *Methods of Biochemical Analysis*, Interscience Pubs., New York, 1954, S. 287.
- ¹⁸ A. KLEINZELLER, *Biochem. J.*, 36 (1942) 729.
- ¹⁹ H. M. KALCKAR UND W. W. KIELLEY, *Science*, 119 (1954) 479.
- ²⁰ H. TIEDEMANN, *Z. Naturforsch.*, 9b (1954) 801.
- ²¹ H. SCHMITZ, V. R. POTTER, R. B. HURLBERT UND D. M. WHITE, *Cancer Research*, 14 (1954) 66.
- ²² R. BERGKVIST UND A. DEUTSCH, *Acta Chem. Scand.*, 7 (1953) 1307.
- ²³ H. H. WEBER UND W. HASSELBACH, 3ème Congr. intern. biochim., Bruxelles, 1955, Rés. communs., S. 359.
- ²⁴ P. BERG UND W. K. JOKLIK, *Nature*, 172 (1953) 1008.
- ^{24a} S. H. LIPTON, S. A. MORELL, A. FRIEDEN UND R. M. BOOK, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 5449.
- ²⁵ L. G. BARTH UND L. JAEGER, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 30 (1947) 111.
- ²⁶ W. W. KIELLEY UND O. MEYERHOF, *J. Biol. Chem.*, 176 (1948) 591.
- ^{26a} V. R. POTTER, E. HERBERT, P. SIEKEWITZ UND A. F. BRUMM, *Federation Proc.*, 13 (1954) 276.
- ²⁷ L. G. BARTH UND L. JAEGER, *Physiol. Zool.*, 20 (1947) 133.
- ²⁸ M. A. ZIELINSKI, *J. Exptl. Biol.*, 14 (1937) 48; *Acta Biol. Exptl. (Warsaw)*, 13 (1939) 35, zit. nach J. BRACHET, *Chemical Embryology*, Interscience Pubs., New York, 1950, S. 331.
- ²⁹ H. H. WEBER, 3ème Congr. intern. biochim., Bruxelles, 1955, Rés. communs., S. 356.
- ³⁰ H. TIEDEMANN, noch nicht veröffentlicht.
- ³¹ L. F. LELOIR, 3ème Congr. intern. biochim., Bruxelles, 1955, Rés. communs., S. 154; also in W. D. McELROY UND B. GLASS, *Phosphorus Metabolism*, Vol. I, Johns Hopkins Press, Baltimore, 1951, S. 67.
- ³² J. L. STROMINGER, *Biochim. Biophys. Acta*, 16 (1955) 616.
- ³³ H. SCHMITZ UND J. J. SAUKKONEN, 3ème Congr. intern. biochim., Bruxelles, 1955, Rés. communs., S. 72.

Eingegangen am 30 Mai 1956