

Das Verhalten der freien Aminosäuren in kernhaltigen und kernlosen Acetabularien

Bei Untersuchungen über die Besonderheiten des Stoffwechsels kernloser Zellen war gefunden worden, dass *Acetabularia mediterranea* nach Entfernung des Zellkernes grosse Mengen an NH_4^+ akkumuliert¹. Dieser Befund lenkte unsere Aufmerksamkeit auf das Verhalten der Aminosäuren in kernlos gemachten Acetabularien. Die Angabe, dass der Gehalt an freien Aminosäuren stärker ansteigt als in kernhaltigen Zellen², schien uns aus folgenden Gründen nicht stichhaltig zu sein: Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe der Ninhydrin-Farbreaktion. Diese Methode ist sehr empfindlich gegen einwertige Kationen und insbesondere gegen NH_4^+ . Bei vergleichsweise geringer NH_4^+ -Konzentration kann ein NH_4^+ -Standard zur Korrektur benutzt werden. Bei Acetabularia ist eine solche Korrektur wegen des grossen NH_4^+ -Gehaltes nicht möglich. Im Gegensatz zu der Farbreaktion ist die von uns verwendete CO_2 -Titrimetrie ähnlichen Einschränkungen nicht unterworfen. Darüber hinaus bietet diese Methode noch den Vorteil, dass sie für freie Carboxylgruppen, die einer freien α -Aminogruppe benachbart sind, spezifisch ist.

Acetabularia mediterranea wurde nach den Vorschriften von HÄMMERLING³ und BETH⁴ gezüchtet. Die noch hutlosen Pflanzen waren am Tage 0 ungefähr 20 mm lang. Bei den kernlosen Zellen war nur das Rhizoid mit dem Kern entfernt worden; auch bei den kernhaltigen Zellen wurde das Rhizoid vor der Bestimmung abgeschnitten. Die Bestimmungen erfolgten jeweils an 3×300 Zellen. Diese wurden nach dreimaligem Waschen mit Meerwasser und destilliertem Wasser in Glashomogenisatoren bei 4° mit 6 ml 1 N HClO_4 homogenisiert. Der Überstand wurde nach dem Zentrifugieren ($25\,000 \times g$; 20 Min) eingefroren und bis zur Bestimmung bei -18° gehalten. Vor der Bestimmung wurde mit 2 N KOH neutralisiert und das ausfallende KClO_4 in der Kälte abzentrifugiert.

Die α -Aminosäuren-Bestimmung erfolgte durch Titration des mit Ninhydrin abgespaltenen CO_2 nach der geringfügig veränderten Methode von VAN SLYKE *et al.*⁵. Das Volumen der Erlenmeyerkolben betrug 50 ml. Die Kolben waren durch Schlitte mit dem Überleitungsrohr verbunden. Das Reaktionsgefäß enthielt neben der Probe (bis zu 5 ml) ungefähr 100 mg festen Citratpuffer (pH 4.7) und ungefähr 50 mg Ninhydrin. In dem Auffanggefäß wurden 19 μ Äquiv. $\text{Ba}(\text{OH})_2$ vorgelegt. Das $\text{Ba}(\text{OH})_2$ stammte aus einem Vorratsgefäß, das durch Natronkalk abgeschlossen und mit einer Bürette verbunden war.

Die Probe wurde zur Entfernung des gelösten CO_2 mit dem Citratpuffer 3 Min gekocht, abgekühlt und mit Ninhydrin versetzt. Dann wurden sofort die Gefäße miteinander verbunden und evakuiert. Die Gefäße und das Überleitungsstück waren vor der Benutzung mit CO_2 -freier Luft CO_2 -frei gemacht worden. Das ganze System wurde für 15 Min in ein siedendes Wasserbad gestellt, unmittelbar danach die Schlitte mit kaltem Wasser abgeschreckt und 2 Stunden bei Zimmertemperatur geschüttelt. Anschliessend wurde das Vakuum mit CO_2 -freier Luft beseitigt und die vorgelegte Barytlauge unter Durchperlen von CO_2 -freier Luft mit 0.005 N HCl und Kresylrot als Indikator titriert. Als Standard diente eine Leucinlösung. Der mittlere Fehler betrug bei einer Vorgabe von 4 μ Mol Leucin bei Parallelbestimmungen $\pm 2.9\%$. Der Messbereich lag zwischen 1 und 8 μ Mol CO_2 . Im Gegensatz zur kolorimetrischen α -Aminosäuren-Bestimmung mit Ninhydrin haben selbst hohe Alkali- und NH_4^+ -

Konzentrationen keinen Einfluss auf die Ausbeute. Zur Bestimmung der säurelöslichen Peptide wurde der HClO_4 -Extrakt in zugeschmolzenen Ampullen 18 Stunden in 6 N HCl bei 105° hydrolysiert und nach Neutralisation in der angegebenen Weise bestimmt.

TABELLE I

AMINOSÄUREN-GEHALT VON KERNHALTIGEN UND KERNLOSEN ACETABULARIEN
IN 4 NACHZUCHTEN

Werte in $\mu\text{Mol}/\text{Pflanze}$. Wegen der Rhizidentfernung war am Tage 0 nur 1 Bestimmung nötig.
Die Wuchsleistung der kernhaltigen und kernlosen Pflanzen entsprach der Norm.

Versuch	Tag 0		Tag 20		Kernlos	
			Kernhaltig		Kernlos	
	direkt	nach Hydrolyse	direkt	nach Hydrolyse	direkt	nach Hydrolyse
1	18		28		31	
2	18	32	31	51	31	48
3	21	45	28	64	30	61
4	14		33		33	

Die Ergebnisse sind in der Tabelle I wiedergegeben. Der Gehalt der Pflanzen an freien Aminosäuren entspricht ungefähr der Konzentration in tierischen Geweben, wenn man als Bezugsgrösse Protein wählt. Während der sauren Hydrolyse steigt der Aminosäuregehalt auf ungefähr das Doppelte. Diese während der Hydrolyse freigesetzten Aminosäuren stammen zumindest zum grössten Teil aus Peptiden, wie sich aus der papierchromatographischen Auftrennung entnehmen lässt. Ebenfalls papierchromatographisch konnte gezeigt werden, dass unter den freien Aminosäuren Glutaminsäure, Asparaginsäure, Asparagin, Alanin und Glycin mengenmässig am wichtigsten sind.

Die Entfernung des Kernes hat während der Versuchsdauer keinen Einfluss auf den Gehalt an freien Aminosäuren und an Peptiden. Dieser Befund steht im Gegensatz zu den älteren Angaben². Eine Erklärung scheint, wie schon erwähnt, darin zu liegen, dass die von den zitierten Autoren verwendete Methode wegen der grossen NH_4^+ -Empfindlichkeit auf Acetabularien nicht anwendbar ist. Für diese Erklärung spricht insbesondere auch die Tatsache, dass für die freien Aminosäuren Werte angegeben werden, die ungefähr um den Faktor 5 zu hoch liegen und ferner die Tatsache, dass für kernlose Pflanzen höhere α -Aminosäure-Werte angegeben werden als für kernhaltige.

Das Fehlen eines Unterschiedes im Aminosäuregehalt zwischen kernhaltigen und kernlosen Acetabularien zeigt, dass das schon vor dem 20. Tag in kernlosen Acetabularien zu beobachtende Zurückbleiben der Proteinzunahme^{6,7} nicht auf einer Veränderung der Gesamtkonzentration der Aminosäuren beruht. Es kann jedoch nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass eine einzelne Aminosäure zum limitierenden Faktor bei der Proteinvermehrung wird. Das ähnliche Verhalten des Aminosäuren-, aber auch des Peptid-Gehaltes, von kernhaltigen und kernlosen Pflanzen ist ein Hinweis darauf, dass die Bildung von Protein-Vorstufen auch längere Zeit nach Entfernung des Kernes nicht grundsätzlich beeinträchtigt ist. Worauf die gesteigerte NH_4^+ -Akkumulation in den kernlosen Acetabularien beruht, bleibt weiterhin offen¹.

Sie ist offenbar nicht auf eine Unterbrechung der Verwertung des NH_4^+ zur Aminosäure-Synthese zurückzuführen.

*Max-Planck-Institut f. Meeresbiologie,
Abt. Hämmerling, Wilhelmshaven (Deutschland)*

H. J. BREMER
H. G. SCHWEIGER
E. SCHWEIGER

- ¹ H. J. BREMER UND H. G. SCHWEIGER, *Planta*, 55 (1960) 13.
- ² J. BRACHET, H. CHANTRENNE UND F. VANDERHAEGHE, *Biochim. Biophys. Acta*, 18 (1955) 544.
- ³ J. HÄMMERLING, *Arch. Protistenk.*, 97 (1944) 7.
- ⁴ K. BETH, *Z. Naturforsch.*, 8b (1953) 334.
- ⁵ D. D. VAN SLYKE, D. A. MACFADYEN UND P. HAMILTON, *J. Biol. Chem.*, 141 (1941) 671.
- ⁶ H. CLAUSS, *Planta*, 52 (1958) 334.
- ⁷ H. CLAUSS UND G. WERZ, *Z. Naturforsch.*, 166 (1961) 162.

Eingegangen am 26. Juli, 1961

Biochim. Biophys. Acta, 56 (1962) 380-382

Pyruvate oxidation in thyroid tissue

The enzymes and coenzymes which are necessary for the operation of the citric acid cycle are present in the thyroid cell^{1,2}. Various data indicate that this metabolic pathway is active in thyroid³⁻⁶. However, pyruvate oxidation by this tissue has not yet been demonstrated.

By using metabolic inhibitors and activators, we have shown that, in sheep thyroid slices, the oxidation to $^{14}\text{CO}_2$ of [6- ^{14}C]glucose reflects the anaerobic oxidation of glucose through the Embden-Meyerhof pathway, and its further aerobic breakdown in the citric acid cycle⁷. Thyroid-stimulating hormone increases the oxidation *in vitro* of [6- ^{14}C]glucose in this tissue^{6,8}. It would therefore seem likely that the hormone stimulates the citric acid cycle in thyroid. The purpose of the present investigation is to extend these observations *in vitro* to the metabolism of pyruvate, and to study the effects of various agents (including thyroid-stimulating hormone) on this metabolism.

Standard experimental procedure, oxygen uptake and radioactivity determination, and data processing have been previously described⁷. Incubations were carried out for 2 h under oxygen in a Warburg vessel. Each flask contained 2 half slices of sheep thyroid^{7,8} in 2.6 ml of Krebs-Ringer-phosphate buffer (pH 7.5) (ref. 9) supplemented with bovine albumin (Armour) (0.12%). Sodium [$3\text{-}^{14}\text{C}$]pyruvate (0.035 C/mole) was obtained from the Radiochemical Centre (Amersham) and its concentration was 4.4 mM. Thyroid-stimulating hormone (Armour) was dissolved in 0.3% bovine albumin solution as previously described⁸. The concentration of additional substances is indicated in the tables.

As we have confirmed that the Q_{O_2} of sheep thyroid slices is not modified by the addition to the Krebs-Ringer-phosphate buffer of either pyruvate or glucose⁴, oxygen uptake data from incubations with glucose and with pyruvate have been pooled in this communication. The mean oxygen uptake for 70 different sheep thyroids collected over a 1-year period was $2.55 \pm 0.08 \mu\text{l O}_2/\text{h/mg}$ dry weight of tissue. This value agrees with figures obtained elsewhere^{4,10}.

Fluoroacetate and malonate depress oxygen uptake and pyruvate oxidation