

## 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  $\text{NH}_4^+$  akkumuliert<sup>1</sup>. 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 Zellen<sup>2</sup>, 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  $\text{NH}_4^+$ . Bei vergleichsweise geringer  $\text{NH}_4^+$ -Konzentration kann ein  $\text{NH}_4^+$ -Standard zur Korrektur benutzt werden. Bei *Acetabularia* ist eine solche Korrektur wegen des grossen  $\text{NH}_4^+$ -Gehaltes nicht möglich. Im Gegensatz zu der Farbreaktion ist die von uns verwendete  $\text{CO}_2$ -Titrationsmethode ähnlichen Einschränkungen nicht unterworfen. Darüber hinaus bietet diese Methode noch den Vorteil, dass sie für freie Carboxylgruppen, die einer freien  $\alpha$ -Aminogruppe benachbart sind, spezifisch ist.

*Acetabularia mediterranea* wurde nach den Vorschriften von HÄMMERLING<sup>3</sup> und BETH<sup>4</sup> 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  $3 \times 300$  Zellen. Diese wurden nach dreimaligem Waschen mit Meerwasser und destilliertem Wasser in Glashomogenisatoren bei 4° mit 6 ml 1 N  $\text{HClO}_4$  homogenisiert. Der Überstand wurde nach dem Zentrifugieren ( $25000 \times g$ ; 20 Min) eingefroren und bis zur Bestimmung bei  $-18^\circ$  gehalten. Vor der Bestimmung wurde mit 2 N KOH neutralisiert und das ausfallende  $\text{KClO}_4$  in der Kälte abzentrifugiert.

Die  $\alpha$ -Aminosäuren-Bestimmung erfolgte durch Titration des mit Ninhydrin abgespaltenen  $\text{CO}_2$  nach der geringfügig veränderten Methode von VAN SLYKE *et al.*<sup>5</sup>. Das Volumen der Erlenmeyerkolben betrug 50 ml. Die Kolben waren durch Schläffe 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  $\mu\text{Äquiv.}$   $\text{Ba}(\text{OH})_2$  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  $\text{CO}_2$  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  $\text{CO}_2$ -freier Luft  $\text{CO}_2$ -frei gemacht worden. Das ganze System wurde für 15 Min in ein siedendes Wasserbad gestellt, unmittelbar danach die Schläffe mit kaltem Wasser abgeschreckt und 2 Stunden bei Zimmertemperatur geschüttelt. Anschliessend wurde das Vakuum mit  $\text{CO}_2$ -freier Luft beseitigt und die vorgelegte Barytlauge unter Durchperlen von  $\text{CO}_2$ -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  $\mu\text{Mol}$  Leucin bei Parallelbestimmungen  $\pm 2.9\%$ . Der Messbereich lag zwischen 1 und 8  $\mu\text{Mol}$   $\text{CO}_2$ . Im Gegensatz zur kolorimetrischen  $\alpha$ -Aminosäuren-Bestimmung mit Ninhydrin haben selbst hohe Alkali- und  $\text{NH}_4^+$ -

Konzentrationen keinen Einfluss auf die Ausbeute. Zur Bestimmung der säurelöslichen Peptide wurde der  $\text{HClO}_4$ -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  $\text{m}\mu\text{Mol/Pflanze}$ . Wegen der Rhizoidentfernung war am Tage 0 nur 1 Bestimmung nötig. Die Wachseleistung der kernhaltigen und kernlosen Pflanzen entsprach der Norm.

Versuch	Tag 0		Tag 20			
			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 Angaben<sup>2</sup>. Eine Erklärung scheint, wie schon erwähnt, darin zu liegen, dass die von den zitierten Autoren verwendete Methode wegen der grossen  $\text{NH}_4^+$ -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  $\alpha$ -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<sup>6,7</sup> nicht auf einer Verminderung 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  $\text{NH}_4^+$ -Akkumulation in den kernlosen Acetabularien beruht, bleibt weiterhin offen<sup>1</sup>.

Sie ist offenbar nicht auf eine Unterbrechung der Verwertung des  $\text{NH}_4^+$  zur Aminosäure-Synthese zurückzuführen.

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

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

<sup>1</sup> H. J. BREMER UND H. G. SCHWEIGER, *Planta*, 55 (1960) 13.

<sup>2</sup> J. BRACHET, H. CHANTRENNE UND F. VANDERHAEGHE, *Biochim. Biophys. Acta*, 18 (1955) 544.

<sup>3</sup> J. HÄMMERLING, *Arch. Protistenk.*, 97 (1944) 7.

<sup>4</sup> K. BETH, *Z. Naturforsch.*, 8b (1953) 334.

<sup>5</sup> D. D. VAN SLYKE, D. A. MACFADYEN UND P. HAMILTON, *J. Biol. Chem.*, 141 (1941) 671.

<sup>6</sup> H. CLAUSS, *Planta*, 52 (1958) 334.

<sup>7</sup> H. CLAUSS UND G. WERZ, *Z. Naturforsch.*, 16b (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<sup>1,2</sup>. Various data indicate that this metabolic pathway is active in thyroid<sup>3–6</sup>. 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  $[6-^{14}\text{C}]$ glucose reflects the anaerobic oxidation of glucose through the Embden–Meyerhof pathway, and its further aerobic breakdown in the citric acid cycle<sup>7</sup>. Thyroid-stimulating hormone increases the oxidation *in vitro* of  $[6-^{14}\text{C}]$ glucose in this tissue<sup>6,8</sup>. 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 described<sup>7</sup>. Incubations were carried out for 2 h under oxygen in a Warburg vessel. Each flask contained 2 half slices of sheep thyroid<sup>7,8</sup> in 2.6 ml of Krebs–Ringer–phosphate buffer (pH 7.5) (ref. 9) supplemented with bovine albumin (Armour) (0.12%). Sodium  $[3-^{14}\text{C}]$ 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 described<sup>8</sup>. The concentration of additional substances is indicated in the tables.

As we have confirmed that the  $Q_{\text{O}_2}$  of sheep thyroid slices is not modified by the addition to the Krebs–Ringer–phosphate buffer of either pyruvate or glucose<sup>4</sup>, 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<sup>4,10</sup>.

Fluoroacetate and malonate depress oxygen uptake and pyruvate oxidation