

Short Communications

SC 11073

**Hemmung der Synthese von DPN-abhängiger
Glutamatdehydrogenase in Hefe durch Actinomycin C**

Aus Hefeextrakten trennten und reinigten wir¹ eine DPN- und eine TPN-abhängige Glutamatdehydrogenase (L-Glutamat:NAD oxidoreductase (desaminierend), EC 1.4.1.2, bzw. L-Glutamat:NADP oxidoreductase (desaminierend), EC 1.4.1.4). Auch aus Extrakten von *Fusarium*² und *Neurospora crassa*³ konnten die beiden Enzyme fraktioniert werden. SANWAL UND LATA⁴ fanden, dass nach Wachstum von *Neurospora* mit Ammoniumsalzen als N-Quelle das DPN-Enzym niedrige und das TPN-Enzym hohe Aktivität aufweist, während mit Glutaminsäure und NH_4^+ als N-Quelle die Aktivität des DPN-Enzyms hoch und diejenige des TPN-Enzyms niedrig ist. Auf Grund weiterer Experimente mit verschiedenen N-Quellen vermuten SANWAL UND LATA⁵, dass aus NH_4^+ und L-Glutaminsäure eine Substanz gebildet wird, die Repression bzw. Derepression der Synthese der beiden Glutamatdehydrogenasen bewirkt.

Auch in *Saccharomyces cerevisiae* findet man abhängig von der N-Quelle des Kulturmediums verschiedene Aktivitäten der DPN-Glutamatdehydrogenase und der TPN-Glutamatdehydrogenase (vgl. Tabelle I). Besonders auffällig verhält sich die

TABELLE I

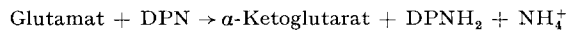
SPEZIFISCHE AKTIVITÄTEN VON DPN-GLUTAMATDEHYDROGENASE
UND TPN-GLUTAMATDEHYDROGENASE IN HEFE NACH WACHSTUM IN NÄHRMEDIEN
MIT VERSCHIEDENEN N-QUELLEN

Je 1 l Medium nach TAVLITZKI⁶ mit äquimolaren Mengen der angegebenen N-Quelle wurde mit 14 mg *Saccharomyces cerevisiae* R₅₉^{*} beimpft und bis zur Mitte der log Phase 16–18 h bei 30° belüftet. Je 1 g der bei 3000 × g abzentrifugierten Hefe wurde mit 3 g Alcoa A-305 5 min bei 0° zerrieben und dann mit 2 ml 0,02 M Phosphatpuffer (pH 7.0) 5 min extrahiert. Nach 20 min Zentrifugieren bei 34 000 × g wurden im Überstand die Glutamatdehydrogenase-Aktivitäten im optischen Test⁷ und Protein nach BEISENHERZ *et al.*⁸ bestimmt. 1 Aktivitätseinheit ist ΔE 0.001 pro min bei 366 mμ ($V = 3$ ml, $d = 1$ cm, 21–23°). Spezifische Aktivität = Aktivitätseinheiten pro mg Protein.

Stickstoffquelle im Kulturmedium	NH_4^+	Glutaminsäure	NH_4^+ und Glutaminsäure
DPN-Glutamatdehydrogenase			
Versuch 1	34	646	—
Versuch 2	29	—	28
TPN-Glutamatdehydrogenase			
Versuch 1	955	1000	—
Versuch 2	910	—	475

* Wir danken Herrn Professor Dr. MARQUARDT und Frau Dr. ULLRICH-GREVE vom Forstbotanischen Institut der Universität Freiburg für die Überlassung des Stammes.

DPN-Glutamatdehydrogenase. Mit Glutaminsäure als N-Quelle ist die spezifische Aktivität des Enzyms etwa 20 mal höher als mit NH_4^+ . Hier liegt eine für das Wachstum der Zelle "zweckmässige" Adaptation an das Glutaminsäure-haltige Nährmedium vor, da DPN-Glutamatdehydrogenase nach der Gleichung



das für verschiedene Synthesezwischenprodukte (Carbamylphosphat, Glutamin etc.) notwendige NH_4^+ aus Glutaminsäure liefert. Im Einklang damit findet man nach Wachstum der Zellen in einem Nährmedium mit Glutaminsäure plus NH_4^+ die Aktivität der DPN-Glutamatdehydrogenase ebenso niedrig wie mit NH_4^+ allein (vgl. 3. Kolonne in Tabelle I). Bei *Neurospora crassa* sind die Verhältnisse weniger übersichtlich, da dort nicht Glutaminsäure allein, sondern nur Glutaminsäure plus NH_4^+ im Medium hohe DPN-Glutamatdehydrogenase-Aktivität bewirkt⁵.

Da die nach verschiedenen Wachstumsbedingungen verschieden grossen Aktivitäten der beiden Glutamatdehydrogenasen ein Ausdruck für die jeweilige Grösse der Enzymsynthese sind, ergibt sich als einfachste Erklärung für unsere Befunde, dass NH_4^+ die Synthese der DPN-Glutamatdehydrogenase reprimiert. Man versteht damit, dass mit Glutaminsäure als einziger N-Quelle hohe Aktivität des Enzyms beobachtet wird, während bei gleichzeitiger Anwesenheit von NH_4^+ niedrige Akti-

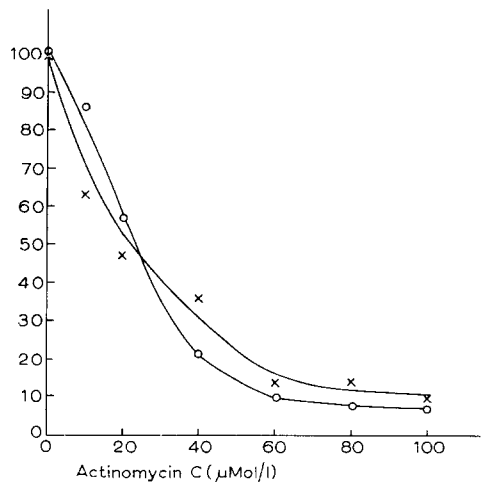


Fig. 1. Einfluss von Actinomycin C* auf Wachstum und DPN-Glutamatdehydrogenase-Aktivität von *Saccharomyces cerevisiae*. Ordinate: Wachstum in % (○) bzw. spezifische Aktivität von DPN-Glutamatdehydrogenase in % (×). Es wurden je 60 mg im Nährmedium mit NH_4^+ angezogene Hefe 3 h in 360 ml Wasser bzw. Actinomycin C-Lösung bei 30° langsam geschüttelt. Nach Zusatz von 40 ml 10-fach konzentriertem Medium nach TAVLITZKI⁶ mit äquimolarer Menge Glutamat statt $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ wurde weitere 2 h langsam bei 30° geschüttelt. Nach Zentrifugieren bei 3000 × g wurden jeweils 50 mg Hefe mit 1 g Alcoa A-305 und 2 ml 0.02 M Phosphatpuffer (pH 7.0) 3 min im Teflonhomogenisator nach POTTER-ELVEHJEM bei 0° zerrieben. Dann wurde zentrifugiert und im Überstand DPN-glutamatdehydrogenase bestimmt, wie in der Legende von Tabelle I angegeben. Proteinbestimmung nach LOWRY *et al.*²⁰.

* Das von uns verwendete Actinomycin C der Firma Bayer AG ist ein "natürliches Gemisch" der Actinomycine C₁, C₂ und C₃ (vgl. ref. 10). Wir danken Herrn Dr. AUHAGEN für die Überlassung des Präparates.

vität vorliegt. Nähme man zur Erklärung unserer Beobachtungen eine Induktion des Enzyms durch Glutaminsäure an, so wäre die verringerte Synthesegeschwindigkeit bei gleichzeitiger Anwesenheit von NH_4^+ im Nährmedium nur mit der Annahme eines zusätzlichen Regulationsmechanismus erklärbar.

Nach JACOB UND MONOD⁹ erfolgen Repression und Derepression der Enzymsynthese durch Beeinflussung der Wirksamkeit der DNA bei der Synthese von "messenger-RNA". Zur experimentellen Prüfung der Beteiligung von DNA an der Regulation der Synthesegeschwindigkeit von Enzymen eignet sich das Antibioticum Actinomycin¹⁰. Actinomycin bildet mit DNA Komplexe¹¹⁻¹⁵ und hemmt dadurch die DNA-abhängige Synthese von "messenger-RNA"¹⁶⁻¹⁹. Erfolgt auch die von uns beobachtete Derepression der Synthese von DPN-Glutamatdehydrogenase durch Ersatz von NH_4^+ im Kulturmedium durch Glutaminsäure entsprechend dem Schema von JACOB UND MONOD⁹ durch Änderung der Wirksamkeit der DNA, so müsste Actinomycin diesen Vorgang hemmen. Fig. 1 zeigt, dass dies tatsächlich der Fall ist. Bei Anwendung verschiedener Konzentrationen von Actinomycin findet man parallel zur Wachstumshemmung eine Hemmung der Synthese von DPN-Glutamatdehydrogenase mit Glutaminsäure als N-Quelle. Im Einklang mit gleichartigen Befunden über die Induktion von β -Galactosidase von NISMAN *et al.*²¹, die uns nach Abschluss der hier vorgelegten Experimente zur Kenntnis gelangten, stützt dieser Versuch die Theorie, dass Repression und Derepression der Synthese von Enzymen durch Beeinflussung von DNA und damit durch Aktivitätsänderung der DNA-abhängigen "messenger-RNA"-Synthese zustande kommen.

Biochemisches Institut der Universität,
Freiburg im Breisgau
(Deutschland)

HELMUT HOLZER
GÜNTHER HIERHOLZER

- ¹ H. HOLZER UND S. SCHNEIDER, *Biochem. Z.*, 329 (1957) 361.
- ² B. D. SANWAL, *Arch. Biochem. Biophys.*, 93 (1961) 377.
- ³ B. D. SANWAL UND M. LATA, *Canad. J. Microbiol.*, 7 (1961) 319.
- ⁴ B. D. SANWAL UND M. LATA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 6 (1962) 404.
- ⁵ B. D. SANWAL UND M. LATA, *Arch. Biochem. Biophys.*, 97 (1962) 582.
- ⁶ J. TAVLITZKI, *Ann. Inst. Pasteur*, 76 (1949) 497.
- ⁷ E. SCHMIDT, in U. BERGMAYER, *Methoden der enzymatischen Analyse*, Weinheim: Verlag Chemie, 1962, S. 752.
- ⁸ G. BEISENHERZ, H.-J. BOLTZE, TH. BÜCHER, R. CZOK, K. H. GARBADÉ, E. MEYER-ARENDT UND G. PFLEIDERER, *Z. Naturforsch.*, 8b (1953) 555.
- ⁹ F. JACOB UND J. MONOD, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 26 (1961) 193.
- ¹⁰ H. BROCKMANN, *Angew. Chem.*, 72 (1960) 939.
- ¹¹ W. KERSTEN, H. KERSTEN UND H. M. RAUEN, *Nature*, 187 (1960) 60.
- ¹² H. M. RAUEN, H. KERSTEN UND W. KERSTEN, *Z. Physiol. Chem.*, 321 (1960) 139.
- ¹³ J. M. KIRK, *Biochim. Biophys. Acta*, 42 (1960) 167.
- ¹⁴ W. KERSTEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 47 (1961) 610.
- ¹⁵ W. KERSTEN UND H. KERSTEN, *Z. Physiol. Chem.*, 330 (1962) 21.
- ¹⁶ G. HARTMANN UND U. COY, *Angew. Chem.*, 74 (1962) 501.
- ¹⁷ J. HURWITZ, J. J. FURTH, M. MALAMY UND M. ALEXANDER, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 48 (1962) 1222.
- ¹⁸ I. H. GOLDBERG UND M. RABINOWITZ, *Science*, 136 (1962) 315.
- ¹⁹ E. REICH, I. H. GOLDBERG UND M. RABINOWITZ, *Nature*, 196 (1962) 743.
- ²⁰ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR UND R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- ²¹ B. NISMAN, J. PELMONT, J. DEMAILLY UND A. YAPO, *Compt. Rend.*, 256 (1963) 523.

Eingegangen den 16 April, 1963