

which of these species ternary enzyme-metal-ion-ATP complexes are formed. Thus *e.g.*, the availability of species corresponding to II or III would be a criterion sufficient to explain, respectively, metal ion specificity of muscle⁶ and yeast⁷ hexokinase.

The support given to our investigations by the Schweizerischer Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung is gratefully acknowledged. I wish to thank Professor H. ERLNMEYER, Dr. P. HEMMERICH and H. SIGEL for helpful discussions. Most of the measurements were performed with the skilful technical assistance of Miss M. DÜRSTELER.

*Institut für Anorganische Chemie,
Universität Basel,
Basel (Switzerland)*

H. BRINTZINGER

¹ M. COHN AND T. R. HUGHES, JR., *J. Biol. Chem.*, 237, (1962) 176.

² U. HANDSCHIN AND H. BRINTZINGER, *Helv. Chim. Acta*, 45 (1962) 1037.

³ S. WATANABE, L. EVENSON AND I. GULZ, *J. Biol. Chem.*, 238 (1963) 324.

⁴ Infrared spectra of ATP complexes in the solid state have been reported by A. EPP, T. RAMASARMA AND L. R. WETTER, *J. Am. Chem. Soc.*, 80 (1958) 724.

⁵ H. BRINTZINGER, to be published.

⁶ E. WALAAS AND O. WALAAS, *Acta, Chem. Scand.*, 16 (1962) 1682.

⁷ H. BRINTZINGER AND S. FALLAB, *Helv. Chim. Acta*, 43 (1960) 43.

Received May 17th, 1963

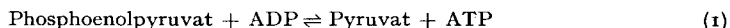
Biochim. Biophys. Acta, 77 (1963) 343-345

PN 10067

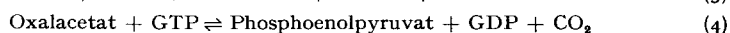
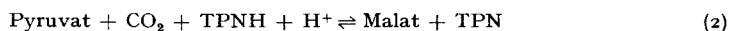
Cortisol induzierter Anstieg der Pyruvatcarboxylaseaktivität in der Rattenleber

Nach Cortisolgabe steigen in der Leber Glykogen¹, Glucose 6-Phosphat und Glucose 1-Phosphat² für die Dauer von 4 bis 6 Std. an. Die Geschwindigkeit des Pyruvateinbaus in Glucose erhöht sich innerhalb dieser Periode auf das 3 bis 4 fache¹. Als Ursache hierfür kamen Änderungen der zwischen Pyruvat und Glucose eingeschalteten Enzyme in Betracht.

Der Mechanismus der Gluconeogenese wurde in verschiedenen Laboratorien untersucht. Als wesentliches Ergebnis dieser Arbeiten werden zwei Wege postuliert, die sich in der Überführung von Pyruvat in Phosphoenolpyruvat unterscheiden: ein direkter Weg über eine Umkehr der durch Pyruvatkinase (ATP: Pyruvat-Phosphotransferase, EC 2.7.1.40) katalysierten Reaktion (Gl. 1)

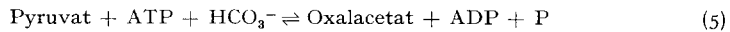


und ein indirekter Weg über die durch die Malatdehydrogenase (decarboxylierend) (L-Malat: NADP-oxydoreductase (decarboxylierend), EC 1.1.1.40 früher bekannt als malic enzyme), Malatdehydrogenase (L-Malat: NAD-Oxydoreductase, EC 1.1.1.37) und Phosphopyruvat-carboxylase (GTP: Oxalacetat-carboxy-lyase (trans phosphorylierend), EC 4.1.1.32) (Gl. 2-4) katalysierten Schritte.



Biochim. Biophys. Acta, 77 (1963) 345-348

Der Nachweis und die Isolierung der Pyruvatcarboxylase (Pyruvat: CO_2 -ligase (ADP), EC 6.4.1.1)³⁻⁵ erschloßen eine weitere Möglichkeit der indirekten Phosphoenolpyruvatsynthese (Gl. 5 und 4), die infolge Spaltung zweier energiereicher Pyrophosphatbindungen (ATP und GTP) die Bildung des Enolphosphats weit mehr begünstigt, als die oben erwähnten Wege.



Nach Untersuchungen von FELLEBERG *et al.*⁶ liegt Pyruvatkinase gegenüber anderen Enzymen des glykolytischen Schemas in der Rattenleber in einem Überschuß vor und scheidet demnach für eine Steuerung der Glucogenese aus. Malatdehydrogenase (decarboxylierend) (Gl. 2), Malatdehydrogenase (Gl. 3) und Phosphopyruvat-carboxylase (Gl. 4) werden durch Cortisol nicht beeinflusst^{7,8}. Es wurde daher eine mögliche Steuerung der Glucogenese über eine durch Cortisol ausgelöste Änderung des Pyruvatcarboxylasespiegels in der Leber untersucht.

Für die Versuche kamen männliche Sprague-Dawley Ratten, 120–150 g schwer, zur Verwendung. Die Tiere wurden mit Laatz-Standardfutter und Wasser ad libitum ernährt. Sie hungerten während des Experimentes und 24 Std. davor. Zur Zeit Null

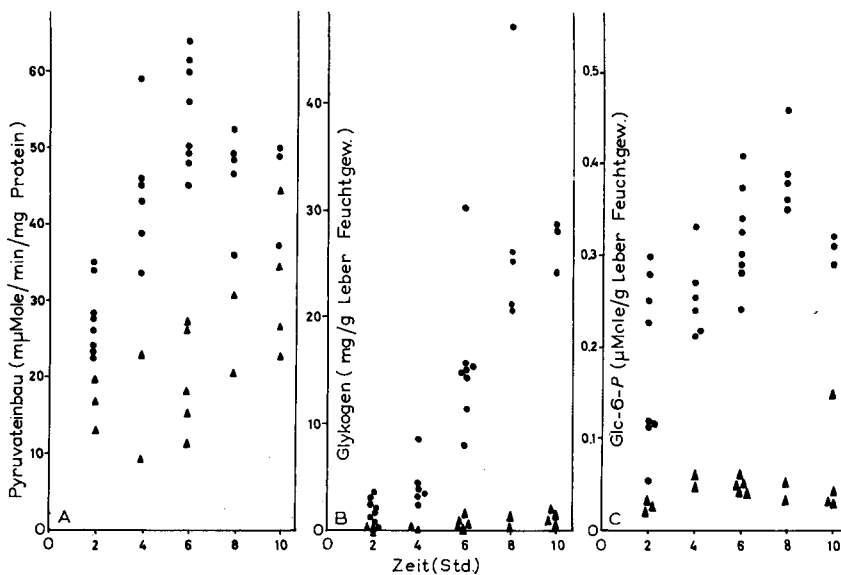
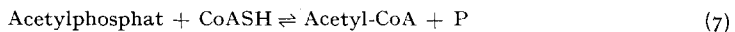
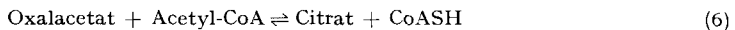


Fig. 1. Einfluß des Cortisols auf Pyruvatcarboxylasespiegel (A), Glykogenspiegel (B) und Glucose-6-Phosphatspiegel (C) in der Rattenleber. ●, mit Cortisol behandelte Tiere; ▲, Kontrolltiere; Die Reaktionsansätze zur Aktivitätsbestimmung der Pyruvatcarboxylase enthielten in 0.55 ml: 50 μMole Trispuffer (pH 7.7), 5 μMole KHCO_3 , 5 μMole MgSO_4 , 0.43 μMole Coenzym A, 0.6 μMole [^{14}C]Pyruvat ($7 \cdot 10^5$ – $8 \cdot 10^5$ Ipm./ μMol), 2 μMole ATP, 1 mg Serumalbumin, 2.5 μMole Acetylphosphat, 0.3 Einheiten Citratsynthase¹⁰, 5 μg krist. Phosphat-acetyltransferase¹¹ und 50 bis 200 μg Protein eines Rattenleberextraktes. Zur Herstellung des Enzymextraktes wurde die Leber mit 0.1 M Trispuffer (pH 7.2) im Verhältnis 1:2 5 min homogenisiert, bei einer Endkonzentration von 1 mM Glutathion 1 min bei 75 W/cm² und 20 kHz beschallt, anschließend bei 100 000 g und 0° klar zentrifugiert. Die Reaktionsansätze wurden nach 30 min. Inkubation bei 30° durch Abkühlen auf –4° abgestoppt, in einem Aliquot von 0.05 ml das überschüssige [^{14}C]Pyruvat durch Hochspannungspapierelektrophorese vom gebildeten radioaktiven Citrat abgetrennt und der Einbau bestimmt¹². Sämtliche Meßwerte sind durch einen Kontrollwert korrigiert, der zur Hemmung der Pyruvatcarboxylase 1 Einheit Avidin enthält.

(Fig. 1) wurde den Tieren 5 mg Cortisol pro 100 g Körpergewicht mit einer Schlundsonde gefüttert⁸. Nach Versuchsende wurden die Ratten in kurzer Äthernarkose getötet, ausgeblutet, die Leber entnommen und sogleich für die verschiedenen Ansätze aufgearbeitet. Glykogen und Glucose 6-Phosphat wurden nach Aufschluß mit Perchlorsäure bestimmt^{8,9}. Die Aktivitätsbestimmung der Pyruvatcarboxylase erfolgte in löslichen Extrakten mit Hilfe eines zusammengesetzten Testes: [$1-^{14}\text{C}$]-Pyruvat wird carboxyliert zu Oxalacetat (Gl. 5). Das gebildete radioaktive Oxalacetat reagiert mit Acetyl-CoA und "condensing enzyme"¹⁰ (Citratsynthase (Citrat-oxalacetat-lyase (CoA-acetylierend), EC 4.1.3.7) zu Citrat (Gl. 6). Acetyl-CoA wird aus Acetylphosphat und Coenzym A mit Phosphat-acetyltransferase (Acetyl-CoA: Orthophosphatacetyltransferase, EC 2.3.1.8)¹¹ regeneriert (Gl. 7).



Bei einem Überschuß an Citratsynthase und Phosphat-acetyltransferase (vergl. Legende zu Fig. 1) ist der Einbau von [$1-^{14}\text{C}$]Pyruvat in Citrat der Menge des eingesetzten Leberextraktes proportional. Die Überführung des radioaktiven Pyruvats in Citrat wird durch den Zusatz von 1 Einheit Avidin vollständig gehemmt^{3,4}, ein weiterer Beweis, daß die nach Gleichung 5 formulierte Reaktion in der beschriebenen Versuchsanordnung erfasst wird.

In Fig. 1 ist an einem größeren Versuchsmaterial die zeitliche Änderung des Glucose-6-Phosphat- und Glykogenspiegels sowie die Änderung der Pyruvatcarboxylaseaktivität nach Cortisolgabe aufgezeichnet. Der Einfluß des Hungers auf Substrat- und Enzymspiegel wurde an Kontrolltieren geprüft, die mit Ausnahme der Cortisolfütterung in gleicher Weise behandelt wurden. Die Aktivität des Enzyms steigt mit den beiden Substraten in der Leber an und erreicht nach 6 Std. ein Maximum. Der maximale Glucose-6-Phosphatspiegel stellt sich nach 6–8 Std. ein, Glykogen erreicht erst nach einer Latenzzeit von 1–2 Std. nach 8–10 Std. das Maximum. Nach den Untersuchungen von HILZ *et al.*² ist die Verzögerung des Glykogenanstiegs als "precursor activation" und "precursor induction" der Synthetase durch Glucose 6-Phosphat zu deuten.

Obwohl die vorliegenden Ergebnisse einen Einfluß des Cortisols auf die Pyruvatcarboxylase demonstrieren, erlauben sie keine Aussage darüber, ob der beobachtete Anstieg der Pyruvatcarboxylaseaktivität mit dem primären Wirkungsmechanismus des Cortisols zusammenhängt, oder als Folgeerscheinung der veränderten Stoffwechsellage aufzufassen ist. Wie aus Fig. 1 ersichtlich, steigt die Pyruvatcarboxylaseaktivität auch in den Kontrollen nach einer Hungerperiode von 30–34 Std. (entsprechend einer Versuchsdauer von 6–10 Std.) an, Glucose 6-Phosphat und Glykogen bleiben dagegen unverändert. Dieser Befund läßt auf die durch Cortisol bedingte Bereitstellung eines weiteren für die Glucogenese notwendigen Faktors schließen. In diesem Zusammenhang sind die Befunde von WIELAND UND WEISS¹² über einen Anstieg des Acetyl-CoA-Spiegels in der Leber nach Cortisolbehandlung zu erwähnen. Acetyl-CoA aktiviert nach UTTER³ die Pyruvatcarboxylase und kann somit die Geschwindigkeit der Glucogenese beeinflussen. Eine mögliche Rolle des Acetyl-CoA als Regulator der Glucogenese wird augenblicklich untersucht.

Die vorliegenden Ergebnisse stützen das Postulat von UTTER³, demzufolge der

Pyruvatcarboxylase eine wichtige Rolle bei der Synthese von Phosphoenolpyruvat in den Mitochondrien zuzuordnen ist. Das Enzym ließ sich auch in Extrakten des Zwerchfells nachweisen (spez. Aktivität 0.01) und ist vermutlich auch im Muskel bei der Synthese der Glucose eingeschaltet.

Die Interpretation der Ergebnisse, wie sie beim Studium der Gluconeogenese aus Pyruvat in der Leber und im Muskel gesammelt wurden, sollte hinsichtlich des "direkten" und des "indirekten" Weges der Phosphoenolpyruvatsynthese unter Berücksichtigung dieses neuen Gesichtspunktes erfolgen.

Die vorliegende Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

*Institut für vegetative Physiologie der Universität,
Frankfurt a.M. (Deutschland)*

HANS-VIKTOR HENNING
ILSE SEIFFERT
WERNER SEUBERT

- ¹ H. J. HÜBENER, *Deut. Med. Wochschr.*, 87 (1962) 438.
- ² H. HILZ, W. TARNOWSKI AND P. AREND, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 10 (1963) 493.
- ³ M. F. UTTER AND D. B. KEECH, *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) PC 17.
- ⁴ W. SEUBERT UND U. REMBERGER, *Biochem. Z.*, 334 (1961) 401.
- ⁵ S. J. BLOOM AND M. J. JOHNSON, *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 2718.
- ⁶ R. VON FELLEBERG, H. EPPENBERGER, R. RICHTERICH UND H. H. AEBI, *Biochem. Z.*, 336 (1962) 334.
- ⁷ D. MATZELT, A. ORIOL-BOSCH UND K. D. VOIGT, *Biochem. Z.*, 335 (1962) 485.
- ⁸ H. J. HÜBENER, *Z. Physiol. Chem.*, 322 (1960) 135.
- ⁹ H. J. HOHORST, in H. U. BERGMAYER, *Methoden der enzymatischen Analyse*, Verlag Chemie, Weinheim, 1962, S. 134.
- ¹⁰ P. A. SRERE AND G. W. KOSICKI, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 2557.
- ¹¹ *Analytical methods applicable to Coenzyme A*, Circular OR 19 der Pabst Laboratories, Milwaukee, Wisc.
- ¹² O. WIELAND UND L. WEISS, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 10 (1963) 333.
- ¹³ W. SEUBERT UND U. REMBERGER, *Biochem. Z.*, im Druck.

Eingegangen am 20 Juni, 1963

Biochim. Biophys. Acta, 77 (1963) 345-348