

(Energie- und Kohlenhydrat-Stoffwechsel, Freisetzung strukturgebundener Enzyme usw.) werden demgegenüber erst mit einiger Verzögerung meßbar. Das Gift wird von der Leber bei Körpertemperatur innerhalb weniger Minuten, unter 10 °C aber außerordentlich langsam aufgenommen. Bei unphysiologisch tiefen Temperaturen bleiben auch Kaliumabgabe und Schwellung der Leber aus oder werden zumindest stark gehemmt.

Isolierte Leberzell-Plasmamembranen binden das ³H-markierte Gift besser als andere subzelluläre Fraktionen aus Leber. Während der ersten Minuten der Vergiftung findet man eine Anreicherung des markierten Phalloidins in der äußeren Zellmembran, während es sich später über die gesamte Zelle verteilt, wobei der Hauptanteil in inneren Membranen (endoplasmatisches Reticulum) gebunden wird. Untersuchungen an isolierten Leberzellmembranen ergaben je nach Versuchsbedingungen entweder eine Hemmung oder eine Aktivierung der kationenabhängigen ATPasen. Eine Beeinflussung des aktiven Kationentransports durch Phalloidin ist deshalb wahrscheinlich.

Elektronenoptische Aufnahmen an isolierten Leberzellmembranen nach in-vitro-Inkubation mit Phalloidin zeigen Veränderungen der Membranstruktur, so daß bei Beginn der Vergiftung eine Primärwirkung an der äußeren Protoplasma-membran der Leberzelle anzunehmen ist. Mit zunehmender Anreicherung des Giftes an inneren Zellmembranen kommt es zu den bereits bekannten, auch morphologisch faßbaren Schädigungen der Leberzelle, jedoch wird die rasche Änderung der Permeabilität der Leberzell-Plasmamembran als das entscheidende Primärereignis der Phalloidinvergiftung angesehen.

[*] Prof. Dr. M. Frimmer, Dr. H. Glossmann, Dr. J. Gries und Priv.-Doz. Dr. D. Hegner
Institut für Pharmakologie und Toxikologie an der
veterinärmedizinischen Fakultät der Universität
63 Gießen, Frankfurter Straße 94

Embryonale Entwicklung der Enzyme des Fructosestoffwechsels

Von F. Heinz (Vortr.) und F. Weiner [*]

Die embryonale und postnatale Entwicklung der Enzyme des Fructosestoffwechsels wurde in der Leber von Ratten und Hühnern untersucht. Die Aktivitäten folgender Enzyme wurden gemessen: Sorbit-Dehydrogenase, Fructokinase, Aldolase mit den Substraten Fructose-1,6-diphosphat und Fructose-1-phosphat, Aldehyd-Dehydrogenase (Substrat D-Glycerinaldehyd) und Triokinase. Weiter wurden die Aktivitäten der NAD- und NADP-spezifischen Alkohol-Dehydrogenasen, die D-Glycerinaldehyd zu Glycerin reduzieren und deren Bedeutung für den Fructosestoffwechsel umstritten ist, gemessen. Der Vergleich zwischen Ratte und Huhn ergab, daß sich die Enzymaktivitäten während der embryonalen und postnatalen Entwicklung in ähnlicher Weise verändern.

Die Enzyme lassen sich in drei Gruppen einteilen:

1. Enzyme, die sich erst nach der Geburt in der Leber nachweisen lassen; einziges Beispiel ist Fructokinase. 2. Enzyme, die während der embryonalen und postnatalen Entwicklung ihr Isoenzymmuster ändern, z. B. Aldolase. Der Quotient der unter optimalen Bedingungen gemessenen Spaltungsgeschwindigkeit von Fructose-1,6-diphosphat und Fructose-1-phosphat ändert sich bei der Ratte von 10 beim Embryo auf 2,6 beim adulten Tier, beim Huhn dagegen nur von 3,8 auf 2,3. 3. Enzyme, die embryonal bereits nachzuweisen sind und deren Aktivität vom embryonalen bis zum adulten Zustand stetig ansteigt. Beispiele sind die Sorbit-Dehydrogenasen, die Alkohol-Dehydrogenasen, die Triokinase und auch die Aldehyd-Dehydrogenase, die bereits embryonal in hoher Aktivität in der Leber von Ratte und Huhn nachzuweisen ist und sich während der weiteren Entwicklung nur wenig verändert.

Unsere Versuche zeigen, daß die Biosynthese der Enzyme des Fructosestoffwechsels nicht durch ein einziges Genom gesteuert wird. Versuche, eine schnellere postnatale Zunahme der Enzymaktivitäten durch Fructose zu erreichen, verliefen ergebnislos.

[*] Dr. F. Heinz und F. Weiner
Institut für Klinische Biochemie und
Physiologische Chemie der Medizinischen Hochschule
3 Hannover, Osterfeldstraße 5

Gewebshyaluronidase und Wundheilung

Von W. Heller (Vortr.) und F. K. Mörl[*]

Bei mehr als fünfzig strumaoperierten Männern und Frauen untersuchten wir das Verhalten der Gewebshyaluronidase und das des proteingebundenen Jods bis zu sieben bzw. neun Tagen nach der Operation. Der Gehalt an proteingebundenem Jod ist ein wohldefiniertes Maß für den Thyroxinspiegel im Blut. Bei der Gewebshyaluronidase (Mittelwertskurven) fällt die Abnahme am Operationstag auf, die aber noch im Bereich der Norm liegt; das Minimum (weit unter dem Normbereich) wird erst am dritten Tag erreicht. Um den Zusammenhang zwischen Gewebshyaluronidase und proteingebundenem Jod exakt verfolgen zu können, müssen die Kurven für jeden Patienten gesondert betrachtet werden. Bei sämtlichen Strumaoperierten nimmt die Menge des proteingebundenen Jods postoperativ zu, während die der Gewebshyaluronidase abfällt. Im Idealfall sind beide Kurven nahezu gegenläufig. So treten bei fast allen Patienten die entsprechenden Maxima und Minima gleichzeitig auf. Die Höhe der Extremwerte hängt jedoch von der Art der Struma ab. Dies wird besonders deutlich bei Hyperthyreosen; allerdings zeigen auch euthyreote Patienten den beschriebenen Verlauf der beiden Kurven, der jedoch nicht so auffällig ist.

Obwohl ein signifikanter Zusammenhang zwischen Gewebshyaluronidase und proteingebundenem Jod besteht, wird offenkundig, daß es nur ein indirekter sein kann, da zwar die Gewebshyaluronidase durch einen Proteinaseinhibitor beeinflussbar ist, nicht aber das proteingebundene Jod. Es gelang uns auf diese Weise, einen Anstieg der Gewebshyaluronidase zu erreichen, der völlig unabhängig vom Spiegel des proteingebundenen Jods im Blut ist.

Die Gabe des Proteinaseinhibitors bewirkt somit einen günstigen therapeutischen Effekt, da ein extremer Abfall der Gewebshyaluronidase für die Wundheilung nicht wünschenswert ist. Der positive Einfluß des Thyroxins bei der Wundheilung ist bekannt, was auch durch in-vitro-Versuche bestätigt wurde und erklärt, weshalb die Wunden nach der Strumaoperation so rasch verheilen.

[*] Dr. W. Heller und Doz. Dr. F. K. Mörl
Chirurgische Klinik und Poliklinik der Universität
74 Tübingen, Calwerstraße 7

Zur Evolution allosterischer Enzyme

Von A. W. Holldorf[*]

An zahlreichen Enzymen sind in den letzten Jahren allosterische Kontrollen nachgewiesen worden. Diese wurden vorwiegend in vitro analysiert. Über die Bedeutung allosterischer Effekte in vivo liegen bisher nur wenige Beobachtungen an Mikroorganismen vor. Hier lassen sich bei Mutanten, in denen einige Enzyme ihre allosterischen Eigenschaften verloren, ihre katalytischen Fähigkeiten aber noch beibehalten haben, charakteristische Stoffwechselveränderungen nachweisen. Indirekte Aussagen über die Bedeutung allosterischer Mechanismen in vivo ergeben sich aus dem Vergleich der in vitro wirksamen Konzentrationen allosterischer Effektoren und den in vivo vorliegenden Konzentrationen an diesen Metaboliten.

Wir verglichen drei allosterisch kontrollierte Enzyme der Biosynthese von Pyrimidinnucleotiden aus mehreren Organismen: Aspartat-Transcarbamylase mit Cytidin-5'-triphosphat als negativem Effektor, Desoxycytidin-5'-monophosphat-Desaminase mit Thymidin-5'-triphosphat als negativem sowie Desoxycytidin-5'-triphosphat als positivem Effektor und Thymidin-Kinase mit Thymidin-5'-triphosphat als negativem Effektor. Unter möglichst optimalen Bedingungen wurden die Aktivitäten dieser Enzyme und ihre Beeinflussung durch die Effektoren in zellfreien Extrakten von Mikroorganismen, niederen Pflanzen und Tieren sowie von Geweben höherer Pflanzen und Tiere ermittelt; daneben wurden (so weit analytisch möglich) die intrazellulären Konzentrationen der Effektoren bestimmt.

Es zeigte sich, daß Desoxycytidin-5'-monophosphat-Desaminase und Thymidin-Kinase aus allen Organismen, die diese Enzyme enthalten, durch die Effektoren in jeweils annähernd gleichen Konzentrationen beeinflusst werden, die in der Größenordnung der intrazellulären Konzentrationen der entsprechenden Nucleotide liegen. Bei Aspartat-Transcarbamylase dagegen beobachtet man dieses Verhalten nur bei einigen Mikroorganismen; bei allen anderen Organismen wirken die Effektoren erst in Konzentrationen, die 10- bis 1000-mal größer als die intrazellulären Konzentrationen an Cytidin-5'-triphosphat sind.

Nach diesen Ergebnissen kann der allosterischen Kontrolle von Desoxycytidin-5'-monophosphat-Desaminase und Thymidin-Kinase bei allen Organismen, von Aspartat-Transcarbamylase wahrscheinlich nur bei Mikroorganismen, eine biologische Bedeutung zukommen. Es ist wahrscheinlich, daß die Kontrolle von Aspartat-Transcarbamylase durch Allosterie im Laufe der Evolution weitgehend verlorengegangen und durch andere Kontrollen ersetzt wurde, während sie sich bei den beiden anderen Enzymen bei allen Organismen erhalten hat.

[*] Priv.-Doz. Dr. A. W. Holldorf
Biochemisches Institut der Universität
78 Freiburg, Hermann-Herder-Straße 7

Allosterische Eigenschaften der Hefepyruvat-Kinase

Von H.-J. Wieker, K.-J. Johannes (Vortr.) und B. Hess[*]

In früheren Arbeiten wiesen Hess et al.^[1] die starke Kooperativität der Hefepyruvat-Kinase gegenüber dem Substrat Phosphoenolpyruvat nach und zeigten, daß Fructose-1,6-diphosphat ein allosterischer Aktivator ist, Adenosintriphosphat (ATP) ein allosterischer Inhibitor.

Die aus dem Modell von Monod, Wyman und Changeux^[2], dessen Forderungen von der Hefepyruvat-Kinase erfüllt werden^[1], resultierenden Zustands- und Bindungsfunktionen und die das Enzym charakterisierenden Konstanten wurden aus weiteren Untersuchungen der Kinetik im stationären Zustand unter dem Einfluß von Fructose-1,6-diphosphat und ATP nach der Methode von Blangy, Buc und Monod^[3] bestimmt. Für die Liganden Phosphoenolpyruvat, Fructose-1,6-diphosphat und ATP wurde die Zahl *n* der Bindungsstellen pro Enzym-Molekül zu zwei ermittelt, d.h. die Hefepyruvat-Kinase besteht aus zwei identischen Protomeren.

Es liegt ein Gleichgewicht zwischen einem aktiven (R) und einem inaktiven (T) Zustand des Enzyms mit einer Gleichgewichtskonstanten $[T]/[R] = L_0 = 1,5 \cdot 10^3$ vor. Die Dissoziationskonstanten für die Liganden vom R-Zustand (K_R) und T-Zustand (K_T) betragen für Phosphoenolpyruvat: $K_R = 2 \cdot 10^{-4}$ M, $K_T = 3,5 \cdot 10^{-2}$ M, non-exclusive binding coefficient $c = 6 \cdot 10^{-3}$; für Fructose-1,6-diphosphat: $K_R = 1 \cdot 10^{-4}$ M; für ATP: $K_T = 2 \cdot 10^{-3}$ M. Aus diesen Konstanten ist zu ersehen, daß die Hefepyruvat-Kinase in Abwesenheit von Liganden überwiegend im T-Zustand vorliegt, ATP diesen Zustand fixiert und die beiden anderen Substanzen das Gleichgewicht weitgehend vom T-Zustand zum R-Zustand verschieben.

Die Untersuchungen über die Bindung des zweiten Substrats ADP, das nur bei Phosphoenolpyruvat-Konzentrationen unter $5 \cdot 10^{-3}$ M Kooperativität zeigt^[1], sind noch nicht abgeschlossen. Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf, daß die Bindung von ADP an den Enzym-Phosphoenolpyruvat-Komplex bevorzugt ist gegenüber der Bindung an das freie Enzym.

[*] Dr. H.-J. Wieker, Dipl.-Phys. K.-J. Johannes und Prof. Dr. B. Hess
Max-Planck-Institut für Ernährungsphysiologie
46 Dortmund, Rheinlanddamm 201

[1] R. Haecel, B. Hess, W. Lauterborn u. K. H. Wüster, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 349, 699 (1968).

[2] J. Monod, J. Wyman u. J.-P. Changeux, J. molecular Biol. 12, 88 (1965).

[3] D. Blangy, H. Buc u. J. Monod, J. molecular Biol. 31, 13 (1968).

Biogenese der Mitochondrien. Syntheseweg mitochondrialer Phospholipide

Von B. Kadenbach[*]

Isolierte Mitochondrien vermögen Phosphatide nur in der Außenmembran zu synthetisieren^[1]. Die Herkunft der Phosphatide der Innenmembran, die etwa 80% der gesamten Phosphatide enthält, ist unbekannt. Einbauversuche mit $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ an isolierten Rattenlebermitochondrien ergaben sehr verschiedene Einbaugeschwindigkeiten (mmol $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ /mol Phosphatid-Phosphat in 10 min) für die untersuchten Phosphatide: Phosphatidyl-cholin: 0,08, -äthanolamin: 0,29, -serin: 4,9, -inosit: 0,3, Lysophosphatidyl-cholin: 2,4. Diese Einbaugeschwindigkeiten (mit Ausnahme der von Lysophosphatidyl-cholin) sind niedriger als die maximalen Einbaugeschwindigkeiten nach Injektion von $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ in vivo (8, 40, 29, 20 bzw. 2,1).

Mit Digitonin^[2] wurden die Außenmembran, die Intracristae-Proteine, die Innenmembran und die Matrix in vitro markierter Mitochondrien isoliert und die Phosphatide durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie getrennt. Die löslichen Fraktionen wurden durch einstündiges Zentrifugieren bei 400000 x g gewonnen. Sie enthielten beträchtliche Mengen an markierten Phosphatiden (nmol Phosphatid-Phosphat/mg Protein): Außenmembran: 660, Intracristae-Raum: 195, Innenmembran: 345, Matrix: 35. Die spezifische Radioaktivität war für Phosphatidyl-cholin, Phosphatidyl-äthanolamin und Phosphatidyl-serin + Phosphatidyl-inositol in der Außenmembran am größten. Nur Lysophosphatidyl-cholin zeigte die höchste Aktivität im Intracristae-Raum. Entsprechend war auch ihr prozentualer Anteil dort am größten (2,2 gegenüber 0,6–0,9).

Kinetische Studien des Einbaus von $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ in vivo zeigten eine schnelle Markierung von Phosphatidyl-äthanolamin in der Mikrosomenfraktion. Erst mit einer Verzögerung von etwa 10 min wird das mitochondriale Phosphatidyl-äthanolamin markiert. Phosphatidyl-cholin wird in beiden Partikeln erst nach einer weiteren Verzögerung von 10 min markiert; wie oben wird es in den Mikrosomen schneller markiert als in den Mitochondrien. In vivo werden auch Phosphatidyl-äthanolamin und Phosphatidyl-serin zuerst in der löslichen und dann in der unlöslichen Mitochondrienfraktion markiert. In einem weiteren Experiment konnte die Übertragung von markierten Phosphatiden von den Mikrosomen in die Mitochondrien direkt in vitro gezeigt werden. Dieser Vorgang ist energie- und zeitabhängig, wie bereits für den Protein-Übergang gezeigt wurde^[3]. Die Ergebnisse werden dahingehend interpretiert, daß der Hauptanteil der mitochondrialen Phosphatide am endoplasmatischen Reticulum synthetisiert wird und zusammen mit neu-synthetisiertem Protein als Molekülkomplex in die Mitochondrien transportiert wird.

[*] Dr. B. Kadenbach
Institut für physiologische Chemie und
physikalische Biochemie der Universität
8 München, Goethestraße 33