

ca. 2% der Gesamtsynthese. In 2 Monate alten Präparaten betrug der nichtenzymatische Anteil bereits ca. 4% der Gesamtsynthese des Citrullins. Wie bereits festgestellt wurde, ist die nichtenzymatische Reaktion stark von der Temperatur abhängig. Bei Temperaturen zwischen 2–4° wird die Reaktion vollständig gehemmt. Die Citrullin-Werte einer 2, 4, 7 und 9 Tage im Kühlschrank aufbewahrten aktiven und inaktivierten Carbamyltransferase-Lösung entsprachen den Ausgangswerten.

Schließlich wurde das Reaktionsgemisch auf seine Empfindlichkeit gegenüber den Eiweißfällungsmitteln Alkohol und Trichloressigsäure geprüft. Es wurde festgestellt, daß keine der beiden Verbindungen die Citrullinbestimmung beeinträchtigt. Die Trichloressigsäure ist besser geeignet, da ein Überschuß an CP in saurer Lösung sehr rasch in anorganisches Phosphat und Carbaminsäure zerlegt wird¹, wodurch das Substrat der nichtenzymatischen Carbamylornithin-Synthese eliminiert wurde.

Über die Verschiedenheit der Milchsäure-Dehydrogenasen

V. Papierelektrophoretischer Vergleich der tryptischen Spaltprodukte

VON THEODOR WIELAND, GERHARD PFLEIDERER UND KLAUS RAJEWSKY

Aus der Biochemischen Abteilung des Instituts für organische Chemie an der Universität Frankfurt am Main

(Z. Naturforschg. 15 b, 434–436 [1960]; eingegangen am 29. März 1960)

Kristallisierte Lactat-Dehydrogenasen aus Schweineherz, Kaninchenskelettmuskel, Rattenherz und Rattenskelettmuskel wurden mit Trypsin abgebaut und die durch Hochspannungs-Elektrophorese der Verdauungsansätze erhaltenen Peptidmuster nach Anfärbung mit Ninhydrin und diazotierter Sulfanilsäure miteinander verglichen. Es ergaben sich die in den Abb. 1–4 dargestellten Unterschiede.

Wie in den vorhergehenden Mitteilungen dieser Reihe ausgeführt^{1–4} weisen die Lactat-Dehydrogenasen (LDH) verschiedenen Ursprungs deutliche elektrophoretische und biochemische Unterschiede auf. Daß diesen verschiedene Primärstrukturen zugrunde liegen, ist bisher nur an einem Beispiel deutlich gemacht worden⁵. Wir haben jetzt mehrere einheitliche, kristallisierte LDH's unter definierten Bedingungen mit Trypsin gespalten, die Produkte durch Hochspannungs-Elektrophorese auf Papier getrennt^{6,7} und miteinander verglichen. Zur Analyse kamen die LDH's aus Schweineherz, Kaninchenskelettmuskel, Rattenherz und Rattenskelettmuskel. Vom kristallisierten Rattenherzenzym konnten die drei stärkeren zur Anode wandernden Komponenten (I–III) durch Stärkeelektrophorese und Elution nach Einwandern in Glaspulver⁸ für sich gewonnen und analysiert werden.

Methoden

Da der Angriff von Trypsin auf native Enzyme zum Teil nur langsam und unvollständig vor sich geht, müssen die Proteine zur Gewährleistung reproduzierbarer Abbaubedingungen vor der Verdauung denaturiert werden. Wir führten diese Denaturierung durch Einbringen einer Suspension der nach l. c.^{2,9,10} kristallisierten Enzyme (in Ammonsulfatlösung) in das gleiche Volumen einer 8-m. wäßrigen Harnstofflösung, 1¹/₂-stdg. Aufbewahren, Dialyse gegen eine Lösung von *m*/30-Ammoniumbicarbonat bei 0–2 °C (12 Std.) und schließliches Erhitzen auf 100 °C aus. Dabei bleiben die Herzmuskelenzyme in Lösung, während die Skelettmuskelenzyme in feinsten Flocken ausfallen. Zur Verdauung wurde ein Trypsinpräparat verwendet, das zur Zerstörung einer Verunreinigung durch Chymotrypsin in 1-proz. Lösung 24 Std. bei 37 °C in *n*/16-HCl inkubiert worden war¹¹. Man stellte eine Lösung oder Suspension von ca. 2 mg Protein pro ml mit Ammoniak und Essigsäure auf *p*_H 8,0 ein und versetzte sie mit 1–2% Trypsin, bezogen auf vorhandenes Eiweiß. Die

¹ TH. WIELAND U. G. PFLEIDERER, *Biochem. Z.* **329**, 112 [1957].

² G. PFLEIDERER U. D. JECKEL, *Biochem. Z.* **329**, 370 [1957].

³ TH. WIELAND, G. PFLEIDERER U. F. ORTANDERL, *Biochem. Z.* **331**, 103 [1959].

⁴ TH. WIELAND, G. PFLEIDERER, I. HAUPT U. W. WÖRNER, *Biochem. Z.* **332**, 1 [1959].

⁵ TH. WIELAND, *Angew. Chem.* **71**, 417 [1959].

⁶ TH. WIELAND U. G. PFLEIDERER, *Angew. Chem.* **67**, 257 [1955].

⁷ TH. WIELAND U. G. PFLEIDERER, *Angew. Chem.* **69**, 199 [1957].

⁸ TH. WIELAND, G. PFLEIDERER U. H. L. RETTIG, *Angew. Chem.* **70**, 341 [1958].

⁹ G. BEISENHERZ, H. J. BOLTZE, TH. BÜCHER, R. CZOK, K. H. GARBADÉ, E. MEYER-ARENDE U. G. PFLEIDERER, *Z. Naturforschg.* **8 b**, 555 [1953].

¹⁰ F. B. STRAUB, *Biochem. J.* **34**, 483 [1940].

¹¹ R. P. REDFIELD U. C. B. ANFENSEN, *J. biol. Chemistry* **221**, 385 [1956].

Ansätze wurden bei 37 °C 22 Stdn. aufbewahrt*, zur Denaturierung des Trypsins aufgekocht und nach dem Zentrifugieren gefriergetrocknet. Die anschließende Elektrophorese der Spaltpeptide erfolgte auf Papier von Macherey, Nagel & Co. Nr. 214 oder 2214 bei p_H 6,5, 1 1/2 Stdn. bei 50 V/cm. Zur Erkennung wurde zumeist mit Ninhydrin entwickelt und anschließend mit diazotierter Sulfanilsäure (Paulys Reagens) besprüht. Direktes Besprühen der Originalpherogramme mit Paulys Reagens läßt schwächere tyrosin- und histidin-haltige Banden zusätzlich erkennen. Die so erhaltenen Pherogramme erwiesen sich als gut reproduzierbar. Mitunter kann es vorkommen, daß sehr schwach ausgeprägte Banden nicht mit voller Sicherheit in allen gleichartigen Ansätzen wiedererkannt werden.

Vergleich zweier Skelettmuskelenzyme (Abb. 2): Deutlichere Unterschiede zeigen sich zwischen den Peptiden aus Kaninchen- und Rattenskelettmuskel (s. a, b und c).

Vergleich der LDH's aus verschiedenen Geweben eines Tieres (Abb. 3): Hier treten überraschenderweise besonders deutliche Unterschiede zutage. Die im Herzenszym befindliche stark Pauly-positive Bande a fehlt im Muster des Skelettenzyms völlig. Nur dort tritt bei b eine stark ninhydrin-positive Bande hervor, während das Herzenszym bei c eine starke Bande aufweist, die wiederum beim anderen fehlt.

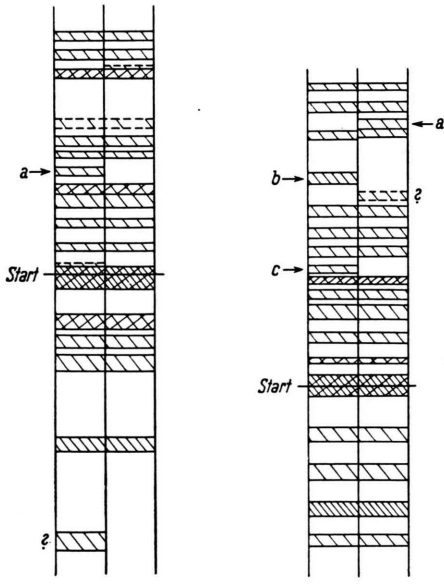


Abb. 1. Pherogramme der tryptischen Spaltpeptide von LDH aus Rattenherz (links) und Schweineherz (rechts) bei p_H 6,5.

■ = Pauly positive Banden
 ▨ = Ninhydrin positive Banden

Abb. 2. Pherogramme der tryptischen Spaltpeptide von LDH aus Kaninchen- und Rattenskelettmuskel (links) und Rattenskelettmuskel (rechts) bei p_H 6,5. Erklärung wie bei Abb. 1.

Ergebnisse

Die Ergebnisse des qualitativen Vergleichs der Spaltpeptide gehen aus Abb. 1 – 4 hervor.

Vergleich zweier Herzmuskelenzyme (Abb. 1): Das Peptidmuster der Ratten- und Schweineherz-LDH weist eine überraschende Gleichartigkeit auf. Lediglich bei a scheint im Rattenenzym eine ninhydrin-positive Bande aufzutreten, die in Schweineenzym fehlt.

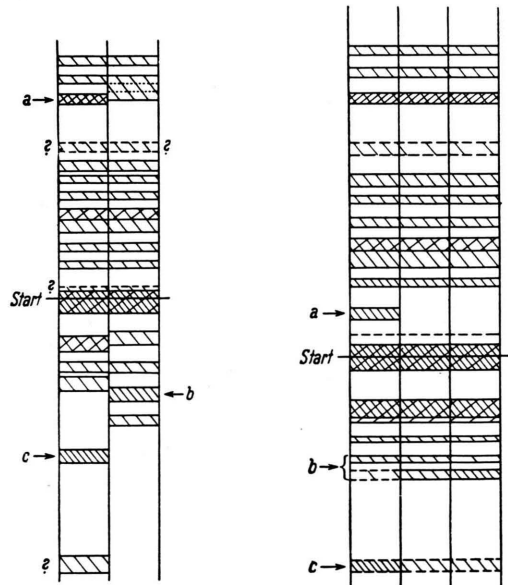


Abb. 3. Pherogramme der tryptischen Spaltpeptide von LDH-Komponente I aus Rattenherz (links) und aus Rattenskelettmuskel (rechts) bei p_H 6,5. Erklärung wie bei Abb. 1.

Abb. 4. Pherogramme der tryptischen Spaltpeptide von LDH-Komponente I aus Rattenherz (links), Komponente II aus Rattenherz (Mitte), Komponente III aus Rattenherz (rechts) bei p_H 6,5. Erklärung wie bei Abb. 1.

Vergleich der verschiedenen Komponenten von Rattenherz-LDH (Abb. 4): Obwohl sich die Komponenten I – V der Rattenherz-LDH in ihrem elektrophoretischen Verhalten so deutlich unterscheiden, daß sie präparativ getrennt werden können, weisen die Peptidmuster der ersten drei Komponenten, die mit Sicherheit verglichen werden konnten, nahezu völlige Übereinstimmung auf. Lediglich Bande a scheint nur in Komponente I vorzukommen. Quan-

* Stichproben zeigten, daß die Verdauung im wesentlichen nach 4–5 Stdn. abgeschlossen war.

titative Unterschiede könnten bei b und c in der aus der in Abb. 4 ersichtlichen Weise bestehen. Von den Komponenten IV und V stand zu einem Vergleich zu wenig Material zur Verfügung.

Schlußbetrachtung

Unsere vergleichenden Analysen lassen auf den ersten Blick keine bedeutenden Unterschiede zwischen den verschiedenen Lactat-Dehydrogenasen erkennen. Hält man sich jedoch vor Augen, daß auch im elektrischen Feld deutlich verschieden wandernde Hämoglobine nur äußerst geringfügige Unterschiede in ihrer Primärstruktur aufweisen¹², so wird man auch den von uns aufgefundenen Differenzen eine gewisse Bedeutung zumessen müssen. Neuerdings sind von ANFINSEN und Mitarbb.^{13, 14} vergleichende Untersuchungen an Ribonucleasen verschiedenen Ursprungs bekanntgegeben worden. Dort bestehen zwischen den Pankreasenzymen von Schwein und Rind nur kleine, zwischen denen von Rind und Schaf deutliche Unterschiede. Die von uns untersuchten Enzyme aus gleichartigen Geweben verschiedener Tiere unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung

in einer Weise, die mit den Befunden an Ribonucleasen etwa vergleichbar sind. Deshalb verdient um so mehr Beachtung, daß der von uns erstmalig durchgeführte Vergleich der LDH's aus *verschiedenen Geweben* ein und *desselben Tieres* (Herz und Skelettmuskel der Ratte, Abb. 3) die *stärksten Differenzen* erkennen läßt. Dies läßt auf eine organspezifische Bildung dieser Enzyme schließen. Die Peptidmuster der heterogenen Herzmuskelenzyme, die sich im elektrischen Feld sehr deutlich unterscheiden, weisen hingegen äußerst große Übereinstimmung auf. Hieraus darf vielleicht gefolgert werden, daß die Ladungsunterschiede der Komponenten weniger auf Unterschiede in der Primärstruktur als vielleicht durch das Vorliegen von mehr oder weniger Säureamid-Seitenketten bedingt sein dürften.

Herrn Dipl.-Chemiker H. L. RETTIG danken wir für seine geschickte Mitarbeit bei der Reindarstellung des Rattenherzenzyms.

¹² V. M. INGRAM, *Biochim. biophysica. Acta* [Amsterdam] **28**, 539 [1958].

¹³ C. B. ANFINSEN, S. E. G. ÅQVIST, J. P. COOKE u. B. JÖNSSON, *J. biol. Chemistry* **234**, 1118 [1959].

¹⁴ A. M. KATZ, W. J. DREYER u. C. B. ANFINSEN, *J. biol. Chemistry* **234**, 2897 [1959].

Enzymatische Aktivierung von Auxinen und ihre Konjugierung mit Glycin

Von M. H. ZENK *

Aus dem Dept. of Horticulture, Purdue University, Lafayette, Ind. U.S.A. **

(Z. Naturforschg. **15 b**, 436—441 [1960]; eingegangen am 2. Mai 1960)

Octanoate-thiokinase, an enzyme from liver mitochondria, was found to catalyze the formation of auxin-CoA esters with several different auxins in the presence of adenosinetriphosphate and coenzyme-A. Evidence was provided to show that indoleacetyl-adenosinemonophosphate was an intermediate in the formation of indoleacetyl-CoA. This intermediate was supplied to the enzyme as the synthetic anhydride, and could lead either to the formation of indoleacetyl-CoA when supplied with CoA or to the formation of indoleacetic acid plus adenosinetriphosphate when supplied with pyrophosphate. Indoleacetyl-CoA was shown to be the intermediary product in the enzymatic formation of indoleacetyl-glycine. 2,4-Dichlorphenoxyacetic acid and α -naphthylacetic acid were not measurably conjugated with glycine under the same conditions. The results are discussed as to their implications in auxin metabolism in plants.

Seit der Entdeckung, daß es sich bei dem pflanzlichen Zellstreckungshormon um β -Indol-3-essigsäure (IES) handelt, fanden die morphologischen und physiologischen Aspekte des Einflusses dieses Auxins auf Pflanzen großes Interesse, sein Schicksal in pflanzlichen oder tierischen Organismen fand

dagegen wenig Beachtung. Daß IES mit Glycin im Tier unter Bildung von Indolacetyl-glycin (Indolacetursäure) konjugiert wird, war frühzeitig bekannt¹. Der Stoffwechsel von Auxinen in Pflanzen wurde überraschenderweise erst vor kurzem in einer Reihe von Arbeiten des kanadischen Arbeitskreises

* Botanisches Institut der Universität, München 19, Menzinger Straße 67.

** Die Untersuchungen wurden von 1956—1958 durchgeführt. Herrn Prof. Dr. A. C. LEOLD danke ich besonders herzlich

für die Überlassung des Themas und die immerwährende Förderung und Hilfe.

¹ L. EWINS u. H. LAIDLAW, *Biochem. J.* **7**, 18 [1913].