

Wechselwirkungen von Proteinen mit Actinomycin C

RUDOLF KOBERSTEIN, BRIGITTE WEBER UND RAINER JAENICKE

Institut für physikalische Biochemie im Institut für physikalische Chemie
der Universität Frankfurt/Main

(Z. Naturforsch. 23 b, 474—483 [1968]; eingegangen am 8. Mai 1967)

Zur Klärung der Frage nach der Beteiligung von Protein-Actinomycin (AMC)-Wechselwirkungen am antibiotischen Wirkungsmechanismus von AMC wurden mit Hilfe von Absorptions-, Fluoreszenz- und Rotationsdispersions-Spektroskopie, sowie Gelfiltration, Gleichgewichts-Dialyse, Ultrazentrifugation und enzymatischen Tests physikalisch-chemische Wechselwirkungen von AMC und Actinocinanalogen mit Ribonuclease, Serumalbumin und einigen SH-Enzymen (ADH, LDH, GAPDH) untersucht. Photochemische Reaktionen wurden ausgeschlossen.

Eine Bildung starker Komplexe wird nur bei $pH < 2$ beobachtet. Unter quasi-physiologischen Bedingungen des Mediums ergibt sich aus einer Differenzbande im Bereich der Phenoxazin-Absorption schwache Komplexbildung, die bei hohen Proteinkonzentrationen auch durch die gemeinsame Sedimentation von AMC und Protein bestätigt wird. Die Peptid-Lacton-Ringe des AMC und die aromatischen Aminosäuren der Proteine scheinen an der Wechselwirkung nicht beteiligt zu sein (Reaktion mit AMC-Dimeren, Null-Differenzspektrum bei $\lambda \sim 280 m\mu$). Die Ähnlichkeit im Verhalten von Cystein, Glutathion und SH-Enzymen und der kompetitive Effekt von Cystein bei der AMC-Enzym-Wechselwirkung weisen auf eine Beteiligung von Cystein am Komplex hin.

Eine durch AMC bewirkte Desaktivierung oder Stimulierung von Ribonuclease wird nicht beobachtet. Dagegen tritt im Fall von SH-Enzymen im pH -Optimum eine dem molaren Verhältnis AMC/Enzym proportionale Desaktivierung auf, die durch DNA bzw. RNA nur z. T. aufgehoben wird. Konformationsänderungen sind dabei nicht nachweisbar; die optische Drehung erweist sich als additiv. „Extrinsic“ Cotton-Effekte treten nicht auf.

Die SH-Spezifität des Ribonuclease-Inhibitors legt in Analogie zu den untersuchten SH-Enzymen die Annahme nahe, daß eine AMC-Protein-Wechselwirkung (Blockierung des RNase-Inhibitors) am biologischen Wirkungs-Mechanismus des AMC beteiligt sein könnte.

Abkürzungen: ADH, Alkoholdehydrogenase; AMC, Actinomycin C; CCP, 2',3'-cyclisches Cytidylphosphat; CP, 3'-Cytidylphosphat; GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase; LDH, Lactatdehydrogenase; MeBl, Methylblau; P I, 3-OH-4,5-Diacetyl-phenoxazon-2; P II, 3-NH₂-Phenoxazon-2; Pr, Proflavin; RNase, Ribonuclease; RSA, Rinderserumalbumin.

Actinomycin hemmt die DNA-abhängige RNA-Synthese¹⁻⁷. Zur Klärung des Wirkungsmechanismus kann — abgesehen von der physikalischen Wechselwirkung mit DNA⁸⁻¹¹ — hypothetisch auch die Stimulierung oder Inhibierung von Enzymen des Nucleinsäure-Stoffwechsels durch Bildung von Protein-AMC-Komplexen diskutiert werden¹². Dabei wären folgende Mechanismen möglich:

- a. Hemmung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase,
- b. Enzym-Induktion oder Stimulierung durch allosterischen Einfluß von AMC auf das aktive Zentrum von RNase oder DNase,
- c. Hemmung des RNase-Inhibitors.

Hypothese a kann ausgeschlossen werden¹³. Hypothese b, die eine Erhöhung der Synthese oder der Aktivität der Nucleasen postuliert, wurde von ERON und McAUSLAN¹⁴ und HILZ und Mitarbb.¹⁵ untersucht.

Die ersten fanden (im Widerspruch zur Hypothese) eine Hemmung der DNase-Aktivität durch AMC; dagegen konnte HILZ in Ascitestumor-Zellen und Thymus bzw. Milz der Ratte nach Inkubation

¹ H. M. RAUEN, H. KERSTEN u. W. KERSTEN, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **321**, 139 [1960]; **327**, 234 [1962]; **330**, 21 [1962].

² W. KERSTEN, H. KERSTEN, and H. M. RAUEN, Nature [London] **187**, 60 [1960].

³ J. M. KIRK, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **42**, 167 [1960].

⁴ I. J. SLOTNIK, Ann. N. Y. Acad. Sci. **89**, 342 [1960].

⁵ G. HARTMANN u. U. COY, Angew. Chem. **74**, 501 [1962].

⁶ J. HURWITZ, J. J. FURTH, M. MALAMAY, and M. ALEXANDER, Proc. nat. Acad. Sci. USA **48**, 1222 [1962].

⁷ I. H. GOLDBERG, M. RABINOWITZ, and E. REICH, Proc. nat. Acad. Sci. USA **48**, 2094 [1962]; Science [Washington] **136**, 315 [1962].

⁸ W. MORTHLAND, P. DE BRUYN, and H. SMITH, Exp. Cell. Res. **7**, 201 [1954].

⁹ D. HAMILTON, W. FULLER, and E. REICH, Nature [London] **198**, 538 [1963].

¹⁰ M. LIERSCH u. G. HARTMANN, Biochem. Z. **340**, 390 [1964]; **343**, 16 [1965].

¹¹ W. MÜLLER u. H. SPATZ, Z. Naturforsch. **20 b**, 842 [1965].

¹² R. JAENICKE, Studia Biophysica [Berlin] **2**, 445 [1967].

¹³ E. FUCHS, persönliche Mitteilung.

¹⁴ L. J. ERON and B. R. McAUSLAN, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **114**, 633 [1966].

¹⁵ W. ERBE, J. PREISS, R. SEIFERT, and H. HILZ, Biochem. biophys. Res. Commun. **23**, 392 [1966]; s. auch J. D. LEITH, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **72**, 643 [1963].

mit AMC u. a. Cytostatica Erhöhungen der RNase- (und DPNase-) Aktivität um Faktoren ≥ 3 nachweisen. Eine Entscheidung zwischen Induktion und Stimulierung kann im komplexen zellulären System nicht gefällt werden, ehe nicht der Einfluß von AMC auf das isolierte Enzym geklärt ist. Dieser Einfluß, ebenso wie die Hypothese c, für die in Versuchen an kompletten Zellen Indizien gefunden wurden¹⁶, sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Außer AMC und seiner Wechselwirkung mit RNase, RSA und einigen typischen SH-Enzymen werden Modellversuche mit Proflavin, Methylenblau und zwei Phenoxazin-Derivaten als Actinocin-analogen Chromophoren¹⁷ diskutiert.

Als Methoden dienen: Absorptions-, Fluoreszenz- und Rotationsdispersions-Spektroskopie, Gelfiltration, Gleichgewichts-Dialyse, Ultrazentrifugation und enzymatischer Test.

Experimenteller Teil

Materialien und Methoden

Die charakteristischen Daten der untersuchten Systeme sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Die Proteine und Farbstoffe wurden ohne weitere Reinigung verwendet; Puffersubstanzen und Komponenten der enzymatischen Tests waren von Merck (p.a.) resp. Boehringer. CCP wurde nach CROOK et al.²⁰ hergestellt. Als Lösungsmittel diene bidest. Austauschwasser.

Zur Gelchromatographie mit Sephadex G 25, 100 und 200 (Deutsche Pharmacia, Frankfurt/M.) dienen Säulen von 0,8·32 bzw. 1,0·50 cm; es wurde absteigend nach dem Unterschichtungs-Verfahren chromatographiert und im Uvicord (LKB-Uppsala) bei 254 m μ analysiert. Für den Fall schwacher Komplexbildung wurde die Methode von HUMMEL und DREYER²² angewandt. Differenzspektren wurden unter Verwendung von jeweils 4 kalibrierten Quarzküvetten (Hellma, Müllheim: QS) mit Hilfe von Beckman-(DK 2 A), Optica-(CF 4) und Zeiss-(PMQ II) Spektralphotometern aufgenommen. Die Küvettenfehler betragen im Bereich von 240–550 m μ (bezogen auf die Extinktion der Mischungen < 0,5 Prozent. Der Vergleich der Differenzspektren im Gitter- bzw. Prismen-Spektrometer erweist sich als notwendig, da bei hohen Extinktionen infolge Spalt-(= Halbwertsbreiten-)Variation $\Delta\epsilon$ -Maxima vorgetauscht werden können.

Fluoreszenzspektren wurden als Relativmessungen im Zeiss Fluoreszenz-Spektrometer mit einer Xe-Lampe als Lichtquelle aufgenommen. Zur Gleichgewichts-Dia-

Substanz	Herkunft	(λ_{\max}) _{aq}	Q_e	$K_e \cdot 10^{-4}$	M	SH	A	Enzym-Test
AMC	Serva, Heidelberg 97% C ₁ , 3% C ₂ etc	240		3,12	1284			
	Bayer, Leverkusen 5% C ₁ , 40% C ₂ , 55% C ₃	436		2,61				
Pr „NF“	Nutritional Bioch. Corp., Cleveland	259		2,70	247			
	3.6. Diaminoacridin	438		1,96				
MeBl	Merck, Darmstadt				320			
P I	Dr. E. FUCHS, München	$\epsilon_{436} \sim 0,3^a$	436	0,17 ^b	273			
P II	Dr. E. FUCHS, München	$\epsilon_{432} \sim 2,7^a$	432	2,54 ^c	212			
RSA	Behring, Op. Nr. 62 u. 302	279	1,67	4,69	68000	0,7		
	Marburg/Lahn							
RNase	Boehringer, Mannheim	279	1,85	1,03	13700	0	30 IE/mg	KALNITSKY ¹⁸ , ^d KUNITZ ¹⁹ , ^d CROOK et al. ²⁰
	(Pancreas, Rind)							
ADH	Boehringer (Hefe)	278	1,62	20,78	140000	~ 20	9900	Boehringer ^e BERGMEYER ²¹
LDH I	Boehringer Isoenzym I: 97% (+ 2,5% II + 0,5% III)	279	1,58	19,59	142000	4*(16)	22600	Boehringer ^e
LDH V	Boehringer Isoenzym V: 96% (+ 2% IV + 0,5% III/II + 1,5% I)	279	1,48	20,68	142000	4*(16)	21600	Boehringer ^e
GAPDH	Boehringer (Kaninchen-Skelettmuskel)	280	1,60	17,50	145000	4*(16)	1860	Boehringer ^e BERGMEYER ²¹

Tab. 1. Charakteristik der untersuchten Systeme. K_e : molarer Extinktions-Koeffizient; Q_e : $\epsilon_{230}/\epsilon_{260}$; M: Molgewicht; SH: Anzahl „essentieller“ SH-Gruppen pro Mol (SH_{total}); A: Aktivität; ^a ges. aq. Lösung (Lösung *via* alkoholische Lsg.); ^b in Äthanol; ^c in Methanol; ^d s-RNA (aus Bierhefe, Boehringer) als Substrat; ^e Boehringer Informationen.

¹⁶ H. HILZ, persönliche Mitteilung.

¹⁷ H. BROCKMANN, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe [Wien] **18**, 1 [1960].

¹⁸ G. KALNITSKY, J. P. HUMMEL, H. RESNIK, J. R. CARTER, L. B. BARNETT, and C. DIERKS, Ann. N. Y. Acad. Sci. **81**, 542 [1959].

¹⁹ M. KUNITZ, J. biol. Chemistry **164**, 563 [1946].

²⁰ E. M. CROOK, A. P. MATHIAS, and B. R. RABIN, Biochem. J. **74**, 234 [1960].

²¹ H. U. BERGMEYER (Ed.), „Methoden der enzymatischen Analyse“, Verlag Chemie, Weinheim 1962.

²² J. P. HUMMEL and W. F. DREYER, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **63**, 530 [1962].

lyse wurde in Dialysierzellen nach CRAIG²³ spektral-photometrisch die Kinetik des Konzentrations-Ausgleichs gemessen, wobei die Abweichungen vom vollständigen Ausgleich der niedermolekularen Komponenten die quantitative Abschätzung des Bindungsverhältnisses ermöglichen.

Zum Nachweis der Komplexbildung in der Ultrazentrifuge (Beckman, Modell E) wurden vergleichende Sedimentations-Geschwindigkeits-Versuche in An- und Abwesenheit von AMC bei einer Wellenlänge von $[\lambda_{\max}]_{\text{AMC}} \cong 440 \text{ m}\mu$ ausgeführt. Zur Densitometrie der Schlieren-Photogramme wurde ein Beckman-Analytrol verwendet.

Rotationsdispersions-Spektren wurden im ORD-Spektropolarimeter Cary 60 aufgenommen*.

Die enzymatischen Tests wurden nach den in Tab. 1 angegebenen Methoden ausgeführt. Für den Fall zeitabhängiger Wechselwirkungen wurde das reine Apoenzym mit AMC etc. inkubiert, um Nebenreaktionen mit den übrigen Komponenten des enzymatischen Tests auszuschließen.

Ergebnisse

1. Chromophor-Protein-Wechselwirkungen

Um mögliche Wechselwirkungen in Bezug auf die beiden funktionellen Teile des AMC-Moleküls (Phenoxazon-System + Peptidlacton-Ringe¹⁷) unterschi-

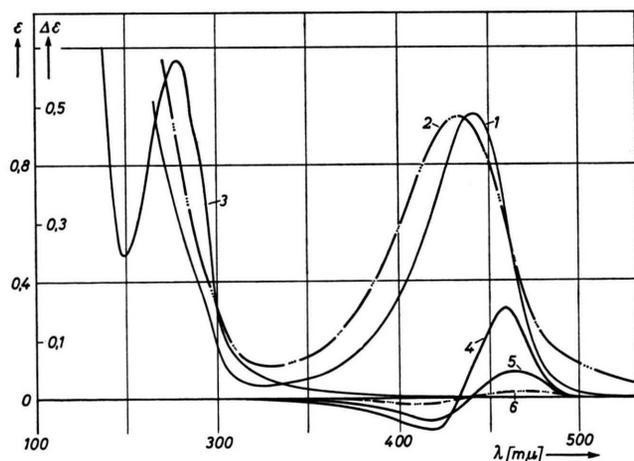


Abb. 1 a. Differenzspektren von Actinomycin-Analogen in Wechselwirkung mit RSA bzw. LDH. Phosphatpuffer $\text{pH } 7$, $I=0,15$, $T=20^\circ\text{C}$ (Schichttiefe: 10 mm Farbstoff + 10 mm Protein vs $2 \cdot 10 \text{ mm}$ Mischung, bzw. 10 mm der Komponenten vs Lösungsmittel). 1. $5 \cdot 10^{-5}\text{-m. Pr}$; 2. $\sim 10^{-5}\text{-m. PII}$; 3. $7 \cdot 10^{-6}\text{-m. LDH V}$; 4. $5 \cdot 10^{-5}\text{-m. Pr}$ vs $1 \cdot 10^{-4}\text{-m. RSA}$; 5. $1 \cdot 10^{-5}\text{-m. Pr}$ vs $3,5 \cdot 10^{-5}\text{-m. LDH V}$; 6. $\sim 10^{-5}\text{-m. P II}$ vs $3,5 \cdot 10^{-5}\text{-m. LDH V}$.

²³ L. C. CRAIG, in: P. ALEXANDER — R. J. BLOCK (Eds.) "Analytical Methods of Protein Chemistry", Vol. I, London 1960, p. 104.

* Herrn Prof. Dr. G. PFLIEDERER danken wir für die Ermöglichung der Messungen.

den zu können, wurden zunächst Wechselwirkungen zwischen Actinocin-Analogen und Proteinen untersucht. Bei Ausschluß photochemischer Reaktionen treten im Bereich der Protein-Absorption im UV in keinem Falle meßbare spektrale Änderungen auf ($\Delta\epsilon/\epsilon < 2\%$), während im Bereich der Phenoxazon-Absorptionsbande im Sichtbaren geringfügige Rotverschiebungen beobachtet werden (Abb. 1 a). Diese Verschiebungen beruhen nicht auf einer Mizellisierung des Farbstoffes, wie unmittelbar aus dem Ausbleiben entsprechender Banden in Konzentrations-Differenz-Spektren bei vergleichbaren Farbstoff-Konzentrationen hervorgeht.

Gelchromatographisch läßt sich keine Komplexbildung nachweisen: Die Elutionsvolumina der Komponenten der Mischung stimmen (bei Ausschluß photodynamischer Reaktionen) mit denen der getrennten reinen Komponenten überein. Andererseits ergibt sich beim Äquilibrieren der Säule mit dem Farbstoff (HUMMEL-DREYER-Methode²²) in der Nachfolge des positiven Protein-Maximums kein negativer Peak, wenn man die Hydratation des Proteins als Korrektur berücksichtigt (Tab. 2).

System	Methode	Gel G	K_d in der Mischung	K_d der Komponenten
RSA/MeBl	Trennung	25	—/2,5	—/2,5
		100	0,16/1,2	0,16/1,3
RSA/AMC	„	100	0,16/0,86	0,17/0,9
RNase/AMC	„	100	0,80/0,84	0,78/0,86
LDH V/AMC	„	200	0,31/2,2	0,30/2,4
RSA/MeBl	HUMMEL-DREYER ²²	25	$A_{\text{neg}}/A_{\text{Protein}}^a = 0,07$	Hydratation ^b $6,6 \pm 0,5\%$
GAPDH/AMC	„	25	0	
LDH V/AMC	„	25	0	

Tab. 2. Gelchromatographie von Protein/AMC- bzw. Protein/Farbstoff-Mischungen (Phosphatpuffer $\text{pH } 7$, $I=0,15$). ^a Verhältnis des negativen Peaks zum Protein-Peak. ^b RSA, Op.Nr. 62, gravimetrisch, nach Trocknung bei 106°C bzw. 40°C , 30 Torr über P_2O_5 bis zur Gewichtskonstanz. ^c Nach 48 h Gleichgewichts-Dialyse mit dem zur AMC-Lösung verwendeten Puffer (Phosphat $\text{pH } 7$, $I=0,15$).

Einwirkung von Licht führt in Analogie zu den Ergebnissen von WAKU²⁴ und WEIL et al.²⁵ zu starken spektralen Änderungen, die auf der Photo-Oxidation von His, Try, Tyr und Met beruhen (Abb. 1 b). Entsprechend der Extinktionszunahme bei $\sim 250 \text{ m}\mu$ äußert sich diese Oxidation in einer Vergrößerung der

²⁴ K. WAKU, J. Biochem. [Tokyo] 57, 578 [1965].

²⁵ L. WEIL, Arch. biochem. Biophysics 110, 57 [1965]; L. WEIL, T. S. SEIBLES, and T. T. HERSKOVITS, Arch. Biochem. Biophysics 111, 308 [1965].

Kurvenflächen im Elutionsdiagramm mit zunehmender Belichtungsdauer; das Hydratations-Minimum bleibt dabei konstant.

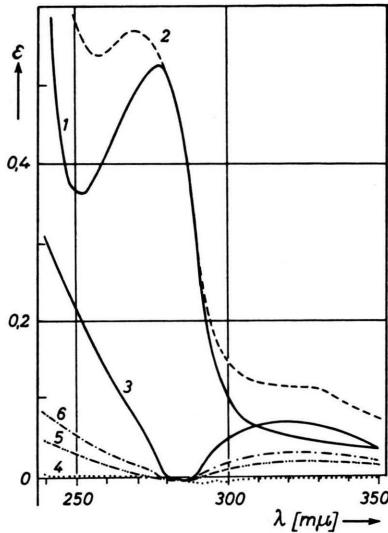


Abb. 1 b. Photochemische Reaktion des Systems RSA/MeBl. 1. $0,85 \cdot 10^{-5} \text{ m}$. RSA [Phosphat p_H 7] vs Lösungsmittel; unverändert nach 36 h Belichtung. 2. $0,85 \cdot 10^{-5} \text{ m}$. RSA + $1 \cdot 10^{-5} \text{ m}$. MeBl vs $1 \cdot 10^{-5} \text{ m}$. MeBl nach 36 h Belichtung. 3. Differenzspektrum 2-1 (36 h). 4. (\cdots) 2-1 (0 h); unverändert nach 24 h 4° C (dunkel). 5. ($-\cdots-$) 2-1 (4 h Tageslicht). 6. ($-\cdots-$) 2-1 (10 h Tageslicht). Im Sichtbaren keine Abweichung von der Null-Linie.

2. AMC-Protein-Wechselwirkungen

Wegen der Möglichkeit photochemischer Reaktionen wurde unter Lichtausschluß gearbeitet. An Parametern wurden variiert:

das molare Verhältnis der Komponenten $q_c = c_{AMC}/c_p \cong 0,5 - 20$ mit $c_{AMC} = 10^{-5} - 2 \cdot 10^{-4} \text{ m}$. und $c_p = 10^{-5} - 2 \cdot 10^{-4} \text{ m}$.; der p_H -Wert: $1,5 \leq p_H \leq 11,0$; die Ionenstärke: $0,1 \leq I \leq 2,0$.

Die Differenzspektren weisen im Falle von RNase und RSA — unabhängig von q_c im p_H -Bereich zwischen 1,5 und 9 keine signifikanten Abweichungen von der Null-Linie auf: $\Delta\varepsilon/\varepsilon_{\text{max}} < 2\%$ (Abb. 2 a). Bei p_H 11 tritt ein zeitabhängiges Differenzspektrum auf (Kurve 1 in Abb. 2 b), das auf der mangelnden Synchronisation bei der Herstellung der Lösungen beruht und ebenfalls für das reine AMC unter identischen experimentellen Bedingungen beobachtet wird; die Nullstellen des Differenzspektrums fallen dabei mit den isosbestischen Punkten der AMC-Ab-

sorptionsspektren zusammen (Kurven 3-5, Abb. 2 b). Die beobachteten spektralen Veränderungen folgen demnach aus der Hydrolyse des Phenoxazon-Systems zum Diphenylamin-System²⁶ und nicht aus Protein-AMC-Wechselwirkungen.

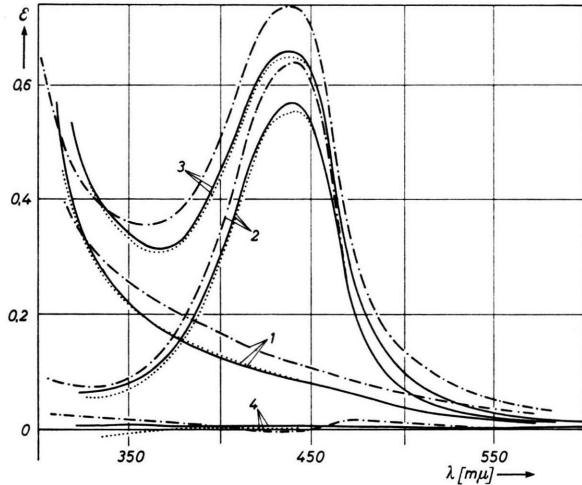


Abb. 2 a. Absorptions- und Differenzspektren von RSA/AMC in Abhängigkeit vom p_H . $c_p = 2 \cdot 10^{-4} \text{ m}$.; $c_{AMC} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ m}$. ($-\cdots-$) p_H 2; (\cdots) p_H 7; ($---$) p_H 9. 1. RSA vs Puffer (10 mm); 2. AMC vs Puffer (10 mm); 3. RSA/AMC vs Puffer (2·10 mm 1:1); 4. Differenzspektrum 3-(2+1); Abweichung $(\Delta\varepsilon/\varepsilon)_{280} = \frac{0,06}{14,9} = 0,004$ (p_H 2); $< \frac{0,14}{18} = 0,008$ (p_H 7); $\frac{0,04}{19,6} = 0,002$ (p_H 9).

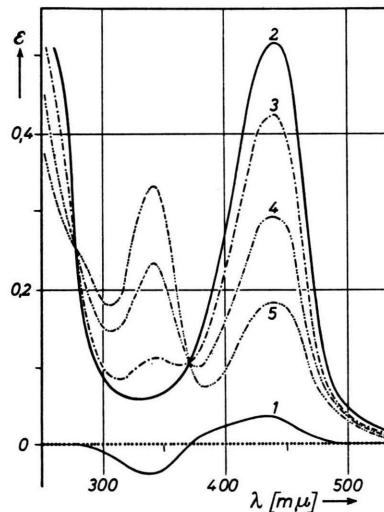


Abb. 2 b. Absorptions- und Differenzspektren von RSA und AMC bei p_H 11. $c_p = 1 \cdot 10^{-5} \text{ m}$.; $c_{AMC} = 2 \cdot 10^{-5} \text{ m}$. 1. RSA + AMC (Mischung bei p_H 11) vs RSA || AMC; 2. AMC-Absorption bei p_H 9 als Referenz; 3-5. AMC vs Glycin/NaOH p_H 11 nach 10', 60', 90'.

²⁶ H. BERG et al., Mb. dtsh. Akad. Wiss. Berlin 1, 524 [1959].

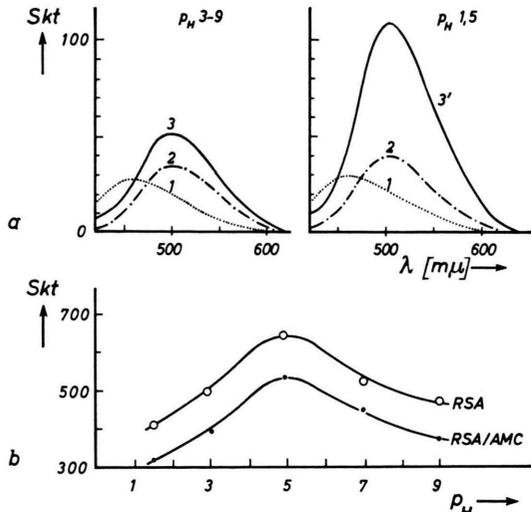


Abb. 3 a. Emissions-Spektrum von RSA (1), AMC (2) und RSA/AMC (3) bei $\lambda_a = 390 \text{ m}\mu$.

Abb. 3 b. Maximalemission bei $\lambda_e = 350 \text{ m}\mu$ von RSA und RSA/AMC: $\lambda_a = 290 \text{ m}\mu$, $c_p = 0,2\%$ RSA $\cong 3 \cdot 10^{-5} \text{ m.}$, $c_{\text{AMC}} = 2 \cdot 10^{-5} \text{ m.}$

Die Fluoreszenzspektren bestätigen das Ergebnis der Absorptionsmessungen. Entsprechend den Anregungs-Maxima: $\lambda_{\text{AMC}} = 390 \text{ m}\mu$ bzw. $\lambda_{\text{RSA}} = 290$ und $385 - 400 \text{ m}\mu$ wurde bei 290 und $390 \text{ m}\mu$ angeregt ($c_{\text{AMC}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ m.}$, $c_p = 3 \cdot 10^{-5} \text{ m.}$). Die $\lambda_a = 290 \text{ m}\mu$ zugeordneten Emissionsspektren von RSA und RSA/AMC stimmen überein; die konstante Differenz der Maximal-Emission bei $350 \text{ m}\mu$ (Abb. 3 b) rührt von der zusätzlichen Absorption der Primär- und Sekundärintensität durch das AMC in der Mischung her. Der gleiche Effekt charakterisiert auch die Emissions-Spektren bei $\lambda_a = 390 \text{ m}\mu$ zwischen p_H 3 und 9 (Abb. 3 a). Bei p_H 1,5 ergibt sich wesentlich verstärkte Fluoreszenz (Kurve 3', Abb. 3 a), die auf Komplexbildung hindeutet.

Die spektroskopischen Resultate werden durch Gelchromatographie (Tab. 2) und Gleichgewichts-Dialyse bestätigt.

Dabei treten im Falle der Dialyse insofern analytische Schwierigkeiten auf, als die Extinktion der notwendig relativ konzentrierten Proteinlösungen ($c_p = 2 \cdot 10^{-4} \text{ m.}$, $c_{\text{AMC}} = 2 \cdot 10^{-5} \text{ m.}$) im Bereich des zur Aufnahme der Dialyse-Kinetik gemessenen AMC-Absorptionsmaximums bei $436 - 440 \text{ m}\mu$ nicht vernachlässigt werden darf:

p_H	2,0	5,0	7,0	9,0
$[\epsilon_{436}^{1\%}]_{\text{RSA}}$	0,190	0,045	0,043	0,058

Hinzukommt, daß die Dialyse zu einer Verdünnung durch Osmose führt, so daß die vor der Dialyse leicht bestimmbare Konzentration c_p nicht als Korrektur verwendet werden kann. Die Schwierigkeit wurde einerseits mit Hilfe von Kontroll-Dialysen ohne AMC umgangen (Elimination von $[\epsilon_{436}]_{\text{RSA}}$ durch Differenzmessung). Andererseits konnte die Extinktionskorrektur im Gleichgewicht aus den obigen Eichdaten und der Biuret-Bestimmung von c_p berechnet werden. Die Ergebnisse sind in Tab. 3 zusammengefaßt.

Die Komplexbildung im stark Sauren erweist sich als rückführbar: Umstellung auf p_H 9 und anschließende Gleichgewichts-Dialyse führt im Fehlerbereich (3%) zum Konzentrationsausgleich des AMC. Erhöhung der Ionenstärke ($I = 2$, NaCl) ist qualitativ ohne Einfluß. Die Komplexbildung bei $p_H < 2$ führt hier zur gemeinsamen Fällung von AMC + RSA, während im übrigen p_H -Bereich Koagulation des Proteins durch Aussalzung oder Erwärmung keine Anreicherung des AMC im Koagulat bewirkt.

3. AMC-Sulphydryl-Wechselwirkungen

Die zuvor diskutierten AMC-Protein-Wechselwirkungen schließen AMC-SH-Wechselwirkungen praktisch aus, da RNase kein Cystein enthält, während im Falle des RSA mit nur 0,7 SH-Gruppen pro Mol.²⁷ im nativen Zustand Wechselwirkungen

p_H	ϵ_p aus Kontroll-Dialyse (90 h)				ϵ_p aus Biuret-Bestimmung (40–120 h)				
	c_p [%]	ϵ_{436}^i	$\Delta\epsilon_{436}$	$\Delta\epsilon/\epsilon^i$ [%]	c_p^a [%]	ϵ_{cp}^b	ϵ_{436}^i	$\Delta\epsilon_{436}$	$\Delta\epsilon/\epsilon^i$ [%]
2,0	0,5	0,20 ₆	0,11 ₇	56	1,07	0,20 ₅	0,725 ^c	0,52	65
	2,0	0,56 ₈	0,49 ₀	86					
5,0	0,5	0,17 ₂	0,00 ₃	< 2	1,02	0,05 ₁	0,035 ^d	-0,016	-4
	2,0	0,17 ₃	0,00 ₂	< 2					
7,0	0,5	0,15 ₄	0,00 ₃	~ 2	1,10	0,05 ₀	0,058 ^d	0,008	2
	2,0	0,51 ₁	0,00 ₃	~ 2					
9,0	0,5	0,13 ₇	0,00 ₂	< 2	1,08	0,06 ₄	0,065 ^d	0,0 1	< 2
	2,0	0,14 ₀	0,00 ₂	< 2					

Tab. 3. Gleichgewichtsdialyse von RSA/AMC in Abhängigkeit vom p_H -Wert. ^a Anfangskonzentration $c_p = 1,4\%$; Hydratation $6,6 \pm 0,5\%$; Endkonzentration $c_{\text{AMC}} = 1,7 \cdot 10^{-5} \text{ m.}$; entsprechend $\epsilon_{436} \sim 0,4$ bei vollständigem Ausgleich; ϵ_{436}^i , Extinktion der Mischung im Innenraum. ^b Fehler $\sim 6\%$; ^c Fehler $\pm 0,012$ ($\sim 2\%$); ^d Fehler $\pm 0,010$ (15–30%).

²⁷ J. F. FOSTER, in: P. W. PUTNAM (Ed.), "The Plasma Proteins", London, New York 1960, Vol. 1, p. 206.

mit großen Molekülen nur bedingt möglich^{28, 29} und mit Hilfe der angewandten experimentellen Methoden kaum nachweisbar sind.

Daher wurden Cystein, Glutathion und einige SH-Enzyme differenzspektroskopisch, gelchromatographisch und in der Ultrazentrifuge untersucht (vgl. auch § 4). Es ergibt sich im Bereich des AMC-Absorptionsmaximums eine schwache Rotverschiebung (Abb. 4), die entsprechend den für die Farbstoffe

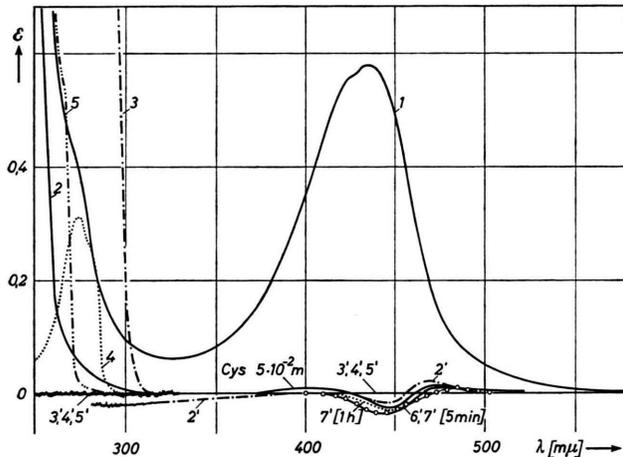


Abb. 4. Absorptions- und Differenzspektren von AMC mit SH-Verbindungen und aromatischen Aminosäuren. Phosphat p_H 7, Schichttiefe 10 mm. 1. AMC ($5 \cdot 10^{-5} \cdot m.$); 2. Cystein ($5 \cdot 10^{-3} \cdot m.$); 3. Try ($2,5 \cdot 10^{-3} \cdot m.$); 4. Tyr ($1,8 \cdot 10^{-3} \cdot m.$); 5. Phe ($2,2 \cdot 10^{-2} \cdot m.$); 6. Glutathion ($5 \cdot 10^{-2} \cdot m.$); 7. ADH ($2 \cdot 10^{-5} \cdot m.$) nach 5' und 1 h. 2'-7' beziehen sich auf die entsprechenden AMC/Aminosäure-Differenzspektren ($c_{AMC} = 5 \cdot 10^{-5} \cdot m.$, übrige c wie bei 2-7).

allein gemessenen Konzentrations-Differenz-Spektren nicht auf Selbst-Assoziation der Chromophore beruhen kann. Im Bereich der aromatischen Aminosäuren wird kein Differenzspektrum beobachtet: $\Delta\epsilon/\epsilon < 2\%$ (Kurve 2', UV). Auch Blindversuche mit Phe, Tyr, Try einerseits und AMC bzw. P II andererseits liefern im UV keine meßbaren Differenzspektren (Kurve 3'-5'). Gelchromatographisch gelingt es nicht, eine SH-spezifische Komplexbildung nachzuweisen (Tab. 2).

In der Ultrazentrifuge wurde densitometrisch die Radialabhängigkeit der Durchlässigkeit von Protein-AMC-Mischungen (RSA, ADH, LDH V, RNase) verglichen mit der der getrennt sedimentierenden

Komponenten¹². Die verwendete Wellenlänge der Lichtquelle im Absorptionsmaximum des AMC ($440 \text{ m}\mu$) sollte dabei für den Fall einer Komplexbildung in der Sedimentationsgrenze des Proteins zu einem Sprung in der Transmission (\sim Schwärzung) führen. Im Bereich kleiner und mittlerer Proteinkonzentrationen erweist sich die Schwärzung als invariant in Bezug auf den Zell-Radius. Dies gilt für RSA auch bei hohen Konzentrationen (4%). Bei RNase ($4\% \cong 3 \cdot 10^{-3} \cdot m.$ in $10^{-4} \cdot m.$ AMC, Phosphat p_H 7 und Acetat p_H 5) ergibt sich densitometrisch ein exponentieller Schwärzungsabfall in der Sedimentationsgrenze, der sich im Falle der Übersichtung mit der AMC-Lösung (als Lösungsmittel) zu einem Peak mit dem Maximum im 50%-Punkt der Sedimentation entwickelt. Für LDH V ($5 \cdot 10^{-5} \cdot m.$, Phosphat p_H 7) resultiert das gleiche Verhalten*. Bei hohen Proteinkonzentrationen gelingt demnach der unmittelbare physikalisch-chemische Nachweis der Komplexbildung. Damit ist (außer für RSA) auch für den Fall niedrigerer Proteinkonzentrationen die Bildung schwacher Komplexe nicht auszuschließen; hinzukommt die Möglichkeit einer Assoziation mit hoher Platzwechsel-Häufigkeit, die sich auf die enzymatische Funktion auswirken könnte.

4. AMC-Enzym-Wechselwirkungen

Die folgenden Versuche beziehen sich auf die enzymatische Funktion (Inhibition oder Stimulierung durch AMC).

Die Mehrkomponenten-Systeme enzymatischer Tests lassen Sekundärreaktionen zu, die durch Blindversuche geprüft wurden. Außer im Falle der RNase wurden die untersuchten Enzyme prinzipiell in Abwesenheit von Koenzym und Substrat mit AMC inkubiert, so daß auftretende zeitabhängige Aktivitätsänderungen nur auf Enzym-AMC-Wechselwirkungen und nicht auf die Komponenten des Testansatzes zurückgeführt werden können.

a) *RNase*. Eine Chromophoren-Wechselwirkung kann wegen des im gesamten Spektralbereich verschwindenden Differenzspektrums ($\Delta\epsilon/\epsilon_{\max} < 1\%$) ausgeschlossen werden (s. o.). Für AMC/s-RNA ($2 \cdot 10^{-5} \cdot m./0,1\%$ s-RNA) ergibt sich auf Grund der schwachen Guanosin-AMC-Wechselwirkung¹¹ $\Delta\epsilon/\epsilon_{436} \cong 5\%$, während ein Einfluß des CCP auf das AMC-Spektrum nicht festgestellt werden kann ($\Delta\epsilon/\epsilon < 2\%$). Die Modifikation des AMC durch McFaydens Reagenz im Falle der

²⁸ R. BENESCH and R. E. BENESCH, *Federat. Proc.* **15**, 218 [1956].

²⁹ J. STAUFF, H. BARTHEL, R. JAENICKE, R. KREKEL u. E. ÜHLEIN, *Koll.-Z.* **178**, 133 [1961].

* Eigensedimentation des AMC kann unter den gegebenen experimentellen Bedingungen nicht nachgewiesen werden (Konstanz von c_{AMC} entlang der Sedimentationskoordinate).

Kalnitsky-Methode (Rotverschiebung um $\sim 25 \text{ m}\mu$) entspricht dem von BROCKMANN¹⁷ bei der Einwirkung von konzentrierter HCl auf AMC beobachteten Verhalten. Sie ist der enzymatischen Reaktion nachgeordnet und daher hier ohne Bedeutung.

Für die RNase-Aktivität ergibt sich im Falle der Kalnitsky-Methode (bei linearer Konzentrations-Abhängigkeit) zwischen den Werten mit und ohne AMC eine konstante Extinktions-Differenz von $\Delta\epsilon = 0,019 \pm 0,003$, die durch die zusätzliche Extinktion des AMC in der Mischung bedingt ist. Korrektur dieses Wertes führt zu übereinstimmenden Aktivitäten in beiden Fällen. Bei der Kunitz-Methode wurde die Unsicherheit der ϵ^∞ -Messung durch die Bestimmung der Anfangs-Neigung im $\epsilon \text{ vs } t$ -Diagramm umgangen, indem die Extinktionsabnahme des Enzym/Substrat-, bzw. Enzym/AMC/Substrat-Gemisches bei $300 \text{ m}\mu$ im Verlauf der ersten 5 min verglichen wurde. Für die Mittelwerte aus je 5 Einzelmessungen bei Inkubationszeiten bis zu 13 h folgt:

ohne AMC:

$$\Delta\epsilon_{300} = 0,144_6 \pm 1\% \\ (2 \text{ ml } 0,1\% \text{ s-RNA, } p_H 5 \\ + 1 \text{ ml } 50 \mu\text{g/ml RNase}),$$

mit AMC:

$$\Delta\epsilon_{300} = 0,146_0 \pm 1,4\% \\ (\text{wie zuvor} + 40 \mu\text{g AMC,} \\ \text{beide bei } 30,0^\circ \text{C}).$$

Die Bestimmung nach Crook mit CCP als Substrat führt zu der Kurve in Abb. 5. Der nach dem kinetischen Ansatz $\ln[1 - [\text{CP}]_t/[\text{CCP}]_0] = -K \cdot t$ postulierte lineare Verlauf im $\log(1 - f\epsilon) \text{ vs } t$ -Dia-

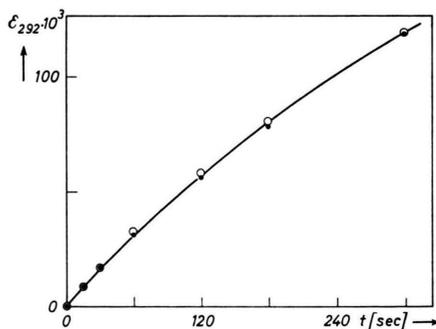


Abb. 5. Einfluß von AMC auf die CCP-Aktivität von RNase (CROOK²⁰), $T = 30^\circ \text{C}$; $0,43 \text{ mg CCP} + 25 \mu\text{g RNase}$ ($+ 40 \mu\text{g AMC}$) in $1,5 \text{ ml Tris } p_H 7,0$; Mittelwerte von je 4 Einzelmessungen.

** Die Abweichung kann auf der Unsicherheit in ϵ^∞ oder auf einer Verunreinigung des CCP mit etwa 5% Cytidylsäure beruhen, die RNase kompetitiv hemmt.

gramm ist dabei nicht exakt realisiert **. Die Anfangs-Neigung als Aktivitäts-proportionale Größe liefert aus je 3 Meßreihen:

ohne AMC:

$$\Delta\epsilon_{292} = 0,110_3 \pm 0,001_1 \\ (2 \text{ ml CCP} = 0,86 \mu\text{g, } p_H 7 \\ + 1 \text{ ml } 50 \mu\text{g/ml RNase}),$$

mit AMC:

$$\Delta\epsilon_{292} = 0,109_2 \pm 0,001_9 \\ (\text{wie zuvor} + 40 \mu\text{g AMC/ml,} \\ 30,0^\circ \text{C}).$$

Eine eventuelle zeitabhängige Aktivitätsänderung kann dabei nicht beobachtet werden; mit dieser Einschränkung stimmt auch die CCP-Aktivität mit und ohne AMC für das angewandte AMC/RNase-Verhältnis überein.

b) SH-Enzyme. Alle untersuchten Dehydrogenasen zeigen in Anwesenheit von AMC eine von der Inkubationszeit abhängige Änderung der enzymatischen Aktivität.

Blindversuche ohne AMC dienen in allen Fällen als 100%-Bezugswert. Es wurde die Abhängigkeit der Aktivitätsänderung vom molaren Verhältnis $q_c = c_{\text{AMC}}/c_{\text{Enzym}}$ (AMC in der Enzymlösung in Abwesenheit von Koenzym und Substrat), von der Inkubationszeit ($t_0 = \text{AMC im Testpuffer}$) und von Zusatzkomponenten zur Inkubationsmischung (Cystein, DNA, RNA) untersucht. Die 3 Zusätze stellen im Falle von LDH Inhibitoren der Pyruvat-Hydrierung dar; die Aktivität im Blindversuch Nucleinsäure/Enzym oder Cystein/Enzym wurde gleich 100% gesetzt. Der Einfluß des AMC auf die Konformation der Enzyme wurde parallel mit Hilfe der Rotationsdispersion gemessen.

Abn. 6 und 7 zeigen die Ergebnisse für ADH, GAPDH und LDH. In allen Fällen resultiert im p_H -Optimum in langsamer Reaktion eine q_c proportionale Desaktivierung, der in einigen Fällen Stimulierung vorausgeht. Die für LDH I und LDH V untersuchte p_H -Abhängigkeit (Abb. 7) ergibt außerhalb des p_H -Optimums Verschwinden der Desaktivierung (LDH V) bzw. schwache Stimulierung (LDH I). Cystein und AMC verhalten sich gegenüber dem Enzym kompetitiv (LDH V); beide Zusätze führen zu einer Hemmung der Aktivität, die bei einem bestimmten Konzentrations-Verhältnis ($5 \cdot 10^{-4} \text{ m. Cys}/10^{-4} \text{ m. AMC, } p_H 7$) zu einem stationären Zustand konstanter (anomal hoher) Restaktivität führt, indem die Cys-AMC-Wechselwirkung die Wechselwirkungen mit dem Enzym überkompensiert. Außerhalb dieses Konzentrationsbereiches oder

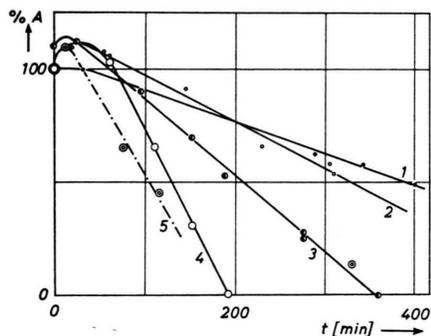


Abb. 6. Desaktivierung von ADH und GAPDH durch AMC (q_c als Parameter. Aktivität ohne AMC \equiv 100%, $T = 25^\circ\text{C}$. Kurven 1-4: ADH [Phosphat pH 7,0] Inkubations-Mischung: 1. $q_c = 2 \cdot 10^{-6}$; 2. $3,3 \cdot 10^{-5}$; 3. $3,3 \cdot 10^{-5}$; 4. $3,2 \cdot 10^{-9}$; 5. $2,7 \cdot 10^{-9}$; 6. $1,5 \cdot 10^{-9}$; 7. $1 \cdot 10^{-4}$; 8. $0,36 \cdot 10^{-9}$; 9. $2,75 \cdot 10^5$. Kurve 5: GAPDH [Tris/HCl pH 7,6] $q_c = \frac{4,5 \cdot 10^{-5}}{0,85 \cdot 10^{-7}} = 530$.

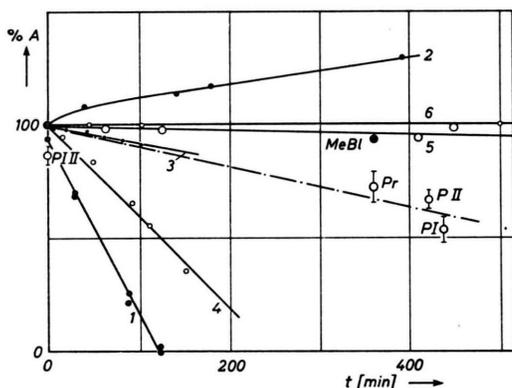


Abb. 7. Desaktivierung von LDH I und LDH V durch AMC und Actinomycin-Analoga (q_c und pH als Parameter). Aktivität ohne AMC \equiv 100%, $T = 25^\circ\text{C}$. LDH I: 1. pH 5, $q_c = 4 \cdot 10^4$; 2. pH 7, $q_c = 4 \cdot 10^4$. LDH V: 3. pH 7, $q_c = 4 \cdot 10^3$; 4. pH 7, $q_c = 3,5 \cdot 10^4$; 5. pH 8, $q_c = 5 \cdot 10^4$; 6. pH 9, $q_c = 5 \cdot 10^4$; Pr: $q_c = 1,7 \cdot 10^4$; MeBl: $q_c = 1,7 \cdot 10^4$; PI: $q_c \approx 3 \cdot 10^2$; P II: $q_c \sim 10$.

bei getrennter Einwirkung tritt die normale Desaktivierungskinetik auf (Abb. 8). Für DNA und s-RNA ergeben sich im Bereich niedriger AMC-Konzentrationen ähnliche Verhältnisse; bei mittleren und hohen q_c führt Zugabe von DNA bzw. s-RNA zu keiner wesentlichen Abnahme der Hemmwirkung des AMC (Abb. 9).

Da die Zeit- und Konzentrations-Abhängigkeit der Desaktivierung (außer im Falle der Cystein- und Nucleinsäure-Blindversuche) im reinen Enzym/AMC Inkubations-System beobachtet wurde, kann die AMC-Wirkung nur auf einer direkten Wechselwir-

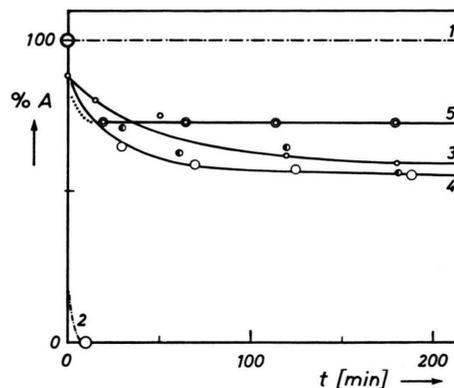


Abb. 8. Einfluß von Cystein auf die Desaktivierung durch AMC: LDH V, Phosphat pH 7,0, $T = 25^\circ\text{C}$. 1. Aktivität ohne Zusatz \equiv 100%; 2. $5 \cdot 10^{-8}m$. Cys/ $3,5 \cdot 10^{-8}m$. LDH ohne und mit $10^{-4}m$. AMC; 3. $2,5 \cdot 10^{-4}m$. Cys/ $3,5 \cdot 10^{-8}m$. LDH/ $1 \cdot 10^{-4}m$. AMC; 4. $5 \cdot 10^{-4}m$. Cys/ $3,5 \cdot 10^{-8}m$. LDH; 5. $5 \cdot 10^{-4}m$. Cys/ $3,5 \cdot 10^{-8}m$. LDH/ $1 \cdot 10^{-4}m$. AMC.

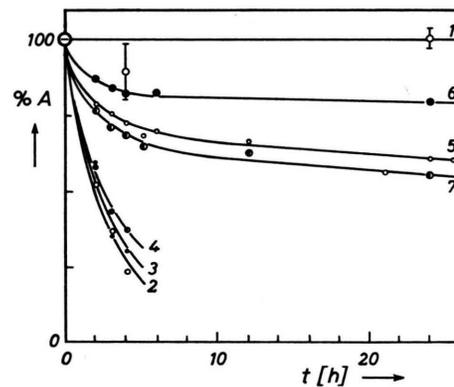


Abb. 9. Einfluß von DNA und RNA auf die Desaktivierung durch AMC: LDH V, Phosphat pH 7,0, $T = 25^\circ\text{C}$. 1. Aktivität ohne Zusatz \equiv 100%; 2. AMC/LDH: $q_c = 2,7 \cdot 10^5$; 3. Inkubations-Mischung: $0,42 \mu\text{g}$ LDH + $100 \mu\text{g}$ AMC + $76 \mu\text{g}$ DNA/ml; 4. $0,42 \mu\text{g}$ LDH + $100 \mu\text{g}$ AMC + $166 \mu\text{g}$ RNA/ml; 5. AMC/LDH: $q_c = 2,7 \cdot 10^4$; 6. $0,42 \mu\text{g}$ LDH + $10 \mu\text{g}$ AMC + $83 \mu\text{g}$ DNA/ml; 7. $1,7 \mu\text{g}$ LDH + $14 \mu\text{g}$ AMC + $33 \mu\text{g}$ RNA/ml; \square LDH/DNA: $1,7 \mu\text{g}$ LDH + $34 \mu\text{g}$ DNA/ml.

kung der beiden Komponenten ohne Beteiligung von Koenzym und Substrat beruhen. Wie Abb. 4 zeigte, scheint sich diese Wechselwirkung in einer geringfügigen spektralen Verschiebung im Bereich der AMC-Bande zu äußern. Zur genaueren Analyse wurden in Analogie zur Untersuchung von Enzym/Koenzym-Wechselwirkungen³⁰ an den Systemen ADH/AMC, LDH I/AMC und LDH V/AMC ORD-Spektren im Wellenlängen-Bereich zwischen 600 und 200 μm gemessen. Es ergibt sich in allen Fällen im Bereich der

³⁰ D. D. ULMER and B. L. VALLEE, *Advances in Enzymol.* **27**, 37 [1965].

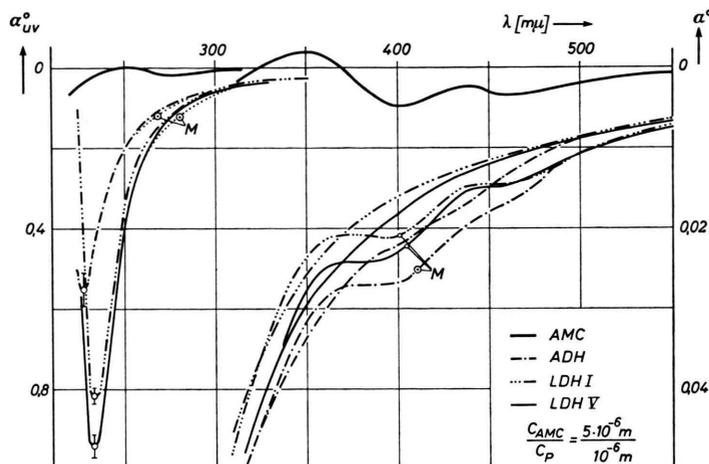


Abb. 10. Rotationsdispersion von AMC und Dehydrogenasen und von AMC/Enzym-Mischungen (M); [Phosphat p_H 7,0], $T=27^\circ C$; Lösungen 30' bei 26000 g zentrifugiert. Cary 60, Schichttiefe 0,1 dm; full range 2,0–0,002°. Für $\lambda < 280 m\mu$ (linke Ordinate) 1:100 verdünnt.

Fehlergrenze ($\Delta\alpha \sim 2-3\%$) Additivität der Inkremente. Zusätzliche ("extrinsic") Cotton-Effekte werden nicht beobachtet (Abb. 10).

Diskussion

Die Ergebnisse schließen unter quasi-physiologischen Bedingungen generell die Bildung stabiler Protein/AMC-Komplexe aus. Sofern Wechselwirkungen eintreten, sind die Assoziate kinetisch zu labil, um gelchromatographisch oder mit Hilfe der Gleichgewichts-Dialyse nachweisbar zu sein. Auch die Methode von Hummel und Dreyer läßt im Bereich der methodischen Fehler keine Komplexbildung erkennen. Erst bei hohen Proteinkonzentrationen gelingt mit Hilfe der Ultrazentrifugation der Nachweis schwacher Komplexbildung. Damit wird zunächst der fluoreszenz-mikroskopische Befund bestätigt, nach dem AMC am Zellkern, nicht aber im Cytoplasma angereichert wird³¹. Für den Fall, daß auch im Bereich niedriger Proteinkonzentrationen bzw. kleiner q_c Komplexbildung eintritt, muß demnach die mittlere Halbwertszeit der Assoziation klein sein. Für die Wirksamkeit als Enzym-Inhibitor oder Aktivator liegt darin – angesichts der hohen Wechselszahlen – keine kritische Einschränkung. Daß derartige Wechselwirkungen existieren, geht aus den Desaktivierungs-Experimenten an SH-Enzymen hervor. Offenbar spielt hierbei der Peptid-Lacton-Ring, der bei den angewandten Konzentrationen in gewissen Bereichen durch Selbst-Assoziation (Dimerisation) des AMC intermolekular abgesättigt ist³², keine wesent-

liche Rolle. Das Auftreten von Differenzspektren im Bereich der charakteristischen Phenoxazon-Absorption und die Desaktivierung durch Actinocin-analoge Derivate allein sprechen vielmehr für eine Chromophor-Wechselwirkung, als deren Partner wegen des Ausbleibens von UV-Differenzspektren und wegen des negativen Befundes bei den AMC/Phe, AMC/Try und AMC/Tyr-Blindversuchen Cystein angenommen werden kann. Für diese Annahme spricht die Ähnlichkeit der Differenzspektren von Cystein bzw. Glutathion/AMC einerseits und ADH/AMC andererseits (Abb. 4), sowie der kompetitive Effekt im Cystein/AMC/Enzym-System. Für die beiden „Nicht-SH-Proteine“ (RSA, RNase) lassen sich bei Ausschluß photodynamischer Reaktionen bzw. chemischer Modifikationen des Farbstoffs keine Änderungen molekularer Parameter feststellen; dies gilt bei Einwirkung des Chromophors ebenso wie für das komplette AMC-Molekül, wenn man von der Wechselwirkung bei extremen Konzentrationen (RNase) oder im stark Sauren absieht. Im p_H -Bereich zwischen p_H 1 und 2 ergibt sich starke Komplexbildung (vgl. S. 478). Dabei sind kovalente Bindungen auf Grund der Reversibilität bei p_H -Umstellung ($p_H \sim 2 \rightarrow p_H$ 9) auszuschließen; desgleichen Ionenpaar-Bindungen, die ungleichsinnige Ladung der Bindungspartner voraussetzen und einen inversen Einfluß der Ionenstärke erwarten ließen. Die experimentellen Indizien im Falle des RSA sprechen für hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Peptidringen des AMC und dem in der offenen F-Form vorliegenden Protein-Molekül²⁷.

³¹ H. u. W. KERSTEN, persönliche Mitteilung.

³² W. MÜLLER u. I. EMME, Z. Naturforsch. **20 b**, 835 [1965].

Auch im Falle der durch AMC-abhängige Desaktivierung gekennzeichneten SH-Enzyme lassen sich — abgesehen von einer minimalen spektralen Verschiebung — keine signifikanten Änderungen physikalisch-chemischer Parameter nachweisen (vgl. besonders die Additivität der ORD-Spektren). Die beobachteten Änderungen der enzymatischen Aktivität beruhen demnach auf sterischen Effekten resp. Konformations-Änderungen, die jenseits der Nachweisgrenze der verfügbaren physikalischen Methoden liegen. Eine nähere Aussage über ihren molekularen Mechanismus ist daher nicht möglich.

In Bezug auf die Ausgangs-Hypothese scheint eine unmittelbare Stimulierung der RNase-Aktivität durch AMC im Sinne der Hypothese b nicht vorzuliegen.

Die Kombination der Methoden von Kalnitsky und Kunitz umfaßt ein Konzentrationsverhältnis RNase/RNA zwischen 1 und 130. Im Falle der Kalnitsky-Methode folgt aus der linearen Konzentrations-Abhängigkeit nullte Ordnung bezüglich des Substrates, d. h. Sättigung des Enzyms mit Substrat. Bei höheren Enzymkonzentrationen (Kunitz) folgt die Kinetik näherungsweise der theoretisch zu erwartenden Reaktion 1. Ordnung bezüglich Enzym und Substrat.

Unabhängig vom verwendeten Substrat und vom Enzym-Substrat-Verhältnis erweist sich AMC im untersuchten Konzentrationsverhältnis ($q_c \sim 8-300$) als ohne Einfluß auf die enzymatische Aktivität. Die Vorstellung einer Enzym-Stimulierung durch allosterischen Einfluß des AMC kann demnach für den Fall der RNase ausgeschlossen werden. Die von HILZ gefundenen Aktivitäts-Erhöhungen können damit nur als Enzym-Induktion durch das Antibiotikum erklärt werden, oder aber als Folge einer Wechselwirkung des AMC mit dem RNase-Inhibitor.

Die direkte Klärung der Alternative scheitert an der Unzugänglichkeit des reinen RNase-Inhibitors.

Da dieser aber über die Sulfhydryl-Funktion mit RNase verknüpft zu sein scheint³³⁻³⁶, kann die beobachtete Wechselwirkung der SH-Enzyme mit AMC als Modellreaktion einer möglichen AMC/Inhibitor-Wechselwirkung diskutiert werden.

Wie an Hand der Differenzspektren und der Konkurrenz-Reaktion von Cystein und AMC bereits ausgeführt wurde, kann der Einfluß des AMC auf die Enzymaktivität als Reaktion mit essentiellen SH-Gruppen verstanden werden. Die Desaktivierung, die auf Grund der Zeitabhängigkeit bei der Inkubation des Enzyms in Abwesenheit des Koenzyms wie des Substrats nur auf einer direkten Enzym/AMC-Wechselwirkung beruhen kann, könnte daher in Parallele gesetzt werden zu den Blockierungsversuchen mit Jodacetat, pCMB o. a. SH-Agenzien, die im Falle des RNase-Inhibitors, entsprechend der starken Zunahme der RNase-Aktivität im Zellhomogenat, zur Dissoziation des Enzym-Inhibitor-Komplexes führen (HILZ³³, ROTH³⁴⁻³⁶).

Die antibiotische Wirkung des AMC wäre danach — als möglicher zusätzlicher Mechanismus — durch Hemmung oder Blockierung des RNase-Inhibitors zu erklären, die gleichbedeutend wäre mit der von HILZ beobachteten RNase-Stimulierung. Der Mechanismus der Wechselwirkung bedarf zu seiner Klärung weiterer Experimente.

Die Arbeit wurde ermöglicht durch großzügige Unterstützung von Seiten der Deutschen Forschungsgemeinschaft und des Verbandes der Chemischen Industrie. Herrn Prof. Dr. E. AUHAGEN, Dr. W. GRUBER und Dr. E. FUCHS danken wir für die freundliche Überlassung von AMC, Enzymen und Phenoxazon-Derivaten. Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. J. STAUFF sowie Prof. Dr. H. HILZ und Dr. E. FUCHS für ihr Interesse an der Arbeit und für kritische Diskussionen.

³³ H. HILZ u. E. J. KLEMPIEN, *Biochem. Z.* **331**, 563 [1959].

³⁴ J. S. ROTH, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **21**, 34 [1956].

³⁵ J. S. ROTH, *J. biol. Chemistry* **231**, 1085 [1958].

³⁶ J. S. ROTH, *Biochem. J.* **101**, 112 [1966].