

werden, daß eine Cytochromoxidasen-Präparation, die chromatographisch aus *Neurospora crassa* gewonnen wurde, aus mehreren Polypeptiden besteht, von denen mindestens eins mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 18000 an den mitochondrialen Ribosomen synthetisiert wird^[1]. Im folgenden werden Versuche beschrieben, die aufzeigen, daß die Kinetik der *In-vivo*-Markierung für die einzelnen Peptide verschieden ist. In exponentiell wachsenden *Neurospora*-Zellen wird durch Zugabe einer kleinen Menge hochmarkierten Leucins eine Pulsmarkierung erzielt. Die Radioaktivität befindet sich nach einigen Minuten vollständig im Protein. In der verwendeten Wachstumphase ist kein Protein-Abbau nachweisbar. Wird eine Kultur mit [¹⁴C]Leucin und nach einer gewissen Zeit mit [³H]Leucin markiert, so wird das ³H/¹⁴C-Verhältnis für alle Proteine nach einer genügend langen Zeit das gleiche sein. Einige Proteine werden Vorstufen für andere Proteine darstellen. In diesem Fall wird die Markierung des Produkts eine Verzögerung aufweisen. Das ³H/¹⁴C-Verhältnis wird unmittelbar nach Zugabe der [³H]Aminosäure niedrig sein und dann allmählich den Wert der anderen Proteine erreichen.

In unseren Versuchen wurde eine exponentiell wachsende *Neurospora*-Kultur mit [¹⁴C]Leucin und nach 45 min mit [³H]Leucin pulsmarkiert. Die eine Hälfte der Kultur wurde 4 min und die andere 90 min nach der ³H-Zugabe geerntet und auf 0°C abgekühlt. In dem länger markierten Anteil war das ³H/¹⁴C-Verhältnis der mitochondrialen Membranproteine 2,1, das der Cytochromoxidasen-Präparation 1,9. Die einzelnen Banden nach elektrophoretischer Auftrennung der Polypeptide zeigten Werte zwischen 1,8 und 2,1.

In dem Anteil der Kultur, der 4 min nach ³H-Zugabe geerntet wurde, war das ³H/¹⁴C-Verhältnis in den mitochondrialen Membranen 1,56, in der Cytochromoxidase dagegen nur 0,36. Die Cytochromoxidase wird also aus Vorstufen gebildet, was auf Grund der Tatsache, daß zwei Proteinsynthesesysteme an ihrem Aufbau beteiligt sind, zu erwarten ist. Trennt man die Peptide dieser Präparation elektrophoretisch, so zeigt sich, daß die Radioaktivität hauptsächlich in der Bande mit dem scheinbaren Molekulargewicht 18000 zu finden ist. Das entsprechende Polypeptid wird also besonders schnell markiert, der Pool der entsprechenden Vorstufe hat einen schnellen Turnover, und muß also klein sein.

Wir vermuten, daß die Synthese dieses Polypeptides an den mitochondrialen Ribosomen der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für den Zusammenbau des Cytochromoxidasen-Proteins darstellt.

¹ Weiss, H., Sebald, W. & Bücher, Th. (1971) *Eur. J. Biochem.* **22**, 19–26.

Adresse: Dipl.-Chem. Andreas J. Schwab, Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie der Universität München, D-8 München 2, Goethestr. 33.

W. Sebald, H. Weiss und G. Jackl

Über die Abhängigkeit des Zusammenbaus der Cytochromoxidase von der Anwesenheit der Produkte der mitochondrialen Proteinsynthese

Cytochromoxidase wurde aus *Neurospora crassa* mit Hilfe einer Chromatographie an Oleoyl-polymethacrylsäure-Harz präpariert^[1] und auf einer Polyacrylamid-Elektrophorese in Natriumdodecylsulfat in sieben Polypeptide aufgetrennt^[2]. Nach einer Pulsmarkierung durch Zugabe von radioaktiven Aminosäuren in Tracermengen wurde die Markierung der einzelnen Polypeptide in Abwesenheit und in Anwesenheit von Chloramphenicol und nach Auswaschen des Inhibitors untersucht.

Chloramphenicol hemmt in einer Konzentration von 4 mg/ml den Aminosäureeinbau in alle Polypeptide zu 90–95%. Nach Auswaschen des Chloramphenicols aus den Zellen und weiterem Wachstum steigt die Markierung der vier Polypeptide mit kleinerem Molekulargewicht auf das fünf- bis zehnfache, während die anderen Polypeptide nur einen kleinen Anstieg in der Markierung zeigen. Demnach werden unter der Wirkung von Chloramphenicol die vier kleinen Polypeptide zwar synthetisiert, aber nicht zu einem fertigen Enzym zusammengebaut.

Chloramphenicol hemmt die mitochondriale, nicht aber die extramitochondriale Proteinsynthese^[3]. Es wird daher gefolgert, daß mindestens ein Produkt der mitochondrialen Proteinsynthese für den Zusammenbau der Cytochromoxidase nötig ist.

Es ist sehr unwahrscheinlich, daß dieses Produkt eine *katalytische* Funktion beim Zusammenbau ausübt, z. B. durch Beteiligung an der Häm- oder Phospholipid-Synthese. Ein solches postuliertes *katalytisches* Protein müßte einen extrem schnellen Turnover aufweisen, da bereits 10 min nach der Zugabe von Chloramphenicol die radioaktiven Aminosäuren in Protein eingebaut sind.

Es wird daher angenommen, daß wenigstens ein Produkt der mitochondrialen Proteinsynthese *stöchiometrisch* am Aufbau der Cytochromoxidase beteiligt ist. Die in Gegenwart von Cycloheximid eingebauten Aminosäuren repräsentieren dieses Produkt^[2].

¹ Weiss, H. & Bücher, Th. (1970) *Eur. J. Biochem.* **17**, 561–567.

² Weiss, H., Sebald, W. & Bücher, Th. (1971) *Eur. J. Biochem.* **22**, 19–26.

³ Lamb, A. J., Clark-Walker, G. D. & Linnane, A. W. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* **161**, 415–427.

Adresse: Dr. Walter Sebald, Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie der Universität München, D-8 München 2, Goethestraße 33.