

Anaplerotische Sequenzen im mikrobiologischen Stoffwechsel [1]

VON PROF. DR. H. L. KORNBERG

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY, UNIVERSITY OF LEICESTER (ENGLAND)

Neben den katabolischen und anabolischen Bahnen, auf welchen den zentralen Bahnen des Stoffwechsels Nahrungsstoffe zugeführt bzw. entzogen werden, gibt es Enzymsequenzen, die für den Ersatz von Zwischenstufen sorgen, die von den zentralen Bahnen während der Biosynthese entfernt wurden. Diese Nachschubbahnen werden als „anaplerotische Sequenzen“ bezeichnet. Die Natur dieser Sequenzen wurde an Mikroorganismen untersucht, die auf C₃- und C₂-Verbindungen wachsen. Bei einer anaplerotischen Sequenz, dem Glyoxylat-Cyclus, dient Phosphoenolpyruvat zur Regelung.

Unter metabolischen Bahnen versteht man die Folgen chemischer, enzymkatalysierter Reaktionen, die es lebenden Organismen ermöglichen, aus ihrer Nahrung Stoffe zum Bau von Zellbestandteilen und Energie zum Unterhalt solcher und anderer endergonischer Prozesse zu ziehen. Man unterteilt diese Reaktionsfolgen in drei Typen. Die katabolischen Bahnen dienen in erster Linie zur Einführung der Nahrungsstoffe in die zentralen energieliefernden Stoffwechselbahnen (die glykolytische Sequenz und den Citronensäure-Cyclus); die anabolischen Bahnen bauen aus den Zwischenstufen dieser Vorgänge die Makromolekeln des Organismus auf. Den Zentralbahnen kommt eine Doppelrolle zu: Ihre Zwischenstufen sind unerlässlich für die Energieversorgung und für den Aufbau der Zellbestandteile. Deshalb wurden diese Bahnen amphibolisch genannt [2].

Diese drei Typen von Stoffwechselprozessen reichen jedoch nicht aus, um das Wachstum von Mikroorganismen zu erklären, die von nur einer Verbindung als einziger Kohlenstoffquelle zu existieren vermögen, wenn der Katabolismus dieser Verbindung nicht unmittelbar eine Zwischenstufe des Citronensäure-Cyclus liefern kann. Hier müssen noch Hilfsreaktionen wirken, welche die beim Wachstum verbrauchten Zwischenstufen nachliefern. In diesem Aufsatz soll die Natur dieser notwendigen Nachfüllbahnen, für die die Bezeichnung anaplerotische Sequenzen [*] vorgeschlagen wird [3], diskutiert werden.

[1] Vorgetragen am 22. Oktober 1964 auf der Herbsttagung der Gesellschaft für Physiologische Chemie in Köln.

[2] B. D. Davis, Cold Spring Harbor Sympos. quantit. Biol. 26, 1 (1961).

1. Anaplerotische Kohlendioxyd-Fixierung

Der Katabolismus von Hexosen, Glycerin oder anderen Pyruvat-Vorstufen liefert C₃-Verbindungen, die in aeroben Organismen über den Citronensäure-Cyclus verbrannt werden. Pyruvat verliert zunächst eines seiner C-Atome und bildet dabei mit Coenzym A das Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA), das nach Kondensation mit Oxalacetat in den Cyclus eintritt. Beim Durchlaufen des Cyclus verliert das Kondensationsprodukt (Citronensäure) zwei weitere C-Atome als CO₂ und bildet Oxalacetat zurück, das dann für die Aufnahme der nächsten C₂-Einheit zur Verfügung steht. In der wachsenden Zelle werden nun aber über anabolische Reaktionsabläufe die Zwischenstufen entfernt, die für die Regeneration des Oxalacetats benötigt werden. Die Zwischenstufen dienen z. B. für die Synthese von Porphyrinen und Aminosäuren der Glutamat- und Aspartat-Familie. Wenn nicht gleichzeitig auch eine anaplerotische Reaktion abläuft, die den Verlust an Zwischenstufen des Citronensäure-Cyclus ausgleicht, müssen Energieversorgung und Biosynthese zum Stillstand kommen. So können z. B. Carboxylierungen eine anaplerotische Funktion erfüllen

[*] Anmerkung des Übersetzers: Von griechisch *ανα* hinauf und *πληροσ* voll, also „auffüllend“. Katabolisch: *καταβαλλειν* einbringen, aufspeichern; anabolisch: *αναβαλλειν* hinaufwerfen, fördern.

[3] Ich danke Prof. A. Wasserstein, der den Schluß zog, daß das Wort anaplerotisch, wenn es noch nicht existierte, erfunden werden sollte. Nachträgliche Prüfung zeigte, daß das Wort im Oxford English Dictionary und im Vokabularium der Pathologie zu finden ist.

[4] W. Seubert u. V. Remberger, Biochem. Z. 334, 401 (1961).

(Abb. 1). In *Pseudomonas* [4] kann Oxalacetat durch direkte Carboxylierung von Pyruvat gebildet werden (Gl. a).

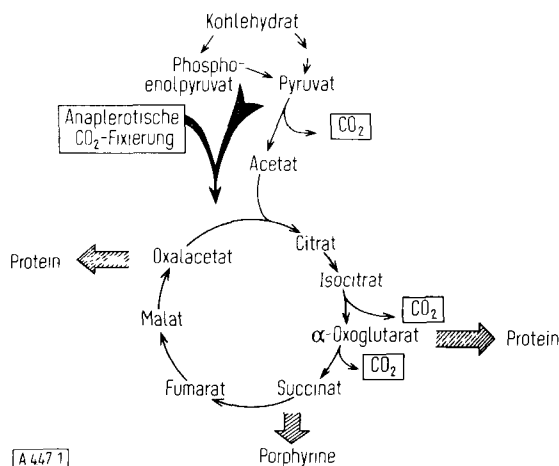
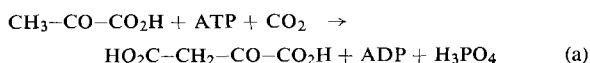
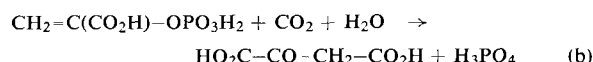
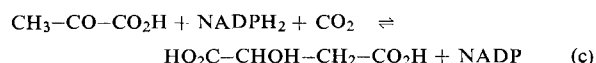


Abb. 1. Anaplerotische Fixierung von Kohlendioxyd. C₄-Verbindungen müssen durch Carboxylierung von C₃-Verbindungen synthetisiert werden (s. schwarzen Pfeil), um die durch Wachstum bedingten Verluste an Zwischenstufen des Citronensäure-Cyclus auszugleichen.

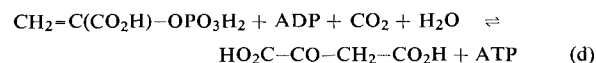
In Enterobacteriaceen scheint die Reaktion (a) nicht abzulaufen [5]. Es werden aber drei andere Enzyme angegriffen, die theoretisch die Bildung von C₄-Säuren durch Carboxylierung von C₃-Verbindungen bewirken könnten: Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (Gl. (b)) [6]:



„malic enzyme“ (Reaktion (c)) [7]:



und an ATP geknüpfte Oxalacetat-Decarboxylase (Gl. (d)) [8]:



Den Träger der anaplerotischen Wirksamkeit konnte man an einer Mutante von *Escherichia coli* ermitteln, der die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase fehlt [5]. Diese Mutante war unfähig, auf Glucose und Ammoniak zu wachsen, vermehrte sich aber, wenn dem Nährmedium irgendeine zum Eintritt in die Zelle befähigte Zwischenstufe des Citronensäure-Cyclus beigegeben wurde. Gewaschene Suspensionen dieser Mutante oxydierten Pyruvat nur bis zum Acetat, das sich anreicherte. Dagegen trat eine vollständige Verbrennung

des Pyruvats ein, wenn katalytische Mengen L-Malat zugesetzt wurden.

Ultraschallextrakte dieser Mutante enthielten ebenso viel von den in Reaktion (c) und (d) wirksamen Enzymen wie Extrakte aus dem Wildstamm, unterschieden sich aber von diesen durch ihre Unfähigkeit, Reaktion (b) zu katalysieren. Damit war gezeigt, daß eine (praktisch irreversible) Phosphoenolpyruvat-Carboxylase für die Bildung von C₄-Verbindungen verantwortlich war. Anaplerotische Enzyme schienen sich danach von anderen Enzymen – obwohl sie ähnliche Reaktionen bewirken – durch ihre andersartigen Funktionen in der Zelle abzuheben.

2. Anaplerotische Sequenzen im Acetat-Stoffwechsel

Mutanten von *E. coli* ohne Phosphoenolpyruvat-Carboxylase können sich von Pyruvat oder seinen Vorstufen nicht ernähren, gedeihen aber ohne weiteres auf Acetat als einziger Kohlenstoffquelle [9]. Das zeigt, daß hier eine weitere anaplerotische Sequenz wirken muß, die Zwischenstufen des Citronensäure-Cyclus entsprechend dem Verbrauch während des Wachstums nachliefert. Diese Sequenz besteht aus zwei Enzymen, deren gemeinsame Wirkung eine Umgehung der decarboxylierenden Schritte des Citronensäure-Cyclus ermöglicht und den Kohlenstoffgehalt der Zelle vermehrt [10] (Abb. 2).

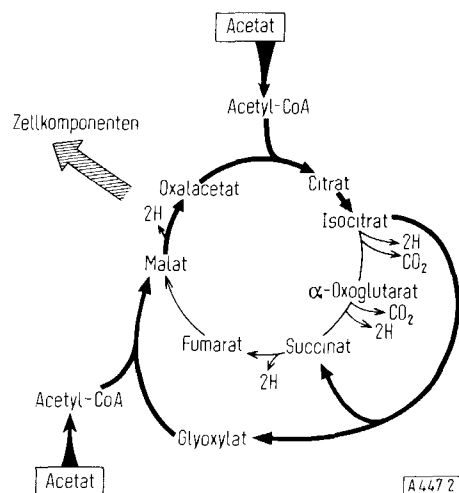


Abb. 2. Citronensäure- und Glyoxylat-Cyclus, dessen anaplerotische Natur durch die dicken Pfeile angedeutet ist.

Das erste dieser beiden Enzyme, Isocitrat-Lyase (Reaktion (e)), katalysiert die Aldolspaltung des threo-D₅-Isocitrats [11] zu Succinat und Glyoxylat [12–14], die zweite, Malat-Synthetase (Reaktion (f)), katalysiert die Kondensation des so gebildeten Glyoxylats mit Acetyl-

[5] J. M. Ashworth, H. L. Kornberg u. R. L. Ward, Biochem. J. 94, 28 P (1965).

[6] R. S. Bandurski u. C. M. Greiner, J. biol. Chemistry 204, 781 (1953).

[7] S. Ochoa, A. H. Mehler u. A. Kornberg, J. biol. Chemistry 174, 979 (1948).

[8] M. F. Utter u. K. Kurahashi, J. biol. Chemistry 207, 787 (1954).

[9] J. M. Ashworth u. H. L. Kornberg, Biochim. biophysica Acta 73, 519 (1963).

[10] Übersicht: H. L. Kornberg, Annu. Rev. Microbiol. 13, 49 (1959); H. L. Kornberg u. S. R. Elsdon, Advances in Enzymol. 23, 401 (1961).

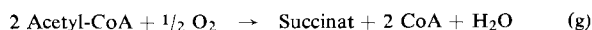
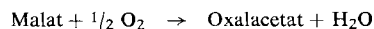
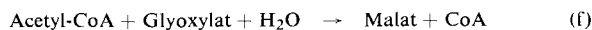
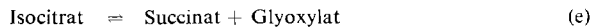
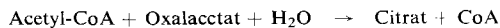
[11] H. B. Vickery, J. biol. Chemistry 237, 1739 (1962).

[12] J. J. R. Campbell, R. A. Smith u. B. A. Eagles, Biochim. biophysica Acta 11, 594 (1953).

[13] J. A. Olson, Nature (London) 174, 695 (1954).

[14] R. A. Smith u. I. C. Gunsalus, J. Amer. chem. Soc. 76, 5002 (1954).

CoA zu Malat [15]. Zusammen mit den von Malat zu Isocitrat führenden Schritten des Citronensäure-Cyclus (welcher natürlich die Energie für das Wachstum auf Acetat liefern muß) kann also diese anaplerotische Bahn den Vorrat des Citronensäure-Cyclus an Zwischenstufen ergänzen, die für biosynthetische Zwecke abgezogen werden. Diese Sequenz (g) (Glyoxylat-Cyclus) bewirkt [16,17] dasselbe wie die oft postulierte „Thunberg-Kondensation“ [18], obwohl sie anders verläuft.



3. Anaplerotische Sequenzen im Glyoxylat-Stoffwechsel

Auch wenn Glyoxylat oder eine seiner Vorstufen als Kohlenstoffquelle für das Wachstum dient, stellt der Citronensäure-Cyclus biosynthetische Zwischenstufen zur Verfügung; er dient aber letzten Endes nicht mehr als Atmungsbahn. Stattdessen wird Glyoxylat über den Dicarbonsäure-Cyclus (Abb. 3) verbrannt, welcher einige Teilprozesse des Citronensäure-Cyclus umfaßt.

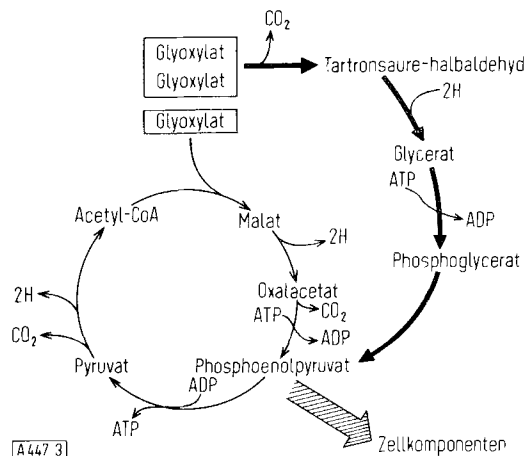
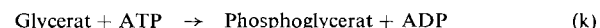
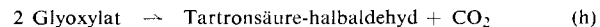


Abb. 3. Der Dicarbonsäure-Cyclus für die Oxydation von Glyoxylat (dünne Pfeile) und die Glycerat-Bahn (dicke Pfeile), welche die Konzentrationen der Zwischenstufen des Dicarbonsäure-Cyclus aufrecht erhält.

In diesem Cyclus wirkt Malat-Synthetase (Reaktion (f)) als Atmungsferment. Sie katalysiert zunächst die Kondensation von Glyoxylat mit Acetyl-CoA zu Malat, das dann über Oxalacetat und Pyruvat weiter oxidiert wird und schließlich das Acceptormolekül für Glyoxylat zurückliefert [19]. Die Ent-

fernung von Ausgangsstoffen der Zellsynthese aus diesem Cyclus (alle Zwischenstufen kommen dafür in Frage) würde die Oxydation zum Stillstand bringen: Eine anaplerotische Sequenz muß daher einspringen, die Glyoxylat in solche Zwischenstufen umwandeln kann. Diese Sequenz besteht aus drei Enzymen [20]. Die Glyoxylat-Carboligase [21] katalysiert die Bildung von Tartronsäure-halbaldehyd aus Glyoxylat, wobei Kohlendioxyd eliminiert wird (Gl. (h)); Tartronsäure-halbaldehyd-Reduktase [22] bewirkt die Reduktion des Halbaldehyds zu Glycerat (Gl. (i)). Schließlich hilft die Glycerat-Kinase [23] bei der Umwandlung des Glycerats in Phosphoglycerat (Gl. (k)), eine Zwischenstufe des amphibolischen Kreislaufs. Die Gesamtreaktion der Glycerat-Bahn [24] (Abb. 3) beschreibt Gleichung (l).



Das Phosphoglycerat wird in Acetyl-CoA umgewandelt, das durch Kondensation mit einer weiteren Molekel des Wachstumssubstrats, Glyoxylat, den Dicarbonsäure-Cyclus wieder auffüllt.

4. Quantitative Aspekte der Anaplerose

Die Beobachtung, daß zellfreie Extrakte von Mikroorganismen viele chemische Reaktionen zu katalysieren vermögen, beweist noch nicht, daß eine Sequenz solcher Reaktionen eine wichtige Rolle als anaplerotische Bahn im Haushalt der Zellen spielt. Dies kann man aber mit auxotrophen Mutanten beweisen. Mutanten von *E. coli* ohne Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (Reaktion (b)) können auf Glucose, Glycerin oder C₃-Säuren erst wachsen, wenn man den Nährmedien eine Zwischenstufe des Citronensäure-Cyclus zuführt, die in die Zellen eindringen kann (vgl. Abschn. 1). Diese Mutanten können sich aber von Acetat oder Glykolat als einziger Kohlenstoffquelle ernähren, da die anaplerotischen Sequenzen, die in diesem Fall wirken (Abb. 2 und 3), die Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat umgehen.

Anderen Mutanten von *E. coli* fehlt die Isocitrat-Lyase (Reaktion (e)); sie können nicht auf Acetat wachsen, während Glucose, Zwischenstufen des Citronensäure-Cyclus und Glykolat eine gute Ernährungsbasis abgeben. Revertanten dieser Mutanten, die die Fähigkeit wiedererlangt haben, auf Acetat zu wachsen, besitzen nachweislich [25] auch wieder eine Isocitrat-Lyase-Aktivität. Schließlich interessiert [26], daß *E. coli* zwei Malat-Synthetasen mit verschiedenen Eigenschaften be-

[15] D. T. O. Wong u. S. J. Ajl, J. Amer. chem. Soc. 78, 3230 (1956).

[16] H. L. Kornberg u. N. B. Madsen, Biochim. biophysica Acta 24, 651 (1957); Biochem. J. 68, 549 (1958).

[17] H. L. Kornberg u. H. A. Krebs, Nature (London) 179, 988 (1957).

[18] T. Thunberg, Skand. Arch. Physiol. 40, 1 (1920).

[19] H. L. Kornberg u. J. R. Sadler, Nature (London) 185, 153 (1960); Biochem. J. 81, 503 (1961).

[20] H. L. Kornberg u. A. M. Gotto, Nature (London) 183, 1791 (1959); Biochem. J. 78, 69 (1961).

[21] G. Krakow, S. S. Barkulis u. J. A. Hayashi, J. Bacteriol. 81, 509 (1961).

[22] A. M. Gotto u. H. L. Kornberg, Biochem. J. 81, 173 (1961).

[23] C. C. Doughty u. J. A. Hayashi, Abstr. 6th Internat. Congr. Biochem. 6, 507 (1964).

[24] H. L. Kornberg, Cold Spring Harbor Sympos. quantit. Biol. 26, 257 (1961).

[25] J. M. Ashworth u. H. L. Kornberg, Biochim. biophysica Acta 89, 383 (1964).

[26] P. Falmagne, E. Vanderwinkel u. J. M. Wiame, Arch. internat. Physiol. Biochim. 71, 813 (1963).

sitzt: Wahrscheinlich spielt eine von ihnen eine katabolische Rolle im Dicarbonsäure-Cyclus, die andere eine anaplerotische im Glyoxylat-Cyclus und in der Glycerat-Bahn.

Andere Hinweise auf die intracelluläre Wirkung der hier besprochenen Enzymsequenzen als Wege des Stoffwechsels kann man aus den Aktivitäten der Schrittmacherenzyme [27] gewinnen, die sich in Extrakten geeignet

Tabelle 1. Aktivitäten einiger anaplerotischer Enzyme in Extrakten aus *E. coli W*. bei 30 °C [24].

Nähr-substrat	Durchschnittliche spezifische Aktivität [μ Mol/Std.·mg Protein]			
	Isocitrat-Lyase (Gl. (e))	Malat-Synthetase (Gl. (f))	Glyoxylat-Carboligase (Gl. (h))	Tartronsäurehalb-aldehyd-Reduktase (Gl. (i))
Lactat	0,5	0,4	1	4
Acetat	15	9	1	4
Glykolat	3	35	28	75

ernährter Kulturen von *E. coli W* messen lassen (Tabelle 1). Die Enzym-Aktivitäten sind mehr als ausreichend, um die Nachlieferung der Zwischenstufen des Citronensäure-Cyclus während des Wachstums zu garantieren. Man gelangt zu dem Schluß, daß die anaplerotischen Sequenzen sowohl notwendig als auch ausreichend für das Wachstum sind.

5. Steuerung anaplerotischer Sequenzen

Aus Tabelle 1 ist zu ersehen, daß die Aktivitäten der Schrittmacherenzyme anaplerotischer Sequenzen vom Stoffwechsel geregelt werden: Man findet ein Enzym nur dann in reichlichen Mengen in den Zellextrakten, wenn es notwendig für das Wachstum auf der angebotenen Kohlenstoffquelle ist. Offensichtlich können Mikroorganismen aus den metabolischen Bahnen, die ihnen genetisch zur Verfügung stehen, die günstigen auswählen [24]. Dieses Phänomen spiegelt sich in der Änderung des Verhältnisses der Aktivität von Malat- zu Citrat-Synthetase wider, die beobachtet wird, wenn auf Lactat gezüchtete *E. coli*-Kulturen auf Lactat, Acetat oder Glykolat weiterwachsen (Abb. 4).

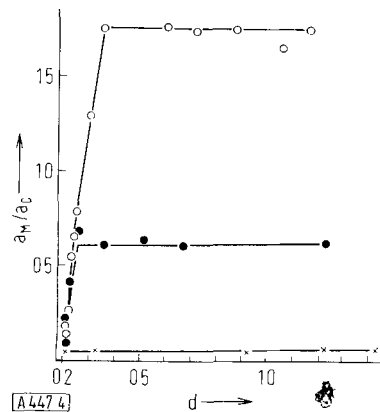


Abb. 4. Änderung des Verhältnisses der Aktivitäten von Malat-(a_M) und Citrat-Synthetase (a_C) in *E. coli W* in Abhängigkeit von der Zelldichte d [mg Trockengewicht/ml]. X: Kultur auf Lactat. ●: Nach Umstellung auf Acetat. ○: Nach Umstellung auf Glykolat.

[27] H. A. Krebs u. H. L. Kornberg, *Ergebn. Physiol., biol. Chem. exp. Pharmacol.* 49, 212 (1957).

Bei diesen Beispielen scheint sich das „richtige“ Aktivitätsverhältnis einzustellen, noch ehe sich die Zahl der Zellen erheblich vergrößert hat. Dieses Verhältnis wird dann während des folgenden Wachstums aufrechterhalten [28]. Das weist darauf hin, daß die Geschwindigkeit, mit der die Schrittmacherenzyme anaplerotischer Sequenzen hergestellt werden, von den Änderungen der intracellulären Konzentrationen spezifischer Metabolite geregelt wird.

6. „Grobregelung“ des Glyoxylat-Cyclus

Die Fähigkeit, bestimmte Stoffwechselbahnen „auszuwählen“, ist weit verbreitet und kommt keineswegs nur den anaplerotischen Sequenzen zu [29]. Bei anaplerotischen Systemen ist die Regelung bisher erst beim Glyoxylat-Cyclus näher untersucht worden. Diese Untersuchung [30] konzentrierte sich auf die Analyse der Faktoren, welche die Bildung von Isocitrat-Lyase in *E. coli W* und den folgenden Varianten regeln: *E. coli M 22-64* (Mutante von *W* ohne Citrat-Synthetase [31]); *E. coli M 191-6* (Mutante von *W* ohne Pyruvat-Oxydase [32]); *E. coli Bm* (Mutante von *B* ohne Phosphoenolpyruvat-Carboxylase [9,33]); *Achromobacter d-15* [34].

a) Einfluß des Nährsubstrats auf die Isocitrat-Lyase-Aktivität

Wurde *E. coli W* auf Acetat gezüchtet, so lag die spezifische Aktivität der Isocitrat-Lyase in den Extrakten bei 15,3 μ Mol produziertes Glyoxylat/mg Protein-Std., also bedeutend höher als bei anderer Ernährung (Abb. 5).

Auch bei den niedrigeren spezifischen Aktivitäten war ein Einfluß des Wachstumssubstrats zu verzeichnen, wie die zwischen 0,25 (für pyruvat-gezüchtete Zellen) und 4,0 (für prolin-gezüchtete Zellen) liegenden Werte erkennen lassen. Die folgenden Zusammenhänge erlauben eine Aussage, welche Phänomene wahrscheinlich diesen Variationen zu Grunde liegen.

1. Die auf verschiedenen Kohlenstoffquellen erreichten Enzym-Aktivitäten scheinen mit der Position dieser Kohlenstoffquelle auf der „metabolischen Landkarte“ (Abb. 5) zusammenzuhängen. Wachstum auf Pyruvat und seinen unmittelbaren Vorläufern führt zu den niedrigsten spezifischen Aktivitäten an Isocitrat-Lyase; die Einschaltung zusätzlicher enzymatischer Reaktionsschritte zwischen das Wachstumssubstrat und den Eintritt in die zu C₃-Verbindungen führenden metabolischen Bahnen bewirkt eine zunehmende Enzym-Produktion.

[28] J. R. Sadler, Dissertation, University of Oxford, 1961.
[29] Neuere Übersicht: H. E. Umbarger, *Science* (Washington) 145, 674 (1964).
[30] H. L. Kornberg, *Colloq. internat. C.N.R.S., Marseille*, 1963 (im Druck).
[31] C. Gilvarg u. B. D. Davis, *J. biol. Chemistry* 222, 307 (1956).
[32] A. D. Gounaris u. L. P. Hager, *J. biol. Chemistry* 236, 1013 (1961).
[33] Geschenk von Prof. L. Gorini u. R. E. Lynch, Boston.
[34] Geschenk von Dr. R. F. Rosenberger, Jerusalem.

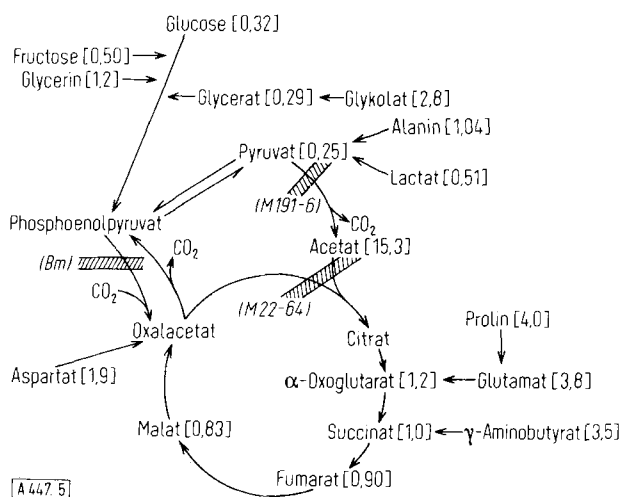


Abb. 5. Einfluß des Nährmediums auf die Aktivität der Isocitrat-Lyase in Extrakten aus *E. coli W*. Die gemessene spezifische Aktivität des Enzyms [μMol produziertes Glyoxylat/ mg Protein-Std.] steht in eckigen Klammern hinter der Bezeichnung des Nährsubstrats. Die schraffierten Balken deuten die Mangelstellen in den Mutanten an.

2. Die Enzym-Aktivitäten, die beim Wachstum auf Kohlenstoffquellen außer Acetat erreicht werden, verhalten sich umgekehrt wie die Wachstumsgeschwindigkeiten auf den betreffenden Nahrungsquellen (Abb. 6).

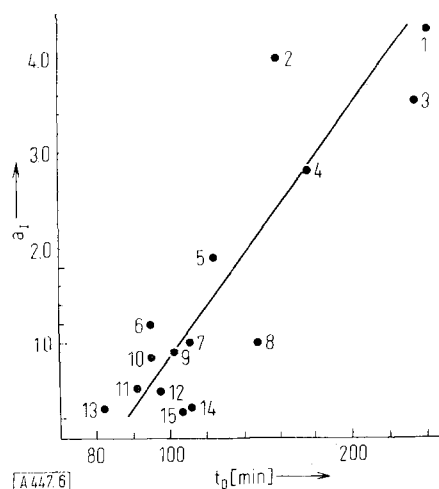


Abb. 6. Beziehung zwischen mittlerer Verdopplungszeit t_D [min] und spezifischer Aktivität an Isocitrat-Lyase in *E. coli W* beim Wachstum auf mehreren Nährsubstraten bei 30°C. 1: Prolin; 2: Glutamat; 3: γ -Aminobutyrat; 4: Glykolat; 5: Aspartat; 6: Glycerin; 7: Succinat; 8: Alanin; 9: Fumarat; 10: Malat; 11: Lactat; 12: Fructose; 13: Glucose; 14: Glycerat; 15: Pyruvat. Ordinate: Spez. Aktivität a_I von Isocitrat-Lyase.

Die höchsten spezifischen Aktivitäten an Isocitrat-Lyase wurden während des Wachstums auf Prolin, Glutamat, γ -Aminobutyrat und Glykolat gemessen; diese Substanzen müssen in einem oder mehreren Reaktionsschritten auf den Eintritt in den Embden-Meyerhof-Weg oder den Citronensäure-Cyclus vorbereitet werden. Auf diesen Substanzen vollzieht sich das Wachstum langsamer als auf den Zwischenstufen der metabolischen Hauptbahnen, in die sie erst umgewandelt werden müssen.

Diese Beobachtungen stützen die Auffassung, daß die Bildungsgeschwindigkeit der Isocitrat-Lyase von den intracellulären Konzentrationen der Metabolite, die dabei als Hemmstoffe wirken, dirigiert wird. Einer der Faktoren, die diese Konzentrationen bestimmen, scheint die

Eintrittsgeschwindigkeit des Wachstumssubstrats in die metabolischen Hauptbahnen zu sein, die somit die Wachstumsgeschwindigkeit des Organismus beeinflusst.

b) Die Rolle des Acetats bei der Bildung der Isocitrat-Lyase

Die hohe Geschwindigkeit der Enzymsynthese während des Wachstums auf Acetat-Basis erscheint als Ausnahme zu den in Abschnitt 6a angegebenen Regeln 1 und 2. Man könnte vermuten, daß Acetat oder Acetyl-CoA die Bildung von Isocitrat-Lyase unmittelbar induzieren. Einige Argumente sprechen aber gegen eine solche Annahme [35]. Wurde *E. coli* in Medien gezogen, welche eine der in Abb. 6 aufgeführten Kohlenstoffquellen (außer Prolin, Glutamat und γ -Aminobutyrat) enthielten, so fand man gleiche spezifische Aktivitäten an Isocitrat-Lyase, ob nun die Lösungen nur 20 mMol Nährsubstrat/l enthielten oder ob noch zusätzlich Acetat in der gleichen Konzentration vorhanden war. Das zeigte, daß Acetat in Gegenwart dieser Substanzen die Bildung von Isocitrat-Lyase nicht induzieren kann. Bei Prolin, Glutamat oder γ -Aminobutyrat als Nährsubstraten regte eine Acetat-Zugabe zum Medium aber die Synthese von Isocitrat-Lyase an. Diese quasi-induzierende Wirkung des Acetats [36], die hier zu 2- bis 3-mal höheren Isocitrat-Lyase-Pegeln als bei Abwesenheit von Acetat führte, zeigte sich auch, wenn man Ammoniumchlorid aus dem Nährmedium wegließ und die Aminosäuren somit nicht nur als Hauptkohlenstoffquelle, sondern auch als ausschließliche Stickstoffquelle fungierten.

Während aber der Wildstamm *E. coli W* auf Prolin + Acetat, Glutamat + Acetat oder γ -Aminobutyrat + Acetat schneller Isocitrat-Lyase bildete als beim Wachstum ohne Acetat, wurde die Enzymbildungsgeschwindigkeit in der Mutante M 22-64 (der die Fähigkeit, aus Oxalacetat und Acetyl-CoA Citrat zu bilden, abgeht; vgl. Abb. 5) durch Acetat nicht beeinflusst (Abb. 7).

Da bekannt ist, daß diese Mutante noch Acetat zu Acetyl-CoA aktivieren kann [19,31], spricht der fehlende Einfluß des Acetats auf die Bildungsgeschwindigkeit der

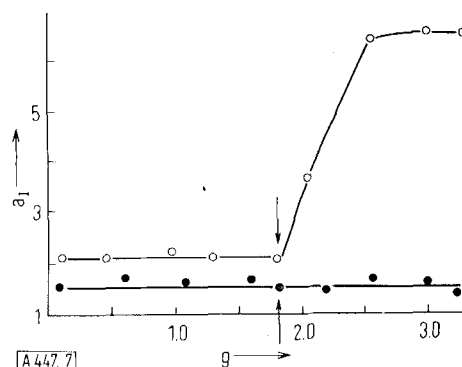


Abb. 7. Einfluß der Zugabe von 20 mM Acetat auf die Bildung von Isocitrat-Lyase durch *E. coli W* (○) und seine Mutante M 22-64 (●) während des Wachstums auf Prolin bei 30°C. Das Acetat wurde an den durch Pfeile markierten Stellen beigelegt. a_I : spez. Aktivität der Isocitrat-Lyase; g = Zahl der Generationen.

[35] H. L. Kornberg, Biochim. biophysica Acta 73, 517 (1963).
[36] R. F. Rosenberger, Biochim. biophysica Acta 64, 168 (1962).

Isocitrat-Lyase in *M 22-64* gegen eine direkte Induktion der Enzymbildung sowohl durch Acetat als auch durch Acetyl-CoA. Dagegen ließen sich die Beobachtungen durch die Vorstellung deuten, daß die unterschiedlichen Geschwindigkeiten der Lyase-Bildung durch die intracellulären Konzentrationen eines (oder mehrerer) dem Oxalacetat nahestehenden Hemmstoffs hervorgerufen werden. Im Wildstamm könnte Acetat diese Konzentrationen durch Citrat-Bildung verringern, nicht dagegen in der Mutante *M 22-64*.

Man zog *M 22-64* auf einem Medium mit 20 mM Glykolat + 2 mM Glutamat und fand in der Wirkung von Acetat auf dieses System eine weitere Bestätigung der Ansicht. Bei Abwesenheit von Acetat wurde die Isocitrat-Lyase mit einer spezifischen Aktivität von 2,2 $\mu\text{Mol/Std.}\cdot\text{mg Protein}$ produziert, die dann über nahezu 2 Generationen konstant blieb. Fügt man nun 50 mM Acetat zu, so wurde die Bildung von Isocitrat-Lyase nicht nur nicht angeregt, sondern ihre spezifische Aktivität wurde stark herabgesetzt, ohne daß das Wachstum verzögert worden wäre. Das gleiche ergab sich, wenn man die auf Glykolat/Glutamat bezogene Mutante in ein frisches Medium übertrug, das diese Kohlenstoffquellen und zusätzlich Acetat (50 mM) enthielt; beim weiteren Wachstum der Organismen fiel der Gehalt an Isocitrat-Lyase auf weniger als 60% des ursprünglichen Wertes (Zellwachstum in Abwesenheit von Acetat) und änderte sich anschließend nicht mehr (Abb. 8).

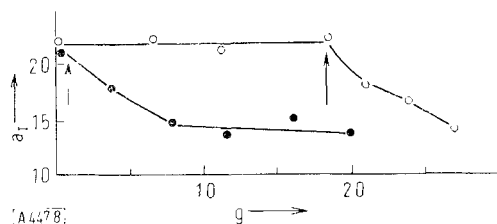


Abb. 8. Einfluß der Zugabe von Acetat auf die Bildung von Isocitrat-Lyase durch *M 22-64*. (○): Wachstum in 20 mM Glykolat + 2 mM Glutamat. (●): Gleiches Medium + 50 mM Acetat. Die Experimente wurden mit Glykolat/Glutamat-ernährten Zellen begonnen. Acetat wurde an den durch Pfeile markierten Stellen zugegeben. a_1 : spez. Aktivität der Isocitrat-Lyase; g = Zahl der Generationen.

Da Acetat in den Stoffwechsel der glykolat-ernährten Mutante eintreten kann [19], indem es sich mit Glyoxylat zu Malat verbindet (vgl. Abb. 3), ist die Hemmung der Isocitrat-Lyase-Bildung möglicherweise einem oder mehreren aus Malat entstehenden Stoffen zuzuschreiben.

c) Mögliche Identität des für die Isocitrat-Lyase-Hemmung verantwortlichen Metaboliten

Die Mutante *M 191-6*, die Pyruvat nicht oxydieren kann, zeigte auf Glykolat + Acetat eine spezifische Aktivität der Isocitrat-Lyase, die weniger als 30% der von *M 22-64* (Abb. 8) und weniger als 15% der des Wildstammes von *E. coli* (Abb. 5) unter gleichen Bedingungen betrug. Wenn überhaupt ein bestimmtes Stoffwechselprodukt als spezifischer Hemmstoff der Isocitrat-Lyase fungierte, so war hiernach zu vermuten, daß einer Zwi-

schenstufe des Citronensäure-Cyclus diese Rolle nicht zukam. Weitere Indizien wiesen in die gleiche Richtung:

1. Die auf Acetat angewiesene Mutante *M 191-6* wurde mit 20 mM Glykolat + 10 mM Acetat ernährt. Nachdem die Zelldichte um etwa 0,1 mg Trockengewicht/ml zugenommen hatte, wurden Proben der Kultur für den Enzymtest abgezweigt und das entnommene Volumen durch frische Nährlösung ersetzt. Unter diesen Bedingungen wuchs also der Organismus mit konstanter Geschwindigkeit und bei etwa konstanter Zelldichte. Auch die Isocitrat-Lyase wurde mit konstanter, wenn auch ungewöhnlich niedriger spez. Aktivität (0,3 $\mu\text{Mol/Std.}\cdot\text{mg Protein}$) produziert. Ersetzte man die entfernte Flüssigkeit durch gleiche Volumina einer (acetatfreien) 20 mM Glykolat-Lösung, so führte die Erschöpfung des Mediums an Acetat zu einer Verlangsamung des Wachstums und schließlich zum Stillstand.

Erwartungsgemäß – die metabolische Fehlstelle dieser Mutante ist bekannt – war das verzögerte Wachstum von einer Anreicherung an Pyruvat (als 2,4-Dinitrophenylhydrazon identifiziert) begleitet. Die spezifische Aktivität der Isocitrat-Lyase in zeitlich aufeinanderfolgenden Proben dieser Kultur fiel auf sehr niedrige Werte ab; dies bedeutet wohl, daß die Überproduktion katabolischer Substanzen aus Glykolat die Konzentrationen an Stoffwechselprodukten innerhalb der Zelle auf Werte steigen ließ, bei denen die Isocitrat-Lyase-Synthese praktisch aufhörte. Da *M 191-6* nicht zur Oxydation von Pyruvat zu Acetat befähigt ist und somit ohne Acetat-Zusatz kein Malat aus Glyoxylat bilden kann, tritt die ungewöhnlich starke Hemmung der Isocitrat-Lyase-Synthese unter Bedingungen ein, die durch eine Überproduktion an C_3 -Verbindungen ohne vorherige Malat-Bildung gekennzeichnet sind.

2. Zugabe von Pyruvat zu einer Kultur von *M 22-64* auf Prolin als einziger Kohlenstoffquelle verzögerte das Wachstum nicht, senkte die Bildungsgeschwindigkeit der Isocitrat-Lyase aber erheblich (Abb. 9). Man darf wohl annehmen, daß Pyruvat-Zusatz die intracellulären Konzentrationen an C_4 -Dicarbonsäuren und an C_3 -Verbindungen in dieser Mutante erhöht, nicht aber die anderer Zwischenstufen des Citronensäure-Cyclus.

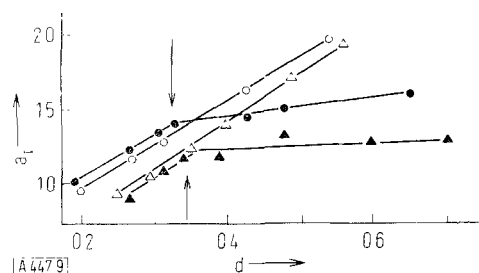


Abb. 9. Einfluß von Pyruvat auf die Bildung von Isocitrat-Lyase in *M 22-64* (Δ , \blacktriangle) und *Bm* (\circ , \bullet) bei 30°C. Die ausgefüllten Symbole kennzeichnen Kulturen, die an den durch Pfeile markierten Stellen auf 5 mM Pyruvat gebracht wurden; Wachstum auf Prolin. a_1 : Isocitrat-Lyase-Aktivität (spez. Aktivität:Zelldichte); d = Zelldichte [mg Trockengewicht/ml].

3. Setzte man einer Kultur der Mutante *Bm* auf Prolin als einziger Kohlenstoff- und Stickstoffquelle Pyruvat zu, so wurde die Wachstumsgeschwindigkeit nicht herabgesetzt, aber die Bildung von Isocitrat-Lyase nahm stark ab (Abb. 9). Diese Mutante kann zwar Pyruvat oxydieren, aber keine C_4 -Dicarbonsäuren erzeugen.

4. Wurde Mutante *Bm* auf 50 mM Acetat + 5 mM Glutamat als einziger Stickstoffquelle gezogen, und fügte man einer solchen Kultur Pyruvat zu, so sank die ursprünglich hohe Bildungsgeschwindigkeit der Isocitrat-Lyase um 85%, wobei aber diesmal die Wachstumsgeschwindigkeit unverändert blieb. Der enzymhemmende Effekt hielt an, bis alles Pyruvat aufgebraucht war (Abb. 10). Da nur Glutamat als Stickstoffquelle zur Verfügung stand und keine α -Oxosäuren im Medium zu entdecken waren, mußte die Aminosäure für das

Wachstum herangezogen worden sein, ohne daß es dabei zu einer intracellulären Anreicherung von Repressorsubstanzen kam. Dagegen waren Repressorsubstanzen aus Pyruvat gebildet worden, obwohl die Mutante daraus keine C₄-Dicarbonsäuren aufbauen kann.

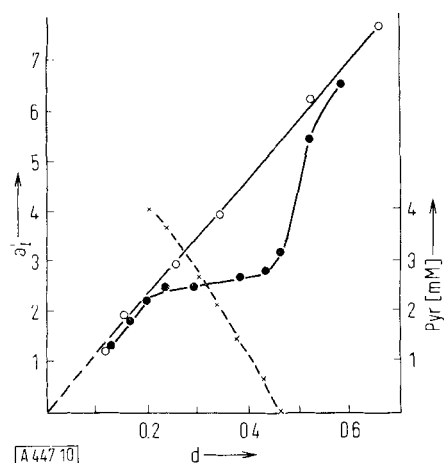


Abb. 10. Einfluß von Pyruvat auf die Bildung von Isocitrat-Lyase in *Bm* (Nährmedium 50 mM Acetat + 5 mM Glutamat, keine weitere Stickstoffquelle) bei 30 °C. (●): Kultur mit Pyruvat-Zusatz, 4 mM. Die abnehmende Pyruvat-Konzentration (rechte Ordinate) ist durch X gekennzeichnet; (○): Kein Pyruvat-Zusatz. a_i : Isocitrat-Lyase-Aktivität (spez. Aktivität·Zelldichte); d = Zelldichte [mg Trockengewicht/ml].

5. Eine *Bm*-Kultur (50 mM Acetat + 5 mM Aspartat als einzige Stickstoffquelle) wuchs nach Zusatz von Pyruvat mit unverminderter Geschwindigkeit weiter; dagegen wurde die ursprüngliche hohe Bildungsgeschwindigkeit der Isocitrat-Lyase drastisch gesenkt (Abb. 11). Auch hier muß die Aminosäure für das Wachstum herangezogen worden sein und muß dem Organismus Oxalacetat zur Verfügung gestellt haben, aber zu langsam, um die Bildungsgeschwindigkeit der Isocitrat-Lyase merklich zu senken. Die Enzymbildung wurde auch hier durch Pyruvat-Zusatz unterdrückt, obwohl *E. coli Bm* aus Pyruvat keine C₄-Verbindungen aufbauen kann.

Aus den fünf Beobachtungen läßt sich schließen: Wenn überhaupt ein bestimmtes Stoffwechselprodukt der spezifische Hemmstoff für die Enzymbildung sein soll, so

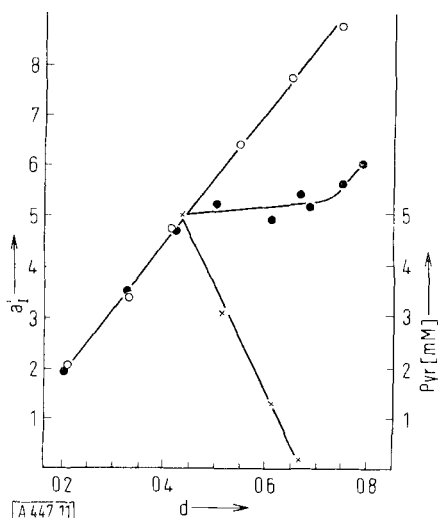
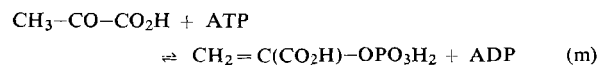


Abb. 11. Einfluß von Pyruvat auf die Bildung von Isocitrat-Lyase in der Mutante *Bm* (Züchtung in 50 mM Acetat + 5 mM Aspartat ohne andere Stickstoffquellen) bei Zusatz von Pyruvat (bei 30 °C). (●): Kultur mit Zusatz von 5 mM Pyruvat. (X): Abnahme der Pyruvat-Konzentration (rechte Ordinate). (○): Kein Pyruvat-Zusatz. a_i : Isocitrat-Lyase-Aktivität (spez. Aktivität·Zelldichte); d = Zelldichte [mg Trockengewicht/ml].

kann es keine C₄-Dicarbonsäure (Ergebnisse mit *Bm*), keine Zwischenstufe des Citronensäure-Cyclus (Ergebnisse mit *M* 22–64) und kein Oxydationsprodukt von Pyruvat (Ergebnisse mit *M* 191–6) sein. Der Metabolit muß daher entweder Pyruvat selbst oder ein in nahem Zusammenhang mit Pyruvat und Oxalacetat stehender Stoff sein.

Wenn man annehmen darf, daß die gleichen Faktoren die Bildung der Isocitrat-Lyase in *E. coli* und anderen Mikroorganismen regeln (Resultate an Bakterien [10], Schimmelpilzen [37,38], Algen [39,40] und Protozoen [41] scheinen diese Annahme zu bestätigen), so gelangt man zu der Folgerung, daß Pyruvat wahrscheinlich nicht der hemmende Metabolit ist. Den wichtigsten Hinweis liefern Untersuchungen an *Achromobacter d-15*. Diese Organismen haben die ungewöhnliche Eigenschaft, nach Wachstum in Gegenwart von Pyruvat, Lactat oder Alanin als einziger Kohlenstoffquelle hohe spez. Aktivitäten (6–8 μ Mol/Std.mg Protein) an Isocitrat-Lyase in den zellfreien Extrakten zu zeigen; ähnlich anderen Organismen bilden sie aber nur geringe Mengen des Enzyms, wenn sie auf Zwischenstufen des Citronensäure-Cyclus gezüchtet werden. Ungewöhnlich ist auch, daß sich *Achromobacter d-15* von Glucose, Glycerin oder Glykolat nicht ernähren kann, wahrscheinlich [42], weil Pyruvat-Kinase fehlt und Reaktion (m) deshalb nicht ablaufen kann:



Die Konsequenz davon ist, daß alle Katabolite ausgeschaltet werden, die diesen wesentlichen Schritt des Embden-Meyerhof-Weges passieren müssen, um in den Citronensäure-Cyclus zu kommen. Es ist daher möglich, daß die hohen Isocitrat-Lyase-Werte in Extrakten von pyruvat-ernährtem *Achromobacter d-15* symptomatisch für den Ausfall von Reaktion (m) sind. Nun kann aber Phosphoenolpyruvat nicht nur gemäß (m) aus Pyruvat [42a], sondern auch nach (d) aus Oxalacetat gebildet werden. Da man sofort zu niedrigen Isocitrat-Lyase-Werten kommt, wenn der Organismus auf Zwischenstufen des Citronensäure-Cyclus gezüchtet wird, muß man schließen, daß Phosphoenolpyruvat einer der hemmenden und regelnden Metabolite bei der Synthese von Isocitrat-Lyase ist.

Wahrscheinlich übt mehr als ein Stoffwechselprodukt eine solche Regelwirkung aus. Hinweise hierauf liefert die Untersuchung der Mutante *BmR*, die sich von *Bm* ableitet, aber im Gegensatz dazu auf Glycerin, Glucose und Pyruvat gezüchtet werden kann. Dieses Wachstums-

- [37] J. F. Collins u. H. L. Kornberg, *Biochem. J.* 77, 430 (1960).
- [38] W. S. Wegener u. A. H. Romano, *J. Bacteriol.* 87, 156 (1964).
- [39] L. C. Harrop u. H. L. Kornberg, *Biochem. J.* 88, 42 P (1963).
- [40] A. G. Calley u. D. Lloyd, *Biochem. J.* 90, 483 (1964).
- [41] J. F. Hogg u. H. L. Kornberg, *Biochem. J.* 86, 461 (1963).
- [42] H. L. Kornberg, J. Dennis u. E. M. Wilson, *Biochem. J.* 92, 55 P (1964).
- [42a] Anmerkung bei der Korrektur: Daß Phosphoenolpyruvat nach Reaktion (m) aus Pyruvat gebildet wird, ist unwahrscheinlich, weil *E. coli* ein PEP-Synthetase-System besitzt, welches mit Pyruvat-Kinase nicht identisch ist. — Vgl. R. A. Cooper u. H. L. Kornberg, *Biochim. biophysica Acta* 104, 618 (1965).

Tabelle 2. Einfluß der Ernährung auf die Isocitrat-Lyase-Aktivität im Wildstamm *E. coli* und der Mutante *BmR* bei 30 °C.

Nährsubstrat	Spezifische Aktivität von Isocitrat-Lyase [$\mu\text{Mol/Std.}\cdot\text{mg Protein}$] in	
	<i>E. coli</i>	<i>BmR</i>
Glucose	0,3	10
Lactat	0,5	20
Malat	0,8	27
Succinat	1,0	34
Acetat	15	50

bild kann jedoch nicht auf eine Rückbildung der Fähigkeit, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase zu synthetisieren, zurückgeführt werden. Vielmehr ist eine zweite Mutation an einem Gen eingetreten, das die Synthese der Isocitrat-Lyase steuert (Tabelle 2). Entsprechendes ist von der Mutante *E. coli K 12* berichtet worden [43].

Wie Tabelle 2 zeigt, ist die differentielle Bildungsgeschwindigkeit von Isocitrat-Lyase in der Mutante *BmR* während des Wachstums auf Glucose über 30-mal so groß wie im Wildstamm von *E. coli*. Trotz der Gegenwart von Substanzen, die die Lyase-Bildung im Wildstamm und in der Mutante *Bm* stark hemmen, kann die Mutante *BmR* C₄-Säuren auf dem Umweg über den Glyoxylat-Cyclus synthetisieren. Bemerkenswert ist dabei, daß die von *BmR*-Zellen aus verschiedenen Nährmedien gewonnenen Extrakte eine ganz ähnliche Abhängigkeit der Isocitrat-Lyase-Aktivität von der mittleren, auf diesem Nährsubstrat beobachteten Verdoppelungszeit ergeben wie die Zellen des Wildstammes (vgl. Abb. 6). Das würde heißen, daß *BmR* der Hemmung durch ein Stoffwechselprodukt entkommen ist, aber noch der Hemmung eines anderen unterliegt [44].

7. „Feinregelung“ des Glyoxylat-Cyclus

Durch Änderung der differentiellen Bildungsgeschwindigkeit der Isocitrat-Lyase wird zwar eine Regelung des Glyoxylat-Cyclus erreicht, doch nur eine relativ grobe. Untersuchungen an *E. coli B* und der Mutante *Bm* legen nahe, daß durch Änderung der intracellulären Phosphoenolpyruvat-Spiegel eine zusätzliche Feinregelung herbeigeführt werden kann, weil Phosphoenolpyruvat auch die Aktivität der Isocitrat-Lyase kräftig zu hemmen vermag [9]. Pyruvat-Zusatz zu Kulturen von *E. coli B* in einem Acetat-Medium oder von *Bm* in einem aus Acetat + Glutamat oder Aspartat bestehenden Medium verminderte die Wachstumsgeschwindigkeit nicht. Wurde jedoch *Bm* ohne diese Aminosäuren in einem Acetat-Medium gezogen, so beendete der Pyruvat-Zusatz das Wachstum sofort. Erst nachdem alles Pyruvat verbraucht war, wuchs die Kultur weiter (Abb. 12).

Man sieht, daß Pyruvat oder ein Produkt seines Stoffwechsels die Bildung von C₄-Verbindungen aus Acetat blockiert. Da in der Mutante *Bm* eine andere Synthese solcher Verbindungen, z. B. durch Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat, nicht möglich ist, hört das Wachstum auf. (Gleichzeitig ist die Unfähigkeit von Pyruvat,

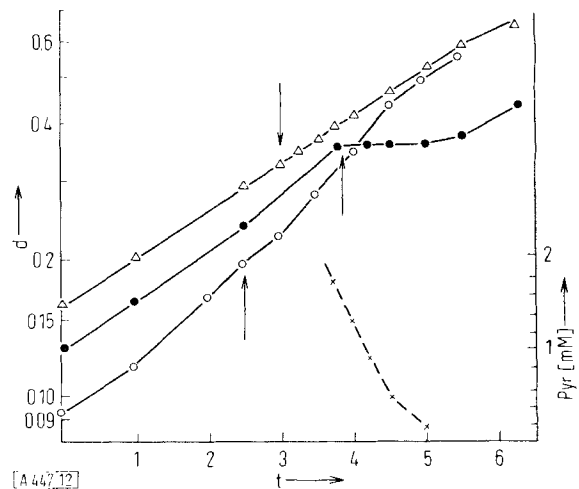


Abb. 12. Einfluß des Pyruvat-Zusatzes auf das Wachstum von *E. coli B* und *Bm* bei 30 °C. (Δ): Stamm *B* in 50 mM Acetat. (\bullet): Mutante *Bm* in 50 mM Acetat. (\circ): Mutante *Bm* in 50 mM Acetat + 5 mM Glutamat. Natriumpyruvat wurde an den durch Pfeile markierten Stellen zugegeben. X stellt die zu Kurve \bullet gehörende Abnahme der Pyruvat-Konzentration (in mM) (rechte Ordinate) von diesem Punkt aus dar. d = Zelldichte [mg Trockengewicht/ml]; t = Zeit [Std.].

das Wachstum der in Acetat + Glutamat oder Aspartat gezüchteten Mutante zu blockieren, ein Beweis, daß die Zellen aus diesen Aminosäuren tatsächlich C₄-Dicarbonsäuren herstellen, vgl. Abb. 10 und 11). Da *Bm* trotz des Wachstumsstillstands Pyruvat verbraucht und gewaschene Suspensionen der auf Acetat gezüchteten Mutante Pyruvat zu oxydieren vermögen, kann die Hemmung durch Pyruvat nicht an irgendeiner Teilreaktion des Citronensäure-Cyclus ansetzen, vielmehr wirkt sie wohl auf ein Schlüsselenzym des Glyoxylat-Cyclus. Die folgenden Beobachtungen wiesen auf die Wirkungsweise des hemmenden Stoffes hin. Weder 0,1 mM noch 1 mM Pyruvat hemmte merklich die Aktivität von Isocitrat-Lyase in zellfreien Extrakten der auf Acetat gezüchteten Mutante *Bm*. Phosphoenolpyruvat dagegen hemmte die Wirkung dieses Enzyms sehr kräftig; in einer Konzentration von $1\cdot 10^{-4}$ M verminderte es die Glyoxylat-Bildung durch Spaltung von Isocitrat (2 mM) auf 58%, in $1\cdot 10^{-3}$ M Konzentration auf 11% des ohne Pyruvat gemessenen Wertes. Die quantitative spektrophotometrische Untersuchung [45] zeigte, daß weder Malat- noch Citrat-Synthetase von 0,1 mM Phosphoenolpyruvat inhibiert wurden, aber daß Isocitrat-Lyase einer nicht konkurrierenden Hemmung unterlag (mit $K_i = 1,3\cdot 10^{-4}$ M). Andere Zwischenstufen des Embden-Meyerhof-Weges, wie 2-Phosphoglycerat, 3-Phosphoglycerat sowie Hexosemono- und -diphosphate wirkten in Konzentrationen von 1 mM nicht inhibierend. Ähnliche Ergebnisse wurden an den Extrakten aus *E. coli W*, *Chlorella vulgaris*, Stamm Brannon Nr. 1 und *Achromobacter d-15* gewonnen.

Schlußbemerkungen

Der Weg der Nahrungsstoffe, deren freigesetzte Energie zur Biosynthese dient, kann nur beschrieben werden, wenn man annimmt, daß in den Zellen spezielle metabolische Bahnen vorhanden sind, die ausschließlich den Citronensäure-Cyclus und andere amphibolische Vor-

[43] E. Vanderwinkel, P. Liard, F. Ramos u. J. M. Wiame, Biochem. biophysic. Res. Commun. 12, 157 (1963).

[44] Diese Beobachtungen entsprechen der Feststellung, daß Mutanten, denen das i-Gen für β -Galaktosidase fehlt, dennoch einer katabolischen Hemmung unterliegen; vgl. J. Mandelstam, Biochem. J. 82, 489 (1962); W. F. Loomis u. B. Magasanik, J. molecular Biol. 8, 417 (1964).

[45] G. H. Dixon u. H. L. Kornberg, Biochem. J. 72, 3P (1959).

Tabelle 3. Katabolische und anaplerotische Sequenzen in *E. coli*.

Kohlenstoffquelle	Katabolische Bahn	Anaplerotische Sequenz
Glucose, Glycerin oder C ₃ -Verbindungen	Citronensäure- Cyclus	Phosphoenolpyruvat- Carboxylase
Acetat	Citronensäure- Cyclus	Glyoxylat-Cyclus
Glykolat	Dicarbonsäure- Cyclus	Glycerat-Bahn

gänge aufrechterhalten. Diese Annahmen wurden in der vorliegenden Arbeit bewiesen. Die Hilfsmechanismen („anaplerotische Sequenzen“) verfügen über eigene biologische Spezies als Schlüsselenzyme, selbst dann, wenn in der Zelle andere Enzyme vorkommen, die ähnliche oder sogar die gleichen Umsetzungen herbeiführen. Anaplerotische Enzyme sind für das Zellwachstum auf der Basis von C₃- und C₂-Verbindungen nötig (Tabelle 3).

Man weiß noch wenig über die Faktoren, welche die anaplerotischen Sequenzen steuern. Beim Glyoxylat-

Cyclus wirken diese Faktoren auf mindestens zwei Ebenen:

Über eine „Feinregelung“, die durch die Hemmung der Aktivität eines Schrittmacherenzym zustande kommt, und eine „Grobregelung“, die auf der Hemmung der Synthese dieses Enzyms beruht. Die Daten weisen ferner daraufhin, daß beide Arten der Regelung auf der Änderung des intracellulären Phosphoenolpyruvat-Gehalts beruhen. Da Phosphoenolpyruvat eine Zwischenstufe bei der Bildung zahlreicher Zellkomponenten (wie aromatischer Aminosäuren, Pentoseeinheiten von Nucleinsäuren und anderer Kohlenhydrate) aus Acetat ist, andererseits das Hauptprodukt des Glyoxylat-Cyclus darstellt, ist diese Regelung ein weiteres Beispiel eines Rückkopplungsmechanismus [29], der es den Mikroorganismen ermöglicht, sich Umweltseinflüssen empfindlich und wirksam anzupassen.

Eingegangen am 24. November 1964 [A 447]

Übersetzt von Dr. H. F. Ebel, Heidelberg

Neuere Methoden der präparativen organischen Chemie IV [*]

Neue Reaktionen von Phosphinalkylenen und ihre präparativen Möglichkeiten

I. Der Säure-Base-Charakter von Phosphoniumsalzen und Phosphinalkylenen [**]

VON PROF. DR. H. J. BESTMANN

INSTITUT FÜR ORGANISCHE CHEMIE DER UNIVERSITÄT ERLANGEN-NÜRNBERG

Phosphoniumsalze können als Brönstedtsche Säuren, Phosphinalkylene als korrespondierende Basen aufgefaßt werden. Zwischen beiden stellt sich ein Gleichgewicht ein. Diese „Umylidierung“ ermöglicht die Darstellung von Phosphoniumsalzen und Phosphinalkylenen. – Außerdem werden andere Methoden zur Gewinnung von Vertretern der beiden Stoffklassen angegeben.

Inhaltsübersicht:

Teil I. Der Säure-Base-Charakter von Phosphoniumsalzen und Phosphinalkylenen

- A. Einleitung
- B. Phosphoniumsalze und Phosphinalkylene als korrespondierende Säure-Base-Paare
- C. Die Umylidierung
- D. Zur Darstellung von Phosphoniumsalzen und Phosphinalkylenen
 1. Phosphoniumsalze
 2. Phosphinalkylene

Teil II. Phosphinalkylene und Halogenverbindungen

- A. Einleitung
- B. Reaktionen, die unter Umylidierung verlaufen
 1. C-Acylierung von Phosphinalkylenen. Aufbau von Ketonen
 2. Reaktion von Phosphinalkylenen mit Chlorameisensäureestern. Aufbau von Carbonsäuren
 3. Reaktion mit organischen Halogeniden und Carbonsäureestern
 4. Reaktion von Phosphinalkylenen mit Halogenen

C. Reaktionen, die unter β -Eliminierung verlaufen

1. Zum Mechanismus des Hofmann-Abbaus quartärer Phosphoniumsalze
2. Synthese von β -Acylacrylsäureestern
3. Synthese α,β -ungesättigter Carbonsäureester

D. Reaktionen, die unter γ -Eliminierung verlaufen

1. Umsetzung von Triphenylphosphinalkylenen mit Chlorameisensäureestern. Darstellung von Polycarbonsäureestern
2. Synthese von Allencarbonsäureestern

E. Reaktionen von Phosphinalkylenen und Halogenverbindungen im Molverhältnis 1:1

1. Aufbau α -verzweigter β -Ketosäureester
2. Reaktionen mit Diazonium-, Nitrilium- und Oxoniumsalzen

F. Intramolekulare Ringschlüsse

1. Monocyclische Verbindungen
2. Polycyclische Verbindungen