

weitesten scheinen die Parallelen bei den magnetischen Eigenschaften der Mischkristalle zu gehen, welche bei der Substitution des Mangans durch Lithium in MnSe entstehen [43, 44].

Für uns ist zunächst wesentlich, daß man die in der Einleitung genannten Gesichtspunkte bei den neuen

[43] R. R. Heikes, T. R. McGuire u. R. J. Happel, Physic. Rev. 121, 703 (1961).

[44] S. J. Pickart, R. Nathans u. G. Shirane, Physic. Rev. 121, 707 (1961).

Stickstoff-, Phosphor- und Arsenverbindungen konsequent verfolgen konnte. Wir erwarten, daß die eingehendere Untersuchung bei einigen Phasen interessante bindungstheoretische Aufschlüsse geben wird.

*Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie für die Förderung dieser Untersuchungen.*

Eingegangen am 7. November 1967 [A 628]

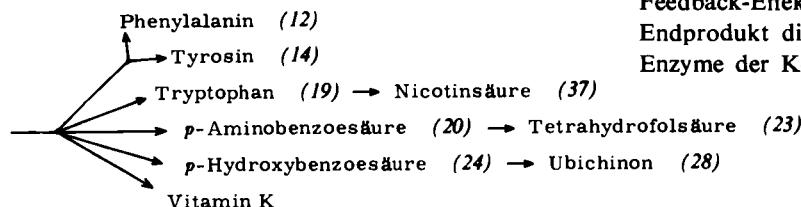
## Die Biosynthese aromatischer Aminosäuren und deren Regulation

von F. LINGENS [1]

*Mikroorganismen synthetisieren die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan sowie die mit ihnen verknüpften Verbindungen p-Aminobenzoësäure, Tetrahydrofolsäure, p-Hydroxybenzoësäure, Ubichinon, Vitamin K und Nicotinsäure auf einem mehrfach verzweigten Weg, der über Shikimisäure führt. Der Ablauf der Biosynthese wird nicht in allen untersuchten Organismen einheitlich reguliert. Wichtig für die Regulation sind die folgenden Eigenschaften der beteiligten Enzyme: Spaltbarkeit in Isoenzyme, Hemmbarkeit, Aktivierung, Repression und Induktion.*

### 1. Einleitung

Die Synthese aromatischer Aminosäuren in der belebten Natur geht von Zwischenprodukten des Kohlenhydratstoffwechsels aus. Vom Grundzweig („Shikimisäure-Weg“) dieser mehrfach verzweigten Biosynthesekette leiten sich Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und p-Aminobenzoësäure ab. Tryptophan dient bei einigen Mikroorganismen, bei Säugetieren und auch beim Menschen u.a. als Ausgangsmaterial für die Biosynthese der Nicotinsäure; p-Aminobenzoësäure wird zur Biosynthese der Tetrahydrofolsäure verwendet. In jüngster Zeit ist erkannt worden, daß sich auch Vitamin K und Ubichinon vom Grundzweig der Aromaten-Biosynthese ableiten (s. Schema 1). Wie viele Biosyntheseketten unterliegt auch die hier beschriebene einer biochemischen Regulation.



Schema 1. Übersicht über die Biosyntheseketten.

Die im folgenden geschilderten Untersuchungen sind im wesentlichen an den Enterobacteriaceen *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes* und *Salmonella typhimurium*, an Hefen (besonders *Saccharomyces cerevisiae*) und am Schimmelpilz *Neurospora crassa* ausgeführt worden. Es ist dabei zu berücksichtigen, daß man Erkenntnisse an einem einzigen Organismus, besonders Erkenntnisse über die Regulation biosynthetischer Vorgänge, nicht ohne weiteres verallgemeinern darf. So gibt es z.B. für die Biosynthese der Nicotinsäure in Mikroorganismen mehrere Möglichkeiten; manche Mikroorganismen können weder Ubichinon noch Vitamin K produzieren.

Unter der Regulation der Biosyntheseketten versteht man die Tatsache, daß die Endprodukte nur dem jeweiligen Bedarf entsprechend gebildet werden. Das Endprodukt einer Synthesekette kann z.B. die Aktivität des ersten Enzyms der Kette hemmen (negativer Feedback-Effekt). Außerdem ist es möglich, daß das Endprodukt die Biosynthese einiger oder sämtlicher Enzyme der Kette hemmt (Repression).

Bei einer verzweigten Biosynthesekette kommt hinzu, daß neben der Regulierung jeder einzelnen Kette auch der Grundzweig reguliert werden sollte. Das kann z.B. so geschehen, daß der erste Schritt des Grundzweiges von Isoenzymen katalysiert wird, von denen jedes durch ein hinter der Verzweigung liegendes Endprodukt spezifisch gehemmt wird (s. Schema 1). Es könnte

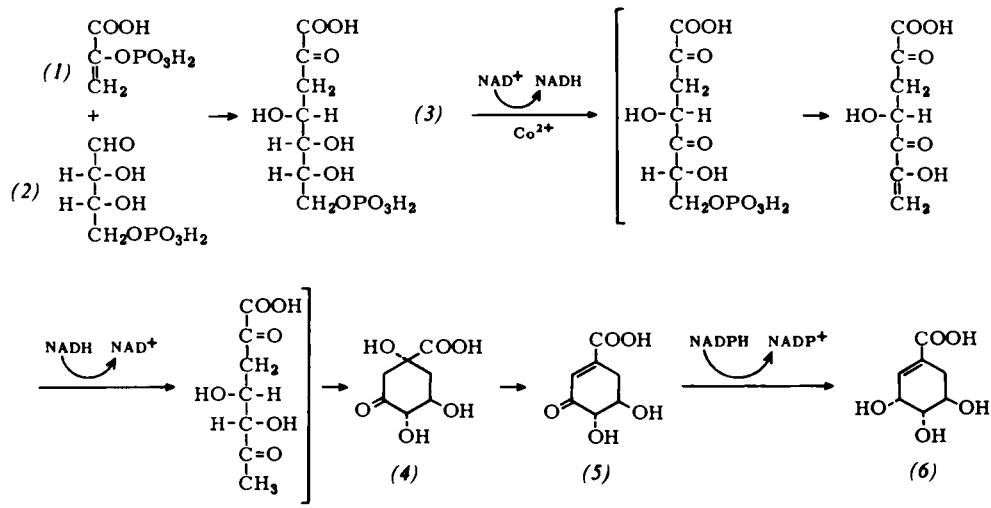
[\*] Prof. Dr. F. Lingens  
Chemisches Institut der Universität  
74 Tübingen, Wilhelmstraße 33  
Neue Anschrift: Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie der Universität Hohenheim  
7 Stuttgart-Hohenheim, Kirchnerstraße 30

aber auch nur ein einziges Enzym vorliegen, das erst durch die gleichzeitige Anwesenheit aller Endprodukte gehemmt wird (multivalenter negativer Feedback-Effekt). Eine Regulation im Grundzweig kann ferner so erzielt werden, daß die Biosynthese der Enzyme erst durch die gleichzeitige Gegenwart von Endprodukten mehrerer Ketten unterdrückt wird (multivalente Repression). Es sollte zweckmäßig sein, wenn bei einer verzweigten Biosynthesekette das Endprodukt einer Kette nicht nur das erste Enzym seiner Kette hemmt, sondern gleichzeitig auch das erste Enzym einer anderen Kette aktiviert. Das Endprodukt einer Synthesekette kann also gegebenenfalls nicht nur die Enzyme der eigenen Kette reprimieren, sondern auch die Enzyme anderer Ketten induzieren. Auch multivalente

zweigten Biosynthesekette notwendig. In einem Medium, dem das Endprodukt des unterbrochenen Synthesewegs fehlt, können biochemische Mangelmutanten nicht wachsen. Die Synthesekette bleibt jedoch bis zum genetischen Block funktionsfähig; die dabei angehäufte Zwischenverbindung wird häufig in das Medium abgegeben (Akkumulation).

## 2. Der Grundzweig der Biosynthese aromatischer Aminosäuren

Im ersten Schritt des Grundzweiges werden Phosphoenolbrenztraubensäure (1) und Erythrose-4-phosphat (2) zu 2-Keto-3-desoxy-araboheptonsäure-7-phosphat (3) kondensiert [2] (s. Schema 2).



Schema 2. Biosynthesegrundzweig bis zur Shikimisäure (6).

Induktion ist beobachtet worden, bei der erst durch die gleichzeitige Gabe von Endprodukten mehrerer Ketten ein Enzym einer anderen Kette induziert wird.

Für die Untersuchung der biosynthetischen Vorgänge wurden vielfach biochemische Mangelmutanten mit geeignetem genetischem Block in der Synthesekette eingesetzt. (Methodische Erläuterungen siehe [1].)

### 1.1. Definitionen

Ein Organismus, der mit  $\text{CO}_2$  als anorganischer Kohlenstoffverbindung wachsen kann, wird als autotroph bezeichnet; ist eine organische Kohlenstoffquelle erforderlich, so spricht man von Heterotrophie. Viele Mikroorganismen in der Natur („Wildstämme“ = prototrophe Formen) synthetisieren sämtliche lebensnotwendigen Verbindungen aus einer einfachen organischen Kohlenstoffquelle und anorganischen Salzen. Bei einem prototrophen Organismus kann man durch Einwirkung eines Mutagens die DNS so verändern, daß ein Enzym ausfällt (genetische Blockierung durch Mutation). Die resultierenden „auxotrophen“ Formen (biochemische Mangelmutanten) benötigen zum Wachstum zusätzlich das Endprodukt oder eine hinter dem „genetischen Block“ liegende Verbindung der Synthesekette. Eine einzige Mutation kann auch zu einem polyauxotrophen Organismus führen. Bei diesem sind zum Wachstum gleichzeitig mehrere Endprodukte als Folge der Mutation im Grundzweig einer ver-

Das Enzym, das diese Reaktion katalysiert (DAHP-Synthetase = PODH-Lyase: E.C.4.1.2.15), benötigt weder ein Metallion noch einen anderen Cofaktor [3]. Spätere Untersuchungen haben gezeigt, daß in *E. coli* und vielen anderen Mikroorganismen für diesen Schritt Isoenzyme vorhanden sind, die alle die gleiche Reaktion auslösen und in charakteristischer Weise durch die Endprodukte der verzweigten Biosynthesekette gehemmt werden. Im zweiten Schritt der Biosynthese wird (3) in 5,5-Didehydrochinasäure (4) umgewandelt [4].

Dieser Ringschluß vollzieht sich vermutlich über drei Zwischenprodukte mit je sieben C-Atomen. Die Oxidation an C-5 von (3) erleichtert die Eliminierung von Phosphat im nächsten Schritt. Daran schließt sich die Reduktion dieser Carbonylgruppe zur Hydroxygruppe, wobei die ursprüngliche Konfiguration von (3) wiederhergestellt wird. Das resultierende 2,6-Diketon cyclisiert zu (4) [5].

Im dritten Schritt wird (4) zur 5,5-Dihydroshikimisäure (5) dehydratisiert. Das Enzym für die Wasserabspaltung ist hoch spezifisch; Chinasäure wurde von

[1] H. Hellmann u. F. Lingens, Angew. Chem. 73, 107 (1961).

[2] P. R. Srinivasan, M. Katagiri u. D. B. Sprinson, J. Amer. chem. Soc. 77, 4943 (1955).

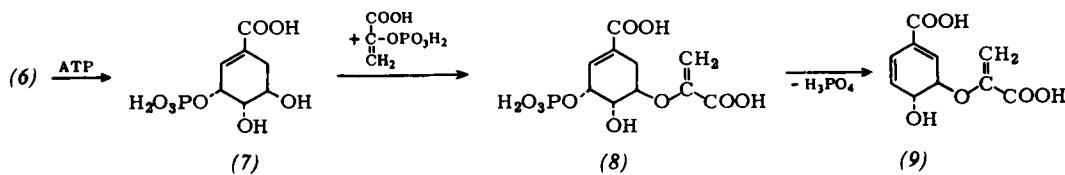
[3] P. R. Srinivasan u. D. B. Sprinson, J. biol. Chemistry 234, 713 (1959).

[4] U. Weiss, B. D. Davis u. E. S. Mingoli, J. Amer. chem. Soc. 75, 5572 (1953).

[5] P. R. Srinivasan, J. Rothschild u. D. B. Sprinson, J. biol. Chemistry 238, 3176 (1963).

ihm nicht zu Shikimisäure dehydratisiert [6]. (5) wird dann zur Shikimisäure (6) reduziert (die Reduktase benötigt als Cofaktor NADPH [7]).

Eine polyauxotrophe *E. coli*-Mutante, deren Bedarf an Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, *p*-Aminobenzoësäure und *p*-Hydroxybenzoësäure allein durch Shikimisäure ersetzt werden konnte, gibt an das Medium unter Mangelbedingungen (5) ab<sup>[8]</sup>; dieser Mutante fehlt die Reduktase zur Umwandlung von (5) in (6). Bei polyauxotrophen Mutanten von



### Schema 3. Biosynthesegrundzweig bis zur Chorismsinsäure (9).

*E. coli*<sup>[9, 10]</sup> und *S. cerevisiae*<sup>[11]</sup>, die mit Shikimisäure nicht zu wachsen vermögen, ließ sich Shikimisäure als Akkumulat nachweisen.

Shikimisäure wird mit ATP zum 5-Phosphorsäure-ester (7)<sup>[12, 13]</sup> phosphoryliert (s. Schema 3). Daran schließt sich eine Umsetzung mit Phosphoenolbrenztraubensäure zum 3-Enolbrenztraubensäureäther von Shikimisäure-5-phosphat (8)<sup>[14]</sup>. Die Aufklärung der Struktur dieses Zwischenproduktes war besonders schwierig, da es labil ist und von entsprechend blockierten Mutanten in entphosphorylierter Form abgegeben wird.

Phosphorsäureester sind häufig nicht als Akkumulate nachzuweisen, da sie als ionisierte Verbindungen die Zellwand nicht passieren<sup>[15]</sup>. Außerdem werden Phosphorsäureester besonders leicht durch „unspezifische“ Phosphatasen angegriffen und sind deshalb nicht zu finden.

Die Verbindung (8) wurde längere Zeit irrtümlich als das Produkt in der Verzweigungsstelle der Biosynthese angesehen, von der die Synthesen von Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan usw. ausgehen. Auffallend war allerdings, daß (8) als Akkumulat (in entphosphorylierter Form) nur bei polyauxotrophen Mutanten aufrat. Von einem Produkt des Verzweigungspunktes ist dagegen zu fordern, daß es als Akkumulat bei solchen Mutanten auftaucht, die im ersten Schritt nach der Verzweigung in einer der möglichen Biosyntheseketten blockiert sind. Verschiedenartige Mutanten sollten also das gleiche Akkumulat liefern. Das konnte tatsächlich für verschiedene *S. cerevisiae*-Mutanten nachgewiesen werden, die das echte Verzweigungsprodukt akkumulierten<sup>[16]</sup>. Dieses Folgeprodukt von (8) wurde erstmals bei einer *A. aerogenes*-Mutante nachgewiesen, die durch mehrfache Mutationen auf die gleichzeitige Zufuhr von Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan angewiesen war<sup>[17, 18]</sup>.

[6] S. Mitsuhashi u. B. D. Davis, Biochim. biophysica Acta 15, 54 (1954).

[7] H. Yaniv u. C. Gilvarg, J. biol. Chemistry 233, 787 (1955).

[8] *J. J. Salamon u. B. D. Davis, J. Amer. chem. Soc.* 75, 5567 (1953).

[9] B. D. Davis, J. biol. Chemistry, 191, 315 (1951).

[10] H. T. Shigeura, II, D. B. Sprinson, *Federat. Proc.* 11, 286 (1952).

[10] H. T. Shigeura u. D. B. Sprinson, *Federat. Proc.* 11, 280 (1952).  
 [11] E. Lingens u. H. Hellmann, *Z. Naturforsch.* 13b, 462 (1958).

[12] R. D. Davis u. E. S. Miragli, J. Bacteriol. 66, 129 (1953).

[12] B. D. Davis u. E. S. Mingeoli, J. Bacteriol. 66, 129 (1953).  
[13] K. W. 12. u. E. S. Mingeoli, J. Bacteriol. 78, 2824 (1955).

[13] U. Weiß u. E. S. Mingioli, J. Amer. chem. Soc. 78, 2894 (1956).

[14] I. G. Levin u. D. B. Sprinson, Biochem. biophysic. F. Commun., 3, 157 (1960); J. biol. Chemistry, 239, 1142 (1964).

[15] D. B. Davis, *Arch. Biochem. Biophys.* **78**, 497 (1958).

[15] B. D. Davis, Arch. Biochem. Biophysics 78, 497 (1958).

[16] F. Lingens u. W. Goebel, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 343, 1 (1965).

[12] M. J. Gibson and E. Gibson, Biochem. J.,

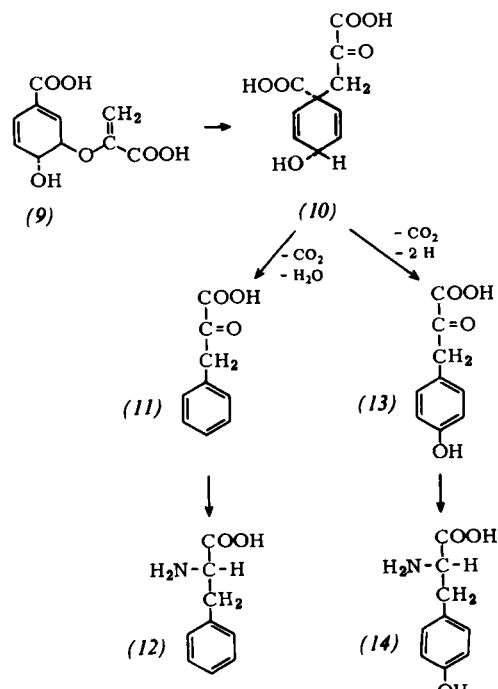
Schließlich spaltet (8) Phosphorsäure ab, und es entsteht der 3-Enolbrenztraubensäureäther der *trans*-3,4-Dihydroprotocatechusäure (9) (Choraminsäure,  $\gamma$ -ωρισμος = Trennung) [19].

Mit der Chorisminsäure schließt der Grundzweig der Biosynthese aromatischer Aminosäuren ab. Im folgenden werden nun die fünf sich daraus ableitenden Syntheseketten besprochen.

Es sei noch angemerkt, daß auch die Chinasäure als Glied der Grundkette vermutet wurde. Diese Annahme stützte sich auf die Beobachtung der Wuchsstoffwirksamkeit dieser Verbindung bei *Aerobacter aerogenes*. Dieser Organismus ist in der Lage, aus Chinasäure 5,5-Didehydrochinasäure zu synthetisieren [20, 21]. Alle anderen bisher untersuchten Mikroorganismen besitzen diese Fähigkeit nicht. Chinasäure ist aber kein Glied der Biosynthesekette, sondern dient *A. aerogenes* als zusätzliche Quelle für 5,5-Didehydrochinasäure.

### 3. Die Biosynthese von Phenylalanin und Tyrosin

Die gemeinsame Ausgangsverbindung für die Biosynthese von Phenylalanin und Tyrosin ist die enzymatisch aus Chorisminsäure (9) gebildete Prephensäure (10)<sup>122</sup>. Die Umwandlung von (9) in (10), die durch



Scheme 4. Biosynthesewege des Phenylalanins (12) und Tyrosins (14)

[19] H. Morell, M. J. Clark, P. F. Knowles u. D. B. Sprinson, *J. Biol. Chemistry* 242, 82 (1967).

[20] B. D. Davis *u. U. Weiß*, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. 220, 1 (1953).

[21] S. Mitsuhashi u. B. D. Davis, Biochim. biophysica Acta 15, 268 (1951).

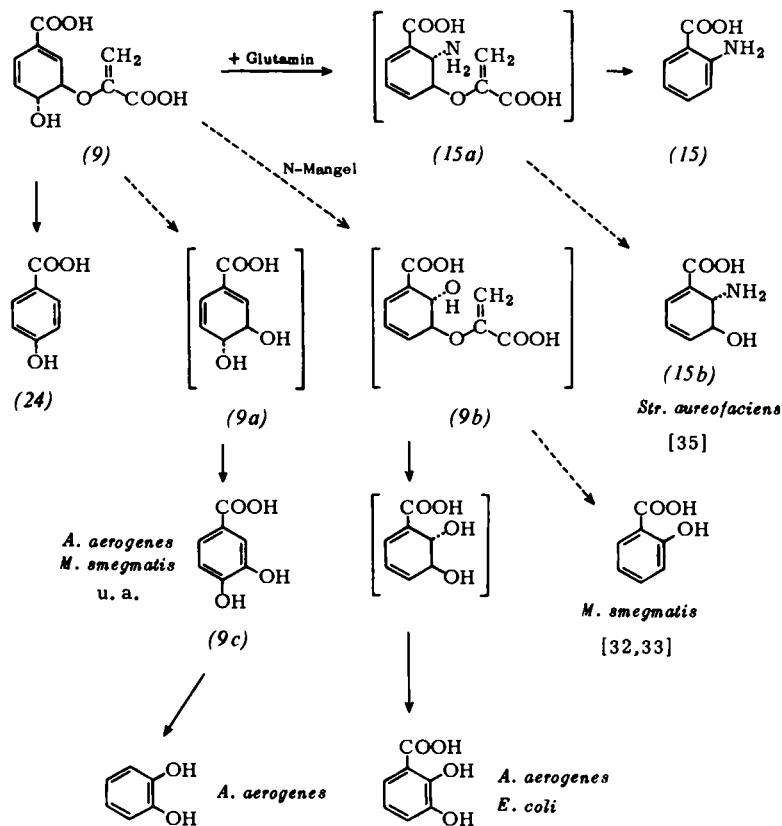
die Chorismat-Mutase katalysiert wird, kann als Claisen-Umlagerung aufgefaßt werden. Sie gelingt auch ohne Enzym durch vorsichtiges Erhitzen von (9) in Pufferlösungen bei pH = 7,0.

Die Prephensäure (10) wird enzymatisch bei pH = 7 zu Phenylbrenztraubensäure (11) und *p*-Hydroxyphenylbrenztraubensäure (13) aromatisiert. Die Reaktion zu (11) wird durch die Prephenat-Dehydratase katalysiert [23].

Diese Reaktion tritt leicht ohne Enzym in schwach saurem Milieu ein. Damit wird verständlich, daß eine Mutante, der die Prephenat-Dehydratase fehlt und die unter Mangelbedingungen (10) akkumuliert, leicht mit dem zu (11) zersetzen

Chorisminsäure (9) in Anthranilsäure um einen recht komplexen Vorgang handelt, wird diese Reaktion zum mindesten bei *N. crassa* und *S. cerevisiae* durch ein einziges Enzym katalysiert [27, 28]. Der Amidstickstoff des Glutamins liefert dabei die Aminogruppe von (15) [29]. Man könnte vermuten, daß diese Biosynthese über den 3-Enolbrenztraubensäureäther der *trans*-2,3-Dihydro-3-hydroxyanthranilsäure (15a) verläuft; bisher konnte diese Verbindung aber noch nicht nachgewiesen werden [16, 30, 31].

Bei der Untersuchung der Umwandlung von (9) in (15) ist bei einigen Mikroorganismen die Bildung von Phenolcarbonäuren und Phenolen beobachtet worden [34]. Das Auftreten



Schema 5. Biosyntheseweg zur Anthranilsäure (15) und Verzweigungen.

Akkumulat wachsen kann, wenn man nicht die Säuerung des Mediums durch ständige Zugabe von Lauge verhindert [24, 25].

Eine reduktive Transaminierung der Phenylbrenztraubensäure (11) ergibt Phenylalanin (12) (s. Schema 4).

*p*-Hydroxyphenylbrenztraubensäure (13) bildet sich aus Prephensäure (10) unter Prephenat-Dehydrogenase-Katalyse. Diese Reaktion erfordert NAD als Co-faktor [26]. Die reduktive Transaminierung von (13) liefert Tyrosin (14).

#### 4. Die Biosynthese des Tryptophans

Das erste, schon länger bekannte Glied in der Tryptophan-Biosynthesekette ist Anthranilsäure (15) (s. Schema 5). Obwohl es sich bei der Umwandlung von

[22] H. Plieninger, Angew. Chem. 74, 423 (1962); Angew. Chem. internat. Edit. 1, 367 (1962).

[23] B. D. Davis, Federat. Proc. 14, 691 (1955).

größerer Mengen an *p*-Hydroxybenzoësäure (24) wird verständlich, da diese Verbindung aus (9) sowohl enzymatisch als auch spontan leicht gebildet wird. Die Bildung der Protocatechusäure (9c) könnte man sich so vorstellen, daß aus (9) durch eine Ätherspaltung zunächst *trans*-3,4-Dihydroprotocatechusäure (9a) entsteht, die anschließend dehydriert wird. Durch Decarboxylierung entsteht aus dieser Verbindung Brenzcatechin. Unter Stickstoff-Mangelbedingungen könnte

[24] B. D. Davis, Science (Washington) 118, 251 (1953).

[25] M. Katagiri u. R. Sato, Science (Washington) 118, 250 (1953).

[26] I. Schwinck u. E. Adams, Biochim. biophysica Acta 36, 102 (1959).

[27] J. A. DeMoss, J. biol. Chemistry 240, 1231 (1965).

[28] F. Lingens, B. Sprößler u. W. Goebel, Biochim. biophysica Acta 121, 164 (1966).

[29] P. R. Srinivasan, J. Amer. chem. Soc. 81, 1772 (1959).

[30] I. G. Levin u. D. B. Sprinson, J. biol. Chemistry 239, 1142 (1964).

[31] P. R. Srinivasan, Biochemistry 4, 2860 (1965).

[32] C. Rattledge u. G. F. Winder, Biochem. J. 84, 501 (1962).

[33] C. Rattledge, Nature (London) 203, 428 (1964).

[34] A. J. Pittard, F. Gibson u. C. H. Doy, Biochim. biophysica Acta 49, 485 (1961).

als Analogon zur stickstoffhaltigen Verbindung ein 3-Enol-brenztraubensäureäther der *trans*-2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybenzoësäure (9b) auftreten. Aus dieser Verbindung ließe sich einerseits die Bildung der Salicylsäure leicht verstehen (Abspaltung von Brenztraubensäure), andererseits wäre die Bildung der 2,3-Dihydroxybenzoësäure zu erklären (Ätherspaltung und Dehydrierung). Bei einer *Streptomyces-aureofaciens*-Mutante mit verringriger Fähigkeit zur Tetracyclin-Biosynthese ist *trans*-2,3-Dihydro-3-hydroxy-anthraniësäure (15b) isoliert worden<sup>[35]</sup>. Man kann sich vorstellen, daß diese Verbindung aus dem postulierten Zwischenprodukt (15a) durch Ätherspaltung gebildet wird.

In jüngster Zeit stellten Cox und Gibson<sup>[36]</sup> fest, daß 2,3-Dihydroxybenzoësäure bei polyauxotrophen Mutanten von *E. coli* eine zusätzliche Wachstumswirkung entfaltet, jedoch kein Vorprodukt von Ubichinon oder Vitamin K ist. Offenbar wird diese Verbindung aber auch über den tatsächlichen Bedarf hinaus gebildet, denn bei *E. coli* ist auch die Akkumulation der Serinverbindung der 2,3-Dihydroxybenzoësäure beobachtet worden<sup>[37]</sup>.

Kürzlich gelang der Nachweis von 2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybenzoësäure als Zwischenprodukt der Biosynthese der 2,3-Dihydroxybenzoësäure<sup>[37a]</sup>.

Als Zwischenprodukt der Umwandlung von Chorisminsäure (9) in Anthraniliësäure (15) ist *N*-Pyruvoylanthraniësäure postuliert worden, die als Akkumulat bei *A. aerogenes* auftreten soll<sup>[38]</sup>. *N*-Pyruvoylanthraniësäure konnte synthetisiert werden<sup>[39]</sup>, ließ sich aber im enzymatischen Test mit *S. cerevisiae*-Extrakten nicht in Anthraniliësäure umsetzen<sup>[28]</sup>.

Die Umwandlung von (9) in (15) kann durch glutamin-analoge Stoffe gehemmt werden. Bei Hemmversuchen mit 6-Diazo-5-oxo-norleucin ließ sich kein Zwischenprodukt der Umwandlung nachweisen. Eine

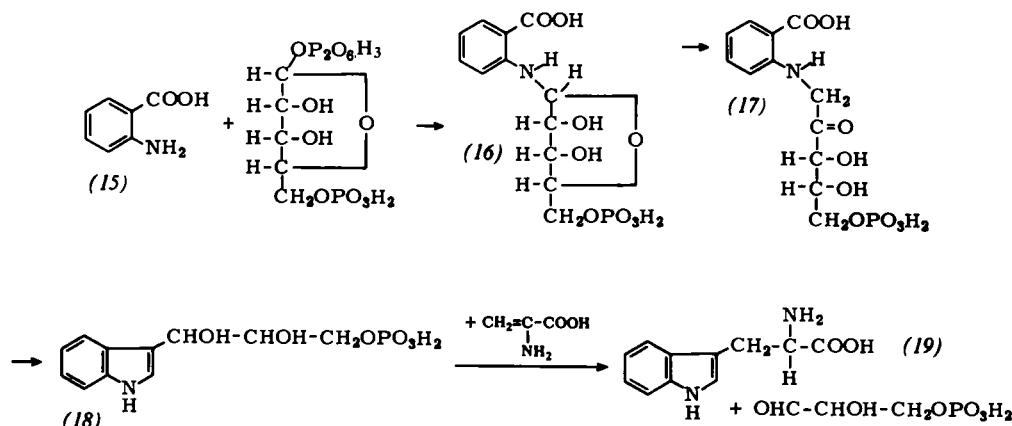
*coli* akkumuliert. Die Ausbeute kann durch Zugabe von Diazo-oxo-norleucin und durch geeignete Bedingungen des Vorfüllens und der Akkumulation erhöht werden<sup>[41]</sup>.

Interessanterweise läßt sich sogar bei der Einwirkung von Diazo-oxo-norleucin auf die Wildstämme von *E. coli* und *S. cerevisiae* Chorisminsäure als Akkumulat nachweisen<sup>[41]</sup>.

Im nächsten Schritt der Tryptophan-Biosynthese wird Anthraniliësäure (15) mit 1-Pyrophosphoryl-*D*-ribose-5-phosphat zu 1-*o*-Carboxyphenyl-*D*-ribosylamin-5-phosphat (16) umgesetzt (s. Schema 6). Erst kürzlich konnte diese Verbindung, die schon lange als Zwischenprodukt formuliert worden war<sup>[42]</sup>, auch enzymatisch nachgewiesen werden<sup>[43]</sup>.

Bei geeignet blockierten Tryptophan-Mangelmutanten sollte man als Akkumulat die entsprechende phosphatfreie Verbindung erwarten. Tatsächlich findet man aber nur Anthraniliësäure.

Die Vermutung, 1-*o*-Carboxyphenyl-*D*-ribosylamin könne aufgrund seiner Labilität nicht nachgewiesen werden, war unrichtig; die Verbindung<sup>[42]</sup> ließ sich in einem Modellversuch wieder unzersetzt aus dem Kulturmischung von Mikroorganismen zurückgewinnen<sup>[44]</sup>. Man muß daher annehmen, daß (16) als labiles Primärakkumulat in Anthraniliësäure und Ribose-5-phosphat zerfällt, das in den Kohlenhydratstoffwechsel übergeht.



Schema 6. Biosyntheseweg des Tryptophans (19).

Mutante, die ihrer genetischen Blockierung in der Tryptophan-Biosynthesekette entsprechend normalerweise Anthraniliësäure akkumuliert, liefert in Gegenwart von 6-Diazo-5-oxo-norleucin Chorisminsäure (9) und Produkte der anderen Biosynthesewege<sup>[40]</sup>. (9) wird in guter Ausbeute von einer Reihe von phe- und/oder tyr<sup>-</sup>-Mutanten<sup>[\*]</sup> von *S. cerevisiae* und *E.*

[35] J. R. D. McCormick, J. Reichenthal, U. Hirsch u. N. O. Sjölander, J. Amer. chem. Soc. 83, 4101 (1961); 84, 3711 (1962).

[36] C. B. Cox u. F. Gibson, J. Bacteriol. 93, 502 (1967).

[37] N. Brot, J. Goodwin u. H. Fales, Biochem. biophys. Res. Commun. 25, 454 (1966).

[37a] I. G. Young, L. M. Jackman u. F. Gibson, Biochim. biophysica Acta 148, 313 (1967).

[38] C. Ratledge, Nature (London) 203, 428 (1964).

[39] F. Lingens u. B. Sprößler, Liebigs Ann. Chem. 702, 169 (1967).

[40] F. Lingens, W. Lück u. G. Müller, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 343, 282 (1966).

[\*] Siehe Abschnitt 1.1.

Im weiteren Verlauf der Biosynthese entsteht über eine Amadori-Umlagerung von (16) 1-*N*-(*o*-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-*D*-ribulose-5-phosphat (17).

Tryptophan-Mangelmutanten von *A. aerogenes*<sup>[45]</sup> und *S. cerevisiae*<sup>[46]</sup> mit genetischem Block im nächsten Schritt der Biosynthesekette akkumulieren unter Tryptophanmangel

[41] F. Lingens u. G. Müller, Z. Naturforsch. 22b, 991 (1967).

[42] F. Lingens, H. J. Burkhardt, H. Hellmann u. F. Kaudewitz, Z. Naturforsch. 12b, 493 (1957).

[43] J. Wegman u. J. A. DeMoss, J. biol. Chemistry 240, 3781 (1965).

[44] F. Lingens u. W. Lück, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 333, 190 (1963).

[45] F. W. E. Gibson, C. H. Doy u. S. B. Segall, Nature (London) 181, 549 (1958).

[46] F. Lingens u. W. Goebel, Biochim. biophysica Acta 148, 60 (1967).

1-N-(*o*-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose. Diese Verbindung und ihr Phosphorsäureester (17) sind auch synthetisch zugänglich [47].

(17) wird im nächsten Schritt zu einer Indolverbindung (18) cyclisiert. Dies geschieht durch Wasserabspaltung und Decarboxylierung an dem C-Atom, das die Carboxygruppe getragen hat, wie sich aus der Umsetzung von 4-Methylanthranilsäure zu 6-Methylindol erkennen ließ [48]. Die C-Atome 1 und 2 der Ribulose liefern die fehlenden C-Atome des Pyrrolringes [49].

Mit Enzymextrakten konnte die Bildung von 3-(Indol-3-yl)-glycerin-1-phosphorsäureester (18) nachgewiesen werden [50]. Tryptophan-Mangelmutanten von *E. coli* und *Salmonella typhimurium* geben an das Medium 1-Indol-3-yl-glycerin ab [42]; entsprechend blockierte Mutanten von *S. cerevisiae* akkumulieren diese Verbindung überraschenderweise nicht, stattdessen aber 3,3-Di(indol-3-yl)-1,2-propandiol [51]. Ein Enzymrohextrakt von *S. cerevisiae* wandelt (18) in den 1-Phosphorsäureester von 3,3-Di(indol-3-yl)-1,2-propandiol um [51].

Außerdem konnte noch 3-Hydroxy-3-(indol-3-yl)-2-oxopropylphosphat nachgewiesen werden [51]. Man hätte vermuten können, daß über diese Verbindung auch eine Tryptophan-Biosynthese unter Erhaltung der Seitenkette analog der Histidin-Biosynthese möglich wäre. Die dann zufordernden Zwischenprodukte Tryptophanol-phosphat, Tryptophanol und Tryptophanal konnten jedoch bei mehreren Mikroorganismen Tryptophan nicht ersetzen [52].

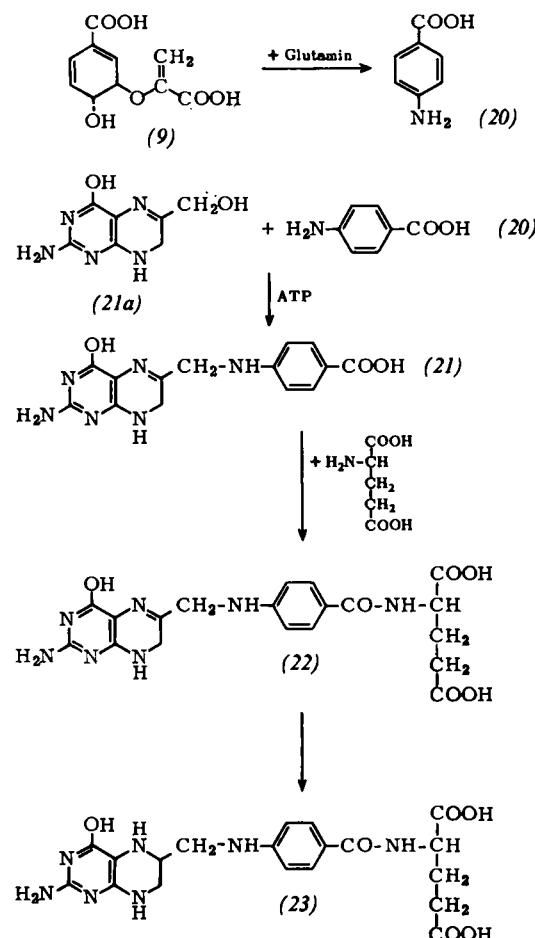
Beim letzten Schritt der Tryptophan-Biosynthese wird (18) unter Abspaltung von Glycerinaldehydphosphat mit  $\alpha$ -Aminoacrylsäure, die aus Serin durch intramolekulare Wasserabspaltung entsteht, zum Tryptophan (19) kondensiert. Die Reaktion wird durch die Tryptophan-Synthetase katalysiert. Dieses Enzym ist aus den Komponenten A und B zusammengesetzt [53-55] und als Multienzymkomplex aufzufassen [56]. Fehlt der Teil B (durch Mutation), so unterbleibt der zweite Teil der Reaktion. Solche Tryptophan-Mangelmutanten akkumulieren unter Mangelbedingungen Indol.

## 5. Die Biosynthese der *p*-Aminobenzoësäure und Tetrahydrofolsäure

Mit Enzymextrakten aus Hefe ließ sich zeigen, daß aus Shikimisäure-5-phosphat (7) mit Glutamin als Stickstoffdonator und NAD *p*-Aminobenzoësäure (20) gebildet wird [57] (s. Schema 7). Spätere Untersuchungen ergaben, daß diese Biosynthese ebenfalls über Chorisminsäure (9) verläuft [58]. Bei der Umwandlung von

- [47] F. Lingens u. E. Schraven, Liebigs Ann. Chem. 655, 167 (1962).
- [48] C. Yanofsky, Science (Washington) 121, 138 (1955).
- [49] C. Yanofsky, J. biol. Chemistry 217, 345 (1955).
- [50] C. Yanofsky, Biochim. biophysica Acta 20, 438 (1956).
- [51] F. Lingens u. W. Goebel, Biochim. biophysica Acta 107, 183 (1965); 148, 70 (1967).
- [52] F. Lingens, H. J. Burkhardt u. H. Hellmann, Z. Naturforsch. 13b, 644 (1958).
- [53] U. Henning, D. R. Helinski, F. C. Chao u. C. Yanofsky, J. biol. Chemistry 237, 1523 (1962).
- [54] B. C. Carlton u. C. Yanofsky, J. biol. Chemistry 237, 1531 (1962).
- [55] D. A. Wilson u. J. P. Crawford, Bacteriol. Proc. USA 1964, 92.
- [56] U. Henning, Angew. Chem. 78, 865 (1966); Angew. Chem. internat. Edit. 5, 785 (1966).
- [57] B. Weiss u. P. R. Srinivasan, Proc. nat. Acad. Sci. USA 45, 1491 (1959).
- [58] M. I. Gibson u. F. Gibson, Biochim. biophysica Acta 65, 160 (1962).

(9) in (20) konnte bisher kein Zwischenprodukt gefunden werden. Genetische Untersuchungen [58a] und Kreuzfütterungsteste an *Neurospora*-[58b] und *E. coli*-Mutanten [58c] sprechen dafür, daß ein Zwischenprodukt gebildet wird.



Schema 7. Biosyntheseweg der Tetrahydrofolsäure (23).

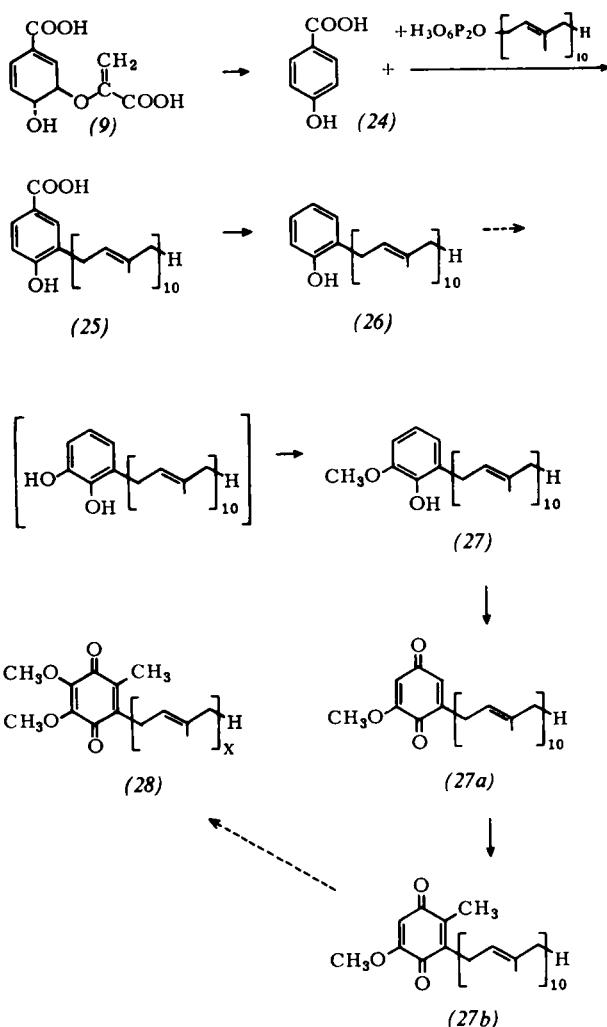
*p*-Aminobenzoësäure dient als Ausgangsmaterial für die Biosynthese der Folsäure. Nach Untersuchungen von Brown et al. verläuft die Biosynthese in *E. coli* folgendermaßen: *p*-Aminobenzoësäure wird mit 2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-7,8-dihydropteridin (21a) in Gegenwart von ATP zuerst zu Dihydropteroinsäure (21) kondensiert; dann wird (21) mit Glutaminsäure zu Dihydrofolsäure (22) umgesetzt, die schließlich zur biologisch aktiven Tetrahydrofolsäure (23) reduziert wird [59].

## 6. Die Biosynthese der *p*-Hydroxybenzoësäure und des Ubichinons

Aus der Chorisminsäure (9) entsteht sowohl enzymatisch als auch spontan *p*-Hydroxybenzoësäure (24) (s. Schema 8).

- [58a] B. Drake, Genetics 41, 640 (1956); M. Huang u. J. Pittard, J. Bacteriol. 93, 1938 (1967).
- [58b] S. Hendl u. P. R. Srinivasan, Biochim. biophysica Acta 141, 656 (1967).
- [58c] F. Lingens u. K. H. Altendorf, unveröffentlicht.
- [59] G. M. Brown, R. A. Weisman u. D. A. Molnar, J. biol. Chemistry 236, 2534 (1961).

In Enzymversuchen konnte für *E. coli* gezeigt werden, daß <sup>14</sup>C-Shikimisäure in Ubichinon (28) eingebaut wird. Durch Zugabe von (24) wurde dieser Einbau verringert [60]. Daraus ergibt sich, daß die Biosynthese des Ubichinons über *p*-Hydroxybenzoësäure verlaufen



Schema 8. Biosyntheseweg des Ubichinons (28). Bei Ubichinon aus Hefe ist  $x = 6$ .

kann. Mit Enzymextrakten aus *Rhodospirillum rubrum* ließ sich nachweisen, daß (24) zunächst mit Decaprenylpyrophosphat zu 3-Decaprenyl-4-hydroxybenzoësäure (25) umgesetzt und anschließend zum 2-Decaprenylphenol (26) decarboxyliert wird [61].

Als weiteres Zwischenprodukt der Ubichinon-Biosynthese bei *Rhodospirillum rubrum* konnte 2-Decaprenyl-6-methoxyphenol (27) isoliert werden [62, 63]. Das als Zwischenprodukt des Überganges von (26) in (27) geforderte 3-Decaprenyl-brenzcatechin ist bisher noch nicht gefaßt worden. Weitere Zwischenprodukte

[60] G. B. Cox u. F. Gibson, Biochim. biophysica Acta 93, 204 (1964); Biochem. J. 100, 1 (1966).

[61] R. K. Olsen, J. L. Smith, G. D. Daves jr., H. W. Moore, K. Folkers, W. W. Parson u. H. Rudney, J. Amer. chem. Soc. 87, 2298 (1965).

[62] R. K. Olsen, G. D. Daves jr., H. W. Moore, K. Folkers u. H. Rudney, J. Amer. chem. Soc. 88, 2346 (1966).

[63] R. K. Olsen, G. D. Daves jr., H. W. Moore, K. Folkers, W. W. Parson u. H. Rudney, J. Amer. chem. Soc. 88, 5919 (1966).

[(27a) und (27b)] der Biosynthese des Ubichinons (28) sind kürzlich nachgewiesen worden [63a].

Bei der Diskussion der Ubichinonbildung muß berücksichtigt werden, daß *p*-Hydroxybenzoësäure (24) nicht nur aus Chorismsäure (9), sondern auch aus Tyrosin entstehen kann. Es wurde vermutet, daß aus (24) *p*-Hydroxybenzaldehyd gebildet wird, in den auch *p*-Hydroxyphenylbrenztraubensäure durch eine nichtenzymatische Reaktion übergehen kann. *p*-Hydroxybenzaldehyd soll sowohl Ausgangsmaterial für den Chinonring des Ubichinons als auch für *p*-Hydroxybenzylalkohol sein. Es sei noch erwähnt, daß auch Säugetiere Tetrahydrofolsäure (23) synthetisieren können. Vermutlich bildet z.B. die Ratte die notwendige *p*-Hydroxybenzoësäure aus Tyrosin, da sie ja nicht über Chorismsäure verfügt [64]. Interessanterweise besitzt das Protozoon *Tetrahymena pyriformis* die Fähigkeit, den Benzochinonring des Ubichinons aus Shikimisäure zu bilden, während diesem Organismus die Enzyme zur Synthese von Tryptophan und Phenylalanin fehlen [65].

## 7. Biosynthese des Vitamins K<sup>1</sup> [6]

Von Davis stammt die Beobachtung, daß polyauxotrophe Mutanten von *E. coli*, die auf die gleichzeitige Zufuhr von Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, *p*-Aminobenzoësäure und *p*-Hydroxybenzoësäure angewiesen sind, besser wachsen, wenn noch ein unbekannter sechster Faktor zugefügt wird, der im üblichen Vollmedium für Bakterien vorhanden ist [66]. Bei diesem Faktor handelt es sich wahrscheinlich um eine Verbindung, die in Vitamin K umgewandelt werden kann. Durch Untersuchungen von Cox und Gibson ist bekannt, daß im sechsten Biosyntheseweg Vitamin K gebildet wird. <sup>14</sup>C-Shikimisäure geht in <sup>14</sup>C-Vitamin K über; durch Zugabe von *p*-Hydroxybenzoësäure ließ sich die Radioaktivität im Vitamin K nicht verringern. Bei Versuchen mit weiteren Substanzen erwiesen sich 3,4-Dihydroxybenzaldehyd und Adrenalin als wirksam [67]. Daraus kann aber nicht geschlossen werden, daß die beiden Verbindungen echte Zwischenprodukte der Biosynthese sind. Kürzlich konnten Leistner, Schmitt und Zenk [67a]  $\alpha$ -Naphthol (29) als Vorstufe von Vitamin K<sub>2</sub> nachweisen; sie postulieren weitere Zwischenstufen der Biosynthesekette (siehe Schema 9).

Davis zeigte schon früher, daß Brenzcatechinderivate den sechsten Faktor des Mediums ersetzen können [68]. An dem Vitamin-K-heterotrophen, anaeroben Bakterium *Fusiformis nigrescens* haben Martius und Leuzinger nachgewiesen, daß 1,4-Naphthochinon in 2-Methylnaphthochinon und weiter in Vitamin K<sub>2(45)</sub>,

[63a] P. Friis, G. D. Davis jr. u. K. Folkers, J. Amer. chem. Soc. 88, 4754 (1966).

[64] W. W. Parson u. H. Rudney, Proc. nat. Acad. Sci. USA 51, 444 (1964).

[65] J. E. Miller, Biochem. biophysic. Res. Commun. 19, 335 (1965).

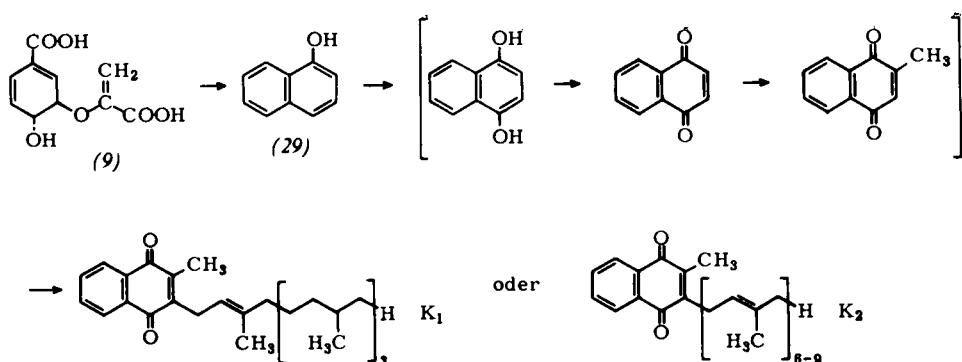
[\*] Mit „Vitamin K“ ist hier Vitamin K<sub>1</sub> und/oder K<sub>2</sub> gemeint.

[66] B. D. Davis, J. Bakteriol. 64, 729 (1952).

[67] G. B. Cox u. F. Gibson, Biochim. biophysica Acta 93, 204 (1964); Biochem. J. 100, 1 (1966).

[67a] E. Leistner, J. H. Schmitt u. M. H. Zenk, Biochem. biophysic. Res. Commun. 28, 845 (1967).

[68] B. D. Davis, Congr. Internat. Biochim., 2e, Paris, 1952, Sympos. Metabolisme Microbien. Masson, Paris 1952, S. 32.



Schema 9. Biosyntheseweg des Vitamins K.

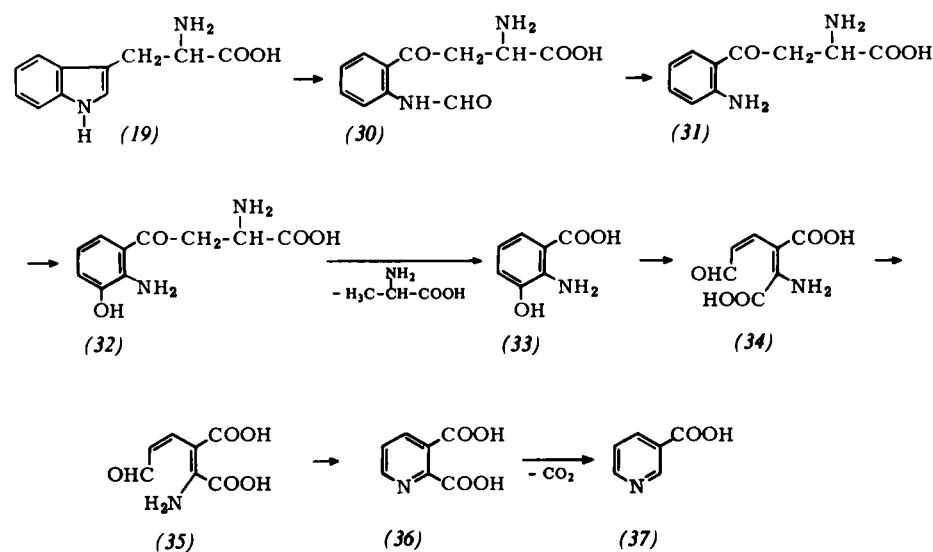
d.h. ein Vitamin K<sub>2</sub> mit 45 C-Atomen in der Seitenkette, umgewandelt wird. Als Methyldonorat wirkt Methionin, nicht aber aktives Formiat oder das  $\beta$ -Kohlenstoffatom des Serins<sup>[69]</sup>.

## 8. Die Biosynthese der Nicotinsäure

Die Nicotinsäure-Biosynthese steht in Zusammenhang mit der Biosynthese aromatischer Aminosäuren, weil hierfür in vielen Organismen Tryptophan als Ausgangsmaterial dient<sup>[70]</sup>. Daneben existiert noch wenigstens ein weiterer Weg, der nicht von aromatischen

Formylkynurenin-Amidase in Kynurenin (31) gespalten<sup>[74]</sup>, das anschließend zum 3-Hydroxykynurenin (32) hydroxyliert wird (s. Schema 10). Durch Kynureninase entstehen daraus 3-Hydroxyanthranilsäure (33) und Alanin<sup>[75]</sup>. Eine Ringspaltung der 3-Hydroxyanthranilsäure (33) mit einer 3-Hydroxyanthranilsäure-Oxygenase ergibt 2-Amino-3-formylvinyl-fumarsäure (34)<sup>[76, 77]</sup>. Diese Verbindung muß zur 2-Amino-3-formylvinylmaleinsäure (35) isomerisiert werden, damit ein Ringschluß zum Pyridinsystem möglich wird. Es entsteht Chinolinsäure (36) und daraus durch Decarboxylierung Nicotinsäure (37).

Die 3-Hydroxyanthranilsäure-Oxygenase wurde zuerst in der Leber nachgewiesen<sup>[78, 79]</sup>. Kürzlich gelang der Nachweis dieses Enzyms in *Saccharomyces cerevisiae*<sup>[80]</sup>.



Schema 10. Biosyntheseweg der Nicotinsäure (37).

Verbindungen ausgeht. Auch einige Säugetiere und der Mensch können aus Tryptophan Nicotinsäure synthetisieren, so daß der Vitaminbegriff im strengen Sinne hier nicht gilt. Den gleichen Biosyntheseweg schlagen auch Pilze, Hefen, bestimmte Algenpilze u.a. ein<sup>[71-73]</sup>. Das Tryptophan (19) wird im ersten Schritt in Formylkynurenin (30) umgewandelt, dieses durch eine

Einige Autoren halten es für möglich, daß die Decarboxylierung dem Ringschluß vorangeht, so daß die Stufe der Chinolinsäure also nicht durchlaufen wird. Bei Nicotinsäure-Mangelmutanten von *S. cerevisiae* zeigt die Chinolinsäure aber eine gute Wachstumswirksamkeit<sup>[71]</sup>.

[74] W. B. Jakoby, J. biol. Chemistry 207, 657 (1954).

[75] W. B. Jakoby u. D. M. Bonner, J. biol. Chemistry 205, 699 (1953).

[76] O. Wiss, H. Simmer u. H. Peters, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 304, 221 (1956).

[77] E. Kiss, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 345, 195 (1966).

[78] C. O. Stevens u. L. M. Henderson, J. biol. Chemistry 234, 1188 (1959).

[79] R. A. Mitchell, H. H. Kaug u. L. M. Henderson, J. biol. Chemistry 238, 1151 (1963).

[80] F. Lingens u. H.-D. Heilmann, Naturwissenschaften 54, 369 (1967); H.-D. Heilmann u. F. Lingens, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 349, 223 (1968).

Ein weiterer Weg zur Biosynthese der Nicotinsäure benötigt als Ausgangsmaterial Asparaginsäure und eine Drei-C-Verbindung, z.B. Glycerin oder Glycerinaldehyd-phosphorsäure-ester<sup>[81-83]</sup>. Diese Möglichkeit zur Synthese von Nicotinsäure wird bis auf wenige Ausnahmen von Bakterien sowie von Blaualgen, Grünalgen, einem Teil der Algenpilze und von höheren Pflanzen ausgenutzt. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß sich auch die Biosynthese des Lysins auf zwei Wegen vollziehen kann: über  $\alpha$ -Aminoadipinsäure oder über  $\alpha, \epsilon$ -Diaminopimelinsäure. Ein Vergleich der Ergebnisse ergab, daß Mikroorganismen, die Lysin über  $\alpha$ -Aminoadipinsäure bilden, Nicotinsäure aus Tryptophan synthetisieren. Bei Vorliegen des  $\alpha, \epsilon$ -Diaminopimelinsäure-Weges der Lysinbiosynthese wird Nicotinsäure im allgemeinen nicht aus Tryptophan gebildet<sup>[73]</sup>.

## 9. Regulation der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren

Die aromatischen Aminosäuren greifen regulierend in ihre Biosyntheseketten ein, indem sie die folgenden Enzyme allosterisch hemmen, gegebenenfalls auch aktivieren: 2-Keto-3-desoxy-arabo-heptonsäure-7-phosphat-Synthetase (DAHP-Synthetase) [(1) + (2)  $\rightarrow$  (3)], Chorismat-Mutase [(9)  $\rightarrow$  (10)], Prephenat-Dehydrogenase [(10)  $\rightarrow$  (13)], Prephenat-Dehydratase [(10)  $\rightarrow$  (11)], Anthranilat-Synthetase [(9)  $\rightarrow$  (15)] und *p*-Aminobenzoat-Synthetase [(9)  $\rightarrow$  (20)] (s. Schema 11).

Es konnte bisher noch nicht geklärt werden, auf welche Weise die Biosynthese der Vitamine, die sich aus dieser verzweigten Synthesekette ableiten, reguliert wird.

Bei Enzymen, deren Aktivität einer Regulation unterworfen ist, handelt es sich um allosterische Proteine. Diese sind nach Monod, Wyman und Changeux<sup>[84]</sup> Oligomere aus identischen Untereinheiten, die durch nicht-kovalente Bindungen verknüpft sind. Jede Untereinheit besitzt stereospezifische Stellen für das Substrat und andere Liganden (Effektoren). Das Oligomere (allosterisches Protein) liegt in den energetisch verschiedenen Zuständen R und T vor, die miteinander im Gleichgewicht stehen. R- und T-Zustand unterscheiden sich in der Quartärstruktur des Proteins. Die Liganden haben verschiedene Affinität zu den beiden Zuständen. Das Gleichgewicht zwischen R- und T-Zustand hängt von der Konzentration der Liganden ab. Dieses Modell ist in zwei Formen realisiert:

1. Das K-System: Die Effektoren und das Substrat haben verschiedene Affinitäten zum R- und T-Zustand. Dadurch beeinflußt der Effektor die Affinität des Enzymproteins zum Substrat, das Substrat die Affinität des Proteins zum Effektor.

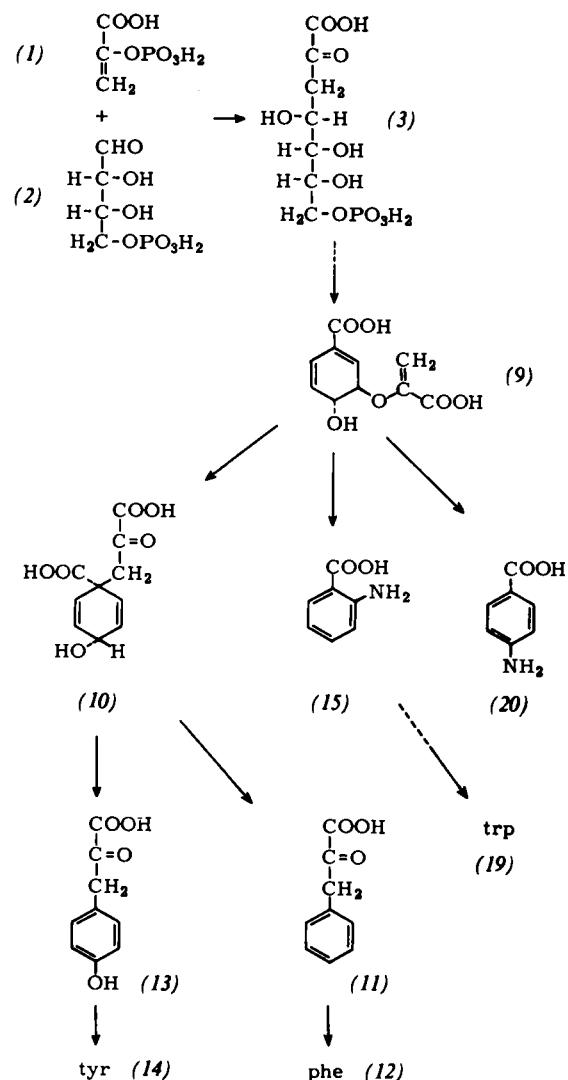
2. Das V-System: Hier hat das Substrat die gleiche Affinität zu beiden Zuständen. Dadurch hat ein Effektor keinen Einfluß auf die Anlagerung des Substrats

[81] E. Mothes, D. Gross, H. R. Schütte u. K. Mothes, Naturwissenschaften 48, 623 (1961).

[82] D. Gross, H. R. Schütte, G. Hübner u. K. Mothes, Tetrahedron Letters 1963, 541.

[83] M. V. Ortega u. G. M. Brown, J. biol. Chemistry 235, 2939 (1960).

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



Schema 11. Regulation der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren.

und umgekehrt. Die beiden Zustände unterscheiden sich aber in ihrer katalytischen Aktivität, so daß ein Effektor, der das Gleichgewicht zugunsten des Zustandes mit der niedrigeren katalytischen Aktivität verschiebt, das Enzym hemmt.

Die Untersuchung der Enzyme für die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren in Mikroorganismen ist noch nicht soweit gediehen, daß in allen Fällen schon eine Zuordnung zu diesen Systemen getroffen werden kann. Außer der allosterischen Beeinflussung der vorhandenen Enzyme ist auch eine Regulation über Repression und Induktion der Biosynthese sämtlicher Enzyme möglich.

Das erste Enzym des Grundzweiges, die DAHP-Synthetase, besteht in *Escherichia coli* *W* und *K 12* aus drei Isoenzymen, von denen eines durch L-Phenylalanin, ein anderes durch L-Tyrosin allosterisch gehemmt und reprimiert wird. Das dritte Enzym unterliegt keiner allosterischen Hemmung, wohl aber einer Repression durch L-Tryptophan<sup>[85-91]</sup>.

[85] L. C. Smith, J. M. Ravel, S. R. Lax u. W. Shive, J. biol. Chemistry 237, 3566 (1962).

[86] K. D. Brown u. C. H. Doy, Biochim. biophysica Acta 77, 170 (1963).

[87] P. G. Lim u. R. J. Mateles, J. Bacteriol. 87, 1051 (1964).

[88] C. H. Doy u. K. D. Brown, Biochim. biophysica Acta 104, 377 (1965).

Der Schritt von der Chorismsäure (9) zur Prephenäsäure (10) in *E. coli* und *Aerobacter aerogenes* wird von zwei Isoenzymen katalysiert. Diese Chorismat-Mutasen sind jeweils zu einem Komplex mit den darauffolgenden Enzymen, der Prephenat-Dehydrogenase und der Prephenat-Dehydratase, vereinigt, die beide ebenfalls durch die Endprodukte gehemmt werden [92]. Tabelle 1 zeigt die Werte der allosterischen Hemmung bei *A. aerogenes*. Die Chorismat-Mutase P und die Prephenat-Dehydratase werden unvollständig durch L-Phenylalanin reprimiert. L-Tyrosin reprimiert eines der beiden Isoenzyme und die Prephenat-Dehydrogenase.

Tabelle 1. Hemmwirkung von L-Phenylalanin und L-Tyrosin auf Enzyme aus *A. aerogenes*.

Zugesetzte Aminosäure	Hemmung von			
	Chorismat-Mutase P (%)	T (%)	Prephenat-Dehydratase (%)	Prephenat-Dehydrogenase (%)
L-phe ( $5 \times 10^{-3}$ M) ( $1 \times 10^{-3}$ M)	65	4	100	14
L-tyr ( $5 \times 10^{-3}$ M) ( $1 \times 10^{-3}$ M)	16	2	44	91

Die Enzyme des Tryptophan-Biosyntheseweges in *E. coli* und *A. aerogenes* werden durch L-Tryptophan koordiniert reprimiert, die Anthranilat-Synthetase wird vollständig gehemmt [93-95].

Jensen und Nester [96-99] haben bei *Bacillus subtilis* nachgewiesen, daß hier der erste Schritt im Grundzweig sowohl durch Prephensäure als auch durch Chorismsäure, nicht aber durch die End-Aminosäuren allosterisch gehemmt wird. Es ist nur eine DAHP-Synthetase vorhanden. Die Chorismat-Mutase wird weder durch L-Tyrosin noch durch L-Phenylalanin gehemmt. Diese Aminosäuren hemmen aber die Prephenat-Dehydrogenase und -Dehydratase. Die dadurch angehäufte Prephensäure kann die DAHP-Synthetase hemmen. L-Tryptophan wirkt als negativer Effektor auf die Anthranilat-Synthetase; dadurch kann eine Akkumulation von Chorismsäure hervorgerufen werden, die ebenfalls, allerdings in geringerem Maße, die DAHP-Synthetase hemmt. L-Phenylalanin, L-Tyrosin und L-Tryptophan bewirken eine Repression der DAHP-Synthetase.

- [89] D. H. Ezekiel, *Biochim. biophysica Acta* **95**, 54 (1965).
- [90] C. H. Doy u. K. D. Brown, *Biochim. biophysica Acta* **118**, 157 (1966).
- [91] B. J. Wallace u. J. Pittard, *J. Bacteriol.* **93**, 237 (1967).
- [92] R. G. H. Cotton u. F. Gibson, *Biochim. biophysica Acta* **100**, 76 (1965).
- [93] J. M. Edwards, F. Gibson, L. M. Jackman u. J. S. Shannon, *Biochim. biophysica Acta* **93**, 78 (1964).
- [94] R. L. Somerville u. C. Yanofsky, *J. molecular Biol.* **11**, 747 (1965).
- [95] A. Matsushiro, K. Sato, J. Ito, S. Kida u. F. Imamoto, *J. molecular Biol.* **11**, 54 (1965).
- [96] R. A. Jensen u. E. W. Nester, *J. molecular Biol.* **12**, 468 (1965).
- [97] R. A. Jensen u. E. W. Nester, *J. biol. Chemistry* **241**, 3365 (1966).
- [98] R. A. Jensen u. E. W. Nester, *J. biol. Chemistry* **241**, 3373 (1966).
- [99] E. W. Nester u. R. A. Jensen, *J. Bacteriol.* **91**, 1594 (1966).

In *Pseudomonas putida* weist die Regulation der Tryptophan-Biosynthese eine Besonderheit auf [100]. Das letzte Enzym der Kette, die Tryptophan-Synthetase, wird durch ihr Substrat 3-(Indol-3-yl)-glycerin-1-phosphat induziert. Dieses Enzym wird durch L-Tryptophan nicht beeinflußt, die übrigen Enzyme der Kette werden aber durch diese Aminosäure reprimiert.

Untersuchungen an *Saccharomyces cerevisiae* haben ergeben [101, 102], daß L-Tyrosin eine allosterische Hemmung des tyrosin-sensitiven Isoenzymes der DAHP-Synthetase, der Chorismat-Mutase und der Prephenat-Dehydrogenase hervorruft. Ein Überschuß an L-Tyrosin kann in *S. cerevisiae* durch Induktion des Abbaus zum Tyrosol beseitigt werden. L-Phenylalanin bewirkt in hoher Konzentration eine Hemmung des phenylalanin-sensitiven Isoenzymes der DAHP-Synthetase und der Prephenat-Dehydratase. Die Biosynthese der Prephenat-Dehydratase wird außerdem durch L-Phenylalanin reprimiert. Es ist wohl zweckmäßig, daß ein Überschuß an L-Phenylalanin gleichzeitig sowohl eine Induktion als auch eine Aktivierung der Prephenat-Dehydrogenase hervorruft. Der Abbau des L-Phenylalanins in *S. cerevisiae*, der zur Beseitigung eines Überschusses dieser Aminosäure dienen kann, führt zum  $\beta$ -Phenyläthanol.

Es läßt sich zeigen, daß L-Tryptophan das erste Enzym seiner Biosynthesekette, die Anthranilat-Synthetase, hemmt; die Synthese dieses Enzyms wird durch L-Tryptophan reprimiert. L-Tryptophan bewirkt gleichzeitig eine Steigerung der Synthesegeschwindigkeit in einem anderen Zweig der Biosynthesekette durch Induktion und Aktivierung der Chorismat-Mutase. Auch L-Tryptophan wird in *S. cerevisiae* abgebaut, und zwar zum Tryptophol. Setzt man L-Tyrosin, L-Phenylalanin und L-Tryptophan gleichzeitig im Überschuß zu, so läßt sich außer den geschilderten Phänomenen noch eine multivalente Induktion der *p*-Aminobenzoat-Synthetase beobachten und als deren Folge die Abgabe von *p*-Aminobenzoësäure in das Medium.

Die nähere Untersuchung der von der Regulation betroffenen Enzyme bestätigte, daß es sich um allosterische Proteine handelt. Die beiden DAHP-Synthetasen, die durch L-Tyrosin bzw. durch L-Phenylalanin gehemmt werden, gehören dem V-System an, während Chorismat-Mutase und Prephenat-Dehydrogenase dem K-System zuzuordnen sind [102].

Die Chorismat-Mutase von *Neurospora crassa* [103] gehört ebenfalls zum K-System der allosterischen Enzyme und wird durch L-Tryptophan aktiviert, durch L-Tyrosin und durch L-Phenylalanin dagegen gehemmt. Auch die Anthranilat-Synthetase von *Neurospora* läßt sich durch L-Tryptophan hemmen.

Bei der Untersuchung der Regulation der Aromaten-Biosynthese in *Claviceps paspali* stellte es sich heraus,

- [100] I. P. Crawford u. I. C. Gunsalus, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **56**, 717 (1966).
- [101] F. Lingens, W. Goebel u. H. Uesseler, *Biochem. Z.* **346**, 357 (1966).
- [102] F. Lingens, W. Goebel u. H. Uesseler, *Europ. J. Biochem.* **1**, 363 (1967).
- [103] T. I. Baker, *Biochemistry* **5**, 2654 (1966).

daß ein alkaloidproduzierender Stamm eine Anthranilat-Synthetase besitzt, die nicht durch L-Tryptophan allosterisch gehemmt wird [104, 105]. Auf diese Weise steht L-Tryptophan offensichtlich in genügender Menge für die Alkaloidsynthese zur Verfügung. *Claviceps paspali* enthält drei DAHP-Synthetasen, von denen je eine durch L-Phenylalanin, L-Tyrosin und L-Tryptophan hemmbar ist. (Das tryptophan-sensitive Isoenzym bildet mit 60 % der Gesamtaktivität die Hauptmenge.) Die Chorismat-Mutase, die auch in diesem Organismus dem K-System angehört, wird sowohl durch L-Tyrosin als auch durch L-Phenylalanin gehemmt. Diese Hemmung wird durch L-Tryptophan als positivem Effektor aufgehoben. Auch durch einige

[104] F. Lingens, W. Goebel u. H. Uesseler, Naturwissenschaften 54, 141 (1967).

[105] F. Lingens, W. Goebel u. H. Uesseler, European J. Biochem. 2, 442 (1967).

tryptophanaloge Verbindungen läßt sich die Chorismat-Mutase aktivieren. Erst nach hoher Anreicherung konnte die Chorismat-Mutase in zwei Isoenzyme zerlegt werden [106]. Die Prephenat-Dehydratase wird durch L-Phenylalanin, die -Dehydrogenase durch L-Tyrosin allosterisch gehemmt.

Die zitierten eigenen Arbeiten entstanden in Zusammenarbeit mit den Herren Dr. W. Goebel, H.-D. Heilmann, Dr. W. Lück, Dr. Gerhard Müller, Dr. O. Oltmanns, Dr. B. Sprößler, Dr. P. Vollprecht und Fräulein H. Uesseler und wurden in dankenswerter Weise von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Verband der Chemischen Industrie und, soweit Isotope zur Anwendung kamen, vom Ministerium für wissenschaftliche Forschung unterstützt.

Eingegangen am 1. August 1967, ergänzt am 12. Februar 1968 [A 629]

[106] F. Lingens u. B. Sprößler, unveröffentlicht.

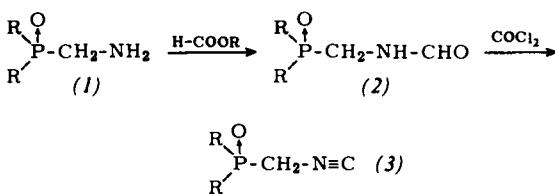
## ZUSCHRIFTEN

### Phosphinylmethyl-isocyanide

Von N. Kreutzkamp und K. Lämmerhirt [\*\*]

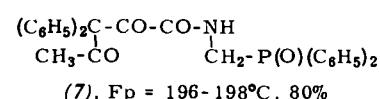
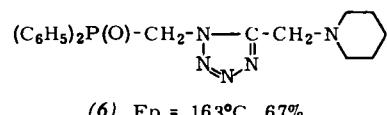
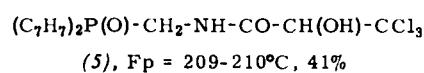
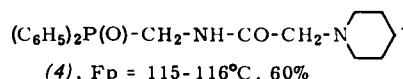
Herrn Professor H. Böhme zum 60. Geburtstag gewidmet

Als erste Beispiele der bisher nicht bekannten Phosphinylmethyl-isocyanide (3) wurden die *P,P*-Diphenyl- ( $R = C_6H_5$ ) und *P,P*-Dibenzyl-Derivate ( $R = CH_2-C_6H_5$ ) durch Ugi-Reaktion [1] aus den entsprechenden *N*-Phosphinylmethyl-



formamiden (2) dargestellt. Die Formamide (2) sind aus den Aminen (1) und Ameisensäureester mit quantitativer Ausbeute zugänglich.

Die Phosphinylmethyl-isocyanide (3) sind feste, farb- und geruchlose Substanzen von relativ hoher Stabilität. Durch



Passerini- oder Ugi-Reaktion können aus ihnen leicht tertiäre Phosphinoxide erhalten werden, die sonst nicht zugänglich sind. Als Beispiele seien die Verbindungen (4)-(7) aufgeführt.

### Arbeitsvorschriften:

Phosphinylmethyl-isocyanide: Eine Lösung von 5,2 g *N*-Diphenylphosphinylmethyl-formamid ( $F_p = 162^\circ\text{C}$ ) und 6,6 ml Triäthylamin in 30 ml Methylenchlorid wird unter Röhren tropfenweise bei 15-20 °C mit 10,8 ml einer 20-proz. Lösung von Phosgen in Toluol versetzt. Das Reaktionsgemisch wird im Vakuum eingedampft und der Rückstand mehrfach mit Benzol ausgekocht. Die vereinigten Benzolausträge werden eingeeengt. Dabei fällt *P,P*-Diphenylphosphinylmethyl-isocyanid aus.  $F_p = 146-148^\circ\text{C}$  (aus Benzol), Ausbeute 80 %.

Analog entsteht aus *N*-Dibenzylphosphinylmethylformamid ( $F_p = 156^\circ\text{C}$ ) *P,P*-Dibenzylphosphinylmethyl-isocyanid,  $F_p = 143-144^\circ\text{C}$ , Ausbeute 72 %.

*N-(P,P-Diphenylphosphinylmethyl)piperidinoacetamid* (4): Unter Eiskühlung wird eine Mischung aus 10 ml Methanol, 1,7 g Piperidin, 2 ml 10 N HCl und 2 ml 40-proz. Formaldehydlösung hergestellt und in kleinen Anteilen 4,8 g *P,P*-Diphenylphosphinylmethyl-isocyanid eingetragen. Das Gemisch wird 72 Std. bei 20 °C aufbewahrt und anschließend im Vakuum eingedampft. Der ölige Rückstand wird in Salzsäure aufgenommen, zweimal mit Methylenchlorid ausgeschüttelt und die wäßrige Phase alkalisch gemacht. Durch Extraktion mit Methylenchlorid gewinnt man die Verbindung als Öl, das beim Verreiben mit Äther erstarrt und aus Benzol umkristallisiert wird.

1 - Diphenylphosphinylmethyl - 5 - piperidinomethyltetrazol (6): 1,7 g Piperidin werden in 20 ml Aceton gelöst und unter Eiskühlung nacheinander mit 2 ml 40-proz. Formaldehydlösung, 5 ml 12,5-proz. Salzsäure, 1,3 g Natriumazid in 10 ml Wasser und 4,8 g *P,P*-Diphenylphosphinylmethyl-isocyanid versetzt. Das Gemisch wird eine Std. bei 20 °C gerührt, mit Kaliumcarbonat gesättigt und mit Aceton ausgeschüttelt.

[\*] Prof. Dr. N. Kreutzkamp und K. Lämmerhirt  
Institut für Pharmazeutische Chemie der  
Universität Hamburg  
2057 Reinbek, Schloß

[1] I. Ugi, W. Betz, U. Fetzer u. K. Offermann, Chem. Ber. 94, 2814 (1961).