

THE BIOSYNTHETIC ACTIVITY OF TRANSAMINATION, STUDIED WITH A VARIANT OF *BACILLUS SUBTILIS*

by

J. M. WIAME, R. STORCK AND S. BOURGEOIS

*Laboratoire de Microbiologie du Centre d'Enseignement et de Recherches des Industries alimentaires, et
Laboratoire de Biochimie des Microorganismes de l'Université Libre, Bruxelles (Belgique)*

In spite of numerous enzymic studies related to transamination, there are only few reports on this type of reaction, studied with living organisms (see GALE¹), available for a general discussion. It has been shown, however, that amino-acid-free mutants of micro-organisms supplied with vitamin B₆ are able to grow on the corresponding ketoacid^{2,3}. This fact supports the idea that transamination reactions are involved in these bacteria. A more direct demonstration would be given if both the amino acid donor of $-NH_2$ and the ketoacid acceptor were necessary for growth.

An opportunity for such a demonstration has been given by a comparative study of two parent strains of *Bac. subtilis*, the strains M_2^- and S_1^- . In a previous work with the strain S_1^- ⁴, it has been shown that this bacterium needs for its growth one of the following amino acids: L-glutamic acid, L-arginine, L-ornithine, L-proline or L-aspartic acid. This bacterium is unable to use NH_4^+ , even partially (as indicated by the sign (—)). With the strain M_2^- , aspartic acid alone is unable to support normal growth, which, however, is possible in the simultaneous presence of aspartic acid plus citric acid, or aspartic acid plus α -ketoglutaric acid (Fig. 1). Citric acid or ketoglutaric acid have no effect on the strain S_1^- (Fig. 2). This constitutes a direct proof of the biosynthetic activity of the aspartic glutamic transamination.

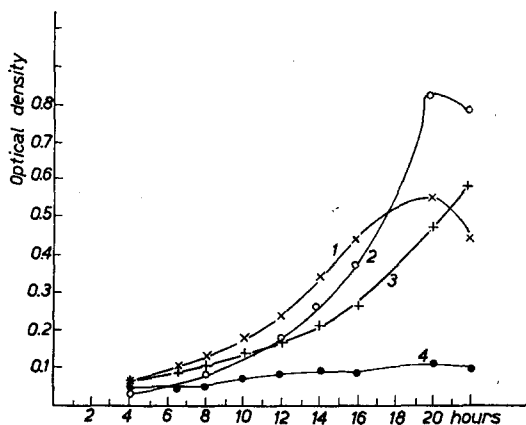


Fig. 1. Growth curves of *Bac. sub.* M_2^- at 35° in a medium containing glycerol M/10, mineral salts⁴ and supplemented with: 1. x-x-x-x glutamic acid M/200; 2. o-o-o-o aspartic acid M/200 and citric acid M/200; 3. +--+--+ aspartic acid M/200 and α -ketoglutaric acid; 4. ●-●-●-● aspartic acid.

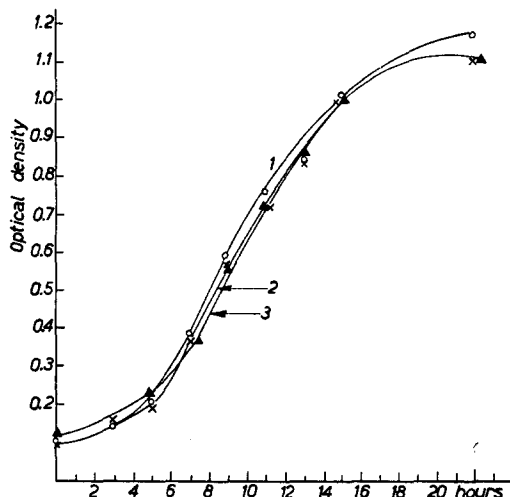


Fig. 2. Growth curves of *Bac. sub.* S_1^- at 35° in a medium containing glycerol M/10, mineral salts⁴ and supplemented with: 1. o-o-o-o aspartic acid M/200; 2. x-x-x-x aspartic acid M/200 and α -ketoglutaric acid M/200; 3. ▲-▲-▲-▲ aspartic acid M/200 and citric acid M/200.

In connection with other results from this laboratory, this observation leads to other conclusions. It was demonstrated, by the method of simultaneous adaptation⁵, that L-arginine, L-ornithine and L-proline replace stoichiometrically L-glutamic acid formed by their previous conversion in the cells into this amino acid. It was, however, impossible to make certain that aspartic acid is also used through L-glutamic acid. The present experiment shows clearly that this is the case, and gives a clear demonstration of the central role of glutamic acid in the nitrogen metabolism of the cell. All the nitrogen of the cell arises from glutamic acid; the other components which replace glutamic acid do so after enzymic adaptation; in the case of aspartic acid, α -ketoglutaric acid is needed as

NH₂ acceptor. From the necessity of either α -ketoglutaric or citric acid, in the presence of aspartic acid, to support growth, one may conclude that the tricarboxylic acid cycle (without an obligatory energetic role) has a synthetic activity in the metabolism of this micro-organism. This hypothesis, which was first suggested by KREBS⁶, is also in agreement with other experiments reported elsewhere⁷. It is worth while noting that, in contrast to the numerous other amino-acid-free mutants which have been obtained, the strains used here are almost the only ones which involve the glutamic or aspartic acid metabolism.

This work has been supported by the Institut pour l'Encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture, the Institut Belge d'Alimentation et de Nutrition and the Centre de Brasserie et Malterie.

REFERENCES

- ¹ E. GALE, in WERKMAN AND WILSON, *Bacterial Physiology*, Academic Press, New York, 1951, p. 453.
- ² H. P. BROQUIST AND E. E. SNELL, *J. Biol. Chem.*, 180 (1949) 59.
- ³ J. T. HOLDEN, R. B. WILDMAN AND E. E. SNELL, *J. Biol. Chem.*, 191 (1951) 559.
- ⁴ J. M. WIAME AND R. STORCK, *Biochim. Biophys. Acta*, 10 (1953) 268.
- ⁵ J. M. WIAME, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 478.
- ⁶ H. A. KREBS, S. GURIN AND L. V. E. EGGLESTON, *Biochem. J.*, 51 (1952) 614.
- ⁷ J. M. WIAME AND S. BOURGEOIS, in press.

Received March 3rd, 1953

DIE WASSER-GLYZERIN-EXTRAHIERTE ZELLE ALS MODELL DER ZELLMOTILITÄT

von

HARTMUT HOFFMANN-BERLING

Institut für Virusforschung, Heidelberg (Deutschland)

Werden Gewebekulturen bei niedriger Temperatur in einer 45 %igen Glycerinlösung von pH $\sim$ 7 und einer Ionenstärke von 0.14μ extrahiert, so stirbt die Zelle ab, doch bleiben die unlöslichen Strukturen erhalten. Zell- und Kernform, Nukleolen, Chromosomen und Teilungsspindel sind unverändert, wenn die Rückführung der Zellen in rein wässrige Lösungen schrittweise erfolgt; Mitochondrien runden sich dagegen ab.

Es wird so ein Modell der Zelle erhalten, das dem sog. Fasermmodell des Muskels¹ ähnlich ist. Modelle aus Zellen in Teilungsruhe, die mindestens einige Tage extrahiert sind, kontrahieren sich auf ATP-Zusatz zu einer Kugel. Die Verkürzung erfolgt dabei nicht frei, sondern gegen den schwer abschätzbaren Widerstand des Fibrinkoagulums im Kulturmedium. Nach einer nur wenige Stunden dauernden Extraktion ist die Verkürzung geringer. Die Kontraktion ist bei 37° C nach knapp 10 min, bei 20° C nach 35 min abgeschlossen. Bei 20° beträgt die Halbwertszeit etwa 7 min. $1.5 \times 10^{-8} M$ Mg⁺⁺ beschleunigt die Kontraktion; $10^{-2} M$ Monojodacetat ist indifferent; eine 10 min dauernde Vorbehandlung mit $10^{-4} M$ Salyrgan hebt dagegen die Kontraktion auf. Die Salyrganwirkung ist auf Cystein reversibel. Auswaschen des ATP lässt die Zelle in jedem Stadium der Bewegung sofort erstarrten. Pyrophosphat bis zu $10^{-2} M$, Trimetaphosphat und sog. Hexametaphosphat bis 5×10^{-3} sind wirkungslos.

Bei in der Anaphase der Kernteilung extrahierten Zellen wandern die Chromosomensätze unter ATP auseinander.

Zellkontraktion wurde erzielt an Fibroblasten aus Amnion, Sclera, Leber, Milz, Subcutangewebe, Skelett- und Herzmuskel, Osteoblasten (Huhn), lymphogranulomatösem Lymphknoten (Mensch) sowie Epithelzellen aus Retina und Epidermis (Huhn) und in der Kultur überlebenden Zellen aus Ehrlich-Ascitestumor der Maus. Modelle aus Epithelzellen sind nur beweglich, wenn sie nicht im Verband liegen. Die Zahl der vorausgegangenen Passagen des betreffenden Gewebestammes ist ohne Einfluss. Anaphasebewegungen wurden bisher nur an Zellmodellen aus Skelettmuskel- und Sclera-fibroblasten gesucht und gefunden.

LITERATUR

- ¹ Vgl. z.B. A. SZENT-GYÖRGYI, *Chemistry of Muscular Contraction*, New York, 1951.
- H. H. WEBER UND H. PORTZEHL, *Adv. Prot. Chem.*, 7 (1952) 161, und *Ergebn. Physiol.*, 47 (1952) 369.

Eingegangen den 9. März 1953