

## Synthese von Phosphoenolpyruvat aus Pyruvat durch Extrakte aus *Hydrogenomonas eutropha* Stamm *H 16*

W. FRINGS und H. G. SCHLEGEL

Institut für Mikrobiologie  
der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH München  
in Göttingen

Eingegangen am 14. Juli 1971

### Biosynthesis of Phosphoenolpyruvate from Pyruvate by Extracts from *Hydrogenomonas eutropha* Strain *H 16*

*Summary.* Crude extracts from *Hydrogenomonas eutropha* strain *H 16* catalyze the biosynthesis of phosphoenolpyruvate from pyruvate and adenosine triphosphate. Under identical conditions extracts from *Escherichia coli* synthesized phosphoenolpyruvate from pyruvate also.

The reaction product phosphoenolpyruvate has been identified by paper chromatography, by employing radioactive pyruvate and by a coupled enzyme assay, using a purified preparation of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonic acid-7-phosphate synthase. AMP has been found as the second product of the PEP-synthase reaction. From these results it is concluded that strain *H 16* contains an enzyme phosphorylating pyruvate directly.

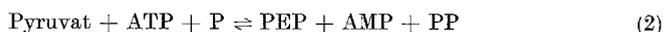
*Zusammenfassung.* Zellfreie Extrakte aus *Hydrogenomonas eutropha* Stamm *H 16* katalysieren die Biosynthese von Phosphoenolpyruvat aus Pyruvat und Adenosin-triphosphat. Unter identischen Bedingungen erfolgte diese Synthese auch durch Extrakte aus *Escherichia coli*.

Das Reaktionsprodukt Phosphoenolpyruvat wurde durch Papierchromatographie, durch Anwendung von radioaktivem Pyruvat und durch einen gekoppelten enzymatischen Test unter Einsatz eines gereinigten Präparates von 3-Desoxy-D-arabino-heptulosonsäure-7-phosphat Synthase, AMP wurde als zweites Produkt der PEP-Synthasereaktion nachgewiesen. Die Versuchsergebnisse lassen darauf schließen, daß der Stamm *H 16* über ein Enzym verfügt, welches Pyruvat direkt phosphoryliert.

Während des Wachstums auf Pyruvat und Lactat als Substraten ist *Hydrogenomonas eutropha* Stamm *H 16* auf die Synthese von Phosphoenolpyruvat (PEP) aus Pyruvat angewiesen. Da die Bildung von PEP

*Abkürzungen.* DAHP = 3-Desoxy-D-arabino-heptulosonsäure-7-phosphat. DTT = Dithiothreitol. PEP = Phosphoenolpyruvat. P = ortho-Phosphat. PP = Pyrophosphat.

aus Pyruvat über die Pyruvat-Carboxylase- und die nachfolgende PEP-Carboxykinase-Reaktion diesem Bakterium nicht möglich ist (vorangehende Arbeit) und da die Pyruvatkinase-Reaktion aus energetischen Gründen nicht von Bedeutung sein kann, muß ein anderer Weg zur Synthese von PEP führen. Eine unmittelbare PEP-Synthese aus Pyruvat durch eine Pyruvat-Phosphorylierung kann durch 2 Enzyme katalysiert werden. Die PEP-Synthase (Reaktion 1) wurde von Cooper u. Kornberg (1965) in *Escherichia coli* entdeckt; sie wurde auch in *Salmonella typhimurium* (O'Brien u. Stern, 1969) und *Acinetobacter* sp. (Herman u. Bell, 1970) nachgewiesen. Durch die Beteiligung von Phosphat an der Pyruvat-Phosphorylierung unterscheidet sich die Pyruvat-Phosphat-Dikinase von der PEP-Synthase (Reaktion 2). Eine Anzahl tropischer Pflanzen (Hatch u. Slack, 1967; Slack, 1968) verfügen über dieses Enzym; sein Nachweis gelang auch in der Amoebe *Entamoeba histolytica* (Reeves, 1968), in *Bacteroides symbiosus* (Reeves et al., 1968), in einigen phototrophen Bakterien (Buchanan u. Evans, 1966) und in *Propionibacterium shermanii* (Evans u. Wood, 1968).



In Rohextrakten von Zellen von Stamm *H 16*, die auf Lactat gewachsen waren, wurden eine relativ geringe Pyruvat-Carboxylierung demgegenüber jedoch sehr hohe PEP-Carboxylase-Aktivitäten gemessen. Es war daher die naheliegende Annahme zu prüfen, ob Stamm *H 16* über einen direkten Weg der PEP-Synthese verfügt.

### Methoden

Angaben über die Anzucht von *Hydrogenomonas eutropha* Stamm *H 16*, über die Extraktgewinnung und die Fraktionierung finden sich in der vorangehenden Arbeit (Frings u. Schlegel, 1971).

Zur Trennung der Phosphatester aus einem Gemisch mit organischen Komponenten eignet sich die zweidimensionale Papierchromatographie (Metzner, 1962). Die eigentliche Trennung der Phosphatester erfolgt in diesem System mit dem für die zweite Laufrichtung (in Faserrichtung) benutzten Gemisch aus sek. Butanol/Ameisensäure/Wasser (6:1:2). Zum Nachweis der so aufgetrennten Phosphatester wurde die von Hirsch (1963) verwendete Methode übernommen. Danach wird das getrocknete Chromatogramm mit einem Glucose-Anilin-Reagens besprüht, kurz erhitzt (130°C, 5–10 min) und in noch heißem Zustand nach Hanes u. Isherwood (1949) (Ammonium-Molybdat-Reagens) behandelt. Enthielten die chromatographierten Reaktionsansätze radioaktiv markierte Substanzen, so wurden die Chromatogramme nach 24 Std Laufzeit luftgetrocknet und in 4 cm breite Längsstreifen (entsprechend der Trennungszone der jeweils aufgetragenen Probe) zerschnitten. Die Papierstreifen wurden im Papierradiochromatographen mit angeschlossenem Potentiometerschreiber (Friecke & Hoepfner, Erlangen) ausgezählt. Pyruvat wurde in einer modifizierten 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Methode (Kimberg u. Yielding,

1962) bestimmt. Der Nachweis des 3-Desoxy-D-arabino-heptulosonsäure-7-phosphats (DAHP) und der DAHP-Synthase wurde nach Doy u. Brown (1965) geführt.

Der Test zum Nachweis einer PEP-Synthase wurde in kleinen einarmigen Warburg-Gefäßen (ca. 6 ml Volumen) durchgeführt. Der Versuchsansatz enthielt (nach Cooper u. Kornberg, 1967; verändert) im Zentralzylinder: 0,10 ml KOH (20<sup>0</sup>/<sub>10</sub>ig) — im Hauptraum 100 µmole TEA-Puffer, pH 8,0 + DTT, CO<sub>2</sub>-frei, 10 µmole ATP, 5 µmole Pyruvat. Endvolumen 1,26 ml. Die Gefäße wurden 15 min im Wasserbad (30°C) vorinkubiert und mit CO<sub>2</sub>-freiem N<sub>2</sub> durchströmt. Der Reaktionsstart erfolgte durch Zukippen der Komponenten aus dem Seitenarm in den Hauptraum. In dem mit der DAHP-Synthase gekoppelten Test wurde 1 µmol Erythrose-4-phosphat zugegeben.

### Ergebnisse und Diskussion

Eine PEP-Synthase ist besonders dann unerlässlich, wenn dem Organismus Pyruvat, Lactat oder Alanin als einzige C-Quelle geboten wird. Daher wurden für die folgenden Versuche die Zellen von *H 16* jeweils über mehrere Passagen auf Lactat angezogen. Die Entscheidung, ob PEP in einem Testsystem, das Pyruvat, Mg<sup>++</sup>, ATP, Puffer und Zellextrakt enthält (Cooper u. Kornberg, 1967), direkt (nach Reaktion 1 oder 2) oder indirekt (über Oxalacetat) synthetisiert wird, ist nur dann möglich, wenn CO<sub>2</sub> als Reaktionspartner ausgeschlossen werden kann. Deshalb wurden die Versuche in Warburg-Gefäßen ausgeführt, deren Zentralzylinder 20<sup>0</sup>/<sub>10</sub>ige KOH als CO<sub>2</sub>-Absorptionsmittel enthielten und die vor dem Reaktionsstart mindestens 10 min mit CO<sub>2</sub>-freiem Stickstoff durchspült worden waren; es wurde CO<sub>2</sub>-freier Puffer eingesetzt.

#### Papier-Chromatographie von Phosphatestern

Wesentliche Bestandteile des Testansatzes nach dem Ablauf einer Pyruvat-Phosphorylierung können Orthophosphat und Phosphatester (AMP, PEP, ATP, ADP) sein. Zum Nachweis einer PEP-Synthase (Ansatz nach Cooper u. Kornberg, 1967) wurden zunächst Rohextrakte von Zellen von *H 16*, die auf Lactat oder autotroph gewachsen waren, bei verschiedenen pH-Werten des Puffers (7,3, 7,8, 8,24, 8,66) eingesetzt. Nach jeweils 5, 20 und 60 min wurde die Reaktion in je einem Ansatz durch HClO<sub>4</sub>-Zugabe abgestoppt. Die enteiweißten und neutralisierten Reaktionsansätze wurden im Vakuum zur Trockne eingengt. Der in wenig Wasser wiederaufgenommene Rückstand wurde absteigend in Faserichtung chromatographiert (Metzner, 1962; Hirsch, 1963). Als Vergleichssubstanzen liefen verschiedene Gemische aus ATP, P, PEP und ADP mit. Die Chromatogramme wurden nach 91 Std Laufdauer entwickelt. Positive Reaktionen ergaben Ansätze mit Rohextrakten aus lactat-gewachsenen Zellen bei einem pH des Puffers von 8,24 und 8,66 — jeweils nach 20 min Reaktionsdauer, d.h. hier wurde ein PEP-Fleck

durch Vergleich mit der Referenzsubstanz identifiziert. In den entsprechenden Ansätzen mit Rohextrakten autotroph gewachsener Zellen ließ sich kein PEP nachweisen.

#### Nachweis einer PEP-Synthese mit 3-<sup>14</sup>C-Pyruvat

Aus 3-<sup>14</sup>C-Pyruvat entsteht, wenn ein System zur PEP-Synthese vorhanden ist, markiertes PEP. Es läßt sich durch Papierchromatographie (System II, absteigend, Hirsch, 1963) vom Pyruvat trennen. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte im Radiopapierautographen.

Zum Vergleich von *H 16* mit einem Organismus, in dem PEP-Synthase bereits exakt nachgewiesen worden war, wurden zur Prüfung auf eine PEP-Synthese Rohextrakte aus *H 16* und *E. coli* eingesetzt. Beide Organismen waren auf Lactat gewachsen. In Parallelansätzen ohne ATP sollte keine PEP-Synthese stattfinden können. Aliquote Teile der nach 40 min abgestoppten Ansätze wurden chromatographiert und ausgewertet (Abb. 1). Die bei Stamm *H 16* erzielte Verteilung der Radioaktivität entspricht der, die sich unter gleichen Bedingungen für *E. coli* ergibt. Während in Ansätzen ohne ATP nur der Pyruvatgipfel sichtbar ist, tritt im kompletten Ansatz zusätzlich ein Radioaktivitätsgipfel im Areal des Phosphoenolpyruvat auf, wobei der Pyruvatgipfel abgenommen hat. In weiteren vergleichenden Versuchen mit *H 16* und *E. coli* wurde stärker markiertes Pyruvat eingesetzt. Die Reaktionen wurden jeweils nach verschiedenen Zeiten (5, 10, 20, 30, 40, 50 und 60 min) abgestoppt und die Proben wie beschrieben behandelt. Einem Gefäß wurde nach 50 min (unter „PEP-Synthese“-Bedingungen) Pyruvatkinase und ADP zugesetzt; es wurde weitere 20 min bei 30°C inkubiert. In diesem Ansatz sollte das möglicherweise synthetisierte Phosphoenolpyruvat wieder zu Pyruvat umgesetzt werden. Das ist, wie Abb. 2 zeigt, auch der Fall.

In fast allen Streifenchromatogrammen befinden sich 3 deutliche Gipfel mit den  $R_f$ -Werten (a) 27,0—29,6 (b) 38,3—44,1 und (c) 66—73. Aufgrund der von Hirsch (1963) für das Lösungsmittelsystem gewonnenen Daten und eines Vergleichs mit 3-<sup>14</sup>C-Pyruvat als Referenzsubstanz ist der Fleck (c) als Pyruvat identifiziert worden. Im gleichen System hat PEP nach Hirsch einen  $R_f$ -Wert von 39, so daß der Gipfel (b) markiertem PEP zugeordnet werden kann. Dafür spricht auch der Befund, daß in dem nachträglich mit Pyruvatkinase versetzten Ansatz der Gipfel (b) wieder abgenommen hat.

Schwierig bleibt die Zuordnung des sehr ausgeprägten Gipfels (a). Der Testansatz läßt die direkte Synthese einer Substanz dieses  $R_f$ -Wertes nicht erwarten. Vermutlich handelt es sich bei dieser stark markierten Verbindung um Aspartat ( $R_f = 23-30$ ). Das setzt allerdings voraus, daß trotz aller Maßnahmen, die ein CO<sub>2</sub>-freies System gewährleisten sollte,

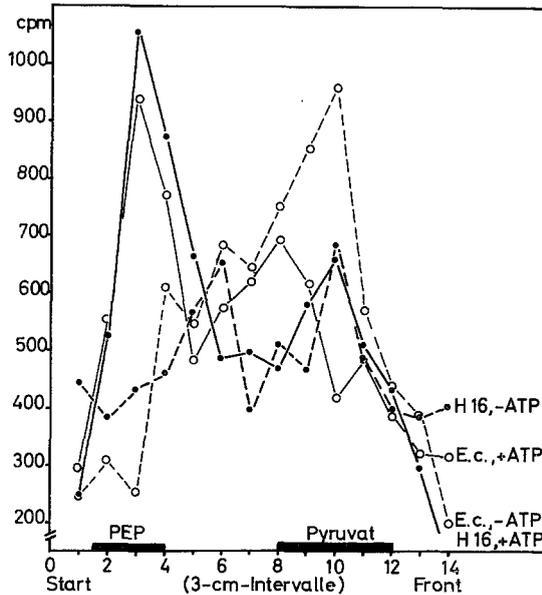


Abb. 1. Prüfung auf PEP-Synthese: Radiopapierchromatographischer Nachweis des durch Rohextrakte aus Stamm *H 16* und *E. coli K 12* gebildeten Phosphoenolpyruvats. Die Zellen wurden auf Lactat angezogen. Der Enzymtest wurde in 6 ml Warburg-Gefäßen bei 25°C durchgeführt. 1,26 ml Endvolumen enthielten 100  $\mu$ mole TEA-Puffer + DTT, CO<sub>2</sub>-frei, pH 8,24; 10  $\mu$ mole Mg<sup>++</sup>; 4,4 mg Protein im Rohextrakt; im Seitenarm: 4  $\mu$ mole ATP; 5  $\mu$ mole Pyruvat und 3-<sup>14</sup>C-Pyruvat mit  $1 \cdot 10^5$  cpm; im Zentralzylinder: 0,10 ml KOH (20%ig). Die Gefäße wurden 15 min mit CO<sub>2</sub>-freiem Stickstoff durchgespült. Der Start erfolgte durch das Zukippen der Komponenten aus dem Seitenarm in den Hauptraum. Die Auswertung (nach 40 min Reaktionsdauer) erfolgte chromatographisch und durch anschließendes Auszählen der Streifenchromatogramme im Radiopapierautographen. Auf der Abszisse sind die durch Farbreaktionen ermittelten Bereiche markiert, in denen PEP und Pyruvat lokalisiert sind

ausreichende Mengen Kohlendioxid für eine Carboxylierung von Pyruvat oder PEP im Testsystem vorhanden waren. Möglicherweise entstammt das CO<sub>2</sub> einer vom Rohextrakt katalysierten Decarboxylierung. Aspartat wurde bei Versuchen zur Carboxylierung von C<sub>3</sub>-Säuren mehrfach als stabiles Intermediärprodukt nachgewiesen.

Um Cofaktoren aus den Rohextrakten abzutrennen, die möglicherweise die Synthese der nicht sicher identifizierten Substanz begünstigen, wurden im nächsten Test bei sonst unveränderten Bedingungen Rohextrakte eingesetzt, die über eine Sephadex-G-25-Säule gegeben worden waren. Das Auszählen und Auswerten der Chromatogramme erbrachte jedoch keine Ergebnisse; es finden sich lediglich 2 benachbarte radio-

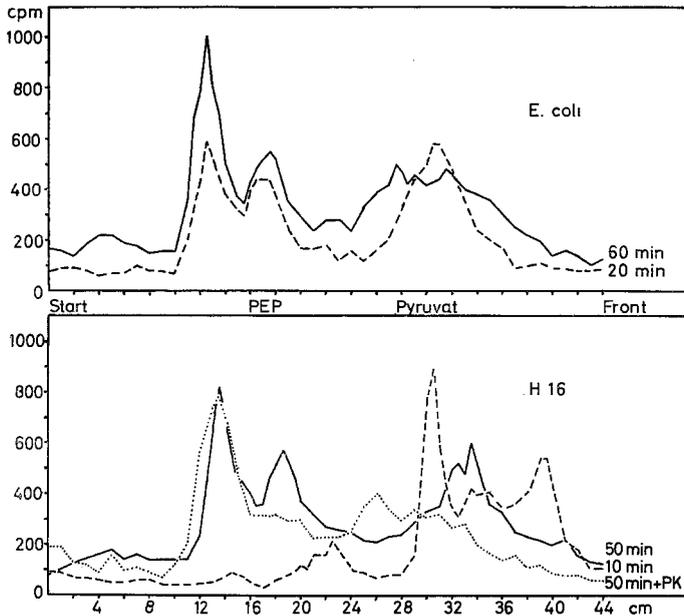


Abb. 2. Prüfung auf PEP-Synthese: Radiopapierchromatographischer Nachweis des durch Rohextrakte aus Stamm *H 16* und *E. coli K 12* gebildeten Phosphoenolpyruvats durch Vergleich mit einem mit Pyruvatkinase + ADP versetzten Reaktionsansatz. Versuchsbedingungen wie unter Abb. 1; die Reaktionsansätze enthielten (0,77 ml Endvolumen, 30°C): 100  $\mu$ mole Puffer pH 8,66, 8  $\mu$ mole  $Mg^{++}$ , 4  $\mu$ mole Pyruvat, 3- $^{14}C$ -Pyruvat, Rohextrakt (*H 16*: 3,2 mg Protein; *E. coli*: 2,6 mg Protein). Nach verschiedenen Zeiten wurde je ein Ansatz durch Zugabe von Perchlorsäure gestoppt. Ein Gefäß wurde nach 50 min Laufzeit geöffnet; 2,9  $\mu$ mole ADP und Pyruvatkinase wurden hineinpipettiert. Es wurde erneut  $CO_2$ -frei begast und nach weiteren 20 min Inkubation gestoppt

aktive Gipfel, die ihrem  $R_f$ -Wert nach mit dem eingesetzten Pyruvat identisch sind. Durch die Sephadex-Behandlung wurden offensichtlich für die PEP-Synthese benötigte Cofaktoren abgetrennt.

#### Nachweis durch Pyruvatbestimmung

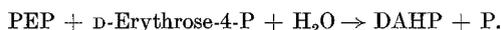
Cooper u. Kornberg (1967) verfolgten die PEP-Synthese-Reaktion sowohl in Rohextrakten als auch mit dem angereicherten Enzym von *E. coli*, indem sie die Abnahme des Pyruvats maßen. Mit Rohextrakten aus *E. coli K 12* wurde der PEP-Synthese-Test unter Bedingungen wiederholt, die denen von Cooper u. Kornberg (1967) möglichst genau entsprachen. Wurde in dem Test Rohextrakt aus mit Lactat gewachsenen *H 16*-Zellen eingesetzt, der mit Avidin vorinkubiert worden war, so ergab

die Pyruvatbestimmung nach dem Ablauf der Reaktion (30 min) im kompletten Ansatz 5,3  $\mu$ mole Pyruvat, im Ansatz ohne ATP 7,8  $\mu$ mole Pyruvat. Eingesetzt wurden 8  $\mu$ mole Pyruvat. Dieses Ergebnis gleicht dem, das mit *E. coli*-Extrakten erhalten wurde.

#### PEP-Nachweis im gekoppelten Test

Es ist unwahrscheinlich, daß sich aus Pyruvat synthetisiertes PEP im Testansatz stärker anreichert, wenn an Stelle des gereinigten Enzymproteins ein Zellrohextrakt eingesetzt wird. So arbeiten die meisten Autoren, die sich bisher mit der PEP-Synthase befaßten (Cooper u. Kornberg, 1965; Benziman, 1966; Hatch u. Slack, 1967) mit angereicherten Enzympräparaten, die keine Phosphatasen, Pyruvatkinase, PEP-Carboxykinase, PEP-Carboxylase oder Pyruvat-Carboxylase und keine Adenylatkinasen mehr enthielten.

Ein unkontrolliertes Abfließen des Substrates oder des Produktes der enzymatischen PEP-Synthase ließe sich durch eine Kopplung des Systems mit einer PEP verbrauchenden Reaktion verringern oder gar verhindern. Das Reaktionsprodukt würde laufend aus dem Gleichgewicht der Komponenten entfernt, die PEP-Synthase also begünstigt. Zu den wenigen Umsetzungen im Stoffwechsel, in denen PEP Reaktionspartner ist, zählt die am Anfang der Sequenzen zur Biosynthese aromatischer Aminosäuren stehende Kondensation von PEP und D-Erythrose-4-phosphat. Sie wird irreversibel von der 3-Desoxy-D-arabino-heptulosonsäure-7-phosphat-Synthase (E.C. 4.1.2.15, „DAHP-Synthase“) katalysiert (Srinivasan u. Sprinson, 1959; Srinivasan et al., 1959):



Nachteilig für eine Kopplung der Reaktionen der PEP-Synthase und der DAHP-Synthase ist die relativ hohe Unempfindlichkeit der beteiligten Enzyme gegenüber PEP. Der  $K_m$ -Wert der DAHP-Synthase für PEP ist mit  $1,8 \cdot 10^{-4}$  M (Doy, 1968) nicht viel günstiger als der für andere PEP verbrauchende Reaktionen wie die Pyruvatkinase ( $K_m = 6 \cdot 10^{-4}$  M; Taylor u. Bailey, 1967) oder die PEP-Carboxylase ( $K_m = 6,3 \cdot 10^{-4}$  M; Smith, 1968,  $5 \cdot 10^{-4}$ ; Maruyama et al., 1966). Neben der Irreversibilität der DAHP-Synthase-Reaktion ist von großem Vorteil, daß ihr Endprodukt in einer relativ einfachen und empfindlichen Farbreaktion nachweisbar ist. Eine Kopplung dieser PEP verbrauchenden mit einer PEP liefernden Reaktion bietet sich also an.

Die Reproduzierbarkeit des DAHP-Synthase-Tests nach Doy u. Brown (1965) wurde mit Rohextrakt aus glucose-gewachsenen Zellen von *E. coli* K 12 geprüft. Der Nachweis des Reaktionsproduktes (DAHP) im enteweißten Überstand wurde durch die Farbreaktion von Doy u.

Brown (1965) bzw. von Gollub et al. (1967) geführt. Danach wird das enzymatisch gebildete DAHP durch eine Behandlung mit Jodat in 3-P-Glycerinsäure und 3-Formyl-Pyruvat gespalten; letzteres ergibt mit 2-Thiobarbitursäure eine Rosafärbung, die sich bei 549 nm photometrisch messen läßt. Eine annähernd doppelte Empfindlichkeit erreicht man durch Extraktion des rosafarbenen Reaktionsproduktes mit Cyclohexanon.

Mit einem Rohextrakt aus lactat-gewachsenen Zellen von *E. coli K 12* wurden die Reaktionen der PEP-Synthase und der DAHP-Synthase miteinander gekoppelt: Die Komponenten des PEP-Synthase-Ansatzes wurden in kleinen Warburg-Gefäßen CO<sub>2</sub>-frei 30 min (30°C) inkubiert. Der DAHP-Nachweis führte zu einer positiven Reaktion. So ergab sich z. B. bei der DAHP-Bestimmung im Ansatz mit ATP eine Extinktion von 0,450; wurde ATP weggelassen, betrug die Extinktion 0,300.

Obwohl Stamm *H 16* ebenfalls über eine aktive DAHP-Synthase verfügt (Friedrich, 1970), wurde zum Nachweis der PEP-Synthase im Rohextrakt auf *H 16* im gekoppelten enzymatischen Test eine aus *E. coli* isolierte und teilweise gereinigte DAHP-Synthase (Sprinson et al., 1962) in Form einer Acetonfraktion zugesetzt. *H 16* und *E. coli K 12* waren auf Lactat angezogen worden. Die in Tab.1 zusammengefaßten Ergebnisse setzen in beiden Organismen Systeme voraus, die aus dem eingesetzten Pyruvat PEP synthetisieren. In *H 16* kann die Reaktion beschleunigt werden, wenn man das Hilfsenzym (DAHP-Synthase) als angereichertes Präparat dem Reaktionsgemisch beifügt. In *E. coli* erfolgt die PEP-Synthase durch die PEP-Synthase (Cooper u. Kornberg, 1965).

#### Nachweis der Nucleotide, die im Pyruvat-Carboxylierungstest entstehen

Für die direkte Synthese von Oxalacetat aus Pyruvat und CO<sub>2</sub> durch das Biotinenzym Pyruvat-Carboxylase ist ATP erforderlich: eines der Reaktionsprodukte ist ADP. Wird aber OAA über den Umweg über

Tabelle 1. *Nachweis von Phosphoenolpyruvat aus Pyruvat und ATP im gekoppelten Test mit DAHP-Synthase als Hilfsenzym*

Ansatz	Extinktion <sup>a</sup>	
	<i>H 16</i>	<i>E. coli K 12</i>
Komplett	0,380	0,530
ohne Pyruvat	0,066	0,050
ohne Erythrose-4-P	0,040	0,035
ohne Acetonfraktion	0,320	nicht geprüft

<sup>a</sup> Die Bestimmung von DAHP erfolgte nach 30 min langer Inkubation des Reaktionsgemisches bei 30°C. Angegeben ist die Extinktion bei 549 nm nach Anwendung des Thiobarbitursäuretests. Weitere Erklärungen im Text.

Tabelle 2. Bestimmung der bei der von Pyruvat ausgehenden Carboxylierung durch eine teilweise gereinigte Fraktion von Stamm H 16 aus ATP gebildeten Nucleotide

Reaktionsgemisch	Inkubationszeit (min)	Reaktionsprodukte ( $\mu$ mole/6,5 ml Ansatz)		
		Pyruvat	ADP	AMP
1 Basismedium <sup>b</sup> + Extrakt <sup>a</sup>	0	0,092	0,450	0,047
	10	0,121	0,486	0,066
	20	0,127	0,471	0,056
2 <sup>c</sup> Basismedium <sup>b</sup>	0	0,112	0,259	0,135
	10	0,108	0,285	0,116
	20	0,112	0,267	0,114
3 Basismedium <sup>b</sup> + Extrakt <sup>a</sup> + Adenylatkinase	0	0,121	0,148	—
	10	0,132	0,222	0,019
	20	0,165	0,204	0,019
4 Basismedium <sup>b</sup> + Extrakt <sup>a</sup> + PyrC-Komponenten <sup>d</sup>	0	1,520	0,302	0,196
	10	1,140	0,276	0,545
	20	1,140	0,265	0,550

<sup>a</sup> Es kam die Ammoniumsulfatfraktion, 50–55% Sättigung, aus Rohextrakten lactat-gewachsener Zellen zur Verwendung. In dieser Fraktion sind PEP-Synthase- und PEP-Carboxylase-Aktivitäten enthalten. Jeder Ansatz enthielt 1,50 mg Protein.

<sup>b</sup> Das Basismedium besteht aus 0,50 ml 0,2 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,8; 3 mM EDTA; 0,04 ml MgSO<sub>4</sub>, 0,5 M; 0,08 ml KCl, 2 M; 0,01 ml ATP, 0,2 M; 1,50 ml H<sub>2</sub>O.

<sup>c</sup> Diese Werte entsprechen den Reagentienleerwerten der enzymatischen Bestimmung von Pyruvat, ADP und AMP im Basismedium.

<sup>d</sup> Dieser Ansatz enthielt alle Komponenten eines Pyruvat-Carboxylase-Tests, also zusätzlich zum Basismedium Rinderserumalbumin, Pyruvat, KHCO<sub>3</sub>, NADH und Malat-DH.

Den bei 30°C inkubierten Ansätzen wurden zu den angegebenen Zeit Proben (0,70 ml) entnommen; sie wurden durch Inkubation bei 100°C (4 min) abgestoppt. Je 0,50 ml der entweißten Probe wurden zum enzymatischen Nachweis der aufgeführten Substanzen (Adam, 1962) verwendet.

PEP durch eine PEP-Synthase und die PEP-Carboxylase synthetisiert, so entsteht AMP und P (oder PP). Eine Umkehr der Pyruvatkinase-Reaktion, bei der ADP gebildet würde, braucht aus energetischen Gründen kaum in Betracht gezogen zu werden. Die quantitative Bestimmung der bei der Synthese von OAA aus Pyruvat unter Verwendung von ATP gebildeten Nucleotide AMP und ADP kann als weiterer Hinweis auf die tatsächlich abgelaufene Reaktion angesehen werden. Es muß allerdings vorausgesetzt werden, daß der eingesetzte Extrakt keine störende Adenylatkinase-Aktivität ( $2 \text{ ADP} \rightleftharpoons \text{AMP} + \text{ATP}$ ) enthält. Zur Prüfung dieser Frage wurden 4 Reaktionsansätze zusammengestellt (Tab. 2). Aus diesen jeweils bei 30°C inkubierten Ansätzen wurden nach den angegebenen Zeiten Proben entnommen und auf ihren AMP- und ADP-Gehalt

hin im enzymatischen Test (Adam, 1962) geprüft. Aus den im optischen Test gemessenen Extinktionsdifferenzen lassen sich dann die Pyruvat-, ADP- und die AMP-Konzentrationen berechnen. Die gegen den Ansatz „2“ veränderten ADP- und AMP-Mengen in den anderen Ansätzen können als ein Hinweis auf eine geringe Phosphatase- und Myokinase-Aktivität angesehen werden. Im Ansatz „2“ wird der Reagentien-Leerwert der mit dem Basismedium eingesetzten Substanzen erfaßt. Durch den Zusatz von Myokinase (Ansatz „3“) ändern sich die AMP- und ADP-Mengen während der Inkubation nicht wesentlich. Dagegen ergibt die Analyse des Pyruvat-Carboxylierungs-Ansatzes eine auffallende Zunahme der AMP-Menge, die etwa der Abnahme des Pyruvats entspricht. Die ADP-Menge bleibt annähernd gleich.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zeigen, daß unter Pyruvatverbrauch AMP gebildet wird; das deutet auf eine direkte PEP-Synthese aus Pyruvat hin. Die Befunde stehen mit den Ergebnissen der vorangehend beschriebenen Versuche in Einklang und besagen, daß Stamm *H 16* über ein PEP synthetisierendes Enzym verfügt und Oxalacetat wie *E. coli K 12* über die kombinierte Funktion dieses Enzyms und der PEP-Carboxylase synthetisiert.

### Literatur

- Adam, H.: Adenosin-5'-diphosphat und Adenosin-5'-monophosphat. In: H.-U. Bergmeyer, Methoden enzymatischer Analyse, pp. 573—577. Weinheim: Verlag Chemie 1962.
- Benziman, M.: Implication of the direct phosphorylation of pyruvate in cellulose synthesis by *Acetobacter xylinum*. Biochem. biophys. Res. Commun. **24**, 391—394 (1966).
- Buchanan, B. B., Evans, M. C. W.: The synthesis of phosphoenolpyruvate from pyruvate and ATP by extracts of photosynthetic bacteria. Biochem. biophys. Res. Commun. **22**, 484—488 (1966).
- Cooper, R. A., Kornberg, H. L.: Net formation of phosphoenolpyruvate from pyruvate by *Escherichia coli*. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **104**, 618—620 (1965).
- — The direct synthesis of phosphoenolpyruvate from pyruvate by *Escherichia coli*. Proc. roy. Soc. B **168**, 263—280 (1967).
- Doy, C. H.: The nature of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase in extracts of wild-type *Neurospora crassa*: A ping-pong reaction controlled by two activating substrates and three allosteric negative modifiers. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **159**, 352—366 (1968).
- Brown, K. D.: Control of aromatic biosynthesis: The multiplicity of 7-phospho-2-oxo-3-deoxy-D-arabino heptonate D-erythrose-4-phosphate lyase (pyruvate phosphorylating) in *Escherichia coli* W. Biochim. biophys. Acta (Amst.) **104**, 377—389 (1965).
- Evans, H. J., Wood, H. G.: P-enolpyruvate synthesis from pyruvate. Fed. Proc. **27**, 588 (1968).
- Friedrich, C. G.: Isolierung Antimetabolit-resistenter, Metabolite ausscheidender Mutanten von *Hydrogenomonas H 16* und Untersuchung der DAHP-Synthase. Diplomarbeit Göttingen 1970.

- Frings, W., Schlegel, H. G.: Zur Synthese von C<sub>4</sub>-Dicarbonsäuren aus Pyruvat durch *Hydrogenomonas eutropha* Stamm H 16. Arch. Mikrobiol. **79**, 204—219 (1971).
- Gollub, E., Zalkin, H., Sprinson, D. B.: Correlation of genes and enzymes, and studies on regulation of the aromatic pathway in *Salmonella*. J. biol. Chem. **242**, 5323—5328 (1967).
- Hanes, C. S., Isherwood, F. A.: Separation of the phosphate esters on the filter paper chromatogram. Nature (Lond.) **164**, 1107—1112 (1949).
- Hatch, M. D., Slack, C. R.: The participation of phosphoenolpyruvate synthetase in photosynthetic CO<sub>2</sub>-fixation of tropical grasses. Arch. Biochem. **120**, 224—225 (1967).
- Herman, N. J., Bell, E. J.: Metabolic control in *Acinetobacter* sp. I. Effect of C<sub>4</sub> versus C<sub>2</sub> and C<sub>3</sub> substrates on isocitrate lyase synthesis. Canad. J. Microbiol. **16**, 769—774 (1970).
- Hirsch, P.: CO<sub>2</sub>-Fixierung durch Knallgasbakterien. II. Chromatographischer Nachweis der frühzeitigen Fixierungsprodukte. Arch. Mikrobiol. **46**, 53—78 (1963).
- Kimberg, D. V., Yielding, K. L.: Pyruvate kinase. Structural and functional changes induced by diethylstilbestrol and certain steroid hormones. J. biol. Chem. **237**, 3233—3239 (1962).
- Maruyama, H., Easterday, R. L., Chang, H. C., Lane, M. D.: The enzymatic carboxylation of phosphoenolpyruvate. I. Purification and properties of phosphoenolpyruvate carboxylase. J. biol. Chem. **241**, 2405—2412 (1966).
- Metzner, H.: Papierchromatographische Trennung der Photosynthese-Intermediärprodukte. Naturwissenschaften **49**, 183 (1962).
- O'Brien, R. W., Stern, J. R.: Role of sodium in determining alternate pathways of aerobic citrate catabolism in *Aerobacter aerogenes*. J. Bact. **99**, 389—394 (1969).
- Reeves, R. E.: A new enzyme with the glycolytic function of pyruvate kinase. J. biol. Chem. **243**, 3202—3204 (1968).
- Menzies, R. A., Hsu, D. S.: The pyruvate-phosphate dikinase reaction. The fate of phosphate and the equilibrium. J. biol. Chem. **243**, 5486—5491 (1968).
- Slack, C. R.: The photoactivation of a phosphopyruvate synthase in leaves of *Amaranthus palmeri*. Biochem. biophys. Res. Commun. **30**, 483—486 (1968).
- Smith, T. E.: *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate carboxylase. Characterization and sedimentation behavior. Arch. Biochem. **128**, 611—622 (1968).
- Sprinson, D. B., Srinivasan, P. R., Katagiri, M.: 3-deoxy-D-arabinoheptulosonic acid 7-phosphate synthetase from *Escherichia coli*. In: S. P. Colowick, N. O. Kaplan, Methods in enzymology, Vol. 5, pp. 394—402. New York: Academic Press 1962.
- Srinivasan, P. R., Katagiri, M., Sprinson, D. B.: The conversion of phosphoenolpyruvic acid and D-erythrose 4-phosphate to 5-dehydroquinic acid. J. biol. Chem. **234**, 713—715 (1959).
- Sprinson, D. B.: 2-keto-3-deoxy-D-arabo-heptonic acid 7-phosphate synthetase. J. biol. Chem. **234**, 716—722 (1959).
- Taylor, C. B., Bailey, E.: Activation of liver pyruvate kinase by fructose 1,6-diphosphate. Biochem. J. **102**, 32C (1967).

Dr. W. Frings  
 Prof. Dr. H. G. Schlegel  
 Institut für Mikrobiologie  
 D-3400 Göttingen, Grisebachstraße 8  
 Deutschland