

NADP- und NAD-spezifische Isocitrat-Dehydrogenase in *Hydrogenomonas eutropha* Stamm H 16

HERMANN GLAESER und HANS G. SCHLEGEL

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

Eingegangen am 1. Juni 1972

NADP- and NAD-Specific Isocitrate Dehydrogenase in *Hydrogenomonas eutropha* Strain H 16

Summary. From crude extracts of fructose-grown cells of *Hydrogenomonas eutropha* strain H 16 both a NADP- and a NAD-specific isocitrate dehydrogenase have been separated and partially purified. With respect to their affinity for isocitrate and NADP or NAD, respectively, both enzymes are very similar. Both enzymes are inhibited by ATP, the NADP-dependent enzyme is activated by AMP and ADP in addition. The NAD-specific enzyme is inhibited by NADH₂. Both enzymes are highly inhibited if glyoxylate and oxalacetate are concomitantly added to the enzyme reaction mixture.

Zusammenfassung. Aus einem Rohextrakt von *Hydrogenomonas eutropha* Stamm H 16-Fruktosezellen wurden eine NADP- und eine NAD-spezifische Isocitrat-Dehydrogenase teilweise gereinigt und getrennt. Beide Enzyme sind in ihrer Affinität zum Isocitrat und zu NADP bzw. NAD sehr ähnlich. Beide Enzyme werden durch ATP gehemmt, das NADP-abhängige Enzym wird außerdem durch AMP und ADP aktiviert. Das NAD-abhängige Enzym wird durch NADH₂ gehemmt. Beide Enzyme werden stark gehemmt, wenn Glyoxylat und Oxalacetat gemeinsam dem Reaktionsgemisch zugesetzt werden.

Die Isocitrat-Dehydrogenase der meisten Bakterien ist NADP-spezifisch. Lediglich bei *Xanthomonas* und *Thiobacillus* konnten Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivitäten mit NADP und NAD als Cofaktoren nachgewiesen werden (Madsen u. Hochster, 1959; Kaplan, 1963; Matin u. Rittenberg, 1971). In einigen Fällen ließen sich Isoenzyme der NADP-Isocitrat-Dehydrogenase nachweisen (Reeves et al., 1968; Self u. Weitzman, 1970). *Hydrogenomonas eutropha* H 16 verfügt über eine NADP- und eine NAD-spezifische Isocitrat-Dehydrogenase (Glaeser u. Schlegel, 1972). In der vorliegenden Arbeit werden ein Verfahren zur Trennung beider Enzyme und der Einfluß verschiedener Substanzen auf ihre Aktivität beschrieben.

Verwendete Abkürzungen: CTAB = Cetyltrimethylammoniumbromid; DEAE = Diäthylaminoäthyl; TCC = Tricarbonsäurecyclus; Tris = Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan.

Methoden

Wachstumsbedingungen von *Hydrogenomonas eutropha* Stamm H 16 (ATCC 17699), die Gewinnung des Rohextraktes und die Methoden der Enzymbestimmungen stimmen mit den beschriebenen Methoden überein (Glaeser u. Schlegel, 1972).

Chemikalien: Whatman DEAE-Cellulose (DE 52) wurde von W. and R. Balston Ltd., Maidstone, bezogen. Die Herkunft der übrigen Chemikalien kann der vorangehenden Arbeit entnommen werden.

Ergebnisse

Die Syntheseraten der NADP- und der NAD-abhängigen Isocitrat-Dehydrogenase hängen in verschiedener Weise von der Art der Kohlenstoff- und Stickstoffquelle ab: die NADP-spezifische Isocitrat-Dehydrogenase weist die höchste Syntheserate in Malatzellen auf, die niedrigste in Fructose-, Allantoin- und autotrophen Zellen. Umgekehrt verhält es sich beim NAD-spezifischen Enzym. Daneben gibt es noch weitere Indizien für das Vorliegen von zwei separaten Enzymen: mit NAD ist die spezifische Aktivität des Enzyms in Tris-Acetat-Puffer wesentlich höher als in Tris-HCl-Puffer; beim NADP-Enzym ist ein solcher Unterschied nicht vorhanden. Beide Enzyme sind vom pH in verschiedener Weise abhängig. Eine weitere Möglichkeit zur Unterscheidung liegt in der Hitzestabilität: 5 minütige Erwärmung des Rohextraktes auf 48°C führte zur völligen Inaktivierung des NADP-abhängigen Enzyms, während das NAD-spezifische Enzym diese Behandlung ohne Aktivitätsverlust überstand.

Durch Chromatographie an Sephadex G-200 ließen sich die beiden Enzyme nur unbefriedigend trennen. Eine hinreichende Trennung wurde durch Chromatographie an DEAE-Cellulose unter Einschaltung eines Hitzeschritts erzielt. Im einzelnen wurde folgender Reinigungsgang ausgearbeitet:

1. *Fällung mit Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)*. Aus dem durch Beschallung gewonnenen Rohextrakt von Fructosezellen wurden durch Zentrifugation bei 90 000 g (60 min) Zelltrümmer abgetrennt; das Überstehende wurde durch Zugabe von 0,3 Volumina einer 2%igen CTAB-Lösung (pH 7,0) von den Nucleinsäuren und von einem Teil der Proteine befreit; die Zentrifugation erfolgte bei 25 000 g (30 min).

2. *Ammoniumsulfat-Fraktionierung*. Der durch Zusatz von festem Ammoniumsulfat auf 30% Sättigung gebrachte Überstand wurde nach 20 min zentrifugiert (30 min, 25 000 g); der Niederschlag wurde verworfen. Das Überstehende wurde zu 60% mit Ammoniumsulfat gesättigt und nach 20 min zentrifugiert (20 min, 25 000 g). Das Sediment wurde in 4 ml 0,05 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,2, aufgelöst und über eine Sephadex G-25-Säule entsalzt.

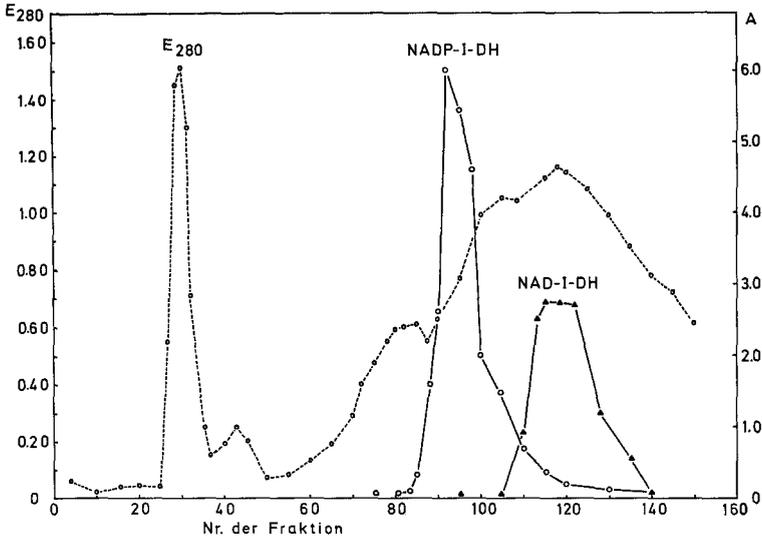


Abb.1. Trennung von NADP- und NAD-spezifischer Isocitrat-Dehydrogenase durch DEAE-Cellulose-Säulenchromatographie. Die Elution erfolgte mit einem linearen Tris-HCl-Puffer-Gradienten (0,05–0,40 M, pH 7,2). Das Volumen der Fraktionen betrug ca. 3 ml. E_{280} Extinktion bei 280 nm; A spezifische Enzymaktivität. NADP-Isocitrat-Dehydrogenase in E /ml Extrakt; NAD-Isocitrat-Dehydrogenase in E /6 ml Extrakt

3. *Chromatographie an DEAE-Cellulose.* Das Eluat wurde auf eine DEAE-Cellulose-Säule (40 cm lang, 2,5 cm \varnothing) aufgetragen, die vorher mit dem 3fachen Volumen 0,05 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,2, äquilibriert worden war. Die Elution erfolgte mit einem linearen Tris-HCl-Puffer-Gradienten (0,05–0,40 M, pH 7,2). Das Eluat wurde in 3 ml-Fraktionen aufgefangen. Die Gipfel des zuerst erscheinenden NADP-spezifischen und des nachfolgenden NAD-spezifischen Enzyms überlappten sich (Abb.1). Die Fraktionen wurden in der Weise vereinigt, daß das NADP-spezifische Enzym frei von NAD-Aktivität war, während in der NAD-Enzym-Fraktion noch Aktivität mit NADP nachzuweisen war. Beide Fraktionen wurden zu 60% mit Ammoniumsulfat gesättigt und nach 20 min bei 25000 g abzentrifugiert. Der in jeweils 4 ml 0,05 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,2, aufgelöste Niederschlag wurde mit Hilfe von Sephadex G-25 entsalzt.

4. *Hitzeschritt.* Die Hitzelabilität des NADP-Enzyms ermöglichte es, die das NAD-Enzym enthaltende Fraktion vom verunreinigenden NADP-Enzym zu befreien; die Lösung wurde in einem Reagensglas 5 min lang im Wasserbad auf 48°C erhitzt. Nach rascher Abkühlung im Eisbad

Tabelle 1. Anreicherung und Trennung der NADP- und der NAD-spezifischen Isocitrat-Dehydrogenase aus *H. eutropha* H 16

Fraktion	Extrakt- volumen (ml)	Protein (mg/ml)	NADP Ges.-akt.	NADP spez. Akt.	Aus- beute (%)	An- reiche- rung	NAD Ges.-akt.	NAD spez. Akt.	Aus- beute (%)	An- reiche- rung
Rohextrakt	31,0	41,5	710	550	100,0	1,0	58,3	45,3	100	1,0
CTAB-Fällung	34,2	18,6	680	1065	95,7	1,9	60,0	94,0	103	2,1
(NH ₄) ₂ SO ₄ -Fraktion (30—60% Sättg.)	7,0	59,9	352	840	49,5	1,5	45,0	107	77,3	2,4
DEAE-Cell. ^a NADP	4,5	4,1	81	4350	11,4	7,9	—	—	—	—
DEAE-Cell. ^b NAD	4,0	7,2	—	—	—	—	13,3	463	17,2	10,4
Hitzeschritt	4,0	3,7	—	—	—	—	13,3	900	17,2	19,9

Als Ausgangsmaterial wurden Fructosezellen verwendet. Angabe der spezifischen Aktivität in μmol Substrat/min/g Protein.

^a Die Fraktionen 90—105 wurden vereinigt und auf 60% Ammoniumsulfat-Sättigung gebracht. Das ausgefällte Protein wurde in 4,5 ml Tris-HCl-Puffer (0,05 M; pH 7,2) aufgenommen.

^b Die Fraktionen 111—126 wurden vereinigt und auf 60% Ammoniumsulfat-Sättigung gebracht. Das ausgefällte Protein wurde in 4,0 ml Tris-HCl-Puffer (0,05 M; pH 7,2) aufgenommen und die Lösung einem Hitzeschritt (5 min; 48°C) unterworfen.

wurde 30 min bei 25000 g zentrifugiert. Der klare Überstand war frei von Aktivität mit NADP als Cofaktor, während das NAD-spezifische Enzym die Behandlung ohne Aktivitätsverlust überstanden hatte. Wurden die zur Bereitung des Rohextraktes verwendeten Fructosezellen 14 Tage lang im eingefrorenen Zustand aufbewahrt, so gingen die Aktivitäten der Citrat-Synthase, Aconitase und α -Ketoglutarat-Dehydrogenase völlig verloren. Da die Isocitrat-Lyase-Aktivität in Fructosezellen verschwindend gering ist, war es gewährleistet, daß beide Fraktionen von möglicherweise störenden Verunreinigungen frei sind.

In Tab.1 sind die Ergebnisse der Anreicherungs- und Trennungsschritte zusammengefaßt.

Regulation der Aktivität der NADP- und NAD-spezifischen Isocitrat-Dehydrogenase

Die Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeiten gegen die Isocitrat- bzw. NADP- und NAD-Konzentration ergibt für beide Isocitrat-Dehydrogenasen hyperboloide Substratsättigungskurven (Abb.2—5). Die K_m -Werte beider Enzyme für Isocitrat bzw. NADP und NAD unterscheiden sich nicht wesentlich voneinander (Tab.2). Den Abb.2—5 ist zu entnehmen, daß Adeninnucleotide die beiden Enzyme im gleichen Sinne beeinflussen. Eine Herabsetzung des K_m -Wertes durch AMP oder

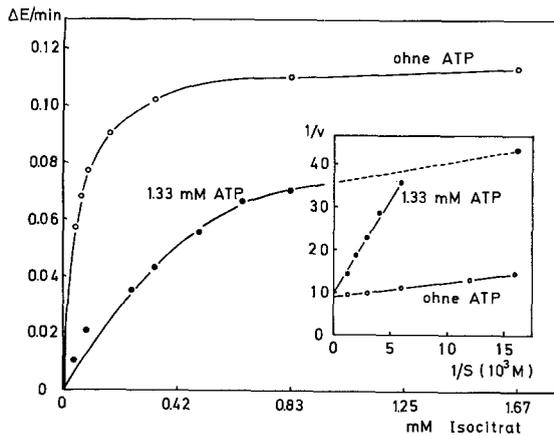


Abb.2. Substrat-(Isocitrat)-Sättigungskurve der NAD-spezifischen Isocitrat-Dehydrogenase in Abwesenheit und Gegenwart von ATP (1,33 mM) und Lineweaver-Burk-Auftragung zur Ermittlung des K_m -Wertes des Enzyms für Isocitrat unter beiden Bedingungen. Das Reaktionsgemisch enthielt 150 μ mole Tris-Acetat-Puffer, pH 8,0; 2 μ mole $MnCl_2$; 4 μ mole NAD; Kalium-DL-Isocitrat; 0,03 ml Enzym und 4 μ mole ATP in 3,00 ml Endvolumen

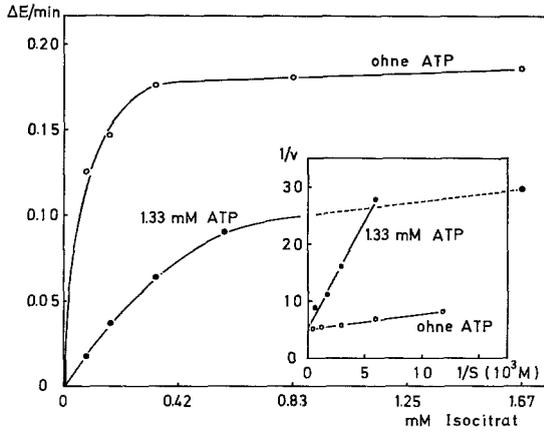


Abb. 3. Substrat-(Isocitrat)-Sättigungskurve der NADP-spezifischen Isocitrat-Dehydrogenase in Abwesenheit und Gegenwart von ATP (1,33 mM) und Lineweaver-Burk-Auftragung zur Ermittlung des K_m -Wertes für Isocitrat unter beiden Bedingungen. Das Reaktionsgemisch enthielt 150 μ mole TEA-Puffer; pH 8,0; 2 μ mole $MnCl_2$; 4 μ mole NADP; Kalium-DL-Isocitrat; 0,01 ml Enzym und 4 μ mole ATP in 3,00 ml Endvolumen

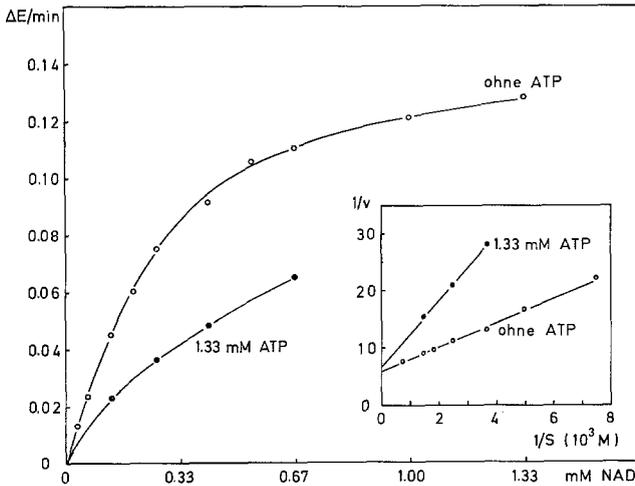


Abb. 4. Substrat-(NAD)-Sättigungskurve der NAD-spezifischen Isocitrat-Dehydrogenase in Abwesenheit und Gegenwart von ATP (1,33 mM) und Lineweaver-Burk-Auftragung zur Ermittlung des K_m -Wertes des Enzyms für NAD unter beiden Bedingungen. Das Reaktionsgemisch enthielt 150 μ mole Tris-Acetat-Puffer, pH 8,0; 2 μ mole $MnCl_2$; 5 μ mole Kalium-DL-Isocitrat; NAD; 0,03 ml Enzym und 4 μ mole ATP in 3,00 ml Endvolumen

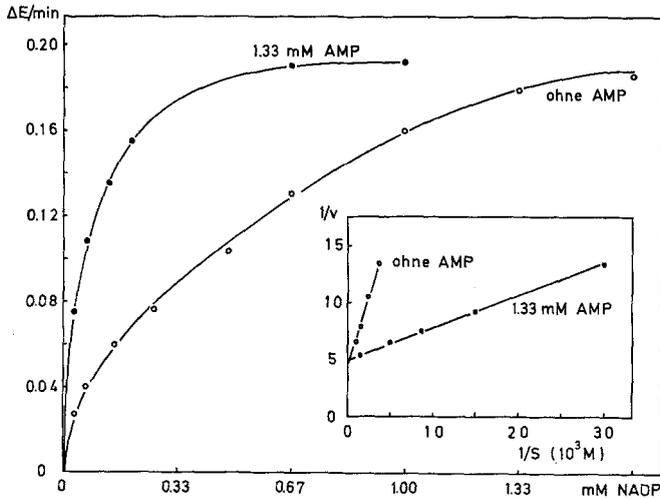


Abb. 5. Substrat-(NADP)-Sättigungskurve der NADP-spezifischen Isocitrat-Dehydrogenase in Abwesenheit und Gegenwart von AMP (1,33 mM) und Lineweaver-Burk-Auftragung zur Ermittlung des K_m -Wertes des Enzyms für NADP unter beiden Bedingungen. Das Reaktionsgemisch enthielt 150 μ mole TEA-Puffer, pH 8,0; 2 μ mole $MnCl_2$; 5 μ mole Kalium-DL-Isocitrat; NADP; 0,01 ml Enzym und 4 μ mole AMP in 3,00 ml Endvolumen

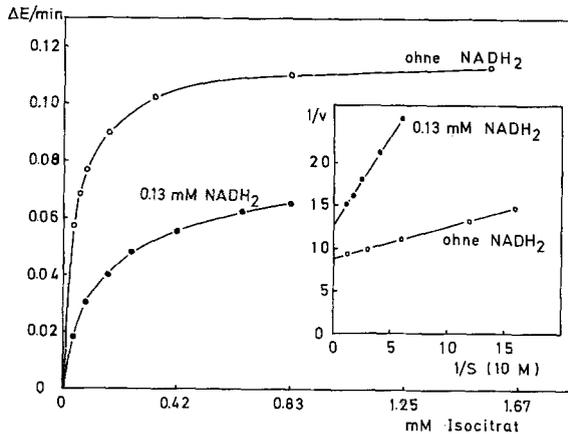


Abb. 6. Substrat-(Isocitrat)-Sättigungskurve der NAD-spezifischen Isocitrat-Dehydrogenase in Abwesenheit und Gegenwart von $NADH_2$ (0,13 mM) und Lineweaver-Burk-Auftragung zur Ermittlung des K_m -Wertes des Enzyms für Isocitrat unter beiden Bedingungen. Das Reaktionsgemisch enthielt 150 μ mole Tris-Acetat-Puffer, pH 8,0; 4 μ mole NAD; Kalium-DL-Isocitrat; 0,03 ml Enzym und 0,4 μ mole $NADH_2$ in 3,00 ml Endvolumen

Tabelle 2. K_m -Werte der NADP- und NAD-spezifischen Isocitrat-Dehydrogenase für Isocitrat bzw. NADP und NAD

	K_m -Werte	
	NADP-I-DH	NAD-I-DH
Isocitrat	$0,6 \cdot 10^{-4}$ M	$0,3 \cdot 10^{-4}$ M
NADP	$0,5 \cdot 10^{-3}$ M	—
NAD	—	$0,3 \cdot 10^{-3}$ M

Tabelle 3. Hemmung der NADP- und NAD-spezifischen Isocitrat-Dehydrogenase durch Glyoxylat + Oxalacetat

Zusatz jeweils 1 mM	Hemmung in Prozenten	
	NADP-I-DH	NAD-I-DH
Glyoxylat	0	0
Oxalacetat	4	6
Glyoxylat + Oxalacetat	100	100
Glyoxylat + Malat	0	6
Glyoxylat + Succinat	0	6
Pyruvat + Oxalacetat	14	12
Glyoxylat + Oxalacetat (0,5 mM)	100	95
Glyoxylat + Oxalacetat (0,25 mM)	90	64

ADP ist einer Erhöhung dieses Wertes durch ATP stoffwechsel-physiologisch gleichwertig. NADH_2 hemmt das NAD-Enzym stark (Abb. 6), hatte jedoch keinen Einfluß auf das NADP-spezifische Enzym. α -Keto-glutarat rief bei keinem der beiden Enzyme eine nennenswerte Hemmung hervor. Beide Enzyme wurden durch Glyoxylat + Oxalacetat stark gehemmt (Tab. 3).

Diskussion

Seit der Entdeckung von Kornberg u. Pricer (1951), daß die NAD-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase aus Hefe durch AMP aktiviert wird, wurden die Isocitrat-Dehydrogenasen aus verschiedenen Eukaryonten hinsichtlich ihres Verhaltens gegenüber Adeninnucleotiden untersucht (Chen u. Plaut, 1963; Hathaway u. Atkinson, 1963; Goebell u. Klingenberg, 1964; Sanwal et al., 1964; Sanwal u. Stachow, 1965; Atkinson, 1968). Es zeigte sich, daß das NAD-spezifische Enzym auf zumindest ein Nucleotid anspricht. Die Aktivität des NADP-abhängigen Enzyms

wird demgegenüber anscheinend durch andere Faktoren beeinflusst (Ernster u. Navazio, 1956; Klingenberg u. Slenczka, 1959; Garland, 1968).

Die meisten Bakterien verfügen über eine NADP-spezifische Isocitrat-Dehydrogenase (Kaplan, 1963), einige auch über Isoenzyme (Reeves et al., 1968; Self u. Weitzman, 1970). Auch für bakterielle Isocitrat-Dehydrogenasen wurde in einigen Fällen eine Kontrolle ihrer Aktivität durch Adeninnucleotide nachgewiesen (Marr u. Weber, 1968; Hampton u. Hanson, 1969). Parker u. Weitzman (1970) konnten die NADP-Isocitrat-Dehydrogenase-Isoenzyme aus *Acinetobacter lwoffii* trennen. Nur eines dieser Isoenzyme wurde durch AMP und ADP aktiviert, das andere weder durch AMP noch durch ADP oder ATP beeinflusst. Bei *H. eutropha H 16* werden beide Isocitrat-Dehydrogenasen durch Adeninnucleotide im gleichen Sinne beeinflusst; die Metabolitkontrolle wirkt sich nur auf die Rate des Isocitrat-Durchsatzes, nicht jedoch auf die anteilmäßige Reduktion des NAD bzw. NADP aus.

Neben den Adeninnucleotiden kann noch eine Reihe von anderen Faktoren die Aktivität der Isocitrat-Dehydrogenasen beeinflussen. Sanwal et al. (1963) und Sanwal u. Stachow (1965) beobachteten bei *Neurospora crassa* eine Aktivierung des NAD-spezifischen Enzyms durch Citrat („precursor activation“) und eine Hemmung durch α -Ketoglutarat. Das NAD-abhängige Enzym aus *H. eutropha* wird durch α -Ketoglutarat kaum, durch NADH₂ dagegen stark gehemmt. Das NADP-spezifische Enzym wird durch diese beiden Substanzen nicht beeinflusst. Es ist daher möglich, daß das intracelluläre NADP/NADPH₂- und das NAD/NADH₂-Verhältnis für die relative Rate beider Reaktionen von Bedeutung sind. Nicht mit dieser Annahme im Einklang steht jedoch der Befund, daß unter autotrophen Bedingungen (niedriges NAD/NADH₂-Verhältnis) die Syntheserate des NAD-abhängigen Enzyms relativ hoch ist.

Beide Isocitrat-Dehydrogenasen von *H. eutropha H 16* unterliegen auch einer konzertierten feedback-Hemmung durch Glyoxylat + Oxalacetat. Wenn beide Säuren in jeweils 0,5 mM Konzentration vorliegen, ist die Hemmung nahezu vollkommen. Diese konzertierte Hemmung ist von Shio u. Ozaki (1968) und Ozaki u. Shio (1968) an *Brevibacterium flavum* entdeckt und als ein Mechanismus erkannt worden, nach dem der Umsatz des Isocitrats dem Bedarf der Zelle entsprechend entweder über den TCC oder den Glyoxylat-Cyclus reguliert wird. Nach den Untersuchungen der genannten Autoren besteht über den Mechanismus der Verteilung von Isocitrat als Substrat der Isocitrat-Dehydrogenase und der Isocitrat-Lyase folgende Vorstellung: der K_m -Wert der Isocitrat-Dehydrogenase für Isocitrat ist wesentlich niedriger als der der Isocitrat-Lyase; die Isocitrat-Lyase wird durch TCC-Intermediärprodukte ge-

hemmt; haben diese eine verhältnismäßig niedrige intracelluläre Konzentration, so kann die Isocitrat-Lyase nur dann den Hauptteil des Isocitrats umsetzen, wenn der K_m -Wert der Isocitrat-Dehydrogenase für Isocitrat erhöht wird. Diese Erhöhung wird durch Glyoxylat + Oxalacetat bewirkt. Bei dieser konzertierten feedback-Hemmung handelt es sich um ein weitverbreitetes Phänomen: Die NADP-spezifischen Enzyme aus *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* und Schweineherz (Shiio u. Ozaki, 1968), *Halobacterium cutirubrum* (Hubbard u. Miller, 1970) und *Crithidia fasciculata* (Marr u. Weber, 1968) unterliegen dieser Hemmung. Beim Enzym aus Schweineherz dürfte es sich um eine rudimentäre Eigenschaft handeln; für *H. eutropha* H 16 könnte dieser Effekt zusammen mit der Kontrolle der Isocitrat-Dehydrogenasen durch Adenin-nucleotide von Bedeutung sein.

Literatur

- Atkinson, D. E.: Citrate and the citrate cycle in the regulation of energy metabolism. In: Metabolic roles of citrate. T. W. Goodwin ed. Biochem. Soc. Symp. **27**, 23—39 (1968).
- Chen, R. F., Plaut, G. W. E.: Activation and inhibition of DPN-linked isocitrate dehydrogenase of heart by certain nucleotides. Biochemistry **2**, 1023—1032 (1963).
- Ernster, L., Navazio, F.: The cytoplasmic distribution of isocitric dehydrogenases. Exp. Cell Res. **11**, 483—486 (1956).
- Garland, P. B.: Control of citrate synthesis in mitochondria. In: Metabolic roles of citrate. T. W. Goodwin, ed. Biochem. Soc. Symp. **27**, 41—60 (1968).
- Glaeser, H., Schlegel, H. G.: Synthese der Enzyme des Tricarbonsäure-Cyclus in *Hydrogenomonas eutropha* Stamm H 16. Arch. Mikrobiol. **86**, 315—325 (1972).
- Goebell, D. E., Klingenberg, M.: DPN-spezifische Isocitrat-Dehydrogenase der Mitochondrien. I. Kinetische Eigenschaften, Vorkommen und Funktion der DPN-spezifischen Isocitrat-Dehydrogenase. Biochem. Z. **340**, 441—464 (1964).
- Hampton, M. L., Hanson, R. S.: Regulation of isocitrate dehydrogenase from *Thiobacillus thiooxidans* and *Pseudomonas fluorescens*. Biochem. biophys. Res. Commun. **36**, 296—305 (1969).
- Hathaway, J. A., Atkinson, D. E.: The effect of adenylic acid on yeast nicotinamide adenine dinucleotide isocitrate dehydrogenase, a possible metabolic control mechanism. J. biol. Chem. **238**, 2875—2881 (1963).
- Hubbard, J. S., Miller, A. B.: Nature of the inactivation of the isocitrate dehydrogenase from an obligate halophile. J. Bact. **102**, 677—681 (1970).
- Kaplan, N. O.: Multiple forms of enzymes. Bact. Rev. **27**, 155—169 (1963).
- Klingenberg, M., Slenczka, W.: Pyridinnucleotide in Leber-Mitochondrien. Eine Analyse ihrer Redoxbeziehungen. Biochem. Z. **331**, 486—517 (1959).
- Kornberg, A., Pricer, W. E.: Di- and triphosphopyridine nucleotide isocitrate dehydrogenases in yeast. J. biol. Chem. **189**, 123—136 (1951).
- Madsen, N. W., Hochster, R. M.: The tricarboxylic acid and glyoxylate cycles in *Xanthomonas phaseoli*. Canad. J. Microbiol. **5**, 1—8 (1959).
- Marr, J. J., Weber, M. M.: Studies on the mechanism of purine nucleotide inhibition of a triphosphopyridine nucleotide specific isocitrate dehydrogenase. J. biol. Chem. **243**, 4973—4979 (1968).

- Matin, A., Rittenberg, S. C.: Enzymes of carbohydrate metabolism in *Thiobacillus* species. *J. Bact.* **107**, 179—186 (1971).
- Ozaki, H., Shiiio, I.: Regulation of the TCA and glyoxylate cycles in *Brevibacterium flavum*. I. Inhibition of isocitrate lyase and isocitrate dehydrogenase by organic acids related to the TCA and glyoxylate cycles. *J. Biochem.* **64**, 355—363 (1968).
- Parker, M. H., Weitzman, P. D. J.: Regulation of NADP-linked isocitrate dehydrogenase activity in *Acinetobacter*. *FEBS-Letters* **7**, 324—326 (1970).
- Reeves, H. C., Brehmeyer, B. A., Ajl, S.: Multiple forms of bacterial NADP-specific isocitrate dehydrogenase. *Science* **162**, 359—360 (1968).
- Sanwal, B. D., Stachow, C. S.: Allosteric activation of nicotinamide adenine dinucleotide specific isocitrate dehydrogenase of *Neurospora*. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **96**, 28—44 (1965).
- Zink, M. W., Stachow, C. S.: Control of DPN-specific isocitric dehydrogenase activity by precursor activation and end product inhibition. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **12**, 510—515 (1963).
- — — Nicotinamide adenine dinucleotide-specific isocitric dehydrogenase. A possible regulatory protein. *J. biol. Chem.* **293**, 1597—1603 (1964).
- Self, C. H., Weitzman, P. D. J.: Separation of isoenzymes by zonal centrifugation. *Nature (Lond.)* **225**, 644—645 (1970).
- Shiiio, I., Ozaki, H.: Concerted inhibition of isocitrate dehydrogenase by glyoxylate plus oxalacetate. *J. Biochem.* **64**, 45—53 (1968).

Dr. Hermann Glaeser
Institut für Mikrobiologie
der Universität des Saarlandes
D-6600 Saarbrücken
Bundesrepublik Deutschland

Prof. Dr. Hans G. Schlegel
Institut für Mikrobiologie
der Gesellschaft für Strahlen- und
Umweltforschung mbH., München
D-3400 Göttingen, Grisebachstr. 8
Bundesrepublik Deutschland