

## Der Aminosäurepool von *Escherichia coli* bei Aminosäureaushungerung\*

Von

Paul Broda\*\*

Aus dem Molecular Biology and Virus Laboratory, University of California,  
Berkeley, CA 94720, USA

Mit 1 Abbildung

(Eingegangen am 12. August 1970)

### *The Amino Acid Pool of Escherichia coli under Amino Acid Starvation*

Amino acid pools from strains of *Escherichia coli* were extracted and analyzed. They were similar to each other in total amino acid composition: in all cases glutamate was the predominant amino acid. However, there were differences between strains in the relative abundance of some of the other amino acids. After arginine starvation or histidine starvation, arginine and histidine respectively were no longer present in detectable amounts in the amino acid pool. However, leucine was present in the pool of a leucine-starved culture, and glycine was present in the pool of a glycine-starved culture. On simultaneous withdrawal of exogenous arginine and histidine, neither amino acid could be detected in the pool. The presence of the *rel* allele had no effect on the pool either of exponentially growing or of amino acid starved cultures. Isoleucine and valine were not detected in the pool of a downshifted, non-growing culture of an RC<sup>rel</sup> strain; the presence of these amino acids allowed growth to continue. This supports the hypothesis that the lag caused by the downshift is due to starvation for isoleucine and valine.

Aminosäurepools von *Escherichia coli*-Stämmen wurden extrahiert und analysiert. Sie waren einander ähnlich in ihrer Gesamtaminosäurezusammensetzung: in allen Fällen bestand Glutamat die vorherrschende Aminosäure. Jedoch bestanden unter den Stämmen Unterschiede in der relativen Häufigkeit von einigen der anderen Aminosäuren. Nach Aushungerung in bezug auf Arginin oder Histidin lagen Arginin bzw. Histidin nicht mehr in nachweisbaren Mengen im Aminosäurepool vor. Hingegen war Leucin im Pool einer nicht mit Leucin versorgten Kultur vorhanden, und Glycin im Pool einer glycinfrei ernährten Kultur. Bei gleichzeitigem Entzug von exogenem Arginin und

---

\* Gewidmet Professor Dr. E. Broda zu seinem 60. Geburtstag.

\*\* Gegenwärtige Adresse: Department of Molecular Biology, University of Edinburgh, Edinburgh 9, Scotland.

Histidin konnte keine dieser beiden Aminosäuren im Pool nachgewiesen werden. Die Anwesenheit des *rel*-Allels hatte weder einen Effekt auf den Pool exponentiell wachsender Kulturen noch auf den Pool aminosäureausgehungerter Kulturen. Isoleucin und Valin wurden im Pool einer nicht wachsenden, „downshifted culture“\* eines  $RC^{rel}$ -Stammes nicht gefunden; die Anwesenheit dieser Aminosäuren gestattete ein Weiterwachsen. Das unterstützt die Hypothese, daß die durch downshift verursachte Hemmung auf der Aushungerung bezüglich Isoleucin und Valin beruht.

### Einleitung

Es liegt eine Reihe von Untersuchungen über den Aminosäurepool von *Escherichia coli* vor<sup>1-5</sup>. Man schätzte den Gehalt an freien Aminosäuren in exponentiell wachsenden Kulturen von *E. coli*, in aminosäureausgehungen Kulturen und solchen, die mit Chloramphenicol behandelt wurden, ab und kam zur Schlußfolgerung, daß allgemein der gesamte Pool an Größe zunimmt, wenn die Proteinsynthese gehemmt wird. Die vorliegende Mitteilung beschreibt eingehende Analysen der Zusammensetzung des Aminosäurepools verschiedener Stämme von *E. coli* unter den Bedingungen des exponentiellen Wachstums und der Aushungerung. Diese Analysen bestätigen die früheren Beobachtungen eines allgemeinen Anwachsens der Poolgröße während des Zufuhrstopps. In zwei Fällen, nämlich bei Arginin und bei Histidin, trat, wie erwartet, bei Zufuhrstop ein Verschwinden der betreffenden Aminosäure aus dem Aminosäurepool ein. In zwei weiteren Fällen, nämlich bei fehlender Zufuhr von Glycin und Leucin, stellte man jedoch wider Erwarten fest, daß die nicht zugeführte Aminosäure nicht aus dem Pool verschwindet.

### Materialien und Arbeitsweise

Die verwendeten Bakterienstämme sind in Tab. 1 angeführt. Kulturen von 200 ml wurden bei 37° in einem M9-Glucose-Medium<sup>6</sup> gezüchtet,

\* Unter einem „downshift experiment“ versteht man einen Versuch, bei dem eine Kultur von einem kompletteren in ein inkompletteres Medium gebracht wird. Wir behalten in dieser Arbeit den englischen Ausdruck bei und bezeichnen so behandelte Kulturen als „downshifted cultures“ (Anm. d. Übers.).

<sup>1</sup> R. J. Britten und F. T. McClure, *Bacteriol. Rev.* **26**, 292 (1962).

<sup>2</sup> D. B. Cowie, *Metabolic pools and the biosynthesis of protein*. In: *Amino Acid Pools* (Herausgeber J. T. Holden), S. 633—645. Amsterdam: Elsevier, 1962.

<sup>3</sup> J. T. Holden, *The composition of microbial amino acid pools*. In: *Amino Acid Pools* (Herausgeber J. T. Holden), S. 73—108. Amsterdam: Elsevier, 1962.

<sup>4</sup> J. Mandelstam, *Biochem. J.* **69**, 103 (1958).

<sup>5</sup> N. S. Willetts, *Biochem. J.* **103**, 453 (1967).

<sup>6</sup> E. H. Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **32**, 120 (1946).

dem 100 µg/ml der betr. Aminosäuren, 20 µg/ml Thiamin und 2 µg/ml Biotin, wo es erforderlich war, beigelegt wurden. Das Wachstum wurde mit einem Klett-Summerson-Photometer verfolgt. Eine Klett-Einheit der optischen Dichte entspricht ungefähr  $10^7$  Zellen pro ml der Kultur. Zur Extraktion der Aminosäurepools wurden die Bakterien auf einem Filter gesammelt und bei 37° mit zwei 50-ml-Portionen von vorgewärmtem M9-Medium, dem Glucose, aber keine Aminosäure beigegeben wurde, gewaschen. Kontroll-experimente zeigten, daß wiederholtes Waschen mit vorgewärmtem M9-Medium keinen Verlust der Aminosäuren aus den Bakterien verursachte, was frühere Beobachtungen bestätigt<sup>7</sup>. Die Bakterien wurden anschließend mit 10 ml kalter 5proz. Trichloressigsäure (*TCA*) aus dem Filter gewaschen. Diese Suspension wurde 30 Min. bei 4° C aufbewahrt und dann zur Entfernung der Zelltrümmer 10 Min. mit 5000g zentrifugiert. *TCA* wurde aus der überstehenden Flüssigkeit durch 10 aufeinanderfolgende Ätherextraktionen entfernt; die wäbr. Phase wurde gefriergetrocknet. Der getrocknete Extrakt wurde in einem Citratpuffer bei pH 2.2 suspendiert und in einem Spinco-Automatic Aminosäureanalysator auf seinen Aminosäuregehalt untersucht. Während der Ätherextraktionen geht ein Teil der Aminosäuren verloren. In Kontrollexperimenten, bei denen Aminosäuregemische von bekannter Zusammensetzung verwendet wurden, konnte man feststellen, daß die einzelnen Aminosäuren mit einer Wirksamkeit von ungefähr 60% wiedergefunden werden.

Für einige Aminosäuren werden wegen technischer Schwierigkeiten keine Werte angegeben: Tryptophan wird im Aminosäureanalysator abgebaut;

Tabelle 1. Verwendete Stämme

Stamm	Genotyp <sup>a</sup>	Herkunft
B	prototroph	b
<i>Barg</i>	<i>arg</i>	b
CP 78	<i>thr leu arg his thi rel</i> <sup>+</sup>	s
CP 79	<i>thr leu arg his thi rel</i>	s
58—161	<i>met bio rel</i> <sup>+</sup>	9
W 6	<i>met rel</i> -1	10
PB 408	<i>met argA gly rel</i> <sup>+</sup>	c

<sup>a</sup> Verwendete genotypische Symbole: *arg*: Arginin; *bio*: Biotin; *gly*: Glycin; *his*: Histidin; *leu*: Leucin; *met*: Methionin; *rel*: Kontrolle der RNS-Synthese; *thi*: Thiamin; *thr*: Threonin. *RC*<sup>str</sup>, *RC*<sup>rel</sup> sind die phänotypischen Symbole für strenge (stringent), bzw. relaxierte (relaxed) Kontrolle der RNS-Synthese.

<sup>b</sup> Von *P. Donini*.

<sup>c</sup> Ein *argA rel*-Derivat von Stamm S 35 (*met gly rel arg*<sup>+</sup>)<sup>11</sup>, das durch Transduktion isoliert wurde.

<sup>7</sup> *R. J. Britten*, Science **124**, 935 (1956).

<sup>8</sup> *N. Fiil* und *J. D. Friesen*, J. Bacteriol. **95**, 729 (1968).

<sup>9</sup> *J. Lederberg*, Genetics **32**, 505 (1947).

<sup>10</sup> *E. Borek*, *A. Ryan* und *J. Rockenbach*, J. Bacteriol. **69**, 460 (1955).

<sup>11</sup> *L. Alföldi*, *G. S. Stent*, *M. Hoogs* und *R. Hill*, Z. Vererbungslehre **94**, 285 (1963).

kleine Mengen von Prolin und Methionin sind schwierig zu schätzen, weil Peaks von nicht identifizierten Verbindungen stören.

Die Peaks von Serin, Asparagin und Glutamin konnten in dem hier verwendeten Analysesystem nicht voneinander getrennt werden; außerdem liegen sie sehr nahe beim Threonin. Die Peaks des oxidierten und des reduzierten Glutathions liegen nahe dem des Aspartats. Deshalb wurde ein Aliquot jeder Probe nach milder Säurehydrolyse (3N-HCl; 100°; 30 Min.) analysiert. Dabei wird Glutathion abgebaut, Asparagin in Aspartat, Glutamin in Glutamat umgewandelt. Im Abschnitt Ergebnisse sind daher Aspartat und Asparagin gemeinsam angegeben; für Glutamin wird kein Wert genannt, weil in allen Fällen der maximal mögliche Betrag an Glutamin (wie man aus der geringen Größe des Prähydrolyse-Peaks schließen kann), verglichen mit dem Glutamat-Peak, sehr klein ist.

### Ergebnisse

#### *Der Aminosäurepool des Stammes CP 78 bei exponentiellem Wachstum und bei Stop der Zufuhr einer notwendigen Aminosäure*

Eine exponentiell wachsende Kultur von CP 78 (Arg<sup>-</sup> His<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> Thr<sup>-</sup>) wurde bei Erreichen einer Dichte von ungefähr  $4 \cdot 10^8$  Zellen/ml filtriert und gewaschen, und der Pool wurde, wie in Materialien und Arbeitsweise beschrieben, extrahiert. Größe und Zusammensetzung des Aminosäurepools dieses Extrakts sind in Tab. 2 dargestellt. Wie man sieht, waren 72% des gesamten Poolextrakts Glutamat und ungefähr 9% Aspartat. Obwohl es möglich ist, daß ein Teil des Wachstumsmediums trotz Filtration und Waschen mit den Bakterien assoziiert blieb, stellte man fest, daß diese vier Aminosäuren auch in Poolextrakten von Kulturen anderer Stämme, die in Abwesenheit dieser Aminosäuren gezüchtet wurden, vorhanden waren.

Es wurde die Auswirkung des Zufuhrstops von entweder Arginin oder Leucin auf den Aminosäurepool des Stammes CP 78 untersucht. Eine exponentiell wachsende Kultur wurde filtriert, gewaschen und in einem neuen Medium, in dem Arginin und Leucin fehlten, wieder suspendiert. Einem aliquoten Teil davon wurde Arginin zugesetzt, dem anderen Leucin. Nach zwei Stunden Inkubationszeit wurden die Kulturen geerntet und die Aminosäurepools extrahiert und analysiert. Diese Ergebnisse sind ebenfalls in Tab. 2 angegeben. Man erkennt daraus, daß im Aminosäurepool einer Kultur, die nicht mit Arginin gefüttert worden war, kein Arginin festgestellt werden konnte, während Leucin offensichtlich noch immer in beträchtlichen Mengen im Pool einer Kultur, der man kein Leucin zugeführt hatte, vorhanden war. Man kann daraus schließen, daß wenig oder gar kein Arginin im Pool von nicht mit Arginin belieferten Bakterien vorhanden ist, daß hingegen Leucin im Pool von nicht mit Leucin belieferten Bakterien bestehen bleibt.

Tab. 2 zeigt auch, daß der Gesamtpool einer nicht mit Arginin belieferten Kultur des Stammes CP 78 um ungefähr 40% größer ist als

Tabelle 2. Mengen an freien Aminosäuren in den Aminosäurepools von Kulturen des Stammes CP 78<sup>a</sup>

	exponentiell wachsend	Kultur nicht mit Arginin beliefert	nicht mit Leucin beliefert
Gesamtpool (nM/Klett ml Bakterien)	141	198	365
% Alanin	0.8	0.6	0.3
% Arginin	1.4	< 0.1	2.0
% Aspartat	8.8	6.7	4.7
% Cystein	1.5	0.3	0.1
% Glutamat	72	63	79
% Glycin	0.9	1.2	0.5
% Histidin	1.3	1.6	1.6
% Isoleucin	0.8	0.2	0.4
% Leucin	5.0	7.9	0.8
% Lysin	2.1	13.3	5.5
% Methionin	—	—	—
% Phenylalanin	0.3	0.9	0.5
% Prolin	—	—	—
% Serin	1.7	1.9	0.8
% Threonin	2.0	1.2	2.2
% Tyrosin	0.4	1.2	0.9
% Valin	0.9	0.3	0.1

<sup>a</sup> Arginin, Histidin, Leucin und Threonin liegen im Medium in Konzentrationen von ungefähr  $4-6 \cdot 10^{-4} M$  vor,

der Pool einer exponentiell wachsenden Kultur. Die Mengen der meisten Aminosäuren im Pool nehmen zu. Der auffallendste Unterschied zeigt sich in der sechsfachen Zunahme der relativen Konzentration des Lysins. Das Anwachsen des Gesamtpools rührt hauptsächlich von der Zunahme der Glutamat- und Lysinmenge her. Der Pool, der aus einer nicht mit Leucin belieferten Kultur extrahiert wird, ist um mehr als das Doppelte größer als der Pool, der aus einer exponentiell wachsenden Kultur extrahiert wird, was wiederum auf der Zunahme der Glutamat- und der Lysinmenge beruht. Aus diesen Beobachtungen kann man den Schluß ziehen, daß bei Aminosäureaushungerung der Aminosäurepool an Größe zunimmt, und daß der Betrag der Zunahme von der Aminosäure abhängt, die man nicht zuführt.

#### *Vergleich des Aminosäurepools des Stammes CP 78 mit dem anderer Stämme*

Die Aminosäurepools von vier anderen Stämmen von *E. coli* wurden mit dem des Stammes CP 78 verglichen. Diese Stämme waren B und sein

Abkömmling *Barg*, Stamm 58—161 (RC<sup>str</sup>) und sein RC<sup>rel</sup> Abkömmling W 6. In Tab. 3 sind Bestimmungen der gesamten Aminosäurepools, die in exponentiell wachsenden Kulturen dieser fünf Stämme vorliegen, und der relativen Mengen an Alanin, Aspartat, Glutamat, Leucin und Lysin (fünf der in den Pools am häufigsten vorkommenden Aminosäuren), ausgedrückt in Prozent des Gesamtpools, angegeben.

Die erste Schlußfolgerung ist, daß die Aminosäurepools von vier der fünf Stämme sehr ähnliche Größen haben. Eine Ausnahme bildet der Stamm *Barg*, der einen um das Zweieinhalbfache größeren Pool als sein Mutterstamm, B, hat. Bei allen fünf Stämmen ist Glutamat die vorherrschende Aminosäure, obwohl bei den Stämmen 58—161 und W 6 der Anteil an Glutamat im Gesamtpool geringer ist als in den anderen drei Stämmen; in diesen beiden Stämmen ist die relative Bedeutung des Aspartats größer. Es gibt auch Unterschiede in den relativen Mengen der anderen Aminosäuren. So erstreckt sich die relative Konzentration an Alanin von 0.6% in Stamm W 6 bis 5% in Stamm B, während sich die Leucinkonzentration zwischen 0.3% in Stamm W 6 bis 5% in CP 78 bewegt.

Tabelle 3. Größe der Aminosäurepools von fünf Stämmen von *E. coli* bei exponentiellem Wachstum und die Beträge von fünf Aminosäuren in diesen Pools

	CP 78 <sup>a</sup>	B	<i>Barg</i> 58—161	W 6	
Total nM/Klett ml	141	175	432	157	182
% Alanin	0.8	5	3	2	0.6
% Asparat	8.8	5	8	21	20
% Glutamat	72	79	77	55	58
% Leucin	5 <sup>b</sup>	0.7	3	0.4	0.3
% Lysin	2	1	2	2	1

<sup>a</sup> Siehe Tab. 2.

<sup>b</sup> Im Medium als Zusatz vorhanden.

Man verglich den Effekt, der bei einer 2stdg. Aushungerung bezüglich Arginin auftritt, auf den Pool des Stammes *Barg* mit dem Effekt auf den Pool des Stammes CP 78, der bereits beschrieben wurde. Es zeigte sich, daß, wie im Pool einer nicht mit Arginin belieferten Kultur des Stammes CP 78, Arginin nicht mehr nachweisbar war. Wie bei Stamm CP 78 kam es zu einer Zunahme der Poolgröße (hauptsächlich Ansteigen der Glutamatmenge und beachtliche Zunahme der Lysinmenge auf 8% des Gesamtpools).

Stamm PB 408 (*met argA gly*) hat einen Bedarf an Aminosäuren, der sowohl durch Serin als auch durch Glycin, die metabolisch interconvertibel sind, gedeckt werden kann. Dieser Stamm wurde untersucht, um

festzustellen, welchen Effekt die Inkubation in einem Glycin-freien Medium auf den Aminosäurepool hat. Um herauszufinden, ob Serin vorhanden ist, wurde ein aliquoter Teil des Poolextraktes einer milden Säurehydrolyse unterzogen, um Asparagin und Glutamin in Aspartat bzw. Glutamat überzuführen (s. unter „Materialien und Arbeitsweise“). Dabei zeigte sich, daß sowohl Serin als auch Glycin noch vorhanden waren, und zwar in Konzentrationen von ungefähr 1.8 bzw. 2.4 nM/Klett/ml Bakterien, verglichen mit Konzentrationen von 2.4 und 11 nM/Klett/ml, die im Pool einer exponentiell wachsenden, mit Glycin gefütterten Kontrollkultur auftraten. Man folgerte daraus, daß der Stop der Glycin-zufuhr nur einen geringen Einfluß auf die im Pool vorhandenen Mengen an Serin und Glycin ausübt.

*Vergleich des Aminosäurepools eines RC<sup>str</sup>-Stammes mit dem eines RC<sup>rel</sup>-Stammes bei Aminosäureaushungierung*

Es ist bekannt<sup>12</sup>, daß RC<sup>rel</sup>-Stämme bei Aminosäureaushungierung Glutamat ausscheiden, RC<sup>str</sup>-Bakterien hingegen nicht. Aus diesem Grund wurden die Aminosäurepools des Stammes CP 79, eines RC<sup>rel</sup>-Abkömmlings des Stammes CP 78, mit denen des Stammes CP 78 verglichen, wobei man Extrakte von sowohl exponentiell wachsenden Kulturen als auch Kulturen, denen man entweder kein Arginin oder kein Leucin zugeführt hatte, verwendete. Unter jeder dieser physiologischen Bedingungen hatten die Pools von Stamm CP 79 ähnliche Größen und ähnliche Zusammensetzung wie die entsprechenden Pools, die man von Stamm CP 78 extrahierte. Insbesondere waren die Glutamatmengen in den beiden Stämmen sehr ähnlich. Der einzige bemerkenswerte Unterschied war, daß die relative Menge an Lysin im Pool eines entweder bezüglich Arginin oder Leucin ausgehungerten Stammes von CP 78 (RC<sup>str</sup>) doppelt so groß war wie in den Pools, die man von Stamm CP 79 (RC<sup>rel</sup>) erhielt.

*Gleichzeitiger Stop der Zufuhr zweier Aminosäuren*

Eine Frage, die sich durch direkte Analyse der Aminosäurepools beantworten läßt, ist, ob eine effektive Aushungierung bezüglich mehr als einer Aminosäure möglich sei. Es könnte der Fall sein, daß zu einem bestimmten Zeitpunkt nur eine Aminosäure wachstumsgehemmt ist, und daß sich deshalb andere Aminosäuren im Pool anreichern. Um dieses Problem zu lösen, wurde eine exponentiell wachsende Kultur des Stammes CP 79 (Arg<sup>-</sup> His<sup>-</sup>) filtriert, gewaschen und in einem Medium, das weder Histidin noch Arginin enthielt, suspendiert. Diese Kultur wurde dann in drei aliquote Teile geteilt; einem Teil setzt man Histidin

<sup>12</sup> P. Broda, J. Bacteriol. **96**, 1528 (1968).

zu, einem weiteren Arginin und dem dritten keine dieser beiden Aminosäuren. Nach 2 Stdn. wurden die Kulturen geerntet und die Aminosäurepools extrahiert und analysiert. Wie in Tab. 4 gezeigt wird, fand man, daß kein Arginin im Pool der nicht mit Arginin belieferten Kultur und kein Histidin im Pool der nicht mit Histidin belieferten Kultur vorhanden war; beide Aminosäuren fehlten im Pool jener Kultur, der man weder Arginin noch Histidin zugeführt hatte. Wie man ersehen kann, nimmt in jedem der drei Fälle die Lysinmenge im Pool zu. Aus der Beobachtung, daß in der weder mit Arginin noch mit Histidin belieferten Kultur keine dieser beiden Aminosäuren nachgewiesen werden konnte, schloß man, daß es möglich sei, in diesem speziellen Fall einen gleichzeitigen Stop der Zufuhr dieser beiden Aminosäuren durchzuführen.

Tabelle 4. Aminosäurepools von Stamm CP 79 bei gleichzeitigem Stop der Zufuhr von Histidin und Arginin

Kultur	Vorhandene Mengen (nM/Klett ml Bakterien) an		
	Arginin	Histidin	Lysin
Exponentiell	1.0	1.8	3.5
—Arginin	< 0.1	2.0	10.2
—Histidin	1.6	< 0.1	8.5
—Arginin, Histidin	< 0.1	< 0.1	9.0

*Der Aminosäurepool einer downshifted culture eines RC<sup>rel</sup>-Stammes*

Verfolgt man die Wachstumsabnahme beim Übergang von einem mit Casamino-säuren angereicherten Medium in ein Medium, das nur jene Aminosäuren enthält, bezüglich derer ein Bakterium auxotroph ist, beobachtet man einen sofortigen Stillstand des Wachstums, und insbesondere der Proteinsynthese<sup>11</sup>. Es wurde angenommen, daß dieser Stillstand der Proteinsynthese auf der Repression einiger für die Biosynthese von Aminosäuren notwendiger Enzyme durch exogene Aminosäuren, die in dem mit Casamino-säuren versorgten Medium vorhanden sind, beruht. Daher sind die Bakterien zum Zeitpunkt ihres shiftdown physiologisch auxotroph. Das Wachstum der Bakterien im Minimalmedium setzt erst dann wieder ein, wenn diese Enzyme nach der Derepression in der Zeit nach dem downshift gebildet wurden. Wir führten ein Experiment durch, um den Effekt auf den Aminosäurepool des Stammes W 6 (Met<sup>-</sup> RC<sup>rel</sup>), hervorgerufen durch einen solchen shiftdown in ein Medium, das als einzige Aminosäure Methionin enthielt, zu messen. 2 Stdn. nach dem shiftdown, als in der Kultur das Wachstum noch nicht eingesetzt hatte, wurde sie geerntet, und der Pool wurde extrahiert und analysiert. Man stellte fest, daß der Pool um ungefähr 70% größer war als der Pool einer exponentiell wachsenden Kultur dieses Stammes. Insbesondere

nahm Lysin um das Siebenfache zu, und Glutamat verdoppelte sich; diese Zunahmen waren jenen, die man bei bezüglich Arginin oder Leucin ausgehungerten Bakterien beobachtet hatte, vollkommen analog. Während die meisten anderen Aminosäuren im Pool, den man aus der downshifted culture extrahiert hatte, zumindest ebenso häufig auftraten wie im Pool einer exponentiell wachsenden Kultur, konnte man weder Valin noch Isoleucin nachweisen. Auf Grund dieser Beobachtung scheint es, als hungerten die Bakterien bei downshift-Bedingungen effektiv nach diesen beiden Aminosäuren.

Man stellte fest<sup>11</sup>, daß Stämme mit dem Phänotyp RC<sup>rel</sup> wesentlich länger bis zum Einsetzen des Wachstums nach einem downshift brauchen als Stämme mit dem Phänotyp RC<sup>str</sup>; tatsächlich sind einige Zellen einer downshifted culture des Stammes W 6 (RC<sup>rel</sup>), eines Stammes, der schon in den früheren Experimenten verwendet wurde, nicht imstande, wieder zu wachsen, wenn man sie nach einem shiftdown auf ein Minimalmedium überimpft. Der Zusatz von Leucin zu solchen Kulturen bewirkte eine weitere hundertfache Abnahme der kolonienbildenden Zellen; jedoch erzeugten alle Zellen in der Population neue Kolonien, wenn man den Platten Isoleucin, Valin sowie Leucin zusetzte<sup>13</sup>. Das stimmt mit der Beobachtung überein, daß Isoleucin und Valin im Pool einer downshifted culture des Stammes W 6 nicht vorliegen, wie schon weiter oben erwähnt wurde, und bestärkt die Vermutung, daß die Ursache für die Unfähigkeit dieses Stammes, nach einem shiftdown wieder zu wachsen, in seiner Aus-hungerung bezüglich Isoleucin und Valin liegt. Diese Schlußfolgerung wurde weiters durch die Ergebnisse eines Wachstumsexperimentes untermauert. Eine exponentiell wachsende Kultur des Stammes W 6, die man mit Casaminosäuren belieferte, wurde filtriert, gewaschen und in einem Methioninhaltigen Medium wieder suspendiert. Diese Kultur teilte man in drei aliquote Teile und setzte dem ersten die Casaminosäuremischung zu, der zweite erhielt keine Zusätze, während man dem dritten Isoleucin und Valin beigab. Wie auf Abb. 1 a ersichtlich, wuchs jene Kontrollkultur, die nur Methionin enthielt, nicht, was frühere Beobachtungen bestätigte<sup>11</sup>; hingegen setzte bei den Kulturen, denen man Casaminosäuren oder gleichzeitig Isoleucin und Valin zugeführt hatte, beinahe sofort nach dem Suspendieren das Wachstum ein. In anderen Experimenten stellte man fest, daß sowohl Isoleucin als auch Valin essentiell für das baldige Wiedereinsetzen des Wachstums nach einem downshift sind, und daß Leucin keine der beiden ersetzen konnte.

Bei einem parallelen Experiment mit dem Stamm 58—161 (RC<sup>str</sup>), der eine Hemmung von ungefähr 2 Stdn. nach einem shiftdown erlitt, zeigte sich, wie man aus Abb. 1 b ersehen kann, daß der Zusatz von Iso-

<sup>13</sup> L. Alföldi und E. Kerekes, Biochim. Biophys. Acta **91**, 155 (1964).

leucin und Valin ein beinahe augenblickliches Wiedereinsetzen des Wachstums nach einem shiftdown bewirkte. So zeigen der RC<sup>str.</sup>-Stamm 58—161 und der RC<sup>rel.</sup>-Stamm W 6 in Gegenwart von Isoleucin und Valin nach einem shiftdown ein ähnliches Wachstumsverhalten. Man nimmt an, daß die längere Hemmung, die für den RC<sup>rel.</sup>-Stamm bei Abwesenheit von Isoleucin und Valin charakteristisch ist, eine Folge des Auftretens des RC<sup>rel.</sup>-Phänotyps ist.

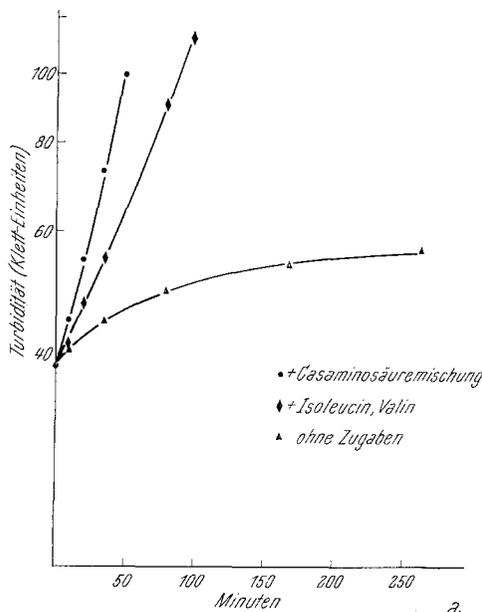


Abb. 1 a

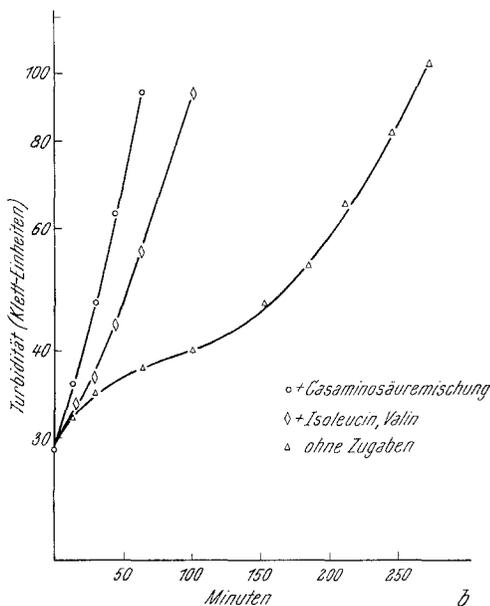


Abb. 1 b

Abb. 1. Wirkung des Zusatzes einer Casamino säuremischung oder von Isoleucin und Valin auf das Wachstum des Stammes W 6 (RC<sup>rel.</sup>) (Abb. 1 a) bzw. des Stammes 58—161 (RC<sup>str.</sup>) (Abb. 1 b), der nach einem shiftdown von einem mit Casamino säure beschicktem Medium in ein Minimalmedium, das als Zusatz Methionin enthält, auftritt

### Diskussion

Wahrscheinlich wird das Wachstum des Aminosäurepools eines Bakteriums in einem stationären Zustand gehalten, und zwar bei solchen Konzentrationen, daß die Eintritts- und Austrittsgeschwindigkeiten der Aminosäuren in den und aus dem Pool gleich groß sind. Die ersten hier beschriebenen Experimente zeigen, daß die relativen Mengen verschiedener im Pool vorliegender Aminosäuren zwischen weiten Grenzen schwanken. In allen untersuchten Stämmen ist Glutamat die vorherrschende Aminosäure, und Aspartat (inclusive Asparagin) ist die

nächst häufigste. Möglicherweise steht das Vorherrschen von Glutamat und Aspartat in Beziehung zu ihrer Funktion als  $\text{NH}_2$ -Donatoren in einer Reihe von Biosynthesewegen. Die hier angegebenen Werte unterscheiden sich von früher veröffentlichten<sup>2, 4</sup> Werten für verschiedene Stämme von *E. coli* und für *Bacillus subtilis*<sup>14</sup> darin, daß Alanin und Glycin relativ weniger häufig sind, und daß Glutamat und Aspartat häufiger sind.

Es liegen ungefähr  $4 \cdot 10^5$  tRNS-Moleküle pro Zelle von *E. coli*<sup>15</sup> vor, und, da die Mengen an tRNS, die jeder Aminosäureart zugeordnet ist, vergleichbar sind<sup>16</sup>, gibt es ungefähr  $2 \cdot 10^4$  tRNS-Moleküle pro Aminosäuretyp pro Zelle. Eine Berechnung aus den hier angegebenen Daten, unter der Annahme, daß das Zellvolumen  $1 \mu^3$  beträgt, zeigt, daß die Zahl der Aminosäuremoleküle im Pool einer Zelle zwischen ungefähr  $10^7$  (für Glutamat) und ungefähr  $4 \cdot 10^4$  (für Phenylalanin) liegt; für die meisten Aminosäuren ist die Anzahl von der Größenordnung  $2 \cdot 10^5$  Moleküle pro Zelle. So ist für die meisten Aminosäuren die Anzahl der Aminosäuremoleküle um das Zehnfache größer als die Anzahl der tRNS-Moleküle.

Ein Vergleich der intracellulären Aminosäurekonzentrationen im Pool einer exponentiell wachsenden Kultur des Stammes CP 78 mit den veröffentlichten *K<sub>m</sub>*-Werten der entsprechenden, aminosäureaktivierenden Enzyme<sup>17, 18</sup> ließ keine Korrelation zwischen diesen beiden Reihen von Werten erkennen. Die *K<sub>m</sub>*-Werte erstrecken sich über zwei Zehnerpotenzen, von  $5 \cdot 10^{-4}$  M für Valin bis  $5 \cdot 10^{-6}$  M für Isoleucin. Im Fall des Valins sind zum Beispiel Poolkonzentration ( $2 \cdot 10^{-4}$  M) und *K<sub>m</sub>*-Wert von der gleichen Größenordnung. Im Gegensatz dazu ist die Konzentration an Isoleucin im Pool ungefähr hundertmal so groß wie der *K<sub>m</sub>*-Wert seines aktivierenden Enzyms.

Bei Aushungerung bezüglich verschiedener Aminosäuren nehmen die Mengen der meisten Aminosäuren im Pool zu. In allen Fällen eines solchen Zufuhrstopps steigt die Lysinmenge im Pool beträchtlich an, aber der bei weitem entscheidendste Faktor, der die Gesamtgröße des Pools bestimmt, ist das Ausmaß der Glutamatzunahme.

Leucin war im Pool einer nicht mit Leucin belieferten Kultur des Stammes CP 78 in ungefähr der halben Konzentration vorhanden, in

<sup>14</sup> R. W. Bernlohr, *J. Bacteriol.* **93**, 1031 (1967).

<sup>15</sup> J. D. Watson, *Molecular biology of the gene*. New York-Amsterdam: Benjamin, 1965.

<sup>16</sup> C. D. Yegian, G. S. Stent und E. M. Martin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **55**, 839 (1966).

<sup>17</sup> F. H. Bergmann, P. Berg und M. Dieckmann, *J. Biol. Chem.* **236**, 1735 (1961).

<sup>18</sup> D. R. Davies und G. L. Cantoni (Herausgeber), *Procedures in nucleic acids research*. New York-London: Harper and Row, 1966.

der es im Pool eines exponentiell wachsenden Stammes vorliegt. Dieses Ergebnis stimmt mit der Beobachtung<sup>16</sup> überein, daß Leucyl-tRNS bis zu 20% beladen zurückbleibt, wenn einem Leucin-Auxotroph kein Leucin zugeführt wird. Ebenso stellte man fest, daß sowohl Glycin als auch Serin im Pool, den man aus einer nicht mit Glycin belieferten Kultur des Stammes PB 408 isolierte, vorlagen. Nennenswerte Mengen an Glycin sind an die tRNS gebunden, die man aus einer solchen Kultur isolierte (*P. Broda*, unveröffentlichte Beobachtung). Diese Beobachtungen legen den Schluß nahe, daß der Mechanismus, der das Aufhören der Proteinsynthese bewirkt, durch ein Ereignis ausgelöst wird, das dem völligen Verschwinden von Leucin, Glycin oder Serin aus dem Pool vorangeht.

Das Experiment, dessen Ergebnisse in Tab. 4 zusammengestellt sind, zeigt, daß es möglich ist, zwei essentielle Aminosäuren, und zwar Arginin und Histidin, gleichzeitig aus dem Pool zu entfernen. Während der Aushungerung ist die einzige Quelle für diese Aminosäuren der Abbau von Proteinen, der im Falle des *E. coli* mit einer Geschwindigkeit von ungefähr 5% des Gesamtproteins pro Stunde verläuft<sup>5</sup>. Es scheint daher, daß bei Zufuhrstop alles Arginin oder Histidin, das in den Pool eintritt, sofort an die entsprechende tRNS-Species gebunden wird. Um jedoch genau festzustellen, wie die Bildung der Peptidkette bei Aushungerung bezüglich zweier Aminosäuren eingeschränkt wird, wäre es notwendig, das Ausmaß der Beladung der tRNS-Species mit Arginin und Histidin in einer Kultur festzustellen, der diese beiden Aminosäuren nicht zugeführt werden.

In dem downshift-Experiment nahmen wie in anderen Fällen von Aminosäureaushungerung die Mengen der meisten Aminosäuren im Pool zu. Daher scheint die Ursache für den Wachstumsstop bei einem shift-down-Versuch nicht in einem generellen Verschwinden des Aminosäurepools zu liegen. Jedoch waren Isoleucin und Valin im Pool von Stamm W 6 (RC<sup>rel</sup>) nicht nachweisbar. Der Zusatz dieser Aminosäuren zu downshifted cultures des Stammes W 6 (RC<sup>rel</sup>) und des Stammes 58—161 (RC<sup>str</sup>) erlaubte ein Fortdauern des Wachstums.

Diese Beobachtungen legen den Schluß nahe, daß der unmittelbare Anlaß für das Aufhören des Wachstums dieser Stämme nach einem downshift die Aushungerung bezüglich Isoleucin und Valin ist. Man schloß auch, daß die Empfindlichkeit von Stamm W 6 auf ein downshift-Experiment eine Folge des Auftretens des RC<sup>rel</sup>-Phänotyps ist. Eine mögliche Erklärung für diese Empfindlichkeit ist, daß die Synthese der biosynthetischen Enzyme für Isoleucin und Valin in der Wachstumsperiode vor dem downshift vollkommen unterdrückt wird, und daß die unkontrollierte Synthese von RNS in dem RC<sup>rel</sup>-Stamm W 6 in der Zeit nach einem downshift die Derepression dieser Enzyme verhindert. Eine andere mögliche Erklärung wäre, daß nach einem downshift des RC<sup>rel</sup>-

Stammes die intrazellulären Konzentrationen von Isoleucin und Valin gering sind, weil diese Aminosäuren ins Medium abgegeben werden<sup>12</sup>.

Ich bin *G. S. Stent* und *J. C. Gerhart* für ihre wertvolle Kritik und *Vladimir Sturm* für die Durchführung der Aminosäureanalysen sehr dankbar.

Diese Forschungsarbeit wurde unterstützt durch ein Fellowship vom Science Research Council of Great Britain, durch das U.S. Public Health Service, Research Grant CA 02129, und durch das Training Grant CA 05028 vom National Cancer Institute.