

Pyrophosphat-abhängige D-Fructose-6-phosphat Phosphotransferase in Rhodospirillaceae

Pyrophosphate-Dependent D-Fructose-6-phosphate-Phosphotransferase in Rhodospirillaceae

Cornelia Pfleiderer und Jobst-Heinrich Klemme

Institut für Mikrobiologie der Universität, Meckenheimer Allee 168, 5300 Bonn 1

Z. Naturforsch. 35 c, 229–238 (1980); eingegangen am 20. November 1979

Fructose-6-phosphate Phosphotransferase, Pyrophosphate, Rhodospirillaceae

A pyrophosphate-dependent fructose-6-phosphate phosphotransferase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* was partially purified and characterized in respect to kinetic and regulatory properties. The enzyme had a molecular weight of about 95 000 dalton and required Mg^{2+} -ions for catalysis and maintenance of activity. The phosphotransferase was specific for fructose-6-phosphate (F-6-P) and inorganic pyrophosphate (PP) as substrates of the fructose-1,6-bisphosphate-forming reaction (forward reaction). In the phosphate (P_i)-dependent back reaction, the preferred substrate was fructose-1,6-bisphosphate (FBP). At optimal pH (7.2 for the forward, and 8.6 for the back reaction) the back reaction had a slightly higher v_{max} than the forward reaction. The substrate-saturation curves of the enzyme were all hyperbolic with intersecting kinetic pattern. The K_m -values (in mM) at saturating $MgCl_2$ -concentration were: 0.38 (F-6-P); 0.025 (PP); 0.02 (FBP) and 0.82 (P_i). The forward reaction was inhibited by ADP and AMP. The inhibition by ADP ($K_i = 0.18$ mM) was of the mixed type in respect to F-6-P, but independent of the PP-concentration. The inhibition by AMP ($K_i = 0.017$ mM) was of a more complex type, because AMP not only decreased the v_{max} of the F-6-P- or PP-saturation curve, but also increased the Hill-coefficient from $n_H = 1$ to $n_H = 2.5$ of the F-6-P-saturation curve. The inhibition of the back reaction by the two adenylates was less pronounced. ATP (at 2.5 mM), like citrate, inhibited the back reaction only at low $MgCl_2$ concentration (1 mM) indicating that the inhibitory effect was due to the chelation of Mg^{2+} . Out of 5 other species of the Rhodospirillaceae tested, the PP-dependent phosphofructokinase was only shown to be present in *Rhodopseudomonas gelatinosa*.

Einleitung

Das fakultativ phototrophe Bakterium *Rhodospirillum (R.) rubrum* gehört – wie *Bacteroides symbiosus*, *Entamoeba histolytica* und verschiedene Arten der Gattung *Propionibacterium* – zu der Gruppe von Mikroorganismen, in denen anorganisches Pyrophosphat (PP) bei einigen Transphosphorylierungsreaktionen ATP als Phosphat-Donator ersetzen kann [1].

Die Existenz verschiedener PP-abhängiger Transphosphorylasen in *R. rubrum* (Pyruvat, Phosphat-Dikinase [2] und Phosphoenolpyruvat-Carboxytransphosphorylase [3]) geht parallel mit dem Vorkommen einer anorganischen Pyrophosphatase (PPase), deren katalytische und strukturelle Eigenschaften eine Regulation im Sinne allosterischer, bzw. hystertischer Enzyme [4] nahelegen. Von den in Propionibakterien vorkommenden PP-abhängigen Transphosphorylasen (Pyruvat, Phosphat-Dikinase, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, PP-L-Serin-Phospho-

transferase und PP-abhängige D-Fructose-6-phosphat-Phosphotransferase) wurden in *R. rubrum* bisher die Pyruvat, Phosphat-Dikinase (EC 2.7.9.1) [2] und die Phosphoenolpyruvat-Carboxytransphosphorylase (EC 4.1.1.38) [3] nachgewiesen.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Anreicherung sowie die katalytischen und regulatorischen Eigenschaften einer PP-abhängigen Fructose-6-phosphat-Phosphotransferase aus *R. rubrum*. Unter den sechs überprüften Rhodospirillaceen-Arten konnte das Enzym, außer in *R. rubrum*, nur in *Rhodopseudomonas gelatinosa* nachgewiesen werden.

Material und Methoden

Organismen und Kulturbedingungen

In der vorliegenden Arbeit wurden die folgenden Bakterienstämme verwendet: *R. rubrum* Stamm S1 (bezogen von Prof. Dr. H. Gest, Indiana University, Department of Microbiology, Bloomington, Indiana, USA), *R. rubrum* DSM Nr. 50914, *Rhodopseudomonas (Rps.) capsulata* Stamm Kb1 (DSM Nr. 155), *Rps. sphaeroides* DSM Nr. 158, *Rps. gelatinosa* DSM

Sonderdruckanforderungen an Dr. C. Pfleiderer.

0341-0382/80/0300-0229 \$ 01.00/0



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Nr. 2150, *Rps. viridis* DSM Nr. 170 und *Rps. palustris* Stamm 1a1 (bezogen von Prof. Dr. G. Drews, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Freiburg).

Die Bakterien wurden, falls nicht anders vermerkt, unter photosynthetischen Bedingungen (4000 lux, 30 °C) im Malat-(NH₄)₂SO₄-Medium nach Ormerod *et al.* [5] angezogen. Außer bei der Anzucht der *R. rubrum*-Stämme wurde das Medium mit 0,05% Hefeextrakt ergänzt. Bei der Anzucht mit anderen C-Quellen als Malat wurden 10-prozentige (w/v) Lösungen dieser Substrate steril filtriert und dem Malat-freien, autoklavierten Grundmedium zugesetzt.

Die photoautotrophe Anzucht von *R. rubrum* Stamm S1 unter H₂/CO₂-Atmosphäre erfolgte nach der Methode von Klemme und Schlegel [6]. Die Adaptation an fermentative Bedingungen erfolgte – ausgehend von 100 ml-Vorkulturen – bei 30 °C in einem Medium mit 0,4% D-Fructose in 1 L-Schraubdeckelflaschen, die mit Aluminiumfolie umwickelt worden waren. Die Inkubationszeit betrug 48 Stunden. Das Wachstum der Kulturen wurde durch Messung der OD bei 660nm in einem „Spectronic 20“-Colorimeter (Fa. Bausch & Lomb, München) verfolgt.

Herstellung zellfreier Extrakte

Die Zellen wurden gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase durch Zentrifugation bei 4 °C und 15 000 × g geerntet, einmal in 50 mM K-Phosphat-Puffer (pH 7,5) gewaschen und schließlich in 5 mM K-Phosphat (pH 7,5) mit 5 mM MgCl₂ und 0,2 mM F-6-P zwecks Stabilisierung der PP-abhängigen F-6-P-Phosphotransferase resuspendiert (1 g Naßgewicht/2 ml Puffer). Konnten die Zellen nicht sofort weiterverarbeitet werden, wurden sie in 25 ml-Portionen bei –18 °C eingefroren und ohne nennenswerten Verlust an Enzymaktivität bis zu 5 Monate gelagert. Der Zellaufschluß erfolgte durch Ultraschall („Schoellerschall“ Typ TG 250, Fa. Schoeller & Co., Frankfurt) mit einer Beschallzeit von 1 min/ml bei voller Leistung. Das resultierende Homogenat wurde 15 min bei 27 000 × g zentrifugiert, um Zelltrümmer und nichtaufgeschlossene Zellen zu entfernen. Zur Sedimentation der Chromatophoren wurde anschließend 90 min bei 130 000 × g zentrifugiert. Der Proteingehalt der 130 000 × g-Überstände wurde mittels der Biuret-Methode [7], der Proteingehalt der angereicherten Enzympräparate nach der Methode von Lowry *et al.* [8] bestimmt.

Bestimmung der Enzymaktivitäten

Mit Ausnahme der anorganischen Pyrophosphatase (EC 3.6.1.1), deren Aktivitätsbestimmung auf colorimetrischem Wege erfolgte [4], wurden sämtliche Enzymaktivitäten mittels eines gekoppelten optischen Tests bei 30 °C gemessen. Die Extinktionsänderungen bei 366 nm wurden im Eppendorf-Photometer Typ 1101 M registriert und durch den Compensationsschreiber 6511 aufgezeichnet. Die in der vorliegenden Arbeit dokumentierten Enzymaktivitäten sind Mittelwerte aus drei Parallelmessungen. Eine Enzymeinheit (E) ist definiert als die Aktivität, welche bei 30 °C einen Umsatz von 1 μmol/min katalysiert. Bei der Suche nach möglichen Enzyreffektoren wurde stets die Wirkung der fraglichen Substanzen auf die Hilfsenzyme überprüft.

Die PP-abhängige F-6-P-Phosphotransferase (PP-6-PFK) wurde in folgenden Reaktionsgemischen bestimmt. *Hinreaktion* (F-6-P + PP → FBP + P_a) in einem nach [9] modifizierten Testgemisch: Imidazol-HCl (pH 7,2), 50 mM; MgCl₂, 5 mM; F-6-P, 2 mM; Na₄P₂O₇, 1 mM; NADH, 0,2 mM; Aldolase, 20 μg; Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase/Triosephosphat-Isomerase, 40 μg; 0,01–0,05 Einheiten PP-6-PFK. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Na₄PP gestartet. *Rückreaktion* (FBP + P_a → F-6-P + PP) in einem nach [10] modifizierten Testgemisch: Imidazol-HCl (pH 8,6), 50 mM; MgCl₂, 5 mM; FBP, 1,5 mM; K₂HPO₄, 5 mM; NADP, 0,25 mM; Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, 40 μg; Phosphoglucose-Isomerase, 4 μg; 0,01–0,05 Einheiten PP-6-PFK. Die Reaktion wurde durch Zugabe von K₂HPO₄ gestartet. 6-Phosphofructokinase (EC 2.7.1.11) und 1-Phosphofructokinase (EC 2.7.1.56) wurden nach Conrad und Schlegel [11], die Fructose-1,6-bisphosphatase (EC 3.1.3.11) nach Joint *et al.* [10] und die Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase (EC 4.1.1.39) nach Hurlbert und Lascelles [12] bestimmt.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteingemischen in Polyacrylamid-Gelen (Gelsystem Nr. 1 mit 7,5% Acrylamid (pH 8,9) nach Maurer [13]) wurde bei Zimmertemperatur und einer Stromstärke von 4–5 mA pro Trennröhrchen (Länge ca. 80 mm, Durchmesser 4 mm) in der Elektrophorese-Apparatur der Fa. Desaga, Heidelberg, durchgeführt.

Die Anfärbung der Proteinbanden erfolgte mit Coomassie Blue R-150. Die Färbelösung hatte die

folgende Zusammensetzung: 0,25 g Coomassie Blue, 45 ml Methanol, 9 ml Eisessig und 46 ml Wasser. Die Entfärbelösung war zusammengesetzt aus 50 ml Methanol, 75 ml Eisessig und 875 ml Wasser. Eine Aktivitätsfärbung der PP-abhängigen F-6-P-Phosphotransferase wurde wie folgt versucht. Die Gele wurden sofort nach Beendigung des Elektrophorese-Vorgangs in einer Lösung mit der folgenden Zusammensetzung inkubiert: 25 ml Imidazol-HCl-Puffer (200 mM, pH 8,6); 5 ml MgCl₂ (50 mM); 5 ml NADP (10 mM); 5 ml K₂HPO₄, (100 mM); 15 ml FBP (10 mM); 2 ml Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (1 mg/ml); 1 ml Phosphoglucose-Isomerase (1 mg/ml); 42 ml Wasser; 30 mg *p*-Nitrotetrazolium-Salz; 4 mg 5-Methylphenazoniummethylsulfat. Die Reagenzien wurden erst unmittelbar vor der Färbung angesetzt und diese selbst im Dunkeln bei Zimmertemperatur durchgeführt.

Analytische Methoden

Anorganisches Phosphat (P_a) wurde colorimetrisch als Phosphomolybdänblau nach der Methode von Taussky und Shorr [14] bestimmt. Anorganisches Pyrophosphat wurde durch Messung des Anstiegs der P_a-Konzentration nach Behandlung der Proben mit anorganischer Pyrophosphatase analysiert. Fructose-6-phosphat wurde nach Hohorst [15] und Fructose-1,6-bisphosphat nach Bücher und Hohorst [16] bestimmt.

Herkunft der Chemikalien

Biochemikalien, Hilfsenzyme, Eichproteine zur Molekulargewichtsbestimmung: Boehringer, Mannheim. Chemikalien für die Gelektrophorese, Ecteola-Cellulose, Tetrazoliumsalz, Methylphenazoniumme-

thylsulfat: Serva, Heidelberg. Protaminsulfat, Ribulose-1,5-bisphosphat: Sigma, München. Sephadex G-25, Sepharose 6-B, Blaue Sepharose CL-6B, Dextranblau: Deutsche Pharmacia, Freiburg. Hefextrakt, nachgereinigter Agar: Difco, Detroit.

Alle sonstigen handelsüblichen Chemikalien (p. a.): Merck, Darmstadt.

Ergebnisse

Einfluß der Kulturbedingungen auf die Enzymtiter in Rohextrakten

Die spezifischen Aktivitäten der PP-abhängigen Fructose-6-phosphat-Phosphotransferase (Hin- und Rückreaktion), der 6-Phosphofructokinase (EC 2.7.1.11), der 1-Phosphofructokinase (EC 2.7.1.56) der alkalischen Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) (EC 3.1.3.11), der Ribulosebisphosphat-Carboxylase (EC 4.1.1.39) sowie der anorganischen Pyrophosphatase (EC 3.6.1.1) in Rohextrakten von *R. rubrum* S1 wurden nach phototroper Anzucht der Zellen auf verschiedenen C-Quellen (D-Fructose, D,L-Malat, Pyruvat, CO₂/H₂) gemessen (Tab. I). Als Markerenzym des Calvin-Cyclus konnte die Ribulosebisphosphat-Carboxylase nach photoautotroper Anzucht (CO₂/H₂) der Zellen mit einer spezifischen Aktivität von 30–40 mE erfaßt werden. Eine ähnlich starke Abhängigkeit des Enzymtiters von der C-Quelle ergab sich auch für die 1-Phosphofructokinase, die nur nach Anzucht mit D-Fructose bzw. CO₂/H₂ nachweisbar war. Alle übrigen Enzymtiter, insbesondere diejenigen der PP-abhängigen Fructose-6-phosphat-Phosphotransferase, waren praktisch unabhängig von der C-Quelle. Aus diesen Messungen läßt sich noch keine physiologische Funktion der PP-abhängigen Fructose-6-phosphat-Phosphotrans-

Tab. I. Spezifische Aktivitäten einiger Enzyme des Intermediärstoffwechsels in Rohextrakten von *R. rubrum* S1 nach phototroper Anzucht auf verschiedenen C-Quellen.

C-Quelle	Spez. Aktivität [nmol/min mg Protein]					
	PP-abhängige F-6-P-Phosphotransferase (Hinreaktion)	6-Phosphofructokinase	1-Phosphofructokinase	FBPase	PPase	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase
D-Fructose	145	3	45	7	390	n. n.
D,L-Malat	150	<1	n. n. ^a	60	450	n. n.
Pyruvat	145	2	n. n.	54	340	n. n.
CO ₂ /H ₂	50	5	24	34	315	35
D-Fructose anaerob, dunkel	505	2	84	12	227	4

^a n. n. = nicht nachweisbar.

ferase ableiten. Ein Hinweis auf die mögliche physiologische Funktion dieses Enzyms ergibt sich aus dem Befund, daß sein Titer in Rohextrakten aus Zellen, die an eine Dunkelfermentation von D-Fructose adaptiert worden sind (vgl. Abschnitt Material und Methoden), beträchtlich erhöht war (500–600 mE/mg Protein gegenüber 50–150 mE/mg Protein nach phototroper Anzucht).

*Anreicherung der PP-abhängigen Fructose-6-phosphat-Phosphotransferase aus *R. rubrum* S1*

Das Enzym wurde aus phototroph mit D,L-Malat als C-Quelle gewachsenen Zellen (ca. 100 g Feuchtgewicht) angereichert. Sämtliche Anreicherungsschritte – mit Ausnahme des Hitzeschrittes – wurden bei +4 °C durchgeführt. Nach Zellaufschluß durch Ultraschall und Entfernung von Zelltrümmern und photosynthetischen Membranen durch Ultrazentrifugation (vgl. Material und Methoden) wurden dem Rohextrakt 10 Volumenprozente einer neutralisierten 1-prozentigen (w/v) Protaminsulfat-Lösung zugesetzt. Das nach einigen Minuten präzipitierte Material wurde durch Zentrifugation bei 15000 U/min sedimentiert und verworfen. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß das Enzym in Gegenwart von 5 mM MgCl₂ bei einer 10-minütigen Präinkubationszeit bis 62 °C stabil ist. Zur weiteren Anreicherung der PP-abhängigen F-6-P-Phosphotransferase (PP-6-PFK) wurde der Mg-haltige Protaminsulfat-Überstand rasch auf 62 °C erhitzt, 10 min auf dieser Temperatur gehalten und dann im Eisbad abgekühlt. Das denaturierte Protein wurde durch Zentrifugation bei 15000 U/min entfernt. Der Überstand wurde an-

schließend einer Fraktionierung mit (NH₄)₂SO₄ unterzogen. Die PP-6-PFK präzipitierte im Bereich von 45–70% Sättigung mit (NH₄)₂SO₄. Das Präzipitat wurde in 10 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) mit 5 mM MgCl₂ und 0,2 mM F-6-P aufgenommen und mittels Passage durch Sephadex G25 (äquilibriert mit vorgenanntem Puffer) entsalzt.

Die entsalzte (NH₄)₂SO₄-Fraktion wurde auf eine mit 5 mM K-Phosphat (pH 7,5) plus 5 mM MgCl₂ äquilibrierte Ecteola-Cellulose-Säule (2,5 × 65 cm) aufgetragen und mittels eines linearen NaCl-Gradienten (0–250 mM) im vorgenannten Puffer eluiert. Als wesentliches Ergebnis dieses Anreicherungsschrittes sei die Abtrennung der PP-abhängigen Phosphotransferase (eluiert ab 190 mM NaCl) von der anorganischen PPase (eluiert ab 230 mM NaCl) betont (Abb. 1). Die PPase stört wegen der Spaltung des Substrates PP die kinetischen Analysen der PP-6-PFK bei niedrigen PP-Konzentrationen. Die PPase-freien Fraktionen des Ecteola-Cellulose-Eluats mit hoher Phosphotransferase-Aktivität wurden vereinigt und erneut einer Fällung mit (NH₄)₂SO₄ (70% Sättigung) unterzogen. Das so konzentrierte Ecteola-Eluat wurde anschließend durch eine Sepharose 6B-Säule (1,5 × 90 cm) filtriert. Die Säule war mit 5 mM K-Phosphat (pH 7,5) + 5 mM MgCl₂ + 0,2 mM F-6-P äquilibriert. Die Spitzenfraktionen wurden in einer Amicon-Druckzelle (PM 10-Membran; 1,5 atü) auf ein geringes Volumen eingeengt. Mit diesen Schritten wurde die PP-6-PFK reproduzierbar 70 bis 100-fach bis zu spezifischen Aktivitäten von 20–25 E/mg Protein angereichert. Ein typischer Anreicherungsgang ist in Tab. II zusammengefaßt. Eine wei-

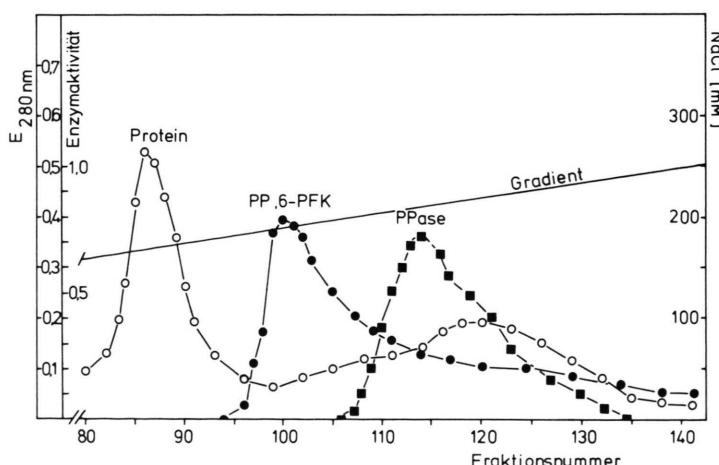


Abb. 1. Reinigung der PP-abhängigen F-6-P-Phosphotransferase aus *R. rubrum* S1 durch Chromatographie auf Ecteola-Cellulose. 10 ml eines dialysierten (NH₄)₂SO₄-Präzipitats (45–70% Sättigung) mit 134 mg Protein wurden auf eine Ecteola-Cellulose-Säule (2,5 × 65 cm) aufgetragen, die mit 5 mM K-Phosphat (pH 7,5) plus 5 mM MgCl₂ äquilibriert worden war. Die adsorbierten Proteine wurden mittels eines linearen NaCl-Gradienten (0–250 mM NaCl) eluiert und in Fraktionen zu je 3,5 ml gesammelt. Die Enzymaktivität (Hinreaktion) ist in $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{ml}$ ausgedrückt.

Tab. II. Anreicherung der PP-abhängigen F-6-P-Phosphotransferase aus *R. rubrum* S 1.

Fraktion	Volumen [ml]	Gesamt- protein [mg]	PP-abhängige F-6-P-Phosphotransferase (Hinreaktion)		
			Gesamt- Einheiten	Spez. Aktivität [E/mg Protein]	Anreicherung
130 000 g-Überstand	232	1858	535	0,29	1
Protaminsulfat-Überstand	245	1596	530	0,33	1,1
Hitzeschritt (62 °C, 10 min)-Überstand	242	518	500	0,96	3,3
45–70% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fraktion	10	126	476	3,78	13,0
Ecteola-Cellulose-Eluat	2	12,8	181	14,1	48,6
Sepharose 6B-Eluat	3	3,1	75	24,2	83,4

tere Reinigung des Enzyms mittels Affinitätschromatographie an Blauer Sepharose CL-6B gelang nicht, da im Gegensatz zur 6-Phosphofructokinase aus Eukaryonten [17] keine Bindung der PP-abhängigen Phosphotransferase an die Blaue Sepharose erfolgte.

Die 70 bis 100-fach angereicherten Enzympräparate enthielten nach gelelektrophoretischer Auftrennung noch drei Proteinbanden. Eine Zuordnung der PP-6-PFK zu einer dieser Banden mittels Aktivitätsfärbung war nicht möglich, da das Enzym im Verlauf der Elektrophorese offensichtlich inaktiviert wurde. Die Inaktivierung ist höchstwahrscheinlich auf die Abdissoziation des stabilisierenden Mg^{2+} -Ions zurückzuführen. Dialyse gegen einen Mg-freien Tris-HCl-Puffer (pH 7,5) führte ebenfalls zu einer Inaktivierung des Enzyms. Der Versuch einer Reaktivierung der PP-6-PFK durch Präinkubation des Gels bzw. herausgeschnittener Gelscheibchen mit 5 mM MgCl_2 blieb ohne Erfolg.

Molekulargewichtsbestimmung

Eine Abschätzung des Molekulargewichts der PP-abhängigen Phosphotransferase wurde mittels Gelfiltration durch eine Sepharose 6B-Säule (1,5 × 90 cm) durchgeführt. Die mit 5 mM K-phosphat (pH 7,2) plus 5 mM MgCl_2 und 0,2 mM F-6-P äquilibrierte Säule (Elution mit gleichem Puffer) wurde in einem getrennten Lauf mit Dextranblau, Ferritin, Katalase, Aldolase und Rinderserumalbumin geeicht. Die PP-6-PFK wurde bei einem V_e/V_0 -Wert von 2,1 eluiert, entsprechend einem Molekulargewicht von 95 000 Dalton. Verschiedentlich wurde das Enzym aber auch bei V_e/V_0 -Werten von 1,5 entsprechend einem Molekulargewicht von etwa 360 000 Dalton, bzw. 2,5, entsprechend einem Molekulargewicht von ca.

40 000 Dalton, eluiert. Offenbar neigt das Enzym einerseits zur Bildung von Aggregaten, andererseits aber auch zur Dissoziation in kleinere Einheiten. Dabei ist es von Interesse zu vermerken, daß das Enzym im Falle der Elution als 40 000 Dalton-Einheit eine nur geringe spezifische Aktivität (ca. 20% der Aktivität des auf die Säule aufgetragenen Präparates) aufwies.

Mg^{2+} -Bedarf, pH-Optimum, Substratspezifität

Mg^{2+} -Ionen waren nicht nur für die Stabilität des Enzyms essentiell, sondern auch für die katalytische Aktivität. Zwar konnte das Enzym wegen des MgCl_2 -Gehalts der Enzym-Stammlösung nicht in einem absolut Mg^{2+} -freien Reaktionsgemisch getestet werden. Aber in einem Testgemisch mit 20 μM MgCl_2 (entsprechend der mit dem Enzym selbst eingebrachten MgCl_2 -Konzentration) wurde lediglich 10 (Hinreaktion) bzw. 0% (Rückreaktion) der mit 5 mM MgCl_2 erzielten Reaktionsrate gemessen. Die Sättigungskurven für MgCl_2 waren sowohl für die Hin-, als auch die Rückreaktion hyperbolisch. Die $S_{0.5}$ -Werte für MgCl_2 (d. h. die MgCl_2 -Konzentrationen, bei denen halbmaximale Reaktionsrate erzielt wurde) betrugen 0,1 mM (Hinreaktion mit 2 mM F-6-P und 1 mM Na_4PP) bzw. 0,5 mM (Rückreaktion mit 1,5 mM FBP und 5 mM K-Phosphat). Mg^{2+} konnte durch Mn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} oder Zn^{2+} nicht ersetzt werden. Das pH-Optimum von Hin- und Rückreaktion (jeweils bestimmt in 50 mM Imidazol-HCl-Puffer unter Standardbedingungen) lag bei pH 7,2 (Hinreaktion) bzw. pH 8,2–8,6 (Rückreaktion). Die maximale Reaktionsrate der Rückreaktion bei pH 8,6 war geringfügig höher als die maximale Rate der Hinreaktion bei pH 7,2.

Mit anderen Zuckermanophosphaten (Fructose-1-phosphat[F-1-P], Glucose-6-phosphat[G-6-P], Glucose-1-phosphat[G-1-P], je 2,5 mM) wies das Enzym lediglich 3 (F-1-P), 1,4 (G-6-P) bzw. 2% (G-1-P) der mit F-6-P erzielten Aktivität auf. Mit ATP bzw. ADP (je 2,5 mM) anstelle von Na_4PP war das Enzym im Vergleich zu der mit PP erzielten Reaktionsrate nur zu 5 (ATP) bzw. 1% (ADP) aktiv. Wurde die ATP-Lösung vor Einsatz im Enzymtest mit anorganischer PPase behandelt und die PPase anschließend durch 5-minütiges Erhitzen auf 80 °C inaktiviert, war die Restaktivität vollständig eliminiert. Die mit unbehandeltem ATP erzielte Aktivität ist demnach auf PP zurückzuführen. Mit Glucose-1,6-bisphosphat (1,5 mM) als Substrat der Rückreaktion wurden 66% der mit FBP erzielten Reaktionsrate gemessen.

Stöchiometrie der von der PP-6-PFK katalysierten Reaktionen

Zur Ermittlung der Stöchiometrie der von der PP-6-PFK katalysierten Reaktionen wurden die Konzentrationen der Substrate bzw. Produkte der Enzymreaktion (F-6-P, PP, FBP, P_a) vor und nach 15-minütiger enzymatischer Katalyse in Reaktionsgemischen mit 50 mM Imidazol-HCl-Puffer (pH 7,2 für

Tab. III. Stöchiometrie der von der PP-abhängigen F-6-P-Phosphotransferase katalysierten Reaktionen.

Substrat bzw. Produkt	$\mu\text{mol}/3\text{ ml Reaktionsgemisch}$		
	Beginn der Reaktion	nach 15 min	Differenz
A	F-6-P	7,55	4,75
	PP	9,43	-2,62
	FBP	0,05	+2,75
	P_a	0,10	+2,55
B	FBP	11,20	-5,40
	P_a	8,75	-5,52
	F-6-P	0	+5,65
	PP	0,12	+5,73

Die Enzymreaktion (A: Hinreaktion; B: Rückreaktion) wurde bei 30 °C in Reaktionsgemischen (3 ml) mit 50 mM Imidazol-HCl-Puffer (pH 7,2 für die Hin- und pH 8,6 für die Rückreaktion), 5 mM MgCl_2 , den in der Tabelle angegebenen Konzentrationen der Substrate und jeweils 10 μg Enzymprotein durchgeführt. Nach 15 min wurde die Reaktion durch Zusatz von 1 ml 3 n HClO_4 abgestoppt. Neutralisation erfolgte mit KHCO_3 . Nach Abzentrifugation des Präzipitates wurden im Überstand die Konzentrationen der Substrate bzw. Produkte bestimmt. Die Anfangskonzentrationen der letzteren wurden in Parallelproben bestimmt, die unmittelbar nach Enzymzusatz abgestoppt wurden.

Tab. IV. Wirkung von Intermediärverbindungen auf die PP-abhängige F-6-P-Phosphotransferase aus *R. rubrum* S1.

Zusatz (2,5 mM)	% Aktivität	
	Hinreaktion	Rückreaktion
-	100	100
P_a	98	-
PP	-	10
ATP	107	45
ADP	15	36
AMP	7	44
cycl. AMP	109	102
Na-Citrat	110	22
F-1-P	92	110
G-1-P	92	120
G-6-P	80	53
PEP	100	70

Die Reaktionsraten wurden bei 30 °C in 50 mM Imidazol-HCl-Puffer (pH 7,2 für die Hin-, und pH 8,6 für die Rückreaktion) gemessen. Die Reaktionsgemische enthielten, abweichend von den Standardansätzen, 1 mM Na_4PP ; 2 mM F-6-P; 2,5 mM MgCl_2 und 3,6 μg Enzymprotein (Hinreaktion), bzw. 5 mM K-Phosphat; 1,5 mM FBP; 1,25 mM MgCl_2 und 7,2 μg Enzymprotein (Rückreaktion). 100% Aktivität entspricht 20 (Hinreaktion) bzw. 24 (Rückreaktion) $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg Protein}$.

die Hinreaktion, pH 8,6 für die Rückreaktion), 5 mM MgCl_2 , den in Tabelle 3 angegebenen Substratmengen und 10 μg Enzymprotein analysiert. Wie die Daten in Tab. III zeigen, entsprachen die Mengen der gebildeten Produkte (FBP und P_a bei der Hinreaktion; F-6-P und PP bei der Rückreaktion) den Mengen der verbrauchten Substrate (F-6-P und PP bei der Hinreaktion; FBP und P_a bei der Rückreaktion).

Effekt verschiedener Intermediärverbindungen auf die PP-abhängige F-6-P-Phosphotransferase

Verschiedene Intermediärverbindungen wurden als mögliche Effektoren des Enzyms getestet (Tab. IV). Die Hinreaktion (Reaktionsgemisch mit 2 mM F-6-P; 2,5 mM MgCl_2 und 1 mM PP) wurde durch ADP und AMP stark gehemmt. P_a , F-1-P, G-1-P und G-6-P hatten eine nur geringe Hemmwirkung, während ATP, cyclisches AMP und Citrat die Reaktionsrate geringfügig erhöhten. Ein ganz anderes Hemmuster ergab sich für die Rückreaktion (Reaktionsgemisch mit 1,5 mM FBP; 5 mM K-Phosphat und 1,25 mM MgCl_2). Letztere war wesentlich weniger empfindlich als die Hinreaktion gegenüber AMP und ADP. Außer ADP und AMP war hier auch ATP ein Inhibitor. Da außer ATP auch PP und Citrat als Inhibitoren fungierten und die K_m -Werte für MgCl_2 von

Hin- und Rückreaktion deutlich verschieden sind, lag die Vermutung nahe, daß die Hemmung der Rückreaktion durch ATP teilweise auf einer Chelierung des für die Reaktion essentiellen Mg^{2+} -Ions beruhte. Eine genauere Analyse zeigte, daß die Hemmwirkung des Na-Citrats (2,5 mM) durch Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration von 1,25 auf 10 mM vollständig aufgehoben wurde. Entsprechendes gilt für die Hemmung durch PP und ATP. Die mit 1 mM des jeweiligen Inhibitors erzielte Hemmwirkung (in beiden Fällen ca. 80% in Reaktionsgemischen mit 1,5 mM FBP; 5 mM K-Phosphat und 1,0 mM $MgCl_2$) wurde durch Erhöhung der $MgCl_2$ -Konzentration von 1 auf 10 mM nahezu vollständig aufgehoben. Demgegenüber war die relativ schwache Hemmung der Rückreaktion durch AMP und ADP weitgehend unabhängig von der $MgCl_2$ -Konzentration. Die Rückreaktion wurde außer durch PP und die Adenylate auch durch G-6-P und PEP gehemmt. Die Zuckerkphosphate F-1-P und G-1-P aktivierten die Rückreaktion geringfügig.

Kinetische Eigenschaften der PP-abhängigen Fructose-6-phosphat-Phosphotransferase

Die Sättigungskurven des Enzyms für die Substrate der Hin- und Rückreaktion sind sämtlich hyperbolisch. Werden die bei verschiedenen Konzentrationen des ersten Substrates als Funktion der Konzentration des zweiten Substrates gemessenen Reaktionsraten in doppelt reziproker Form nach Cleland [18] aufgetragen, erhält man für Hin- und Rückreaktion jeweils eine Schar von Geraden, die sich in einem Punkt schneiden (Abb. 2). Dieser Be-

fund schließt einen Ping-Pong-Mechanismus, d. h. die Bildung eines phosphorylierten Enzym-Zwischenproduktes, aus. Aus den Diagrammen ergeben sich die folgenden Michaelis-Menten-Konstanten (K_m): 0,38 mM (F-6-P), 0,025 mM (PP); 0,02 mM (FBP); 0,82 mM (P_a). Die Hemmung der Hinreaktion durch die Adenylate wurde genauer analysiert. Trägt man für den Fall der ADP-Hemmung die in Reaktionsgemischen mit verschiedenen F-6-P/ADP-Relationen gemessenen Daten in doppelt reziproker Form ($1/v = f[1/F-6-P]$) bzw. im Dixon-Diagramm ($1/v = f[ADP]$) auf, so erhält man Geraden, die sich in einem Punkt schneiden (Abb. 3). ADP verhält sich also in Bezug auf F-6-P wie ein kompetitiver Inhibitor. Weitere Messungen zeigten, daß die Hemmung durch ADP unabhängig von der PP-Konzentration ist. Für den Standardtestansatz mit 50 mM Imidazol-HCl-Puffer, pH 7,2, mit 1 mM PP und 2,5 mM $MgCl_2$ ergibt sich aus dem Dixon-Diagramm (Abb. 3) ein K_i -Wert für ADP von 0,18 mM. In ähnlicher Weise, aber schwächer, wirken IDP und GDP auf das Enzym. UDP hat keinen Effekt.

AMP ist ein wesentlich stärkerer Inhibitor als ADP. Im Standardtestansatz mit 1 mM F-6-P, 1 mM P_a und 5 mM $MgCl_2$ bewirkt 0,05 mM AMP schon eine nahezu vollständige Hemmung des Enzyms.

Mißt man (PP-Konzentration jeweils 1 mM) bei verschiedenen F-6-P-Konzentrationen die Reaktionsrate v als Funktion der AMP-Konzentration und trägt die Reaktionsraten in reziproker Form gegen die Inhibitor-Konzentration auf, so erhält man keine Geraden, sondern mehr oder weniger stark aufwärts gekrümmte Parabel-ähnliche Kurven. Extrapolation der linearen Abschnitte dieser Kurven (für F-6-P-

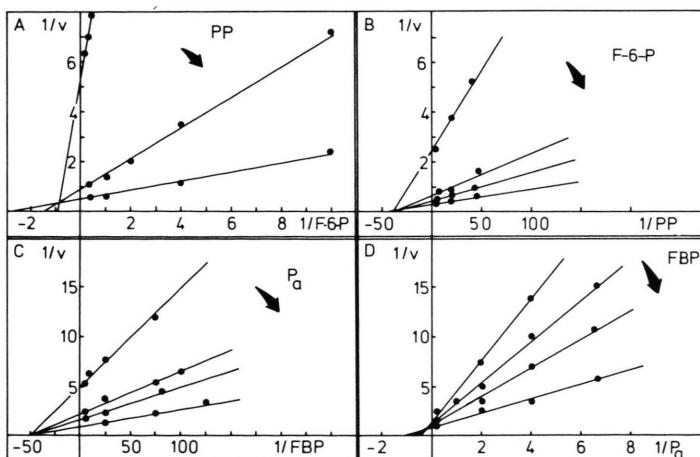


Abb. 2. Lineweaver-Burk-Diagramme der Substratsättigungskurven der PP-abhängigen F-6-P-Phosphotransferase aus *R. rubrum* S1. Die Reaktionsraten wurden in 50 mM Imidazol-HCl-Puffer (pH 7,2 für die Hinreaktion [A, B]; pH 8,6 für die Rückreaktion [C, D]) in Gegenwart von 5 mM $MgCl_2$ und den in den Teilabbildungen angegebenen Substratkonzentrationen gemessen. A: PP-Konzentrationen 0,025; 0,05 und 0,5 mM. B: F-6-P-Konzentrationen 0,1; 0,5; 1,0 und 5,0 mM. C: P_a -Konzentrationen 0,05; 0,5; 1,0 und 5,0 mM. D: FBP-Konzentrationen 0,025; 0,5; 2,5 und 5,0 mM. Konzentrationsangaben der variablen Substrate in mM. Reaktionsraten in $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg Protein}$.

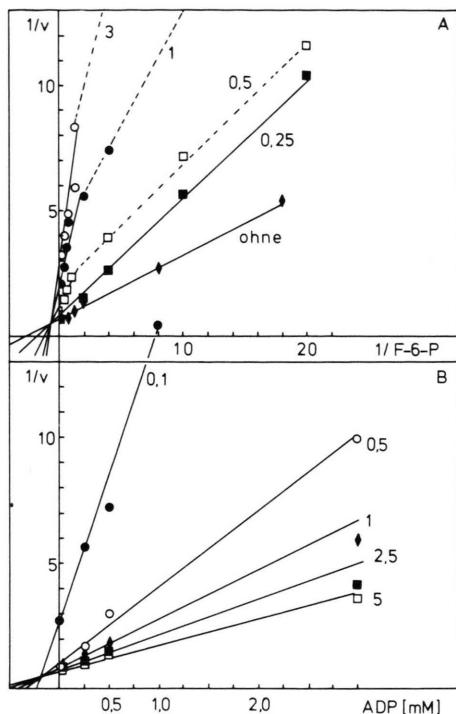


Abb. 3. Hemmung der PP-abhängigen F-6-P-Phosphotransferase aus *R. rubrum* S1 durch ADP. Die Reaktionsraten (Hinreaktion) wurden in Gemischen mit 50 mM Imidazol-HCl-Puffer (pH 7,2); 1 mM Na_4PP ; 2,5 mM MgCl_2 und den in den Teilabbildungen angegebenen Substrat- bzw. Inhibitor-Konzentrationen gemessen. A: Lineweaver-Burk-Diagramm. F-6-P als variables Substrat (Konzentration in mM). ADP-Konzentrationen (in mM) bei den einzelnen Geraden angegeben. B: Dixon-Diagramm ($1/v = f(\text{ADP})$). Die Zahlenangaben an den Geraden bezeichnen die F-6-P-Konzentrationen (mM). Reaktionsraten in $\mu\text{mol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

Konzentrationen von 0,5 bis 5 mM) ergibt aber einen gemeinsamen Schnittpunkt, der einen K_i -Wert von 17 μM anzeigt. Im Gegensatz zu ADP hat AMP auch einen Einfluß auf die Kooperativität der F-6-P-Sättigungskurve. Die normalerweise hyperbolische F-6-P-Sättigungskurve wird durch AMP in eine sigmoide Sättigungskurve mit Hill-Koeffizienten von $n_H = 1,2$ (0,025 mM AMP) bis $n_H = 2,5$ (0,05 mM AMP) überführt (Abb. 4). CMP, IMP und UMP haben einen wesentlich schwächeren Hemmeffekt als AMP (bei gleicher Inhibitorkonzentration ca. 10% der AMP-Wirkung) und verändern den Hill-Koeffizienten der F-6-P-Sättigungskurve nicht. Hill-Koeffizient ($n_H = 1$) und $S_{0,5}$ -Wert der PP-Sättigungskurve des Enzyms werden durch AMP nicht beeinflußt.

Vorkommen der PP-abhängigen F-6-P-Phosphotransferase in anderen Rhodospirillaceae-Stämmen

Die spezifischen Aktivitäten der 1-Phosphofructokinase (EC 2.7.1.56), der 6-Phosphofructokinase (EC 2.7.1.11), der alkalischen Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase, EC 3.1.3.11) und der PP-abhängigen F-6-P-Phosphotransferase wurden in Rohextrakten aus photosynthetisch mit D,L-Malat bzw. D-Fructose gewachsenen Zellen von 6 weiteren Rhodospirillaceen-Stämmen (*R. rubrum* DSM 50914, *Rps. capsulata* Kb1, *Rps. sphaeroides* DSM 158, *Rps. gelatinosa* DSM 2150, *Rps. palustris* 1a1 und *Rps. viridis* DSM 170) gemessen (Tab. V). Die PP-abhängige F-6-P-Phosphotransferase konnte – außer in dem zweiten *R. rubrum*-Stamm – nur in *Rps. gelatinosa* nachgewiesen werden. 1-Phosphofructokinase-Aktivitäten

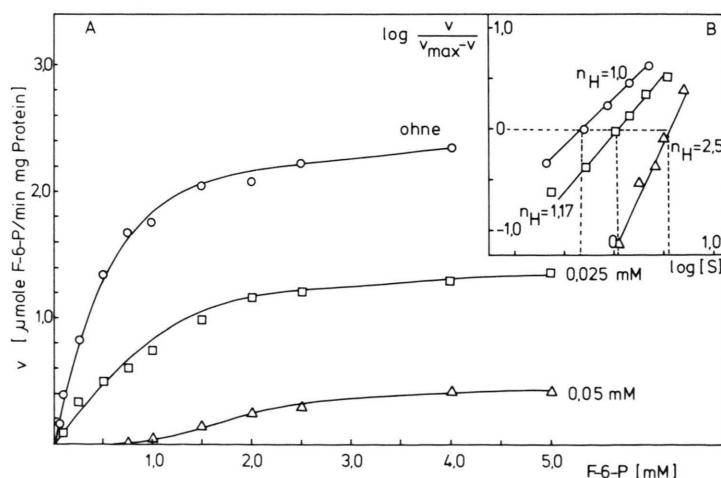


Abb. 4. Effekt von AMP auf die F-6-P-Sättigungskurve der PP-abhängigen F-6-P-Phosphotransferase aus *R. rubrum* S1. Die Reaktionsraten wurden in Gemischen mit 50 mM Imidazol-HCl-Puffer (pH 7,2); 5 mM MgCl_2 ; 1 mM Na_4PP ; 2,3 μg Enzym und den in der Abbildung angegebenen F-6-P- und AMP-Konzentrationen gemessen. \circ , ohne AMP; \square , + 0,025 mM AMP; \triangle , + 0,05 mM AMP. A: Reaktionsraten v als Funktion der F-6-P-Konzentration. B: Hill-Diagramm der Daten aus A.

Tab. V. Spezifische Aktivitäten einiger Enzyme des Intermediärstoffwechsels in Rohextrakten verschiedener Rhodospirilaceen-Arten nach phototroper Anzucht mit Fructose bzw. Malat.

Enzym	Spezifische Aktivität [mE/mg Protein]							
	<i>Rps. caps. Kb1</i>		<i>Rps. sphaer. DSM 158</i>		<i>Rps. gel. DSM 2150</i>	<i>Rps. pal. a</i>	<i>Rps. viridis a</i>	
	Fruct.	Malat	Fruct.	Malat	Fruct.	Malat	Malat	Fruct.
1-Phosphofructokinase	312	34	329	30	n. n. ^b	n. n.	n. n.	56
6-Phosphofructokinase	6	3	50	24	6	n. n.	n. n.	10
PP-abhängige F-6-P-Phosphotransferase (Hinreaktion)	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	175	n. n.	n. n.	510
FBPase	377	169	35	66	125	10	55	12

^a *Rps. palustris* 1a1 und *Rps. viridis* DSM 170 wachsen nicht mit D-Fructose als C-Quelle.

^b n. n. = nicht nachweisbar.

konnten in *R. rubrum*, *Rps. capsulata*, *Rps. sphaerooides* und *Rps. gelatinosa* gemessen werden. Offenbar kommen Phosphofructokinasen (ATP- oder PP-abhängig) nur in solchen Stämmen bzw. Species vor, welche Hexosen (in diesem Falle D-Fructose) unter photosynthetischen Bedingungen als C-Quelle verwerten können.

Diskussion

Pyrophosphat-abhängige Fructose-6-phosphat-Phosphotransferasen wurden bisher erst in vier Mikroorganismen-Arten nachgewiesen, in *Entamoeba histolytica* [9], *Propionibacterium shermanii* [19], *Rhodospirillum rubrum* und *Rhodopseudomonas gelatinosa*. In Propionibakterien und der pathogenen Amoeba übernimmt das Enzym offenbar die Funktion der fehlenden (oder zumindest nur in sehr geringer Aktivität vorhandenen) ATP-abhängigen 6-Phosphofructokinase im Zuge der Glykolyse und trägt damit zur Konservierung der Phosphoanhydridenergie des Pyrophosphats im Intermediärstoffwechsel bei (vgl. ref. [1]).

Die Rolle der PP-abhängigen F-6-P-Phosphotransferase im Stoffwechsel von *R. rubrum* oder *Rps. gelatinosa* ist demgegenüber unklar. Eine Funktion analog der „klassischen“ Phosphofructokinase im Zuge der Photoassimilation oder der Dunkelfermentation von D-Fructose ist aufgrund der außerordentlich starken Hemmung der Hinreaktion durch AMP unwahrscheinlich. Außerdem wird D-Fructose mittels des PEP-Fructose-Phosphotransferase-Systems als F-1-P in die Zellen eingeschleust [20] und dann

höchstwahrscheinlich mittels der durch D-Fructose induzierbaren 1-Phosphofructokinase zu Fructose-1,6-bisphosphat phosphoryliert. Auch wenn der deutlich erhöhte Enzymtiter nach Adaptation von *R. rubrum* an eine Dunkelfermentation von D-Fructose eine glykolytische Funktion der PP-abhängigen F-6-P-Phosphotransferase nahelegt, spricht doch das Regulationsmuster (Hemmung durch AMP) dagegen, zumal bisher auch kein Effektor gefunden wurde, welcher die Hemmung durch AMP kompensiert.

Bei der Diskussion einer möglichen Rolle des Enzyms im Stoffwechsel sind zweifellos die „regulatorischen“ Hemmwirkungen der Adenylate von Bedeutung. Interessanterweise unterscheidet sich der Mechanismus der AMP-Hemmung deutlich von demjenigen der ADP-Hemmung. Aufgrund des in Bezug auf F-6-P gemischten Hemmtypus ist anzunehmen, daß ADP – evtl. durch Konkurrenz mit PP um das Mg²⁺ – die Bindung des F-6-P an das Enzym beeinträchtigt. Bei hohen F-6-P-Konzentrationen bleibt die Hemmung aus. Demgegenüber verringert AMP drastisch die maximale Reaktionsrate und induziert Kooperativität in der F-6-P-Sättigungscurve. Es ist nicht auszuschließen, daß diese an allosterische Wechselwirkungen erinnernden Effekte mit Änderungen im Molekulargewicht des Enzyms einhergehen (vgl. Abschnitt Molekulargewichtsbestimmung).

Physiologisch von Bedeutung ist sicherlich die Tatsache, daß die Rückreaktion wesentlich weniger empfindlich gegenüber AMP ist als die Hinreaktion. Hin- und Rückreaktion unterscheiden sich auch deutlich in ihrem Mg²⁺-Bedarf. Halbsättigung der

Hinreaktion (mit 1 mM PP und 2,5 mM F-6-P) wird schon mit 0,1 mM, Halbsättigung der Rückreaktion (mit 5 mM Pa und 1,5 mM FBP) erst mit 0,5 mM MgCl₂ erzielt. Ähnliche Daten wurden für die PP-abhängige Phosphofructokinase aus *Entamoeba histolytica* [21] ermittelt. Aufgrund dieser unterschiedlichen *K_m*-Werte für Mg²⁺ hemmen Metall-chelierende Substanzen wie ATP, PP und Citrat bei limitierender MgCl₂-Konzentration (< 1 mM) die Rückreaktion in weitaus stärkerem Maße als die Hinreaktion. Inwieweit diesen durch Chelatbildung bedingten Hemmeffekten eine Rolle *in vivo* zukommt, ist schwer abzuschätzen.

Abschließend muß festgestellt werden, daß aufgrund der regulatorischen Eigenschaften eine Rolle der PP-abhängigen F-6-P-Phosphotransferase im Zuge der Glykolyse bzw. der D-Fructose-Photoassimilation unwahrscheinlich ist. Demzufolge hätte das Enzym im Intermediärstoffwechsel die Funktion

einer Phosphat-abhängigen Fructose-1,6-bisphosphatase. Es ist sicherlich kein Zufall, daß dieses ungewöhnliche Enzym gerade in solchen Rhodospirillaceen-Arten (*R. rubrum* und *Rps. gelatinosa*) nachgewiesen werden kann, die eine im allosterischen Sinne regulierte anorganische PPase enthalten [22]. In diesen Bakterien-Arten scheint die Regulation des PP-Pools durch ein komplexes Wechselspiel zwischen Biosynthese-Reaktionen, anorganischer PPase und PP-abhängigen Phosphotransferasen (PEP-Carboxytransphosphorylase; Pyruvat, Phosphat Dikinase sowie PP-abhängige F-6-P-Phosphotransferase) zu erfolgen.

Danksagung

Die vorliegenden Untersuchungen wurden durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

- [1] J.-H. Klemme, Z. Naturforsch. **31 c**, 544 (1976).
- [2] G. Kullmann, Vergleichende Untersuchungen zur Regulation der Pyruvatkinase bei fakultativ phototrophen Bakterien. Dissertation, Universität Bonn 1978.
- [3] A. Shadi, S. E. Mansurova, I. I. Chernyadew u. I. S. Kulæv, Mikrobiologiya **44**, 206 (1975).
- [4] J.-H. Klemme u. H. Gest, Eur. J. Biochem. **22**, 529 (1971).
- [5] J. G. Ormerod, K. S. Ormerod u. H. Gest, Arch. Biochem. Biophys. **94**, 449 (1961).
- [6] J.-H. Klemme u. H. G. Schlegel, Arch. Mikrobiol. **59**, 185 (1967).
- [7] G. Beisenherz, H. J. Boltze, T. Bücher, R. Czok, K. H. Garbade, E. Meyer-Arendt u. G. Pfeiderer, Z. Naturforsch. **8B**, 555 (1953).
- [8] O. Lowry, N. Rosebrough, A. Farr u. R. Randall, J. Biol. Chem. **193**, 265 (1951).
- [9] R. E. Reeves, D. J. South, H. J. Blytt u. L. G. Warren, J. Biol. Chem. **249**, 7737 (1974).
- [10] I. R. Joint, I. Morris u. R. C. Fuller, J. Biol. Chem. **247**, 4833 (1972).
- [11] R. Conrad u. H. G. Schlegel, Arch. Microbiol. **112**, 39 (1977).
- [12] H. E. Hurlbert u. J. Lascelles, J. Gen. Microbiol. **33**, 445 (1963).
- [13] H. R. Maurer, Disk-Elektrophorese. Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Elektrophorese. Walter de Gruyter, Berlin 1968.
- [14] H. H. Taussky u. E. Shorr, J. Biol. Chem. **202**, 675 (1953).
- [15] H.-H. Hohorst, in: Methoden der enzymatischen Analyse (H. U. Bergmeyer, Hrsg.), S. 1200, Verlag Chemie, Weinheim 1970.
- [16] T. Bücher u. H.-H. Hohorst, Methoden der enzymatischen Analyse (H. U. Bergmeyer, Hrsg.), S. 1282, Verlag Chemie, Weinheim 1970.
- [17] W. Diezel, H.-J. Böhme, K. Nissler, R. Freyer, W. Heilmann, G. Kopperschläger u. E. Hofmann, Eur. J. Biochem. **38**, 479 (1973).
- [18] W. W. Cleland, Nature **198**, 463 (1963).
- [19] W. E. O'Brien, S. Bowien u. H. G. Wood, J. Biol. Chem. **250**, 8690 (1975).
- [20] M. H. Saier, B. U. Feucht u. S. Roseman, J. Biol. Chem. **246**, 7819 (1971).
- [21] R. Reeves, R. Serrano u. D. J. South, J. Biol. Chem. **251**, 2958 (1976).
- [22] J.-H. Klemme, B. Klemme u. H. Gest, J. Bacteriol. **108**, 1122 (1971).