Die Verwertung von Essigsäure durch *Chlorella* im Licht

Von H. G. SCHLEGEL *

Aus dem Institut für Mikrobiologie, Göttingen

(Z. Naturforschg. 14 b, 246—253 [1959]; eingegangen am 15. Oktober 1958)

Studies on the utilization of acetate-2- ^{14}C by *Chlorella pyrenoidosa* have shown that light brings about a preferential incorporation of acetate into the fatty acids of the cellular lipids. Approximately 50% of the labelled acetate-carbon added was found in the petroleumethersoluble fraction. The isotope-pattern of glucose (from hydrolyzed starch) is in agreement with the function of the tricarboxylic acid-, glyoxylic acid-cycle respectively in *Chlorella*. The asymmetrical distribution of the labeled carbon (C 4, 5, 6 > C 1, 2, 3) in the glucose-molecule seems to indicate that there is a dilution of the dihydroxyacetone-moiety from a pool which may be fed by (trans)aldolase-reactions.

Vorangegangene Untersuchungen hatten gezeigt, daß der Umsatz organischer Substrate durch *Chlorella* von den Versuchsbedingungen ($\pm$ Licht, $\pm \text{CO}_2$) quantitativ stark beeinflusst wird. Assimilationsquotienten von $\Delta\text{O}_2 / -\Delta\text{CO}_2 \approx 5$ bei Gegenwart von Essigsäure und CO_2 deuteten auf eine Beeinflussung der Essigsäure-Assimilation durch Licht auch in qualitativer Hinsicht und auf einen bevorzugten Einbau des Acetats in die Fettfraktion der Zelle¹. Unter Verwendung von Acetat-2- ^{14}C sollten diese Befunde überprüft werden. Darüber hinaus zielten die Versuche dieser Arbeit darauf ab, durch schrittweisen Abbau der im Licht und im Dunkeln synthetisierten Glucose das Verteilungsmuster des eingebauten Acetat-Kohlenstoffes im Glucosemolekül zu erfassen, welches Rückschlüsse auf die beteiligten Prozesse des Intermediärstoffwechsels ermöglicht. Wood und Mitarbb.^{2, 9, 19} haben die Isotopenverteilung im Glykogen der Leber mehrfach als Indikator des Intermediärstoffwechsels herangezogen und damit wesentliche Beiträge für die Funktion des Tricarbonsäurezyklus in tierischen Organen geliefert. An Grünalgen liegt bisher nur eine sehr kleine Anzahl von Untersuchungen dieser Art vor. Da an der photosynthetischen CO_2 -Fixierung und der Regeneration des CO_2 -Acceptors zahlreiche Schritte des intermediären Kohlenhydrat-Stoffwechsels beteiligt sind, dürften von experimentellen Studien über den Einbau von markierten Zuckern und organischen Säuren wesentliche Beiträge zur Aufhellung der komplexen Prozesse der Photosynthese zu erwarten sein. GIBBS und KANDLER³ erfaßten die Isotopen-

verteilung in Glucose, die aus *Chlorella*, Tabak-, Canna- und Sonnenblumenblättern nach kurzfristiger $^{14}\text{CO}_2$ -Exposition im Licht gewonnen worden war, und fanden eine asymmetrische Verteilung des isotopen Kohlenstoffes über das Glucosemolekül (C 4 > C 3 > C 1, 2, 5 oder 6). Über einige orientierende Versuche mit markierten Acetaten berichtete GIBBS⁴. Da die vorliegende Untersuchung zu verwandten Ergebnissen führte, wird die Frage des Zustandekommens der asymmetrischen Markierung eingehend erörtert.

Methoden

Chlorella pyrenoidosa wurde herangezogen wie beschrieben¹, nach fünftägigem Wachstum bei 20°C (am Nordfenster und im Licht von Tageslicht-Leuchtstoffröhren) durch Zentrifugieren geerntet, gewaschen und durch 18–24 stdg. Durchströmen mit Luft im Dunkeln an Speichersstoffen verarmt. Vor dem Versuch wurden die Zellen erneut gewaschen und in $m/30$ -Phosphatpuffer pH 5,6 aufgeschwemmt. Alle Versuche wurden an reservestoffarmen Zellen durchgeführt.

Die Aufnahme von markiertem Acetat unter variierten Bedingungen ($\pm$ Licht, $\pm$ Kohlendioxid) wurde nach zwei verschiedenen Methoden verfolgt: a) Versuch 1 (Tab. 1): In 15-ml-Warburg-Gefäßen in einer Licht-Warburg-Apparatur mit Bodenbeleuchtung (ca. 1000 fcdls am Boden der Gefäße). b) Versuch 2 (Abb. 1): Zur kontinuierlichen Durchströmung wurde die *Chlorella*-Suspension in Feinsinterfiltern mit hohem Rand, die in einem gleichmäßig temperierten (30°C), von der Seite belichteten (75-W-Reflektor Flodd Lamps, General Electric) Glasaquarium untergetaucht waren, von unten her mit 5% CO_2 enthaltender, bzw. CO_2 -freier Luft durchperlt. Nach gewissen Zeiten

* Durchgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Dem Leiter des Department of Microbiology, School of Medicine, Western Reserve University, Cleveland, Herrn Dr. L. O. KRAMPITZ, danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes.

¹ H. G. SCHLEGEL, Planta 47, 510 [1956].

² H. G. WOOD, N. LIFSON u. V. LORBER, J. biol. Chemistry 159, 475 [1945].

³ M. GIBBS u. O. KANDLER, Proc. nat. Acad. Sci. USA 43, 446 [1957].

⁴ M. GIBBS, Plant Physiol., Suppl. 32, XVII [1957].

wurden 5-ml-Proben der Suspension in 0,5 ml 5-n. H_2SO_4 enthaltende Zentrifugengläser auspipettiert, abzentrifugiert, mit 5 ml 1-proz. NaCl-Lösung zweimal gewaschen, in van Slyke-Röhrchen übergeführt, bei $105^\circ C$ getrocknet und nach van Slyke und Folch⁵ verbrannt; das Kohlendioxyd wurde in 3,5 ml 2,5-n. CO_2 -freier NaOH aufgefangen, gewogen und die Radioaktivität nach der $BaCO_3$ -Methode bestimmt.

Zur Verfolgung des Einbaus von Acetat in verschiedene Zellfraktionen (Abschnitt II und III) wurden 7–8 g Algen (Naßgewicht) in 200 ml *m*/30-Phosphatpuffer pH 5,6 aufgeschwemmt und zu gleichen Teilen in zwei Fernbach-Kolben (4 l) übergeführt, von denen der eine dunkel gehalten, der andere von unten her einer Lichtintensität von 2000 fcdls ausgesetzt wurde. Beide Kolben wurden in einem Thermostaten bei $30^\circ C$ geschüttelt. Nach 30 min langem Schütteln unter Durchströmung mit 5% CO_2 -Luft-Gemisch wurden jedem Kolben ca. 30 μ Mole Acetat-2- ^{14}C zugesetzt und Schütteln und Durchströmung für 10–30 min fortgesetzt. Der Einbau wurde durch Herabsetzung des pH auf 1,0 und Eiskühlung abgebrochen; dann wurde sofort in der Kälte abzentrifugiert und einmal mit 1% NaCl-Lösung gewaschen; die gepackten Zellen wurden bis zur Extraktion im gefrorenen Zustand aufbewahrt. Mit heißem, wäßrigem Äthanol, Aceton, einem Gemisch von Äthanol-Äther und Äther⁶ wurden die Pigmente, Fette und freien Zucker sowie deren Ester weitgehend extrahiert. Der Pigmentextrakt wurde zur Trockne eingengt und mit trockenem Petroläther extrahiert, wobei ein beträchtlicher Teil wasserlöslicher Substanzen, darunter im wesentlichen Glucose, zurückblieben. Der Petrolätherextrakt wurde mehrmals mit Wasser gewaschen und durch Filtrieren durch eine Schicht von wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Ein aliquoter Teil wurde verbrannt und die spezifische Aktivität bestimmt. Der Rest wurde nach Eindunsten mit 20 ml einer Lösung von 5-proz. KOH in 50-proz., wäßrigem Methanol versetzt und durch 10-stdg. Kochen unter Rückfluß verseift. Die alkalische Lösung wurde dann mit Wasser verdünnt und mit Petroläther erschöpfend extrahiert. Diese die Kohlenwasserstoffe enthaltende Petrolätherfraktion wurde nach Waschen mit 0,1-n. $NaHCO_3$ -Lösung und Wasser durch wasserfreies Natriumsulfat filtriert, eingengt, gewogen und ein aliquoter Teil zur Bestimmung der spezifischen Aktivität verbrannt. Der Rest des Unverseifbaren wurde von Petroläther an Aluminiumoxyd (aktives und deaktiviertes 1:1)⁷ chromatographiert und die Aktivität der einzelnen Zonen und die spezifische Aktivität des β -Carotins bestimmt. Aus der alkalischen wäßrigen Phase wurden nach Ansäuern die Fettsäuren mit Petrol-

äther ausgeschüttelt, dann in Alkali aufgenommen und wieder in Petroläther übergetrieben; der Petroläther wurde mit 0,01-n. H_2SO_4 mehrmals gewaschen und schließlich über wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet. Die spezifische Aktivität dieser Fettsäurefraktion wurde sowohl in dünner Schicht als auch nach der Bariumcarbonat-Methode bestimmt.

Die fettextrahierten Algen wurden mit 4 ml 1-n. H_2SO_4 versetzt und 3 Stdn. im strömenden Dampf hydrolysiert. Aus dem Hydrolysat ließen sich durch Entsalzen an den Ionenaustauschern Duolite C-3 und Duolite A-4 und zweimalige Chromatographie mit wassergesättigtem *n*-Butanol an säuregewaschenem Papier Whatman Nr. 3 MM 25 mg reine Glucose gewinnen. Die Radioautographie eines Chromatogramms der gereinigten Glucose (in Phenol- H_2O) zeigte, daß in dem Glucosepräparat keine verunreinigenden radioaktiven Substanzen vorhanden waren. An einem aliquoten Teil der Glucose wurde nach Verbrennung die spezifische Aktivität bestimmt.

Der Glucoseabbau erfolgte nach dem von GUNSALUS und GIBBS⁸ entwickelten und von BERNSTEIN⁹ überprüften und ausgearbeiteten Verfahren der Vergärung durch den heterofermentativen Milchsäurebildner *Leuconostoc mesenteroides* *. Die isolierte radioaktive Glucose wurde durch reine Glucose auf 0,6–1,0 mMol ergänzt. Frische, am Ende der log-Phase geerntete und zweimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschene Zellen von *Leuconostoc mesenteroides* vergären Glucose zu CO_2 (C 1), Äthanol (C 2, 3) und Milchsäure (C 4, 5, 6). Kohlendioxyd wurde während der Gärung durch einen N_2 -Strom laufend entfernt und in 3,5 ml 2,5-n. NaOH aufgefangen; der Fortgang der Gärung wurde durch wiederholte Wägung der CO_2 -Absorptionseinheit verfolgt. Der Äthylalkohol wurde aus dem von den Zellen befreiten und alkalisch gemachten (pH 8,0) Gärmedium abdestilliert, mit Chromsäure zu Essigsäure oxydiert und letztere durch Wasserdampfdestillation übergetrieben, eingengt und dem SCHMIDT-Abbau¹⁰ unterworfen. Aus dem Destillationsrückstand des Gärmediums wurde die Milchsäure nach Ansäuern durch Äther extrahiert und von eventuell vorhandenen flüchtigen Verbindungen durch Wasserdampfdestillation befreit. C 4 wurde mit Permanganat abgespalten¹¹ und als CO_2 in NaOH aufgefangen; der Acetaldehyd wurde durch Bisulfit gebunden und durch Chromsäure zu Essigsäure oxydiert (C 5, 6). Durch quantitative Bestimmung der Intermediärprodukte wurde der Abbau verfolgt. Im einzelnen wurde die Durchführungsvorschrift von SAKAMI¹² befolgt.

Die Methode zur Aktivitätsbestimmung des CO_2 ist identisch mit der, die ORMEROD¹³ eingehend beschrieben

⁵ D. D. VAN SLYKE u. J. FOLCH, J. biol. Chemistry **136**, 509 [1940].

⁶ H. W. MILNER, J. biol. Chemistry **176**, 813 [1948].

⁷ T. W. GOODWIN u. M. JAMIKORN, Biochem. J. **62**, 269 [1956].

⁸ I. C. GUNSALUS u. M. GIBBS, J. biol. Chemistry **194**, 871 [1952].

* Für die Überlassung dieses Stammes (39) danke ich Dr. J. DE MOSS.

⁹ I. A. BERNSTEIN, K. LENTZ, M. MALM, P. SCHAMBYE u. H. G. WOOD, J. biol. Chemistry **215**, 137 [1955].

¹⁰ E. F. PHARES, Arch. Biochem. Biophysics **33**, 173 [1951].

¹¹ T. E. FRIEDEMANN u. J. B. GRAESER, J. biol. Chemistry **100**, 291 [1933].

¹² W. SAKAMI, Handbook of isotope tracer methods Dept. of Biochemistry, Western Reserve University, Cleveland, Ohio 1955.

¹³ J. G. ORMEROD, Biochem. J. **64**, 373 [1956].

hat. Alle Messungen erfolgten mit dem Tracerlab-Counter; es wurden mindestens 3000 Zerfälle gezählt; die Meßwerte wurden bezüglich des Nulleffektes und der Selbstabsorption korrigiert; die in Zerfällen pro min gemessene Aktivität wurde in Millimikro-Curies ($m\mu C$) umgerechnet.

Ergebnisse

I. Vorversuche

Die ersten Versuche zielten darauf ab, unsere früheren über die Polysaccharid-Synthese angestellten Versuche unter Anwendung der Tracer-Technik zu überprüfen und den Einfluß von Licht und Kohlendioxyd auf die Verwertung der Essigsäure zu studieren; auch sollten diese Versuche über die Bedingungen Aufschluß geben, unter denen der Einbau von markiertem Acetat zum Zwecke der Analyse einzelner Zellfraktionen zu erfolgen hat.

Bedingungen	Radioaktivität der Zellen [$m\mu C$]	
	Versuch I	Versuch II
Dunkel — CO_2	55,6	55,2
Dunkel + CO_2	39,3	38,7
Licht — CO_2	70,5	61,3
Licht + CO_2	90,0	74,5

Tab. 1. Einbau von Acetat- $2^{14}C$ in *Chlorella*. Warburg-Gefäße mit *Chlorella*-Suspension (10,2 mg Tr.-Gew.) in $m/15$ -Phosphatpuffer pH 5,5; 0,1 ml 20-proz. KOH im Zentralgefäß, bzw. 5% CO_2 in der Atmosphäre; 10 μ Mole Acetat (0,15 μC) aus dem Seitenarm zugefügt und nach 80 min mit 0,3 ml 5-n. H_2SO_4 abgestoppt. Beleuchtungsstärke am Boden der Gefäße 1000 fcdls.

Aus Tab. 1 ist die gegenüber dem Dunkelversuch im Licht erhöhte Acetataufnahme ersichtlich. Der durch die Entziehung des Kohlendioxyds im Dunkeln beschleunigte Einbau des Acetats entspricht ganz den bereits früher durch Messung der Polysaccharid-Synthese gewonnenen Ergebnissen. Der Versuch im Licht erlaubt keine eindeutigen Schlüsse, da Acetat zum Teil veratmet und ein Teil des respiratorischen CO_2 sicher reassimiliert wird. Der Versuch wurde unter Bedingungen wiederholt, die einen wirksameren Austausch zwischen dem Kohlendioxyd der Gasphase und dem der Acetatveratmung zuzuschreibenden CO_2 versprochen. Die Suspension wurde durch ein am Gefäßboden befindliches Glasinterfilter kräftig durchströmt. Das Atmungs- CO_2 und somit auch das gebildete radioaktive CO_2 sollte größtenteils im Luftstrom entfernt und somit eine Reassimilation weitgehend verhindert werden.

Beide Versuche, im Licht und im Dunkeln (Abb. 1) wurden nacheinander angestellt; die Daten sind also nur bedingt miteinander vergleichbar. Der Acetat-Einbau wird im Licht stark gefördert, sofern

Abb. 1. Einbau von Acetat- $2^{14}C$ in *Chlorella* unter kontinuierlicher Durchströmung mit 5% CO_2 enthaltender, bzw. durch KOH gewaschener Luft, im Licht (a) und im Dunkeln (b). Jedes Gefäß (Feinsinterfilter mit hohem Rand) enthielt 6 ml Algensuspension (=61,2 mg Tr.-Gew.); 16 ml 0,1-m. Phosphatpuffer pH 5,6; 1 ml $3 \cdot 10^{-3}$ -m. $NaHCO_3$, bzw. H_2O ; 30 μ Mole Acetat (0,3 μC); seitliche Belichtung, Beleuchtungsstärke ca. 1000 fcdls. Proben von 5 ml wurden 25, 45 und 65 min nach Zusatz des Acetats entnommen und mit 0,5 ml 5-n. H_2SO_4 abgestoppt; Zellen zweimal gewaschen und spezifische Aktivität nach Verbrennung gemessen. Licht- und Dunkelversuch wurden nacheinander unter den gleichen Bedingungen durchgeführt.

CO_2 vorhanden ist. Im CO_2 -freien Milieu wird auch im Licht der Acetat-Einbau herabgesetzt. Die Depression der Acetat-Aufnahme durch CO_2 -Entziehung im Licht unter den Dunkeleinbau steht mit den Ergebnissen von PHILLIPS¹⁴ im Einklang, nach denen das Wachstum von *Chlorella* mit Acetat bei CO_2 -Abwesenheit durch Licht gehemmt wird.

II. Einbau von Acetat- $2^{14}C$ in verschiedene Zellfraktionen

Die Bestimmung des Quotienten $\Delta O_2 / -\Delta CO_2$ während der Assimilation von CO_2 und Essigsäure durch *Chlorella pyrenoidosa* hatte Werte bis zu 6 ergeben, woraus auf eine bevorzugte Synthese von Substanzen zu schließen war, die stärker reduziert sind als Kohlenhydrate; es wurde vermutet, daß unter den gegebenen Bedingungen Fette und Terpene aufgebaut werden. Um diese manometrischen Experimenten entstammenden Schlüsse in einer mehr direkten Weise nachzuprüfen, wurden *Chlorella*-Suspensionen im Licht und im Dunkeln in Gegenwart von markiertem Acetat geschüttelt; in gewissen Zeitintervallen wurden Proben entnommen, von denen die spezifischen Aktivitäten der in

Abb. 2. Spezifische Aktivitäten im Ätherlöslichen und in den äther-extrahierten Zellresten von *Chlorella* als Funktion der Einbauzeit von Acetat-2-¹⁴C. Je 0,5 g (Tr.-Gew.) *Chlorella*-Zellen in 75 ml *m*/30-Phosphatpuffer *p*_H 5,6 wurden im Licht (2000 fcdls) und im Dunkeln geschüttelt; 9,20 und 45 min nach Zusatz von je 8 μMolen Acetat-2-¹⁴C wurden Proben entnommen und aufbereitet wie im Text angegeben. Spezifische Aktivität in mμC/mg des Petrolätherlöslichen, bzw. der äther-extrahierten Zellen.

Fettlösungsmitteln löslichen Komponenten und der extrahierten Zellreste bestimmt wurden. Einzelheiten der Versuchsdurchführung sind im methodischen Teil gegeben.

Abb. 2 gibt die Zunahme der spezifischen Aktivitäten im petroläther-löslichen Anteil und den äther-extrahierten Zellresten während der Assimilation von Acetat-2-¹⁴C im Licht und im Dunkeln wieder. Die spezifische Aktivität des Ätherlöslichen steigt im Licht etwa achtmal rascher an als im Dunkeln.

Während Licht den Einbau von Essigsäure in die äther-unlöslichen Komponenten der Zellen kaum erhöht, fördert es den Einbau in die Lipide außerordentlich. Die vorangegangenen Beobachtungen über die Erhöhung des Assimilationsquotienten während der Acetatassimilation im Licht berechtigen dazu, das Anwachsen der spezifischen Aktivität der Fettfraktion mit einer Netto-Synthese von Fetten zu interpretieren und nicht etwa nur als Ausdruck eines höheren „turnover“ der Fette gegenüber anderen Zellbestandteilen zu werten.

Das Petrolätherlösliche wurde verseift und in Unverseifbares und Fettsäuren getrennt (Tab. 2). Da die spezifische Aktivität des Unverseifbaren, welches die Polyisoprenoide enthält, fragwürdig klein erschien, wurde β-Carotin chromatographisch isoliert und seine spezifische Aktivität bezüglich der durch Wägung wie auch der durch Extinktionsmessung bestimmten Menge errechnet; beide Werte stimmten gut überein. Glucose wurde durch Säurehydrolyse der in den fettextrahierten Zellen enthaltenen Stärke gewonnen und durch wiederholte Papierchromatographie gereinigt. Betrachten wir zunächst die Verhältnisse beim Einbau im Licht. Von den zugesetzten 21 μC wurden 10,1 μC in die petroläther-lösliche Fraktion eingebaut, die nahezu ein Drittel des Trockengewichtes ausmacht. Davon fanden wir 6,2 μC in der Fettsäurefraktion, die sicher nicht quantitativ erfaßt wurde. Diesen Beträgen gegenüber fallen die in die Fraktion des Unverseifbaren und in die Stärke eingebauten Mengen radioaktiven Acetats kaum ins Gewicht. In den spezifischen Aktivitäten der isolierten Fraktionen kommt der bevorzugte Einbau des zugesetzten Acetats in die Fraktion der Fettsäuren noch deutlicher zum Ausdruck. Die früher geäußerte Vermutung, daß Acetat im Licht auch bevorzugt in Terpenkörper eingeeht, hat sich nicht bewahrheitet;

Zellfraktion	Gesamtaktivität [mμC]		Spezifische Aktivität [mμC/mgC]	
	Licht	Dunkel	Licht	Dunkel
Petrolätherlösliches	10100	1320	104	14,3
davon in Fettsäuren	6200	760	108	14,1
davon im Unverseifbaren	240	47	12	2,5
davon in β-Carotin	6	1,3	11,2	2,3
Glucose (hydrolyst. Stärke)	73	68	7,5	6,9

Tab. 2. Einbau von Acetat-2-¹⁴C in verschiedene Zellfraktionen von *Chlorella* im Licht und im Dunkeln. Chlorellazellen (je 0,52 g Tr.-Gew.) in 100 ml *m*/30-Phosphatpuffer *p*_H 5,6 unter 5% CO₂ Luft-Atmosphäre im Licht (2000 fcdls) bzw. Dunkelheit 30 min vorinkubiert, dann 21 μMole (=21 μC) Acetat-2-¹⁴C zugefügt und 20 min geschüttelt; Einbau beendet durch Zusatz von je 0,4 ml 1-*n*. HCl und Eiskühlung. Zellen wurden abzentrifugiert und gewaschen. In den vereinigten und bei *p*_H 9,0 eingeeengten überstehenden Lösungen wurde das unverbrauchte Acetat nach Wasserdampfdestillation bestimmt; im Licht wurden 0,28 und im Dunkeln 7,6 μC unverbraucht gelassen.

ihre spezifische Aktivität, repräsentiert durch Werte für β -Carotin, liegt zwar noch über dem Wert für Glucose, beträgt aber nur ein Zehntel des Wertes für Fettsäuren.

Im Dunkeln wurden nur 1,32 μ C in das Petrol-ätherlösliche eingebaut. Die spezifischen Aktivitäten der Fettfraktionen sind beträchtlich geringer als im Licht. Aber auch hier liegen die Werte für Fettsäuren höher als für Polyisoprenoide und Glucose. Das bedeutet, daß das Acetat selbst im Dunkeln (unter den hier gegebenen Bedingungen des N-Mangels und nach Verarmung) vorzugsweise in Fettsäuren eingebaut wird.

Nach den vorliegenden Ergebnissen steigert Licht den Acetateinbau in *Chlorella*-Zellen in einer spezifischen Weise, indem es die Bildung von Speichersstärke nur unbedeutend stimuliert, die Synthese von Fettsäuren aus Acetat aber außerordentlich begünstigt. Es ist anzunehmen, daß dieser Effekt unter den hier angewandten Bedingungen des N-Mangels und nach Verarmung der Zellen noch ausgeprägter in Erscheinung tritt als unter Wachstumsbedingungen. Die Assimilation von markiertem Acetat durch gewaschene Suspensionen von *Chlorella* im Licht bietet sich als ein rentabler Weg zur Synthese markierter langkettiger (C 16 und C 18) Fettsäuren aus Essigsäure an.

III. Isotopenverteilung im Glucosemolekül

Die gereinigte Glucose wurde dem biologischen Abbau durch *Leuconostoc mesenteroides* unterwor-

fen, und die spezifische Aktivität jedes einzelnen Kohlenstoffatoms des Glucosemoleküls erfaßt. In Tab. 3 sind die Ergebnisse des Abbaus von Glucose, die aus drei voneinander unabhängigen Versuchen stammt, dargestellt. Die Versuchsbedingungen weichen hinsichtlich der Einbauzeiten und eingesetzten Aktivitäten voneinander ab, wodurch die unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten hinreichend erklärt werden. Dennoch stimmen die Relationen zwischen den gewonnenen Daten soweit überein, daß sie gemeinsam interpretiert werden können. Die im vorangehenden Abschnitt herausgestellte Tatsache, daß die im Dunkeln und die im Licht gebildete Glucose nahezu die gleiche spezifische Aktivität aufweist, kann bereits als Hinweis dafür angesehen werden, daß sich der Mechanismus der Stärkesynthese unter beiden Bedingungen nicht nennenswert unterscheidet. Die gewonnenen Werte bestätigen diese Annahme. Um eine rasche Orientierung zu ermöglichen, wurden die Mittelwerte der relativen spezifischen Aktivitäten (C 6 = 100) in Abb. 3 graphisch dargestellt.

Zunächst sei die vorherrschende *Symmetrie* in der Markierung der Kohlenstoffatome der Glucosekette (C 1 = 2 = 5 = 6 > C 3 = 4) kurz erörtert. Diese Isotopenverteilung im Glucosemolekül deutet auf die maßgebliche Beteiligung des Tricarbonsäurezyklus (TCC) bei der Assimilation von Essigsäure durch *Chlorella*. Der TCC in seiner bisherigen Form ist jedoch nur für dissimilatorische Prozesse von Bedeutung; für jeden in den Zyklus einmündenden C 2-Körper werden zwei Moleküle Kohlendioxyd abgespalten. Nennenswerte synthetische Leistungen

		Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
		$\mu\mu\text{C}/\text{mgC}$	% C 6	$\mu\mu\text{C}/\text{mgC}$	% C 6	$\mu\mu\text{C}/\text{mgC}$	% C 6
Licht	C 1	21,2	72	5,72	87	5,55	82
	C 2	22,8	77	7,2	109	5,75	85
	C 3	13,0	44	2,64	40	0,86	13
	C 4	21,1	72	3,3	50	1,14	17
	C 5	31,5	107	6,8	103	7,6	112
	C 6	29,5	100	6,6	100	6,8	100
Dunkel	C 1	10,5	55	5,34	72	2,3	57
	C 2	14,0	74	5,72	77	2,55	63
	C 3	6,9	36	2,1	28	0,97	24
	C 4	8,3	44	2,54	34	2,48	61
	C 5	22,5	118	7,72	104	4,42	108
	C 6	19,0	100	7,42	100	4,07	100

Tab. 3. Verteilung von ^{14}C im Glucosemolekül. Vers. 1. 0,5 g (Tr.-Gew.) *Chlorella*; 30 μ Mole Acetat; Einbauzeit 35 Minuten. Die mit 80-proz. wäbrigem Äthanol extrahierten Zuckerester wurden gemeinsam mit den Zellen hydrolysiert. Vers. 2. Circa 0,4 g (Tr.-Gew.) *Chlorella*; 2 μ Mole Acetat; Einbauzeit 30 Minuten. Die Glucose wurde durch Säurehydrolyse der fettextrahierten Zellen gewonnen. Vers. 3. 0,72 g (Tr.-Gew.) *Chlorella*; 25 μ Mole Acetat, Einbauzeit 20 Minuten. Die Glucose wurde durch Säurehydrolyse der fettextrahierten Zellen gewonnen.

kann man demnach mit der Funktion des TCC nicht erklären. Nach der Entdeckung der Isocitratase-Reaktion¹⁵ und der Äpfelsäure-Synthese aus Glyoxylsäure und Acetyl-Coenzym A¹⁶ haben KORNBERG und KREBS¹⁷ daher auf die Beteiligung dieser Reak-

Abb. 3. Verteilung von ¹⁴C über das Glucosemolekül. Mittel der relativen, spezifischen Aktivitäten der im Licht, bzw. im Dunkeln synthetisierten Glucose (helle bzw. schwarze Rechtecke).

tionen an der Synthese von Zellsubstanzen aus Essigsäure hingewiesen und die sich unter Berücksichtigung dieser Reaktionen ergebende Modifikation des TCC wegen der Beteiligung der Glyoxylsäure „Glyoxylsäure-Zyklus“ genannt. Dabei tritt Essigsäure an zwei Stellen in den Zyklus ein. Die hervorragende Bedeutung dieses Zyklus für alle mit Acetat und „acetogenen“ Substraten wachsenden Organismen und für die Umwandlung von Fetten in Kohlenhydrate¹⁸ ist unmittelbar einzusehen. Die Interpretation der Isotopenversuche erfährt durch die Substitution dieses „Glyoxylsäure-Zyklus“ für den TCC in qualitativer Hinsicht keine Revision, da sowohl im TCC als auch im Glyoxylsäure-Zyklus der Methyl-C der Essigsäure in die beiden mittleren C-Atome der C 4-Säuren eingebaut und die durch deren Decarboxylierung gebildete C 3-Säure lediglich in den Nicht-Carboxyl-C-Atomen markiert wird. Das Isotopenmuster in der synthetisierten Glucose folgt dann aus Reaktionen der Glykolyse: Glycerinaldehyd-3-phosphorsäure (GA-3-P) liefert die C-Atome 4, 5 und 6 und die mit Glycerinaldehyd-3-phosphorsäure im

Triosephosphatisomerase-Gleichgewicht stehende Dihydroxyaceton-phosphorsäure (DHA-P) liefert die C-Atome 1, 2 und 3. Eine prinzipiell gleiche Isotopenverteilung wurde im Glucosemolekül der Speicherkohlenhydrate von verschiedenen Organen und Organismen nach Verfütterung von Acetat-2-¹⁴C gefunden, für die durch enzymchemische Studien die Funktion des TCC und der Glykolyse gut fundiert ist. Die vorgelegten Ergebnisse stützen somit die Vorstellung, daß diese Prozesse auch in *Chlorella pyrenoidosa* die dominierenden Routen des Intermediärstoffwechsels darstellen.

Als zweiter hervorstechender Zug der Isotopenverteilung im Glucosemolekül bedarf die *Asymmetrie* $C 4 + 5 + 6 > C 1 + 2 + 3$ einer Erörterung. Es handelt sich hierbei um eine verschiedentlich gemachte Beobachtung, die man mit einem ungenügenden Triosephosphatisomerase-Gleichgewicht und der Verdünnung der Dihydroxyacetonphosphorsäure-Einheit durch einem „pool“ entstammende Bausteine interpretieren könnte¹⁹. Es braucht sich dabei keineswegs um einen pool von Glycerin oder Dihydroxyacetonphosphorsäure zu handeln: durch das Enzym Transaldolase, das gerade im Stoffwechsel photosynthetischer Organismen eine wesentliche Rolle spielt^{20, 21}, wird die Verbindung zum pool der Intermediärprodukte des Photosyntheszyklus hergestellt. Transaldolase überträgt Dihydroxyaceton von Sedoheptulose-7-phosphat oder Fructose-6-phosphat auf Glycerinaldehyd-3-phosphorsäure. Aldolase überträgt Dihydroxyacetonphosphorsäure von Sedoheptulose-1,7-diphosphat auf Glycerinaldehyd-3-phosphorsäure. In unserem Falle dürfte im Zuge dieser Übertragungsreaktionen ein Teil der markierten Glycerinaldehyd-3-phosphorsäure mit unmarkierten Dihydroxyaceton-phosphat zusammen treten und so Glucosemoleküle entstehen lassen, in denen lediglich die C-Atome 4, 5 und 6 markiert sind. In diesen Reaktionen findet die beobachtete Asymmetrie eine einfache Erklärung.

Die einfachste Erklärung für die Ungleichheit der spezifischen Aktivitäten der C-Atome in 1, 2 und 5,

¹⁴ J. N. PHILLIPS, zitiert nach J. MYERS, *Annu. Rev. Microbiol.* **5**, 157 [1951].

¹⁵ R. S. SMITH u. I. C. GUNSALES, *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 5002 [1954]; R. S. SMITH u. I. C. GUNSALES, *J. biol. Chemistry* **229**, 305 [1958].

¹⁶ D. T. O. WONG u. S. J. AJL, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 3230 [1956].

¹⁷ H. L. KORNBERG u. H. A. KREBS, *Nature [London]* **179**, 988 [1957].

¹⁸ H. L. KORNBERG u. H. BEEVERS, *Nature [London]* **180**, 35 [1957].

¹⁹ P. SCHAMBYE, H. G. WOOD u. G. POPJAK, *J. biol. Chemistry* **206**, 875 [1954].

²⁰ B. L. HORECKER u. P. Z. SMYRNIOTIS, *J. biol. Chemistry* **212**, 811 [1955].

²¹ W. VISHNIAC, L. B. HORECKER u. S. OCHOA, *Advances in Enzymol.* **19**, 1 [1957].

6-Stellung ist in einer teilweisen minimalen Gleichgewichtseinstellung mit einem symmetrischen C 3-Körper zu sehen. So könnte durch Phosphatasewirkung aus Dihydroxyacetonphosphorsäure Dihydroxyaceton entstehen, das durch Glycerokinase und ATP wieder zu Dihydroxyacetonphosphorsäure rephosphoryliert wird^{22, 23}, wobei die Phosphorylierung an beiden Enden des symmetrischen Moleküls mit der gleichen Wahrscheinlichkeit erfolgen sollte. Durch diese Reaktionen würde auf der Stufe der Dihydroxyacetonphosphorsäure eine teilweise Herabsetzung der spezifischen Aktivität von C 1 erfolgen, was sich durch Rückreaktionen auch auf C 6 auswirken könnte. Die spezifische Aktivität der C-Atome 3 und 4 würde dadurch natürlich heraufgesetzt.

Diskussion

Daß Essigsäure und wahrscheinlich auch andere organische Säuren im Licht bevorzugt in Fettsäuren eingebaut werden, erscheint in Anbetracht der laufenden Regeneration von reduzierten Pyridinnucleotiden unter diesen Bedingungen plausibel. Im Stoffwechsel der Zelle scheint der Prozeß am meisten gefördert zu werden, welcher der im Überschuß produzierten Reduktionskraft am meisten bedarf, also die Fettsynthese gegenüber der Synthese von Kohlenhydraten. Daß die Kohlenwasserstoffe, insbesondere die Carotinoide von dieser bevorzugten Synthese ausgeschlossen sind, obwohl auch sie über Acetyl-Coenzym A aufgebaut werden, mag auf den Umstand zurückzuführen sein, daß diese Substanzen keine natürlichen Speicherstoffe von *Chlorella* darstellen.

Die Intermediärprozesse, die zu der angegebenen Isotopenverteilung über die C-Atome des Glucosemoleküls führen, wurden bereits im experimentellen Teil diskutiert. Lediglich die asymmetrische Markierung soll hier im Zusammenhang mit einigen Befunden besprochen werden, die in den letzten Jahren beim Studium der Kohlenhydrat-Synthese tierischer Organe erhoben wurden. Bei langfristigen Einbauversuchen mit Ratten fanden Wood und Mit-

arbb. stets eine symmetrische Verteilung der Isotope entlang der Glucosekette des Leberglykogens. Erst die Anwendung der biologischen Degradationsmethode mit *Leuconostoc mesenteroides*, die die routinemäßige Bestimmung der spezifischen Aktivität jedes einzelnen Kohlenstoff-Atoms im Glucosemolekül ermöglicht, lenkte die Aufmerksamkeit auf eine gewisse Asymmetrie im Isotopenmuster. Eine solche wurde zuerst für Glucose aus Leberglykogen beschrieben¹⁹, das aus Ratten nach Verfütterung von Glycerin-¹⁴C isoliert worden war: in C 3 wurde eine 1,4 – 2,4-fach höhere Aktivität gefunden als in C 4. Ein umgekehrtes Verhältnis (C 4 > C 3) fanden SCHAMBYE, WOOD und KLEIBER²⁴ in der Glucose und Galaktose des Milchezuckers aus Milch nach intravenöser Injektion der Kuh mit Acetat-1-¹⁴C. Von besonderem Interesse sind in diesem Zusammenhang die Ergebnisse von MARKS und HORECKER²⁵, die Leberschnitte von normal gefütterten und 72 Std. lang ausgehungerten Ratten mit ¹⁴CO₂ und Milchsäure inkubierten; in letzteren war die isolierte Glykogen-Glucose symmetrisch, in ersteren hingegen unsymmetrisch (C 4 > C 3) markiert. Wurden die Hunger-Ratten-Leberschnitte mit Lactat + ¹⁴CO₂ + Glycerin inkubiert, so wurde auch hier eine ausgeprägte Asymmetrie aufgefunden. Die skizzierten Resultate verschiedenartiger Einbauversuche stehen mit der Vorstellung im Einklang, daß Glucose über Reaktionen der Glykolyse aus GA-3-P (C 4, 5, 6) und DHA-P (C 1, 2, 3 der Glucose) synthetisiert wird. Während Glycerin in die glykolytischen Reaktionen über DHA-P eintritt, münden Milchsäure, Brenztraubensäure, 3-Phosphoglycerinsäure, Essigsäure und alle Verbindungen, die Acetyl-Coenzym A bilden können („acetogene Substrate“), über GA-3-P in die glykolytischen Reaktionen ein.

In vivo ist stets ein gewisser pool vorhanden, durch den die zugesetzten isotonhaltigen Verbindungen verdünnt werden*; die Verteilung der Isotopen über das Glucosemolekül hängt dann davon ab, ob das zugesetzte radioaktive Substrat über DHA-P oder GA-3-P in die glykolytischen Reaktionen eingeschleust wird und der pool groß oder klein ist. Außerdem wird der Grad der Asymmetrie um so

²² C. BUBLITZ u. E. P. KENNEDY, J. biol. Chemistry **211**, 951 [1954].

²³ O. WIELAND u. M. SUYTER, Biochem. Z. **329**, 320 [1957].

²⁴ P. SCHAMBYE, H. G. WOOD u. M. KLEIBER, J. biol. Chemistry **226**, 1011 [1957].

²⁵ P. A. MARKS u. B. L. HORECKER, J. biol. Chemistry **218**, 327 [1956].

* Auf die Möglichkeit, daß die Verdünnung der Dihydroxyacetonphosphat-Einheit durch einen aus Glycerophosphaten gespeisten pool erfolgt, weist auch BENSON hin. (A. A. BENSON, Proc. Int. Symp. Enzyme Chemistry, Tokyo 1957, 189–191.)

größer sein, je kürzer die Einbauzeit gehalten wird. Daß mit der Speisung des pools an DHA durch Transaldolase-Reaktionen aus dem pool der Intermediärprodukte des Pentosephosphatzyklus zu rechnen ist, wurde bereits erwähnt.

Die asymmetrische Markierung der Hexosen aus *Chlorella* nach kurzfristiger $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung^{3,26} findet durch die vorgelegten Befunde keine Erklärung. Es ist lediglich darauf hinzuweisen, daß auch Sedoheptulose-7-phosphat und Fructose-6-phosphat als Quelle von Dihydroxyaceton anzusehen sind. Wird DHA von Zuckerphosphatestern, die den Pentose-

phosphatzyklus schon mehr als zweimal durchlaufen haben, durch Transaldolase auf GA-3-P übertragen, so kommt es zu einer Isotopenverteilung, wie sie von den Autoren gefunden wurde: $\text{C}4 > \text{C}3$ und $\text{C}1, 2 > \text{C}5, 6$. Auch die Beobachtung, daß durch zusätzliche Verabreichung von Glucose zu den $^{14}\text{CO}_2$ -fixierenden Zellen die Asymmetrie über längere Einbauzeiten erhalten bleibt, findet in der Annahme eines durch Glucose gespeisten pools eine hinreichende Erklärung.

²⁶ O. KANDLER u. M. GIBBS, *Plant Physiol.* **31**, 411 [1956].

Manometrische Messungen des respiratorischen Stoffwechsels von Gewebekulturen aus Affennieren-Zellen unter besonderer Berücksichtigung einiger physiologischer Momente

Von TH. LUTHARDT, R. SAUTHOFF und H. K. MITTELSTRASS *

Aus der Universitäts-Kinderklinik Freiburg i. Br. (Direktor: Prof. Dr. W. KELLER)

(Z. Naturforschg. **14 b**, 253—259 [1959]; eingegangen am 22. Dezember 1958)

In vitro kultivierte Affennieren-Zellen geben unter physiologischen Meßbedingungen keinen Anhaltspunkt für die Entwicklung eines Gärungsstoffwechsels im Sinne einer Krebsentstehung. Ausgewachsene Kulturen weisen nach Mediumerneuerung zunächst aerobe Glykolyse auf, diese geht im Laufe eines Tages praktisch vollkommen zurück, der oxydative Stoffwechsel ändert sich währenddessen nicht; Messungen über drei weitere Tage geben keine Änderungen dieses Bildes mehr. Das Auftreten eines Gärungsstoffwechsels in Suspensionen von in vitro kultivierten Nierenzellen und bei ausgewachsenen Kulturen unmittelbar nach Mediumerneuerung ist kein Anzeichen für die Entstehung eines Krebsstoffwechsels; wahrscheinlich handelt es sich u. a. dabei um einen vorübergehenden durch das neue Medium bedingten Wachstums-Stoffwechsel.

Stoffwechseluntersuchungen, gleich welcher Art, an Gewebekulturen in vitro zeichnen sich durch methodische Kompliziertheiten aus, die zweifacher Natur sind. Zu den empfindlichen Meßmethoden kommt die Schwierigkeit, die Kulturen während der Messung in gutem Zustand zu halten; nur zu leicht unterliegt man diesen Schwierigkeiten und mißt unter unphysiologischen Bedingungen an nicht repräsentativem Material.

Manometrische Messungen des Stoffwechsels von Kartoffel-Gewebeschnitten, an denen einer von uns beteiligt war, zeigten, daß es nach Änderung von Umgebungsbedingungen bis zu Tagen dauert, ehe ein neues Stoffwechsel-Gleichgewicht erreicht wird¹⁻³. SUSCHNY, KELLNER, BRODA, FIGDOR und RÜCKER⁴

haben auch für die in vitro-Gewebekultur menschlicher Gewebe im Rahmen ihrer Messungen mit radioaktiven Isotopen auf diesen Faktor ausführlich hingewiesen. Fermentuntersuchungen in verschiedenen Gewebekultur-Fractionen, z. B. in den Zellen, im Kulturüberstand, in der Versenfraktion beim Versenieren, wurden von MATZELT und HOMANN⁵ durchgeführt; sie zeigen ebenfalls sehr deutlich, wie leicht das Gleichgewicht von Gewebekulturen gestört wird, und daß es viele Stdn. braucht, bis wieder konstante Verhältnisse vorliegen. Ebenso zeigt der zeitliche Verlauf beim Glucoseeinbau in Gewebekulturen nach Änderung von Umgebungsbedingungen, etwa nach Mediumwechsel, über viele Stdn. sich ändernde Werte⁶, das gleiche gilt für die Milchsäureproduk-

* Diese Arbeit wurde aus Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

¹ J. PICHOTKA, *Med. meteor. Hefte* **13**, 38 [1958].

² TH. LUTHARDT, *Pflüg. Arch. ges. Physiol. Menschen Tiere* **268**, Heft 1 (Tagungsber.) [1958].

³ J. PICHOTKA, W. HÖFLER u. TH. LUTHARDT, in Vorbereitung.

⁴ O. SUSCHNY, G. KELLNER, E. BRODA, B. FIGDOR u. W. RÜCKER, *Exp. Cell Res.* **14**, 316 [1958].

⁵ D. MATZELT u. J. HOMANN, *Biochem. Z.* **330**, 245 [1958].

⁶ Y. BECKER, N. GROSSOWICZ u. H. BERNKOPF, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **97**, 77 [1958].