

(Bereich Biochemie der Sektion Biowissenschaften  
der Karl-Marx-Universität Leipzig)

## Einfluß freier Fettsäuren auf die Aktivität von Enzymen des Citrat- und Glyoxylatzyklus aus *Acinetobacter calcoaceticus*

H.-P. KLEBER und H. GÖBEL

(Eingegangen am 8. 8. 1974)

Der Einfluß von freien Fettsäuren der Kettenlänge  $C_6$ — $C_{12}$  auf die Aktivität der Enzyme des Citratzyklus (Citratsynthase, Aconitase, Isocitratdehydrogenase, Fumarase, Malatdehydrogenase), des Glyoxylatzyklus (Isocitratlyase) sowie des Malatenzyms aus *Acinetobacter calcoaceticus* wird untersucht.

Durch freie Fettsäuren wird nur das Malatenzym gehemmt. Die Fettsäuren hemmen das Enzym gegen L-Malat kompetitiv nichtlinear. Die graphisch ermittelten  $K_I$ -Werte nehmen in der homologen Reihe der Fettsäuren von der Hexansäure ( $K_I = 1,0 \times 10^{-2}$  M) zur Dodecansäure ( $K_I = 3,0 \times 10^{-4}$  M) ab. Die durch Fettsäuren bedingte Hemmung des Malatenzyms ist abhängig vom pH-Wert.

Untersuchungen über den Einfluß von CoA-Derivaten längerkettiger Fettsäuren auf die Aktivität von Enzymen unterschiedlicher Stoffwechselwege sind vor allem in höheren Organismen recht zahlreich. So werden Enzyme, die direkt oder indirekt an der Lipogenese oder Ketogenese beteiligt sind, wie z. B. die Acetyl-CoA-Carboxylase (WHITE u. KLEIN 1965, LYNNEN 1967), Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (EGER-NEUFELDT *et al.* 1965) und Citratsynthase (SRERE 1965) durch langkettige Acyl-CoA-Derivate gehemmt.

Von freien Fettsäuren ist bekannt, daß sie die Schlüsselenzyme der Glykolyse und des Pentosephosphatzyklus in Rattenleber hemmen (WEBER *et al.* 1967, LEA u. WEBER 1968), während Enzyme der Gluconeogenese (Fructose-1,6-diphosphatase) bzw. Enzyme, die reversible Reaktionen der Glykolyse katalysieren (Phosphohexoisomerase), nicht durch freie Fettsäuren beeinflußt werden (WEBER *et al.* 1966 und 1967). Die Autoren diskutieren ihre Ergebnisse als eine spezifische Hemmung der glykolytischen Enzyme im Sinne einer negativen Rückkopplung, die es dem Organismus erlaubt, bei Angebot von Fettsäuren die Gluconeogenese zu stimulieren.

An Mikroorganismen sind Untersuchungen zur Regulation von Enzymen durch freie Fettsäuren relativ wenig durchgeführt worden (u. a. FERDINANDUS u. CLARK 1969). Da sowohl freie Fettsäuren — als auch ihre CoA-Thioester — beim *n*-Alkanabbau entstehen, schien es von Interesse, den Einfluß dieser Metabolite auf Enzyme mikrobieller Herkunft zu studieren.

Über die Beeinflussung von Enzymen amphibolischer und anaplerotischer Stoffwechselwege durch freie Fettsäuren in *Acinetobacter calcoaceticus*, der *n*-Alkane als einzige C-Quelle verwerten kann (KLEBER *et al.* 1973), soll im folgenden berichtet werden.

### Material und Methoden

Als Testobjekt diente *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V (KLEBER *et al.* 1973). Stammhaltung, Gewinnung der Impfuspension, Bedingungen der Züchtung und Zellaufschluß sind an anderer Stelle

beschrieben (KLEBER u. AURICH 1973). C-Quelle war Mepasin, welches vorwiegend aus *n*-Alkanen der Kettenlänge  $C_{13}$ – $C_{18}$  besteht.

Für die Durchführung der Versuche wurden die Enzyme durch Fällung mit Ammoniumsulfat (70%) von eventuell störenden niedermolekularen Verbindungen befreit. Das Malatenzym wurde nach Anreicherung untersucht (GÖBEL 1973).

Die Bestimmung der Citratsynthase (EC 4.1.3.7), Aconitase (EC 4.2.1.3), NADP-abhängigen Isocitratdehydrogenase (EC 1.1.1.42), Fumarase (EC 4.2.1.2), Malatdehydrogenase (EC 1.1.1.37), Isocitratlyase (EC 4.1.3.1) sowie des Malatenzyms (EC 1.1.1.40) ist ausführlich an anderer Stelle beschrieben worden (KLEBER u. AURICH 1973, 1974).

Die Proteinbestimmung erfolgte nach LOWRY *et al.* (1951) mit Rinderserumalbumin als Standard.

### Ergebnisse

Tabelle 1 zeigt den Einfluß von freien Fettsäuren der Kettenlänge  $C_6$ – $C_{12}$  auf die Aktivität der untersuchten Enzyme bei sättigenden Coenzymkonzentrationen. Die eingesetzten Substratkonzentrationen entsprechen den jeweiligen  $K_M$ -Werten. Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, werden weder die Enzyme des Citratzyklus noch das

Tabelle 1  
Einfluß von freien Fettsäuren auf Enzyme aus *Acinetobacter calcoaceticus*

	Aktivität (in %) nach Einsatz von				
	Hexan- (6,7 mM)	Octan- (5,5 mM)	Nonan- (3,3 mM)	Decan- (1,6 mM)	Dodecan- säure (0,4 mM)
Citratsynthase	104	100	97	100	104
Aconitase	96	100	102	100	97
Isocitratdehydrogenase	100	100	103	100	104
Fumarase	97	100	97	98	100
Malatdehydrogenase	102	102	98	101	97
Isocitratlyase	98	102	97	104	97
Malatenzym	73	60	68	50	77

Schlüsselenzym des Glyoxylatzyklus, die Isocitratlyase, durch freie Fettsäuren in ihrer Aktivität beeinflußt. Lediglich das Malatenzym wird durch freie Fettsäuren gehemmt, wobei — unter Berücksichtigung der eingesetzten Konzentration — die Hemmung mit steigender Kettenlänge zunimmt.

Die Hemmung des Malatenzyms durch Octansäure mit *L*-Malat als dem variablen Substrat ist in Abbildung 1 in der Darstellung nach LINEWEAVER-BURK und in Abbildung 2 in der Auftragung nach DIXON dargestellt.

Die  $NADP^+$ -Konzentration entsprach mit 1 mM dem über 20fachen der kinetisch ermittelten Dissoziationskonstanten (KLEBER 1972). Der Kurvenverlauf ist in beiden Darstellungen nichtlinear, die Hemmung kompetitiv. Beim Einsatz von Hexan-, Nonan-, Decan- und Dodecansäure wird ein der Octansäure entsprechender Kurvenverlauf und Hemmungstyp erhalten. Fettsäuren höherer Kettenlänge (Tetradecan- und Hexadecansäure) konnten auf Grund der noch geringeren Löslichkeit bzw. Präzipitation als Mangansalz nicht eingesetzt werden.

Die aus der DIXON-Darstellung graphisch ermittelten  $K_I$ -Werte der Fettsäuren bei Hemmung des Malatenzyms gegen *L*-Malat sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Sie nehmen in der homologen Reihe der Fettsäuren von der Hexansäure zur Dodecansäure um etwa zwei Zehnerpotenzen ab. Die  $pK_I$ -Werte steigen linear mit der Kettenlänge der eingesetzten Fettsäuren an, woraus sich die Bedeutung hydrophober Wechselwirkungen für die Bindung des Inhibitors an das Enzym ableiten läßt.

Die durch Fettsäuren bedingte Hemmung des Malatenzyms ist abhängig vom pH-Wert, wie es mit Octansäure in Abbildung 3 dargestellt ist. Das pH-Optimum des

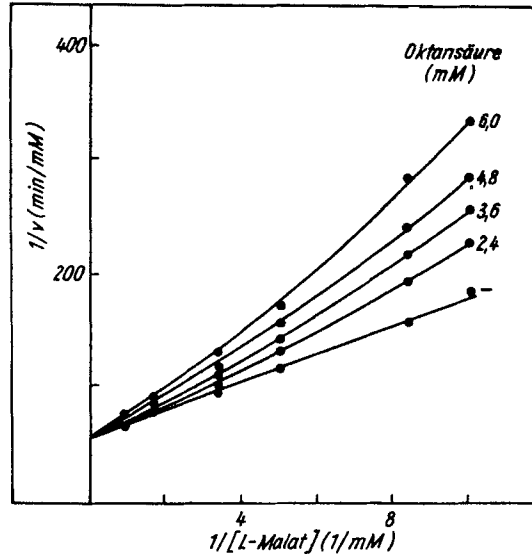


Abb. 1. Hemmung des Malatenzyms durch Octansäure mit L-Malat als dem variablen Substrat (0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,5, 1 mM NADP<sup>+</sup>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>) in der Darstellung nach LINEWEAVER u. BURK.

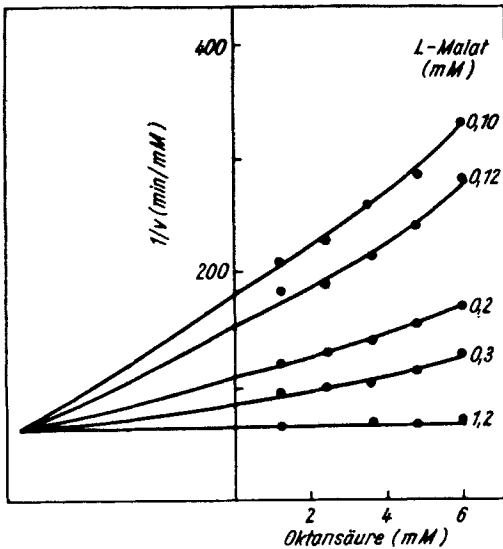


Abb. 2

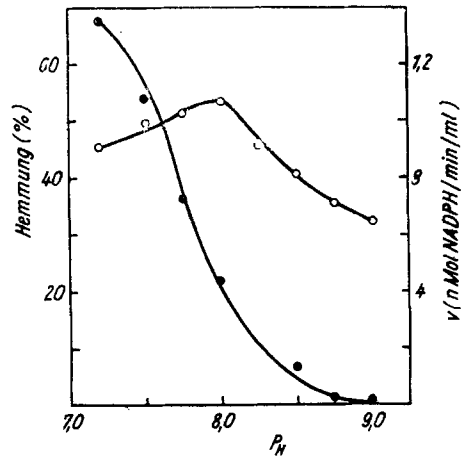


Abb. 3

Abb. 2. Hemmung des Malatenzyms durch Octansäure mit L-Malat als dem variablen Substrat (0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,5, 1 mM NADP<sup>+</sup>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>) in der Darstellung nach DIXON

Abb. 3. Einfluß des pH-Wertes auf die Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  (in nMol NADPH/min/ml; ○) und die Hemmung des Malatenzyms (in %; ●) durch 5 mM Octansäure. Der Reaktionsansatz enthielt: 0,12 mM L-Malat, 1 mM NADP<sup>+</sup>, 0,5 mM MnCl<sub>2</sub> und Tris/HCl-Puffer (0,1 M)

angereicherten Enzyms liegt — wie an anderer Stelle schon dargestellt (KLEBER 1975) — unter Verwendung von Tris/HCl-Puffer (0,1 *M*) zwischen pH 7,9 und 8,1. Während 5 *mM* Octansäure bei pH 7,2 das Malatenzym zu 68% hemmt, ist die Hemmwirkung bei pH 9,0 gleich Null.

Tabelle 2  
K<sub>I</sub>-Werte von Fettsäuren für das  
Malatenzym

Fettsäure	K <sub>I</sub> -Wert ( <i>M</i> )
Hexansäure	$1,0 \cdot 10^{-2}$
Octansäure	$5,6 \cdot 10^{-3}$
Nonansäure	$5,5 \cdot 10^{-3}$
Decansäure	$1,1 \cdot 10^{-3}$
Dodecansäure	$3,0 \cdot 10^{-4}$

### Diskussion

Die erhaltenen Befunde über den Einfluß freier Fettsäuren auf die Regulation der Aktivität von Enzymen des Citrat- und Glyoxylatzyklus sowie des NADP<sup>+</sup>-abhängigen Malatenzyms fügen sich gut in die bisherigen Ergebnisse der Regulation des Stoffwechsels von *A. calcoaceticus* ein. Da der Mikroorganismus ein obligater Aerobier ist, dient der Citratzyklus sowohl der Energieproduktion (zusammen mit der Atmungskette) als auch der Biosynthese, indem er u. a. die Ausgangssubstrate für die Gluconeogenese liefert. Es erscheint somit physiologisch sinnvoll, daß der Citratzyklus auch bei Anwesenheit von Fettsäuren — z. B. bei Wachstum auf *n*-Alkanen — mit unverminderter Geschwindigkeit abläuft und in seiner Biosynthesefunktion noch durch das „Nachfüllen“ von C<sub>4</sub>-Intermediaten durch den Glyoxylatzyklus unterstützt wird (KLEBER u. AURICH 1973, 1974).

So werden auch die Enzyme des Citratzyklus aus *Acinetobacter* — ähnlich wie in *Arthrobacter crystallopoietes* (FERDINANDUS u. CLARK 1969) — nicht durch freie Fettsäuren gehemmt. Eine Ausnahme macht die Fumarase, die in *Arthrobacter* — im Gegensatz zu *Acinetobacter* — durch Octan-, Dodecan- und Tetradecansäure gehemmt wird. Durch diesen Regelmechanismus soll der Rückfluß von Malat zum Fumarat verhindert werden, wodurch gleichzeitig die Konzentration des für die Gluconeogenese notwendigen Oxalacetats erhöht wird (WEBER *et al.* 1967, FERDINANDUS u. CLARK 1969). Die NADP<sup>+</sup>-abhängige Isocitratdehydrogenase wird ebenso wie in *Arthrobacter* (FERDINANDUS u. CLARK 1969) nicht durch Fettsäuren gehemmt. Daraus kann man schlußfolgern, daß das Enzym keine Beziehungen zur Lipogenese besitzt (PANDE *et al.* 1964) und das gebildete NADPH wahrscheinlich zur Bildung von Glutamat aus  $\alpha$ -Ketoglutarat verwendet wird.

Auch die Isocitratlyase, die als Schlüsselenzym des Glyoxylatzyklus u. a. bei der Umwandlung von Fett in Kohlenhydrate eine Rolle spielt (HOGG u. KORNBERG 1963), wird durch freie Fettsäuren nicht gehemmt. Da die Malatsynthase als zweites Enzym des Glyoxylatzyklus Acetyl-CoA verbraucht, kommt es zu einer Konkurrenz zwischen dieser anaplerotischen Sequenz und der Fettsynthese um Acetyl-CoA.

Das Malatenzym aus *A. calcoaceticus* dient ähnlich wie in anderen Mikroorganismen (SANWAL 1970) der Synthese von Pyruvat aus Malat, wobei außerdem NADPH als Reduktionsäquivalent für die Lipidsynthese entsteht. Durch Acetat — aber auch durch *n*-Alkane (KLEBER 1973) — wird das Enzym reprimiert. Darüber hinaus wirkt Acetyl-CoA — ähnlich wie in *Escherichia coli* (SANWAL *et al.* 1968) — als Endprodukt der Reaktionskette hemmend auf das Malatenzym aus *Acinetobacter* (KLEBER 1975). Die Hemmung des Malatenzyms durch freie Fettsäuren erscheint in diesem Zusammenhang physiologisch sinnvoll und kann als negative Rückkopplung gedeutet werden. Hinsichtlich der pH-Abhängigkeit der Hemmung, der Nichtlinearität der

Hemmungskurven sowie des Hemmungstypes bestehen zwischen freien Fettsäuren und Acetyl-CoA (KLEBER 1975) keine Unterschiede.

Beziehungen des Malatenzyms zur Lipogenese wurden schon früher beschrieben (PANDE *et al.* 1964, WISE u. BALL 1964 u. a.). Dadurch wird das Postulat unterstützt (FERDINANDUS u. CLARK 1969 u. a.), daß freie Fettsäuren Enzyme hemmen, die bei der Lipogenese eine Rolle spielen. Da der Grad der Hemmung des Malatenzyms sich mit steigender Kettenlänge der Fettsäuren erhöht, wobei der Hemmungstyp — ähnlich wie in *Arthrobacter* (FERDINANDUS u. CLARK 1969) — stets kompetitiv ist, scheinen länger-kettige Fettsäuren die effektiveren Regulatoren zu sein.

### Literatur

- EGER-NEUFFELDT, I., TEINZER, A., WEISS, L. and WIELAND, O., 1965. Inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase by long chain acyl-coenzyme A. *Biochem. biophysic. Res. Commun.*, **19**, 43.
- FERDINANDUS, J. and CLARK, J. B., 1969. Selective inhibition of bacterial enzymes by free fatty acids. *J. Bacteriol.*, **98**, 1109.
- GÖBEL, H., 1973. Hemmung amphibolischer und anaplerotischer Enzyme aus *Acinetobacter calcoaceticus* durch freie Fettsäuren. Diplomarbeit, Karl-Marx-Universität Leipzig.
- HOGG, J. F. and KORNBERG, H. L., 1963. The metabolism of  $C_2$ -compounds in micro-organisms. IX. Role of the glyoxylate cycle in protozoal glyconeogenesis. *Biochem. J.*, **86**, 462.
- KLEBER, H.-P., 1972. Regulation von Enzymen des Citrat- und Glyoxylatzyklus sowie des NADP-abhängigen Malatenzyms in *Acinetobacter calco-aceticus* unter dem Einfluß der Kohlenwasserstoffassimilation. Dissertation zur Promotion B, Karl-Marx-Universität Leipzig.
- KLEBER, H.-P., 1973. Repression des Malatenzyms durch *n*-Alkane in *Acinetobacter calco-aceticus*. *Z. Allg. Mikrobiol.*, **13**, 467.
- KLEBER, H.-P., 1975. Hemmung des Malatenzyms aus *Acinetobacter calcoaceticus* durch Acetyl-CoA. *Z. Allg. Mikrobiol.*, **15**, 19.
- KLEBER, H.-P. und AURICH, H., 1973. Einfluß von *n*-Alkanen auf die Synthese der Enzyme des Glyoxylatzyklus in *Acinetobacter calco-aceticus*. *Z. Allg. Mikrobiol.*, **13**, 473.
- KLEBER, H.-P. und AURICH, H., 1974. Verhalten der Enzyme des Citratzyklus während der *n*-Alkan-Assimilation bei *Acinetobacter calcoaceticus*. *Z. Allg. Mikrobiol.*, **14**, 575.
- KLEBER, H.-P., SCHÖPP, W. und AURICH, H., 1973. Verwertung von *n*-Alkanen durch einen Stamm von *Acinetobacter calcoaceticus*. *Z. Allg. Mikrobiol.*, **13**, 445.
- LEA, M. A. and WEBER, G., 1968. Role of enzymes in homeostasis. VIII. Inhibition of the activity of glycolytic enzymes by free fatty acids. *J. biol. Chemistry*, **243**, 2096.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chemistry*, **193**, 265.
- LYNEN, F., 1967. The role of biotin-dependent carboxylations in biosynthetic reactions. *Biochem. J.*, **102**, 381.
- PANDE, S. V., KAHN, R. P. and VENKITASUBRAMANIAN, T. A., 1964. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-specific dehydrogenases in relation to lipogenesis. *Biochim. biophysica Acta*, **84**, 239.
- SANWAL, B. D., 1970. Allosteric controls of amphibolic pathways in bacteria. *Bacteriol. Rev.*, **34**, 20.
- SANWAL, B. D., WRIGHT, J. A. and SMANDO, R., 1968. Allosteric control of the activity of malic enzyme in *Escherichia coli*. *Biochem. biophysic. Res. Commun.*, **31**, 623.
- SRERE, P. A., 1965. Palmityl-coenzyme A inhibition of the citrate condensing enzyme. *Biochim. biophysica Acta*, **106**, 445.
- WEBER, G., CONVERY, H. J. H., LEA, M. A. and STAMM, N. B., 1966. Feedback inhibition of key glycolytic enzymes in liver by action of free fatty acids. *Science*, **154**, 1357.
- WEBER, G., LEA, M. A., CONVERY, H. J. H. and STAMM, N. B., 1967. Regulation of gluconeogenesis and glycolysis: studies of the mechanisms controlling enzyme activity, p. 257. In: G. WEBER (Ed.), *Advances in Enzyme Regulation*, Vol. 5. Pergamon Press Oxford.
- WHITE, D. and KLEIN, H. P., 1965. Factors affecting fatty acid synthesis in cell-free preparations from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. biophysic. Res. Commun.*, **20**, 78.
- WISE, E. M. and BALL, E. G., 1964. Malic enzyme and lipogenesis. *Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **52**, 1255.

Anschrift: Doz. Dr. H.-P. KLEBER  
Sektion Biowissenschaften  
Bereich Biochemie  
Karl-Marx-Universität Leipzig  
DDR 701 Leipzig, Talstr. 33