

Evolution von Stoffwechselwegen bei Mikroorganismen*

Von Th. Leisinger

Mikrobiologisches Institut der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Universitätstraße 2, CH-8006 Zürich

Summary

Research on the evolution of new metabolic pathways in microorganisms is challenged by two fields of current interest: Enzyme engineering and accumulation of some man-made chemicals in the biosphere. On theoretical grounds it is assumed that metabolic pathways have evolved in a retrograde manner by a stepwise process of tandem gene duplication and subsequent divergence of gene function. Some steps of this process have been studied by analyzing the evolution of new enzymatic activities in catabolic pathways of bacteria. In studies on the acquisition of xylitol utilization in *Aerobacter aerogenes* and on the directed evolution of the aliphatic amidase of *Pseudomonas aeruginosa* new metabolic activities were related to defined changes in enzymes and regulatory systems. The evolution of biosynthetic pathways is not amenable to experiments but has been studied by comparative biochemistry. While biosynthetic pathways seem to be similar in widely divergent microorganisms the regulatory patterns may be very different. This general observation is illustrated by comparing the regulation of arginine biosynthesis in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Einleitung

Spekulationen über den Evolutionsprozeß haben seit jeher eine große Faszination auf Biologen ausgeübt. Der bekannte Mikrobiologe Roger Stanier hat den Hang, Betrachtungen über die Evolution anzustellen, als harmlose Gewohnheit bezeichnet, die aber zum gefährlichen Laster werden kann, wenn sie mit Leidenschaft betrieben wird¹. Diese Ansicht ist vielleicht berechtigt, wenn man an die vergleichende Evolutionsforschung denkt, die retrospektiv ausgerichtet ist und deren Anliegen es ist, längst abgeschlossene Vorgänge aus dem Vergleich der Eigenschaften von heute lebenden Organismen zu rekonstruieren. Eine Disziplin also, die mit der Hypothek des Spekultativen belastet ist und daher auf viele Wissenschaftler eher abschreckend wirkt.

Mit Mikroorganismen, insbesondere mit Bakterien, kann nicht nur vergleichende, sondern auch experimentelle Evolutionsforschung betrieben werden. D.h. es ist im Prinzip möglich, die Eigenschaften eines Bakteriums im Labor in einer gewünschten Richtung gezielt zu verändern^{2,3}. Diese Art der Evolutionsforschung, experimentelle Evolutionsforschung mit Bakterien, kann nicht nur als «harmlose Gewohnheit» bezeichnet werden, sondern berührt Problemkreise, die auch dem Chemiker nahestehen und von denen zwei erwähnt seien:

- In einigen Fällen ist es gelungen, die biochemische Evolution von Mikroorganismen zu lenken und dadurch Stämme mit neuen enzymatischen Eigenschaften zu erhalten^{4,5,6,7}. Denkt man an die Enzym-

technologie, deren industrielle Möglichkeiten heute immer deutlicher erkannt werden⁸, so erhält die gezielte Veränderung der Eigenschaften von Enzymen besondere Bedeutung. Es ist denkbar, daß industriell wichtige Enzyme in Zukunft so verändert werden, daß sie für den technologischen Einsatz besser geeignet sind, d.h. z.B. besser an Träger gebunden werden können, ihre Aktivität länger behalten oder Reaktionen katalysieren, die das ursprüngliche Enzym nicht durchführen konnte.

- Gewisse synthetische organische Moleküle, die als Insektizide, Fungizide oder Detergenzien verwendet werden, sammeln sich in der Biosphäre in quantitativ bedeutsamen Mengen an. Diese Anhäufung geschieht deshalb, weil sich diese synthetischen organischen Substanzen der Mineralisierung durch Mikroorganismen widersetzen, d.h. weil es keine Mikroorganismen gibt, die befähigt sind, diese Verbindungen in nützlicher Frist abzubauen. Das Auftreten von schwer abbaubaren Verbindungen hat den Glauben an die Unfehlbarkeit von Mikroorganismen erschüttert. Wir wissen heute nicht, ob das Fehlen von Mineralisierungspotential für gewisse synthetische Produkte darauf zurückzuführen ist, daß noch zu wenig Zeit für die Evolution neuer Stoffwechselwege verflossen ist⁹. Schließlich hat sich die biochemische Evolution in der Natur über einen Zeitraum von gut 3 Milliarden Jahren erstreckt, während die nicht abbaubaren organischen Verbindungen erst seit 10 bis 20 Jahren in größeren Mengen in der Biosphäre anzutreffen sind. Es wäre aber auch möglich, daß das Potential für die Evolution neuer Stoffwechselwege durch biochemische und genetische Gegebenheiten beschränkt ist und sich nicht weit über die relativ enge Klasse der biologisch produzierten Verbindungen hinausentwickeln kann. Mit Hilfe von Evolutionsexperimenten an Mikroorganismen sollte es möglich sein, zu entscheiden, welche der beiden Ansichten eher zutrifft: die optimistische, die unbegrenzte Möglichkeiten für die Evolution annimmt, oder die pessimistische, welche Evolution nur innerhalb eines begrenzten Rahmens sieht. Die Antwort auf diese Frage dürfte sich auch auf die Handhabung von schwer abbaubaren Verbindungen in der Praxis auswirken.

Bakterien sind aus verschiedenen Gründen die geeigneten Objekte für Untersuchungen über die Evolution von Stoffwechselwegen; sie gehören zu den Prokaryonten, d.h. ihre Zellen sind verhältnismäßig einfach organisiert. Sie lassen sich nicht nur biochemisch, sondern auch

* Vortrag vor der Basler Chemischen Gesellschaft am 20. Juni 1974.

genetisch analysieren, sie können leicht in großen Populationen gezüchtet werden, haben eine Generationszeit in der Größenordnung von einer Stunde und bringen deshalb, was für Evolutionsexperimente wichtig ist, in kurzer Zeitspanne eine große Anzahl Generationen hinter sich.

Stoffwechselwege als «biochemische Organelle»

Unter einem Stoffwechselweg versteht man eine Folge von chemischen Reaktionen, durch die eine Verbindung *A* über eine Reihe von Zwischenprodukten in das Endprodukt *D* übergeführt wird (vgl. Abb. 1).

Die einzelnen Umwandelungsschritte laufen nicht spontan ab, sondern werden durch Enzyme katalysiert. Die Enzyme sind in ihrer Wirkung spezifisch, so daß in der Regel für jeden Stoffwechselschritt ein individuelles Enzym ausgebildet ist. Die Spezifität der Enzyme ist in ihrer Struktur begründet, und die Information für ihre Struktur wiederum ist im genetischen Material der Zelle, in der DNS, codiert (Abb. 1). Der Apparat, der die Übersetzung von DNS in Proteine besorgt (mRNS, tRNS, Ribosomen), ist nicht spezifisch für einen bestimmten Stoffwechselweg. Er liegt in einer Bakterienzelle in ungefähr 10000- bis 20000facher Ausführung vor und wird für die Übersetzung der verschiedensten Gene in die entsprechenden Proteine gebraucht¹⁰.

Strukturgene und Enzyme genügen aber nicht, um einen Stoffwechselweg zu einem funktionstüchtigen Teil des Gesamtstoffwechsels, zu einem leistungsfähigen biochemischen Organell zu machen. Es sind in jedem Stoffwechselweg noch Regulationselemente ausgebildet, die es ermöglichen, die Bildungsrate des Endprodukts zu regulieren, sie auf die Produktion anderer Metabolite abzustimmen und so den einzelnen Stoffwechselweg in das Gesamtgeschehen zu integrieren. Im Prinzip kennt man zwei Typen solcher Regelmechanismen:

1. Repression und Induktion. Diese Mechanismen wirken auf die Enzymsynthese. Repression¹¹ liegt vor, wenn ein Überschuß an Endprodukt *D* die Übersetzung von DNS in Protein hemmt und damit zu einer verminderten Bildung der Enzyme des Stoff-

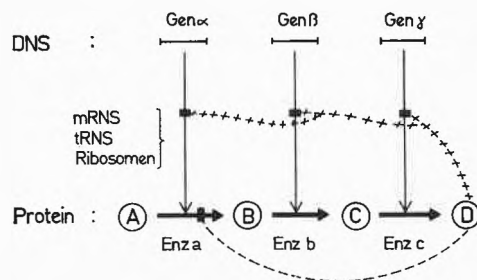


Abb. 1. Schematische Darstellung eines Biosynthesewegs. Die Verbindung *A* wird in drei enzymatischen Schritten in das Endprodukt *D* übergeführt. *D* reprimiert die Synthese der Enzyme a, b und c (+ + + + +) und hemmt die Aktivität von Enzym a (— — — — —). Vgl. Text

wechselwegs, nicht aber aller andern Enzyme in der Zelle führt. Repression wird meistens bei Biosynthesewegen beobachtet (Abb. 1). Von Induktion¹² spricht man, wenn die Anwesenheit des Ausgangsprodukts *A* zu einer Steigerung in der Bildungsrate derjenigen Enzyme führt, die an der Umwandlung von *A* in *D* beteiligt sind. Induktion kommt bei katabolischen Wegen vor (Fig. 2).

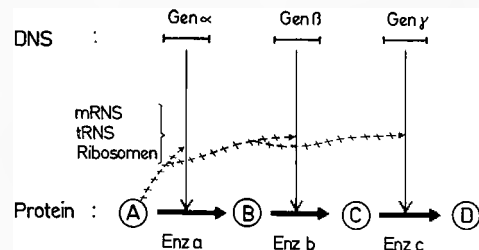


Abb. 2. Schematische Darstellung eines katabolischen Stoffwechselwegs. Die Verbindung *A* wird in drei enzymatischen Schritten zu *D* abgebaut. *A* induziert die Synthese der Enzyme a, b und c (+ + +). Vgl. Text

2. Feedback-Hemmung¹³. Ein Mechanismus, der auf der Ebene der Enzymaktivität eingreift. Ein Ansteigen der Konzentration des Endprodukts *D* führt zur Hemmung eines, meistens des ersten Enzyms eines Stoffwechselwegs.

Retroevolution

Wendet man sich der Frage nach dem Mechanismus der Entstehung neuer Stoffwechselwege zu, so sieht man sich vor allem der Schwierigkeit gegenübergestellt, eine Erklärung für die schrittweise Entstehung komplexer, mehrstufiger Stoffwechselwege zu finden. Einerseits ist es undenkbar, daß alle Komponenten eines mehrstufigen Stoffwechselweges schlagartig und gleichzeitig entstanden sind, andererseits ist ein in Entstehung begriffener und daher noch nicht funktioneller Stoffwechselweg negativer Selektion ausgesetzt, da er die Ökonomie der Zelle belastet, der Zelle aber keine Vorteile bringt. Das einzige Modell, das dieser Situation gerecht wird, ist die Theorie der Retroevolution¹⁴, die im Jahre 1945 von N. H. Horowitz aufgestellt worden ist und die auf folgenden Überlegungen beruht.

Verschiedene Experimente¹⁵ deuten darauf hin, daß zu Beginn der biologischen Evolution, also etwa vor 3,5 Milliarden Jahren, auf der Erde ein reiches Gemisch von organischen Molekülen vorhanden war. Aus dieser nährhaften organischen Suppe konnten die damals lebenden primitiven Organismen alle für ihre Vermehrung benötigten Bausteine beziehen. Sie waren also in bezug auf Ernährung von ihrer Umgebung abhängig und besaßen nur geringe Fähigkeiten, Zellbausteine selbst zu synthetisieren. War nun eine essentielle organische Verbindung in der Ursuppe aufgebraucht, so kam das Wachstum

zum Stillstand. Ein Organismus, der in dieser Situation durch Mutation die Fähigkeit erwarb, eine Vorstufe der essentiellen Verbindung in diese umzuwandeln, konnte wieder wachsen und hatte sich dadurch einen großen selektiven Vorteil erworben. Das Wachstum konnte weitergehen, bis die Vorstufe erschöpft war und sich in gleicher Weise Organismen mit der Fähigkeit, eine Vorstufe der Vorstufe zu verwerten, durchsetzten. Man nimmt also an, daß die Evolution der einzelnen Schritte eines Biosynthesewegs rückwärts stattgefunden hat, in der Richtung, die dem Metabolitfluß im Stoffwechselweg entgegengesetzt ist. Auf das in Abb.1 dargestellte Schema bezogen, bedeutet dies, daß die Enzyme des von A nach D führenden Stoffwechselweges in der Reihenfolge Enzym c, Enzym b, Enzym a entstanden sind.

Horowitz hat seine Theorie der Retroevolution am Beispiel der Biosynthesewege entwickelt. Wie steht es aber mit der Entstehung der anderen großen Klasse von Stoffwechselsequenzen, den katabolischen Wegen oder Abbauwegen, welche komplexe Verbindungen dem zentralen Stoffwechsel zuführen? Bakterien benötigen die Enzyme solcher Wege nur, wenn das Ausgangsprodukt des Stoffwechselweges, z.B. irgendein Zucker oder eine aromatische Verbindung, im Nährmedium vorliegt. Die Enzyme von Abbauwegen werden deshalb in der Regel durch das erste Substrat des Abbauweges induziert. Auch auf die Frage nach der Entstehung von katabolischen Wegen ist der Mechanismus der Retroevolution bis jetzt die einzige einleuchtende Antwort. Auch hier gilt die Tatsache, daß ein einzelner Schritt eines mehrstufigen Abbauweges dem Organismus nichts nützt, sondern erst der gesamte Stoffwechselweg zu einem selektiven Vorteil führt.

Experimentelle Evolution katabolischer Stoffwechselwege

Katabolische Wege eignen sich gut, um den Prozeß der Entstehung neuer Stoffwechselfunktionen im Experiment zu studieren. Meist ist dabei folgendes Vorgehen gewählt worden: Einem Bakterienstamm, der unfähig ist, auf einer gewissen Verbindung zu wachsen, wird diese Verbindung als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle vorgelegt. Nach der Behandlung mit mutagenen Agenzien werden Mutanten isoliert, welche das neue Substrat verwerten können. In genetischen und enzymatischen Untersuchungen der Mutanten wird dann festgestellt, worauf der Gewinn der neuen Stoffwechselfunktion zurückzuführen ist. Als Beispiel für diese Art von Experimenten seien die Arbeiten von Lin und Mitarbeitern besprochen^{4, 16}. Diese Autoren haben die Mutationsschritte analysiert, durch die *Aerobacter aerogenes* die Fähigkeit zur Verwertung einer neuen Kohlenstoffquelle gewinnt. Der Wildstamm dieses Bakteriums wächst auf den verschiedensten Kohlenstoffquellen, nicht aber auf dem Polyalkohol Xylit. Es gelang, eine spontane Xylit verwertende Mutante (X1) zu selektionieren, von der nach Mutagenese mit N-Methyl-N'-nitro-N-

nitrosoguanidin die Xylit besser verwertende Mutante X2 isoliert worden ist. In einem dritten Schritt schließlich ist dann die Mutante X3 gewonnen worden, die Xylit noch besser verwertet als X1 und X2 (Tabelle 1).

Stamm	Verdoppelungszeit auf Xylit
Wildtyp	∞
↓ Selektion	
Mutante X1	270 Minuten
↓ Mutagenese, Selektion	
Mutante X2	120 Minuten
↓ Mutagenese, Selektion	
Mutante X3	55 Minuten

Tabelle 1. Gewinn der Fähigkeit, Xylit zu verwerten durch *Aerobacter aerogenes* (nach Wu et al.⁴)

Die enzymatische Analyse der 3 Mutanten hat ergeben, daß die Fähigkeit von X1, Xylit zu verwerten, auf den Verlust der Regulation für die Synthese des Enzyms Ribitdehydrogenase zurückzuführen ist. Während im Wildtyp Ribitdehydrogenase durch Ribit induziert wird, d.h. nur gebildet wird, wenn Ribit im Medium vorliegt, ist dieses Enzym in der Mutante X1 konstitutiv, d.h. es wird immer, unabhängig von der Zusammensetzung des Milieus, gebildet. Da Ribitdehydrogenase, allerdings mit geringem Wirkungsgrad, Xylit zu Xylulose oxidiert und da Xylulose von *Aerobacter* verwertet wird, führt die Mutation zu Konstitutivität dazu, daß Xylit als Kohlenstoffquelle dienen kann. Im ersten Mutationsschritt ist also die Quantität eines an sich nicht für Xylit,

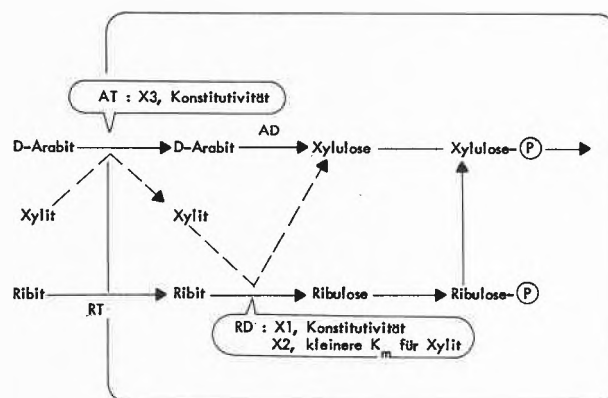


Abb. 3. Xylitverwertung durch *Aerobacter aerogenes* (nach Wu et al.⁴). Die ausgezogenen Pfeile geben die Verwertung von D-Arabit und von Ribit durch den Wildtyp von *Aerobacter aerogenes* an, der unfähig ist, Xylit zu verwerten. Gestrichelte Pfeile zeigen den Weg der Verwertung von Xylit durch die Mutanten X1, X2 und X3. RD: Ribitdehydrogenase; AD: Arabitdehydrogenase; RT: Transportsystem für Ribit; AT: Transportsystem für Arabit

$\text{CH}_3\text{CONH}_2 + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{Amidase}} \text{CH}_3\text{COOH} + \text{NH}_3$				
Stamm	Wildtyp	→ C-Mutante	→ B-Mutante	→ V-Mutante
Regulation der Amidase	induzierbar	konstitutiv	konstitutiv	konstitutiv
Substrat-spektrum	Acetamid Propionamid	Acetamid Propionamid	Acetamid Propionamid Butyramid	Propionamid Butyramid Valeramid

Tabelle 2. Evolution der aliphatischen Amidase von *Pseudomonas aeruginosa* (nach Clarke²)

sondern für die verwandte Verbindung Ribit bestimmten Enzyms erhöht worden. Es konnte gezeigt werden, daß im zweiten Mutationsschritt die Qualität dieses Enzyms verbessert worden ist. Die Ribitdehydrogenase der Mutante X2 hat eine gegenüber dem Enzym aus Mutante X1 um den Faktor 2,5 erhöhte Affinität für Xylit, wodurch die Mutante X2 auf diesem Substrat schneller wachsen kann (Tabelle 1).

Im dritten Mutationsschritt hat der Organismus schließlich ein Transportsystem für Xylit erworben. Die Mutante X3 kann mit Hilfe dieses Transportsystems Xylit aktiv in der Zelle konzentrieren und dadurch die Verdoppelungszeit nochmals herabsetzen. Wie in Abb. 3 angedeutet, beruht der Erwerb des Xylit-Transportsystems auf der Konstitutivität einer Permease für den verwandten Alkohol Arabit. Die Reihenfolge der Mutationen in diesem Beispiel entspricht dem Prinzip der Retroevolution: gegenläufig zum Metabolit-Fluß ist zuerst Xylitdehydrogenase-Aktivität und erst nachher Xylitpermease-Aktivität erworben worden.

Ein anderes Beispiel für systematische Studien über die Evolution eines Enzyms sind die Arbeiten von P. Clarke und Mitarbeitern^{2, 5} über die aliphatische Amidase von *Pseudomonas aeruginosa*. Der Wildstamm von *P. aeruginosa* kann Acetamid oder Propionamid als einzige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle verwenden. Die höheren Homologen Butyramid und Valeramid werden vom Ausgangsstamm nicht verwertet, da die von ihm gebildete Amidase nur durch Acetamid und Propionamid induziert wird und auch nur diese beiden Amide zu hydrolysieren vermag (Tabelle 2). Eine Mutante (C-Mutante), welche die Wildtyp-Amidase konstitutiv, d.h. auch in Abwesenheit von Acetamid oder Propionamid synthetisiert, ist nicht fähig, auf Butyramid zu wachsen. Die erhöhte Produktion dieses Enzyms genügt also in diesem Falle nicht, um die fehlende Spezifität dieses Enzyms für Butyramid wettzumachen. Ausgehend von C-Mutanten, können aber in einem zweiten Mutationsschritt B-Mutanten mit erweitertem Substratspektrum erhalten werden, die nun auf Butyramid wachsen und diese Verbindung zu hydrolysieren vermögen. In einem dritten Schritt schließlich kann das Substratspektrum der Amidase so erweitert werden, daß sie auch Valeramid spaltet (V-Mutante). Mit dem Gewinn der Fähigkeit, Valeramid

zu spalten, verliert das Enzym aber die Möglichkeit zur Hydrolyse von Acetamid (Tabelle 2). Man scheint hier also an eine Grenze der Variationsmöglichkeiten des Enzymproteins anzustoßen. Die Definition solcher Begrenzungen und der Vergleich der Strukturen dieser Serie von Amidasen sind natürlich Aspekte, die für den Enzymologen von großem Interesse sind und die im Amidase-System gegenwärtig auch bearbeitet werden. Bei der Entstehung der Xylitverwertung, bei der Evolution neuer Amidasen sowie auch in den meisten andern Fällen, in denen die Aquisition neuer Stoffwechselfunktionen untersucht worden ist, hat man den selben Ablauf von Geschehnissen beobachtet. In einem ersten Schritt wird durch eine Regulationsmutation die Konzentration eines Enzyms, das keine oder nur geringe Spezifität für das neue Substrat hat, erhöht. Erst wenn die Zelle eine genügende Menge des unspezifischen Enzyms produziert, wird dieses Enzym durch eine Reihe von Mutationen im Strukturgen der Verwertung des neuen Substrats optimal angepaßt.

Die erwähnten Beispiele zeigen, daß es durch die Wahl einer geeigneten Strategie möglich ist, neue katabolische Fähigkeiten von Bakterien im Labor zu selektionieren. Ein wichtiger Punkt dieser Strategie scheint es zu sein, an bestehende Enzymreaktionen anzuknüpfen. Um ans Ziel zu gelangen, muß die Selektion von neuen Eigenschaften schrittweise erfolgen. Die Wahrscheinlichkeit für die Veränderung eines Enzyms in Richtung Verwertung eines neuen Substrats darf nicht zu gering sein, d.h. modifiziertes Enzym muß in einem oder in zwei Mutationsschritten entstehen können. Mutet man den Bakterien hingegen zu viel zu und stellt bei der Selektion nach neuen Eigenschaften zu hohe Ansprüche, so wird der Erfolg ausbleiben. Mutanten mit den gewünschten Eigenschaften werden aus dem Ausgangsstamm nur durch Kumulation mehrerer unabhängiger Mutationen entstehen können, und die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten solcher Mutationen in ein und derselben Zelle und in der richtigen Kombination ist zu klein.

Evolution von Biosynthesewegen

Im Fall von Biosynthesewegen liegen die Verhältnisse etwas anders. Die Synthesewege für die wichtigsten Zellbausteine, wie z.B. für Aminosäuren und Nukleotide,

sind evolutionsmäßig gesehen älter als die katabolischen Wege. Die verschiedensten Organismen bauen ihre Zellen aus den selben Bausteinen auf, und die von ihnen betriebene Synthese der biologisch wichtigen Makromoleküle (Proteine, Nucleinsäuren) ist so auf die Verwendung der Standard-Monomere (Aminosäuren, Nucleotide) eingespielt, daß ihnen aus der Evolution eines neuen Biosynthesewegs kein selektiver Vorteil entstehen würde. Experimentelle Anordnungen, mit denen für die Bildung eines neuen Biosynthesewegs positiv selektioniert werden könnte und die damit die Voraussetzung für die Durchführung von Evolutionsexperimenten schaffen, sind denn auch nicht bekannt. Aus diesem Grunde ist die Evolution von Biosynthesewegen nicht experimentell, sondern mit Hilfe der vergleichenden Evolutionsforschung untersucht worden.

Solche vergleichende Untersuchungen von Biosynthesen in Mikroorganismen und in höheren Organismen haben gezeigt, daß diese Klasse von Stoffwechselwegen im Verlaufe der Evolution erstaunlich konservativ weitergegeben worden ist¹⁷. Mit wenigen Ausnahmen^{18, 19} sind die Zwischenprodukte eines Biosynthesewegs und die Art der Enzymreaktionen in allen Organismen, die einen bestimmten Syntheseweg besitzen, die selben. Neuerdings zeigt es sich, daß die Weitergabe von Stoffwechselwegen trotzdem nicht so monoton abgelaufen ist. Verschiedene Organismen haben im Verlaufe der Evolution ganz verschiedenartige Mechanismen für die Regulation eines bestimmten Stoffwechselwegs ausgebildet. Während sich das Gerüst der Biosynthesewege nicht verändert hat, findet man große Variationen in bezug auf die Regulationsmechanismen, welche die Synthese²⁰ oder die Aktivität^{21, 22} von Enzymen steuern. Kehrt man zur Vorstellung von Biosynthesewegen als biochemischen Organellen zurück, so kann gesagt werden, daß die Funktion dieser Organelle während der Evolution konstant geblieben ist, ihre Struktur sich aber verändert hat.

Diese allgemeine Beobachtung wird im folgenden am Beispiel der Regulation der Argininbiosynthese in zwei Bakterien zu illustrieren versucht.

Escherichia coli und *Pseudomonas aeruginosa* besitzen etwa gleich viel genetische Information pro Zelle, unterscheiden sich aber in bezug auf die Basenzusammensetzung der DNS (50% Guanin + Cytosin bei *E. coli*, 67% Guanin + Cytosin bei *P. aeruginosa*). Die Argininsynthese verläuft in beiden untersuchten Bakterien, wie übrigens auch in allen andern Organismen, die Arginin synthetisieren können, von Glutaminsäure ausgehend in acht enzymatischen Schritten zu Arginin^{23, 24}. Die ersten vier Zwischenprodukte dieser Synthesekette sind N-acetyliert, was sie vor einer internen Zyklisierung schützt. Bei *E. coli* beobachtet man das «klassische Bild». Alle acht Biosynthese-Enzyme werden durch einen Überschuß des Endprodukts Arginin reprimiert²³; ihre Synthese wird durch Arginin unterdrückt. Das erste Enzym, die N-Acetylglutamat-Synthetase, unterliegt der Feed-

back-Hemmung durch Arginin, d.h. dieses Enzym wird durch Arginin in seiner Aktivität gehemmt^{25, 26}, was bei einem Überschuß an Arginin zur sofortigen Unterbrechung des unnötig gewordenen Stoffwechselwegs führt (Abb. 4). Es ist ferner zu beachten, daß *E. coli* N-Acetylglutamat unter Investition von Acetyl-CoA synthetisiert, die Acetylgruppe dann aber im fünften enzymatischen Schritt unter Bildung von Acetat hydrolytisch abspaltet.

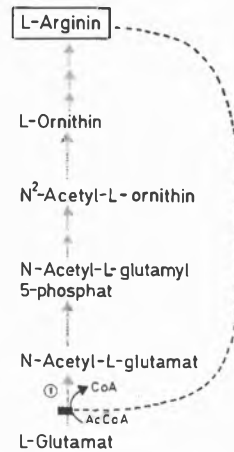


Abb. 4. Argininbiosynthese in *Escherichia coli*. Alle acht Enzyme des Synthesewegs werden durch Arginin reprimiert. Enzym 1 (N-Acetylglutamat-Synthetase) wird durch Arginin gehemmt (— — —)

Bei *P. aeruginosa* ist die Kontrolle der Enzymsynthese durch Arginin wenig ausgeprägt. Der Spiegel von nur drei der acht Biosyntheseenzyme wird durch Arginin reguliert^{24, 27}. In diesem Organismus ist aber die Argininsynthese energetisch rationeller gestaltet, indem die N-Acetylgruppe von Acetylornithin nicht abgespalten, sondern durch eine Transacetylase auf Glutaminsäure übertragen wird. Dadurch bleibt die in Form von Acetyl-CoA investierte Energie erhalten, und es entsteht, wie in Abb. 5 angegeben, ein Zyklus von acetylierten Verbindungen. Dem ersten Enzym, der N-Acetylglutamat-Synthetase, kommt dabei nur noch die Funktion zu, diesen Zyklus wiederaufzufüllen.

Die Einführung dieser energetisch vorteilhaften Modifikation der Argininbiosynthese bei *P. aeruginosa* hat verschiedene Veränderungen im Feedback-Muster zu Folge (Abb. 5):

- Um die Argininsynthese durch das Endprodukt wirksam zu kontrollieren, ist das zweite Enzym, die N-Acetylglutamat-5-Phosphotransferase, feedbackempfindlich geworden²⁸. Hemmung nur des ersten Enzyms allein durch Arginin, wie das bei *E. coli* beobachtet wurde, würde die Argininsynthese nicht unterbinden.
- Außerdem ist eine Feinkontrolle des Acetylierungsschritts eingeführt worden, welche eine synergistische Hemmung des ersten Enzyms durch Acetylglutamat und Arginin ermöglicht²⁹.

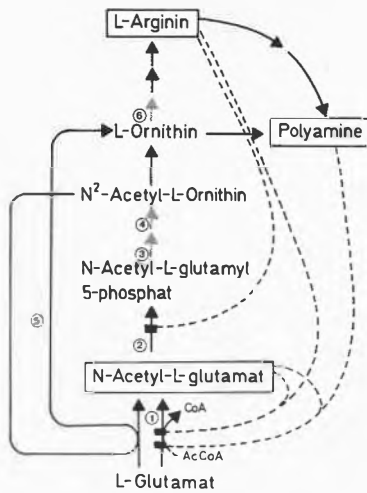


Abb.5. Argininbiosynthese in *Pseudomonas aeruginosa*. N-Acetylglutamat, das erste Zwischenprodukt des Synthesewegs, wird durch Enzym (N-Acetylglutamat-Synthetase) oder durch Enzym 5' (Ornithin-Acetyltransferase) gebildet. Der Spiegel von drei Enzymen (3,4,6) wird durch Arginin reguliert. Arginin hemmt Enzym 2 (N-Acetylglutamat-5-Phosphotransferase) und übt zusammen mit N-Acetylglutamat eine synergistische Hemmung auf Enzym 1 aus (---). N-Acetylglutamat wirkt auch zusammen mit Polyaminen als Inhibitor von Enzym 1 (---)

– Und schließlich wird die Rate des Acetylierungsschritts nicht nur auf den Argininbedarf abgestimmt, sondern auch auf die Konzentration an Polyaminen (Spermidin, Spermin und Putrescin) in der Zelle, die als Folgeprodukte von Arginin angesehen werden können. Polyamine und Acetylglutamat üben ebenfalls synergistische Hemmung auf das erste Enzym aus²⁹. Alle diese Feedback-Mechanismen in *Pseudomonas* wirken also auf eine möglichst genaue Kontrolle des Spiegels an acetylierten Verbindungen hin.

Obwohl die Argininsynthese in den beiden untersuchten Bakterien über die selben Zwischenprodukte verläuft, haben sich zwei ganz verschiedene Typen der Regulation dieses Biosynthesewegs herausgebildet. Bei *E. coli* zielt die Regulation auf eine möglichst rationelle Proteinsynthese ab, bei *P. aeruginosa* hingegen beobachtet man eine raffinierte Kontrolle des Spiegels der energetisch wertvollen acetylierten Zwischenprodukte der Argininbiosynthese. Welche selektionierenden Kräfte im Verlaufe der Evolution zur Ausbildung des einen oder des andern Regulationstyps geführt haben, ist unbekannt.

Ähnliche Unterschiede in den Regulationsmustern, wie sie bei *E. coli* und *P. aeruginosa* für den Fall der Argininbiosynthese geschildert worden sind, wurden in andern Biosynthesewegen und in andern Mikroorganismen gefunden^{20, 21, 22}. Es zeichnet sich dabei ab, daß jeder Regulationstyp einer bestimmten taxonomischen Gruppe von Organismen entspricht, so daß diese Regulationsmuster als evolutionäre Marken angesehen werden können, welche die Einheitlichkeit der Biosynthesewege gewissermaßen kompensieren.

Wie entstehen neue Gene?

Das entscheidende Geschehen bei der Entstehung neuer Stoffwechselfunktionen spielt sich auf der Ebene der Gene ab. Hier treten Mutationen auf, welche Veränderungen in den Eigenschaften der entsprechenden Enzyme zur Folge haben und so zu neuen Stoffwechselfunktionen oder zu Veränderungen in der Regulation bestehender Stoffwechselwege führen. Die Entstehung neuer Stoffwechselfunktionen kann aber nicht nur auf der Modifikation bereits bestehender Gene beruhen, wie das bei den besprochenen Beispielen der Fall war. Im Verlaufe der Evolution mußte sich auch das genetische Material der Zelle vermehren. Man stellt sich vor, daß die Vermehrung der Gene durch Genduplikationen zustande kommt, durch gelegentliche Fehler bei der DNS-Verdoppelung, die vor jeder Zellteilung abläuft³⁰. Im Falle einer Genduplikation wird ein bestimmter DNS-Abschnitt zweimal kopiert. Ist ein Gen verdoppelt, so kann eine Kopie die ursprüngliche Funktion beibehalten, die andere Kopie des Gens hingegen durch eine Folge von Mutationen eine neue Funktion übernehmen (Abb.6).

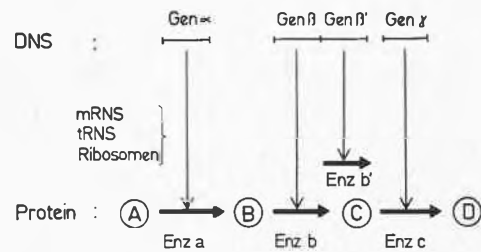


Abb.6. Genverdoppelung. Durch einen Fehler bei der Replikation ist Gen β verdoppelt worden. Die eine der beiden Kopien des Gens kann als Folge von Mutationen eine neue Funktion übernehmen, ohne daß das Funktionieren des bestehenden Stoffwechselwegs beeinträchtigt wird

Es ist unklar, welche bestehenden Gene das Rohmaterial für die Gene eines neu entstehenden Stoffwechselwegs liefern. Man erwägt heute zwei Möglichkeiten für die Abstammung der Gene eines Stoffwechselwegs³¹.

Nach dem Modell der *horizontalen* Evolution nimmt man an, daß bei der Selektion eines Enzyms für eine neue Funktion in erster Linie seine katalytischen Eigenschaften ausschlaggebend sind. Erst nachträglich, durch eine Folge von Mutationen, ist dann in diesem Enzym die Fähigkeit geschaffen worden, ein neues Substrat, ein Zwischenprodukt des neuen Stoffwechselwegs, wirkungsvoll zu binden. Bei dieser Art von Evolution erwartet man eine verstreute Anordnung der Gene des neu entstehenden Stoffwechselwegs auf dem Bakteriengenom. Die Gene für die einzelnen Schritte des neuen Wegs sind ja aus verschiedenen, schon bestehenden Wegen zusammengesucht worden (Tabelle 3).

Tabelle 3. Woher stammen die Gene eines Stoffwechselwegs?

	horizontale Evolution	vertikale Evolution
primäre Selektion für	katalytische Aktivität	Bindung von Substrat
Entwicklung während der Evolution	Bindung von Substrat	katalytische Aktivität
Lage der Strukturgene	verstreut	gruppiert

Im Modell der vertikalen Evolution wird vorgeschlagen, daß alle Gene eines Stoffwechselwegs durch eine Folge von Genduplikationen aus dem selben Gen hervorgegangen sind³². Wenn man die Fähigkeit, ein Substrat zu binden, als diejenige Funktion betrachtet, für die primär selektioniert wird, so ist ein Enzym des selben Stoffwechselwegs der bevorzugte Kandidat für die Übernahme des nächsten enzymatischen Schritts. Es besitzt bereits die Fähigkeit, das Substrat zu erkennen, und kann durch Mutationen so verändert werden, daß es die katalytische Funktion des nächsten Stoffwechselschritts ausführen kann. Läuft dieser Prozeß auch für die folgenden Schritte konsequent ab, so sollte man für die Gene eines Stoffwechselwegs eine gruppierte Anordnung erhalten (Tabelle 3).

Untersucht man die Anordnung der Gene in den heute lebenden Bakterien, so findet man beide Typen von genetischer Organisation (Abb. 7). Die Gene gewisser Stoffwechselwege sind verstreut angeordnet, die Gene anderer Stoffwechselwege hingegen liegen gruppiert, in sogenannten Operons³³ zusammengefaßt, auf dem Chromosom. Da die beobachtete Anordnung der Gene auch sekundär entstanden sein könnte, scheut man sich davor,

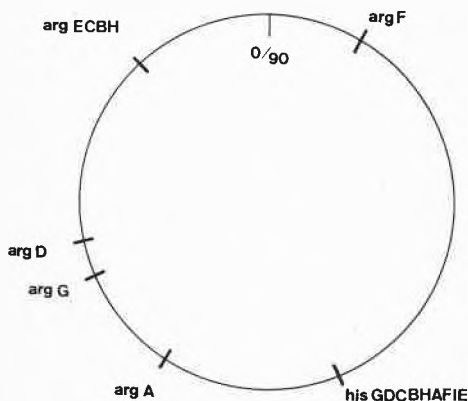


Abb. 7. Verstreute und gruppierte Anordnung der Gene von Stoffwechselwegen auf dem Bakterienchromosom. Das genetische Material von *Escherichia coli* liegt in Form eines ringförmigen Riesenmoleküls vor. Mehr als 450 verschiedene genetische Loci sind auf diesem Ringchromosom kartiert³⁴. In der Figur ist die Lage der acht Strukturgene der Argininbiosynthese (teils verstreute, teils gruppierte Anordnung) und die Lage der neun Strukturgene der Histidinbiosynthese (gruppiert in einem einzigen Operon) angegeben.

auf Grund der Genanordnung allein auf die Art und Weise der Entstehung eines Stoffwechselwegs zu schließen. Zuverlässigere Informationen über die Herkunft der Gene eines Stoffwechselwegs wären von Analysen der Aminosäuresequenz der Enzyme zu erwarten. Bis heute liegen noch keine Daten über die Primärstruktur der Enzyme ein und desselben Weges vor. Im Falle der vertikalen Evolution würde man bei einem Vergleich der Aminosäuresequenzen eine gewisse Homologie zwischen den Enzymen eines Stoffwechselwegs erwarten. Für den Fall der horizontalen Evolution hingegen sollte Homologie zwischen funktionell verwandten Enzymen verschiedener Stoffwechselwege beobachtet werden können.

Literatur

- 1 R. Y. Stanier, *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 20 (1970) 1.
- 2 P. H. Clarke, *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 24 (1974) 183.
- 3 G. D. Hegemann und S. L. Rosenberg, *Ann. Rev. Microbiol.* 24 (1970) 429.
- 4 T. T. Wu, E. C. C. Lin und S. Tanaka, *J. Bacteriol.* 96 (1968) 447.
- 5 J. L. Betz, P. R. Brown, M. J. Smyth und P. H. Clarke, *Nature* 247 (1974) 261.
- 6 J. C. Francis und P. E. Hansche, *Genetics* 74 (1973) 259.
- 7 G. T. Cocks, J. Aguilar und E. C. C. Lin, *J. Bacteriol.* 118 (1974) 83.
- 8 *Industrial Aspects of Biochemistry*, FEBS Special Meeting, Dublin 1973, North-Holland, Amsterdam 1974.
- 9 G. D. Hegeman, in *Degradation of Synthetic Organic Molecules in the Biosphere*, National Academy of Sciences, Washington, D. C., 1972.
- 10 J. D. Watson, *Molecular Biology of the Gene*, 2nd Ed., W. A. Benjamin Inc., New York/Amsterdam 1970.
- 11 M. Cohn, J. Monod, M. R. Pollock, S. Spiegelman und R. Y. Stanier, *Nature* 172 (1953) 1096.
- 12 J. Monod und M. Cohn, *Adv. Enzymol.* 13 (1952) 67.
- 13 H. E. Umbarger, *Science* 123 (1956) 848.
- 14 N. H. Horowitz, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 31 (1945) 153.
- 15 S. L. Miller, in *The Origin of Life on Earth*, Pergamon Press, London 1959.
- 16 S. A. Lerner, T. T. Wu und E. C. C. Lin, *Science* 146 (1964) 1313.
- 17 M. Florkin in *Unity and Diversity in Biochemistry*, Pergamon Press, London/New York 1960.
- 18 S. L. Stenmark, D. L. Pierson, R. A. Jensen und G. I. Glover, *Nature* 247 (1974) 290.
- 19 H. J. Vogel in *Evolving Genes and Proteins*, Academic Press, New York 1965.
- 20 J. L. Canovas, L. N. Ornston und R. Y. Stanier, *Science* 156 (1967) 1695.
- 21 R. A. Jensen, D. S. Nasser und E. W. Nester, *J. Bacteriol.* 94 (1967) 1582.
- 22 H. B. LéJohn, *Nature* 231 (1971) 164.
- 23 H. J. Vogel, *Methods in Enzymology* 17A (1970) 249.
- 24 J. H. Isaac und B. W. Holloway, *J. Gen. Microbiol.* 73 (1972) 427.
- 25 S. Vyas und W. K. Maas, *Arch. Biochem. Biophys.* 100 (1963) 542.
- 26 D. Haas und Th. Leisinger, *Path. Microbiol.* 40 (1974) 140.
- 27 R. Voellmy und Th. Leisinger, *J. Gen. Microbiol.* 73 (1972) xii.
- 28 D. Haas, V. Kurer und Th. Leisinger, *Eur. J. Biochem.* 31 (1972) 290.
- 29 D. Haas und Th. Leisinger, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 60 (1974) 42.
- 30 A. L. Koch, *Genetics* 72 (1972) 297.
- 31 L. N. Ornston, *Bacteriol. Rev.* 35 (1971) 87.
- 32 N. H. Horowitz, in *Evolving Genes and Proteins*, Academic Press, New York 1965.
- 33 F. Jacob und J. Monod, *J. Molec. Biol.* 3 (1961) 318.
- 34 A. L. Taylor und C. D. Trotter, *Bacteriol. Rev.* 36 (1972) 504.