



Institut für Biotechnologie

***Untersuchungen zur Regulation
des Pentosephosphatweges
in Corynebacterium glutamicum***

Bernd Stefan Moritz

***Untersuchungen zur Regulation
des Pentosephosphatweges
in Corynebacterium glutamicum***

Bernd Stefan Moritz

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3743
ISSN 0944-2952
Institut für Biotechnologie Jül-3743
D 61 (Diss. Universität Düsseldorf, 2000)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
☎ 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Abstract

Investigation of the pentose phosphate pathway regulation of *Corynebacterium glutamicum*.

Since many years the gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* is used for the technical production of amino acids like L-glutamate and L-lysine. As for the biosynthesis of these amino-acids also NADPH is needed, the purpose of this doctoral dissertation was to study the regulation of the pentose phosphate pathway.

The first two enzymes of the pentose phosphate pathway, the glucose-6-phosphate dehydrogenase and the 6-phosphogluconate dehydrogenase were isolated from *C. glutamicum* and characterized. According to biochemical investigations, the glucose-6-phosphate dehydrogenase consists of two different protein-subunits, which are encoded by the adjacent *zwf*- and *opcA*-genes.

The glucose-6-phosphat-dehydrogenase operates according to an ordered Bi-Bi-mechanism, whereas the 6-phosphogluconate dehydrogenase operates according to a Theorell-Chance ordered Bi Ter mechanism. In the case of both enzymes NADPH competes with NADP for the cofactor binding site, whereby the competitive inhibition constants of NADPH are similar to the Michaelis-constants of NADP; these constants are all around 15 μM to 40 μM . As the intracellular concentrations of NADP and NADPH are between 100 μM and 370 μM and therefore significantly greater than the corresponding kinetic constants, both enzymes are influenced by the NADPH/NADP-concentration ratio *in vivo*. In the case of a leucine-auxotrophic strain of *C. glutamicum*, this ratio increased fourfold, which showed that the NADPH/NADP-concentration ratio is very important for the *in vivo* regulation of the pentose phosphate pathway.

On the basis of the kinetic data a model was deduced, which allows the calculation of the *in vivo* activity of the glucose-6-phosphate dehydrogenase from the intracellular concentrations of glucose-6-phosphate, NADP and NADPH. The obtained specific activities of around 10×10^{-3} units per mg dry weight were in full accord with the same fluxes determined by NMR after ^{13}C -labelling.

The *in vivo* activity of the glucose-6-phosphate-dehydrogenase was a factor of 4 to 8 smaller than the maximal *in vitro* activity in the case of substrate saturation. As a smaller intracellular NADPH/NADP-concentration-ratio leads to an increased activity of both dehydrogenases of the pentose phosphate pathway, it is likely, that NADPH does not limit lysine production of *C. glutamicum*.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	9
2.1 CHEMIKALIEN	9
2.2 BAKTERIENSTÄMME UND PLASMIDE	9
2.3 STAMMHALTUNG	10
2.3.1 Vorkultur	10
2.3.2 Hauptkultur	10
2.4 BESTIMMUNG DER BIOMASSEKONZENTRATION	13
2.5 TROCKENGEWICHTSBESTIMMUNG	13
2.6 BESTIMMUNG DER GLUCOSE-, AMINOSÄURE-, α -ISOPROPYLMALAT- UND LACTAT-KONZENTRATIONEN IM ÜBERSTAND	13
2.7 ZELLAUFSCHLUßVERFAHREN	14
2.8 BESTIMMUNG DER SPEZIFISCHEN AKTIVITÄTEN DER GLUCOSE-6-PHOSPHAT-DEHYDROGENASE UND DER 6-PHOSPHOGLUCONAT-DEHYDROGENASE	15
2.9 BESTIMMUNG DER SPEZIFISCHEN AKTIVITÄT DER GLUTAMAT-DEHYDROGENASE	15
2.10 BESTIMMUNG DER PROTEIN-KONZENTRATIONEN	15
2.11 ISOLIERUNG DER GLUCOSE-6-PHOSPHAT-DEHYDROGENASE UND 6-PHOSPHOGLUCONAT-DEHYDROGENASE	16
2.11.1 Anionenaustauschchromatographie	16
2.11.2 Farbstoff-Affinitätschromatographie	16
2.11.3 2'5'-ADP-Sepharose Liganden-Affinitäts-Chromatographie	17
2.11.4 Gelfiltrationschromatographie der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	18
2.12 SDS-GELELEKTROPHORESE	19
2.13 N-TERMINALE SEQUENZIERUNG UND MALDI-ANALYSE	19
2.14 NATIVE GELELEKTROPHORESE DER GLUCOSE-6-PHOSPHAT-DEHYDROGENASE	19
2.15 KINETISCHE CHARAKTERISIERUNG DER GLUCOSE-6-PHOSPHAT UND 6-PHOSPHOGLUCONAT-DEHYDROGENASE	19
2.16 SCHNELLE ABSTOPPUNG DES STOFFWECHSELS DURCH METHANOL-QUENCHING UND ZELLEXTRAKTIONEN ZUR METABOLITPOOL-QUANTIFIZIERUNG	20
2.16.1 Methanol-Quenching	20
2.16.2 Perchlorsäure-Extraktion	22
2.16.3 Spezielle Extraktions-Verfahren zur Quantifizierung von NADP und NADPH	22
2.17 BESTIMMUNG INTRAZELLULÄRER METABOLIT-KONZENTRATIONEN	24
2.17.1 Quantifizierung von NADP und NADPH in Zellextrakten von <i>Corynebacterium glutamicum</i>	24
2.17.2 Quantifizierung von AMP, ADP und ATP	25
2.17.3 Quantifizierung von Glucose-6-P, Gluconat-6-P, Fructose-1,6-P ₂ , D-Glycerinaldehyd-3-P, Xylulose-5-P und Ribulose-5-P	26
2.18 BERECHNUNG DER IN VIVO-AKTIVITÄT DER GLUCOSE-6-PHOSPHAT-DEHYDROGENASE	28
3 Ergebnisse	29
3.1 ISOLIERUNG DER GLUCOSE-6-PHOSPHAT-DEHYDROGENASE UND DER 6-PHOSPHOGLUCONAT-DEHYDROGENASE	29
3.2 UNTERSUCHUNGEN ZUR REGULATION DER GLUCOSE-6-PHOSPHAT-DEHYDROGENASE UND DER 6-PHOSPHOGLUCONAT-DEHYDROGENASE	34
3.2.1 Mechanismen der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase	34
3.2.2 Bestimmung der Michaelis-Konstanten und Untersuchung der Hemmung beider Enzyme durch Produkte	36
3.2.4 Regulation der Glucose-6-phosphat- und Gluconat-6-phosphat-Dehydrogenasen durch intrazelluläre Metabolite	42
3.2.5 Einfluß von Salzen und Polyethylenglycol auf die Aktivitäten der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase	48
3.4 UNTERSUCHUNGEN ZUR REGULATION DES PENTOSEPHOSPHATWEGES AM BEISPIEL DER HOMOLOGEN UND HETEROLOGEN GLUDH-MUTANTE VON C.GLUTAMICUM	50
3.4.1 Intrazelluläre Metabolit-Konzentrationen und spezifische Enzymaktivitäten der homologen und heterologen GLUDH-Mutante	51
3.4.2 Berechnung der in vivo-Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	54

3.4.3 Sensitivität der in vivo-Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase gegenüber der Variation intrazellulärer Metabolit-Konzentrationen.	56
3.5 UNTERSUCHUNGEN ZUR REGULATION DES PENTOSEPHOSPHATWEGES AM BEISPIEL DER C.GLUTAMICUM STÄMME MH20-22B UND LE4	58
4 Diskussion	71
4.1 FUNKTION UND BEDEUTUNG DES OPCA-PROTEINS	71
4.2 AKTIVITÄTEN DER GLUCOSE-6-PHOSPHAT UND 6-PHOSPHOGLUCONAT-DEHYDROGENASEN IN VIVO UND IN VITRO	71
4.3 REGULATION DER GLUCOSE-6-PHOSPHAT-DEHYDROGENASE UND DER 6-PHOSPHOGLUCONAT-DEHYDROGENASE DURCH INTRAZELLULÄRE METABOLITE.....	74
4.4 KONTROLLE DES STOFFFLUSSES AM VERZWEIGUNGSPUNKT GLYCOLYSE UND PENTOSEPHOSPHATWEG DURCH DIE INTRAZELLULÄRE GLUCOSE-6-PHOSPHAT KONZENTRATION	78
4.5 UNTERSUCHUNGEN ZUR BATCH-KULTIVIERUNG DER STÄMME LE4 UND MH20-22B.....	79
4.6 WIRD DIE LYSIN BIOSYNTHESE DURCH NADPH LIMITIERT?	82
5 Zusammenfassung	83
6 Literaturverzeichnis	85

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AcCoA	Acetyl Coenzym A
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATCC	<i>American type culture collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
CoA	Coenzym A
DEAE	Diethylaminoethyl
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
FBP	Fructose-1,6-bisphosphat
F6P	Fructose-6-phosphat
G6P	Glucose-6-phosphat
G-6-PDH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
GAP	D-Glycerinaldehyd-3-phosphat
GLUDH	Glutamat-Dehydrogenase
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i>
HPr	hitzestabiles Protein
ICD	Isocitrat-Dehydrogenase
K_M	Michaelis-Konstante
K_{ic}	kompetitive Hemmkonstante
K_{iu}	unkompetitive Hemmkonstante
kb	Kilobasenpaar
kD	Kilodalton
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (oxidiert)
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduziert)
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (oxidiert)
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (reduziert)
n.b.	nicht bestimmt
n.n.	nicht nachweisbar
OAA	Oxalacetat
OD	Optische Dichte, ermittelt bei einer Wellenlänge von 600 nm
OpcA	‘oxidative pentosephosphate cycle protein’
P_i	Orthophosphat, anorganisches Phosphat

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEP	Phosphoenolpyruvat
P5P	Pentose-5-phosphat
6PG	6-Phosphogluconat
6-PGDH	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase
ppm	<i>Parts per million</i>
PPW	Pentosephosphatweg
PRPP	5-Phosphoribosyl- α -pyrophosphat
PTS	Phosphotransferase-System
RUP	Ribulose-5-phosphat
SDS	sodium dodecyl sulfate
ssp.	subspecies
Tab.	Tabelle
TG	Trockengewicht
U	Unit ($\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}_{\text{Protein}}^{-1}$)
V_{max}	maximale Geschwindigkeit
Zwf	Zwischenferment (Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase)

1 Einleitung

Corynebacterium glutamicum ist ein gram positives, keulenförmiges Bakterium, welches zur Untergruppe der Actinomyeten gehört (Liebl, 1992). Der Wildstamm produziert unter bestimmten Bedingungen, wie Biotin-Limitierung (Shiio et al., 1962) oder Temperaturerhöhung (Gourdon et al., 1999) L-Glutamat. Durch gentechnische Veränderungen konnte erreicht werden, daß *Corynebacterium glutamicum* auch essentielle Aminosäuren wie L-Lysin (Schrumpf, B., 1992), L-Threonin (Eikmanns et al. 1991a) und L-Isoleucin (Morbach et al., 1995 und Colon et al., 1995) ins Nährmedium ausscheidet. Die mikrobielle Herstellung von Aminosäuren hat den Vorteil, daß nur die biologisch relevanten L-Enantiomere der Aminosäuren gebildet werden, so daß dieses biotechnologische Verfahren gegenüber chemischen Verfahren, bei denen aufwendige Racematspaltung durchgeführt werden muß, vorteilhaft ist. Somit erlangte *Corynebacterium glutamicum* als Aminosäureproduzent eine große industrielle Bedeutung.

Essentielle Aminosäuren wie L-Lysin, L-Threonin und L-Isoleucin sind als Futtermittelzusatz wichtig, da durch Aminosäure-Supplementierung die Futterqualität verbessert werden kann. Aminosäuren werden jedoch auch in der Nahrungsmittelindustrie (L-Glutamat), als Vorstufe zur Synthese von Pharmaka und als Zusätze zu Infusionslösungen verwendet (Leuchtenberger, 1996).

Bisher konnte eine Steigerung der Lysin-Produktion mit *C. glutamicum* hauptsächlich durch Zufallsmutagenese, durch den Einsatz von Substratanaloga beim Screening und durch gezielte Eingriffe in die Lysin-Biosynthesewege erreicht werden. So konnten beispielsweise die Lysin-Produzenten durch Mutation mit *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-Nitrosoguanidin und Selektion bei Anwesenheit des Lysin-Analogons S-(β -aminoethyl)-L-cystein (AEC) gewonnen werden. Diese Stämme waren in der Aspartat-kinase so verändert, daß dieses Enzym nicht mehr durch Lysin und Threonin Feedback-inhibiert wird (Schrumpf et al., 1992). Auch konnte die Lysinproduktion durch Überexpression der Dihydropicolinat-Synthase (*dapA*) erhöht werden (Eggeling et al., 1998). Die bei *C. glutamicum* erzielten Erfolge bei der Aminosäureproduktion werden mit der relativ einfachen Regulation der Aminosäurebiosynthese in diesem Organismus in Verbindung gebracht (Liebl, 1992).

Neben der Regulation des Biosynthese Weges hat auch der Zentralstoffwechsel einen starken Einfluß auf die Lysin-Produktion, da er die Vorstufen liefert. Im Falle von Lysin sind dies Pyruvat und Oxalacetat (Lengeler et al., 1999). Auch liefert er die erforderlichen Reduktions- (NADPH) und Energie-Äquivalente (ATP). Man kann daher erwarten, daß die Bereitstellung dieser Vorstufen einen entscheidenden Einfluß auf die Lysin-Produktion und -Ausbeute hat. Erste Erfolge auf diesem Gebiet konnten durch Veränderungen im Bereich der anapleroti-

schen Reaktionen des Citronensäure-Cyclus erzielt werden. Wenn die Pyruvat-Carboxylase durch Biotin-Mangel in ihrer Aktivität limitiert wird, führt dies zu einer verringerten Lysin-Produktion, welches die Wichtigkeit einer ausreichenden Oxalacetat-Versorgung hervorhebt (Peters-Wendisch, 1996). Die Lysin-Produktion ist ebenfalls bei Pyruvat-Kinase negativen Mutanten geringer (Gubler et al., 1994), da in diesem Fall zwar noch Pyruvat durch das Phosphotransferase-System (PTS) gebildet wird (Malin & Bourd, 1991), welches jedoch nicht mehr für eine Lysin Überproduktion ausreicht. Mit Hilfe der ^{13}C -Markierungstechnik konnte auf der anderen Seite festgestellt werden, daß die anaplerotische Nettoreaktion von Pyruvat zum Oxalacetat durch die entgegengerichtete PEP-Carboxykinase-Aktivität reduziert wird und somit auch die Bereitstellung von Oxalacetat für die Lysin-Biosynthese. Durch Herstellung einer PEP-Carboxykinase Deletionsmutante konnte die Lysin-Produktion um ca. 20-50 % gesteigert werden (Eikmanns und Petersen).

Ein anderer Aspekt ist die Bereitstellung von NADPH für die Lysin-Produktion. Pro Molekül Lysin werden für die Biosynthese 4 Moleküle NADPH benötigt, so daß NADPH ein limitierender Faktor der Lysin-Biosynthese sein könnte. NADPH wird im Zentralstoffwechsel durch unterschiedliche Enzyme gebildet (Abb.1), die jedoch, je nach Stamm und Wachstumsbedingungen, zu unterschiedlichen Anteilen zu der Gesamt-NADPH-Bildung beitragen (Marx, 1997).

Als NADPH-Produzent wäre ein anaplerotischer Reaktionszyklus bestehend aus Pyruvat Carboxylase, Malat-Dehydrogenase und Malat-Enzym denkbar, bei dem NADPH aus NADH gebildet wird. Anders als beim Wachstum auf Glucose (Cocaign-Bousquet & Lindley, 1996), wird diesem anaplerotischen Zyklus allerdings beim Wachstum auf Lactat (Cocaign-Bousquet & Lindley, 1994) und Fructose (Dominguez, 1998) eine Bedeutung zugesprochen. Die geringe Bedeutung des Malat-Enzyms beim Wachstum auf Glucose wurde auch durch die ^{13}C -Markierungstechnik bestätigt (Petersen). Da *C. glutamicum* im Gegensatz zu *E. coli* keine Transhydrogenase besitzt (Vallino, 1991; Kinoshita & Tanaka, 1972), ist eine direkte Übertragung der Elektronen von NADH auf NADP nicht möglich.

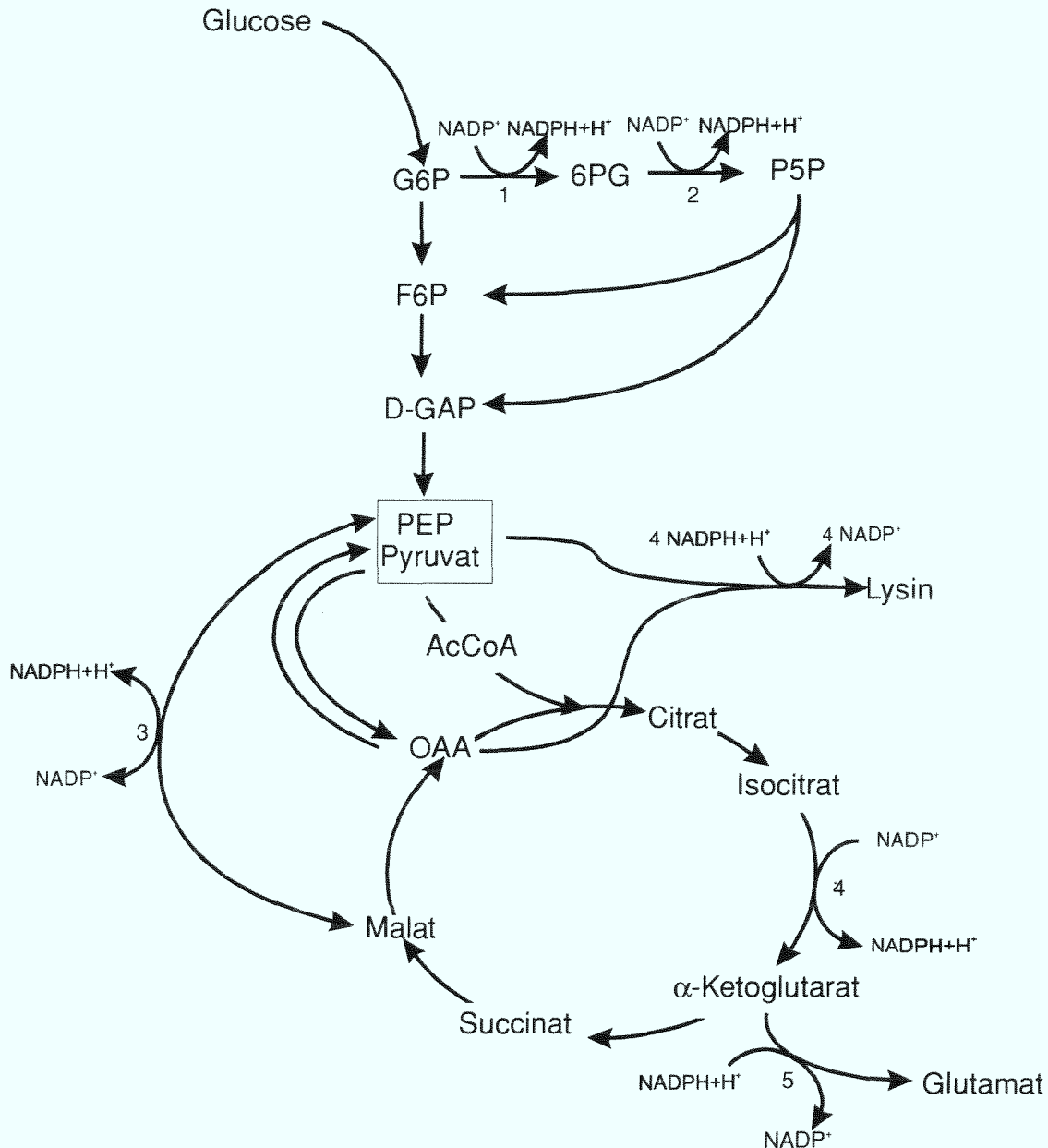


Abb.1: NADPH produzierende Prozesse in *C. glutamicum*. Während der Lysin-Produktion ist der oxidative Teil des Pentosephosphatweges der Haupt NADPH-Lieferant der Zelle. Die Glutamat-Dehydrogenase und die Lysin-Produktion sind große NADPH Verbraucher. Abkürzungen: 1: Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase; 2: 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase; 3: Malat-Enzym; 4: Isocitrat-Dehydrogenase; 5: Glutamat-Dehydrogenase

Als wichtigste NADPH-Lieferanten in *C. glutamicum* beim Wachstum auf Glucose sind daher die Isocitrat-Dehydrogenase und der oxidative Teil des Pentosephosphatweges anzusehen. Der Stofffluß durch den Pentosephosphatweg, und somit auch die NADPH Produktion durch diesen Stoffwechselweg ist bereits ausführlich mit Hilfe der ^{13}C -Markierungstechnik unter-

sucht worden (Marx et al. 1996, 1997 & 1999). Demzufolge wird der Stofffluß durch den oxidativen Teil des Pentosephosphatweges im Wesentlichen durch NADPH Verbrauch und Produktion bestimmt. Ist die Aktivität des Citrat-Zyklus hoch, wie z.B. während der Glutamat-Produktion mit *C. glutamicum*, findet eine verstärkte NADPH-Bildung durch die Isocitrat-Dehydrogenase statt, so daß die Pentosephosphatweg-Aktivität sinkt. Während der Lysin-Produktion, die viel NADPH verbraucht, konnte eine stark erhöhte Pentosephosphatweg-Aktivität festgestellt werden (Marx et al., 1997). In diesem Fall ist der Pentosephosphatweg der Haupt NADPH-Lieferant der Zelle (Marx et al., 1997). Auch bei der Riboflavin-Produktion mit *Bacillus subtilis* konnte eine vergrößerte Pentosephosphatweg-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden, welches sich durch den vergrößerten NADPH-Bedarf bei der Purin-Biosynthese erklärt (Sauer et al., 1996).

Durch ein stöchiometrisches Stoffwechselmodell von *E.coli* konnte zudem gezeigt werden, daß die NADPH-Produktion durch den Pentosephosphatweg mit ansteigendem ATP-Bedarf für 'Maintenance' weniger wichtig wird (Varma & Palsson, 1993). Das wird dadurch verursacht, daß der Stofffluß durch den Citrat-Cyclus bei steigendem ATP-Bedarf und somit auch die NADPH-Produktion durch die Isocitrat-Dehydrogenase größer werden. Dies stimmt mit dem beim Wachstum auf Fructose im Vergleich zu Glucose verringerten Fluß durch den Pentosephosphatweg von *Corynebacterium melassecola* überein, da beim Wachstum auf Fructose der ATP-Bedarf durch 'Maintenance' größer ist (Pons et al., 1996).

Eine interessante Fragestellung ist, ob es sich bei NADPH um einen limitierenden Faktor der Lysin-Bildung handelt. Auf der einen Seite wurde gefunden, daß eine starke NADPH-Bildung bei Verwendung von Gluconat als einziger Kohlenstoffquelle nicht zu einer Steigerung der Lysin-Produktion führt, welches suggeriert, daß NADPH kein limitierender Faktor ist (Vallino & Stephanopoulos, 1994). Auf der anderen Seite konnte jedoch gezeigt werden, daß die spezifische Lysin Produktionsrate sich unter bestimmten Bedingungen vergrößert, wenn ein Gemisch aus Glucose und Gluconat als Kohlenstoffquelle verwendet wird (Lee et al., 1998). Durch ^{13}C -Markierungstechnik (Marx et al. 1996, 1997 & 1999) konnte zwar eine überschüssige NADPH-Produktion festgestellt werden, die jedoch eher auf bisher nicht berücksichtigte NADPH verbrauchende Prozesse schließen läßt. So wurde in *C.glutamicum* eine membrangebundene NADPH-Oxidase-Aktivität gefunden (Matsushita, 1998). *C.glutamicum* könnte wie *E.coli* (Scott et al., 1987; Lynch&Lin, 1996) eine NADPH abhängige Glutathion-Peroxidase besitzen, die an den Prozessen zur Peroxid-Entgiftung beteiligt ist. Ein wichtiges Resultat von NADPH Bilanzierungsstudien (Marx, 1997a) ist, daß bei Lysin-Bildung ein deutlich reduzierter NADPH-Überschuß festgestellt werden konnte, der bei Berücksichtigung

bisher unbekannter NADPH verbrauchender Prozesse darauf hinweist, daß die NADPH-Bereitstellung einen limitierenden Faktor der Lysin-Biosynthese darstellen könnte. Da es sich beim Pentosephosphatweg um den wichtigsten NADPH-Lieferanten unter Lysin-Produktions-Bedingungen handelt, ist in diesem Zusammenhang eine Untersuchung der Regulation dieses Stoffwechselweges interessant.

Die starke Abhängigkeit der Aktivität des Pentosephosphatweges vom NADPH Bedarf läßt darauf schließen, daß die intrazelluläre Konzentration dieses Metaboliten einen starken Einfluß auf die Aktivitäten der Glucose-6-phosphat und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenasen ausübt. Tatsächlich nimmt das NADPH/NADP-Konzentrations-Verhältnis eine zentrale Position bei der Regulation dieses Stoffwechselweges ein. Steigt das Verhältnis an, so werden die Aktivitäten der beiden Enzyme gehemmt, da NADPH bei den meisten bisher untersuchten Organismen ein kompetitiver Inhibitor bezüglich des Substrats NADP^+ ist (Levy, 1979; Rosemeyer, 1987). Aber auch ATP hemmt die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase vieler Organismen (Levy, 1979; Kato et al., 1979). Aus Glucose-Puls Experimenten mit der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde geschlossen, daß NADPH und ATP die wichtigsten Inhibitoren der Glucose-6-phosphat und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase sind (Vaseghi, 1999) und somit den Fluß durch den Pentosephosphatweg wesentlich beeinflussen. Auf der anderen Seite konnte für *E.coli* gezeigt werden, daß der Stofffluß durch die Glycolyse stark durch das ATP/ADP-Verhältnis gesteuert wird (Koebmann et al., 1999). Dies läßt allgemein vermuten, daß Schlüsselmetabolite wie Energieäquivalente und Reduktionsäquivalente einen großen Einfluß auf die Stoffflußverteilung zwischen Glycolyse und Pentosephosphatweg haben.

Aber auch Zuckerphosphate, wie Fructose-1,6-bisphosphat, D-Glycerinaldehyd-3-phosphat und Ribulose-5-phosphat, spielen eine Rolle bei der Regulation der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (Sugimoto & Shiio, 1987a & 1987b; Kato, 1979). Bei einer Ribulose-5-phosphat-Epimerase Defektmutanten von *E. coli* wird die Hemmung des oxidativen Teils vom Pentosephosphatweg der Hemmung der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase durch das sich anstauende Ribulose-5-phosphat zugeschrieben (Juhnke, 1996), wobei die Zellen anfälliger für Redoxstreß werden. Bei *C. glutamicum* konnte am Beispiel von exponentiell auf Glucose und Fructose wachsenden Zellen gezeigt werden, daß bei geringerem Pentosephosphatweg-Fluß im Falle von Fructose als C-Quelle die intrazellulären Fructose-1,6-bisphosphat und D-Glycerinaldehyd-3-phosphat-Konzentrationen erhöht waren (Dominguez, 1998). Dies macht die *in vivo* Relevanz der Hemmung der Glu-

Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase durch diese Zuckerphosphate wahrscheinlich.

Die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus Bäckerhefe wird durch Palmitoyl CoA inhibiert (Taketa et al., 1974). Diese Hemmung kann als negative Feedback-Hemmung der Fettsäure-Biosynthese verstanden werden, die anzeigt, daß kein weiterer Bedarf an NADPH für die Fettsäure-Bildung notwendig ist. Palmitoyl CoA hemmt die Glucose-6-phosphat dehydrogenase von Bäckerhefe nicht nur durch Veränderung der Konformation des Enzyms, sondern auch durch Veränderung der Quartärstruktur (Kawaguchi & Bloch, 1974), welches zeigt, daß eine Regulation auch durch Beeinflussung von Protein-Protein Wechselwirkungen erfolgen kann. Bei *Saccharomyces cerevisiae*, Erbsen und Sojabohnen bilden die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase wahrscheinlich einen Komplex, wobei Metabolit-Channeling auftritt (Debnam et al., 1997). Durch Assoziations-Dissoziations-Gleichgewichte solcher Multienzymkomplexe besteht die Möglichkeit einer zusätzlichen Regulationsebene des oxidativen Teils vom Pentosephosphatweg (Wilson, 1980). Bei Rattenzellen vergrößert PDGF (‘Platelet Derived Growth Factor’) und EGF (‘Epidermal Growth Factor’) die Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, wobei bei permeabilisierten Zellen die Freisetzung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase stimuliert wird (Tian et al., 1998). Dies läßt vermuten, daß die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase in diesen Zellen an intrazelluläre Strukturen gebunden ist, und daß hierdurch die Aktivität des Enzyms beeinflußt wird.

Die Regulation des oxidativen Teils vom Pentosephosphatweg erfolgt nicht nur durch intrazelluläre Metabolite und durch Beeinflussung der Quartärstruktur der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, sondern auch durch die Veränderung der intrazellulären Konzentrationen dieser Enzyme. Bei *E. coli* wurde festgestellt, daß die spezifischen Aktivitäten der beiden Enzyme beim Wachstum auf Glucose (Verdopplungszeit 1 h) im Vergleich zum Wachstum auf Acetat (Verdopplungszeit 4 h) um das 4- bis 5-fache ansteigen (Wolf, et al. 1979). Dies stimmt mit *Saccharomyces cerevisiae* (Nissen et al., 1997) und *Bacillus subtilis* (Sauer et. al, 1997) überein, bei denen der Stofffluß durch den Pentosephosphatweg bei Glucose limitierter kontinuierlicher Kultivierung mit der Verdünnungsrate ansteigt. Auch bei Ratten-Zellen stieg die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität nach Wachstums-Stimulation durch den ‘Epidermal Growth Factor’ an (Stanto et al., 1991 ; Tian et al., 1994).

Die spezifische Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase wird zudem durch die Konzentrationen von Sauerstoffradikalen beeinflußt. Bei menschlichen Zellen ist bei einem durch

Sauerstoff-Radikale verursachten oxidativen Streß die Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase erhöht (Ursini et al., 1997). Auch bei Mikroorganismen übernehmen die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase eine wichtige Rolle bei der Radikal-Entgiftung, da sie NADPH bilden, welches die für die Radikal-Reduktion notwendigen Elektronen zur Verfügung stellt (Juhnke et al., 1996). Somit erklärt sich, daß bei *E. coli* die zwf-Expression durch soxR, einem durch Radikale aktivierbaren FeS-Protein (Lengeler et al., 1999), reguliert wird und somit durch Superoxid bildende Agenzien erhöht wird (Greenberg et al., 1991). Dagegen wird die Aktivität der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase auf Translationsebene reguliert. Bei *E. coli* konnte auf der gnd-mRNA (mRNA der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase) eine anti-Shine Dalgarno-Sequenz gefunden werden, durch die die Translations-Initiations-Geschwindigkeit reduziert wird (Baker & Wolf, 1984 und Carter-Muenchau&Wolf, 1989). Der Effektor dieser Regulation konnte bisher allerdings noch nicht identifiziert werden.

Im Falle von *C. glutamicum* ist die spezifische Aktivität der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase bei Verwendung von Gluconat anstelle von Glucose als Kohlenstoffquelle erhöht (Vallino & Stephanopoulos, 1994), welches zeigt, daß auch bei *C. glutamicum* unter bestimmten Bedingungen eine Regulation des Pentosephosphatweges durch Variation der Enzym-Konzentrationen erfolgt. Beim Wachstum auf Fructose im Vergleich zu Glucose blieben die spezifischen Aktivitäten der Glucose-6-phosphat und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenasen von *C. glutamicum* allerdings unverändert (Dominguez et al., 1998).

Obwohl die durch die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase katalysierte Oxidation von Glucose-6-phosphat zu 6-Phosphoglucono- δ -lacton reversibel ist, wird sie jedoch durch die spontane exergonische Hydrolyse des Lactons zum 6-Phosphogluconat insgesamt irreversibel (Levy, 1979 und Debnam et al., 1997). Da die Reaktion weit vom Gleichgewicht entfernt ist (Greenbaum et al, 1971 und Gumaa & McLean, 1969), ist sie zudem der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Pentosephosphatweges. Dagegen ist die oxidative Decarboxylierung von 6-Phosphogluconat reversibel (Silverberg & Dalizel, 1975, Toews et al., 1976), was bedeutet, daß die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase die Schrittmacherreaktion des oxidativen Teils vom Pentosephosphatweg katalysiert und daher ein Hauptkontrollpunkt dieses Stoffwechselweges sein sollte (Voet, 1992).

Da es sich beim Pentosephosphatweg um den wichtigsten NADPH-Lieferanten während der Lysin-Produktion bei *C. glutamicum* handelt (Marx et al., 1997), und eine NADPH Limitierung nicht ausgeschlossen werden kann, war es das Ziel dieser Arbeit die Regulation der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase durch intrazel-

luläre Metabolite zu untersuchen. Hierzu war es zunächst erforderlich beide Enzyme zu isolieren und kinetisch hinsichtlich regulierend wirkender Metabolite zu untersuchen. Im zweiten Teil der Arbeit wurden dann die intrazellulären Konzentrationen relevanter Metabolite wie NADP, NADPH und Glucose-6-phosphat bestimmt. Auf Basis der ermittelten kinetischen Daten wurde ein enzymkinetisches Modell erstellt, welches unter Berücksichtigung intrazellulärer Metabolit-Konzentrationen die Vorhersage des Kohlenstoffflusses durch den Pentosephosphatweg ermöglicht. Die Untersuchungen wurden sowohl mit kontinuierlich kultivierten Zellen (Glucose-Limitierung), als auch mit exponentiell unter Batch-Bedingungen kultivierten Zellen (Glucose-Überschuß) durchgeführt. Auf der einen Seite sollte eine direkte Beziehung zu den bereits durchgeführten Stoffflußanalysen durch die ^{13}C -Markierungstechnik hergestellt werden (Marx, 1997) und auf der anderen Seite ein Einblick in die Abläufe während der industriell relevanten Batch-Produktionsprozesse gewonnen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Wenn nicht anders vermerkt wurden alle Chemikalien von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) und Roche (Mannheim, Deutschland) bezogen.

2.2 Bakterienstämme und Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten *Corynebacterium glutamicum* Stämme und Plasmide sind in Tab. 1 und Tab. 2 aufgeführt.

Beim ATCC 13032 handelt es sich um den *C. glutamicum* Wildtyp, während der Stamm MH20-22B, der durch Mutagenese mit *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-Nitrosoguanidin und Selektion bei Anwesenheit des Aspartat-Analogons S-(β -aminoethyl)-L-cystein (AEC) erhalten wurde, ein Lysin-Produktionsstamm ist. Die Stämme LE 4 und MH20-22B, sowie die homologe und die heterologe GLUDH-Mutante sind isogen. Der Stamm LE 4 scheidet jedoch kein Lysin aus, da er im Gegensatz zum Stamm MH20-22B die Wildtyp Aspartat-Kinase besitzt, die durch L-Lysin gehemmt wird. Die heterologe GLUDH-Mutante enthält Plasmid-kodiert die NAD abhängige Glutamat-Dehydrogenase aus *Peptostreptococcus asaccharolyticus* (Marx, 1999), während die homologe GLUDH-Mutante ebenfalls plasmid-codiert die NADP abhängige Glutamat-Dehydrogenase aus *Corynebacterium glutamicum* (Marx, 1999) enthält. Bei beiden Stämmen ist die chromosomale Glutamat-Dehydrogenase deletiert worden.

Tab. 1: In den verwendeten Stämmen vorkommende Plasmide. Abkürzungen: ^r Resistenz; ori=origin of replication; P = Promotor; lacI = lac-Repressor.

<i>Plasmid</i>		
PEKEx2	Pendel- und Expressionsvektor, Kanamycin ^r , lacI ^q , tacP, ori pBL1, ori colE1	Eikmanns et al., 1991b
PEK0	Kanamycin ^r , ori pBL1, ori colE1	Eikmanns et al., 1991b

Tab. 2 Verwendete *C. glutamicum* Stämme und deren Eigenschaften. Abkürzungen: GLUDH: Glutamat-Dehydrogenase, p: Plasmid, ^r Resistenz; Fbr: Feedback resistant, Fbs: Feedback sensitiv

	Eigenschaften	Referenz
<i>Stamm</i>		
ATCC 13032	Wildtyp, Nalidixin ^r	Abe et al., 1967
MH20-22B	Lysin-Produzent, Aspartat-Kinase (Fbr), Isopropylmalat-Dehydratase negativ	Menkel et al. 1989
LE4	Nichtausscheider, Aspartat-Kinase (Fbs), Isopropylmalat-Dehydratase negativ	Schrumpf et al. 1992
Heterologe GLUDH-Mutante	MH20-22BΔgdh pEK1.9gdh	Marx et al. 1999
Homologe GLUDH-Mutante	MH20-22BΔgdh pEKExpgdh-1	Marx et al. 1999

2.3 Stammhaltung

2.3.1 Vorkultur

Die Vorkultivierung der Zellen erfolgte in Bacto Brain Heart Infusion Medium (Difco Laboratories, Detroit, USA) für 15 h bei einer Temperatur von 30°C. Bei der homologen und heterologen GLUDH-Mutante enthielt die Vorkultur zusätzlich 20 µg/ml Kanamycin, um den Verlust der in diesen Stämmen enthaltenen Plasmide (Tab. 1) zu verhindern. Vor dem Animpfen der Hauptkultur (Tab. 3) wurden die Zellen zweimal mit Saline (0,9 % NaCl) gewaschen.

2.3.2 Hauptkultur

Die Zusammensetzung der Minimal-Medien zur Chemostat-Kultivierung der homologen und heterologen GLUDH-Mutante sowie zur Batch-Kultivierung der Stämme MH20-22B, LE 4 und ATCC13032 ist Tab. 3 zu entnehmen. Bei der Kultivierung aller Stämme wurde ein Laborfermenter (Infors AG, Bottmingen, Switzerland) verwendet. Das Kulturgefäß wurde gemäß dem Originalgefäß der Firma Infors angefertigt (Glasbläserei des Forschungszentrums Jülich), enthielt aber einen zusätzlichen Ausgang (Abb. 5), der mit einem Septum verschlossen war, um die schnelle Probennahme zur Metabolitpool-Bestimmung zu ermöglichen. Zur Kontrolle des Verlaufs der Zellkultivierung erfolgte die Aufzeichnung des pH-Wertes, des Sauerstoffpartialdrucks, der Temperatur, des Luft-Zustroms (in l/min) und der Rührgeschwindigkeit mit einem PC unter dem Betriebssystem WINDOWS (Microsoft, Redmond, WA, USA), wobei das Meßdatenerfassungsprogramm MEDUSA (A. Hartbrich, Forschungszen-

trum Jülich) verwendet wurde. Der Sauerstoffpartialdruck wurde auf einen Wert von 30 % einreguliert, um eine Sauerstoff-Limitierung der Zellen zu vermeiden. Hierzu erfolgte die *online* Messung des Sauerstoffpartialdrucks amperometrisch mit einer Pt-Ag-Elektrode (Modell 768-O₂, Ingold AG, Frankfurt). Die Kulturen wurden mit synthetischer Luft begast (20% Sauerstoff und 80 % Stickstoff), wobei die Zuluft über einen Massenstromregler (Brooks Instrument B.V., Veenendaal, Niederlande) gesteuert wurde. Der pH-Wert wurde bei allen Zell-Kultivierungen durch automatisierte Zudosierung von 5 M Natronlauge auf 7,0 einreguliert. Die Temperatur betrug in allen Fällen 30°C.

Zur Isolierung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase wurde der Wildtyp von *C. glutamicum* (ATCC 13032) aerob in 2,5 l Minimalmedium (Tab. 3) bei 30°C kultiviert. Die Zellen wurden in der späten exponentiellen Wachstumsphase geerntet, 15 min lang abzentrifugiert (6400 g und 4°C) und mit 100 mM TRIS/HCl Puffer pH 7.5, der zusätzlich 10 mM MgCl₂ enthielt, gewaschen. Die Zellen wurden dann bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

Um eine direkte Vergleichbarkeit zu den bereits durchgeführten ¹³C-Markierungs-Experimenten zu ermöglichen (Marx, 1999), wurden die homologe und die heterologe GLUDH-Mutante (Tab. 2) im Chemostaten unter Glucose-Limitierung mit einer Verdünnungsrate von 0,09 h⁻¹ kultiviert. Die Zuführung des Mediums (Tab. 3) und die Entfernung der Kulturflüssigkeit erfolgte durch peristaltische Pumpen (Watson Marlow). Die Probennahmen zur Metabolitpoolbestimmung (Abschnitt 2.16), zur Quantifizierung der spezifischen Enzymaktivitäten (Abschnitte 2.7 bis 2.10) und zur Trockengewichtsbestimmung (Abschnitt 2.5) erfolgte während der stationären Phase nach 5 Verweilzeiten.

Bei der Batch-Kultivierung der Leucin auxotrophen *C. glutamicum*-Stämme MH20-22B und LE4 enthielt das Medium nur 150 mg/l Leucin (Tab.3), welches dazu führte, daß die vorgelegte Glucose (30g/l) nach der exponentiellen Wachstumsphase bei einsetzender Leucin-Limitierung noch nicht vollständig verbraucht war. Trotz ausreichender Glucose-Versorgung sank die Wachstumsrate nach Leucin-Limitierung stark ab (Übergangsphase) bevor schließlich die stationäre Phase erreicht wurde. Das Medium (2 l Kulturvolumen) wurde mit einer hohen OD von 3,5 angeimpft, so daß bereits nach 15 h die stationäre Phase der Batch-Kultur erreicht wurde. Die Probennahmen zur Metabolitpoolbestimmung, zur Quantifizierung der spezifischen Enzymaktivitäten und zur Trockengewichtsbestimmung erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Batch-Kultivierung. Es wurde darauf geachtet, daß Proben genau zum Zeitpunkt der einsetzenden Leucin-Limitierung entnommen wurden, da in dieser kurzen Phase, im Rahmen einer 'Stringent Response' (Cashel et al., 1996), große Verände-

rungen im Stoffwechsel zu erwarten waren. Zur Bestimmung dieses Zeitpunktes wurde die CO₂-Konzentration in der Abluft genau verfolgt, wobei die *online* CO₂-Konzentrationsmessung durch Infrarotspektroskopie (BINOS 1, Leybold-Heraeus) erfolgte. Eine Plateauisierung der CO₂-Konzentration, die während der exponentiellen Wachstumsphase kontinuierlich anstieg, zeigte die einsetzende Leucin-Limitierung an.

Tab. 3: Zusammensetzung der Medien (modifiziert nach Schrupf et al, 1992) bei den durchgeführten Zell-Kultivierungen der Stämme ATCC13032, MH20-22B und LE4, sowie der homologen und heterologen GLUDH-Mutanten.

	ATCC13032	homol. und heterol. GLUDH-Mutante	MH20-22B und LE4
Substanz	Menge pro l		
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g	40g	20 g
KH ₂ PO ₄	1 g	1 g	1 g
K ₂ HPO ₄	1 g	1 g	1 g
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0.25 g	0.25 g	0,25 g
CaCl ₂	10 mg	10 mg	10 mg
Biotin	0.2 mg	0.2 mg	0,2 mg
Protocatechuat	30 mg	30 mg	30 mg
FeSO ₄ × 7 H ₂ O	1 mg	1 mg	1 mg
MnSO ₄ × H ₂ O	1 mg	1 mg	1 mg
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	0.1 mg	0.1 mg	0.1 mg
CuSO ₄	0.02 mg	0.02 mg	0.02 mg
NiCl ₂ × 6 H ₂ O	0.002 mg	0.002 mg	0.002 mg
HCl	1.2 g	1.2 g	1.2 g
Polypropylen-Glycol	0.2 g	0.2 g	0.2 g
tritriplex II	75 mg	75 mg	150 mg
Glucose	100 g	7.5 g glucose	30 g
Kanamycin monosulfat	-	20 mg	-
KCl	-	1 g	-
Leucin	-	150 mg	150 mg
IPTG	-	2.1 µg	-

2.4 Bestimmung der Biomassekonzentration

Die Biomassekonzentration während der Zell-Kultivierungen wurde photometrisch bei 600 nm ermittelt. Hierzu wurde die Zellsuspension mit Aqua dest. so weit verdünnt, daß die optische Dichte nicht größer als 0,2 war. Die optische Dichte war dann proportional zur Biomassekonzentration. Der Nullwert diente optische Dichte von reinem Wasser.

2.5 Trockengewichtsbestimmung

Zur Trockengewichtsbestimmung wurden 10 ml Kulturflüssigkeit in vorgewogenen Glasröhrchen abzentrifugiert (10 min, 3000 g, Sepatech Minifuge RF (Heraeus,Hanau)), zweimal mit 20 mM Ammoniumacetat gewaschen und anschließend für 48 h bei 110 °C getrocknet. Ammoniumacetat ist ein flüchtiges Salz und daher bei der Trockengewichtsbestimmung vorteilhaft.

2.6 Bestimmung der Glucose-, Aminosäure-, α -Isopropylmalat- und Lactat-Konzentrationen im Überstand

Die Glucose-Konzentration im Medium wurde durch einen optischen Test bestimmt (Kunst, 1984). Dabei wird Glucose zunächst durch Hexokinase unter ATP-Verbrauch phosphoryliert und anschließend in der Indikatorreaktion durch die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase oxidiert. Die durch NADPH-Bildung verursachte Extinktionszunahme bei 340 nm ist proportional zur Glucose-Konzentration.

Die Aminosäuren im Kulturüberstand wurden durch Reversed-Phase-HPLC nachgewiesen (Lindroth & Mopper, 1979; Jones & Gilligan, 1983). Dabei wurden 2,5 μ l der Probe mit ortho-Phthaldialdehyd automatisch mit der Computer-gesteuerten Anlage HP 1090 A (Agilent Technologies, Waldbronn) derivatisiert und anschließend mit einer ODS 5 C-18-Kieselgel-Säule (Chromatographie-Service, Langerwehe) getrennt. Es wurde ein Elutionsgradient zwischen 0,1 M NaAcetat pH 7,2 und Methanol bei 40 °C und einem Fluß von 0,6 ml/min verwendet. Die Fluoreszenz-Detektion bei 436 nm erfolgte nach Anregung bei 243 nm.

Die Bestimmung von α -Isopropylmalat und Lactat im Überstand erfolgte mit einem AMX 400-WB Spektrometer (Bruker Analytik GmbH, Karlsruhe). Hierzu 100 μ l Überstand in 600 μ l 2 mM Natrium-3-Trimethylsilyl-[2, 2', 3, 3'-D₄]Propionat (Aldrich Chemicals, Milwaukee, WI, USA; gelöst in D₂O) aufgenommen (Sonntag et al. 1993) und in 5 mm NMR-Röhrchen

(Norell, Mays Landing, NJ, USA) umgefüllt. Für alle ^1H -NMR-Messungen wurde ein inverser 5 mm GRASP-Probenkopf (Bruker, Karlsruhe) verwendet und folgende Meßparameter gewählt: 15 s Relaxationszeit, 2 s Wasser-Unterdrückungspuls, 9 μs 90° Transmitter-Puls, 6 kHz Spektralweite, 32 k Fourier Datentransformation und 64 akkumulierte Einzelmessungen.

2.7 Zellaufschlußverfahren

Zur Isolierung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase erfolgte der Zellaufschluß in einer Kugelmühle (Disintegrator S, BIOMATIC, Rodgau-Hainhausen, Deutschland). Zuvor wurden die Zellen in einem TRIS/HCl-Puffer 100 mM pH 7,5 mit 10 mM MgCl_2 , 0.75 mM DTT und dem Protease Inhibitor Gemisch Complete (Roche, Mannheim, Deutschland) resuspendiert. Das Verhältnis des Zellfeuchtgewichts zum gesamten Suspensionsvolumen wurde auf 0,3 eingestellt. Nach Zusatz von 100 cm^3 Glasperlen mit einem Durchmesser zwischen 0,1 und 0,25 mm (Fisher scientific, Düsseldorf, Germany) pro 100 ml Zellsuspension wurde der Zellaufschluß 12 min lang (Ringrührer) bzw. 6 min lang (PVDF-Zylinderrührer) bei einer Drehzahl von 5000 rpm durchgeführt (Abb.2). Nach Entfernung der Glas-Perlen folgte ein Ultrazentrifugations-Schritt (235,000 g, 90 min, 4°C). Der Überstand wurde dann als Rohextrakt für die Reinigung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase eingesetzt.

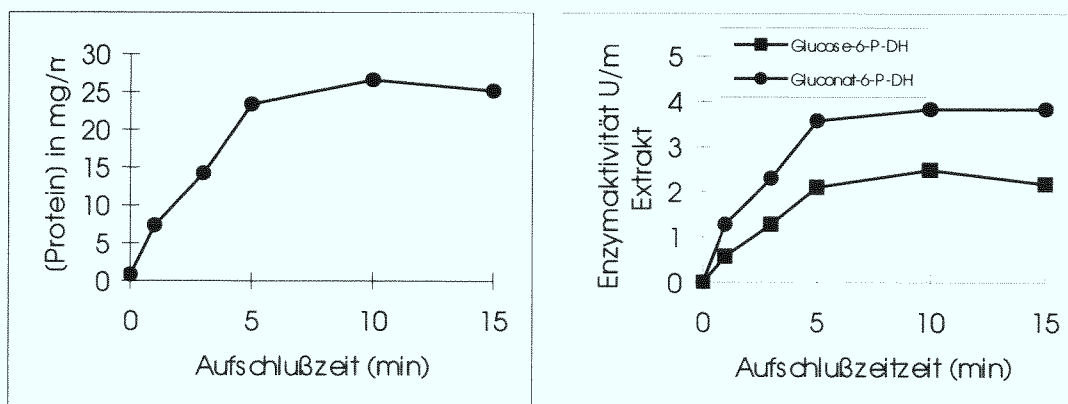


Abb.2: Optimierung des Zellaufschlusses von *C. glutamicum* in einem Disintegrator S der Firma BIOMATIC mit einem PVDF-Zylinderrührer bei einer Drehzahl von 5000 rpm. Nach 5 min war der Zellaufschluß vollständig. Die Proteinaktivität wurde durch den Aufschluß nicht beeinträchtigt.

Zur Bestimmung der spezifischen Enzym-Aktivitäten während der durchgeführten Zell-Kultivierungen (Abschnitt 2.3) erfolgte ein 5 minütiger Zellaufschluß durch Ultraschall (UP 200S,

Dr. Hilscher, Teltow, Germany). Zuvor wurden die Zellen sedimentiert (4000 g, 4°C) und in 50 mM Tris/HCl pH 7,5 mit 0,2 M KaliumGlutamat resuspendiert (OD≈200).

2.8 Bestimmung der spezifischen Aktivitäten der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase

Das Assay-System zur Bestimmung der spezifischen Glucose-6-phosphat und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase-Aktivitäten im Rohextrakt enthielt 50 mM TRIS/HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1mM NADP und 200 mM KaliumGlutamat. KaliumGlutamat dient dazu die intrazelluläre Umgebung in *C. glutamicum* zu simulieren, da Glutamat-Konzentrationen in dieser Größenordnung festgestellt werden konnten (Guillouet & Engasser, 1996 und Börmann-El Kholy et al., 1993). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 mM Glucose-6-phosphat bzw. 1 mM 6-Phosphogluconat gestartet. Alle Messungen wurden bei 30 °C durchgeführt.

2.9 Bestimmung der spezifischen Aktivität der Glutamat-Dehydrogenase.

Die Bestimmung wurde gemäß einer modifizierten Methode von Meers (Meers, 1970) durchgeführt. Das Assay-Gemisch enthielt 200 mM TRIS/HCl pH 8.0, 20 mM NH₄Cl, 2.7 mM NAD(P)H und 10 mM α-Ketoglutarat. Die Abnahme der NAD(P)H-Konzentration wurde bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen.

2.10 Bestimmung der Protein-Konzentrationen

Die Protein-Konzentrationen von Rohextrakten wurde spektrophotometrisch durch Coomassie Brilliant Blau-Färbung bestimmt (Stoscheck, 1990), wobei Bovine Serum Albumin als Protein-Standard verwendet wurde. Ein Liter des Reaktionsgemisches enthielt 40 mg Coomassie Brilliant Blau, 50 ml absoluten Ethanol und 100 ml 85 %ige Phosphorsäure. Zu 5 ml Reaktionsgemisch wurden bis zu 100 µl Protein-Lösung hinzugefügt. Die Messungen erfolgten in einem Küvettenphotometer (UV-160A Photometer, Shimadzu, Kyoto, Japan).

2.11 Isolierung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase

Alle Anreicherungsschritte zur Isolierung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase von *C. glutamicum* wurden mit einem Biosys2000 HPLC-System durchgeführt (Beckman, Fullerton, USA). Nach jedem Schritt wurden in jeder Fraktion die Aktivitäten der beiden Enzyme nach der im Abschnitt 2.8 beschriebenen Methode durchgeführt, wobei ein Mikrotiter-Plattenphotometer (Spectramax 190 Plus, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) verwendet wurde.

2.11.1 Anionenaustauschchromatographie

500 ml Rohextrakt wurden zunächst auf eine XK 50/30 Säule (Pharmacia, Freiburg, Germany) aufgetragen, die mit dem Anionenaustauschermaterial Fractogel EMD DEAE-650(S) (Merck, Darmstadt) gefüllt war, wobei das Bedvolumen 500 ml betrug. Die Säule war zuvor mit Niedrigsalzpuffer (30 mM MgCl₂ 0.75 mM DTT und 50 mM TRIS/HCl pH 7.5) äquilibriert worden. Um Fremdproteine zu eluieren, wurde die Säule nach Auftragung des Rohextraktes mit einem Säulenvolumen des gleichen Puffers, der zusätzlich 144 mM KCl enthielt, gewaschen. Dabei blieben sowohl die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, als auch die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase vollständig am Säulenmaterial gebunden. Die Elution der beiden Enzyme erfolgte dann durch einen linearen Salzgradienten, wobei die KCl-Konzentration in einem Zeitraum von 95 min von 144 mM auf 320 mM erhöht wurde. Die Flußrate betrug 7.4 ml/min. Die aktiven Fraktionen wurden danach gepoolt und durch Ultrafiltration ankonzentriert (Centriprep 30 Concentrators, Amicon, Beverly, USA). Durch nachfolgende Verdünnung mit Niedrigsalzpuffer (siehe oben) konnte die KCl-Konzentration auf 40 mM reduziert werden, welches wichtig war, um eine vollständige Bindung des Proteins im nachfolgenden Anreicherungsschritt durch Procion Rot-Sepharose zu ermöglichen.

2.11.2 Farbstoff-Affinitätschromatographie

Zur weiteren Anreicherung der beiden Proteine wurde der an Sepharose gebundene Farbstoff Procion Rot verwendet (Abb. 3), der eine hohe Affinität zu Enzymen hat, die NADP als Kofaktor benötigen. Es wird angenommen, daß sich dieser Farbstoff im Bereich der NADP-Bindestelle an die Enzyme anlagert und somit deren selektive Retention in der Säule bewirkt (Watson, 1978 und Jessup & Dean, 1981). Die vergleichsweise hohe Proteinbindekapazität

ermöglicht den Einsatz bereits bei hoch konzentrierten Proteinlösungen mit geringem Anreicherungsgrad.

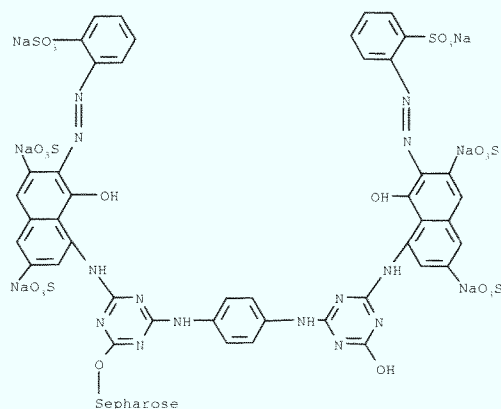


Abb.3: Strukturformel des an Sepharose gebundenen Farbstoffs Procion-Rot.

Die partiell aufgereinigte Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase wurden nun getrennt weiter bearbeitet, wobei eine XK26/20 Säule (Pharmacia, Freiburg, Germany) verwendet wurde, die mit 65 ml Red Sepharose CL6B Gel (Pharmacia, Freiburg, Germany) gefüllt war. Die Säule wurde zuvor mit Niedrigsalzpuffer (Abschnitt 2.11.1) äquilibriert. Die Elution erfolgte durch einen 590 minütigen linearen KCl-Gradienten von 0 bis 800 mM, wobei die Flußrate diesmal 0,87 ml/min betrug. Nach dem Poolen der aktiven Fraktionen wurde die KCl-Konzentration wie bereits beschrieben (Abschnitt 2.11.1) auf 10 mM reduziert, um eine vollständige Bindung an die beim dritten Aufreinigungsschritt eingesetzte 2'5'-ADP-Sepharose zu gewährleisten.

2.11.3 2'5'-ADP-Sepharose Liganden-Affinitäts-Chromatographie

Die 2'5'-ADP-Ankergruppe (Abb. 4) stellt einen Teil der NADP-Struktur dar und eignet sich daher in besonderem Maße zur Aufreinigung NADP-bindender Enzyme (Brodelius, 1974). Allerdings ist die Proteinbindekazapazität gering, weshalb dieses Verfahren nach der Procion-Rot Farbstoff-Affinitäts-Chromatographie als dritter Aufreinigungsschritt zum Einsatz kam.

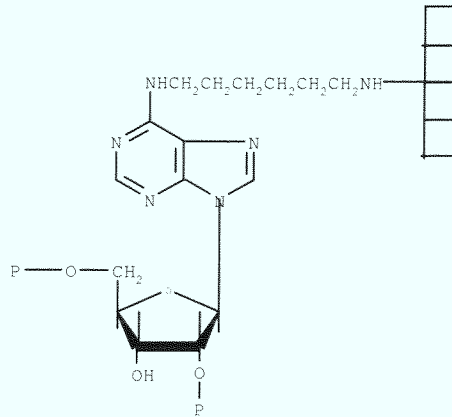


Abb.4: Strukturformel von 2'5'-ADP-Sepharose.

Die eingesetzte 2'5'-ADP Sepharose Matrix (Pharmacia, Freiburg, Germany), deren Bettvolumen 20 ml betrug, befand sich in einer XK16/20 Säule (Pharmacia, Freiburg, Germany), die vorab mit dem üblichen Niedrigsalzpuffer (Abschnitt 2.11.1) äquilibriert worden war. Die Elution erfolgte diesmal mit einem linearen NADP-Gradienten, wobei die NADP-Konzentration zwischen 0 und 2 mM variiert wurde. Die vollständige Abtrennung des NADP erfolgte durch wiederholte Ultrafiltrationsschritte (Centriprep 30 Concentrators, Amicon, Beverly, USA) und durch Verdünnungsschritte mit Niedrigsalzpuffer. Die nun vollständig aufgereinigte 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase wurde nach Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff bei -70°C gelagert.

2.11.4 Gelfiltrationschromatographie der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase

Im Falle der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase wurde eine Gelfiltrationschromatographie als vierter Aufreinigungsschritt durchgeführt. Hierbei wurde eine Superdex G200pg Säule (Pharmacia, Freiburg, Germany) mit einem Durchmesser von 1.6 cm und einem Bettvolumen von 114 ml verwendet. Die Elution erfolgte in diesem Fall durch den bereits beschriebenen Niedrigsalzpuffer (Abschnitt 2.11.1), der zusätzlich 200 mM KCl enthielt, um eine Adsorption des Proteins an die Gelfiltrationsmatrix zu verhindern. Die aktiven Fraktionen wurden gepoolt und in Centriprep 30 Concentratoren (Amicon, Beverly, USA) ankonzentriert. Die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase war sehr viel instabiler als die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase und zeigte nach Schockgefrierung und sofortigem schnellen Auftauen bereits einen 50 %igen Aktivitätsverlust. Deshalb wurde die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase anders als die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase nach Zusatz von 50 % (v/v) Glycerin bei -20°C gelagert.

2.12 SDS-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Reinheit der Proteine wurde eine denaturierende diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt (Laemmli, 1970). Das Trenngel enthielt 10 % Polyacrylamid und 0,375 M TRIS-HCl pH 8,8, während das Sammelgel 4 % Polyacrylamid und 0,125 M TRIS-HCl pH 6,8 enthielt. Als Laufpuffer diente 0,25 M TRIS pH 8,3 mit 1,86 M Glycin und 35 mM SDS. Die Polymerisation wurde durch Zusatz von N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin und Ammonium-peroxo-disulfat eingeleitet. Die Anfärbung der Gele erfolgte durch Coomassie Brilliant Blau Färbung (Neuhoff, 1985).

2.13 N-terminale Sequenzierung und MALDI-Analyse

Die N-terminale Sequenzierung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase wurde gemäß dem Verfahren von Edman (Edman, P. & Begg, G., 1967) durchgeführt, wobei ein Procise Protein Sequenzierungs - System (Applied Biosystems, Foster City, USA) verwendet wurde. Für die MALDI-MS Analyse wurde die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase tryptisch verdaut und die Peptidmassen mit einem MALDI-TOF Reflex III (Bruker Daltronik, Bremen) bestimmt.

2.14 Native Gelelektrophorese der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase

Die native gelelektrophoretische Auftrennung des Rohextraktes von *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde gemäß der Methode von McLellan (McLellan, 1982) in einem HEPES/Imidazol-gepufferten Gel (43 mM Imidazol und 35 mM HEPES) bei einem pH-Wert von 7.4 durchgeführt. Nach der Auftrennung wurde das Gel für 3 min im Glucose-6-phosphat Assay-Gemisch aufbewahrt (Abschnitt 2.8). Da unter diesen Bedingungen bei Anwesenheit der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase das fluoreszierende Reaktionsprodukt NADPH entsteht, konnte das Enzym bei Bestrahlung des Gels mit Licht der Wellenlänge von 366 nm sichtbar gemacht werden.

2.15 Kinetische Charakterisierung der Glucose-6-phosphat und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase.

Das Assay-Gemisch war mit 50 mM TES-HCl, pH 7.5 gepuffert und enthielt unterschiedliche Konzentrationen von NADP, 6-Phosphogluconat und Glucose-6-phosphat. Wenn nicht an-

ders beschrieben, wurden alle Enzym-Aktivitäten bei Anwesenheit von 10 mM MgCl_2 und 200 mM KaliumGlutamat bestimmt. KaliumGlutamat dient dazu die intrazelluläre Umgebung in *C. glutamicum* zu simulieren, da Glutamat-Konzentrationen in dieser Größenordnung festgestellt werden konnten (Guillouet & Engasser, 1996 und Börmann-El Kholy et al., 1993). Die Untersuchungen wurden in einem Mikrotiter-Plattenphotometer (Spectramax 190 Plus, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt, wobei die Temperatur in allen Fällen 30°C betrug.

Da bei graphischen Auswertemethoden wie Lineweaver-Burk oder Hanes Plots nicht alle ermittelten Meßwerte gleichermaßen gewichtet werden und somit bei der Bestimmung von Michaelis-Konstanten, Dissoziationskonstanten und Hemmkonstanten Fehler auftreten können, erfolgt die weitere Auswertung nicht durch Sekundär-Plots (Segel, 1975), sondern durch nichtlineare Regression mit Hilfe des Programms Scientist (Version 2.0, Micro Math Scientific Software, Salt Lake City, USA).

2.16 Schnelle Abstopfung des Stoffwechsels durch Methanol-Quenching und Zellextraktionen zur Metabolitpool-Quantifizierung

2.16.1 Methanol-Quenching

Da die 'Turnover'-Raten für Stoffwechselmetabolite sich im ms-Bereich bewegen (de Koning und van Dam, 1992), muß der Metabolismus möglichst schnell abgestoppt werden. Deshalb wurden ungefähr 3 ml Zellkultur (30 °C) in einer Spritze aufgenommen, die bereits vorgekühltes 60 %iges (v/v) Methanol (−58°C) enthielt (de Koning und van Dam, 1992 und Schäfer et al. 1999). Die Endtemperatur bei dieser Verfahrensweise betrug −20 °C. Das genaue Zellkulturvolumen wurde durch Gewichtsmessung bestimmt. Um die niedrige Temperatur im Zeitraum zwischen der Probennahme und der nachfolgenden Zentrifugation zu halten, wurden die Proben in speziell angefertigten vorgekühlten Aluminiumblöcken transportiert, die speziell an 50 ml Falcon-Tubes angepaßte Bohrungen enthielten. Nach der Zentrifugation in einer Kühlzentrifuge (Avanti TM 30, Beckman, München, Deutschland) bei −20°C (5 min, 10000 rpm) erfolgte die Extraktion der Zellsedimente durch Perchlorsäure oder ethanolische Kalilauge.

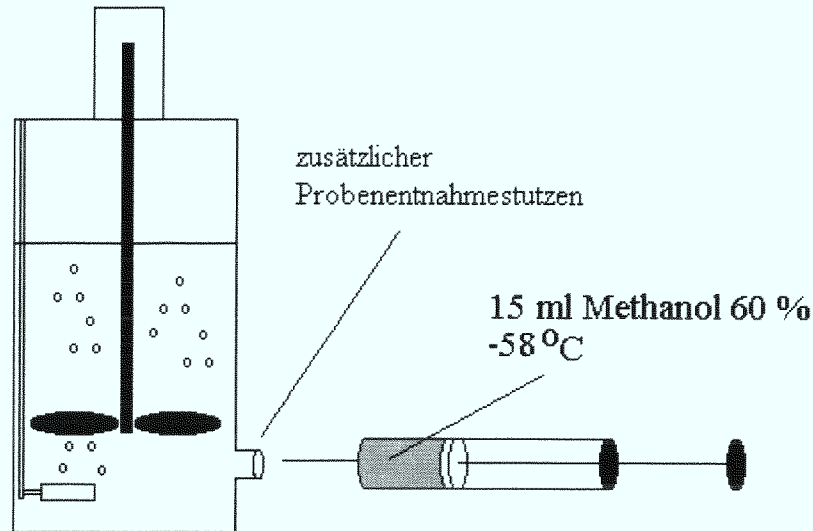


Abb.5: Kulturgefäß mit einem durch ein Septum verschlossenen Probenentnahmestutzen. Die schnelle Abstopfung des Stoffwechsels von *C. glutamicum* erfolgte durch -58°C kaltes 60 %iges Methanol, welches in einer Spritze mit Kanüle vorgelegt wurde.

Im Falle von *Lactococcus lactis* laufen die Zellen bei dieser Methanol-Behandlung teilweise aus (Jensen et al., 1999), welches zu falschen Resultaten bei der Metabolitpool-Bestimmung führen würde. Um die Stabilität von *C. glutamicum* während der Methanol-Behandlung zu untersuchen, wurden die Zellen unterschiedlich lange in 60 %igem Methanol bei -20°C aufbewahrt. Nach anschließender Zentrifugation bei -20°C und Aufschluß durch 35 %ige Perchlorsäure (Abschnitt 2.16.2), konnte durch Metabolitpool-Analyse festgestellt werden, daß die ermittelbaren intrazellulären Konzentrationen von Glucose-6-phosphat und Fructose-1,6-bisphosphat auch nach 46 min nicht abnahmen (Tab. 4). Daraus wurde geschlossen, daß die Zellen während der Methanol-Behandlung stabil bleiben, so daß dieses Verfahren im Falle von *C. glutamicum* für das Quenching des Stoffwechsels eingesetzt werden kann.

Tab.4: Ermitteltbare intrazelluläre Konzentrationen von Fructose-1,6-bisphosphat und Glucose-6-phosphat nach unterschiedlich langer Aufbewahrung in -20°C kaltem 60%igem Methanol.

Zeit in 60%igem Methanol	Fructose-1,6-P ₂	Glucose-6-P
(min)	intrazelluläre Konzentration (mM)	
12	1498	1080
22	1316	962
29	1456	1007
38	1463	1049
46	1374	967

2.16.2 Perchlorsäure-Extraktion

Die nach Methanol-Quenching erhaltenen Zell-Sedimente wurden durch Zugabe von 2 ml Perchlorsäure 35 % (w/v) (Schäfer et al., 1999) und durch nachfolgende 10 minütige Behandlung im Ultraschallbad (2200 sonifier, Branson Ultrasonics, Danbury, USA) extrahiert (Hermann & Krämer, 1996). Zelltrümmer wurden danach durch 30 minütige Zentrifugation bei 41000 g entfernt. Die Neutralisation des Zellextraktes erfolgte durch langsame Zugabe von ca. 900 µl 5 M K_2CO_3 Lösung (Schäfer et al., 1999). Dabei verhinderte das Entweichen von CO_2 eine Erwärmung des Extraktes. Das ausgefallene KaliumPerchlorat wurde durch Zentrifugation abgetrennt (5000g, 10 min). Der Extrakt wurde nach Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff bei $-70^\circ C$ bis zur Analyse gelagert. Die Stabilität aller in diesen Extrakten quantifizierten Metaboliten wurde durch interne Standardisierung überprüft.

2.16.3 Spezielle Extraktions-Verfahren zur Quantifizierung von NADP und NADPH

Zur Quantifizierung der intrazellulären Nicotinamid-Adenin-Dinucleotide (NADP und NADPH) wurde das enzymatische Analyseverfahren von Bernofsky & Swan (Abschnitt 2.17.1) verwendet (Bernofsky & Swan, 1973). Da bei diesem Verfahren jedoch nicht zwischen NADP und NADPH unterschieden werden kann, mußte bei der notwendigen Zellextraktion vermieden werden, daß diese beiden Metabolite gleichzeitig erhalten bleiben. Dies wurde durch zwei getrennte Extraktionen (Gutmann, 1992a & Theobald, 1997) erreicht. Bei saurer Extraktion mit Perchlorsäure (pH 1.0; 7 min, $55^\circ C$) bleibt NADP stabil, während NADPH vollständig zerstört wird (Tab. 5) (Lowry et al., 1961 & Kaplan et al. 1951); bei alkalischer Extraktion in ethanolischer Kalilauge (25% v/v Ethanol, pH 12.4; 3 min, $55^\circ C$) bleibt NADPH stabil und NADP wird vollständig zerstört (Tab. 6). Zur Stabilisierung des pH-Wertes während der alkalischen Extraktion wurden 500 mM Kaliumphosphat (pH 12.4) zugesetzt, da das K_3HPO_4/K_3PO_4 -Puffersystem einen pK_S -Wert von 12,325 hat (Holleman & Wiberg, 1985). Bei der alkalischen Extraktion konnte gezeigt werden, daß die Temperaturbehandlung 3min nicht überschreiten darf, um eine ausreichende Stabilität von NADH und NADPH zu gewährleisten. Die Zellextraktion erfolgt unmittelbar und ist daher unabhängig von der Dauer der Temperaturbehandlung (Abb. 6). Um jedoch die vollständige Zerstörung von NAD und NADP sicherzustellen, mußte der Zeitrahmen von 3min voll ausgeschöpft werden.

Die in den Tabellen 5 u. 6 dargestellten Stabilitätsuntersuchungen wurden bei allen in dieser Arbeit durchgeführten Extraktionen zur Quantifizierung von NADP und NADPH vorgenommen.

Um den Stoffwechsel hinreichen schnell zu stoppen, wurden entweder metanolgequenchte Zellsedimente in den vorgewärmten, nach obigen Bedingungen zusammengesetzten Extraktionsflüssigkeiten resuspendiert (Batch-Kulturen der Stämme LE4 und MH20-22B), oder die jeweils vorgewärmten Extraktionsflüssigkeiten in einer Spritze vorgelegt, in die dann eine bestimmte Menge Zellsuspension direkt aus dem Fermenter hineingesogen wurde (Chemo-stat-Kulturen der homologen und heterologen GLUDH-Mutante).

Tab.5: Die Standardzugabe erfolgte vor 7 minütiger Inkubation bei 55°C in Perchlorsäure. Da die oxidierten Dinucleotide stabil bleiben, während die reduzierten Dinucleotide vollständig zerstört werden, liegt die Wiederfindungsrate bei ca. 50 %. Die Konzentrationen der reduzierten und oxidierten Dinucleotiden waren gleich groß.

	NAD			NADP		
	Gesamt-Konzentration	Konzentrationsvergrößerung durch den Standard	Gemessene Konzentrationsvergrößerung	Gesamt-Konzentration	Konzentrationsvergrößerung durch den Standard	Gemessene Konzentrationsvergrößerung
	µM					
Zellextrakt	0,156	-		0,0415		
Zellextrakt + Std NAD(P)	0,215	+ 0,057	+0,059	0,102	+0,057	+0,0608
Zellextrakt + Std NAD(P)/NAD(P)H	0,222	+ 0,114	+0,058	0,104	+0,114	+0,059

Tab.6: Zellextrakte sind mit jeweils 2,46 µM Dinucleotidstandard versetzt worden und anschließend 0-7 min in ethanolischem KOH pH 12,5 bei 55 °C inkubiert worden. Man erkennt, daß die oxidierten Dinucleotide (NAD und NADP) während der alkalischen Extraktion vollständig zerstört werden, während die reduzierten Dinucleotide (NADH und NADPH) stabil bleiben.

Inkubationszeit	+Std. NADH 2,46 µM		+Std NAD/NADH jew. 2,46 µM		+Std. NADPH 2,46 µM		+Std NADPH/NADP jew. 2,46 µM	
	[Std] / µM	% von erwar- teter Konz	[Std] / µM	% von erwar- teter Konz	[Std] / µM	% von erwar- teter Konz	[Std] / µM	% von erwar- teter Konz
1 min	2,41	98	2,41	49	2,75	112	2,55	52
3 min	2,2	89	2,29	46	2,5	102	2,6	53
5 min	2,08	85	2,47	50	2,5	102	2,45	50
7 min	2,05	83	2,25	45	2,5	102	2,3	47

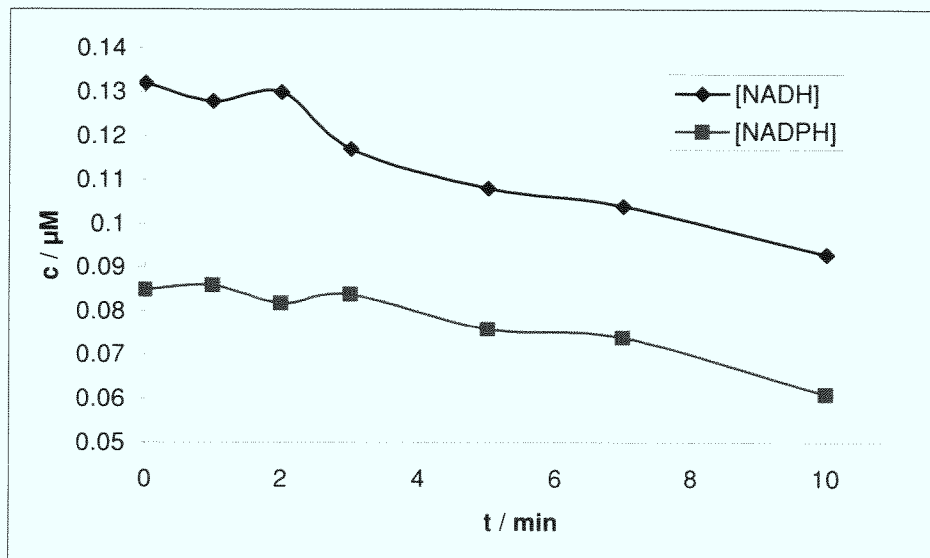


Abb. 6: Unterschiedlich lange Extraktion von *C. glutamicum* in ethanolischer KOH bei 55 °C. Auftragung der Konzentrationen von NADH und NADPH im Zellextrakt gegen die Inkubationszeit bei 55 °C. Man erkennt, daß die Inkubationszeit nicht länger als 2 bis 3 min sein sollte, um eine ausreichende Stabilität zu gewährleisten. Der Aufschluß der Zellen ist bereits nach kurzer Extraktion bei 55 °C vollständig.

2.17 Bestimmung intrazellulärer Metabolit-Konzentrationen.

Die intrazellulären Konzentrationen wurden auf Basis des Zell-Trockengewichtes und des Verdünnungsfaktors während der Zell-Extraktion berechnet. Für das intrazelluläre Volumen von *C. glutamicum* wurde dabei ein Wert von 2 $\mu\text{l}/\text{mg}$ Trockengewicht verwendet (Gutmann et al., 1992b).

2.17.1 Quantifizierung von NADP und NADPH in Zellextrakten von *Corynebacterium glutamicum*.

Die Konzentrationen von NADP und NADPH wurden durch das 'enzymatic cycling'-Verfahren von Bernofsky and Swan bestimmt (Bernofsky, C. & Swan, M., 1973).

Durch die Glucose-6-P-Dehydrogenase wird zunächst Glucose-6-P zu Gluconat-6-P oxidiert, wodurch NADPH erzeugt wird. Durch das Oxidationsmittel Phenazinium Ethosulfat (PES) wird NADPH dann unter PESH_2 -Bildung reoxidiert. Das gebildete PESH_2 führt nun zur Bildung eines Formazans, welches photometrisch bei 570 nm nachgewiesen werden kann. Die Extinktionszunahme-Geschwindigkeit durch Formazan-Bildung ist dabei proportional zur

NADP(H)-Konzentration. Wegen der cyclischen Struktur des Assays werden die Dinucleotide nicht verbraucht, sondern wiederholt oxidiert und reduziert. Hierdurch kann eine hohe Sensitivität erzielt werden, so daß Konzentrationen ab 0,1 µM bequem gemessen werden können. Ein Nachteil liegt jedoch darin, daß zwischen reduzierten und oxidierten Dinucleotiden nicht unterschieden werden kann. Im Falle einer vollständigen Zerstörung der reduzierten Dinucleotide bei saurer Zell-Extraktion und einer vollständigen Zerstörung der oxidierten Dinucleotide bei alkalischer Zellextraktion (Abschnitt 2.16.3) können jedoch trotzdem die oxidierten und reduzierten Dinucleotide durch dieses Verfahren getrennt quantifiziert werden.

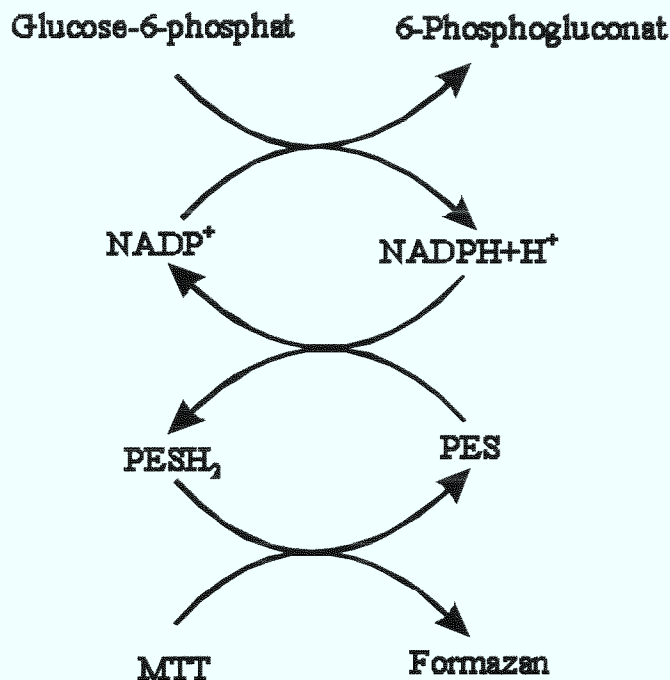


Abb.7: Schema zum Ablauf des enzymatischen Assays zur Quantifizierung der Nicotinamid-Adenin-Dinucleotide. Glucose-6-P wird durch die Glucose-6-P-Dehydrogenase zu 6-Phosphogluconat umgesetzt. Das sich bildende Formazan kann bei 570 nm gemessen werden. Abkürzungen: Phenazine-Ethosulfat (PES); 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide oder Thiazolyl blue (MTT).

2.17.2 Quantifizierung von AMP, ADP und ATP

AMP, ADP und ATP wurden durch Reversed Phase HPLC quantifiziert. Dabei wurde die Computer-gesteuerte Anlage HP 1090 A (Agilent Technologies, Waldbronn) verwendet. Es kamen zwei unterschiedliche Verfahren zum Einsatz.

Bei den Bestimmungen im Zusammenhang mit der homologen und heterologen GLUDH-Muante erfolgte die Elution durch einen kombinierten Acetonitril-Salz Gradienten (Müller et al., 1996), wobei das folgende Puffersystem verwendet wurde:

<i>Puffer A:</i>	20 mM KH ₂ PO ₄ pH 5,2	<i>Puffer B:</i>	200 mM KH ₂ PO ₄ pH 5,2
	2, 5 % Acetonitril		10 % Acetonitril
	5 mM TBAHS (Tetrabutyl- ammoniumhydrogensulfat)		5 mM TBAHS

Die Elution erfolgte bei einer Flußrate von 1 ml/min über einen Zeitraum von 67 min durch kontinuierliche Erhöhung des Anteils von Puffer B: 0-50 % B in 30 min, 50-80 % B in 36 min und 80 % B – 100 % B in 1 min. Als Säule wurde eine Nucleosil 100-5 C18-Säule (250×3 mm I.D.) (Chromatographie-Service, Langerwehe) verwendet. Das Injektionsvolumen betrug 10-25 µl.

Bei den Batch-Fermentationen der Stämme MH20-22B und LE4 wurde die Analyse gemäß einem modifizierten Verfahren nach Folley (Folley et al., 1983 und Meyer et al., 1999) durchgeführt, wobei die Elution über einen Zeitraum von 30 min isokratisch durch einen Phosphorsäure-TEA-Puffer erfolgte, der pro Liter 2,04 ml konzentrierte Phosphorsäure (85 % w/v) und 10 ml 0,5 M MgSO₄ enthielt. Der pH-Wert wurde mit ca. 5,5 ml Triethylamin auf einen Wert von 6,5 eingestellt. Die Flußrate betrug 1,5 ml/min. Als Säule wurde eine Hypersil 100-5 C18 ODS 5U-Säule (125×8×4 mm I.D.) (Chromatographie-Service, Langerwehe) verwendet. Das Injektionsvolumen betrug 10 µl.

2.17.3 Quantifizierung von Glucose-6-P, Gluconat-6-P, Fructose-1,6-P₂, D-Glycerinaldehyd-3-P, Xylulose-5-P und Ribulose-5-P

Die Quantifizierung von Glucose-6-P, Gluconat-6-P, Fructose-1,6-P₂, D-Glycerinaldehyd-3-P, Dihydroxyacetonphosphat, Xylulose-5-P und Ribulose-5-P wurde mit einem Spectramax 190 Plus Mikrotiter-Plattenphotometer durchgeführt (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), wobei die im Bergmeyer beschriebenen Methoden (Bergmeyer, 1984) in modifizierter Form zum Einsatz kamen. Die Quantifizierung erfolgte durch Messung der Extinktionsveränderungen bei 340 nm, die entweder durch eine NADH-Konzentrationsabnahme (Dihydroxyacetonphosphat, D-Glycerinaldehyd-3-phosphat und Fruktose-1,6-bisphosphat), eine NADH-Konzentrationszunahme (Ribulose-5-phosphat und Xylulose-5-phosphat) bzw. durch eine NADPH-Konzentrationszunahme (Glucose-6-phosphat und 6-Phosphogluconat) verursacht werden.

Im Falle von 6-Phosphogluconat und Glucose-6-phosphat enthielt das Assay-Gemisch neben 125 µl Zellextrakt 125 µl TEA Puffer (0,4 M, pH 7,6), 5 µl MgCl₂ (250 mM); 5 µl NAD (25 mM) und 10 µl 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (12 U/ml) bzw. 10 µl Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (10 U/ml).

Das Assay-Gemisch zur Quantifizierung von D-Glycerinaldehyd-3-phosphat, Dihydroxyacetonphosphat und Fructose-1,6-bisphosphat enthielt neben 125 µl Zellextrakt 125 µl Puffer (0,5 M TEA, pH 7,6 mit 5 mM EDTA), 10 µl NADH (7 mM), 10 µl Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (3 U/ml), 10 µl Triosephosphat-Dehydrogenase (200 U/ml) und Aldolase (6 U/ml). Die Reaktion wurde bei D-Glycerinaldehyd-3-phosphat durch Zugabe von Triosephosphat-Isomerase und bei Fructose-1,6-bisphosphat durch Zugabe von Aldolase gestartet.

Als Standard wurde neben Fructose-1,6-bisphosphat und Dihydroxyacetonphosphat D-Glycerinaldehyd-3-P verwendet. D-Glycerinaldehyd-3-P war jedoch nur als DL-Racemat käuflich zu erwerben (Sigma, Deutschland). Daher wurde D-Glycerinaldehyd-3-phosphat diethylacetal (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) als Ausgangssubstanz verwendet und durch saure Hydrolyse in D-Glycerinaldehyd-3-phosphat überführt. 50 mg des Dicyclohexylammonium Salzes von D-Glycerinaldehyd-3-phosphat diethylacetal wurden hierzu zunächst in 10 ml Wasser gelöst und der pH-Wert auf 2,0 eingestellt. Nach 15 stündiger Hydrolyse bei 37°C wurde der pH-Wert auf 5,0 eingestellt und die Lösung bei -20°C gelagert.

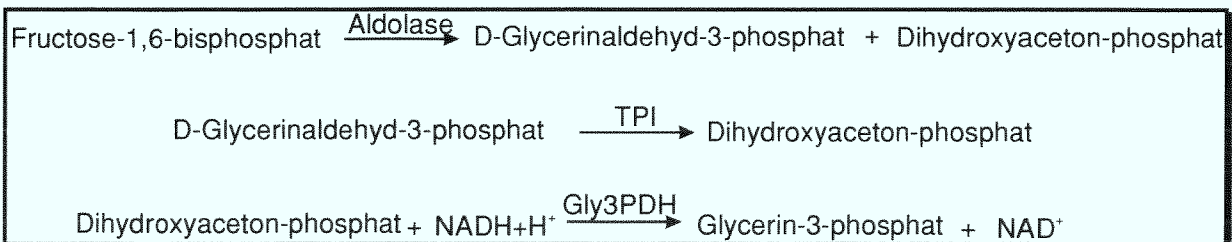


Abb.8: Assay-System zur Quantifizierung von D-Glycerinaldehyd-3-phosphat, Dihydroxyacetonphosphat und Fructose-1,6-bisphosphat. Abkürzungen: TPI: Triosephosphat-isomerase; Gly3PDH: Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase

Ribulose-5-phosphat und Xylulose-5-phosphat wurden in einem Assay-System quantifiziert, welches Glycylglycin-Puffer (25 mM, pH 7,4); MgCl₂ (6 mM); Thiamine-Pyrophosphat (220 µM); Natrium-Arsenat (4.5 mM); NAD (3 mM); Glycolaldehyd (1mM); Glycerinaldehyd 3-phosphat-Dehydrogenase (12.8 U/ml); Transketolase (0.32 U/ml) und Ribulose 5-phosphat-3-epimerase (2 U/ml) enthielt. die Reaktion wurde bei Xylulose-5-phosphat durch Zugabe

von Transketolase und bei Ribulose-5-phosphat durch Zugabe von Ribulose-5-phosphat-3-epimerase gestartet.

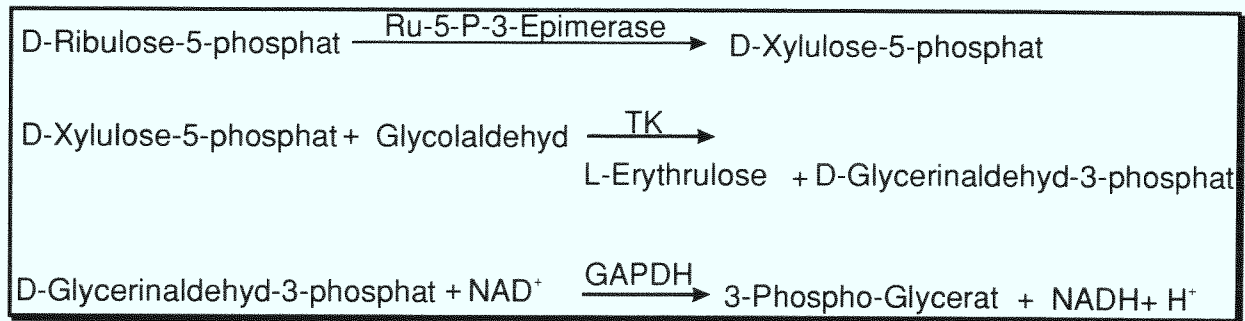


Abb. 9: Assay-System zur Quantifizierung von Ribulose-5-phosphat und Xylulose-5-phosphat in Zellextrakten; die Extinktionszunahme bei 340 nm wird durch die Bildung von NADH verursacht und ist der Xylulose-5-phosphat bzw. Ribulose-5-phosphat Konzentration im Zellextrakt proportional.

2.13 Berechnung der *in vivo*-Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase

Zum Vergleich mit den ^{13}C -Stofffluß-Daten der homologen und heterologen GLUDH-Mutante (Marx, 1999) mußte die auf mg lösliches Protein und Minuten bezogene spezifische Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase auf das Trockengewicht bezogen werden. Für den Anteil des durch Ultraschallaufschluß freigesetzten Proteins am gesamten Trockengewicht wurde ein Wert von 30 % ermittelt, so daß die spezifischen Aktivitäten mit einem Faktor von 0,3 multipliziert werden mußten, um sie auf das Trockengewicht zu beziehen. Die Proteinkonzentrationsmessung erfolgte dabei durch Coomassie Brilliant Blau-Färbung (Bradford, 1976) mit BSA als Protein-Standard (Abschnitt 2.10). Den für *C. glutamicum* typischen Proteinanteil am gesamten Trockengewicht von 50 % hätte man bei Verwendung des Verfahrens von Lowry erhalten (Lowry, 1951), da bei der Bradford-Methode ein systematischer Fehler bei der Protein-Bestimmung auftritt, wobei die durch dieses Verfahren erhaltenen Protein-Konzentrationen um einen Faktor von 1,6 zu klein sind (Chiapelli, 1979).

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase

Die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase konnten durch Ionenaustausch-Chromatographie, Procion-Rot-Farbstoffaffinitäts-Chromatographie und 2'5'-ADP Liganden-Affinitäts-Chromatographie isoliert werden, wobei die Reinheit durch Coomassie gefärbte SDS-Gele (Laemmli, 1979) überprüft wurde (Abb. 10). Überraschenderweise traten im Falle der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase zwei Banden (60 kDa und 30 kDa) im SDS-Gel auf, was darauf schließen ließ, daß dieses Enzym in *C. glutamicum* als Komplex aus zwei unterschiedlichen Proteinen vorkommt, der eine Masse von ungefähr 300 kDa besitzt, wie sich durch die Gelfiltrationschromatographie ergab. Um die Identität dieser beiden Proteine zu überprüfen, wurden sie N-terminal sequenziert und die erhaltenen Sequenzen mit der DNA-Sequenz der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* (Hatakeyama et al., 1997) verglichen. Zusätzlich wurde das OpcA- und das Zwf-Protein tryptisch verdaut und die Massen der erhaltenen Peptide mit einem MALDI-TOF-Massenspektrometer bestimmt. In beiden Fällen konnte eine Übereinstimmung mit den abgeleiteten Proteinsequenzen des *zwf*-Gens und eines Gens direkt 'upstream' vom *zwf*-Gen festgestellt werden. Sowohl bei *Mycobacterium tuberculosis* (Cole, 1998), einem nahe verwandten Organismus, als auch bei Cyanobacterium *Nostoc* sp. Strain ATCC 29133 (Summers, 1995) handelt es sich hierbei um das *opcA*-Gen, das, wie für Cyanobakterien gezeigt werden konnte (Summers, 1995), zusammen mit dem *zwf*-Gen cotranskribiert wird. Die N-terminale Sequenz dieses Proteins von *Corynebacterium glutamicum* (Hatakeyama et al., 1997) ist der Sequenz des *opcA*-Gens von *Mycobacterium tuberculosis* ähnlich (Cole, 1998); auch die Masse des Proteins von 30 kDa (Abb. 10) stimmt mit der des OpcA-Proteins von *Mycobacterium tuberculosis* überein.

Im Falle des Zwf-Proteins konnte erst ab der achten Position die Sequenz durch Edman-Sequenzierung ermittelt werden, da die Spektren am Anfang durch eine Verunreinigung überlagert waren, die möglicherweise durch den verwendeten Puffer in die Probe gelangte. Die Identifikation des Zwf-Proteins ist jedoch durch die ermittelte Teilsequenz, das Massenfingerprint (Abb. 10), die MALDI-TOF-Analyse der tryptischen Peptide und die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität abgesichert.

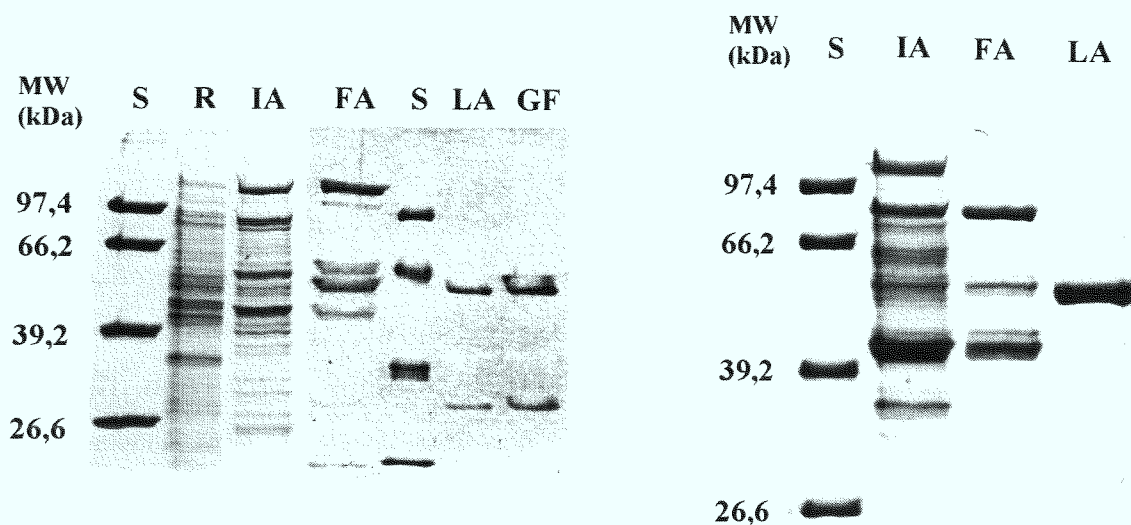


Abb.10: SDS-Gelelektrophorese der vereinigten aktiven Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (links) und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (rechts) Fraktionen. *Abkürzungen:* R = Rohextrakt; IA = DEAE Ionen-Austausch-Chromatographie; S = Standard; FA = Procion-Rot Farbstoffaffinitäts-Chromatographie; LA = 2'5'-ADP Liganden Affinitäts Chromatographie; GF = Gelfiltrations Chromatographie; MW=Molekulargewicht

OpcA:	MIFXLPDXXXQQISK	*
	MIF ELPD TTTQQISK	**
Zwf:	XXXXXXPXXWXNPLRD	*
	ST NT TPSS WT NPLRD	**

Abb.11: N-terminale Sequenzen der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase von *C. glutamicum*. X: nicht identifiziert * bestimmt durch N-terminale Sequenzierung ** aus der Gen-Sequenz abgeleitet (Hatakeyama et al., 1997).

Zur Isolierung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase standen keine Überproduzenten zur Verfügung, so daß zur vollständigen Isolation, ausgehend vom *C. glutamicum* Wildtyp, hohe Anreicherungsfaktoren von 650 (Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase) bzw. 1380 (6-Phosphogluconat-Dehydrogenase) erzielt werden mußten (Tab. 7 und 8). Die spezifische Aktivität im Rohextrakt war im Falle der Glucose-6-phosphat-

Dehydrogenase um ca. 30 % kleiner, als die der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase. Die maximal erreichte spezifische Enzymaktivität betrug bei der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase 213 U/mg und bei der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase 143 U/mg Protein.

Die Proteinausbeute lag nach den ersten drei Anreicherungsschritten, die in beiden Fällen zur vollständigen Isolation der Enzyme führten, bei 15 %. Die großen Verluste bei der Gelfiltrationschromatographie (3 % Endausbeute) hat mehrere Ursachen. Zum einen fand während der Gelfiltration eine Vergrößerung des Volumens und somit auch der Oberfläche der Proteinlösung statt, so daß eine große Oberflächenadsorption unvermeidbar war (Scopes, 1987). Zum anderen ist bekannt, daß Protein-Komplexe bei hohen Verdünnungen instabil werden können (Minton & Wilf, 1981), wodurch ein Aktivitäts-Verlust der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase durch Trennung der Zwf- und OpcA-Untereinheiten verursacht werden könnte. Dies würde auch mit der Abnahme der spezifischen Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität nach der Gelfiltration korrelieren. Es konnte gezeigt werden, daß das OpcA-Protein bei Cyanobakterien für die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität essentiell ist (Sundaram et al., 1998; Summers et al., 1995).

Für diese Vermutungen spricht auch, daß die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase durch Zusatz von Polyethylenglycol stabilisiert wurde (Abb.12). Trotz PEG-Abwesenheit konnte im Falle der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase unter ähnlichen Bedingungen kein Aktivitätsverlust festgestellt werden. Somit wird der Zwf-OpcA-Komplex wahrscheinlich durch niedrige Makromolekül-Konzentrationen, wie sie nach der Isolation auftreten, destabilisiert und verliert bei Dissoziation seine Aktivität. Es ist bekannt, daß Polyethylenglycol einen Einfluß auf die Stabilität von Enzymen hat (Lee&Lee, 1987).

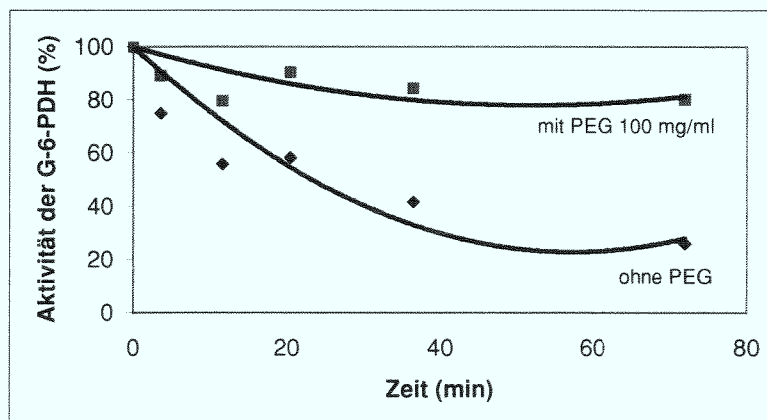


Abb.12: Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase von *Corynebacterium glutamicum* bei An- und Abwesenheit von 100 mg/ml Polyethylenglycol nach unterschiedlich langer Aufbewahrung bei 30°C.

Tab.7: Isolierung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum*. Abkürzungen: C = Rohextrakt; IA = DEAE Anionen-Austausch-Chromatographie; FA = Procion-Rot Farbstoffaffinitäts Chromatographie; LA = 2'5'-ADP Liganden Affinitäts Chromatographie; GF = Gelfiltrations Chromatographie.

Schritt	Volumen	Aktivität	Protein			spezifische Aktivität	Anreicherungs-faktor	Ausbeute
	ml	U/ml	total U	mg/ml	gesamt mg	U/mg		%
C	524	0.5	273	3.4	1766	0.16	0	100
IA	125	1.5	189	1.1	131	1.4	9.3	69
FA	18.5	7.5	138	0.26	4.7	29	189	51
LA	4.3	8	34.4	0.038	0.16	213	1378	12.6
GF	4.9	2	9.7	0.013	0.06	159.5	1032	3.6

Tab.8: Aufreinigung der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum*. Abkürzungen: wie in Tab.7.

Schritt	Volumen	Aktivität	Protein			spezifische Aktivität	Anreicherungs-faktor	Ausbeute
	ml	U/ml	total U	mg/ml	gesamt mg	U/mg		%
C	78.3	0.8	65	3.7	293	0.22	0	100
IA	25.8	1.9	47.9	1.6	41	1.2	5	64
FA	30	0.7	21.7	0.075	2.3	9.6	43	33
LA	54.5	0.18	9.6	1.2	0.07	143	646	15
				$\times 10^{-3}$				

Deutliche Unterschiede ergaben sich auch hinsichtlich der Lagermöglichkeiten bei den beiden Proteinen. Während im Falle der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase nach Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff, Lagerung bei -70°C und dem Wiederauftauen kein Aktivitäts-Verlust festgestellt werden konnte, war bei gleicher Verfahrensweise bei der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase keine Aktivität mehr feststellbar. Die Ursache für das unterschiedliche Verhalten, liegt sehr wahrscheinlich auch hier in der Instabilität des Zwf-OpcA-Enzymkomplexes, der bei den extremen Bedingungen während des Einfrierens und Auftauens dissoziiert (Scopes, 1987). Oberhalb der eutektischen Punkte der in der Proteinlösung enthaltenen Salze, die meistens über -25°C liegen, bilden sich Kavitäten mit extremen pH-Werten und hohen Salzkonzentrationen aus, die zur Präzipitation und Dissoziation von Proteinen führen können

(Scopes, 1987). Dies ist vermutlich die Ursache für den Aktivitäts-Verlust der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase.

Da vermutet wird, daß das OpcA-Protein eine wichtige Rolle bei der Assemblierung verschiedener multimerer Formen der cyanobakteriellen Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase spielt (Sundaram et al, 1998), die aus einer unterschiedlichen Anzahl von Zwf-Monomeren zusammengesetzt sind, wurde unter schonenden Bedingungen eine native gelelektrophoretische Auftrennung des Rohextraktes von *C. glutamicum* durchgeführt, um zu überprüfen, ob auch bei diesem Organismus unterschiedliche Multimere vorkommen. Die Auftrennung erfolgte bei einem pH-Wert von 7.4, da unter diesen Bedingungen der OpcA-Zwf Komplex stabil bleibt, wie durch die Aufreinigung des Enzyms, die bei diesem pH-Wert erfolgte, gezeigt wurde. Zudem ist bei diesem pH-Wert die Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase maximal (Sugimoto & Shiio, 1987a), welches für den Nachweis dieses Enzyms durch 'Activity Staining' vorteilhaft ist (Abschnitt 2.14). In den Gel-Bereichen, in denen sich die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase befand, wurde dabei fluoreszierendes NADPH gebildet, welches bei Bestrahlung durch UV-Licht (366 nm) sichtbar wurde (Abb. 13). Es ergab sich jedoch nur eine einzelne Bande, welches darauf schließen läßt, daß im Gegensatz zu Cyanobakterien nur eine einzelne multimerer Form des Enzyms in *C. glutamicum* vorkommt.

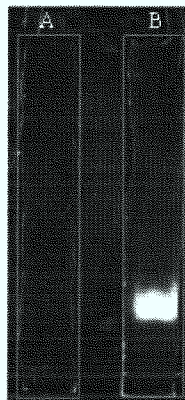


Abb. 13: Native Polyacrylamidgel-Elektrophorese des Rohextraktes von *C. glutamicum*. Das 'Activity Staining' erfolgte durch das Standard-Assay-Gemisch der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. (A = Nullprobe ohne NADP; B = Probe mit NADP und Glucose-6-phosphat).

3.2 Untersuchungen zur Regulation der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase

In der Einleitung wurden bereits erörtert, daß die *in vivo*-Aktivitäten der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase durch Veränderung ihrer spezifischen Aktivitäten und durch die Veränderung intrazellulärer Metabolit-Konzentrationen reguliert werden können. Das Ziel dieser Untersuchung war daher, diese unterschiedlichen Regulationsebenen durch ein enzymkinetisches Modell in einen quantitativen Zusammenhang zu bringen, wozu eine enzymkinetische Charakterisierung beider Enzyme hinsichtlich ihres Reaktionsmechanismus und hinsichtlich regulierend wirkender intrazellulärer Metabolite erforderlich war. In solchen enzymkinetischen Modellen treten die spezifischen Aktivitäten beider Enzyme und relevante intrazelluläre Metabolit-Konzentrationen als Variablen auf. Nach Quantifizierung dieser Größen sollte jedoch eine Berechnung der *in vivo*-Aktivität der beiden Enzyme ermöglicht werden.

3.2.1 Mechanismen der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase.

Der Mechanismus eines Enzyms wird unter anderem durch die Anzahl der Substrate und Produkte festgelegt. Die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, welche die reversible Oxidation von Glucose-6-phosphat zu 6-Phosphoglucono- δ -lacton katalysiert, hat zwei Substrate und zwei Produkte (Abb. 14), während die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, die 6-Phosphogluconat oxidativ decarboxyliert, zwei Substrate und drei Produkte hat.

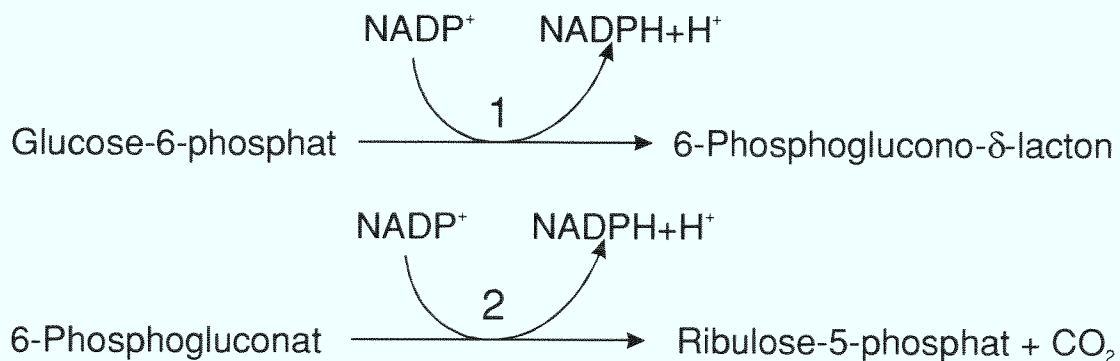


Abb.14 Reaktionen der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (1) und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (2).

Ein weiteres Kriterium für die Ermittlung der Mechanismen der beiden Enzyme ist die Reihenfolge der Substrat-Bindung und der Produkt-Freisetzung. Bei einem sequentiellen Mechanismus werden vor Freisetzung des ersten Produktes alle Substrate vom Enzym gebunden, während bei einem Ping-Pong Mechanismus vorher bereits erste Produkte gebildet werden. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten entscheiden zu können, wurde die Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeiten beider Enzyme von ihren Substrat-Konzentrationen (Glucose-6-phosphat und NADP bzw. 6-Phosphogluconat und NADP) untersucht. Die Auftragungen nach Lineweaver und Burk bei Variation der Glucose-6-phosphat- bzw. der 6-Phosphogluconat-Konzentration waren in beiden Fällen linear und hatten einen gemeinsamen Schnittpunkt (Abb. 15). Auch die Auftragungen bei Variation der NADP-Konzentration unter Konstanthaltung der Glucose-6-phosphat- bzw. 6-Phosphogluconat-Konzentration ergaben Geradenschar mit jeweils einem Schnittpunkt. Da im Falle eines Ping-Pong-Mechanismus eine parallele Geradenschar auftreten muß (Voet, 1992), wurde daraus geschlossen, daß beide Enzyme einen sequentiellen Reaktionsmechanismus besitzen. Generell ist ein Schnittpunkt der Geraden links von der $1/v$ -Achse ein graphischer Nachweis eines sequentiellen Mechanismus (Voet, 1992). Gemäß der Anzahl von Produkten und Substraten liegt im Falle der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase ein sequentieller BiBi-Mechanismus und im Falle der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase ein sequentieller Bi-Ter-Mechanismus vor.

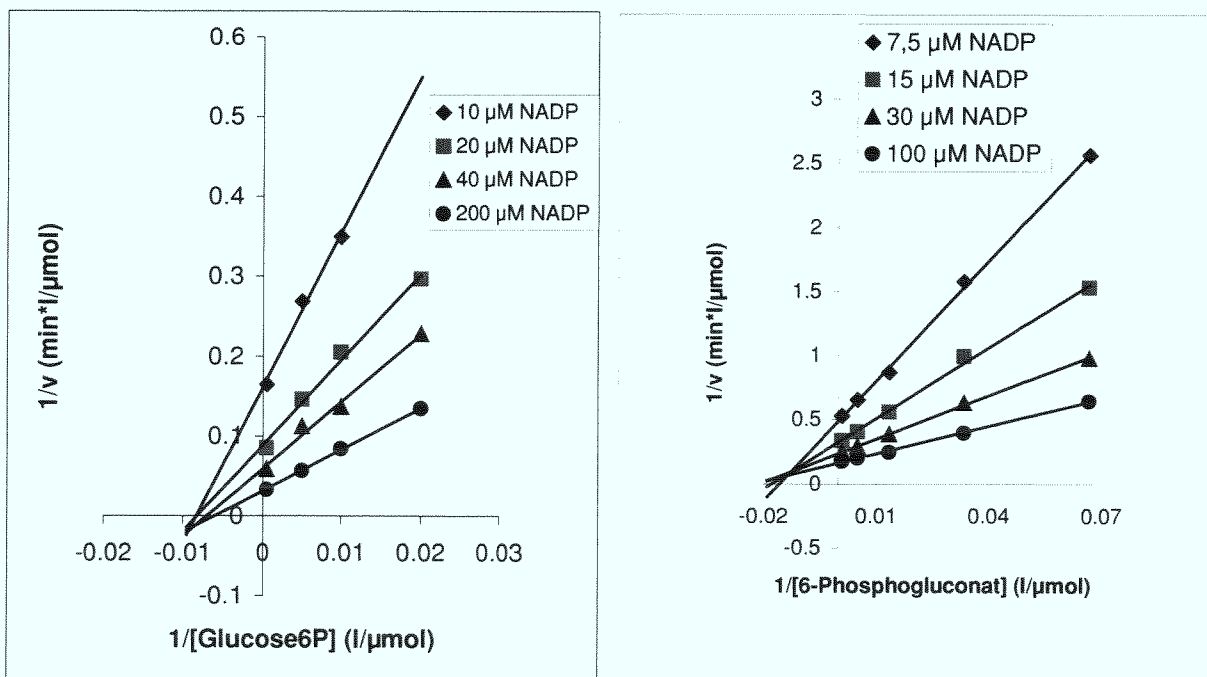


Abb.15: Lineweaver Burk Plots der Glucose-6-phosphat und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum*.

3.2.2 Bestimmung der Michaelis-Konstanten und Untersuchung der Hemmung beider Enzyme durch Produkte

Bei der nichtlinearen Regression zur Ermittlung der Enzymkonstanten wurde ein gleichermaßen für sequentielle Bi-Bi und sequentielle Bi-Ter Mechanismen gültiges enzymkinetisches Modell verwendet (Gleichung (1)).

$$v = \frac{v_{\max} [A][B]}{K_{ia} K_{mB} + K_{mB} [A] + K_{mA} [B] + [A][B]} \quad (1)$$

In Gleichung (1) handelt es sich bei $v_{\max}$ um die maximale Geschwindigkeit des Enzyms bei Substrat-Sättigung, bei $[A]$ und $[B]$ um die Konzentrationen der beiden Substrate und bei K_{mA} , K_{mB} , bzw. K_{ia} um die Michaelis-Konstanten und die Dissoziationskonstante des Substrats A. Diese Funktion beschreibt eine Fläche im Raum, wobei die Geschwindigkeit v in Abhängigkeit von $[A]$ und $[B]$ unterschiedliche Werte annimmt. Durch die verwendete Software war es möglich diese Fläche optimal an die gewonnenen Meßwerte anzupassen. Für die einzelnen K_m und K_i -Werte ergaben sich dabei die in Tab. 9 angegebenen Werte. Es fällt auf, daß die Michaelis-Konstanten der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase ($K_{mG6P} = 160 \mu\text{M}$ und $K_{mNADP} = 40 \mu\text{M}$) 2 bis 4-fach größer sind, als die entsprechenden Konstanten der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase ($K_{m6PG} = 34 \mu\text{M}$ und $K_{mNADP} = 17 \mu\text{M}$), welches zeigt daß die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase eine höhere Affinität zu ihren Substraten hat, als die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. Da im Falle der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase die Reihenfolge der Substrat-Bindung an das Enzym nicht geklärt werden konnte, wie nachfolgend begründet wird, wurden in diesem Fall zwei Dissoziationskonstanten angegeben. Hierzu wurden zwei unterschiedliche Regressionsanalysen mit vertauschten A und B-Substraten durchgeführt. Die K_m -Werte waren in beiden Fällen gleich.

Untersuchungen der Produkt-Hemmung durch Ribulose-5-phosphat und NADPH ergaben bei der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase weitere Informationen über die Reihenfolge der Substrat-Bindung und Produkt-Freisetzung und bei der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase weitere Informationen über die Stabilität des ternären Übergangskomplexes. 6-Phosphoglucono- δ -lacton, welches neben NADPH das zweite Produkt der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase darstellt, konnte allerdings nicht untersucht werden, da die Halbwertszeit dieser Substanz von 1,5 min bei einem pH-Wert von 7,4 zu kurz für die durchzuführenden Untersuchungen ist (Horecker, 1953). Diese Instabilität resultiert aus der schnellen Hydrolyse des 6-Phosphoglucono- δ -lactons unter Bildung von 6-Phosphogluconat.

Tab.9: Kinetische Konstanten der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase und der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum*. Für die nichtlineare Regression wurde Gleichung (1) als Modell-Funktion verwendet. *Abkürzungen:* G6P = Glucose-6-phosphat; 6PG = 6-Phosphogluconat; K_m = Michaelis-Konstanten; K_i = Dissoziationskonstante des ersten vom jeweiligen Enzym gebundenen Substrats.

Enzyme	Gleichung	K_m (G6P)	K_m (6PG)	K_m (NADP)	K_i (6PG) ¹	K_i (NADP) ²
		μM				
6-Phosphogluconat-Dehydrogenase	1	-	34 ± 13	$16,8 \pm 3$	62 ± 25	34 ± 13
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	1	169 ± 23	-	40 ± 4	-	$32,5 \pm 10,4$

¹ Wenn 6-Phosphogluconat das erste Substrat ist ² Wenn NADP das erste Substrat ist

Bei der reinen kompetitiven Produkt-Hemmung bezüglich eines Substrates wird nur der K_m -Wert dieses Substrats erhöht, weshalb bei einer ausreichend hohen Substrat-Konzentration trotz Anwesenheit des Produkts die maximale Katalyse-Geschwindigkeit erreicht wird. Bei der reinen unkompetitiven Hemmung wird dagegen die Maximalgeschwindigkeit beeinflusst, so daß auch bei hohen Substrat-Konzentrationen die maximale Katalyse-Geschwindigkeit nicht erreicht werden kann. Während bei den reinen Hemmtypen eine einzige Hemmkonstante, nämlich K_{ic} im Falle der kompetitiven Hemmung und K_{iu} bei der unkompetitiven Hemmung, zur vollständigen Beschreibung ausreicht, müssen im Falle der gemischten Hemmung beide Konstanten angegeben werden. Mathematisch lassen sich die Hemmkonstanten gemäß Gleichung (2) formulieren, die bei den durchgeführten nichtlinearen Regressionen als Modell-Gleichung verwendet wurde. Experimentell wurden hierzu die Anfangsgeschwindigkeiten der beiden Enzyme bei Variation einer Produkt-Konzentration [P] und einer Substrat-Konzentration [S] bestimmt. Dabei wurde die Konzentration des jeweils anderen Substrats konstant gehalten. Auch erfolgten die Messungen bei Abwesenheit der anderen Produkte. Wie durch Lineweaver Burk-Auftragungen bereits sichtbar wird (Abb.16) liegt im Falle von NADPH (bei Variation von NADP) und Ribulose-5-phosphat (bei Variation von 6-Phosphogluconat) ein kompetitiver Hemmtyp vor, da sich die Geraden auf der $1/v$ -Achse schneiden. Bei der nichtlinearen Regression ergaben sich daher für K_{ic} endliche Werte (Tab. 10), während für die K_{iu} -Werte nur ein Grenzwert von $+\infty$ angegeben werden kann. Bei der Hemmung durch Ribulose-5-phosphat bezüglich NADP wurde dagegen ein gemischter Hemmtyp festge-

stellt, so daß sich bei der Regressions-Analyse für beide Hemmkonstanten endliche Werte ergaben (Tab. 10). Gleiches galt für die Hemmung durch NADPH bezüglich Glucose-6-phosphat und 6-Phosphogluconat.

$$v = \frac{v_{\max} \times [S]}{\left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right) \times K_m + \left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}}\right) \times [S]} \quad (2)$$

Die kompetitiven Hemmkonstanten von NADPH bezüglich NADP waren mit 20 bis 30 μM den entsprechenden K_m -Werten von NADP ähnlich, während die kompetitive Hemmkonstante von Ribulose-5-phosphat bezüglich 6-Phosphogluconat mit 350 μM deutlich größer war, als der K_m -Wert von 6-Phosphogluconat. Dies bedeutet, daß die Aktivitäten beider Enzyme bei einem NADP/NADPH-Konzentrations-Verhältnis von 1 in etwa halbiert werden, während das 6-Phosphogluconat/Ribulose-5-phosphat Konzentrationsverhältnis bei 0,1 liegen muß, um die gleiche Wirkung zu erzielen.

Tab.10: Produkt Hemm-Typen und Hemm-Konstanten der Glucose-6-phosphat und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenasen. Für die nichtlineare Regression wurde Gleichung (2) verwendet. *Abkürzungen:* K_{ic} = kompetitive Hemm-Konstante; K_{iu} = unkompetitive Hemm-Konstante.

Enzym	Gleichung	Produkt	Substrat	Hemmtyp	K_{ic}	K_{iu}
					μM	
Glucose-6-P-Dehydrogenase	2	NADPH	Glucose-6-P	gemischt	$10 \pm 1,9^3$	61 ± 10^3
	2	NADPH	NADP	kompetitiv	20 ± 2^4	-
6-Phosphogluconat-Dehydrogenase	2	NADPH	NADP	kompetitiv	$30 \pm 5,2$	-
	2	NADPH	Gluconat6P	gemischt	108 ± 12^1	103 ± 27^1
	2	Ribulose5P	NADP	gemischt	1166 ± 153^2	731 ± 102^2
	2	Ribulose5P	Gluconat6P	kompetitiv	346 ± 50	-

¹ [NADP] = 30 μM ² [6-Phosphogluconat] = 150 μM ³ [NADP] = 50 μM ⁴ [Glucose6P]=750 μM

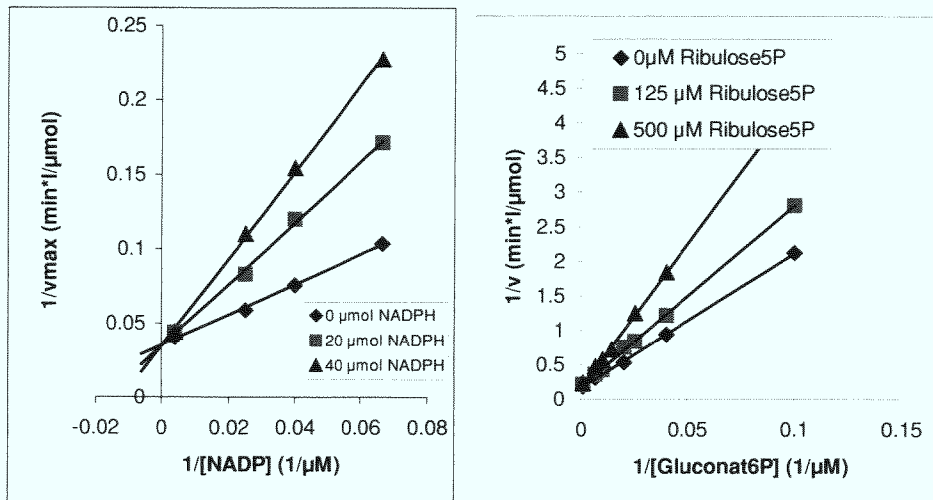


Abb.16: Hemmung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase durch NADPH und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase durch Ribulose-5-phosphat. Da sich die Geraden auf der $1/v$ -Achse schneiden liegt in beiden Fällen ein kompetitiver Hemmtyp vor.

Das Produkt-Hemmschema der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (Tab. 10) ist mit einem geordneten Bi-Bi-Mechanismus konform, bei dem der Cofaktor NADP zuerst an das Enzym bindet und NADPH das zuletzt freigesetzte Produkt ist. Dies lässt sich leicht aus der kompletten Geschwindigkeitsgleichung eines geordneten Bi-Bi-Mechanismus ableiten, in der alle Substrate und Produkte der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase berücksichtigt werden (Segel, 1975). Im Falle der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase lässt sich die kompetitive Hemmung durch NADPH und Ribulose-5-phosphat bezüglich der Substrate NADP und 6-Phosphogluconat allerdings nicht mit einem geordneten Bi-Ter-Mechanismus in Übereinstimmung bringen, da in diesem Fall ein kompetitiver Hemmtyp nur einmal auftreten darf (Segel, 1975). Im Falle eines geordneten Theorell-Chance Bi-Bi-Mechanismus, bei dem der zentrale ternären Komplex schnell unter Bildung des ersten Reaktionsproduktes zerfällt und dessen Konzentration somit vernachlässigt wird (Theorell & Chance, 1951), fallen jedoch einige Terme in der kompletten Geschwindigkeitsgleichung des normalen geordneten Bi-Bi-Mechanismus weg, so daß auch die Hemmung des ersten freigesetzten Produkts bezüglich des zweiten gebundenen Substrats kompetitiv wird (Segel, 1975).

Daher wurde vermutet, daß im Falle der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase ein geordneter Theorell-Chance Bi-Ter-Mechanismus vorliegt, für den jedoch bisher noch keine vollständige Geschwindigkeits-Gleichung abgeleitet worden ist. Deshalb wurde die Ableitung dieser Gleichung gemäß der Regeln von King, Altmann und Cleland (King & Altmann, 1956 und Cleland, 1963) durchgeführt, wie sie auch von Segel (Segel, 1975) beschrieben werden. Das zur Ableitung notwendige Reaktionsschema enthält alle bei diesem Mechanismus relevanten

Elementarprozesse (Abb. 17). Der ternäre Übergangskomplex $EAB \bullet EPQR$ kommt in diesem Schema nicht vor, da seine Konzentration aufgrund der kurzen Halbwertszeit als vernachlässigbar klein angesehen werden kann (Segel, 1975).

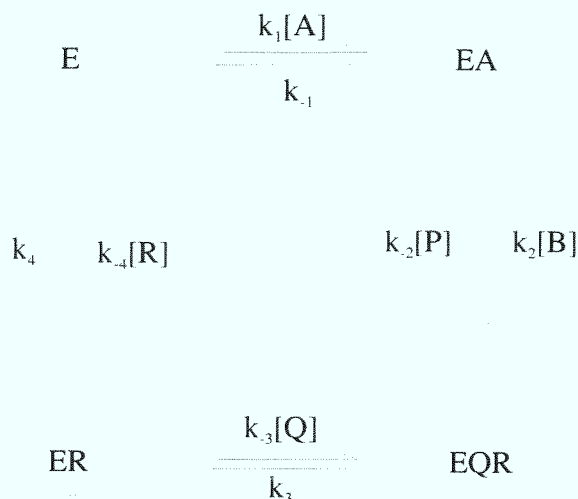


Abb.17: Einzelne Elementarprozesse der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase. *Abkürzungen:*

k_x = Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen Elementarprozesse; A = erstes vom Enzym gebundenes Substrat; B = zweites vom Enzym gebundenes Substrat; P = erstes freigesetztes Produkt; Q = zweites freigesetztes Produkt; R = drittes freigesetztes Produkt.

Die folgende komplette Geschwindigkeits-Gleichung eines geordneten Theorell-Chance Bi-Ter-Mechanismus konnte abgeleitet werden:

$$v = \frac{V_f \left([A][B] - \frac{[P][Q][R]}{K_{eq}} \right)}{K_{ia}K_{mb} + K_{mb}[A] + K_{ma}[B] + [A][B] + \frac{K_{ia}K_{mb}}{K_{ip}}[P] + \frac{K_{ia}K_{mb}}{K_{ir}}[R] + \frac{K_{ia}K_{mb}K_{mr}}{K_{ir}K_{mq}K_{ip}}[P][Q] + \frac{K_{ia}K_{mb}}{K_{ir}K_{mq}K_{ip}}[P][Q][R] + \frac{K_{ia}K_{mb}K_{mp}}{K_{ir}K_{mq}K_{ip}}[R][Q] + \frac{K_{ia}K_{mb}}{K_{ir}K_{ip}}[P][R] + \frac{K_{mb}}{K_{ip}}[A][P] + \frac{K_{mb}K_{mr}}{K_{ir}K_{mq}K_{ip}}[A][Q][P] + \frac{1}{K_{iq}}[A][B][Q] + \frac{K_{ia}K_{mb}K_{mp}}{K_{ir}K_{mq}K_{ip}K_{ib}}[R][Q][B] + \frac{K_{ma}}{K_{ir}}[R][B]} \quad (3)$$

Die dabei verwendeten kinetischen Konstanten lassen sich durch die Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen Elementarprozesse wie folgt ausdrücken:

$$\begin{array}{llllll}
 K_{mp} = \frac{k_{-1}}{k_{-2}} & K_{mq} = \frac{k_{-1}}{k_{-3}} & K_{mr} = \frac{k_{-1}}{k_{-4}} & K_{ma} = \frac{k_3k_4}{k_4k_1 + k_1k_3} & K_{mb} = \frac{k_3k_4}{k_2k_4 + k_2k_3} \\
 K_{ir} = \frac{k_4}{k_{-4}} & K_{iq} = \frac{k_4 + k_3}{k_{-3}} & K_{ip} = \frac{k_3}{k_{-2}} & K_{ia} = \frac{k_{-1}}{k_1} & K_{ib} = \frac{k_{-1}}{k_2} & V_f = \frac{k_3k_4}{k_4 + k_3}
 \end{array}$$

Dabei handelt es sich bei K_{mx} um Michaelis-Konstanten, bei K_{ix} um Hemm-Konstanten, bei K_{eq} um die Gleichgewichtskonstante der Reaktion und bei V_f um die maximale Geschwindigkeit in Produkt-Richtung. A, B, P, Q und R sind wie in Abb. 17 definiert.

Gleichung (3) gibt die Aktivität bei gleichzeitiger Anwesenheit aller Produkte und Substrate an. Die Ableitung von Gleichung (3) war notwendig, um das spezielle Produkt-Hemm-Muster eines geordneten Theorell-Chance Bi-Ter-Mechanismus zu ermitteln. Hierzu wurde Gleichung (3) unter Berücksichtigung der Substrate A und B bei Anwesenheit eines einzelnen Produktes (P bzw. R) reziprok formuliert (Gleichungen (4a)-(4d)). Dabei konnte in zwei Fällen ein kompetitiver Hemmtyp und ebenfalls in zwei Fällen ein gemischter Hemmtyp festgestellt werden, welches dem festgestellten Produkt-Hemm-Muster der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase entspricht. Daher kann davon ausgegangen werden, daß im Falle der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase ein geordneter Theorell-Chance Bi-Ter- Mechanismus vorliegt.

$$\frac{v_{\max}}{v} = \frac{1}{[A]} \left\{ \frac{K_{ia} K_{mb}}{[B]} \left(1 + \frac{P}{K_{ip}} \right) + K_{ma} \right\} + \left\{ \frac{K_{mb}}{[B]} \left(1 + \frac{P}{K_{ip}} \right) + 1 \right\} \quad (4a) \quad \text{gemischt}$$

$$\frac{v_{\max}}{v} = \frac{1}{[B]} \left\{ \frac{K_{ia} K_{mb}}{[A]} \left(1 + \frac{P}{K_{ip}} \right) + K_{mb} \left(1 + \frac{P}{K_{ip}} \right) \right\} + \left\{ \frac{K_{mA}}{[A]} + 1 \right\} \quad (4b) \quad \text{kompetitiv}$$

$$\frac{v_{\max}}{v} = \frac{1}{[A]} \left\{ \frac{K_{ia} K_{mb}}{[B]} \left(1 + \frac{R}{K_{ir}} \right) + K_{ma} \left(1 + \frac{R}{K_{ir}} \right) \right\} + \left\{ \frac{K_{mB}}{[B]} + 1 \right\} \quad (4c) \quad \text{kompetitiv}$$

$$\frac{v_{\max}}{v} = \frac{1}{[B]} \left\{ \frac{K_{ia} K_{mb}}{[A]} \left(1 + \frac{R}{K_{ir}} \right) + K_{mb} \right\} + \left\{ \frac{K_{mA}}{[A]} \left(1 + \frac{R}{K_{ir}} \right) + 1 \right\} \quad (4d) \quad \text{gemischt}$$

Da das Produkt-Hemm Muster bezüglich der Produkte NADPH und Ribulose-5-phosphat symmetrisch ist, gibt es zwei Möglichkeiten für die Reihenfolge der Substrat-Bindung und Produkt-Freisetzung, zwischen denen nicht unterschieden werden konnte (Abb. 18). Dies ist auch der Grund dafür, daß die Reaktionspartner während der durchgeführten Ableitungen durch die allgemeine Buchstaben Nomenklatur bezeichnet werden mußten und nicht speziell für die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase formuliert werden konnten.

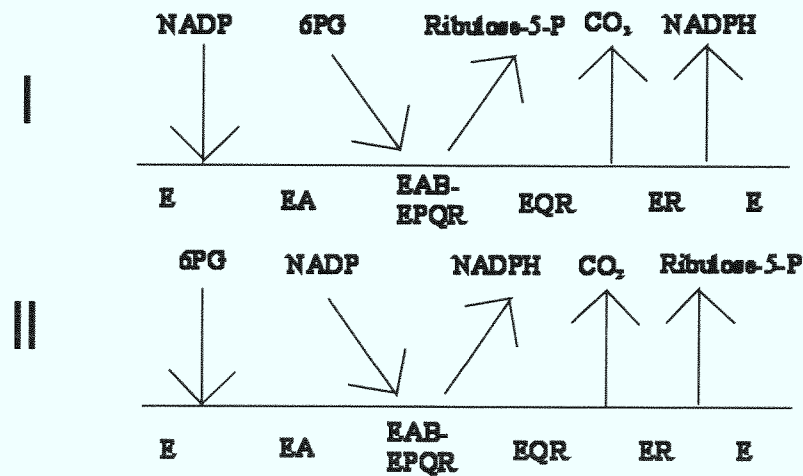


Abb 18: Alternative Reaktions Mechanismen der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase. I: NADP bindet zuerst an das Enzym; II: Gluconat-6-P bindet zuerst an das Enzym. Der ternäre Übergangskomplex EAB-EPQR hat eine kurze Halbwertszeit, welches durch die schrägen Pfeile symbolisiert wird. *Abbkürzungen:* A = erstes Substrat, welches vom Enzym gebunden wird; B = zweites Substrat welches vom Enzym gebunden wird; P = erstes Produkt; Q = zweites Produkt; R = drittes Produkt.

3.2.4 Regulation der Glucose-6-phosphat- und Gluconat-6-phosphat-Dehydrogenasen durch intrazelluläre Metabolite

Eine Gruppe von weit verbreiteten Inhibitoren der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase von verschiedenen Organismen zeigen Struktur-Ähnlichkeiten zum Substrat NADP, da bei allen ein Adenin-phosphat-Rest Teil der Gesamtstruktur ist. Zu dieser Gruppe gehören Palmitoyl-CoA, Acetyl-CoA, AMP, ADP, ATP, NAD, und NADH (Levy, 1979 & Sugimoto, 1987a u. 1987 b), welche daher alle hinsichtlich ihrer Beeinflussung der beiden untersuchten Enzymaktivitäten untersucht wurden.

Um erste Informationen über die 'in vivo' Regulation der beiden Enzyme zu gewinnen, wurden diese Metabolite zunächst in Konzentrationen dem Assay-Gemisch zugesetzt, die entweder sehr viel größer oder zumindest im Bereich der bereits bekannten intrazellulären Konzentrationen in *C. glutamicum* waren. Da mit größer werdenden Substrat-Konzentrationen die Unterschiede zwischen den Reaktionsgeschwindigkeiten bei An- bzw. Abwesenheit des Inhibitors immer kleiner werden, wurden die NADP-, Glucose-6-phosphat- und 6-Phosphogluconat-Konzentrationen so eingestellt, daß sie in der Nähe ihrer K_m -Werte lagen, so daß eine ausreichende Detektierbarkeit von eventuellen kompetitiven Hemm-Effekten sichergestellt war.

Die kinetischen Konstanten (K_{iu} und K_{ic} -Werte) wurden nur nach Beobachtung einer signifikanten Hemmung bestimmt.

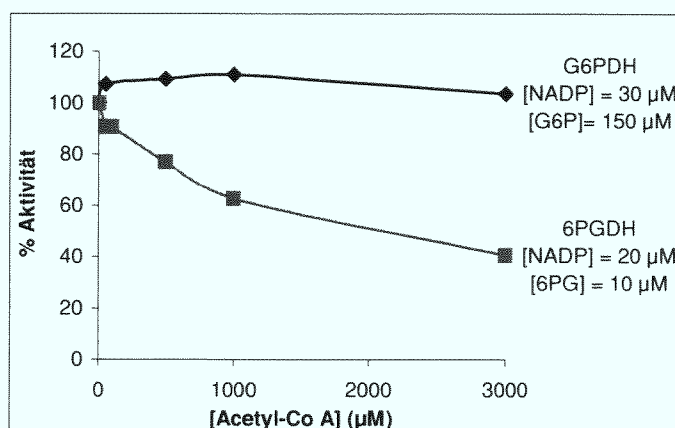


Abb. 19: Hemmung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase durch Acetyl-CoA. *Abkürzungen:* G-6-PDH = Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase; 6-PGDH = 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase; G6P = Glucose-6-P; 6PG = 6-Phosphogluconat.

Obwohl Acetyl-CoA bei einer Konzentration von 2 mM eine 50 %ige Inhibierung der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase verursacht (Abb.19), ist eine *in vivo* Relevanz unwahrscheinlich, da in *C. glutamicum* die Acetyl-CoA-Konzentrationen im Bereich von 15 bis 150 μM und somit weit unter 2 mM liegt (Wendisch, 1997). Bei der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase konnte keine Hemmung durch Acetyl-CoA festgestellt werden, so daß insgesamt resultiert, daß Acetyl-CoA nur einen schwachen Einfluß auf die Aktivität des oxidativen Teils vom Pentosephosphatweg hat.

Aufgrund der großen Struktur-Ähnlichkeit zu NADP und NADPH konnte nicht ausgeschlossen werden, daß auch NAD und NADH die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (Scopes, 1997) und die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (Stournaras et al., 1982) beeinflussen. Es wurde jedoch keine NAD abhängige Aktivität der beiden Enzyme festgestellt und auch NADH zeigte keinen Hemmeffekt.

ATP, ADP und AMP, die, abgesehen von der 5'-Phosphatgruppe, eine Struktur-Identität mit dem Adenin-Anteil des NADP bzw. NADPH aufweisen, hemmten beide Dehydrogenasen, wobei gemischte bzw. kompetitive Hemmtypen festgestellt werden konnten (Tab. 11). Es fiel auf, daß bezüglich der Substrate Glucose-6-P und 6-Phosphogluconat der kompetitive Anteil deutlich überwog, wobei die Stärke dieser kompetitiven Hemmungen bei beiden Enzymen deutliche Tendenzen zeigten. Im Falle der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase nahm die

Hemmung bei Variation der Glucose-6-P-Konzentration ausgehend von AMP über ADP zum ATP hin ab ($K_{icAMP}=3,6$ mM; $K_{icADP}=8,7$ mM; $K_{icATP}=12,1$ mM), während bei der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase bei Variation der 6-Phosphogluconat-Konzentration eine umgekehrte Tendenz festgestellt werden konnte ($K_{icAMP}=5,1$ mM; $K_{icADP}=4,5$ mM; $K_{icATP}=1,1$ mM). Auch bei Variation der NADP-Konzentration unter Konstanthaltung der Glucose-6-P bzw. 6-Phosphogluconat-Konzentration überwog der kompetitive Anteil der Hemmung. Die Ermittlung der Hemm-Konstanten erfolgte wie bei der Untersuchung der Produkt-Hemmung durch Gleichung (2), wobei in diesem Fall die Produkt-Konzentration [P] gleich der Adenin-Nucleotid-Konzentration ist.

Tab. 11: Regulation der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase durch verschiedene intrazelluläre Metabolite. Bei einer reinen kompetitiven Hemmung werden jeweils nur die kompetitiven (K_{ic}), im Falle einer gemischten Hemmung auch die unkompetitiven Hemmkonstanten (K_{iu}) angegeben. Die jeweiligen Hemmkonstanten ergaben sich bei Variation des angegebenen Substrats.

Effektor	Substrat	Hemm-Typ	K_{ic}	K_{iu}
mM				
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase				
AMP	NADP	kompetitiv ^{1,2}	$3,6 \pm 0,4$	-
	Glucose-6-P	kompetitiv ^{1,3}	$3,1 \pm 0,5$	-
ADP	NADP	kompetitiv ^{1,2}	$8,7 \pm 0,6$	-
	Glucose-6-P	kompetitiv ^{1,3}	$8,7 \pm 1,5$	-
ATP	NADP	gemischt ^{1,2}	$7,7 \pm 0,9$	15 ± 5
	Glucose-6-P	kompetitiv ^{1,3}	$12,1 \pm 2,8$	-
6-Phosphogluconat-Dehydrogenase				
AMP	NADP	gemischt ^{1,4}	$5,2 \pm 0,5$	$17 \pm 1,5$
	6-Phosphogluconat	kompetitiv ^{1,5}	$5,1 \pm 0,6$	-
ADP	NADP	gemischt ^{1,4}	$5,2 \pm 0,6$	$11,8 \pm 1,0$
	6-Phosphogluconat	kompetitiv ^{1,5}	$4,5 \pm 0,5$	-
ATP	NADP	gemischt ^{1,4}	$1,3 \pm 0,2$	$7,2 \pm 1,3$
	6-Phosphogluconat	kompetitiv ^{1,5}	$1,1 \pm 0,2$	-

¹bei Abwesenheit von $MgCl_2$; ²[Glucose-6-phosphat] = 150 μ M; ³[NADP] = 45 μ M; ⁴ [6-Phosphogluconat]= 25 μ M; ⁵ [NADP]= 25 μ M

Neben den Adenin-phosphat-Rest haltigen Effektoren, hemmen auch verschiedene Zuckerphosphate die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconat dehydrogenase einiger Organismen (Levy, 1979; Kato, 1978 und Sugimoto, 1987a und 1987b), von denen Fructose-1,6-bisphosphat, 5-Phosphoribosyl- α -pyrophosphat (PRPP), D-Glyceraldehyde-3-phosphat, Erythrose-4-phosphat, Ribulose-5-phosphat, Xylulose-5-phosphat, Phosphoenolpyruvat und Fructose-6-phosphat in dieser Arbeit näher untersucht worden sind (Tab. 12 und Abb. 20).

Beide-Dehydrogenasen wurden durch PRPP gehemmt, wobei 5 mM PRPP eine 30 %ige Hemmung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und eine 50 %ige Hemmung der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase verursachten. In *E. coli* konnte eine PRPP-Konzentration von 2,5 $\mu\text{mol/gZellprotein}$ (Bagnara, et al., 1973) festgestellt werden, woraus sich mit Hilfe von Angaben über den Protein-Anteil am gesamten Trockengewicht (Neidhardt et al., 1990) und Angaben über das intrazelluläre Volumen pro Trockengewicht (Cayley et al., 1991) bei *E. coli* eine intrazelluläre PRPP-Konzentration von ca. 500 μM bis 1,4 mM berechnen läßt. Bei Übertragung dieser Verhältnisse auf *C. glutamicum* kann ein schwacher 'in vivo' Hemm-Effekt durch diesen Metaboliten nicht ausgeschlossen werden.

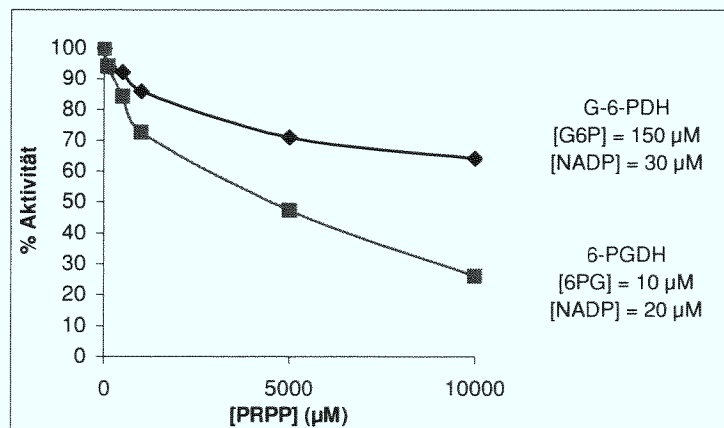


Abb. 20: Hemmung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase durch Phosphorylribose-1-pyrophosphat. *Abkürzungen:* G-6-PDH = Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase; 6-PGDH = 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase; PRPP = 5-Phosphoribosyl- α -pyrophosphat.

Die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase wurde auch durch Phosphoenolpyruvat inhibiert, wobei 10 mM Phosphoenolpyruvat eine 18 %ige Inhibierung verursachten (Tab. 12). In *C. glutamicum* konnten intrazelluläre PEP-Konzentrationen zwischen 1 mM während des exponentiellen Wachstums auf Glucose und bis zu 16 mM bei Glutamat-Produktion festgestellt

werden (Gourdon & Lindley, 1999). Diese zeigt, daß PEP unter bestimmten Bedingungen *in vivo* einen hemmenden Einfluß auf die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität ausüben kann.

Bei Zusatz von 10 mM Fructose-1,6-bisphosphat konnte kein Hemmeffekt festgestellt werden. Die Hemmung der Glucose-6-P-Dehydrogenase durch D-Glycerinaldehyd-3-phosphat (8% bei 2.3 mM) könnte im Falle von exponentiell auf Fructose wachsenden Zellen, bei denen die intrazelluläre D-GAP Konzentration bei 4 mM liegt in geringem Umfang physiologisch relevant sein (Dominguez et al., 1998).

Tab.12: Hemmung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase von *Corynebacterium glutamicum* durch Phosphoenolpyruvat, D-Glycerinaldehyd-3-phosphat und Fructose-1,6 bisphosphat. Bei dieser Untersuchung wurden folgende Substrat Konzentrationen gewählt: Phosphoenolpyruvat: [NADP] = 50 μ M; [Glucose-6-P] = 100 μ M; DGAP: [NADP] = 25 μ M; [6-Phosphogluconat] = 100 μ M; Fructose-1,6 P₂: [NADP] = 50 μ M; [6-Phosphogluconat] = 200 μ M.

Metabolit	Konzentration	Hemmung
	mM	%
Phosphoenolpyruvat	10	18
D-Glycerinaldehyd-3-phosphat	2.3	8
Fructose-1,6-bisphosphat	10	0

Im Gegensatz zur Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase konnte im Falle der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase eine sehr viel stärkere Hemmung durch D-Glycerinaldehyd-3-phosphat ($K_{ic}=1,0$ mM), Fructose-1,6-bisphosphat ($K_{ic}=3,8$ mM) und auch Erythrose-4-phosphat ($K_{ic}=1,0$ mM) festgestellt werden. Alle diese Zuckerphosphate hemmten die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase kompetitiv bezüglich des Substrats 6-Phosphogluconat (Tab. 13). Dies zeigte, daß die 6-Phosphogluconat Bindungsstelle der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase eine relativ niedrige Zuckerphosphat-Bindungsspezifität besitzt. Die K_{ic} -Werte für D-Glycerinaldehyd-3-phosphat and Fructose-1,6-bisphosphat liegen im Bereich von gemessenen intrazellulären Konzentrationen (Dominguez et al., 1998), so daß diese Substanzen *in vivo* als signifikante Inhibitoren wirken können. Da der K_{ic} von Erythrose-4-P wahrscheinlich unphysiologisch hoch ist und die Detektion dieses Metaboliten vermutlich wegen spontaner Dimerisierung (Blackmore, 1976) sehr problematisch ist (Bergmeyer, 1984), wurde die Quantifizie-

nung von Erythrose-4-phosphat in dieser Studie nicht durchgeführt. Obwohl die Nachweisgrenze beim optischen Verfahren zur Quantifizierung von Erythrose-4-phosphat bei ca. 3 μM liegt (Bergmeyer, 1984), muß die intrazelluläre Konzentration größer als 200 μM sein, da durch die Zell-Extraktion eine starke Verdünnung stattfindet.

Tab.13: Hemmung der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase durch D-Glycerinaldehyd-3-phosphat (D-GAP), Fructose-1,6-bisphosphat und Erythrose-4-phosphat.

Effektor	Substrat	Hemm-Typ	K_{ic}	K_{iu}
mM				
D-GAP	NADP	gemischt ¹	$8,0 \pm 2,6$	34 ± 16
	6-Phosphogluconat	kompetitiv	$1,00 \pm 0,17$	-
Fructose-1,6-P ₂	NADP	gemischt ¹	$13,5 \pm 4,5$	$13,9 \pm 2,2$
	6-Phosphogluconat	kompetitiv	$3,8 \pm 0,2$	-
Erythrose-4-P	NADP	kompetitiv	$0,98 \pm 0,13$	-

¹[6-Phosphogluconat] = 250 μM

Im Gegensatz zu den Enzymen anderer Organismen (Röber et al., 1984; Silverberg & Dalziel, 1975; Betts & Mayer, 1975) konnte bei beiden Enzymen kein Hemm-Effekt durch Citrat, Glyoxylat und Isocitrat festgestellt werden. 10 mM Oxalacetat verursachten lediglich eine 20 %ige Hemmung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, während keine Hemmung der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase festgestellt werden konnte. Oxalacetat konnte mit den üblichen enzymatischen Verfahren in Zellextrakten von *C. glutamicum* bisher nicht nachgewiesen werden (D. Molenaar), welches zum einen mit einer im Extrakt nicht nachweisbaren intrazellulären Konzentration von unter 200 μM und zum anderen mit der leichten Decarboxylierbarkeit dieses Metaboliten (Pedersen, 1954; Reij, 1974 und Speck, 1949) zusammenhängen könnte. Bisher konnten nur kleine intrazelluläre Oxalacetat-Konzentrationen wie beispielsweise 5 $\mu\text{mol/l}$ in Mitochondrien (Siess et al., 1984) und 20 nmol/g Trockengewicht in Säugerzellen (Williamson et al., 1979) quantifiziert werden. Daher kann angenommen werden, daß die intrazelluläre Konzentration dieses Metaboliten auch bei *C. glutamicum* weit unter 10 mM liegt, welches einen *in vivo*-Effekt von Oxalacetat sehr unwahrscheinlich macht. Da festgestellt wurde (Sugimoto & Shio, 1987a), daß die Hemmung durch Oxalacetat nach einer Gelfiltrations-Chromatographie stark reduziert sein kann, wurde auch die durch DEAE-Anionenaustauschchromatographie partiell angereicherten Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase von *C. glutamicum* bezüglich ihrer Hemmung durch Oxalacetat untersucht. Aber auch hier

konnte bei Anwesenheit von 10 mM Oxalacetat nur ein schwacher Hemm-Effekt von ca. 20 % festgestellt werden. Bei allen Untersuchungen mit Oxalacetat lagen die Substrat-Konzentrationen bei 40 μ M (NADP) bzw. 100 μ M (Glucose-6-P).

3.2.5 Einfluß von Salzen und Polyethylenglycol auf die Aktivitäten der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase.

Die möglichen Effekte einer *in vivo* Umgebung auf die Funktion der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase und der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase wurden durch Veränderung der Konzentrationen von Kalium Glutamat bzw. MgCl_2 und durch Zusatz von 100 mg/ml des inerten Polymers Polyethylenglykol 6000 untersucht. Durch PEG-Zusatz kann der makromolekulare 'Crowding-Effekt', der aus den hohen Polymer-Konzentrationen innerhalb der Zelle resultiert, imitiert werden (Record et al., 1998).

Auch bei niedriger Osmolarität des Nährmediums liegen, in Abhängigkeit von der externen Osmolarität, innerhalb der Zelle hohe Protein- und RNA-Konzentrationen von zusammen 300 bis 450 mg/ml vor (Cayley et al., 1991). Dies führt dazu, daß der osmotische Druck steigt bzw. daß der Wasser-Aktivitätskoeffizient einen Wert <1 annimmt, und somit die Aktivität des Lösungsmittels Wasser im Vergleich zur verdünnten Lösung kleiner ist. Dieses wiederum hat Auswirkungen auf die Gleichgewichtslage von Reaktionen, an denen Wasser als Reaktionspartner beteiligt ist. Wenn durch Substrat-Bindung Wassermoleküle vom Enzym entfernt werden, handelt es sich bei Wasser um ein Reaktionsprodukt. In diesem Fall wird die Bindung des Substrats bei einem reduzierten Wasser-Aktivitätskoeffizienten erleichtert, welches zu einer Verkleinerung des K_m -Wertes führt (Rand, 1992).

Nach PEG-Zusatz konnte tatsächlich festgestellt werden, daß die K_m -Werte der Glucose-6-phosphat und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase sanken (Tab. 14). Da hingegen die Maximalgeschwindigkeit bei Substrat-Sättigung nach PEG-Zusatz unverändert blieben, kann Wasser als kompetitiver Inhibitor beider Enzyme bezeichnet werden.

Die Effekte von typischen intrazellulären Soluten auf die Aktivität beider Enzyme wurde durch Zusatz von 200 mM KaliumGlutamat und unterschiedlicher Konzentrationen von MgCl_2 untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß die intrazelluläre KaliumGlutamat-Konzentrationen in *C. glutamicum* bei 170 mM (Guillouet & Engasser, 1996) bzw. bei 120-280 mM liegt (Börmann-El Kholy et al., 1993). Im Gegensatz zur 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase war bei der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase der Zusatz von ionischen Soluten notwendig, um eine Aktivität dieses Enzyms zu ermöglichen (Abb. 21). Bei Abwesenheit von MgCl_2 und KaliumGlutamat war keine Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität meßbar.

KaliumGlutamat konnte den aktivierenden Effekt des bivalenten Magnesium-Ions teilweise übernehmen, aber auch nach Zusatz von KaliumGlutamat ist der aktivierende Effekt durch MgCl_2 signifikant. Die Notwendigkeit des Zusatzes von Mg^{2+} wurde auch bei den Glucose-6-phosphat-Dehydrogenasen aus Erbsen-Chloroplasten (Wildner, 1975) und aus *Bacillus licheniformis* (Opheim, 1973) beobachtet.

Auf der anderen Seite wurde die Aktivität der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase nach Zusatz von Kalium Glutamat oder MgCl_2 reduziert (Abb.21), welches durch die Vergrößerung des K_m -Wertes bezüglich 6-Phosphogluconat verursacht wurde (Abb. 22). Nach Kalium-Glutamat Zusatz vergrößerte sich der K_m -Wert um einen Faktor von 2,5 und stieg nach Zusatz von MgCl_2 weiter an. Im Gegensatz zur Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase erfordert die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase also keinen Zusatz von monovalenten und bivalenten Ionen. Dies stimmt mit dem Enzym aus Schafs-Leber überein, bei dem bivalente Ionen ebenfalls nicht essentiell für die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase-Aktivität (Silverberg & Dalziel, 1975) sind.

Tab. 14: K_m -Werte der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase bei An- und Abwesenheit von 100 mg/ml PEG. Die Untersuchungen wurden bei den angegebenen MgCl_2 -Konzentrationen durchgeführt.

Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase ($[\text{MgCl}_2] = 1.4 \text{ mM}$)		
	$K_m(\text{NADP})$	$K_m(\text{G6P})$
	μM	
ohne PEG	90 ± 22	255 ± 42
mit PEG	38 ± 10	156 ± 45
6-Phosphogluconat-Dehydrogenase ($[\text{MgCl}_2] = 2.5 \text{ mM}$)		
	$K_m(\text{NADP})$	$K_m(6\text{-PG})$
	μM	
ohne PEG	25 ± 4	25 ± 5
mit PEG	$10 \pm 1,1$	18 ± 2

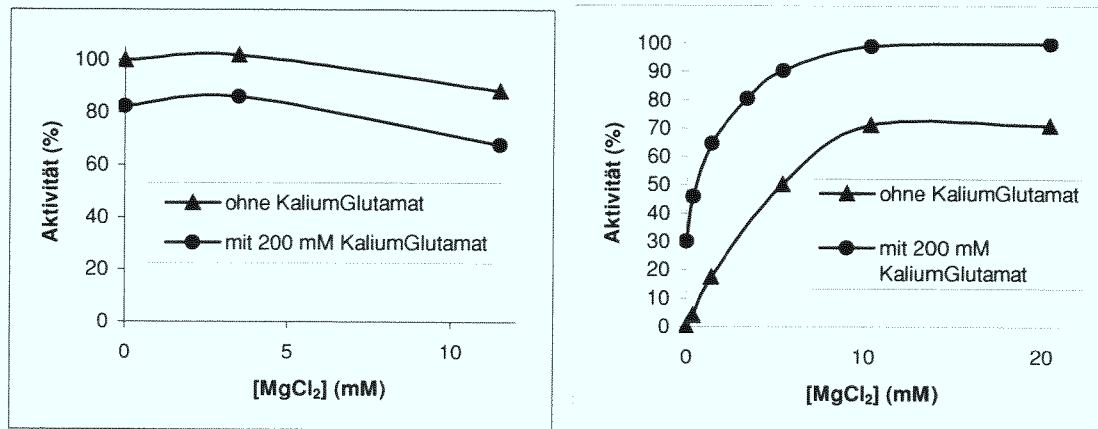


Abb. 21: Einfluß von KaliumGlutamat und $MgCl_2$ auf die Aktivität der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (links) und der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (rechts). Dabei wurden die folgenden Substrat-Konzentrationen gewählt: 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase: $[NADP] = 30 \mu M$; $[6\text{-Phosphogluconat}] = 50 \mu M$ Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase: $[NADP] = 45 \mu M$; $[Glucose\text{-}6\text{-phosphat}] = 200 \mu M$.

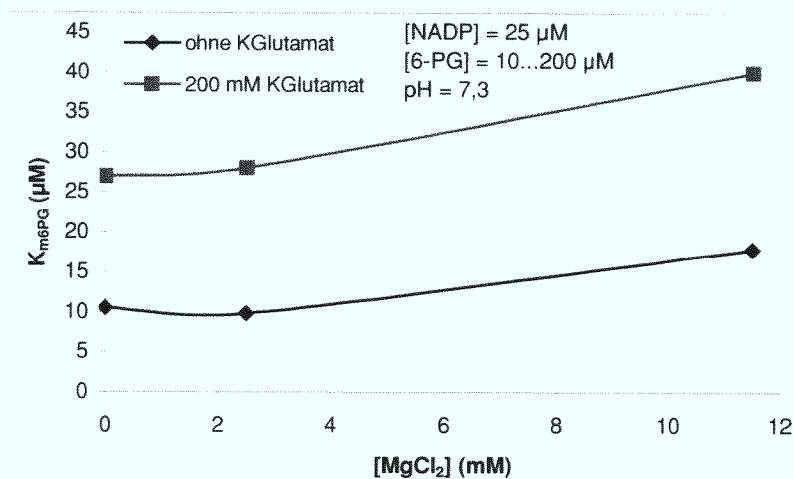


Abb.22: K_{m6PG} -Wert der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase in Abhängigkeit von $MgCl_2$ und KaliumGlutamat. Bei den angegebenen K_m -Werten handelt es sich um apparente Werte, die nur bei der angegebenen NADP-Konzentration von $25 \mu M$ gültig sind.

3.4 Untersuchungen zur Regulation des Pentosephosphatweges am Beispiel der homologen und heterologen GLUDH-Mutante von *C. glutamicum*.

Um die Pentosephosphatweg-Aktivität durch ein enzymkinetisches Modell berechnen zu können (Abschnitt 3.4.2), sind neben den ermittelten enzymkinetischen Konstanten und den Informationen zum Enzym-Mechanismus auch die Konzentrationen relevanter intrazellulärer

Metabolite und die spezifischen Aktivitäten der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase sowie der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase erforderlich. Daher wurden die homologe und heterologe GLUDH-Mutante diesbezüglich analysiert (Tab. 15 & 16). Die beiden Stämme sind bereits durch ^{13}C -Markierungsexperimente hinsichtlich ihrer Pentosephosphatweg-Aktivität untersucht worden (Marx et al., 1999), wobei die Kultivierung bei Glucose-Limitierung im Chemostaten erfolgte. Somit war es interessant die Untersuchungen bei gleichen Wachstums-Bedingungen durchzuführen, um eine direkte Vergleichbarkeit zwischen den Ergebnissen der enzymkinetischen Untersuchungen und denen der ^{13}C -Markierungs-Technik zu ermöglichen.

3.4.1 Intrazelluläre Metabolit-Konzentrationen und spezifische Enzymaktivitäten der homologen und heterologen GLUDH-Mutante.

Es wurde postuliert, daß die zellinterne Konzentration von Metaboliten, die das gemeinsame Substrat zweier Stoffwechselwege sind, einen großen Einfluß auf die Aufspaltung des Stoffflusses haben kann (LaPorte et al., 1984). Daher sollte man dies auch für Glucose-6-P erwarten, da dieser Metabolit das gemeinsame Substrat der Glycolyse und des Pentosephosphatweges ist. Doch obwohl der Pentosephosphatweg-Fluß in der homologen GLUDH-Mutante gegenüber dem der heterologen GLUDH-Mutante 3 fach erhöht ist (Marx et al., 1999), waren die Glucose-6-phosphat Konzentrationen in beiden Fällen identisch (Tab. 15), woraus ersichtlich ist, daß *in vivo* die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität nicht durch die intrazelluläre Glucose-6-phosphat Konzentration reguliert wird.

Tab.15: Intrazelluläre Konzentrationen einiger Metabolite in der homologen und heterologen GLUDH-Mutante des *C. glutamicum* Lysin-Produzenten MH20-22B. Abkürzungen: n.b. = nicht bestimmt.

Metabolit	homologe GLUDH-Mutante	heterologe GLUDH-Mutante
	mM	
Glucose-6-P	0.50 ± 0.08	0.54 ± 0.08
6-Phosphogluconat	0.95 ± 0.15	<0.15
D-Glycerinaldehyd-3-P	<0.15	0.95 ± 0.10
Ribulose-5-P	n.b.	<0.15
Fructose-1,6-P ₂	0.82 ± 0.16	0.84 ± 0.17
ATP	1.4 ± 0.3	2.0 ± 0.3
ADP	0.48 ± 0.03	0.62 ± 0.03
AMP	0.118 ± 0.005	n.b.
NADP	0.291 ± 0.03	0.130 ± 0.01
NADPH	0.26 ± 0.015	0.27 ± 0.03

Im Gegensatz dazu war die 6-Phosphogluconat-Konzentration in der homologen GLUDH-Mutante mindestens 6-fach erhöht, welches einen vergrößerten Stofffluß durch die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase ermöglicht, wenn im Falle der homologen GLUDH-Mutante keine Substrat-Sättigung vorliegt. Bei der homologen GLUDH-Mutante lag die 6-Phosphogluconat-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze, so daß hier keine genaue Konzentration angegeben werden kann. Fructose-1,6-bisphosphat ist ein kompetitiver Inhibitor bezüglich des Substrats 6-Phosphogluconat. Daher ist die Hemmung durch Fructose-1,6 bisphosphat bei der homologen GLUDH-Mutante schwächer, da in diesem Fall die 6-Phosphogluconat-Konzentration deutlich erhöht war. Da jedoch die Fructose-1,6-bisphosphat Konzentration bei beiden Stämmen deutlich unter den K_{ic} -Werten der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase lag kann *in vivo* kein großer Einfluß auf die Aktivität dieses Enzyms erwartet werden. Im Falle der heterologen GLUDH-Mutante ist die Hemmung der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase durch D-Glycerinaldehyd-3-phosphat stärker, da auf der einen Seite die intrazelluläre Konzentration bis in den Bereich des ermittelten K_{ic} -Wertes anstieg und auf der anderen Seite die 6-Phosphogluconat-Konzentration signifikant reduziert war. In der heterologen GLUDH-Mutante konnte kein Ribulose-5-phosphat nachgewiesen werden, so daß die zellinterne Konzentration auf alle Fälle unter 150 μM liegt. Da der K_{ic} -Wert von Ribulose-5-phosphat im Falle der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase jedoch bei 350 μM lag, ist dieser Metabolit wahrscheinlich nicht an der Hemmung der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase beteiligt. Gleiches gilt bezüglich beider-Dehydrogenasen für AMP und ADP, da die intrazellulären Konzentrationen weit unter den entsprechenden K_i -Werten lagen. Im Gegensatz dazu lag die ATP-Konzentration (1.4-2 mM) jedoch im Bereich der ermittelten K_i Werte der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase. Daher scheint ATP eine Rolle bei der *in vivo* Regulation dieser Enzymaktivität zu spielen. Der Wert von 0.8, der für die Energie-Ladung der homologen GLUDH-Mutante berechnet werden kann, ist ein typischer Wert für wachsende Zellen (Lengeler et al., 1999).

Es ist überraschend, daß die Konzentrationen des wichtigsten Inhibitors NADPH unter Berücksichtigung der Fehlertoleranzen bei der homologen und heterologen GLUDH-Mutante identisch waren, und daß sie weit über den K_{ic} -Werten der beiden Enzyme lagen (Tab. 15). Der wichtigste Unterschied bezüglich aller identifizierten Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase Effektoren war die Konzentration von NADP, die im Falle der heterologen GLUDH-Mutante um einen Faktor 2 reduziert war. Trotzdem war die NADP-Konzentration in der heterologen GLUDH-Mutante immer noch mehrfach gegenüber den ermittelten K_m -Werten von 40 μM bzw. 17 μM erhöht (Tab. 9). Dies zeigt, daß

nicht die direkten NADP und NADPH Konzentrationen einen Einfluß auf die Aktivitäten der beiden-Dehydrogenasen ausüben, sondern vielmehr deren Konzentrations-Verhältnis.

Die zu erwartende *in vivo*-Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase ist nicht nur primär von der intrazellulären NADP, NADPH und Glucose-6-phosphat Konzentration abhängig, sondern auch von der maximalen Aktivität des Enzyms (Segel, 1975). Die spezifische Enzymaktivität im Rohextrakt konnte als maximale *in vivo*-Aktivität angesehen werden, da durch den Zellaufschluß Effektoren wie NADPH stark verdünnt wurden und bei der Aktivitätsmessung die Konzentrationen von Glucose-6-phosphat und NADP weit über den entsprechenden K_m -Werten lagen. Gleiches gilt bezüglich der Enzymaktivität auch für die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase. Es wurde festgestellt, daß die spezifischen Enzym-Aktivitäten der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase während des 'Steady State' der Chemostat-Kultur in der heterologen GLUDH-Mutante um ca. 30 % kleiner sind, welches mit dem verringerten Pentosephosphatweg-Fluß in der heterologen GLUDH-Mutante korreliert (Tab. 16).

Zusätzlich wurden auch die spezifischen Aktivitäten der homologen und heterologen Glutamat-Dehydrogenase bestimmt (Tab. 16). Die herterologe Glutamat-Dehydrogenase ist hauptsächlich NAD-spezifisch, woraus ein geringerer NADPH-Bedarf der heterologen GLUDH-Mutante und somit auch ein verringerter Stofffluß durch den Pentosephosphatweg resultiert (Marx, 1999). Die Bestimmung dieser Werte war nur für die Stammüberprüfung wichtig und steht nicht im direkten Zusammenhang mit den Untersuchungen zur Regulation des Pentosephosphatweges.

Tab.16: Spezifische Aktivitäten der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase und der Glutamat-Dehydrogenase im Roh-Extrakt der homologen und heterologen GLUDH-Mutante während des stationären Zustands der Glucose-limitierten kontinuierlichen Kultivierung. *Abkürzungen:* TG = Trockengewicht.

Enzyme	homologe GLUDH-Mutante	heterologe GLUDH-Mutante
	$\mu\text{mol}/(\text{min} \times \text{mg TG})$	
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	0.069 ± 0.003	0.045 ± 0.006
6-Phosphogluconat-Dehydrogenase	0.105 ± 0.006	0.072 ± 0.006
homologe bzw. heterologe Glutamat-Dehydrogenase	1.9 ± 0.15 (NADP)	2 ± 0.15 (NAD) 0.056 ± 0.014 (NADP)

3.4.2 Berechnung der *in vivo*-Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase

Im Falle der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase wurde neben NADPH kein weiterer wichtiger Regulator des Enzyms gefunden, so daß zur Berechnung der *in vivo*-Aktivität dieses Enzyms neben den intrazellulären Konzentrationen von NADP und Glucose-6-phosphat nur die intrazelluläre Konzentration von NADPH berücksichtigt werden muß. Aus der Theorie geordneter Bi-Bi-Reaktionsmechanismen (Segel, 1975) ergibt sich für diesen speziellen Fall Gleichung (5), welche die Reaktionsgeschwindigkeit der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase bei gleichzeitiger Anwesenheit von NADP, Glucose-6-phosphat und NADPH beschreibt. Da mit Gleichung (5) die *in vivo*-Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase berechnet wurde, wird Gleichung (5) durch nicht-lineare Regression an alle gemessenen Anfangs-Geschwindigkeiten angepaßt, die sich bei gleichzeitiger Variation von Glucose-6-phosphat, NADP und NADPH ergaben. Die erhaltenen Werte für K_{mG6P} , K_{mNADP} , K_{iNADP} und $K_{icNADPH}$ (Tab. 17), die sich kaum von denen durch Gleichung (1) und (2) ermittelten Werten unterschieden, wurden für die *in vivo*-Aktivitäts-Berechnungen verwendet. Da sich aus Gleichung (5) die $K_{iuNADPH}$ - und $K_{icNADPH}$ -Werte bezüglich Glucose-6-phosphat durch den $K_{icNADPH}$ -Wert bezüglich NADP berechnen lassen, werden diese beiden Werte redundant und daher nicht angegeben.

$$v = \frac{v_{\max} [NADP][G6P]}{K_{iNADP} K_{mG6P} \left(1 + \frac{NADPH}{K_{iNADPH}}\right) + K_{mG6P} [NADP] + K_{mNADP} [G6P] \left(1 + \frac{NADPH}{K_{iNADPH}}\right) + [NADP][G6P]} \quad (5)$$

Tab.17: Enzymkinetische Konstanten der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, wie sie sich durch nichtlineare Regression mit Gleichung (5) als Modellfunktion ergeben. Abkürzungen wie in Tab. 9 und Tab. 10.

Enzym	Gleichung	K_m (G6P)	K_m (NADP)	$K_{icNADPH}$	K_i (NADP)
		μM			
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	5	150 ± 21	37 ± 3	$17,7 \pm 1,7$	45 ± 11

Durch Gleichung (5) konnte die *in vivo*-Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase in der homologen und heterologen GLUDH-Mutante aus den intrazellulären NADP, NADPH und Glucose-6-phosphat Konzentrationen (Tab. 15) berechnet werden (Tab. 19). Auch die spezifischen Aktivitäten der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (Tab. 16), die der Variablen $v_{\max}$ in Gleichung (5) entsprechen, sind hierzu erforderlich. Die Resultate stimmten gut mit

dem Stofffluß durch den oxidativen Teil des Pentosephosphatweges überein, wie er zuvor durch ^{13}C Markierungsexperimente bestimmt werden konnte (Marx, 1999). Da zur Berechnung der *in vivo*-Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase insgesamt 8 Meßwerte erforderlich sind, tritt ein Gesamtfehler bei der Flußberechnung unter Berücksichtigung aller Meßwertschwankungen von ca. 30 % auf.

Zur Umrechnung der durch ^{13}C Markierung bestimmten und relativ auf die Glucose-Aufnahmerate bezogenen Pentosephosphatweg-Aktivität sind alle der in Tab. 18 aufgeführten Daten notwendig. Die Umrechnung erfolgte gemäß Gleichung (6), in der D die Verdünnungsrate im Chemostaten, TG das Trockengewicht, [Glucose] die Glucose-Konzentration im zulaufenden Medium und OD die optische Dichte der Zellsuspension bezeichnen.

$$\text{Aktivität} = \frac{D \times [\text{Glucose}]}{\frac{TG}{\text{Volumen} \times OD} \times OD} \quad (6)$$

Tab. 18: Werte zur Berechnung der *in vivo*-Flüsse durch die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase auf Basis der ^{13}C -Stofffluß-Daten der homologen und heterologen GLUDH-Mutanten (Marx, 1999) und Endergebnisse. Für diese Berechnung wurde das Trockengewicht der Zellen (TG), die Verdünnungsrate während der Glucose limitierten Chemostat-Kultur (D), die Glucose-Konzentration im Medium [Glucose] und die optische Dichte der Zellsuspension (OD) verwendet.

	PPW-Aktivität (%)	D (h^{-1})	[Glucose]/mM	$\frac{\text{mgTG}}{\text{ml} \times \text{OD}}$	OD	Glucose-Fluß in $\frac{\text{nmol}}{\text{mgTG min}}$	Gluc-Fluß durch den PPW in $\frac{\text{nmol}}{\text{mg}_{\text{TG}} \text{ min}}$
hom. GLUDH	76.3	0.09	41.7	0.4	7.8	20	15,2
heterol. GLUDH	24.6	0.09	41.7	0.37	10	16,9	4,2

Durch die Quantifizierung von Metabolitpools und spezifischen Enzymaktivitäten konnte am Beispiel der beiden GLUDH-Mutanten gezeigt werden, daß die Regulation des oxidativen Teils vom Pentosephosphatweg in *C.glutamicum* hauptsächlich durch veränderte spezifische Aktivitäten der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase sowie durch Variation des NADPH/NADP Konzentrations-Verhältnisses erfolgt, während die intrazelluläre Glucose-6-phosphat- Konzentration zumindest im Falle der beiden GLUDH-Mutanten bei der *in vivo*-Regulation keine Rolle spielt. Die spezifische Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase ist gemäß Gleichung (5) direkt proportional zur *in vivo*-Aktivität des Enzyms.

Tab.19: *In vivo* Aktivitäten der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase in der homologen und heterologen GLUDH-Mutante. Die Berechnungen erfolgten gemäß den Gleichungen (5) u. (6).

	<i>in vivo</i> -Aktivität der Glucose-6-P-Dehydrogenase	
	homologe GLUDH-Mutante	heterologe GLUDH-Mutante
	nmol Glucose-6-phosphat/(mg TG×min)	
berechnet gemäß Gleichung (5)	17,1	6
wie durch ¹³ C-Stoffflußanalyse bestimmt (Marx, 1999) und gemäß Gleichung (6) umgerechnet	15,2	4,2

Da im Falle der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase bei der homologen GLUDH-Mutante keine Übereinstimmung mit den ¹³C-Stofffluß-Daten erzielt werden konnte und im Falle der heterologen GLUDH-Mutante 6-Phosphogluconat, dessen intrazelluläre Konzentration zur Berechnung der *in vivo*-Aktivität notwendig ist, nicht nachweisbar war, wurden für die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase keine weiteren *in vivo*-Aktivitäts Berechnungen durchgeführt.

3.4.3 Sensitivität der *in vivo*-Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase gegenüber der Variation intrazellulärer Metabolit-Konzentrationen.

Durch Gleichung (5), die durch die gute Übereinstimmung der enzymkinetisch berechneten *in vivo*-Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase mit den ¹³C-Stofffluß-Daten gestützt wird, wurde im weiteren der Einfluß unterschiedlicher Metabolit-Konzentrationen auf die Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase abgeschätzt. Da die intrazellulären Konzentrationen von NADP und NADPH in *C.glutamicum* sehr viel größer als die entsprechenden K_m - und K_i -Werte sind, wird die Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und somit auch die *in vivo*-Aktivität des Pentosephosphatweges weniger durch die absoluten NADP und NADPH-Konzentrationen beeinflusst, sondern eher durch das NADP/NADPH-Konzentrations-Verhältnis. Dies wird am Beispiel der beiden GLUDH-Mutanten deutlich, bei denen trotz der konstanten NADPH-Konzentration die *in vivo*-Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase bei der heterologen GLUDH-Mutante wegen der verringerten NADP-Konzentration geringer war. Auch die Berechnungen durch Gleichung (5), für die eine intrazelluläre Glucose-6-phosphat Konzentration von 500 μ M verwendet wurde, verdeutlicht die Bedeutung des NADP/NADPH-Konzentrations-Verhältnisses (Abb. 23).

Um die Beeinflussung der *in vivo*-Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase durch die Glucose-6-phosphat-Konzentration abzuschätzen, wurden gemäß der homologen GLUDH-Mutante NADP- und NADPH-Konzentrationen von 290 μM bzw. 260 μM in Gleichung (5) eingesetzt (Tab. 15) und die Glucose-6-P-Konzentration variiert. Das Resultat (Abb. 24) zeigt, daß der Fluß sensitiv gegenüber Veränderungen der Glucose-6-phosphat Konzentration ist. Überraschenderweise findet jedoch trotzdem *in vivo* keine Veränderung der Glucose-6-phosphat Konzentration im Vergleich zur heterologen GLUDH-Mutante statt (Tab.15).

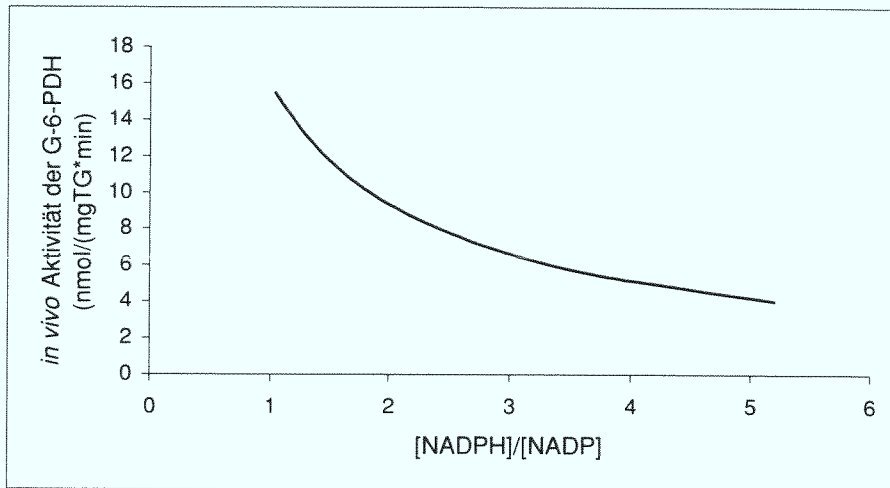


Abb. 23: Abhängigkeit der *in vivo*-Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase vom NADPH/NADP-Konzentrations-Verhältnis (gemäß Gleichung (5)). Die NADP Konzentration wurde zwischen 50 μM und 250 μM variiert, während die NADPH Konzentration in allen Fällen 260 μM betrug.

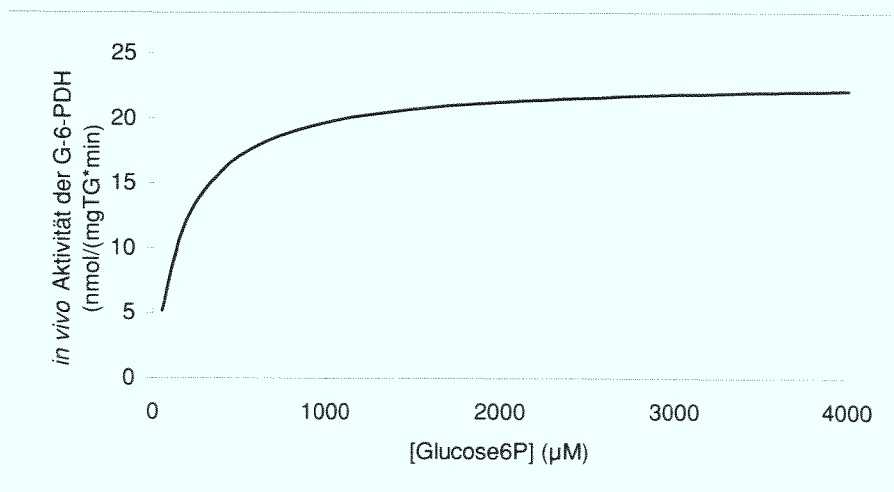


Abb.24: *In vivo*-Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase in Abhängigkeit von der Glucose-6-phosphat Konzentration. Die NADP und NADPH-Konzentrationen waren bei dieser Berechnung konstant und mit denen der homologen GLUDH-Mutante identisch (Tab. 15).

3.5 Untersuchungen zur Regulation des Pentosephosphatweges am Beispiel der *C. glutamicum* Stämme MH20-22B und LE4

Die Stämme MH20-22B und LE4 sind isogen und unterscheiden sich nur hinsichtlich der Regulation ihrer Aspartat-Kinase (Schrumpf et al., 1992). Während beim Stamm LE4 eine negative Feedback-Hemmung des Enzyms durch Lysin stattfindet besteht diese Hemmung beim Stamm MH20-22B nicht, was zur Folge hat, daß der Stamm MH20-22B im Gegensatz zum Stamm LE4 Lysin produziert. Da pro Lysin-Molekül 4 NADPH-Moleküle verbraucht werden, sollte daher bei beiden Stämmen der NADPH-Bedarf und somit auch die Aktivität des Pentosephosphatweges stark unterschiedlich sein. Somit war es interessant analog zur homologen und heterologen GLUDH-Mutante auch bei diesen beiden Stämmen die Regulation des Pentosephosphatweges zu untersuchen. Während bei der homologen und heterologen GLUDH-Mutante die Kultivierung der Zellen kontinuierlich unter Glucose-Limitierung erfolgte, wurden bei den Stämmen MH20-22B und LE4 Batch-Kulturen untersucht. Batch-Prozesse sind bei der industriellen Lysin-Produktion von großer Bedeutung, so daß es interessant war die Veränderung intrazellulärer Metabolitpools im Verlauf einer Batch-Kultivierung zu untersuchen.

Mit *C. glutamicum* in Batch Kultur sind bereits umfangreiche Stoffflußanalysen auf der Basis von Massenbilanzierungen (Vallino & Stephanopoulos, 1994) und ^{13}C -Markierungstechnik (Rollin et al., 1995 und Dominguez et al. 1998) durchgeführt worden, während die Veränderungen einzelner Metabolitkonzentrationen im Zentralstoffwechsel während des Verlaufs einer Batch-Kultivierung bisher nur in wenigen Fällen untersucht wurden (Gourdon & Lindley, 1999). Daher war das Ziel intrazelluläre Metabolit-Konzentrationen wie NADP, NADPH, ATP, ADP, Glucose-6-phosphat etc. im Verlauf der Batch- Kultivierungen zu quantifizieren. Das Medium der Batch-Kulturen der beiden Leucin-auxotrophen *C. glutamicum* Stämme LE4 und MH20-22B enthielt 30 g/l Glucose und 150 mg/l Leucin. Entscheidend hierbei war, daß die Zellen vor dem Verbrauch der Glucose Leucin-limitiert waren und trotz ausreichender Glucose-Versorgung nicht in der Lage waren ihre Wachstumsrate konstant zu halten (Abb. 25). Sobald das im Medium enthaltene Leucin verbraucht war, nahmen die CO_2 -Produktion und die Wachstumsrate stark ab. Bei den beiden isogenen Stämmen, die sich lediglich bezüglich der Feedback-Regulation ihrer Aspartat-Kinasen unterscheiden (Schrumpf et al., 1992), traten nun deutliche Unterschiede auf. Im Gegensatz zum Stamm LE4 begann der Stamm MH20-22B bei Leucin-Limitierung mit einer starken Lysin Produktion, da die Aspartat-Kinase anders als beim Stamm LE4 nicht durch Lysin gehemmt wurde. Beim Stamm MH20-22B konnte eine Endkonzentration von 40 mM Lysin erreicht werden, während sie beim

Stamm LE4 nur 1,3 mM betrug. Da beide Stämme keine Isopropylmalat-Dehydratase-Aktivität haben (Schrumpf et al., 1992), wurde neben Lysin auch α -Isopropylmalat ins Medium ausgeschieden. Die Konzentrationen betrugen am Ende der Batch-Kulturen beim Stamm MH20-22B 4,8 mM und beim Stamm LE4 7,7 mM. Auch konnte zu diesem Zeitpunkt Lactat im Medium festgestellt werden, wobei die Konzentrationen bei beiden Stämmen im Bereich von 1,7 mM lagen. Es war nun interessant das Verhalten der intrazellulären Metabolit-Konzentrationen im Bereich der einsetzenden Leucin-Limitierung zu untersuchen.

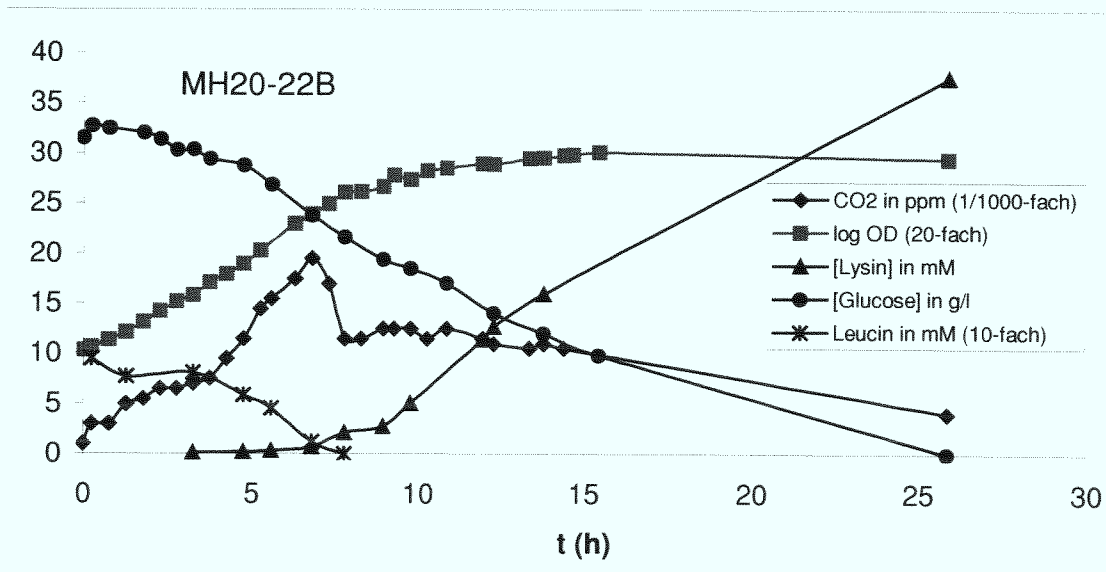
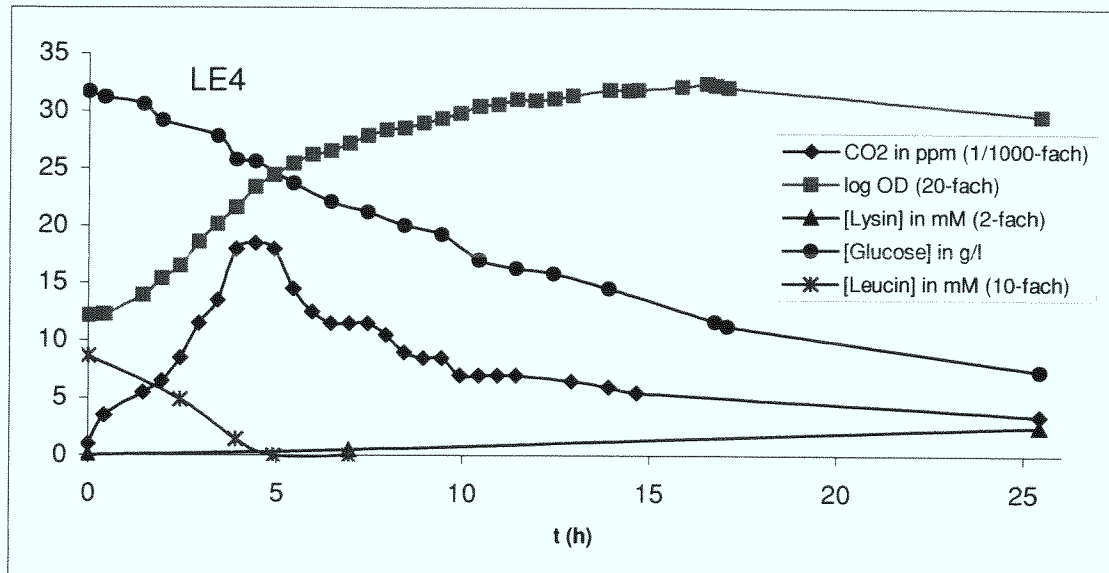


Abb.25: Verlauf des CO₂-Partialdrucks, der optischen Dichte und der extrazellulären Lysin-Leucin- und Glucose- Konzentrationen während der Batch-Kultivierungen der *C.glutamicum*-Stämme LE4 (oben) und MH20-22B (unten).

Bei der homologen und heterologen GLUDH-Mutante wurde gezeigt, daß das NADPH/NADP-Konzentrations-Verhältnis eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Pentosephosphatweges spielt. Daher sollte es für die Zellen wichtig sein das Konzentrationsverhältnis dieser Metabolite, insbesondere bei verändertem NADPH-Bedarf für reduktive Biosynthesen, genau zu steuern.

Dies konnte bei beiden Fermentationen auch tatsächlich beobachtet werden, wobei zum Zeitpunkt der einsetzenden Leucin-Limitierung (4,4 h (Stamm LE4) bzw. 6,7 h (Stamm MH20-22B) nach Fermentations-Start) erwartungsgemäß die größten Veränderungen beobachtet werden konnten (Abb. 26).

Die Leucin-Limitierung führte bei beiden Stämmen zu einer reduzierten Wachstumsrate, und somit zu einem reduzierten NADPH-Bedarf für die Biomasseproduktion. Dadurch erklärt sich beim Stamm LE4 die deutliche Vergrößerung des NADPH/NADP-Konzentrations-Verhältnisses von ca. 1,8 auf 4 (Abb. 27), da NADPH in geringerem Umfang zur Biomasseproduktion gebraucht wird und sich daher in der Zelle anstaut. Durch diese Veränderung des NADPH/NADP-Konzentrations-Verhältnisses wird, gemäß den gewonnenen *in vitro*-Enzymdaten der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, die Pentosephosphatweg-Aktivität signifikant reduziert, wodurch sich der Organismus dem veränderten NADPH-Bedarf sehr flexibel durch eine Verringerung der NADPH-Produktion anpassen kann. Überraschenderweise wurde beim Stamm MH20-22B jedoch keine derartige Veränderung des NADPH/NADP-Konzentrations-Verhältnisses (Abb. 27) gefunden, obwohl sich auch hier die Wachstumsrate nach Leucin-Limitierung deutlich verkleinerte. Im Gegensatz zum Stamm LE4 begann aber der Stamm MH20-22B nach Leucin-Limitierung mit einer starken Lysin-Produktion, so daß ein neuer NADPH verbrauchender Stoffwechselweg aktiv war, der das relativ konstante NADPH/NADP-Konzentrations-Verhältnis erklärbar macht.

Um die beobachteten Veränderungen des NADPH/NADP-Konzentrations-Verhältnisses besser verstehen zu können, wurde eine NADPH Bilanzrechnung durchgeführt, bei der, basierend auf den zur Verfügung stehenden Daten zur Lysinproduktion und zum Wachstum der beiden Stämme, der NADPH-Bedarf pro Biotrockenmasse berechnet wurde (Abb. 28). Für diese Rechnungen wurde ein NADPH-Bedarf für die Biomasseproduktion von 11,51 mmol/gTG angenommen, der speziell für *C. glutamicum* beim exponentiellen Wachstum auf Glucose bestimmt worden ist (Cocaign-Bousquet, 1996). Aus der Lysin-Bildung pro mg Trockengewicht läßt sich der NADPH-Bedarf für die Lysin-Produktion errechnen, wobei 4 NADPH pro gebildetem Lysin benötigt werden. Es resultierte, daß beim Stamm MH20-22B der NADPH-Bedarf auch nach der Leucin-Limitierung unverändert blieb, das heißt, daß der

durch die verringerte Biomasseproduktion herabgesetzte NADPH-Verbrauch zunächst vollständig durch die Lysin-Produktion kompensiert wurde. Damit erklärt sich beim Stamm MH20-22B das konstante NADPH/NADP-Konzentrations-Verhältnis. Beim Stamm LE4 nimmt dagegen der NADPH-Bedarf nach Leucin-Limitierung stark ab, so daß sich hier NADPH in der Zelle anstaut (Abb. 26).

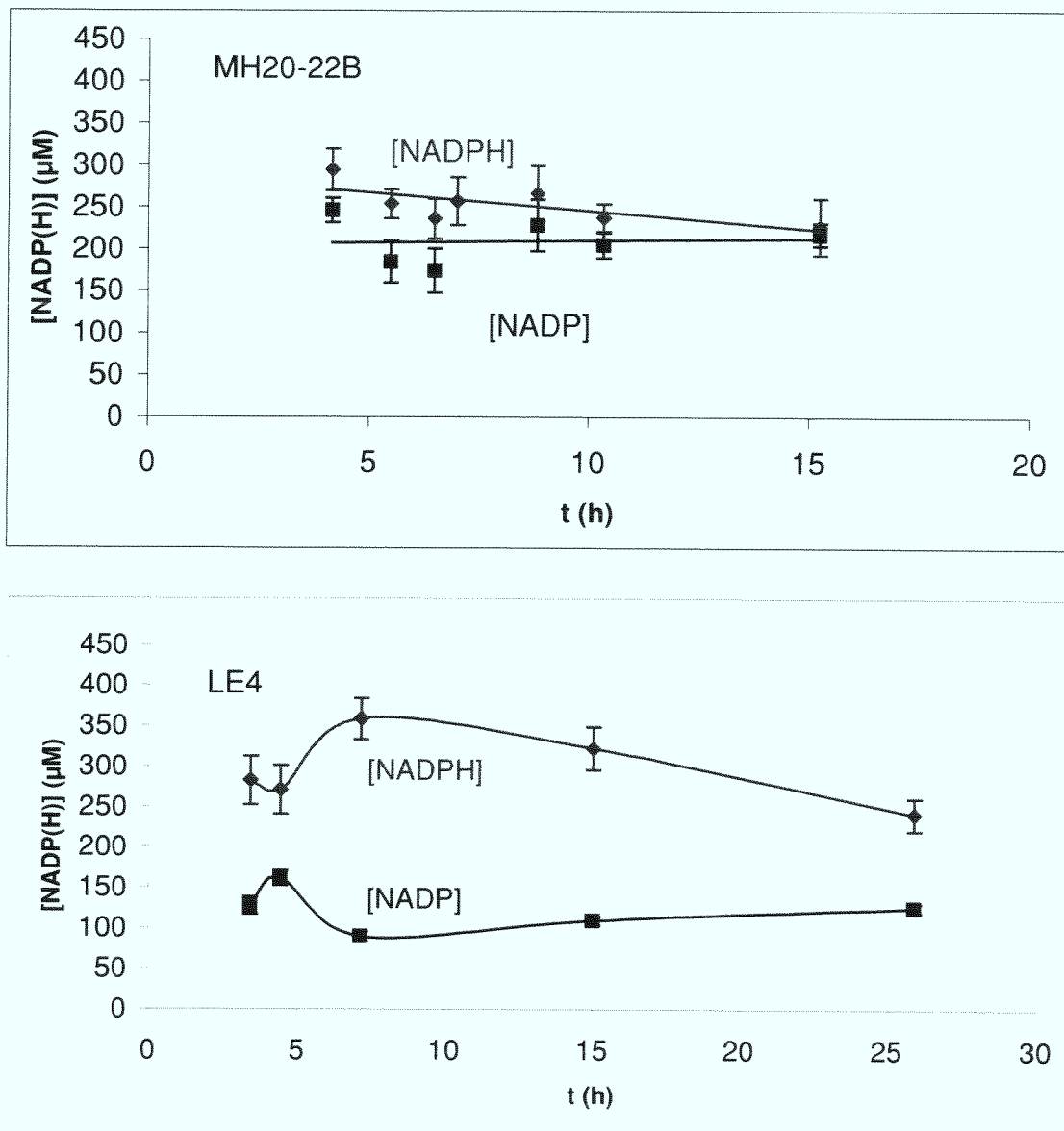


Abb.26: Intrazelluläre NADP und NADPH-Konzentrationen in den *C. glutamicum* Stämmen MH20-22B (oben) und LE4 (unten) in Abhängigkeit von der Zeit. Beim Stamm MH20-22B bleiben die beiden Konzentrationen ungefähr konstant, während beim Stamm LE4 die NADPH-Konzentration nach einsetzender Leucin-Limitierung ansteigt und die NADP-Konzentration abfällt.

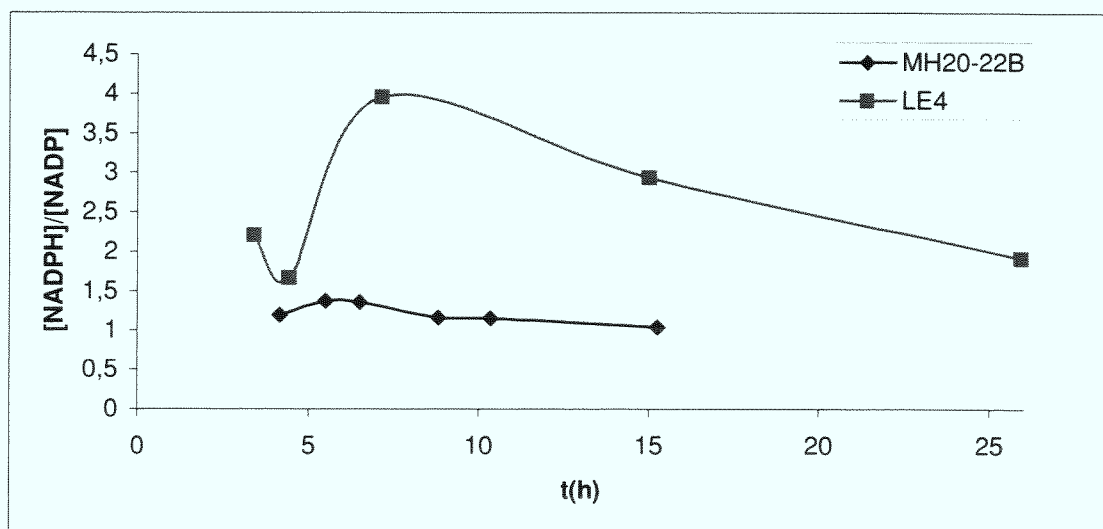


Abb.27: NADPH/NADP Konzentrations-Verhältnis bei den Stämmen MH20-22B und LE4 in Abhängigkeit der Zeit (Die Stundenzählung beginnt mit dem Animpfen der Kulturen). Im Gegensatz zum Stamm MH20-22B nimmt das NADPH/NADP-Konzentrations-Verhältnis beim Stamm LE4 nach Leucin-Limitierung stark zu.

Im weiteren Verlauf der Batch-Kultivierung des Stammes MH20-22B nahm der NADPH-Verbrauch jedoch ab, obwohl die Lysin-Produktionsrate in etwa konstant blieb. Dies läßt sich zum einen durch die vollständige Einstellung des Wachstums, die erst mit mehrstündiger Verzögerung nach der Leucin-Limitierung einsetzt, und zum anderen durch die Verteilung der gleichen Lysin-Produktion auf mehr Biomasse am Ende der Fermentation erklären. Interessant ist, daß sich das NADPH/NADP-Konzentrations-Verhältnis trotz des verringerten NADPH-Bedarfs beim Stamm MH20-22B nicht ändert, und daß auch beim Stamm LE 4 langsam wieder das NADPH/NADP-Konzentrations-Verhältnis eingestellt wird, welches vor der Leucin-Limitierung ermittelt werden konnte. Dies läßt auf zusätzliche, bisher unbekannte NADPH verbrauchende Prozesse schließen, die am Ende der Batch-Kultivierung eine große Bedeutung erlangen. Auch könnte ein Anstieg der Konzentration eines bisher unbekannten Inhibitors der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase eine Ursache sein, da dann die wirkliche *in vivo*-Aktivität des Pentosephosphatweges kleiner wäre.

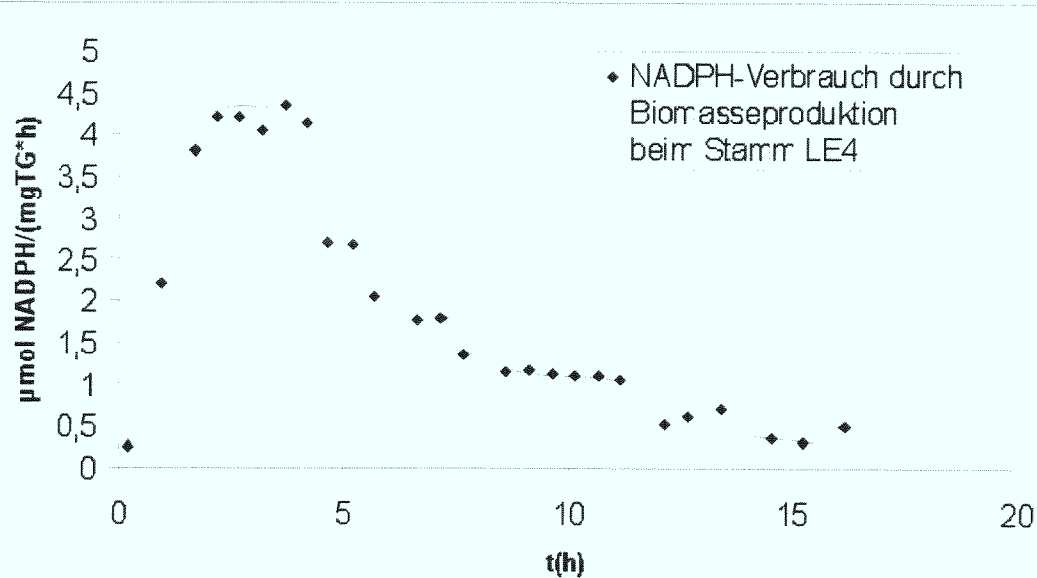
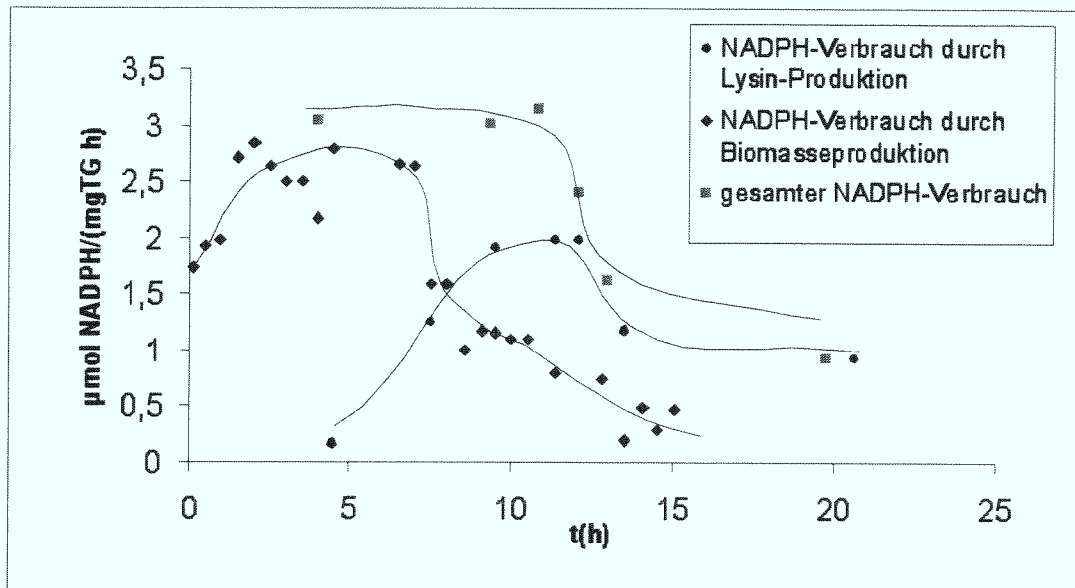


Abb.28: NADPH-Bedarf der *C. glutamicum*-Stämme MH20-22B und LE4. Beim Stamm MH20-22B werden sowohl der NADPH-Bedarf für die Biomassenproduktion, als auch der NADPH-Bedarf für die Lysin-Produktion angegeben. Der gesamte NADPH-Bedarf blieb beim Stamm MH20-22B auch nach Leucin-Limitierung für ca. 3 h konstant. Beim Stamm LE4 fiel der NADPH Bedarf direkt nach Leucin-Limitierung ab, da in diesem Fall keine Lysin-Produktion stattfand.

Um eine enzymkinetische Berechnung der *in vivo*-Aktivitäten der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase durchführen zu können, müssen nach Möglichkeit alle relevanten Substrate, Produkte und sonstige Effektoren der Glucose-6-phos-

phat-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase quantifiziert werden. Es ergab sich jedoch, daß die Konzentrationen von 6-Phosphogluconat und Ribulose-5-phosphat sich durch die angewendeten enzymatischen Verfahren nicht nachweisen ließen. Ihre intrazellulären Konzentrationen liegen daher vermutlich unter 200 μM , so daß weitere enzymkinetische Modellrechnungen wie bei den beiden durchgeführten Chemostat-Kultivierungen der homologen und heterologen GLUDH-Mutante auf die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase beschränkt bleiben müssen, da zur Berechnung der *in vivo*-Aktivität der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase mindestens die intrazelluläre Konzentration von 6-Phosphogluconat bekannt sein muß.

Zur Berechnung der *in vivo*-Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase durch Gleichung (5) ist neben den NADP- und NADPH-Konzentrationen auch die intrazelluläre Glucose-6-phosphat Konzentration erforderlich. Es wurde festgestellt, daß während des Übergangs von der exponentiellen Wachstumsphase zur Leucin-limitierten Phase ein deutlicher Abfall der intrazellulären Glucose-6-phosphat-Konzentration von ca. 4 mM bis auf ca. 2 mM stattfand, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stämmen LE4 und MH20-22B auftraten (Abb. 29). Auch im weiteren Verlauf der Batch-Kultivierungen nahm die Glucose-6-phosphat Konzentration weiter ab, jedoch mit einer deutlich verringerten Rate.

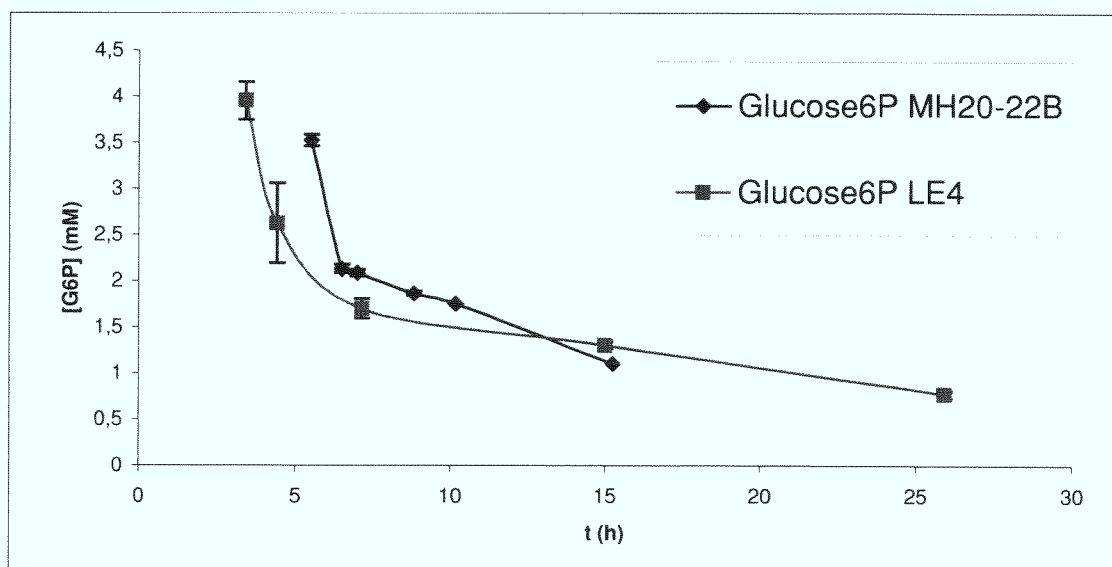


Abb.29: Abhängigkeit der intrazellulären Glucose-6-P Konzentration in den Stämmen MH20-22B und LE4 von der Zeit (Die Stundenzählung beginnt mit dem Animpfen der Kulturen). Nach 4,4h (Stamm LE4) bzw. 6,7 h (Stamm MH20-22B) sind die Zellen Leucin-limitiert.

Gemäß Gleichung (5) ist die *in vivo*-Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase direkt proportional zur spezifischen Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. Sie veränderte sich bei den Stämmen LE4 und MH20-22B im Verlauf der Batch-Kultivierung nicht (Tab. 20), so daß davon ausgegangen wurde, daß die Regulation des Stoffflusses in den Pentosephosphatweg auch nach der Leucin-Limitierung nicht durch Veränderung der Konzentration der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase erfolgt. Es fiel allerdings auf, daß die Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase beim Stamm MH20-22B kleiner war, was mit der geringeren Wachstumsrate vor Leucin-Limitierung beim Stamm MH20-22B ($0,25 \text{ h}^{-1}$ im Vergleich zu $0,37 \text{ h}^{-1}$ beim Stamm LE4) und der daraus resultierenden geringeren maximalen NADPH-Bedürftigkeit gut übereinstimmt. Die spezifische Aktivität der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase verhielt sich analog zu derjenigen der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, war jedoch durchgehend 1,5- bis 2-fach erhöht (Tab. 20).

Tab.20: Spezifische Aktivitäten der Glucose-6-phosphat- und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenasen in den Stämmen MH20-22B und LE4 in Abhängigkeit von der Zeit (Die Stundenzählung beginnt mit dem Animpfen der Kulturen).

Zeit	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase
Stamm LE4		
h	mU/mgProtein	
2,9	$130,8 \pm 1,84$	240 ± 10
3,9	$136 \pm 3,1$	270 ± 20
4,9	$124,28 \pm 10,9$	240 ± 10
7,4	$118,93 \pm 9,4$	280 ± 20
14,9	$125,35 \pm 6$	287 ± 17
25,9	$120,8 \pm 2,8$	240 ± 10
Stamm MH20-22B		
h	mU/mgProtein	
4,4	$86 \pm 0,5$	$130 \pm 0,8$
5,6	92 ± 4	$136 \pm 1,5$
7,5	88 ± 12	120 ± 5
10,4	71 ± 11	106 ± 6
15,25	76 ± 5	128 ± 8

Wie im Falle der kontinuierlich unter Glucose-Limitierung kultivierten heterologen und homologen GLUDH-Mutante, konnte aus den intrazellulären Konzentrationen von NADP, NADPH und Glucose-6-phosphat und der spezifischen Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase die *in vivo*-Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase gemäß Gleichung (5) abgeschätzt werden. Da die Oxidation von Glucose-6-phosphat zu 6-Phosphoglu-

conat irreversibel ist (Levy, 1979), konnte angenommen werden, daß die *in vivo*-Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase dem Stofffluß in den Pentosephosphatweg entspricht (Abb. 30). Die Berechnungen zeigten, daß die Aktivität des Pentosephosphatweges vor der Leucin-Limitierung beim Stamm LE4 etwas höher ist, welches sich durch die erhöhte Wachstumsrate und dem daraus resultierenden höheren NADPH-Bedarf erklärt. Nach Leucin-Limitierung nahm im Falle des Stammes LE4 der Pentosephosphatweg-Fluß deutlich ab, während er beim Stamm MH20-22B konstant blieb. Dieses war zu erwarten, da die Veränderung des NADPH/NADP-Konzentrations-Verhältnisses (Abb. 27) gemäß den ermittelten enzymkinetischen Daten einen größeren Einfluß auf die Aktivität des Pentosephosphatweges hatte, als die Glucose-6-P-Konzentration (Abb. 29). Die Verringerung der Glucose-6-phosphat-Konzentration nach Leucin-Limitierung der Batch-Kultur hat kaum einen Einfluß auf die *in vivo*-Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, welches durch den im Vergleich zur intrazellulären Glucose-6-phosphat Konzentration kleinen K_m -Wert der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase von 150 μM erklärbar wird.

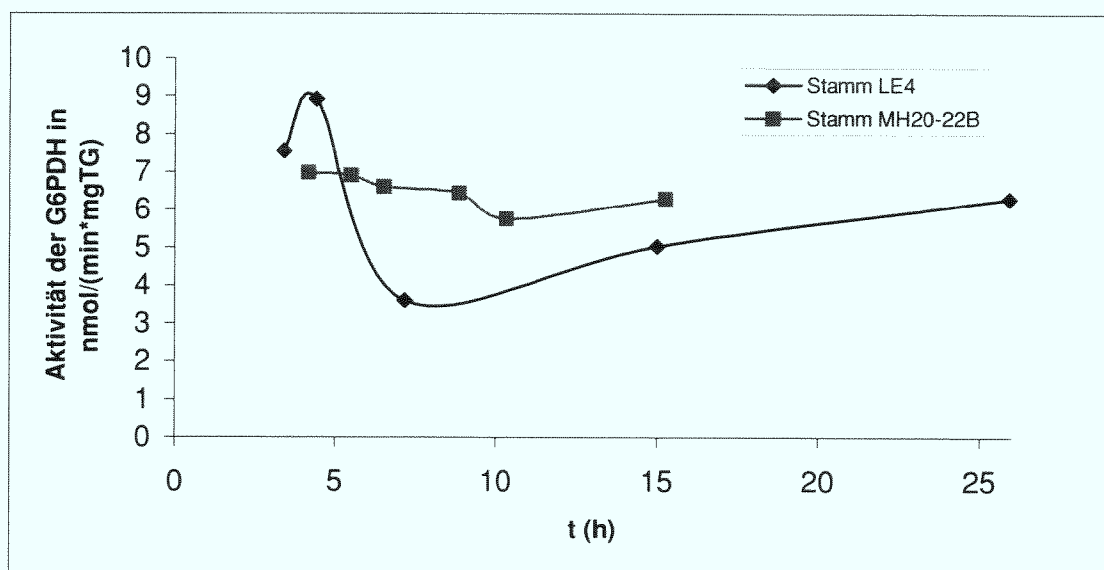


Abb.30: Berechnung der *in vivo*-Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase in den Stämmen MH20-22B und LE4 durch Gleichung (5). Die Aktivität beim Stamm MH20-22B blieb auch nach der Leucin-Limitierung konstant, während sie im Stamm LE4 stark abnahm.

Bisher wurde die Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, die dem Stofffluß in den Pentosephosphatweg entspricht, auf das Zell-Trockengewicht bezogen. Durch den prozentualen Bezug des Stoffflusses auf die Glucose-Aufnahmerate wird es möglich, die Aufteilung des gesamten Stoffflusses zwischen der Glycolyse und dem Pentosephosphatweg abzuschät-

zen. Dabei wurde festgestellt, daß sowohl beim Stamm MH20-22B, als auch beim Stamm LE4 der relative Anteil des Pentosephosphatweges nach Leucin-Limitierung anstieg (Tab. 21) und das, obwohl der auf das Trockengewicht bezogene Stofffluß beim Stamm LE4 abfiel und beim Stamm MH20-22B konstant blieb. Dies wurde dadurch verursacht, daß die Glucose-Aufnahmerate nach Leucin-Limitierung bei beiden Stämmen absank. Während des exponentiellen Wachstums vor der Leucin Limitierung (Phase I) konnte ein 10 %iger Anteil am gesamten Glucose-Fluß, und während der Leucin-Limitierung (Phasen II&III) ein stark ansteigender Anteil von 30-60 % abgeschätzt werden (Tab. 21). In Phase II der Batch Kultivierung der Stämme LE4 und MH20-22B sind die Zellen zwar schon Leucin-limitiert, wachsen aber noch mit verringerter Wachstumsrate weiter. Beim Stamm MH20-22B ist in dieser Phase der NADPH-Bedarf mit demjenigen während des exponentiellen Wachstums vergleichbar, während er beim Stamm LE4 deutlich verringert ist (Abb. 28). In Phase III findet kein Wachstum mehr statt und auch der NADPH-Bedarf des Stammes MH20-22B geht in dieser Phase zurück.

Obwohl der NADPH-Bedarf beim Stamm MH20-22B durch die Lysin-Produktion größer ist, ist der relative Anteil des Pentosephosphatweges bei beiden Stämme ungefähr gleich. Demnach ist allein die erhöhte Glucose-Aufnahmerate beim Stamm MH20-22B für die erhöhte Aktivität des Pentosephosphatweges verantwortlich (Tab. 21).

Obwohl während des exponentiellen Wachstums viel NADPH für die Biomassenproduktion gebraucht wird, ist der relative Anteil des Stoffflusses durch den Pentosephosphatweg am gesamten Fluß mit ca. 10 % sehr viel kleiner, als während der Leucin-Limitierung. Dies läßt sich durch die große Bedeutung der Isocitrat-Dehydrogenase für die NADPH-Produktion während der exponentiellen Wachstumsphase erklären. Bei einer zum Stamm MH20-22B vergleichbaren Batch-Kultivierung des *C.glutamicum* Stammes ATCC21253, der bei Threonin-Limitierung Lysin ausscheidet, wurde ein Citrat-Zyklus-Fluß von ca. 60 % festgestellt (Vallino & Stephanopoulos, 1993). Mit diesem Wert wurde eine NADPH-Bilanzrechnung durchgeführt, die zeigte, daß die NADPH-Bilanz während des exponentiellen Wachstums ungefähr geschlossen war (Tab. 22). Da bisher nicht alle NADPH verbrauchenden Prozesse in *C.glutamicum* bekannt sind, handelt es sich bei den Literaturangaben zur NADPH-Bedüftigkeit einer bakteriellen Zelle (Neidhardt, 1990 und Cocain-Bousquet, 1996) lediglich um Schätzwerte. Somit ist es ein erfreuliches Ergebnis, daß eine ungefähr geschlossene NADPH-Bilanz auf Basis enzymkinetischer Berechnungen erhalten werden konnte.

Tab.21: Glucose-Aufnahmerate und relativ auf die Glucose-Aufnahmerate bezogener Stofffluß durch den Pentosephosphatweg in unterschiedlichen Phasen der Batch-Kulturen der Stämme MH20-22B und LE4.

Phase	Glucose-Aufnahmerate		PPW-Fluß	
	nmol/(min×mgTG)		%	
	LE4	MH20-22B	LE4	MH20-22B
I	100	90	9	8
II	10	22	36	30
III	10	13	56	50

Tab. 22: NADPH Produktion und NADPH Bedarf beim Stamm MH20-22B während der exponentiellen Wachstumsphase vor dem Verbrauch des vorgelegten Leucins.

NADPH-Bedarf	NADPH-Produktion		
	durch PPW	durch ICD*	Summe
	nmol/(min×mgTG)		
50	13,8	53	67

* nach Vallino & Stephanopoulos, 1993

Bei Leucin-Limitierung der Stämme MH20-22B und LE4 war zu erwarten, daß die Zellen im Rahmen einer 'Stringent Response' (Cashel, 1996) ihren Zentral-Stoffwechsel umstellen. Daher war es interessant auch weitere intrazelluläre Metabolit-Konzentrationen im Verlauf der Batch-Kultivierung der Stämme MH20-22B und LE4 zu quantifizieren. Es ist bekannt, daß ATP und ADP bei *E. coli* eine Schlüsselposition bei der Regulation der Glycolyse übernehmen, wobei die Glycolyse durch einen Anstieg des ATP/ADP-Konzentrations-Verhältnisses gehemmt wird (Koebsmann, 1998). Während die ADP-Konzentration bei einsetzender Leucin-Limitierung annähernd konstant blieb (0,5-1mM) (Abb. 31), nahm die ATP-Konzentration bei beiden Stämmen zu diesem Zeitpunkt einen Maximalwert an (Anstieg von ca. 2 mM auf ca. 3,5 mM), wodurch die Glycolyse wahrscheinlich deutlich gehemmt wird (Koebsmann, 1998).

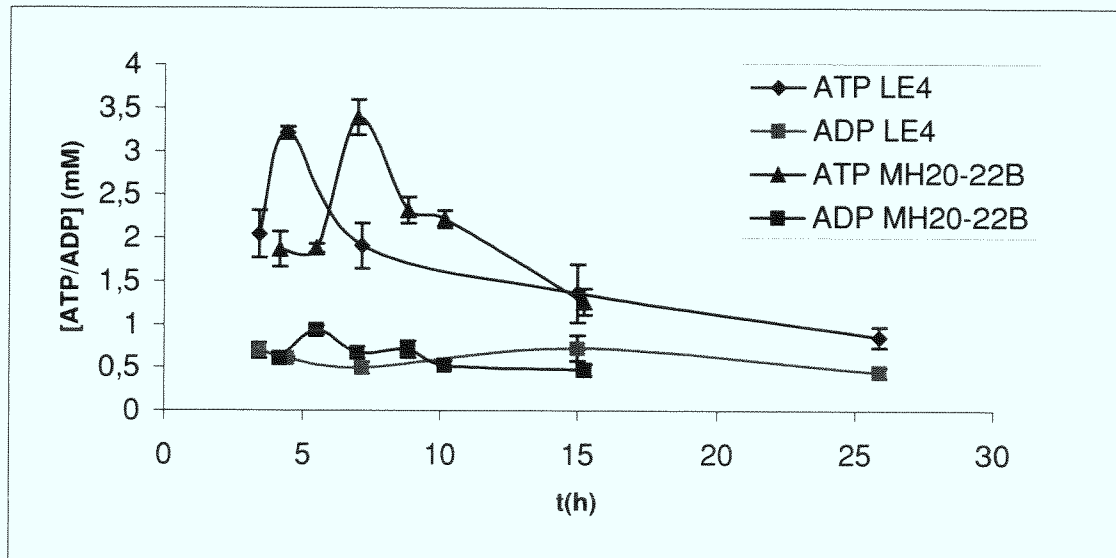


Abb.31: Intrazelluläre ATP- und ADP-Konzentrationen in den Stämmen MH20-22B und LE4 in Abhängigkeit der Zeit (Die Zählung der Stunden beginnt mit dem Animpfen der Kulturen).

Die maximale Fructose-1,6-bisphosphat Konzentration im Bereich der einsetzenden Leucin-Limitierung (Abb. 32) stützt die Annahme, daß die Glycolyse zu diesem Zeitpunkt gehemmt wird. Möglicherweise wird durch die Hemmung der Glycolyse die Abbau-Geschwindigkeit von Fructose-1,6-bisphosphat reduziert, wodurch sich dieser Metabolit vorübergehend in der Zelle anstaut. Dies würde den Konzentrations-Anstieg von ca. 3 mM auf 4,5-5 mM erklären. Nach der Leucin-Limitierung ist die Fructose-1,6-bisphosphat-Konzentration im Stamm MH20-22B im Vergleich zum Stamm LE4 um den Faktor 2 erhöht. Dies wiederum könnte mit der erhöhten Glucose-Aufnahmerate und dem erhöhten Kohlenstoff-Bedarf wegen der Lysin-Biosynthese des Stamms MH20-22B zusammenhängen. Im Gegensatz zur Fructose-1,6-bisphosphat-Konzentration blieb die Dihydroxyaceton-phosphat-Konzentration nahezu unverändert (1-2 mM), wobei die Konzentration beim Stamm MH20-22B etwa um den Faktor 1,5 bis 2 höher war. D-Glycerinaldehyd-3-phosphat und Xylulose-5-phosphat konnten nicht nachgewiesen werden, da die intrazelluläre Konzentrationen in diesen Fällen kleiner als 200 μ M waren und somit durch die angewendeten enzymatischen Verfahren nicht nachgewiesen werden konnten.

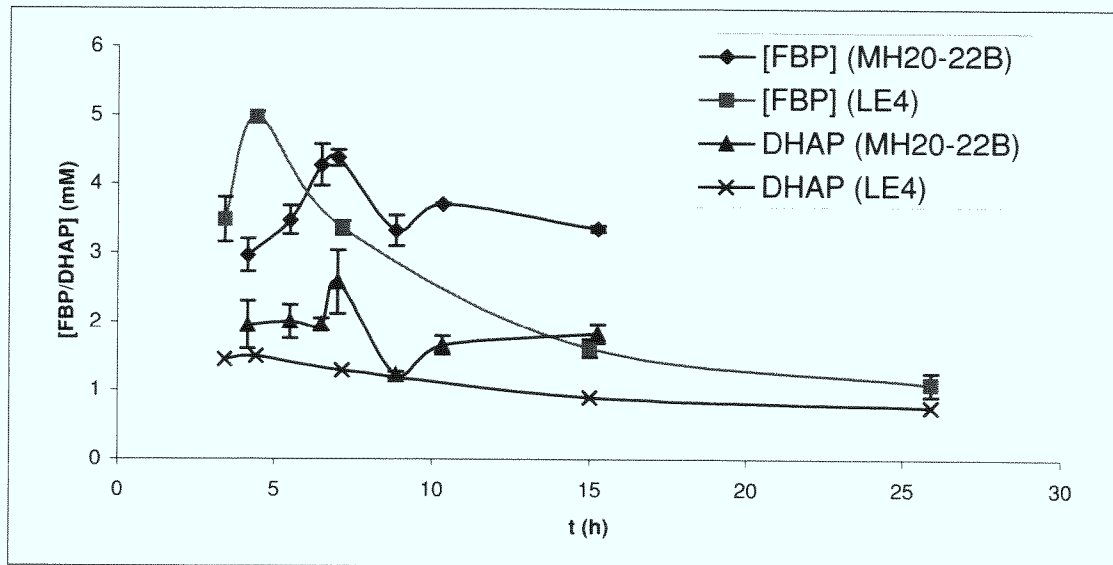


Abb.32: FBP und DHAP-Konzentrationen in den Stämmen MH20-22B und LE4 in Abhängigkeit der Zeit (Die Zählung der Stunden beginnt mit dem Animpfen der Kulturen).

4 Diskussion

4.1 Funktion und Bedeutung des OpcA-Proteins

Durch die Reinigung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* konnte erstmalig gezeigt werden, daß das Enzym ein heteromultimerer Komplex ist, der aus Zwf- (Zwischenferment) und OpcA- (‘oxidative pentose-phosphate cycle’) Untereinheiten zusammengesetzt ist, die durch die im Genom benachbarten *zwf*- und *opcA*-Gene codiert werden. Eine Trennung dieser Untereinheiten war nur durch stark denaturierende Agenzien wie SDS möglich. Das *opcA*-Gen wurde auch in anderen Mikroorganismen wie *Mycobacterium* (Cole, 1998) und verschiedenen Cyanobakterien (Sundaram, S. et al., 1998) gefunden, wobei die Sequenzen homolog zueinander sind. Das *opcA*-Gen liegt zusammen mit dem *zwf*-Gen im selben Operon, wie bei Cyanobakterien gezeigt werden konnte (Summers et al., 1995). Da Mutationen innerhalb des *opcA*-Gens einen nahezu vollständigen Verlust der cyanobakteriellen Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität bewirken (Sundaram, S. et al., 1998; Summers, M.L et al., 1995), kann erwartet werden, daß dieses Protein auch im Falle von *Corynebacterium glutamicum* essentiell ist. Wie bei Cyanobakterien (Sundaram, S. et al., 1998) könnte das OpcA-Protein auch bei *C. glutamicum* an der Assemblierung des Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Komplexes beteiligt sein. Beim Vergleich der Proteinsequenz des OpcA-Proteins mit der menschlichen 6-Phosphogluconolactonase (Collard et al., 1999) konnte eine geringe Sequenzähnlichkeit von 16 % festgestellt werden. Dies könnte ein Hinweis auf eine Lactonase-Funktion des OpcA-Proteins sein, welches jedoch wegen der geringen Sequenzähnlichkeit unsicher ist.

4.2 Aktivitäten der Glucose-6-phosphat und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenasen in vivo und in vitro

Die Berechnung von *in vivo* Flüssen auf Basis der *in vitro* bestimmten Enzym-Kinetiken in Kombination mit Metabolit-Pool Analysen ist schwierig, da es bisher nicht möglich ist, exakte Werte für kinetische Konstanten *in vivo* zu bestimmen. Ein ideales Assay-System muß die gleiche Zusammensetzung wie das Cytosol haben, um *in vivo* Enzym-Parameter zu erhalten. Dabei sind die größten Probleme die Komplexität und Variabilität des Cytosols (Guillouet & Engasser, 1996; Cayley, et al., 1991). Zudem sind die intrazellulären Konzentrationen von Salzen und Makromolekülen stark von der externen Osmolarität abhängig. Ins-

gesamt wird deutlich, daß die durch *in vitro* Untersuchungen gewonnenen enzymkinetischen Daten nur Näherungen der wirklichen *in vivo*-Situation sein können. Trotzdem wurde oft versucht eine Vorstellung von den Einflüssen der *in vivo* Bedingungen auf Enzym-Aktivitäten zu gewinnen (Rand, 1992 und Yancey et al., 1982).

Hohe intrazelluläre Polymer-Konzentrationen können beispielsweise durch Zugabe von inerten Polymeren wie Polyethylenglycol imitiert werden (Record, 1998). Dadurch wurden sowohl bei der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, als auch bei der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* die K_m -Werte maximal 2-fach reduziert. Dies stimmt mit Ergebnissen anderer Autoren überein, die unterschiedliche Proteine wie die Hexokinase aus Bäcker-Hefe (Rand et al., 1993) und Hämoglobin (Colombo et al., 1992) untersucht haben. Bei diesen Proteinen tritt Wasser als Reaktionspartner auf, wobei bei der Bindung von Glucose an die Hexokinase 100 Wassermoleküle vom Enzym freigesetzt werden, während der umgekehrte Fall beim Hämoglobin auftritt, wobei 60 Wasser-Moleküle zusammen mit 4 Sauerstoff-Molekülen gebunden werden. Die hohe Zahl der involvierten Wassermoleküle bei diesen Prozessen verdeutlicht die Bedeutung der Wasseraktivität für viele intrazelluläre Prozesse. Während die Bindung von Glucose an die Hexokinase durch den 'Macromolecular Crowding Effekt', der zu einer verringerten Wasseraktivität führt, erleichtert wird, wird die Bindung von Sauerstoff an Hämoglobin durch diesen Effekt eher behindert. Dies äußert sich bei der Hexokinase in der Verringerung des K_m -Wertes und bei Hämoglobin in einer herabgesetzten Sauerstoff-Affinität. Da bei der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase die K_m -Werte nach PEG-Zusatz sanken, kann davon ausgegangen werden, daß, wie bei der Hexokinase, Wasser bei der Substrat-Bindung freigesetzt wird. Da die Maximalgeschwindigkeiten der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase durch PEG-Zusatz nicht beeinflußt wurden, kann Wasser als kompetitiver Inhibitor dieser Enzymaktivitäten bezeichnet werden.

Neben dem Einfluß des 'Macromolecular Crowding' auf die Wasseraktivität, könnten durch diesen Effekt auch Konformations- (Minton, 1998) und Assoziations/Dissoziations-Gleichgewichte (Minton & Wilf, 1981) der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase verschoben werden und somit die beobachteten Veränderung der K_m -Werte bewirken.

Es konnte gezeigt werden, daß die Aktivitäten der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase durch die ionische Zusammensetzung und die Ionenstärke des Testmediums beeinflußt wurden, was auch bei den entsprechenden Enzymen ande-

rer Organismen festgestellt werden konnte (Dyson et al., 1973 und Cohen & Rosemeyer, 1969).

Der aktivierende Einfluß von Magnesium-Ionen auf die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase kann viele Ursachen haben. So ist Mg^{2+} bei der Bildung von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase Multimeren involviert (Bonsignore, A. et al., 1971) und spielt eine Rolle bei der Bindung von Glucose-6-phosphat (Domschke et al., 1970). KaliumGlutamat konnte die aktivierende Funktion von Magnesium teilweise übernehmen, welches mit Untersuchungen des Enzyms aus menschlichen Erythrocyten übereinstimmt (Cohen & Rosemeyer, 1969), wobei gezeigt werden konnte, daß bei ausreichend hoher Ionenstärke keine weitere Aktivierung des Enzyms durch Magnesium stattfindet. Im Falle der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase könnte die Vergrößerung des K_m -Wertes bezüglich 6-Phosphogluconat bei steigenden Kalium Glutamat- und $MgCl_2$ -Konzentrationen auf die Veränderung der Konformation der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase in Abhängigkeit der Ionenstärke zurückzuführen sein (Dyson et al., 1973).

Trotz dieser vielschichtigen Effekte durch das 'Macromolecular Crowding' sowie durch unterschiedliche Ionenstärken und Ionenarten ist es überraschend, daß die basierend auf *in vitro*-Enzymdaten berechneten *in-vivo*-Flüsse durch die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase gut mit den durch ^{13}C -Markierung bestimmten Flüssen übereinstimmen. Der Grund hierfür könnte darin liegen, daß die K_m -Werte sehr viel kleiner sind als die intrazellulären Konzentrationen der entsprechenden Substrate. Während im Falle der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase die $K_{mGlucose6P^-}$ bzw. K_{mNADP^-} -Werte bei 150 μM bzw. 37 μM liegen, wurden intrazelluläre Glucose-6-phosphat-Konzentrationen von 500 μM bis 4000 μM und NADP-Konzentrationen von 130-250 μM in *C.glutamicum* ermittelt. Das Enzym arbeitet also weitgehend im Bereich der Substrat-Sättigung, was auch dadurch deutlich wird, daß beispielsweise eine Halbierung des $K_{mGlucose6P^-}$ -Wertes nur einen schwachen Einfluß auf die Geschwindigkeit der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase ausüben würde (Abb. 33).

Im Gegensatz dazu hat die Veränderung des K_{mNADP^-} -Wertes einen großen Effekt auf den berechneten *in vivo*-Fluß, da hierbei die starke kompetitive Hemmung durch NADPH eine wichtige Rolle spielt. Das Verhältnis aus dem K_{mNADP^-} -Wert und dem $K_{icNADPH}$ -Wert hat einen zum NADPH/NADP-Konzentrations-Verhältnis vergleichbaren Einfluß auf die Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. Nimmt man jedoch an, daß sich die Effekte der '*in vivo*'-Umgebung gleichermaßen auf die beiden Enzym-Konstanten auswirken, so wird die Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase nicht beeinflusst (Abb. 34). Diese Annahme ist sinnvoll, da NADP und NADPH sich nur im Redoxzustand ihres Nicotin-Ringes unter-

scheiden und der Adenosin-diphosphat Rest wichtiger als der Nicotinamid-Anteil für die Bindung des Coenzym an das Protein ist (De Flora et al., 1975 und Grove et al, 1976).

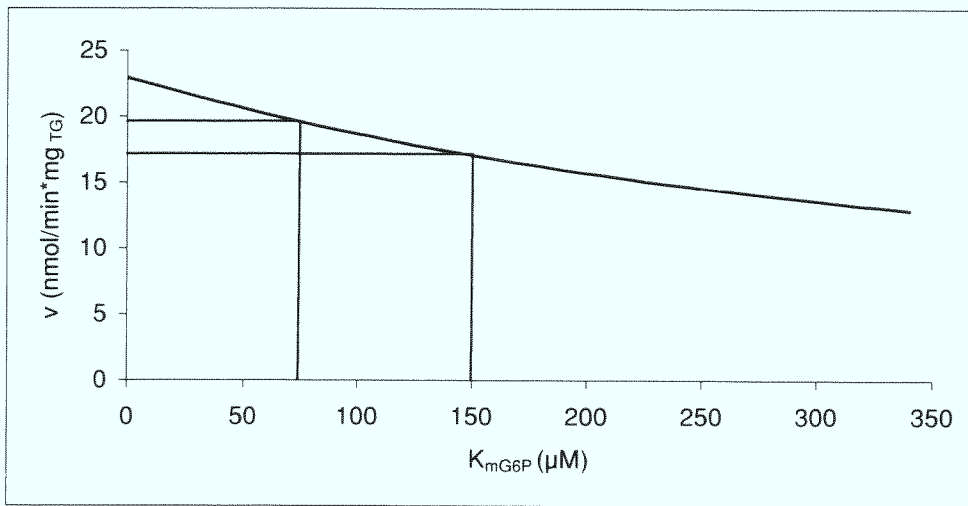


Abb.33: Einfluß des $K_{m\text{Glucose6P}}$ -Wertes auf die Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. Für die Berechnungen wurden die intrazellulären Konzentrationen von NADP, NADPH und Glucose-6-phosphat der homologen GLUDH-Mutante verwendet.

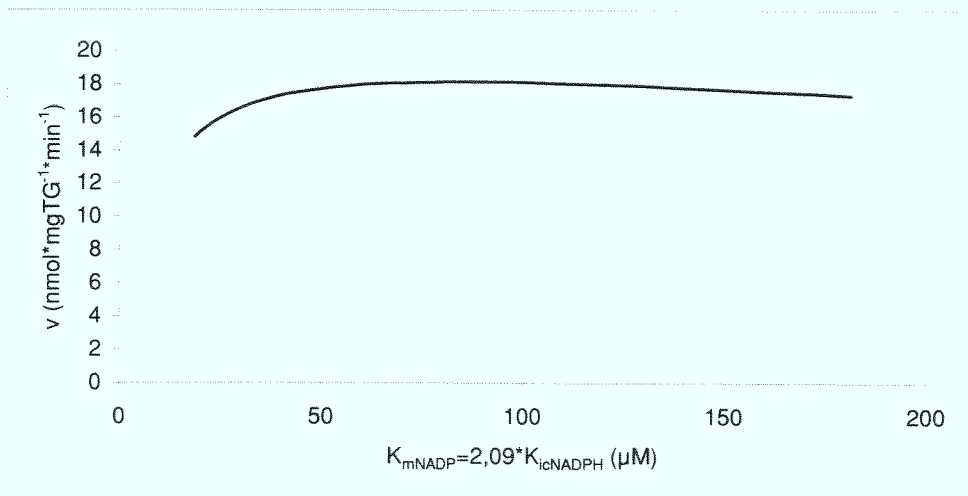


Abb.34: Einfluß der $K_{m\text{NADP}}$ - und der $K_{ic\text{NADPH}}$ -Werte auf die Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. Vorausgesetzt wird, daß sich das Verhältnis dieser beiden Enzym-Konstanten ($37 \mu\text{M}/17,7 \mu\text{M}=2,09$) nicht verändert.

4.3 Regulation der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase durch intrazelluläre Metabolite.

NADPH ist ein wichtiger Inhibitor der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase bei vielen Organismen (Levy, 1979 und Rosemeyer, 1987).

Dagegen haben NAD und NADH auch bei *C. glutamicum ssp. flavum* (Sugimoto & Shiio 1987a und 1987b) keinen hemmenden Effekt, was zeigt, daß insbesondere das 2'-Phosphat von NADP⁺ eine wichtige Funktion bei der Bindung dieses Coenzym hat (De Flora et al., 1975 und Grove et al, 1976). Demnach ist die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität nicht über NAD bzw. NADH an den Energie-Metabolismus gekoppelt.

Im Falle der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase überwogen die kompetitiven Anteile der Hemmung durch ATP, ADP und AMP bezüglich beider Substrate, woraus eine starke Abhängigkeit der *in vivo* Relevanz dieser Hemmungen von den intrazellulären NADP und Glucose-6-phosphat Konzentrationen resultiert. Bei der Batch-Kultivierung der Stämme MH20-22B war die NADP-Konzentration 2,5 bis 7 fach und die Glucose-6-phosphat Konzentration 13 - bis 26 - fach gegenüber den entsprechenden K_m -Werten erhöht, so daß die Konzentration eines kompetitiven Inhibitors ebenfalls im vergleichbaren Umfang gegenüber seinem K_{ic} -Wert ($K_{icADP} = 8$ mM und $K_{icATP} = 12$ mM) erhöht sein muß, um die Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase um 50 % zu reduzieren. Da die ATP und ADP Konzentrationen jedoch im Vergleich zu ihren K_{ic} -Werten um Faktoren von ca. 3 bis 16 kleiner waren, ist kein deutlicher *in vivo*-Effekt zu erwarten. Bei AMP kann ein schwacher *in vivo* Effekt zunächst nicht ausgeschlossen werden, da die Hemmung durch AMP stärker war ($K_{ic} \approx 3$ mM). Auch wäre die Hemmung des Pentosephosphatweges durch hohe AMP-Konzentrationen sinnvoll, da dann statt NADPH und Ribose-5-P eher ATP durch die Glycolyse gebildet werden sollte. Berechnungen mit Gleichung (2) zeigen aber (Abb. 35), daß diese Hemmung unter Voraussetzung der bei der Batch-Kultivierung der Stämme MH20-22B und LE4 gemessenen ATP und ADP Konzentrationen erst bei einer sehr kleinen Energieladung signifikant werden würde. Daher ist auch im Falle von AMP die *in vivo* Relevanz der Hemmung eher fragwürdig. Die bakterielle Energieladung liegt gewöhnlich im Bereich von 0,8 bis 0,9 (Dietzler et al, 1979; Walker-Simmons&Atkinson, 1977) und fällt nur bei Abwesenheit einer verstoffwechselbaren Kohlenstoffquelle auf 0,3 bis 0,4 ab (Barrette et al., 1988). Eine schwache Hemmung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase würde also nur unter extremen Bedingungen stattfinden. Auch bei der im Chemostaten kultivierten homologen und heterologen GLUDH-Mutante führt eine ähnliche Argumentation zu dem Resultat, daß die Hemmung durch ATP, ADP und AMP *in vivo* wahrscheinlich nicht relevant ist.

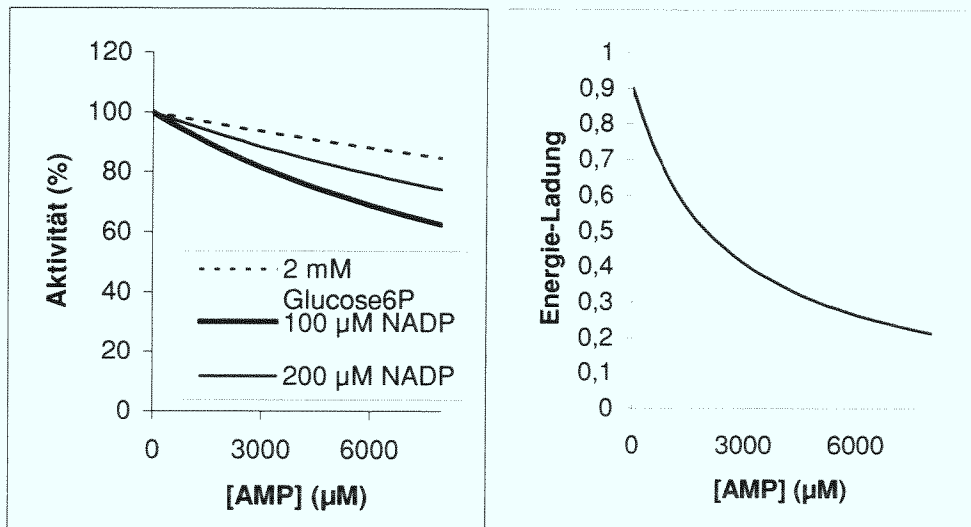


Abb.35: Hemmung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase durch AMP. Die Berechnungen sind mit Gleichung (2) durchgeführt worden, wobei die entsprechenden K_{ic} -Werte aus Tab. 11 und die in der Legende angegebenen Substrat-Konzentrationen verwendet worden sind. Die Hemmung wird dann signifikant, wenn die Energieladung ungewöhnlich klein wird und die NADP-Konzentration wie im Falle des Stammes LE4 nach Leucin-Limitierung weit abfällt.

Auch die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase wurde durch AMP, ADP und ATP gehemmt, wobei allerdings die Hemmung durch ATP mit $K_{ic6PG} = 1,1 \text{ mM}$ am größten war. Die ermittelten Hemmtypen deuten darauf hin, daß alle drei Adenosin-phosphate mit der freien 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase wechselwirken, wobei 6-Phosphogluconat das zuerst vom Enzym gebundene Substrat ist (Segel, 1975). Dies ergibt sich aus der Theorie von 'Dead-End'-Inhibitoren, die reversibel an das Enzym binden und damit die Aktivität von Enzymen reduzieren. Da die intrazelluläre 6-Phosphogluconat-Konzentration in den meisten Fällen kleiner als 150 μM ist und dieser Metabolit somit nicht nachgewiesen werden konnte, ist eine Abschätzung der *in vivo*-Relevanz dieser Hemmung schwierig. Allerdings ist bei den zu erwartenden kleinen 6-Phosphogluconat-Konzentrationen eine signifikante Hemmung des Enzyms durch ATP stattfinden. Eine mögliche Aktivierung des Pentosephosphatweges durch niedrige ATP-Konzentrationen würde dazu führen, daß der Stofffluß die Phosphofructokinase teilweise umgeht, wodurch weniger ATP verbraucht wird (Vashegi et al., 1999). Somit könnte ATP wie bei *Saccharomyces cerevisiae* (Vashegi et al., 1999) auch bei *C. glutamicum* an der Koordination von Glycolyse und Pentosephosphatweg beteiligt sein. Eine Hemmung durch ATP konnte auch bei der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase aus *Candida boidinii* (Kato et al., 1979), *Pseudomonas C* (Ben-Bassat & Goldberg, 1980) und *Gluconobacter suboxydans*

(Adachi & Ameyama, 1982) festgestellt werden, welches zeigt, daß ATP in vielen Mikroorganismen ein Regulator der Pentosephosphatweg-Aktivität ist.

Da die Hemmung durch ATP jedoch bei Abwesenheit von Mg^{2+} untersucht worden ist, ist die wirkliche *in vivo*-Hemmung kleiner, als bisher diskutiert wurde, da im Falle der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase nach Zugabe von Mg^{2+} die Hemmung durch ATP reduziert wird (Levy, 1979, Kato et al., 1979, Avigad, 1966) und 80 bis 90 % des ATP intrazellulär durch Magnesium komplexiert sind, wie ^{31}P -NMR-Studien zeigen (Lundberg et al., 1990 & Mitsumori, 1984).

Die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase wurde nur schwach durch D-Glycerinaldehyd-3-phosphat und Fructose-1,6-bisphosphat gehemmt, so daß eine *in vivo* Relevanz eher unwahrscheinlich ist. Auch Phosphoenolpyruvat, welches die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase von *Zymomonas mobilis* (Scopes, 1997) hemmt, beeinflusste die Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase von *Corynebacterium glutamicum* nur schwach. Dies stimmt mit der Annahme überein, daß Phosphoenolpyruvat ein genereller allosterischer Effektor nur für solche Enzyme ist, die Teil des Entner-Doudoroff Weges sind (Turnail & Schlegel, 1972), der in *Corynebacterium glutamicum* nicht existiert.

Bei der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase konnten im Vergleich zur Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase größere Hemm-Effekte durch D-Glycerinaldehyd-3-phosphat und Fructose-1,6-bisphosphat festgestellt werden. Fructose-1,6-bisphosphat hemmt auch die Enzyme aus *Candida boidinii* (Kato et al., 1979), *Streptococcus faecalis* (Bridges et al., 1975) und *Glucobacter suboxydans* (Adachi & Ameyama, 1982). Fructose-1,6-bisphosphat und D-Glycerinaldehyd-3-phosphat sind kompetitive Inhibitoren bezüglich 6-Phosphogluconat und sollten bei den in den meisten Fällen kleinen Konzentrationen dieses Zuckers in *C. glutamicum* an Bedeutung gewinnen. Beim Wachstum auf Fructose ist, wie durch ^{13}C -Markierungs-Analysen gezeigt werden konnte (Dominguez et al., 1998), der Fluß durch den Pentosephosphatweg geringer, wobei die Fructose-1,6-bisphosphat Konzentration erhöht ist (Dominguez et al., 1998). Dies deutet darauf hin, daß Fructose-1,6-bisphosphat ein Regulator der Pentosephosphatweg-Aktivität sein könnte.

Bleibt die Frage, warum gerade die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase durch eine Reihe von intrazellulären Metaboliten gehemmt wird, während die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, die doch aufgrund der Irreversibilität der 6-Phosphogluconat-Bildung (Levy, 1979 und Debnam et al., 1997) die Schlüsselposition bei der Regulation des Pentosephosphatweges übernehmen sollte (Voet, 1992) (Abschnitt 1), kaum durch andere Metabolite gehemmt wird.

Eine Erklärung könnte die *in vivo* Anordnung der Enzyme des Pentosephosphatweges sein. Für den Pentosephosphatweg von *Saccharomyces cerevisiae* wird diskutiert, daß die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase einen Komplex bilden, wobei Metabolit-Channeling auftritt (Debnam, 1997). Bei *Saccharomyces cerevisiae* konnte gezeigt werden, daß selbst extern zugesetztes 6-Phosphogluconat bei gleichzeitiger Anwesenheit der Glucose-6-phosphat und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenasen nicht vollständig mit dem aus Glucose-6-phosphat gebildeten 6-Phosphogluconat im Gleichgewicht steht (Debnam, 1997). Wenn dies auch für *C. glutamicum* zutrifft, könnte damit die in den meisten Fällen niedrige intrazelluläre 6-Phosphogluconat Konzentration und außerdem die zusätzliche Beeinflussung der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase-Aktivität durch ATP, Fructose-1,6-bisphosphat und D-Glycerinaldehyd-3-phosphat erklärt werden. Bei Metabolit-Channeling ist eine hohe Substrat-Spezifität nicht notwendig, da dann die Substrat-Bindungsstellen nicht für Fremd-Metabolite zugänglich wären.

4.4 Kontrolle des Stoffflusses am Verzweigungspunkt Glycolyse und Pentosephosphatweg durch die intrazelluläre Glucose-6-phosphat Konzentration

Bei der intrazellulären Glucose-6-phosphat-Konzentration konnte eine Korrelation mit der Glucose-Aufnahmerate festgestellt werden. Im Chemostaten bei Glucose-Limitierung lag eine Glucose-Aufnahmerate von ca. 15-20 nmol/(min×mgTG) vor, während sie bei der Batch-Kultivierung von ca. 90-100 nmol/(min×mgTG) auf ca. 10 nmol/(min×mgTG) fiel. Gleichzeitig fiel auch die intrazelluläre Glucose-6-phosphat Konzentration und bewegte sich auf die bei Glucose-Limitierung festgestellte Konzentration zu. Die reduzierte Glucose-Aufnahmerate könnte mit der Hemmung des PTS-Systems durch das phosphorylierte HPr-Protein zusammenhängen (Abschnitt 4.5).

Die zellinterne Konzentration von Glucose-6-phosphat könnte neben einem schwachen Einfluß auf die Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase einen starken Einfluß auf die Phosphofructokinase ausüben. Der bidirektionale Metabolit-Fluß der Phospho-glucose-isomerase ist im Vergleich zum Nettofluß groß (Marx, 1997a), so daß davon ausgegangen werden kann, daß sich das Verhältnis der Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat Konzentrationen gemäß der Gleichgewichts-Konstanten einstellt. Mit $\Delta G^{\circ} = 2,2$ kJ/mol (Voet, 1992) läßt sich eine Gleichgewichtskonstante von 0,41 für die Umwandlung von Glucose-6-phosphat in Fructose-6-phosphat errechnen (Gumaa & McLean, 1969), so daß zu erwarten ist, daß die intrazelluläre Fructose-6-phosphat Konzentration in etwa halb so groß ist, wie die Glucose-6-

phosphat Konzentration. Da der K_m -Wert der Phosphofructokinase von *C. glutamicum ssp. flavum* bei 2,4 mM liegt (Sugimoto & Shii, 1989), sollte die Glucose-6-phosphat Konzentration über Fructose-6-phosphat einen großen Einfluß auf die Aktivität dieses Enzym ausüben. Es ist also wahrscheinlich, daß durch die reduzierte Glucose-6-phosphat Konzentration nur die Aktivität der Glycolyse reduziert wird, während die Aktivität des Pentosephosphatweges wegen des kleinen K_{mG6P} -Wertes von 150 μ M nur schwach beeinflusst wird. Vermutlich dienen die unterschiedlichen K_m -Werte (150 μ M bei der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase im Vergleich zu 2,3 mM bei der Phosphofructokinase) dazu, den Pentosephosphatweg und die Glycolyse unterschiedlich durch die zellinterne Glucose-6-phosphat Konzentration zu steuern.

4.5 Untersuchungen zur Batch-Kultivierung der Stämme LE4 und MH20-22B

Während der Batch-Kultivierung der Stämme LE4 und MH20-22B wurden die Zellen Leucin-limitiert, als die vorgelegte Glucose noch nicht vollständig verbraucht war. Zu diesem Zeitpunkt kann die Leucin-t-RNA nicht mehr beladen werden, da die beiden Stämme nicht in der Lage sind, Leucin selbst zu produzieren (Schrumpf et al., 1992). Dies induziert wahrscheinlich die Bildung von ppGpp bzw. pppGpp, so daß im Rahmen einer 'Stringent Response' auch der Zentralstoffwechsel stark beeinflusst werden sollte (Cashel et al., 1996). Dies wurde durch die großen Veränderungen der intrazellulären ATP, Fructose-1,6-bisphosphat, Glucose-6-phosphat, NADP und NADPH-Konzentrationen bei einsetzender Leucin-Limitierung angedeutet. Über die genauen Ursachen dieser Pool-Veränderungen und über die Zusammenhänge mit der 'Stringent Response' gibt es jedoch bislang keine genauen Informationen (Cashel et al., 1996). Es ist jedoch bekannt, daß durch diese Streßantwort innerhalb von Minuten die ribosomale RNA-Transkription und die Protein-Synthese um bis zu 90 % gesenkt werden können (Lengeler et al., 1999). Da damit der ATP-Bedarf der Zelle sinkt und die Aktivität ATP produzierender Stoffwechselwege möglicherweise mit Verzögerung reduziert wird, könnte hierdurch die vorübergehende Anstauung von ATP in der Zelle verursacht werden.

Bei *C. glutamicum ssp. flavum* wurde festgestellt (Sugimoto & Shii, 1989), daß die Phosphofructokinase im Gegensatz zu anderen Organismen nicht durch ATP gehemmt wird, so daß angenommen werden kann, daß in diesem Fall keine Hemmung der Glycolyse auf Höhe der Phosphofructokinase erfolgt, sondern eher im weiteren Verlauf dieses Stoffwechselweges. Dies würde mit der maximalen Fructose-1,6-bisphosphat-Konzentration zum Zeitpunkt der einsetzenden Leucin-Limitierung übereinstimmen. Ein möglicher Kontrollpunkt könnte neben anderen Enzymen der Glycolyse die Pyruvat-Kinase sein, da bekannt ist, daß ATP ein wichtiger Inhibitor des Enzyms von *Corynebacterium glutamicum* ist (Jetten et al., 1994). Die Re-

gulation der Pyruvat-Kinase wird allgemein als wichtig erachtet, da ihr Substrat Phosphoenolpyruvat gleichzeitig ein Phosphat-Gruppen Donor für das PTS-System und für ADP ist und somit sowohl in der Glucose-Aufnahme, als auch in der Bereitstellung von Energieäquivalenten involviert ist (Thompson, 1978). Auch beim Wachstum von *Bacillus subtilis* auf Substrat-Gemischen wie Glucose und Citrat ist die Regulation der Pyruvat-Kinase von zentraler Bedeutung (Goel et al., 1999).

Auffällig ist, daß die Konzentrationen von ATP und Fructose-1,6-bisphosphat nur vorübergehend vergrößert sind und danach wieder abfallen. Demnach ist die Regulation durch ATP nur innerhalb eines kurzen Zeitraumes während der Stoffwechsel-Umstellung nach Beginn der Leucin-Limitierung relevant und verliert danach möglicherweise an Bedeutung. Um die genaue Regulation der Glycolyse nach Leucin-Limitierung zu untersuchen müßten weitere intrazelluläre Metabolite quantifiziert werden. Interessant hierbei wäre beispielsweise die Konzentration von Phosphoenolpyruvat, da ein reduzierter Stofffluß durch die Glycolyse aus der Verringerung dieses Pools resultieren könnte, wenn sie eine dem K_{mPEP} -Wert der Pyruvat-Kinase (1,2 mM) vergleichbare Größe annimmt (Jetten et al., 1994). Auch ist bekannt, daß ppGpp einen Einfluß auf die Protein-Synthese ausübt (Cashel et al., 1996). Möglicherweise wird hierdurch auch die Aktivität von Glycolyse-Enzymen beeinflusst.

Die beobachtete Erhöhung der Fructose-1,6-bisphosphat Konzentration könnte auch einen Einfluß auf übergeordnete Regulations-Strukturen haben. So ist beispielsweise bekannt, daß Fructose-1,6-bisphosphat bei gram positiven Bakterien ein allosterischer Aktivator einer ATP-abhängigen Protein-Kinase ist, die das HPr-Protein des PTS-Systems am Serin 46 phosphoryliert (Deutscher & Saier, 1983). Bei *Lactococcus lactis* konnte gezeigt werden, daß HPr(ser-P) das PTS-System inhibiert (Reizer & Panos, 1980; Reizer, 1989; Ye et al., 1994). Damit könnte der Abfall der Glucose-Aufnahmerate von ca. 90-100 nmol/(min×mgTG) auf ca. 10 nmol/(min×mgTG) nach Leucin-Limitierung der Stämme LE4 und MH20-22B erklärt werden.

Beim Stamm LE4 fiel auf, daß sich das NADPH/NADP-Konzentrations-Verhältnis im weiteren Verlauf der Leucin-limitierten Phase der Batch-Kultur wieder auf den vor der Leucin-Limitierung festgestellten Wert zubewegte, während beim Stamm MH20-22B das Verhältnis konstant blieb. Dabei stieg die Pentosephosphatweg-Aktivität beim Stamm LE4 an, während sie beim Stamm MH20-22B konstant blieb. Dies war überraschend, da in beiden Fällen die Wachstumsrate und beim Stamm MH20-22B zusätzlich die Lysin-Produktionsrate abnahmen. Der NADPH-Bedarf sollte also sinken und somit auch die Aktivität NADPH produzierender Prozesse wie der Pentosephosphatweg.

Dies könnte durch bisher nicht berücksichtigte NADPH verbrauchende Prozesse erklärt werden. Es ist bekannt, daß, unter aeroben Bedingungen bei der Reduktion von Sauerstoff zum Wasser, Superoxid- ($O_2^{\bullet -}$) und Hydroxyl-Radikale ($OH^{\bullet}$) entstehen, die reduziert werden müssen, wobei NADPH eine wichtige Rolle spielt (Lengeler, 1999 und Juhnke, 1996). Eine weitere Möglichkeit wäre, daß ein bisher unbekannter Inhibitor des Pentosephosphatweges an Bedeutung gewinnt, so daß der durch das enzymkinetische Modell abgeschätzte Stofffluß in Wirklichkeit zu hoch sein könnte.

In der exponentiellen Wachstums-Phase (vor dem Beginn der Leucin-Limitierung) konnte ein auf die Glucose-Aufnahme-Rate bezogener relativer Anteil des Pentosephosphatweges von ca. 10 % ermittelt werden. Dies ist deutlich niedriger als während des exponentiellen Wachstums von *C. melassecola* ATCC 17965 durch ein auf Massen-Bilanzierung basierendes Stoffwechsel-Modell (Pons et al., 1996) bzw. durch ^{13}C -Fluß-Analyse (Rollin et al. 1995) festgestellt werden konnte, reicht aber trotzdem aus, um die NADPH-Bilanz ungefähr zu schließen (Tab. 22). In beiden Fällen lag der relative Anteil des Pentosephosphatweges am gesamten Stofffluß bei ca. 50 %. Erklärbar wird diese Differenz beim Vergleich der Wachstumsraten. Während die Wachstumsraten der Stämme MH20-22B und LE4 bei $0,25\ h^{-1}$ (MH20-22B) bzw. $0,37\ h^{-1}$ (LE4) lagen, konnten bei *C. melassecola* Wachstumsraten von ca. $0,6\ h^{-1}$ erzielt werden, welches zu einem deutlich erhöhten NADPH-Bedarf führt, der zu einer Aktivierung des Pentosephosphatweges führen sollte. Bei *C. glutamicum* ATCC 21253, konnte während des exponentiellen Wachstums auf Glucose ein relativer Beitrag des Pentosephosphatweges von 25 % ermittelt werden (Vallino & Stephanopoulos, 1993), welches dem für *C. glutamicum* vorhergesagten Fluß näher kommt. Die Wachstumsrate war in diesem Fall mit der des Stammes MH20-22B vergleichbar.

Allgemein wurde festgestellt, daß die Aktivität des Pentosephosphatweges mit der Wachstumsrate korreliert. So konnte bei Säugerzellen festgestellt werden, daß das Zellwachstum bei Hemmung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase abnimmt, während bei Überexpression dieses Enzyms das Wachstum zunimmt (Tian et al., 1998). Auch bei *E. coli* werden die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase bei erhöhter Wachstumsrate stärker exprimiert (Wolf et al., 1979). Dies stimmt mit Untersuchungen bei *Saccharomyces cerevisiae* (Nissen et al., 1997) und *Bacillus subtilis* (Sauer et. al, 1997) überein, bei denen festgestellt wurde, daß der Stofffluß durch den Pentosephosphatweg bei Glucose limitierter kontinuierlicher Kultivierung mit der Wachstumsrate anstieg. Demnach wird die Aufspaltung des Stoffflusses zwischen Glycolyse und Pentosephosphatweg stark durch

die Wachstumsrate beeinflusst, welches mit dem hohen NADPH-Bedarf für die Biomassenproduktion korreliert (Neidhardt, 1990).

4.6 Wird die Lysin Biosynthese durch NADPH limitiert?

Die Aktivität des Pentosephosphatweges wurde durch die spezifische Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und das NADPH/NADP-Konzentrations-Verhältnis bestimmt. Da die spezifische Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, die der maximal möglichen Aktivität des Pentosephosphatweges entspricht, im Vergleich zu ihrer *in vivo*-Aktivität 4- bis 8-fach höher war, und eine Aktivitätssteigerung leicht durch eine Veränderung des NADPH/NADP-Konzentrations-Verhältnisses erreicht werden könnte, ist es unwahrscheinlich, daß NADPH ein limitierender Faktor der Lysin-Biosynthese ist. Dies stimmt mit der Untersuchung einer Mutante von *C.glutamicum* überein, deren Glucosephosphat-Isomerase-Aktivität abgeschwächt war (Vallino & Stephanopoulos, 1994). Obwohl in diesem Fall fast die gesamte Glucose durch den Pentosephosphatweg verstoffwechselt wurde, konnte trotzdem keine Steigerung der Lysin-Ausbeute beobachtet werden.

5 Zusammenfassung

Das gram-positive Bakterium *Corynebacterium glutamicum* wird zur großtechnischen Herstellung der Aminosäuren L-Glutamat und L-Lysin seit vielen Jahren eingesetzt. Da bei der Biosynthese dieser Aminosäuren auch NADPH benötigt wird, war es das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit, die Regulation des Pentosephosphatweges als Hauptlieferant von NADPH in *C. glutamicum* zu untersuchen.

Zunächst wurden aus *C. glutamicum* die ersten beiden Enzyme des Pentosephosphatweges, die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, isoliert und charakterisiert. Wie die biochemischen Untersuchungen ergaben, besteht die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus zwei verschiedenen Protein-Untereinheiten, die durch die benachbarten *zwf*- und *opcA*-Gene kodiert werden. Bei Cyanobakterien ist das OpcA-Protein essentiell für die Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase.

Die kinetische Charakterisierung ergab bei der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase einen geordneten Bi-Bi-Mechanismus und bei der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase einen geordneten Theorell-Chance Bi-Ter-Mechanismus, der durch die kurze Halbwertszeit des ternären Übergangs-Komplexes charakterisiert wird. Bei beiden Enzymen konkurriert NADPH mit NADP um die Kofaktor-Bindungsstelle, wobei die kompetitiven Hemmkonstanten von NADPH den Michaelis-Konstanten von NADP ähnlich sind; diese Konstanten liegen im Bereich von 15 μM bis 40 μM . Da die intrazellulären Konzentrationen von NADP und NADPH mit 100 μM bis 370 μM deutlich größer sind, werden beide Enzyme *in vivo* durch das NADPH/NADP-Konzentrationsverhältnis beeinflusst. Am Beispiel eines Leucin-auxotrophen *C. glutamicum* Stamms, bei dem dieses Verhältnis um den Faktor 4 anstieg, konnte gezeigt werden, daß das NADPH/NADP-Konzentrationsverhältnis eine wichtige Rolle bei der *in vivo*-Regulation des Pentosephosphatweges spielt.

Basierend auf den enzymkinetischen Daten konnte ein Modell erstellt werden, mit dem aus den intrazellulären Konzentrationen von Glucose-6-phosphat, NADP und NADPH die *in vivo*-Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase berechnet werden kann. Die so ermittelte spezifische Aktivität von etwa 10×10^{-3} Einheiten pro mg Trockengewicht stimmte mit Daten von Stoffflußanalysen überein, die mit Hilfe der ^{13}C -Markierung und NMR-Analyse für die *in vivo*-Aktivität des Pentosephosphatweges bestimmt wurden. Die *in vivo*-Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase war somit um den Faktor 4 bis 8 kleiner, als die maximale *in vitro*-Aktivität bei Substrat-Sättigung. Da durch ein geringeres intrazelluläres NADPH/NADP-Konzentrationsverhältnis eine erhöhte Aktivität der beiden NADP-abhängi-

gen Dehydrogenasen des Pentosephosphatweges zur Folge hat, ist NADPH wahrscheinlich kein limitierender Faktor bei den Lysin-produzierenden *C. glutamicum*-Stämmen.

6 Literaturverzeichnis

- Abe, S., Takayama, K., Kinoshita, S. (1967)** Taxonomical studies on glutamic acid producing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **13**, 279-301
- Adachi, O. & Ameyama, M. (1982)** 6-Phospho-D-gluconate-Dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*, *Methods Enzymol.*, **89**, 291-295
- Avigad, G. (1966)** Inhibition of glucose 6-phosphate-Dehydrogenase by adenosine 5'-triphosphate. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **56(5)**, 1543-1547
- Bagnara, A.S., Mitchell, A., Sin, I.L. & Finch, L.R. (1973)** A Sensitive Method for Estimating 5-Phosphoribosyl 1-Pyrophosphate in *Escherichia coli*, *Analytical Biochemistry* **54**, 535-544
- Baker, H.V. & Wolf, R.E. (1984)** Essential site for growth rate dependent regulation within the *Escherichia coli gnd* structural gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 7669-7673
- Barrette, B.C., Hannum, D.M., Wheeler, W.D. & Hurst, J.K. (1988)** Viability and Metabolic Capability Are Maintained by *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Streptococcus lactis* at Very Low Adenylate Energy Charge. *J. Bacteriol*, **170**, 3655-3659
- Ben-Bassat, A. & Goldberg, I. (1980)** Purification and properties of glucose-6-phosphate-Dehydrogenase (NADP+/NAD+) and 6-phosphogluconate-Dehydrogenase (NADP+/NAD+) from Methanol-grown *Pseudomonas C*, *Biochimica et Biophysica Acta*, **611**, 1-10
- Bernofsky, C. & Swan, M. (1973)** An improved cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotide, *Anal. Biochem.*, **53**, 452-458
- Bergmeyer (1984)** *Methods of enzymatic analysis*, Verlag Chemie GmbH, Weinheim, Germany
- Betts, S.A. & Mayer, R.J. (1975)** Purification and Properties of 6-Phosphogluconate Dehydrogenase from Rabbit Mammary Gland. *Biochem. J.*, **151**, 263-270
- Blackmore, P.F., Williams, J.F. & MacLeod, J.K. (1976)** Dimerization of Erythrose 4-Phosphate. *FEBS-Letters*, **64**, 222-226
- Bonsignore, A., Lorenzoni, I., Cancedda, R., Cosulich, M.E., and De Flora, A. (1971)** Effect of divalent cations on the structure of human erythrocyte glucose 6-P dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **42**, 159-165.
- Börmann-El Kholy,E.R., Eikmanns, B.J., Gutmann, M. & Sahm, H (1993)** Glutamate Dehydrogenase Is Not Essential for Glutamate Formation by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environm. Microbiol.*, **59**, 2329-2331.

- Bradford, M.M. (1976)** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254
- Bridges, R. B. & Wittenberger, C. L. (1975)** 6-Phosphogluconate-Dehydrogenase from *Streptococcus faecalis*, *Methods of enzymology*, **41**, 232-237
- Brodelius, P. (1974)** The synthesis of three AMP-analogues: N6-(6-aminohexyl)-adenosine 5'-monophosphate, N6-(6-aminohexyl)-adenosine 2',5'-bisphosphate, and N6-(6-aminohexyl)-adenosine 3',5'-bisphosphate and their application as general ligands in biospecific affinity chromatography, *Eur.J.Biochem.*, **47**, 81-89
- Carter-Muenchau, P. & Wolf, R.E. Jr. (1989)** Growth rate dependent regulation of 6-Phosphogluconate-Dehydrogenase level mediated by an anti-Shine-Dalgarno sequence located within the *Escherichia coli gnd* structural gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 1138-1142.
- Cashel, M., Gentry, D.R., Hernandez, V.J. & Vinella, D. (1996)** The Stringent Response in *Escherichia coli* and *Salmonella*, ASM Press Washington, D.C.
- Cayley, S., Lewis, B.A., Guttman, H.J. & Record, M.T. (1991)** Characterization of the Cytoplasm of *Escherichia coli* K-12 as a Function of External Osmolarity, *J.Mol.Biol.* **222**, 281-300
- Chiappelli, F., Vasil, A., & Haggerty, D.F. (1979)** The Protein Concentration of Crude Cell and Tissue Extracts as Estimated by the Method of Dye Binding: Comparison with the Lowry Method. *Anal. Biochem.*, **94**, 160-165.
- Cleland, W.W. (1963)** The kinetics of enzyme-catalysed reactions with two or more substrates or products, *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 104-137, 173-187 and 188-196
- Cocaign-Bousquet, M. & Lindley, N.D. (1994)** Pyruvate overflow and carbon flux within the central metabolic pathways of *Corynebacterium glutamicum* during growth on lactate. *Enzyme Microb. Technol.*, **17**, 260-267.
- Cocaign-Bousquet, M., Gyonvarch, A., Lindley, N.D. (1996)** Growth Rate-Dependent Modulation of Carbon Flux through Central Metabolism and the Kinetic Consequences for Glucose-Limited Chemostat Cultures of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 429-436
- Cohen G.N. (1983)** The common pathway to lysine, methionine and threonine, p. 147-171. In: K.M. Herrmann and R.L. Somerville (ed.), Amino acids: Biosynthesis and genetic regulation. Addison-Wesley Publishing Co., Reading, PA.

- Cohen, P. & Rosemeyer, M.A. (1968)** The molecular weight and subunit structure of glucose-6-phosphate-Dehydrogenase from human erythrocytes, *FEBS Lett.*, **1**, 147-149
- Cohen, P. & Rosemeyer M.A. (1969)** Subunit interactions of glucose-6-phosphate-Dehydrogenase from human erythrocytes, *Eur. J.Biochem.*, **8**, 8-15
- Cole, S.T. (1998)** Deciphering the biology *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence, *Nature*, **393** (6685), 537-544
- Collard, F., Collet, J.F., Gerin, I., Veiga-da-Cunha, M., van Schaftingen, E. (1999)** Identification of the cDNA encoding human 6-phospholactonase, the enzyme catalysing the second step of the pentose phosphat pathway, *FEBS Letters*, **459** 223-226
- Colombo, M.F., Rau, D.C. & Parsegian, V.A. (1992)** Protein Solvation in allosteric Regulation: A Water Effect on Hemoglobin. *Science* **256**, 655-659
- Colon, G.E., T.T. Nguyen, M. S. M. Jetten, A.J. Sinskey, and G. Stephanopoulos (1995)** Production of isoleucine by overexpression of *ilvA* in a *Corynebacterium lactofermentum* threonine producer, *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **43**, 482-488.
- Debnam, P.M., Shearer, G., Blackwood, L. & Kohl, D.H. (1997)** Evidence for channeling of intermediates in the oxidative pentose phosphate pathway by soybean and pea nodule extracts, yeast extracts, and purified yeast enzymes *Eur. J. Biochem.*, **246**, 283-290
- De Flora, A., Morelli, A., Giuliano, F., Benatti, U. & Radin, L. (1975)** Human erythrocyte glucose 6-phosphate-Dehydrogenase. Influence of coenzyme derivatives on thermostability and kinetic properties, *Ital. J.Biochem.*, **24**(2), 147-161
- Deutscher, J. & Saier, M.H., Jr (1983)** ATP-dependent kinase-catalyzed phosphorylation of a seryl residue in HPr, a phosphate carrier protein of the phosphotransferase system in *Streptococcus pyogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 6790-6794
- Dietzler, D.N., Leckie, M.P., Sternheim, W.L., Ungar, J.M., Crimmins, D.L. & Lewis, J.W. (1979)** Regulation of Glycogen Synthesis and Glucose Utilization in *Escherichia coli* during Maintenance of the Energy Charge. *J. Biol. Chem*, **254**, 8276-8287.
- Dominguez, H., Rollin, C., Guyonvarch, A. Guerquin-Kern, J.L., Coccagn-Bousquet, M. & Lindley, D.N. (1998)** Carbon Flux distribution in the central metabolic pathways of *Corynebacterium glutamicum* during growth on fructose, *Eur. J.Biochem.*, **254**, 96-102
- Domschke, W., Ullrich, J., Domagk, G.F., and Decker, K. (1970)** Optical Rotatory Dispersion of the two Glucose-6-phosphate Dehydrogenases from *Candida utilis*. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **351**, 919-922.

- Dyson, J.E.D., D’Orazio, R.E. , Hanson, W.H. (1973)** Sheep Liver 6-Phosphogluconate-Dehydrogenase: Isolation Procedure and Effect of pH, Ionic Strength, and Metal Ions on the Kinetic Parameters, *Arch. Biochem. Biophys.* **154**, 623-635
- Edman,P. & Begg, G. (1967)** A Protein Sequencer, *Eur. J. Biochem.*, **1**, 80-91.
- Eggeling L, Oberle S. & Sahm H. (1998)** Improved L-lysine yield with *Corynebacterium glutamicum*: use of dapA resulting in increased flux combined with growth limitation *Appl. Microbiol Biotechnol* **49(1)**, 24-30
- Eikmanns B.J., Metzger M., Reinscheid D.J., Sahm H. (1991a)** Amplification of three threonine biosynthesis genes in *Corynebacterium glutamicum* and ist influence on carbon flux in different strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 617-622.
- Eikmanns. B.J., Kleinertz, E., Liebl, W., Sahm, H. (1991b)** A family of *Corynebacterium glutamicum* / *E. coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression and promotor probing. *Gene* **102**, 93-98
- Folley, L.S., Power, S.D. & Poyton, R.O. (1983)** Seperation of Nucleotides by Ion Pair, Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. Use of Mg(II) and Triethylamine as Competing Hetaerons in the Separation of Adenine and Guanine Nucleotides *J. Chromatogr.* **281**, 199-207.
- Goel, A., Lee, J., Domach, M. M., Ataai, M. M. (1999)** Metabolic Fluxes, Pools, and Enzyme Measurements Suggest a Tighter Coupling of Energetics and Biosynthetic Reactions Associated with Reduced Pyruvate Kinase Flux, *Biotechnol. Bioeng.*, **64**, 129-134
- Gourdon, P. & Lindley, N. D. (1999)** Metabolic Analysis of Glutamate Production by *Corynebacterium glutamicum* *Metabolic Engineering* **1**, 224-231
- Greenbaum, A.L., Guma, K.A., and McLean, P. (1971)** The distribution of hepatic metabolites and the control of the pathways of carohydrate metabolism in animals of different dietary and hormonal status. *Arch. Biochem. Biophys.*, **143**, 617
- Greenberg, J.T., Chou, J.H., Monach, p.A., Demple, B. (1991)** Activation of oxidative stress genes by mutations of the *soxQ/cfxB/marA* locus of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**, 4433-4439.
- Grove, T.H., Ishaque, A. & Levy, H.R. (1976)** Glucose-6-phosphate-Dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. Interaction of the enzyme with coenzymes and coenzyme analogs. *Arch. Biochem. Biophys.*, **177(1)**, 307-316
- Gubler M., Jetten M., Lee S.H. & Sinskey A.J. (1994)** Cloning of the Pyruvate Kinase Gene (pyk) of *Corynebacterium glutamicum* and site specific inactivation of pyk in a lysine-producing *Corynebacterium lactofermentum* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2494-2500

- Guillouet, S. & Engasser, J.M. (1996)** Growth of *Corynebacterium glutamicum* in ammonium- and potassium-limited continuous cultures under high osmotic pressure, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **46**, 291-296
- Gumaa, K.A. & Mc Lean, P. (1969)** The pentose-phosphate pathway of glucose metabolism. Enzyme profiles and transient and steady state content of intermediates of alternative pathways of glucose metabolism in Krebs ascites cells. *Biochem J.*, **115**, 1009-1029
- Gutmann, M. (1992a)** Glutamatsekretion bei *Corynebacterium glutamicum*: Mechanismus und physiologische Bedeutung des Carrier vermittelten Exports. Dissertation Univ. Düsseldorf-Berichte d. FZ-Jülich-2836
- Gutmann, M., Hoischen, C. & Krämer, R. (1992b)** Carrier mediated glutamate secretion by *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1112**, 115-123
- Hatakeyama, K., Kuwabara, K., Kobayashi, M. & Yugawa, H. (1997)** Glucose-6-phosphate-Dehydrogenase and DNA capable of coding the same, Patent: JP 1997224661-A 1 02-SEP-1997, Mitsubishi Chem. Corp.
- Hermann, T. & Krämer, R. (1996)** Mechanism and regulation of Isoleucine Excretion in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environm. microbiol.*, **62(9)**, 3238-3244
- Holleman, A.F., Wiberg, E. & Wiberg, N. (1985)** Lehrbuch der Anorganischen Chemie, Water de Gruyter, Berlin, New York
- Horecker, B.L., and Smyrniotis, P.Z. (1953)** Reversibility of glucose-6-phosphate oxidation. *Biochim. biophys. Acta*, **12**, 98-102
- Jensen, N.B.S., Jokumsen, K.V., Villadsen, J. (1999)** Determination of the Phosphorylated Sugars of the Embden-Meyerhoff-Parnas Pathway in *Lactococcus lactis* Using a Fast Sampling Technique and Solid Phase Extraction, *Biotechnol. Bioeng.*, **63 (3)** 356-362
- Jessup, W. & Dean, P.D.G. (1981)** Purification of 6-phosphogluconate-Dehydrogenase from *Acer Pseudoplatanus L.* using immobilized Procion Red HE-3B, *J. Chromatogr.*, **219**, 419-426
- Jetten, M.S.M., Gubler, M.E., Lee, S.H. & Sinskey, A.J. (1994)** Structural and Functional Analysis of Pyruvate Kinase from *Corynebacterium glutamicum*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 2501-2507
- Jones, B.M., Gilligan, J.P. (1983)** o-Phthaldialdehyde precolumn derivatization and reversed-phase-high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids. *J.Chromatography*, **266**, 471-482.

- Juhnke, H., Krems, B., Kötter, P., Entian, K.D. (1996)** Mutants that show increased sensitivity to hydrogen peroxide reveal an important role for the pentose phosphate pathway in protection of yeast against oxidative stress. *Mol. Gen. Genet.*, **252**, 456-464
- Kato, N., Sahm, H., Schütte, H. & Wagner, F. (1979)** Purification and properties of glucose-6-phosphate-Dehydrogenase and 6-phosphogluconate-Dehydrogenase from methanol utilizing yeast, *Candida Boidinii*, *Biochimica et Biophysica Acta*, **566**, 1-11
- Kaplan, N.O., Colowick, S.P. & Barnes, C.C. (1951)** Effect of Alkali on Diphosphopyridine Nucleotide. *J. Biol.Chem.*, **224**, 461-472
- Kawaguchi, A. & Bloch, K. (1974)** Inhibition of glucose-6-phosphate-Dehydrogenase by palmitoyl coenzyme A, *J.Biol.Chem.*, **249(18)**, 5793-5800
- King, E.L. & Altmann, C. (1956)** A schematic method of deriving the rate laws for enzyme-catalysed reactions, *J.Phys.Chem.*, **60**, 1375-1378
- Kinoshita, S., Tanaka, K. (1972)** Glutamic acid. pp. 263-324. In: K.Yamada (ed.), The microbial production of amino acids. Wiley, New York.
- Koebmann, B.J., Nilsson, D., Snoep, J.L., Westerhoff, H.V. & Jensen, P.R. (1998)** The glycolytic flux in *E. coli* appears to be controlled by the demand for ATP. In *Biothermokinetics In The Post Genomic Era* (Larsson et al., eds), 205-210.
- de Koning, W. & van Dam, K. (1992)** A Method for the Determination of Changes of Glycolytic Metabolites in Yeast on a Subsecond Time Scale Using Extraction at Neutral pH, *Anal. Biochem.*, **204**, 118-123
- Kunst, A., Dreager, B. & Ziegenhorn, J. (1984)** in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U., Hrsg.) 3rd ed., vol. VI, pp. 163-172, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel
- Laemmli, U.K. (1970)** Nature 227, 680-685. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4
- LaPorte, D.C., Walsh, K. & Koshland, D.E. (1984)** The Branch Point Effect Ultrasensitivity and Subsensitivity to Metabolic Control, *J. Biol. Chem.*, **259**, 14068-14075
- Lee, L.Y. & Lee, J.C. (1987)** Thermal Stability of Proteins in the Presence of Poly(ethylene glycols), *Biochemistry*, **26**, 7813-7819
- Lee, H.W., Pan, J.G., Lebeault, J.M (1998)** Enhanced L-lysine production in threonine-limited continuous culture of *Corynebacterium glutamicum* by using gluconate as a secondary carbon source with glucose, *Appl.Microbiol.Biotechnol.*, **49**, 9-15
- Lengeler, W.J., Drews, G. & Schlegel H.G. (1999)** Biology of the Procaryotes, Georg Thieme Verlag Stuttgart, Germany

- Leuchtenberger W. (1996)** Amino acids-technical production and use. In: Rehm H-J, Reed G., Pühler A. & Stadler P. (eds.) *Biotechnology Vol. 6 Products of primary metabolism*. Verlag Chemie, Weinheim , pp. 465-502
- Levy, H.R. (1979)** Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenases, in *Advances in Enzymology* (Meister, A., ed.) Vol. 48 pp. 97-192, John Wiley and sons, New York
- Liebl, W (1992)** The Genus *Corynebacterium*-Nonmedical. In: Balows A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. & Schleifer K.H. (eds.) *The Prokaryotes*, Chapter 49, second edition Springer Verlag (New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest)
- Lindroth, P. & Mopper, K. 1979** High-performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthaldialdehyde. *Anal. Chem.*, **51**, 1167-1174
- Lowry, O.H., Passonneau, J.V. & Rock, M.K. (1961)** The Stability of Pyridine Nucleotides. *J. Biol. Chem.* **236**, 2756-2759
- Lowry, O.H. Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951)** Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Lundberg, P., Harmsen, E., Ho, C. & Vogel, H.J. (1990)** Nuclear Magnetic Resonance Studies of Cellular Metabolism. *Anal. Biochem.*, **191**, 193-222
- Lynch, A.S., Lin, E.C.C. (1996)** Responses to molecular oxygen in *Escherichia coli* and *Salmonella*, pp. 1526-1538. In: Neidhardt, F.C. (ed. in chief), 2nd ed., ASM, Washington.
- Malin G.M. & Bourd G.I. (1991)** Phosphotransferase-dependent glucose transport in *Corynebacterium glutamicum*. *J.Appl.Bacteriol.*, **71**, 517-523
- Marx, A., de Graaf, A.A., Wiechert, W., Eggeling, L. & Sahm, H. (1996)** Determination of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with metabolite balancing. *Biotechnol.Bioeng.*, **49**, 111-129
- Marx, A. (1997a)** Bestimmung des Kohlenstoffflusses im Zentralstoffwechsel von *Corynebacterium glutamicum* mittels ¹³C-Isotopenanalyse. Dissertation Universität Bonn, Berichte des Forschungszentrums Jülich (jül-3459).
- Marx, A., Striegel, K., de Graaf, A.A., Sahm, H. & Eggeling, L. (1997b)** Response of the Central Metabolism of *Corynebacterium glutamicum* to different flux burdens, *Biotechnol. Bioeng.*, **56**, 168-180.

- Marx A., Eikmanns, B.J., Sahm, H., de Graaf, A.A. & Eggeling, L. (1999)** Response of the Central Metabolism in *Corynebacterium glutamicum* to the use of an NADH-dependent glutamate-Dehydrogenase, *Metabolic Engineering*, **1**, 35-48.
- Matsushita, K., Yamamoto, T., Toyama, H. & Adachi, O. (1998)** NADPH Oxidase System as a Superoxide-generating Cyanide-Resistant Pathway in the Respiratory Chain of *Corynebacterium glutamicum*. *Biosci.Biotechnol.Biochem.*, **62 (10)**, 1968-1977
- McLellan, T. (1982)** Electrophoresis Buffers for Polyacrylamide Gels at Various pH, *Anal. Biochem.*, **126**, 94-99
- Meers, J.L., Tempest, D.W. & Brown, C.M. (1970)** Glutamine(amide) 2-oxoglutarate amidotransferase oxidoreductase (NADP); an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria, *J.Gen.Microbiol.*, **64**, 187-194
- Menkel, E., Thierbach, G., Eggeling, L. & Sahm, H. (1989)** Influence of increased aspartate availability on lysine formation by a recombinant strain of *Corynebacterium glutamicum* and utilization of fumarate, *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 684-688
- Meyer, S., Rizzi, N.N., Reuss, M. & Neubauer, P. (1999)** Optimized Analysis of Intracellular Adenosine and Guanosine Phosphates in *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* **271**, 43-52.
- Minton, A.P. & Wilf, J. (1981)** Effect of Macromolecular Crowding upon the Structure and Function of an Enzyme: Glyceraldehyde-3-phosphat Dehydrogenase. *Biochemistry*, **20**, 4821-4826
- Minton, A.P. (1998)** Molecular Crowding: Analysis of Effects of High Concentrations of Inert Cosolutes on Biochemical Equilibria and Rates in Terms of Volume Exclusion. *Methods in Enzymology*, **Vol. 295**, 127-149
- Mitsumori, F. (1985)** Phosphorous-31 Nuclear Magnetic Resonance Studies on Intact Erythrocytes. Determination of Intracellular pH and Time Course Changes in Phosphorus Metabolites, *J. Biochem.*, **97**, 1551-1560.
- Morbach, S., H. Sahm, and L. Eggeling. (1995)** Use of feedback-resistant threonine dehydratases of *Corynebacterium glutamicum* to increase carbon flux toward L-isoleucine. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 4315-4320.
- Müller, R.H., Löffhagen, N. & Babel, W. (1996)** Rapid extraction of (di)nucleotides from bacterial cells and determination by ion pair reversed-phase HPLC, *J.Microbiol.Meth.*, **25**, 29-35
- Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L. & Schaechter, M. (1990)** Physiology of the bacterial cell. A Molecular Approach. p. 4, Sinauer Sunderland, Massachusetts, USA)

- Neuhoff, V. (1985)** Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: a systematic analysis. *Electrophoresis*, **6**, 427-448
- Nissen, T.L., Schulze, U., Nielsen, J., Villadsen, J. (1997)** Flux distributions in anaerobic, glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiol.*, **143**, 203-218.
- Opheim, D. & Bernlohr, R.W. (1973)** Purification and Regulation of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from *Bacillus licheniformis*. *J.Bacteriol.*, **116**, 1150-1159
- Pedersen, K.J. (1954)** Amine Catalysis in the Decarboxylation of Oxaloacetic Acid. *Acta Chem. Scand*, **8**, 710-722.
- Peters-Wendisch (1996)** Anaplerotische Reaktionen in *Corynebacterium glutamicum*: Untersuchungen zur Bedeutung der PEP-Carboxylase und der Pyruvat-Carboxylase im Zentralstoffwechsel und bei der Aminosäureproduktion, Dissertation Universität Düsseldorf, Berichte des Forschungszentrums Jülich, Jül-3259
- Pons, A., Dussap, C. G., Péquignot, C., and Gros, J.B. (1996)** Metabolic Flux Distribution in *Corynebacterium melassecola* ATCC 17965 for various Carbon Sources, *Biotechnol. Bioeng.*, **51**, 177-189
- Rand, R.P. (1992)** Raising Water to New Heights. *Science*, **256**, 618
- Rand, R.P., Fuller, N.L., Butko, P., Francis, G. & Nicholls, P. (1993)** Measured Change in Protein Solvation with Substrate Binding and Turnover, *Biochem.* **32 (23)**, 5925-5929
- Record, M. T., Courtenay E. S., Cayley, S. and Guttman, H. J. (1998)** Biophysical compensation mechanisms buffering *E.coli* protein-nucleic acid interactions against changing environments, *TIBS* , **23**-May, 190-194
- Redenbach, M., Kieser, H.M., Denapate, D., Eichner, A., Cullum, J., Kinashi, H. & Reij, R. & Vanderlinde, R.E. (1974)** Assay of Aspartate Aminotransferase Activity: Effects of Serum and Serum Proteins on Oxaloacetate Decarboxylation and Dialysis, *Clin. Chem.* **20**, 454-464
- Reizer, J. & Panos, C. (1980)** Regulation of β -galactoside phosphate accumulation in *Streptococcus pyogenes* by an expulsion mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , **77** , 5497-5501
- Reizer, J., Sutrina, S.L., Saier, M.H., Jr, Steward, G.C., Peterkowsky, A. & Reddy, P. (1989)** Mechanistic and physiological consequences of HPr(ser) Phosphorylation on the activities of the phosphoenolpyruvate:sugar Phosphotransferase system in gram-positive bacteria: studies with site-specific mutants of HPr. *EMBO J*, **8**, 2111-2120
- Röber, B., Stolle, J. & Reuter, G. (1984)** *Z.Allg.Microbiol.*, **24**, 629-636

- Rosemeyer, M.A. (1987)** The Biochemistry of Glucose-6-phosphate-Dehydrogenase, 6-Phosphogluconate Dehydrogenase and Glutathione Reductase, *Cell Biochemistry and Function*, **5**, 79-95
- Rollin, C., Morgant, V., Guyonvarch, A. and Guerquin-Kern, J.L. (1995)** ^{13}C -NMR studies of *Corynebacterium glutamicum* melassecola metabolic Pathways, *Eur. J. Biochem*, **227**, 488-493.
- Sauer, U., Hatzimanikatis, V., Hohmann, H.P., Manneberg, M., van Loon, A.P.G.M. & Bailey, J.E. (1996)** Physiology and Metabolic Fluxes of Wild-Type and Riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 3687-3696
- Sauer, U., Hatzimanikatis, V., Bailey, J.E., Hochuli, M., Szyperski, T. & Wüthrich, K. (1997)** Metabolic Fluxes in riboflavin-producing *Bacillus subtilis*, *Nature Biotechnology*, **15**, 448-452
- Schäfer U., Boos W., Takors R. & Weuster Botz D. (1999)** Automated Sampling Device for Monitoring of Intracellular Metabolite Dynamics. *Anal. Biochem*, **270**, 88-96
- Schrumpf, B., Eggeling, L. & Sahm, H. (1992)** Isolation and prominent characteristics of an L-lysine hyperproducing strain of *Corynebacterium glutamicum* *Appl. Microbiol. Biotechnol* **37**, 566-571
- Scopes, R.K. (1987)** Protein purification. Principles and Practice. 2nd Edition, Springer Verlag (New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest)
- Scopes, R.K. (1997)** Allosteric control of *Zymomonas mobilis* glucose-6-phosphate-Dehydrogenase by phosphoenolpyruvate, *Biochem J.*, **326**, 731-735
- Scott, M.D., Meshnick, S.R., Eaton, J.W. 1987.** Superoxide dismutase-rich bacteria: Paradoxical increase in oxidant toxicity. *J.Biol.Chem.*, **262**, 3640-3645.
- Segel I.H. (1975)** Enzyme kinetics. Behaviour and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems, John Wiley & Sons
- Shiio, L. Otsuka, S.I., Takahashi, M. (1962)** Effect of biotin on the bacterial formation of glutamic acid. *J.Biochem.* **52**: 108-116
- Siess, E.A., Kientsch-Engel, R.I., Wieland, O.H. (1984)** Concentration of free Oxaloacetate in the Mitochondrial Compartment of Isolated Liver Cells. *Biochem. J.*, **218**, 171-176.
- Silverberg, M. & Dalziel, K. (1975)** 6-Phospho-D-gluconate-Dehydrogenase from Sheep Liver, *Methods of enzymology*, **41**, 215-220
- Speck, J.F. (1949)** The Effect of Cations on the Decarboxylation of Oxalacetic Acid. *J. Biol. Chem.* **178**, 315-324

- Stanton, R.C., Seifter, J.L., Boxer, D.C., Zimmerman, E. & Cantley, L.C. (1991)** Rapid Release of Bound Glucose-6-phosphate Dehydrogenase by Growth Factors. Correlation with increased enzymatic activity. *J. Biol. Chem.* **266**, 12442-12448
- Stoscheck, C.M. (1990)** Quantitation of protein. *Meth. Enzymol.* **182**, 50-68.
- Stournaras, C., Butz, F. & Kurz, G. (1982)** 6-Phospho-D-gluconate-Dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*. *Methods Enzymol.*, **89**, 278-282.
- Sugimoto, S. & Shiiro I. (1989)** Fructose Metabolism and Regulation of 1-Phosphofructokinase and 6-Phosphofructokinase in *Brevibacterium flavum*, *Agric. Biol. Chem.*, **53** (5), 1261-1268
- Sugimoto, S. & Shiiro I. (1987a)** Regulation of Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase in *Brevibacterium flavum*, *Agric. Biol. Chem.*, **51** (1), 101-108
- Sugimoto, S. & Shiiro I. (1987b)** Regulation of 6-Phosphogluconate-Dehydrogenase in *Brevibacterium flavum*, *Agric. Biol. Chem.*, **51** (5), 1257-1263
- Summers, M.L., Wallis, J.G., Campbell, E.L. & Meeks, J.C. (1995)** Genetic Evidence of a Major Role for Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase in Nitrogen Fixation and Dark Growth of the Cyanobacterium *Nostoc sp. Strain ATCC 29133*, *J. Bacteriol.*, **177**(21), 6184-6194
- Sundaram, S., Karakaya, H., Scanlan, D.J. & Mann, N.H. (1998)** Multiple oligomeric forms of glucose-6-phosphate-Dehydrogenase in cyanobacteria and the role of *opcA* in the assembly process, *Microbiology*, **144**, 1549-1556
- Taketa, K. & Pogell, B.M. (1966)** The Effect of Palmityl Coenzyme A on Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase and Other Enzymes. *J. Biol. Chem.* **241**, 720-726
- Theobald, U., Mailinger, W., Baltes, M., Rizzi, M. & Reuss, M. (1997)** *In vivo* Analysis of Metabolic Dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*: I. Experimental Observations, *Biotechnol. Bioeng.*, **55**, 305-316
- Theorell, H. & Chance, B. (1951)** Studies on liver alcohol-Dehydrogenase II. The Kinetics of the Compound of Horse liver alcohol-Dehydrogenase and reduced diphosphopyridine nucleotide, *Acta Chem. Scand.*, **5**, 1127-1144
- Thompson, J. (1978)** In Vivo Regulation of Glycolysis and Characterization of Sugar:Phosphotransferase Systems in *Streptococcus lactis*, **136**, 465-476
- Tian, W.N., Pignatere, J.N., and Stanton, R.C. (1994)** Signal Transduction Proteins That Associate with the Platelet-derived Growth Factor (PDGF) Receptor Mediate the PDGF-induced Release of Glucose-6-phosphat Dehydrogenase from Permeabilized Cells. *J.Biol.Chem.*, **269**, 14798-14805

- Tian, W.N., Braunstein, L.D., Pang, J., Stuhlmeier, K.M., Xi, Q.C., Tian, X. & Stanton, R.C. (1998)** Importance of Glucose-6-phosphate-Dehydrogenase Activity for Cell Growth, *J.Biol.Chem.*, **273**, 10609-10617.
- Toews, M.L., Kanji, M.I. & Carper, W.R. (1976)** 6-Phosphogluconate-Dehydrogenase-Purification and Kinetics, *J.Biol. Chem.*, **22**, 7127-7131
- Tunail, N., and Schlegel, H.G. (1972)** Phosphoenolpyruvate, a new inhibitor of Glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 1554-1560
- Ursini, M.V., Parrella, A., Rosa, G., Salzano, S., Martini, G. (1997)** Enhanced expression of glucose-6-phosphate-Dehydrogenase in human cells sustaining oxidative stress, *Biochem. J.*, **323**, 801-806
- Vallino, J.J. (1991)** Identification of branch point restrictions in microbial metabolism through metabolic flux analysis and local network perturbations. Ph.D. thesis Massachusetts Institute of Technology.
- Vallino, J.J. & Stephanopoulos, G. (1993)** Metabolic Flux Distributions in *Corynebacterium glutamicum* During Growth and Lysine Overproduction. *Biotechnol. Bioeng.* **41**, 633-646
- Vallino, J.& Stephanopoulos, G. (1994)** Carbon Flux distributions at the Glucose 6-Phosphate Branch point in *Corynebacterium glutamicum* during Lysine Overproduction, *Biotechnol. Prog.*, **10**, 327-334
- Varma A. & Palsson B.O. (1993)** Metabolic Capabilities of *Escherichia coli* II. Optimal Growth Patterns, *J.theor.Biol.*, **165**, 503-522
- Vaseghi S., Baumeister A., Rizzi M. & Reuss M. (1999)** *In vivo* Dynamics of the Pentose Phosphate Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, *Metabolic engineering* , **1**, 128-140
- Voet, D. & Voet, J.G. (1992)** Biochemie VCH-Verlag, Weinheim
- Walker-Simmons M. & Atkinson, D.E. (1977)** Functional Capacities and the Energy Charge in *Escherichia coli* Under Conditions of Nutritional Stress, *J. Bacteriol* , **130**, 676-683
- Watson, D.H. (1978)** The selective retardation of NADP+-dependent-Dehydrogenases by immobilized procion red HE-3B *Biochem. J.*, **173**(2), 591-596
- Wendisch, V. (1997)** Physiologische und NMR-spektroskopische Untersuchungen zur *in vivo* Aktivität zentraler Stoffwechselwege im Wildstamm und in rekombinanten Stämmen von *Corynebacterium glutamicum* Univ. Düsseldorf-Ber.d.FZJülich Jül-3397
- Wildner, G.F. (1975)** The Regulation of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase in Chloroplasts *Z. Naturforsch.*, **30c**, 756-760

- Wilson, J.E. (1980)** Brain hexokinase, the prototype ambiquitous enzyme, *Curr. Top. Cell. Regul.* **16**, 2-54
- Williamson, J.R. & Corkey, B.E. (1979)** Assay of Citric Acid Cycle Intermediates and Related Compounds, Update with Tissue Metabolite Levels and Intracellular Distribution, in: S.P. Colowick, N.O. Kaplan (eds.), *Methods in Enzymology*, Vol. *LV*, Academic Press, New York 1979, pp. 200-222.
- Wolf, R.E. Jr, Prather, D.M., Shea, F.M. (1979)** Growth rate dependent alteration of 6-phosphogluconate-Dehydrogenase and glucose-6-phosphate-Dehydrogenase levels in *Escherichia coli* K-12. *J.Bacteriol.*, **139**, 1093-1096
- Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D. und Somero, G. N. (1982)** Living with Water Stress: Evolution of Osmolyte Systems *Science*, **217**, 1214-1222
- Ye, J.J., Reizer, J., Cui, X. & Saier, M.H., Jr (1994)** Inhibition of the Phosphoenolpyruvate:Lactose Phosphotransferase System and Activation of a Cytoplasmic Sugar-phosphate Phosphatase in *Lactococcus lactis* by ATP-dependent Metabolite-activated Phosphorylation of Serine 46 in the Phosphocarrier Protein HPr. *J. Biol. Chem.*, **269**, 11837-11844.
- Yue, R.H., Noltmann, E.A. & Kuby, S.A. (1969)** Glucose 6-phosphate-Dehydrogenase from *brewers' yeast* (Zwischenferment). 3. Studies on the subunit structure and on the molecular association phenomenon induced by triphosphopyridine nucleotide, *J Biol Chem.*, **244(5)**, 1353-64.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie 1 des Forschungszentrums Jülich angefertigt.

Ich möchte an dieser Stelle Herrn Professor Dr. Sahm sehr herzlich für die Überlassung des Themas danken. Sein Interesse am Fortgang der Arbeit und seine Anregungen waren mir stets eine wertvolle Hilfe.

Frau Professor Dr. Kula danke ich für die Übernahme des Korreferats sowie für ihre Bereitschaft, mir durch Rat und Tat zu helfen.

Für die gute Hilfe bei vielen Arbeiten im Labor, für das besondere Engagement und die bemerkenswerte Ausdauer möchte ich mich ganz besonders bei Frau Striegel bedanken. Du hast mir sehr geholfen.

Das Gleiche gilt auch für Frau Mack und Herrn Lambert die mich im Labor mit viel Ausdauer unterstützt haben. Dafür vielen Dank.

Dr. Lothar Eggeling und Dr. Albert de Graaf danke ich für die vielen anregenden Diskussionen und ihre stete Bereitschaft, mir bei der Lösung so mancher Probleme behilflich zu sein.

Für die engagierte Hilfsbereitschaft, hin zu einer optimalen Nutzung vieler Computerfunktionen möchte ich mich bei Dr. Siggi Schobert bedanken.

Bei vielen Fragestellungen aus der *in vivo in vitro* – Problematik haben mir die vielen anregenden Unterhaltungen mit Herrn Dr. Karl Ludwig Schimz sehr geholfen. Dafür möchte ich mich hier sehr herzlich bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Professor Dr. Meyer vom Institut für Physiologische Chemie der Ruhr-Universität Bochum für die N-terminale Sequenzierung und die MALDI-Analyse.

Schließlich möchte ich mich für die immer nette und freundliche Atmosphäre im Büro bei Doris, Eva, Anja und Sören und für die freundliche Aufnahme und die stets gewährte Hilfsbereitschaft und Unterstützung in so vielen Dingen bei allen Angehörigen des Institutes ganz herzlich bedanken.

Forschungszentrum Jülich



Jül-3743
Februar 2000
ISSN 0944-2952