



FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH

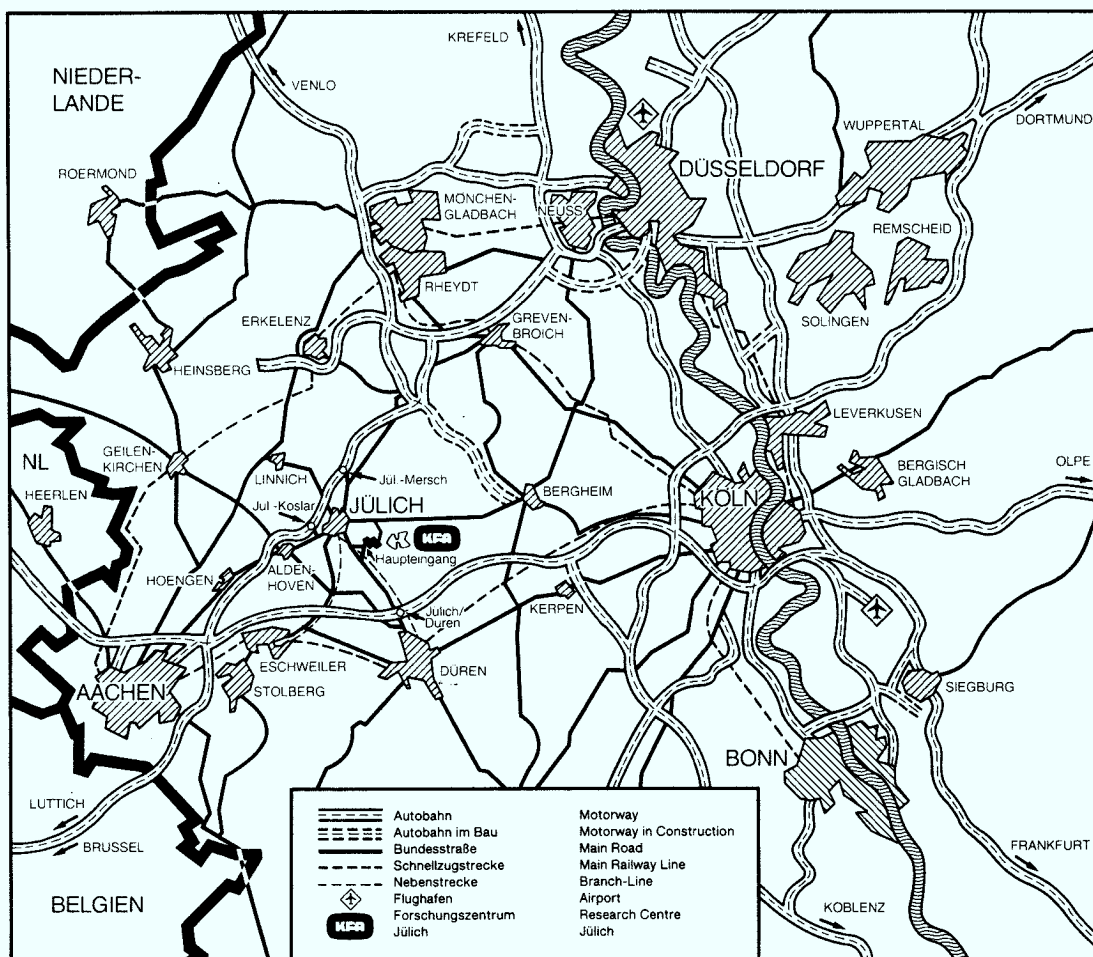
Institut für Biotechnologie

**Untersuchungen zum Mechanismus
der Glutamatsekretion in
*Corynebacterium glutamicum***

von

Christian Hoischen

Jül-2413
Dezember 1990
ISSN 0366-0885



Als Manuskript gedruckt

Forschungszentrum Jülich: Berichte Nr. 2413

Institut für Biotechnologie Jül-2413

D 61 (Diss. Universität Düsseldorf)

Zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK · Forschungszentrum Jülich GmbH

Postfach 1913 · D-5170 Jülich (Bundesrepublik Deutschland)

Telefon: 02461/61-0 · Telex: 833556-70 kfad · Telefax: 02461/61-6103



6133207534

**Untersuchungen zum Mechanismus
der Glutamatsekretion in
*Corynebacterium glutamicum***

von

Christian Hoischen

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG.....	1
1. Modelle zum Mechanismus der Glutamatsekretion.....	4
1.1. Modell I ("leak").....	4
1.1.1. Befunde zur erhöhten Permeabilität der Cytoplasmamembran.....	5
1.1.2. Befunde zum Zusammenhang zwischen verändertem Lipidstatus und erhöhter Sekretionsaktivität.....	6
1.2. Modell II ("Inversionscarrier").....	8
2. Zur Energetik der Glutamatsekretion - Allgemeine Prin- zipien der Energiekopplung von Transportprozessen.....	9
2.1. Primär aktive Transportsysteme.....	9
2.2. Sekundär aktive Transportsysteme.....	11
3. Ziel der Arbeit.....	12
 II. MATERIAL UND METHODEN.....	 13
1. Chemikalien.....	13
2. Nährmedien.....	14
3. Organismus und Kulturbedingungen.....	16
4. Metabolitnachweis im Kulturfiltrat.....	17
4.1. Glutamatbestimmung.....	17
4.2. Glucosebestimmung.....	18
4.3. Lactatbestimmung.....	18
4.4. Gesamtanalyse von Aminosäuren.....	19
4.5. Cyanidnachweis.....	20
5. Extraktion und Bestimmung intrazellulärer Aminosäuren.....	20
6. Bestimmung des internen Zellvolumens und der internen Aminosäurekonzentration.....	21
7. Bestimmung der intrazellulären Kalium - und Natriumkonzentration.....	22
8. Die Komponenten der proton motive force.....	23
8.1. Das Membranpotential.....	23
8.2. Der pH-Gradient.....	25
9. Messung der Substrataufnahme.....	27
10. Die intrazellulären Adeninnukleotide.....	28
11. Bestimmung der Glutamatsekretion durch Einbau von radioaktiver Markierung.....	31

12. Lipidanalytik.....	33
12.1. Bestimmung des Gesamtphospholipidgehalts - Extraktionsmethode I.....	33
12.1.1. Phosphatanalyse.....	33
12.2. Fettsäureanalyse.....	34
12.3. Einbau von [^{14}C]-Acetat in das Gesamtlipid - Extraktionsmethode II.....	36
12.4. Auftrennung und Identifikation der Phospholipide....	36
12.4.1. Anfärbemethoden für die Phospholipide.....	38
12.5. Quantitative Bestimmung der einzelnen Phospholipide.	40
12.5.1. Synthese der einzelnen Phospholipide nach der Biotinaddition.....	40
III. ERGEBNISSE.....	42
1. Charakterisierung der Glutamatsekretion.....	42
1.1. Optimierung eines Minimalmediums für die Glutamatproduktion.....	42
1.2. Standardglutamatfermentation unter Biotinlimitierung.	44
1.3. Kurzzeitfermentation mit <i>Corynebakterium glutamicum</i> ..	45
1.4. Biochemische und bioenergetische Analyse der Sekretion.....	49
1.5. Spezifität der Glutamatsekretion.....	52
1.6. Einfluß des energetischen und metabolischen Status der Zellen.....	54
1.7. Einfluß des osmotischen Drucks auf die Sekretion.....	56
2. Der Einfluß von Biotinmangel und verändertem Lipidstatus auf die Glutamatsekretion bei <i>Corynebakterium glutamicum</i> ..	59
2.1. Vergleich der Lipidzusammensetzung von Produzenten- zellen und Nichtproduzenten zellen.....	60
2.2. Korrelation von Membranveränderungen und Glutamatefflux.....	62
2.3. Der primäre Wirkort des Biotins bei nachträglicher Zugabe.....	69
3. Energetik und Regulation der Glutamatsekretion.....	73
3.1. Einfluß der Komponenten der proton motive force und des Glutamatkonzentrationsgradienten auf die Sekretion.....	74

III

3.2. Einfluß der Adeninnukleotide auf die Glutamatsekretion.....	78
3.2.1. Der Entkoppler CCCP.....	79
3.2.2. Einfluß von Valinomycin auf den ATP-Pool.....	79
3.2.3. Korrelation zwischen Adeninnukleotid-Pool und Hemmung der Glutamatsekretion durch O ₂ -Limitierung und Cyanid.....	81
3.2.4. Korrelation zwischen ATP-Gehalt und Produktion unter glucoselimitierten Bedingungen.....	84
3.2.5. Hemmung der Sekretion durch Blockierung der F ₁ F ₀ -ATPase.....	84
3.2.6. Regulation der Glutamatsekretion durch die energy charge und das Verhältnis ATP/ADP.....	86
3.3. Einfluß der Hemmstoffe auf die Glucoseaufnahme.....	89
4. Glutamatproduktion mit induzierten Aufnahmezellen.....	90
4.1. Charakterisierung der EDTA-behandelten Zellen.....	92
 IV. DISKUSSION.....	95
1. Zum Mechanismus der Glutamatsekretion.....	95
2. Zum Einfluß der Membranveränderungen auf die Glutamatsekretion.....	100
3. Energetik und Regulation der Glutamatsekretion.....	105
4. Modell der Glutamatsekretion.....	111
 V. ZUSAMMENFASSUNG.....	115
 VI. LITERATUR.....	117
 VII. VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN.....	130

I. EINLEITUNG

Corynebacterium glutamicum und eine Reihe anderer gram⁺, nicht sporulierender und unbeweglicher coryneformer Bakterien werden seit mehr als 30 Jahren für die mikrobielle Produktion von ca. 300 000 t/Jahr Glutamat und anderer Aminosäuren, bes. Lysin, Isoleucin und Leucin, eingesetzt (Kinoshita et al., 1957; Kleemann et al., 1985; Leuchtenberger, 1984; Nakayama, 1982; Wichmann et al., 1990). Zudem wurden Verfahren zur Prolin- (Nakanishi et al., 1987) und Glutaminproduktion (Tsuchida et al., 1987) entwickelt. Na-Glutamat findet vor allem in der Lebensmittelindustrie wegen seiner aromasteigernden und geschmacksverbessernden Wirkung breite Anwendung (Maggi, Aromat, Fondor, Erdnüsse etc).

Mit der Absicht, zu erhöhten Glutamatausbeuten zu gelangen, versuchten Shiio et al. (1969, 1980) Engpässe im Syntheseweg des Glutamats zu erkennen, um diese dann durch Klonierung der Enzyme, die die limitierenden Schritte katalysieren, auszuschalten (Tsuchida et al., 1984). Aufgrund dieser Untersuchungen stellte man für die Glutamatbiosynthese und deren Regulation bei *Corynebacterium glutamicum* eine Hypothese auf, die sich auf Zellen im Produktionszustand bezieht (Mori und Shiio, 1987; Nakayama et al., 1974; Ruklish et al., 1979, 1987; Shiio et al., 1959; Shiio, 1960; Shiio und Ujigawa-Takeda, 1979; Shiio et al., 1982). Wie in Abb. 1 zusammengefaßt dargestellt ist, wird das Substrat Glucose sowohl über die Glykolyse, bei der die Phosphofruktokinase nicht reguliert wird (Sugimoto und Shiio, 1989), als auch über den Pentosephosphatweg abgebaut. Durch ¹³C-NMR-Studien wurde nachgewiesen, daß der Anteil der Glykolyse 80 - 90% ausmacht, während über den Pentosephosphatweg 10 - 20% der Glucose umgesetzt werden (Oishi und Aida, 1965; Walker et al., 1982). Letztendlich gelangt das Substrat in den Zitronensäurezyklus und es entsteht 2-Oxoglutarat, das reduktiv durch die sehr aktive Glutamat-DH zum Glutamat aminiert wird (Kimura, 1962). Das mit der Glutamat-DH um das Substrat 2-Oxoglutarat konkurrierende Enzym des Zitronensäurezyklus, die 2-Oxoglutarat-DH, zeigt nur sehr geringe schwer nachweisbare Aktivitäten. Da dieses Enzym offensichtlich stark reguliert wird und sich bei der Präparation als sehr instabil zeigte, hatte es lange Zeit nicht nachgewiesen werden können (Shiio et al., 1962b). Seine

Existenz konnte erstmals 1980 von Shiio und Ujigawa-Takeda für einen Glutamatproduzenten eindeutig bewiesen werden. Zur Auffüllung des Zitronensäurezyklus existieren unter Produktionsbedingungen starke anaplerotische Sequenzen wie die CO_2 -fixierende PEP-Carboxylase, der Glyoxylatzyklus (bei Acetat als C-Quelle) und das NADP-spezifische Malatenzym (Kinoshita und Tanaka, 1972).

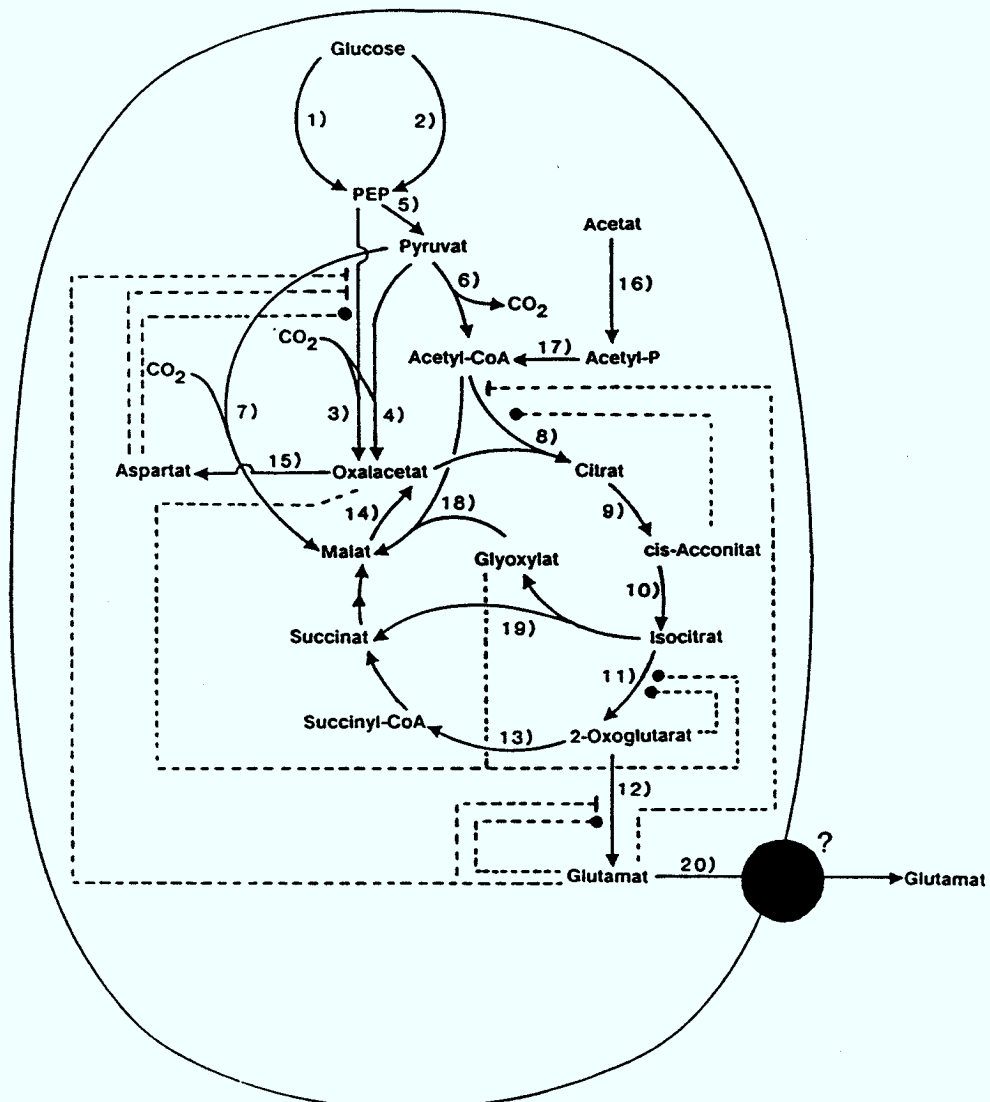


Abb. 1: Glutamatbiosynthese und Regulation der Biosynthese bei Glutamatbakterien. 1) Enzyme der Glykolyse, 2) Enzyme des Pentosephosphatweges, 3) PEP-Carboxylase, 4) Pyruvat-Carboxylase, 5) Pyruvat-Kinase, 6) Pyruvat-Dehydrogenase, 7) Malat-Enzym, 8) Citrat-Synthase 9), 10) Aconitase, 11) Isocitrat-Dehydrogenase, 12) Glutamat-Dehydrogenase, 13) 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase, 14) Malat-Dehydrogenase, 15) Transaminase A, 16) Acetat-Kinase, 17) Phosphat-Acetyltransferase, 18) Malat-Synthetase, 19) Isocitrat-Lyase, 20) Sekretionssystem. ----● symbolisiert Feedbackinhibition, ----| stellt Feedbackrepression dar.

Entsprechend der oben beschriebenen Hypothese für die Glutamatbiosynthese unter Produktionsbedingungen lenkt diese Konstellation, hohe Glutamat-DH-Aktivitäten und sehr niedrige 2-Oxoglutarat-DH-Aktivitäten, den Metabolitfluß in Richtung Glutamat und stellt eine wichtige Voraussetzung für eine hohe Glutamatproduktion dar (Crueger und Crueger, 1989). Um einem zu starken Anstieg der internen Glutamatkonzentration entgegenzuwirken, wird die Glutamatsynthese aus 2-Oxoglutarat durch Feedbackinhibition und Feedbackrepression des Endprodukts Glutamat reguliert (Shiio und Ozaki, 1970; Shiio und Ujigawa, 1978). Weiterhin reguliert das Glutamat seine Synthese durch Feedbackrepression der PEP-Carboxylase, die zusätzlich durch Aspartat reguliert wird, und der Citratsynthase. Die Citratsynthase wird zudem durch cis-Aconitat inhibiert (Abb. 1).

Schon früh wurde bei Experimenten mit coryneformen Glutamatproduzenten herausgefunden, daß sie eine natürliche Biotinauxotrophie aufweisen. Die Fermentation dieser Organismen bei wachstums-limitierenden Biotinkonzentrationen führte zu einer erheblichen Steigerung der Glutamatausbeuten (Shiio et al., 1962a). Anfangs wurde daher das biotinauxotrophe *Corynebacterium glutamicum* zur Glutamatproduktion in definiertem Mineralsalzmedium unter Biotinlimitierung fermentiert. Da jedoch in preisgünstigeren Komplexmedien wie Zuckerrohr- oder Zuckerrübenmelasse große Mengen Biotin enthalten sind (Crueger und Crueger, 1989), versuchte man, die Glutamatsekretion auch auf anderen Wegen hervorzurufen. Die Effluxinduktion kann neben (I) der Biotinlimitierung durch die folgenden Behandlungsmöglichkeiten der Zellen hervorgerufen werden: (II) durch Zugabe von gesättigten Fettsäuren oder Fettsäurederivaten im Verlauf einer Fermentation (Takinami et al., 1965); (III) durch Zusatz von Penicillin während der logarithmischen Wachstumsphase (Nunheimer et al., 1970; Somerson und Phillips, 1961); (IV) durch Anzucht von ölsäureauxotrophen Mutanten unter Ölsäuremangel (Kanzaki et al., 1969; Kitano et al., 1972); (V) durch Anzucht von glycerinauxotrophen Mutanten unter Glycerinmangel (Kikuchi et al., 1972; Nakao et al., 1972). Für alle Produktionsmethoden wurde angenommen, daß sie Veränderungen der Cytoplasmamembran bewirken.

Ausgehend vom angebotenen Substrat zum gewünschten Produkt Glutamat (Abb. 1) bestehen im Gegensatz zu den eindeutigen Vorstellungen für den letzten Schritt bei der Glutamatproduktion - der Sekretion des synthetisierten Glutamats aus dem Cytoplasma ins ex-

terne Medium - zwei unterschiedliche Hypothesen, von denen jedoch noch keine experimentell bewiesen ist. Im folgendem sollen daher die Vorstellungen erläutert werden, die in der Literatur bisher zur Glutamatsekretion bei *Corynebacterium glutamicum* entwickelt wurden. Gleichzeitig werden die zum Verständnis der Glutamatsekretion notwendigen bioenergetischen Grundlagen zum Stofftransport, insbesondere zu primären und sekundären Transportsystemen vorgestellt.

1. Modelle zum Mechanismus der Glutamatsekretion

Für den Glutamatefflux bei *C. glutamicum* sind im Laufe der Jahre zwei Modelle in der Literatur beschrieben worden, die in der vorliegenden Arbeit als "leak"-Modell und als "Inversionscarrier"-Modell bezeichnet werden. Sie werden im folgenden näher erläutert.

1.1. Modell I ("leak")

Gemäß dem "leak"-Modell soll folgender Prozeß zur effizienten Glutamatsekretion führen (Bunch und Harris, 1986; Demain und Birnbaum, 1968; Kikuchi und Nakao, 1986; Kinoshita und Nakayama, 1978): Die unter Fermentationsbedingungen suboptimale Biotinkonzentration führt während des Wachstums der Bakterienpopulation zu einer Verringerung der Biotinkonzentration in den einzelnen Zellen (Takinami et al., 1966). Dieser Biotinmangel bewirkt eine stark reduzierte Aktivität der Acetyl-CoA-Carboxylase bei der Fettsäuresynthese, woraufhin die Menge an frei verfügbaren Fettsäuren in der Zelle absinkt. Daraus resultieren ein Mangel an Phospholipiden und Veränderungen in der Phospholipid- und Fettsäurezusammensetzung der Cytoplasmamembran. Diese Veränderungen, so postuliert Modell I, verändern wiederum die physikalischen Eigenschaften der Membran und führen zu Membranschädigungen: die Membran wird unspezifisch permeabel für Glutamat, so daß der Glutamatefflux durch passive Diffusion erfolgt (Bunch und Harris, 1986; Demain und Birnbaum, 1968; Hirose et al., 1985; Kikuchi und Nakao, 1986; Kinoshita und Tanaka, 1972; Milner et al., 1987; Shio et al., 1962 a,b, 1963). Mit dem passiven Ausfluß des Glutamats sinkt die interne Glutamatkonzentration, woraufhin die Feedbackhemmung wegfällt, die den Glutamatlevel in der Zelle auf einem konstanten Wert halten soll (Britz und Demain, 1985; Kinoshita, 1985). Dies hat zur Folge, daß in den Zellen ständig Glutamat synthetisiert

und sezerniert wird (Demain und Birnbaum, 1968; Shio et al., 1962 a,b, 1963).

Nach der "leak" - Hypothese wird Glutamat also passiv durch Diffusion über eine permeabilisierte Cytoplasmamembran sezerniert. Die einzige Triebkraft für die Glutamatsekretion wäre in diesem Fall der chemische Gradient des Glutamats über die Membran.

Modell I ("leak") stellt die in der Literatur allgemein anerkannte Hypothese für die Glutamatsekretion dar, wird aber auch für die Sekretion von anderen Aminosäuren und Nukleotiden in Erwägung gezogen (Crueger und Crueger, 1989; Furuya et al., 1968, 1970; Teshiba und Furuya, 1982). Die Hypothese stützt sich auf die in den weiteren Punkten aufgeführten experimentellen Befunde.

1.1.1. Befunde zur erhöhten Permeabilität der Cytoplasmamembran

Aufgrund der im folgenden beschriebenen Tatbestände postulierten Shio et al. (1963), daß die gesteigerte Glutamatproduktion auf eine Erhöhung der Permeabilität der Cytoplasmamembran zurückzuführen sei. Es wurde früh festgestellt (Shio et al., 1962b), daß der stimulierende Effekt der Biotinlimitierung auf die Glutamatsekretion nicht durch die Aktivierung bestimmter an der Glutamatbiosynthese beteiligter Enzyme erklärt werden kann. Aufgrund von Untersuchungen, in denen die intrazellulären Aminosäuren von biotinlimitierten Produzentenzellen und biotinsupplementierten Nichtproduzentenzellen analysiert und miteinander verglichen wurden (Shio et al., 1962c), zeigten die Autoren, daß der Glutamatgehalt von Produzentenzellen, der bei beiden Zelltypen 60 - 70% des gesamten Aminosäurepools ausmacht, nur ca. 50% der Glutamatinnenkonzentration von Nichtproduzenten aufweist. Auch die übrigen Aminosäurekonzentrationen von Produzenten waren bei diesem Vergleich reduziert. Nach intensiver Waschprozedur sank der Gehalt an internen Aminosäuren, insbesondere der Glutamatgehalt, bei biotinlimitierten Zellen - im Vergleich zu biotinsupplementierten Zellen - stark ab (Kimura, 1963; Shio et al., 1962a). Als Maß für die

internen Aminosäurekonzentrationen setzten die Autoren die analysierte Aminosäuremenge pro Trockengewicht ein, oder die Aminosäuremenge wurde auf den N-Gehalt der Zellen bezogen.

Der Tatbestand, daß die Glutamatsekretion neben der Biotinlimitierung auch noch durch Penicillinaddition (Somerson und Phillips, 1961) und durch Addition von Fettsäurederivaten (Shiio et al., 1963; Takinami et al., 1963) induziert werden konnte, wurde als allgemeiner Hinweis für die Gültigkeit von Modell I gewertet. Auch diese zusätzlichen Möglichkeiten zur Glutamatproduktion führten zu Effekten, die den unter Biotinlimitierung auftretenden Wirkungen ähnlich waren, wie erheblich erhöhter Glutamatefflux und reduzierter interner Glutamatkonzentration. Hieraus folgerten Shiio et al. (1963), daß die Biotinlimitierung die Addition von Fettsäuren und der Zusatz von Penicillin an noch nicht bekannten Wirkorten die Synthese der Zellmembran beeinflussen, so daß diese für Glutamat permeabilisiert wird.

1.1.2. Befunde zum Zusammenhang zwischen verändertem Lipidstatus und erhöhter Sekretionsaktivität

Aufgrund der oben aufgeführten Überlegungen haben eine Reihe von Autoren intensive Untersuchungen bezüglich der Zusammensetzung der Cytoplasmamembran bei coryneformen Glutamatproduzenten vorgenommen.

Schon früh wurde die erhöhte Glutamatsekretion mit Veränderungen in der Fettsäurezusammensetzung erklärt. Shibukawa et al. (1966, 1968) zeigten für den Glutamatproduzenten *Microbacterium ammoniaphilum*, daß der Fettsäuregehalt von Produzenten auf 50% des Ausgangswertes von Nichtproduzenten reduziert war. Die Produzenten wiesen zudem einen erhöhten Anteil an gesättigten Fettsäuren auf. Daraus folgerten die Autoren, daß für eine effiziente Glutamatsekretion ein Verhältnis gesättigter/ungesättigter Fettsäuren größer 1 vorliegen muß. Demgegenüber zeigten Otsuka und Shiio (1968) für *Brevibacterium flavum* und Kikuchi und Nakao (1973a) für *Corynebacterium alkanolyticum*, daß die Fettsäurezusammensetzung nicht als ausschließlicher Regulator der Glutamatsekretion in Frage kommt.

Auch der Phospholipidgehalt der Zellen, bzw. die Phospholipidzusammensetzung wurden als regulatorische Komponente in Erwägung gezogen, nachdem Takinami et al. (1968) festgestellt hatten, daß Produzenten einen um 50% reduzierten Phospholipidgehalt aufweisen. Daraufhin zeigten Shibukawa et al. (1970), daß bei *Microbacterium ammoniaphilum* unter Produktionsbedingungen ein erhöhter Anteil von Cardiolipin (DPG) auftritt, während bei Nichtproduzenten Phosphatidsäure (PA) überwiegt. Die Autoren folgerten, daß die Glutamatsekretion durch die Phospholipidzusammensetzung, besonders durch das Verhältnis DPG/PA reguliert wird. Kobayashi et al. (1971) wiesen für eine penicillinresistente Mutante von *Corynebacterium hydrocarboclastus* nach, daß mit einer hohen Glutamatsekretion nach Penicillinaddition eine deutliche Verminderung des relativen PIM-Gehalts der Zellen korreliert war. Im Widerspruch zu Shibukawa et al. (1970) schlugen die Autoren eine Regulation durch ein einzelnes Phospholipid, PIM, vor.

In Übereinstimmung mit Takinami et al. (1968) wiesen Kikuchi et al. (1973) und Nakao et al. (1973) auch für *Corynebacterium alkano-lyticum* eine Korrelation zwischen einer Reduktion des Phospholipidgehalts in der Cytoplasmamembran und einer erhöhten Glutamatsekretion nach. Der Organismus kann mit Alkanen als einziger C-Quelle durch Zugabe von Penicillin zur Glutamatsekretion angeregt werden. Auch eine glycerin-auxotrophe Mutante von *Corynebacterium alkano-lyticum* (Kikuchi und Nakao, 1973 a,b; Nakao et al., 1972) weist unter Produktionsbedingungen einen reduzierten Phospholipidgehalt auf. Eine Veränderung in der Phospholipidzusammensetzung wurde jedoch nicht nachgewiesen.

Die oben vorgestellten Untersuchungen galten der Charakterisierung einer möglichen regulatorischen Komponente für die Glutamatsekretion. Dafür wurden die Fettsäurezusammensetzung, der Gehalt an PIM oder das Verhältnis DPG/PA favorisiert. Die vielfältigen Daten widersprechen einander jedoch bezüglich der regulatorischen Komponente. Als gemeinsame Grundaussage sämtlicher durchgeführten Untersuchungen stellte sich heraus, daß unter allen Umständen bei Glutamatproduzenten die Cytoplasmamembran in der Zusammensetzung und im Gehalt der Phospholipide und der Fettsäuren drastisch verändert ist.

1.2. Modell II ("Inversionscarrier")

Die zweite Hypothese für den Glutamatefflux basiert auf dem allgemein für viele Effluxprozesse in Bakterien angenommenen Modell. Demnach wird der Substratefflux - wegen der grundsätzlichen Reversibilität enzymatischer Vorgänge - durch eine Inversion des Aufnahmeprozesses, entsprechend einem veränderten elektrochemischen Potential, katalysiert (Ten Brink und Konings, 1986; Konings und Michels, 1980; Konings, 1985; Saier, 1979).

Clement et al. stellten 1984 eine zu Modell I ("leak") konträre Hypothese auf, die besagt, daß während der Glutamatproduktion die Aminosäure Glutamat über seinen Aufnahmecarrier sezerniert wird, der in Umkehrung seiner ursprünglichen Transportrichtung arbeitet. Diese zweite Literaturhypothese wird im folgendem als Modell II ("Inversionscarrier") bezeichnet.

Die Autoren (Clement et al., 1984; Clement und Lanéelle, 1986; Marquet et al., 1986) untersuchten Zellen von *Corynebacterium glutamicum*, die Glutamat produzierten, unter Biotinlimitierung und nach Zugabe von Fettsäurederivaten. Die Produzentenzellen wiesen, wie bereits bei der Beschreibung von Modell I ("leak") erwähnt, einen auf ca. 50% reduzierten Phospholipidgehalt und ein verändertes Verhältnis gesättigter/ungesättigter Fettsäuren auf.

Im Vergleich zu unbehandelten Zellen nahmen diese lipidveränderten Produzenten Glutamat nur mit verhältnismäßig geringen Raten auf. Da die Glutamataufnahme durch Protonophore und Ionophore hemmbar ist, postulierten die Autoren ein sekundär aktives Aufnahmesystem, das durch die proton motive force getrieben wird.

Nach Modell II sollten die beobachteten Lipidveränderungen in der Cytoplasmamembran das Glutamataufnahmesystem selektiv von seiner Energiequelle, (einer Komponente) der proton motive force, entkoppeln, während die Fähigkeit des Carriers, mit seinem Substrat zu interagieren bestehen bleibt. Aufgrund dieser Entkopplung sollte der Carrier das Glutamat nur noch entsprechend dem elektrochemischen Potential des Glutamats transportieren, d.h., aus dem Cytoplasma ins umgebende Medium.

2. Zur Energetik der Glutamatsekretion - Allgemeine Prinzipien der Energiekopplung von Transportprozessen

Zur Energetik der Glutamatsekretion bei *Corynebacterium glutamicum* existieren entsprechend den beiden vorgestellten Modellen (vgl. I.1.1. und I.1.2.) zwei kontroverse Vorstellungen. Das "leak" - Modell besagt, daß Glutamat durch passive Diffusion über eine physikalisch veränderte Membran sezerniert wird, wobei der Konzentrationsgradient als Triebkraft des Efflux fungiert (Demain und Birnbaum, 1968; Kikuchi und Nakao, 1986). Es ist unklar, ob eine Proteinkomponente an der Sekretion beteiligt ist. Nach dem "Inversionscarrier" - Modell wird Glutamat durch seinen in umgekehrter Richtung arbeitenden Aufnahmecarrier sezerniert (Clement et al., 1984; Clement und Lanéelle, 1986). Es handelt sich um ein sekundäres Transportsystem, das das Glutamat entsprechend seinem elektrochemischen Potential transportiert.

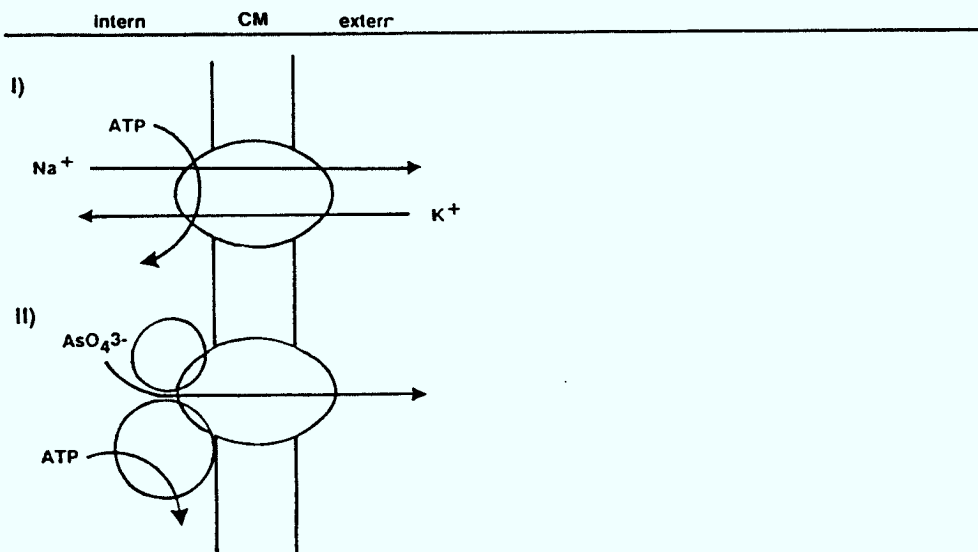
Da jedoch der Mechanismus der Glutamatsekretion bisher noch nicht näher untersucht worden ist, und da zudem beide Modelle zur Glutamatsekretion sich diesbezüglich offensichtlich widersprachen, war keine eindeutige Aussage zur Energetik und Regulation möglich.

Unter der Annahme, daß Aufnahme- und Sekretionssysteme nach vergleichbaren biochemischen Prinzipien verlaufen, sollen im folgenden kurz die allgemeinen Prinzipien der Energiekopplung bei bekannten bakteriellen Aufnahmesystemen erläutert werden. Der Substrattransport über die bakterielle Cytoplasmamembran wird in der Regel in zwei unterschiedliche Kategorien bezüglich des Transportmechanismus aufgeteilt (Harold, 1986): und zwar in primär aktive (I) und sekundär aktive (II) Transportsysteme.

2.1. Primär aktive Transportsysteme

Bei den primär aktiven Transportsystemen ist der Translokationsschritt direkt an eine chemische Reaktion gekoppelt. Dazu gehören zunächst die ATP-getriebenen Carrier, bei denen der Transport durch die Energie aus Phosphatbindungen getrieben wird. Als Beispiele sind zunächst die ATP-abhängigen Kationentransportsysteme zu nennen, wie der ATP-abhängige Natriumtransport (Abb. 2A) in *Streptococcus faecalis* (Heefner und Harold, 1980), der Kalziumtransport in einer Reihe von Mikroorganismen (Lynn und Rosen, 1987) und Kaliumaufnahmesysteme in *Escherichia coli* (Rhoads und

A) primär aktive Transportsysteme



B) sekundär aktive Transportsysteme

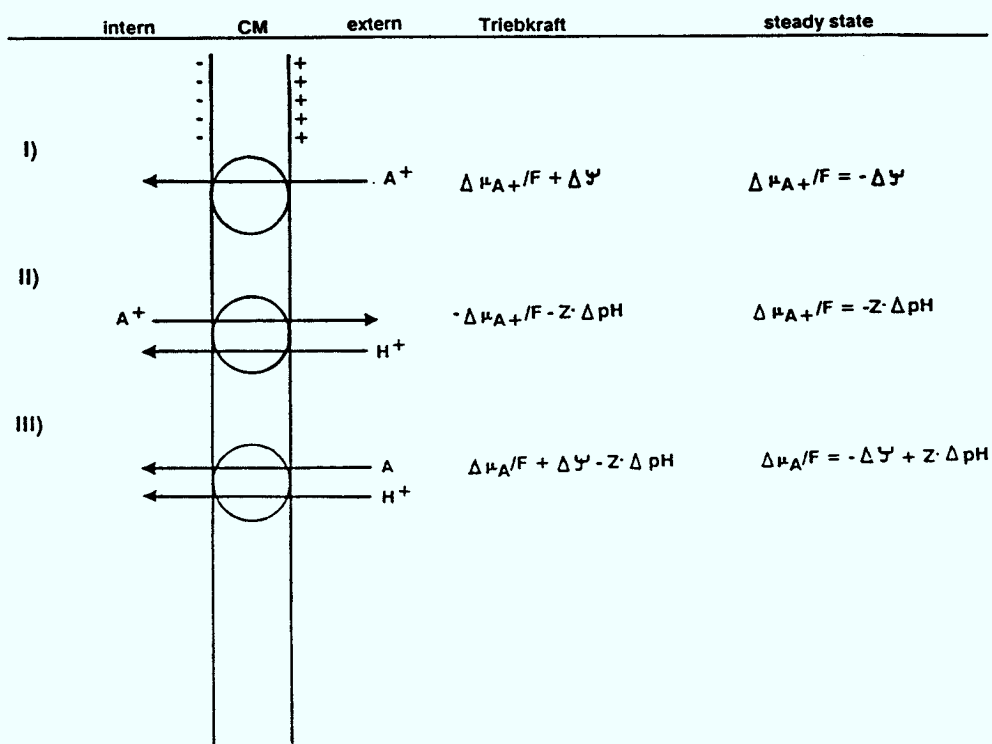


Abb. 2: Primär und sekundär aktive bakterielle Transportsysteme. A) Beispiele für primär aktive Transportsysteme: I) ATP-abhängiger Na^+ -Export bei *Streptococcus faecalis*; II) ATP-abhängiger Arsenat-export bei *Escherichia coli*. B) Prinzipien des sekundär aktiven Transports: I) Uniport; II) Antiport; III) Symport. $Z = 2,3 \cdot R \cdot T / F \approx 59 \text{ mV}$. R = Gaskonstante, T = absolute Temperatur, F = Faraday'sche Konstante.

Epstein, 1977; Walderhaug et al., 1987). Auch ATP-abhängige Aufnahmesysteme für Aminosäuren sind weit verbreitet (Boos, 1974). In diese Kategorie fallen vor allem eine Reihe von bindeproteinabhängigen Aminosäureaufnahmesystemen in gram⁻ Bakterien (Ames, 1986, 1988). Auch in gram⁺ Bakterien gibt es Hinweise für ATP-abhängigen primären Transport von Aminosäuren (Poolman et al. 1987a,b).

ATP - abhängige Exportsysteme sind für Schwermetalle bei auftretenden Resistenzen, z.b. für den Arsenatefflux (Abb. 2A) von *Escherichia coli*, gezeigt worden (Silver und Misra, 1988). Diese Möglichkeit wurde für den Glutamatefflux bisher noch nicht berücksichtigt.

Auch Gruppentranslokationssysteme werden zu den primären Transportsystemen gezählt. Die transportierten Substrate werden während des Transportvorgangs durch eine Kaskade beteiligter enzymkatalysierter Reaktionen chemisch modifiziert (Postma und Lengeler, 1985). Am ausführlichsten sind die PEP-Phosphotransferasesysteme für bestimmte Zucker untersucht, die unter den Eubakterien weit verbreitet sind (Reizer et al., 1988; Saier et al., 1988; Saier, 1989) und auch für den Glutamatproduzenten *Brevibacterium flavum* nachgewiesen wurden (Mori und Shiio, 1987). Gruppentranslokationssysteme sind bisher jedoch nie für den Transport von Aminosäuren beobachtet worden.

2.2. Sekundär aktive Transportsysteme

Der Transport einer Reihe von Substraten über die bakterielle Cytoplasmamembran wird entsprechend der chemiosmotischen Hypothese (Mitchell, 1972) durch die proton motive force oder eine ihrer Komponenten getrieben, d.h. durch das elektrische Potential oder durch den pH Gradienten über die Membran. Ionengradienten (Na⁺, K⁺) und der chemische Gradient des Substrates kommen ebenfalls als Triebkräfte in Frage (Mitchell, 1966, 1970).

Drei verschiedene Möglichkeiten für den sekundären Transport werden beschrieben (Abb. 2B): (I) Uniport, ein einzelnes Solut wird transportiert; (II) Symport, zwei oder mehr Solute werden gekoppelt in die gleiche Richtung transportiert; (III) Antiport, zwei oder mehr Solute werden gekoppelt in entgegengesetzte Richtungen transportiert. Nach diesem Modell kann der Substrattransport in beide Richtungen, entsprechend der Ausrichtung und Größe der unterschiedlichen Triebkräfte ablaufen. Bei sekundären Trans-

portprozessen wird das Substrat in unmodifizierter Form transportiert, und es sind keine energieliefernden Reaktionen direkt beteiligt (Harold, 1986; Hellingwerf und Konings, 1985).

Die Substrataufnahme über sekundär aktive Transportsysteme ist für eine große Anzahl von Aminosäure- und Zuckertransportsysteme, unter anderem auch in einigen Bakterien für Glutamat nachgewiesen worden (Anraku, 1980; Konings, 1977; Landick et al., 1984). Aus theoretischen Überlegungen wird angenommen, daß auch viele Effluxprozesse bei Bakterien über sekundär aktive Transportsysteme (vgl. I.1.2.) ablaufen. Für *Streptococcus cremoris* wurde gezeigt, daß durch Efflux des metabolischen Endprodukts Lactat ein Membranpotential aufgebaut wurde (Otto et al., 1982) und auch in *Selenomonas ruminantium* kann sich unter bestimmten Umständen beim natriumabhängigen Succinatefflux ein Membranpotential bilden (Michel und Macy, 1990).

3. Ziel der Arbeit

1) Modell I, das von einer für Glutamat permeabilisierten Membran ausgeht, ist insgesamt aus biochemischen Gründen als fragwürdig anzusehen. Auch das zu Modell I konträre Modell II, der "Inversionscarrier", ist bisher noch nicht bewiesen. Deshalb ist es ein Ziel der vorliegenden Arbeit, die Glutamatsekretion biochemisch und bioenergetisch eingehend zu charakterisieren und einem der beschriebenen Modelle zuzuordnen, bzw. ein neues Modell für die Sekretion zu erstellen.

2) Im Rahmen der Untersuchungen zum Mechanismus der Glutamatsekretion sollte auch die Energetik und Regulation der Sekretion analysiert werden. Auch dieses Problem ist bisher noch nicht einmal im Ansatz gelöst worden, und es werden entsprechend der konträren Modelle unterschiedliche Möglichkeiten vorgeschlagen.

3) Für alle Methoden, die zur effizienten Glutamatsekretion führen, ist eine Korrelation zwischen Lipidveränderungen und erhöhter Sekretion nachgewiesen worden. Die beiden in der Literatur vertretenen Modelle "leak" und "Inversionscarrier" beziehen diese Lipidveränderungen mit ein. Da alle Methoden, die zur effizienten Glutamatsekretion führen, offensichtlich mit Veränderungen in der Cytoplasmamembran verknüpft sind, soll geklärt werden, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen Lipidveränderungen und erhöhter Glutamatsekretion besteht.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien

Soweit nicht besonders aufgeführt, wurden Chemikalien der Firmen Merck, Darmstadt, oder Boehringer, Mannheim, in p. A. Qualität oder in den höchsten erhältlichen Reinheitsstufen verwendet.

Difco Laboratories, Detroit, USA

Bacto-Agar
Bacto-Pepton
Yeast-Extract

Serva Feinbiochemica, Heidelberg

Fuchsin
Glycylglycin
Rhodamin 6G

Sigma, St. Louis, USA

CCCP
Cerulenin
DCCD
DPG
INT
Nigericin
Luciferin/Luciferase
PA
PC
PE
PG
PI
PS
Triton X-100
Valinomycin

Radiochemikalien der Firma
Amersham international plc

[U-¹⁴C]-Acetat
[U-¹⁴C]-Benzoat
[U-¹⁴C]-Glucose
[U-¹⁴C]-Glutamat
[¹⁴C]-Methylamin
[¹⁴C]-Taurin
[U-¹⁴C]-TPP
³H₂O

2. Nährmedien

2.1. Mineralsalzmedium I (MMI)

Zur Stammhaltung, für die Herstellung von Glycerinstammkulturen und zur Zellanzucht wurde das MMI-Flüssigmedium in der folgenden Zusammensetzung verwendet (modifiziert nach Kase und Nakayama, 1972):

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5	g/l
Harnstoff	5	g/l
KH_2PO_4	2	g/l
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	2	g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25	g/l
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01	g/l
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,01	g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01	g/l
pH 7 (10N KOH)		

Nach der Sterilisation wurden zugesetzt:

Glucose (getrennt autoklaviert)	50	g/l
Biotin (sterilfiltriert)	nach Bedarf	

Nachdem das MMI-Medium optimiert worden war (vgl. III.1.1.), wurden vor dem Autoklavieren zusätzlich eine Spurenelementlösung (vgl. II.2.2.) zugesetzt (3 ml/l).

2.2. Spurenelementlg.:

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10	mg/l
H_3BO_3	30	mg/l
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	20	mg/l
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,9	mg/l
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2	mg/l
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3	mg/l

2.3. MMYE-Medium

Dieses Medium wurde für die Anzucht von glutamataufnahmeinduzierten Zellen (Santamaria et al., 1985) verwendet:

Harnstoff	3	g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10	g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,4	g/l
NaCl	50	mg/l
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2	mg/l
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2	mg/l
Yeast-Extract	1	g/l
Biotin	200	$\mu\text{g/l}$

Nach der Sterilisation werden getrennt autoklaviert die folgenden Lösungen zugesetzt:

Na-Glutamatlösung (1 M)	100	ml/l
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (10 g/100 ml)	10	ml/l

2.4. Vollmedium

Dieses Medium wurde für die Stammhaltung und in der verfestigten Form für die Sterilkontrolle verwendet:

Pepton aus Fleisch	15,6	g/l
Yeast-Extract	2,8	g/l
NaCl	5,6	g/l
Glucose (getrennt autoklaviert)	5	g/l

Zum Verfestigen wurde dem Medium 2% (Gew/V) Bacto-Agar zugesetzt.

3. Organismus und Kulturbedingungen

In allen Experimenten wurde *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (Wildtyp) verwendet.

Die Organismen wurden, soweit nicht anders angegeben, in 500 ml Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen bei einer Füllmenge von 100 ml kultiviert. Die Inkubation erfolgte auf einem Rotationsschüttler bei 100 Upm und 30° C. Für die Anzucht wurden die Kolben mit 0,5 - 3% (V/V) einer Vorkultur oder einer Glycerinstammkultur angeimpft.

Die Stammhaltung erfolgte entweder in MMI Flüssigmedium oder auf Vollmediumplatten. Zusätzlich wurden Glycerindauerkulturen angelegt. Dazu wurden in MMI-Medium gewachsene Zellen (200 µg/l Biotin) mit Glycerin (85%) im Verhältnis 5/1 (V/V) gemischt und bei -20° C in Schraubdeckelröhrchen eingefroren. Bei -20°C ist die Lagerung bis mindestens 1 Jahr problemlos möglich.

Eine Biotinkonzentration von 10 µg/l wird für die Herstellung von Glycerinstammkulturen für die Glutamatfermentation eingesetzt (bei dieser Konzentration herrscht für das Wachstum noch keine Biotinlimitierung vor). Diese Stammkulturen werden direkt für das Animpfen von Standardfermentationen unter Biotinmangel benutzt (Animpfvolumen 1-2%).

Zur Sterilitätskontrolle wurden die Kulturen auf Vollmediumplatten ausgestrichen, oder Proben der Flüssigkulturen wurden unter dem Phasenkontrastmikroskop auf Kontaminationen hin untersucht.

Das Wachstum von *Corynebacterium glutamicum* wurde durch Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm in einem Beckmann Spectralphotometer mit Aqua dest. als Referenz gemessen. Da eine Linearität zwischen gemessener optischer Dichte und Zellmenge bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 vorlag, wurden Kulturen mit höherer OD₆₀₀ entsprechend verdünnt. Durch Trockengewichtsbestimmungen von gewachsenen Zellen wurden die folgenden Konversionsfaktoren zwischen OD und Trockengewicht (Tg) ermittelt: 0,21 mgTg/OD x ml für biotinlimitierte Produzentenzellen; 0,24 mgTg/OD x ml für biotinsupplementierte Nichtproduzenten.

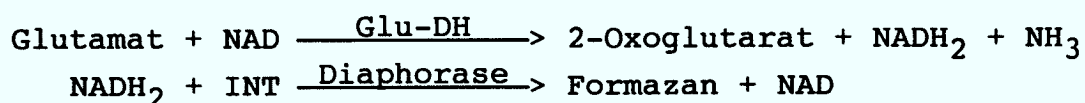
4. Metabolitnachweis im Kulturfiltrat

Zum Zeitpunkt der Probenentnahme wurden im Verlauf von Fermentationen Aliquots von Zellsuspensionen einer schnellen Silikonölzentrifugation unterworfen, die in Kap. II.5. detailliert beschrieben ist. Dadurch erfolgte eine schnelle Abtrennung der Zellen vom umgebenden Kulturmedium. Die Kulturfiltrate (Überstände) wurden für die Analyse verschiedener Metabolite herangezogen.

4.1. Glutamatbestimmung

Die Glutamatbestimmung erfolgte modifiziert nach Beutler und Michal (1974).

Reaktionsprinzip:



Glu-DH = Glutamat-Dehydrogenase,
INT = Iodnitrotetrazolium Violett

Testansatz:

850	μl Puffer (Triäthanolamin-HCl 75 mM)
	(KH ₂ PO ₄ 10 mM)
	(Triton X-100 0,5%)
10	μl NAD (50 mM)
50	μl INT (1,5 mM)
10	μl Diaphorase (350 U/ml)
10 - 100	μl Probe

Start mit:

20 μl Glu-DH (1000 U/ml)

Vor dem Gebrauch wurde die Diaphorase ((NH₄)₂SO₄ - Lösung) abzentrifugiert und in H₂O (dreifaches ursprüngliches Volumen) resuspendiert. Bei Raumtemperatur wurde bis zum Reaktionsstillstand (ca. 20 min) bei 492 nm die Extinktionsänderung gemessen. Der

Extinktionskoeffizient betrug unter diesen Bedingungen $19,9 \times \text{cm}^2 \times \mu\text{Mol}^{-1}$. Um die Linearität zwischen der gemessenen Extinktion und der Glutamatkonzentration zu gewährleisten, sollte die maximale Glutamatkonzentration im Testansatz $25 \mu\text{M}$ nicht überschreiten.

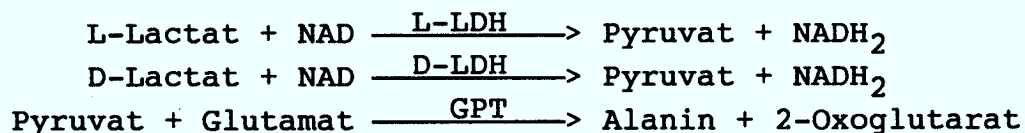
4.2. Glucosebestimmung

Glucose wurde enzymatisch mit Hexokinase und Glucose-6-P-Dehydrogenase bestimmt (modifiziert nach Bergmeyer et al., 1974).

4.3. Lactatbestimmung

Das Stoffwechselprodukt Lactat wurde enzymatisch bestimmt (modifiziert nach einer Methode der Boehringer GmbH, 1984).

Reaktionsprinzip:



LDH = Lactat-Dehydrogenase, GPT = Glutamat-Pyruvat-Transaminase

Testansatz:

500	μl Puffer (Glycylglycin 0,44 mM)	pH = 10
	(Glutamat 0,77 mM)	
100	μl NAD	(38 mM)
360-X	μl H ₂ O	
X	μl Probe	(10 < X < 100)
10	μl GPT (800 U/ml)	

Start mit:

10 μ l L-LDL (1500 U/ml)
10 μ l D-LDH (300 U/ml)

Bei einer Temperatur von 37°C wird die Extinktion bei 340 nm bis zum Reaktionsstillstand (ca. 50 min) gemessen.

4.4. Gesamtanalyse von Aminosäuren

Die Gesamtanalyse der Aminosäure erfolgte nach dem am Institut allgemein üblichen Verfahren mit einem automatischen Aminosäureanalysator LC 2000 der Fa. Biotronik GmbH, Puchheim, nach dem Kationenaustauscherprinzip. Zur Probenvorbereitung wurde das Kulturfiltrat auf eine Konzentration von max 0,3 mM je Aminosäure verdünnt.

Probenverdünnungspuffer:

tri-Na-Citrat·2H ₂ O	19,6	g
Phenol	1,92	g
Thiodiäthanol	20	ml
Aqua dest.	ad 1000	ml

Der pH-Wert wurde mit 6 N HCl auf 2,2 eingestellt.

Trennbedingungen:

Trennsäule	0,6 x 35 cm
Trennharz	Durrun DC-6A
Probenvolumen	100 µl
Probenkonzentration	max. 30 nmol pro Aminosäure und 60 nmol NH ₃ /100 µl Probe
Puffer	Na-Citrat/NaCl
Durchflußrate	32 ml/h
Meßbereich	570 nm 0-1 EE 470 nm 0-1 EE
Betriebstemperatur	48°C bzw. 58°C
Analysenzeit	92 min für Aminosäureelution 143 min einschließlich Rege- nerieren und Äquilibrieren

Zur Integration wurde ein Shimadzu Data Prozessor Chromatopac C-R 18 verwendet.

4.5. Cyanidnachweis

Die Cyanidbestimmung im Kulturfiltrat erfolgte durch einen Test Kit der Firma Merck, Darmstadt (Merck Spectroquant).

5. Extraktion und Bestimmung intrazellulärer Aminosäuren

Aliquots (100 μ l) von Zellsuspensionen ($OD_{600} = 5 - 20$) aus Kurzzeitfermentationen wurden mit der Methode der Silikonölzentrifugation (Klingenberg und Pfaff, 1967) gestoppt.

Dazu wurden Beckmannreaktionsgefäße (300 μ l) zunächst in der unteren Lage mit 30 μ l 20% Perchlorsäure als Säurestoppschicht und einer wegen seiner geringeren Dichte oben aufliegenden Silikonölschicht (PN 200, Bayer Leverkusen) bestückt. Je nach spezifischer Dichte des Mediums wurde die Dichte des Silikonöls zwischen $d = 1,03$ und $d = 1,04$ variiert. Die Aliquots wurden auf die Silikonölschicht aufgelegt und die gefüllten Reaktionsröhrchen wurden anschließend für 40 Sekunden in einer Beckmann Microfuge bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Dadurch wurden die Zellen sehr schnell vom Medium abgetrennt, durch die Silikonölschicht gerissen, was eine weitgehende Entfernung des umgebenden Kulturfiltrats bewirkte, und letztendlich in der Perchlorsäureschicht sedimentiert. Durch die Sedimentierung in der Perchlorsäureschicht wurden die Zellen sofort inaktiviert.

Zur weiteren Aufarbeitung wurden die sedimentierten Zellen in den Perchlorsäureschichten in 750 μ l Reaktionsgefäße transferiert und anschließend durch Beschallung in einem Ultraschallbad (10 Minuten) bei Raumtemperatur extrahiert. Die resultierenden Extrakte wurden durch die Zugabe von 25 μ l 5 M KOH, 1 M Triäthanolamin neutralisiert, zur besseren Abtrennung von eventuell mitgeschleppten Silikonölresten mit 15 μ l Silikonöl der Dichte $d = 1,07$ versetzt, und anschließend eingefroren (-18°C). Die aufgetauten Extrakte wurden kalt in einer Eppendorffzentrifuge bei 14 000 Upm (6 Minuten) zentrifugiert und die resultierenden Überstände für die Metabolitbestimmung (vgl. II.4.) eingesetzt. Die verbleibenden Sedimente enthielten Zellfragmente, denaturierte Proteine, präzipitiertes K-Perchlorat und Silikonöl.

6. Bestimmung des internen Zellvolumens und der internen Aminosäurekonzentration

Für die Berechnung der intrazellulären Metabolitkonzentrationen war es notwendig, das intra- und extrazelluläre Wasservolumen zu bestimmen. Für diese Bestimmung wurden 0,5 ml Aliquots von Zellsuspensionen aus Kurzzeitfermentationen ($OD_{600} = 5 - 20$; vgl. II.5.) mit ^3H_2O und [^{14}C]-Taurin für ca. 90 Sekunden bei Raumtemperatur inkubiert (Rottenberg, 1979).

Dazu wurden die Aliquots in Eppendorf Cups mit Raumbestimmungsansätzen der folgenden Zusammensetzung vermischt: 5 μ l ^3H_2O (ca. 1 - 2 μ Ci), 5 μ l [^{14}C]-Taurin (ca. 0,5 - 1 μ Ci), 20 μ l nichtmarkiertes Taurin (10 mM).

Anschließend wurden die Inkubate - für eine bessere statistische Absicherung der Doppelmarkierungsexperimente - in 5 Portionen zu je 100 μ l aufgeteilt, die jeweils einer Silikonölzentrifugation unterworfen wurden, so daß die Zellen vom umgebenden Medium getrennt wurden. Das ^3H_2O ist frei permeabel, während das [^{14}C]-Taurin die Cytoplasmamembranen von *Corynebacterium glutamicum* nicht penetrieren kann. Somit ist die mitgerissene Menge an ^3H_2O ein Maß für den intra- und extrazellulären Wasserraum, wohingegen das mitgeschleppte [^{14}C]-Taurin den extrazellulären Wasserraum repräsentiert. Aus der Differenz dieser beiden Werte lassen sich die intrazellulären Volumina errechnen.

Für die Berechnung der jeweiligen spezifischen Aktivitäten des Wassers wurden 20 μ l Aliquots der Überstände in Minivials, die mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit gefüllt waren, in einem Flüssig-Scintillaationszähler (Rackbeta 1214) der Firma LKB nach einem Programm für Doppelmarkierungen gemessen.

Zur Bestimmung der im Sediment befindlichen Radioaktivität wurden die Perchlorsäureschichten in Eppendorf Cups transferiert, in 750 μ l H_2O resuspendiert und durch Beschallung bei Raumtemperatur im Ultraschallbad (8 Minuten) extrahiert. Nach einer anschließenden Zentrifugation (Eppendorffzentrifuge, 14 000 Upm) wurden 650 μ l Aliquots der Überstände im Scintillationszähler (s.o.) auf den Gehalt ihrer Radioaktivität hin gemessen.

Daraufhin wurden die cytoplasmatischen Volumina folgendermaßen berechnet:

$$^3\text{H}_2\text{O-Raum} = V_{\text{Ü}} \times \text{dpm } ^3\text{H}_2\text{O}_{\text{Sed}} / \text{dpm } ^3\text{H}_2\text{O}_{\text{Ü}} \quad (\mu\text{l}/\text{Probenvolumen})$$

$$\text{Taurinraum} = V_{\text{Ü}} \times \text{dpm } [^{14}\text{C}]_{\text{Sed}} / \text{dpm } [^{14}\text{C}]_{\text{Ü}} \quad (\mu\text{l}/\text{Probenvolumen})$$

$$\text{Internes Volumen} = ^3\text{H}_2\text{O-Raum} - \text{Taurinraum} \quad (\mu\text{l}/\text{Probenvolumen})$$

$V_{\text{Ü}}$ = Zählvolumen des Überstandes (20 μl)

dpm_{Sed} = dpm des gesamten aufgearbeiteten Sediments
(wurde aus den gemessenen Werten für die 650 μl Aliquots hochgerechnet)

Probenvolumen = 100 μl

Das intrazelluläre Volumen von biotinlimitierten Zellen variierte zwischen 0,8 und 1,2 $\mu\text{l}/\text{mgTg}$, der gesamte Wasserraum zwischen 3,3 und 4,5 $\mu\text{l}/\text{mgTg}$. Für biotinsupplementierte Nichtproduzenten (vgl. Ebbighausen et al., 1989a) lagen die entsprechenden Werte zwischen 1,6 und 1,9 μl (intrazelluläres Volumen), bzw. zwischen 3,9 und 4,9 μl (gesamter Wasserraum).

Für die Berechnung der internen Aminosäurekonzentrationen mußte die Menge der Aminosäuren aus dem umgebenden Medium, die mit den Zellen im externen Taurinraum cosedimentiert waren, vom Gehalt der insgesamt gemessenen Aminosäuren (vgl. II.4.) abgezogen werden. Eine anschließende Division des Gehalts der internen Aminosäuren durch das intrazelluläre Volumen ergab die interne Konzentration.

7. Bestimmung der intrazellulären Kalium- und Natriumkonzentration

Zellsuspensionen ($\text{OD}_{600} = 10 - 20$) von Kurzzeitfermentationen wurden zu definierten Zeitpunkten 200 μl Aliquots entnommen. Diese Aliquots wurden einer Silikonölzentrifugation unterworfen. Im Unterschied zu dem oben beschriebenen Verfahren (vgl. II.5.) wurde hier keine Perchlorsäureschicht benutzt, so daß die Zellen im Silikonöl sedimentierten. Die Sedimente wurden in Eppendorf Cups transferiert, wo sie in 200 μl CTAB (0,2%) durch Beschallung im Ultraschallbad bei Raumtemperatur (10 Minuten) extrahiert wurden. Durch anschließende Ultrazentrifugation bei 4°C (20 Minuten) in einem Ti 50 Rotor (40 000 Upm) wurden die Zellreste sedimentiert

und die Öl-Wasser-Emulsion getrennt. Die Überstände wurden für die chemische Analyse benutzt. Parallel zu dieser Aufarbeitung wurden Raumbestimmungen (vgl. II.6.) durchgeführt, um die intrazellulären Konzentrationen zu ermitteln. Auch hier wurden Korrekturen für die Mengen an im Taurinraum mitgeschleppten Kalium und Natrium aus dem Medium durchgeführt.

Der Kalium- und Natriumgehalt der aufgearbeiteten Proben wurde in der Zentralabteilung für chemische Analysen der KFA Jülich mittels Atomabsorptions-Spektrometrie ermittelt.

8. Die Komponenten der proton motive force

Die Bestimmung des Membranpotentials und des pH-Gradienten über die Cytoplasmamembran ermöglichen die Berechnung der proton motive force (pmf) der Zellen:

$$\Delta \mu_{H^+}/F = \Delta p \text{ (pmf)} = \Delta \psi - Z \Delta pH$$

F = Faraday'sche Konstante, $Z = 2,3RT/F \approx 59 \text{ mV}$ bei Raumtemperatur, $\Delta \mu_{H^+}$ = elektrochemische Potentialdifferenz

Das Membranpotential ($\Delta \psi$) und der pH-Gradient wurden in *Corynebacterium glutamicum* nach Rottenberg (1979) und Kashket (1985) bestimmt.

8.1. Das Membranpotential

Die Bestimmung des Membranpotentials (innen negativ) basierte auf dem Prinzip, daß ein permeables Kation (C^+) entsprechend dem Membranpotential bis zu dem Punkt in die Zelle wandert, bei dem ein elektrochemisches Gleichgewicht erreicht wird. Dieses Gleichgewicht wird durch die folgende Formel beschrieben:

$$\Delta \psi \approx -Z \cdot \log([C^+]_{\text{int}}/[C^+]_{\text{ext}})$$

Für die Bestimmung des Membranpotential wurden von Zellsuspensionen ($OD_{600} = 5 - 20$) Aliquots zu je 500 μl entnommen, die für ca. 2 Minuten (25°C) unter gelegentlichem Rühren mit dem permeab-

len, lipophilen Kation $[U-^{14}C]-TPP^+$ (66 700 dpm/nmol) inkubiert wurden. Die Ausgangskonzentration des vorgelegten $[U-^{14}C]-TPP^+$ war so gewählt, daß die Gesamtkonzentration im Testansatz ca. 2,8 μM betrug. Die Aliquots wurden anschließend einer Silikonölzentrifugation unterworfen, um die Verteilung des TPP über die Cytoplasmamembran zu bestimmen.

Zur Berechnung der intra- und extrazellulären TPP-Konzentrationen wurden Aliquots des Gesamtansatz und des Überstands im Flüssig-Scintillationszähler auf ihren Gehalt an Radioaktivität hin untersucht. Daraus wurden die TPP-Mengen, die sich in jeweils 100 μl Gesamtansatz und Überstand befinden, und die TPP-Konzentration des Überstands ausgerechnet. Die in den Sedimenten befindliche TPP-Menge wurde anschließend durch die Differenz zwischen der TPP-Menge im Gesamtansatz und der TPP-Menge im Überstand ermittelt:

$$TPP_{Sed} = TPP_{Ges} - TPP_{\ddot{u}}$$

TPP_{Sed} = TPP-Menge im Sediment von 100 μl Zellsuspension

TPP_{Ges} = Gesamte TPP-Menge von 100 μl Zellsuspension

$TPP_{\ddot{u}}$ = TPP-Menge im Überstand von 100 μl Zellsuspension

Unabhängig vom Membranpotential wird die Sonde TPP auch durch anionische Gruppen auf der Zelloberfläche und im Zellinneren gebunden. Somit bestand die Gefahr, daß aufgrund der gemessenen Daten weit überhöhte Membranpotentiale berechnet wurden. Daher wurde zur vorläufigen Korrektur die Bestimmung der internen TPP-Menge auch mit Zellen durchgeführt, die zuvor durch einen Ionophorencocktail (20 μM Valinomycin/2 μM Nigericin) deenergetisiert worden sind. Der hier ermittelte Wert für die interne TPP-Menge, der die vom Membranpotential unabhängige unspezifische Bindung repräsentierte, wurde anschließend vom entsprechenden Wert der unbehandelten Zellen abgezogen. Aufgrund der parallel durchgeführten Raumbestimmungen konnten die interne TPP-Konzentration und das Membranpotential berechnet werden.

Zudem wurde entsprechend dem "exponential mean model" von Zaritzky et al. (1981) angenommen, daß die Assotiation des lipophilen Kations TPP^+ an die Cytoplasmamembran sowohl von der externen als auch von der jeweiligen internen TPP-Konzentration abhängt.

Somit kommt es bei energetisierten Zellen zu einer unspezifischen Bindung, die durch die oben beschriebene Korrektur nicht mehr zu erfassen ist. Daher wurden die ermittelten Werte zusätzlich nach diesem Modell korrigiert.

8.2. Der pH-Gradient

Der pH-Gradient wurde durch die Verteilung von schwachen Säuren, bzw. schwachen Basen über die Membran berechnet. Für die jeweilige neutrale Form ist die Membran frei permeabel, während das Ion impermeabel ist.

Für den Fall, daß der interne pH-Wert über dem externen liegt, wurde eine schwache Säure benutzt, die in seiner neutralen undissoziierten Form (AH) in die Zelle gelangen konnte. Ein Gleichgewicht ist dann erreicht, wenn $[AH_{int}] = [AH_{ext}]$ ist. Da die Säure innerhalb und außerhalb der Zelle die gleiche Dissoziationskonstante aufweist und die ionisierte Form unter den gegebenen Testbedingungen ($pH_{ext} > pK + 1$) den weitaus größten Anteil stellt, kann man aus der Gesamtverteilung der Säure über die Cytoplasmamembran auf die Verteilung der freien Säure schließen und den pH-Gradienten berechnen:

$$1) \quad pH_{int} - pH_{ext} = \Delta pH = \log([A^-_{int}]/[A^-_{ext}])$$

Wenn der interne pH-Wert unter dem externen liegt, wird eine schwache Base benutzt, die in ihrer neutralen Form permeabel ist. Aus denselben Überlegungen wie oben kann der pH-Gradient durch die folgende Gleichung berechnet werden:

$$2) \quad pH_{ext} - pH_{int} = -\Delta pH = \log([AH^+_{int}]/[AH^+_{ext}])$$

a) $pH_{int} > pH_{ext}$

Zur Bestimmung von positiven pH-Gradienten wurden 500 µl Aliquots von Zellsuspensionen ($OD_{600} = 5 - 20$) mit der schwachen Säure $[U-^{14}C]$ -Benzoat (122 000 dpm/nmol) für ca. 2 Minuten (25°C) inkubiert. Zum selben Zeitpunkt wurden die externen pH-Werte bestimmt. Die Konzentration des Benzoats in den Testansätzen betrug

ca. 2,5 μM . Die Zellen wurden anschließend durch Silikonölzentrifugation vom umgebenden Medium getrennt, und die Überstände und Sedimente wurden für die Bestimmung der internen und externen Benzoatkonzentrationen aufgearbeitet (vgl. II.6.). Als Kontrolle wurde die gleiche Prozedur mit deenergetisierten Zellen (20 μM Valinomycin/2 μM Nigericin) durchgeführt. Somit konnte die unspezifische Bindung des Benzoats ermittelt werden. Daher wurden die ermittelten Benzoat-Mengen der deenergetisierten Zellen von den entsprechenden Werten der unbehandelten Zellen subtrahiert, um das unspezifisch gebundene Benzoat auszuschließen. Diese neuerhaltenen Werte dienten als Grundlage für die Bestimmung der internen Benzoatkonzentration, die aufgrund der parallel durchgeführten Raumbestimmungen berechnet werden konnten. Aus diesen Daten wurde mittels der oben angegebenen Formel 1 der pH-Gradient ermittelt.

b) $\text{pH}_{\text{int}} < \text{pH}_{\text{ext}}$

Für die Ermittlung von negativen pH-Gradienten wurden 500 μl Aliquots von Zellsuspensionen mit der schwachen Base [^{14}C]-Methylamin (ca. 124 000 dpm/nmol) für 2 Minuten (25°C) inkubiert. Gleichzeitig wurden die externen pH-Werte bestimmt. Die Konzentration des Methylamins betrug in den Testansätzen ca. 20 μM . Nach der Inkubation wurden die Zellen durch Silikonölzentrifugation vom umgebenden Medium getrennt. Die Überstände und die Sedimente wurden für die Bestimmung der externen und der internen Methylaminkonzentrationen entsprechend dem in Kap. II.6. beschriebenen Verfahren aufgearbeitet. Jedoch ließ sich für die Sonde Methylamin die unspezifische Bindung nicht durch Deenergetisierung der Zellen mit einem Ionophorencocktail (20 μM Valinomycin/2 μM Nigericin) bestimmen, da das einmal aufgenommene Methylamin nach der Deenergetisierung nur unzureichend wieder abgegeben wurde. Zudem nimmt *Corynebacterium glutamicum* unter bestimmten Umständen Methylamin vermutlich durch ein Transportsystem auf (Krämer, 1989, persönliche Mitteilung). Daher wurden die pH-Gradienten bei verschiedenen externen pH-Werten sowohl mit Benzoat, als auch mit Methylamin untersucht. Bei dem pH-Wert, wo der durch Benzoat ermittelte pH-Gradient den Wert 0 ergab, wurde die gleichzeitig gemessene interne Methylaminmenge als unspezifisch gebunden definiert. Dieser Wert wurde daraufhin zu Korrektur bei der Bestimmung negativer pH-Gra-

dienten von den gemessenen internen Methyaminmengen subtrahiert. Die neuerhaltenen Werte wurden in interne Konzentrationen umgerechnet und dienten zur Berechnung des pH-Gradienten (Formel 2).

9. Messung der Substrataufnahme

Glutamataufnahmekinetiken wurden mit der Methode der schnellen Membranfiltration und der Silikonölzentrifugation durchgeführt.

Für die Bestimmung der Glutamataufnahme von fermentierenden Zellen wurden 1 ml Aliquots von Zellsuspensionen ($OD_{600} = 5 - 10$) aus Kurzzeitfermentationen mit hochmarkiertem [U- ^{14}C]-Glutamat versetzt (25°C). Nach der Vermischung der zugeführten Radioaktivität mit unmarkiertem Glutamat, das in den Fermentationsansätzen z.T. in relativ hohen Konzentrationen vorlag, war die spezifische Radioaktivität größer als 5 000 dpm/nmol. Die externen Glutamatkonzentrationen lagen weit über dem K_m -Wert von ca. 1 μM (Krämer et al., 1990a), so daß Aufnahmezeiten im Bereich der V_{max} gewährleistet waren. Innerhalb der ersten 90 Sekunden nach Inkubationsbeginn wurden zu verschiedenen Zeitpunkten 100 μl Aliquots entnommen und durch Silikonölzentrifugation gestoppt. Für sämtliche Überstände wurden im Flüssig-Scintillationszähler der Gehalt an Radioaktivität und enzymatisch die aktuelle Glutamatkonzentration bestimmt, da unter Fermentationsbedingungen die externe Glutamatkonzentration ständig zunahm. Somit konnte für jede Probe die spezifische Radioaktivität des Glutamats ermittelt werden. Die in den Sedimenten befindliche Radioaktivität wurde nach der in Kap. II.6. beschriebenen Methode analysiert und anschließend wurde über die jeweilige spezifische Aktivität die Menge aufgenommenen Glutamats ermittelt. Die Aufnahmeaktivität wurde in nmol/min x mgTg angegeben.

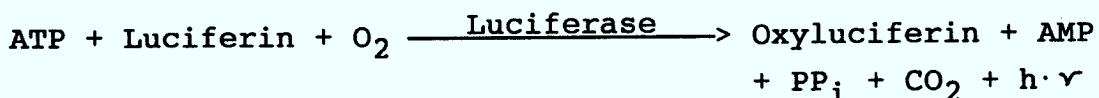
Alternativ konnte die Glutamataufnahme auch durch die schnelle Membranfiltration bestimmt werden. Hier wurden ebenfalls die oben beschriebenen Inkubationsansätze eingesetzt. Innerhalb der ersten 90 Sekunden nach Inkubationsbeginn wurden zu verschiedenen Zeitpunkten 100 μl Aliquots entnommen und durch Transfer in 850 μl eiskaltes Medium mit hoher Glutamatkonzentration (10 mM) und anschließende Filtration in einer Vakuum Mehrfachfiltrationsanlage

VF 1 (Fa. Amicon) gestoppt. Die Zellen mit dem aufgenommenen Substrat verblieben auf den Glasfaserfiltern (Whatman GF/F), die anschließend noch zweimal mit je 5 ml eiskaltem Medium gewaschen wurden, um unspezifisch an die Filter und die Zellen gebundene Radioaktivität zu entfernen. Nach dem Trocknen wurden die Filter in Vials mit 8 ml Scintillationsflüssigkeit in einem Flüssig-Scintillationszähler auf ihren Gehalt an Radioaktivität hin untersucht. Diese Methode wies gegenüber der Silikonölzentrifugation den Nachteil auf, daß durch Verdünnung der Probe und die Filtration die Kulturfiltrate verloren gingen und somit die aktuelle externe Glutamatkonzentration und die spezifische Radioaktivität nicht bestimmt werden konnten.

10. Die intrazellulären Adeninnukleotide

Die Bestimmung der internen Adeninnukleotide erfolgte mit Luciferin/Luciferase über die Messung der Lichtemission (modifiziert nach Lundin et al., 1976 und Schimz et al., 1981). Die Messungen liefen nach den folgenden Reaktionsprinzipien ab:

1) ATP-Bestimmung:



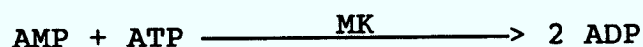
2) ADP-Bestimmung:

Das ADP wurde vor der Bestimmung enzymatisch in ATP überführt:



3) AMP-Bestimmung

Das AMP wurde zunächst in ADP überführt, das anschließend in ATP umgewandelt wurde:



PK = Pyruvatkinase, MK = Myokinase

a) Extraktion und Probenvorbereitung:

Die Nukleotide wurden durch Mischung der Zellen mit Dimethylsulfoxid extrahiert (Krämer et al., 1990b; Lefebvre et al., 1988). 40 µl Aliquots von Zellsuspensionen aus Kurzzeitfermentationen ($OD_{600} = 5 - 20$) wurden zu definierten Zeitpunkten unmittelbar nach der Entnahme in 360 µl Dimethylsulfoxid eingespritzt, sofort danach mit 1 600 µl eiskaltem Wasser vermischt und bis zur Nukleotidanalyse bei -18°C eingefroren.

b) Durchführung der ATP-Bestimmung:

Für die ATP-Bestimmung wurden die unbehandelten Extrakte eingesetzt. Zur internen Standardisierung wurden die Messungen zusätzlich nach Zugabe einer definierten ATP-Menge durchgeführt. Die Bestimmungsansätze setzten sich wie folgt zusammen:

100 µl Extrakt

Start durch gleichzeitige Injektion von:

250 µl Luciferin/Luciferase (50 mg Lyophilisat in 5 ml H_2O)
wurden zentrifugiert und der
Überstand im Test eingesetzt.

2250 µl Testpuffer 50 mM Tris- H_2SO_4 pH = 7,4
 3,5 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$
 2,5 mM K_2SO_4
 0,6 mM EDTA

Für die interne Standardisierung wurde ein identischer Ansatz eingesetzt, der zusätzlich zu den 100 µl Extrakt 40 µl ATP ($1 \mu\text{M}$) enthielt.

Mit einem Biolumineszenzanalysator (XP 2000, Skan AG Basel, CH) wurde während der ersten 20 Sekunden nach Beginn der Injektion die Lichtemission gemessen, integriert und in "counts" angegeben.

Für die Berechnung der ATP-Konzentrationen in den Extrakten wurden Mittelwerte aus Mehrfachbestimmungen eingesetzt. Die ATP-Menge (Σ_T) wurde in nmol/100 µl Extrakt angegeben und wurde durch die folgende Formel ermittelt:

$$\Sigma_T = Co_{Probe} \times ATP_{IS} / (Co_{IS} - Co_{Probe}) \quad (\text{nmol}/100 \mu\text{l Extrakt})$$

Co_{Probe} = Counts pro 100 μl Extrakt

Co_{IS} = Counts pro 100 μl Extrakt + 40 μl interner Standard

ATP_{IS} = ATP-Menge in 40 μl internem Standard

c) Durchführung der ADP-Bestimmung:

Die Überführung des gesamten ADP der Extrakte in ATP erfolgte in folgendem Reaktionsansatz:

500 μl Extrakt

45 μl PEP-Puffer

50 mM Na-PEP

500 mM $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$

2 M KCl

100 mM Tris pH = 7,5

5 μl Pyruvatkinase (2000 U/ml)

Nach 5 - max 10 min wurde der ATP-Gehalt dieser Proben nach dem oben beschriebenen Verfahren bestimmt. Um auf die in den Extrakten befindliche Gesamtmenge von ATP und ADP (Σ_{TD}) zu kommen, mußte der hier gemessene Wert mit dem Faktor 1,1 multipliziert werden. Dadurch wurde die Verdünnung durch den PEP-Puffer und die PK ausgeglichen. Die ADP-Menge in 100 μl Extrakt (Σ_D) wurde folgendermaßen berechnet:

$$\Sigma_D = \Sigma_{TD} - \Sigma_T$$

d) Durchführung der AMP-Bestimmung:

Die Überführung des gesamten ADP und AMP der Extrakte in ATP erfolgte in folgendem Reaktionsansatz:

500 μl Extrakt

45 μl PEP-Puffer

50 mM Na-PEP

500 mM $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$

2 M KCl

100 mM Tris pH = 7,5

5 μl Pyruvatkinase (2000 U/ml)

10 μl Myokinase

(1800 U/ml)

(Die $(NH_4)_2SO_4$ -Lösung wurde zentrifugiert und der Niederschlag im gleichen Volumen H_2O aufgenommen)

Nach mindestens 30 Minuten Inkubationszeit wurde der ATP-Gehalt nach dem oben beschriebenen Verfahren bestimmt. Um die Verdünnung des Extrakts durch PEP-Puffer, PK und die MK auszugleichen, wurden die ermittelten ATP-Mengen mit dem Faktor 1,12 multipliziert. Die erhaltenen Werte entsprachen dem Gesamtgehalt von ATP, ADP und AMP (Σ_{TDM}) in 100 μl Extrakt. Die AMP-Menge in 100 μl Extrakt (Σ_{M}) wurde folgendermaßen berechnet:

$$\Sigma_{\text{M}} = \Sigma_{\text{TDM}} - \Sigma_{\text{TD}}$$

Aufgrund der parallel durchgeführten Raumbestimmungen konnten die internen Adeninnukleotidkonzentrationen berechnet werden.

11. Bestimmung der Glutamatsekretion durch Einbau von radioaktiver Markierung

Bei hohen vorgelegten externen Glutamatkonzentrationen war es aus den in Kap. III.3.1. näher erläuterten Gründen unmöglich, die Glutamatsekretion chemisch zu erfassen. Daher wurde der Einbau von [^{14}C]-Markierung, die aus zugesetzter radioaktiv markierter Glucose stammte, ins externe Glutamat als Maß für die Glutamatsekretion genommen.

Biotinlimitierte Zellen ($\text{OD}_{600} = 16$) einer Kurzzeitfermentation (vgl. III.1.3.) wurden über einen Zeitraum von ca. 40 Minuten unter C-Quellmangel inkubiert. Anschließend wurde den Ansätzen [U- ^{14}C]-Glucose in einer Konzentration von 2,5 mM zugegeben (ca. 0,5 $\mu\text{Ci/ml}$). Zu definierten Zeitpunkten wurden 150 μl Aliquots entnommen und einer Siliconölzentrifugation unterworfen. Die Überstände wurden für die chemische und radioaktive Glutamat- und Glucoseanalyse eingesetzt. Anhand der Sedimente wurden die internen Glutamatkonzentrationen, soweit dies bei den z.T. hohen vorgelegten externen Konzentrationen möglich war, bestimmt.

Für die radioaktive Bestimmung der Glutamatsekretion, bzw. der Glucoseabnahme, sollten das Glutamat und die Glucose zunächst dünnschichtchromatographisch voneinander getrennt werden. Es wurde ein System gesucht, das Glutamat und Glucose auch bei extrem hohen Glutamatkonzentrationen (300 mM) und bei verhältnismäßig großen Auftragsvolumina (25 μl) gut voneinander trennt. Nach Austesten ei-

ner Reihe verschiedener Fließmittel und verschiedener stationärer Phasen erfüllte das im folgenden beschriebene System die gestellten Ansprüche am besten.

25 µl Aliquots der Probenüberstände wurden gleichmäßig auf einer Linie von ca 6 cm Breite auf Silica Gel 60 DC-Platten (Format: 10 x 10 cm) der Merck AG, Darmstadt, aufgetragen. Da die Proben sehr unterschiedliche Glutamatkonzentrationen aufwiesen (0,05 - 300 mM) und die Glucose in einigen Proben chemisch nicht mehr detektierbar war, wurden vor dem Auftrag alle Proben auf eine Glutamatkonzentration von 300 mM und eine Glucosekonzentration von 100 mM gebracht. So war gewährleistet, daß die Proben einander in ihrer Zusammensetzung angeglichen waren und die Glucose in jeder Probe gleich gut detektiert werden konnte. Pro DC-Platte konnte jeweils eine Probe aufgetrennt werden.

Nach dem Auftrag wurden die Proben in Entwicklungskammern für die Nano-DC mit dem folgenden Fließmittel (Stahl, 1969) aufgetrennt: Propanol/H₂O (7/3, V/V). Glucose und Glutamat wurden durch dieses Verfahren auch bei den eingesetzten hohen Konzentrationen klar getrennt. Der R_f-Wert für Glutamat betrug 0,23, während für die Glucose ein R_f-Wert von 0,46 ermittelt wurde. Nach der Trennung wurden die Platten zunächst mit Sprühreagenz 1 eingesprüht, um das Glutamat sichtbar zu machen. Anschließend wurde die Glucose durch Sprühreagenz 2 angefärbt. Die Flecke wurden markiert und anschließend durch H₂O₂-Behandlung wieder entfärbt, um bei der folgenden Radioaktivitätsbestimmung der Proben einen möglichen Farbquench zu vermeiden. Die Flecken wurden ausgekratzt, in Vials überführt und mit 12 ml Scintillationsflüssigkeit im Flüssig-Scintillationszähler analysiert. Wegen der hohen Chemoluminescens der Proben wurden sie z.T. mehrere Tage kühl und dunkel gelagert und in einem abgedunkelten Raum gemessen.

Sprühreagenz 1: 0,2% ige Ninhydrinlsg. in H₂O-gesättigtem Butanol (vgl. II.12.4.1.)

Sprühreagenz 2: Anilin 100 mM in H₂O-gesättigtem
Phthalsäure 100 mM Butanol

Nach dem Einsprühen 5 Minuten auf 105°C.

12. Lipidanalytik

12.1. Bestimmung des Gesamthospholipidgehalts - Extraktionsmethode I

Zur Bestimmung der Gesamthospholipide wurde das Totallipid der Zellen zunächst nach der modifizierten Methode von Bligh und Dyer (1959) extrahiert. 0,4 - 1 ml Aliquots von Kurzzeitfermentationen ($OD_{600} = 5 - 20$) wurden durch schnelles Kühlen auf Eis und Addition von Perchlorsäure (Endkonzentration 1%) gestoppt. Nach zweimaligem Waschen in H_2O und anschließender Resuspension der Zellen in 1,3 ml H_2O wurden 5 ml $CHCl_3/MeOH$ (1/2, V/V) addiert, so daß das entstehende einphasige Gemisch die folgende Zusammensetzung aufwies: $H_2O/CHCl_3/MeOH = 0,8/1/2$ (V/V/V). Zur Extraktion wurde das Gemisch für eine Stunde im Ultraschallbad in verschlossenen Schraubdeckelröhrchen beschallt. Anschließend wurde die Suspension 7 min in einer Heraeus Minifuge bei 6000 Upm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Der Überstand wurde mit 1,65 ml H_2O und 1,65 ml $CHCl_3$ versetzt, um die folgende Zusammensetzung zu erreichen: $H_2O/CHCl_3/MeOH = 1,8/2/2$ (V/V/V). Die anschließend entstehenden zwei Phasen wurden durch eine 7 minütige Zentrifugation (Heraeus Minifuge, 6000 Upm) getrennt. Daraufhin wurde die untere, lipidhaltige Phase aufgenommen, durch Argonbegasung bei 35°C getrocknet und einer anschließenden Phosphatanalyse unterworfen.

12.1.1. Phosphatanalyse

Die getrockneten Gesamtlipide (vgl. II.10.1.) wurden zunächst verascht. Dazu wurden sie in 0,5 ml Lösung 1 aufgenommen und erhitzt:

Temperaturverlauf:

30 min	85°C
30 min	140°C
30 min	175°C

Nach dem Abkühlen wurden für die Phosphatbestimmung (Chen et al., 1956) in der angegebenen Reihenfolge 0,5 ml H₂O, 0,5 ml Lösung 2, 0,2 ml Lösung 3 und 0,05 ml Lösung 4 zugegeben und mit der Probe vermischt. Anschließend wurden die Ansätze für 30 Minuten im Wasserbad bei 60°C erwärmt. Danach wurde die Extinktion bei 820 nm gegen einen gleichbehandelten Leerwert bestimmt.

Die Ermittlung der Phosphatmenge erfolgte anhand einer Eichkurve. Dazu wurden 5, 10 und 20 µl einer 1 mM KH_2PO_4 -Lösung parallel zu den Proben verascht und einer anschließenden Phosphatbestimmung unterworfen. Der Phospholipidgehalt wurde in nmol lipidlöslichem Phosphat/mgTg angegeben.

Verwendete Lösungen:

Lsg. 1: a) H_2O_2 (35%) 3 Teile

b) 14 ml H_2SO_4 konz. 7 Teile
4 ml HClO_4 konz.

frisch zubereiten

Lsg. 2: a) 6,25 g Ammoniummolybdat . H₂O
in 50 ml heißem H₂O gelöst

b) 17,4 ml H_2SO_4 konz.

c) ad 125 ml H₂O

Lsg. 3: 2 M Na-Acetat

Lsg. 4: 2 % Ascorbat (Gew/V)

12.2. Fettsäureanalyse

Hierfür wurde zunächst das Gesamtlipid von Aliquots (4 ml) aus Zellsuspensionen ($OD_{600} = 10-20$) entsprechend der Extraktionsmethode 1 (vgl. II.12.1.) extrahiert. Zur Quantifizierung der Fettsäuren wurden eine definierte Menge (50 μ l) einer Phosphatidylcho-

lin-Diheptadecanoyl-Lösung (2,5 mM) coextrahiert. Die Heptadecansäure (17:0), die für *Corynebacterium glutamicum* nicht nachgewiesen werden konnte, wurde zur internen Standardisierung benutzt.

Nach der Extraktion wurden die getrockneten Gesamtlipide in 5 ml 2 N HCL in Methanol resuspendiert und anschließend für 15 Stunden bei 85°C in verschlossenen Schraubdeckelröhrchen verestert. Nach dem Abkühlen wurden die entstandenen Fettsäuremethylester dreifach mit je 5 ml Hexan extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden bei 35°C im Argonstrom getrocknet, in 1,5 ml Hexan resuspendiert und anschließend in GC-Probenröhrchen im Argonstrom getrocknet. Die Fettsäuremethylester wurden in 300 µl Hexan gelöst und mit einem Gaschromatograph der Firma Hewlett Packard (5890A) analysiert. Der Probenauftrag erfolgte automatisch mit einem Hewlett Packard Sampler (7673A).

Trennbedingungen:

Trennsäule	C P Sil 88 Kapillarsäule
	Länge: 55 m
	Durchmesser: 0,25 µm
Trägergas	Helium
Injektionsvolumen	2 µl
Gasflußrate	30 ml/min
Ofentemperatur (min)	140°C
Ofentemperatur (max)	200°C
Temperaturprogramm	4°C/min
Initialzeit	1 min
Haltezeit	20 min
Gesamtlaufzeit	36 min
Detektion	FID
Detektortemperatur	250°C
H ₂ -Strom	30 ml/min
Luftstrom	300 ml/min

Die Fettsäuremenge wurde mit Hilfe eines angeschlossenen Integrators der Firma Hewlett Packard (3392A) bestimmt. Die Identifizierung der Fettsäuren erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten mit käuflichen Fettsäuremethylesterstandards.

12.3. Einbau von [^{14}C]-Acetat in das Gesamtlipid - Extraktionsmethode 2

Zellsuspensionen ($\text{OD}_{600} = 10 - 20$) wurden im Verlauf von Kurzzeitfermentationen mit [^{14}C]-Acetat (57mCi/mmol) versetzt ($0,5\ \mu\text{Ci/ml}$). Zur kinetischen Auflösung des [^{14}C]-Acetateinbaus in das Gesamtlipid wurden nach bestimmten Zeitintervallen Aliquots zu je $200\ \mu\text{l}$ entnommen und die Reaktion durch anschließende Addition in $100\ \mu\text{l}$ eiskalte Perchlorsäure (20%) gestoppt. Die Mischung wurde 5 Minuten in einer Eppendorfzentrifuge ($14\ 000\ \text{Upm}$) zentrifugiert und das Sediment zweimal mit je $200\ \mu\text{l}$ Perchlorsäure (5%) gewaschen.

Anschließend wurde das resultierende Sediment dreimal extrahiert. Dazu wurde das Sediment mit $150\ \mu\text{l}$ $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2/1, V/V) versetzt, 40 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt und danach mit $50\ \mu\text{l}$ MeOH versetzt. Nach einer Zentrifugation (5 min) bei $14\ 000\ \text{Upm}$ wurde der Überstand vorsichtig abgenommen.

Die vereinigten Überstände wurden anschließend zweimal mit gleichen Volumina H_2O gewaschen und die organischen Phasen im Argonstrom getrocknet. Das Lipid wurde in $70\ \mu\text{l}$ $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2/1, V/V) resuspendiert und die Radioaktivität von Aliquots wurde in einem LKB-Scintillationszähler gezählt.

12.4. Auftrennung und Identifikation der Phospholipide

Für die Auftrennung der einzelnen Phospholipide wurde das Gesamtlipid von Aliquots ($4\ \text{ml}$) einer Kurzzeitfermentation ($\text{OD}_{600} = 10 - 20$) nach Extraktionsmethode 1 (vgl. II.12.1.) extrahiert. Das getrocknete Gesamtlipid wurde in $200\ \mu\text{l}$ $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1/2, V/V) resuspendiert. Hiervon wurden Aliquots durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie (2D-DC) aufgetrennt. Die Proben wurden auf Silica Gel 60 Dünnschichtchromatographieplatten der Merck AG, Darmstadt aufgetragen, die vor Gebrauch 1 Stunde bei 105°C erhitzt worden waren.

Das Fließmittel für die erste Dimension war $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ (65/25/5, V/V/V). Nach dem vollständigen Trocknen der DC-Platten wurde für die zweite Dimension $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{Aceton}/\text{Essigsäure}/\text{H}_2\text{O}$ (30/10/40/10/5, V/V/V/V/V) als Laufmittel eingesetzt.

Phosphatidsäure (PA), Phosphatidylinositol (PI), Diphosphatidylglycerol (DPG) und Phosphatidylglycerol (PG) wurden durch den Einsatz spezifischer Anfärbemethoden (vgl. II.12.4.1.) und durch den Vergleich ihrer Rf-Werte mit denen von käuflichen Referenzsubstanzen identifiziert.

Jedoch PI und Phosphatidylinositolmannosid (PIM) konnten nicht eindeutig unterschieden werden, da sie die gleichen Färbereaktionen zeigten und da PIM nicht käuflich als Referenzsubstanz erhältlich war. Daher wurden die Phospholipide zunächst durch eindimensionale-DC unter Verwendung des folgenden Fließmittels aufgetrennt: Diisobutylketon/Essigsäure/Wasser (40/25/5, V/V/V). Unter

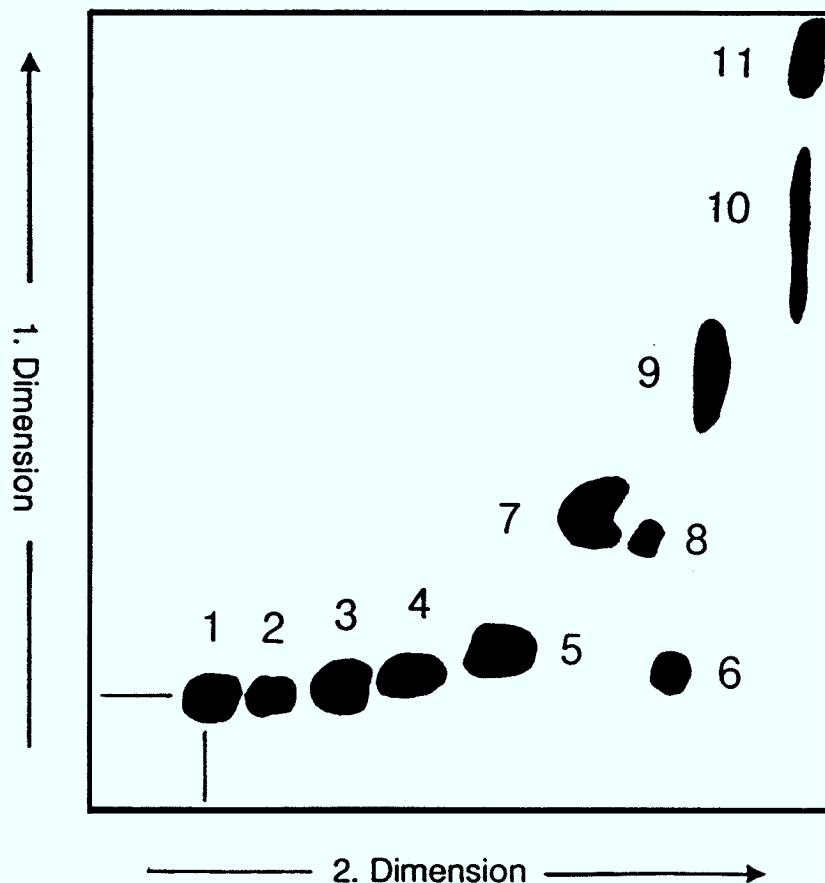


Abb. 3: Zweidimensionales Dünnschichtchromatogramm von Lipidextrakten biotinlimitierter, glutamatproduzierender Zellen von *Corynebacterium glutamicum*: erste Dimension: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65/25/5, V/V/V); zweite Dimension: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{Aceton}/\text{H}_2\text{O}/\text{Essigsäure}$ (30/10/40/10/5, V/V/V/V/V). 1 Startpunkt, 2 unbekanntes Lipid, das nur Spuren von Phosphat aufweist, 3 PI, 4 PIM, 5 X, 6 PA, 7 PG, 8 DPG, 9 Glycolipid, 10 freie Fettsäuren, 11 weniger polare Lipide.

diesen Bedingungen war der Rf-Wert vom PIM bereits publiziert (Komura et al., 1975; Thaler und Diekmann, 1979), so daß PIM über den Vergleich der Rf-Werte identifiziert werden konnte. Der durch 1D-DC identifizierte PIM-Fleck wurde ausgekratzt, mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ eluiert, wieder auf eine Dünnschichtplatte übertragen und anschließend einer 2D-DC unterworfen. Durch den Vergleich der Rf-Werte konnte somit auch das PIM auf der 2D-DC zugeordnet werden. Ein 2D-Dünnschichtchromatogramm von *Corynebacterium glutamicum* unter Biotinlimitierung ist in Abb. 3 dargestellt.

12.4.1. Anfärbemethoden für die Phospholipide

Die durch DC aufgetrennten Lipide wurden durch die folgenden modifizierten Färbemethoden (Kates, 1972; Stahl, 1969) charakterisiert:

1) J_2 -Dampf:

Hierfür wurden die Platten in einem verschlossenen, mit Jod bestückten Chromatographietank bis zur Gelbfärbung der Lipidflecken aufbewahrt. Mit dieser Methode wurden alle Lipide detektiert.

2) Ammoniummolybdatlösung:

5 ml Ammoniummolybdatlsg. (0,1 g/ml), 1,5 ml HCl (25%) und 2,5 ml HClO_4 wurden gemischt und mit Aceton auf 50 ml aufgefüllt.

Mit dieser Methode wurden alle phosphathaltigen Lipide angefärbt. (10 min; 105°C).

3) Perjodat-Schiff-Reagenz:

Lsg. 1: Na-Perjodat, 0,25 g in 100 ml H_2O
frisch zubereiten

Lsg. 2: 5 g Na-metabisulfit in 500 ml H_2O
frisch zubereiten

Lsg. 3: Schiff's-Reagenz. 1 g basisches Fuchsin und 10 g Na-metabisulfit wurden in 10 ml HCl (konz.) gerührt. Anschließend wurden 100 ml H₂O zugegeben. Die Lösung wurde 1 Stunde mit Aktivkohle behandelt, filtriert und mit H₂O auf 500 ml aufgefüllt. Vor dem Gebrauch wurde diese Lösung 1/2 mit Lösung 2 verdünnt.

Die Platten wurden zunächst in Lösung 1 eingetaucht und nach 15 - 20 Minuten mehrmals in Lösung 2 eingetaucht. Danach wurden die Platten kurz in Lösung 3 eingetaucht. Zuckerhaltige Phospholipide, wie PI, PIM und PG, sowie Glycolipide ohne Phosphatanteil färbten sich bei dieser Prozedur rosa.

4) Rhodamin 6G - Färbung:

100 mg Rhodamin 6G wurden in 100 ml H₂O gelöst. Vor dem Gebrauch wurde 1 ml dieser Stammlösung mit 49 ml 2 N KOH gemischt. Die DC-Platten wurden mit dieser Lösung eingesprüht und unter einer UV-Lampe bei 366 nm untersucht. Saure Phospholipide, wie PA, DPG, PG, PI und PS erscheinen blau, während neutrale Phospholipide, wie PC und PE gelb erscheinen.

5) Ninhydrinfärbung:

0,2 g Ninhydrin wurden in 100 ml Butanol (wassergesättigt) gelöst. Nach dem Einsprühen der Platten wurden sie zur Farbentwicklung einige Minuten auf 105°C erhitzt. Mit dieser Methode färbten sich NH₂-haltige Lipide violett.

12.5. Quantitative Bestimmung der einzelnen Phospholipide

Die durch 2D-DC aufgetrennten einzelnen Phospholipide (vgl. II.12.4.) wurden von den Platten abgekratzt und anschließend mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1/2, V/V) eluiert. Die Eluate wurden anschließend im Argonstrom getrocknet. Der jeweilige Phospholipidgehalt wurde durch Phosphatanalyse bestimmt, nachdem die Proben zunächst verascht worden waren (vgl. II.12.1.).

12.5.1. Synthese der einzelnen Phospholipide nach der Biotinaddition

Der innerhalb eines kurzen Zeitraums nach der Biotinaddition erwartete nur geringfügige Anstieg des Gehalts der einzelnen Phospholipide, die in kleinen Mengen auftreten (vgl. III.2.2.), reichte nicht aus, um chemisch mit der oben beschriebenen Methode (vgl. II.12.5.) detektiert zu werden. Daher wurden für eine schnelle kinetische Auflösung der nach der Biotinaddition einsetzenden Neusynthese eines jeden einzelnen Phospholipids die Einbauraten von [^{14}C]-Acetat in die aufgetrennten Phospholipide bestimmt.

5 Minuten bevor eine biotinlimitierte glutamatproduzierende Zellsuspension ($\text{OD}_{600} = 10 - 20$) im Verlauf einer Kurzzeitfermentation mit Biotin behandelt wurde, erfolgte die Gabe von [^{14}C]-Acetat (57 mCi/mmol; 0,5 $\mu\text{Ci/ml}$). Nach kurzen Zeitintervallen wurden Aliquots von den biotinbehandelten Zellen und einer unbehandelten Kontrolle entnommen und entsprechend der Extraktionsmethode 1 extrahiert (vgl. II.12.1.). Anschließend wurden die Phospholipide durch 2D-DC getrennt (vgl. 12.4.). Die Flecken der einzelnen Phospholipide wurden ausgekratzt und ihre Radioaktivität in einem Flüssig-Scintillationszähler gemessen.

Um die gemessene eingebaute Menge an Radioaktivität in die einzelnen Phospholipide mit den tatsächlich neusynthetisierten Phospholipidmengen korrelieren zu können, wurden die einzelnen Phospholipide zusätzlich chemisch analysiert. Dies geschah nach einer - im Vergleich zu der schnell nach der Biotinaddition erfolgenden Bestimmung des [^{14}C]-Einbaus - relativ langen zeitlichen Periode. Somit war gewährleistet, daß die neusynthetisierte Menge der einzelnen Phospholipide ausreichte, um chemisch detektiert zu werden.

Die chemischen Analysen wurden unmittelbar vor und 18 Minuten nach der Biotinaddition durchgeführt. Daraufhin wurden die chemisch bestimmten Mengen der einzelnen neusynthetisierten Phospholipide mit der eingebauten Radioaktivität korreliert, die zu den gleichen Zeitpunkten gemessen worden war. Aufgrund der somit erhaltenen Korrelationen, die für jedes einzelne Phospholipid unterschiedlich waren, konnte die inkorporierte Radioaktivität, die innerhalb kurzer Zeitintervalle nach der Biotinaddition gemessen worden war, für jede individuelle Phospholipidspezies in Lipidmengen umgerechnet werden. Für die durchgeführte Umrechnung mußte einzig die Annahme gemacht werden, daß die spezifische Radioaktivität des eingebauten [^{14}C]-Acetats für jedes neu synthetisierte Phospholipid identisch war.

III. ERGEBNISSE

1. Charakterisierung der Glutamatsekretion

1.1. Optimierung eines Minimalmediums für die Glutamatproduktion

Um Glutamatfermentationen unter definierten limitierenden Biotinkonzentrationen durchführen zu können, war es notwendig, den Organismus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 über viele Passagen hinweg in Mineralsalzmedium zu kultivieren. Dies war wichtig, weil beim Animpfen mit Vorkulturen, die in Komplexmedium angezogen wurden, das Produktionsmedium durch unbekannte Mengen Biotin aus der Vorkultur kontaminiert werden konnte. Das für Fermentationen üblicherweise verwendete Mineralsalzmedium MMI war für diese Zwecke ungeeignet, da die optische Dichte (OD_{600}) nach dem zweiten Animpfen nur noch 1,2 statt 13, wie nach dem ersten Animpfen, erreichte. Dies war vermutlich auf das Ausdünnen wachstumsfördernder Faktoren wie etwa Spurenelemente, Vitamine oder kleine Peptide zurückzuführen.

Um auch nach dem zweiten Animpfen ein besseres Wachstum zu erreichen, wurden dem MMI-Medium zunächst Spurenelemente (vgl. II.2.2.) zugesetzt. Die Zellen wurden in MMI-Medium angezogen, anschließend wieder in MMI-Medium überimpft und das Wachstum durch Messung der OD bestimmt. Da für einige coryneformen Bakterien neben der Biotinauxotrophie auch eine Thiaminauxotrophie bekannt war, wurde auch der Einfluß von Thiamin auf das Wachstum nach zweimaligen Überimpfen getestet.

Wie aus Tab. 1 hervorgeht, wurde allein durch Zusatz von Spurenelementen - mit einer End- OD_{600} von 12,8 - eine wesentliche Erhöhung der erreichbaren Zelldichte hervorgerufen. Dagegen hatte die Zugabe von Thiamin keinen positiven Effekt auf das Wachstum. Das mit Spurenelementen supplementierte MMI-Medium wurde nun zum mehrmaligen Überimpfen der Zellen benutzt, und auch nach mehr als 10 Passagen blieben die Verdopplungszeiten und die Zelldichten gleich. Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, daß für eine Kultivierung über mehrere Passagen das MMI-Medium mit Spurenelementen versetzt werden muß.

Tabelle 1: Einfluß von Spurenelementen und Thiamin auf das Wachstum von *C. glutamicum* in MMI-Medium (200µg/l Biotin)

Zusatz zum Grundmedium	OD ₆₀₀ Beginn ¹⁾	OD ₆₀₀ Ende ²⁾	Verdopplungs- zeit (h)
1% Glucose	0,21	1,25	ca. 5
1% Glucose, Thiamin (100 µg/l)	0,29	1,3	ca. 5
1% Glucose, Spurenelemente	0,32	12,8	ca. 4
1% Glucose, Spurenelemente Thiamin (100 µg/l)	0,32	10,4	ca. 4

1) OD₆₀₀ nach dem Animpfen 2) Erreichte maximale OD₆₀₀

Das nächste Ziel war, für die Untersuchungen der Glutamatsekretion eine Biotinkonzentration zu finden, die eine möglichst hohe reproduzierbare Glutamatproduktion bei gleichzeitig hohen Zellausbeuten ermöglichte. Dazu wurden der Einfluß unterschiedlicher Biotinkonzentrationen auf das Wachstum und die ausgeschiedene Glutamatmenge bestimmt. Die Vorkultur wurde bei einer Biotinkonzentration von 10 µg/l angezogen, wodurch noch optimales Wachstum möglich war, aber eine Kontamination der Hauptkultur mit Biotin vermieden wurde. Wie in Tab. II dargestellt, erwies sich die Biotinkonzentration von 1 µg/l als günstigster Kompromiß zwischen optimaler Glutamatbildung und hoher Zellausbeute. Zur Anzucht sezernierender Zellen für Exportuntersuchungen wurde dem MMI-Medium daher das Biotin in einer Konzentration von 1 µg/l zugesetzt.

Der Animpfvorgang wurde des weiteren durch den Gebrauch von Glycerinstammkulturen (-20° C) aus MMI-Medium (10 µg/l Biotin) anstelle von Vorkulturen erleichtert. Die Fermentationen zeigten im Hinblick auf das Wachstum und die Glutamatproduktion keine Unterschiede zu Fermentationen, die mit frischen Vorkulturen angeimpft worden waren.

Tabelle 2: Einfluß der Biotinkonzentration auf Wachstum und Glutamatproduktion von *Corynebacterium glutamicum*

Biotin ($\mu\text{g/l}$)	pH ¹⁾	OD ₆₀₀ ¹⁾	ext Glut. (mM) ¹⁾
0,0	8,8	1,4	4,4
0,3	8,6	3,7	9,8
0,5	5,9	7,0	37
1,0	5,2	13,5	45
1,5	5,2	17,0	43,5

¹⁾ Angegeben sind Endwerte nach 57 h Fermentationszeit

1.2. Standardglutamatfermentation unter Biotinlimitierung

Eine Standardglutamatfermentation im Schüttelkolben in MMI-Medium mit limitierender Biotinkonzentration (1 $\mu\text{g/l}$) ist in Abb. 4 dargestellt. Der Start der Fermentation erfolgte mit einer Glycerindauerkultur von *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032.

Die Zellen begannen nach ca. 15 h Fermentationszeit gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase, das bedeutet sobald der Biotinmangel das Zellwachstum limitierte, Glutamat zu sezernieren. Die Sekretionsrate erreichte innerhalb von 1-2 Stunden ein Maximum von 20 nmol/min x mgTg und blieb auch während der weiteren Fermentationsdauer von 15 Stunden konstant. Diese Rate ist mit den bei Fermentationen im Industriemaßstab gemessenen Raten vergleichbar (Kinoshita und Tanaka, 1972). Während des Produktionszeitraums lag auch eine hohe intrazelluläre Glutamatkonzentration zwischen 120 - 150 mM vor, die anschließend gleichzeitig mit der Sekretionsrate absank.

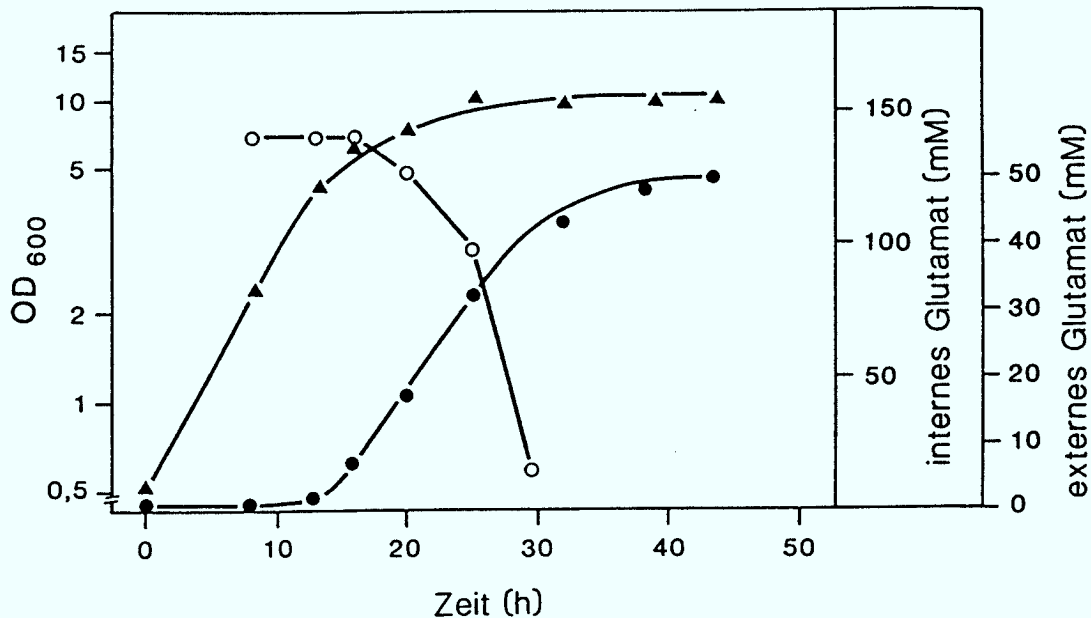


Abb. 4: Standardglutamatfermentation mit *Corynebacterium glutamicum* in MMI-Medium mit 1 µg Biotin/l. Die gefüllten Dreiecke symbolisieren die OD₆₀₀, die geschlossenen Kreise die externe Glutamatkonzentration und die offenen Kreise die interne Glutamatkonzentration.

1.3. Kurzeitfermentation mit *Corynebacterium glutamicum*

Für eine detaillierte Analyse des Glutamatefflux in Bezug auf die relevanten kinetischen und energetischen Parameter war eine Methode erforderlich, die folgende Bedingungen erfüllen sollte: (I) Die Zellen sollten schnell nach dem Sekretionsbeginn, bei noch niedrigen Glutamataußenkonzentrationen (< 1mM) in die optimale Sekretionsphase eintreten, so daß auch geringe Veränderungen der Außen- und der Innenkonzentration exakt bestimmbar wurden. Bei Standardfermentationen wurde die maximale Sekretionsrate erst 1 - 2 Stunden nach dem Sekretionsbeginn bei einer Außenkonzentration ≥ 3 mM erreicht. (II) Der Beginn der Sekretionsphase sollte möglichst genau definierbar sein. (III) Die experimentellen Bedingungen, wie die Zusammensetzung des Mediums, Ionen, pH, etc., sollten frei variierbar werden.

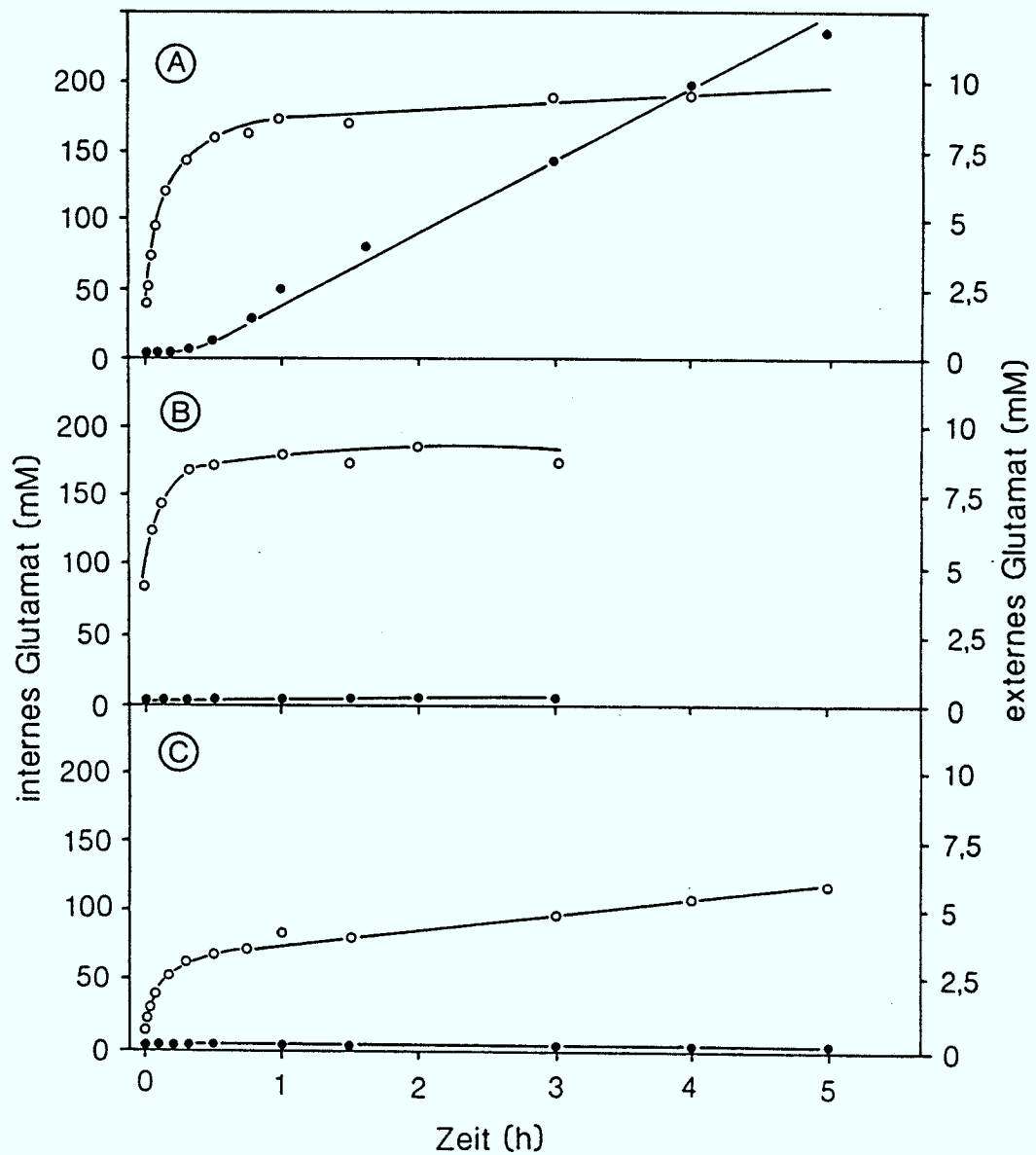


Abb. 5A-C: Kurzzeitfermentation mit *Corynebacterium glutamicum*. Die internen Glutamatkonzentrationen (offene Symbole) und die externen Glutamatkonzentrationen (geschlossene Symbole) wurden bestimmt. A Biotinlimitierte Produzenten mit Glucose. B Biotin-supplementierte Nichtproduzenten mit Glucose. C Biotinlimitierte Produzenten ohne Glucose.

Dazu wurde die im folgenden als Kurzzeitfermentation bezeichnete Methode entwickelt: Zellen, die während der Standardfermentation in MMI-Medium die optimale Sekretionsrate von 20 nMol/min x mgTg erreicht hatten, wurden geerntet. Zu diesem Zeitpunkt hat die Außenkonzentration des Glutamats einen Wert von ungefähr 5 mM erreicht, und die Innenkonzentration befindet sich in einem steady state zwischen 130 und 150 mM. Die Zellen wurden zweimal (4°C) in MMI-Medium ohne Glucose gewaschen und anschließend in MMI-Medium mit 5% Glucose für 90 min inkubiert. Diese Zwischeninkubation erhöhte die Reproduzierbarkeit der Glutamatsekretion bei der anschließend folgenden eigentlichen Kurzzeitfermentation. Nach der Zwischeninkubation wurden die Zellen dreimal bei Raumtemperatur in MMI-Medium mit 5% Glucose gewaschen. Unmittelbar nach der Resuspension der Zellen im gleichen Medium wurde die Kurzzeitfermentation durch Inkubation auf einem Reziprokschüttler (30°C) gestartet. Danach wurde sofort die erste Probe entnommen. Alle Schritte wurden mit MMI-Medium ohne supplementiertes Biotin durchgeführt. Die Konditionierung gewährleistete, daß von Beginn der Experimente an - also noch bei niedriger externer Glutamatkonzentration - echte Produzentenzellen eingesetzt wurden.

In Abb. 5A ist der Verlauf einer Kurzzeitfermentation mit biotinlimitierten Produzentenzellen dargestellt. Die durch die Konditionierung auf ungefähr 40 mM abgesenkte interne Glutamatkonzentration stieg innerhalb der ersten 30 min nach Beginn des Experiments auf hohe Werte zwischen 150 und 200 mM an und blieb über den gesamten Verlauf der Kurzzeitfermentation konstant. Die effiziente Glutamatsekretion begann nach Ablauf einer anfänglichen lag-Phase von 15 Minuten, sobald eine interne Konzentration von 120 - 130 mM erreicht war. Dieses Schwellenphänomen deutet auf eine Regulation der Glutamatsekretion hin. Die während des gesamten Prozeß konstant bleibende Sekretionsrate (20 nmol/min x mgTg) führte zu einem Absinken des chemischen Gradienten von mehr als 600 auf unter 30. Die Sekretion lief demnach unabhängig vom chemischen Gradienten ab, der gemäß Model I und II die Triebkraft für diesen Prozeß darstellen soll (vgl. I.2.).

Diesem Experiment ist zum Vergleich eine Kurzzeitfermentation mit biotinsupplementierten Nichtproduzenten in Abb. 5B gegenübergestellt. Die Zellen wurden im Unterschied zu den oben beschriebenen Zellen mit einer hohen Biotinkonzentration (200 µg/l) angezogen und bei jedem Waschschrift wurde Biotin zugesetzt. Auch

diese Zellen wiesen zu Beginn des Experiments eine - aufgrund der intensiven Waschprozedur deutlich reduzierte - interne Glutamatkonzentration auf (ca. 80 mM), die innerhalb von 30 Minuten auf hohe konstante Werte zwischen 150 und 200 mM anstieg. Die internen Konzentrationen waren im Widerspruch zu Modell I (vgl. I.1.1.) identisch mit denen von biotinlimitierten Produzentenzellen. Trotz der hohen Innenkonzentration und des hohen chemischen Gradienten wurden nur sehr geringe Mengen Glutamat ins Medium sezerniert.

In Abb. 5A,B sind zwei unterschiedlich angezogene Zelltypen, biotinlimitierte Produzenten und biotinsupplementierte Nichtproduzenten, in Bezug auf die Glutamatsekretion miteinander verglichen worden. Um weitere eventuell anzuchtbedingte Unterschiede zwischen diesen Zellen als Grund für das veränderte Sekretionsverhalten ausschließen zu können, galt das weitere Interesse der Möglichkeit, das Sekretionsverhalten bei ein und demselben Zelltyp zu verändern. Daraufhin sollten die Parameter Sekretionsrate, Innenkonzentration und chemischer Gradient verglichen werden. Dafür wurde mit Produzentenzellen (vgl. Abb. 5A) eine Kurzzeitfermentation in glucosefreiem Medium durchgeführt. Die Zellen wurden identisch angezogen und vorbehandelt: im Unterschied zu den vorherigen Experimenten wurde jetzt glucosefreies Medium für den letzten Waschvorgang und für die anschließende Kurzzeitfermentation verwendet. Trotz C-Quellmangels erhöhten auch diese Zellen ihre anfangs deutlich reduzierte interne Glutamatkonzentration innerhalb von 30 Minuten auf 80 mM und erreichten ein über den Zeitraum von 4 Stunden konstantes Niveau um 100 mM (Abb. 5C). Vermutlich verwendeten die Zellen zum Anheben ihres Glutamatpools bisher noch nicht nachgewiesene Speichersubstanzen. Die externe Glutamatkonzentration verblieb über den ganzen Zeitraum des Experiments unverändert unterhalb der Meßgrenze von 50 μ M, wodurch ein sehr hoher chemischer Gradient von ≥ 2000 (int/ext) eingehalten wurde. Die Tatsache, daß trotz des hohen Konzentrationsgradienten die Sekretion unter glucoselimitierten Bedingungen bei Null lag, sprach für eine Regulation des Sekretionsprozesses. Zudem steht dieses Ergebnis im Widerspruch zu Modell II (vgl. I.1.3.), nach dem der hohe Gradient neben dem Membranpotential, das in diesem Fall auch sehr hoch ist (135 mV), die Triebkraft der Sekretion darstellt.

Aus dem Vergleich der vorgestellten Zelltypen geht hervor, daß Produzenten und Nichtproduzenten bis auf die Fähigkeit Glutamat zu sezernieren, keine Unterschiede aufweisen. Sogar ohne C-Quelle erreichen Produzenten entgegen den Vorstellungen von Modell I hohe interne Glutamatkonzentrationen und damit auch sehr hohe chemische Gradienten.

1.4. Biochemische und bioenergetische Analyse der Sekretion

Um Kriterien zu erstellen, den Sekretionsmechanismus einem der oben vorgestellten Modelle zuzuordnen, wurden Zellen von *Corynebacterium glutamicum* durch Bestimmung der wichtigsten kinetischen und energetischen Parameter analysiert. Dafür wurden die drei in Abb. 5A-C vorgestellten Zelltypen - Produzenten, mit und ohne C-Quelle, und Nichtproduzenten - im Verlauf von Kurzzeitfermentationen miteinander verglichen. Tabelle 3 zeigt die Resultate, die zu zwei repräsentativen Zeitpunkten gewonnen wurden: 5 min nach Start der Kurzzeitfermentation, also in der lag-Phase der Glutamatsekretion bei niedriger interner Glutamatkonzentration; und 2 h nach Start des Experiments, d.h. in der vollen Produktionsphase bei hoher interner Glutamatkonzentration.

Wie in Tabelle 3 dargestellt, war die Glutamataufnahmerate in allen Fällen niedrig. Sezernierende Zellen zeigten eine deutlich reduzierte Aufnahmerate im Vergleich zu Nichtproduzenten. Die Produktionsrate von biotinlimitierten Zellen war mindestens 50-fach höher als der Grundefflux von biotinsupplementierten Zellen. Produzenten ohne C-Quelle (vgl. Abb. 5A-C) sezernierten kein Glutamat. Zudem führte der Biotinmangel bei den Produzenten zellen, ähnlich wie bei Standardfermentationen zu einer starken Reduktion des Wachstums, während biotinsupplementierte Zellen mit normaler Rate wuchsen.

Als Maß für die Permeabilität der Zellen wurden das Membranpotential und die Konzentrationsgradienten kleiner Ionen, wie Kalium und Natrium bestimmt. Das Membranpotential war mit Werten um 160 mV unter allen untersuchten Bedingungen - unabhängig von der Fähigkeit, Glutamat mit hohen Raten zu sezernieren - sehr hoch und zumindest in der beobachteten Zeitspanne auch unabhängig von der Anwesenheit einer C-Quelle. Die angegebenen hohen Werte sind nach

dem "exponential mean model" von Zaritsky et al. (1981) korrigiert. Die unkorrigierten Werte lagen bei 200 mV.

Neben den hohen Membranpotentialen wiesen alle Zelltypen vergleichbar hohe Kaliumkonzentrationsgradienten auf. Der typische Verlauf der internen Kaliumkonzentration während einer Kurzzeitfermentation ist am Beispiel der biotinlimitierten Produzentenzellen in Abb. 6 gezeigt. Zu Beginn der Kurzzeitfermentationen lagen die internen Kaliumkonzentrationen bei Werten zwischen 800 und 1000 mM und die Gradienten waren dementsprechend hoch. Während der Konditionierungsprozedur akkumulierten die Zellen, die sehr effiziente Aufnahmesysteme für Kalium und Natrium besitzen (Krämer et al., 1990a), intern große Mengen Kalium. Die Innenkonzentrationen fielen jedoch nach Start der Kurzzeitfermentation auf konstante Werte zwischen 250 und 300 mM ab. Daraufhin sanken entsprechend der hohen externen Kaliumkonzentrationen des Mediums (ca. 35 mM) die Gradienten auf Werte um 8 (int/ext) ab und blieben dann mindestens drei Stunden konstant. Bei niedrigerem externen Kalium waren die Zellen in der Lage weitaus höhere Konzentrationsgradienten über längere Zeiträume aufrechtzuerhalten. Neben Kalium wurden

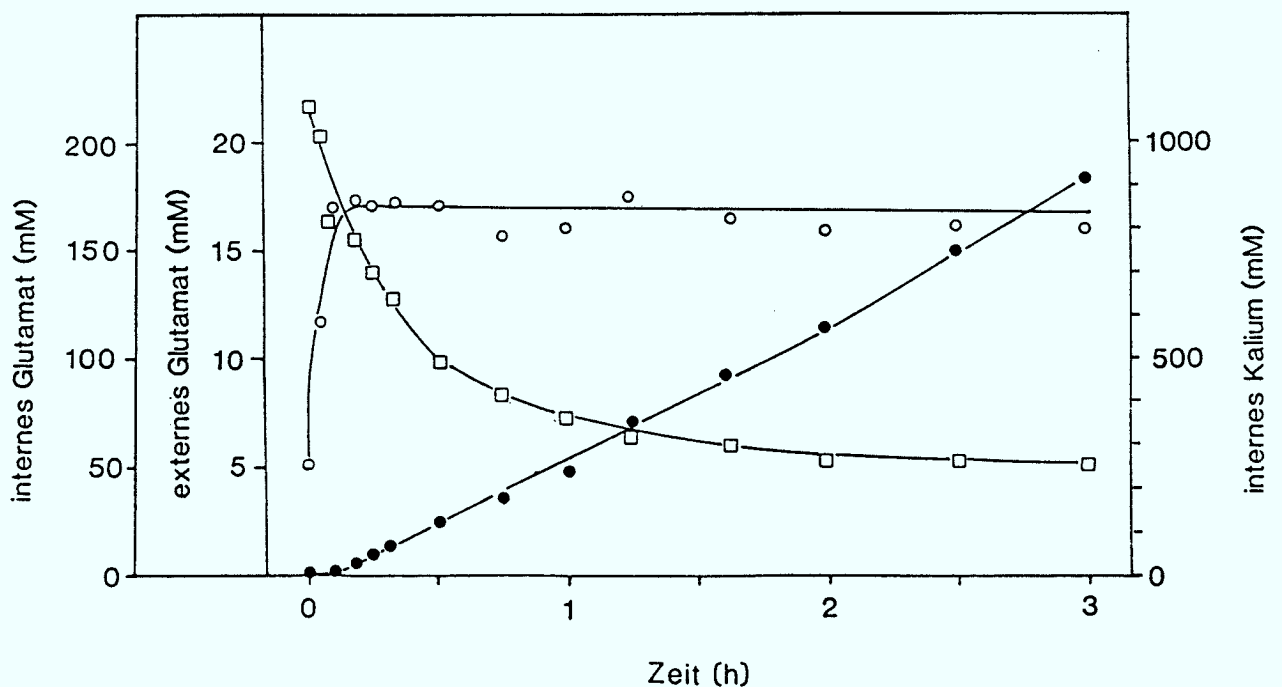


Abb. 6: Kurzzeitfermentation mit biotinlimitierten Produzentenzellen. Die Verläufe der internen (offene Kreise) und der externen (geschlossene Kreise) Glutamatkonzentration, sowie der Verlauf der internen Kaliumkonzentration (offene Quadrate) sind angegeben.

auch die internen Natriumkonzentrationen bestimmt. Sie waren jedoch zu gering, um neben den hohen Verunreinigungen des zur Aufarbeitung der Proben benutzten Aqua bidest. (ca 150-200 μM Na) und der verwendeten Chemikalien genau bestimmt zu werden. Unabhängig von der Höhe der externen Konzentrationen (200 μM - 60 mM) lagen sie unter 1 mM.

Tabelle 3: Biochemische und bioenergetische Analyse der Glutamatsekretion. Vergleich Produzenten und Nichtproduzenten im Verlauf einer Kurzzeitfermentation. Kinetische und energetische Daten der Zellen wurden in Abhängigkeit vom Status der Glutamatsekretion verglichen. Nichtproduzenten entsprechen biotinsupplementierten Zellen, während Produzenten unter Biotinlimitierung angezogen wurden. Glucose als einzige C-Quelle wurde wie angezeigt zugegeben.

	Nichtproduzenten		Produzenten			
	+ Glucose		+ Glucose		- Glucose	
	1) 5 min	1) 2 h	1) 5 min	1) 2 h	1) 5 min	1) 2 h
OD ₆₀₀	11	15	10	10,5	10	9,5
Produktionsrate (nmol/min x mgTg)	0,36	0,42	<0,1	21	<0,01	<0,01
Aufnahmerate (nmol/min x mgTg)	0,8	1,1	0,85	0,2	0,75	0,8
$\Delta \psi$ (mV)	158	167	162	170	150	135
K ⁺ (int/ext)	34	9	23	8	21	8
pH _{in}	7,7	8,2	7,7	8,0	8,3	8,8
pH _{ex}	7,7	8,6	7,6	8,4	8,3	8,8
int Glut. (mM)	130	192	95	184	38	104
ext Glut. (mM)	0,12	0,42	0,15	5,5	<0,05	<0,05
Glut. (int/ext)	1080	460	630	33	≥750	≥2000

1) Zeitpunkte der Probenentnahmen

Der pH des Mediums lag für alle oben aufgeführten Zellen während des Zeitraums der Kurzzeitfermentationen (Tab. 3) in einem Bereich zwischen 7,0 und 8,8. Die auftretenden pH-Gradienten waren nie größer als 0,5 Einheiten.

Bei der Analyse der verschiedenen Zelltypen traten bis auf die Fähigkeit, Glutamat zu sezernieren, in bioenergetischer Hinsicht keine Unterschiede zwischen Produzenten und Nichtproduzenten auf. Die Cytoplasmamembran von Produzenten wies demnach weder gegen Protonen noch gegen kleine Ionen eine erhöhte Permeabilität auf.

1.5. Spezifität der Glutamatsekretion

Als weiteres wichtiges Kriterium zur Bestimmung des Mechanismus der Glutamatsekretion wurde die Spezifität des Glutamatefflux bestimmt. Für die Eingrenzung der Carrierspezifität sind Konkurrenzexperimente mit anderen Aminosäuren notwendig. Dafür müßten deren Konzentrationen gegenüber der spezifischen Aminosäure gezielt variiert werden. Im Gegensatz zu Aufnahmeuntersuchungen, bei denen das externe Medium für Manipulationen frei zugänglich ist, sind die notwendigen Veränderungen der internen Aminosäurekonzentrationen bei Exportuntersuchungen nicht ohne weiteres möglich. Es war nur möglich, die neben dem Glutamat vorliegenden internen Pools der übrigen Aminosäuren zu bestimmen und deren Exportaktivitäten zu messen. So konnten nur wenige Aminosäuren zum Vergleich mit Glutamat herangezogen werden, da sowohl die internen Konzentrationen als auch die Exportaktivitäten der meisten von ihnen zu niedrig war. Als sensitivste Aminosäure für Konkurrenzexperimente mit dem Exportsystem wurde zunächst Aspartat wegen seiner grossen strukturellen Ähnlichkeit zum Glutamat und seiner bekannten Konkurrenz mit Glutamat im Falle des Aufnahmesystems bei *Corynebacterium glutamicum* (Krämer et al., 1988) ausgewählt. Zudem wurde das zwitterionische Threonin wegen seiner hohen Innenkonzentration und der gut meßbaren Exportaktivität untersucht.

Wie aus Tab. 4 ersichtlich, war die Sekretion sowohl von Threonin als auch von Aspartat im Verlauf einer Kurzzeitfermentation unter Biotinlimitierung im Vergleich zur Glutamatsekretion extrem niedrig (ca. 0,1 nmol/min x mgTg) und kam zum Schluß der Fermentation trotz hoher Gradienten fast zum Erliegen. Mit Ausnahme der Akkumulationsphase in der ersten Stunde veränderten sich die in-

ternen Aminosäurekonzentrationen im Verlauf des Experiments nicht signifikant. Die Gradienten (int/ext) aller drei Aminosäuren lagen zu Beginn des Experiments vergleichbar hoch (200 - 350). Der schwache Efflux von Aspartat und Threonin während der ersten zwei Stunden der Kurzzeitfermentation senkte deren Konzentrationsgradienten auf Werte zwischen 50 und 60, wo sie sich schließlich stabilisierten. Glutamat wurde jedoch über den gesamten Zeitraum mit konstant hoher Rate sezerniert, so daß der Konzentrationsgradient ständig weiter abnahm. Diese Ergebnisse dokumentieren, daß der Prozeß der Glutamatsekretion eine klare Spezifität für Glutamat aufweist und im Gegensatz zum Glutamataufnahmecarrier, der nach Modell II auch die Sekretion katalysiert, sogar zwischen Glutamat und Aspartat unterschieden wird.

Tabelle 4: Bestimmung der internen und externen Konzentrationen von Glutamat, Aspartat und Threonin im Verlauf einer Kurzzeitfermentation unter Biotinlimitierung

	Glutamat _(mM)			Aspartat _(mM)			Threonin _(mM)		
	int	ext	int/ext	int	ext	int/ext	int	ext	int/ext
t _(min) ¹⁾									
0	39	0,2	195	5,3	0,03	177	14	0,04	350
21	145	0,98	148	6,1	0,03	203	12	0,06	200
53	176	2,5	70	5,7	0,05	114	8	0,08	100
100	184	4,4	42	6,1	0,07	87	9	0,12	75
150	190	9,8	19	5,8	0,11	53	11	0,18	61
207	193	13,6	14	7,3	0,14	50	12	0,18	67

1) "t" = Zeitpunkt der Probenentnahme

1.6. Einfluß des energetischen und metabolischen Status der Zellen

In Kapitel III.1.4. wurde darauf hingewiesen, daß die Glutamatsekretion reguliert werden kann. Bei C-Quellmangel kam sie vollständig zum Erliegen (Abb. 5C), obwohl alle biochemischen und bioenergetischen Parameter, wie der Glutamatgradient, das Membranpotential und Ionengradienten unverändert geblieben sind (Tab. 3). Da jedoch C-Quellmangel eine schwerwiegende Veränderung für die Zellen bedeutet, sollten der energetische Status des fakultativ anaeroben Bakteriums *Corynebacterium glutamicum* durch Einsatz weniger drastischer Mittel verändert und die Auswirkung auf die Glutamatsekretion untersucht werden.

Zunächst wurde der Einfluß einer Anaerobisierung auf den Glutamatefflux untersucht. Dafür wurde eine Zellsuspension in einem verschlossenen Schüttelkolben mit einem schwachen Stickstoffstrom begast. Wie in Abb. 7 dargestellt, wurde sehr schnell nach Beginn

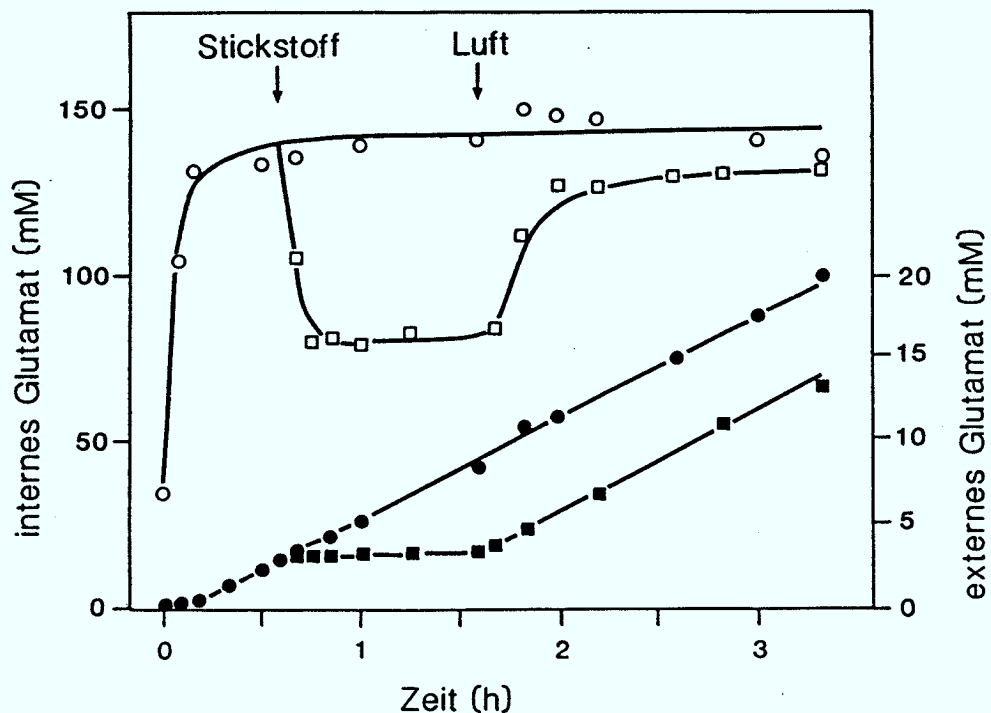


Abb. 7: Kurzzeitfermentation: Effekt der Anaerobisierung durch N_2 -Begasung auf die interne (offene Symbole) und die externe (geschlossene Symbole) Glutamatkonzentration. Diese Parameter wurden unter konstanter Belüftung (Kreise) oder unter anaeroben Bedingungen (Quadrate) gemessen. Die Pfeile zeigen den Zeitpunkt der Stickstoffbegasung, bzw. der anschließenden erneuten Belüftung.

der Stickstoffbegasung die Glutamatsekretion fast vollständig gehemmt. Die interne Glutamatkonzentration sank lediglich um ungefähr 40% des Ausgangswertes der unbehandelten Zellen ab. Auch nach Abnahme des internen Glutamats blieb sein Gradient (int/ext) bei einem hohen Wert von ca 25. Die Wirkung der Anaerobisierung auf die Glutamatsekretion war vollständig reversibel, denn nach erneuter Belüftung der Kultur begannen die Zellen sehr schnell wieder mit hohen Raten (20 nmol/min x mgTg) Glutamat zu sezernieren. Auch die Innenkonzentration stieg langsam wieder auf die Ausgangswerte an.

In einem ähnliches Experiment wurde Cyanid, ein Hemmstoff der Elektronentransportkette, eingesetzt. Wie in Abb. 8 dargestellt, führte die Zugabe von NaCN (6 mM) ebenfalls innerhalb weniger Minuten zu einer fast vollständigen Hemmung der Glutamatsekretion. Ähnlich wie die Stickstoffbegasung bewirkte Cyanid ein Absinken des internen Glutamatpools um ca. 35% von 155 mM auf 100 mM; der verbleibende Gradient war mit 45 (int/ext) relativ hoch. Nach 2 Stunden Fermentation mit Cyanid erlangten die Zellen ihre Fähig-

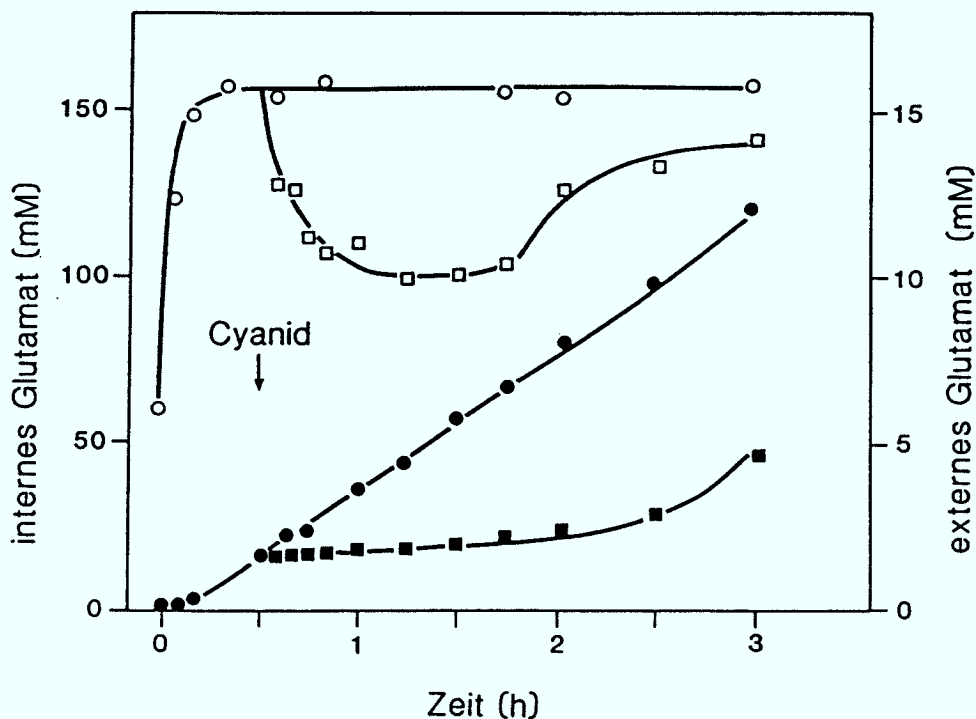


Abb. 8: Kurzzeitfermentation: Effekt von Cyanid (6 mM) auf die interne (offene Symbole) und die externe (geschlossene Symbole) Glutamatkonzentration. Die unbehandelten Zellen werden durch Kreise symbolisiert, und die cyanidbehandelten Zellen durch Quadrate. Der Pfeil zeigt den Zeitpunkt der Cyanidaddition an.

keit zur Glutamatsekretion zurück. Gleichzeitig stieg die interne Glutamatkonzentration fast wieder auf den Ausgangswert. Diese Wiederaufnahme der Effluxaktivität hing mit der Verflüchtigung des Cyanids zusammen. Die Cyanidabnahme wurde chemisch bestimmt.

Da die Glutamatsekretion durch O_2 -Limitierung und Hemmung der Elektronentransportkette trotz hoher chemischer Gradienten gehemmt wird, kann man davon ausgehen, daß sie durch den energetischen oder metabolischen Zustand der Zellen reguliert wird.

1.7. Einfluß des osmotischen Drucks auf die Sekretion

Für die Lysinsekretion bei *Corynebacterium glutamicum* ist von Luntz et al. (1986) vorgeschlagen worden, daß die Sekretion über eine substratspezifische Pore abläuft, die durch den osmotischen Druck des Mediums bzw. die interne Lysinkonzentration reguliert wird. Diese Poren sollten sich bei ansteigender Lysininnenkonzentration - bedingt durch die Differenz zwischen internem und externem osmotischen Druck - öffnen. Die Möglichkeit einer Regulation durch den osmotischen Druck des Mediums war für die Glutamatsekretion hier bisher noch nicht in Betracht gezogen worden. Sie sollte im folgenden untersucht werden.

Unter diesem neuen Gesichtspunkt mußte besonders das in Abb. 5C dargestellte Experiment neu analysiert werden, da hier der osmotische Druck, der unter Produktionsbedingungen 530 mOs beträgt, wegen des C-Quellmangels auf ca. 200 mOs reduziert wurde. Das Absenken des osmotischen Drucks auf fast 1/3 des Ausgangswertes könnte, wegen der damit einhergehenden Reduktion der internen Glutamatkonzentration einen osmotisch regulierten Carrier schließen und zu einem Stopp der Glutamatsekretion führen. Somit wäre die beobachtete Hemmung auf einen reduzierten osmotischen Druck und nicht, wie angenommen, auf eine Regulation durch den metabolischen Zustand der Zellen zurückzuführen (vgl. III.1.4.).

Um zu überprüfen, ob bei C-Quellmangel die Sekretion aufgrund des reduzierten osmotischen Drucks gehemmt wird, wurde eine Kurzzeitfermentation unter C-Quellmangel, jedoch diesmal mit unverändert hohem osmotischen Druck des Mediums durchgeführt. Um den osmotischen Druck von 530 mOs aufrecht zu erhalten, wurde dem Medium Sorbitol (330 mM), das von *Corynebacterium glutamicum* nicht verwertet wird, anstelle der Glucose zugesetzt. Neben den aktuellen

Glutamatkonzentrationen wurden andere wichtige Parameter, etwa Ionengradienten, Membranpotential und pH-Gradienten bestimmt. Die interne Glutamatkonzentration von Sorbitolzellen erreichte mit ca. 100 mM (Abb. 9) ähnlich hohe Werte wie die Kontrollzellen, die einem reduzierten osmotischen Druck ausgesetzt waren (vgl. Abb. 5C). Der geringe Anstieg des externen Glutamats war nicht auf den erhöhten osmotischen Druck zurückzuführen, sondern vermutlich kamen Verunreinigungen des Sorbitols durch Spuren von Glucose, Acetat und Mannitol für dieses Phänomen in Frage. Ansonsten zeigte *Corynebacterium glutamicum* die gleichen bioenergetischen Eigenschaften, wie unter Fermentationsbedingungen (Tab. 3). Neben einem hohen Membranpotential von 150 mV besaßen die Zellen einen hohen stabilen Glutamatgradienten von 650. Auch der Kaliumgradient (int/ext) stellte sich im Verlauf des Experiments bei 7 ein (Abb. 9). Im Falle einer Regulation durch den osmotischen Druck wäre

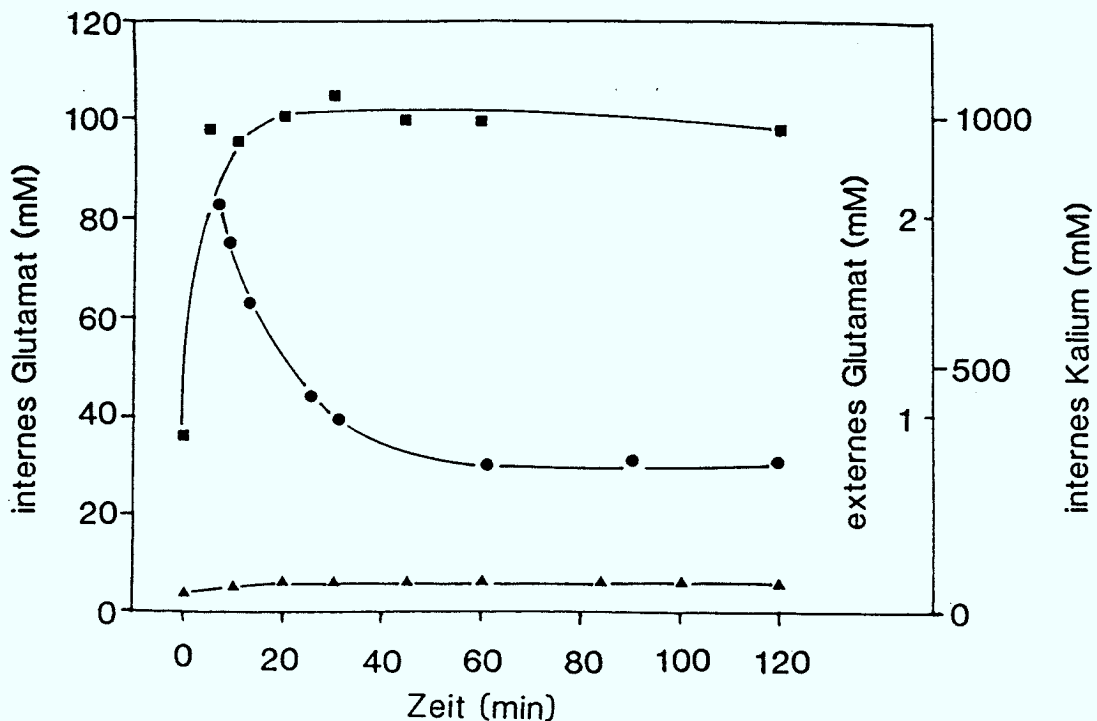


Abb. 9: Einfluß einer Erhöhung der Osmolarität durch Sorbitolgabe auf die Glutamatsekretion von biotinlimitierten Produzenten unter C-Quellmangel. Sorbitol befand sich von Anfang an im Reaktionsansatz. Neben der externen Glutamatkonzentration (geschlossene Dreiecke) ist der Effekt auf die interne Glutamatkonzentration (geschlossene Quadrate) und den internen Kaliumgehalt der Zellen (geschlossene Kreise) abgebildet

eine deutlich verringerte interne Glutamatkonzentration im Vergleich zum Medium mit 200 mOs zu erwarten gewesen. Auch der stabile chemische Gradient spricht gegen eine Osmoregulation, denn er hätte aufgrund der Glutamatsekretion schnell absinken müssen.

Weiterhin wurde der Effekt einer schnellen Absenkung des osmotischen Drucks auf die Sekretion untersucht. Dazu wurde die Kultur während der effizienten Produktionsphase im Verhältnis 1:3 mit aqua bidest. verdünnt und der osmotische Druck von 530 auf 175 mOs abgesenkt. Ein Kontrollansatz wurde mit Medium 1:3 verdünnt, so daß der osmotische Druck gleichblieb. Die auf die Zellkonzentration bezogene Effluxrate stieg in beiden Fällen von 15 auf 20 nmol/min x mgTg an (Abb. 10). Bei einer Regulation durch den osmotischen Druck wäre für die mit Aqua bidest. verdünnten Zellen

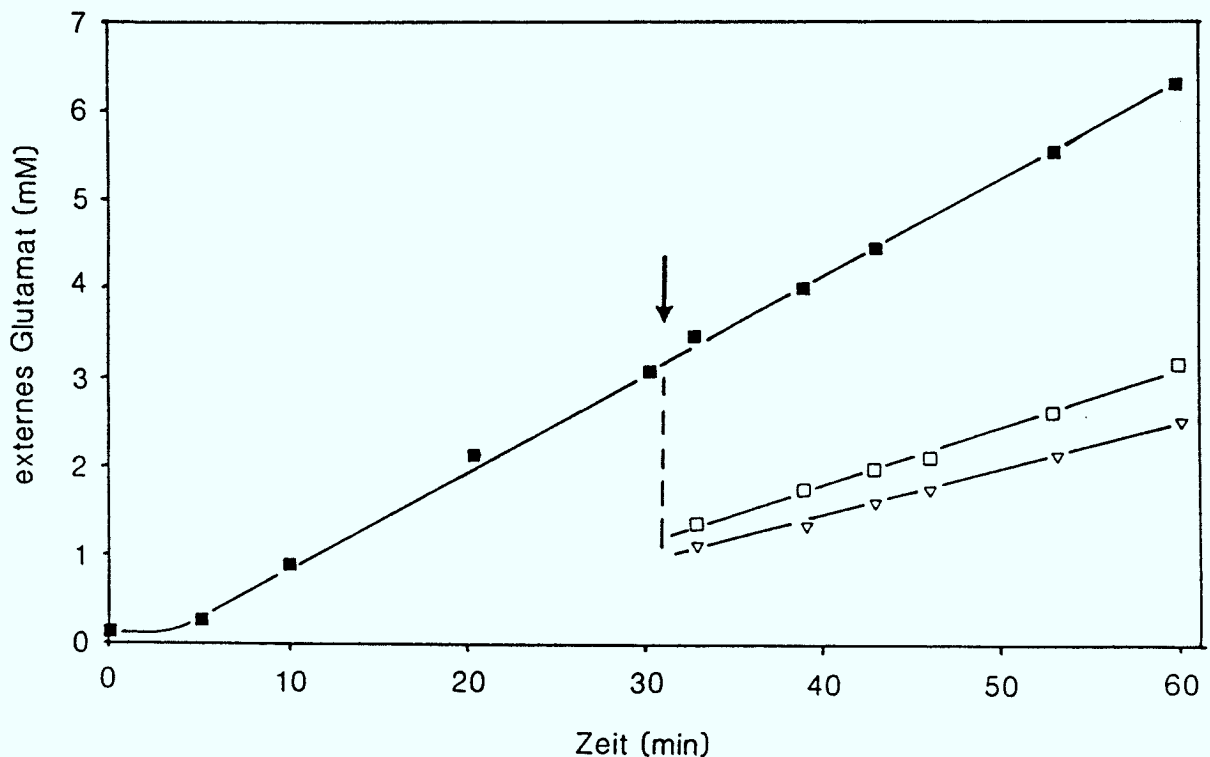


Abb. 10: Einfluß einer Absenkung der Osmolarität von 530 auf 175 mOs im Verlauf einer Kurzzeitfermentation auf die Glutamatsekretion von biotinlimitierten Produzenten. Die Zunahme der externen Glutamatkonzentration ist dargestellt für: unbehandelte Zellen (geschlossene Quadrate), für Zellen die mit Medium bei gleichbleibender Osmolarität (offene Dreiecke) und für Zellen die mit H₂O bei starker Reduktion der Osmolarität verdünnt worden sind (offene Quadrate). Obwohl der Anstieg der externen Glutamatkonzentration nach der Verdünnung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle langsamer ablief, war eine Erhöhung der Sekretionsrate zu verzeichnen, da die Sekretionsrate sich auf die 1/3 verdünnte Zellmenge bezog.

zumindest ein vorübergehender Rückgang der Sekretionsrate zu erwarten gewesen. Die interne Glutamatkonzentration veränderte sich nur geringfügig.

Letztendlich hatte auch ein schnelles Anheben des osmotischen Drucks von 530 auf 860 mOs durch Zugabe von Glucose (330 mM) keinen sichtbaren Einfluß auf die Sekretionsrate (nicht dargestellt).

Die aufgeführten Ergebnisse schließen insgesamt eine Regulation der Glutamatsekretion durch den osmotischen Druck des Mediums aus.

2. Der Einfluß von Biotinmangel und verändertem Lipidstatus auf die Glutamatsekretion bei *Corynebacterium glutamicum*

Für die weitere Charakterisierung der Glutamatsekretion mußte berücksichtigt werden, daß alle Verfahren, die zur Induktion der Glutamatsekretion führen, auch mit Veränderungen in der Cytoplasmamembran korreliert sind. Das Wesen dieser Korrelationen zwischen den beobachteten Lipidveränderungen und dem erhöhten Glutamatefflux ist in der Literatur bisher allerdings kontrovers erklärt worden (vgl. I.1.1.2.). Obwohl stets als selbstverständlich angenommen, ist bisher noch nicht eindeutig gezeigt worden, ob der effiziente Glutamatefflux und die Veränderungen im Lipidstatus der Zellen tatsächlich kausal miteinander verknüpft sind, oder ob beide Phänomene nur zeitlich zusammen auftreten. Ausgehend von der Annahme, daß die durch die Biotinlimitierung auftretenden Membranveränderungen für die effiziente Glutamatsekretion essentiell sind, war immer noch ungeklärt, ob dieses Phänomen als einzige Voraussetzung für den Glutamatefflux ausreichte. In Anbetracht der Tatsache, daß neben der Fettsäuresynthetase noch eine Reihe anderer biotinabhängiger cytosolischer Enzyme existieren (Knowles, 1989) und unlängst sogar biotinabhängige Transportsysteme entdeckt worden sind (Dimroth, 1987), stellte sich zudem die Frage, ob der Einfluß des Biotins auf die Glutamatsekretion überhaupt durch die Hemmung der Fettsäuresynthese ausreichend erklärt werden kann.

2.1. Vergleich der Lipidzusammensetzung von Produzentenzellen und Nichtproduzentenzellen

Als Ausgangsbasis für weitere Untersuchungen bezüglich der Korrelation zwischen Glutamatsekretion unter Biotinmangel und veränderter Cytoplasmamembran wurde zunächst die Gesamtmenge an Membranlipiden unter den definierten Bedingungen der Kurzzeitfermentation bestimmt, wobei biotinlimitierte Produzenten und biotinsupplementierte Nichtproduzenten miteinander in bezug auf ihren Phospholipid- und Fettsäuregehalt verglichen wurden. Weiterhin wurden die Zusammensetzung der einzelnen Fettsäuren gaschromatographisch analysiert und die verschiedenen Phospholipidklassen dünnschichtchromatographisch getrennt sowie chemisch bestimmt.

In Tabelle 5 sind die gemessenen Parameter vollständig aufgelistet. Wie aufgrund der vielfältigen Literaturdaten erwartet (vgl. I.1.1.2.), bestanden deutliche Unterschiede zwischen Produzenten und Nichtproduzenten. Die Gesamtmenge an Membranlipiden, die sowohl durch den Gehalt an Fettsäuren als auch durch den Phospholipidgehalt repräsentiert wird, war bei Produzenten um ungefähr 50% reduziert. Auch das Verhältnis gesättigter/ungesättigter Fettsäuren ist in biotinlimitierten Zellen von 0,7 auf 1,1 erhöht. Diese grundsätzlichen Beobachtungen stimmen mit bereits publizierten Ergebnissen überein (Hucheng et al., 1984; Shibukawa et al., 1966, 1970, Takinami et al., 1968). Die Analyse der Fettsäurezusammensetzung zeigte, daß die Veränderungen im Verhältnis gesättigter/ungesättigter Fettsäuren bei biotinlimitierten Zellen einerseits auf eine relative Zunahme von Palmitinsäure und andererseits auf eine relative Abnahme von Ölsäure zurückzuführen war. Neben den in Tabelle 5 aufgeführten Fettsäuren konnte keine weitere Substanz in wesentlichen Mengen bei der Fettsäureanalyse der Lipide detektiert werden.

Die Identifikation der einzelnen Phospholipide, die durch Phosphatanalyse quantifiziert wurden, erfolgte durch spezifische Färbereaktionen, nachdem das Gesamtlipid von *Corynebacterium glutamicum* für die Phospholipidanalyse extrahiert und die Extrakte durch 2D- Dünnschichtchromatographie aufgetrennt (Abb. 3) worden waren. Eine Phospholipidkomponente, die im folgenden Komponente X genannt wird, und über deren Herkunft in Kap. IV.2. ausführlich diskutiert wird, konnte nicht klar identifiziert werden. Die

Tabelle 5: Phospholipide und Fettsäuren von *Corynebacterium glutamicum*. Unter den Bedingungen einer Kurzzeitfermentation wurden Lipidgehalt und -Zusammensetzung abhängig vom Status der Glutamatsekretion verglichen. "Produzenten" sind unter Biotinlimitierung angezogen, während "Nichtproduzenten" Wachstum unter Biotinsupplementierung bedeutet. Alle Daten repräsentieren Mittelwerte von mindestens drei Bestimmungen.

Verbindung		Produzenten	Nichtproduzenten
Fettsäuren ($\mu\text{g}/\text{mgTg}$)		10.8 $\pm$ 0.5	20 $\pm$ 0.8
Fettsäuren gesätt./ungesätt.		1.1 $\pm$ 0.05	0.71 $\pm$ 0.05
Phospholipide (nmol/mgTg)		17 $\pm$ 1.1	32 $\pm$ 1.5
Verbindung		% - Anteil an gesamten Fettsäuren oder gesamten Phospholipid in	
		Produzenten	Nichtproduzenten
Myristinsäure	(14:0)	2.3 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.1
Palmitinsäure	(16:0)	47.8 $\pm$ 1.1	40.2 $\pm$ 1.2
Palmitoylsäure	(16:1)	1.8 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1
Stearinsäure	(18:0)	1.3 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.1
Ölsäure	(18:1)	46.5 $\pm$ 1.5	57.9 $\pm$ 1.5
Phosphatidylinositol	(PI)	6.6 $\pm$ 0.6	3.2 $\pm$ 0.4
PI-mannosid	(PIM)	7.7 $\pm$ 0.7	4.9 $\pm$ 0.5
Phosphatidylglycerol	(PG)	69.5 $\pm$ 3.1	87 $\pm$ 1.9
Di-PG	(DPG)	4.2 $\pm$ 0.5	1.0 $\pm$ 0.4
Phosphatidsäure	(PA)	5.4 $\pm$ 0.6	2.5 $\pm$ 0.4
Unbekanntes Pl.	(X)	6.5 $\pm$ 0.7	1.4 $\pm$ 0.3

durchgeführten Färbereaktionen wiesen auf ein saures, der Phosphatidsäure ähnliches Phospholipid hin. In Übereinstimmung zu den Daten von Hucheng et al. (1984) wurde kein stickstoffhaltiges Phospholipid detektiert. Obgleich die Gesamtmenge an Phospholipiden bei biotinlimitierten Zellen auf 50% reduziert war, zeigte die Zusammensetzung der individuellen Phospholipidspezies keine nennenswerte Veränderung. Lediglich der relative Anteil der Hauptkomponente, Phosphatidylglycerol, war in Produzentenzellen etwas reduziert. Dementsprechend war der relative Anteil aller übrigen, in kleineren Mengen vorkommenden Bestandteile geringfügig erhöht.

Somit traten für *Corynebacterium glutamicum* auch unter den Bedingungen der Kurzzeitfermentation deutliche Unterschiede in Lipidgehalt- und Zusammensetzung zwischen Produzenten und Nichtproduzenten auf.

2.2. Korrelation von Membranveränderungen und Glutamatefflux

In Tabelle 5 wurden, wie auch in allen bisher publizierten Arbeiten zu dieser Problematik, zwei völlig unterschiedliche Zelltypen, biotinlimitierte Produzenten und biotinsupplementierte Nichtproduzenten, miteinander verglichen. Jedoch führte der Vergleich zweier unterschiedlicher Populationen nicht zu eindeutigen Hinweisen für den Einfluß des Biotins auf die Regulation der Glutamatsekretion. Daher sollte versucht werden, innerhalb ein und derselben Population den Sekretionsstatus zu verändern, und anschließend die Veränderungen sowohl in Lipidgehalt- und Zusammensetzung, als auch in den kinetischen und energetischen Eigenschaften der Sekretion zeitlich aufzulösen und miteinander zu vergleichen.

In einem bisher neuartigen Versuchsansatz wurde ein direkter Vergleich einer Population von *Corynebacterium glutamicum* Zellen unter Produktions- und Nichtproduktionsbedingungen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen im Verlauf einer Kurzzeitfermentation unter biotinlimitierten Sekretionsbedingungen in zwei Anteile aufgeteilt. Zu einem der beiden Teile wurde anschließend Biotin (200 µg/l) hinzugefügt. Von beiden Hälften der geteilten Zellpopulation, den biotinlimitierten Zellen und den Zellen mit nachträglich zugegebenem Biotin, wurden sowohl kinetische und energetische Parameter

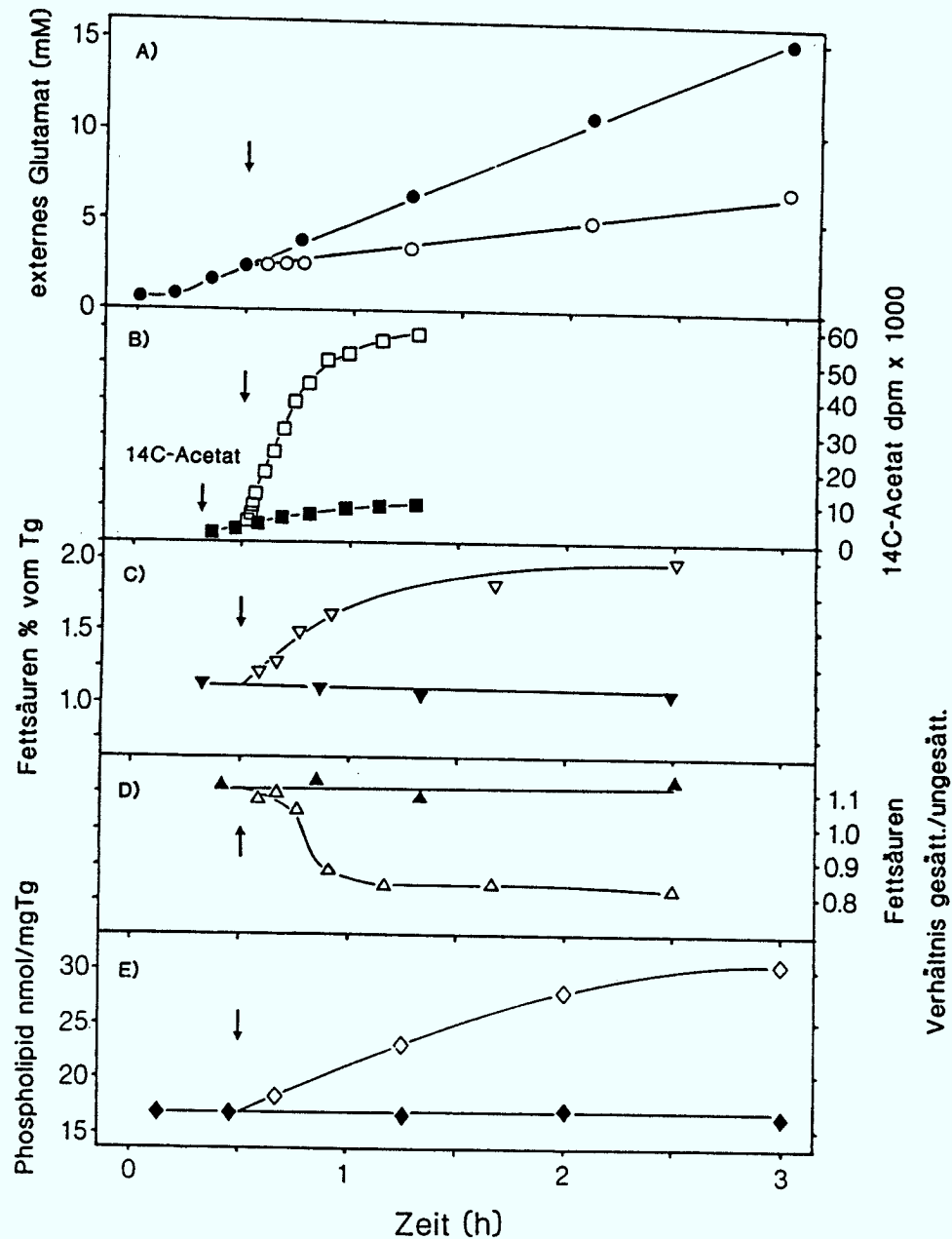


Abb. 11: Kurzzeitfermentation. Effekt der Biotinaddition auf biotinlimitierte Produzentenzellen. Unbehandelte (geschlossene Symbole) und biotinbehandelte (offene Symbole) wurden miteinander verglichen. Die Pfeile symbolisieren den Zeitpunkt der Biotinaddition. A Glutamatsekretion. B Aktivität der Fettsäuresynthese, angezeigt durch die Einbaurate von ^{14}C -Acetat in das Gesamtlipid. Der Zeitpunkt der ^{14}C -Acetat-Zugabe ist durch einen Pfeil angegeben. C Fettsäuregehalt. D Verhältnis gesättigter/ungesättigter Fettsäuren. E Phospholipidgehalt.

des Glutamatexports als auch die Veränderungen des Membranstatus in kurzen Zeitabständen nach der Biotinaddition bestimmt. Mit diesem experimentellen Ansatz sollte eine Voraussetzung für die funktionelle Korrelation zwischen Membranstatus und Sekretionszustand auf ihre Gültigkeit hin untersucht werden. Im Fall einer Korrelation müßten die erwarteten Veränderungen in der Aktivität der Glutamatsekretion und im Membranstatus der Zellen gleichzeitig auftreten.

Wie in Abb. 11A dargestellt, hemmte die nachträgliche Biotinaddition unmittelbar in einem Zeitraum von weniger als 1 min die Glutamatsekretion auf ungefähr 20% des Ausgangswertes der unbehandelten Produzenten. Nach der Biotingabe blieb das Membranpotential unverändert hoch bei 160 mV und auch die interne Glutamatkonzentration blieb stabil, so daß die schnelle Hemmwirkung nicht durch die Veränderung dieser beiden Energieparameter erklärt werden konnte. Die Zellen begannen, mit normalen Raten zu wachsen.

In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob die Hemmung der Glutamatsekretion zeitlich mit einer Aktivierung der Fettsäuresynthese korreliert ist. Um den Effekt der Biotinsupplementierung auf die Aktivität der Fettsäuresynthese darzustellen, wurde der Einbau von radioaktiv markiertem ^{14}C -Acetat ins Gesamtlipid gemessen. Aus Abb. 11B geht hervor, daß nur Spuren von radioaktiver Markierung in das Lipid unbehandelter, biotinlimitierter Produzenten eingebaut werden. Dadurch wird die Annahme bestätigt, daß die Fettsäuresynthese aufgrund des Biotinmangels weitgehend gehemmt ist. Bei dem biotinbehandelten Parallelansatz setzte unmittelbar nach der Biotinaddition die Inkorporation großer Mengen an radioaktiver Markierung aus dem ^{14}C -Acetat in das Gesamtlipid ein. Der Einbau von ^{14}C -Acetat in das Gesamtlipid konnte jedoch nicht direkt für die Quantifizierung des neusynthetisierten Lipids herangezogen werden, da der überwiegende Anteil des Acetyl-CoA, der Vorstufe für die Fettsäuresynthese, aus der unmarkierten Glucose stammte, die als Substrat für die Glutamatproduktion in hohen Konzentrationen eingesetzt wurde, und nicht aus dem markierten ^{14}C -Acetat.

Daher war es notwendig, den Effekt der Biotinaddition auf die Lipidsynthese der Zellen durch chemische Bestimmung der Zunahme des totalen Fettsäuregehalts der Zellen zu untersuchen. Aus Abb. 11C geht hervor, daß die Biotinzugabe tatsächlich binnen weniger Minuten zu einem Anstieg des Fettsäuregehalts führte. Das ur-

sprüngleiche Verhältnis Lipid/Trockengewicht von biotinsupplementierten Produzenten erreichten die Zellen hingegen erst nach ca. 2 Stunden. Zu dem Zeitpunkt allerdings, zu dem die Hemmung der Glutamatsekretion bereits vollständig eingetreten war (Abb. 11A), betrug die Menge an neusynthetisierten Fettsäuren auf jeden Fall weniger als 5% des Ausgangswertes (Abb. 11C). Ganz offensichtlich war die geringe Menge an Fettsäuren, die in den ersten Minuten nach Biotinzugabe neusynthetisiert worden war, für die Regulation der Sekretion nicht ausschlaggebend.

Der bei biotinlimitierten Zellen erhöhte Anteil gesättigter Fettsäuren ist ebenfalls als Grund für die Glutamatsekretion in Betracht gezogen worden. Daher ist der unmittelbare Einfluß des Biotins auch auf diesen Parameter hin untersucht worden. In Abb. 11D wird deutlich, daß die Zellen nach der Biotinzugabe den Anteil an ungesättigten Fettsäuren erhöhten. Jedoch war wie im Fall der Fettsäuresynthese der zeitliche Verlauf dieses Vorgangs nicht mit der unmittelbaren Hemmung der Glutamatsekretion in Einklang zu bringen. Eine deutliche Veränderung im Verhältnis gesättigter/ungesättigter Fettsäuren war erst nach 10-20 Minuten zu beobachten, so daß auch diese Möglichkeit als Grund für die Effluxhemmung ausfiel. In der frühen Phase der Fettsäuresynthese nach der Biotinzugabe konnte auch kein signifikanter Anstieg einer unerwarteten neuen oder einer spezifischen Fettsäure, die für die Hemmung verantwortlich sein könnte, detektiert werden.

Da auch der Phospholipidgehalt der Zellen als Regulator der Glutamatsekretion in Betracht gezogen worden ist, wurde weiterhin, wie in Abb. 11E dargestellt, der Einfluß der Biotinaddition auf den Phospholipidgehalt der Zellen untersucht. Vergleichbar dem Fettsäuregehalt stieg die Menge an Phospholipiden sofort nach Biotinsupplementierung an. Jedoch erreichten auch hier die Zellen erst nach ca. 2 Stunden die Werte von echten Nichtproduzenten. Während der ersten Minuten nach der Biotinzugabe - zu diesem Zeitpunkt war die Hemmung der Sekretion bereits eingetreten - war auch bei der Bestimmung dieses Parameters nur ein verhältnismäßig geringer Anstieg von weniger als 5% im Vergleich zu den Ausgangszellen detektierbar, der die Effekte auf die Sekretion nicht erklären kann.

Von den oben untersuchten Punkten, wie Phospholipid- und Fettsäuregehalt und Fettsäurezusammensetzung, konnte keiner mit der

schnellen 80%-igen Reduktion der Glutamatsekretion in Beziehung gebracht werden. Daher war es notwendig, eine andere Erklärung für diesen Effekt zu untersuchen. Es bestand die Möglichkeit, daß eine spezifische, vielleicht regulatorische Lipidkomponente für das schnelle Umschalten im Sekretionsverhalten der Zellen verantwortlich war. Dieses Lipid würde in diesem Fall nur in geringen Mengen synthetisiert und wäre somit in der Analyse der Gesamtlipide nicht detektierbar, da die anderen Lipide in der Menge weit überwiegen. Eine spezifische Fettsäure, für die diese Möglichkeit in Betracht käme, konnte nicht gefunden werden (s.o.).

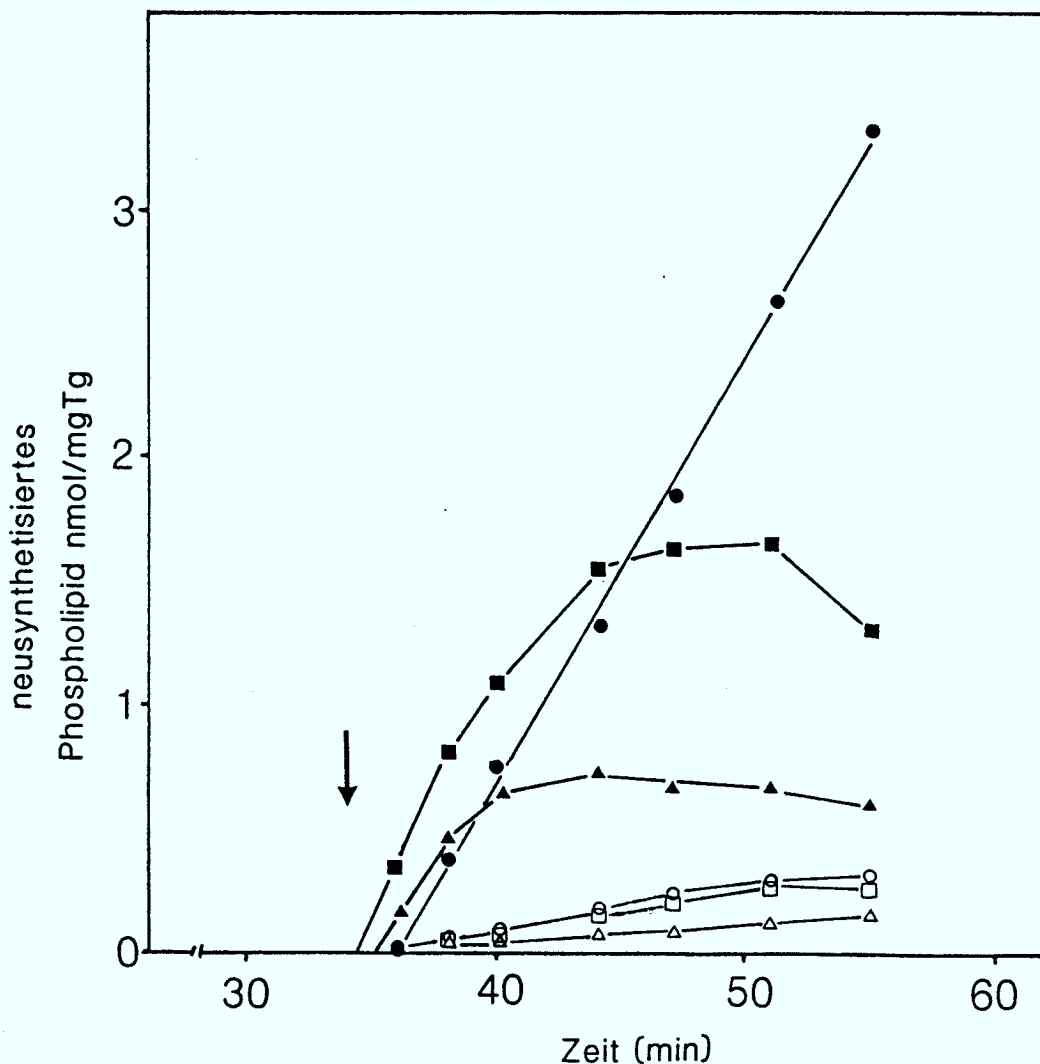


Abb. 12: Effekt der Biotinaddition auf die Synthese der einzelnen Phospholipide von biotinlimitierten Produzentenzellen während einer Kurzzeitfermentation. Die Mengen von neusynthetisiertem PG (geschlossene Kreise), PA (geschlossene Quadrate), X (geschlossene Dreiecke), PI (offene Quadrate), PIM (offene Dreiecke) und DPG (offene Kreise) wurde bestimmt. Der Pfeil zeigt den Zeitpunkt der Biotinaddition an.

Daher wurden alle Phospholipidspezies einzeln im zeitlichen Verlauf ihrer Neusynthese nach der Biotinaddition analysiert. Mit der Absicht, die vermutete regulatorische Komponente zu finden, wurden die Phospholipide, die nach Biotinzugabe neusynthetisiert worden waren, durch den Einbau von radioaktiv markiertem ^{14}C -Acetat markiert und mittels 2D-Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Zur quantitativen Bestimmung der neusynthetisierten Phospholipide wurde von jeder Phospholipidspezies zu repräsentativen Zeitpunkten, wie in Material und Methoden detaillierter beschrieben, Phosphatbestimmungen vorgenommen. Hierdurch konnte für jedes einzelne Phospholipid die spezifische Radioaktivität bestimmt werden. In Abb. 12 ist der hieraus errechnete zeitliche Verlauf für die Neusynthese aller Phospholipide dargestellt. Die ohne Biotinaddition neusynthetisierten Phospholipidmengen waren sehr gering, und sind daher in Abb. 12 nicht mit aufgeführt. Die Biotinzugabe bewirkte, daß sämtliche Phospholipide kurz nach der Biotingabe neusynthetisiert wurden, wobei PA etwas früher als die anderen Phospholipide erschien. Die Bedeutung der ebenfalls neusynthetisierten Komponente X wird an anderer Stelle diskutiert (vgl. IV.2.). Die Syntheseraten der einzelnen Phospholipide stimmten mehr oder weniger mit ihren relativen Mengenanteilen in der Cytoplasmamembran überein. Die Synthese einer neuen, bis dahin noch nicht erschienenen, eventuell regulierenden Verbindung, konnte nicht entdeckt werden.

Abschließend sollte der zeitliche Verlauf der Veränderungen in der Phospholipidzusammensetzung in Abhängigkeit von der Biotinzugabe ermittelt werden, denn es war notwendig zu überprüfen, ob der Hemmeffekt des Biotins auf schnelle Veränderungen in der Verteilung der Phospholipide zurückzuführen wäre. Hierzu wurden die Daten aus Tabelle 5, die die relative Phospholipidzusammensetzung von biotinlimitierten Produzenten repräsentieren, mit den Ergebnissen aus dem Markierungsexperiment (vgl. Abb. 12) kombiniert und daraus folgend der relative Gehalt von jedem einzelnen Phospholipid errechnet. Wie in Abb. 13 dargestellt, wurden für jede Phospholipidspezies Veränderungen des mengenmäßigen Anteils im zeitlichen Verlauf nach der Biotinaddition analysiert. Der relative Anteil von PG sank zunächst in der frühen Phase der aktiven Phospholipidsynthese leicht ab, obwohl es in dieser Phase im gleichen Maß wie alle anderen Phospholipide neusynthetisiert worden ist. Der Gehalt von PA und etwas später auch der des sauren Phospholi-

pids X stiegen hingegen vorübergehend an. Dieser Tatbestand wird in der Diskussion ausführlich erläutert. Neben diesen unspezifischen Effekten konnten keine signifikanten Änderungen in der Phospholipidzusammensetzung gefunden werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse konnte ausgeschlossen werden, daß die unmittelbare Hemmung der Sekretion aus schnellen Veränderungen in Lipidgehalt- und Zusammensetzung von *Corynebacterium glutamicum* resultierte.

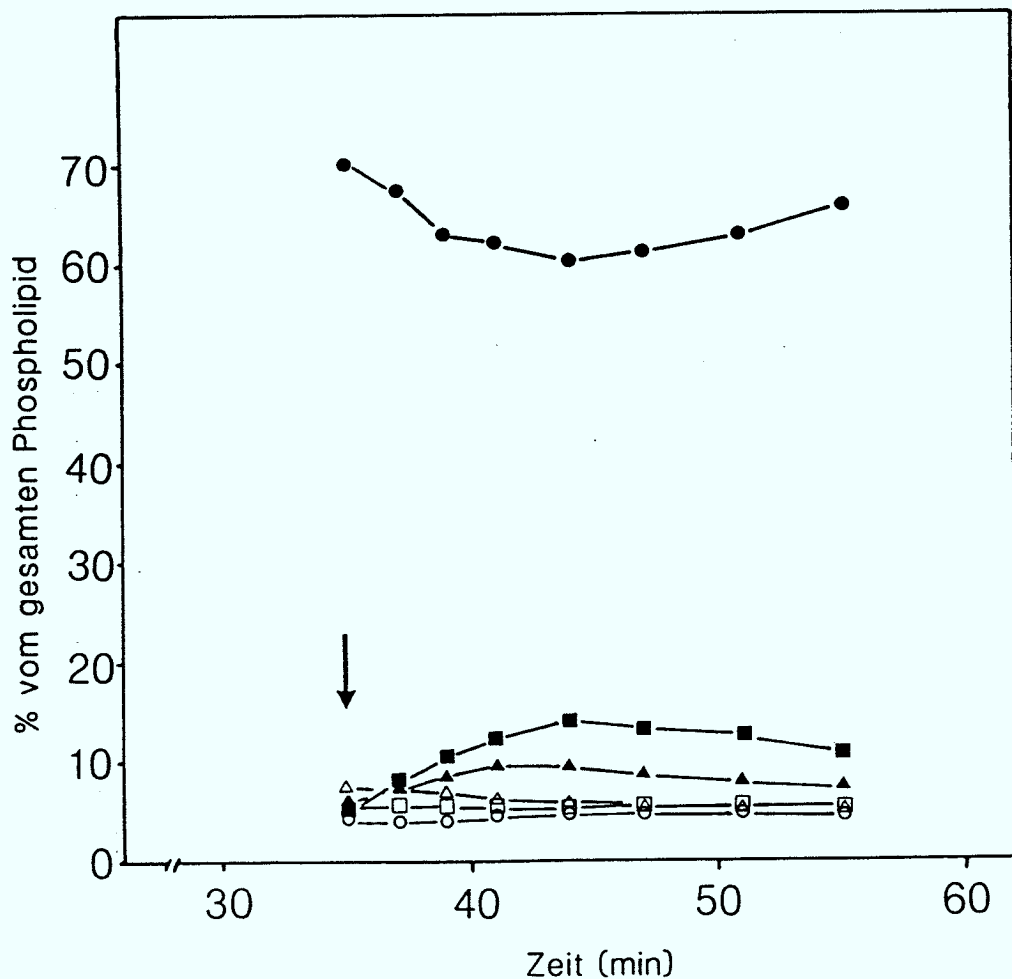


Abb. 13: Effekt der Biotinaddition auf die Phospholipidzusammensetzung von biotinlimitierten Produzentenzellen im Verlauf einer Kurzzeitfermentation. Die relativen Mengenanteile wurden für PG (geschlossene Kreise), PA (geschlossene Quadrate), X (geschlossene Dreiecke), PI (offene Quadrate), PIM (offene Dreiecke) und DPG (offene Kreise) bestimmt. Der Pfeil symbolisiert den Zeitpunkt der Biotinaddition. Die Phospholipidzusammensetzung von unbehandelten Zellen verblieb auf dem Level des Zeitpunkts vor der Biotinaddition (vgl. Tab. 5).

2.3. Der primäre Wirkort des Biotins bei nachträglicher Zugabe

Bereits in der Einleitung zu diesem Kapitel wurde erwähnt, daß die Frage zum Wirkort des Biotins noch nicht eindeutig geklärt war. Ein Einfluß des Biotins auf andere cytosolische Enzyme neben der Acetyl-CoA Carboxylase (Knowles, 1989) konnte ebensowenig als Erklärung für den Biotineffekt ausgeschlossen werden, wie eine mögliche direkte Beteiligung von biotinabhängigen, carriervermittelten Prozessen (Dimroth, 1987). Deshalb wurde der Effekt der Biotinaddition im Verlauf einer Kurzzeitfermentation (s. Abb. 11A) noch einmal besonders in Bezug auf den Wirkort des Biotins untersucht. Mit der Absicht, die Spezifität der Biotinwirkung auf die Fettsäuresynthese nachzuweisen, sollte Cerulenin eingesetzt werden. Cerulenin ist ein spezifischer Inhibitor des "condensing enzymes" (β -ketoacyl-ACP Synthase) des Fettsäuresynthasekomplexes (Funabashi et al., 1989; Omura, 1981).

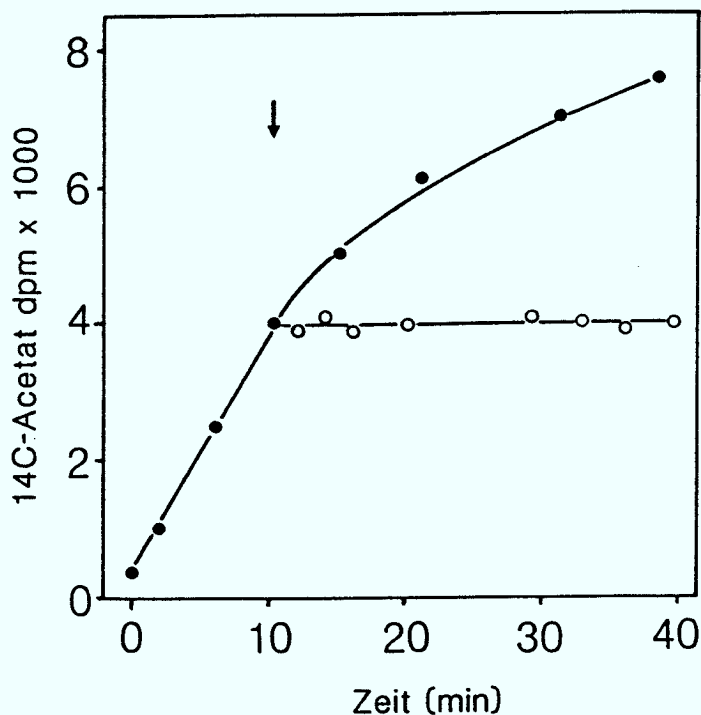


Abb. 14: Einfluß von Cerulenin auf die Fettsäuresynthese. Die Fettsäuresynthese wird durch den Einbau von $[U-^{14}C]$ -Acetat in das Gesamtlipid von biotinsupplementierten wachsenden Nichtproduzenten im Verlauf einer Kurzzeitfermentation angezeigt. Die geschlossenen Kreise symbolisieren die unbehandelten Zellen, während die offenen Kreise den Effekt nach der Ceruleninaddition (durch einen Pfeil (angezeigt) darstellen.

Der Hemmeffekt des Cerulenins hatte bereits für die isolierte Fettsäuresynthase von *Brevibacterium ammoniagenes*, das mit *Corynebacterium glutamicum* nah verwandt ist (Collins und Cummins, 1986; Suzuki et al., 1981), gezeigt werden können (Kawaguchi et al., 1979). Der Nachweis für die Wirkung auf ganze Zellen von *Corynebacterium glutamicum* stand aber noch aus, ebenso war die erforderliche Einwirkdauer des Cerulenins zur vollständigen Hemmung der Fettsäuresynthase noch nicht ermittelt. Durch Abb. 14 wird verdeutlicht, daß die Gabe von 200 µg Cerulenin/ml zu biotinsupplementierten wachsenden Zellen den Einbau von ^{14}C -Acetat in das neu-synthetisierte Lipid unmittelbar und vollständig hemmte. Somit eignete sich Cerulenin sehr gut dafür, die Bedeutung der Fettsäuresynthaseaktivität in Abhängigkeit von der Biotinaddition für die Glutamatsekretion zu untersuchen.

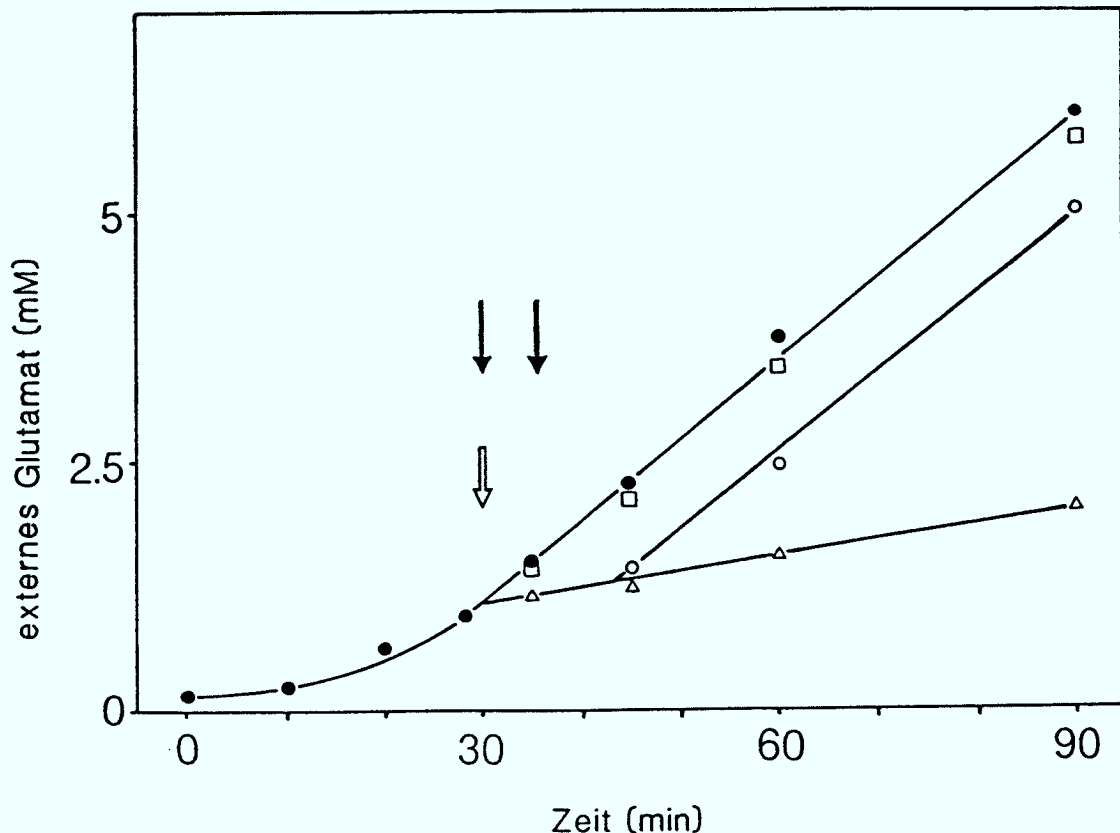


Abb. 15: Kurzzeitfermentation von *Corynebacterium glutamicum*: der Effekt von Cerulenin auf die Hemmung der Glutamatsekretion durch Biotinaddition. Die Glutamatsekretion von unbehandelten Zellen wird durch geschlossene Symbole dargestellt, während offene Symbole biotinbehandelte Zellen repräsentieren. Der offene Pfeil symbolisiert den Zeitpunkt der Biotinaddition. Die offenen Dreiecke repräsentieren die externe Glutamatkonzentration von Zellen, die allein mit Biotin behandelt wurden. Die ausgefüllten Pfeile stellen die Zeitpunkte der Ceruleninaddition dar, entweder zusammen mit dem Biotin (offene Quadrate) oder 6 Minuten nach der Biotinzugabe (offene Kreise).

Durch Cerulenin (200 µg/ml) konnte die Hemmwirkung des Biotins auf die Glutamatsekretion von Produzentenzellen aufgehoben werden (Abb. 15). Die Addition von Biotin allein hemmte, wie bereits oben beschrieben (Abb. 11A), die Glutamatsekretion sofort. Wenn jedoch gleichzeitig mit der Biotinaddition die Fettsäuresynthese durch Cerulenin gehemmt wurde, ließ sich die Hemmwirkung des Biotins auf die Glutamatsekretion vollständig aufheben. Sogar wenn Cerulenin 6 Minuten nach dem Biotin zugegeben wurde, begannen die Zellen um wenige Minuten verzögert, wieder mit hoher Rate - vergleichbar denen von unbehandelten Zellen - Glutamat zu sezernieren. Hierdurch wurde offensichtlich, daß Cerulenin in den vorgestellten Experimenten der Biotinwirkung auf der Ebene der Fettsäuresynthese entgegenwirkte. Diese Gegenwirkung war allerdings nicht funktionell, sondern phänomenologisch. Somit beruhte die schnelle Hemmwirkung des Biotins auf metabolischen Veränderungen, hervorgerufen durch die einsetzende Aktivität der Fettsäuresynthese.

Aufgrund dieser Erkenntnisse war der Gedanke naheliegend, daß die alleinige Gabe von Cerulenin für biotinsupplementierte Nichtproduzenten von *Corynebacterium glutamicum* die Abnahme von Biotin simulieren und somit als Schalter für die Glutamatsekretion dienen könnte. Daher wurde, wie in Abb. 16A dargestellt, der Einfluß von Cerulenin (200 µg/ml) auf biotinsupplementierte Nichtproduzenten untersucht. Nachdem Cerulenin zugegeben worden war, begannen die Zellen trotz Biotinsupplementierung Glutamat zu sezernieren. Innerhalb von 2 Stunden erreichten die Zellen mit 12 nmol/min x mgTg eine hohe Produktionsrate, die mit denen von normalen Kurzzeitfermentationen vergleichbar ist (vgl. Abb. 5A). Wichtige bioenergetische Parameter, wie das Membranpotential und die interne Glutamatkonzentration, blieben unverändert hoch. Somit können die Zellen durch spezifische Inhibierung der Fettsäuresynthese zur effizienten Glutamatsekretion induziert werden.

Um die Vergleichbarkeit des cerulenininduzierten Glutamatefflux mit den oben beschriebenen Produzenten und Nichtproduzenten sicherzustellen, die in Lipidgehalt- und Zusammensetzung detailliert analysiert waren, wurde ferner der Phospholipidgehalt dieser Zellen im Verlauf eines Induktionsxperiments gemessen (Abb. 16B). Da die Zellen trotz Ceruleninbehandlung und Hemmung der Fettsäuresynthese zunächst weiterwuchsen, sank der Phospholipidgehalt innerhalb von 2-3 Stunden nach Ceruleninaddition auf ungefähr 50% des

Ausgangswertes von biotinsupplementierten Zellen ab. Dieser Wert ist mit dem Lipidgehalt von biotinlimitierten Produzenten identisch. Eine effiziente Glutamatsekretion konnte erst dann beobachtet werden, wenn der Phospholipidgehalt der Zellen auf Werte sank, die weniger als 70% von unbehandelten Zellen betrug. Die Ergebnisse verdeutlichen, daß durch alleinige Hemmung der Fettsäuresynthese und die damit verbundenen metabolischen Veränderungen die Zellen zur Glutamatsekretion induziert werden können, dabei aber Veränderungen in der Cytoplasmamembran notwendige Voraussetzungen für eine effiziente Glutamatsekretion sind.

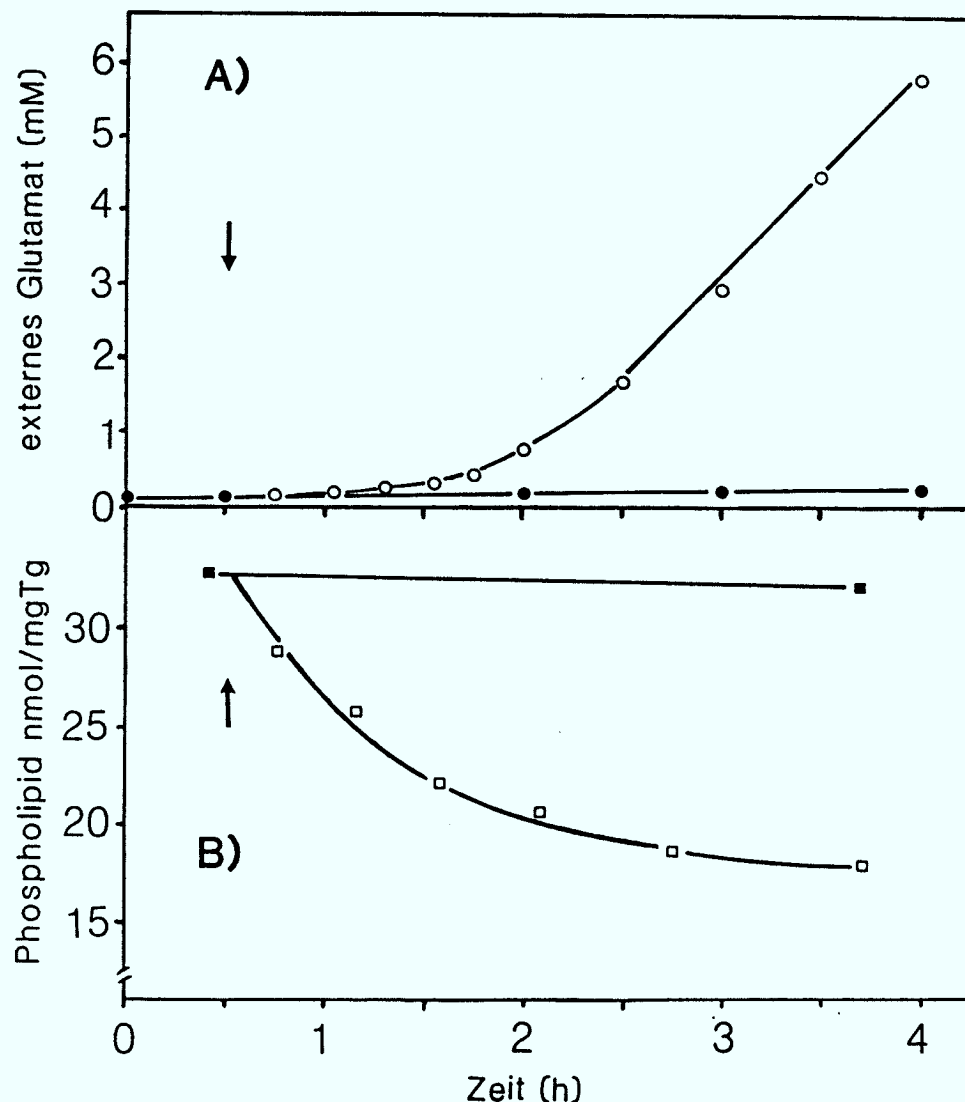


Abb. 16A,B: Kurzzeitfermentation mit biotinsupplementierten Nichtproduzenten von *Corynebacterium glutamicum*: Der Effekt von Cerulenin auf die Glutamatsekretion. Unbehandelte (geschlossene Symbole) und ceruleninbehandelte Zellen wurden miteinander verglichen. Der Pfeil zeigt den Zeitpunkt der Ceruleninaddition an. A Glutamatsekretion. B Phospholipidgehalt,

3. Energetik und Regulation der Glutamatsekretion

Der Mechanismus der Glutamatsekretion ist in der Literatur bisher kontrovers mit unterschiedlichen Vorstellungen zur Triebkraft der Sekretion erklärt worden (vgl. I.1.). Über die Energetik und die Regulation der Glutamatsekretion war zu Beginn der vorliegenden Arbeit nichts bekannt. Durch eine Reihe von Experimenten, die allerdings noch keine kausalen Zusammenhänge erkennen lassen, konnte hier gezeigt werden, daß die Glutamatsekretion vom energetischen bzw. metabolischen Zustand der Zellen reguliert wird: Die Glutamatsekretion wurde durch die folgenden Behandlungen gehemmt, I) O₂-Limitierung (vgl. III.1.6.), II) Hemmung der respiratorischen Kette durch Cyanid (vgl. III.1.6.), III) C-Quell-Limitierung (vgl. III.1.3.) und IV) Biotinaddition (vgl. III.2.2.). Die eigentliche Triebkraft für die Sekretion blieb hingegen noch ungeklärt.

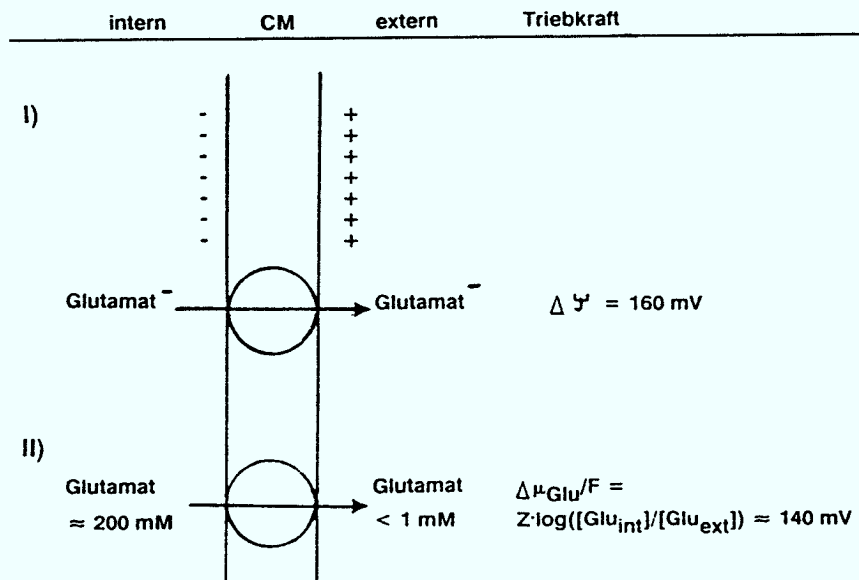


Abb. 17: Wichtige bioenergetische Parameter, die als Triebkräfte für die Glutamatsekretion in Frage kommen: I) Membranpotential; II) chemischer Gradient des Glutamat. $Z = 2,3 \cdot R \cdot T / F \approx 59 \text{ mV}$. R = Gaskonstante, T = absolute Temperatur, F = Faraday'sche Konstante.

3.1. Einfluß der Komponenten der proton motive force und des Glutamatkonzentrationsgradienten auf die Sekretion

In Abb. 17 sind die wichtigsten bioenergetischen Parameter von *Corynebacterium glutamicum* zusammengestellt, wonach das mit 160 mV hohe Membranpotential (extern positiv) mit der größten Wahrscheinlichkeit als Triebkraft für die Sekretion der anionische Aminosäure Glutamat in Frage kam. Demnach würde das Glutamat elektrophoretisch entsprechend seiner negativen Ladung sezerniert. Zumindest für die Kurzzeitfermentationen, in deren Verlauf die externe Glutamatkonzentration niemals die interne überstieg, stellte aber der Glutamatkonzentrationsgradient ebenfalls eine starke Triebkraft dar. Die zu Beginn der Experimente vorliegenden Gradienten entsprachen einem Membranpotential von 140 mV. Es war naheliegend, zunächst auch für den Glutamatexport ein sekundär aktives Transportsystem in Betracht zu ziehen.

Mit dem folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob das hohe Membranpotential und/oder der zumindest anfangs hohe Konzentrationsgradient entscheidende Energiequellen für die Sekretion darstellen. Die Bestimmung der Glutamatsekretionsrate erwies sich nach vollständigem Abbau des Membranpotentials - durch den Einsatz des elektrogenen Kaliumionophors Valinomycin (Reed, 1979) und Variation der externen Kaliumkonzentration - als meßtechnisch einfach. Die Analyse der Exportrate bei umgekehrtem Glutamatkonzentrationsgradienten stellte sich jedoch als meßtechnisch viel komplizierter heraus, da es hierfür - bei einer intrazellulären Glutamatkonzentration zwischen 150 und 200 mM - notwendig war, die externe Konzentration auf 300 mM anzuheben. Bei einer derart hohen vorgelegten Außenkonzentration konnte die relativ geringfügige Zunahme des externen Glutamats, die bei einer Kurzzeitfermentation in dem zu beobachtenden Zeitraum von 30 min zu erwarten war (max. 2-4 mM), durch chemische Analyse nicht mehr exakt erfaßt werden. Deshalb wurde der Einbau von radioaktiver Markierung aus zugeführter ^{14}C -Glucose in sezerniertes Glutamat als Maß für die Glutamatsekretion genommen. Um eine möglichst hohe spezifische Radioaktivität der Glucose zu erreichen, wurde sie den Zellen erst im

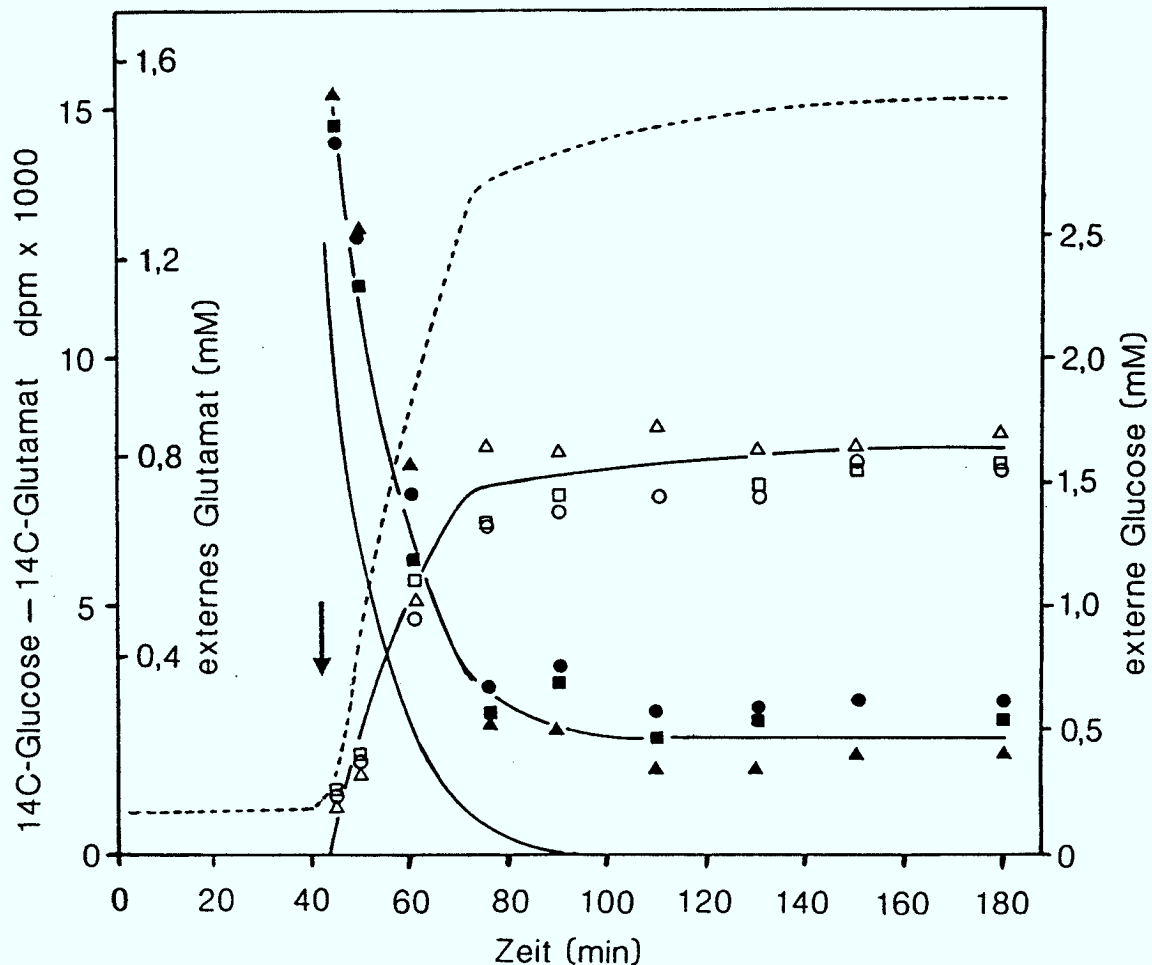


Abb. 18: Glutamatsekretion unter Aufhebung des Membranpotentials und Umkehrung des Konzentrationsgradienten während einer Kurzzeitfermentation. Die Zellen wurden unter C-Quellmangel fermentiert und nach 40 min Fermentationszeit in drei Teile aufgeteilt. Der Pfeil symbolisiert den Zeitpunkt zu dem $[U-^{14}C]$ -Glucose (2,5 mM) in alle drei Ansätze gegeben wurde. Gleichzeitig mit der Glucose wurde Ansatz 1 (Dreiecke) mit 300 mM KCl, Ansatz 2 (Kreise) mit 300 mM KCl und 50 μ M Valinomycin und Ansatz 3 (Quadrate) mit 300 mM K-Glutamat und 50 μ M Valinomycin bestückt. Die radioaktiv gemessene Zunahme des externen Glutamats wird durch offene Symbole angezeigt; wegen der identischen Verläufe wird die Glutamatsekretion für alle drei Ansätze durch eine einzige Kurve dargestellt. Die radioaktiv gemessene Abnahme der Glucose aus dem Medium wird durch geschlossene Symbole angezeigt; auch hier lag zwischen allen drei Ansätzen eine Übereinstimmung vor, so daß nur eine einzige Kurve dargestellt ist. Der chemisch gemessene Verlauf der Glucoseabnahme wird für alle drei völlig übereinstimmenden Ansätze gemeinsam durch die durchgezogene Linie symbolisiert. Die gebrochene Linie stellt die chemisch gemessenen identischen Verläufe der Glutamatsekretion für die Ansätze 1 und 2 dar.

Verlauf der Kurzzeitfermentation, die zunächst ohne C-Quelle durchgeführt worden war, in der relativ niedrigen Konzentration von 2,5 mM zugesetzt. Zum selben Zeitpunkt erfolgte der Einsatz der Effektoren.

Die Kontrollzellen ohne Valinomycin, denen im Unterschied zu normalen Kurzzeitfermentationen (vgl. III.1.3.) 300 mM KCl zugegeben wurde, begannen unmittelbar nach Glucosegabe mit hoher Rate Glutamat zu sezernieren (Abb. 18); in dem Maße wie Glutamat extern erschien, wurde die Glucose abgebaut (beides chemisch gemessen). Nachdem die Glucose vollständig verbraucht war, stoppte die Produktion. Um den Efflux auch durch den Einbau von radioaktiver Markierung ins Glutamat beschreiben zu können, wurden die Überstände der entnommenen Proben dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt, die dem Glutamat und der Glucose entsprechenden Flecken ausgekratzt und im Scintillationszähler gemessen. Die Verläufe der resultierenden Kurven für den Glutamatefflux und den Glucoseabbau waren mit den chemisch gemessenen Kontrollen, die in einem anderen Maßstab abgebildet sind, identisch. Vermutlich aufgrund der starken Chemolumineszenz der Glucoseproben lag der Endwert bei der radioaktiven Bestimmung nicht bei Null.

In einem Parallelansatz (Abb. 18) wurde eine der beiden erwarteten Triebkräfte der Sekretion, das Membranpotential, durch Zugabe von Valinomycin (50 μ M) in Kombination mit 300 mM KCl eliminiert. Unmittelbar nach Valinomycingabe sank das Membranpotential der Zellen auf Werte um 0 mV ab. Entgegen den Erwartungen blieb die Glutamatsekretion jedoch in dem untersuchten Zeitraum unbeeinflusst und lief mit unverändert hoher Rate ab. Auch die Glucose wurde mit gleicher Rate wie im unbehandelten Ansatz abgebaut. Die durch Messung der Radioaktivität ermittelten Verläufe für Glutamatefflux und Glucoseabbau waren ebenfalls mit der Kontrolle identisch. Es konnte so die Schlußfolgerung gezogen werden, daß die Glutamatsekretion unabhängig vom Membranpotential abläuft.

In einem zusätzlichen Parallelansatz wurde neben dem Membranpotential die zweite wahrscheinliche Triebkraft des Efflux, der Konzentrationsgradient des Glutamats, abgebaut. In diesem Fall wurde ebenfalls Valinomycin (50 μ M) eingesetzt, jedoch in Kombination mit 300 mM K-Glutamat anstelle von 300 mM KCl. Das Membranpotential sank sofort vollständig ab. Obwohl das externe Glutamat von 50 μ M auf 300 mM erhöht wurde, stieg die interne Glutamatkonzentration nicht wesentlich über 200 mM an. Demzufolge lag nach

der Glutamatzugabe ein umgekehrter Konzentrationsgradient vor. Da sich der Glutamatefflux aus den oben erwähnten Gründen chemisch nicht bestimmen ließ, mußte das Erscheinen von ^{14}C -Markierung im externen Glutamat als Maß für den Glutamatefflux herangezogen werden. Die Einbaurrate von radioaktiver Markierung aus der zugeführten Glucose ins externe Glutamat und somit auch die ausgeschiedene Menge Glutamat stimmte mit den beiden vorangegangenen Kontrollen vollständig überein (Abb. 18). Da auch die chemisch gemessene Glucoseabnahmerate bei allen Ansätzen ebenso wie der radioaktiv gemessene Abbau identisch waren, ergab sich ein weiteres Argument für die Übereinstimmung des radioaktiv gemessenen Efflux mit dem tatsächlichen Efflux. Zusätzlich zur Eliminierung des Membranpotentials beeinflusste auch die gleichzeitige Umkehrung des Glutamatkonzentrationsgradienten die Sekretionsrate nicht meßbar. Die Glutamatsekretion stellt demnach keinen vom Konzentrationsgradienten getriebenen Efflux des Glutamats dar, sondern sie findet im Gegenteil sogar in einem aktiven Prozeß gegen einen Konzentrationsgradienten statt.

Der pH Gradient war als Triebkraft nur wenig wahrscheinlich, da er im Verlauf der Experimente bei konstanter Effluxrate variierte und zudem nie sehr hoch ausgeprägt war (vgl. Tab.3); auch schnelle Veränderungen des pH-Gradienten um 0,5 Einheiten durch Einsatz des elektroneutralen K^+/H^+ -Antiporters (Ahmed und Booth, 1983) Nigericin ($10\text{ }\mu\text{M}$) zeigten keinen sichtbaren Effekt auf die Sekretionsrate.

Die Glutamatsekretion ist nach den oben beschriebenen Experimenten ein aktiver energieabhängiger Prozeß, der entgegen den bisherigen Erwartungen nicht vom Membranpotential oder dem Konzentrationsgradienten getrieben wird. Die Effekte auf den Efflux waren im Vergleich zu den drastischen Änderungen dieser beiden Energieparameter vernachlässigbar.

3.2. Einfluß der Adeninnukleotide auf die Glutamatsekretion

Da die naheliegenden Möglichkeiten für den Antrieb der Sekretion, das Membranpotential und der Konzentrationsgradient des Glutamats, ausgeschlossen werden konnten, mußten andere zelluläre Energieträger auf ihre eventuelle Funktion als Regulatoren der Glutamatsekretion hin untersucht werden.

In Vorexperimenten zeigte sich, daß Produzenten einen internen ATP-Pool von 8 - 11 mM aufwiesen, während biotinsupplementierte Nichtproduzenten 5-7 mM nicht überstiegen. Im folgenden sollen eine Reihe von Experimenten vorgestellt werden, die zumindest eine klare Korrelation zwischen der Aktivität der Glutamatsekretion und dem ATP-Pool der Zellen, bzw. dem Verhältnis ATP/ADP und der energy charge zeigen.

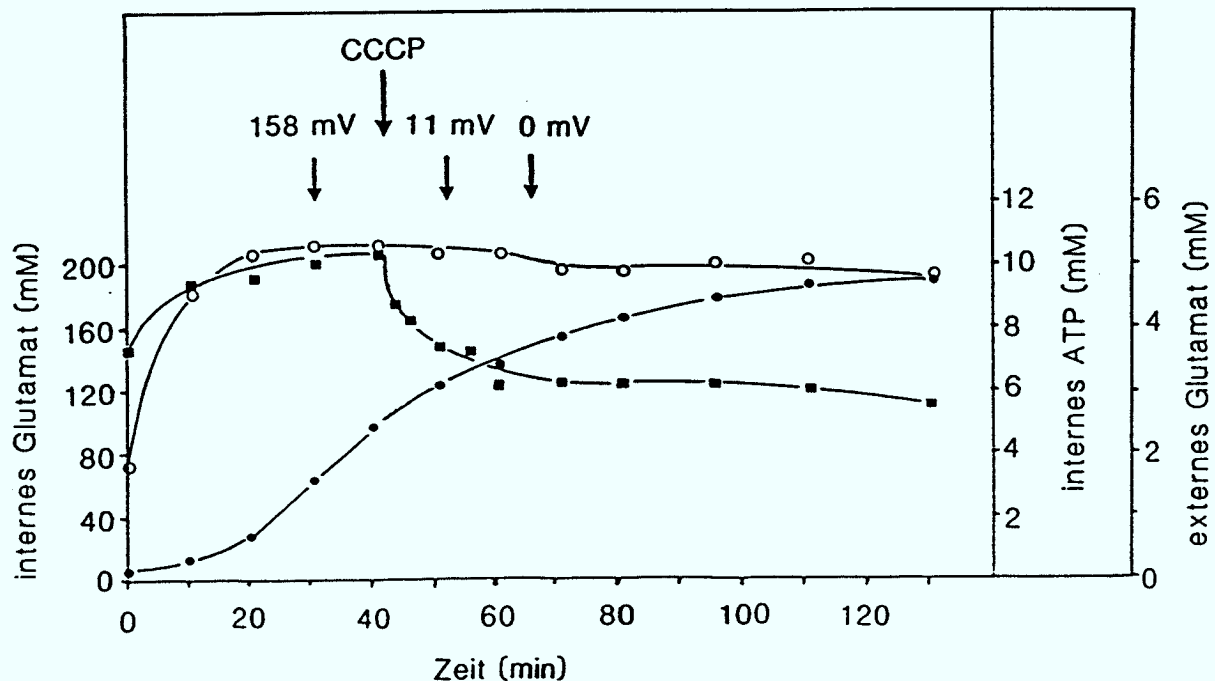


Abb. 19: Kurzzeitfermentation mit biotinlimitierten Zellen: Effekt von CCCP (50 μ M). Der Zeitpunkt der CCCP-Addition ist durch den großen Pfeil dargestellt. Der Einfluß von CCCP auf die Glutamatsekretion (geschlossene Kreise), die interne ATP-Konzentration (geschlossene Quadrate), das interne Glutamat (offene Kreise) und das Membranpotential (kleine Pfeile) wurden bestimmt.

3.2.1. Der Entkoppler CCCP

Durch Einsatz von CCCP (50 μ M), ein Entkoppler der Elektronentransportkette (Heytler, 1979), konnte ebenfalls die Energieabhängigkeit der Sekretion demonstriert werden. Im Verlauf einer Kurzzeitfermentation unter Biotinlimitierung sank die Sekretionsrate nach Zugabe von CCCP (Abb. 19) langsam bis auf ca. 20% der Rate von unbehandelten Zellen ab. Das Membranpotential wurde sofort vollständig abgebaut. Da es jedoch schon vorher als Triebkraft ausgeschlossen werden konnte (vgl. III.3.1.), kam dieser Befund nicht als Begründung für die Effluxhemmung in Frage. Die interne Glutamatkonzentration und der Gradient blieben hingegen unverändert hoch.

Nur der Verlauf der internen ATP-Konzentration korrelierte gut mit der Sekretionsrate. Nach der CCCP-Addition sank der interne ATP-Pool schnell von 10 auf 6 mM ab, und die Sekretionsrate verkleinerte sich deutlich. Auch in der Anfangsphase der Kurzfermentation war der Efflux mit der ATP-Konzentration korreliert. Zu Beginn, der lag-Phase der Sekretion, lag die interne ATP-Konzentration aufgrund der Konditionierungsprozedur niedrig im Vergleich zu Zellen während der effizienten Sekretion und stieg schnell an. Erst nach Überschreiten einer Konzentration von ca. 8 mM begannen die Zellen Glutamat mit hohen Raten zu sezernieren. Mit diesem Experiment ist eine Korrelation zwischen der bei Produzenten erhöhten ATP-konzentration und der hohen Sekretionsrate deutlich geworden.

3.2.2. Einfluß von Valinomycin auf den ATP-Pool

Da das elektrogene Kaliumionophor Valinomycin trotz Eliminierung des Membranpotentials die aktive Sekretion nicht hemmte (Abb. 18), stellte sich die Frage, inwieweit unter diesen Umständen der ATP-Pool der Zellen beeinflusst würde. Wie in Abb. 20 dargestellt, sank das Membranpotential sofort nach Gabe von Valinomycin (50 μ M) in Kombination mit KCl (300 mM) auf Null ab, während die Sekretion auch nach Abbau des Membranpotentials noch über einen Zeitraum von 35 Minuten ungehemmt mit hoher Rate verlief, um anschließend zu sinken. In diesem Experiment und auch in Kontrollexperimenten fiel

die interne Glutamatkonzentration von 240 mM auf ca 100 mM ab, ohne daß dadurch die Sekretion beeinflußt wurde. Demnach können die Zellen auch bei relativ geringen internem Glutamat mit hohen Raten sezernieren.

Für das ATP war nach der Valinomycingabe ein kurzes, vorübergehendes Absinken zu beobachten. Innerhalb von 5 Minuten hatten sich die Zellen jedoch erholt und eine hohe Konzentration von 9 mM erreicht. Das kurzzeitige Absinken des ATP-Spiegels wirkte sich nicht signifikant auf die Glutamatsekretion aus, da zum Zeitpunkt der Valinomycingabe die für die effiziente Sekretion häufig beobachtete Schwelle von 8 mM noch nicht erreicht war, und die Zellen somit auch noch nicht mit hoher Rate sezernierten. Erst nach der Valinomycinaddition wurde die Konzentration von 8 mM überschritten und die Zellen begannen mit der effizienten Sekretion (28 mmol/min x mgTg). Der ATP-Pool blieb daraufhin über 35 Minuten konstant und

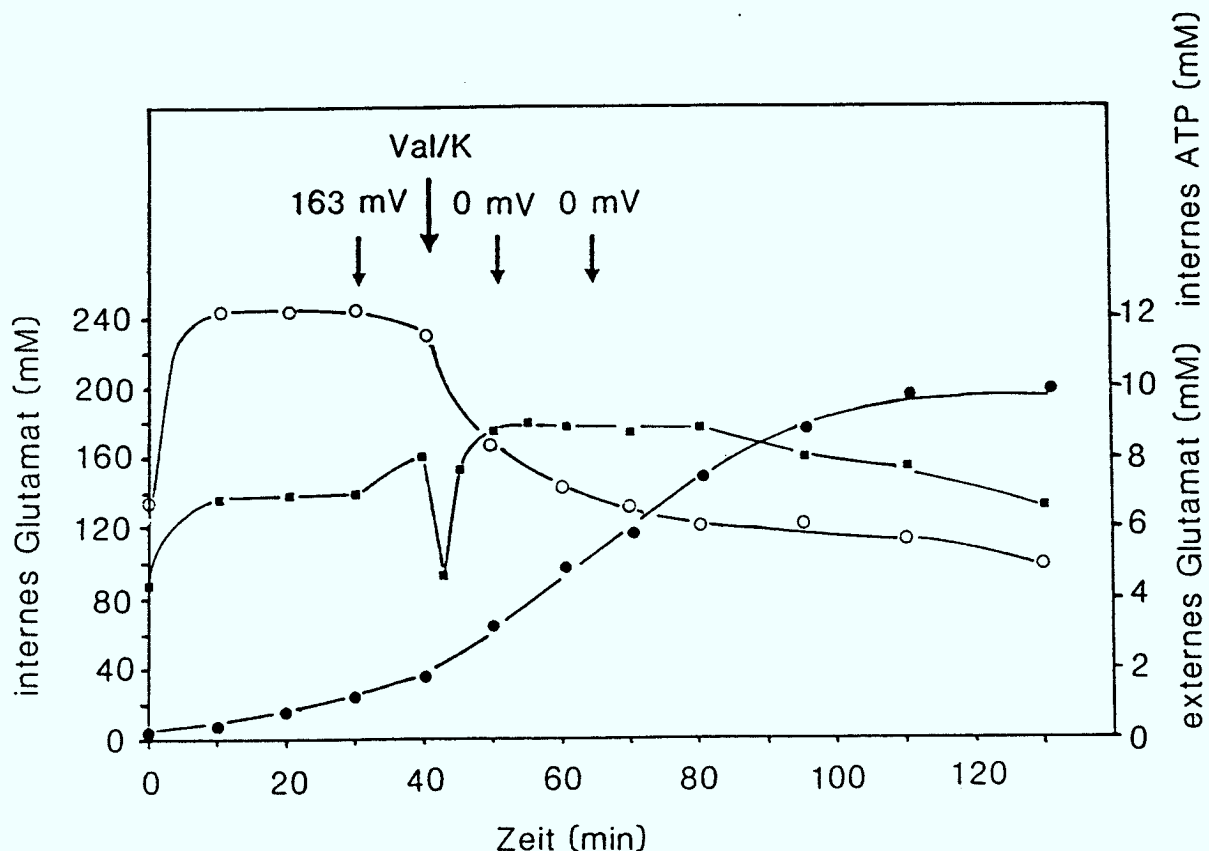


Abb. 20: Kurzzeitfermentation mit biotinlimitierten Zellen: Effekt von Valinomycin (50 μ M) bei einer vorgelegten externen Kaliumkonzentration von 300 mM auf die externe Glutamatkonzentration (geschlossene Kreise), die interne Glutamatkonzentration (offene Kreise) und den internen ATP-Pool (geschlossene Quadrate) und das Membranpotential (kleine Pfeile). Der große Pfeil symbolisiert den Zeitpunkt der Valinomycingabe.

sank dann langsam unter 8 mM ab. Mit dieser ATP-Abnahme war eine Hemmung der Sekretion korreliert. Auch dieses Ergebnis schließt eine Regulation der Sekretion durch das Membranpotential, den chemischen Gradienten oder eine hohe interne Glutamatkonzentration aus. Allein zwischen dem intrazellulären ATP und der Sekretion wird ein enger Zusammenhang sichtbar.

3.2.3. Korrelation zwischen Adeninnukleotidpool und Hemmung der Glutamatsekretion durch O₂-Limitierung und Cyanid

Die Hemmung der Sekretion durch O₂-Limitierung und Cyanid-Behandlung (vgl. III.1.6.) ließ auf eine Regulation durch Veränderungen des metabolischen und/oder energetischen Zustandes der Zellen schließen. Aus naheliegenden Gründen war es von Interesse zu untersuchen, ob auch hier Korrelationen mit dem ATP-Pool der Zellen bestünden.

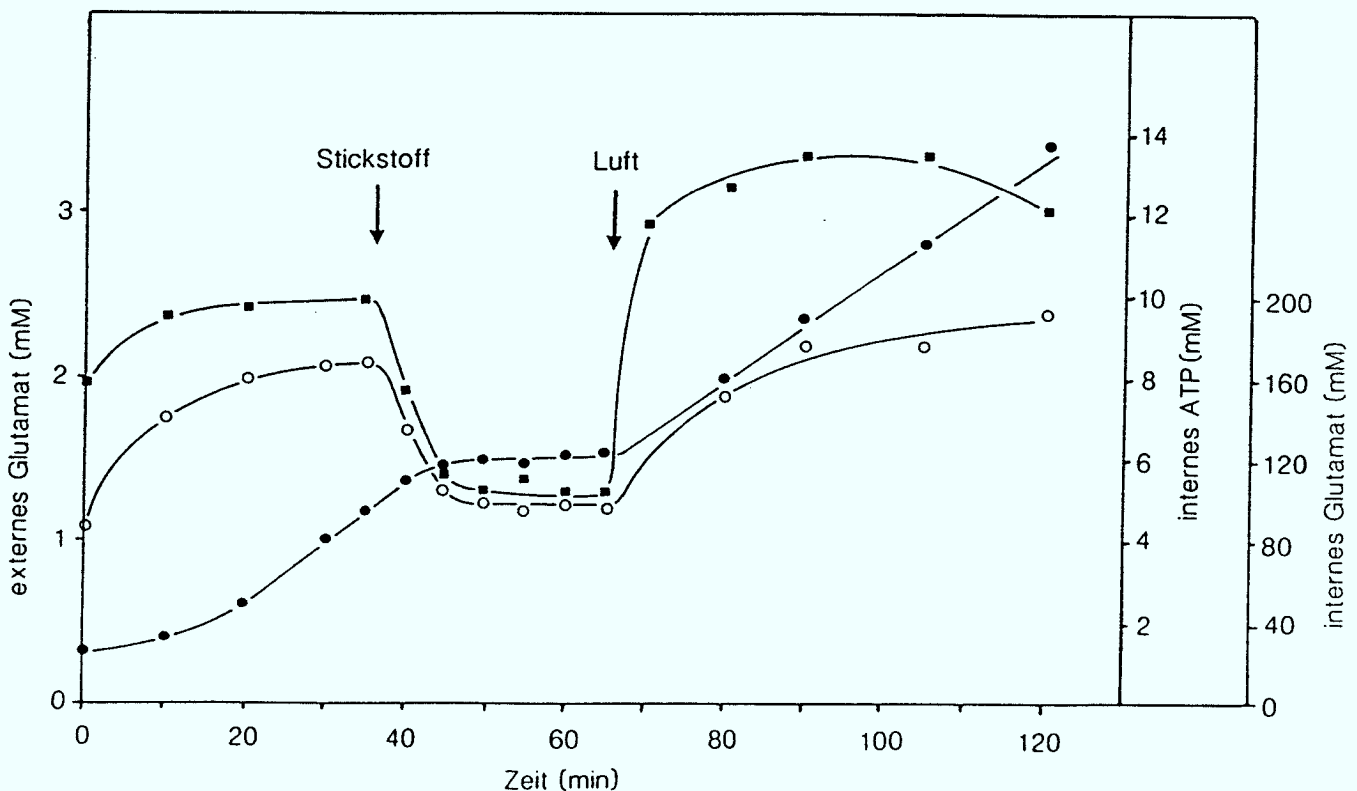


Abb. 21: Kurzzeitfermentation mit *Corynebacterium glutamicum*: Effekt der Anaerobisierung durch Stickstoffbegasung auf die interne (offene Kreise) und die externe (geschlossene Kreise) Glutamatkonzentration. Der interne ATP-Gehalt ist durch (geschlossene Quadrate) dargestellt.

Eine O_2 -Limitierung durch Stickstoffbegasung bewirkte innerhalb weniger Minuten die fast vollständige Hemmung der Exkretion (Abb. 21). Im gleichen Zeitraum sank die interne ATP-Konzentration von 10 mM auf 5 mM ab. Unmittelbar nach erneuter Belüftung der Zellen stieg der interne ATP-Pool der Zellen bis auf Maximalwerte von 13 mM an. Zeitgleich mit dem ATP-Gehalt nahm die Sekretionsrate zu und erreichte sehr schnell wieder die Ausgangswerte.

Auch die Behandlung mit Cyanid (6 mM) hemmte innerhalb eines kurzen Zeitraums die Glutamatsekretion fast vollständig (Abb. 22). Die interne ATP-Konzentration sank nach Cyanidgabe von 12 auf 4 mM ab und auch in diesem Fall stagnierte die Sekretion. Mit der Abnahme des Cyanidgehalts im Medium (vgl. III.1.6.) stieg der ATP-Pool wieder an, und nach Überschreiten einer Konzentration von 8 mM begannen die Zellen wieder, Glutamat zu sezernieren.

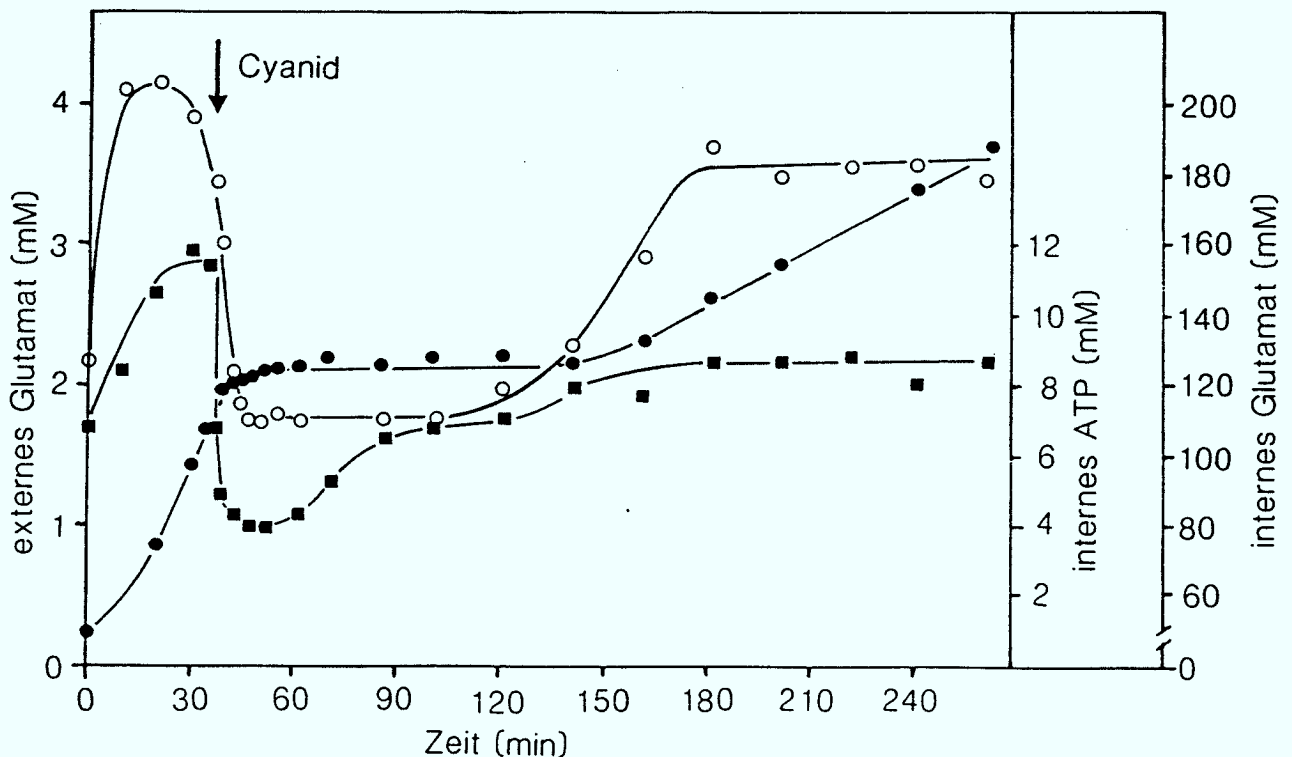


Abb. 22: Kurzzeitfermentation mit *Corynebacterium glutamicum*: Effekt einer Cyanidzugabe auf die interne (offene Kreise) und die externe Glutamatkonzentration (geschlossene Kreise). Der interne ATP-Gehalt wird durch (geschlossene Quadrate) dargestellt. Der Pfeil symbolisiert den Zeitpunkt der Cyanidgabe (6 mM).

Die Anaerobiose und die Cyanidbehandlung wirkten sich allerdings auch auf die interne Glutamatkonzentration aus. Diese sank in beiden Fällen auf ca 110 mM ab. Da die Innenkonzentration und der Gradient als mögliche Triebkraft hatten ausgeschlossen werden können, kam dieses Phänomen jedoch nicht als Erklärung für die Exkretionshemmung in Frage. Zudem war der resultierende Gradient (int/ext) noch sehr hoch. Das Membranpotential sinkt unter diesen Bedingungen nicht unter 100 mV (Krämer, persönliche Mitteilung).

Auch diese Experimente zeigten eine deutliche Korrelation zwischen hoher Glutamatsekretion und einem erhöhten ATP-Gehalt.

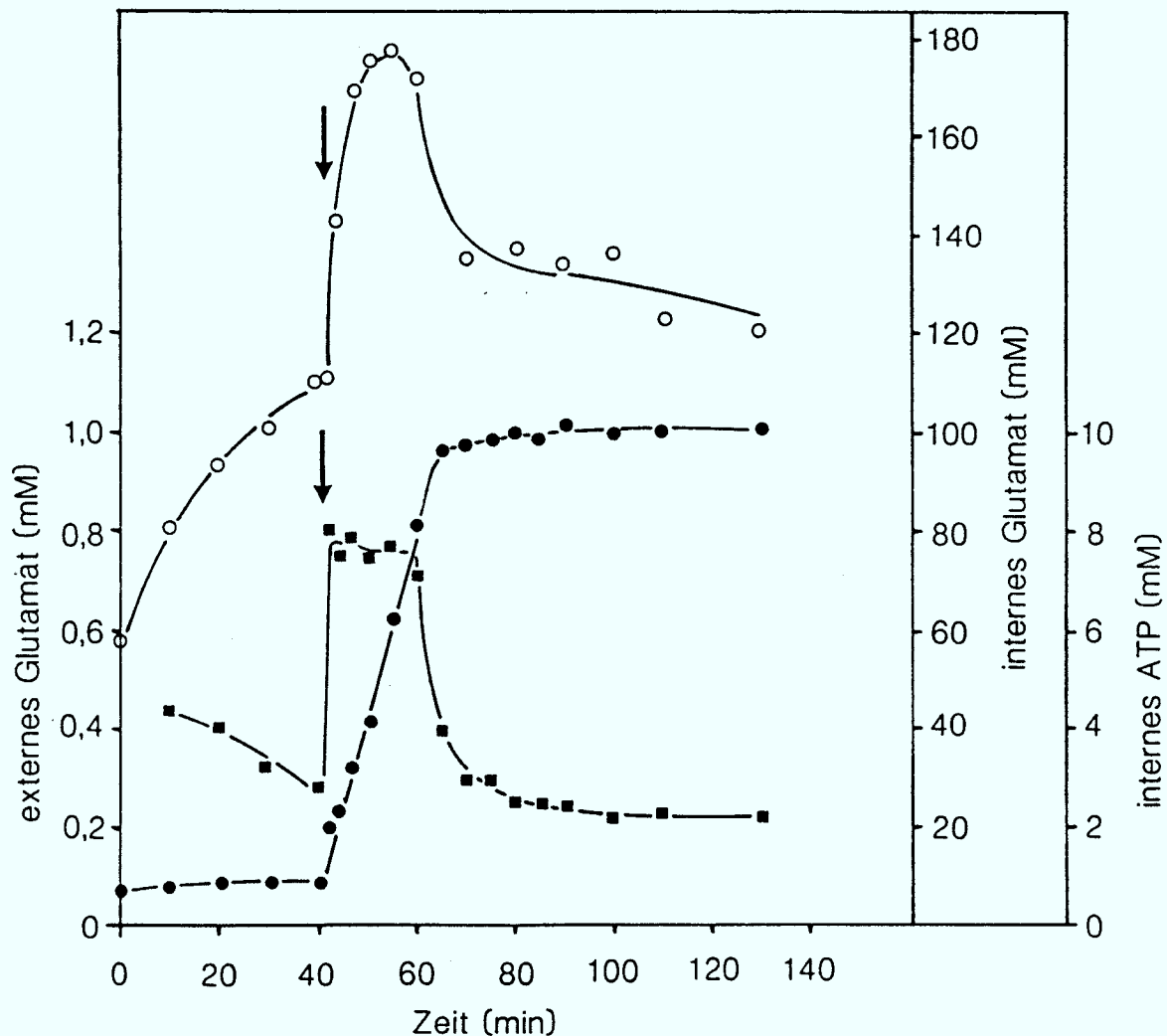


Abb. 23: Kurzzeitfermentation mit *Corynebacterium glutamicum* unter glucoselimitierten Bedingungen: Effekt einer Glucosegabe auf die interne (offene Kreise) und die externe (geschlossene Kreise) Glutamatkonzentration. Die interne ATP-Konzentration wird durch (geschlossene Quadrate) dargestellt. Der Pfeil symbolisiert den Zeitpunkt der Glucoseaddition (1 mM).

3.2.4. Korrelation zwischen ATP-Gehalt und Produktion unter glucoselimitierten Bedingungen

Da biotinlimitierte Zellen von *Corynebacterium glutamicum* bei Mangel an einer C-Quelle aufgrund von Regulationsmechanismen trotz eines extrem hohen Glutamatgradienten und hohen Membranpotentials kein Glutamat (vgl. III.1.3. u. III.1.4.) sezernierten, war es notwendig, die Zellen auch in diesem Fall in Bezug auf eine Korrelation zwischen ATP-Gehalt und Sekretion zu analysieren.

Wie in Abb. 23 dargestellt, wurde den Produzentenzellen im Verlauf einer Kurzzeitfermentation unter C-Quellmangel Glucose (1 mM) zugefüttert. Unmittelbar nach der Glucosezugabe begannen die Zellen mit hoher Rate bis zum Verbrauch der Glucose zu produzieren. Die interne ATP-Konzentration, die ohne verwertbare C-Quelle auf weniger als 3 mM abgesunken war, stieg zeitgleich mit dem Start der Sekretion sofort nach Glucosegabe innerhalb von Sekunden auf ca. 8 mM an. Auf diesem Wert blieb sie bis zum Verbrauch der Glucose und sank dann langsam ab. Mit der Abnahme des ATP-Gehalts kam auch der Efflux zum Stillstand. Die interne Glutamatkonzentration stieg von 110 auf 170 mM an, um anschließend mit dem Verbrauch der Glucose auf 130 mM abzusinken.

Wie in den vorherigen Experimenten wird auch hier eine deutliche Korrelation zwischen dem ATP-Pool der Zellen und der Glutamatsekretion sichtbar.

3.2.5. Hemmung der Sekretion durch Blockierung der F_1F_0 -ATPase

Alle bisher beschriebenen Experimente, in deren Verlauf der Efflux durch den Einsatz von Inhibitoren wie CCCP, Cyanid, O_2 -Mangel oder Valinomycin gehemmt wurde, waren streng mit einem Absinken des intrazellulären ATP-Gehalts korreliert. Die Wirkung der eingesetzten Inhibitoren war immer mit einer Hemmung oder einer Entkopplung der Elektronentransportkette verknüpft. In einem weiteren Ansatz sollte der ATP-Pool der Zellen gezielt durch Manipulation an einer völlig anderen Stelle im Energiefluß der Bakterien, der F_1F_0 -ATPase, reduziert werden.

Daher wurde der Einfluß von DCCD, einem spezifischen Hemmstoff der F_1F_0 -ATPasen (Linnett und Beechey, 1979) auf den internen ATP-Pool und das Sekretionsverhalten der Zellen untersucht. Das DCCD kam in einer relativ hohen Konzentration von ca. 250 nmol/mg Protein zum Einsatz. Dies gewährleistete auch unter den Bedingungen der Kurzzeitfermentation, die für die DCCD-Wirkung wegen des hohen pH zwischen 8 und 9 ungünstig waren, eine reproduzierbare, sofortige Wirkung. Aus Abb. 24 geht hervor, daß eine sehr gute Korrelation zwischen dem ATP-Pool und der Sekretion vorlag. Binnen weniger Minuten nach DCCD-Gabe sank wegen der Hemmung der F_1F_0 -ATPase das ATP von 9,5 mM auf weniger als 7 mM ab. Zeitgleich mit dem Absinken des ATP-Pools kam die Sekretion fast vollständig zum Erliegen. Das verbleibende ATP, das allein durch die Glykolyse gebildet wird, reichte nicht zum Aufrechterhalten einer für die effiziente Sekretion notwendigen ATP-Konzentration aus.

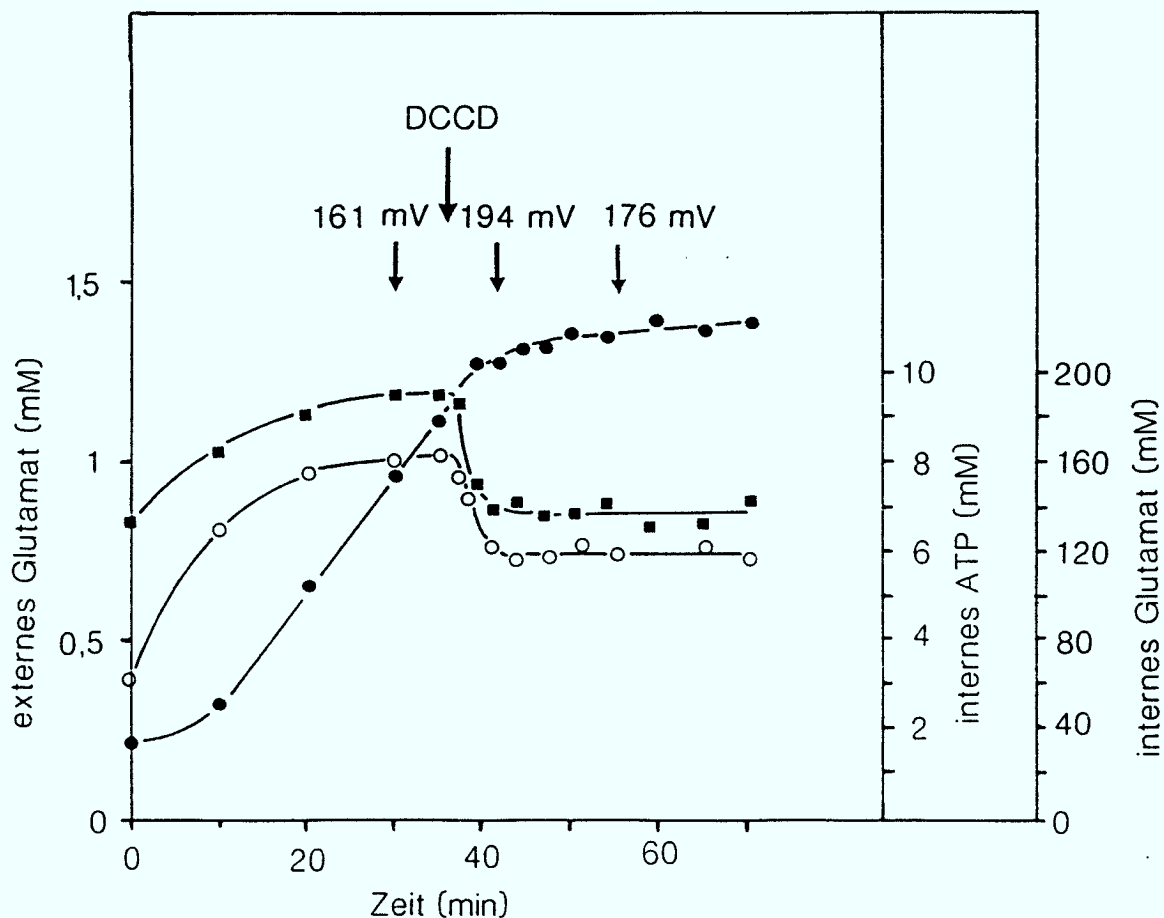


Abb. 24: Kurzzeitfermentation mit *Corynebacterium glutamicum*: Die F_1F_0 -ATPase wurde durch Gabe von DCCD gehemmt. Die interne (offene Kreise) und externe (geschlossene Kreise) Glutamatkonzentration, sowie die interne ATP-Konzentration (geschlossene Quadrate) und das Membranpotential (kleine Pfeile) sind dargestellt. Der große Pfeil symbolisiert den Zeitpunkt der DCCD-Zugabe (ca 250 nmol/mg Protein).

Aufgrund der Blockade des Protonenrückstroms in die Zelle kam es zu einer Hyperpolarisation der Cytoplasmamembran. Das Membranpotential stieg vorübergehend von 160 mV auf über 190 mV an. Ähnliche Effekte sind bei anderen Bakterien beobachtet worden (Lübben und Schäfer, 1989). Auch die interne Glutamatkonzentration ging von 160 auf 120 mM herunter, doch die Effluxhemmung ließ sich aus den oben erwähnten Gründen (vgl. III.3.2.1. u. III.3.2.2.) nicht auf dieses Phänomen zurückführen.

Die durch Hemmung der ATPase hervorgerufene Reduktion des ATP-Pools bewirkte eine Sekretionshemmung, wodurch ein erneuter Hinweis auf die Korrelation zwischen Sekretion und ATP-Gehalt gegeben war.

3.2.6. Regulation der Sekretion durch die energy charge und das Verhältnis ATP/ADP

In Kapitel III.2.2. wurde durch Experimente, bei denen die Glutamatsekretion mittels Biotinaddition gehemmt wurde, gezeigt, daß neben den Veränderungen in der Cytoplasmamembran auch metabolische oder energetische Veränderungen, die durch den Biotinmangel hervorgerufen wurden, eine essentielle Voraussetzung für die effiziente Glutamatsekretion sind. Durch den Einsatz von Inhibitoren konnte mittels Hemmexperimenten, die in Kapitel III.3.2.1. - III.3.2.5. dargestellt sind, eine Korrelation zwischen der effizienten Glutamatsekretion und einem hohen ATP-Gehalt der Zellen nachgewiesen werden. Im folgenden wurde versucht, diese Korrelation auch für das oben beschriebene Experiment, bei dem die Glutamatsekretion durch nachträgliche Biotinaddition gehemmt wurde (vgl. III.2.2.) herzustellen. Hier wurde im Gegensatz zu den bisher vorgestellten Hemmexperimenten die Glutamatsekretion durch eine "physiologische" Behandlung, d.h., durch Addition von Biotin gehemmt, einem für das Wachstum essentiellen Vitamin.

Der schon beschriebene schnelle (< 1 min) Hemmeffekt des Biotins auf den Efflux ist in Abb. 25A dargestellt. Das interne Glutamat und das Membranpotential blieben unverändert hoch. Neben dem Efflux wurde der Effekt des Biotinnachstarts auf den ATP-, ADP- und AMP-Gehalt der Zellen analysiert (Abb. 25B). Die anfängliche lag-Phase des Efflux war mit einem ATP-Anstieg verbunden. Nachdem sich eine hohe konstante Konzentration von 9,5 mM eingestellt

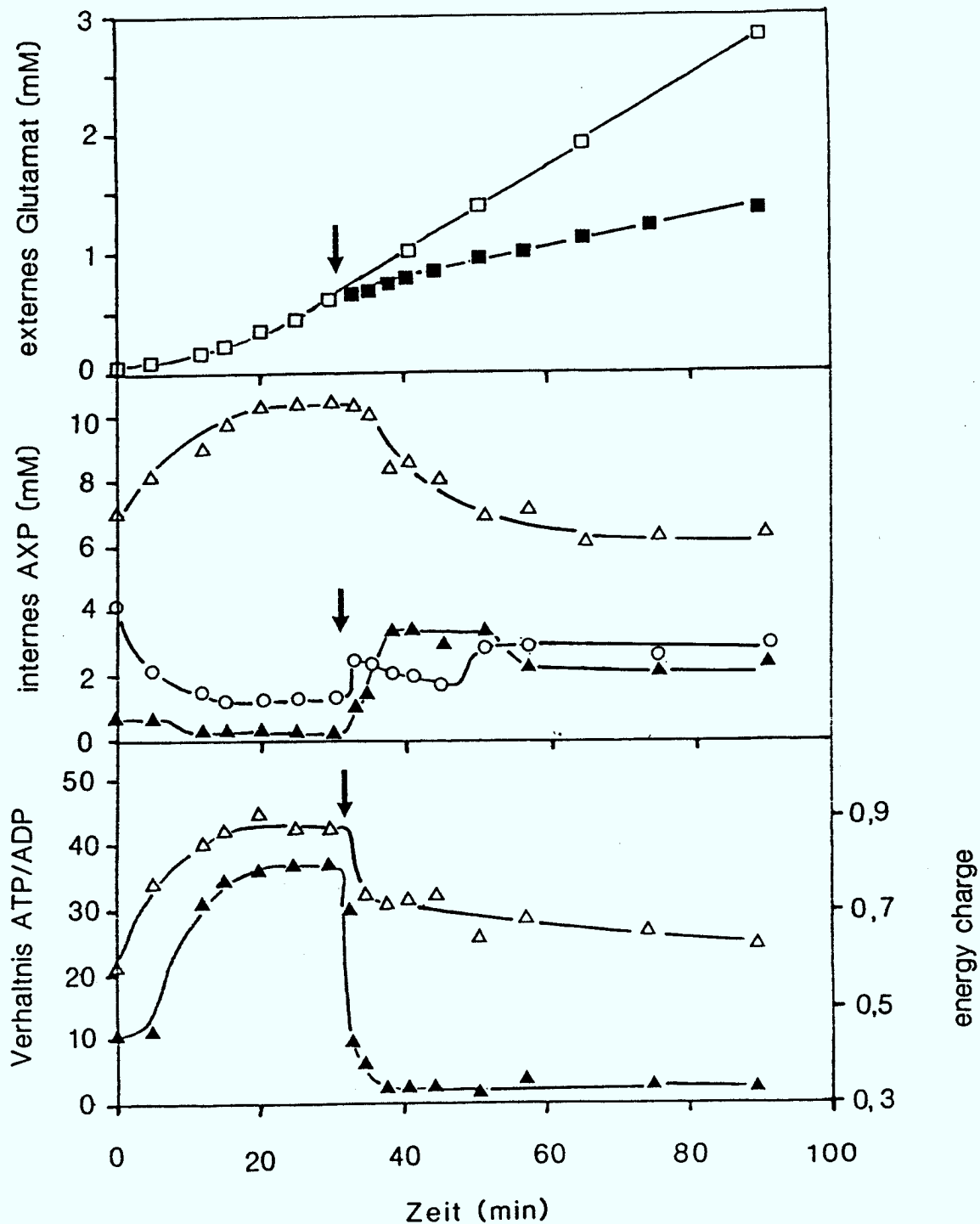


Abb. 25 A-C: Kurzzeitfermentation: Einfluß der Biotinaddition auf biotinlimitierte Produzenten. Der Pfeil symbolisiert den Zeitpunkt der Biotinaddition (200 µg/l). **A** Einfluß auf die Glutamatsekretion. Unbehandelte Zellen werden durch offene Quadrate und biotin-behandelte Zellen durch geschlossene Quadrate dargestellt. **B** Einfluß auf die interne ATP- (offene Dreiecke) ADP- (geschlossene Dreiecke) und AMP-Konzentration (offene Kreise). Die Meßpunkte 3 - 7 der ADP-Konzentration repräsentieren einen Mittelwert aus allen in diesem Zeitraum bestimmten Werten, da das ADP wegen der extrem niedrigen Werte ($< 0,3\text{mM}$) neben dem hohen ATP-Gehalt nur sehr schwer zu bestimmen ist. **C** Einfluß auf die energy charge (offene Dreiecke) und das Verhältnis (ATP/ADP).

hatte, begannen die Zellen mit hoher Rate Glutamat zu sezernieren. Nach der Biotinaddition sank auch in diesem Experiment das ATP auf den niedrigen Wert von biotinsupplementierten Nichtproduzenten (5-6 mM) ab. Jedoch im Vergleich zum Hemmeffekt setzte dieser Vorgang erst mit einer Verzögerung von 3-4 Minuten ein. Somit kam für die Biotinhemmung die ATP-Abnahme als alleiniger Regulator nicht in Frage. Im Gegensatz zum ATP wurden jedoch beim ADP und AMP sehr schnelle Effekte sichtbar. Das ADP, das während der Sekretionsphase bei einer kaum detektierbaren niedrigen Konzentration ($< 0,3$ mM) lag, stieg sehr schnell nach der Biotinaddition auf über 1 mM und erreichte schließlich Werte zwischen 2 und 3 mM (vergleichbar mit biotinsupplementierten Nichtproduzenten). Auch der Wert des AMP erhöhte sich sofort von 1 mM auf 2-3 mM.

Deshalb lag die Vermutung nahe, daß die Sekretion vom Verhältnis ATP/ADP oder von der energy charge der Zellen reguliert wird. Zur Veranschaulichung ist in Abb. 25C der Einfluß des Biotins auf diese Energieparameter gezeigt. Aufgrund des anfangs niedrigen ATP-Gehalts und des etwas erhöhten ADP-Pools lag das Verhältnis zu Beginn der Fermentation bei einem niedrigen Wert unter 10. Es stieg schnell an, erreichte ein hohes Plateau von ca. 40 und die Zellen begannen, das Glutamat mit hohen Raten zu sezernieren. Unmittelbar nach der Biotinaddition sank das Verhältnis ATP/ADP wegen des ADP-Anstiegs auf weniger als 10 ab und pendelte sich bei 2 ein (vergleichbar biotinsupplementierten Nichtproduzenten). Für die energy charge zeichnete sich während des Experiments ein ähnlicher Verlauf ab. Zu Fermentationsbeginn lag die energy charge bei einem niedrigen Wert um 0,6 und stieg schnell an. Die Zellen begannen mit dem Erreichen eines hohen Plateaus über 0,85 mit der effizienten Produktion. Bedingt durch den Biotinnachstart und den daraufhin folgenden Anstieg von ADP und AMP sank die energy charge schlagartig unter 0,7 und stellte sich bei 0,65 ein (vergleichbar biotinsupplementierten Nichtproduzenten), womit auch die Sekretion gehemmt wurde.

Aufgrund dieser Korrelation scheint der schnelle Biotineffekt durch die Änderung des Verhältnisses ATP/ADP und/oder der energy charge erklärbar zu sein. Es ist davon auszugehen, daß auch in allen anderen Experimenten, bei denen eine Korrelation zwischen ATP-Gehalt und Glutamatsekretion beobachtet worden ist (vgl. III.3.2.1. - III.3.2.5.), die ATP-Abnahme mit einer Senkung des Verhältnisses ATP/ADP, bzw. der energy charge einherging.

3.3. Einfluß der Hemmstoffe auf die Glucoseaufnahme

Für einige der bisher vorgestellten Hemmexperimente, mit denen die Korrelation zwischen dem ATP-Pool der Zellen und der effizienten Glutamatsekretion bewiesen wurde (vgl. III.3.2.), ließ sich ein entscheidender Einwand erheben: es bestand die Möglichkeit, daß die beobachtete Effluxhemmung nicht auf den verminderten ATP-Pool der Zellen, sondern auf eine gehemmte Glucoseaufnahme zurückzuführen sei. Daher sollte als entscheidende Kontrolle der Nachweis erbracht werden, daß die beobachteten Hemmeffekte durch Cyanid, DCCD, O_2 -Limitierung und CCCP tatsächlich auf einer Veränderung wichtiger Energieparameter beruhten und nicht etwa auf eine Hemmung der Glucoseaufnahme zurückzuführen waren.

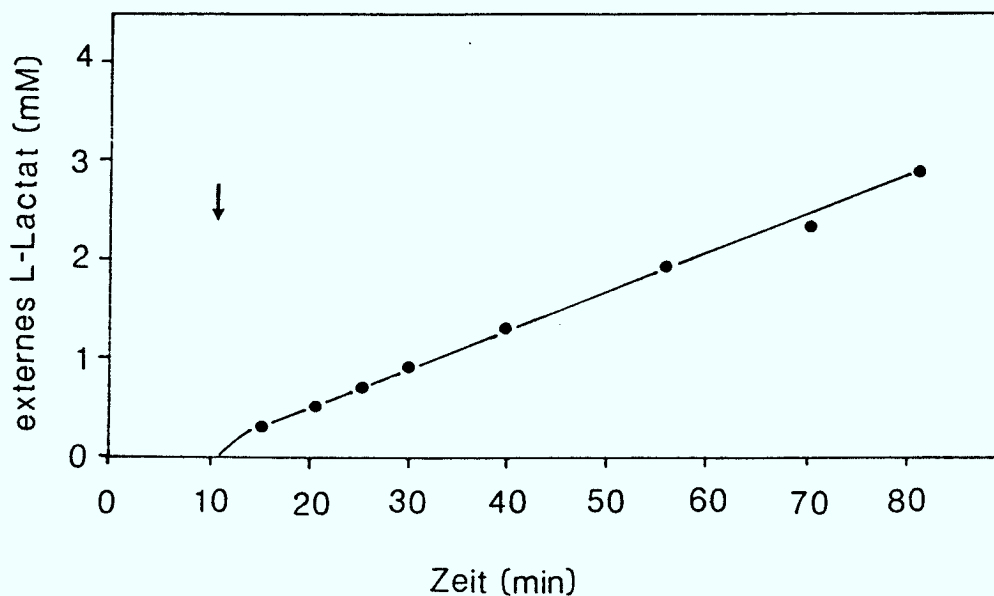


Abb. 26: Kurzzeitfermentation unter anaeroben Bedingungen (Stickstoffbegasung). Das Experiment wurde zunächst unter glucoselimitierten Bedingungen durchgeführt. Der Pfeil repräsentiert den Zeitpunkt der Glucoseaddition (300 mM). Die externe Lactatkonzentration wird durch geschlossene Kreise symbolisiert.

Die zur Kontrolle notwendige Bestimmung der Glucoseaufnahme erfolgte nicht durch Messung der Aufnahme von ^{14}C -markierter Glucose. Die Kurzzeitfermentationen wurden standardmäßig mit hohen Glucosekonzentrationen durchgeführt (330 mM), und es war somit unmöglich, die Glucose genügend hoch radioaktiv zu markieren. Außerdem schieden die Zellen große Teile der aufgenommenen Markierung als Stoffwechselprodukte (Glutamat, Carbonsäuren, etc.) unmittelbar nach der Aufnahme wieder aus.

Da die Zellen unter O_2 -Limitierung große Mengen Lactat produzierten, wurde das sezernierte Lactat als Maß für die Mindestmenge aufgenommener Glucose genommen. In Abb. 26 ist dargestellt, daß die Zellen sofort nach Glucosegabe L-Lactat (kein D-Lactat) mit einer Rate von 30 nmol/min x mg Tg sezernierten. Die Glucose wurde also mindestens mit einer Rate von 15 nmol/min x mg Tg aufgenommen. Wurde zudem DCCD oder CCCP zugegeben, so erhöhte sich die Lactatproduktion und somit die Glucoseaufnahme. Cyanid bewirkte allein - auch ohne O_2 -Limitierung - eine starke Lactatsekretion (ca. 40 nmol/min x mg Tg). Damit konnte für alle eingesetzten Effektoren eine Hemmung der Glucoseaufnahme oder des Stoffwechsels ausgeschlossen werden.

4. Glutamatproduktion mit induzierten Aufnahmezellen

Alle bisherigen Untersuchungen zur Energetik und zur Regulation der Glutamatsekretion sind mit einem Zelltyp durchgeführt worden, der unter definierten biotinlimitierten Bedingungen in MMI-Medium angezogen worden war. Die ATP-Abhängigkeit der Sekretion ist in den meisten Fällen durch Hemmexperimente dargestellt worden, bei denen eine strenge Korrelation zwischen der Hemmung der Sekretion und Veränderungen in der Zusammensetzung der Adeninnukleotide auftrat. Zur weiteren Charakterisierung der Energetik war es aber auch wünschenswert, diese Korrelation in umgekehrter Richtung, d.h. beim Übergang vom nichtsezernierenden zum sezernierenden Zustand darzustellen. Daher sollte ein vollständig unterschiedlicher Zelltypus darauf hin untersucht werden, ob er ebenfalls zur Sekretion stimuliert werden kann, und wenn ja, ob dieser Prozeß mit den Adeninnukleotiden korreliert ist.

Für die folgenden Sekretionsexperimente wurden typische induzierte Glutamataufnahmezellen nach Krämer et al. (1990 a,b) eingesetzt. Diese Zellen wurden in MMYE-Medium mit Na-Glutamat (100 mM) als alleiniger C-Quelle angezogen und besitzen ein induziertes, hochaffines ATP-abhängiges Aufnahmesystem für Glutamat. Glutamat wird mit einer ca. 20-fach höheren Rate (15-20 nmol/min x mg Tg) aufgenommen, als bei Zellen, die mit Glucose als C-Quelle angezogen worden sind (vgl. Tab.3).

Zunächst wurden verschiedene Bedingungen der Kurzzeitfermentation für die Sekretion der Zellen getestet: I) ein Puffer, der normalerweise für Glutamataufnahmeexperimente eingesetzt wurde (EDTA 1 mM; Mes/Tris 50 mM, pH 8,5; KCl 20 mM), und dem Glucose (50 mM) als C-Quelle und Harnstoff und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (je 5 g/l) als N-Quellen sowie Biotin (200 µg/l) zugesetzt wurden; II) MMI-Medium mit Biotin (200 µg/l); III) MMI-Medium mit Biotin (200 µg/l) und Cerulenin (100 µg/l).

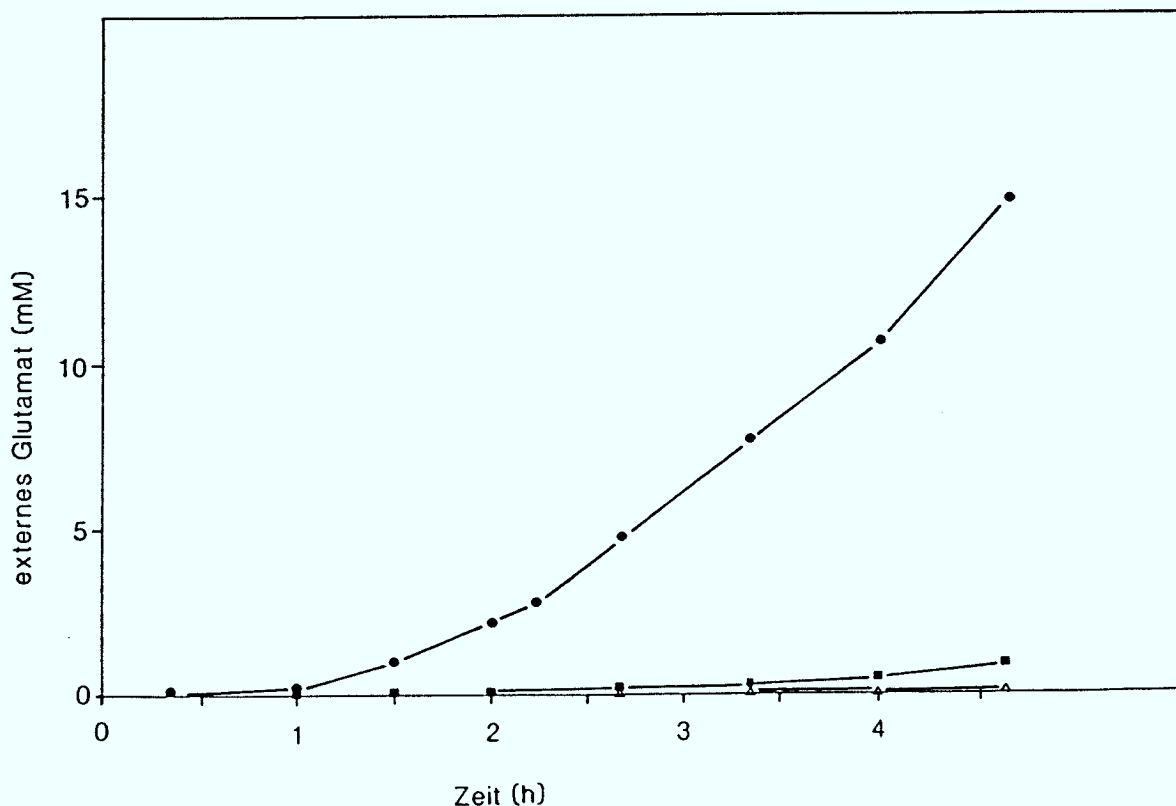


Abb. 27: Kurzzeitfermentationen mit induzierten Glutamataufnahmezellen. Die Fermentationsbedingungen sind in Kap. III.4. genau erläutert. Die geschlossenen Kreise stellen die Glutamatsekretion von Zellen aus Ansatz I dar. Ansatz II wird durch geschlossene Quadrate und Ansatz III durch offene Dreiecke repräsentiert.

Wie in Abb. 27 gezeigt, sezernierten Zellen aus Ansatz I trotz der Biotinsupplementierung nach einer lag-Phase von 30-45 min mit einer Rate von 23 nmol/min x mgTg Glutamat. Die Sekretion konnte unter diesen speziellen Bedingungen eindeutig auf einen durch das im Medium befindliche EDTA herbeigeführten Mangel an Ca^{2+} zurückgeführt werden (Krämer und Lambert, pers. Mitteilung). Das beobachtete Effluxphänomen war spezifisch für die auf Glutamat angezogenen Aufnahmezellen, da Zellen, die in glucosehaltigem MMI-Medium (200 µg Biotin/l) angezogen waren, unter diesen Bedingungen keinen Efflux aufwiesen. Die Glutamataufnahmezellen und die neue Möglichkeit zur Stimulierung der Sekretion stellten eine interessante Alternative dar, die Zellen beim Übergang in den Produktionszustand zu analysieren.

Die Zellen aus Ansatz II, in MMI-Medium mit supplementierten Biotin, sezernierten wie angenommen kein Glutamat.

Zellen mit induziertem Glutamataufnahmesystem sezernierten nach Ceruleninbehandlung (Ansatz III) - im Gegensatz zu glucosegewachsenen Zellen, bei denen eine Ceruleninbehandlung schnell zu einem effizienten Efflux geführt hatte (vgl. III.2.3. u. Abb. 16) - über einen langen Zeitraum von 240 Minuten fast kein Glutamat.

4.1. Charakterisierung der EDTA-behandelten Zellen

Für die Charakterisierung war zunächst zu klären, ob auch die zur Glutamataufnahme induzierten Zellen unter EDTA-Bedingungen beim Übergang zur effizienten Glutamatsekretion einen veränderten Lipidgehalt aufweisen, wie er bisher stets im Zusammenhang mit der Produktion beobachtet worden war. Zudem stellte sich die Frage, ob unter diesen, bisher noch nicht beschriebenen Bedingungen eine Korrelation zwischen den Adeninnukleotiden und der Sekretion auftrat.

Wie in Abb. 28A dargestellt, begannen die Zellen nach ca. 30 Minuten Fermentationszeit Glutamat zu sezernieren und erreichten eine Rate von 21 nmol/min x mgTg. Die interne Glutamatkonzentration stieg anfangs auf über 200 mM an, sank jedoch im weiteren Verlauf des Experiments langsam ab. Die Zellen mit induziertem Glutamataufnahmesystem besaßen von Beginn der Fermentation an mit 23 nmol Phospholipid/mgTg einen deutlich reduzierten Phospholipidgehalt im Vergleich zu biotinsupplementierten

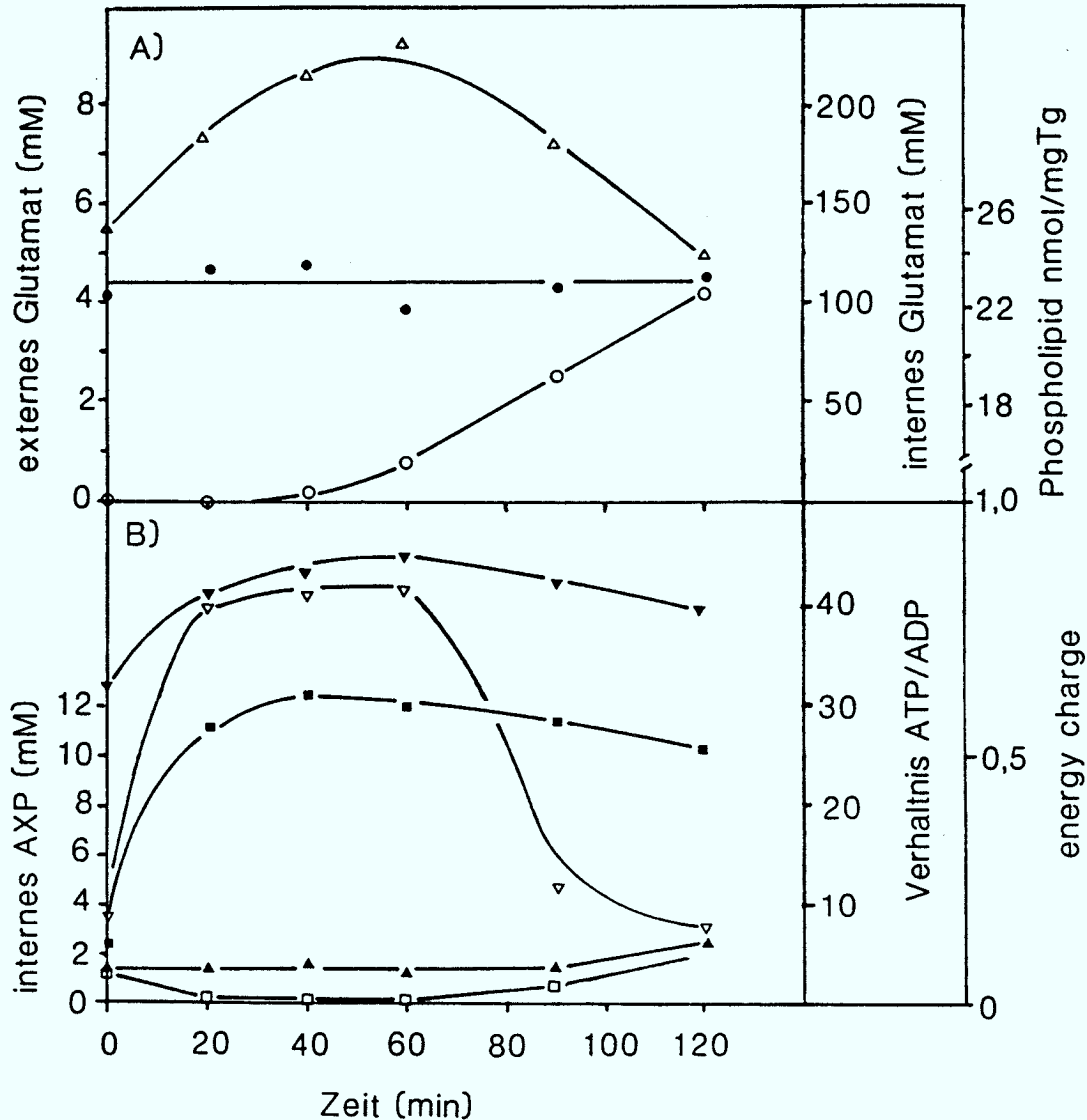


Abb. 28A,B: Kurzzeitfermentation mit induzierten Glutamataufnahmezellen unter den Fermentationsbedingungen von Ansatz I (vgl. Abb. 24, Kap. III.4.). **A** Die interne (offene Dreiecke) und externe (offene Kreise) Glutamatkonzentration, sowie der Phospholipidgehalt (geschlossene Kreise) sind dargestellt. **B** der Verläufe der internen ATP- (geschlossene Quadrate) ADP- (offene Quadrate) und AMP-Konzentrationen (geschlossene Dreiecke) sind ebenso abgebildet, wie die energy charge (geschlossene umgekehrte Dreiecke) und das Verhältnis ATP/ADP (offene umgekehrte Dreiecke).

glucosegewachsenen Nichtproduzenten (32 nmol Phospholipid/mgTg). Diese Werte sind mit den niedrigen Phospholipidmengen von biotinlimitierten Produzenten vergleichbar, die einen Gehalt von 16-18 nmol Phospholipid/mgTg aufwiesen. Somit fand auch unter diesen Bedingungen die Glutamatsekretion mit Zellen statt, deren Phospholipidgehalt stark verringert war. Die Zellen wiesen, ähnlich den typischen Produzentenzellen, (vgl. III.1.3.) relativ kleine cytoplasmatische Räume auf (ca. 1 μ l/mgT).

Die effiziente Sekretion fand bei hoher energy charge (0,85) und hohem Verhältniss ATP/ADP (40) statt (Abb. 28B). Auch der ATP-Pool der Zellen war mit ca 12 mM stark erhöht. Alle Parameter ähnelten biotinlimitierten Produzenten. Ab einer Fermentationszeit von 90 Minuten waren die Ergebnisse nicht mehr interpretierbar, da ein Teil der Zellen lysierte. Da bei der Extraktionsmethode, die Zellen nicht vom umgebenden Medium abgetrennt wurden, repräsentierten die gemessenen erhöhten ADP- und AMP-Werte hier nicht mehr die tatsächlichen Innenkonzentrationen.

Auch Zellen unter vollkommen anderen Produktionsbedingungen erfüllten die zwei in der vorliegenden Arbeit postulierten Bedingungen für die effiziente Glutamatsekretion: der Lipidgehalt war um ca 35% reduziert und die Adeninnukleotidzusammensetzung in Richtung hohes ATP, hohes Verhältnis ATP/ADP und hohe energy charge verändert.

IV. Diskussion

1. Zum Mechanismus der Glutamatsekretion

Eine wichtige Voraussetzung für die Untersuchungen zum Mechanismus der Glutamatsekretion bei *Corynebacterium glutamicum* stellte in der vorliegenden Arbeit die Ausarbeitung eines experimentellen Systems dar, das eine genaue und reproduzierbare kinetische Auflösung des Efflux ermöglichte. In der Literatur ist der Glutamatexport bisher noch nicht kinetisch analysiert worden, da in den meisten Fällen die Sekretion im Verlauf von Standardfermentationen untersucht worden ist (Kikuchi und Nakao, 1972; Nunheimer et al., 1970; Nakao et al., 1973; Takinami et al., 1963, 1966). Bei der Standardfermentation ist eine exakte kinetische Auflösung der Sekretion nicht möglich, da die effiziente Sekretion erst im Verlauf der Fermentation zu einem nicht genau definierbaren Zeitpunkt - beim Auftreten des Biotinmangels - startet. Shio et al. (1962 b, c, 1963) analysierten die Glutamatsekretion zwar unter Verwendung von gewaschenen, in Puffer resuspendierten Produzenten-zellen. Allerdings wurde auch in diesem Fall der Sekretionsprozeß nicht kinetisch aufgelöst.

Nachdem als Grundlage für die weiteren Experimente ein Mineral-salzmedium optimiert worden war, wurde die Methode der Kurzzeit-fermentation entwickelt, die eine reproduzierbare detaillierte Analyse des Sekretionsprozesses ermöglichte und gegenüber den bisherigen Verfahren eine Reihe von Vorteilen aufwies (vgl. III.1.3.): I) die Zellen sezernierten sehr früh bei geringer Außenkonzentration des Glutamats mit optimalen Raten, wodurch exakte kinetische Untersuchungen des Efflux ermöglicht wurden; II) der Zeitpunkt des Sekretionsbeginn ließ sich genau definieren; III) die experimentellen Bedingungen ließen sich während des Experiments beliebig variieren.

Die Sekretionsraten (20 nmol/min x mgTg) entsprachen denen von Fermentationen, die im Industriemaßstab mit Produktionsstämmen durchgeführt worden sind (Kinoshita und Tanaka, 1972). Daher war die Kurzzeitfermentation gut zur Analyse des Sekretionsprozesse geeignet.

In den bisherigen Publikationen sind weiterhin die aktuellen internen Glutamatkonzentrationen nicht bestimmt worden. Mit einer Ausnahme (Marquet et al. 1986) wurde der Glutamatgehalt pro Zellmasse (Kikuchi und Nakao, 1972; Kimura, 1963; Kitano et al., 1972) oder pro Zellstickstoff (Shiio et al., 1962a,b, 1963) als Maß für die interne Glutamatkonzentration angegeben. Diese Parameter erwiesen sich jedoch als unzureichende Bezugsgrößen für Vergleiche der internen Konzentrationen, da durch Untersuchungen und Vergleiche der spezifischen cytoplasmatischen Volumina in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, daß biotinlimitierte Produzenten mit ca. 0,8 - 1,2 $\mu\text{l}/\text{mgTg}$ wesentlich geringere spezifische Innenräume als biotinsupplementierte Nichtproduzenten mit ca. 1,8 $\mu\text{l}/\text{mgTg}$ aufweisen. Da diese Unterschiede in früheren Publikationen noch nicht berücksichtigt werden konnten, kam man zu irrtümlichen Schlußfolgerungen bezüglich der Konzentrationsunterschiede des internen Glutamats zwischen Produzenten und Nichtproduzenten.

Die genaue Erfassung der internen Konzentrationen wichtiger Metabolite und Ionen stellte jedoch die Basis für Aussagen bezüglich des Mechanismus der Glutamatsekretion dar. Zur Analyse des Glutamatefflux wurden die chemischen Gradienten von Substraten und Ionen, die pH-Gradienten und die korrigierten Membranpotentiale der Zellen bestimmt. Die Untersuchung der jeweiligen Aufnahme- und Effluxraten des Glutamats vervollständigten die Charakterisierung in biochemischer und bioenergetischer Hinsicht.

Aus Tabelle 3 ging entgegen den bisherigen Vermutungen hervor, daß - unabhängig vom Vorhandensein eines Substrats - biotinlimitierte Produzenten und biotinsupplementierte Nichtproduzenten bezüglich der in Tab. 3 aufgelisteten Energieparameter (Membranpotential, interne Konzentrationen und Konzentrationsgradienten von Glutamat und Ionen) bis auf die Fähigkeit zur effizienten Glutamatsekretion nahezu identische Eigenschaften aufwiesen.

Zusammengefaßt kann man aus diesen Befunden eindeutig folgern, daß die Glutamatsekretion nicht durch passive Diffusion über eine permeabilisierte Cytoplasmamembran abläuft. Die Unzulänglichkeit von Model I ("leak") soll durch die im folgenden aufgelisteten Argumente dokumentiert werden. (I) Der chemische Gradient des Glutamats, der für Modell I die eigentliche Triebkraft darstellen würde, ist in Nichtproduzenten höher als in Produzenten. (II) Im Verlauf einer Kurzzeitfermentation erwies sich die Sekretionsrate

als unabhängig vom chemischen Gradienten. Bei konstanter Innenkonzentration sank der Konzentrationsgradient infolge der Sekretion um mehr als eine Größenordnung ab, ohne daß sich die Sekretionsrate änderte. (III) Die internen Glutamatkonzentrationen sind in Produzenten und Nichtproduzenten identisch (150-200 mM). Für Produzenten zellen konnte die postulierte Reduktion der Innenkonzentration nicht beobachtet werden, die für die Aufhebung der Feedbackinhibierung notwendig wäre. (IV) Unter Substratmangel sezernierten biotinlimitierte Zellen kein Glutamat, obwohl unter diesen Bedingungen die höchsten meßbaren Konzentrationsgradienten (≥ 2000) auftraten (vgl. Abb. 5C, Tab. 3). (V) Das Membranpotential lag in allen Fällen, unabhängig vom Sekretionszustand der Zellen, bei hohen konstanten Werten um 160 mV (Tab. 3). Da das Membranpotential einen Maßstab für die Permeabilität von Membranen darstellt, sprach dieser Befund gegen eine Erhöhung der Permeabilität bei biotinlimitierten Zellen. (VI) Die Permeabilität für andere kleine Kationen, wie K^+ war bei Produzenten ebenfalls nicht erhöht. (VII) Der Glutamatefflux ist spezifisch für Glutamat; das Exportsystem kann zwischen Glutamat und Threonin, sogar zwischen Glutamat und Aspartat unterscheiden. (VIII) Obwohl die Sekretionsrate unabhängig vom chemischen Gradienten ist, setzte die Glutamatproduktion jeweils nach einer anfänglichen lag-Phase von ca. 15 Minuten und dem Überschreiten einer gewissen Schwellenkonzentration des internen Glutamats ein (vgl. Abb. 5A). Dieses Schwellenphänomen, das auf eine Regulation der Sekretion hindeutet, wird unten noch ausführlich diskutiert (vgl. IV.3.). (IX) Die Biotinaddition hemmte die Sekretionsrate von Produzenten unmittelbar auf 20% des Ausgangswertes von unbehandelten Zellen (Abb. 11A). Dieser Hemmeffekt trat nur aufgrund schneller metabolischer Veränderungen in den Zellen ein. Die beobachteten Veränderungen in Lipidgehalt und -zusammensetzung hingegen waren zu langsam, um den schnellen Hemmeffekt zu erklären (vgl. III.2.2.). In ihrer Gesamtheit schließen diese Argumente das "leak"-Modell I aus, wonach biotinlimitierte Zellen Glutamat über eine permeabilisierte Membran mittels passiver Diffusion sezernieren (Bunch und Harris, 1986; Demain und Birnbaum, 1968; Hirose et al., 1985; Kikuchi und Nakao, 1986; Kinoshita und Tanaka, 1972; Shiio et al., 1962a,b, 1963).

Auch die zweite in der Literatur von Clement et al. (1984) und Clement und Lanéelle (1986) vorgestellte Hypothese für die Glutamatsekretion, Modell II ("Inversionscarrier"), konnte durch eine Reihe von Befunden ausgeschlossen werden. (I) Unter den Bedingungen der Kurzzeitfermentation war die Sekretionsrate mindestens 20-fach höher als der $V_{\max}$ -Wert der Aufnahme. (II) Für das Inversionsmodell wurden das Membranpotential und der Konzentrationsgradient des Glutamats als Triebkräfte der Sekretion in Erwägung gezogen (Clement et al., 1984; Clement und Lanéelle, 1986; Marquet et al., 1986). Aus Tabelle 3 geht hervor, daß Nichtproduzentenzellen bezüglich dieser Parameter mindestens gleich hohe Werte wie Produzenten zellen aufwiesen. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß der Efflux weder vom Membranpotential, noch vom chemischen Gradienten getrieben wird (vgl. III.3.1.). (III) Der Aufnahmecarrier von *Corynebacterium glutamicum* unterschied nicht zwischen Glutamat und Aspartat (Krämer et al., 1988). Bei der Sekretion hingegen wurde das Glutamat gegenüber dem Aspartat deutlich bevorzugt (Tab. 4). (IV) Die Glutamataufnahme bei *Corynebacterium glutamicum* (Krämer et al. 1990 a,b) ist ein unidirektionaler Vorgang, der direkt mit dem ATP-Gehalt der Zellen, bzw. mit dem Verhältnis ATP/ADP korreliert ist. Auch für die Sekretion wurde eine strenge Korrelation mit dem Verhältnis ATP/ADP und der energy charge nachgewiesen (vgl. III.3.2.). Diese Parameter weisen in sezernierenden Zellen sogar noch höhere Werte auf. Daher kann das Modell II nur unter der Voraussetzung gelten, daß der Aufnahmecarrier neben der Transportrichtung auch seinen molekularen Mechanismus ändert. (V) Für Glutamataufnahmezellen konnte beim Übergang in den Produktionszustand (vgl. III.4.1.) vorübergehend ein "futile cycle" nachgewiesen werden (Krämer, 1990 pers. Mitteilung), d.h., die Zellen sezernierten Glutamat und nahmen es sofort wieder auf. Da beide Prozesse unter optimalen energetischen Voraussetzungen, die denen von "normalen" Produzenten entsprechen, mit maximalen Raten stattfanden, kann man folgern, daß während des "futile cycles" zwei unterschiedliche Carrier gleichzeitig aktiv waren.

Durch die bisher vorgestellten Ergebnissen wurden die beiden in der Literatur beschriebenen Modelle ("leak" und "Inversionscarrier") ausgeschlossen. Stattdessen sprechen eine Reihe von Argumenten für ein drittes, bisher in der Literatur für die Sekretion des Glutamats noch nicht vorgeschlagenes Modell, das Modell eines energieabhängigen, membrangebundenen Sekretionscarriers: (I) Die Spezifität des Sekretionsprozesses ist ein klassisches Argument für einen enzymkatalysierten, also carriervermittelten, Vorgang. (II) Die Sekretion wurde durch den energetischen und/oder metabolischen Zustand der Zellen reguliert. Dies konnte durch einige Experimente gezeigt werden: Limitierung der C-Quelle, Sauerstoffmangel, oder Hemmung der respiratorischen Kette (vgl. III.1.3. u. III.1.6.). (III) Die Glutamatsekretion startete erst nach Ablauf einer anfänglichen lag-Phase (Abb. 5A), obwohl schon lange vorher sehr hohe Konzentrationsgradienten des Glutamats vorlagen. (IV) Durch Biotinaddition ist die Sekretion reversibel hemmbar. Die drei zuletzt aufgezählten Argumente II - IV repräsentieren typische Regulationsphänomene. (V) Die Glutamatsekretion ist energieabhängig (vgl. III.3.1.). (VI) Die Glutamatsekretion ist ein aktiver Prozeß, der auch gegen einen Konzentrationsgradienten (int < ext) stattfindet. (VII) Die Glutamatsekretion ist streng mit dem Verhältnis ATP/ADP, bzw. der energy charge korreliert (Abb. 25C).

Die Interpretation bezüglich des dritten Modells, des Sekretionscarriers, wurde zudem durch den Befund gestützt, daß die Glutamatsekretion nicht, entsprechend einem von Luntz et al. (1986) aufgestellten Modell für die Lysinsekretion, durch den osmotischen Druck des Mediums beeinflusst wird (vgl. III.1.7.).

Analog zu der hier vertretenen Hypothese des Sekretionscarriers wurden spezifische Sekretionssysteme bisher nur zur Erklärung von Antibiotikaresistenzen (Hedstrom et al., 1982; McMurry et al., 1987) und Schwermetallresistenzen (Mobley und Summers, 1987; Silver und Misra, 1988) gezeigt. Exportsysteme wurden ebenfalls für einige nichtverwertbare Zucker nachgewiesen (Reizer und Panos, 1980; Reizer, 1989).

Auch für andere Sekretionssysteme von coryneformen Bakterien wurde in der Literatur das traditionelle "leak"-Modell ausgeschlossen. Die Isoleucinsekretion bei *Corynebacterium glutamicum* wird ebenso durch einen spezifischen Sekretionscarrier katalysiert (Ebbighausen et al., 1989b), wie die Lysinsekretion (Bröer, 1989

pers. Mitteilung). Teshiba und Furuya (1983 a,b, 1984) zeigten, daß der Efflux von 5'-IMP entgegen der bis dahin in der Literatur vertretenen Hypothese nicht durch passive Diffusion über eine physikalisch veränderte Membran stattfindet und wiesen einen carrier-vermittelten Prozeß nach. Die Annahme, daß Nukleotide entsprechend den Fermentationsbedingungen passiv über eine defekte Membran ausgeschleust werden (Furuya, 1976) wurde auch für die NAD-Sekretion von *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6872 widerlegt (Schmid und Auling, 1989).

Obwohl eindeutige Beweise für das Vorhandensein eines spezifischen Sekretionscarriers für Glutamat nur durch genetische Nachweise (Mutation) oder durch die biochemische Charakterisierung des isolierten Carriers erbracht werden können, sprechen die vorgestellten Fakten klar für das dritte Modell, den Sekretionscarrier (Hoischen und Krämer, 1989, 1990a).

2. Zum Einfluß der Membranveränderungen auf die Glutamatsekretion

Mit der Widerlegung von Modell I ("leak") und Modell II ("Inversionscarrier") (vgl. IV.1.) wurden gleichzeitig die Erklärungen ausgeschlossen, die für die beobachteten Veränderungen in der Cytoplasmamembran aufgestellt worden sind (Bunch und Harris, 1986; Clement et al., 1984; Clement und Lanéelle, 1986; Demain und Birnbaum, 1968; Kikuchi und Nakao, 1986; Kinoshita und Tanaka, 1972; Milner et al., 1987) (vgl. I.1.1.). Somit blieb die Bedeutung der Lipidveränderungen für die Sekretion ungeklärt. Von grundlegendem Interesse war daher die Frage, ob für den in der vorliegenden Arbeit postulierten Sekretionscarrier tatsächlich eine Korrelation zwischen der Lipidzusammensetzung der Membran und der Fähigkeit zur effizienten Glutamatsekretion besteht, und ob die veränderte Membran die einzige Voraussetzung für den Glutamatefflux darstellt. Für die durchgeführten Arbeiten erwies sich ein neuartiger experimenteller Ansatz als wichtig, der es ermöglichte, ein und denselben Zelltyp direkt durch Biotinaddition zwischen produzierendem und nichtproduzierendem Zustand umzuschalten (vgl. III.2.2.). Dabei wurden die Unterschiede im metabolischen Zustand und in der Membranzusammensetzung der Zellen vermieden, die in der

Regel zwischen den unterschiedlich angezogenen Zellen auftraten. In den bisherigen Publikationen zu diesem Thema wurden jeweils unterschiedliche Zelltypen, biotinsupplementierte Nichtproduzenten und biotinlimitierte Produzenten, miteinander verglichen.

Um die Vergleichbarkeit mit Literaturdaten sicherzustellen, wurde zunächst der konventionelle Vergleich zweier unterschiedlicher Zellpopulationen in Bezug auf Lipidgehalt- und Zusammensetzung durchgeführt. Dabei konnten die in früheren Publikationen beschriebenen Unterschiede zwischen Produzenten und Nichtproduzenten zum großen Teil bestätigt werden. Der Lipidgehalt von biotinlimitierten Zellen war (Tab. 5) auf 50% des Wertes von biotinsupplementierten Zellen reduziert (Takinami et al., 1968) und das Verhältnis gesättigter/ungesättigter Fettsäuren war in Produzenten von 0,7 auf Werte über 1 angestiegen (Shibukawa und Ohsawa, 1966; Shibukawa et al., 1970; Takinami et al., 1968). Wie bereits publiziert, wurden als wichtigste Fettsäurekomponenten Palmitinsäure und Ölsäure gefunden (Collins et al., 1982; Suzuki und Komagata, 1983). Die in Tabelle 5 angegebene Phospholipidzusammensetzung stimmte weitgehend mit den Daten von Hucheng et al. (1984) für *Corynebacterium glutamicum* und von Thaler und Diekmann (1979) für *Brevibacterium ammoniagenes* überein. Es traten jedoch Unterschiede zu den Lipidanalysen von anderen glutamatproduzierenden coryneformen Bakterien (s.u.) in Bezug auf das Phosphatidylglycerol als Hauptkomponente und das Vorhandensein stickstoffhaltiger Phospholipide auf.

Neben der schnellen Überführung von Produzenten in Nichtproduzenten durch Biotinaddition wurde eine detaillierte Lipidanalyse innerhalb der ersten Minuten nach der Sekretionshemmung durchgeführt. Die Korrelation mit der Exportaktivität war für die Aufklärung des Zusammenhangs zwischen Membranstatus und Sekretion essentiell, da dadurch wichtige Argumente gewonnen wurden, die gegen einen direkten Zusammenhang zwischen dem Lipidstatus und der Effluxaktivität sprechen (vgl. III.2.2.). Die Biotinaddition bewirkte eine unmittelbare Hemmung der Glutamatsekretion, während die beobachteten Effekte auf Lipidgehalt- und Zusammensetzung später und mit vergleichsweise langsameren zeitlichen Verlauf eintraten. Obwohl die Lipidsynthese unmittelbar nach der Biotinaddition einsetzte, veränderten sich in dem Zeitraum, in dem der vollständige Hemmeffekt auf die Sekretion bereits eingetreten war, weder die Menge an neusynthetisierten Fettsäuren noch der Phospholipidgehalt

der Zellen signifikant. Auch das Verhältnis gesättigter/ungesättigter Fettsäuren sank mit einem viel langsameren zeitlichen Verlauf als die Glutamatsekretion. Da durch die Biotinaddition die Sekretion zunächst unabhängig von Veränderungen in der Membran gehemmt wurde, wird deutlich, daß ein effizienter Glutamatefflux nicht zwangsläufig als Folge von Veränderungen in der Cytoplasmamembran eintritt.

Außerdem wurde in diesem Zusammenhang die Vermutung untersucht, daß die Glutamatsekretion durch die Anwesenheit eines bestimmten Phospholipids oder die Kombination verschiedener Phospholipide induziert wird (Kikuchi und Nakao, 1973 a,b; Takinami et al., 1968). Das PIM wurde ebenso als Regulator für den Glutamatefflux in Erwägung gezogen (Kobayashi et al., 1971) wie der Gehalt an PA und DPG (Shibukawa et al., 1970). Daher wurde der relative Gehalt von jedem einzelnen Phospholipid in seinem zeitlichen Verlauf unmittelbar nach der Biotinaddition zu Produzentenzellen untersucht. Als einzige signifikante Veränderungen wurden ein relativer Anstieg von PA und der Komponente X beobachtet (Abb. 12 u. 13). Gleichzeitig mit dem vorübergehenden Anstieg einiger, der in geringen Mengen vorliegenden Phospholipidkomponenten war ein zeitlich begrenztes Absinken der Hauptkomponente PG zu erkennen. Der vorübergehende Anstieg von PA war nicht unerwartet, da PA als Vorstufe für alle anderen Phospholipide fungiert. Entsprechend dem unmittelbaren Anstieg der Lipidsynthese durch die Biotinaddition, entwickelte sich der zeitliche Verlauf der zellulären PA-Konzentration genauso, wie man es von einem Vorläufermolekül erwartete. Die Komponente X, bei der es sich um ein saures Phospholipid ohne Zucker- und Stickstoffkomponente handelt, zeigte ebenfalls das vorläuferähnliche kinetische Verhalten von PA. Aus diesen Gründen wurde gefolgert, daß auch X ein Vorläufermolekül der Hauptkomponente PG darstellt: CDP-Diacylglycerol, oder PG-Phosphat (Bishop, 1988; Finnerty, 1978).

Ein effluxinduzierender Effekt der Phosphatidsäure und der Komponente X wurde durch ein zusätzliches Argument ausgeschlossen. Die durch die Biotinaddition - im Vergleich zur Hemmung der Glutamatsekretion - langsam einsetzende Veränderung der Phospholipidzusammensetzung bewirkte, daß sich die Zellen wenige Minuten nach der Biotinaddition, vorübergehend noch stärker von Nichtproduzenten unterschieden als unbehandelte Produzenten, obwohl die Sekretion bereits gehemmt war (vgl. Abb. 13). Bezüglich der Hypothesen,

die eine Regulation der Glutamatsynthese durch einzelne Phospholipide, wie PA und PIM, favorisierten, konnte gezeigt werden, daß PIM sich nach der Biotinaddition nicht signifikant veränderte, und DPG nur in geringen Mengen vertreten war.

Aufgrund dieser experimentellen Befunde konnte eine Korrelation zwischen der Hemmung der Glutamatsekretion und den Veränderungen in der Lipidzusammensetzung ausgeschlossen werden. Durch das in Abb. 15 beschriebene Experiment, in dessen Verlauf die Hemmwirkung des Biotins durch Cerulenin, einem spezifischen Hemmstoff der Fettsäuresynthese, aufgehoben wurde (vgl. III.2.3.), ergab sich ein noch aussagekräftigeres Argument gegen eine direkte funktionelle Verknüpfung dieser beiden Phänomene. Falls tatsächlich die geringfügigen Veränderungen in Lipidgehalt- und Zusammensetzung der Membran, die innerhalb der ersten Minute nach der Biotinaddition auftreten, für die sofortige Hemmung der Glutamatsekretion verantwortlich wären, dürfte dieser Effekt nicht sofort wieder durch Hemmung der Fettsäuresynthese mittels Cerulenin revertierbar sein.

Aufgrund der vorgestellten Ergebnisse muß man folgern, daß die Veränderungen in der Lipidzusammensetzung nicht als alleiniger Trigger für die Glutamatsekretion fungieren können. Dieser Schluß wird noch durch die Tatsache gestützt, daß die hier analysierte Phospholipidzusammensetzung (Tab. 5) sich deutlich von anderen coryneformen glutamatproduzierenden Organismen unterscheidet. Es traten Unterschiede in Bezug auf die jeweiligen Hauptkomponenten und das Vorhandensein stickstoffhaltiger Phospholipide auf (Kikuchi und Nakao, 1973 a,b; Kobayashi et al., 1971; Shibukawa et al., 1970).

Obwohl nachgewiesen werden konnte, daß die Glutamatsekretion und die Lipidzusammensetzung nicht miteinander in einem kausalen Zusammenhang stehen, blieben noch wichtige Punkte bezüglich der Bedeutung des Lipidstatus unbeantwortet: (I) Ist der reduzierte Lipidgehalt der Zellen doch eine notwendige Voraussetzung für die Glutamatsekretion, obwohl er als alleiniger Trigger ausgeschlossen werden konnte? (II) Sind die Effekte des Biotins - einerseits die durch den Mangel ausgelöste Glutamatsekretion und andererseits die durch die Biotinaddition hervorgerufene, unmittelbare Effluxhemmung - tatsächlich direkt mit der Aktivität der Fettsäuresynthese verknüpft oder hängen sie möglicherweise (auch) mit anderen biotinabhängigen Enzymsystemen in der Zelle zusammen? Außerdem mußte die Möglichkeit erwogen werden, daß der Sekretionscarrier direkt

durch Biotin reguliert wird, da für *Propionigenium modestum* (Laubinger und Dimroth, 1988) und für *Klebsiella pneumoniae* (Dimroth und Thomer, 1988) biotinabhängige Transportsysteme entdeckt worden sind.

Zur Klärung dieser Fragen wurde Cerulenin eingesetzt, ein spezifischer Hemmstoff der bakteriellen Fettsäuresynthetase (Funabashi et al., 1989; Kawaguchi et al., 1979; Omura et al., 1981), der auch bei ganzen Zellen von *Corynebacterium glutamicum* zu einer kompletten und unmittelbaren Hemmung der Fettsäuresynthese führte (Abb. 14). Cerulenin kompensierte den Hemmeffekt des Biotins auf die Glutamatsekretion vollständig. Sowohl der einsetzende Start der Fettsäuresynthese als auch die Hemmung der Glutamatsekretion wurden durch simultane Ceruleningabe unterdrückt (Abb. 15). Es war durch eine zeitlich gegenüber dem Biotin verzögerte Ceruleningabe sogar möglich, von hoher Sekretionsrate auf gehemmte Sekretion und - innerhalb eines Zeitraums von wenigen Minuten - wieder auf die hohe Sekretionsrate umzuschalten. Dieses Umschalten konnte, wie oben schon erwähnt, nicht durch schnelle Veränderungen in der Membran erklärt werden. Der Schaltvorgang mußte jedoch wegen der spezifischen Wirkung von Cerulenin mit der Aktivität der Fettsäuresynthetase korreliert sein. Daraus konnte man folgern, daß der schnelle Hemmeffekt des Biotins auf die Glutamatsekretion direkt mit dem Biotineinfluß auf die Fettsäuresynthese von *Corynebacterium glutamicum* in Beziehung steht. Vermutlich ist die Sekretionshemmung auf metabolische Veränderungen der Zellen zurückzuführen, die durch die plötzlich einsetzende Aktivität der Fettsäuresynthese hervorgerufen werden. Durch den Einsatz von Cerulenin konnten aber auch andere mögliche Erklärungen für die Wirkung des Biotins, etwa ein Effekt auf biotinabhängige Enzyme (Knowles, 1989) oder Carrier (Dimroth, 1987), ausgeschlossen werden.

Da Cerulenin dem Biotin entgegenwirkte, war es naheliegend, den direkten Effekt des Cerulenins auf die Glutamatsekretion von biotinsupplementierten Zellen zu testen. Wie aufgrund seiner Hemmwirkung auf die Fettsäuresynthese erwartet, führte Cerulenin tatsächlich zu einer effizienten Glutamatsekretion (Abb. 16A). Die Zellen begannen aber erst nach starker Reduktion des Lipidgehalts mit hoher Rate Glutamat zu sezernieren (Abb. 16B). Dieses Ergebnis stimmt mit den in der Literatur beschriebenen Befunden überein, wonach eine Glutamatproduktion unter allen bekannten Produktionsbedingungen immer nur dann stattfindet, wenn die Cytoplasmamembran

verändert ist (Kikuchi et al., 1973; Nakao et al., 1973; Shibukawa et al., 1966a, 1968; Takinami et al., 1968). Demnach stellt ein reduzierter Lipidgehalt eine essentielle Voraussetzung für die effiziente Glutamatsekretion dar.

Zusammengefaßt können die folgenden Schlußfolgerungen gezogen werden (Hoischen und Krämer, 1990b): (I) Membranveränderungen sind zwar eine notwendige, aber nicht ausreichende Voraussetzung für den carriervermittelten Glutamatefflux bei *Corynebacterium glutamicum*. (II) Die unmittelbare Sekretionshemmung durch Biotin steht mit der veränderten Aktivität der Fettsäuresynthese und nicht mit Membranveränderungen in Beziehung. (III) Die Effluxinduktion durch Biotinlimitierung ist zunächst auf die verminderte Aktivität der Fettsäuresynthese zurückzuführen. Neben den Membranveränderungen sind noch andere regulierende Faktoren notwendig, die mit der Aktivität der Fettsäuresynthese in Zusammenhang stehen.

3. Energetik und Regulation der Glutamatsekretion

Bisher ist in der Literatur die Energetik des Glutamatefflux noch nicht aufgeklärt worden (vgl. I.2.). Das "leak" - Modell besagt, daß Glutamat passiv, durch den Konzentrationsgradienten getrieben, über eine permeabilisierte Cytoplasmamembran diffundiert (Bunch und Harris, 1986; Demain und Birnbaum, 1968; Milner et al., 1987; Shio et al., 1962a,b, 1963). Gemäß dem "Inversions-carrier" - Modell läuft die Glutamatsekretion über den von seiner Energiequelle, einer Komponente der proton motive force, entkoppelten Aufnahmecarrier ab, der das Glutamat entsprechend seines elektrochemischen Potentials exportiert (Clement et al., 1984; Clement und Lanéelle, 1986; Marquet et al., 1986). Da beide Modelle ausgeschlossen werden konnten (vgl. IV.1.), blieb die Frage nach der Energetik der Sekretion weiterhin offen. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde zunächst für den Glutamatexport von einem System ausgegangen, das von der proton motive force oder einer ihrer Komponenten angetrieben wird, denn der Transport vieler Aminosäuren läuft über sekundär aktive Systeme ab (Anraku, 1980; Konings, 1977; Landick et al., 1984). Da zudem das Membran-

potential und der Konzentrationsgradient ($\text{int} > \text{ext}$) in einer für die Sekretion der anionischen Aminosäure Glutamat äußerst günstigen Konstellation vorlagen (vgl. III.3.1.), erschien diese Arbeitshypothese sehr wahrscheinlich.

Daher wurden das Membranpotential und der chemische Gradient des Glutamats auf ihren Einfluß auf die Sekretion hin untersucht. Für diese Untersuchungen wurde zunächst das Membranpotential durch das elektrogene Kaliumionophor Valinomycin und Erhöhung der externen Kaliumkonzentration eliminiert (Abb. 18). Es stellte sich jedoch heraus, daß die Sekretion nicht vom Membranpotential allein getrieben wird, da - entgegen den bisherigen Annahmen - die Sekretionsrate im Verleichen zum kompletten Abbau des Membranpotentials unbeeinflußt blieb (Abb. 18).

Zusätzlich zum Membranpotential wurde auch der chemische Gradient des Glutamats als mögliche Triebkraft für die Glutamatsekretion eliminiert, indem neben der Valinomycinaddition die externe Konzentration des Glutamats über die entsprechende interne Konzentration erhöht wurde. Die neben dem Abbau des Membranpotentials vorgenommene Umkehrung des chemischen Gradienten, die einer Potentialänderung von ca. 160 mV entsprach, hatte keinen deutlich sichtbaren Effekt auf die Glutamatsekretion (Abb. 18). Der pH-Gradient konnte als Triebkraft für die Glutamatsekretion genauso ausgeschlossen werden (vgl. Kap. III.3.1.) wie ein entscheidender Einfluß der externen Natrium- und Kaliumkonzentrationen. Da die Zellen bei abgebautem Membranpotential das Glutamat mit hohen Raten auch gegen einen Konzentrationsgradienten sezernieren konnten, muß es sich um einen aktiven, energieabhängigen Vorgang handeln. Entgegen den Erwartungen wird der Efflux weder vom Membranpotential, noch vom chemischen Gradienten getrieben. Auch der pH-Gradient und Ionengradienten (K^+ , Na^+) konnten als Triebkräfte ausgeschlossen werden.

Durch eine Reihe von Experimenten wurde stattdessen gezeigt, daß die Glutamatsekretion signifikant mit dem Energiestatus des Adeninnukleotidsystems korreliert ist. Nachdem deutlich wurde, daß Produzenten mit 8 - 11 mM einen gegenüber Nichtproduzenten (5 - 7 mM) erhöhten ATP-Gehalt aufweisen, wurden die Effekte von spezifischen, unterschiedlich wirkenden Inhibitoren auf die Glutamatsekretion in ihrem zeitlichen Verlauf untersucht. Simultan wurden

die Veränderungen der relevanten Energieparameter - chemischer Gradient, Membranpotential und Zusammensetzung der Adeninnukleotide - analysiert und die Veränderungen in der Sekretionsrate mit den überprüften Parametern korreliert.

Die Korrelation zwischen der Glutamatsekretion und dem ATP-Gehalt der Zellen wurde zunächst durch den Einsatz von CCCP, einen Entkoppler der Elektronentransportkette, gezeigt, der die Sekretion binnen weniger Minuten hemmte (Abb. 19). Aufgrund der CCCP-Gabe sank gleichzeitig mit der Sekretionsrate der ATP-Gehalt der Zellen. Auch das Ausbleiben einer Sekretionshemmung nach Zugabe des elektrogenen Kaliumionophors Valinomycin konnte durch den Verlauf des zellulären ATP-Pools erklärt werden (Abb. 20). Die Valinomycingabe hatte zunächst nur eine vorübergehende Wirkung auf den ATP-Spiegel, die sich bei der Sekretion nicht bemerkbar machte. Erst 35 Minuten nach der Valinomycinaddition sank der ATP-Pool, woraufhin eine Sekretionshemmung eintrat. Der Befund, daß die Sekretion mit dem ATP-Pool der Zellen korreliert ist, wurde des weiteren durch Experimente, in deren Verlauf die Sekretion reversibel durch O₂-Limitierung oder Cyanidbehandlung gehemmt wurde (vgl. III.3.2.3.), gestützt. Auch die Exporthemmung, die trotz hoher chemischer Gradienten unter C-Quellmangel auftrat, konnte durch Veränderungen im ATP-Gehalt der Zellen erklärt werden (vgl. III.3.2.4.). Bei Glucosemangel war das ATP stark reduziert, während die Addition von Glucose einen Anstieg des ATP und den Start der Sekretion hervorrief. In einem weiteren Experiment wurde der ATP-Pool durch Hemmung der F₁F₀-ATPase mittels DCCD gesenkt. Auch in diesem Fall war die Abnahme des ATP mit einer Sekretionshemmung korreliert. In allen Experimenten hing die effiziente Glutamatsekretion offensichtlich vom Über- bzw. Unterschreiten einer ATP-Schwellenkonzentration im Bereich von 8 mM ab. Auch die stets zu beobachtende lag-Phase der Sekretion zu Beginn der Kurzzeitfermentationen (vgl. III.3.2.) korrelierte mit dem Verlauf des ATP-Gehalts der Zellen.

In einigen der vorgestellten Experimente - wie der Sekretionshemmung durch O₂-Limitierung, Cyanidgabe (vgl. III.3.2.3.), Glucoselimitierung (vgl. III.3.2.4.) und DCCD-Gabe (vgl. III.3.2.5.) - ging die beobachtete Sekretionshemmung auch mit einem gleichzeitigen Absinken der internen Glutamatkonzentration und des Konzentrationsgradienten (int/ext) einher. Das Absinken des Gradienten kam jedoch nicht als Erklärung für die Sekretionshemmung in Frage,

da er als Triebkraft der Sekretion hatte ausgeschlossen werden können (s.o.). Diese Möglichkeit wurde zudem durch das CCCP-Experiment (vgl. III.3.2.1.) ausgeschlossen, in dessen Verlauf die Sekretion trotz eines unverändert hohen Gradienten gehemmt wurde. Eine Regulation der Glutamatsekretion durch die interne Glutamatkonzentration konnte zumindest für den untersuchten Konzentrationsbereich nicht beobachtet werden, denn es wurde gezeigt, daß die Zellen nach der Zugabe von Valinomycin, trotz stark gesunkener interner Glutamatkonzentrationen, weiterhin mit hohen Raten Glutamat sezernierten (vgl. Abb. 20). Auch die in einigen Experimenten gleichzeitig mit der Sekretionshemmung auftretende Reduktion des Membranpotentials (vgl. III.3.2.1. u. III.3.2.3.) konnte die Sekretionshemmung nicht erklären, da es als Triebkraft der Sekretion hatte ausgeschlossen werden können. Diese Aussage wird zudem durch ein Experiment gestützt, in dessen Verlauf die Sekretion trotz einer durch DCCD-Gabe hervorgerufenen Hyperpolarisation der Cyto-plasmamembran (von 160 auf 190 mV) gehemmt wurde (vgl. III.3.2.5.).

Allen vorgestellten Experimenten, in deren Verlauf durch den Einsatz unterschiedlicher Inhibitoren an verschiedenen Stellen im Energiekreislauf der Zellen eingegriffen wurde, ist einzig und allein gemeinsam, daß die Sekretion mit dem ATP-Gehalt korreliert ist.

Experimente, in deren Verlauf die Glutamatsekretion mittels Biotinaddition gehemmt wurde (vgl. III.3.2.6.), ergaben weitere Daten, die zu einer genaueren Analyse dieser Regulationsphänomene führten. Dabei wurde eine Korrelation zwischen der effizienten Glutamatsekretion und dem gegenüber Nichtproduzenten erhöhten Verhältnis ATP/ADP, bzw. der energy charge gefunden, zwei Energieparametern, die wichtige regulatorische Funktionen im Metabolismus innehaben (Atkinson, 1971; Lowry, 1971). Da ADP und AMP sofort nach der Biotingabe stark anstiegen, kam es zu einem unmittelbaren Absinken des ATP/ADP-Verhältnisses von 40 auf 2 und der energy charge von 0,85 auf 0,65, obwohl die ATP-Konzentration selbst erst mit einer Verzögerung von 2-3 Minuten signifikant absank (Abb. 25). Die nach der Biotinaddition erreichten Werte entsprachen denen von biotinsupplementierten Nichtproduzenten.

Allerdings kann die Zunahme von ADP und AMP nicht allein durch ein gleichzeitiges Absinken des ATP erklärt werden. Die Gesamtkonzentration der Adeninnukleotide stieg von 11 auf 13 mM an. Dieser Vorgang kann eventuell durch die Beteiligung des zellulären Adenosin- und Pyrophosphatpools erklärt werden. Durch Phosphorylierung des Adenosins wird AMP und daraus folgend ADP gebildet. Die Adeninnukleotidzunahme kann nicht durch Neusynthese über IMP (Chapman und Atkinson, 1977) erklärt werden, da der Anstieg des Adeninnukleotidgehalts mit einer zu hohen Geschwindigkeit abläuft.

Neben den bisher vorgestellten Hemmexperimenten, bei denen die Abnahme der Sekretionsgeschwindigkeit mit gleichzeitig auftretenden Veränderungen der Adeninnukleotidzusammensetzung in Zusammenhang gebracht wurde, ergaben sich noch weitere Möglichkeiten, diese Korrelation nachzuweisen. Als zusätzliche Kontrolle konnte diese Korrelation auch beim Übergang vom nichtsezernierenden in den sezernierenden Zustand gezeigt werden. Die zu Beginn der Experimente auftretende lag-Phase der Sekretion läßt sich durch ein anfangs reduziertes Verhältnis ATP/ADP, bzw. eine niedrige energy charge erklären. Erst mit der Zunahme dieser beiden Parameter begannen die Zellen mit der effizienten Sekretion. Sogar bei der Stimulierung von Aufnahmezellen zur Glutamatsekretion durch EDTA-Behandlung (vgl. III.4.1.) trat die Korrelation zwischen dem ATP/ADP-Verhältnis bzw. der energy charge und der Glutamatsekretion auf.

Die zuletzt vorgestellten Daten ermöglichten eine genauere Charakterisierung der Regulation der Glutamatsekretion und weisen deutlich auf die Möglichkeit hin, daß die Sekretion durch das Verhältnis ATP/ADP oder die energy charge reguliert wird. Die Untersuchungen beweisen jedoch nicht, ob die Adeninnukleotide als Triebkraft der Glutamatsekretion fungieren können. Es existieren jedoch zumindest einige aussagekräftige Hinweise für die Adeninnukleotide als Triebkraft: (I) Allein mit der Zusammensetzung der Adeninnukleotide trat in allen Experimenten eine eindeutige Korrelation auf. (II) Bei Produzenten ist das Verhältnis ATP/ADP (Faktor 20) ebenso wie die energy charge signifikant gegenüber Nichtproduzenten erhöht. (III) Die Eliminierung des Membranpotentials und die Umkehrung des Glutamatkonzentrationsgradienten übten keinen signifikanten Effekt auf die Sekretionsrate des anionischen Glutamats aus. Da man somit annehmen kann, daß das Membranpoten-

tial und der Konzentrationsgradient auf den Sekretionsprozeß nur einen geringen Einfluß im Vergleich zur tatsächlichen Triebkraft ausüben, kommt als Triebkraft nur ein energiereiches System wie die Adeninnukleotide in Frage.

Für einen endgültigen Beweis müssen die gewonnenen Ergebnisse entweder genetisch aufgrund von Sequenzvergleichen mit anderen ATP-abhängigen Systemen, durch biochemische Untersuchungen mit Vesikeln, oder mit dem rekonstituierten Carrier bestätigt werden. ATP-abhängige Exportsysteme sind bisher nur im Falle von Schwermetallresistenzen nachgewiesen worden. Hier basieren die Untersuchungen auf DNA Sequenzvergleichen (Mobley und Summers, 1987; Silver und Misra, 1988). Daneben wurden Kationen translozierende ATPasen (Heefner und Harold, 1980; Lynn und Rosen, 1987; Rhoads und Epstein, 1977; Walderhaug et al., 1987) als ATP-abhängige Transportmoleküle identifiziert. Bisher ist allein für das bindenproteinabhängige Histidinaufnahmesystem von *Salmonella typhimurium* und *Escherichia coli* mit genetischen und biochemischen Methoden eindeutig ein ATP-abhängiger Transportmechanismus aufgeklärt worden. Nachdem zunächst aufgrund von Sequenzvergleichen ein ATP-abhängiges System postuliert worden ist (Ames, 1986, 1988), versuchte man anschließend den biochemischen Nachweis mit ganzen Zellen (Joshi et al., 1989) zu erbringen. Die ATP-abhängigkeit wurde in "right side out" (Prossnitz et al., 1989) und "inside out" Membranvesikeln (Ames et al., 1989) dargestellt und im rekonstituierten System bestätigt (Bishop et al., 1989).

Für biotinlimitierte Nichtproduzenten entsprechen die analysierten Energieparameter, wie der ATP-Gehalt (5 - 7 mM), das Verhältnis ATP/ADP (2-3) und die energy charge (0,65) den allgemein bei Bakterien gefundenen Verhältnissen, wo für das Verhältnis ATP/ADP Werte zwischen 2 und 5, bzw. zwischen 0,7 und 0,9 für die energy charge angegeben werden (Chapman und Atkinson, 1977; Harrison, 1976; Karl, 1980, Otto et al., 1984). Im Vergleich dazu publizierten Kornilova et al. (1987) für das dem *Corynebacterium glutamicum* verwandte *Brevibacterium flavum* einen ATP-Gehalt von ca. 1 mM, ein Verhältnis ATP/ADP von 0,8 - 1,1 und eine energy charge zwischen 0,5 und 0,6. Die in der vorliegenden Arbeit bestimmten Werte für Produzenten liegen auf jeden Fall über denen von Nichtproduzenten und höher als allgemein für Bakterien beschrieben.

4. Modell der Glutamatsekretion

Abschließend soll basierend auf den bisherigen Überlegungen ein Modell für die Glutamatsekretion unter Biotinlimitierung bei *Corynebacterium glutamicum* aufgestellt werden. Durch die Biotinlimitierung werden zwei für die effiziente Glutamatsekretion essentielle Voraussetzungen erfüllt:

(I) Die Fettsäuresynthese wird in ihrer Aktivität gehemmt, wodurch es zu einer Reduktion der Phospholipide kommt und das Verhältnis Lipid/Protein in der Cytoplasmamembran verändert wird. Diese Veränderungen bewirken, eventuell durch Lipid-Protein-Wechselwirkungen die Aktivierung des bei Zellen, die auf Glucose als Substrat gewachsenen sind, vermutlich konstitutiven Sekretionscarriers. Die veränderte Cytoplasmamembran stellt zwar eine essentielle Voraussetzung für den effizienten Glutamatefflux dar, reicht allein jedoch nicht zur effizienten Sekretion aus, da der Carrier durch den energetischen und/oder metabolischen Zustand der Zellen reguliert wird. Die Regulation von Membranproteinen - insbesondere von Carriern - durch Lipid-Protein-Wechselwirkungen ist in der Literatur schon häufig beobachtet worden (Bishop, 1988; Lenaz, 1987; Leonard, 1981; Missiaen et al., 1989; Sanderman, 1978; Yeagle, 1989).

(II) Durch die Hemmung der Fettsäuresynthese kommt es aufgrund der anschließenden Behinderung des Zellwachstums auch zur Hemmung der Synthese von Makromolekülen, wie DNA, RNA und Proteine. Dadurch werden grundlegende Veränderungen im Metabolismus und Energiehaushalt der Zellen hervorgerufen, die aufgrund bisher noch nicht verstandener Mechanismen in einem erhöhten Verhältnis ATP/ADP und einer erhöhten energy charge münden. Diese Veränderungen stellen die zweite wichtige Voraussetzung für die aktive Sekretion dar. Vermutlich wird die Sekretion durch ATP getrieben und durch das Verhältnis ATP/ADP, bzw. die energy charge reguliert.

Die effiziente Sekretion findet nur dann statt, wenn wie im Fall der biotinlimitierten Produzenten beide Voraussetzungen zusammen eintreffen. Durch das veränderte Verhältnis Lipid/Protein wird der Sekretionscarrier aktiviert und aufgrund des erhöhten

Verhältnisses ATP/ADP kann er mit der max. Rate von 20 nmol/min x mgTg das Glutamat sezernieren. Demgegenüber repräsentieren biotinsupplementierte Nichtproduzenten einen Zelltyp, bei dem keine der beiden Voraussetzungen zutrifft. Da der Sekretionscarrier bei glucosegewachsenen Zellen vermutlich konstitutiv ist, weisen diese Zellen einen Grundefflux auf, der zwischen 0,5 und 1 nmol/min x mgTg liegt. Für einen kurzen Zeitraum nach der Effluxhemmung durch Biotinaddition (vgl. III.2.2. u. III.3.2.6.) existiert ein dritter Zelltyp, bei dem nur eine der beiden Voraussetzungen zutrifft: der Lipidgehalt ist noch auf dem Stand von Produzenten, jedoch das Verhältnis ATP/ADP ist bereits auf das Niveau von Nichtproduzenten gesunken. Bei diesem Zelltyp ist die Sekretion auf 20% des Wertes von Produzenten, also 4 - 5 nmol/min x mgTg, gesunken. Dieser Wert repräsentiert einen aktivierten Carrier, der aufgrund der reduzierten Triebkraft nicht mit maximaler Rate transportiert.

Der Zusammenhang zwischen der Biotinaddition und seinem Einfluß auf die Adeninnukleotide ist noch unbekannt, obwohl die Abhängigkeit von der Aktivität der Fettsäuresynthese nachgewiesen ist. Er ist nicht auf Veränderungen im NAD(P)H-Pool der Zellen zurückzuführen, wie man aufgrund der Abhängigkeit der Fettsäuresynthese von Redoxäquivalenten vermuten könnte (Die Biotinaddition zeigte keinen unmittelbaren Effekt auf den NAD(P)H-Gehalt der Zellen). Produzenten repräsentieren stationäre Zellen, bei denen neben der Fettsäuresynthese zwangsläufig auch die Protein-, DNA- und RNA-Synthese stagniert. Da neben dem Biotinmangel keine andere Limitierung vorliegt, können die Zellen sofort nach der Biotinaddition wieder mit der Makromolekülsynthese beginnen, wobei direkt oder indirekt ATP und ADP, das in Produzentenzellen in nur sehr geringen Mengen (< 0,3 mM) vorliegt, benötigt wird.

Im Anschluß an diese Erläuterungen stellt sich die Frage nach der Bedeutung dieses effizienten Sekretionssystems für *Corynebacterium glutamicum*. In Anlehnung an die Befunde von Neijssel und Tempest (1979, 1986) zur Metabolitüberproduktion bei *Klebsiella aerogenes* kann man davon ausgehen, daß diverse Sekretionssysteme unter Mikroorganismen weit verbreitet sind, und unter außergewöhnlichen physiologischen Situationen, z.B. unter Mangelbedingungen, aktiviert werden. Die Autoren zeigten, daß *Klebsiella aerogenes* bei der Anzucht unter verschiedenen Wachstumslimitierungen, die

durch NH_4^+ -, PO_4^{3-} -, K^+ -, oder Mg^{2+} -Mangel hervorgerufen wurden, verschiedene Metabolite sezernierte. Nur wenn die C-Quelle wachstumslimitierend eingesetzt wurde, kam es nicht zum Metabolitefflux. Aufgrund der Wachstumshemmung und der fehlenden Regulation des Energiestoffwechsels wird die Glucose nicht vollständig, sondern nur bis hin zu bestimmten Intermediaten abgebaut, die ausgeschieden werden (Tempest und Neijssel, 1980; Tempest, 1978). Der hohe Substratumsatz bewirkt möglicherweise während der Wachstums-limitierung ein hohes Energieniveau.

Die Existenz des Glutamatsekretionscarriers für *Corynebacterium glutamicum* kann eventuell analog zu den von Neijssel und Tempest (1976) beschriebenen Effluxsystemen erklärt werden, die bei vielen Bakterien in extremen physiologischen Situationen wichtige Funktionen erfüllen. Ein weiterer Analogieschluß zu diesen Systemen, wonach allgemeine Wachstums-limitierungen die Metabolitsekretion hervorrufen, wie bereits von Kikuchi und Nakao (1973a) für *Corynebacterium alkanolyticum* vermutet, ist allerdings nicht ohne weiteres möglich. Die Biotinlimitierung führt zwar zu einer Wachstumshemmung und einer Veränderung des Energiehaushalts der Zellen, jedoch wird hierdurch nur eine der zwei Voraussetzungen für die effiziente Sekretion erfüllt. Die zweite Voraussetzung, die veränderte Cytoplasmamembran, kann nur durch einen sehr speziellen Effekt der Biotinlimitierung - die Hemmung der Fettsäuresynthese - erfüllt werden, und paßt somit nicht in das allgemeine Konzept. Gegen diese Möglichkeit sprechen auch die Befunde, daß die effiziente Glutamatsekretion nicht durch Wachstumshemmung aufgrund allgemeiner Mangelbedingungen herbeigeführt werden kann. In Limitierungsexperimenten bewirkten K^+ -, PO_4^{3-} - oder Spurenelementemangel keinen effizienten Efflux. Auch die Fermentation der isoleucinauxotrophen Mutante EB 3, die einen Defekt in der Threonin-Desaminase aufweist (Boles, 1990), führte bei wachstumslimitierenden Isoleucinkonzentrationen zu keiner deutlich erhöhten Glutamatsekretion. Ähnliche Untersuchungen sind von Linton (1990) mit Chemostatkulturen von *Corynebacterium glutamicum* durchgeführt worden, in der Absicht, unter wachstumslimitierenden Bedingungen die Organismen zur Glutamatsekretion anzuregen. Jedoch fand Linton weder unter N- noch unter PO_4^{3-} -Limitierung eine nennenswerte Metabolitsekretion. Nur eine Wachstums-limitierung durch Biotinmangel rief eine Glutamatsekretion hervor.

Zusammengefaßt wird die Glutamatsekretion demnach durch einen Effluxcarrier katalysiert, dessen Existenz sich eventuell durch das von Neijssel und Tempest (1976) aufgestellte Konzept für die Metabolitüberproduktion bei Bakterien erklären läßt. Im Gegensatz zu den allgemeinen Effluxsystemen benötigt dieser Carrier neben den durch die Wachstumshemmung hervorgerufenen metabolischen Veränderungen als spezielle Voraussetzung für seine Aktivität zusätzlich noch Lipidveränderungen in der Membran.

V. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zum Mechanismus der Glutamatsekretion unter Biotinlimitierung bei dem biotin-auxotrophen Glutamatproduzenten *Corynebacterium glutamicum* durchgeführt. Dabei kam der neuentwickelten Methode der Kurzzeitfermentation ein besonderer Stellenwert zu.

1) Die zwei in der Literatur für die Glutamatsekretion beschriebenen Modelle, Modell I ("leak") und Modell II ("Inversionscarrier") wurden auf ihre Gültigkeit für die Glutamatsekretion hin untersucht. Durch eingehende biochemische und bioenergetische Analyse des Sekretionsprozesses konnte Modell I eindeutig ausgeschlossen werden. Auch Modell II stellte sich als zumindest sehr unwahrscheinlich heraus. Die Ergebnisse sprachen für ein drittes bisher in der Literatur noch nicht vorgeschlagenes Modell, einen energie-abhängigen, regulierten Sekretionscarrier.

2) Biotinlimitierte Glutamatproduzenten wiesen im Vergleich zu biotinsupplementierten Nichtproduzenten einen reduzierten Lipidgehalt und eine veränderte Lipidzusammensetzung auf.

3) In einem neuartigen experimentellen Ansatz wurden Produzenten durch Biotinaddition innerhalb eines sehr kurzen Zeitraums in der Glutamatsekretion gehemmt. Dabei wurden innerhalb der ersten Minuten nach dem Umschalten von hoher zu niedriger Sekretion Veränderungen in der Fettsäure- und der Phospholipidzusammensetzung und in der Sekretionsrate analysiert.

4) Es stellte sich heraus, daß die mit der Biotinaddition einhergehenden Veränderungen in Zusammensetzung und Gehalt der Phospholipide und Fettsäuren zeitlich nicht mit der schnellen Sekretionshemmung einhergingen. Es wurden weder eine spezifische Fettsäure noch ein spezifisches Phospholipid gefunden, die die Sekretion regulieren könnten. Eine effiziente Glutamatsekretion trat nur dann auf, wenn der Lipidgehalt der Zellen reduziert war. Obgleich Membranveränderungen für eine hohe Sekretionsaktivität eine notwendige Voraussetzung darstellen, reichen sie allein nicht aus, um einen effizienten Export herbeizuführen.

5) Die für die Glutamatsekretion am ehesten als Triebkräfte erwarteten energetischen Parameter, das Membranpotential und der Glutamatkonzentrationsgradient ($\text{int} > \text{ext}$), konnten als Triebkräfte ausgeschlossen werden, da die Zellen auch bei gleichzeitigem Ausschalten beider Parameter mit unverändert hoher Rate Glutamat sezernierten.

6) Die effiziente Glutamatsekretion korrelierte im Verlauf einer Vielzahl unterschiedlicher Experimente einzig und allein mit der Adeninnukleotidzusammensetzung der Zellen. Produzenten besaßen gegenüber Nichtproduzenten einen stark erhöhten ATP-Gehalt. Das Verhältnis ATP/ADP und die energy charge wiesen bei Produzenten ebenfalls wesentlich höhere Werte auf. Durch Absenkung des ATP-Gehalts, bzw. des Verhältnisses ATP/ADP und der energy charge sank unter allen getesteten Bedingungen zeitgleich die Sekretionsrate.

7) Ein Modell für den Mechanismus der carrierkatalysierten Glutamatsekretion, das die notwendigen Veränderungen in der Cytoplasmamembran und die Veränderungen in der Adeninnukleotidzusammensetzung mit einbezieht, wurde konzipiert und diskutiert.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- Ahmed, S., und I. R. Booth. 1983. The use of valinomycin, nigericin, and trichlorocarbanilide in control of the protonmotive force in *Escherichia coli* cells. *Biochem. J.* 212:105-112.
- Ames, F. L. G., K. Nikaido., J. Groarkes, und J. Petithory. 1989. Reconstitution of periplasmic transport in inside-out membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 264:3998-4002.
- Ames, G. F.-L. 1986. Bacterial periplasmic transport systems: structure, mechanism, and evolution. *Ann. Rev. Biochem.* 55:397-425.
- Ames, G. F.-L. 1988. Structure and mechanism of bacterial periplasmic transport systems. *J. Bioenerg. Biomembr.* 20:1-18.
- Anraku, Y. 1980. Transport and utilization of amino acids by bacteria. P 9-33. In J. W. Paine (ed.). *Microorganisms and nitrogen sources*. John Wiley & Sons. New York.
- Atkinson, D. E. 1971. Adenine nucleotides as universal stoichiometric metabolic coupling agents. *Adv. Enzyme Regul.* 9:207-219.
- Bergmeyer, H. U., E. Bernt, F. Schmidt, und H. Storck. 1974. D-Glucose. Bestimmung mit Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, p. 1241-1246. In H. U. Bergmeyer (ed.), *Methoden der enzymatischen Analyse*, Band II. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße.
- Beutler, H. O., und G. Michal. 1974. L-Glutamatbestimmung mit Glutamat-Dehydrogenase, Diaphorase und Tetrazoliumsätzen, p. 1753-1759. In H. U. Bergmeyer (ed.), *Methoden der enzymatischen Analyse*, Band II. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße.
- Bishop, L., R. Agbayani, Jr., S. V. Ambudkar, P. C. Maloney, und G. F. L. Ames. 1989. Reconstitution of a bacterial periplasmic permease in proteoliposomes and demonstration of ATP hydrolysis concomitant with transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:6953-6957.
- Bishop, W. R. 1988. Assembly of phospholipids into cellular membranes: biosynthesis, transmembrane movement and intracellular translocation. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 4:579-610.
- Bligh, E. D., und W. J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canad. J. Biochem. Biophysiol.* 37:911-917.
- Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica. 1984. *Methoden der enzymatischen Lebensmittelanalytik*.
- Boles, E. 1990. Untersuchungen zur Induktion der Isoleucinaufnahme in Threonindesaminase-defekten Mutanten von *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit, Universität Köln.
- Boos, W. 1974. Bacterial transport. *Ann. Rev. Biochem.* 43:123-146.

Ten Brink, B., und W. N. Konings. 1886. Generation of a proton motive force. *Methods in Enzymology*. Vol. 125:492-510.

Britz, M. L., und A. L. Demain. 1985. Regulation of metabolite synthesis. P 617-636. In M. Moo-Young (ed.). *Comprehensive Biotechnology*. Vol. I. Pergamon Press. Oxford.

Bunch, A. W., und R. E. Harris. 1986. The manipulation of micro-organisms for the production of secondary metabolites. *Biotechnol. Gen. Engin. Rev.* 4:117-144.

Chapman, A. G., und D. E. Atkinson. 1977. Adenine nucleotide concentrations and turnover rates. Their correlation with biological activity in bacteria and yeast. *Adv. Microbial. Physiol.* 15:253-306.

Chen, P. S., T. J. Toribura, und H. Warner. 1956. Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.* 28:1756-1758.

Clement, Y., und G. Lanéelle. 1986. Glutamate excretion mechanism in *Corynebacterium glutamicum*: triggering by biotin starvation or by surfactant addition. *J. Gen. Microbiol.* 132:925-929.

Clement, Y., B. Escoffier, M. C. Trombe, und G. Lannéelle. 1984. Is glutamate excreted by its uptake system in *Corynebacterium glutamicum*? A working hypothesis. *J. Gen. Microbiol.* 130:2589-2594.

Collins, M. D., und C. S. Cummins. 1986. *Brevibacterium*. P. 1266-1276. In Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. II.

Collins, M. D., M. Goodfellow, und D. E. Minnikin. 1982. Fatty acid composition of some mycolic acid-containing coryneform bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 128:2503-2509.

Crueger, W., und A. Crueger. 1989. Aminosäuren. S. 142-163. In Crueger, W., und A. Crueger (Ed.) *Biotechnologie - Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie*. Oldenbourg Verlag, München, Wien.

Demain, A. L., und J. Birnbaum. 1968. Alteration of permeability for the release of metabolites from the microbial cell. *Current Topics Microbiol. Immunol.* 46:1-25.

Dimroth, P. 1987. Sodium ion transport decarboxylases and other aspects of sodium ion cycling in bacteria. *Microbiol. Rev.* 51:320-340.

Dimroth, P., und A. Thomer. 1988. Dissociation of the sodium-ion-translocating oxaloacetate decarboxylase of *Klebsiella pneumoniae* and reconstitution of the active complex from the isolated subunits. *Eur. J. Biochem.* 175:175-180.

Ebbighausen, H., B. Weil, und R. Krämer. 1989a. Transport of branched-chain amino acids in *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* 151:238-244.

Ebbighausen, H., B. Weil, und R. Krämer. 1989b. Isoleucine excretion in *Corynebacterium glutamicum*: evidence for a specific efflux carrier system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31:184-190.

- Finnerty, W. R. 1978. Physiology and Biochemistry of bacterial phospholipid metabolism. *Adv. Microbial Physiol.* 18:177-233.
- Funabashi, H., A. Kawaguchi, H. Tomada, S. Omura, S. Okuda, and S. Iwasaki. 1989. Binding site of cerulenin in fatty acid synthetase. *J. Biochem.* 105:751-755.
- Furuya, A. 1976. In Ogata, K., K. Kinoshita, T. Tsunoda, and K. Ogata (eds.) p. 125-156. Kodansha, Tokyo, and Wiley, New York.
- Furuya, A., S. Abe., and S. Kinoshita. 1968. Production of nucleic acid-related substances by fermentative processes. XIX. Effects of manganese and adenine on 5'-inosinic acid by a mutant of *Brevibacterium ammoniagenes*. *Agric. Biol. Chem.* 34:210-221.
- Furuya, A., S. Abe., and S. Kinoshita. 1970. Production of nucleic acid-related substances by fermentative processes. XXXI. Accumulation of 5'-inosinic acid by a mutant of *Brevibacterium ammoniagenes*. *Appl. Microbiol.* 16:981-987.
- Harold, F. M. 1986. The vital force: A Study Of Bioenergetics. W. H. Freeman and Company. New York.
- Harrison, D. E. F. 1976. The regulation of respiration in growing bacteria. *Adv. Microbial. Physiol.* 14:243-313.
- Hedstrom, R. C., B. P. Crider, and R. G. Eagon. 1982. Comparison of kinetics of active tetracycline uptake and active tetracycline efflux in sensitive and plasmid RP4-containing *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 152:255-259.
- Heefner, D. L., and F. M. Harold. 1980. ATP-linked sodium transport in *Streptococcus faecalis*. The sodium circulation. *J. Biol. Chem.* 255:11396-11402.
- Hellingwerf, K. J., and W. N. Konings. 1985. The energy flow in bacteria: The main free energy intermediates and their regulatory role. *Adv. Microbial. Physiol.* 26:125-154.
- Heytler, P. D. 1979. Uncouplers of oxidative phosphorylation. *Methods in Enzymology*, vol XV:462-472.
- Hirose, Y., H. Enai, and H. Shibai. 1985. P 593-600. In Moo-Young, M., W. H. Blanch, S. Drew., and . I. C. Wang. (eds.). *Comprehensive Biotechnology*. Pergamonn Press. Oxford.
- Hoischen, C., and R. Krämer. 1989. Evidence for an efflux carrier system involved in the secretion of glutamate by *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* 151:342-347.
- Hoischen, C., and R. Krämer. 1990a. Mechanism of glutamate secretion in *Corynebacterium glutamicum*, p. 127-130. In Behrens, D. and A. J. Driesel (eds.), *Dechema Biotechnology Conferences*, Vol. 3A, Verlag Chemie, Weinheim Bergstraße
- Hoischen, C., and R. Krämer. 1990b. Membrane alteration is necessary but not sufficient for effective glutamate secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bact.* 172:3409-3416.

- Hucheng, A., M. Marquet, M. Welby, H. Montrozier, G. Goma, and G. Lanéelle. 1984. Glutamate excretion triggering mechanism: A reinvestigation of the surfactant-induced modification of cell lipids. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*. 135B:53-67.
- Joshi, A. K., S. Ahmed, and G. F. L. Ames. 1989. Energy coupling in bacterial periplasmic transport systems. *J. Biol. Chem.* 264:2126-2133.
- Kanzaki, T., K. Isobe., H. Okazaki, and H. Fukuda. 1969. L-glutamic acid fermentation. Part II. Relation between biotin and oleic acid. *Agric. Biol. Chem.* 33:771-780.
- Karl, D. M. 1980. Cellular nucleotide measurements and applications in microbial ecology. *Microbiol. Rev.* 44:739-796.
- Kase, H., and K. Nakayama. 1972. Produktion of L-threonine by analog-resistant mutants. *Agric. Biol. Chem.* 36:1611-1621.
- Kashket, E. R. 1985. The proton motive force in bacteria: a critical assessment of methods. *Ann. Rev. Microbiol.* 39:219-242
- Kates, M. 1972. Techniques of lipidology. P. 354-465. In T. S. Work, and E. Work (eds.), laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, vol. 3. North-Holland, Amsterdam. American Elsevier, New York.
- Kawaguchi, A., H. Tomada, S. Okuda, J. Awaya, and S. Omura. 1979. Cerulenin resistance in a cerulenin-producing fungus. Isolation of cerulenin insensitive fatty acid synthetase. *Arch. Biochem. Biophys.* 197:30-35.
- Kikuchi, M., and Y. Nakao. 1972. Change in permeability to L-glutamic acid in the glycerol auxotroph GL-21. *Agric. Biol. Chem.* 36:1135-1140.
- Kikuchi, M., and Y. Nakao. 1973a. Relation between cellular phospholipids and the excretion of L-glutamic acid by a glycerol auxotroph of *Corynebacterium alkanolyticum*. *Agric. Biol. Chem.* 37:509-514.
- Kikuchi, M., and Y. Nakao. 1973b. Relation between cellular phospholipids and the excretion of L-glutamic acid by a glycerol auxotroph of *Corynebacterium alkanolyticum*. *Agric. Biol. Chem.* 37:515-519.
- Kikuchi, M., and Y. Nakao. 1986. Glutamic acid, p. 101-116. In K. Aida, I. Chibata, K. Nakayama, K. Takinami, and H. Yamada (eds.), Progress in industrial microbiology, vol 24. Kodansha LTD, Tokyo. Elsevier, Amsterdam.
- Kikuchi, M., Kanamaru, T., and Y. Nakao. 1973. Relation between the extracellular accumulation of L-glutamic acid and the excretion of phospholipids by penicillin-treated *Corynebacterium alkanolyticum*. *Agric. Biol. Chem.* 37:2405-2408.
- Kikuchi, M., M. Doi, M. Suzuki, and Y. Nakao. 1972. Culture conditions for the production of L-glutamic acid from n-paraffins by glycerol auxotroph GL-21. *Agric. Biol. Chem.* 36:1141-1146.

- Kimura, K. 1962. The significance of glutamic dehydrogenase in glutamic acid fermentation. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 4:253-260.
- Kimura, K. 1963. The effect of biotin on the amino acid biosynthesis by *Micrococcus glutamicus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 9:205-212.
- Kinoshita, K., and K. Nakayama. 1978. Amino acids. P 209-261. In Rose, A. H. (ed.). *Economic microbiology*. Vol. II. Primary products of metabolism. Academic Press. London.
- Kinoshita, S. 1985. Glutamic acid bacteria. P 115-142. In Demain, A. and N. Solomon (eds.). *Biology of industrial microorganisms*. The Benjamin/Cummings Publishing Company.
- Kinoshita, S., and K. Tanaka. 1972. Glutamic acid, p. 263-324. In K. Yamada, S. Kinoshita, T. Tsunoda, and K. Aida (eds.), *The microbial production of amino acids*. Kodansha, Tokyo. John Wiley and Sons, New York.
- Kinoshita, S., S. Uda, and M. Shimino. 1957. Studies on the amino acid fermentation. I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 3:193-205.
- Kitano, K., Y. Sugiyama, and T. Kanazaki. 1972. L-Glutamate fermentation with acetic acid by an oleic acid requiring mutant. II. Inhibitory factors against the extracellular accumulation of L-glutamate. *J. Ferment. Technol.* 50:182-191.
- Kleemann, A., W. Leuchtenberger, B. Hoppe, and H. Tanner. 1985. Amino acids. P 57-97. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim/Bergstraße. Vol. A2.
- Klingenberg, M., and E. Pfaff. 1967. Means of terminating reactions. *Methods in Enzymology*, vol X:680-684.
- Knowles, J. R. 1989. The mechanism of biotin dependent enzymes. *Annual Rev. Biochem.* 58:195-221.
- Kobayashi, K., S. Ikeda, K. Hishinuma, Y. Hirose, and H. Okada. 1972. Conditions of oxygen supply in L-glutamic acid fermentation from hydrocarbon. *Agric. Biol. Chem.* 36:961-966.
- Kobayashi, K., S. Ikeda, K. Takinami, Y. Hirose, and T. Shiro, 1971. Production of L-glutamic acid from hydrocarbon by penicillin-resistant mutants of *Corynebacterium hydrocarboclastus*. *Agric. Biol. Chem.* 35:1241-1247.
- Komura, I., K. Yamada, S.I. Otsuka, and K. Komagata. 1975. Taxonomic significance of phospholipids in coryneform and nocardioform bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 21:251-261.
- Konings, W. N. 1977. Active transport of solutes in bacterial membrane vesicles. *Adv. Microbial. Physiol.* 15:175-251.
- Konings, W. N. 1985. Generation of metabolic energy by end-product efflux. *Trends in Biochemical sciences.* 8:317-319.

- Konings, W. N., und P. A. M. Michels. 1980. Electron transfer-driven solute translocation across bacterial membranes, p. 33-86. In C. J. Knowles (ed.), Diversity of Bacterial Respiratory Systems. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Kornilova, I. G., V. G. Mishneva, V. D. Shats, und Y. E. Shvinka. 1988. Change in nucleotide pool of *Brevibacterium flavum* cells that oxidize molecular hydrogen, established by High-Performance Liquid Chromatography. Microbiology. 57:142-146.
- Krämer, R., H. Ebbighausen, und C. Hoischen. 1988. Transport of amino acids in *Corynebacterium glutamicum*, p. 33-42. In Quagliariello, E., und F. Palmieri. (eds.) Molecular basis of biomembrane transport. Elsevier, Amsterdam.
- Krämer, R., und C. Lambert. 1990a. Uptake of glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. I. Kinetic properties and regulation by internal pH and potassium. Eur. J. Biochem. Angenommen zur Veröffentlichung.
- Krämer, R., Lambert, C., Ebbighausen, H., und C. Hoischen. 1990b. Uptake of glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. II. Evidence for a primary active transport system. Eur. J. Biochem. Angenommen zur Veröffentlichung.
- Landick, R., D. L. Oxender, und G. Ferro-Luzzi Ames. 1984. Bacterial amino acid transport systems. P 577-615. In Martonosi (ed.). The enzymes of biological membranes. Plenum Publishing Corp. New York.
- Laubinger, W., und P. Dimroth. 1988. Characterization of the ATP synthase of *Propionigenium modestum* as a primary sodium pump. Biochemistry. 27:7531-7537.
- Lefebvre, Y., P. Couture, und D. Couillard. 1988. An analytical procedure for the measurement of ATP extracted from activated sludge. Can. J. Microbiol. 34:1275-1279.
- Lenaz, G. 1987. Lipid fluidity and membrane protein dynamics. Bioscience Reports. 7:823-837.
- Leonard, J. E., C. A. Lee., A. J. Apperson, S. S. Dills, und M. H. Saier, Jr. 1981. The role of membranes in the transport of small molecules. P 1-52. In B. K. Gosh (ed.). Organization of prokaryotic cell membranes. CRC Press Inc. Boca Raton.
- Leuchtenberger, W. 1984. Enzymatische und mikrobielle Herstellung von L-Aminosäuren. CLB Chemie für Labor und Betrieb. 35:178-283.
- Linnett, P. E., und R. B. Beechey. Inhibitors of the ATP Synthetase System. Methods in Enzymology, vol XV:472-518.
- Linton, J. D. 1990. The relationship between metabolite production and the growth efficiency of the producing organism. Fems Microbiol. Revs. 75:1-18
- Lowry, O. H., J. Carter, J. B. Ward, und L. Glaswer. 1971. The effect of carbon and nitrogen sources on the level of metabolic intermediates in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 246:6511-6521.

- Lundin, A., A. Rickardson, und A. Thore. 1976. Continuous monitoring of ATP-converting reactions by purified firefly luciferase. *Anal. Biochem.* 75:611-620.
- Luntz, M. G., N. I. Zhdanova, und G. I. Bourd. 1986. Transport and excretion of L-lysine in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Gen. Microbiol.* 132: 2137-2146.
- Lübben, M., und G. Schäfer. 1989. Chemiosmotic energy conversion of the archaebacterial thermoacidophile *Sulfolobus acidocaldarius*: Oxidative phosphorylation and the presence of an F_0 -related N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-binding proteolipid. *J. Bacteriol.* 171:6106-6116.
- Lynn, A. R., und B. P. Rosen. 1987. Calcium transport in prokaryotes. P 181-201. In Rosen, B. P., and S. Silver (eds.). *Ion transport in prokaryotes*. Academic Press. San Diego.
- Marquet, M., J. L. Uribellarrea, A. Hucheno, G. Lanéelle, and G. Goma. 1986. Glutamate excretion by *Corynebacterium glutamicum*: a study of glutamate accumulation during a fermentation course. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25:220-223
- McMurry, L. M., B. H. Park, V. Burdett, and S. B. Levy. 1987. Energy-dependent efflux mediated by class L (TetL) tetracycline resistance determinant from streptococci. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 31:1648-1650.
- Michel, T. A., und J. M. Macy. 1990. Generation of a membrane potential by sodium-dependent succinate efflux in *Selenomonas ruminantium*. *J. Bacteriol.* 172:1430-1435.
- Milner, J. L., B. Vink, und J. M. Wood. 1987. Transmembrane amino acid flux in bacterial cells. *CRC Critical Rev. Biotechnol.* 5:1-47.
- Missiaen, L., L. Raeymaekers, F. Wuytack, M. Vrolix, H. de Smedt, und R. Casteels. 1989. Phospholipid-protein interactions of plasma-membrane Ca^{2+} -transporting ATPase. *Biochem. J.* 263:687-694.
- Mitchell, P. 1966. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biological Reviews.* 41:445-502
- Mitchell, P. 1970. Membranes of cells and organelles: Morphology, transport and metabolism. *Symposium of the Society for General Microbiology.* 20:121-166
- Mitchell, P. 1972. Chemiosmotic coupling in energy transduction: a logical development of biochemical knowledge. *Bioenergetics* 3:5-24.
- Mobley, H. L., und A. O. Summers. 1987. Plasmid-encoded ion transport systems. P 305-326. In Rosen, B. P., und S. Silver (eds.). *Ion transport in prokaryotes*. Academic Press. San Diego.
- Mori, M., und I. Shio. 1987. Pyruvate formation and sugar metabolism in an amino acid-producing bacterium, *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.* 54:129-138.

- Nakanishi, T., T. Hirao, T. Azuma, M. Sakurai, and H. Hgino. 1987. Application of L-glutamate to proline fermentation by *Corynebacterium acetoacidophilum*. J. Ferment. Technol. 65:139-244.
- Nakao, Y., Kanamaru, T., Kikuchi, M., and S. Yamatodani. 1973. Extracellular accumulation of phospholipids, UDP-N-Acetylhexosamine derivatives and L-glutamic acid by penicillin-treated *Corynebacterium alkanolyticum*. Agric. Biol. Chem. 37:2399-2404.
- Nakao, Y., M. Kikuchi, M. Suzuki, and M. Doi. 1972. Microbial production of L-glutamic acid by glycerol auxotrophs. Part I. Induction of glycerol auxotrophs and production of L-glutamic acid from n-paraffins. Agric. Biol. Chem. 36:490-496.
- Nakayama, K. 1982. Amino acids. P 748-801. In Reed, C. (ed.). Industrial microbiology. Prescott & Dunn's. AVI Publ. Comp. Inc. Westport, USA.
- Nakayama, K., A. Araki, H. Hagino, H. Kase, and H. Yoshida. 1974. Amino acid fermentation using regulatory mutants of *Corynebacterium glutamicum*. P. 437-449. In McDonald, K. D. (ed.) Second Int. Symp. Genet. Industr. Microorg. (GIM 74). Academic Press, London.
- Neijssel, O. M., and D. W. Tempest. 1979. The physiology of metabolite overproduction. Microbial Technology, Symp. Soc. Gen. Microbiol. 29:53-82.
- Neijssel, O. M., and D. W. Tempest. 1985. Overproduction of microbial metabolites. P 605-616. In Moo-Young, M. (ed). Comprehensive Biotechnology. Vol I. Pergamon Press, Frankfurt.
- Nunheimer, T. D., J. Birnbaum, E. D. Ihnen, and A. L. Demain. 1970. Product inhibition of the fermentative formation of glutamic acid. Appl. Microbiol. 20:215-217.
- Oishi, K., and K. Aida. 1965. Studies on amino acid fermentation. Part XI. Effect of biotin on the Embden-Meyerhof-Parnas Pathway and the hexose-monophosphate shunt in a glutamic acid-producing bacterium, *Brevibacterium ammoniagenes* 317-1. Agric. Biol. Chem. 29:83-89.
- Omura, S. 1981. Cerulenin. Methods in Enzymology, vol. 72:520-532.
- Otsuka S. I., Und I. Shiio. 1968. Fatty acid composition of cell wall-cell membrane fraction from *Brevibacterium flavum*. J. Gen. Appl. Microbiol. 14:135-146.
- Otto, R., R. G. Langeven, H. Veldkamp, and W. N. Konings. 1982. Lactate efflux-induced electrical potential in membrane vesicles of *Streptococcus cremoris*. J. Bacteriol. 149:733-738.
- Otto, R., B. Klont, B. ten Brink, and W. N. Konings. 1984. The phosphate potential, adenylate energy charge and proton motive force in growing cells of *Streptococcus cremoris*. Arch. Microbiol. 139:338-343.

- Poolman, B., A. J. M. Driessen, and W. N. Konings. 1987. Regulation of solute transport in Streptococci by external and internal pH values. *Microbiol. Rev.* 51:498-508.
- Poolman, B., E. D. Smid, and W. N. Konings. 1987. Kinetic properties of a phosphate-bond-driven glutamate-glutamine system in *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. *J. Bacteriol.* 169:1755-2761.
- Postma, P. W., and J. W. Lengeler. 1985. Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferasesystem of bacteria. *Microbiological Revs.* 49:232-269.
- Prossnitz, E., A. Gee., and G. F. L. Ames. 1989. Reconstitution of the histidine periplasmic transport system in membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 264:5006-5014.
- Reed, P. W. 1979. Ionophores. *Methods in Enzymology*, vol XV:436-454.
- Reizer, J. 1989. Regulation of sugar uptake und efflux in gram positive bacteria. *FEMS Microbiol. Revs.* 63:149-156.
- Reizer, J., and C. Panos. 1980. Regulation of β -galactoside phosphate accumulation in *Strptococcus pyogenes* by an expulsion mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:5497-5501.
- Reizer, J., M. H. Saier, Jr., J. Deutscher, F. Grenier, J. Thompson, and W. Hengstenberg. 1988. The phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system in gram positive bacteria: Properties, mechanism and regulation. *CRC Crit. Revs. Microbiol.*, 15:297-338.
- Rhoads, D. B., and W. Epstein. 1977. Energy coupling to net K^+ transport in *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.* 252:1394-1401.
- Rottenberg, H. 1979. The measurement of membrane potential and pH in cells, organelles, and vesicles. *Methods in Enzymology*, vol 55:547-569.
- Ruklish, M. P., D. F. Marauska, and U. É. Viestur. 1979. Nature of the regulation of enzymes of glucose and acetic acid metabolism in lysine-forming *Brevibacterium flavum*. *Microbiology* 47:804-808.
- Ruklish, W. P., M. É. Duntse, V. A. Levane, and R. V. Kalninya. 1987. Characteristics of the operation of the tricarboxylic acid cycle in *Brevibacterium flavum* and *Micrococcus glutamicus*. *Microbiology* 56:592-596.
- Saier, M. H., Jr. 1979. The role of the cell surface in regulating the internal environment, p. 167-227. In I. C. Gunsalus, J. R. Sokatch, and L. N. Ornston (eds.), *The bacteria*, vol. VII. Academic Press, New York.
- Saier, M. H., Jr. 1989. Current studies on the bacterial phosphotransferase system in the Saier laboratory. *FEMS Microbiol. Revs.*, 63:183-192.
- Saier, M. H., Jr., M. Yamada, J. Lengeler, B. Erni, K. Suda, P. Argos, K. Schnetz, B. Rak, C. A. Lee, G. C. Stewart, K. G. Geri, and E. B. Waygood. 1988. Sugar permeases of the bacterial phospho-

enolpyruvate-dependent phosphotransferase system: sequence comparisons. *FASEB J.* 2:199-208.

Sandermann, H., Jr. 1978. Regulation of membrane enzymes by lipids. *Biochim. Biophys. Acta.* 515:209-237.

Santamaria, R., J. G. Gil, and J. F. Martin. 1985. High-frequency transformation of *Brevibacterium lactofermentum* protoplasts by plasmid DNA. *J. Bacteriol.* 162:463-467.

Schimz, K. L., B. Rütten, and M. Tretter. 1981. Determination of adenosine nucleotides with luciferin/luciferase from crude firefly lantern extract on a bioluminescence analyser. *Adv. Biotechnol.* 1:457-462.

Schmid, J., and G. Auling. 1989. Alterations of the membrane composition induced by manganese depletion are late events in the nucleotide fermentation with *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6872. *Agric. Biol. Chem.* 53:1783-1788.

Shibukawa, M., and T. Ohsawa. 1966. L-Glutamic acid fermentation with molasses. Part IV. Effect of saturated-unsaturated fatty acid ratio in the cell membrane fraction on the extracellular accumulation of L-glutamate. *Agric. Biol. Chem.* 30:750-758.

Shibukawa, M., M. Kimura, S. Okabe, and T. Ohsawa. 1968. L-glutamic acid fermentation with molasses. Part X. On the difference in fatty acid derivative and penicillin mechanisms for the bacterial extracellular accumulation of L-glutamate. *Amino Acid Nucleic Acid.* 17:61-65

Shibukawa, M., M. Kurima, and S. Oruchi. 1970. L-glutamic acid fermentation with molasses. Part XII. Relationship between the kind of phospholipids and their fatty acid composition in the mechanism of extracellular accumulation of L-glutamate. *Agric. Biol. Chem.* 34:1136-1141.

Shiio, I. 1960. Bacterial formation of glutamic acid from acetic acid. I. Glutamate formation and its related enzymes in *Brevibacterium flavum*, No. 2247. *J. Biochem.* 47: 273-282.

Shiio, I., and H. Ozaki. 1970. Regulation of adenine dinucleotide phosphate-specific glutamate dehydrogenase from *Brevibacterium flavum*. *J. Biochem.* 68:633-647.

Shiio, I., and K. Ujigawa. 1978. Enzymes of the glutamate and aspartate synthetic pathway in a glutamate-producing bacterium, *Brevibacterium flavum*. *J. Biochem.* 84:647-657.

Shiio, I., and K. Ujigawa-Takeda. 1979. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase by synergistic action of aspartate and 2-oxoglutarate. *Agric. Biol. Chem.* 43:1479-2485.

Shiio, I., and K. Ujigawa-Takeda. 1980. Presence and regulation of 2-ketoglutarate dehydrogenase complex in a glutamate-producing bacterium, *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.* 44:1897-1904.

Shiio, I., S.-I. Otsuka, and T. Tsunoda. 1959. Glutamic acid formation from glucose by bacteria. I. Enzymes of the Embden-

Meyerhof-Parnas pathway, the Krebs-cycle, and the Glyoxylate bypass in cell extracts of *Brevibacterium flavum* No. 2247. J. Biochem. 46:1303-1311.

Shiio, S., S. I. Otsuka, und M. Takahashi. 1962 a. Effect of biotin on the bacterial formation of glutamic acid. I. Glutamate formation and cellular permeability of amino acids. J. Biochem. 51:56-62.

Shiio, I., S. I. Otsuka, und M. Katsuya. 1962 b. Effect of biotin on the bacterial formation of glutamic acid. II. Metabolism of glucose. J. Biochem. 52:108-116.

Shiio, I., K. Narui, N. Yahaba, und M. Takahashi. 1962 c. Free intracellular amino acid of a glutamate-forming bacterium, *Brevibacterium flavum* No. 2247. Analysis and release. J. Biochem. 51:109-111.

Shiio, I., S. I. Otsuka, und M. Katsuya. 1963. Cellular permeability and extracellular formation of glutamic acid in *Brevibacterium flavum*. J. Biochem. 53:333-340.

Shiio, I., H. Momose, und A. Oyama. 1969. Genetic and biochemical studies on bacterial formation of L-glutamate. I. Relationship between isocitrate lyase, acetate kinase and phosphate acetyltransferase levels and glutamate production in *Brevibacterium flavum*. J. Gen. Appl. Microbiol. 15:27-40.

Shiio, I., H. Ozaki, und M. Mori. 1982. Glutamate metabolism in a glutamate-producing bacterium, *Brevibacterium flavum*. Agric. Biol. Chem. 46:493-500.

Silver, S., und T. Misra. 1988. Plasmid mediated heavy metal resistances. Ann. Rev. Microbiol. 42:717-743.

Somerson, N., und T. Phillips. 1961. Procède d'obtention d'acide glutamique. Belg. Patent No. 593, 807.

Stahl, E. 1969. Thin-Layer Chromatography. 2. Auflage. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.

Sugimoto, S., und I. Shiio. 1989. Fructose metabolism of 1-phosphofructokinase and 6-phosphofructokinase in *Brevibacterium flavum*. Agric. Biol. Chem. 53:1261-1268.

Suzuki, K., T. Kaneko, und K. Komagata. 1981. Deoxyribonucleic acid homologies among coryneform bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 31:131-138

Suzuki, K.-I., und K. Komagata. 1983. Taxonomic significance of cellular fatty acid composition in some coryneform bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 33:188-200.

Takinami, K., H. Okada, und T. Tsunoda. 1963. Biochemical effects of fatty acids and its derivatives on L-glutamic acid fermentation. 1. Accumulation of L-glutamic acid in the presence of sucrose fatty acid ester. Agric. Biol. Chem. 27:858-863.

Takinami, K., H. Yoshii, H. Tsuru, and H. Okada. 1965. Biochemical effects of fatty acid and its derivatives on glutamic acid fermentation. Part III. Biotin-tween 60 relationship in the accumulation of L-glutamic acid and the growth of *Brevibacterium lactofermentum*. Agric. Biol. Chem. 29:351-359.

Takinami, K., H. Yoshii, Y. Yamada, H. Okada, and K. Kinoshita. 1968. Control of L-glutamic acid fermentation by biotin and fatty acid. Amino Acid Nucl. Acid 18:120-160.

Takinami, K., Y. Yamada, and H. Okada. 1966. Biochemical effects of fatty acid and its derivatives on L-glutamic acid fermentation. IV. Biotin content of growing cells of *Brevibacterium lactofermentum*. Agric. Biol. Chem. 30:674-682.

Tempest, D. W. 1978. The biochemical significance of microbial growth yields: a reassessment. TIBS 8:180-184.

Tempest, D. W., and O. M. Neijssel. 1980. Growth yield values in relation to respiration. P 1-31. In Knowles, C. J. (ed). Diversity of Respiratory Systems. CRC Press, Boca Raton, FL.

Teshiba, S., and A. Furuya. 1982. Mechanisms of 5'-inosinic acid accumulation by permeability mutants of *Brevibacterium ammoniagenes*. I. Genetical improvement of 5'-IMP productivity of a permeability mutant of *B. ammoniagenes*. Agric. Biol. Chem. 46:2257-2263.

Teshiba, S., and A. Furuya. 1983a. Mechanisms of 5'-inosinic acid accumulation by permeability mutants of *Brevibacterium ammoniagenes*. II. Sensitivities of a series of mutants to various drugs. Agric. Biol. Chem. 47:1035-1041.

Teshiba, S., and A. Furuya. 1983b. Mechanisms of 5'-inosinic acid accumulation by permeability mutants of *Brevibacterium ammoniagenes*. III. Intracellular 5'-IMP pool and excretion mechanisms of 5'-IMP. Agric. Biol. Chem. 47:2357-2363.

Teshiba, S., and A. Furuya. 1984. Mechanisms of 5'-inosinic acid accumulation by permeability mutants of *Brevibacterium ammoniagenes*. IV. Excretion mechanisms of 5'-IMP. Agric. Biol. Chem. 48:1311-1317.

Thaler, M., and H. Diekmann. 1979. The effect of manganese deficiency on lipid content and composition in *Brevibacterium ammoniagenes*. Eur. J. Microbiol. Biotechnol. 6:379-387.

Tsuchida, T., K. Kubota, Y. Yoshihara, K. Kikuchi, and F. Yoshinaga. 1987. Fermentative production of L-glutamine by sulfaguanidine resistant mutants derived from L-glutamate producing bacteria. Agric. Biol. Chem. 51:2089-2094.

Tsuchida, T., K. Miwa, S. Nakamori, and H. Momose. 1984. Method for producing L-glutamic acid by fermentation. U. S. Patent 4427773.

Walderhaug, M. O., D. C. Dosch, and W. Epstein. 1987. Potassium transport in bacteria. P 85-130. In Rosen, B. P., and S. Silver (eds.). Ion transport in prokaryotes. Academic Press. San Diego.

Walker, T. E., C. H. Han., V. H. Kollmann, R. E. London, und N. A. Matwiyoff. 1982. ^{13}C nuclear magnetic resonance studies of the biosynthesis by *Microbacterium ammoniaphilum* of L-glutamate selectively enriched with carbon-13. J. Biol. Chem. 257:1189-1195.

Wichmann, R., C. Wandrey, und J. Große-Wiesmann. 1990. Continuous microbial production of L-leucine with cell retention. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32:373-379.

Yeagle, P. L. 1989. Lipid regulation of cell membrane structure and function. FASEB Journal. 3:1833-1842.

Zarietsky, A., M. Kihara, und R. M. Macnab. 1981. Measurement of membrane potential in *Bacillus subtilis*: A comparison of lipophilic cations, rubidium ion, and a cyanine dye as probes. J. Membrane. Biol. 63:215-231

VII. VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATCC	American type culture collection
ATP	Adosintriphosphat
CCCP	Carboxylcyanid-m-chlorophenylhydrazon
CoA	Coenzym-A
DC	Dünnschichtchromatographie
DCCD	Dicyclohexylcarbodiimid
DPG	Cardiolipin (Diphosphatidylglycerol)
dpm	desintegrations per minute
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ext	extern
F	Faraday'sche Konstante
h	Stunde
int	intern
INT	Iodnitrotetrazolium Violett
K_m	Michaelis Menten Konstante
min	Minute
NAD(H)	Nicotinamidadenindinukleotid (reduziert)
OD ₆₀₀	optische Dichte gemessen bei 600 nm
PA	Phosphatidsäure
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PEP	Phosphoenolpyruvat
PG	Phosphatidylglycerol
PI	Phosphatidylinositol
PIM	Phosphatidylinositolmannosid
PS	Phosphatidylserin
R	Gaskonstante
T	absolute-Temperatur
Tab.	Tabelle
Tg	Trockengewicht
TPP	Tetraphenylphosphoniumbromid
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Enzymeinheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volumen
V_{max}	Maximalgeschwindigkeit

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie 1 der KFA Jülich durchgeführt.

Diese Arbeit entstand auf Anregung von Herrn Prof. Dr. R. Krämer, dem ich für sein stetiges Interesse an der Arbeit, seine zahlreichen Hilfestellungen und seine wertvolle Bereitschaft zur kritischen Diskussion herzlich danke.

Herrn Prof. Dr. H. Sahm danke ich für die Ermöglichung dieser Dissertation am Institut für Biotechnologie 1 und sein großes Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Bei Herrn Dr. Holger Ebbighausen bedanke ich mich für seine Hilfsbereitschaft und für die gute Zusammenarbeit.

Für seine freundliche Unterstützung bei der Lipidanalytik danke ich Herrn Dr. Schulenberg-Schell.

Mein Dank gilt auch Frau Brita Weil besonders für ihren steten medizinischen Beistand und ihre kulinarische Betreuung.

Ferner danke ich den Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe, Jutta Ruhrmann, Angelika Salentin, Marcella Guttman, Etta Riemer, Ekkard Boles, Stefan Bröer, Thomas Dierks, Camille Lambert und Reiner Stappen für die gute Kooperation und das freundliche Arbeitsklima bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Letztendlich möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts für Biotechnologie 1, besonders Frau Dr. Petra Pielken und Frau Dr. Elisabeth Scheer, für die nette Aufnahme, Aufgeschlossenheit und stets gewährte Hilfsbereitschaft danken.

