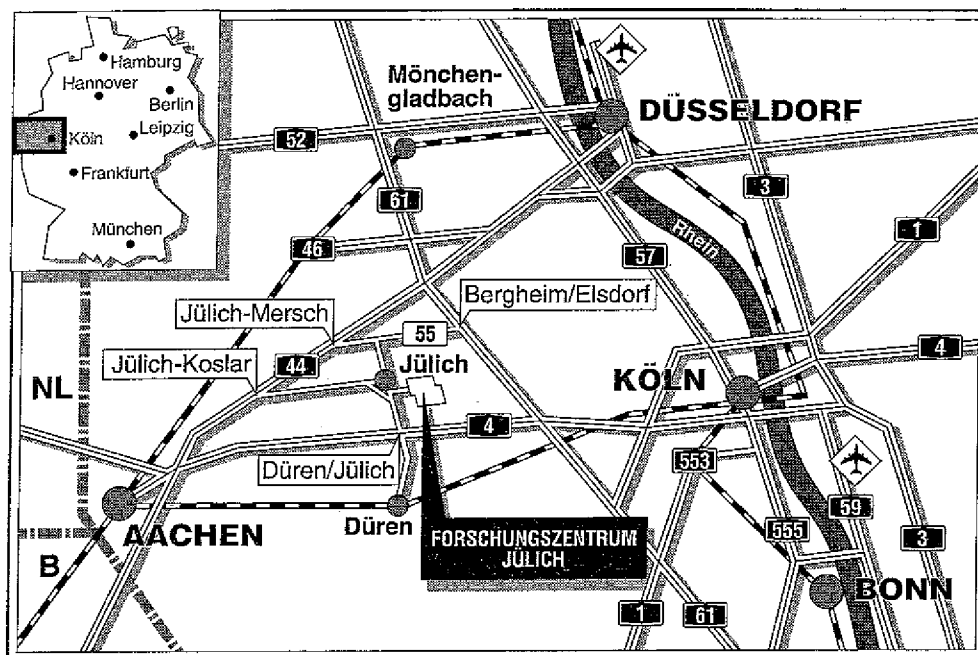


Institut für Biotechnologie

**Aufnahme und Sekretion von Lysin
durch *Corynebacterium glutamicum***

Stefan Bröer



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 2557

ISSN 0366-0885

Institut für Biotechnologie Jül-2557

D 61 (Diss. Universität Düsseldorf)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

Postfach 1913 · D-5170 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

Telefon: 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · Telex: 833556-70 kfa d

Aufnahme und Sekretion von Lysin durch *Corynebacterium glutamicum*

Stefan Bröer

It must be concluded that the bacterial solution to energy surplus is in general to waste it.

Harold (1986)

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1. Lysin, Metabolismus und Produktion	1
1.2. Bakterielle Transportsysteme	3
1.2.1. Funktion und Struktur bakterieller, sekundär aktiver Aufnahmesysteme	4
1.2.2. Funktion und Struktur bakterieller Exportsysteme	7
1.2.3. Kraftübertragung in sekundär aktiven Transportsystemen	12
1.3. Ziel der Arbeit	18
2. Material und Methoden	19
2.1. Chemikalien	19
2.2. Medien	19
2.2.1. Minimalmedium 1	19
2.2.2. Minimalmedium 2	20
2.2.3. Minimalmedium 3	21
2.2.4. Vollmedium	21
2.2.5. Vollmedium-Agar	22
2.2.6. Sekretionsmedium für ATCC 13032	22
2.3. Stämme und Kulturbedingungen	22
2.3.1. Stämme	22
2.3.2. Kulturbedingungen	23
2.3.2.1. Standardkultur	23
2.3.2.2. Exportmessungen im Wildstamm ATCC 13032	23
2.3.2.3. Stammhaltung	23
2.3.2.4. Kontinuierliche Kultur	24
2.4. Methoden	24
2.4.1. Silikonölzentrifugation	24
2.4.2. Bestimmung des Cytoplasmavolumens	26
2.4.3. Bestimmung der Komponenten der Protonenmotorischen Kraft	27
2.4.3.1. Bestimmung des Membranpotentials mit TPP ⁺	27
2.4.3.2. Membranpotentialbestimmung mit ⁸⁶ Rb ⁺ und Spannungsklemme	28
2.4.3.3. Bestimmung der pH-Gradienten	29
2.4.4. Bestimmung des cytosolischen ATP-Gehaltes	31
2.4.5. Induktion von Diffusionspotentialen	32
2.4.6. Bestimmung der Aminosäurekonzentration	33
2.4.7. Glukosebestimmung	34

2.4.8. Bestimmung der organischen Säuren	35
2.4.9. Bestimmung von Kaliumionen	35
2.4.10. Bestimmung der Lysinaufnahme	35
2.4.11. Bestimmung des Lysinexports	36
2.4.12. Berechnungen	37
3. Ergebnisse	39
3.1. Energetische und physiologische Parameter von <i>Corynebacterium glutamicum</i> unter besonderer Berücksichtigung des Lysinproduktionsstammes DG 52-5	39
3.1.1. Größe, Gestalt, Wachstumsbereich	39
3.1.2. Das Membranpotential	40
3.1.3. Der pH-Gradient	40
3.1.4. Protonenmotorische Kraft	41
3.1.5. Der cytosolische ATP-Gehalt	41
3.2. Das Lysinaufnahmesystem von <i>Corynebacterium glutamicum</i>	42
3.2.1. Kinetische Eigenschaften	42
3.2.2. Energetik und Mechanismus der Lysinaufnahme	43
3.2.3. Nettotransportfunktionen des Lysinaufnahmesystems	49
3.3. Das Lysinexportsystem von <i>Corynebacterium glutamicum</i>	53
3.3.1. Meßmethodik	53
3.3.2. Nachweis eines spezifischen Sekretionscarriers	55
3.3.3. Mechanismus und Energetik des Lysinexports	60
3.3.4. Biotechnologische Aspekte der Lysinsekretion	82
3.3.4.1. Die Lysinsekretion als limitierender Schritt der Lysinproduktion	82
3.3.4.2. Vergleich der Exportsysteme dreier verschiedener Stämme	86
3.3.5. Mikroorganismen in der Natur, bakterienökologische Gesichtspunkte der Lysinsekretion	91
4. Diskussion	94
4.1. Bioenergetik von <i>Corynebacterium glutamicum</i>	94
4.2. Das Lysinaufnahmesystem von <i>Corynebacterium glutamicum</i>	95
4.3. Das Lysinexportsystem von <i>Corynebacterium glutamicum</i>	98
4.4. Biotechnologische Aspekte der Lysinsekretion	103
4.5. Bedeutung des Lysinexportsystems unter "in vivo" Bedingungen	107
5. Zusammenfassung	109
6. Literatur	110

ABKÜRZUNGEN und SYMBOLE

c	Konzentration
C	Carrierpopulation
dpm	Zerfälle/min
F	Faradaykonstante
g	Erdbeschleunigung
J	Flux
k	Geschwindigkeitskonstante 1. Ordnung
K	Bindungskonstante
K _M	Michaelis-Konstante
P	Permeabilitätskonstante
q	Verbrauchsrate
R	Gaskonstante
s	Substrat
T	Absolute Temperatur
TG	Zelltrockenmasse
TPP ⁺	Tetraphenylphosphoniumbromid
V	Volumen
x	Strecke
y	Ertrag
z	2,3 RT/F
μ	(elektro)chemisches Potential
δψ	Membranpotential
δpH	pH-Gradient

1. EINLEITUNG

1.1. Lysin, Metabolismus und Produktion

L-Lysin gehört zu den für Vertebraten essentiellen Aminosäuren. Da diese Aminosäure im Viehfutter limitierend ist, kann der Nährwert pflanzlicher Nahrungs- und Futtermittel durch Zusatz von L-Lysin gesteigert werden (Hoppe und Martens, 1983). 1985 wurden 80 000 t dieser Aminosäure produziert. Die industrielle Herstellung von L-Lysin erfolgt ausschließlich auf mikrobiellem Wege (Eldib et al., 1985).

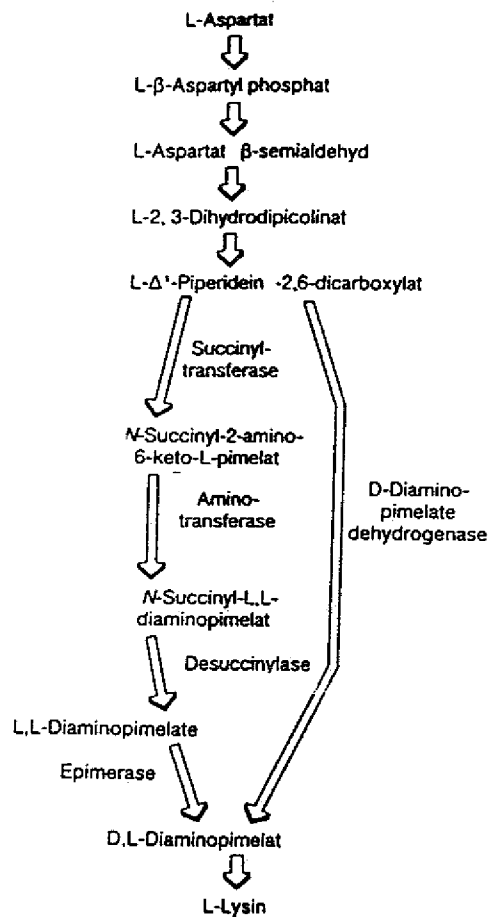


Fig. 1 Lysinbiosynthese in *C. glutamicum* (nach Schrumpf et al., 1991)

Dabei werden durch konventionelle Mutagenese erzeugte Produktionsstämme der nahe verwandten Arten *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium lactofermentum* und *Brevibacterium flavum* eingesetzt. Lysin wird in Prokaryonten über den von Aspartat ausgehenden Diaminopimelatweg synthetisiert, der im Falle von *C. glutamicum* verzweigt ist (Schrumpf et al., 1991)(Fig.1). Zur Aspartatfamilie gehören weiterhin Asparagin, Methionin, Threonin und Isoleucin. Die Regulation dieses Biosynthesewegs in *C. glutamicum* ist relativ einfach. Das Bakterium besitzt nur eine Aspartatkinase, die einer konzertierten Rückkopplungshemmung durch Lysin und Threonin unterliegt (Nakayama et al., 1966). Alle anderen Enzyme der Lysinbiosynthese werden weder in ihrer Menge noch in ihrer Aktivität reguliert (Cremer et al., 1988).

Gute Lysinproduzenten wurden in der Gestalt von Mutanten gefunden, die in Gegenwart hoher Konzentrationen des Lysin-analogons S-Aminoethylcystein (AEC) (Sano und Shio, 1970) oder Analoga des Threonins (Tosaka et al., 1978) ungehindert wachsen können. In diesen Mutanten ist die Aspartatkinase in ihrer Struktur so verändert, daß sie die allosterischen Effektoren Lysin oder Threonin nicht mehr zu binden vermag und aus diesem Grunde nicht mehr regulierbar ist.

Während die Stoffwechselphysiologie von *Corynebacterium glutamicum* schon sehr gut untersucht ist, fehlen jegliche Daten über Mechanismus und Bedeutung der Lysintransportsysteme für die Lysinproduktion. Aus verschiedenen Bereichen gibt es Hinweise, daß Lysin aktiv aus den Zellen heraustransportiert werden muß. (i) Lysin ist bei physiologischen pH-Werten positiv geladen und muß gegen das außen positive Membranpotential ausgeschieden werden. (ii) In Lysinfermentationen kann Lysin gegen einen Konzentrationsgradienten im Medium angehäuft werden (Schrumpf, 1990). (iii)

Speziell für den Glutamatexport (Hoischen und Krämer 1989, 1990), aber auch für den Isoleucinexport (Ebbighausen et al., 1989) durch *C. glutamicum* und den Inosinsäureexport durch *Brevibacterium ammoniagenes* (Teshiba und Furuya, 1982, 1984) bestehen sehr gute Evidenzen eines carriervermittelten Transports. Untersuchungen zum Prolinexport in *Escherichia coli* (Rancourt et al., 1984) geben den Hinweis, daß auch die Aufnahmesysteme entscheidenden Einfluß auf die Sekretionsrate haben können.

1.2 Bakterielle Transportsysteme

Stoffwechsel betreibende Zellen stellen offene Systeme dar, die über eine Vielzahl spezifischer Transportsysteme für die Aufnahme und den Export von Ionen und Substraten verfügen.

Aufgrund der Mechanismen unterscheidet man üblicherweise primäre und sekundäre Transportsysteme. Die primären stellen die Energie für den Transport durch eine chemische Reaktion bereit. In der Regel ist dies eine ATP Spaltung oder eine Redoxreaktion. Die sekundären entnehmen die Energie für den Transport aus elektrischen und/oder chemischen Gradienten über der Membran. Solche Gradienten sind das Membranpotential, der Protonengradient, der Na^+ -Gradient, Substratgradienten oder Kombinationen daraus. Bei den sekundären Systemen unterscheidet man den Uniport-, Symport- und Antiport-Mechanismus. Aus mechanistischen Gründen sollen zwei weitere Transportsysteme in diese Gruppe eingeordnet werden, obwohl sie nicht mit den elektrochemischen Gradienten gekoppelt sind: (i) Die erleichterte Diffusion als Variante des Uniports mit einem ungeladenen Substrat. (ii) Die Gruppentranslokation als eine erleichterte Diffusion, die direkt an ein metabolisches Enzym gekoppelt ist (In der Tat zeigen bestimmte Mutanten der PTS-

Systeme erleichterte Diffusion für Zucker; Postma und Lengeler, 1985).

1.2.1. Funktion und Struktur bakterieller, sekundär aktiver Aufnahmesysteme

Aufgrund der guten experimentellen Zugänglichkeit sind bereits zahlreiche sekundär aktive Aufnahmesysteme charakterisiert worden. Die weitaus meisten sind Symport-Systeme (Rosen, 1978). Aus der Vielzahl der Systeme seien hier nur die in *Corynebacterium glutamicum* und nah verwandten Arten gefundenen Symport-Systeme erwähnt: Na^+ /Threonin in *Brevibacterium flavum* und *Corynebacterium glutamicum* (Shiio et al., 1973), Na^+ /Serin in *Brevibacterium flavum* (Araki et al., 1973), Na^+ /Isoleucin (Ebbighausen et al., 1989), nH^+ /Acetat (Ebbighausen et al., 1991) und nNa^+ /Succinat (Ebbighausen et al., 1991) in *C. glutamicum*, Na^+ /Methionin in *Brevibacterium linens* (Ferchichi et al., 1987), H^+ /Aromatische Aminosäuren in *Brevibacterium linens* (Boyaval et al., 1983).

Uniport-Systeme sind in Bakterien hingegen äußerst selten. Als Beispiele für ungeladenen Substanzen sind der Glycerintransport in *E. coli* (Heller et al. 1980), der Glukosetransport in *Zymomonas mobilis* (DiMarco und Romano, 1985) und *Streptococcus bovis* (Russell, 1990) zu nennen. Negativ geladene Substanzen können nicht im Uniport aufgenommen werden, für positiv geladene Substanzen sind jedoch ebenfalls nur wenige Systeme bekannt. So zum Beispiel der Lysintransport in *Staphylococcus aureus* (Niven and Hamilton, 1974), nicht jedoch in anderen Organismen (Rosen, 1978). Der Grund für die Bevorzugung des Symport-Systems liegt in den viel höheren Akkumulationen, die es erreicht wodurch die Homöostase des Innenraums auch unter ungünstigen Bedingungen

möglich ist. Ein anderes Transportsystem, das ebenfalls diesen Vorteil besitzt, ist das Antiport-System. Hier ist Transport überhaupt erst möglich, wenn auf beiden Seiten der Membran Substrat vorhanden ist. Ein Verlust von internen Substanzen, ist bei Abwesenheit des Substrates im Außenmedium nicht möglich. Dieses System ist in Bakterien weitaus häufiger anzutreffen als das Uniport-System. Die Anzahl bekannter bakterieller Antiporter steigt ständig. Ihre Charakterisierung hat erst in den letzten Jahren begonnen, obwohl der Antiport-Mechanismus eine der ersten Transportfunktionen ist, die in Bakterien überhaupt entdeckt wurden (Mitchell, 1954). Diesem Austausch von internem gegen externes Phosphat in *Staphylococcus aureus* konnte erst in neuester Zeit eine sinnvolle Funktion zugeordnet werden. Es handelt sich um die homologe Austauschfunktion zweier Proteine, die den Antiport von Hexosephosphat gegen Phosphat bzw. den Austausch von Glycerinphosphat gegen Phosphat vermitteln (Maloney et al., 1990). Auch diese Proteine wurden in ihrem Mechanismus zunächst mißgedeutet und als Protonensymportsysteme falsch charakterisiert (Rosen, 1978), da die Ladung des anorganischen Phosphats vom pH-Wert abhängt (Ambudkar et al., 1986). Der Sinn dieser Transportfunktionen wird einer Aufrechterhaltung des Phosphatspiegels der Bakterienzelle zugeschrieben (Maloney et al. 1984). Wie aus diesen Experimenten ersichtlich ist, können Antiporter sowohl heterologen als auch homologen Austausch vermitteln. Antiporter treten häufig als sogenannte Substrat/Produkt-Antiporter im Zusammenhang mit speziellen, häufig auch induzierbaren, Stoffwechselwegen auf (Poolman, 1990). Ein Beispiel ist der Arginin-Deiminase-Weg in *Lactococcus lactis*. Arginin wird aufgenommen, zu Ornithin metabolisiert und dies im Antiport gegen Arginin wieder ausgeschieden (Driessen et al., 1987). Dieser Stoffwechselweg samt dem

Transportsystem ist auch in anderen Organismen nachgewiesen worden, z. B. in *Enterococcus faecalis* (Poolman et al., 1987) und *Pseudomonas aeruginosa* (Lüthi et al., 1990). Weitere Substrat/Produkt-Antiporter sind der Agmatin/Putrescin-Antiporter aus *Enterococcus faecalis* (Driessen et al., 1988) und der Oxalat/Formiat-Antiporter aus *Oxalobacter formigenes* (Anantharam et al., 1989). Für *Streptococcus thermophilus* wird ein Lactose/Galaktose-Antiporter postuliert (Hutkins und Ponne, 1991).

Lysinaufnahmesysteme sind in einigen Organismen untersucht worden. In *Staphylococcus aureus* wurde es als Uniport-System charakterisiert (Niven und Hamilton, 1974). In *E. coli* ist der Mechanismus nicht geklärt; das Membranpotential und der Protonengradient beeinflussen die Akkumulation (Ramos und Kaback, 1977). Darüberhinaus gibt es in diesem Organismus auch ein Bindeprotein-system für Lysin, Arginin und Ornithin (Rosen, 1971). In *Lactococcus lactis* wird Lysin ebenfalls von zwei Systemen transportiert (Driessen et al., 1989), zum einen durch ein Protonensymport-System, zum anderen durch den Arginin/Ornithin-Antiporter, der auch Lysin akzeptiert. Für den Lysintransport in *Corynebacterium glutamicum* wurde ebenfalls ein Protonensymport postuliert (Luntz et al., 1986).

Alle bisher in ihrer Primärstruktur aufgeklärten bakteriellen sekundären Transportproteine weisen eine sehr ähnliche Struktur auf, unabhängig vom jeweiligen Mechanismus (Maloney, 1990). Die Hydropathie-Analyse ergibt in jedem Falle etwa 12 Transmembran-Helices (Henderson, 1990). Die Helices sind zum Teil amphipatisch, so daß davon ausgegangen wird, daß alle oder ein Teil von Ihnen einen Kanal bilden, durch den das Substrat transportiert wird. Für mehrere Proteine ist nachgewiesen worden, daß sie als Monomer aktiv sind (Ambudkar et al., 1990, Wright et al., 1983).

Daraus ist zu schließen, daß kein Kanal zwischen mehreren Proteinen ausgebildet wird, wie dies bei Ionenkanälen typisch ist (Stroud et al., 1990). Da es bisher nur im Fall der Lactose-Permease möglich war, für den Transport wichtige Aminosäuren zu bestimmen (Brooker, 1990; King und Wilson, 1990; Kaback, 1990), ist eine Vorhersage des Mechanismus' aufgrund der Primärsequenz bisher unmöglich. Trotz intensivster Analyse unzähliger Mutanten der Lactose-Permease gibt es heftige Kontroversen über die Funktion dieser essentiellen Aminosäuren (King und Wilson, 1990 1,2; Brooker, 1990, 1991; Franco und Brooker; 1991).

1.2.2. Funktion und Struktur bakterieller Exportsysteme

Bakterien müssen eine Vielzahl von Stoffen exportieren. Exportphänomene lassen sich in drei Gruppen einteilen: (i) Ausscheidung von überflüssigen oder giftigen Substanzen, (ii) Export als Möglichkeit der Regulation cytosolischer Konzentrationen, (iii) Export von Substanzen, die außerhalb der Zelle wichtige Funktionen ausüben.

Häufig wurde angenommen, daß der Export durch Diffusion vonstatten geht, mittlerweile sind jedoch in vielen Fällen Transportproteine nachgewiesen worden. Einige Beispiele von Transportproteinen, geordnet nach den oben genannten Kriterien, seien aufgeführt:

- (i) Stoffwechselendprodukte, z.B. Lactat (Harold and Levin, 1974), Succinat (Michel and Macy, 1990), Formiat (Anantharam et al., 1989), Acetat (Boenigk et al., 1989), Butyrat (Loubiere et al., 1990), Ornithin (Driessen et al., 1987) und toxische Substanzen, z.B. Schwermetalle (Silver

und Misra, 1988), Antibiotika (McMurry et al., 1980) oder Desinfektionsmittel (Purewal et al., 1990);

(ii) Natrium (Booth, 1985), Protonen (Oesterhelt und Tittor, 1989), Kalium (Bakker et al., 1987)), Kalzium (Rosen and Silver, 1987), Chlorid (Oesterhelt und Tittor, 1989);

(iii) Komplexbildner (V. Braun, pers. Mitteilung), Signalstoffe (McGrath und Varshavsky, 1989).

Der Export wird von Proteinen vermittelt, die grundsätzlich wie die Aufnahmesysteme funktionieren, in der Evolution vielleicht sogar einen gemeinsamen Ursprung haben (Rouch et al., 1990). In manchen Fällen sind in Abhängigkeit vom metabolischen Zustand sogar Aufnahme oder Export durch ein und dasselbe System möglich. Dies gilt insbesondere für Transportsysteme der Gruppe (i). In ruhenden Zellen oder Vesikeln können alle Systeme, die Stoffwechselendprodukte exportieren, auch die Aufnahme dieser Stoffe ermöglichen. Es sind sekundäre Transportsysteme, und sie ermöglichen nur eine geringe Akkumulation. Antiportsysteme, die für die Exkretion von Ornithin und Formiat genutzt werden, sind sowohl Aufnahme- als auch Exportsysteme. Sie wurden bereits im Abschnitt über die Aufnahmesysteme erläutert. Sequenzen von Exportproteinen liegen bisher nur in einem Falle vor (Lüthi et al., 1990).

Für die Untersuchung spezieller Exportproteine haben sich die Resistenz vermittelnden Transporter als besonders geeignet erwiesen. Schwermetallresistenz wird meist von ATPasen vermittelt (Silver et al., 1989), doch scheint es auch hier sekundär aktiven Transport zu geben (Nies et al., 1990). Die Cadmium transportierende ATPase ist eine P-Typ-ATPase (Nucifora et al., 1989, zur Klassifizierung siehe Pedersen und Carafoli, 1987). Die Arsen transportierende ATPase zeigt in der Primärsequenz nur in der ATP

Bindungsstelle Homologie zu anderen ATPasen und gehört damit weder zu den F_1F_0 -ATPasen noch zu den P-Typ-ATPasen. Eine Homologie zum "multi drug resistance protein", dem P-Glykoprotein, das den Efflux von toxischen Substanzen in Eukaryonten vermittelt (Chen et al. 1986; Gros et al. 1986), ist sowohl in der ATP-Bindungsstelle als auch im topologischen Aufbau zu finden (Silver et al., 1989). Damit ist das Arsenateffluxprotein eher dem Bindeproteintyp-ATPase zugehörig (Hyde et al., 1990). Bei mehreren Schwermetall exportierenden Systemen sind assoziierte Proteine gefunden worden, die die Spezifität des Transports modulieren können (Rosen, 1991; Nies et al., 1989).

Neben der Arsenat transportierenden ATPase ist der Tetracyclin-Efflux, insbesondere die Resistenzdeterminante des Transposons Tn10, die biochemisch am besten charakterisierte Export-Permease. Sie zeigt einen sekundären Transportmechanismus, in dem Tetracyclin als Komplex mit divalenten Kationen im Antiport gegen ein Proton ausgetauscht wird (Kaneko et al., 1985) (ein Symport mit einem OH^- ist genauso möglich). Der gesamte Prozeß ist elektro-neutral. Ein künstlich angelegtes Membranpotential kann den Export nicht treiben, eine pH-Differenz führt jedoch zu Efflux. Zweiwertige Kationen sind unbedingt erforderlich für den Transport (Yamaguchi et al., 1990). Für den Protonentransport wird ein Ladungsübertragungsmechanismus ("charge relay") postuliert (Yamaguchi et al., 1991), wie er auch für die Laktosepermease gefordert wird (Kaback, 1990). Die Sequenz des Proteins ist bekannt (Hillen und Schollmeier, 1983). Es gehört in die Familie von Transportproteinen mit 12 Transmembranhelices. Mittlerweile ist eine ganze Reihe von Tetracyclinresistenz-proteinen kloniert worden, deren Verwandtschaft untereinander deutlich ist (Yamaguchi et al., 1990). Ein konserviertes Dipeptid $\text{Ser}^{65}\text{-Asp}^{66}$ ist allen

gemeinsam und wird als zentraler Teil eines Tores ("gate") vorgeschlagen (Yamaguchi et al., 1990). Offensichtlich verwandt mit diesen Exportproteinen sind andere, die Resistenz gegen Desinfektionsmittel verleihen. Aufgrund ihrer Transportspezifität werden sie meist "Ethidium-Resistenz verleihende Transportproteine" genannt (Rouch et al., 1990). Neben der Homologie zu den Tetracyclineffluxproteinen findet sich auch noch Homologie zum Arabinose-Aufnahmesystem von *E. coli* (Rouch et al., 1990).

(ii) Natriumefflux wird meist durch Na^+/H^+ -Antiporter vermittelt. Diese Antiporter dienen in neutrophilen Bakterien der pH-Homöostase, wenn der externe pH über pH 8,5 steigt (Mc Morrow et al., 1989). In alkalophilen Bakterien sind sie daher obligatorisch (Krulwich und Guffanti, 1989). Kaliumefflux kann durch mehrere Systeme vermittelt werden (Booth, 1985; Bakker et al., 1987). Die physiologische Bedeutung dieser Systeme ist jedoch unklar, da ein signifikanter Efflux nur durch N-ethylmaleimide induzierbar ist. Der interne Kalziumspiegel wird in Bakterien niedrig gehalten, der Grund hierfür ist unbekannt. Eine Reihe von Kalziumeffluxsystemen ist bekannt (für eine Übersicht siehe Rosen und Silver, 1987).

Die dritte Gruppe von Effluxproteinen ist die am schlechtesten untersuchteste. Die Sekretion von Siderophoren ist ein Beispiel. Aufgrund des komplizierten Aufnahmemechanismus' (Braun, 1985) wird davon ausgegangen, daß auch Exportsysteme existieren. Ein erster Hinweis darauf sind ausscheidungsdefekte Mutanten (V. Braun, pers. Mitteilung). Das STE-6 Protein der eukaryontischen Hefe würde ebenfalls in diese Gruppe gehören (McGrath und Varshavsky, 1989). Es ist für die Sekretion des α -Faktor-Pheromons der Hefe nötig und gehört zu den Bindeproteintyp-ATPasen.

Die Sekretion von Aminosäuren wurde bisher nur wenig untersucht und konnte noch nicht einer der drei Gruppen zugeordnet werden.

Vier mechanistische Modelle werden bisher in der Literatur diskutiert. (i) Das Diffusions-Modell wurde für die Glutamatsekretion durch *Corynebacterium glutamicum* entwickelt. Es geht davon aus, daß die Membran der Bakterienzellen durch die für die Glutamatproduktion nötige Vorbehandlung (Biotinmangel, Penicillinbehandlung, Behandlung mit Fettsäurederivaten) physikalisch verändert wird und Glutamat relativ unspezifisch ausfließen kann (Demain und Birnbaum, 1968). Es stützt sich auf Befunde über eine erhöhte Permeabilität von Glutamat-produzierenden Zellen in Bezug auf bestimmte Stoffwechselmetabolite (Shiio et al. 1962). Weiterhin wird angenommen, daß die Membran von Bakterienzellen eine gewisse Permeabilität für alle Aminosäuren aufweist (Milner et al., 1987; Driessen et al., 1987), deren Höhe jedoch umstritten ist. (ii) Das Inversionsmodell wurde ebenfalls für die Glutamatsekretion durch *C. glutamicum* vorgeschlagen. Die für die Glutamatsekretion nötigen Vorbehandlungen sollen nach diesem Modell zu einer Entkopplung des Aufnahmesystems von seiner treibenden Kraft führen. Glutamat wird dann, aufgrund seiner negativen Ladung, über das Aufnahmesystem aus der Zelle getrieben (Clement et al., 1984). (iii) Das Poren-Modell wurde für die Lysinsekretion vorgeschlagen. Die Erhöhung der internen Lysinkonzentration unter Produktionsbedingungen soll die Osmolarität des Cytoplasmas erhöhen. Dies wiederum führt zur Öffnung von osmotisch kontrollierten Poren, durch die das Lysin ausströmt (Luntz et al. 1986). (iv) Das Sekretionscarriermodell wird von der eigenen Arbeitsgruppe vorgeschlagen. Es postuliert spezielle Sekretionscarrier für Glutamat (Hoischen und Krämer, 1989,1990) und Isoleucin (Ebbighausen et al., 1989).

1.2.3. Energiekopplung in sekundär aktiven Transportsystemen

Eine zentrale Frage zum Verständnis sekundärer Transportsysteme ist die Wirkung von Substrat- und elektrischen Gradienten auf den Transportvorgang. Thermodynamisch betrachtet müssen alle am Transport beteiligte Gradienten zum Ausgleich kommen. Die Akkumulationsverhältnisse lassen sich berechnen (Harold, 1986) und mit den gemessenen Daten vergleichen. Diese Methode ist die sicherste zur Bestimmung von Stöchiometrien, ist aber nur anwendbar, wenn bei niedrigen Konzentrationen gemessen wird (Booth, 1988). Eine mögliche Erklärung für diese Einschränkung wird weiter unten besprochen.

Weitaus schwieriger ist die Frage, wie die elektrochemischen Gradienten auf die Transportgeschwindigkeit wirken. Nach der Proportionalität der freien Energie zum elektrochemischen Gradienten $\mu = nRT \ln (s_{in}/s_{out}) + zF \delta\psi$ ist auch eine Proportionalität zur Geschwindigkeit zu erwarten, wie sie bei der Diffusion vorhanden ist (Nernst-Planck-Gleichung): $J = -P(ds/dx + s zF/RT d\psi/dx)$. Beim Carriervermittelten Transport ist diese Proportionalität nur unter bestimmten Bedingungen vorhanden. Für die Betrachtung der Frage ist es sinnvoll, den Transportprozeß als Transportzyklus darzustellen. Zwei einfache Zyklen für den Uniport einer positiv geladenen Substanz sind in Fig. 2 dargestellt. Änderungen der Transportgeschwindigkeit können in diesem Zyklus mehrere Gründe haben: (i) Massenwirkungseffekte, die durch den Besetzungsgrad und die Anzahl der Bindungsstellen auf beiden Seiten der Membran hervorgerufen werden. (ii) Affinitätseffekte, die durch eine Änderung der Bindungskonstanten hervorgerufen werden. (iii) Translokationseffekte, die durch Änderung der Geschwindigkeitskonstanten der Translokationsschritte 1 und 3 hervorgerufen

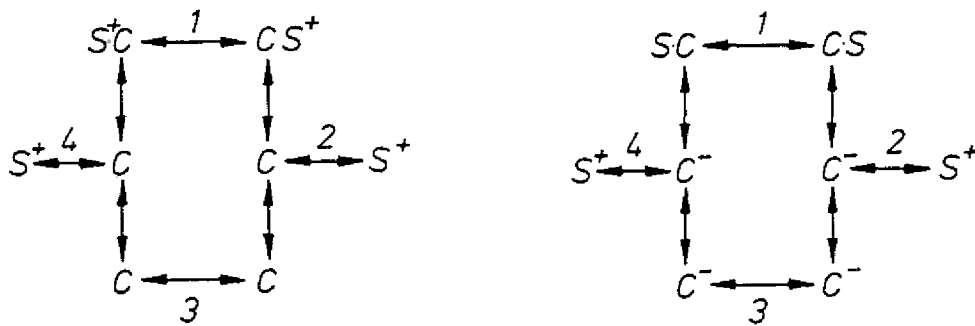


Fig. 2 Transportzyklus für den Uniport einer positiv geladenen Substanz unter der Annahme, daß der Carrier-Substratkomplex (links) oder der unbeladene Carrier (rechts) geladen ist.

werden. Die Substratbindungsschritte 2 und 4 sind normalerweise sehr schnell und nicht limitierend, sie werden daher zumeist außer acht gelassen. Für die Melibiosepermease wurde jedoch nachgewiesen, daß die Dissoziation der Ionen der langsamste Schritt des Transport-zyklus ist (Pourcher et al., 1990).

Das Transportsubstrat übt vor allen Dingen Massenwirkungseffekte aus, da es an das Transportprotein gebunden werden muß, bevor die Translokation zur anderen Seite erfolgen kann. Die Affinitätskonstante dieser Bindung bestimmt ganz entscheidend die Transportgeschwindigkeit. Man nimmt daher an, daß die Translokationsschritte für die Hin- und Rückreaktion dem Michaelis-Menten-Gesetz gehorchen. Die einfachste Gleichung für den Schritt 1 in Fig. 2 sieht daher so aus:

$$J_{\text{net}} = J_{\text{max}} \left(\frac{s_{\text{out}}}{(K_M + s_{\text{out}})} - \frac{s_{\text{in}}}{(K_M + s_{\text{in}})} \right) \quad (\text{Rottenberg, 1976}).$$

Ein Beispiel verdeutlicht diesen Sachverhalt. Die Bindungskonstante eines neutralen Substrats betrage 5 μM auf beiden Seiten der Membran (der Transportprozeß ist reversibel). Die Innenkonzentration betrage 5 mM, die Außenkonzentration 50 mM. Die Bindungsstellen, die zur Innenseite zeigen, sind damit zu 99,9% besetzt; diejenigen die zur Außenseite zeigen, zu 99,99% besetzt. Die

Geschwindigkeiten von Hin- und Rückreaktion unterscheiden sich damit nur um 0,09%. Trotz eines zehnfachen Konzentrationsgradienten ist die Nettogeschwindigkeit verschwindend gering. Ganz anders liegt der Fall bei einem zehnfachen Konzentrationsgradienten um den K_M . Es läßt sich leicht ableiten (Rottenberg, 1976), daß dann in guter Näherung $J_{\text{net}} = J_{\text{max}} / 4 \cdot \ln(a_{\text{out}}/a_{\text{in}})$ gilt. Dieses Beispiel zeigt auch, daß die Einstellung des Gleichgewichtes sehr lange dauern kann, wenn die Konzentrationen auf beiden Seiten der Membran weit über dem K_M liegen. Dies wird als einer der Gründe dafür angegeben, daß Akkumulationen bei Konzentrationen über dem K_M immer zu niedrig bestimmt werden (Wright, 1989; Sanders et al., 1984). Ein gutes Beispiel für die Tatsache, daß weitab vom K_M die Transportrate nicht mehr von den Konzentrationsgradienten abhängt, ist die pH-Abhängigkeit der Laktosepermease (Page und West, 1981; Page, 1987). Der pK für das Symportproton liegt wahrscheinlich bei pH 10 (Wright, 1986). Die Aufnahmerate ist im Bereich von pH 5 bis 9 jedoch stetig ansteigend.

Trotzdem zeigen viele Transportprozesse auch einen Einfluß der Substratgradienten weit oberhalb des K_M . Solche Effekte werden Trans-Effekte genannt, da sie in der Regel dann beobachtet werden, wenn auf der der Transportrichtung gegenüberliegenden Seite die Konzentration eines Substrats erhöht wird. Meist hat dies eine Reduktion der Transportgeschwindigkeit zur Folge. (Dieses Phänomen ist nicht identisch mit der Austauschdiffusion, bei der in der Regel eine Erhöhung der Transportgeschwindigkeit in Anwesenheit eines Substrats auf der Trans-Seite beobachtet wird. Die Austauschdiffusion ist jedoch kein Nettotransport, sondern eine Austauschrate für markiertes Substrat; siehe z.B. Höfer, 1977). Der Grund liegt im Entzug der besetzten Carrier aus dem Transport-

zyklus auf der Transseite, auf der eigentlich die Ablösung des Substrats erfolgen sollte. Damit ist der Transeffekt ebenfalls ein Massenwirkungseffekt (Dorando und Crane 1984; Kessler und Semenza, 1983). Aus dieser Betrachtung ergibt sich auch, daß ein Transportsystem unter symmetrischen Bedingungen keine unterschiedlichen K_M Werte auf der Innen- und Außenseite haben darf, da dies automatisch zu einer Akkumulation ohne Energieverbrauch führen würde. Möglich ist jedoch die Annahme, daß die Änderung der Konzentration der Transportsubstrate einen Einfluß auf den K_M hat (Sanders et al., 1984). Dies wäre ein Affinitätseffekt durch Substrat. Auch eine Änderung der Geschwindigkeitskonstanten ist denkbar (Sanders et al., 1984). So wurden für die Laktosepermease auf der Innen- und Außenseite je drei apparente pK -Werte gefunden, von denen postuliert wird, daß zwei auf eine Änderung der Aktivität und einer auf eine Änderung der Affinität zurückzuführen sind (Page, 1987). Eine Erklärung ausschließlich durch Massenwirkungseffekte wird jedoch ebenfalls vorgeschlagen (Wright und Overath, 1986). Einen Einfluß der Transportsubstrate auf den K_M wurde auch in anderen Fällen beschrieben, so für Protonen beim Glukosetransport in *Chlorella vulgaris* (Schwab und Komor, 1978) und für Natrium beim Glukosetransport in Bürstensaumvesikeln (Kaunitz und Wright, 1984).

Der Einfluß des Membranpotentials läßt sich am besten als Translokationseffekt beschreiben, also über eine Änderung der Geschwindigkeitskonstanten. Affinitätsänderungen sind ebenfalls denkbar, Massenwirkungseffekte jedoch nicht. Zuerst sollen die Translokationseffekte besprochen werden. Zwei etwas unterschiedliche Betrachtungsweisen sind möglich: Die erste betont die Bewegung der Ladung und hat ihren historischen Hintergrund in der Untersuchung von Ionophoren und lipophilen Kationen (z.B. Läger,

1980). Die zweite betont mehr den Charakter eines immobilen Proteins, also das Permease-Konzept (Wright und Overath, 1986). Der Einfluß des Membranpotentials kann sich nur in Schritt 1 oder 3 des Transportzyklus (Fig.2) äußern, da die Bindungs-Schritte wieder vernachlässigt werden. Dabei geht man davon aus, daß nur bei einem der beiden Schritte das Membranpotential wirkt, da entweder der Carrier-Substrat-Komplex eine Ladung trägt oder der unbeladene Carrier (Geck und Heinz, 1976). Die Modellvorstellung dazu, das Barrierenmodell, (Hall et al., 1973) gilt jedoch für beide Möglichkeiten. Es geht davon aus, daß eine Energiebarriere in der Membran während des Transports überwunden werden muß (Eyringscher Übergangszustand). Das Membranpotential hilft, diese Barriere zu überwinden. Die Höhe der Energiebarriere entscheidet über das Ausmaß des Transports bei fehlendem Membranpotential. Je nach Lage der Energiebarriere ist topologisch nur der Teil des Transportwegs vom Potential getrieben, der vor der Barriere liegt. Die Schritte hinter der Barriere sind nicht mehr geschwindigkeitsbestimmend und daher scheinbar unabhängig vom Membranpotential. Daraus ergibt sich, daß nicht der volle Spannungsabfall über der Membran den Transport treibt oder in Gegenrichtung hemmt, sondern nur ein Teil (Boork und Wennerström, 1984; Garlid et al., 1989). Weiterhin ergibt sich daraus, daß die Abhängigkeit der Transportraten vom Membranpotential flacher ist als die Abhängigkeit der Akkumulationen (Hall et al., 1973). Für die Diffusion lipophiler Kationen oder Ionophoren ist dieses Modell gültig (Morf, 1981). Bei der Transportkatalyse durch Carrierproteine wird meist angenommen, daß die Reorientierung des unbeladenen Carriers spannungsabhängig ist. Nach gängigen Vorstellungen bewegt sich beim Transport nur ein Teil des Proteins, nämlich das sogenannte Tor ("gate"), und diese Bewegung muß keineswegs die gesamte

Membran überspannen. Die topologische Lage des Tores ist nur in wenigen Fällen bekannt. Für das Tetracyclin-Transportprotein wird eine Lage ganz auf einer der Außenseiten angenommen (Yamaguchi et al., 1990), also sozusagen als Deckel. Wirklich nachgewiesen ist das Tor nur im Bakteriorhodopsin in Form eines Lysinrestes (Oesterhelt und Tittor, 1989) und im Bande 3 Protein der Erythrocyten (Passow, 1986). Die Ableitung der Gleichungen für das Barrierenmodell setzt weiterhin ein konstantes Feld über der Membran voraus (Geck und Heinz, 1976). Die Gleichungen gelten streng nur, wenn die Ionen frei wie in Wasser diffundieren können (Glaser, 1986). Dies hat bei Transportproteinen zu der Vorstellung des sogenannten Protonenschachtes ("proton-well") geführt. Sie kann sehr gut die Potentialabhängigkeit der F_1F_0 -ATPase (Maloney, 1982) und des Protonenhexosesymporters aus Chlorella erklären (Schwab und Komor, 1978). Eine völlig andere Erklärung bieten jedoch Sanders et al. (1984).

Die Vorstellung eines beweglichen Tores ist im zweiten Modell aufgenommen, das oben als Permease-Konzept vorgestellt wurde. Man betrachtet jetzt das Membranpotential so, daß es das Tor, das geladen ist, ausrichtet. Die Verteilung zwischen innen und außen richtet sich nach der Nernstschen Gleichung. Ist das Potential gleich 0, ist eine 1:1 Verteilung zu beobachten. Damit sind Hin- und Rückreaktion gleich schnell. Bei 60 mV ist zwischen beiden ein Faktor 10 zu messen u.s.w. Dieser Effekt läßt sich beim Natrium-Glucose-Symporter aus Nieren nachweisen (Lever, 1984). Die zwei Modelle unterscheiden sich in ihren Konsequenzen für die Membranpotentialabhängigkeit jedoch nur wenig, da in beiden letztendlich die Geschwindigkeitskonstanten für Hin- und Rückreaktion des membranpotentialabhängigen Schrittes gegensinnig durch das Membranpotential beeinflusst werden. Auch im Fall des Membran-

potentials lassen sich Modelle errechnen, in denen das Potential fast nur einen Einfluß auf die Affinitätskonstanten, nicht jedoch auf die Maximalgeschwindigkeit zeigt (Sanders et al., 1984). Experimentell wurde dies zum Beispiel beim Glukosetransport in *Chlorella vulgaris* gefunden (Schwab und Komor, 1978).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Einflüsse der Transportsubstrate häufig als Massenwirkungseffekte beschrieben werden können, die Einflüsse des Membranpotentials meist als Translokationseffekte. Wie oben dargestellt, wirken die elektrochemischen Gradienten häufig nur auf einen oder wenige Schritte des Transportzyklus'. Um diese Wirkung tatsächlich zu sehen, ist es erforderlich, daß dieser Schritt den gesamten Transportzyklus limitiert (Sanders et al., 1984, Heinz et al., 1988). Bei der Untersuchung ist es daher wichtig, die elektrochemischen Gradienten in der Regel über mehrere Zehnerpotenzen zu variieren.

1.3. Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war, die Transportvorgänge von Lysin in *Corynebacterium glutamicum* zu untersuchen. Dabei sollten grundlegende biochemische Fragen beantwortet, aber auch die biotechnologischen Aspekte des Lysintransports im Zusammenhang mit der Lysinproduktion betrachtet werden.

Das Hauptgewicht lag in der Aufklärung des Mechanismus und der Energiekopplung sowohl des Lysinaufnahmesystems als auch des Lysinexportsystems. Aus der Einzelbetrachtung und einem Vergleich dieser beiden Systeme sollte es dann möglich sein, folgende Fragen zu klären: (i) Welches der genannten Modelle zur Aminosäuresekretion ist für den Fall des Lysins gültig? (ii) Gibt es

generelle Unterschiede zwischen Aufnahmesystemen und Exportsystemen?

Mit diesen Fragen eng verknüpft stehen die biotechnologisch relevanten Aspekte der Lysinsekretion: (i) Sind die in vitro gemessenen Effekte auch in vivo von Bedeutung ? (ii) Kann der Lysinexport ein limitierender Schritt für die Lysinproduktion sein? (iii) Hat die Lysinaufnahme einen Einfluß auf den Lysinexport? (iv) Haben unterschiedlich leistungsfähige Lysinproduktionsstämme auch unterschiedliche Exportsysteme?

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden in p.A. Qualität oder hoher Reinheit eingesetzt und von üblichen Herstellern bezogen. Die Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham geliefert.

Dipeptide wurde von der Firma Bachem Biochemika GmbH, Heidelberg bezogen. Besondere Bezugsquellen werden unter den jeweiligen Methoden aufgeführt.

2.2. Medien

2.2.1. Mineralsalzmedium 1 (MM 1) (modifiziert nach Kase und Nakayama, 1972)

Zur Anzucht des Wildstamms ATCC 13032 und der lysinauxotrophen Mutante 39/28

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	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
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,001	g/l
CuSO_4	0,2	mg/l
NiCl_2	0,02	mg/l
Biotin	0,2	mg/l

Das Medium wurde mit NaOH auf pH 7 eingestellt. Die Spurenelemente wurden als Stammlösungen zugesetzt. Nach dem Sterilisieren wurden noch folgende sterile Lösungen zugesetzt:

Glukose (50%)	25	g/l
Lysin (für den Stamm 39/28)	0,2	g/l

2.2.2. Mineralsalzmedium 2 (MM 2)

Für Wachstum und Lysinproduktion

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5	g/l
Harnstoff	5	g/l
KH_2PO_4	0,5	g/l
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0,5	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
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,001	g/l
CuSO_4	0,2	mg/l
NiCl_2	0,02	mg/l
Biotin	0,2	mg/l

Das Medium wurde mit NaOH auf pH 7 eingestellt. Die Spurenelemente wurden als Stammlösungen zugesetzt. Nach dem Sterilisieren wurden noch folgende sterile Lösungen zugesetzt:

Glukose (50%)	25	g/l
Leucin (5%) für den Stamm		
MH 20/22B	0,5	g/l
Kanamycin (für den Stamm		
KK 25)	10	µg/l

2.2.3. Mineralsalzmedium 3 (MM 3)

Für die kontinuierliche Kultur des Lysinproduktionsstammes DG 52-5

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5	g/l
Harnstoff	5	g/l
NaH_2PO_4	1,0	g/l
KCl	0,45	g/l
Na_3Citrat	0,45	g/l
Na_4EDTA	0,06	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
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,001	g/l
CuSO_4	0,2	mg/l
NiCl_2	0,02	mg/l
Biotin	0,2	mg/l
Polypropylenglykol	0,1	ml/l
Lysin·HCl (optionell)	14,6	g/l

Die Spurenelemente wurden als Stammlösungen mit 10 ml $\text{HCl}_{\text{conc}}/1$ zugesetzt. Das Medium wurde nicht neutralisiert. Es hatte einen pH zwischen 4 und 5. Während der Fermentation wurde es durch NaOH neutralisiert. Nach dem Sterilisieren wurden noch folgende sterile Lösungen zugesetzt:

Glukose (50%)	25	g/l
Thiamin (2g/l)	2	mg/l

2.2.4. Vollmedium

Für die Stammhaltung und die Anzucht des Wildstammes für die Lysinaufnahmemessungen und Exportmessungen.

Pepton aus Fleisch	15,6	g/l
Hefeextrakt	2,8	g/l
NaCl	2,5	g/l

Das Medium wurde mit KOH auf pH 7 eingestellt. Nach dem Sterilisieren wurden noch folgende sterile Lösungen zugesetzt:

Glukose (50%)	25	g/l
---------------	----	-----

2.2.5. Vollmedium-Agar

Für die Stammhaltung und die Sterilitätskontrolle wurden dem unter 2.5. beschriebenen Medium noch 20 g Agar/l zugesetzt.

2.2.6. Sekretionsmedium für ATCC 13032

Tris·HCl	50 mM
H-Alanin-Lysin-OH·HCl·0.5 H ₂ O	1 mM
NH ₄ (SO ₄)	10 mM
Natriumglutamat	10 mM
Natriumchlorid	10 mM
Kaliumchlorid	10 mM

Das Medium wurde mit HCl auf pH 7,5 eingestellt. (Aufgrund seiner Zusammensetzung ist es nur für Kurzzeitfermentationen geeignet).

2.3. Stämme und Kulturbedingungen

2.3.1. Stämme

Stamm (Mutante)	Phänotyp, Genotyp
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	Wildtyp
39/28, abgeleitet von ATCC 13032	Lysinauxotroph
5.5 pCS 23, abgeleitet von ATCC 13032 (A. Seep Feldhaus)	Lysinaufnahme negativ, enthält Plasmid pCS 23 mit feedback- resistenter Aspartatkinase
DG 52-5, abgeleitet von ATCC 13032	AEC-resistent, Lysinproduzent, Aspartatkinase feedback-resistent (Menkel et al., 1988)
MH20/22B, abgeleitet von ATCC 13032	AEC-resistent, Leu ⁻ , guter Lysin- produzent, Aspartatkinase feedback- resistent (Menkel et al. 1988)
13032 pSUP lysC ^{fbr} (später KK 25 genannt)	Wildstamm mit in das Genom integrier- ter feedback-resistenter Aspartat- kinase des MH 20/22 B, kanamycin- resistent (Arbeitsgruppe Eggeling)

2.3.2. Kulturbedingungen

2.3.2.1. Standardkultur

Alle Stämme wurden in 500 ml Erlenmeyerkolben mit zwei Schikanen, beschickt mit 100 ml Medium, angezogen. Die Inkubation erfolgte auf einem Rotationsschüttler bei 100 Upm und 30°C. Für die meisten Zwecke war eine Übernachtskultur ausreichend. Kulturen für Aufnahmemessungen wurden auf Vollmedium angezogen und in der spätlogarithmischen Wachstumsphase geerntet. Kulturen für die Exportmessungen wurden aufgrund ihres butterähnlichen Geruchs (Diacetyl?) geerntet, der mit dem Beginn effektiver Sekretion auftritt. Eine Korrelation zum pH-Wert und der optischen Dichte ist jedoch auch möglich. Im Falle des Stammes KK 25 wurde der optimale Erntezeitpunkt durch einen pH = 6,7 bestimmt.

2.3.2.2. Exportmessung im Wildstamm ATCC 13032

Zellen des Wildstamms wurden auf Vollmedium ohne Glukosezusatz herangezogen und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Die Zellen wurden zweimal bei 25°C mit 50 mM Tris·HCl, pH 7,5, 10 mM NaCl, 10 mM KCl gewaschen und in dem Sekretionsmedium suspendiert, so daß eine Zelldichte von etwa 2 bis 4 mg TG/ml erreicht wurde. Der Export wurde dann bis zu 3 Stunden verfolgt.

2.3.2.3. Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgte unter Zusatz von 20% sterilem Glycerin bei -20°C. Die Kulturen für die Stammhaltung wurden auf Vollmedium herangezogen und in der spätlogarithmischen Phase entsprechend

abgefüllt. Als Inokulum für eine Übernachtskultur diene jeweils 1ml der Stammkultur.

2.3.2.4. Kontinuierliche Kultur (Evans et al. 1970)

Die kontinuierliche Kultur wurde in einem 2-l-Fermenter (Eigenbau der Freien Universität Amsterdam) mit einem Füllvolumen von einem Liter betrieben. Das Medium wurde in 20-l-Portionen autoklaviert und dem Fermenter über eine peristaltische Pumpe zugeführt. Die Kulturbrühe wurde von der Oberfläche her über dieselbe peristaltische Pumpe mit einem Schlauch größeren Durchmessers abgesogen, so daß die Füllhöhe konstant gehalten wurde. Die Begasung erfolgte mit Pressluft bei einem Durchfluß von 60 l/Stunde. Die Rührgeschwindigkeit betrug 560 Upm. Unter diesen Bedingungen wurden maximal 5% des eingetragenen Sauerstoffs durch die Zellen veratmet. Da das Medium untitriert zugeführt wurde ($\text{pH} < 5$), wurde zur automatischen pH-Kontrolle 3M NaOH verwendet. Der Sauerstoffverbrauch und die CO_2 -Produktion wurden alle vier Stunden ("online") automatisch durch ein angeschlossenes Massenspektrometer bestimmt. Durchflußrate, Luftdurchfluß, optische Dichte, Trockengewicht, pH und die Reinheit der Kultur wurden regelmäßig kontrolliert. Die Proben wurden direkt aus dem Fermenter oder aus dem Abfluß entnommen.

2.4. Methoden

2.4.1. Silikonölzentrifugation (Klingenberg und Pfaff, 1967)

Die Silikonölzentrifugation dient der Trennung der Bakterienzellen von ihrem umgebenden Medium und macht Gebrauch von der unter-

schiedlichen Dichte dieser beiden Bestandteile. 300 µl Reaktionsgefäße (Beckman) wurden mit 30 µl 20%iger Perchlorsäure und 65 µl Silikonöl der Dichte 1,03 (PN 200, Roth, Karlsruhe) versehen. Aufgrund der unterschiedlichen Dichte lag nach einem kurzen Zentrifugationsschritt das Öl über der Perchlorsäure. Auf die so vorbereiteten Röhrchen wurden bis zu 200 µl Kulturbrühe pipetiert. Anschließend wurden die Röhrchen 30 Sekunden lang in einer Microfuge E (Beckman) zentrifugiert. 95% der Bakterienzellen wanderten dabei durch das Öl in die Perchlorsäure und wurden dort sofort extrahiert. Durch dieses Verfahren wurde ein Stop des Metabolismus innerhalb von etwa 10 Sekunden erreicht.

Für die Bestimmung radioaktiv markierter Substanzen wurden Aliquote (20 oder 50 µl) der Überstände mit Scintillationsflüssigkeit gemischt und in einem Scintillationszähler (Rack beta 1214, LKB, Schweden) gezählt. Für die Bestimmung von radioaktiven Substanzen in den Extrakten wurde der Perchlorsäure enthaltende Teil des Röhrchens mittels eines Skalpell abgetrennt. Der Inhalt der Spitze wurde durch Zentrifugation in ein Eppendorf-Cup überführt, mit 750 µl Wasser versetzt und gut suspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde ein Aliquot des Überstands im Szintillationszähler gezählt.

Für die Bestimmung nicht radioaktiver Metabolite wurde die Perchlorsäurefraktion wie eben beschrieben gewonnen, mit 45 µl Wasser versetzt und durch Zugabe von 25 µl einer 5M KOH, 1M Triethanolamin-Lösung neutralisiert. Das Endvolumen der Perchlorsäurefraktion betrug damit 100 µl. Das ausgefallene Kaliumperchlorat wird nach Kühlung auf Eis abzentrifugiert und der Überstand direkt für die Analytik eingesetzt. Die Überstände der Silikonölröhrchen konnten unverändert für die Analytik verwendet werden.

2.4.2. Bestimmung des Cytoplasmavolumens (Rottenberg, 1979)

Für die Berechnung intrazellulärer Konzentrationen ist es notwendig, das Cytoplasmavolumen zu kennen. Grundlage dieser Bestimmung ist die Silikonölzentrifugation (2.4.1.). Da bei dieser Methode immer etwas Kulturmedium in das Sediment mitgeschleppt wird, war es nötig, eine Korrektur für dieses Volumen zu machen. Für die Raumbestimmung wurden daher zwei radioaktive Substanzen verwendet. $^3\text{H}_2\text{O}$ verteilte sich gleichmäßig außerhalb und innerhalb der Zellen, während ^{14}C -Taurin von *Corynebacterium glutamicum* nicht aufgenommen wurde. Letzteres ist ein Maß für das in das Sediment mitgeschleppte Medium, ersteres ein Maß für das gesamte in das Sediment gelangte Volumen, die Differenz also das Cytoplasmavolumen.

Zur Ausführung wurden 0,5 ml Zellsuspension ($\text{OD}_{600} = 5-20$) mit 20 μl eines Markierungscocktails ($^3\text{H}_2\text{O}$ ca. 40kBq, ^{14}C -Taurin ca. 10kBq, 10 mM Taurin) 30 Sekunden inkubiert und dann in fünf Portionen zu je 100 μl in die Silikonölzentrifugation eingesetzt. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte wie unter 2.4.1. beschrieben. 20 μl der Überstände und die Sedimente wurden im Szintillationszähler nach einem Programm für Doppelmarkierungen gezählt. Das Cytoplasmavolumen wurde wie folgt errechnet:

$$^3\text{H}_2\text{O-Raum} = V_{\text{üst}} \times \text{dpm } ^3\text{H}_2\text{O}_{\text{sed}} / \text{dpm } ^3\text{H}_2\text{O}_{\text{üst}}$$

$$\text{Taurinraum} = V_{\text{üst}} \times \text{dpm } ^{14}\text{C}_{\text{sed}} / \text{dpm } ^{14}\text{C}_{\text{üst}}$$

$$\text{Internes Volumen} = ^3\text{H}_2\text{O-Raum} - \text{Taurinraum}$$

$V_{\text{üst}}$ = Volumen des Überstands (100 μl)

dpm_{sed} = dpm des gesamten aufgearbeiteten Sediments

$\text{dpm}_{\text{üst}}$ = dpm des gesamten Überstands

Probenvolumen = 100 μl

2.4.3. Bestimmung der Komponenten der protonenmotorischen Kraft

Die Bestimmung des Membranpotentials und des pH-Gradienten ermöglichen die Berechnung der protonenmotorischen Kraft:

$$\delta \mu_{H^+}/F = \delta p = \delta \Psi - z \delta pH$$

2.4.3.1 Bestimmung des Membranpotentials mit TPP⁺ (Rottenberg, 1979)

Das Membranpotential wurde mittels einer radioaktiven Sonde, des Tetraphenylphosphoniumbromids (TPP⁺) bestimmt. TPP⁺ ist ein lipophiles Kation und kann daher die Membran permeieren. In genügend geringen Konzentrationen eingesetzt (< 10 µM), kann seine Verteilung durch die Nernstsche Gleichung beschrieben werden.

$$\delta \Psi = -z \cdot \log (TPP^+_{in}) / (TPP^+_{out}).$$

Für die Bestimmung wurden 500 µl Zellsuspension zu 10 µl ¹⁴C-TPP⁺ (ca. 70 000 dpm/nmol, Endkonzentration <10 µM) gegeben und nur 30 Sekunden inkubiert, wodurch Anaerobiose vermieden wurde. Um die Verteilung des TPP⁺ zwischen Überstand und Cytoplasma zu bestimmen, wurde mit drei Aliquoten von je 100 µl eine Silikonölzentrifugation durchgeführt. Da bei hohen Membranpotentialen (> 100 mV) ein Großteil der radioaktiven Markierung in die Zellen wandert, konnte die intrazelluläre Radioaktivität aus der Differenz zwischen der Radioaktivität im Gesamtansatz und der im Überstand bestimmt werden.

Die so errechneten Potentiale zeigten jedoch unüblich hohe Werte. Es wurde daher angenommen, daß ein Teil des TPP⁺ unspezifisch an die Zellen gebunden wurde. Der Anteil des gebundenen

TPP⁺ hängt jedoch von der Konzentration des TPP⁺ ab. Da die Zellen das TPP⁺ im Cytoplasma membranpotentialabhängig bis zu mehreren mM akkumulierten, war also eine Veränderung der Bindung in Abhängigkeit vom Membranpotential zu erwarten. Für eine genaue Potentialbestimmung mußte daher ein Iterationsverfahren angewendet werden, das auf eine Eichkurve zurückgreift, bei der die Bindung von ¹⁴C-TPP⁺ an deenergetisierte Zellen bei verschiedenen TPP⁺-Konzentrationen gemessen wurde. Eine genaue Beschreibung dieser Methode ist bei Zaritzki et al. (1981) zu finden.

2.4.3.2. Membranpotentialbestimmung mit ⁸⁶Rb⁺ und Spannungsklemme (Rottenberg, 1979).

Da die Membranpotentialbestimmung mit TPP⁺ problematisch war, wurde als weitere Methode die Verteilung von ⁸⁶Rb⁺ verwendet. Die Membran muß für diesen Zweck für ⁸⁶Rb mittels Valinomycin permeabel gemacht werden. ⁸⁶Rb⁺ verteilt sich dann wie TPP⁺ entsprechend der Nernstschen Gleichung. Die Verteilung wurde nach der Silikonölzentrifugation bestimmt. Im Gegensatz zur TPP⁺-Methode war eine unspezifische Bindung nicht festzustellen. Die externe Kaliumkonzentration durfte 100 µM nicht überschreiten. Höhere Kaliumkonzentrationen führten dazu, daß der K⁺-Transport schneller ist als die Protonenausschleusung durch die Atmungskette, damit kommt es zu einer Reduktion des Membranpotentials. Das Membranpotential wird dann durch ein Kaliumdiffusionspotential ersetzt, das durch die Nernstsche Gleichung errechnet werden kann, in die die ⁸⁶Rb⁺-Verteilung eingesetzt wird. Die so eingestellten Potentiale waren über mindestens 30 Minuten stabil. Die Methode wird daher, in Analogie zu der in der Neurophysiologie

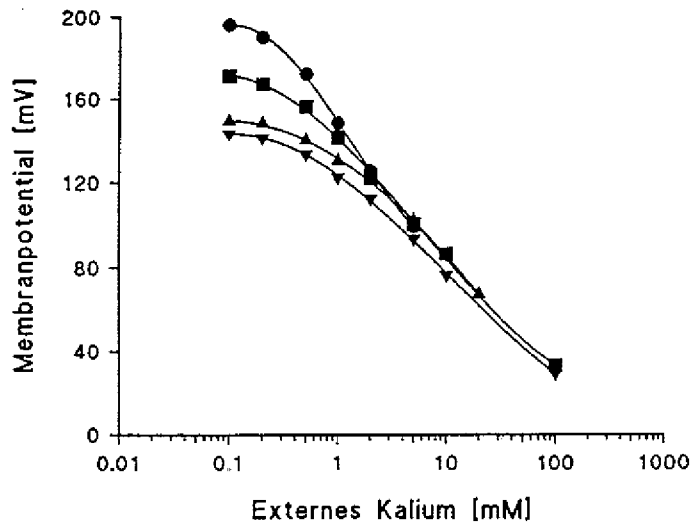


Fig. 3 Bestimmung und Variation des Membranpotentials mittels verschiedener Kaliumkonzentrationen in Anwesenheit von Valinomycin (▼) pH 6,5; (▲) pH 7,5; (■) pH 8,5; (●) pH 9,2. Die Gleichgewichtspotentiale bei verschiedenen pH-Werten sind in Tabelle 1 aufgelistet.

angewendeten Methode, als Spannungsklemme bezeichnet (Fig. 3). Zur Ausführung wurden 500 μl Zellsuspension zu 5 μl $^{86}\text{Rb}^+$ (1 kBq/ μl) und 5 μl 1 mM Valinomycin gegeben. Nach 30 Sekunden wurde mit 3 Aliquoten von je 100 μl die Silikonölzentrifugation durchgeführt und die radioaktive Markierung bestimmt.

2.4.3.3. Bestimmung des pH-Gradienten (Rottenberg, 1979)

Der pH-Gradient kann durch die Verteilung von schwachen Basen bzw. schwachen Säuren über der Membran bestimmt werden, da die Membran für die jeweilige neutrale Form frei permeabel ist, während sie für das Ion impermeabel ist.

Liegt der interne pH-Wert über dem externen, wird eine schwache Säure benutzt. Diese liegt in diesem Fall im Cytosol stärker dissoziiert vor als im Überstand. Da nur die undissoziierte Form permeieren kann wird die Säure im Innenraum akkumuliert. Der pH-Gradient lässt sich dann wie folgt berechnen:

$$\text{pH}_{\text{in}} - \text{pH}_{\text{ex}} = \delta \text{ pH} = \log ([^{14}\text{C}_{\text{in}}]/[^{14}\text{C}_{\text{ex}}]).$$

Gilt $\text{pH}_{\text{ex}} < \text{pK} + 1$ muß für den Anteil an undissoziierter Säure im Cytosol korrigiert werden, es gilt:

$$\text{pH}_{\text{in}} = \log \left[\frac{{}^{14}\text{C}_{\text{in}}}{{}^{14}\text{C}_{\text{ex}}} (10^{\text{pK} + 10^{\text{pH}_{\text{ex}}}} - 10^{\text{pK}}) \right]$$

Liegt der interne pH-Wert unter dem externen, wird eine schwache Base benutzt, deren neutrale Form permeieren kann. Aus denselben Überlegungen wie oben gilt dann:

$$\text{pH}_{\text{ex}} - \text{pH}_{\text{in}} = - \delta \text{ pH} = \log \left(\frac{{}^{14}\text{C}_{\text{in}}}{{}^{14}\text{C}_{\text{ex}}} \right).$$

Und für die Korrektur, wenn $\text{pH}_{\text{ext}} > \text{pK} - 1$ gilt:

$$\text{pH}_{\text{in}} = \log \left[\frac{A_{\text{in}}}{A_{\text{ex}}} (10^{-\text{pK}} + 10^{-\text{pH}_{\text{ex}}}) - 10^{-\text{pK}} \right]$$

a) $\text{pH}_{\text{int}} > \text{pH}_{\text{ext}}$

Zur Bestimmung wurden 500 μl Zellsuspension ($\text{OD}_{600} = 5 - 20$) mit 10 μl U- ${}^{14}\text{C}$ -Benzoat ($\text{pK} = 4,3$) (ca. 100 000 dpm/nmol, ca. 3 μM) für 1 min inkubiert. 3 x 100 μl dieser Zellsuspension wurden anschließend in die Silikonölzentrifugation eingesetzt. Die Radioaktivität im Überstand und in den Extrakten wurde dann wie oben beschrieben bestimmt. Die Menge von unspezifisch gebundenem Benzoat wurde in deenergetisierten Zellen bestimmt, die für diesen Zweck mit 10 μl 2 mM Valinomycin/0,2 mM Nigericin-Lösung vorbehandelt wurden. Der so erhaltene Wert wurde von den Meßwerten subtrahiert.

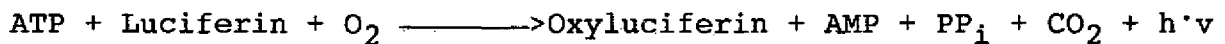
b) $\text{pH}_{\text{int}} < \text{pH}_{\text{ext}}$

Die Bestimmung wurde wie unter a) beschrieben durchgeführt, als Sonde jedoch U- ${}^{14}\text{C}$ -Methylamin ($\text{pK} = 9,3$) gleicher spezifischer Aktivität und Konzentration verwendet. Für die Korrektur gegen unspezifisch gebundenes Methylamin wurden die Zellen durch 0,01 % Cetyltrimethylammoniumbromid (Endkonzentration) deenergetisiert.

2.4.4. Bestimmung des cytosolischen ATP-Gehalts

Zur Bestimmung des ATP-Gehaltes wurde die Luciferin/Luciferase-Methode benutzt (modifiziert nach Lundin et al., 1976 und Schimz et al., 1981). Die Messung verläuft nach dem folgenden Prinzip:

Luciferase



Die Lichtmenge ist proportional zur ATP-Menge.

a) Extraktion und Probenvorbereitung

Die Nukleotide wurden durch Mischung der Zellen mit Dimethylsulfoxid (DMSO) extrahiert (Houssin et al., 1990). Hierfür wurden 20 µl Zellsuspension ($\text{OD}_{600} = 5-20$) in 180 µl DMSO pipettiert und der Extrakt sofort durch Zugabe von 800 µl eiskaltem Wasser heruntergekühlt. Die so erhaltenen Proben können längere Zeit gefroren aufbewahrt werden.

b) Durchführung der Bestimmung

Für die ATP-Bestimmung wurden die oben erhaltenen Extrakte unverändert eingesetzt. Zur Berechnung der ATP-Menge wurden externe Standards benutzt. Um gegen die Löschung der Lichtblitze durch Probenbestandteile zu korrigieren, wurde jeder Probe zusätzlich noch ein interner Standard zugesetzt und der ATP-Gehalt daraufhin nochmals bestimmt. Für die Bestimmung wurde ein Lyophilisat aus dem Extrakt des Laternenorgans des Leuchtkäfers benutzt (Sigma, Buffered Firefly Lantern Extract, FLE-50). 50 mg Lyophilisat wurden in 5 ml Wasser aufgelöst und die ungelösten

Bestandteile in einer Laborzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde unverändert benutzt oder entsprechend dem Signal verdünnt.

Der Meßansatz sieht wie folgt aus:

100 µl Extrakt

250 µl Luciferin/Luciferase

2250 µl Testpuffer (50 mM Tris-H₂SO₄, pH 7,4, 3,5 mM MgSO₄,
2,5 mM K₂SO₄, 0,6 mM EDTA)

Für die interne Standardisierung wurde ein identischer Ansatz eingesetzt, der zusätzlich zu den 100 µl Extrakt 40 µl einer 1 µM ATP-Lösung enthielt.

Da die Erzeugung der Lichtblitze einen zeitabhängigen Verlauf hat, wurde die Messung in einem Biolumineszenzanalysator (XP 2000, Skan AG Basel, CH) halbautomatisch durchgeführt. Das Gerät injiziert beim Start der Messung den Luciferin/Luciferase-Extrakt und den Testpuffer in eine Küvette und mißt 20 Sekunden lang die Lichtemission.

2.4.5. Erzeugung von Diffusionspotentialen (de Vrij et al., 1989)

Um die Wirkung der einzelnen, den Transport treibenden Kräfte (Membranpotential, pH-Gradient) bestimmen zu können, war es notwendig, diese getrennt zu erzeugen. Dies war durch das Anlegen von Diffusionspotentialen möglich. Dazu wurde eine dichte Zellsuspension (OD₆₀₀ ca. = 100) zwei Stunden auf Eis mit 50 mM Tris·HCl pH 7,5, 10 mM NaCl, 100 mM Kaliumacetat, 200 mM KCl und 100 µM Valinomycin inkubiert. Ein Aliquot der Zellen wurde einmal schnell mit eiskaltem Puffer (50 mM Tris·HCl, pH 7,5, 10 mM NaCl) gewaschen und sofort 1:10 mit den folgenden Puffern verdünnt: Mit dem Waschpuffer um ein Membranpotential und einen pH-Gradienten

(innen alkalisch) zu erhalten; mit 50 mM Tris·HCl, pH 7,5, 10 mM NaCl, 100 mM Natriumacetat um ein Membranpotential zu erhalten; mit 50 mM Tris·HCl, pH 7,5, 10 mM NaCl, 300 mM KCl um einen pH-Gradienten (innen alkalisch) zu erhalten; und mit dem Inkubationspuffer um deenergetisierte Zellen zu erhalten. Alle Gradienten mußten anschließend gemessen werden, da ihre genaue Höhe nicht vorhersagbar war.

2.4.6. Bestimmung von Aminosäure-Konzentrationen (Jones und Gilligan, 1983)

Für die Bestimmung der Aminosäuren wurden 3 x 100 µl Zellsuspension aus den Ansätzen entnommen und mit diesen eine Silikonöltrifugation durchgeführt. Die drei Überstände wurden vereinigt und 150 µl davon in ein Probenfläschchen überführt. Dazu wurden 150 µl einer 0,2 mM Ornithin, 0,12% Natriumazid Lösung pipettiert. Ornithin diente als interner Standard, um die Genauigkeit der Analyse zu überprüfen. Das Azid verhinderte das bakterielle Wachstum in den Proben. Die Perchlorsäurefraktionen wurden wie unter 2.4.1. beschrieben behandelt. Die Extrakte der drei Röhrchen wurden vereinigt, 150 µl in ein Probenfläschchen pipettiert und 150 µl der Ornithin/Azid-Lösung hinzugefügt.

Für die Analyse der Proben wurde ein HPLC-Gerät vom Typ HP 1090 M (Hewlett-Packard, Waldbronn) mit angeschlossenen Fluoreszenzdetektor (HP 1046A) verwendet. Die zu analysierende Aminosäurelösung (1 µl) wurde unmittelbar vor jeder Analyse der automatischen Vorsäulenderivatisierung mit 10 µl o-Phtaldialdehyd/2-Mercaptoethanol-Fertigreagenz (Pierce Europe, B.V. Oud-Beijerland, Niederlande) unterzogen. Sie reagieren dabei schnell und quantitativ zu fluoreszierenden, thiosubstituierten Isoindolen,

die auf einer "reversed phase"-Säule (Hypersil OD 18, 5 μm , Vorsäule: 20 x 4 mm, Hauptsäule 150 x 4 mm, Chromatographie-Service, Langerwehe, [die Kombination aus einer Vor- und einer Hauptsäule kann für gut 2000 Analysen verwendet werden]) bei 40 °C aufgetrennt wurden. Die Flußrate betrug 0,5 ml/min. Die mobile Phase bestand aus einer Mischung aus 0,1 M Natriumacetat pH 7,2; 0,06% Natriumazid und Methanol. Die Mischung änderte sich gemäß eines Gradientenprogramms während der 15,5 Minuten währenden Analyse wie folgt:

Zeit (min)	Methanol%	Natriumacetat%
0.01	25	75
3	45	55
7	65	35
13	73	27
14.29	73	27
14.30	25	75

Aminosäurekonzentrationen von mehr als 0,5 mM wurden aus Proportionalitätsgründen nicht überschritten. Die Berechnung der Konzentrationen erfolgte durch Vergleich mit einem externen Standard und wurde gegebenenfalls durch den internen Standard korrigiert.

2.4.7. Glukosebestimmung (nach Bergmeyer et al., 1974)

Die Glukosebestimmung beruhte auf einem gekoppelten Test mittels Hexokinase und Glukose-6-Phosphatdehydrogenase. Es wurde die Zunahme von NADH bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte durch Vergleich mit einer Eichkurve. Es wurde die Hexokinase aus *Saccharomyces cerevisiae* und die Dehydrogenase aus *Leuconostoc mesenteroides* verwendet.

2.4.8. Bestimmung von organischen Säuren

Die Aufarbeitung der Proben für die Bestimmung der organischen Säuren erfolgte analog derjenigen der Aminosäuren. Die Bestimmung erfolgte durch UV-Detektion bei 210 nm nach der Auftrennung durch Ionenausschlußchromatographie bei 60°C. Für die Trennung wurde ein Ionenchromatograph S-1000 verwendet (Sykam AG, Gilching), der mit einer Ionenausschlußsäule bestückt war (LC E 01). Die Bestimmung der organischen Säuren erfolgte durch Vergleich mit entsprechenden Standards. Als Laufmittel diente 0,01 N H₂SO₄ bei einer Flußgeschwindigkeit von 0,8 ml/min.

2.4.9. Bestimmung von Kaliumionen

Der Kaliumgehalt von Fermentationsüberständen wurde mittels Atomabsorptionsspektroskopie (Perkin Elmer 3030) durch den Analysenauftragsdienst des Forschungszentrum Jülich bestimmt.

2.4.10. Bestimmung der Lysinaufnahme

Für die Bestimmung der Lysinaufnahme wurde die schnelle Membranfiltration oder die Silikonölzentrifugation benutzt. In beiden Fällen wurden ruhende Zellen für die Transportmessungen verwendet. Wachsende Zellen aus dem Schüttelkolben wurden zum gewünschten Zeitpunkt geerntet, abzentrifugiert (5', 3000g) und zweimal mit 50 mM Tris·HCl pH 7,5; 10mM NaCl; 10 mM KCl gewaschen. Nach dem letzten Schritt wurden die Zellen im selben Puffer aufgenommen, so daß eine Zelldichte von 1,8 - 7,2 mg Trockengewicht/ml erreicht wurde. Für die Aufnahmemessung wurden diese Zellen 1 min bei 25°C vorinkubiert. Die Aufnahme wurde durch Zugabe der Zellen zum

Ansatz gestartet, wobei das Volumen der Zellzugabe 1/12 des Gesamtansatzes betrug. Der Ansatz enthielt 1 - 500 μM markiertes Lysin (15 - 200 Bq/nmol) im oben beschriebenen Puffer. Um die Transportreaktion zu stoppen, wurden 100 μl aus dem Ansatz entnommen und in 850 μl eiskalten Puffer gegeben, der 1 mM unmarkiertes Lysin enthielt. Die so entstandenen 950 μl Zellsuspension wurden sofort über eine Mehrfachfiltrationsanlage VF1 (Amicon) abfiltriert, wobei die Zellen durch Glasfaserfilter (Whatman GF/F) zurückgehalten wurden. Anhaftendes Medium wurde durch zweimaliges Spülen mit 5 ml eiskaltem Puffer entfernt. Nach dem Trocknen wurden die Filter mit Scintillationsflüssigkeit versetzt und in einem Scintillationszähler ausgewertet.

Weniger fehlerbehaftet, jedoch aufwendiger ist die Silikonölzentrifugation. Die Vorbehandlung der Zellen war identisch zu der oben beschriebenen. In diesem Fall wurde die Transportreaktion jedoch durch die Silikonölzentrifugation selbst gestoppt. Die Durchführung der Silikonölzentrifugation und die Aufarbeitung der Proben ist unter 2.4.1. beschrieben.

2.4.11. Bestimmung des Lysinexports

Die Zellen wurden zum gewünschten Zeitpunkt geerntet (5 min, 3000 g), zweimal mit eiskaltem (!) Puffer (50 mM Tris·HCl, pH 7,5; 10 mM NaCl; 10 mM KCl) gewaschen und im selben Puffer aufgenommen, so daß eine Zellkonzentration von etwa 40 mg Trockengewicht/ml erreicht wurde. Diese Zellen konnten bis zu 2 Stunden auf Eis gehalten werden, ohne daß größere Verlust von zellinternem Lysin eintraten. Sollte in den späteren Ansätzen das Membranpotential variiert werden, wurde zum Waschen der gleiche Puffer mit 0,1 mM KCl verwendet. Die Sekretion wurde durch einen Temperatursprung

auf 25°C gestartet. Dazu wurde ein Volumenteil Zellsuspension zu elf Volumenteilen des vorgewärmten Exportansatzes pipettiert. In Aliquoten von je 3 x 100 µl wurde der Export durch eine Silikonölzentrifugation zu den gewünschten Zeiten gestoppt. Die Silikonölzentrifugation und die Aufarbeitung der Proben ist in Kapitel 2.4.1. beschrieben. Da der Puffer keine Substrate enthielt, konnte kein Lysin neu synthetisiert werden. Daher konnte nur das nach dem Waschen verbliebene interne Lysin durch das Exportsystem ausgeschieden werden. Es erschien quantitativ im Überstand.

Wenn die externe Lysinkonzentration höher als 10 mM lag, konnte die zellinterne Lysinkonzentration nicht ohne weiteres bestimmt werden, da Verfälschungen durch mitgeschlepptes externes Lysin auftraten. Dieses Problem wurde durch die schnelle Waschprozedur umgangen. Dazu wurden 350 µl Zellsuspension dem Ansatz entnommen, in einer Eppendorffzentrifuge abzentrifugiert (18 sek !) und der Überstand abgesogen (10 sek). Nach dem Resuspendieren (30 sek) mit 350 µl eiskaltem Waschpuffer wurden 3 x 100 µl sofort der Silikonölzentrifugation zugeführt. Wurde das Protokoll genau eingehalten, traten keine Verluste von internem Lysin auf.

2.4.12. Berechnungen

Entsprechend der Michaelis-Menten-Kinetik, hängt die Lysinexportrate von der Lysininnenkonzentration ab. Da die interne Lysinkonzentration von Versuch zu Versuch etwas schwankte, war es sinnvoll, zum Vergleich der Exportaktivität eine Größe zu haben, die unabhängig von der internen Lysinkonzentration ist. Diese Vergleichsgröße ist die Geschwindigkeitskonstante k .

Liegen die Innenkonzentration nicht weit über dem K_M des Exportsystems, so lassen sich die erhaltenen Effluxkurven sehr gut

als eine Reaktionskinetik 1. Ordnung behandeln, es gilt daher $V = k \cdot c$. Während die Geschwindigkeit (V) von der Innenkonzentration abhängt ist (k) nur von den energetischen Parametern abhängig. Wird der Logarithmus der Lysininnenkonzentration gegen die Zeit aufgetragen entspricht die Steigung dieser Geraden " k ". Zuverlässigere Werte für " k " konnten aus dem Verlauf der externen Lysinkonzentrationen gewonnen werden. Dafür müssen die aktuellen Konzentrationen im Überstand vom Wert der Konzentration nach unendlich langer Zeit abgezogen werden. Wird der Logarithmus der so errechneten Werte gegen die Zeit aufgetragen, entspricht die Steigung der Geraden " k ".

Liegen die Innenkonzentrationen deutlich über dem K_M treten Abweichungen von einer Reaktion 1. Ordnung auf. Diese Abweichung konnte jedoch dazu ausgenutzt werden, den K_M des Exportsystems zu ermitteln. Dazu wurde die Steigung der Effluxkurve (die Rate), gegen die zum derzeitigen Zeitpunkt gemessene Innenkonzentration aufgetragen. Um die Steigung zu jedem Zeitpunkt genau zu ermitteln, wurden Teilstücke einer Effluxkurve als einfach exponentieller Zerfall behandelt und die entsprechende Geschwindigkeitskonstante ermittelt (Enzfitter, Elsevier-Biosoft). Aus diesen Daten wurde ein Sekundärdiagramm (k) gegen Zeit aufgestellt und die aktuelle Geschwindigkeit durch Multiplikation mit der Innenkonzentration ermittelt.

3. Ergebnisse

3.1. Energetische und physiologische Parameter von *Corynebacterium glutamicum* unter besonderer Berücksichtigung des Lysinproduktionsstammes DG 52-5

3.1.1. Größe, Gestalt, Wachstumsbereich

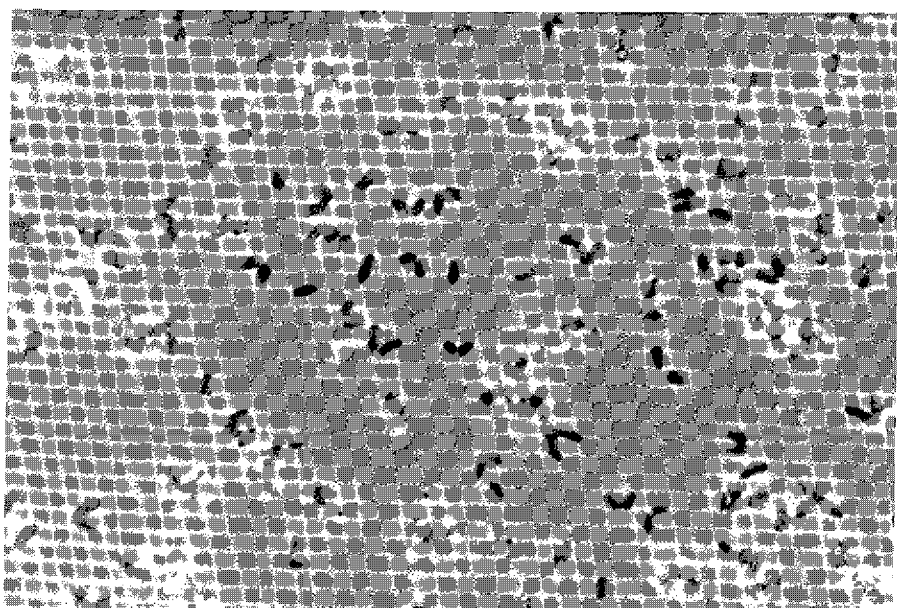


Fig. 4 Lichtmikroskopische Aufnahme von *Corynebacterium glutamicum*

Corynebacterium glutamicum ist ein Gram-positives unbewegliches Bakterium. Nach der Analyse im Coulter Counter ist das Bakterium etwa 2 μm groß. Dieser Wert ist überbestimmt, da bei neutralem pH häufig zwei Bakterien aneinanderhängen (V-Form), wie im Mikroskop festgestellt werden konnte (Fig. 4). Bei höheren pH-Werten bildete *Corynebacterium glutamicum* größere Aggregate. Typisch ist die Keulenform der einzelnen Bakterien. Kontaminationen ließen sich daher leicht erkennen. Gutes Wachstum war zwischen pH 6 und pH 8,5 möglich.

3.1.2. Das Membranpotential

Das Membranpotential wurde mittels TPP^+ oder $^{86}\text{Rb}^+$ bestimmt. Alle verwendeten Stämme verhalten sich in Bezug auf das Membranpotential völlig gleich. Tabelle 1 gibt das Membranpotential unter verschiedenen Bedingungen an. Die durch TPP^+ bestimmten Werte wurden nach der von Zaritzki et al. (1981) entwickelten Methode korrigiert. Trotz Korrektur wurden mit ^{86}Rb stets höhere Werte

Tabelle 1 Potentialbestimmung bei *C. glutamicum*

Stamm	pH	Methode	Membranpotential(mV)		Bedingungen
			unkorr.	korr.	
13032	5,5	TPP	116	22	Standard ^a
	7,5	TPP	165	97	Standard ^a
	7,5	TPP	182	118	0,1 mM KCl, 10 μM Val.
	9,0	TPP	198	136	100 mM KCl
	9,5	TPP	215	157	Standard ^a
DG 52-5	7,5	TPP	165	90	Standard ^a
	7,5	TPP	176	110	0,1 mM KCl, 10 μM Val.
	7,5	Rb	150		0,1 mM KCl, 10 μM Val.
	6,5	Rb	142		0,1 mM KCl, 10 μM Val.
	8,5	Rb	171		0,1 mM KCl, 10 μM Val.
	9,2	Rb	195		0,1 mM KCl, 10 μM Val.
MH20/22B	7,5	Rb	150		0,1 mM KCl, 10 μM Val.

^a 50 mM MES/Tris; 10 mM NaCl; 10 mM KCl

bestimmt als mittels TPP^+ . Die Rb-Methode kann nur in Gegenwart von Valinomycin benutzt werden.

3.1.3. Der pH-Gradient

Der pH-Gradient wurde wie unter 2.4.3.3. beschrieben bestimmt. Es konnten keine Unterschiede zwischen den verwendeten Stämmen

festgestellt werden. *Corynebacterium glutamicum* zeigt

Tabelle 2 pH-Gradient in *C. glutamicum*

Stamm	externer pH	interner pH
13032	5,0	6,5
	5,5	6,6
	6,5	7,1
	7,5	7,5
	8,0	7,5
	8,5	7,6
	9,0	7,7
DG 52-5	5,0	6,6
	6,0	7,1
	7,1	7,5
	7,5	7,5
	9,0	7,6
MH20/22B	nicht bestimmt	

eine ausgeprägte pH-Homöostase, die für einen konstanten inneren pH über einen weiten Bereich des äußeren pH sorgt.

3.1.4. Protonenmotorische Kraft

Aus den in 3.1.2. und 3.1.3. ermittelten Daten läßt sich die Protonenmotorische Kraft berechnen (nach ^{86}Rb Bestimmung).

Es gilt $\text{pmk} = \delta\mu_{\text{H}^+}/F = 2,3 \text{ RT}/F \cdot \delta\text{pH} + \delta\psi$, damit ergibt sich

bei pH 6,5 $\text{pmk} = -60 \text{ mV} - 140 \text{ mV} = -200 \text{ mV}$

bei pH 7,5 $\text{pmk} = \delta\psi = -150 \text{ mV} (\delta\text{pH} = 0)$

bei pH 9,0 $\text{pmk} = +80 \text{ mV} - 190 \text{ mV} = -110 \text{ mV}$

3.1.5. Der cytosolische ATP-Gehalt

In ruhenden Zellen des Stammes DG 52-5 beträgt der ATP-Gehalt zwischen 4 und 5 mM. Völlig deenergetisierte Zellen wiesen einen Gehalt zwischen 1,5 und 2mM ATP auf.

3.2. Das Lysinaufnahmesystem von *Corynebacterium glutamicum*

3.2.1. Kinetische Eigenschaften

Ruhende Zellen (Zellen in Puffer ohne Glukose) des Wildtyps ATCC 13032 nehmen radioaktiv markiertes L- $[^{14}\text{C}]$ -Lysin auf (Fig. 5). Ein Gleichgewicht der Verteilung zwischen Innenraum und Medium wurde nach etwa 2 Stunden erreicht. Einmal aufgenommenes Lysin wurde nicht metabolisiert. Dies wurde durch die Auftrennung der Zell-extrakte in einer Dünnschichtchromatographie belegt. Die gesamte Aktivität fand sich auf der Höhe eines Lysinstandards wieder. Aus der Verteilung des markierten Lysins zwischen innen und außen wurden die Akkumulationsverhältnisse berechnet. Bei einer Außenkonzentration von 10 μM Lysin wurde für das Cytosol eine

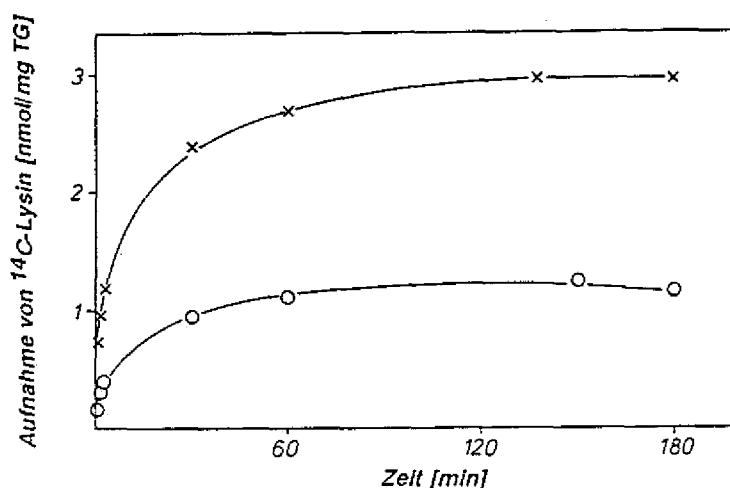


Fig. 5 Verlauf der Aufnahme von ^{14}C -Lysin. Zwei verschiedene Lysinkonzentrationen, 10 μM (o) und 100 μM (x) wurden eingesetzt.

Konzentration von 1-2 mM gefunden. Dies entspricht einer 100 - 200 fachen Akkumulation, wie sie typisch für sekundäre Transportsysteme ist. Das Lysinaufnahmesystem zeigt eine Michaelis-Menten Kinetik (Fig. 6). Für Zellen, die auf Minimalmedium 1 gewachsen waren, wurde ein K_M von 10 μM und eine Maximalgeschwindigkeit von

0,15 nmol/min(/mg TG) gemessen. Die Maximalgeschwindigkeit betrug 0,2 - 0,3 nmol/min(/mg TG), wenn die Zellen auf Komplexmedium herangezogen wurden. Ebenso zeigten sich keine starken Änderungen

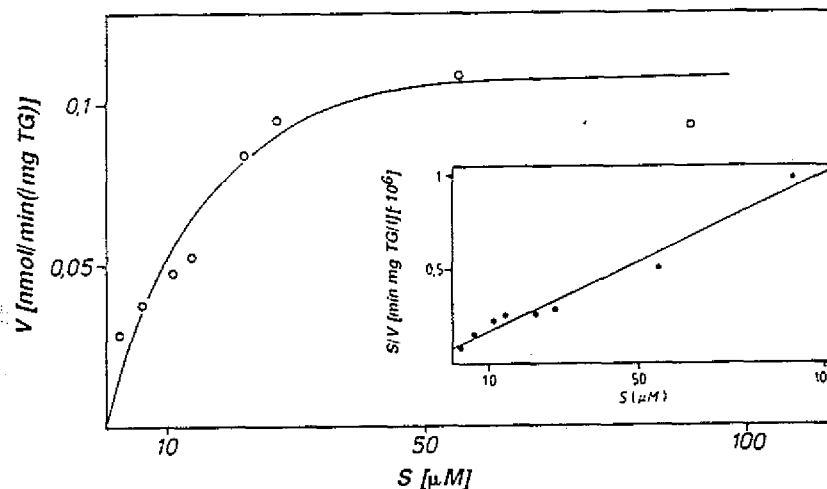


Fig. 6 Abhängigkeit der Transportgeschwindigkeit von der Substratkonzentration. Direkte Auftragung und Diagramm nach Hanes (Nebenbild).

der Transportaktivität, wenn die Aufnahmerate zu verschiedenen Zeiten der Wachstumskurve gemessen wurde. Die geringe Transportaktivität steht in guter Übereinstimmung mit der langsamen Äquilibration zwischen innen und außen. Aufgrund der besseren Aktivität wurden für die weiteren Versuche Zellen verwendet, die auf Komplexmedium gewachsen waren.

3.2.2. Energetik und Mechanismus der Lysinaufnahme

Um den Mechanismus der Lysinaufnahme näher zu charakterisieren, wurde der Einfluß verschiedener Ionophoren auf die Energetik der Zelle und den Transport untersucht. Alle Inhibitoren wurden 1 min vor dem Start des jeweiligen Aufnahmeexperiments zugegeben. Offensichtlich wird die Lysinaufnahme weder vom Membranpotential, noch durch den pH-Gradienten oder durch ATP getrieben. Die einzige

treibende Kraft, die unter diesen Bedingungen noch vorhanden war, war der Substratgradient selbst. Daher wurden die Änderungen der internen und externen Lysinkonzentrationen während des Transports

Tabelle 3 Energetik der Lysinaufnahme

Inhibitor	Bedingungen	Transport-rate (%)	δpH (mV)	Membran potential (mV)	ATP (mM)
Ohne Zugabe	Standard ^a	100	0	130	4-5
Valinomycin	10mM KCl, pH 7,5	108	0	95	3
(10 μM)	100mMKCl, pH 7,5	94	n.b.	40	2
	300mMKCl, pH 7,5	78	n.b.	20	1,6
Valinomycin	Standard ^a	95	0	≈ 0	n.b.
(10 μM) + Nigericin (2 μM)					
CCCP (7 μM)	Standard ^a	84	0	≈ 0	n.b.
CCCP (35 μM)	Standard ^a	72	0	≈ 0	n.b.
Arsenat (10 mM)	Standard ^a	100	0	n.b.	n.b.
Cyanid (5 mM)	Standard ^a	100	0	100	2,2

^a 50 mM Tris·HCl, pH 7,5; 10 mM KCl; 10 mM NaCl

über HPLC verfolgt. Es zeigte sich, daß (i) während der Aufnahme von [¹⁴C]-Lysin keine Änderung der Konzentrationen von internem oder externem Lysin erfolgte, (ii) daß die mittels beider Methoden gemessenen Akkumulationsverhältnisse übereinstimmten und (iii), daß die Akkumulation von der Außenkonzentration abhängig war. Bei einer externen Konzentration von 10 μM wurde eine 100fache, bei einer Konzentration von 100 μM eine 12fache Akkumulation gemessen. Diese Daten deuten auf einen homologen Austausch von internem unmarkiertem gegen externes markiertes Lysin hin. Um dies deutlicher zu zeigen, wurde ein anderer Versuchsansatz gewählt. Die Zellen wurden 2 Std mit radioaktiv markiertem Lysin beladen. Unmittelbar nach Zugabe eines Überschusses an unmarkiertem Lysin war ein Ausfließen von Radioaktivität zu sehen (Fig. 7). Die Schnelligkeit der Exportreaktion entsprach der der Aufnahme-

reaktion. Ein neues Gleichgewicht wurde erreicht, wenn die spezifische Aktivität innen wie außen gleich war. Somit ist das Lysinaufnahmesystem in seinen Transportfunktionen völlig

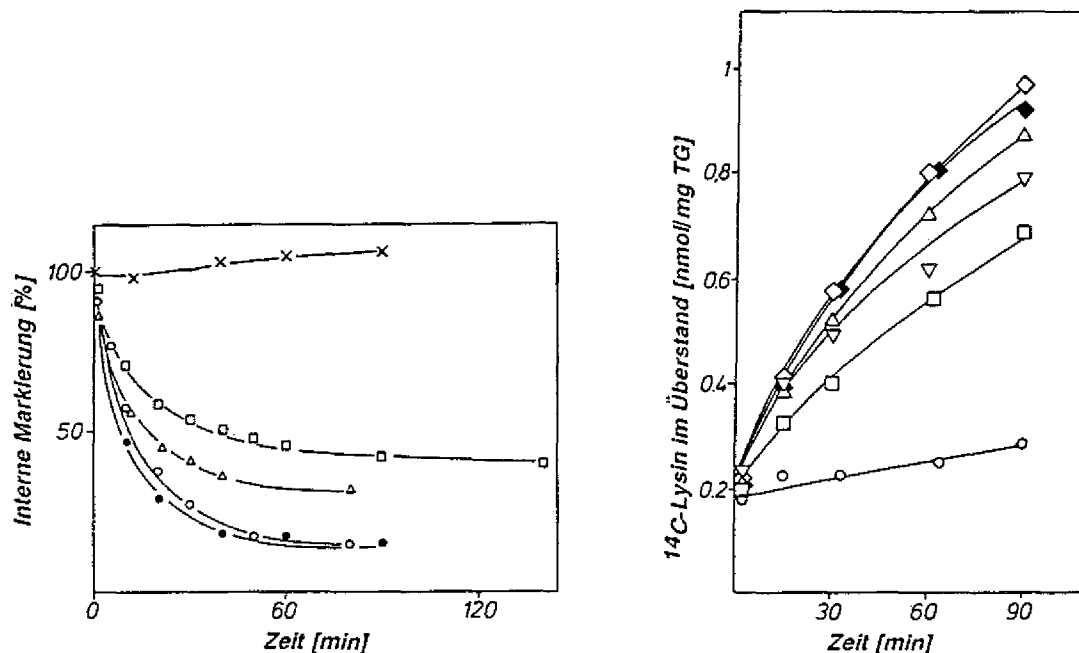


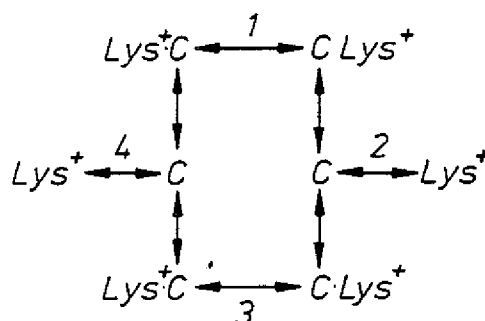
Fig. 7 (links) Austauschfunktion und Reversibilität des Lysinaufnahmesystems. Die Zellen wurden 2 Stunden mit $100\ \mu\text{M}$ ^{14}C -Lysin vorinkubiert und die Messung mit folgenden Zugaben gestartet: (X) keine Zugabe; (□) $300\ \mu\text{M}$ Lysin; (Δ) $400\ \mu\text{M}$ Lysin; (○) 1mM Lysin; (●) 1mM AEC. Das Experiment (□) wurde mit dem lysinauxotrophen Stamm 39/28 durchgeführt.

Fig. 8 (rechts) Obligate Austauschfunktion des Lysinaufnahmesystems. Die Zellen wurden 2 Stunden mit $100\ \mu\text{M}$ ^{14}C -Lysin vorinkubiert und dann das Lysin im Überstand durch Waschen entfernt. Der Efflux von radioaktivem Lysin wurde nach den folgenden Zugaben gemessen. (○) keine Zugabe; (□) $10\ \mu\text{M}$ Lysin; (▽) $20\ \mu\text{M}$ Lysin; (Δ) $50\ \mu\text{M}$ Lysin; (◇) $100\ \mu\text{M}$ Lysin; (◆) $100\ \mu\text{M}$ AEC.

reversibel. Aus der Elektroneutralität des Transports und der Symmetrie der Aufnahme und Exportkurven (Fig. 11), ist ein Austausch im Verhältnis 1:1 anzunehmen. Um zu prüfen, ob das Lysinaufnahmesystem ein obligates Antiportsystem ist oder auch Uniportfunktionen besitzt, wurde ein leicht veränderter Ansatz gewählt (Fig. 8). In diesem Experiment wurden im Gegensatz zu dem in Fig. 7 dargestellten Experiment die Zellen vor Zugabe des

unmarkierten Lysins gewaschen. Die Menge des externen Substrats war daher verschwindend gering, der Substratgradient sehr hoch. Dennoch war ohne Zugabe von externem Lysin praktisch kein Efflux von internem Lysin zu messen. Die Zugabe von externem Lysin stimulierte jedoch sofort den Efflux von Radioaktivität. Der Aufnahmemechanismus für Lysin wurde somit als obligates Antiportsystem charakterisiert. Alle beschriebenen Eigenschaften können durch den schematischen Transportzyklus (Fig. 9) beschrieben werden.

Fig. 9 Schematischer Transportzyklus für das Lysinaufnahmesystem. 1 und 3, Transportschritte; 2 und 4 Bindungsschritte.



Eine Nettoaufnahme kann von diesem System nur durch einen heterologen Austausch vermittelt werden, bei dem die Aufnahme an den Export einer anderen Substanz gekoppelt ist. Denkbar ist auch das Umschalten auf einen Uniportmechanismus. Da in ganzen Zellen eine Änderung der cytosolischen Komponenten schwierig ist, wurde der heterologe Antiport in Gegenrichtung untersucht. Dies ist zulässig, da wie oben erwähnt das Aufnahmesystem reversibel ist. Um mögliche Antiportsubstrate zu identifizieren, wurden die Zellen mit radioaktivem Lysin 2 Std vorbeladen und dann das potentielle Antiportsubstrat auf der Außenseite zugegeben. Folgende Substrate (Endkonzentrationen) wurden auf ihre Akzeptanz durch das Lysin-transportsystem getestet: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (50 mM), Arginin (1 mM), Ornithin (1 mM), Harnstoff (100 mM), Isoleucin (1 mM), Leucin (10 mM), Threonin (1 mM), Methionin (1 mM), Betain (1 mM), Diaminopimelat (1 mM), Spermidin (1 mM), Cadaverin (1 mM), S-aminoethyl-

cystein (AEC, 1 mM). Arginin induzierte einen schwachen Antiport, das Lysinanalogon AEC wurde vom Antiportsystem genauso gut erkannt wie Lysin selbst (Fig. 7). Alle anderen Substanzen bewirkten keine nennenswerte Abnahme der inneren Radioaktivität. Die übliche

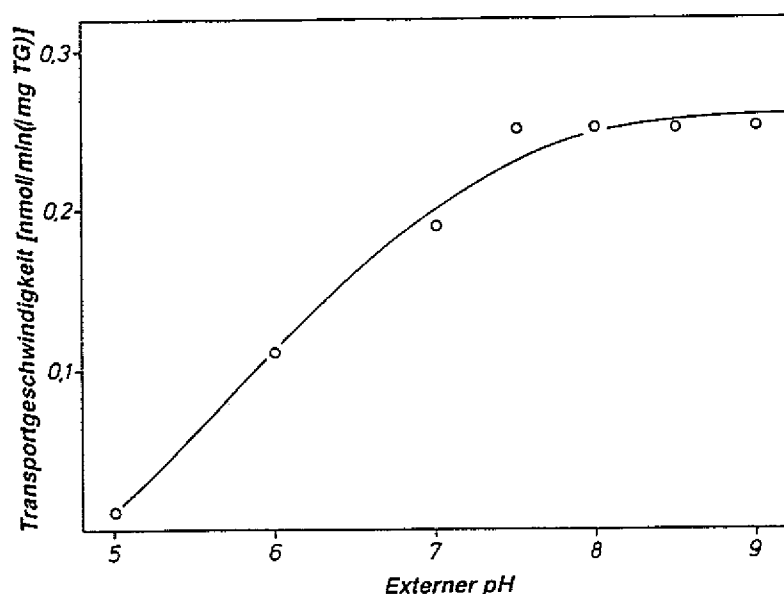


Fig. 10 pH-Abhängigkeit der ^{14}C -Lysin Aufnahme.

Kopplung von sekundären Transportsystemen erfolgt über H^+ -, Na^+ - oder K^+ -Ionen. Da ein Antiport unter bestimmten Bedingungen an diese Ionengradienten gekoppelt sein könnte, wurde im folgenden die Aufnahme von Lysin in Abhängigkeit von der Natrium-, Kalium- und Protonenkonzentration untersucht. Eine Änderung der externen Natriumkonzentration zwischen 50 μM und 100 mM bei pH 7,5 ergab keine Änderung der Transportaktivität. Ebenso zeigte sich keine Änderung bei einer Variation der externen Kaliumkonzentration zwischen 20 μM und 300 mM bei pH 7,5. Daher wurde die pH-Abhängigkeit des Systems genauer untersucht. Die Lysinaufnahme zeigt ein breites pH-Optimum oberhalb pH 7,5 (Fig. 10). Ein Protonen-Lysin-Antiport ist nur sinnvoll oberhalb pH 7,5, da unterhalb dieses Wertes ein Efflux von Lysin begünstigt wird.

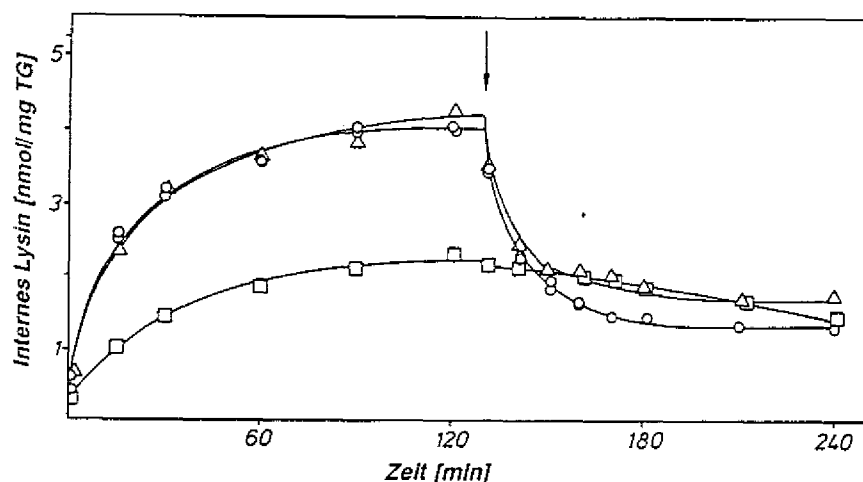


Fig. 11 Antiportfunktion bei verschiedenen pH-Werten. Die Zellen wurden 2 Stunden mit $100 \mu\text{M}$ ^{14}C -Lysin vorbeladen. Nach dieser Zeit erfolgte die Zugabe von $400 \mu\text{M}$ unmarkiertem Lysin. ($\square$) pH 5; ($\circ$) pH 7,5; (Δ) pH 9.

Die Geschwindigkeit änderte sich nur wenig zwischen pH 7 und pH 9. Der pH hat also nur einen sehr schwachen Einfluß auf den Antiport. Weiterhin ließ sich der homologe Antiport auch bei pH 9

Tabelle 4 Abhängigkeit der Lysinaufnahme vom internen pH-Wert

Ionophor	Bedingungen	pH _i	pH _o	Transportrate (%)
Keine Zugabe	Standard ^a	7,5	7,5	100
Nigericin (2 μM)	10 mM KCl	6,0	7,5	10
Nigericin (2 μM)	300 mM KCl	6,5	6,5	7
Nigericin (2 μM)	300 mM KCl	7,5	7,5	100
Nigericin (2 μM)	300 mM KCl	9,0	9,0	100
Nigericin (2 μM)	10 mM KCl	7,0	8,5	100

^a 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM KCl; 10 mM NaCl

demonstrieren (Fig. 11). Eine Variation des inneren pH-Wertes zeigte starke Effekte auf die Transportrate (Tabelle 4). Ein niedriger pH auf der Innenseite hemmte die Aufnahme stark, ein H^+ -Antiport konnte also auch durch dieses Experiment ausgeschlossen werden. Vielmehr sind die beobachteten Effekte des externen und internen pH sind auf konformative Effekte zurückzuführen. Ein pH-

Schalter bei Aminosäuretransportsystemen in Bezug auf den internen pH wurde bereits bei verschiedenen anderen Transportsystemen gefunden (Driessen et al. 1987, Krämer et al. 1990).

3.2.3. Nettotransportfunktionen des Lysinaufnahmesystems

Da eine Nettoaufnahme von Lysin unter den bisherigen Testbedingungen nicht nachgewiesen werden konnte, wurde die Lysinaufnahme in einem lysinauxotrophen Stamm näher untersucht. Der Stamm 39/28 weist einen Defekt in der Diaminopimelatdecarboxylase auf und kann nur mit Supplementierung durch Lysin wachsen. Wie zu erwarten, zeigte dieser Stamm eine Nettoaufnahme von Lysin während des Wachstums (Fig. 12). Wurden diese Zellen jedoch in Vollmedium herangezogen und die Antiportfunktion wie beim Wildstamm getestet, so zeigte auch der Stamm 39/28 homologen Antiport (Fig. 7). Um die Nettoaufnahme während des Wachstums genauer zu untersuchen, wurde daher die Kurzzeitfermentation eingesetzt. Diese Methode ermöglicht Transportuntersuchungen an wachsenden Zellen. Im Gegensatz zu normalen Wachstumsexperimenten, wurden Zellen, die in Vollmedium herangezogen wurden, gewaschen und mit hoher Zelldichte (etwa 4 mg TG/ml) in frisches Medium überführt; dadurch sind Konzentrationsänderungen der beteiligten Substrate gut zu messen. Ein solches Experiment für den Stamm 39/28 ist in Fig. 12 zu sehen. Das angebotene Lysin wurde aufgenommen und bis zur Detektionsgrenze verbraucht, die etwa bei 5 μM liegt. Die Transportrate lag bei 0,5 nmol/min(/mg TG) und war damit etwas höher als die der Antiportfunktion (0,3 nmol/min(/mg TG)) in ruhenden Zellen. Da die Akkumulationen, die durch dieses System erreicht wurden, relativ gering waren, (etwa 40 fach) kam es zum Absinken der internen Lysinkonzentration während des Wachstums. In

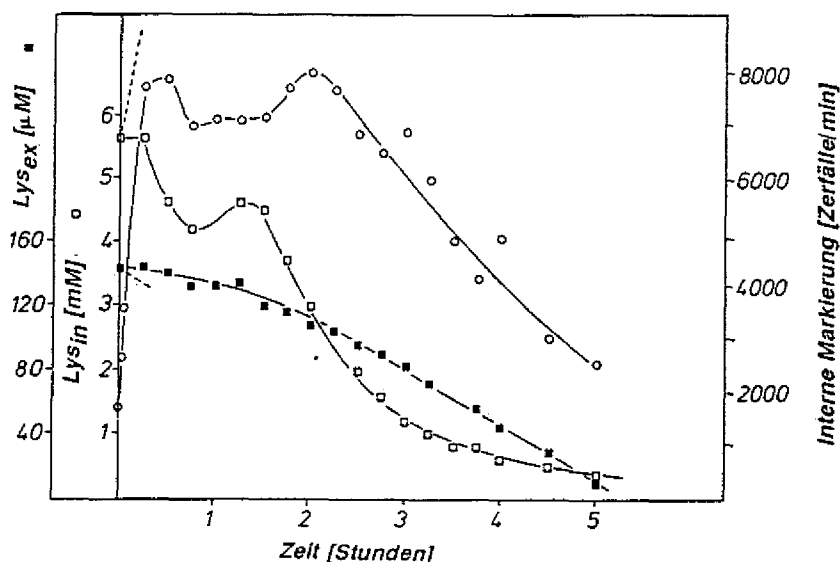


Fig. 12 Aufnahme von Lysin durch den lysinauxotrophen Stamm 39/28 unter Wachstumsbedingungen. Die Aufnahme rate wurde durch ^{14}C -Lysin und mittels HPLC bestimmt. Die gestrichelten Linien zeigen die errechneten Konzentrationsveränderungen an, die gemessen werden müßten, wenn die Aufnahme von ^{14}C -Lysin tatsächlich eine Nettoaufnahme wäre. (■) Externes Lysin; (□) Internes Lysin; (○) Interne Markierung.

den ersten zwanzig Minuten war eine Aufnahme von Radioaktivität, jedoch keine Konzentrationsänderung des Lysins zu messen. Dies entspricht der homologen Antiportfunktion. Innerhalb von 20 Minuten erfolgte dann ein Umschalten auf Nettoaufnahme. Wurden Zellen des auxotrophen Stammes nach Verbrauch des Lysins geerntet und gewaschen, um den Lysintransport zu untersuchen, so zeigten diese Zellen weiterhin Nettotransport (Fig. 13) und unterschieden sich damit von den auf Komplexmedium gewachsenen Zellen (Fig. 7). Die auffälligste Eigenschaft des Lysin/Lysin-Antiports ist seine Unempfindlichkeit gegenüber Hemmstoffen der Zellenergetik. Diese Eigenschaft zeigte die Nettoaufnahme nicht mehr, sie benötigt elektrochemische Energie (Fig. 13). Die Zugabe von Valinomycin führte zum Zusammenbruch des Membranpotentials und zum sofortigen Ende der Nettoaufnahme (Fig. 13A). Die Aufnahme von radioaktivem

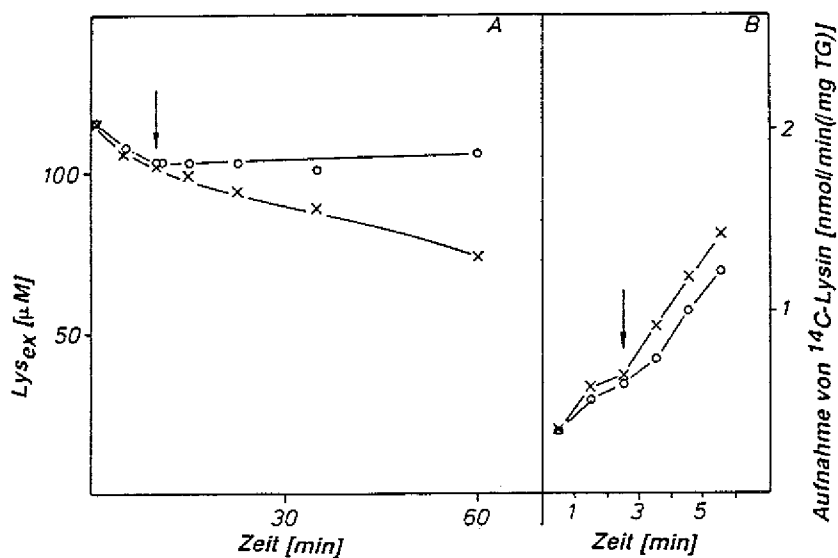


Fig. 13 Nettoaufnahme durch ruhende Zellen des Stammes 39/28. Die Zellen wurden nach einer Fermentation geerntet, wie sie in Fig. 12 dargestellt ist. Die lysinverarmten Zellen wurden gewaschen und in einen Puffer mit 300 mM KCl suspendiert. Die Lysinaufnahme wurde durch HPLC (A) und über radioaktives Lysin (B) bestimmt. Nach kurzer Zeit (Pfeil) wurden einem Teil des Ansatzes (o) 10 μM Valinomycin zugefügt. (x) Kontrolle ohne Valinomycin.

Lysin ist unabhängig vom Membranpotential (Fig. 13B). Es ist daher anzunehmen, daß nach dem Zusammenbruch des Membranpotentials wieder homologer Antiport stattfindet. Die Nettoaufnahme ist denkbar als Uniport oder heterologer Antiport. Alle bisher bekannten Antiporter tauschen ähnliche Substanzen aus (siehe Einleitung). Es war daher sinnvoll, die Chromatogramme auf andere Aminosäuren oder Amine hin zu untersuchen, die während der Lysinaufnahme abgegeben werden. In den Fermentationen wurden keine Änderungen bemerkt, ruhende Zellen schieden jedoch geringe Mengen der Aminosäuren Alanin und Valin aus, deren Korrelation zur Lysinaufnahme jedoch nicht deutlich war. Überdies neigt *C. glutamicum* zum Ausscheiden von Aminosäuren, wenn das Nahrungsangebot gut ist. Trotzdem wurde der heterologe Antiport daraufhin an ruhenden Zellen genauer untersucht. Für diese Experimente wurden in Vollmedium herangezogene Zellen des Wildtyps zwei

Stunden mit radioaktivem Lysin vorbeladen, dann gewaschen und das vermutete Antiportsubstrat im Überschuß zugegeben. Da in diesen

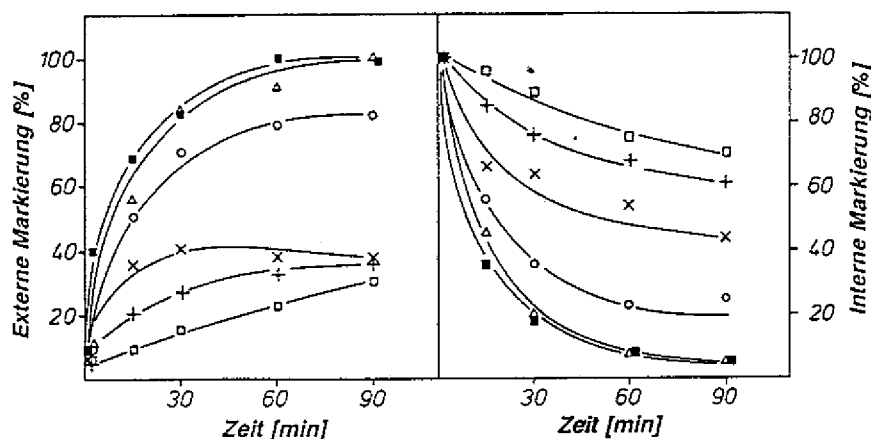


Fig. 14 Heterologe Antiportfunktion des Lysinaufnahmesystems. Die Zunahme der externen Radioaktivität (A) und die Abnahme der internen Radioaktivität (B) sind dargestellt. Die Zellen wurden 2 Stunden mit $100 \mu\text{M } ^{14}\text{C}$ -Lysin equilibriert, dann abzentrifugiert und in die neuen Puffer suspendiert. Alle Puffer enthalten 50 mM Tris·HCl, pH 7,5, 10 mM NaCl und die folgenden Zusätze: (+) ohne Zusatz; ($\square$) 10 mM KCl, 10 μM Valinomycin ($\delta\psi = 95 \text{ mV}$); ($\times$) 10 mM Alanin, 10 mM KCl ($\delta\psi = 130 \text{ mV}$); ($\circ$) 10 mM KCl, 10 μM Valinomycin, 10 mM Alanin (95 mV); ($\blacksquare$) 100 mM KCl, 10 μM Valinomycin, 10 mM Alanin (40 mV); ($\triangle$) 100 mM KCl, 10 μM Valinomycin, 10 mM Lysin (40 mV). Aufgrund der verschiedenen Vorinkubationen waren die internen Lysinkonzentrationen unterschiedlich, die Werte wurden daher auf % normiert.

Experimenten der Antiport in Gegenrichtung zum physiologischen Transport laufen muß, also eine positive Ladung nach außen verschoben wird, sollte ein Membranpotential hemmend wirken. Die Zugabe von 10 mM Alanin oder 10 mM Valin erzeugte einen sofortigen Efflux von Lysin, der durch ein erhöhtes Membranpotential gehemmt wurde (Fig. 14). Die eingesetzten Konzentrationen entsprachen den zellinternen Konzentrationen. Die Antiportreaktion war spezifisch, Isoleucin erzeugte ebenfalls einen Lysinefflux, andere Aminosäuren jedoch kaum noch (Fig. 15). Getestet wurden Glutaminsäure (10 mM), Threonin (10 mM), Arginin (10 mM), Glycin (10 mM), Glutamin (10 mM) und Serin (10 mM). Die Antiportreaktion konnte auch über HPLC nachgewiesen werden. Die Zugabe von 10 mM Alanin zu deenergetisierten Zellen führte zu einer Verringerung des zellinternen

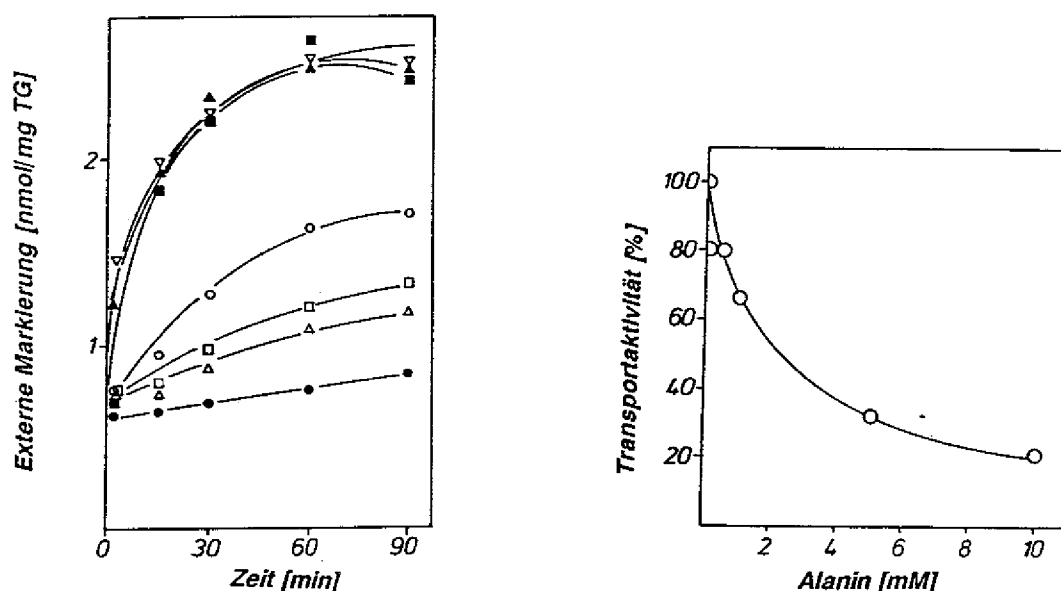


Fig. 15 (links) Spezifität des heterologen Antiports. Die Zellen wurden wie bei Fig. 14 beschrieben inkubiert, dann jedoch in 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM NaCl, 100 mM KCl, 10 μ M Valinomycin mit den folgenden Zusätzen suspendiert: (●) keine Zugaben; (△) 10 mM Threonin, (□) 10 mM Glycin, (○) 10 mM Serin; (▲) 10 mM Isoleucin, (■) 10 mM Valin; (▽) 10 mM Lysin.

Fig. 16 (rechts) Kompetitive Inhibition der Lysinaufnahme (100 μ M 14 C-Lysin) durch verschiedene Alanin-Konzentrationen.

Lysingehalts von 6 mM auf 0,5 mM innerhalb von 90 min. Gleichzeitig trat eine entsprechende Menge an Lysin im Überstand auf. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Alanin entsprechend der Antiportaktivität auch ein kompetitiver Inhibitor der Lysinaufnahme ist (Fig. 16).

3.3. Das Lysinexportsystem von *Corynebacterium glutamicum*

3.3.1. Meßmethodik

Der Wildtyp von *Corynebacterium glutamicum* scheidet während der Kultivierung nur geringe Mengen von Lysin aus. Für die Untersuchung des Lysinexports bot sich daher der Lysinproduktionsstamm DG

52-5 an, der während des Wachstums kontinuierlich Lysin ausscheidet. Seine Lysinbiosynthese ist durch eine nicht mehr durch Rückkopplung regulierte Aspartatkinase charakterisiert (Menkel et al., 1988). Dadurch kommt es zu einer Erhöhung der zellinternen Lysinkonzentration bis auf 60 mM. Im Wildstamm wurden unter denselben Bedingungen nur 10 mM bestimmt. Weitere Veränderungen gegenüber dem Wildstamm waren nicht bekannt. Für die Entwicklung

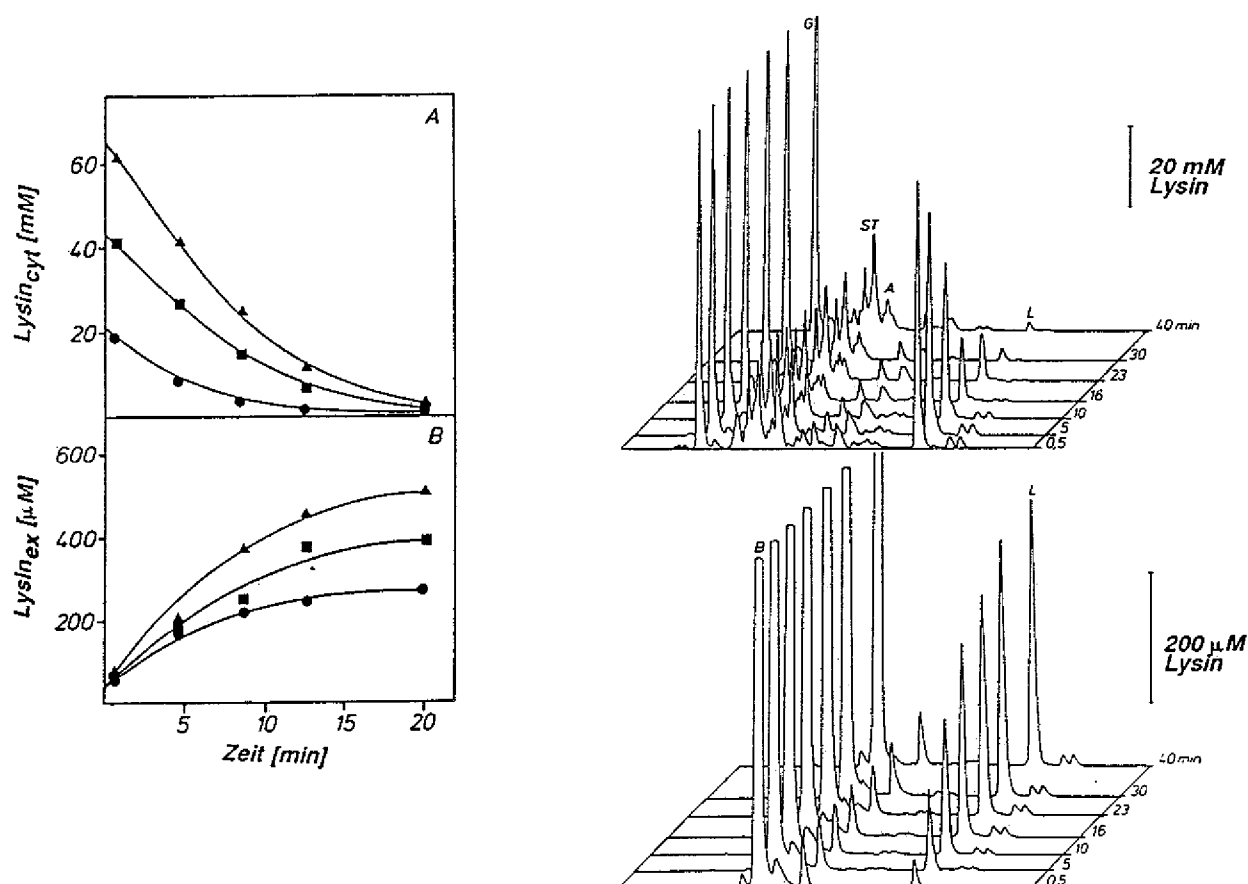


Fig. 17 (links) Lysinsekretion durch den Stamm DG 52-5. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeiten geerntet ($\blacktriangle$, $\blacksquare$, $\bullet$) und der Standard-Effluxtest durchgeführt. Die Zunahme der externen Konzentration und die Abnahme der internen Konzentration sind gezeigt.

Fig. 18 (rechts) Spezifität der Lysinsekretion. Vergleich der Aminosäureanalysen der Überstände (oben) und der Extrakte (unten) im Verlauf der Sekretion. Folgende Substanzen sind markiert: G = Glutamat, S = Serin, T = Threonin, A = Alanin, B = Tris-Puffer.

eines brauchbaren Testsystems für den Export (im weiteren Efflux-

test genannt, Ausführung siehe 2.4.11.) waren zwei Beobachtungen von entscheidender Bedeutung. (i) Wurden die Zellen zu einem Zeitpunkt geerntet, an dem der interne Lysingehalt etwa 60 mM betrug, so blieb diese hohe Konzentration erhalten, wenn die Zellen kalt gewaschen wurden. (ii) Wurden die gewaschenen Zellen auf 25°C erwärmt, begannen sie das interne Lysin innerhalb kurzer Zeit auszuschcheiden (Fig. 17 und 18), bis eine Innenkonzentration von 1 bis 2 mM erreicht war. Im Medium erschien gleichzeitig eine entsprechende Menge Lysin. Wurde eine Bilanz aufgestellt, so erschien im Überstand immer etwas mehr (ca. 10%), als im Sediment verschwand. Der Grund hierfür ist im Nachfließen von Metaboliten zu suchen.

3.3.2. Nachweis eines spezifischen Sekretionscarriers

Entsprechend den in der Einleitung vorgestellten Modellen zur Aminosäuresekretion (1. Export durch Diffusion, 2. Export durch eine Pore, 3. Export durch das Aufnahmesystem, 4. Export durch einen spezifischen Carrier) wurde zunächst eine Einordnung der Lysinsekretion vorgenommen.

Der Lysinexport wird durch ein Protein vermittelt - Argumente gegen das Diffusions-Modell.

Eine erhöhte unspezifische Permeabilität der Membran Lysin-produzierender Stämme sollte auch bei anderen membranabhängigen Prozessen sichtbar sein. Als Maß für die Intaktheit der Membran wurde die Höhe des Membranpotentials, der Ionen- und Substratgradienten im Vergleich zum Wildstamm untersucht. Bei pH 7,5 wurde in beiden Stämmen ein Membranpotential von 150 mV aufrechterhalten, bei pH 9 sogar ein Membranpotential von 190 mV. Weiterhin wurden beträchtliche Kaliumgradienten aufrechterhalten. Die

interne Kaliumkonzentration betrug etwa 100 mM bei einer Außenkonzentration von 0,1 mM. In Bezug auf die Aminosäuren wurden normale Gradienten aufrechterhalten (etwa 200 fach). Im Falle des Glutamats bestand sogar ein 6000 facher Konzentrationsunterschied während der Lysinsekretion. Dies kann deutlich auf den HPLC-Chromatogrammen erkannt werden, die zur Verfolgung der Lysinsekretion aufgenommen wurden (Fig. 18). Außer Lysin erschien keine weitere Aminosäure im Überstand, obwohl viele Aminosäuren (z. B. Serin, Threonin, Alanin, Aspartat, Glutamat, Diaminopimelat) intrazellulär in Konzentrationen von mehreren mM vorlagen. Das heißt der Exportvorgang war spezifisch, eine allgemein erhöhte Permeabilität konnte nicht festgestellt werden. Ein weiteres Indiz

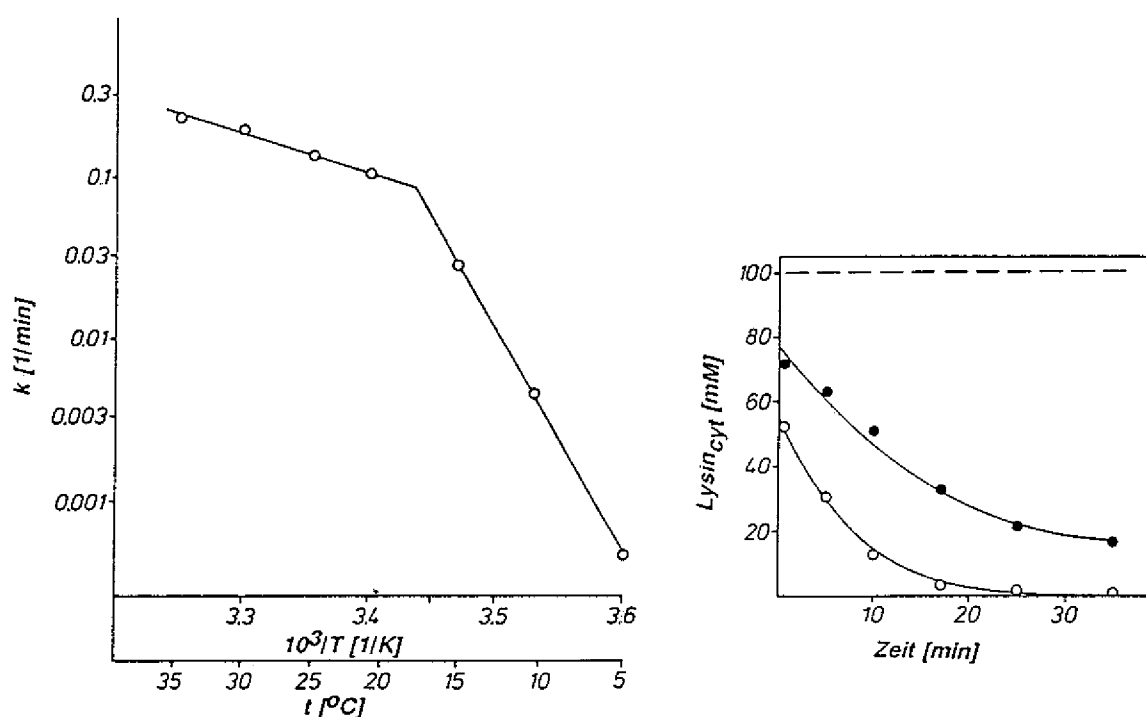


Fig. 19 (links) Temperaturabhängigkeit der Lysinsekretion (Arrhenius-Diagramm).

Fig. 20 (rechts) Lysinexport entgegen eines Konzentrationsgradienten (●). Die Abnahme der Innenkonzentration wurde in Puffer mit 100 mM Lysin (gestrichelte Linie) untersucht. Für die Messung der internen Konzentrationen wurde die Waschprozedur benutzt. (○) Kontrolle ohne externes Lysin.

gegen einen Diffusionsprozeß war die auffällige Temperaturabhäng-

igkeit der Lysinsekretion. Wird der Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten gegen $1/T$ aufgetragen (Arrhenius-Diagramm) läßt sich die Aktivierungsenergie des Transportprozesses ermitteln (Fig. 19). Zwischen 20°C und 35°C betrug die Aktivierungsenergie 54 kJ/mol . Unterhalb von 18°C stieg die Aktivierungsenergie auf 260 kJ/mol . Bei 50°C wurde die Denaturierungstemperatur erreicht, es war kaum noch Export meßbar (nicht gezeigt). Alle diese Eigenschaften sind typisch für den carrier-vermittelten Transport.

Lysin wird aktiv aus der Zelle ausgeschieden, Argumente gegen das Poren-Modell.

Ein Efflux von Lysin durch Poren würde in deenergetisierten Zellen zu einem Ausgleich der Innen- und Außenkonzentration führen. Da *C. glutamicum* während des Exports ein hohes (innen negatives) Membranpotential aufweist, müßte Lysin sogar im Cytosol akkumuliert werden. Wird Lysin durch das Exportsystem auf der Außenseite akkumuliert, kann das Porenmodell ausgeschlossen werden. Um dies zu überprüfen, wurde im Effluxtest eine Konzentration von 100 mM Lysin im Medium vorgelegt. Dennoch konnte Lysin gegen diesen Konzentrationsgradienten ausgeschieden werden (Fig. 20).

Bei diesen Versuchen traten meßtechnische Probleme durch während der Silikonölzentrifugation mitgeschlepptes externes Lysin auf. Die Innenkonzentration konnte erst nach Einführung der schnellen Waschprozedur (siehe 2.4.11.) richtig bestimmt werden. Bei sehr hohen externen Konzentration war trotzdem meist noch eine Kontamination sichtbar, die auch den unterschiedlichen Startpunkt der beiden Kurven auf der Ordinate erklärt.

Lysin wird nicht durch das Aufnahmesystem exportiert - Argumente gegen das Inversionsmodell.

Da *C. glutamicum* ein Lysinaufnahmesystem besitzt, ist ein Export über ein rückwärts laufendes Aufnahmesystem denkbar. Der Mecha-

nismus der Aufnahme erlaubt zwar auch einen Lysinexport, aber nur im Antiport gegen externes Alanin, Isoleucin oder Valin. Dieser "Lysinexport" ist nur in deenergetisierten Zellen möglich, während der Lysinexport unter Lysinproduktionsbedingungen energetisierte Zellen benötigt (siehe Abschnitt 3.3.3.). Ein direkter Test gegen eine Beteiligung des Aufnahmesystems am Export war möglich durch Messung der Aufnahme während des Exports. Bei einer Innenkonzentration von 54 mM wurde eine Exportrate von 8,5 nmol/min(/mg TG) über HPLC-Messungen bestimmt. Gleichzeitig wurde die Aufnahme von [^{14}C]-Lysin bestimmt, indem zu verschiedenen Zeiten 100 μM radioaktiv markiertes Lysin zu den Exportansätzen gegeben wurde. Die Aufnahmerate betrug 0,23 nmol/min(/mg TG), stimmte also gut mit den für das Aufnahmesystem ermittelten Werten überein. Da beide Systeme gleichzeitig mit maximaler Geschwindigkeit liefen, ist das Inversionsmodell unwahrscheinlich.

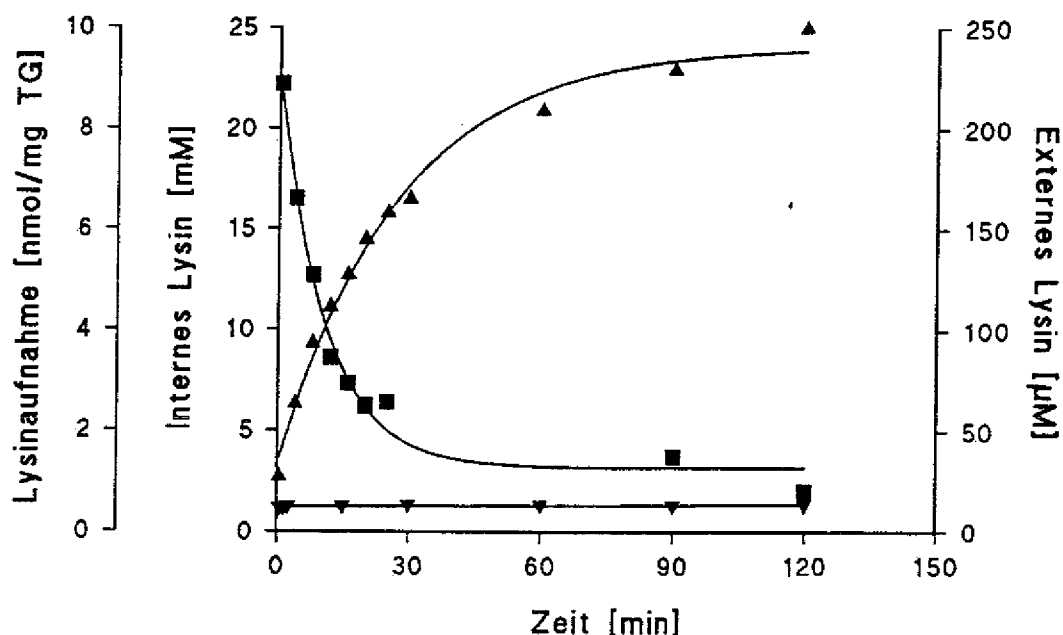


Fig. 21 Aufnahme und Export in der Mutante 5.5 (pCS23). (▼) Aufnahmerate, (■) interne Lysinkonzentration, (▲) externe Lysinkonzentration.

Ein weiteres Argument gegen das Inversionsmodell sind die Untersuchungen mit dem Stamm 5.5 (pCS 23). Dieser Stamm ist eine

aufnahmefehler Mutante des Wildtyps, zeigt jedoch völlig normalen Efflux (Fig. 21). Da der Wildtyp nur sehr wenig Lysin exportiert, wurde in diesen Stamm das Plasmid pCS 23 eingebracht, das die deregulierte Aspartatkinase aus dem Stamm DG 52-5 enthält. Dadurch ließ sich die interne Lysinkonzentration erhöhen.

Charakterisierung des Lysinexportcarriers

Alle bisher vorgestellten Experimente deuteten darauf hin, daß *C. glutamicum* einen spezifischen Exportcarrier für Lysin besitzt. Die Maximalgeschwindigkeit und die Michaelis-Menten-Konstante werden bei Aufnahmesystemen zur kinetischen Charakterisierung routinemäßig bestimmt. Dies ist bei Exportsystemen weitaus schwieriger, da die zellinterne Konzentration variiert werden muß. Der

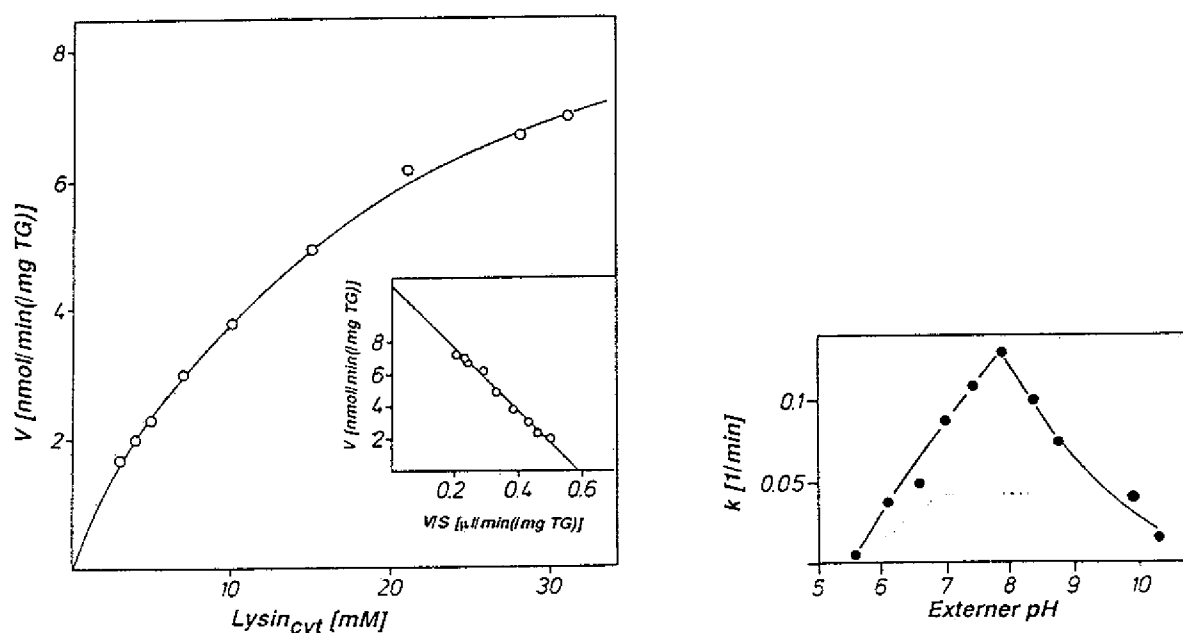


Fig. 22 (links) Kinetische Konstanten des Lysinexports. Die direkte Auftragung und das Diagramm nach Eadie-Hofstee (Nebenbild) sind gezeigt.

Fig. 23 (rechts) pH-Abhängigkeit des Lysinefflux. Die gepunktete Linie wird in Abschnitt 3.3.4.1. erläutert.

Effluxtest bietet jedoch einen Satz von Konzentrationen und Geschwindigkeiten, wenn die Steigung der Tangente an der Kurve zu verschiedenen Zeiten bestimmt und der jeweiligen Innenkonzentra-

tion zugeordnet wird. Es zeigte sich, daß 20 - 40 Meßpunkte im Laufe eines zwanzig Minuten dauernden Effluxtestes genommen, eine vernünftige Auswertung gestatteten (Fig. 22). Es wurde ein $K_M = 20$ mM und $V_{max} = 12$ nmol/min(/mg TG) errechnet. Diese Methode erreicht jedoch nicht die Genauigkeit der klassischen Bestimmung, insbesondere auch deswegen, da die Innenkonzentration $2 \times K_M$ nicht überschritt.

Zur weiteren Charakterisierung wurde die pH-Abhängigkeit des Lysinexports untersucht (Fig. 23). Der Export zeigt ein scharfes Maximum bei pH 7,8.

3.3.3. Mechanismus und Energetik des Lysinexports

Korrelation des Lysinexports zum Membranpotential

Um den Mechanismus des Exportsystems einzugrenzen, wurden zunächst Inhibitorstudien vorgenommen (Tabelle 5). Alle Inhibitoren, die das Membranpotential herabsetzten hemmten auch den Lysinexport. Um zu beweisen, daß diese Wirkungen wirklich der Veränderung des Membranpotentials zugeordnet werden können, sind drei Bedingungen zu erfüllen. (i) Die treibende Kraft muß eine sinnvolle Korrelation zum Transport über einen größeren Bereich aufweisen. (ii) Unter den gleichen Bedingungen sollten andere mögliche treibende Kräfte keine Korrelation zeigen und (iii) es sollte eine zeitliche Korrelation vorhanden sein, d.h.: Wenn die treibende Kraft schlagartig zusammenbricht, sollte auch die Transportaktivität schlagartig zurückgehen.

Mittels der Spannungsklemme wurde das Membranpotential zwischen 20 mV und 150 mV variiert. Fig. 24 zeigt, daß die Transportgeschwindigkeit, dargestellt als Geschwindigkeitskonstante (k),

Tabelle 5. Einfluß verschiedener Inhibitoren auf die Lysinsekretion ^a.

Inhibitor (Bedingungen)	Membran- potential	ATP- Gehalt	Transport- aktivität
	mV	mM	%
Ohne Zugabe	130	4,5	100
CCCP (35 μ M)	30	2	2
Valinomycin (10 μ M, 300mM KCl)	16	1,6	2
Monensin (2 μ M, 10 mM NaCl)	n. b.	n.b.	95
Natriumcyanid (5 mM)	100	2,2	42
DCCD (0.3 μ mol/mg d. wt.)	154	2,8	140

^aDie Sekretion wurde mittels des Effluxtests bestimmt, alle Aktivitäten sind als % der Kontrolle angegeben ($k = 0.14 \text{ min}^{-1}$).

Ein pH-Gradient war nicht vorhanden.

über diesen Bereich mit dem Membranpotential korreliert war. Die Abhängigkeit vom Membranpotential war groß. Eine Änderung des Membranpotentials um 60 mV erzeugte eine zehnfache Änderung der Exportrate. Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurde im folgenden die Korrelation anderer möglicher treibender Kräfte zum Lysin-export untersucht. Die Differenzierung zwischen dem Membranpotential (sekundärer Transport) und dem ATP-Gehalt (primärer Transport) als treibender Kraft war für die weiteren Untersuchungen besonders wichtig. Die Membranpotentialabhängigkeit gehorcht beim sekundär aktivem Transport dem Nernstschen Gesetz (Morf, 1981). Wird der Logarithmus der Transportrate gegen das Membranpotential aufgetragen, ergibt sich eine Gerade (Fig. 24, Nebenbild). Dieses gute Indiz für einen sekundären Transport wird eingeschränkt, da die ATP-Synthese bei pH 7,5 (kein 8 pH) ebenfalls vom Membranpotential getrieben wird. Eine Differenzierung zwischen Membranpotential und ATP ist jedoch möglich, da die F_1F_0 -ATPase unterhalb von etwa 100 mV keine ATP-Synthese mehr katalysieren kann (Kell, 1988). Tabelle 6 zeigt die Korrelation des

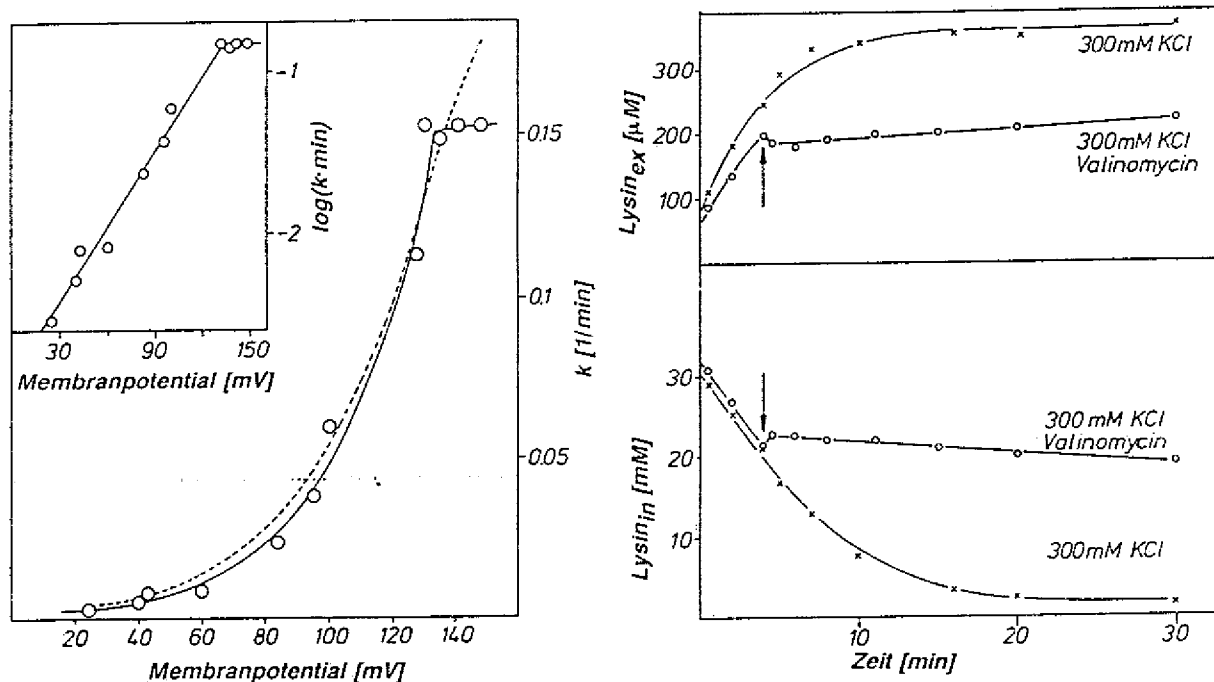


Fig. 24 (links) Abhängigkeit der Exportgeschwindigkeit vom Membranpotential. Das Membranpotential wurde durch Änderung der Kaliumkonzentration in Anwesenheit von Valinomycin variiert. Die äußere Lysinkonzentration betrug 100 μM , die interne 40 mM. Die gestrichelte Linie zeigt die Abhängigkeit, wie sie durch das kinetische Modell errechnet wird. Die gepunktete Linie wird in Abschnitt 3.3.4.1. erläutert. Nebenbild: Logarithmische Darstellung der Daten.

Fig. 25 (rechts) Hemmung der Sekretion durch Abbau des Membranpotentials. In zwei Ansätzen mit 300 mM KCl wurde die Lysinsekretion bestimmt. Zum angegebenen Zeitpunkt wurde ein Ansatz (o) mit Valinomycin (Endkonz. 10 μM) versehen, um das Membranpotential abzubauen. (x) Kontrolle ohne Valinomycin.

Lysinexports zum Membranpotential und dem ATP Gehalt. In diesem Experiment wurde der Effluxtest in vier Ansätzen mit verschiedenen KCl-Konzentrationen durchgeführt. In allen Ansätzen wurde dieselbe Exportrate bestimmt (1. Zeile). Nach vier Minuten wurde zu allen Ansätzen Valinomycin zugegeben, und die Transportrate, das Membranpotential und der ATP-Gehalt bestimmt (Zeilen 2-5). Der Vergleich der Zeilen 1 und 2, 4 und 5 zeigte, daß die Transportrate mit dem Membranpotential und nicht dem ATP-Gehalt gekoppelt war.

Tabelle 6. Korrelation der Transportaktivität zum Membranpotential und ATP-Gehalt^a.

Bedingung	Transport- rate	Membran- potential	ATP-Gehalt
	nmol·min ⁻¹ · mg·TG. ⁻¹	mV	mM
Standard ^b (0.1-30mM KCl)	12.9 ± 0.7	130	4.1 ± 0.3
Valinomycin(10µM)			
0.1 mM KCl	14.6	150	3.5
Valinomycin(10µM)			
3 mM KCl	9.7	118	2.7
Valinomycin(10µM)			
10 mM KCl	3.7	87	1.8
Valinomycin(10µM)			
30 mM KCl	1.2	59	2.0

^a Das Membranpotential wurde im Ansatz ohne Valinomycin durch ¹⁴C-TPP-Verteilung bestimmt, in den Ansätzen mit Valinomycin durch die Verteilung ⁸⁶Rb berechnet.

^b Standardbedingungen sind 50 mM Tris·HCl, pH 7,5, 10 mM NaCl, die Kaliumkonzentrationen sind die angegebenen.

Ein weiteres Experiment zur Differenzierung zwischen ATP-getriebenem und Membranpotential-getriebenem Transport machte sich die Wirkung des Inhibitors DCCD und des Ionophors Valinomycin zunutze. Die Hemmung der F₁F₀-ATPase durch DCCD erfolgt über kovalente Modifikation und ist irreversibel. Das durch die Spannungsklemme mittels Valinomycin eingestellte Potential hingegen ist variabel. Im ersten Teil des Experimentes wurde der ATP-Gehalt und das Membranpotential durch Gabe von Valinomycin (300 mM KCl) gesenkt. Die Exportrate war dadurch stark gehemmt. Dann wurde DCCD zugegeben, um die ATPase irreversibel zu hemmen. Nach erfolgter Modifikation wurden die Zellen zweimal in kaliumfreien Puffer gewaschen und dadurch das Membranpotential wieder angehoben. Wie aus der Tabelle 7 ersichtlich, wurde auch der Export durch diese Maßnahme restauriert. Allein das Niveau der

internen Lysinkonzentration nach langer Zeit war höher als sonst üblich im Stamm DG52-5 und betrug 14 mM. Diesem Ergebnis

Tabelle 7. Inhibierung und Restauration des Lysinexports.^a

Versuchsschritt oder Zugabe	Efflux- konstante (k)	Membran- potential	ATP-Gehalt
	min ⁻¹	mV	mM
1. Standard	0.14	-144	4.5
2. DCCD, Valinomycin, KCl	0.005	- 50	2.4
3. 2 x waschen	0.14	-130	1.8

^a Schritt 1. and 2. wurden in Parallelansätzen durchgeführt. In Schritt 1. wurde unter Standardbedingungen gemessen (50 mM Tris·HCl, 10 mM NaCl, 10 mM KCl). In Schritt 2. wurden dem Ansatz 10 μ M valinomycin, DCCD (0.3 μ mol/mg d.wt.) und 300 mM KCl zugegeben. Schritt 3. folgt auf Schritt 2. indem die Zellen zweimal in kaliumarmen Puffer gewaschen werden (50 mM Tris·HCl pH 7.5, 10 mM NaCl, 0.1 mM KCl).

entsprach der Wirkung von DCCD, wenn es alleine eingesetzt wurde. Nach der Gabe von DCCD erhöhte sich das Membranpotential und die Exportrate, während sich der ATP-Gehalt erniedrigte (Tab. 5).

Aufgrund seiner hohen Leitfähigkeit wirkt Valinomycin innerhalb von Sekunden sowohl auf das Membranpotential als auch auf den ATP-Gehalt. Innerhalb der Meßmöglichkeiten (mindestens zwei Meßpunkte) ließ sich zeigen, daß auch der Transport sofort gehemmt wird (Fig. 25). Damit war auch die zeitliche Korrelation zwischen treibender Kraft und Transport gegeben.

Wie in der Einleitung dargestellt, ist die Korrelation der treibenden Kraft zu den Raten schwieriger zu beurteilen, als die Korrelation zu den entsprechenden Akkumulationsverhältnissen. Daher wurde der Effluxtest in Gegenwart einer hohen externen Lysinkonzentration durchgeführt. Bei einem Membranpotential von 130 mV (in Abwesenheit eines δ pH) wurde ein chemischer Gradient für Lysin von 82 mV erreicht. Dies entsprach einer internen Konzentration von 13 mM bei einer externen Konzentration von 300

mM. Aufgrund der hohen externen Lysinkonzentration traten bei diesem Experiment dieselben Problem auf, wie bei dem in Fig. 20 beschriebenen. Innerhalb der Meßmöglichkeiten läßt sich jedoch sagen, daß die Höhe der Akkumulation mit der treibenden Kraft gut übereinstimmte.

Da nachgewiesen werden konnte, daß das Membranpotential die treibende Kraft des Lysinexports ist, handelt es sich um ein sekundäres Transportsystem. Als weitere treibende Kräfte wurden daher der Einfluß des Lysingradienten und der Einfluß der Ionengradienten auf den Lysinexport untersucht.

Der Lysingradient als treibende Kraft

Eine Veränderung der Lysinkonzentration auf der Innenseite (cis-Seite) der Zellen folgte dem Michaelis-Menten-Gesetz (siehe Fig. 22). Eine Erhöhung der Lysinkonzentration auf der Trans-Seite führte zu einer Verlangsamung des Transports (Fig. 26). Die Stärke des Einflusses läßt sich besser in der logarithmischen Darstellung (Fig. 26, Nebenbild) beurteilen. Diese Darstellung betont den Lysingradienten als treibende Kraft. Es war auffällig, daß Konzentrationen, die deutlich über dem für die Innenseite bestimmten K_M lagen, einen besonders starken Einfluß ausübten. Bei Außenkonzentrationen von über 60 mM war der Lysingradient dem Membranpotential ebenbürtig. Das heißt eine zehnfache Änderung des Lysingradienten führte zu einer zehnfachen Änderung der Transportgeschwindigkeit. Der Lysingradient war jedoch nicht in jedem Fall dem Membranpotential in der Wirkung gleichwertig. Dies wurde bei der Bestimmung der Abhängigkeit der Transportrate vom Membranpotential sichtbar. In diesen Experimenten lag in allen Ansätzen ein etwa 1000facher Lysingradient vor (interne Konzentration etwa 60 mM, externe Lysinkonzentration etwa 60 μ M). Bei Zusammenbruch

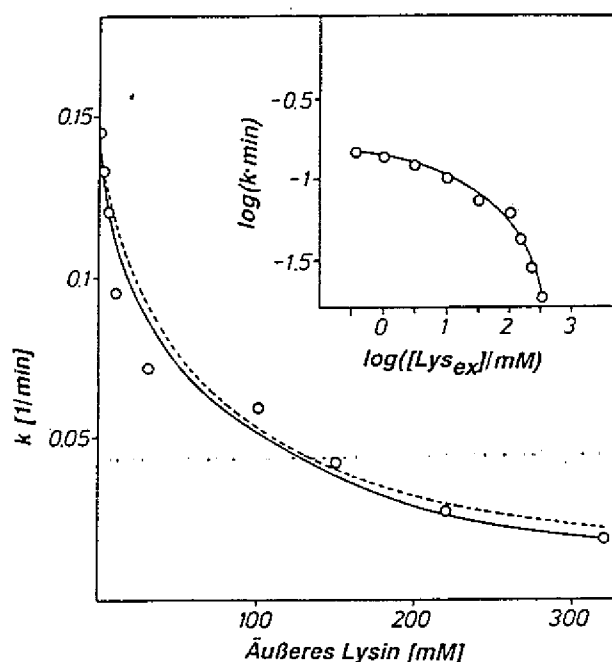


Fig. 26 Trans-Effekt von Lysin. Die Effluxrate wurde in Anwesenheit verschiedener externer Lysinkonzentrationen untersucht. Das Membranpotential betrug 130 mV. Die gestrichelte Linie zeigt die nach dem kinetischen Modell errechnete Abhängigkeit. Die gepunktete Linie wird in Abschnitt 3.3.4.1. erläutert. Nebenbild: Doppelt-logarithmische Darstellung der Daten.

des Membranpotentials war trotz des Lysingradienten fast keine Aktivität des Exportsystems meßbar. Dies belegte, daß unter diesen Bedingungen die Äquivalenz der treibenden Kräfte nicht gegeben war.

Die Wirkung der Ionengradienten auf den Lysinexport

Das Membranpotential ist die wichtigste treibende Kraft des Lysinexports. Lysin ist beim pH des Cytoplasmas positiv geladen. Das Membranpotential ist innen negativ gegenüber außen. Die bisherigen Beobachtungen können daher am besten erklärt werden, wenn der Exportmechanismus als Symport mit mindestens zwei Anionen oder als Antiport gegen mindestens zwei Kationen erfolgt. Nur in diesen Fällen würde als Nettobewegung die Verschiebung einer positiven Ladung nach innen erfolgen, die die Abhängigkeit vom Membranpotential erklärt. Aufgrund dieser Überlegungen wurde die Wirkung der Ionengradienten auf den Lysinexport untersucht. Im

Effluxtest waren im Außenmedium nur Kalium-, Natriumionen und Protonen vorhanden. Tris^+ war als Ion ausgeschlossen, da es kein physiologisches Substrat ist und zudem gezeigt werden konnte, daß der Export in Phosphat-Puffer gleich schnell war. Eine Änderung der Natriumkonzentration auf der Außenseite von 50 μM bis zu 300 mM zeigte keinen Einfluß auf die Exportgeschwindigkeit im Efflux-test. Eine Änderung der Kaliumkonzentration zwischen 30 μM und 300 mM zeigte ebenfalls keinerlei Einfluß. Durch die Bestimmung der internen Kalium- und Natriumkonzentrationen ($[\text{K}_{\text{in}}] > 100 \text{ mM}$; $[\text{Na}_{\text{in}}] \text{ ca. } 1 \text{ mM}$) wurde nachgewiesen daß sich auch die Ionengradienten in diesen Experimenten stark veränderten. Beide Ionen waren daher als mögliche Antiportsubstrate auszuschließen.

Die pH-Abhängigkeit zeigt ein scharfes Maximum bei pH 7,8 (Fig. 23). Der absteigende Ast unter alkalischen Bedingungen könnte daher die sinkende Protonenkonzentration widerspiegeln. Ein Antiportmechanismus mit der Beteiligung von zwei Protonen ließ jedoch einen starken Einfluß des pH auf den Transport erwarten. Bei einer einhundertfachen Änderung des Protonengradienten, d.h. bei einer Änderung des externen pH von pH 8 bis pH 10 zeigt sich jedoch nur eine Verminderung der Transportgeschwindigkeit um 80%. Um die Wirkung der verschiedenen treibenden Kräfte getrennt zu untersuchen, wurde die Methode der induzierten Diffusionspotentiale (de Vrij et al. 1989) verwendet (Fig. 27). Folgende treibende Kräfte wurden einzeln oder in Kombinationen erzeugt: (i) ein Lysingradient, (ii) ein pH-Gradient und (iii) ein Membranpotential. Waren alle drei treibenden Kräfte vorhanden wurde normaler Efflux gemessen. Die Kombination von Membranpotential und Lysingradient erzeugte einen Export gleicher Aktivität. Ein pH-Gradient von 42 mV in Kombination mit einem Lysingradient oder auch der Lysingradient alleine, waren nicht in der Lage einen

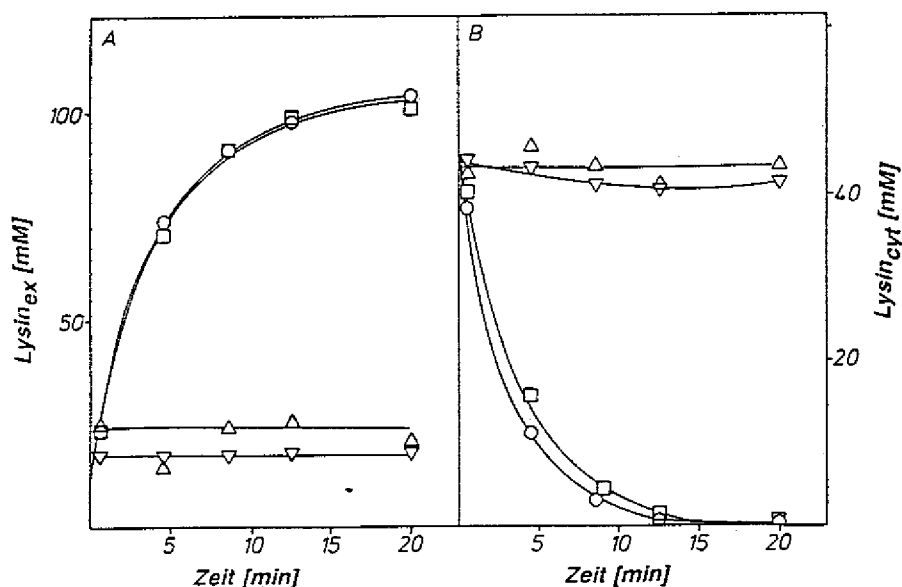


Fig. 27 Treibende Kräfte des Lysinexports. Die treibenden Kräfte wurden durch verschiedene Diffusionspotentiale induziert. (A) externe und (B) interne Konzentrationen unter den folgenden Bedingungen: (▽) Lysingradient von 180 mV; (Δ) δ pH von 0,7 Einheiten (innen alkalisch) und ein Lysingradient von 180 mV; (○) Membranpotential von 130 mV und ein Lysingradient von 180 mV; (□) Membranpotential (130 mV); δ pH (0,7 Einheiten, innen alkalisch); Lysingradient (180 mV).

Lysinefflux zu erzeugen. Auch ein pH-Gradient von 54 mV in Kombination mit einem Lysingradient (Fig. 33) konnte keinen Lysinexport erzeugen. Nur unter Bedingungen, in denen ein Membranpotential vorhanden war, erfolgte auch Lysinexport.

Da der Einfluß der Protonenkonzentration bzw. des pH-Gradienten auf den Export nicht unter allen Bedingungen den Erwartungen entsprach, wurde die mögliche Beteiligung von Anionen am Export untersucht. Verschiedene organische Säuren werden von *C. glutamicum* in größeren Mengen während der Fermentation ausgeschieden (siehe z.B. Menkel et al. 1988). Eine Beteiligung am Transportprozeß wäre daher möglich. In den folgenden Experimenten wurde daher geprüft, ob ein Transeffekt, ganz Analog dem des Lysins, mit verschiedenen Anionen zu finden ist. Dazu wurde der Efflux test in

Gegenwart von 100 mM des betreffenden Anions durchgeführt. Zu erwarten war eine Verminderung der Transportrate oder ein erhöhtes Niveau der internen Lysinkonzentration auch nach langen Zeiten. Es wurden Phosphat-, Hydrogencarbonat-, Chlorid-, Sulfat-, Laktat-, Citrat-, Malat-, Succinat-, Fumarat-, Oxalat-, Oxoglutarat-, Formiat-, Glyoxylat-, Pyruvat-, Gluconatanionen getestet. Keines dieser Anionen konnte die erwarteten Effekte hervorrufen. Nur 300 mM Ammoniumacetat führte zu einer deutlichen Reduktion der Transportgeschwindigkeit, die jedoch auf eine leichte Entkopplung zurückgeführt werden konnte. Das Membranpotential verringert sich unter diesen Bedingungen um etwa 15 mV. Weiterhin konnte keine korrelierte Sekretion von organischen Säuren während des Lysin-effluxes beobachtet werden.

Einfluß der Protonenkonzentration bei aufgehobenem

Lysingradient

Wie oben erwähnt, läßt sich der Einfluß des alkalischen pH auf den Lysinexport auch als Transeffekt durch eine ansteigende OH^- -Konzentration deuten. Die pH-Effekte waren unerwartet gering, jedoch kann die Wirkung von treibenden Kräften verdeckt werden, wenn andere Gradienten noch sehr groß sind (Heinz, 1978). Der Lysingradient betrug in den Standardexperimenten etwa 180 mV. Figur 28 zeigt die enorm erhöhte Empfindlichkeit des Exports gegenüber dem pH, wenn der Lysingradient aufgehoben war. Diese Versuchsbedingungen werden in der Literatur als "in der Schwebe halten" (static head) bezeichnet, was besagt, daß kleine Störungen unter dieser Bedingung große Wirkungen nach sich ziehen. Eine Erhöhung des pH um nur 0,4 Einheiten reduzierte den Lysinexport um 90% (Fig. 29). Da unter diesen Bedingungen der Lysingradient aufgehoben war und das Membranpotential bei erhöhtem pH sogar anstieg, war es plausibel anzunehmen, daß die Abnahme der

Fig. 28 Export in Abhängigkeit des pH. Effluxkurven wurden bei pH 7,5 (○, ●) und pH 9 (□, ■) in Gegenwart (offene Symbole) oder Abwesenheit (geschlossene Symbole) von 100 mM Lysin im Außenmedium aufgenommen.

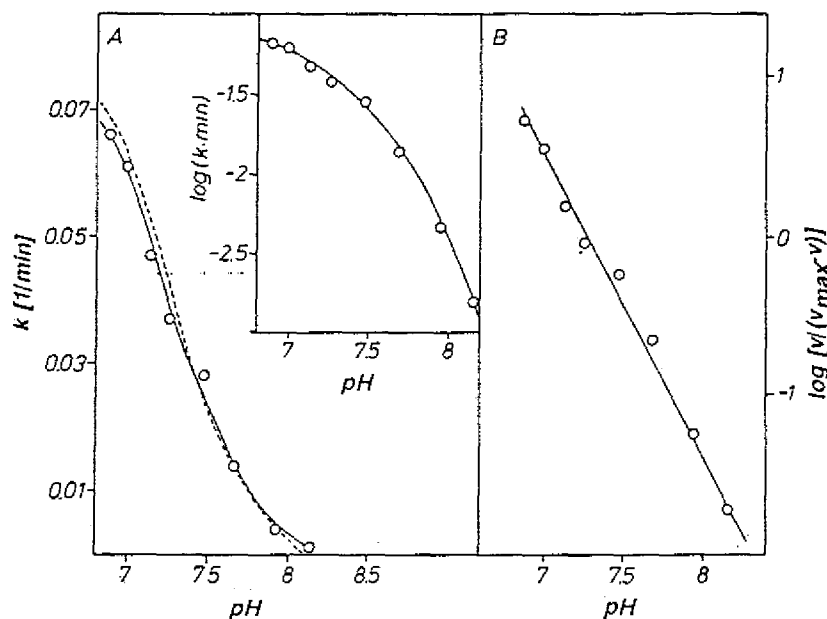
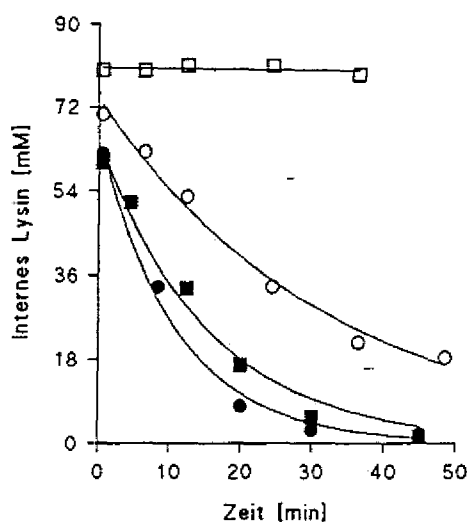
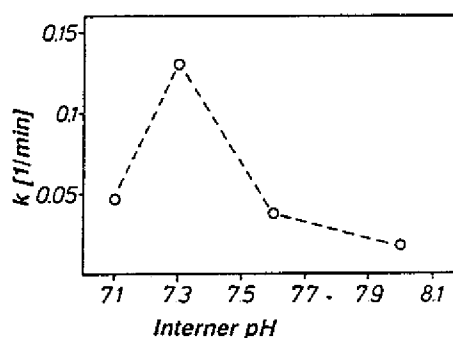


Fig. 29 Abhängigkeit des Exports vom pH bei einer externen Lysinkonzentration von 92 mM. (A) Direkte Auftragung, (B) Hill-Diagramm derselben Daten, Nebenbild: Logarithmische Auftragung der Daten. Die gestrichelte Linie zeigt die nach dem Modell berechnete Abhängigkeit. Die gepunktete Linie wird in Abschnitt 3.3.4.1. erläutert.

Transportaktivität nur durch die Änderung der Protonenkonzentration verursacht wurde. Dies erlaubte eine Stöchiometriebestimmung nach der Aktivierungsmethode (Hill-Diagramm-Analyse, Turner, 1984). Eine entsprechende Auftragung der Daten ergab eine

Steigung der Geraden von 1,78 zwischen pH 6,8 und pH 8,15 (Fig. 29). Dieses Ergebnis deutet auf einen 2H^+ /Lysin-Antiport hin. Eine Veränderung des pH-Gradienten führte innerhalb von Sekunden zu einer entsprechenden Änderung der Exportaktivität. Analog zu den Wirkungen des Lysins wäre für eine Änderung des internen pH-Werts eine Michaelis-Menten-Abhängigkeit zu erwarten. Der interne pH war jedoch nur sehr beschränkt Änderungen zugänglich, wenn andererseits der externe pH konstant bleiben sollte. Trotz dieser Einschränkungen wurde der interne pH durch die Gabe von Nigericin bei verschiedenen KCl-Konzentrationen variiert ($\text{pH}_{\text{ex}} = 8,1$). Es ergab sich ein pH-Optimum von pH 7,3 (Fig. 30).

Fig. 30 Abhängigkeit des Lysinexports vom internen pH. Der interne pH wurde durch verschiedene KCl-Konzentrationen in Anwesenheit des Ionophors Nigericin ($2 \mu\text{M}$) variiert.



Betrachtet man den Lysinexport als 2OH^- -Symport, so sollte eine drastische Erniedrigung der internen OH^- -Konzentration zu einem Abfall der Transportrate führen. Um dies zu überprüfen, wurde der interne pH im Effluxtest durch Gabe von Nigericin (externe Kaliumkonzentration 3mM , externer pH = 7,5) auf pH 6,3 eingestellt. Die Transportaktivität ging unter diesen Bedingungen auf 3% zurück ($100\% : k = 0,14 \text{ min}^{-1}$).

Vergleich der Wirkung der treibenden Kräfte auf den Lysinexport

Der Lysinexport wird von einem sekundär aktiven Transportsystem vermittelt. Die treibenden Kräfte sind das Membranpotential, der Lysingradient und der pH-Gradient. Ein plausibler Mechanismus ist ein 2H^+ /Lysin-Antiport (2OH^- /Lysin-Symport). Wie schon dargestellt, unterscheiden sich die treibenden Kräfte in ihrer Wirkung

auf den Export. Das Membranpotential war allein in der Lage, einen effektiven Export zu erzeugen. Ein Lysingradient oder ein pH-Gradient oder beide Gradienten zusammen können nur einen geringen Grund-Efflux erzeugen (Fig. 26). Beide Substrate zeigen jedoch

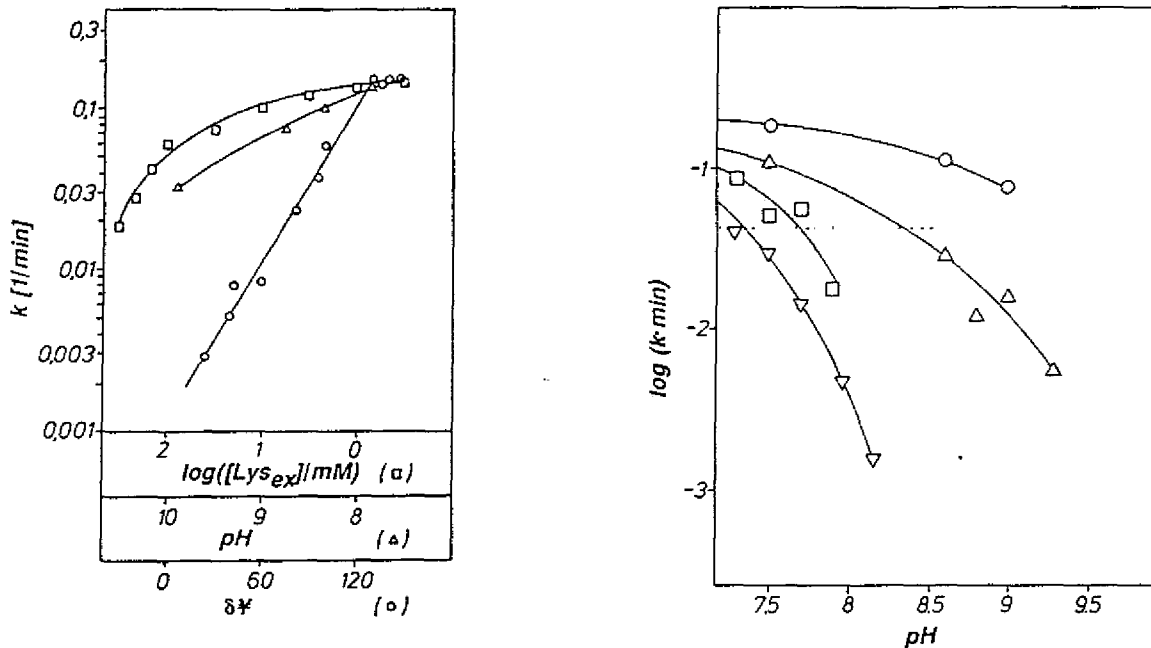


Fig. 31 (links) Vergleich der Wirkungen der drei treibenden Kräfte auf den Lysinexport. Die Daten entstammen den Nebenschildern der Figuren 24 und 26 und der Figur 23.

Fig. 32 (rechts) Gegenseitiger Einfluß des pH und der externen Lysinkonzentration auf den Lysinexport. Interne Lysinkonzentration 40 mM. (○) 0.1 mM, (Δ) 10 mM, (□) 50 mM, (▽) 100 mM externe Lysinkonzentration. Die gepunktete Linie wird in Abschnitt 3.3.4.1. erläutert.

Trans-Effekte. Die unterschiedliche Stärke der Hemmung des Exports bei gleichartiger Variation der Gradienten wird in der Zusammenstellung deutlich (Fig. 31). Entsprechend der Stöchiometrie wirkte eine pH-Änderung bei einem Lysingradient von 180 mV doppelt so stark wie eine Änderung der Lysinkonzentration bei einem $\delta pH = 0$. Da sowohl Protonen (H^+) als auch Lysin Trans-Effekte zeigten, war es möglich, daß sie sich auch gegenseitig beeinflussen. In der Tat konnte der Transeffekt einer erhöhten Lysinkonzentration durch eine Erhöhung der H^+ -Konzentration verstärkt werden und umgekehrt (Fig. 32).

Umgekehrt erhob sich die Frage, ob es Bedingungen gibt, unter denen eine Veränderung des Membranpotentials keine Änderung der Transportaktivität mehr hervorruft. Um dies zu prüfen wurde das Membranpotential (wie in Fig. 24) bei verschiedenen pH-Werten und externen Lysinkonzentrationen variiert (Fig. 33). Alle Kurven

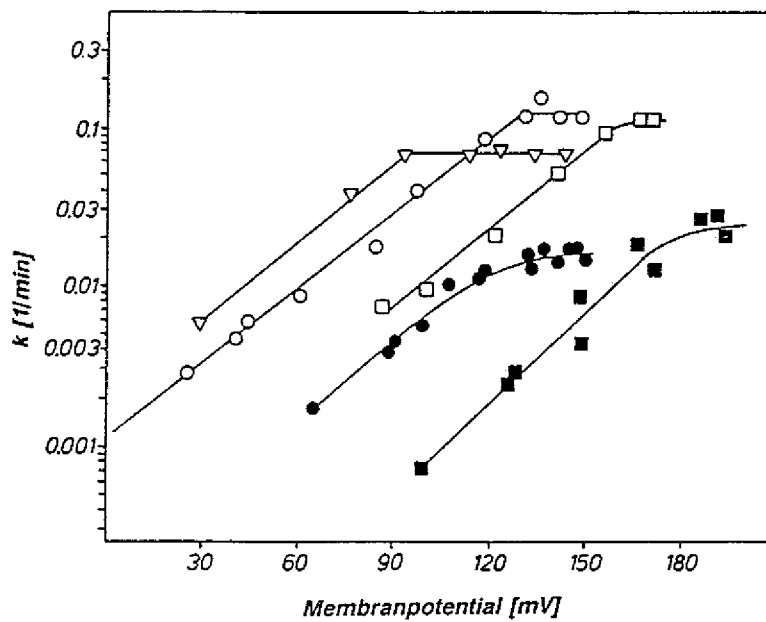
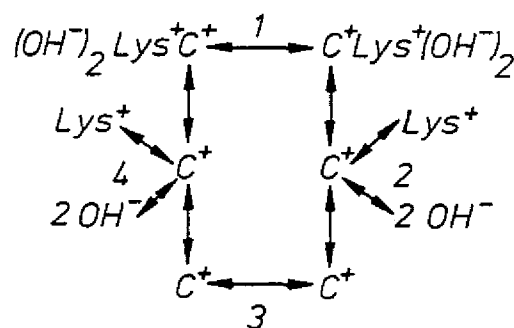


Fig. 33 Abhängigkeit der Lysinsekretion vom Membranpotential bei verschiedenen Bedingungen. (▽) pH 6,5, 0,1 mM externes Lysin, (○) pH 7,5 0,1 mM externes Lysin; (□) pH 8,5, 0,1 mM externes Lysin; (●) pH 7,5, 150 mM externes Lysin; (■) pH 9,2, 10 mM externes Lysin.

zeigten zwei Bereiche. Einen in dem die Exportrate stetig mit dem Membranpotential anstieg und einen zweiten in dem eine Erhöhung des Membranpotentials keine weitere Erhöhung der Exportrate zur Folge hatte. Die Steigung des vom Membranpotential abhängigen Bereichs war jedoch unter allen Bedingungen gleich. Die Höhe der Maximalgeschwindigkeit hing stark von den gewählten Bedingungen ab (beachte die logarithmische Skala). Bei einer externen Lysinkonzentration von 150 mM war es trotz eines hohen Membranpotentials nicht möglich, den Transport über einen Wert von $k = 0,02 \text{ min}^{-1}$ zu heben, während unter Standardbedingungen Raten von $k = 0,145 \text{ min}^{-1}$ erreicht wurden. Wurde der externe pH erhöht, waren höhere

Membranpotentiale nötig, um gleiche Transportraten zu erreichen wie unter Standardbedingungen. Die zwei Phasen der Potentialabhängigkeit konnten am besten unter der Annahme erklärt werden, daß im ansteigenden Teil der Kurve die Rate durch das Membranpotential kontrolliert wird und daher die Steigung in allen Fällen gleich war. Im flachen Teil der Kurve wird die Rate jedoch durch den pH und/oder die Lysinkonzentration bestimmt, da eine Änderung dieser beiden Parameter die unterschiedlichen Niveaus der Kurven erzeugte. Eine qualitative Erklärung der beschriebenen Effekte

Fig. 34 Schematischer
Transportzyklus für den
Lysinexport.



war durch das in Fig. 34 dargestellte Modell möglich. Wird der Zyklus im Uhrzeigersinn betrachtet, so erfolgt in Schritt 4 die Bindung von 2 OH^- und Lysin an den positiv geladenen Carrier (C^+) auf der Innenseite. In Schritt 1 erfolgt der Konformationswechsel des insgesamt ungeladenen Komplexes zur Außenseite. In Schritt 2 erfolgt die Dissoziation der Substrate auf der Außenseite. Der unbeladene Carrier, dessen positive Ladung nun nicht mehr neutralisiert wird, macht durch das Membranpotential getrieben, in Schritt 3 einen Konformationswechsel zur Innenseite (die nicht nummerierten Pfeile sind keine Reaktionsschritte, sondern nur graphische Hilfen). In diesem Modell ist der Schritt, auf den das Membranpotential wirkt (Schritt 3), getrennt von dem Schritt, auf den die Substratgradienten wirken (Schritt 1). Wird die Exportrate

durch Schritt 3 limitiert, so führt eine Änderung der Substratgradienten nur zu geringen Effekten (Fig. 31). Wird die Exportrate durch Schritt 1 limitiert, ist der Export unabhängig vom Membranpotential, wie dies zu Fig. 33 erläutert wurden. Die Trennung der beiden Einflüsse brachte es mit sich, daß der Transport formal als $2\text{OH}^-/\text{Lysin}^+$ -Symport anzusehen ist. Kinetische Experimente erlauben es jedoch nicht, zwischen Protonenantipport und Hydroxylionensymport zu differenzieren. Da beide Substrate in einem Schritt transportiert werden, sollten sie sich gegenseitig beeinflussen. Dies ist deutlich in Fig. 32 zu sehen. Die Transeffekte beider Substanzen ergänzen sich. Zwei weitere Beobachtungen können durch dieses Modell ebenfalls erklärt werden. (i) Der Lysinexport ist scheinbar irreversibel, da das (innen negative) Membranpotential den Transport nur in Exportrichtung bevorzugt. (ii) Sowohl ein pH-Gradient als auch ein Lysingradient können in Abwesenheit des Membranpotentials den Export nicht treiben, da der elektrogene Schritt dann äußerst langsam ist.

Diese qualitative Deutung sollte durch eine quantitative Beschreibung des Transportmechanismus bestätigt werden. Wie in der Einleitung beschrieben, gehorcht der sekundäre Transport, sofern er vom Membranpotential getrieben wird, im wesentlichen dem Michaelis-Menten-Gesetz unter Berücksichtigung der Rückreaktion und dem Nernstschen Gesetz. Aufgrund dieser Annahmen wurde versucht, eine kinetische Gleichung zu entwickeln, die mit den gemessenen Daten in guter Übereinstimmung ist. Grundlage für die Entwicklung der kinetischen Gleichungen ist der schematische Transportzyklus (Fig. 34). Die Schritte 2 und 4 sind bei den meisten Transportprozessen nicht geschwindigkeitsbestimmend. Da keine experimentellen Daten vorlagen, die gegen diese Annahme sprachen, wurden sie zur Vereinfachung in den kinetischen

Gleichungen nicht berücksichtigt. In der Ableitung der Gleichungen konnten die Schritte 1 und 3 (in Hin- und Rückrichtung) dann als Reaktionen 1. Ordnung betrachtet werden, das heißt es gibt nur einen Reaktanden, und zwar den Carrier-Lysin- 2OH^- -Komplex oder den unbeladenen Carrier. Es gilt $J = P \cdot c$. J ist der Flux, P die Permeabilitätskonstante und c ist die Konzentration

transportkompetenter d.h. beladener Carrier. Zunächst wird für Schritt 1 die entsprechende Gleichung {1} aufgestellt. Dazu ist es nötig die Carrierpopulation zu unterteilen, und zwar in eine Gruppe, deren Bindungsstellen nach innen zeigen (C'') und in eine Gruppe, deren Bindungsstellen nach außen zeigen (C'). Der Netto-Flux J_C von Schritt 1 kann dann wie folgt beschrieben werden:

$$J_C = P_C \cdot C'' \cdot a'' - P_C \cdot C' \cdot a' \quad \{1\}$$

P_C ist der Permeabilitätskoeffizient für den Transportschritt. Da nur beladene (transportkompetente) Carrier den Translokations-schritt durchführen können, werden die beiden Carrierpopulationen mit den entsprechenden "Michaelis-Menten-Termen" multipliziert.

$$a' = \left[\frac{[\text{lys}]'}{[\text{lys}]' + K_L'} \right] \cdot \left[\frac{[\text{OH}]'}{[\text{OH}]' + K_{\text{OH}}'} \right]^2 \quad \{2\}$$

a'' wird analog unter Verwendung der internen Konzentrationen ($''$) gebildet. Der Nettoflux von Schritt 3 wird entsprechend abgeleitet.

$$J_O = P_O \cdot C' \cdot b' \cdot \beta - P_O \cdot C'' \cdot b'' \cdot \beta^{-1} \quad \{3\}$$

P_O ist der Permeabilitätskoeffizient für den Rückkehrschritt. Da nur die unbeladenen Carrier an diesem Schritt teilnehmen, werden die Carrierpopulationen mit b' beziehungsweise b'' multipliziert.

$$b' = \left[\frac{K_L'}{[\text{lys}]' + K_L'} \right] \cdot \left[\frac{K_{\text{OH}}'}{[\text{OH}]' + K_{\text{OH}}'} \right]^2 \quad \{4\}$$

Wie oben erwähnt, ist die Nernst-Gleichung Grundlage für die Potentialabhängigkeit: $\delta\varphi = -R \cdot T / F \cdot \ln (C' / C'')$. Aus dieser Gleichung läßt sich β definieren. β gibt das Verhältnis von Hin und Rückreaktion (C' / C'') bei Anliegen eines elektrischen Potentials wieder.

$$\beta = \exp(-F \delta\varphi / R \cdot T)$$

Beide Teilreaktionen (Schritt 1 und 3) sind bei laufendem Transport gleich schnell, der Gesamtfluß damit $J_t = J_c = J_o$ und die gesamte Carrierpopulation $C_t = C' + C''$. Mit diesen beiden Erhaltungsbedingungen lassen sich die kinetischen Gleichungen aufstellen:

$$P_c \cdot C'' \cdot a'' - P_c \cdot C' \cdot a' = P_o \cdot C' \cdot b' \cdot \beta - P_o \cdot C'' \cdot b'' \cdot \beta^{-1} \quad \{5\}$$

und zusammengefaßt:

$$C'' / C' = (P_c \cdot a' + P_o \cdot b'' \cdot \beta) / (P_c \cdot a'' + P_o \cdot b' \cdot \beta^{-1}) \quad \{6\}$$

Der rechte Term ersetzt C'' / C' in den Gleichungen

$$C'' = C_t \cdot 1 / (1 + C' / C'') \quad \{7\} \text{ und } C' = C_t \cdot 1 / (1 + C'' / C'), \quad \{8\}$$

die aus den Erhaltungsgleichungen durch Division durch C' beziehungsweise C'' erhalten werden können. Die umgewandelten Gleichungen {7} und {8} werden dann in Gleichung {1} eingesetzt:

$$J_t = P_o \cdot P_c \cdot C_t \left[\frac{a'' \cdot b' \cdot \beta - a' \cdot b'' \cdot \beta^{-1}}{P_o (b' \cdot \beta + b'' \cdot \beta^{-1}) + P_c (a' + a'')} \right] \quad \{9\}$$

In diese Gleichung gehen somit alle treibenden Kräfte ein. Um die Übereinstimmung dieses Modells mit den Meßergebnissen überprüfen zu können, mußten die Konstanten experimentell werden. Es wurden folgende Werte ermittelt (Tab. 8) und in die Gleichung {9} eingesetzt. Somit enthält Gleichung {9} als einzige Unbekannte die Carriermenge C_t . Diese wurde variiert, um die errechneten Kurven den absoluten Meßwerten anzugleichen. Alle Kurven konnten mit etwa derselben Carriermenge angepaßt werden. Die folgenden Grenzwert-

Tabelle 8 Kinetische Konstanten des Lysinexports

Konstante	Wert	Ableitung siehe	Bestimmung nach
P_c	0.1 min^{-1}	(c)	Fig. 32
P_o	0.002 min^{-1}	(a)	Fig. 32
K_L'	50 mM	(c)	Fig. 34
K_L''	20 mM	(b)	Fig. 21
K_{OH}'	pK = 7,2	-	angepaßt
K_{OH}''	pK = 7,2	-	angepaßt

betrachtungen zeigen, daß die oben angegebenen Konstanten in der Tat aus den entsprechenden Abbildungen entnommen werden konnten.

(a) Kein Membranpotential und niedriges externes Lysin.

Wenn Schritt 3 limitierend ist, sollte die Extrapolation der Potentialabhängigkeit auf 0 mV ein Maß für P_o sein. Der hohe Lysingradient treibt dann den Export. Bei abgebautem $\delta\psi$ ist der potentialgetriebene Schritt sehr langsam, der Lysingradient ist unter Standardbedingungen jedoch hoch (etwa 1000 fach). β und β^{-1} werden = 1, a' ist nahe = 0, und b' kann zu y' umgewandelt werden:

$$y' = \left[\frac{K_{OH}'}{[OH]' + K_{OH}'} \right]^2 \quad \{10\}$$

Gleichung {9} vereinfacht sich zu

$$J_t = P_o \cdot P_c \cdot C_t \left[\frac{a'' \cdot y'}{P_o(y' + b'') + P_c \cdot a''} \right] \quad \{11\}$$

$P_c \cdot a''$ ist viel größer als $P_o(y' + b'')$, da $\delta\psi = 0$. Damit vereinfacht sich Gleichung {11} weiter:

$$J_t = P_o \cdot C_t \cdot y'$$

Wenn der pH niedrig ist ($[OH]' < K_{OH}'$), geht y' gegen 1. Die Extrapolation der Spannungsabhängigkeit bei pH 6,5 auf 0 mV gibt also ein gutes Maß für P_o .

(b) Hohes Membranpotential und niedriges externes Lysin.

Beim Efflux unter Standardbedingungen wird der potentialabhängige Schritt durch $\delta\psi$ und der substratabhängige Schritt durch den Lysingradient getrieben. β^{-1} ist sehr klein, für a' und b' gilt dasselbe wie unter (a). Gleichung {9} sieht dann wie folgt aus:

$$J_t = P_O \cdot P_C \cdot C_t \left[\frac{a'' \cdot y' \cdot \beta}{P_O(y' \cdot \beta) + P_C \cdot a''} \right] \quad \{12\}$$

Setzt man für a''

$$a'' = \left[\frac{[\text{lys}]''}{[\text{lys}]'' + K_L''} \right] \cdot x'' \quad \{13\}$$

mit

$$x'' = \left[\frac{[\text{OH}]''}{[\text{OH}]'' + K_{\text{OH}}''} \right]^2 \quad \{14\}$$

ein, dividiert durch $\left[\frac{[\text{lys}]''}{[\text{lys}]'' + K_L''} \right]$

und multipliziert mit $[\text{lys}]''$ so erhält man aus Gleichung {12} Gleichung {15}, in der die Terme, in denen die Lysinkonzentration eingeht, in einem Bruch zusammengefaßt sind.

$$J_t = \left[\frac{P_O \cdot P_C \cdot C_t \cdot x'' \cdot y' \cdot \beta}{P_C \cdot x'' + P_O \cdot y' \cdot \beta} \right] \cdot \left[\frac{[\text{lys}]''}{K_M'' + [\text{lys}]''} \right] \quad \{15\}$$

wobei der K_M'' folgenden Ausdruck repräsentiert.

$$K_M'' = K_L'' \left[\frac{P_O \cdot y' \cdot \beta}{P_C \cdot x'' + P_O \cdot y' \cdot \beta} \right] \quad \{16\}$$

Gleichung {15} hat die Form einer Michaelis-Menten-Gleichung. Der experimentell ermittelte apparente K_M von 20 mM ist demnach also sehr nahe an der tatsächlichen Dissoziationskonstante K_L'' , da $P_O \cdot y' \cdot \beta$ größer als $P_C \cdot x''$ unter diesen Bedingungen ist.

(c) Hohes Membranpotential und variable äußere

Lysinkonzentration. Wird der Export bei hohem Membranpotential gerade nicht mehr durch Schritt 3 sondern durch Schritt 1 limitiert, sollte dies P_C entsprechen. Der Trans-Effekt des Lysins unter Standardbedingungen ($\delta\psi = 135$ mV, $pH_{ex} = 7,5$, $[Lys_{in}] = 40$ mM) entspricht kinetisch einer Enzymhemmung. a' ist in diesem Fall nicht $= 0$, β^{-1} wird jedoch sehr klein. Gleichung {9} vereinfacht sich dadurch zu:

$$J_t = P_O \cdot P_C \cdot C_t \left[\frac{a'' \cdot b' \cdot \beta}{P_O(b' \cdot \beta) + P_C(a' + a'')} \right] \quad \{17\}$$

Da die äußere Lysinkonzentration variiert werden soll, ist es sinnvoll, die "externes Lysin enthaltenden" Terme zusammenzufassen. b' und a' werden daher durch Ausdrücke {2} und {4} ersetzt und anschließend durch $K_L/([Lys'] + K_L)$ dividiert. Nach Ausmultiplizieren, Kürzen, Zusammenfassen und Vereinfachen erhält man als Zwischenergebnis:

$$J_t = \frac{P_O \cdot P_C \cdot C_t \cdot a'' \cdot y' \cdot \beta \cdot K_L}{[Lys'](P_C \cdot a'' + P_C x') + K_L (P_C \cdot a'' + P_O \cdot \beta \cdot y')} \quad \{18\}$$

Durch Erweitern mit $1/(P_C \cdot a'' + P_C x')$ gelangt man zur endgültigen Form.

$$J_t = \left[\frac{P_O \cdot P_C \cdot C_t \cdot a'' \cdot y' \cdot \beta}{P_C \cdot a'' + P_O \cdot y' \cdot \beta} \right] \cdot \left[\frac{K_{1/2}}{K_{1/2} + [lys]'} \right] \quad \{19\}$$

in dieser Gleichung ist:

$$K_{1/2} = K_L' \left[\frac{P_C \cdot a'' + P_O \cdot y' \cdot \beta}{P_C \cdot a'' + P_C \cdot x'} \right] \quad \{20\}$$

Durch die Zusammenfassung des rechten Teils von Gleichung {20} zu einer Inhibitionskonstante $K_{1/2}$ wird die Analogie zur Dixon-Gleichung deutlich. Eine Auftragung $1/J$ gegen die externe Lysinkonzentration $[lys]'$ ergibt als Ordinatenabschnitt $1/V_{\max}$ und als Steigung $1/(K_{1/2} \cdot V_{\max})$. Es ergibt sich ein $K_{1/2}$ von 50 mM (Fig. 35). Aus der Gleichung ist ersichtlich, daß $K_{1/2}$ keine Konstante ist, sondern durch das Membranpotential und den pH variiert wird. Unter den Standardbedingungen (Membranpotential 135 mV, $pH_{\text{ex}} = 7,5$; $[Lys]_{\text{in}} = 40\text{mM}$) ist der Ausdruck in Klammern der Gleichung {20} nahezu = 1 und somit $K_{1/2} = K_L'$. Wird die äußere

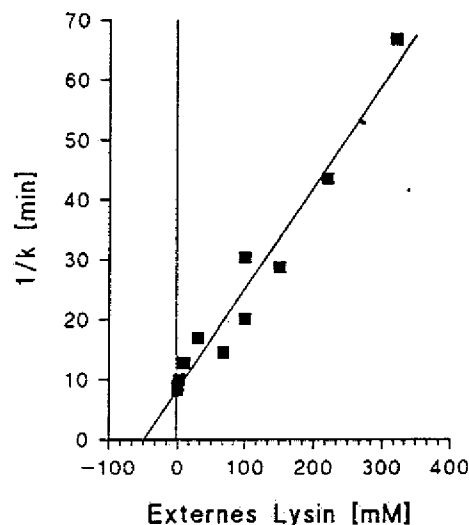


Fig. 35 Bestimmung des $K_{1/2}$
für den Einfluß der äußeren
Lysinkonzentration auf den Export.

Lysinkonzentration sehr klein, so wird der Ausdruck in der zweiten Klammer von Gleichung {19} gleich eins. $P_O \cdot y' \cdot \beta$ ist größer als $P_C \cdot a''$, besonders bei alkalischem pH. Dadurch vereinfacht sich Gleichung {19} zu: $J_t = P_C \cdot C_t \cdot a''$

In Anbetracht der Tatsache, daß $[Lys'']$ größer als der interne K_M ist, zeigt sich, daß das Plateau der Spannungsabhängigkeit bei pH 8,5 einen guten Wert für P_C darstellt.

Das hier vorgestellte Modell zeigt eine hohe Übereinstimmung mit den gemessenen Daten. Dies ist in den Figuren 24, 26 und 29 zu erkennen, in denen die berechneten Kurvenverläufe eingezeichnet wurden. Das qualitative Modell von Fig. 34 vermag also die zunächst widersprüchlich erscheinenden Wirkungen der treibenden Kräfte konsistent zu erklären.

3.3.4. Biotechnologische Aspekte der Lysinsekretion

3.3.4.1. Die Lysinsekretion als limitierender Schritt der Lysinproduktion

Nachdem dargestellt wurde, daß der Lysinexport durch einen Carrier vermittelt wird, der im wesentlichen dem Michaelis-Menten-Gesetz gehorcht und vom elektrischen Potential getrieben wird, muß dieses Transportenzym in die Reihe der an der Lysinproduktion beteiligten Enzyme eingeordnet werden. Eine Limitierung der Lysinproduktion durch eine niedrige Aktivität des Exportsystems ist denkbar wenn die Transportraten in der gleichen Größenordnung liegen wie die Produktionsraten. Zur Beurteilung dieser Frage wurden die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Transportraten mit den von Schrumpf (1990) gemessenen Produktionsraten des Stammes DG 52-5 verglichen. Die maximalen Produktionsraten sind in den Figuren 23, 24, 26, 29 als gepunktete Linien eingezeichnet. Es zeigte sich, daß die Produktionsraten deutlich niedriger als die maximalen Transportraten waren. Eine Limitierung ist nur dann möglich, wenn die Transportrate unter die Biosyntheserate fällt. Aufgrund des

Mechanismus' des Exports kommen folgende Möglichkeiten in Betracht: (i) Die externe Lysinkonzentration wird sehr hoch. (ii) Der externe pH wird sehr hoch; dies trifft insbesondere zu, wenn auch die externe Lysinkonzentration erhöht ist. (iii) Das Membranpotential sinkt ab, wie dies bei niedrigem pH der Fall ist.

Zwei verschiedene Ansätze sollten die Frage klären, ob diese theoretischen Möglichkeiten tatsächlich unter praxisnahen Bedingungen eintreten. Im ersten Ansatz sollte der Export durch einen erhöhten pH und eine erhöhte Lysinkonzentration gehemmt werden. Im zweiten Ansatz sollte der Export durch einen erniedrigten pH gehemmt werden. Die kontinuierliche Kultur bot sich für den ersten Ansatz aus mehreren Gründen als Methode der Wahl an: 1. Der pH kann leicht kontrolliert werden. 2. Die Zellmasse bleibt konstant, so daß die Exportraten gut verglichen werden können. 3. Die Lysinkonzentration im Überstand bleibt konstant. Im Gegensatz zu allen anderen Arten der Kultivierung können also alle für den Lysinexport relevanten Parameter konstant gehalten werden. Als Kontrolle wurde eine Fermentation ohne zugesetztes Lysin durchgeführt, d.h. im Überstand erscheint nur das Lysin, das von den Zellen selbst ausgeschieden wird. Bei einer Durchflußrate von $0,2 \text{ h}^{-1}$ war diese Konzentration gering ($< 5 \text{ mM}$). In einer zweiten Fermentation wurde dem ansonsten identischen Medium 80 mM Lysin zugesetzt. Um den Efflux zu variieren, wurde in beiden Fermentern der Export bei pH 7, 8, und 9 untersucht (Tabelle 9). Dieses Experiment entspricht den "in vitro" Untersuchungen von Figur 32. Ein Vergleich der Sekretionsraten bei pH 7 und pH 8 zeigte, daß eine Erhöhung des pH um nur eine Einheit die Sekretionsrate stark erniedrigte, wenn die externe Lysinkonzentration erhöht war. Dies ist in Einklang mit den Ergebnissen, die im Effluxtest ermittelt wurden (Fig. 32). Die Ergebnisse bei pH 9 entsprachen jedoch nicht

Tabelle 9 Lysinproduktion in kontinuierlicher Kultur

Fermenter 1 (ohne zugesetztes Lysin) (Volumen: 0,98 l)			
	pH 7	pH 8	pH 9
Verdünnungsrate (h^{-1})	0.2	0.2	0.198
Trockengewicht (g/l)	4.8 ± 0.5	5.2 ± 0.8	2.8 ± 0.4
$q \text{ O}_2$ ($\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	3.8 ± 0.6	3.5 ± 0.3	6.3 ± 0.4
$y \text{ O}_2$ (g d.wt./mol)	54 ± 9	57 ± 4	31 ± 2
$q \text{ Glucose}$ ($\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	4.0 ± 0.2	5.3 ± 0.6	4.8 ± 0.9
$y \text{ Glucose}$ (g d.wt./mol)	50 ± 2	38 ± 4	42 ± 8
$[\text{Lys}_{\text{in}}]$ (mM)	8.4 ± 1.2	7.3 ± 0.9	9.4 ± 1.0
Produktionsrate ($\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	0.21 ± 0.02	0.17 ± 0.01	0.31 ± 0.04
Fermenter 2 (80 mM zugesetztes Lysin) (Volume: 1,03 l)			
	pH 7	pH 8	pH 9
Verdünnungsrate (h^{-1})	0.195	0.199	0.206
Trockengewicht (g/l)	3.5 ± 0.1	3.7 ± 0.3	1.4 ± 0.3
$q \text{ O}_2$ ($\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	4.1 ± 0.8	4.9 ± 0.3	8.5 ± 1
$y \text{ O}_2$ (g d.wt./mol)	48 ± 9	40 ± 3	25 ± 3
$q \text{ Glucose}$ ($\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	3.1 ± 0.5	5.1 ± 0.8	9.4 ± 1.8
$y \text{ Glucose}$ (g d.wt./mol)	61 ± 10	39 ± 6	22 ± 4
$[\text{Lys}_{\text{in}}]$ (mM)	15.0 ± 1.2	15.6 ± 1.5	13.2 ± 0.4
Produktionsrate ($\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	0.23 ± 0.16	0.084 ± 0.052	0.97 ± 0.40
y = Ertrag; q = Aufnahmerate Für die Berechnungen siehe Fiechter, 1989			

den Ergebnissen der in vitro Experimente (siehe Diskussion). Während der kontinuierlichen Kultur wurde der Sauerstoffverbrauch und die Glukoseaufnahme bestimmt, um festzustellen ob der Export von Lysin gegen einen Konzentrationsgradienten einen merklichen Energiebeitrag kostet. Ein erhöhter Energieverbrauch sollte sich durch niedrigere Erträge oder eine höhere Atmungsrate bemerkbar machen. Vergleicht man auch in diesem Fall nur die Werte von pH 7 und pH 8 so sind die Unterschiede zwischen den beiden Fermentern gering, die Atmungsrate bei pH 8 ist in Fermenter 2 jedoch etwas

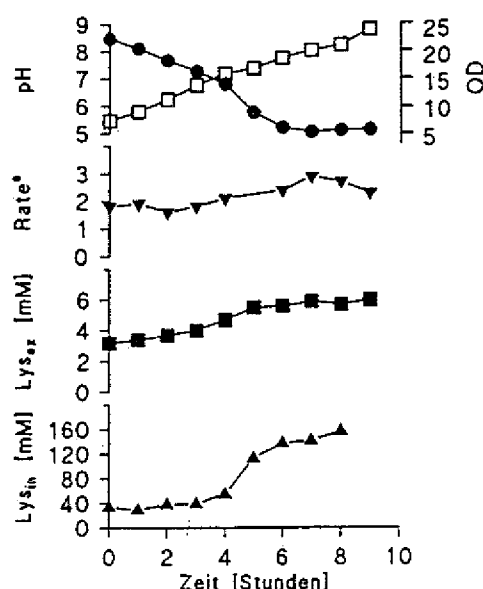
höher als in Fermenter 1.

Da die kontinuierliche Kultur eine sehr aufwendige Methode ist, wurde der zweite Ansatz in Schüttelkolbenkulturen mit dem Stamm KK 25 durchgeführt. Dieser besitzt das Exportsystem des Wildtyps. Da es langsamer als das Exportsystem des Stamm DG 52-5 ist (siehe unten), sollte eine Limitierung der Produktion durch die Sekretion also besser sichtbar sein als beim Stamm DG 52-5. Die Versuche wurden so durchgeführt, daß die Produktionsrate während der Fermentation bestimmt wurde, gleichzeitig jedoch auch ein Aliquot Zellen entnommen und mit diesem der normale Effluxtest durchgeführt wurde (Fig. 36). Während sich also der pH-Wert in der Fermentation dauernd ändert und damit die Sekretionsrate, wird die potentielle Exportfähigkeit bei pH 7,5 im Effluxtest bestimmt. Es

Fig. 36 Lysinexport des Stammes 13032^r während der Fermentation.

(●) pH der Kultur, (□) Optische Dichte der Kultur, (▲) Interne Lysinkonzentration, (■) externe Lysinkonzentration, (▼) Effluxrate im Standard-Effluxtest bei pH 7,5.

^a [nmol/min/(mg TG)]



war deutlich zu sehen, daß mit dem Absinken des äußeren pH-Wertes der Export in der Batch-Kultur zum Erliegen kam. Die entnommenen und gewaschenen Zellen zeigten jedoch ganz normale Sekretion. Durch das Absinken des externen pH wurde die Aktivität des Exports so gering, daß eine Lysinproduktion trotz hoher Biosynthese (die

interne Lysinkonzentration betrug bis zu 150 mM) nicht mehr möglich war.

Die Ergebnisse aus den Fermentationen stimmen gut mit den Ergebnissen der Effluxtest-Versuche überein. Der pH-Wert spielt eine wichtige Rolle bei der Lysinsekretion. Sowohl eine Erhöhung als auch eine Erniedrigung des externen pH konnte den Lysinexport unter Kultivierungsbedingungen hemmen und damit die Lysinproduktion verringern.

3.3.4.2. Vergleich der Exportsysteme dreier verschiedener Lysinproduktionsstämme

Eng verknüpft mit der Frage der Limitierung der Produktion durch den Exportvorgang ist die Frage, ob verschiedene Produktionsstämme auch verschiedene Exportsysteme besitzen. Sollte der Export wirklich eine Bedeutung in der Flußkontrolle der Lysinproduktion besitzen, so wäre es zu erwarten, daß effektivere Produktionsstämme auch auf bessere Exportsysteme hin mutagenisiert und selektioniert wurden. Um diese Hypothese zu prüfen, sollten die Exportsysteme des Wildtyps und zweier unterschiedlich guter Lysinproduzenten untersucht werden. Folgende Fragen sollten beantwortet werden: (i) Wie sieht das Exportsystem des Wildtyps aus? (ii) Unterscheidet es sich vom Exportsystem des Referenzstammes DG 52-5? (iii) Ist das Exportsystem des Hochleistungsstammes MH20/22B nochmals verändert? Da der Wildstamm, unter denselben Bedingungen herangezogen wie die Produktionsstämme, praktisch keinen Export zeigt, wurde zu einem genetisch manipulierten Wildstamm gegriffen. Dieser Stamm besitzt neben der normalen Aspartatkinase noch eine in das Genom integrierte deregulierte Aspartatkinase aus dem Stamm MH20/22B und wird im

weiteren KK 25 genannt. Die im Folgenden vorgestellten Experimente wurden genauso durchgeführt wie die entsprechenden Experimente für den Stamm DG 52-5 in den Abschnitten 3.3.2. und 3.3.3. Auf eine technische Beschreibung der Experimente wurde daher verzichtet.

Zunächst wurden die K_M -Werte und die $V_{\max}$ -Werte der Exportsysteme der drei Stämme vergleichen (Fig. 37 und Tab. 10). Die

Fig. 37 Stammvergleich. Abhängigkeit der Lysinsekretion von der Innenkonzentration. (▲) DG 52-5, (■) MH20/22B, (▼) KK 25

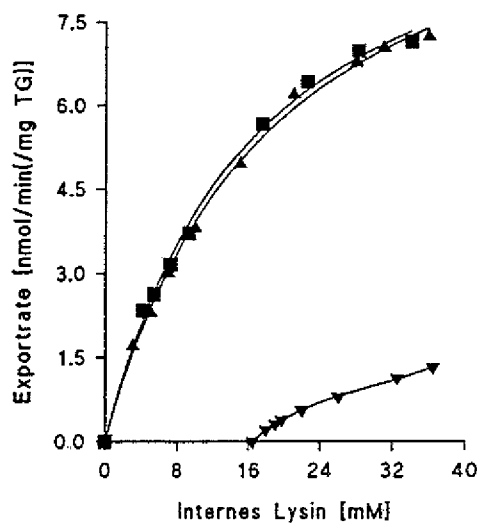


Tabelle 10: Kinetische Konstanten der Effluxsysteme verschiedener Stämme

Stamm	K_M	$V_{\max}$
	mM	nmol/min/(mg TG)
KK 25	^a	1,8
DG 52-5	20	12
MH 20/22B	20	12

^a Keine Michaelis-Menten Kinetik

Stämme DG52-5 und MH20/22B unterschieden sich kaum. Obwohl es bei dieser K_M -Bestimmung nicht zu erkennen ist, war die Exportrate bei gleicher Innenkonzentration im Falle des Stammes MH20/22B in der Regel 10 - 20% schneller als beim Stamm DG 52-5. Der Stamm KK 25 zeigte keine Michaelis-Menten-Kinetik beim Export. Unterhalb einer

internen Lysinkonzentration von 17 mM war ein Export nicht mehr meßbar. Bei Vergleichen mit dem Stamm KK 25 wurde daher in Abweichung zu den Abbildungen in Kapitel 3.3.3. die Exportrate und nicht die Geschwindigkeitskonstante verwendet. Der auffälligste Unterschied zwischen den Produktionsstämmen und dem Stamm KK 25 war die sechsfach höhere Exportrate der Produktionsstämme.

Wie in Abschnitt 3.3.4.1. belegt wurde, kann der pH-Wert unter Produktionsbedingungen die Aktivität der Exportsysteme stark

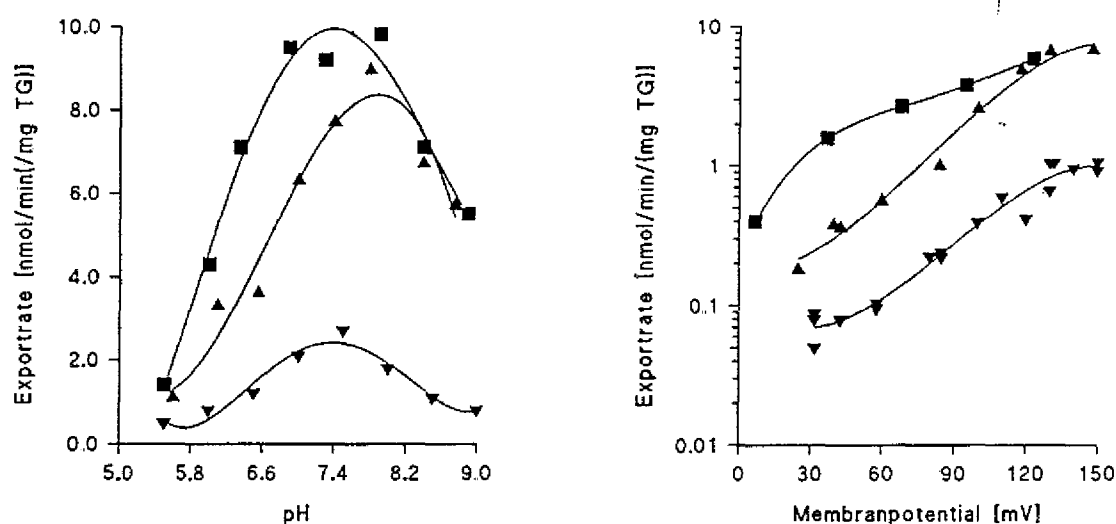


Fig. 38 (links) Stammvergleich, Abhängigkeit der Exportgeschwindigkeit vom pH. (▲) DG 52-5, (■) MH20/22B, (▼) KK 25.

Fig. 39 (rechts) Stammvergleich, Abhängigkeit der Exportrate vom Membranpotential. (▲) DG 52-5, (■) MH20/22B, (▼) KK 25.

beeinflussen. Daher wurde die pH-Abhängigkeit der Exportrate der drei Stämme verglichen (Fig. 38). Während für alle drei Systeme nahezu identische pH-Optima bestimmt wurden, zeigte der Stamm MH20/22B bei saurem pH eine etwa doppelt so hohe Transportaktivität wie der Stamm DG 52-5. Beide Produktionsstämme wiederum wiesen eine deutlich höhere Aktivität als der Stamm KK 25 auf.

Um die Exportsysteme der drei Stämme genauer zu differenzieren, wurden die für den Mechanismus charakteristischen Eigenschaften genauer untersucht. (i) Der Einfluß des Membranpotentials auf die Exportrate (Fig. 39), ist für die Stämme KK 25 und DG 52-5 ähnlich. Innerhalb der Meßgenauigkeit, insbesondere beim KK 25, ist die Steigung der Kurven zwischen 60 und 120 mV in beiden Fällen gleich. Der Stamm MH20/22B zeigte eine geringere Abnahme der Exportrate bei abnehmendem Membranpotential. (ii) Der Transeffekt des Lysins (die hemmende Wirkung einer erhöhten externen Lysinkonzentration) auf die Exportrate war bei allen Stämmen sehr ähnlich (Fig. 40). Aufgrund der geringen Exportrate waren die Werte für den Stamm KK 25 entsprechend niedriger. (iii) Der Trans-Effekt des pH bei hohen Lysinkonzentrationen konnte nur

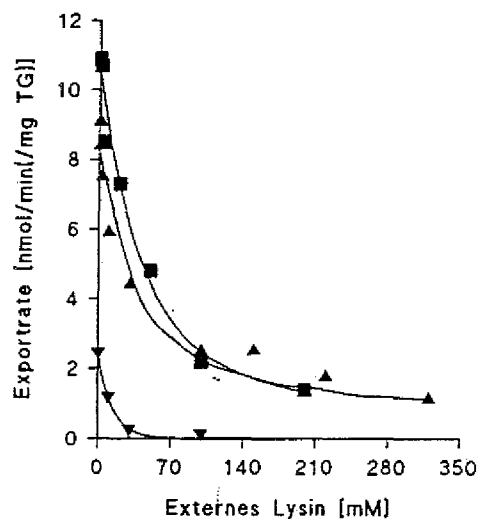


Fig. 40 Stammvergleich, Trans-Effekt des Lysins auf den Export (▲) DG 52-5, (■) MH20/22B, (▼) KK 25.

für die Stämme DG 52-5 und MH20/22B bestimmt werden, da die Exportaktivität des Stammes KK 25 zu niedrig war. Entsprechend des Mechanismus' des Lysinexports sollte die pH-Abhängigkeit mit steigender Lysinkonzentration im Medium zunehmen. Dies war auch beim Stamm MH20/22B der Fall (Fig. 41). Der Export wurde jedoch im Vergleich zum DG 52-5 durch den ansteigenden pH weniger stark

gehemmt.

In allen Experimenten in denen eine erhöhte externe Lysin-konzentration vorlag, konnte die Exportgeschwindigkeit nur nach der Abnahme der Innenkonzentration bestimmt werden, da die schnelle Waschprozedur (siehe 2.4.11.) angewandt wurde. Dies führt zu einer Unterschätzung der Exportrate, da der interne Lysinpool durch ein Nachlaufen der Biosynthese aufgefüllt wurde. Dieser

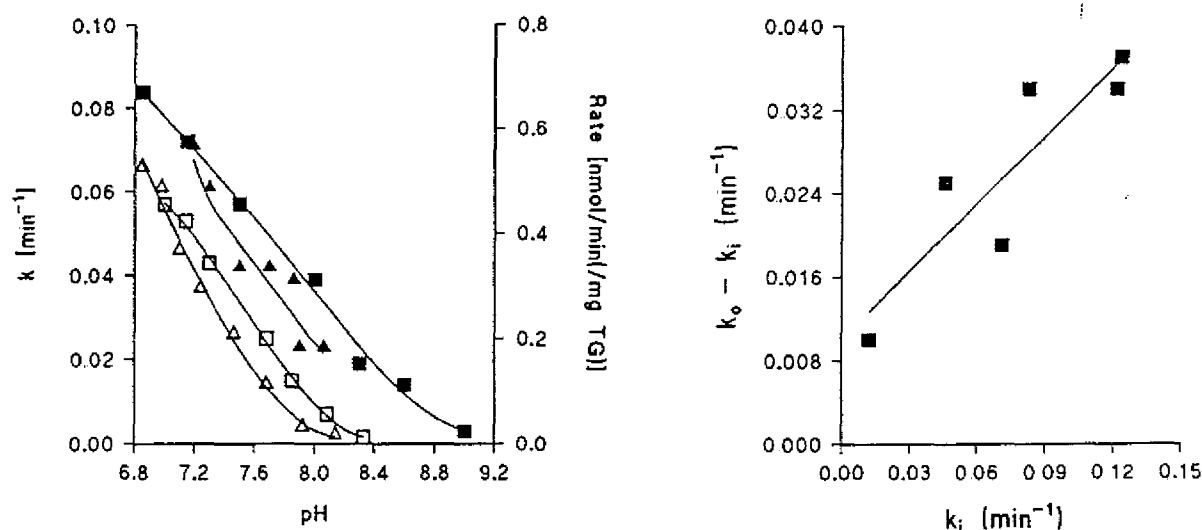


Fig. 41 (links) Stammvergleich. Abhängigkeit der Lysinexkretion vom pH bei vermindertem Lysingradient. ($\blacktriangle$, $\triangle$) DG 52-5; ($\blacksquare$, $\square$) MH20/22B. Offene Symbole: $\text{Lys}_{\text{ex}} = 90 \text{ mM}$; geschlossene Symbole: $\text{Lys}_{\text{ex}} = 50 \text{ mM}$.

Fig. 42 (rechts) Eichkurve für die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten nach den Innenkonzentrationen im Stamm MH20/22B. k_i = Geschwindigkeitskonstante bestimmt nach Innenkonzentrationen, k_o = Geschwindigkeitskonstante bestimmt nach den Außenkonzentrationen.

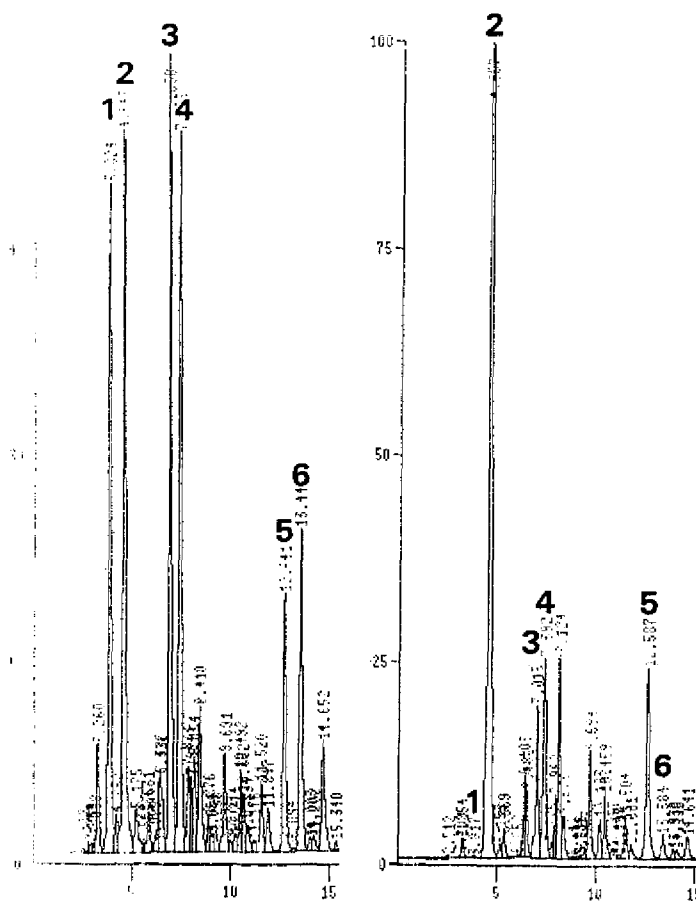
Fehler war beim Stamm DG 52-5 klein, für den Stamm MH20/22B mußte jedoch eine Korrekturkurve aufgestellt werden. Als Maß für das Nachlaufen der Biosynthese wurde die Differenz zwischen der Abnahme der inneren Lysinmenge und der Zunahme der äußeren Lysinmenge genommen. Diese Daten konnten aus Experimenten entnommen werden, in denen sowohl interne als auch externe Konzentrationen

gemessen wurden. Aus der pH-Abhängigkeit des Stammes MH20/22B konnte eine entsprechende Eichkurve erstellt werden (Fig. 42). Die Kurven für den Stamm MH20/22B in Fig. 40 und 41 wurden nach dieser Eichkurve korrigiert. Der Stamm KK 25, der das Exportsystem des Wildtyps besitzt, zeigte einen deutlich langsameren Export als der Stamm DG 52-5. Bei der Selektion auf erhöhte Lysinproduktion wurde daher auch ein verändertes Exportsystem selektioniert. In Abschnitt 3.3.4.1. wurde belegt, daß ein sehr niedriger, aber auch ein hoher pH, bei hoher externer Lysinkonzentration dazu führen können, daß der Export die Lysinproduktion im Stamm DG 52-5 limitiert. Der bessere Lysinproduzent MH20/22B besitzt ein Exportsystem, das in beiden Fällen weniger stark gehemmt wird als die Lysinexportpermease des Stammes DG 52-5.

3.3.5. Mikroorganismen in der Natur, bakterienökologische Gesichtspunkte der Lysinsekretion

Der Nachweis eines spezifischen Carriers für den Lysinexport wirft die Frage auf, welche Aufgabe dieser Carrier unter natürlichen Bedingungen haben könnte. Aufgrund des Transportmechanismus muß angenommen werden, daß dieser Carrier ausschließlich dem Export dient. Der K_M -Wert und die Maximalgeschwindigkeit sind Daten, die in der Regel den physiologischen Bedürfnissen angepaßt sind. Der Export im Wildstamm wird jedoch erst bei Konzentrationen über 20 mM relevant. Diese Konzentrationen werden bei Wachstum auf Minimalmedium jedoch nicht erreicht. Entsprechend "produziert" der Wildstamm im Verlaufe einer Fermentation nur 1-2 mM Lysin. Die Produktionsraten sind gering und betragen nur 0,15 - 0,38 nmol/min(/mg TG). *Corynebacterium glutamicum* ist ein Bodenbakterium. In natürlicher Umgebung dürfte zersetztes organisches

Fig. 43 Vergleich der Aminosäure-
zusammensetzung im Cytoplasma
unter verschiedenen Anzuchtbe-
dingungen, nach dem Waschvorgang.
(links) Anzucht auf Minimalmedium
(rechts) Anzucht auf komplexem
Medium. 1, Asp; 2, Glu; 3 ?;
4, Gly, Thr; 5, Orn
(als interner Standard); 6, Lys.



Material eine Hauptnahrungsquelle sein. Es wurde daher überprüft, ob der interne Lysinpool bei Fütterung einer komplexen Nahrungsquelle andere Werte erreicht als im Minimalmedium. Dazu wurden Zellen auf Minimalmedium mit Glukose und auf Vollmedium ohne Glukose herangezogen. Ein Vergleich der Chromatogramme der entsprechenden Zellextrakte zeigte deutlich, daß das Aminosäuremuster in Abhängigkeit von den Anzuchtbedingungen verändert war (Fig. 43). Der Lysinpool war bei Anzucht auf Komplexmedium deutlich erhöht. Da in Komplexmedium die Aminosäuresekretion nicht untersucht werden konnte, wurden die in ihrem Stoffwechsel umgestellten Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet und in ein Kurzfermentations-Medium überimpft. Dieses Medium enthielt anstelle von Glukose Glutamat als Kohlenstoffquelle,

Fig. 44 Lysinsekretion durch den Wildtyp
ATCC 13032 nach Fütterung von 1mM
Alanin-Lysin (Endkonz.).

(A) Externe Lysinkonzentration,
(B) interne Lysinkonzentration.

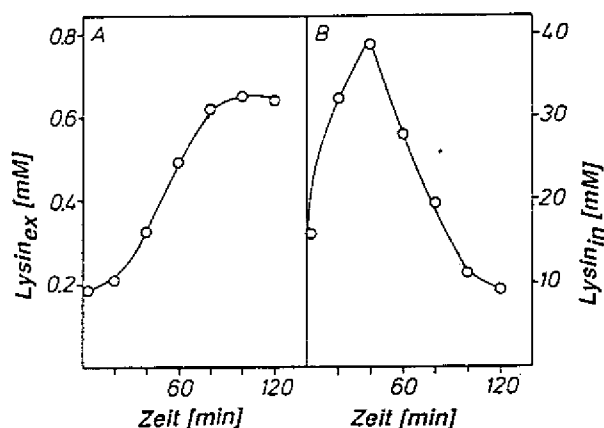


Tabelle 11 Abhängigkeit der Sekretion durch ATCC 13032 vom pH und Membranpotential

Bedingung	Rate
Potentialabhängigkeit^a	
0,1 mM KCl, 10 μ M Valinomycin	91% ^b
3 mM KCl, 10 μ M Valinomycin	53% ^c
6 mM KCl, 10 μ M Valinomycin	24% ^d
100 mM KCl, 10 μ M Valinomycin	8% ^e
pH-Abhängigkeit^f	
pH 6,5	3,3 nmol/min/(mg TG)
pH 7,5	3,8 nmol/min/(mg TG)
pH 8,5	4,3 nmol/min/(mg TG)

^a Bei der Messung der membranpotentialabhängigkeit trat zusätzlich ein Kaliumeffekt auf. Es wurden unterschiedliche Exportraten vor der Valinomycinzugabe gemessen, es wurde daher normiert.

^b 100% = 0,32 nmol/min/(mg TG)

^c 100% = 0,6 nmol/min/(mg TG)

^d 100% = 0,9 nmol/min/(mg TG)

^e 100% = 0,85 nmol/min/(mg TG)

^f Die Sekretionsrate wurde wie unter "Methoden" beschrieben bestimmt, jedoch bei verschiedenen pH-Werten.

um Repression zu vermeiden. Da der Lysinpool untersucht werden sollte, wurden als komplexe Nahrungsquelle lysinhaltige Peptide angeboten. Von den drei getesteten Peptiden Lysin-Alanin, Alanin-

Lysin und Lysin-Glutamat erzeugte Alanin-Lysin den stärksten Lysinexport (Fig. 44). Die Lysininnenkonzentration stieg zunächst bis auf 40 mM an, nahm dann jedoch schnell wieder ab, weil das Peptid verbraucht wurde. Die Sekretionsrate betrug bis zu 3,5 nmol/min(/mg TG). Wie der Lysinexport in den anderen Stämmen, war auch der peptidinduzierte Efflux vom Membranpotential abhängig, und die pH-Abhängigkeit bei niedriger externer Lysinkonzentration war gering (Tab. 11).

4. Diskussion

4.1. Bioenergetik von *Corynebacterium glutamicum*

C. glutamicum ist ein Gram positives, neutrophiles, aerobes, (fakultativ anaerobes) Bakterium. Das Membranpotential und die protonenmotorische Kraft erreichen Werte, wie sie für aerobe Bakterien typisch sind (Kashket, 1985). Das Cytoplasma ist im Bereich um pH 7,5 gut gepuffert, die ATPase ist durch DCCD hemmbar. Die Atmungsrate, die Glukoseaufnahme und die entsprechenden Wachstumserträge stimmen mit denen anderer Bakterien überein (Neijssel und Tempest, 1979). *C. glutamicum* benutzt, wie die meisten Bakterien, Kalium als Hauptkation des Cytoplasmas.

Die zuverlässige Messung des Membranpotentials unter allen Versuchsbedingungen stellt nach wie vor ein Problem dar. Die Membranpotentialbestimmung mittels ^{86}Rb gilt als die zuverlässigste Methode zur Bestimmung des Membranpotentials (Bakker, 1990). Wird das Membranpotential mit TPP^+ gemessen, so ergibt sich eine gute Übereinstimmung, wenn von den Werten ein konstanter Anteil an unspezifischer Bindung abgezogen wird, der das Potential scheinbar um 25 mV erhöht. Wird die Korrektur nach dem Modell des exponentiellen Mittels (Zaritzki et al., 1981) durchgeführt, so

ergeben sich zu niedrige Werte, wie dies auch schon bei anderen Bakterien beobachtet wurde (Bakker, 1990). Werden Membranpotentiale mit und ohne Valinomycin bei verschiedenen pH-Werten bestimmt, ergeben sich ebenfalls Differenzen. Mittels TPP^+ -Verteilung wurde gemessen, daß das Membranpotential in *C. glutamicum* von pH 9 nach pH 5,5 von 157 mV bis auf 22 mV linear abnimmt. Ähnliche Werte wurden von Ebbighausen et al. (1989) bestimmt. Wird das Membranpotential unter denselben Bedingungen mittels $^{86}\text{Rb}^+$ /Valinomycin bestimmt, so nimmt das Potential zwar ebenfalls ab, aber von 190 mV (bei pH 9) auf 130 mV (bei pH 6). In diesem Fall scheint die Bestimmung mittels TPP^+ die physiologischen Werte wiederzugeben, da sie mit anderen Bakterien (Rosen, 1978; Kashket, 1985) und den Transportmessungen in Übereinstimmung sind. Die K^+ -Gleichgewichtspotentiale haben wahrscheinlich die angegebene Höhe, entsprechen jedoch nicht den physiologischen Werten. Ein Indiz dafür ist die Tatsache, daß bei einer Kaliumkonzentration von 0,1 mM die Zugabe von Valinomycin den Lysinexport beschleunigen kann (Tabelle 7).

4.2. Das Lysinaufnahmesystem von *Corynebacterium glutamicum*

In seinen kinetischen Eigenschaften stellt das Lysinaufnahmesystem ein typisches Aminosäureaufnahmesystem dar. Die Affinität ist hoch, die Aufnahmerate gering, für Lysintransportsysteme jedoch nicht ungewöhnlich (siehe z.B. Fan et al. 1972).

Der Mechanismus offenbarte Unterschiede zu den meisten anderen bakteriellen Transportsystemen. Aufgrund der Untersuchungen von Antiportern in Mitochondrien existieren Kriterien für den obligaten Antiport. (i) Die Aufnahme ist energieunabhängig. (ii) Während der Aufnahme von radioaktiv markiertem Substrat ist keine Nettoaufnahme feststellbar. (iii) Das Transportsystem ist voll reversibel. (iv) Mit radioaktivem Substrat vorbeladene Zellen

verlieren keine Markierung, erst bei Zugabe eines externen Substrats kommt es sofort zum Efflux von Radioaktivität. Alle vier Kriterien werden vom Lysinaufnahmesystem erfüllt, das damit als obligates Antiportsystem charakterisiert werden konnte. Ein H^+ /Lysin-Symport, wie er von Luntz et al. (1986) für *C. glutamicum* vorgeschlagen wurde ist damit ausgeschlossen. Unter den hier verwendeten Meßbedingungen erfolgt ein Austausch von externem und internem Lysin. Ein heterologer Antiport ist jedoch mit dem künstlichen Lysinanalogon S-Aminoethylcystein (AEC) möglich.

Der homologe Antiport kann keine Nettoaufnahme vermitteln. Eine Nettoaufnahme von Lysin durch das Aufnahmesystem ist denkbar als heterologer Antiport oder als Uniport. Heterologer Antiport wird meist bei sogenannten Substrat/Produkt-Antiportern gefunden (Poolman, 1990). Uniport-Funktionen wurden beim P_i -Antiport in Mitochondrien (Wohlrab, 1980) und beim Arginin/Ornithin-Antiporter aus *Pseudomonas aeruginosa* (Driessen, pers. Mitteilung) gefunden. Letzteres Ergebnis ist besonders bemerkenswert, da dieser Antiporter 43 % Homologie auf DNA-Ebene zum Lysinantiporter aus *C. glutamicum* besitzt (A. Seep-Feldhaus, pers. Mitteilung). Eine Uniportfunktion des Lysinaufnahmesystems konnte in ganzen Zellen nicht festgestellt werden. Wurde das äußere Lysin durch Waschen entfernt, so war praktisch kein Efflux meßbar (Fig. 8). Der heterologe Antiport stellt also den wahrscheinlicheren Mechanismus der Nettoaufnahme dar. Aufgrund der großen Homologie zum Arginin/Ornithin-Antiporter wurde getestet ob Arginin oder Ornithin mögliche Substrate des Lysinaufnahmesystems darstellen. Beide Aminosäuren werden jedoch nur in geringem Maße akzeptiert. Entsprechend sind beide Substanzen auch schlechte kompetitive Inhibitoren der Lysinaufnahme. Eine heterologe Antiportfunktion ist jedoch vorhanden. Sie ist spezifisch für Alanin, Valin und Isoleucin und ist nur in deenergetisierten Zellen zu messen, da positiv geladenes Lysin im Gegentauch exportiert wird. Alanin

kann mit Lysin um die Bindestelle konkurrieren; es ist ein kompetitiver Inhibitor der Lysinaufnahme. Um festzustellen, ob dieser Mechanismus die Nettoaufnahme unter physiologischen Bedingungen ermöglicht, wurde die Lysinaufnahme im lysinauxotrophen Stamm 39/28 untersucht. Die Lysinaufnahme durch diese Zellen ist, wie der heterologe Antiport, energieabhängig. Ein Export von Alanin, Isoleucin oder Valin während der Lysinaufnahme des auxotrophen Stammes konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der vorhandenen Aufnahme- und Exportsysteme für diese Aminosäuren (Ebbighausen et al. 1989,1,2 und unveröffentlichte Beobachtungen) war allerdings auch nicht zu erwarten, daß diese zusätzliche langsamere Transportfunktion meßtechnisch aufgelöst werden können.

Bei den bisher bekannten Antiportern (z.B. Driessen et al. 1987; Anantharam et al. 1989) bestimmen die Konzentrationsverhältnisse der Transportsubstrate die Anteile von homologem und heterologem Antiport unter physiologischen Bedingungen. Dies konnte in *C. glutamicum* aus den eben genannten Gründen nicht gezeigt werden. Es scheint in *C. glutamicum* jedoch einen Umschaltmechanismus zwischen beiden Transportarten zu geben (Fig. 12). In den ersten zehn Minuten einer Kurzfermentation erfolgt homologer Austausch, danach setzt unter Wachstumsbedingungen die Nettoaufnahme ein.

Die Ergebnisse der hier erfolgten kinetischen und mechanistischen Charakterisierung des Lysinaufnahmesystems wurden durch molekulargenetische Untersuchungen bestätigt (Seep-Feldhaus, 1991). Der Lysinantiporter aus *Corynebacterium glutamicum* hat nach diesen Ergebnissen 12 Transmembranhelices. Er gehört damit zu der Gruppe sekundärer Transportsysteme (Maloney, 1990). Die Homologien auf DNA- oder Aminosäure-Ebene zwischen den Mitgliedern dieser Gruppe sind meist gering und erstrecken sich nur über kurze Stücke. Zwischen der Melibiose-Permease und der Lactose-Permease

gibt es zum Beispiel keine Homologie (Yazyu et al. 1984). Größere Homologien findet man zwischen den verschiedenen Tetracyclin-resistenzproteinen (Rouch et al. 1990) und den Zuckertransportproteinen in verschiedenen Organismen (Henderson, 1990). Eine Übereinstimmung der Sequenz des Lysinaufnahmesystems von 43% mit dem Arginin/Ornithin-Antiporter aus dem Gram-negativen *Pseudomonas aeruginosa* muß daher als sehr hoch eingestuft werden. Dem entspricht der ähnliche Mechanismus. Beide Proteine vermitteln den Antiport von positiv geladenen Aminosäuren ähnlicher Struktur.

4.3. Das Lysinexportsystem in *Corynebacterium glutamicum*

Für die Untersuchung des Aminosäureexports in *C. glutamicum* wurde bisher die Kurzfermentation verwendet (Hoischen und Krämer, 1989; Ebbighausen et al. 1989,2). Dieses Meßsystem ist relativ unhandlich. Der in dieser Arbeit entwickelte Effluxtest erlaubt es, eine große Anzahl von Parametern kontrolliert zu variieren. Er wurde ermöglicht durch die Tatsache, daß während der Fermentation im Produktionsstamm DG 52-5 sehr hohe Lysinkonzentrationen im Cytosol erreicht werden. Die Einführung einer reversiblen Inhibition des Exports durch Temperaturerniedrigung ermöglichte die zuverlässige Bestimmung der Innenkonzentration bei hohen Außenkonzentrationen. In etwas anderer Form wurde dieser Test auch für andere Exportsysteme vorgeschlagen (Gerlach et al., 1986). Die Schritte sind dann: (i) Beladung der exportkompetenten Zellen mit der radioaktiven Form des zu exportierenden Substrats. (ii) Abtrennung des radioaktiven Substrats durch Waschen und Aufkonzentrieren der Zellen. (iii) Verdünnen der Zellen in den Testansatz.

Für den Export von Aminosäuren in *C. glutamicum* werden verschiedene Modelle postuliert. Es konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß der Lysinexport kein diffusionsgetriebener Prozeß ist, wie dies für den Glutamatexport diskutiert wurde (Demain und

Birnbaum, 1968). Driessen et al. (1987) haben jedoch für die Diffusion von Lysin in Membranvesikeln von *Streptococcus cremoris* eine Geschwindigkeitskonstante von $k = 0,3 \text{ min}^{-1}$ ermittelt. Dieser Wert ist doppelt so hoch als der hier für den aktiven Export gemessene. Die Diffusion durch die Membran von *C. glutamicum* (ganze Zellen) ist weitaus geringer. In deenergetisierten Zellen wurde nur eine Geschwindigkeitskonstante von $k = 0.001$ bestimmt (Fig. 33). Luntz et al. (1986) haben ein Poren-Modell für die Lysinsekretion vorgeschlagen. Dieses Modell konnte durch den Nachweis der Akkumulation auf der Außenseite ausgeschlossen werden. Ebenso sind die gemessenen Trans-Effekte nicht zu erwarten, da im Falle einer Pore die Geschwindigkeitskonstante auch bei abnehmendem Konzentrationsgradient gleich bleiben sollte (Stein, 1986).

Das Inversionsmodell (Clement et al. 1984) konnte ebenfalls widerlegt werden. Aufnahme und Export werden von zwei in ihren kinetischen Eigenschaften verschiedenen Systemen vermittelt.

Wie im Falle des Glutamats (Hoischen und Krämer, 1989 und 1990) und des Isoleucins (Ebbighausen et al. 1989) besitzt *C. glutamicum* demnach ein spezifisches Exportsystem auch für Lysin.

Die Lysinexportpermease konnte im weiteren als ein sekundäres Transportsystem (in Abgrenzung zum primären Transport) charakterisiert werden. Das kationische Lysin muß gegen das (außen positive) Membranpotential aus der Zelle heraus transportiert werden, das Membranpotential ist jedoch gleichzeitig die treibende Kraft. Dieser scheinbare Widerspruch taucht genauso bei allen Aufnahmesystemen für negativ geladene Substanzen auf (Harold, 1986). So ist Glutamat einfach negativ geladen und muß gegen das innen negative Membranpotential in die Zelle transportiert werden. Im Falle des Glutamats wird dieses Problem meist durch einen Symport mit zwei Kationen, im einfachsten Fall zwei Protonen, gelöst (Ruhrmann und Krämer, 1991). Beim Lysinexport wird es durch einen $2 \text{ OH}^-/\text{Lysin-Symport}$ (bzw. $2 \text{ H}^+/\text{Lysin-Antiport}$) gelöst, da die

Beteiligung anderer Ionen ausgeschlossen werden konnte.

Thermodynamisch betrachtet sind die drei treibenden Kräfte des Lysinexports, das Membranpotential, der pH-Gradient und der Lysingradient gleichwertig. In Abschnitt 3.3.3. wurde gezeigt, daß ihr Einfluß auf die Transportrate jedoch sehr unterschiedlich sein kann. Daher wurde der pH-Gradient als treibende Kraft zunächst nicht erkannt. Nur bei aufgehobenem Lysingradient ist der pH-Gradient als treibende Kraft deutlich sichtbar. Bei der Betrachtung der Transportraten gilt, daß die Veränderung einer treibenden Kraft nur dann sichtbar ist, wenn der Schritt im Transportzyklus auf den sie wirkt, die Transportrate limitiert (Heinz, 1978). Ein Beispiel dafür ist die Wirkung des Membranpotentials auf den Na^+ /Glutamat-Cotransport in Nierenbürstensaummembranen (Heinz et al. 1988). Wie in der Einleitung dargestellt, hat auch die Affinität der Bindungsstelle einen großen Einfluß auf die Wirkung der Gradienten. Ein Beispiel hierfür ist die pH-Abhängigkeit der Laktosepermease, aus deren Verlauf nicht auf eine Beteiligung von Protonen am Transportmechanismus geschlossen werden kann (siehe Einleitung und Page, 1987). Beide Effekte spielen beim Lysinexport eine Rolle, sie konnten anhand des vorgestellten Modells (Fig. 34) erklärt werden.

Das Modell von Fig. 34 kann fast alle Beobachtungen in Zusammenhang mit dem Lysinexport erklären. Dennoch war es als Gegenbeweis wichtig zu zeigen, daß andere mögliche Modelle dies nicht können. Ein ebenso plausibles, thermodynamisch völlig gleichwertiges, Modell müßte den Transport von Protonen im potentialabhängigen Schritt fordern. In dem entsprechenden kinetischen Modell ist der Export bei pH 9 auch in Abwesenheit von externem Lysin stark gehemmt, da sich die treibende Kraft des pH-Gradienten und des Membranpotentials nahezu aufheben. Der aktive Export bei pH 9 ist damit ein weiteres Indiz für den Transport von Lysin und OH^- in einem Schritt.

Das kinetische Modell bestätigte, daß aus den Kurven der Potentialabhängigkeit die Permeabilitätskoeffizienten ermittelt werden können. P_C ist 50mal größer als P_O . Dies entspricht der allgemeinen Anschauung, daß ein beladener Carrier einen höheren Permeabilitätskoeffizienten hat als ein unbeladener (Höfer, 1977).

Das kinetische Modell gibt dem qualitativen Arbeitsmodell (Fig. 34) eine solide Basis. Neben der üblichen Annahme für kinetische Modelle, daß die Bindungsschritte die Rate nicht limitieren (Geck und Heinz, 1976), wird nur die Gültigkeit der Michaelis-Menten-Gleichung und der Nernstschen Gleichung vorausgesetzt. Die auffällige Übereinstimmung des Modells mit den Messungen kann aus den gestrichelten Linien in den Figuren 24, 26, 29 abgelesen werden. Sie zeigen die berechneten Daten neben den gemessenen an. Die einzige Abweichung zeigt sich bei der Abhängigkeit vom Membranpotential. Das schnelle Abknicken in die Sättigung wird vom Modell nicht nachvollzogen. Sättigung wird erst bei höheren k -Werten erreicht ($k = 0,27/\text{min}$).

Eine weitere Abweichung der experimentellen Daten von der Theorie ist das Fehlen der Austauschdiffusion unter deenergetisierten Bedingungen (Höfer, 1977). Diese Beobachtung wurde auch schon bei anderen sekundären Transportsystemen gemacht (Yamaguchi et al., 1991). Die Gültigkeit des Modells wird durch die Vorhersage der pH-Abhängigkeit (Fig. 23) weiter verstärkt. Die Steigung der beiden Äste der pH-Abhängigkeit, links und rechts des Optimums, wird durch das Modell gut wiedergegeben. Nur der Wert des Optimums wird um eine halbe pH-Einheit verfehlt. Grundlage ist auch hier wieder die Limitierung der Rate durch verschiedene Schritte. Mit zunehmender Protonenkonzentration sinkt das Membranpotential und damit die Exportrate (unterhalb pH 7,8). Mit abnehmender Protonenkonzentration (steigende OH^- Konzentration) wird die Rate durch die Trans-Inhibition durch OH^- limitiert (oberhalb pH 7,8). Die pH-Abhängigkeit kann also ohne Zuhilfenahme

konformativer Effekte erklärt werden.

Für viele protonengekoppelte Transportproteine wird eine Änderung der Stöchiometrie mit dem pH-Wert diskutiert. Nachgewiesen ist dies für den Hexosephosphat-Antiporter aus *Streptococcus lactis* (Ambudkar et al., 1986). Für die Lactose-Permease ist die Stöchiometriefrage nicht entschieden. Eine Zusammenfassung der umfangreichen Literatur zu diesem Thema ist bei Booth und Konings (1981) zu finden. Nach den vorliegenden Ergebnissen ist eine Änderung der OH^- (Protonen)-Stöchiometrie der Lysinexportpermease mit dem pH unwahrscheinlich. (i) Die pH-Effekte können durch das Modell unter Annahme des $2\text{OH}^-/\text{Lysin}^+$ erklärt werden. (ii) Die Steigung der Potentialabhängigkeit ist zwischen pH 6,5 und 9,2 konstant, so daß angenommen werden muß, daß unter allen Bedingungen die gleiche Nettoladung transportiert wird.

Die Stärke der Potentialabhängigkeit beträgt 60 mV für eine zehnfache Änderung der Transportgeschwindigkeit. Dies ist in Übereinstimmung mit der erwarteten Veränderung der Akkumulationen

$$\log ([\text{Lys}_0]/[\text{Lys}_i]) = -F \cdot \Delta\psi / 2,3 RT + 2 \cdot \Delta\text{pH},$$

jedoch kein Beweis für den Transport einer Nettoladung (Turner, 1981). Vielmehr wird häufig, unter Annahme einer Energiebarriere in der Mitte der Membran (siehe Einleitung), eine flachere Abhängigkeit von 120 mV für eine zehnfache Änderung der Rate gefordert (Kimmich et al, 1984). Dieses Modell wurde für lipophile Kationen und Ionophore bestätigt (Morf, 1981). Für den Carriertransport wurden jedoch nur in wenigen Fällen Strom/Spannungskurven erstellt. Für den Na^+ /Zucker-Symport im Darmepithel wurde eine Abhängigkeit entsprechend dem Barrierenmodell gefunden (Kimmich et al., 1984), nicht jedoch für die Laktosepermease, wenn eine Stöchiometrie von 1:1 vorausgesetzt wird (Ghazi und Shechter, 1981). Es ist also fraglich, ob das Barrierenmodell in dieser Form auf den Carriertransport angewendet werden kann.

Mechanistisch betrachtet, ist die Lysinexportpermease ein typisch sekundäres Transportsystem. Der Export ist an die protonenmotorische Kraft gekoppelt. Dennoch weist das Lysinexportsystem Eigenschaften auf, die es als spezielles Exportsystem kennzeichnen.

(i) Der interne K_M ist den internen Konzentrationen angepaßt. Er liegt im mM Bereich und nicht im μ M Bereich, wie sonst für Aminosäuretransportsysteme üblich.

(ii) Für die Ladungskompensation wird im Transportzyklus cytosolisches OH^- verwendet. Dies ist zwar nur ein formales Kriterium, da auch kinetische Modelle mit H^+ denkbar sind (Aronson, 1985), unterscheidet sich jedoch von der sonst üblichen Kompensation durch externes H^+ .

(iii) Der unbeladene Carrier (oder das "gate") trägt eine positive Ladung und wird daher durch das Membranpotential nach innen ausgerichtet. Aufnahmesysteme sind normalerweise negativ geladen in der unbeladenen Form (Rottenberg, 1976; Kaczorowski und Kaback, 1979; Kessler und Semenza, 1983).

4.4 Biotechnologische Aspekte des Lysinexports

In Schüttelkolbenkulturen mit dem Stamm KK 25 konnte gezeigt werden, daß bei niedrigem externen pH die Lysinproduktion aufgrund der Hemmung des Exports nicht mehr möglich ist. Schrumpf (1990) stellte bei ihren Untersuchungen zur Biosynthese des Lysins im Stamm DG 52-5 fest, daß während der Hauptproduktionsphase (bei niedrigem externen pH) die Limitierung der Lysinproduktion wahrscheinlich nicht innerhalb des Biosyntheseweges zu suchen ist. Da zudem die Exportrate im Effluxtest bei niedrigem pH die gleiche Höhe wie die von Schrumpf bestimmten Produktionsraten hat, kann davon ausgegangen werden, daß der Export auch im DG 52-5 unter diesen Umständen die Lysinproduktion limitiert. In den in

kontinuierlicher Kultur durchgeführten Experimenten konnte darüberhinaus nachgewiesen werden, das auch ein hoher externer pH in Kombination mit einer erhöhten Lysinkonzentration die Lysinproduktion hemmen kann. Die Ergebnisse bei pH 9 wichen jedoch von der Vorhersage ab. Bei diesem pH war die Zellmasse im Fermenter auf die Hälfte zurückgegangen. Da die Nährstoffzufuhr unverändert war, muß davon ausgegangen werden, daß die Absterberate bei pH 9 sehr hoch war. Absterbende Zellen haben keine intakte Membran mehr, es ist also möglich, daß durch diese Zellen Lysin produziert wurde, ohne daß der Export eine Rolle spielt.

Für den Efflux von Fermentationsendprodukten (insbesondere Laktat) wird gefordert (Ten Brink et al. 1985), daß der Export unter bestimmten Bedingungen einen Energiegewinn erbringt, da die Sekretion als Protonensymport abläuft. Der Lysinexport ist ein energieverbrauchender Prozeß. Der Stamm MH20/22B kann in Fermentationen bis zu 270 mM Lysin im Überstand akkumulieren (L. Eggeling, pers. Mitteilung). Ob dies einen nennenswerten Energiebetrag kostet, wurde bisher nicht untersucht. Da sich in der kontinuierlichen Kultur beide Fermenter nur im Lysingehalt unterscheiden, müßten Unterschiede in den Erträgen und der Atmungsrate ihren Grund in diesem Unterschied haben. Die Ergebnisse deuten auf keinen signifikanten Energieverbrauch für den Export hin.

Die Sekretion von Aminosäuren kann stark erniedrigt sein, wenn ein aktives Aufnahmesystem die exportierte Aminosäure gleich wieder aufnimmt (futile cycle). So ist die Prolinsekretion in *Escherichia coli* deutlich höher, wenn Mutanten ohne Aufnahmesystem verwendet werden (Rancourt et al. 1984). Auch im Falle der Isoleucinsekretion durch *C. glutamicum* wird die Exportrate durch die Wiederaufnahme vermindert (Ebbighausen et al. 1989). Eine Verminderung der Produktion von Lysin durch das Aufnahmesystem ist ausgeschlossen. Seine Aktivität ist 50mal geringer als Aktivität des Exportsystems. Unter den meisten Bedingungen vermittelt es homo-

logen Austausch, so daß überhaupt kein Einfluß zu erwarten ist.

Aus den vorgestellten Daten zum Stammvergleich ist deutlich zu ersehen, daß bei der biochemischen Charakterisierung der Produzentenstämme (Mutanten) DG 52-5 und MH20/22B neben der in der Literatur bisher erwähnten Veränderung der Aspartatkinase (Menkel et al., 1988) auch noch die Veränderung des Exportsystems festzuhalten ist. Aufgrund des Einflusses des Lysinexports auf die Lysinproduktion ist es nicht verwunderlich, daß durch die Selektion auf bessere Produzentenstämme gleichzeitig eine Selektion auf ein für die Produktion optimiertes Effluxsystem erfolgte.

Der Wildstamm zeigt unter allen Meßbedingungen eine deutlich langsamere Sekretion als die Produktionsstämme. Unterhalb einer cytosolischen Lysinkonzentration von 15 mM ist kein Export mehr meßbar. Zwei Erklärungen bieten sich an. (i) Lysinaufnahme und Export halten sich unter diesen Bedingungen die Waage. Aufgrund der geringen Exportraten beim Wildtyp ist dies möglich. Diese Annahme wird gestützt durch Exportmessungen mit dem Stamm 5.5 pCS 23, der nicht mehr in der Lage ist, Lysin aufzunehmen. In diesem Stamm wird Lysin im Effluxtest solange ausgeschieden, bis eine cytosolische Konzentration von 3 mM erreicht ist. Unklar ist jedoch, warum das Lysinaufnahmesystem unter diesen Umständen Nettotransport zeigt. (ii) Der Lysinexport wird reguliert. Für den Glutamatexport durch *C. glutamicum* wird eine Regulation angenommen (Hoischen und Krämer, 1990). Da im Stamm DG 52-5 keine offensichtlichen Regulationsphänomene sichtbar waren, fehlen entsprechende Daten.

Die Abhängigkeit vom pH, der externen Lysinkonzentration und dem Membranpotential beim Lysinexport im Wildtyp sind ähnlich denen des DG 52-5. Die niedrige Aktivität könnte also durch eine niedrigere Kopienzahl begründet sein.

Die Exportsysteme der beiden Produktionsstämme unterscheiden sich nicht nur vom Wildstamm, sondern auch voneinander. Trotz der

Übereinstimmung im Mechanismus zeigt der Stamm MH20/22B unter bestimmten Bedingungen deutliche Unterschiede zum DG 52-5 in der Exportaktivität. (i) Die Exportaktivität ist unterhalb von pH 7 etwa doppelt so hoch. (ii) Die Abhängigkeit vom Membranpotential ist verändert. (iii) Der Transeffekt von Lysin + OH^- ist schwächer.

Punkt (i) stimmt mit den Ergebnissen von Schrumpf (1990) überein, nach denen die für den DG 52-5 festgestellte Limitierung bei saurem pH im Stamm MH20/22B nicht meßbar ist. Der Stamm MH20/22B besitzt genau wie der Stamm DG 52-5 eine deregulierte Aspartatkinase und ist auch sonst in der Lysinbiosynthese unverändert (Eggeling, pers. Mitteilung). Der Unterschied im Exportsystem ist bisher der einzige Unterschied, der zu erklären vermag, daß dieser Stamm ein besserer Lysinproduzent ist, da die Leucinauxotrophie noch nicht ursächlich mit der Lysinproduktion in Verbindung gebracht werden konnte. Punkt (ii) hat einen erhöhten Permeabilitätskoeffizient P_o zur Folge. Dies deutet auf eine Änderung in der molekularen Konstruktion des Carriers hin. Punkt (iii) kann am besten durch eine Veränderung des pK der OH^- -Bindungsstelle erklärt werden. Die Kurven der Transeffekte sind um 0,2 pH-Einheiten parallel verschoben. Setzt man diese Veränderung in das kinetische Modell ein, so erhält man eine recht gute Übereinstimmung. Alle Veränderungen zusammengekommen deuten auf eine Mutation im Carrierprotein hin. Von der Laktosepermease existiert eine große Anzahl von gut charakterisierten Mutanten (Roepe et al. 1990, Brooker et al. 1990, King und Wilson, 1990). Leider wurde keine dieser Mutanten auf ihre Potentialabhängigkeit untersucht, so daß ein Vergleich in dieser Hinsicht nicht möglich ist. Für viele Mutationen wurden jedoch Doppeleffekte gefunden (King und Wilson, 1990). Das heißt, eine einfache Mutation, die z. B. aufgrund einer veränderten Substraterkennung ausgewählt wurde, zeigt zusätzliche Veränderungen z. B. in Bezug auf das

cotransportierte Ion. Dies ist ähnlich bei den verschiedenen Lysinexportsystemen, Veränderungen der Potentialabhängigkeit tauchen in Zusammenhang mit Veränderungen in der OH⁻-Bindung auf.

4.5. Bedeutung des Lysinexportsystems unter in vivo Bedingungen

Der Lysinexport in *C. glutamicum* ist carriervermittelt. Dieser Carrier konnte nicht nur in Lysinproduzenten nachgewiesen werden, sondern auch im Wildtyp. Die Lysinexportpermease ist ein spezieller Exportcarrier. Es stellt sich daher Frage nach der Bedeutung unter natürlichen Bedingungen. Die Aminosäurepools in *C. glutamicum* sind je nach Wachstumsbedingungen großen Schwankungen unterworfen (Schrumpf, 1990 und Fig. 43), so ist zum Beispiel bei Wachstum auf Komplexmedium die interne Lysinkonzentration erhöht. Da *C. glutamicum* ein Bodenbakterium ist, dürften komplexe Nahrungsquellen, wie verrottendes organisches Material, wahrscheinlich auch unter natürlichen Bedingungen die Hauptnahrungsquelle darstellen. Die interne Lysinkonzentration wird daher wahrscheinlich auch unter natürlichen Bedingungen stark schwanken. Eine Verringerung der internen Lysinkonzentration durch Metabolismus ist in *C. glutamicum* nicht möglich. Die Synthese ist im Gegensatz zu *E. coli* wenig reguliert (Nakayama, 1985). Eine hohe Lysininnenkonzentration hemmt die Aspartatkinase und damit auch die Synthese von Diaminopimelat (Bestandteil der Zellwand) und die Synthese der anderen Aminosäuren der Aspartatfamilie. Eine hohe interne Lysinkonzentration hemmt daher das Wachstum. Die Regulation der Lysinkonzentration durch Lysinexport ist daher sinnvoll. In Übereinstimmung mit diesen Daten ist die Tatsache, daß Peptide schon in geringen Konzentrationen wachstumshemmend für *C. glutamicum* sind (European Patent Application, Nr. 379903). Werden Stämme selektioniert, die resistent gegen Peptide sind, so findet man häufig gute Aminosäureproduzenten, also Stämme mit

wahrscheinlich verändertem Exportsystem. Das Lysinexportsystem stellt im Wildstamm demnach eine zusätzliche Möglichkeit für die Regulation der internen Konzentration dar.

5. Zusammenfassung

1. Das Lysinaufnahmesystem von *Corynebacterium glutamicum* ist ein Antiportsystem. In ruhenden Zellen wurde der Mechanismus als homologer Lysin/Lysin-Antiport charakterisiert. Treibende Kräfte sind die Substratgradienten. Die Nettoaufnahme ist über einen heterologen Lysin/(Isoleucin, Alanin, Valin)-Antiport möglich. Er wird von den Substratgradienten und dem Membranpotential getrieben.
2. *Corynebacterium glutamicum* besitzt ein spezifisches Lysinexportsystem, das als 2OH^- /Lysin-Symporter charakterisiert wurde. Die Exportrate ist von der Höhe des Membranpotentials, dem pH-Gradienten und dem Lysingradienten abhängig. Der unbeladene Carrier trägt eine positive Ladung, daher ist die Wirkung des Membranpotentials verschieden von der Wirkung der Substrate (Lysin und OH^-). Diese Eigenschaften konnten durch ein kinetisches Modell quantitativ beschrieben werden. Die Lysinexportpermease ist ein sekundäres Transportsystem, sie weist jedoch Besonderheiten im Mechanismus auf, die sie von sekundären Aufnahmesystemen unterscheidet.
3. Die "in vitro" bestimmten Daten zum Export, konnten auch unter Fermentationsbedingungen bestätigt werden. Bei niedrigem pH, und hohem pH in Anwesenheit hoher externer Lysinkonzentrationen ist der Lysinexport der limitierende Schritt der Lysinproduktion. Die Lysinaufnahme hat in den Produktionsstämmen keinen Einfluß auf den Lysinexport.
4. Verschieden leistungsfähige Produktionsstämme haben unterschiedliche Exportsysteme. Sie unterscheiden sich in der Abhängigkeit vom pH und vom Membranpotential. Die Produktionsstämme haben ein schnelleres Exportsystem als der Wildtyp.
5. Das Exportsystem wird im Wildtyp von *Corynebacterium glutamicum* wahrscheinlich dazu benutzt, die cytosolische Lysinkonzentration zu regulieren. Diese Funktion ist am deutlichsten zu beobachten, wenn lysinhaltige Peptide die Hauptnahrungsquelle darstellen.

6. Literatur

- Ambudkar, S.V.; Sonna, L.A.; Maloney, P.C. (1986) Variable stoichiometry of phosphate-linked anion exchange in *Streptococcus lactis*: implications for the mechanism of sugar phosphate transport by bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 280-284
- Ambudkar, S.V.; Anantharam, V.; Maloney, P.C. (1990) UhpT, the sugar phosphate antiporter of *Escherichia coli*, functions as a monomer. *J. Biol. Chem.* 265: 12287-12292
- Anantharam, V.; Allison, M.; Maloney, P.C. (1989) Oxalate:Formate Exchange. *J. Biol. Chem.* 264: 7244-7250
- Araki, K.; Oka, T.; Nakayama, K. (1973) Na⁺-dependent transport of amino acids and its significance for growth of a lysine-producing bacterium. *Agric. Biol. Chem.* 37: 1357-1366
- Bakker, E.P.; Booth, I.R.; Dinnbier, U.; Epstein, W.; Gajewska, A. (1987) Evidence for multiple K⁺ export systems in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169: 3743-3749
- Bakker, E.P. (1990) The role of alkali-kation transport in energy coupling of neutrophilic and acidophilic bacteria: an assessment of methods and concepts. *FEMS Microbiol. Rev.* 75: 319-334
- Bergmeyer, H.U.; Bernt, E.; Schmidt, F.; Storck, H. (1974) D-glucose. Bestimmung mit Hexokinase und Glukose-6-phosphat-dehydrogenase, pp.1241-1246. In H.U. Bergmeyer (ed.), *Methoden der enzymatischen Analyse*, Band II. Verlag Chemie, Weinheim
- Boenigk, R.; Dürre, P.; Gottschalk, G. (1989) Carrier-mediated acetate transport in *Acetobacterium woodii*. *Arch. Microbiol.* 152: 589-593
- Booth, I.R., Konings, W.N. (1981) Do the stoichiometries of ion-linked transport systems vary? *TIBS* 6: 257-262
- Booth, I.R. (1985) Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol. Rev.* 49: 359-378
- Booth, I.R. (1988) Bacterial transport: energetics and mechanisms. pp. 377-428 In: *Bacterial energy transduction*, Anthony, C. (ed.), Academic Press, London
- Boork, J.; Wennerström, H. (1984) The influence of membrane potentials on reaction rates control in free-energy-transducing systems. *Biochim. Biophys. Acta* 767: 314-320
- Boyaval, P.; Moreira, E.; Desmazeaud, M.J. (1983) Transport of aromatic amino acids by *Brevibacterium linens*. *J. Bacteriol.* 155: 1123-1129
- Braun, V. (1985) The unusual features of the iron transport systems of *Escherichia coli*. *TIBS* 10: 75-78
- Brooker, R.J. (1990) The lactose permease of *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* 141: 309-315
- Brooker, R.J. (1991) An analysis of lactose permease "sugar specificity" mutations which also effect the coupling between proton and lactose transport. *J. Biol. Chem.* 266: 4131-4138
- Chen, C.; Chin, J.E.; Ueda, K.; Clark, D.P.; Pastan, I.; Gottesmann, M.M.; Roninson, I.B. (1986) Internal duplication and homology with the bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 47: 381-389
- Clement, Y.; Escoffier, B.; Trombe, M.C.; Laneelle, G. (1984) Is glutamate excreted by its uptake system in *Corynebacterium glutamicum* ? A working hypothesis. *J. Gen. Microbiol.* 130: 2589-2594
- Cremer, J.; Treptow, C.; Eggeling, L.; Sahm, H. (1988) Regulation of enzymes of lysine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Gen. Microbiol.* 134: 3221-3229
- Demain, A.L.; Birnbaum, J. (1968) Alteration of permeability for the release of metabolites from the microbial cell. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 46: 1-25

- de Vrij, W.; Bulthuis, R.A.; van Iwaarden, P.R.; Konings, W.N. (1989) Mechanism of L-glutamate transport in membrane vesicles from *Bacillus stearothermophilus*. J. Bacteriol. 171: 1118-1125
- DiMarco, A.A.; Romano, A.H. (1985) D-Glucose transport system of *Zymomonas mobilis*. Appl. Environm. Microbiol. 49: 151-157
- Dorando, F.C.; Crane, R.K. (1984) Studies on the kinetics of Na^+ gradient coupled glucose transport as found in renal brush-border membrane vesicles from rabbit jejunum. Biochim. Biophys. Acta 772: 273-287
- Driessen, A.J.M.; Hellingwerf, K.J.; Konings, W.N. (1987) Mechanism of energy coupling to entry and exit of neutral and branched chain amino acids in membrane vesicles of *Streptococcus cremoris*. J. Biol. Chem. 262: 12438-12443
- Driessen, A.J.M.; Poolman, B.; Kiwiet, R.; Konings, W.N. (1987) Arginine transport in *Streptococcus lactis* is catalyzed by a cationic exchanger. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 6093-6097
- Driessen, A.J.M.; Kodde, J.; de Jong, S.; Konings, W.N. (1987) Neutral amino acid uptake by membrane vesicles of *Streptococcus cremoris* is subjected to regulation by internal pH. J. Bacteriol. 169: 2748-2754
- Driessen, A.J.M.; Smid, E.J.; Konings, W.N. (1988) Transport of diamines by *Enterococcus faecalis* is mediated by an agmatine-putrescine antiporter. J. Bacteriol. 170: 4522-4527
- Driessen, A.J.M.; Leeuwen, C.; Konings, W.N. (1989) Transport of basic amino acids by membrane vesicles of *Lactococcus lactis*. J. Bacteriol. 171: 1453-1458
- Ebbighausen, H.; Weil, B.; Krämer, R. (1989) Transport of branched-chain amino acids in *Corynebacterium glutamicum*. Arch. Microbiol. 151: 238-244
- Ebbighausen, H.; Weil, B.; Krämer, R. (1989) Isoleucine excretion in *Corynebacterium glutamicum*: evidence for a specific efflux carrier system. Appl. Microbiol. Biotechnol. 31: 184-190
- Ebbighausen, H.; Weil, B.; Krämer, R. (1991) Carrier-mediated acetate uptake in *Corynebacterium glutamicum*. Arch. Microbiol. 155: 505-510
- Ebbighausen, H.; Weil, B.; Krämer, R. (1991) Na^+ -dependent succinate uptake in *Corynebacterium glutamicum*. FEMS Microbiol. Lett. 77: 61-66
- Eldib, I.A.; Valenti, G.; Oxenhorn, S.; Chu, W.; Jiminez, M. (1985) Lysine and tryptophane production: balancing market, technology, plant design. Bio/Technology 3: 425-426
- European Patent Application Nr. 90100549.6; Publication Nr. 379903; 01.08.90 Bulletin 90/31. Titel: Process for producing L-amino acids by fermentation
- Evans, C.G.T.; Herbert, D.; Tempest, D.W. (1970) The continuous cultivation of microorganisms 2. Construction of a chemostat. In Norris, J.R.; Ribbons, D.W. (eds.) Meth. Microbiol. Vol. 2, pp. 277-327, Academic Press, New York.
- Fan, C.L.; Miller, D.L.; Rodwell, V.W. (1972) Metabolism of basic amino acids in *Pseudomonas putida*. J. Biol. Chem. 247: 2283-2288
- Ferchichi, M.; Hemme, D.; Nardi, M. (1987) Na^+ -stimulated transport of L-methionine in *Brevibacterium linens* CNRZ 918. Appl. Environm. Microbiol. 53: 2159-2164
- Fiechter, A. (1989) Batch and continuous culture of microbial, plant and animal cells pp.453-505 In: Biotechnology, Rehm, H.J.; Reed, G. (eds.) Volume 1, Verlag Chemie, Weinheim

- Franco, P.J.; Brooker, R.J. (1991) Evidence that the asparagine 322 mutant of the lactose permease transports protons and lactose with a normal stoichiometry and accumulates lactose against a concentration gradient. *J. Biol. Chem.* 266: 6693-6699.
- Garlid, K.D.; Beavis, A.D.; Ratkje, S.K. (1989) On the nature of ion leaks in energy-transducing membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 976: 109-120
- Geck, P.; Heinz, E. (1976) Coupling in secondary transport. *Biochim. Biophys. Acta* 443: 49-53
- Gerlach, J.H.; Kartner, N.; Bell, D.R.; Ling, V. (1986) Multidrug resistance. *Cancer Surveys* 5: 25-46
- Ghazi, A.; Shechter, E. (1981) Lactose transport in *Escherichia coli* cells. Dependence of kinetic parameters on the transmembrane electrical potential difference. *Biochim. Biophys. Acta* 645: 305-315
- Glaser, R. (1986) *Biophysik*, 3. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Gros, P.; Croop, J.; Housman, D. (1986) Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. *Cell* 47: 371-380
- Hall, J.E.; Mead, C.A.; Szabo, G. (1973) A barrier model for current flow in lipid bilayer membranes. *J. Membr. Biol.* 11: 75-97
- Harold, F.M. (1986) *The vital force: A study of bioenergetics*. Freeman and company, New York
- Harold, F.M.; Levin, E. (1974) Lactic acid translocation: terminal step in glycolysis by *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 117: 1141-1148
- Heinz, E. (1978) Mechanics and energetics of biological transport. *Molecular Biology Biochemistry and Biophysics*, vol. 29. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Heinz, E.; Sommerfeld, D.L.; Kinne, R.K.H. (1988) Electrogenicity of sodium/L-glutamate cotransport in rabbit renal brush-border membranes: a reevaluation. *Biochim. Biophys. Acta* 937: 300-308
- Heller, K.B.; Lin, E.C.C.; Wilson, H.T. (1980) Substrate specificity and transport properties of the glycerol facilitator of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 144: 274-278
- Henderson, P.J.F. (1990) The homologous glucose transport proteins of prokaryotes and eukaryotes. *Res. Microbiol.* 141: 316-327
- Hillen, W.; Schollmeir, K. (1983) Nucleotide Sequence of the Tn10 encoded tetracycline resistance gene. *Nucl. Acid. Res.* 11: 525-529
- Höfer, M. (1977) *Transport durch biologische Membranen*. Verlag Chemie, Weinheim
- Hoischen, C.; Krämer, R. (1989) Evidence for an efflux carrier system involved in the secretion of glutamate by *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* 151: 342-347
- Hoischen, C.; Krämer, R. (1990) Membrane alteration is necessary but not sufficient for effective glutamate secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 172: 3409-3416
- Hoppe, B.; Martens, J. (1983) Aminosäuren - Bausteine des Lebens. *Chemie in unserer Zeit* 17: 41-53
- Houssin, C.; Eynard, N.; Shechter, E.; Ghazi, A. (1991) Effect of osmotic pressure on membrane energy-linked functions in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1056: 76-84
- Hutkins, R.W.; Ponne, C. (1991) Lactose uptake driven by galactose efflux in *Streptococcus thermophilus*: evidence for a galactose-lactose antiporter. *Appl. Environm. Microbiol.* 57: 941-944

- Hyde, S.; Emsley, P.; Hartshorn, M.J.; Mimmack, M.M.; Gileadi, U.; Pearce, S.R.; Gallagher, M.P.; Gill, D.R.; Hubbard, R.E.; Higgins, C.F. (1990) Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance, and bacterial transport. *Nature* 346: 362-365
- Jones, B.N.; Gilligan, J.P. (1983) *o*-Phthaldialdehyde precolumn derivatization and reversed phase high performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids. *J. Chromatogr.* 266: 471-482
- Kaback, H.R. (1990) Lac permease of *Escherichia coli*: on the path of the proton. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 326: 425-436
- Kaneko, M.; Yamaguchi, A.; Sawai, T. (1985) Energetics of tetracycline efflux system encoded by Tn10 in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 193: 194-198
- Kase, H.; Nakayama, K. (1972) Production 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
- Kaunitz, J.D.; Wright, E.M. (1984) Kinetics of sodium D-Glucose cotransport in bovine intestinal brush border vesicles. *J. Membr. Biol.* 79: 41-51.
- Kell, D.B. (1988) Proton motive energy transducing systems: some physical and experimental approaches, pp. 429-490. In: *Bacterial Energy Transduction*, Anthony, C. (ed.), Academic press, New York
- Kessler, M.; Semenza, G. (1983) The small-intestinal Na^+ , D-Glucose cotransporter: an asymmetric gated channel (or pore) responsive to $\delta\psi$. *J. Membr. Biol.* 76: 27-56
- Kimmich, G.A.; Randles, J.; Restrepo, D.; Montrose, M. (1985) The potential dependence of the intestinal Na^+ -dependent sugar transporter. pp. 63-76 In: Semenza, G.; Kinne, R. (eds.) *Ann. NY Acad. Sci. New York* vol. 456
- King, S.C.; Wilson, T.H. (1990, 1) Sensitivity of efflux-driven carrier turnover to external pH in mutants of the *Escherichia coli* lactose carrier that have tyrosine or phenylalanine substituted for histidine-322. *J. Biol. Chem.* 265: 3153-3160
- King, S.C.; Wilson, T.H. (1990, 2) Towards an understanding of the structural basis of "forbidden" transport pathways in the *Escherichia coli* lactose carrier: mutations probing the energy barriers to uncoupled transport. *Mol. Microbiol.* 4: 1433-1438
- Klingenberg, M.; Pfaff, E. (1967) Means of terminating reactions, pp. 680-684. In Estabrook, R.W., Pullman, M.R. (eds.) *Meth. Enzymol.* vol X. Academic Press, Inc. New York
- Krämer, R.; Lambert, C.; Hoischen, C.; Ebbighausen, H. (1990) Uptake of glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. I. Kinetic properties and regulation by internal pH and potassium. *Eur. J. Biochem.* 194: 929-935
- Krulwich, T.A.; Guffanti, A.A. (1989) The Na^+ Cycle of extreme alkalophiles: a secondary Na^+/H^+ antiporter and Na^+ /Solute symporters. *J. Bioenerg. Biomembr.* 21: 663-677
- Läuger, P. (1980) Kinetic properties of ion carriers and channels. *J. Membr. Biol.* 57: 163-178
- Lever, J.E. (1984) A two sodium Ion/D-Glucose symport mechanism: Membrane potential effects on Phlorizin Binding. *Biochemistry* 23: 4697-4702
- Loubiere, P.; Goma, G.; Lindley, N.D. (1990) A non-passive mechanism of butyrate excretion operates during acidogenic fermentation of methanol by *Eubacterium limosum*. *Antonie van Leeuwenhoek* 57: 83-89
- Lundin, M.G.; Rickardson, A.; Thore, A. (1976) Continuous monitoring of ATP-converting reactions by purified firefly luciferase. *Anal. Biochem.* 75: 611-620

- Luntz, M.G.; Zhdanova, N.I.; Bourd, G.I. (1986) Transport and excretion of L-Lysine in *Corynebacterium glutamicum*. J. Gen. Microbiol. 132: 2137-2146
- Lüthi, E.; Baur, H.; Gamper, M.; Brunner, F.; Villeval, D.; Mercenier, A.; Haas, D. (1990) The arc operon for anaerobic arginine catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* contains an additional gene, arcD, encoding a membrane protein. Gene 87: 37-43
- Maloney, P.C. (1982) Energy coupling to ATP Synthesis by the proton-translocating ATPase. J. Membr. Biol. 67: 1-12
- Maloney, P.C.; Ambudkar, S.V.; Thomas, J.; Schiller, L. (1984) Phosphate/hexose 6-phosphate antiport in *Streptococcus lactis*. J. Bacteriol. 158: 238-245
- Maloney, P.C.; Ambudkar, S.V.; Anantharam, V.; Sonna, L.A.; Varadhachary, A. (1990) Anion-Exchange Mechanisms in Bacteria. Microbiol. Rev. 54: 1-17.
- Maloney, P.C. (1990) A consensus structure for membrane transport. Res. Microbiol. 141: 374-383
- McGrath, J.P.; Varshavsky, A. (1989) The yeast STE6 gene encodes a homologue of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein. Nature 340: 400-404
- McMorrow, I.; Shuman, H.A.; Sze, D.; Wilson, D.M.; Wilson, H.T. (1989) Sodium/proton antiport is required for growth of *Escherichia coli* at alkaline pH. Biochim. Biophys. Acta 981: 21-26
- McMurry, L.; Petrucci, R.E.; Levy, S.B. (1980) Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different resistance determinants in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 3974-3977
- Menckel, E.; Thierbach, G.; Eggeling, L.; Sahm, H. (1989) Influence of increased aspartate availability on lysine formation by a recombinant strain of *Corynebacterium glutamicum* and utilization of fumarate. Appl. Environm. Microbiol. 55: 684-688
- Michel, T.A.; Macy, J.M. (1990) Generation of a membrane potential by sodium-dependent succinate efflux in *Selenomonas ruminantium*. J. Bacteriol. 172: 1430-1435
- Milner, J.L.; Vink, B.; Wood, J.M. (1987) Transmembrane amino acid flux in bacterial cells. CRC Critical Rev. Biotechnol. 5: 1-47
- Mitchell, P. (1954) Transport of Phosphate across the osmotic barrier of *Micrococcus pyogenes*: specificity and kinetics. J. Gen. Microbiol. 9: 257-272
- Nakayama, K.; Tanaka, H.; Hagino, H.; Kinoshita, S. (1966) Studies on lysine fermentation . Part V. Concerted feedback inhibition of aspartokinase and the absence of lysine inhibition on aspartic semialdehyde-pyruvate condensation in *Micrococcus glutamicus*. Agr. Biol. Chem. 30: 611-616
- Nakayama, K. (1985) Lysine, pp.607-620. In Moo-Young, M. (ed.), Comprehensive biotechnology, vol. 3 Pergamon Press Inc. Oxford
- Ncijsel, O.M.; Tempest, D.W. (1979) The physiology of metabolite overproduction. Microbial technology, Symp. Soc. Gen. Microbiol. 29: 53-82
- Niven, D.F.; Hamilton, W.A. (1974) Mechanism of energy coupling to the transport of amino acids by *Staphylococcus aureus*. Eur. J. Biochem. 44: 517-522
- Nies, D.H.; Nies, A.; Chu, L.; Silver, S. (1989) Expression and nucleotide sequence of plasmid-determined divalent cation efflux system from *Alcaligenes eutrophus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 7351-7355
- Nies, A.; Nies, D.H.; Silver, S. (1990) Nucleotide sequence and expression of a plasmid-encoded chromate resistance from *Alcaligenes eutrophus*. J. Biol. Chem. 265: 5648-5653

- Nucifora, G.; Chu, L.; Misra, T.K.; Silver, S. (1989) Cadmium resistance from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258 *cadA* gene results from cadmium-efflux ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3544-3548
- Oesterhelt, D.; Tittor, J. (1989) Two pumps, one principle: light driven ion transport in Halobacteria. *TIBS* 14: 57-61
- Overath, P.; Wright, J.K. (1983) Lactose permease: a carrier on the move. *TIBS* 8: 404-408
- Page, M.G.P.; West, I.C. (1981) The kinetics of the β -galactoside-proton symport of *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 196: 721-731
- Page, M.G.P. (1987) The role of protons in the mechanism of galactoside transport via the lactose permease of *Escherichia coli*. *Bioch. Biophys. Acta* 897: 112-126
- Passow, H. (1986) *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 103: 61-223
- Pedersen, P.L.; Carafoli, E. (1987) Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function. *TIBS* 12: 146-150
- Poolman, B.; Driessen, A.J.M.; Konings, W.N. (1987) Regulation of arginine-ornithine exchange and the arginine deiminase pathway in *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 169: 5597-5604
- Poolman, B. (1990) Precursor/product antiport in bacteria. *Mol. Microbiol.* 4: 1629-1636
- Postma, P.W.; Lengeler, J.W. (1985) Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system of bacteria. *Microbiol. Rev.* 49: 232-269
- Pourcher, T.; Bassilana, M.; Sarkar, H.K.; Kaback, H.R.; Leblanc, G. (1990) The melibiose/ Na^+ symporter of *Escherichia coli*: kinetic and molecular properties. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 326: 411-423
- Purewal, A.S.; Jones, I.G.; Midgley, M. (1990) Cloning the ethidium efflux gene from *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 68: 73-76
- Ramos, S.; Kaback, H.R. (1977) The Relationship between electrochemical proton gradient and active transport in *Escherichia coli* membrane vesicles. *Biochemistry* 16: 854-859
- Rancourt, D.E.; Stephenson, J.T.; Vickell, G.A.; Wood, J.M. (1984) Proline excretion by *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 26: 74-80
- Roepe, P.D.; Consler, T.G.; Menezes, M.E.; Kaback, H.R. (1990) The lac permease of *Escherichia coli*: site-directed mutagenesis studies on the mechanism of β -galactoside/ H^+ symport. *Res. Microbiol.* 141: 290-308
- Rosen, B.P. (1971) Basic amino acid transport in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 246: 3653-3662
- Rosen, B.P. (ed.) (1978) *Bacterial Transport*. Marcel Dekker, New York
- Rosen, B.P.; Silver, S. (eds.) (1987) *Ion transport in prokaryotes*. Acad. Press Inc. New York
- Rosen, B.P.; Hsu, C.M.; Karkaria, C.E.; Kaur, P.; Owolabi, J.B.; Tisa, L.S. (1990) A plasmid-encoded anion-translocating ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1018: 203-205
- Rosen, B.P.; Weigel, U.; Monticello, R.A.; Edwards, B.P.F. (1991) Molecular analysis of an anion pump: purification of the ArsC Protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 284: 381-385
- Rottenberg, H. (1976) The driving force for proton(s) metabolites cotransport in bacterial cells. *FEBS Lett.* 66: 159-163

- Rottenberg, H. (1979) The measurement of membrane potential and pH in cells, organelles, and vesicles, pp. 547-569. In Fleischer, S. and Packer, L. (eds.), Meth. Enzymol. vol LV. Academic Press, Inc. New York
- Rouch, D.A.; Cram, D.S.; DiBernadino, D.; Littlejohn, T.G.; Skurray, R.A. (1990) Efflux-mediated antiseptic resistance gene *qacA* from *Staphylococcus aureus*: common ancestry with tetracycline- and sugar-transport proteins. Mol. Microbiol. 4: 2051-2062
- Ruhrmann, J.; Krämer, R. (1991) Quantification of energetic parameters in *Zymomonas mobilis* exemplified by secondary uptake of glutamate. J. Bacteriol. eingereichte Veröffentlichung
- Russel, J.B. (1990) Low-affinity, high-capacity system of glucose transport in the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*: evidence for a mechanism of facilitated diffusion. Appl. Environm. Microbiol. 56: 3304-3307
- Sanders, D.; Hansen, U.P.; Gradmann, D.; Slayman, C.L. (1984) Generalized kinetic analysis of ion-driven cotransport systems: a unified interpretation of selective ionic effects on Michaelis parameters. J. Membr. Biol. 77: 123-152
- Sano, K.; Shiio, I. (1970) Microbial production of L-Lysine: III. Production by mutants resistant to S-(2-aminoethyl)-L-cysteine. J. Gen. Appl. Microbiol. 16: 373-391
- Schimz, K.L.; Rütten, B.; Tretter, M. (1981) Determination of adenosine nucleotides with luciferin/luciferase from crude firefly lantern extract on a bioluminescence analyser. Adv. Biotechnol. 1: 457-462
- Schrumpf, B. (1990) Dissertation, Universität Düsseldorf
- Schrumpf, B.; Schwarzer, A.; Kalinowski, J.; Pühler, A.; Eggeling, L.; Sahm, H. (1991) A functional split pathway for lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. J. Bacteriol. 173: 4510-4516
- Schwab, W.G.; Komor, E. (1978) A possible mechanistic role of the membrane potential in proton-sugar cotransport of *Chlorella*. FEBS Lett. 87: 157-160
- Shiio, I.; Otsuka, S.I.; Takahashi, M. (1962) 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.; Miyajima, R.; Kashima, N. (1973) Na⁺-dependent transport of threonine in *Brevibacterium flavum*. J. Biochem. 73:1185-1193
- Silver, S.; Misra, T.K. (1988) Plasmid mediated heavy metal resistances. Ann. Rev. Microbiol. 42: 717-743
- Silver, S.; Nucifora, G.; Chu, L.; Misra, T.K. (1989) Bacterial resistance ATPases: primary pumps for exporting toxic cations and anions. TIBS 14: 76-80
- Stein, W.D. (1986) Diffusion across membranes. Acad. Press, Inc, San Diego
- Stroud, R.M.; McCarthy, M.P.; Shuster, M. (1990) Nicotinic acetylcholine receptor superfamily of ligand-gated ion channels. Biochemistry 29: 11009-11023
- Ten Brink, B.; Otto, R.; Hansen, U.P.; Konings, W.N. (1985) Energy recycling by lactate efflux in growing and nongrowing cells of *Streptococcus cremoris*. J. Bacteriol. 162: 383-390
- Teshiba, S.; Furuya, A. (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.; Furuya, A. (1984) Mechanisms of 5'-Inosinic acid accumulation by permeability mutants of *Brevibacterium ammoniagenes*. IV. Excretion Mechanism of 5'-IMP. Agric. Biol. Chem. 48: 1311-1317
- Tosaka, O.; Takinami, K.; Hirose, Y. (1978) L-Lysine production by S-(2-aminoethyl)-L-cysteine and α -amino- β -hydroxyvaleric acid resistant mutants of *Brevibacterium lactofermentum*. Agr. Biol. Chem. 42: 745-752

- Turner, J. (1981) Kinetic analysis of a family of cotransport models. *Biochim. Biophys. Acta* 649: 269-280
- Turner, J. (1985) Stoichiometry of cotransport systems. pp 10-25 In: Semenza, G.; Kinne, R. (eds.) *Ann. NY Acad. Sci. New York* vol. 456
- Wohlrab, H. (1980) Purification of a reconstitutively active mitochondrial phosphate transport protein. *J. Biol. Chem.* 255: 8170-8173
- Wright, J.K.; Weigel, U.; Lustig, A.; Bocklage, H.; Mieschendahl, M.; Müller-Hill, B.; Overath, P. (1983) Does the lactose carrier of *Escherichia coli* function as a monomer? *FEBS Lett.* 162: 11-15
- Wright, J.K.; Seckler, R.; Overath, P. (1986) Molecular aspects of sugar:ion cotransport. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 225-248
- Wright, J.K. (1989) Product Inhibition during Ion:Solute Cotransport is an alternative to leaks as a cause of low accumulation. *J. Membr. Biol.* 109: 1-8
- Yamaguchi, A.; Udagawa, T.; Sawai, T. (1990) Transport of divalent cations with tetracycline as mediated by the Transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein. *J. Biol. Chem.* 265: 4809-4813
- Yamaguchi, A.; Ono, N.; Akasaka, T.; Nuomi, T.; Sawai, T. (1990) Metal-Tetracycline/H⁺ Antiporter of *Escherichia coli* encoded by a Transposon Tn10. *J. Biol. Chem.* 265: 15525-15530
- Yamaguchi, A.; Adachi, K.; Akasaka, T.; Ono, N.; Sawai, T. (1991) Metal-Tetracycline/H⁺ Antiporter of *Escherichia coli* encoded by a Transposon Tn10. *J. Biol. Chem.* 266: 6045-6051
- Yazyu, H.; Shiota-Niiya, T.; Shimamoto, T.; Kanazawa, H.; Futai, M.; Tsuchiya, T. (1984) Nucleotide Sequence of the melB gene and characteristics of deduced amino-acid sequence of the melibiose carrier in *E. coli*. *J. Biol. Chem.* 259: 4320-4326
- Zaritzky, A.; Kihara, M.; Macnab, R.M. (1981) Measurement of membrane potential in *Bacillus subtilis*: a comparison of lipophilic cations, rubidium ion, and a cyanine dye as probes. *J. Membr. Biol.* 63: 215-231

Jül-2557
November 1991
ISSN 0366-0885