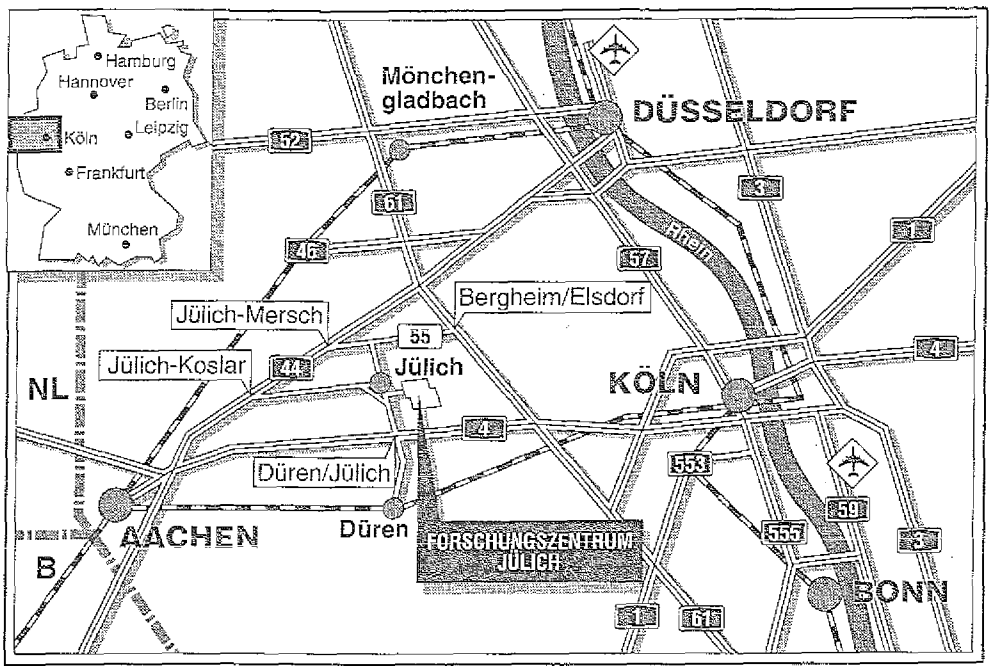
FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH

Institut für Biotechnologie

Untersuchungen zu Energetik und Transportvorgängen bei *Zymomonas mobilis*

Jutta Ruhrmann



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 2708
ISSN 0366-0885
Institut für Biotechnologie Jül-2708
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

Untersuchungen zu Energetik und Transportvorgängen bei *Zymomonas mobilis*

Jutta Ruhrmann

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

alaD	Alanin-Dehydrogenase-Gen
Ala-DH	Alanin-Dehydrogenase
AOA	Aminooxyacetat
BPAB	4-Bromphenacylbromid
CCCP	Carboxylcyanid-m-chlorophenylhydrazon
CTAB	Cethyltrimethylammoniumbromid
DCCD	Dicyclohexylcarbodiimid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpm	radioaktive Zerfälle pro Minute
Ea	Aktivierungsenergie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ex	extern
F	Faraday-Konstante
g	Erdbeschleunigung
Glu	Glutamat
h	Stunde
in	intern
k	Geschwindigkeitskonstante 1. Ordnung
K_m	Michaelis-Konstante
MES	Morpholinoethansulfonsäure
min	Minute
NAD(H)	Nicotinamidadenindinucleotid (reduziert)
OD_{600}	optische Dichte bei 600 nm
NEM	N-Ethylmaleimid
PCMB	p-(Chlormercuri)-benzoesäure
PCMBS	p-(Chlormercuri)-benzolsulfonsäure
R	Gaskonstante
rpm	Umdrehungen pro Minute
S	Substratkonzentration
T	absolute Temperatur
TG	Zelltrockenmasse, Trockengewicht
TPB	Tetraphenylboron
$TPMP^+$	Triphenylmethylphosphoniumbromid
TPP^+	Tetraphenylphosphoniumbromid
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units = Enzymeinheit
V_{max}	Maximalgeschwindigkeit
Z	2.3 RT/F
Δp	protonenmotorische Kraft
ΔpH	pH-Gradient
$\Delta \psi$	Membranpotential

1. EINLEITUNG

Zymomonas mobilis, ein Gram-negatives, anaerobes, jedoch aerotolerantes Bakterium, baut Glucose anaerob über den Entner-Doudoroff-Weg ab (Entner und Doudoroff, 1952; Gibbs und DeMoss, 1954; Dawes et al., 1966; Kersters und DeLey, 1968). Das entstandene Pyruvat wird über eine Pyruvat-Decarboxylase zu Acetaldehyd decarboxyliert, welches schließlich über zwei Isoenzyme der Alkohol-Dehydrogenase, ZADH I (Hoppner und Doelle, 1983; Wills et al., 1981) und ZADH II (Scopes, 1983; Neale et al., 1986) zu Ethanol reduziert wird (Abb. I). Ein Mol Glucose wird hierbei zu zwei Mol Ethanol und zwei Mol CO_2 umgesetzt. Da nur der Entner-Doudoroff-Weg zur ATP-Synthese genutzt wird, beträgt die Energieausbeute pro Mol umgesetzter Glucose nur 1 Mol ATP (Swings und Deley, 1977). Entsprechend ist nur eine geringe Biomasseproduktion bei hohen Glucoseumsatzraten zu verzeichnen (Rogers et al., 1982). Im Vergleich zur Hefe, die Glucose über den Fructose-1,6-bisphosphat-Weg mit einer Energieausbeute von zwei Mol ATP pro Mol Glucose abbaut, besitzt *Z. mobilis* bezüglich der Ethanolproduktion Vorteile. Die spezifischen Raten der Glucose-Aufnahme und Ethanolproduktion sind 3 - 4 mal höher als die der Hefe (Rogers et al., 1982; Skotnicki et al., 1983). Ebenso ist die Ethanolausbeute höher, wobei bis zu 97 % der theoretisch zu erwartenden Maximalausbeuten erreicht werden (Rogers et al., 1982; Montenecourt, 1985; Baratti und Bu`lock, 1986; Jones und Doelle, 1991). Das Substratspektrum von *Z. mobilis* ist sehr begrenzt, wobei ausschließlich auf Glucose, Fructose und Sucrose als Kohlenstoffquelle Wachstum festgestellt wird (Swings und Deley, 1977).

Neben der aus ökonomischen Gründen erwünschten Erweiterung des begrenzten Substratspektrums ist eine Erweiterung des Produktspektrums von *Z. mobilis* mit Hilfe gentechnischer Methoden sinnvoll. Erfolgreich wurde bereits die Produktion von Alanin, ausgehend von Pyruvat, durchgeführt. Hierzu wurde das L-Alanin-Dehydrogenase-Gen (alaD-Gen) aus dem mesophilen Stamm *Bacillus sphaericus* in *Z. mobilis* eingeführt (Uhlenbusch et al., 1991). Reinigung, Charakterisierung sowie Klonierung und Sequenzierung der L-Alanin-Dehydrogenase aus *B. sphaericus* wurden bereits beschrieben (Oshima und Soda, 1979; Oshima et al, 1990; Kuroda et al, 1990). Als Temperaturoptimum wurde 30°C (Kuroda et al., 1990) bzw. 37°C (Uhlenbusch et al., 1991) angegeben. Das pH-Optimum für die reduktive Aminierung liegt bei pH 8.5, für die oxidative Desaminierung bei pH 10,5 (Ohshima und Soda, 1990). Die Affinitäten der Alanin-

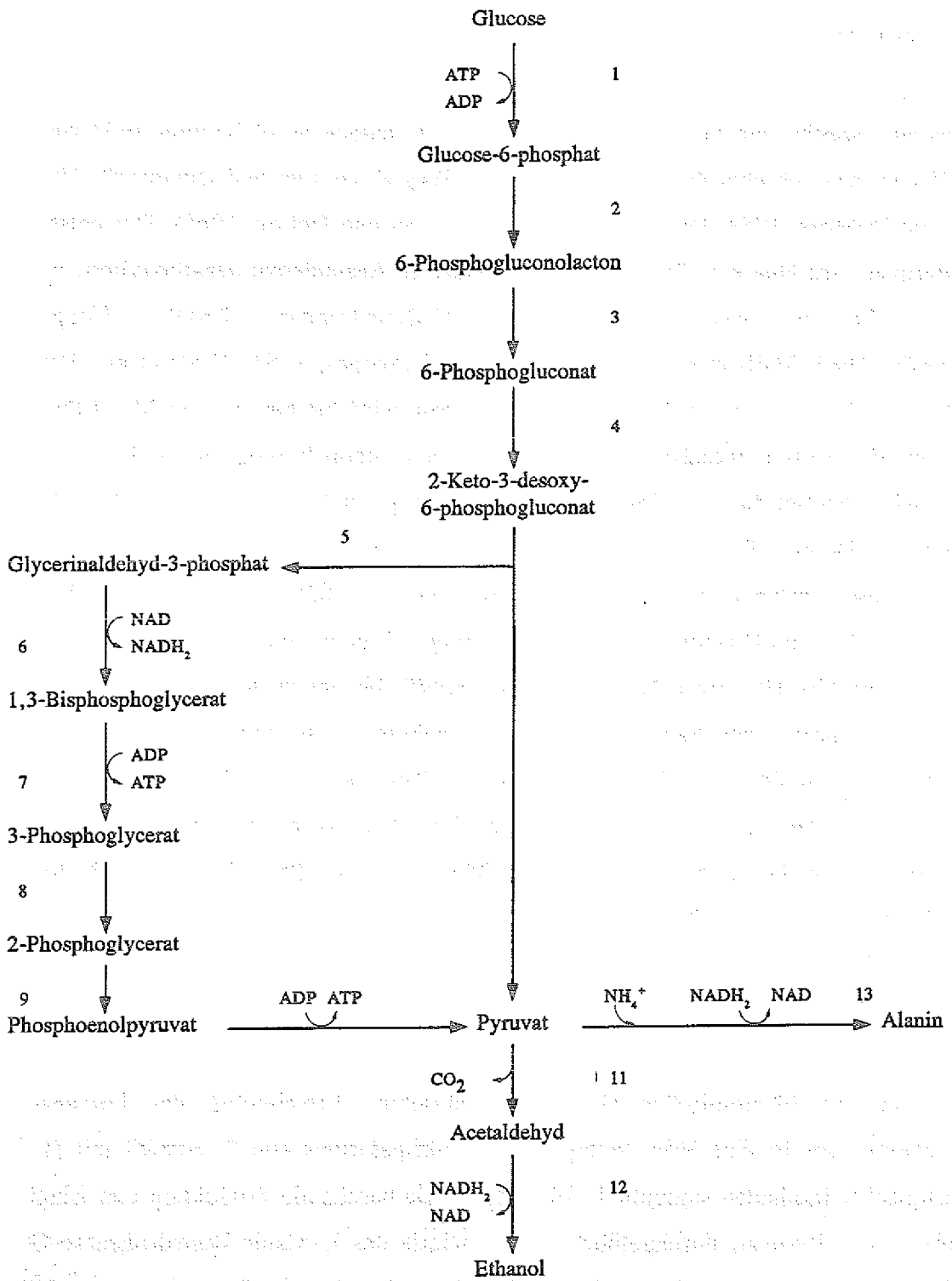
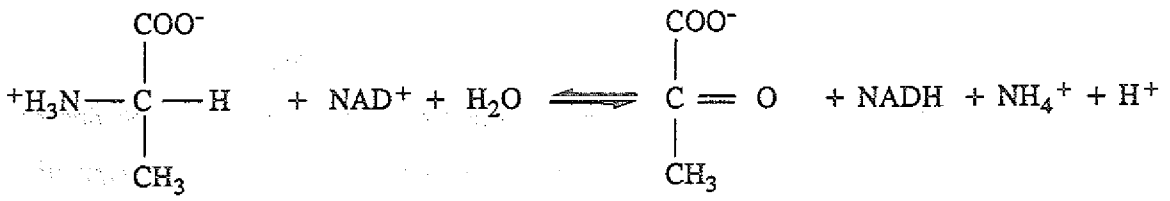


Abb.I: Der Entner Doudoroff-Weg (2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat-Weg, KDPG-Weg) des Abbaus von Glucose. Angegeben ist ebenfalls die von Pyruvat ausgehende Alanin-Synthese der Rekombinante *Zymomonas mobilis* CP4-thi/pZY 73. Beteiligte Enzyme: (1) Hexokinase, (2) Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, (3) 6-Phosphogluconolactonase, (4) 6-Phosphogluconat-Dehydrase, (5) Phospho-2-keto-3-desoxygluconat-Aldolase, (6) Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (7) Phosphoglycerat-Kinase, (8) Phosphoglyceromutase, (9) Enolase, (10) Pyruvat-Kinase, (11) Pyruvat-Decarboxylase, (12) Alkohol-Dehydrogenase, (13) L-Alanin-Dehydrogenase

Dehydrogenase für die verschiedenen Substrate waren wie folgt: K_m (Pyruvat) = 1.7 mM und K_m (Alanin) = 18.9 mM. Es wurde ein Vektor konstruiert, durch den das alaD-Gen mit Hilfe des *Zymomonas*-eigenen Pyruvatdecarboxylase-Promotors exprimiert wurde (Uhlenbusch et al., 1991). Dieses Gen führte nach Expression in *Z. mobilis* zu einer Alanin-Dehydrogenaseaktivität von 0.5 - 1 U/ mg Protein.

Die thiaminpyrophosphat-abhängige, konstitutiv gebildete Pyruvat-Decarboxylase (EC 4.1.1.1.) ist das Schlüsselenzym der Ethanolbildung bei *Z. mobilis* (Hoppner und Doelle, 1983). Das konstitutiv gebildetet Enzym wurde aus *Z. mobilis* gereinigt und charakterisiert (Bringer-Meyer et al., 1986; Neale et al., 1987). Der K_m der Pyruvat-Decarboxylase für Pyruvat beträgt 0.4 mM, das Temperaturoptimum liegt bei 30°C und das pH-Optimum bei pH 5.5 (Bringer-Meyer et al. 1986). Die Klonierung und Sequenzierung der Pyruvat-Decarboxylase aus *Z. mobilis* ATCC 29191 (Bräu und Sahm, 1986; Neale et al., 1987; Reynen und Sahm, 1988) und *Z. mobilis* ATCC 31821 (Conway et al., 1987) wurde durchgeführt. Die Pyruvat-Decarboxylase konkurriert mit der Alanin-Dehydrogenase um das gemeinsame Substrat Pyruvat. Unter den üblichen Anzuchtbedingungen von *Z. mobilis* (pH 5.5) war sowohl aufgrund des pH-Optimums als auch insbesondere der höheren Affinität der Pyruvat-Decarboxylase zum Pyruvat trotz exprimierter Alanin-Dehydrogenase ein Stoffwechselfluß überwiegend in Richtung Ethanolbildung festzustellen. Dieses Problem wurde durch die Fermentation einer thiaminauxotrophen Mutante *Z. mobilis* CP4-thi, die ohne Thiaminzusatz kein Thiaminpyrophosphat mehr synthetisieren konnte (Typas, unveröffentlicht), umgangen. Da die Pyruvat-Decarboxylase Thiaminpyrophosphat als Cofaktor benötigt, wurde nach einer "Hungerphase" der Zellen in Minimalmedium ohne Thiaminzusatz eine starke Herabsetzung der Pyruvat-Decarboxylaseaktivität erreicht (Uhlenbusch et al., 1991) und somit der Stoffwechselfluß effizient in Richtung L-Alaninbildung umgelenkt. Die Fermentation der Rekombinante *Z. mobilis* CP4-thi/pZY 73 in einem geeigneten Medium (Glucose als Kohlenstoffquelle, Ammoniumacetat als Stickstoffquelle) führte zu einer hohen internen Alaninkonzentration, wobei Alanin-Efflux beobachtet werden konnte (Uhlenbusch et al., 1991).
Die L-Alanin-Dehydrogenase (L-Alanin : NAD Oxidoreduktase, desaminierend, EC 1.4.1.1) katalysiert die reversible Desaminierung von L-Alanin zu Pyruvat:



L-Alanin Pyruvat

L-Alanin-Dehydrogenasen sind in einigen Bakterienstämmen nachgewiesen worden (McCormick und Halvorson, 1963; Germano und Anderson, 1968; McCowen und Phibbs, 1974; Johansson und Gest 1976; Caballero et al., 1989). Über die aminierende Aktivität kann das Enzym der Assimilation von Ammonium dienen (Meers und Pedersen, 1972; Caballero et al., 1989). Andererseits spielt die Alanin-Dehydrogenase bei verschiedenen *Bacillus*-Stämmen eine Rolle beim Katabolismus von L-Alanin zu Pyruvat während des vegetativen Wachstums der Zellen auf L-Alanin. Hierbei kann L-Alanin als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle sowie das entstehende Pyruvat als Energiequelle dienen (Meers und Pedersen, 1972; McCowen und Phibbs, 1974). Bei sporulierenden Zellen von *Bacillus licheniformis* wird u.a. über L-Alanin aufgrund der Alanin-Dehydrogenaseaktivität Energie und Kohlenstoffgerüst für die Synthese der Strukturkomponenten von Sporen zur Verfügung gestellt (McCowen und Phibbs, 1974).

Bei *Z. mobilis* wird nur der Entner-Doudoroff-Weg zur ATP-Synthese genutzt, d.h. die Energieausbeute ist sehr gering. Die protonenmotorische Kraft wird unter anaeroben Bedingungen bei *Z. mobilis*, wie bei anderen anaeroben Bakterien auch, über die Protonen-pumpende Funktion einer H^+-ATPase (Adenosintriphosphatase, EC 3.6.1.3.) aufgebaut (Lazdunski und Belaich, 1972). Lazdunski und Belaich reinigten partiell eine ATPase und ermittelten einen K_m von 1 mM (Lazdunski und Belaich, 1972). Kürzlich wurde eine ATPase vom F_OF_1-Typ aus *Z. mobilis* gereinigt und charakterisiert, wobei es sich um eine protonen-pumpende ATPase handelt (Reyes und Scopes, 1991). Hier wurde für ATP ein K_m = 0.1 mM ermittelt.
Die Aerotoleranz von *Z. mobilis* (Lindner, 1931; Wills et al., 1981) läßt sich auf das Vorhandensein einer Katalase und einer Superoxid-Dismutase zurückführen (Swings und DeLey, 1977; Bringer et al., 1984; Pankova et al., 1985). Bei *Z. mobilis* bestehen gute Evidenzien für eine komplette Elektronentransportkette. So verfügt *Z. mobilis* sowohl

über eine membranassoziierte NADH-Dehydrogenase (Dawes et al., 1966; McGill und Dawes, 1971; Bringer et al., 1984) als auch über eine membrangebundene Glucose-Dehydrogenase (Dawes et al., 1966) mit Pyrrolochinolinchinon (PQQ) als fest gebundenem Cofaktor (Strohdeicher et. al., 1988, 1989). Sauerstoff dient als terminaler Elektronenakzeptor. Nachgewiesen wurden ebenfalls die Cytochrome b, c und d (Belaich und Senez, 1965; Swings und Deley, 1977; Pankova, 1985). Es bestehen somit gute Indizien für eine komplette Elektronentransportkette, wobei die Elektronen von den primären Oxidasen (Glucose-Dehydrogenase und NADH-Dehydrogenase) in die gleiche Atmungskette eingespeist werden (Strohdeicher et al., 1990). Hierbei ist Ubiquinon die Chinonkomponente in der Atmungskette (Strohdeicher et al., 1990). Es ist also theoretisch möglich, daß unter aeroben Bedingungen bei *Z. mobilis* eine ATP-Synthese auch über eine oxidative Phosphorylierung stattfindet.

Obwohl der Kohlenhydratmetabolismus von *Z. mobilis* bereits detailliert untersucht wurde (Swings und Deley, 1977; Rogers et al., 1982; Scopes et al., 1985; Vikarii, 1988), ist nur sehr wenig über Transportprozesse bekannt. Auch bezüglich der Komponenten der Zellenergetik liegen nur unzureichende Daten vor. In der Literatur wurde bereits beschrieben, daß Versuche zur Ermittlung des Membranpotentials bisher aufgrund methodischer Schwierigkeiten fehlschlugen. Die Daten zur protonenmotorischen Kraft beschränkten sich so auf die Bestimmung des Protonengradienten (Kalnenieks et al., 1987 a,b; Pankova et al., 1988). Ausführlich untersucht wurde bisher nur die Glucoseaufnahme über eine konstitutive, stereospezifische, erleichterte Diffusion (carrier-vermittelt), wobei es sich um einen Carrier mit einer hohen Aktivität und einer niedrigen Affinität zum Substrat handelt (Dimarco und Romano, 1985; Struch 1992). Der Glucosetransport bei *Z. mobilis* wird somit ausschließlich über den Substrat-Gradienten getrieben. Aufgrund des hohen Glucoseumsatzes ist infolge der niedrigen internen Glucosekonzentration stets ein Glucosegradient vorhanden. Das Gen der Glucose-Permease wurde bereits sequenziert und ist wahrscheinlich gemeinsam mit den für die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, die 6-Phosphogluconat-Dehydratase und die Glucokinase codierenden Genen in einem Gen-Operon organisiert (Barnell et al., 1990). Neben dem Transport von Glycerin in *Escherichia coli* (Sanno et al., 1968; Heller et al., 1980) und Glucose in *Steptococcus bovis* (Russel, 1990) ist der Glucosecarrier von *Z. mobilis* bisher das einzige bekannte Beispiel einer erleichterten Diffusion in Prokaryoten.

Transportsysteme, insbesondere Aufnahme und Sekretion von Aminosäuren, wurden in *Z. mobilis* bisher noch nicht bezüglich Mechanismus und Energiekopplung untersucht. Nur die Aufnahme von Glutamin wurde bei *Z. mobilis* beschrieben (Alexandri et al., 1990). Bei einer Vielzahl von Gram-negativen und Gram-positiven Organismen ist die Aufnahme von Aminosäuren und anderer Substrate geklärt und wird in die im folgenden beschriebenen zwei Kategorien eingeteilt.

1.1 Bakterielle Transportsysteme

Der Transport über bakterielle Cytoplasmamembranen wird bezüglich Mechanismus und Energiekopplung in primäre und sekundäre Transportsysteme eingeteilt (Harold, 1986).

1.1.1 Primäre Tranportsysteme

Bei primären Transportsystemen ist der Transport des Substrates direkt an eine chemische Reaktion gekoppelt, wobei chemische Energie in ein elektrochemisches Potential umgewandelt wird. Beispiele für primäre Transportsysteme sind der ATPase-Komplex und die Elektronentransportkette.
Bei ATP-abhängigen Aufnahmesystemen handelt es sich um Bindeprotein-abhängige Aufnahmesysteme, die sich sensitiv gegenüber osmotischem Schock verhalten. (Ames, 1986). Diese bei Gram-negativen Bakterien wie z. B. *E. coli* und *S. typhimurium* weit verbreiteten Systeme sind für die Aufnahme von Aminosäuren, Peptiden, Zuckern und Anionen beschrieben (Furlong,1987). Auch das Vitamin Thiamin wird bei *E. coli* über ein primäres Transportsystem aufgenommen (Iwashima et al., 1971, Nishimune und Hayashi, 1971). In *E. coli* und *Salmonella typhimurium* sind bindeprotein-abhängige Aminosäureaufnahmesysteme z.B. für Glutamat/Aspartat (Barash und Halpern, 1974; Willis und Furlong, 1975; Schellenberg und Furlong, 1977; Kustu et al., 1979) beschrieben. Es gibt auch Hinweise für ATP-abhängigen primären Transport von Aminosäuren bei Gram-positiven Bakterien (Poolman et al., 1987 a,b; Noji et al., 1988; Sato et al., 1989; Krämer und Lambert, 1990 a, b).

Sehr gut untersucht sind die PEP-abhängigen Phosphotransferasesysteme, durch die ein großer Anteil von Hexosen und Hexitolen transportiert wird (Postma und Lengeler,

1985). Das Substrat wird im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Transportvorgängen während der Aufnahme phosphoryliert. Bei der Aufnahme von Mannitol über das Phosphotransferasesystem wurde festgestellt, daß der Transport über die Membran auch ohne den Phosphorylierungsschritt stattfinden kann. Es handelt sich also um eine erleichterte Diffusion mit einer gekoppelten Phosphorylierung (Lolkema, 1990, 1991a,b).

1.1.2 Sekundäre Transportsysteme

Bei sekundären Transportsystemen besteht eine Kopplung des elektrischen Gradienten eines Substrates mit dem Transport eines zweiten. Hierbei kann es sich um die protonenmotorische Kraft bzw. einer ihrer Komponenten (Protonengradient oder Membranpotential), Ionengradienten oder um den elektrochemischen Gradienten des Substrates handeln. Der Substrattransport kann in beide Richtungen verlaufen. Bezüglich des Mechanismus wird zwischen Uniport, Symport und Antiport unterschieden.

Uniport

Bei diesem Prozeß wird ein einzelnes Solut über die Membran transportiert. Die bereits erwähnte erleichterte Diffusion ungeladener Substrate wie Glucose und Glycerin ist hier einzuordnen. Auch der Valinomycin-vermittelte K^+-Transport ist als Uniport zu bezeichnen (Harold, 1986). Theoretisch können positiv geladene Substanzen aufgrund der Membranpolarisation mittels Uniport in die Zelle gelangen.

Symport

Bei Symportsystemen, die bei Bakterien häufig zu finden sind, werden zwei oder mehr Solute gekoppelt in die gleiche Richtung transportiert. Bei *E. coli* wird z. B. sowohl ein Na^+-unabhängiger, $2H^+$/Glutamat-Aspartat-Symport (Deguchi et al., 1989; Wallace et al., 1990; Tolner et al., 1992) als auch ein Na^+/Glutamat-Symport (Deguchi et al., 1990; Fujimura et al. 1983; Schellenberg und Furlong,1977), bei *Bacillus stearothermophilus* ein Na^+H^+/Glutamat-Symport (DeVrij et al., 1989) beschrieben. Des weiteren ist bei *E. coli* ein Na^+/Prolin-Symport (Anraku, 1990, 1992) sowie ein Na^+H^+/Melibiose-Symport (Tsuchiya und Wilson, 1978) bekannt. Eine Vielzahl weiterer Symportvorgänge sind bei *E. coli* nachgewiesen worden, wie z.B. der Symport von Protonen mit weiteren Aminosäuren (Glycin, Histidin, Lysin und Phenylalanin), Zuckern (Arabinose, Galactose

und Lactose) sowie organischen Säuren (Lactat, Pyruvat, Succinat und Gluconat) (Matin und Konings, 1973; Harold und Levin, 1974; Maloney, 1987). Auch bei der alpha-Ketoglutarat Permease in *E. coli* handelt es sich um einen Protonensymporter (Seol und Shatkin, 1992). In *Klebsiella pneumoniae* ist mit der Citrataufnahme das bisher einzige Beispiel eines $3H^+$/Substrat-Symportes beschrieben worden (Van der Rest et al., 1991).

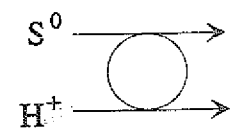
Antiport

Bei diesem Prozeß werden zwei oder mehr Substrate gekoppelt in entgegengesetzter Richtung transportiert. Häufig handelt es sich hierbei um Substrat-Produkt Antiporter (Poolman, 1990). Beispiele hierfür wären der Oxalat-Formiat-Antiport in *Oxalobacter forminogenes* (Anantharam et al., 1988), der Arginin-Ornithin-Antiport in *Streptococcus lactis* (Poolman et al., 1987) und *Pseudomonas aeruginosa* (Lüthi etal., 1990) oder der von Hutkins und Ponne postulierte Lactose-Galactose-Antiporter in *Streptococcus thermophilus* (Hutkins und Ponne, 1991). In Alkalophilen dienen Na^+/H^+-Antiporter der Aufrechterhaltung der pH-Homöostase (Krulwich und Guffanti, 1989; Krulwich et al., 1990). Entsprechende Funktionen besitzt der Na^+/H^+-Antiport in neutrophilen Bakterien bei alkalischem externem pH-Wert (Padan et al., 1981; Booth, 1985; McMorrow et al., 1989). Der Nigericin-vermittelte K^+/H^+-Austausch ist ebenfalls als Antiport zu bezeichnen.

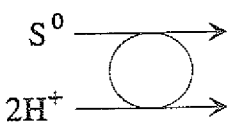
Viele bakterielle sekundäre Transportsysteme weisen eine sehr ähnliche Struktur auf (Maloney, 1990). So besitzen die Transportproteine meist 12 Transmembranhelices (Maiden et al., 1987; Maloney, 1989; Anraku et al., 1990; Kaback et al., 1990; Tolner et al., 1992). Besonders detailliert wurde die Lactosepermease von *E. coli* untersucht (Brooker 1990; Kaback et al., 1990). Auch sie besitzt 12 Transmembranhelices in α-helikaler Konformation, die durch hydrophile Domänen ("loops") verbunden sind. Rekonstitutionsexperimente in Proteoliposomen zeigten, daß sie als Monomer aktiv ist (Kaback, 1990), wie es bereits für mehrere Transportproteine nachgewiesen wurde (Ambudkar et al., 1990).

Sekundäre Transportsysteme ermöglichen im Vergleich zu primären Systemen eine geringere Akkumulation des Substrates. Die Steilheit des Gradienten hängt neben der Höhe der protonenmotorischen Kraft von der Stöchiometrie des Transportprozesses ab.

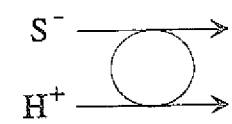
So ist der Transport einer ungeladenen bzw. geladenen Aminosäure aufgrund der Transportstöchiometrie mit n Protonen abhängig von den einzelnen wirkenden Kräften der Komponenten der protonenmotorischen Kraft. Membranpotential und Protonengradient sind hierbei mit unterschiedlichen Faktoren beteiligt (Abb.II). Wird ein Substrat mit Protonen cotransportiert, so läßt sich über die Verteilung des Substrates nach Einstellung des thermodynamischen Gleichgewichtes, bei bekannten energetischen Parametern als treibende Kraft, die Stöchiometrie des Transportes errechnen.



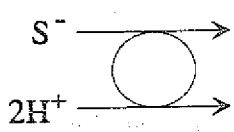
$$Z \cdot \log ([S^0]_{in}/[S^0]_{ex}) = - (\Delta\psi - Z\,\Delta pH) = - \Delta p$$



$$Z \cdot \log ([S^0]_{in}/[S^0]_{ex}) = - 2(\Delta\psi - Z\,\Delta pH) = -2\Delta p$$



$$Z \cdot \log ([S^-]_{in}/[S^-]_{ex}) = Z\,\Delta pH$$



$$Z \cdot \log ([S^-]_{in}/[S^-]_{ex}) = - (\Delta\Psi - 2\,Z\,\Delta pH)$$

Abb. II: Symport eines ungeladenen (S^0) bzw. negativ geladenen Substrates (S^-) mit 1 bzw. 2 Protonen (nach Rottenberg, 1976). Z = 2,3 RT/F = 59 mV

1.1.3 Bakterielle Exportsysteme

Bakterielle Exportsysteme, bei denen in einigen Fällen Transportproteine nachgewiesen wurden, können verschiedene Funktionen erfüllen. Exportiert werden Stoffwechselendprodukte wie z.B. Acetat (Boenigk et al., 1989), Butyrat (Loubiere et al., 1990), Formiat (Anantharam, et al., 1989), Lactat (Harold und Levin, 1974; Gätje et al., 1991) und Succinat (Michel und Macy, 1990). Der Export von Lysin in *C. glutamicum* dient wahrscheinlich ebenfalls der Regulation der internen Lysinkonzentration (Bröer und

Krämer, 1991). Wichtig ist der Export toxischer Substanzen wie Schwermetalle (Silver und Misra, 1987) und Antibiotika (Yamaguchi et al., 1990). Hierbei handelt es sich häufig um plasmidcodierte Transportsysteme (Tynecka et al., 1981; Foster, 1983; Rosen und Borbolla, 1984). Schwermetallresistenzen werden meist von ATPasen vermittelt, so z.B. der Arsenat- und Arsenitefflux sowohl in Gram-negativen als in Gram-positiven Bakterien sowie der Cadmiumefflux in Gram-positiven Bakterien (Tynecka et al., 1981; Silver und Misra, 1988; Nucifora et al., 1989; Silver et al., 1989). Der Tetracyclinefflux wird durch einen sekundären Transportprozeß vermittelt. Tetracyclin wird als Komplex mit divalenten Kationen im Antiport gegen ein Proton elektroneutral ausgetauscht (Kaneko et al., 1985; Yamaguchi et al., 1990).
Über die Sekretion von Aminosäuren dagegen ist noch sehr wenig bekannt. Bezüglich des Mechanismus dieser Sekretionssysteme lassen sich die im folgenden vorgestellten Modelle unterscheiden.

Diffusionsmodell ("leak")

Dieses Modell wurde für die Glutamat-Sekretion von *C. glutamicum* vorgeschlagen (Demain und Birnbaum, 1968). Der Glutamat-Efflux ist nur nach entsprechender Vorbehandlung der Zellen zu beobachten. So führte Biotinmangel im Medium, Penicillinaddition sowie Addition von Fettsäurederivaten zu einer Glutamat-Sekretion, was die Autoren auf eine unspezifische Membranpermeabilität aufgrund einer physikalischen Veränderung der Membran zurückführten (Shiio et al., 1963; Demain und Birnbaum, 1968). Der Efflux sollte dann, relativ unspezifisch, durch passive Diffusion erfolgen, d.h. die einzige Triebkraft bei diesem Modell ist der chemische bzw. elektrochemische Gradient des betreffenden Substrates über der Membran. Die Glutamat-Exkretion nach Zugabe von Fettsäurederivaten (Amin-Detergenzien), was infolge einer Permeabilisierung der Membran zur Glutamat-Sekretion führt, wurde kürzlich von einer weiteren Arbeitsgruppe näher untersucht (Duperray et al., 1992).

Es muß davon ausgegangen werden, daß die Bakterienmembran insbesondere für ungeladene Aminosäuren eine gewisse Permeabilität aufweist, wobei über das Ausmaß keine Klarheit besteht (Driessen et al., 1987; Milner et al., 1987). Der passive Flux wird durch das Ficksche Gesetz beschrieben, gehorcht also einer Reaktion 1. Ordnung. In

Liposomen wurden Korrelationen zwischen der relativen Hydrophobizität der Seitenketten der Aminosäuren und der Konstante erster Ordnung aufgestellt, wobei mit steigender Hydrophobizität der Aminosäuren die Konstante erster Ordnung stieg (Driessen et al., 1987). In *Lactococcus lactis* wird Prolin z. B. durch passive Diffusion aufgenommen (Smid und Konings, 1990). Ebenso ist bei *E. coli* K12 ein durch Diffusion bedingter Prolin-Efflux nicht auszuschließen (Rancourt, 1983).

Inversionscarrier

Auch dieses Modell wurde für die Glutamat-Sekretion von *C. glutamicum* vorgeschlagen. Es wird davon ausgegangen, daß die Sekretion über eine Inversion des Aufnahmeprozesses verläuft. Ermöglicht würde dieser Vorgang bei entsprechend veränderten elektrochemischen Potentialen. Für die Glutamat-Sekretion wurde postuliert, daß infolge der notwendigen Vorbehandlung der Zellen eine Entkopplung des Aufnahmesystems von der treibenden Kraft stattfindet und Glutamat infolge seiner negativen Ladung über seinen Aufnahmecarrier sezerniert wird (Clement et al., 1984; Clement und Laneelle, 1986). Ein vergleichbares Modell wäre für die Sekretion anderer Aminosäuren ebenfalls denkbar.

Porenmodell

Dieses Modell wurde für die Lysin-Sekretion bei *C. glutamicum* vorgeschlagen (Luntz et al., 1986). Es basiert auf der Annahme von osmotisch kontrollierten Poren, die sich nach Erhöhung der internen Lysinkonzentration unter Produktionsbedingungen und der daraus resultierenden Erhöhung der Osmolarität des Cytoplasmas öffnen.

Sekretionscarrier

Bei diesem Modell wird ein spezifischer Sekretionscarrier für Aminosäuren postuliert. So wurde bei *C. glutamicum* carriervermittelter Transport für die Aminosäuren Glutamat (Hoischen und Krämer, 1989, 1990), Isoleucin (Ebbighausen, 1989) und Lysin (Bröer und Krämer, 1991) beschrieben. Der Lysinexport konnte als 2 OH^-/Lysin-Symport charakterisiert werden (Bröer und Krämer, 1991).

Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung des zellulären Energiestatus sowie von Transportvorgängen bei *Z. mobilis*. Hierbei war interessant, ob es neben der erleichterten Diffusion, dem bisher einzigen untersuchten Transportprozeß in diesem Bakterium, auch andere Aufnahmesysteme gibt, die den primären oder sekundären Transportvorgängen anderer Bakterien entsprechen.

Zunächst war es deshalb notwendig, die energetischen Parameter, d.h. den ATP-Gehalt sowie die protonenmotorische Kraft, zu bestimmen und gegebenenfalls geeignete Meßmethoden aufgrund der bekannten Schwierigkeiten zu optimieren.

Die Quantifizierung der energetischen Parameter sollte die Untersuchung eines Aufnahmesystems bezüglich Mechanismus und Energiekopplung ermöglichen. Nach einem Screening verschiedener Aminosäuren wurde die Glutamat-Aufnahme gewählt, da einerseits eine hohe Aufnahmeaktivität beobachtet wurde, andererseits Glutamat als alleinige Stickstoffquelle genutzt werden kann. Zur weiteren Beschreibung der Transporteigenschaften von *Z. mobilis* sollte auf der Basis der bis dahin gewonnenen Daten ein Sekretionsmechanismus untersucht werden. Bei *Z. mobilis* ist bisher, mit Ausnahme des Ethanol-Efflux, kein Metabolit-Export bekannt. Da der Wildtyp von *Z. mobilis* nur sehr geringe interne Konzentrationen sämtlicher Aminosäuren aufweist und kein Netto-Efflux zu beobachten war, wurde am Beispiel der Alanin-Sekretion des rekombinanten Stammes *Z. mobilis* CP4-thi/pZY 73 ein Aminosäure-Export untersucht.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden die Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt) oder Boehringer (Mannheim) in p.A. Qualität oder in hohen Reinheitsstufen bezogen.

Yeast -Extrakt	Difco Laboratories, Detroit, USA
CCCP	Sigma, St. Louis, USA
DCCD	
Nigericin	
Luciferin/Luciferase	
MES	
Pantothenat (Ca^{2+}-Salz)	
Valinomycin	
[U-^{14}C]-Alanin	Amersham International (Buckinghamshire, UK)
[U-^{14}C]-Benzoat	
[U-^{14}C]-Glucose	
[U-^{14}C]-Glutamat	
[^{14}C]-Methylamin	
[U-^{14}C]-Thiocyanat (^{14}C-SCN^-, Na-Salz)	
[U-^{14}C]-Taurin	
[U-^{14}C]-Tetraphenylphosphonium-bromid	
^3H_2O	
$^{86}Rb^+$	

2.2 Nährmedien

2.2.1 Vollmedium (Bringer et al., 1984)

Dieses Medium wurde zur Stammhaltung und zur Anzucht von *Z. mobilis* subsp. *mobilis* verwendet.

Glucose	20.0 g/l (Stammhaltung) bzw.
	50.0 g/l (Anzucht)
Hefeextrakt	10.0 g/l
KH_2PO_4	1.0 g/l
$(NH_4)_2SO_4$	0.5 g/l

Das Medium wurde mit KOH auf pH 5.5 eingestellt. Glucose in höheren Konzentrationen (50 g/l, getrennt autoklaviert) wurde dem Medium nach Autoklavieren zugesetzt. Zur Stammhaltung von *Z. mobilis* CP4-thi/pZY73 wurde Tetracyclin (in 96% Ethanol) nach Autoklavieren und Abkühlen des Mediums in einer Endkonzentration von 30 μg/ml (Stammlösung 100-fach konzentriert) zugesetzt.

2.2.2 Minimalmedium (modifiziert nach Fein et al.)

Glucose	50.0 g/l
$(NH_4)_2SO_4 \cdot 7\ H_2O$	1.98 g/l
KH_2PO_4	3.48 g/l
Citronensäure-Monohydrat	0.21 g/l
MES	19.52 g/l

Vitamin-Stammlösung:

Biotin	10 mg/100 ml
Ca^{2+}-Pantothenat	10 mg/100 ml

Die Komponenten wurden in bidestilliertem Wasser angesetzt und mit KOH auf pH 5.8 eingestellt. 5% (v/v) Glucose (getrennt autoklaviert) und 1% (v/v) Vitaminlösung (sterilfiltriert) wurden dem Medium nach Autoklavieren und Abkühlen zugesetzt.

2.2.3 Alaninbildungsmedium

Das o.g. Minimalmedium wurde mit KOH auf pH 7.0, die Ammoniumkonzentration wurde mit NH_4^+-Acetat auf 100 mM (Endkonzentration) eingestellt.

2.3 Stämme und Kultivierungsbedingungen

Stämme:

Bei den Stämmen *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* Stamm Zm6 (ATCC 29191, Swings und Deley, 1977) und Stamm CP4 (ATCC 31821, Goncalves de Lima et al., 1970) handelt es sich jeweils um den Wildtyp. Die Mutante *Z. mobilis* CP4-thi/pZY73 (Uhlenbusch et al. 1990) wurde nach Klonierung und Exprimierung der Alanin-Dehydrogenase aus *Bacillus sphaericus* in die thiaminauxotrophe Mutante *Z. mobilis* CP4-thi (ATCC 31821 Derivat, Typas, nicht veröffentlicht) erhalten.

Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgte bei allen Stämmen anaerob in 30 ml Anaerobengefäße (Bellco-Glass-Inc., New Jersey, USA) gefüllt mit 10 ml Vollmedium, pH 5,5, bei *Z. mobilis* CP4-thi/pZY73 wurde zusätzlich 30 μl/ml Tetracyclin zugesetzt. Die Zellen wurden einmal wöchentlich überimpft, über Nacht bei 30°C angezogen und anschließend bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Anzucht

Die Anzucht von *Z. mobilis* Zm6 erfolgte anaerob in 300 ml Zweihalskolben, gefüllt mit 150 ml Vollmedium, pH 5.5. Die Kulturen wurden ohne Schütteln bei 30°C über Nacht angezogen. Die Kolben wurden zur Anzucht mit 0.1 % einer Stammkultur (0.5 mg Trockengewicht pro ml) beimpft. Nach ca. 12 h wurden die Zellen in der exponentiellen Phase zentrifugiert (3000 rpm, 10 min), zweimal in MES-Puffer (100 mM MES, 10 mM NaCl, 10 mM KCl, pH 5.5) gewaschen, eingeengt und in die entsprechenden Versuche eingesetzt.

Die Fermentation von *Z. mobilis* CP4-thi/pZY 73 erfolgte in drei Schritten. Zunächst wurden die Zellen, wie oben beschrieben, zur Erlangung einer hohen Zelldichte in Vollmedium angezogen und in der exponentiellen Phase geerntet. Die Zellen wurden zweimal in Minimalmedium steril gewaschen, anschließend in Minimalmedium überimpft ("Thiamin-Hungerphase") und bei 30°C 16 h inkubiert (ca. 2 - 3 Zellteilungen). Die Größe des Inokulums wurde so gewählt, daß die Zelldichte zu Beginn der Inkubation 0.1 mg Trockengewicht pro ml betrug. Schließlich wurden die Zellen in Alaninbildungsmedium überführt und bei 37°C ohne Schütteln kultiviert.

2.4 Methoden

2.4.1 Siliconölzentrifugation (Klingenberg und Pfaff, 1967)

Durch die Siliconölzentrifugation erfolgt eine schnelle Trennung der Zellen von ihrem umgebenden Kulturmedium. Hierzu wurden 400 μl Reaktionsgefäße (Beckman) mit 30 μl 20%iger Perchlorsäure und 65 μl Siliconöl gefüllt. Aufgrund der unterschiedlichen Dichte lag die Ölschicht nach einem kurzen Zentrifugationsschritt über der Perchlorsäure. Je nach Dichte der eingesetzten Zellsuspension wurde Siliconöl mit einer Dichte d = 1.03 oder d = 1.04 gewählt. Auf die vorbereiteten Röhrchen wurden Aliquots von 100 - 200 μl Zellsuspension pipettiert und 30 Sekunden in einer Microfuge E (Beckman) bei maximaler Geschwindigkeit (14000 rpm) zentrifugiert.

Die Zellen wurden durch die Ölschicht gerissen, wodurch das sie umgebende Medium weitgehend abgetrennt wurde und sedimentierten innerhalb von ca. 7 Sekunden in der Perchlorsäureschicht. In der Säureschicht erfolgte eine sofortige Inaktivierung und Extrahierung der Zellen.

Für die Ermittlung radioaktiv markierter Substanzen wurden 20 μl der Überstände mit Scintillationsflüssigkeit gemischt und in einem Scintillationszähler (Rack beta 1214, LKB, Schweden) gezählt. Zur Bestimmung der radioaktiv markierten Extrakte wurde der die Perchlorsäureschicht enthaltene Teil des Röhrchens abgetrennt, in ein Eppendorfgefäß gegeben und mit 750 μl Wasser versetzt. Durch Zentrifugation wurde das Sediment in das Eppendorfgefäß überführt, anschließend suspendiert und 10 min in einem Ultraschallbad behandelt. Nach erneuter Zentrifugation (Eppendorfzentrifuge, 14000 rpm, 5 min) wurden 650 μl des erhaltenen Überstandes ebenfalls mit Scintillationsflüssigkeit gemischt und gezählt.

Die Bestimmung nicht radioaktiver Metabolite erfolgte wieder durch Zentrifugation der Zellen in die Perchlorsäureschicht. Die Überstände der Siliconölröhrchen wurden ohne weitere Behandlung in die Analytik eingesetzt. Das Sediment in der Perchlorsäureschicht wurde durch Zentrifugation in 750 μl Gefäße überführt, mit 45 μl A. dest. versetzt, suspendiert und durch Beschallung in einem Ultraschallbad (10 min) behandelt. Die Extrakte wurden durch Zugabe von 25 μl 5 M KOH, 1 M Triethanolamin neutralisiert und zur besseren Abtrennung von eventuell mitgeschleppten Siliconölresten mit 15 μl Siliconöl der Dichte 1.07 versetzt. Nach Kühlung der Zellen auf Eis wurde das ausgefallene Kaliumperchlorat neben Zellfragmenten abzentrifugiert (Eppendorfzentrifuge, 14000 rpm, 5 min). Der resultierende Überstand wurde in die Analytik eingesetzt.

2.4.2 Die Bestimmung des Cytoplasmavolumens (Rottenberg, 1979).

Zur Ermittlung von internen Konzentrationen ist es notwendig, das interne Zellvolumen zu kennen. Die Methode zur Ermittlung des Cytoplasmavolumens basiert auf der bereits beschriebenen Siliconölzentrifugation. Da bei dieser Methode immer Medium mit den Zellen in das Sediment mitgeschleppt wird, mußte das tatsächliche Zellvolu-

men unter Berücksichtigung dieses extrazellulären Raumes korrigiert werden. Für die Raumbestimmung wurden deshalb zwei radioaktiv markierte Substanzen eingesetzt. Zum einen wurde ^3H_2O eingesetzt, welches in die Zellen diffundiert und somit das gesamte in das Sediment gelangte Volumen repräsentiert. Zum anderen wurde ^{14}C-Taurin verwendet, welches von *Z. mobilis* nicht aufgenommen wird und somit ein Maß für den extrazellulären Raum ist. Mittels dieses "Taurinraumes", welcher für das Volumen des mitgeschleppten Mediums steht, erfolgte die Korrektur der Werte. Die Differenz von Wasser- und Taurinraum ergibt das Cytoplasmavolumen.

Durchführung:

Zur Durchführung der Bestimmung wurden 500 μl der Zellsuspension mit 20 μl des Raumbestimmungsansatzes (5 μl ^3H_2O, ca. 40 kBq, 5 μl ^{14}C-Taurin, ca. 10 kBq, 10 μl nicht-markiertes Taurin, 10 mM) 60 Sekunden inkubiert, in 5 Aliquots zu je 100 μl aufgeteilt und in die Siliconölzentrifugation eingesetzt. Anschließend wurden je 20 μl des Überstandes bzw. 650 μl des Extraktes der Sedimente im Scintillationszähler nach einem Programm für Doppelmarkierungen gemessen. Routinemäßig wurde ein Zellvolumen von 2.2 -2.4 μl / mg Trockengewicht bestimmt.
Die Zellvolumina wurden folgendermaßen berechnet:

^3H_2O-Raum = $V_Ü \cdot$ dpm $^3H_2O_{sed}$/dpm $^3H_2O_Ü$

Taurinraum = $V_Ü \cdot$ dpm $^{14}C_{sed}$/dpm $^{14}C_Ü$

Internes Volumen = ^3H_2O-Raum - Taurinraum

$V_Ü$ = Volumen des Überstandes (20 μl)

dpm_{sed} = dpm (^{14}C bzw. ^3H_2O) des gesamten aufgearbeiteten Sedimentes

$dpm_Ü$ = dpm (^{14}C bzw. ^3H_2O) des gesamten Überstandes

Probenvolumen = 100 μl

2.4.3 Die Ermittlung der Komponenten der protonenmotorischen Kraft

Die Bestimmung des Membranpotentials und des Protonengradienten über der Cytoplasmamembran ermöglichen die Berechnung der protonenmotorischen Kraft:

$$\Delta\mu_H/F = \Delta p \text{ (pmf)} = \Delta \psi - Z \cdot \Delta pH$$

F = Faraday Konstante, Z = 2.3 RT/F = 59 mV bei RT,
$\Delta\mu_H$ = elektrochemische Potentialdifferenz

2.4.3.1 Das Membranpotential

Ermittlung des Membranpotentials mittels TPP^+ (Rottenberg, 1979)

Die Ermittlung des Membranpotentials (innen negativ) basiert bei dieser Methode auf der Akkumulation der permeablen Sonde Tetraphenylphosphoniumbromid (^{14}C-TPP^+) entsprechend des Membranpotentials.

$$\Delta \psi = -Z \cdot \log [TPP^+]_{in}/[TPP^+]_{ex}$$

Durchführung:
Zur Durchführung wurden 500 μl Zellsuspension mit 10 μl ^{14}C-TPP^+ (70000dpm/nmol, ca. 2-3 μM im Gesamtansatz) vermischt und bei 30°C 2 min inkubiert. Aliquots von 100 μl wurden anschließend in die Siliconölzentrifugation eingesetzt.
Zur Destabilisierung der äußeren Membran wurden den Ansätzen 2-3 mM EDTA (Endkonzentration) zugesetzt und vor Zugabe der Sonde 5 min vorinkubiert.
Gegebenenfalls wurde den Ansätzen Tetraphenylboron (nicht-markiert, 1 -10- μM) zur Absättigung der hydrophilen Bindestellen zugegeben. Zur Bestimmung der internen und externen TPP^+-Konzentration wurden Aliquots des Gesamtansatzes sowie des Überstandes im Szintillationszähler gezählt. Der TPP^+-Menge des Sedimentes wurde aus der Differenz der TPP^+-Menge von Gesamtansatz und Überstand ermittelt. Zur

Bestimmung der Nullwerte wurden die Zellen entkoppelt bzw. glucoseverarmt. Zur Problematik dieser Methode bei *Z. mobilis* s. Ergebnisse.

Ermittlung des Membranpotentials mit $^{86}Rb^+$ in Gegenwart von Valinomycin (Rottenberg, 1979)

Bei dieser Methode wird die Membran für $^{86}Rb^+$ mit dem K^+-Ionophor Valinomycin permeabilisiert. Die Verteilung von $^{86}Rb^+$ entlang des elektrochemischen Gradienten kann durch die Nernstsche Gleichung beschrieben werden:

$$\Delta\psi = -Z \cdot \log [^{86}Rb^+]_{in}/[^{86}Rb^+]_{ex}$$

Durchführung:
Die externe Kaliumkonzentration wurde von 0.3 - 200 mM variiert. In Gegenwart von Valinomycin und hohen Kaliumkonzentrationen wird das Membranpotential durch ein Kaliumdiffusionspotential ersetzt, welches durch die Nernstsche Gleichung errechnet werden kann (s.o.). Zur Durchführung des Versuches wurden zu 500 μl Zellsuspension 5 - 10 μl 10 mM Valinomycin, 5 μl $^{86}Rb^+$ (5 kBq) und die entsprechenden K^+-Konzentration gegeben. Gegebenenfalls wurde dem Ansatz 2 -3 mM EDTA (Endkonzentration) zugesetzt. Nach 10 min wurden dreimal je 100 μl des Ansatzes in die Siliconölzentrifugation eingesetzt und die radioaktive Markierung in Überstand und Sediment wie beschrieben ermittelt. Zur Problematik dieser Methode bei Anwendung bei *Z. mobilis* s. Ergebnisse.

Ermittlung des Membranpotentials mittels SCN^- (Cox et al., 1979)

Da die Ermittlung des Membranpotentials mit $^{86}Rb^+$/Valinomycin äußerst problematisch war, wurde eine weitere Methode durchgeführt. Die negativ geladenene Sonde ^{14}C-SCN^- verteilt sich frei über der Membran entsprechend des bestehenden Membranpotentials, d.h. bei einem Membranpotential, innen negativ, ist eine Abreicherung der Sonde festzustellen. Das Membranpotential läßt sich durch die Nernstsche

Gleichung errechnen:

$$\Delta \psi = -Z \cdot (-\log [^{14}C\text{-}SCN^-]_{in}/[^{14}C\text{-}SCN^-]_{ex})$$

Durchführung:
Zur Durchführung wurden 500 μl Zellsuspension mit 10 μl $^{14}C\text{-}SCN^-$ 3 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden dreimal je 100 μl Ansatz mittels Siliconölzentrifugation extrahiert und die Verteilung der radioaktiven Sonde in Überstand und Sediment ermittelt. Zur Kontrolle wurden die Potentiale völlig deenergetisierter Zellen (glucoseverarmt bzw. nach Zusatz des Protonophors CCCP) als Nullwert bestimmt.

2.4.3.2 Der pH-Gradient (Rottenberg, 1979)

Der pH-Wert kann durch die Verteilung von schwachen Säuren bzw. Basen über der Cytoplasmamembran bestimmt werden. Die Membran ist für die jeweilige neutrale Form permeabel, während das Ion nicht permeieren kann.
Ist der interne pH-Wert höher als der externe, wird die Verteilung einer schwachen Säure, wie z.B. Benzoat, genutzt, die in der undissoziierten Form (AH) die Membran permeieren kann. Im Gleichgewicht gilt:

$$[AH]_{in} = [AH]_{ex}$$

Unter der Voraussetzung einer intern und extern gleichen Dissoziationskonstanten liegt die Säure aufgrund der intern und extern unterschiedlichen pH-Werte im Cytoplasma stärker dissoziiert (A^-) vor als im Überstand. Da nur die undissoziierte, neutrale Form die Membran permeieren kann, akkumuliert die Säure im Cytoplasma. Der pH-Gradient läßt sich nach der folgenden Gleichung errechnen:

$$pH_{in} - pH_{ex} = \Delta pH = \log ([A^-]_{in}/[A^-]_{ex})$$

Hierbei muß für den externen pH $pH_{ex} > pK + 1$ gelten, so daß davon ausgegangen werden kann, daß der größte Anteil der Säure intern und extern in der dissoziierten Form vorliegt.

Gilt nun $pH_{ex} < K + 1$, muß der Anteil an undissoziierter Säure im Cytoplasma in die Rechnung mit einbezogen werden. Es gilt :

$$pH_{in} = \log (A^-_{in}/A^-_{ex}(10^{pK}+10^{pHex}) - 10^{pK})$$

Liegt der externe pH-Wert höher als der interne, wird eine schwache Base verwendet, die ebenfalls nur in ihrer neutralen Form permeabel ist. Analog den genannten Überlegungen wird der pH-Gradient wie im folgenden genannt, berechnet:

$$pH_{ex} - pH_{in} = - \Delta pH = \log ([AH^-]_{in}/[AH^+]_{ex})$$

hierbei muß gelten: $pH_{ex} < pK - 1$

Bei $pH_{ex} > pK - 1$ gilt:

$$pH_{in} = \log (A_{in}/A_{ex}(10^{-pK} + 10^{-pHex}) - 10^{-pK})$$

Durchführung:

a) $pH_{in} > pH_{ex}$

Zur Bestimmung des pH-Gradienten wurden 500 μl Zellsuspension (OD600 = 5 - 10) mit 10 μl ^{14}C Benzoat (ca. 122000 dpm/nmol; pK = 4.3) 2 min bei 30°C inkubiert. Die Benzoatkonzentration im Testansatz betrug 3 μM. Es wurden dreimal je 100 μl der Suspension in die Siliconölzentrifugation eingesetzt und die Konzentration des internen sowie des externen markierten Benzoates ermittelt. Um die Menge des unspezifisch gebundenen Benzoates festzustellen, wurde die Verteilung der Sonde auch bei völlig deenergetisierten Zellen (glucoseverarmt oder Zugabe von CCCP) ermittelt. Die erhaltenen Werte wurden von den Meßwerten der energetisierten Zellen subtrahiert. Aus diesen Werten wurde nach parallel durchgeführter Raumbestimmungen die interne Benzoatkonzentration ermittelt.

b)$pH_{in} < pH_{ex}$

Zur Bestimmung des Gradienten wurden 500 μl Zellsuspension mit 10 μl ^{14}C-Methylamin (ca. 124000 dpm/nmol; pK = 9.3) für 2 min bei 30°C inkubiert. Die weitere Durchführung erfolgte wie unter a) beschrieben. Eine Aufnahme von Methylamin wurde in dem gewählten Zeitraum nicht beobachtet. Zur Korrektur des unspezifisch gebundenen Methylamins wurden die Zellen vollständig deenergetisiert (durch Glucoseverarmung) bzw. durch Behandlung mit 0.01% Cetyltrimethylammoniumbromid (Endkonzentration) permeabilisiert.

2.4.4 Ermittlung des cytosolischen ATP-Gehaltes

Die Bestimmung des ATP-Gehalts erfolgte nach der Luciferin/ Luciferase-Methode über Messung der Lichtemission (modifiziert nach Lundin et al., 1976 und Schimz et al., 1981). Die Reaktion verläuft nach folgendem Prinzip:

$$ATP + Luciferin + O_2 \xrightarrow{Luciferase} Oxyluciferin + AMP + PP_i + CO_2 + h \cdot v$$

Hierbei war die gemessene "Lichtmenge" dem ATP-Gehalt direkt proportional.

a) Extraktion und Probenvorbereitung

Die Nucleotide wurden durch Mischung der Zellsuspension mit Dimethylsulfoxid (DMSO) extrahiert (Lefebvre et al., 1988, Houssin et al., 1990). Zu definierten Zeitpunkten wurden hierfür 20 μl Zellsuspension in 180 μl DMSO pipettiert und sofort mit 800 μl eiskaltem Wasser vermischt.

b) Durchführung der ATP-Bestimmung

Die Ermittlung des ATP-Gehalts wurden mit den unter a) beschriebenen unbehandelten Extrakten durchgeführt. Zur Berechnung der ATP-Menge wurde dem Extrakt ein

interner ATP-Standard zugesetzt und der ATP-Gehalt ebenfalls bestimmt. Der interne Standard war notwendig, um die Messungen gegen die Löschung der Lichtblitze (Quench) durch im Extrakt vorhandenen Bestandteile zu korrigieren. Zur Bestimmung wurden 50 mg eines Luciferin/Luciferase-Lyophilisates (Sigma, Buffered Firefly Lantern Extract, FLE-50) in 5 ml kaltem A. dest. gelöst und die ungelösten Bestandteile kalt zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand wurde, gegebenenfalls verdünnt, eingesetzt. Der Meßansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

100 μl Zellextrakt

250 μl Luciferin/Luciferase

2250 μl Testpuffer	50 mM Tris-H_2SO_4 pH 7.4
	3.5 mM $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$
	2.5 mM K_2SO_4
	0.6 mM EDTA

Für die interne Standardisierung wurde einem identischen Ansatz zusätzlich zu den 100 μl Zellextrakt 40 μl ATP-Lösung (1μM) zugesetzt.
Die Messungen wurden mit einem Bioluminescenzanalysator (XP 2000, Skan AG Basel, CH) durchgeführt. Nach Start der Reaktion durch Injektion des Luciferin/Luciferase-Gemisches und Puffer in eine Küvette mit vorgelegtem Zellextrakt erfolgte 20 Sekunden lang die Messung der Lichtemission.

2.4.5 Ermittlung von Aminosäurekonzentrationen mittels HPLC (Jones und Gilligan, 1983)

Für die Bestimmung der internen und externen Aminosäurekonzentration wurden den Ansätzen 3 x 200 μl Zellsuspension entnommen und eine Siliconölzentrifugation durchgeführt. Die so erhaltenen Überstände wurden vereinigt und erneut kalt zentri-

fugiert. Ein Aliquot von 150 μl wurde mit 150 μl einer Ornithin/Azid-Lösung (0.2 mM Ornithin als interner Standard, 0.12 Natriumazid zur Verhinderung von Zellwachstum) vermischt und in die Analyse eingesetzt. Die Perchlorsäureextrakte wurden wie beschrieben aufgearbeitet. 3 x 70 - 80 μl wurden vereinigt, kalt zentrifugiert und 150 μl des so erhaltenen Überstandes wiederum mit 150 μl der Ornithin/Azid-Lösung vermischt. Die Analyse der Proben erfolgte mit einem HPLC-Gerät vom Typ HP 1090 M (Hewlett Packard, Waldbronn) und Fluoreszenzdetektor (HP 1046A). Vor jeder Analyse wurde je 1 μl Aminosäurelösung mit 10 μl *o*-Phtaldialdehyd/2-Mercaptoethanol-Fertigreagenz (Pierce Europe, B. V. Oud-Beijerland, Niederlande) zur automatischen Vorsäulenderivatisierung gemischt. Die Aminogruppen reagierten hierbei schnell und quantitativ zu fluoreszierenden, thiosubstituierten Isoindolen. Diese wurden auf einer "reversed phase"-Säule (Hypersil OD 18, 5 μm, Vorsäule: 20 x 4 mm, Hauptsäule: 150 x 4 mm, Chromatographie-Service, Langerwehe) bei 40°C mit einer Flußrate von 0.5 ml/min aufgetrennt. Eluiert wurde mit 0.1 M Natriumacetat, pH 7.2 und Methanol (0.06% Natriumazid wurden aus Sterilitätsgründen ebenfalls zugesetzt), wobei der jeweilige Anteil gemäß eines Gradientenprogramms während der Analyse (Gesamtlaufzeit 15.5 min) wie im folgenden dargestellt, variierte:

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

Die Aminosäurederivate eluierten entsprechend zunehmender Hydrophobizität von der Säule. Die Berechnung der Aminosäurekonzentrationen erfolgte mittels eines externen Standards, wobei die Werte gegebenenfalls über den internen Ornithinstandard korrigiert wurden. Zur Ermittlung der internen Konzentration wurden parallel ermittelte Raumbestimmungen einbezogen. Die Aminosäurekonzentration wurde korrigiert, indem die Fraktion der externen Aminosäure, welche die sedimentierten Zellen kon-

taminierte ("Taurinraum"), abgezogen wurde. Division des internen Aminosäuregehaltes durch das ermittelte Zellvolumen ergab die Aminosäurekonzentration.

2.4.6 Ermittlung der L-Alaninkonzentration mittels L-Alanin-Dehydrogenase (Williamson, 1985)

Die Methode basiert darauf, daß bei der oxidativen Desaminierung des Alanins zu Pyruvat durch die L-Alanin-Dehydrogenase NADH im stöchiometrischen Verhältnis gebildet und photometrisch bei 340 nm quantifiziert werden kann. Hierbei wurde das entstehende Pyruvat durch Hydrazin im Testpuffer als Hydrazon der Reaktion entzogen, so daß eine quantitative Umsetzung des L-Alanins erfolgte. Der Meßansatz sah wie folgt aus:

0.5 ml	Testpuffer
0.1 ml	NAD-Lösung (15 mM)
0.01 ml	L-Alanin-Dehydrogenase (5 mg/ml, Boehringer Mannheim)
0.34 ml	A. bidest

Testpuffer:	30 mM Tris
	1 mM EDTA
	3% Hydrazin pH 10

Nach Equilibrierung (3 min) wurde die Extinktion (E_1) bei 340 nm und 37°C bestimmt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0.05 ml Probe gestartet. Nach ca. 15 min wurde die Extinktion (E_2) bestimmt. Die Berechnug der L-Alaninkonzentration erfolgte nach Lambert-Beer.
Zur Ermittlung der L-Alaninkonzentration wurden die Zellen bekannter OD_{600} wie beschrieben mittels Ultraschall aufgeschlossen. Parallel wurden Raumbestimmungen zur Ermittlung der internen Konzentration durchgeführt.

2.4.7 Aufnahme von Aminosäuren

Die Zellen wurden, falls nicht anders angegeben, in Vollmedium angezogen und in der logarithmischen Phase bei einer Zelldichte von 0.35 - 0.5 mg Trockengewicht pro ml geerntet. Nach zweimaligem Waschen in MES-Puffer (100 mM MES, 10 mM NaCl, 10 mM KCl, 3 - 5% Glucose, pH 5.5) wurden die Zellen konzentriert in demselben Puffer aufgenommen (Zelldichte zwischen 2.1 und 2.4 mg Trockengewicht pro ml). Bis zu Versuchsbeginn wurden die Zellen auf Eis aufbewahrt. Zur Ermittlung der Aufnahme wurden die Zellen zunächst 5 min bei 30°C vorinkubiert. Sofern nicht anders angegeben, wurden 3 mM Aminooxyacetat, ein Inhibitor von Aminotransferasen, zugesetzt. Anschließend wurde die Aufnahme durch Zugabe des Substrates gestartet. Zu definierten Zeitpunkten wurde die Aufnahme mittels Siliconölzentrifugation gestoppt. Pipettiert wurden 100 μl bei markiertem, 200 μl Zellsuspension bei nicht-markiertem Substrat. Bei Experimenten zur pH-Abhängigkeit wurden Zellen auf die 10-fache OD_{600} eingeengt und in Puffer mit entsprechend eingestelltem pH-Wert 10-fach verdünnt.

2.4.8 Ermittlung der Alanin-Sekretion

Zur Ermittlung der Sekretion wurde *Z. mobilis* CP4-thi/pZY73 wie unter 2.3.3. beschrieben, angezogen. Bis zu Beginn des Experimentes wurden die Zellen in Minimalmedium, pH 6 mit 5% Glucose bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert und in 37°C temperiertem Alaninproduktionsmedium mit einer Zelldichte von 2.4 - 3.6 mg TG / ml aufgenommen und bei 37°C ohne Schütteln im Wasserbad inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurden Aliquots von 200 μl entnommen. Die Sekretion wurde mittels Siliconölzentrifugation in der Perchlorsäureschicht gestoppt, die Aufarbeitung der Proben und Ermittlung der externen und internen Alaninkonzentration erfolgte wie unter 2.4.1. respektive 2.4.5. beschrieben.

Zur Ermittlung der Temperaturabhängigkeit bzw. pH-Abhängigkeit wurden die Zellen eingeengt und in Alaninproduktionsmedium mit einer hohen OD aufgenommen.

Anschließend wurden die Zellen in entsprechend vortemperiertem Produktionsmedium bzw. entsprechend eingestelltem pH-Wert 10-fach verdünnt.
Experimente zur Untersuchung der Hemmung der Alanin-Sekretion erforderten in jedem Fall vor Inhibitorzugabe eine Vorinkubation der Zellen in Alaninproduktionsmedium, um den Aufbau einer hohen Alaninkonzentration zu ermöglichen.

2.4.9 Ermittlung der internen Kaliumkonzentration

a) Ermittlung der Kaliumkonzentration mittels Ionenchromatographie

Die Zellen wurden analog zur Aufnahmemessung behandelt, d.h. nach Zentrifugation wurden sie zweimal in MES-Puffer, pH 5.0 bzw. pH 5.5 10 mM NaCl und 5% Glucose gewaschen und in demselben Puffer suspendiert (Zelldichte 2.1 - 2.4 mg TG/ml). Die zugesetzte Kaliumkonzentration des Puffers betrug 0.3 - 0.5 mM. Beckman-Röhrchen wurden mit 65 μl Siliconöl gefüllt. Zu definierten Zeitpunkten wurden 200 μl Zellsuspension auf die Ölschicht pipettiert und einer Siliconölzentrifugation unterworfen. Die Zellen sedimentierten im Siliconöl. Durch Zentrifugation wurden die Sedimente in Eppendorf-Gefäße überführt und in 200 μl CTAB (0.02%) mit nachfolgender 10- minütiger Beschallung im Ultraschallbad bei Raumtemperatur extrahiert. Die Proteine wurden durch 10-minütiges Kochen ausgefällt. Durch anschließende Ultrazentrifugation bei 4°C (20 min, Ti 50 Rotor, 40000 rpm) wurden Zellreste und Proteine entfernt sowie die Öl-Wasser-Phase getrennt. Die so erhaltenen Überstände wurden ionenchromatographisch analysiert. Parallel wurden Raumbestimmungen zur Ermittlung der internen Konzentration durchgeführt. Hierbei wurden die Werte bezüglich der im "Taurinraum" mitgeschleppten Kaliumkonzentrationen korrigiert. Die Analyse wurde mit einem Ionenchromatographen (S 1000, Sykam) mit angeschlossenem Leitfähigkeitsdetektor (S 3110, Sykam) durchgeführt. Die Trennung erfolgte auf einem Kationenaustauscher auf Polystyrolbasis (LCA KO1). Hierzu wurden 5 - 10 μl des wie oben beschriebenen, filtrierten Zellextraktes injiziert. Eluiert wurde mit 3,5 mM HNO_3 bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 1 ml/ min. Die Detektion erfolgte indirekt über eine Messung der Leitfähigkeit, d.h. die Kationen wurden im Leitfähigkeitsdetektor als Erniedrigung der Gesamt-Leitfähigkeit regi-

striert. Sowohl MES als auch CTAB führten zu keiner Störung der Analyse.

b) Ermittlung der Kaliumkonzentration bzw. des Kaliumgradienten mittels der Verteilung von $^{86}Rb^+$

Die Zellen wurden wie unter a) beschrieben behandelt. Nach dem Waschvorgang wurden extern variierende Kaliumkonzentrationen zugesetzt. 400 μl Zellsuspension wurden mit 5 μl $^{86}Rb^+$(5 kBq) vermischt. Nach 15 min wurde mit dreimal 100 μl Zellsuspension eine Siliconölzentrifugation durchgeführt. Die Aufarbeitung der Zellextrakte und der parallel durchgeführten Raumbestimmungen wurden wie unter 2.4.1. beschrieben durchgeführt. Anhand der so ermittelten $^{86}Rb^+$-Verteilung konnte direkt auf den Kaliumgradienten geschlossen werden.

2.4.10 Herstellung von Rohextrakten

Zur Herstellung eines Rohextraktes wurden die Zellen in der exponentiellen Phase geerntet und in frischem Medium aufgenommen. Ein Aliquot von 0.4 ml Zellsuspension wurde in ein Eppendorf Cup gegeben und 6 mal 30 Sekunden (nach 30 Sekunden je 1 min Beschallpause) mit einem Ultraschall-Desintegrator bei 60 Watt aufgeschlossen. Die Zellen wurden während der Beschallung im Eisbad gekühlt. Die Zellfragmente wurden anschließend durch Zentrifugation (Sigma Kühlzentrifuge, 20 min, 13000 rpm, 4°C) abgetrennt. Es folgte eine Ultrazentrifugation (Ultrazentrifuge, 2 h, 40000 rpm, 4°C). Die erhaltenen Überstände wurden direkt für Messungen der Alanin-Dehydrogenaseaktivität eingesetzt.

2.4.11 Proteinbestimmung (Bradford, 1976)

Hierzu wurden 0.05 ml Rohextrakt in entsprechender Verdünnung mit 2.5 ml Bradford Reagenz gemischt. Nach 1 Minute wurde die Extinktion bei 578 nm gegen einen

Leerwert (Bradford Reagenz ohne Protein) gemessen. Die Proteinkonzentration der Proben wurde anhand einer Eichgeraden mit Rinderserumalbumin ermittelt.

Bradford Reagenz:	100 ml	85%-ige o-Phosphorsäure
	40 mg	Serva Blau G, gelöst in
	50 ml	95%-igem Ethanol
ad 1000 ml A. bidest		

2.4.12 Ermittlung der L-Alanin-Dehydrogenaseaktivität (Williamson, 1985)

Die Bestimmung der Alanin-Dehydrogenaseaktivität erfolgte vergleichbar der Ermittlung der L-Alaninkonzentration (2.4.6.). Die Extinktion wurde bei 37°C (temperierte Küvette) und 340 nm verfolgt.

Reaktionsansatz:

0.5 ml	Testpuffer
0.1 ml	NAD-Lösung (15 mM)
0.35 - x ml	A. dest
x ml	Rohextrakt

Nach Equilibrieren wurde die Reaktion durch Zugabe von 0.05 ml L-Alanin (100 mM) gestartet.

Die Berechnung der spezifischen Aktivität erfolgt nach Lambert-Beer. Die spezifische Aktivität wurde in U/mg Protein angegeben, wobei eine Enzymeinheit 1 μmol Produkt entspricht, das in 1 min unter diesen Bedingungen gebildet wurde.

3. ERGEBNISSE

3.1 Die energetischen Parameter von *Zymomonas mobilis*

Zymomonas mobilis gewinnt ATP ausschließlich über den Entner-Doudoroff-Weg und verfügt somit nur über eine geringe Energieausbeute. Eine mit der Elektronentransportkette gekoppelte oxidative Phosphorylierung wurde bisher noch nicht nachgewiesen. Über den Energiestatus von *Z. mobilis* lagen noch keine ausreichenden Daten vor. Die genaue Kenntnis der energetischen Parameter war jedoch in Hinblick auf die in dieser Arbeit zu klärenden Transportprozesse bei *Z. mobilis* notwendig. So setzen Untersuchungen von primären und sekundären Transportsystemen bezüglich Mechanismus und Energiekopplung eine Quantifizierung der möglichen treibenden Kräfte, d.h. des Membranpotentials, des Protonengradienten sowie des cytosolischen ATP-Gehaltes voraus. Zunächst wurden deshalb die energetischen Parameter von *Z. mobilis* ermittelt, um die Kopplung des zu untersuchenden Transportprozesses einem der energetischen Parameter eindeutig zuzuordnen. Methoden zur Ermittlung dieser Parameter mußten bei *Z. mobilis* z.T. noch etabliert werden.

3.1.1 Der cytosolische ATP-Gehalt

Der ATP-Gehalt wurde wie unter 2.4.4 beschrieben ermittelt. Bei energetisierten Zellen wurde eine Konzentration zwischen 4 und 5 mM bestimmt. Glucoseverarmte Zellen wiesen mit maximal 0.1 mM (Nachweisgrenze) eine ungewöhnlich niedrige Konzentration auf. Es konnte gezeigt werden, daß der ATP-Gehalt sowohl in Gegenwart hoher Konzentrationen des Entkopplers CCCP als auch hoher Salzkonzentrationen nicht beeinflußt wurde (Tab. 1).

3.1.2 Der pH-Gradient

Der pH-Gradient wurde bei externen pH-Werten von 4.0 - 8.0, wie unter 2.4.3.2 beschrieben, mit den Sonden ^{14}C-Benzoat und ^{14}C-Methylamin ermittelt. In einem weiten Bereich des externen pH (pH 4.0 - 7.0) wurde eine ausgeprägte pH-Homöostase fest-

gestellt, wobei der interne pH-Wert bei pH 6.0 - 6.4 lag (Abb. 1). Deenergetisierung der Zellen führte zu einem vollständigen Abbau des Protonengradienten.

Tab. 1: Der cytosolische ATP-Gehalt von *Z. mobilis* Zm6

Zellen	ATP [mM]
glucose-supplementiert	3.6 - 4.5
glucose-verarmt	0.1[b)]
+ CCCP (100 μM)	4.0
NaCl (300 mM)	3.9
KCl (300mM)	3.9

b) Nachweisgrenze

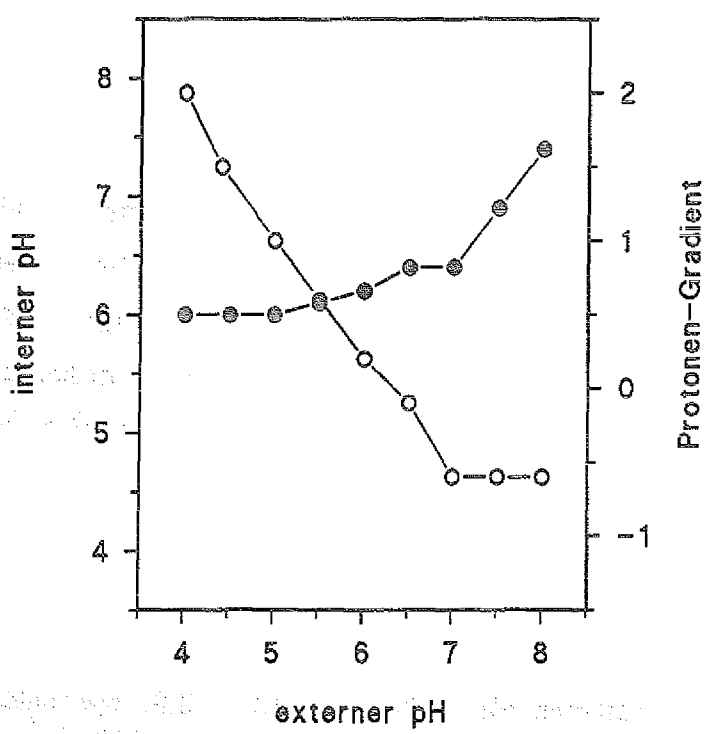


Abb. 1: Abhängigkeit des Protonengradienten (○) bzw. des internen pH (●) vom externen pH. Der pH-Gradient wurde wie in Material und Methoden beschrieben ermittelt.

3.1.3 Das Membranpotential

Zur Ermittlung des Membranpotentials wurden zunächst konventionelle Methoden erprobt, die routinemäßig bei Bakterien angewandt werden. Hierbei handelte es sich zum einen um Bestimmungen mittels der lipophilen Sonde Tetraphenylphosphoniumbromid (TPP^+), zum anderen wurde die Verteilung von $^{86}Rb^+$ in Gegenwart von Valinomycin ermittelt.

3.1.3.1 Versuche zur Ermittlung des Membranpotentials mit TPP^+

Wie bereits beschrieben (Kalnenieks et al., 1987) zeigte sich, daß die lipophile Sonde TPP^+ sich nicht frei entsprechend des elektrischen Gradienten über die Membran verteilte, d.h. es wurde keine interne Akkumulation der Sonde nachgewiesen. Die im Sediment ermittelte Markierung war auf unspezifische Bindung von TPP^+ zurückzuführen. Deenergetisierung der Zellen mit CCCP führte zu keiner signifikanten Änderung der Adsorption der Sonde. Dieses Phänomen wurde auch bei anderen Gram-negativen Bakterien wie z.B. *E. coli*, beschrieben (Bakker, 1990). Hier wurden diese Probleme gelöst, indem die äußere Membran durch Behandlung mit EDTA destabilisiert und somit für die Sonde permeabilisiert wurde (Padan und Rottenberg, 1973). Versuche zur Destabilisierung der äußeren Membran von *Z. mobilis* mit EDTA (3 mM) führten zu keiner korrekten Verteilung von TPP^+. Ebenso war nach Absättigung der unspezifischen hydrophilen Bindestellen mit Tetraphenylboron (TPB^-), welches die Membran nicht permeieren kann, keine Verbesserung zu erzielen.

3.1.3.2 Die Verteilung von $^{86}Rb^+$ in Gegenwart von Valinomycin

Die Verteilung von $^{86}Rb^+$ in Gegenwart von Valinomycin ist eine generell angewandte Methode zur Ermittlung des Membranpotentials (Rottenberg, 1979; Ahmed und Booth, 1983; Kashket, 1983). Diese Methode basiert darauf, daß $^{86}Rb^+$ sich wie K^+ in Gegenwart des Kalium-Ionophors Valinomycin frei über die Membran entlang des elektrischen Gradienten entsprechend der Nernstschen Gleichung verteilt. Bei hohen externen Kaliumkonzentrationen wird ein künstlich eingestelltes K^+-Diffusionspotential ermittelt, welches

entsprechend der extern eingestellten Kaliumkonzentration variiert. Bei sehr niedrigen externen Kaliumkonzentrationen wird dagegen das tatsächliche Membranpotential gemessen. Zur Durchführung des Experimentes wurden die Zellen in Puffer mit 0.3 mM KCl gewaschen und variierende Konzentrationen von KCl zugesetzt. Wie aus Abb.2 zu erkennen, wurden Membranpotentiale von -130 mV (bei pH 5.5) bzw. -85 mV (bei pH 5.0) ermittelt. Die Steigung der Geraden betrug ca. - 50 mV für einen 10-fachen Anstieg der externen Kaliumkonzentration, wobei dieser Wert nahe dem theoretisch maximalen Wert bei -59 mV lag.

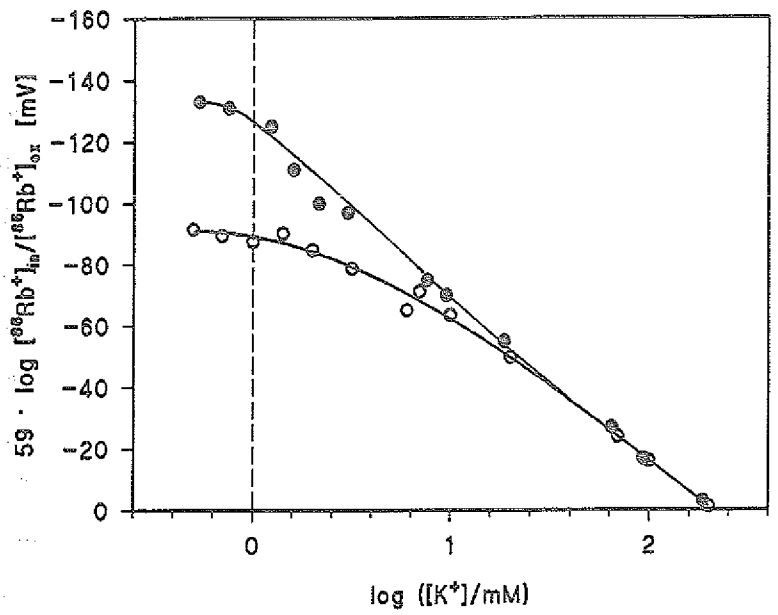


Abb.2: Der elektrische Gradient 59 log $[^{86}Rb^+]_{in}/[^{86}Rb^+]_{ex}$ in Abhängigkeit von der externen Kaliumkonzentration bei pH 5.0 (○) und pH 5.5 (●). Die Ansätze wurden jeweils mit 100 μM Valinomycin und der entsprechenden Kaliumkonzentration 10 min vorinkubiert (s. Text).

Diese Ergebnisse deuteten zunächst darauf hin, daß diese Methode auch bei *Z. mobilis* anzuwenden war. Es zeigte sich jedoch, daß sich K^+ bzw. $^{86}Rb^+$ nicht, wie nach Insertion von Valinomycin in die Membran zu erwarten, innerhalb von Sekunden entsprechend des elektrischen Gradienten verteilte. Valinomycin wurde deshalb auf seine Wirksamkeit hin überprüft. In Parallelansätzen wurde die Zeitabhängigkeit der Gleichgewichtseinstellung von extern zugesetztem $^{86}Rb^+$ nach 10-minütiger Vorinkubation mit Valinomycin (100 μM) bzw. ohne Valinomycin untersucht. Zugabe des K^+-Ionophors

sollte aufgrund der für K^+- und $^{86}Rb^+$-Ionen spezifischen Permeabilisierung der Membran zu einer sofortigen Verteilung des $^{86}Rb^+$ (innerhalb von Sekunden) entsprechend des Kalium-Diffusionspotentials führen. Wie aus Abb.3 zu erkennen, war in beiden Fällen erst nach 15 min eine stabile Verteilung des $^{86}Rb^+$ entsprechend des Kaliumgradienten erreicht. Nach Einstellung des Gleichgewichts wurde der Entkoppler CCCP zugesetzt, was zum Absinken der internen Kaliumkonzentration und schließlich zum Ausgleich von internem und externem Kalium führte.

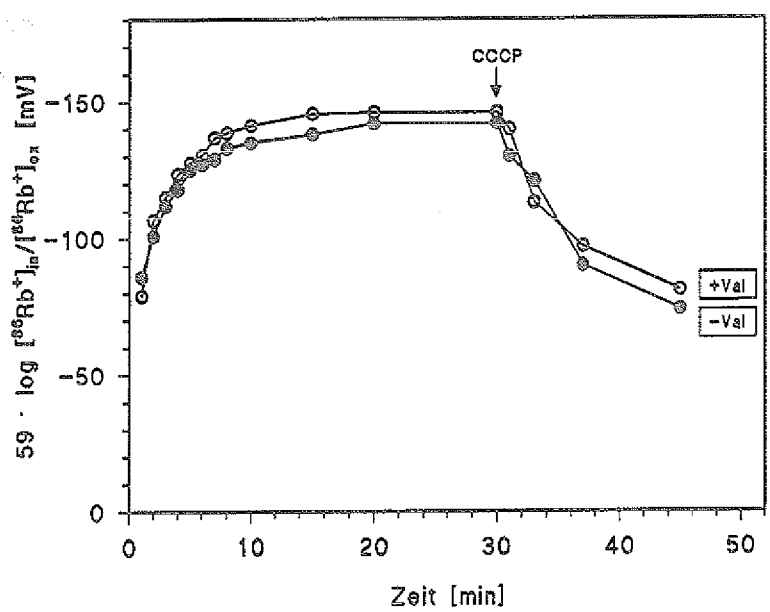


Abb.3: **Überprüfung der Wirksamkeit von Valinomycin.** Die Gleichgewichts-Einstellung des elektrischen Gradienten 59 log $[^{86}Rb^+]_{in}/[^{86}Rb^+]_{ex}$ wurde sowohl mit (○) als auch ohne (●) Valinomycin beobachtet. Nach 30 min wurden 100 μM CCCP zugesetzt (Pfeil).

Weder höhere Valinomycinkonzentrationen (bis zu 200 μM) noch längere Vorinkubationen führten zu einer Beschleunigung der Verteilung. Ebenso war nach Zusatz von EDTA (3 mM) zur Destabilisierung der äußeren Membran keine schnellere Verteilung von $^{86}Rb^+$ festzustellen. Diese Ergebnisse ließen den Rückschluß zu, daß der $^{86}Rb^+$-Flux auch nach Zugabe von Valinomycin ausschließlich auf carrier-vermittelten Kaliumtransport beruht. Valinomycin wirkt in *Z. mobilis* nicht als K^+-Ionophor, da es wahrscheinlich nicht in die Cytoplasmamembran inserieren kann. Eine freie Diffusion und Verteilung von $^{86}Rb^+$ entsprechend der Nernstschen Gleichung wurde demnach nicht beobach-

tet. Bei den Experimenten zur Ermittlung des Membranpotentials wurde somit auch kein K^+-Diffusionspotential, sondern der Kaliumgradient bei variierenden externen Kaliumkonzentrationen ermittelt. Zugabe von CCCP führte, wie in Abb.3 dargestellt, zum $^{86}Rb^+$-Efflux, d.h. zum Abbau des Kaliumgradienten. Dies kann als ein Hinweis auf ein sekundär getriebenes K^+-Transportsystem gewertet werden (siehe Diskussion).

Ermittlung der internen Kaliumkonzentration bei *Z. mobilis*

Die $^{86}Rb^+$-Methode ließ sich nun, ohne Zusatz von Valinomycin, nach Einstellung des Gleichgewichts über Messung von $[^{86}Rb^+]_{in}/[^{86}Rb^+]_{ex}$ zur Ermittlung von Kaliumgradienten bzw. internen Kaliumkonzentrationen bei variierenden externen Kaliumkonzentrationen nutzen. Die absolute interne Kaliumkonzentration wurde bei einer externen

K^+_{ex} [mM]	K^+_{in} [mM]
0.50	86
0.75	120
0.94	118
1.3	129
1.7	130
2.2	130
3.1	138
7.7	143
9.5	146
18.6	160
64.5	184
92.1	184
184.0	207

Tab. 2: Einfluß der externen Kaliumkonzentration auf die interne Kaliumkonzentration bei pH 6.0. Die Kalium-Gradienten wurden über die Verteilung von $^{86}Rb^+$ nach 10-minüiger Inkubation ermittelt.

Kaliumkonzentration von 0.5 mM zunächst ionenchromatographisch bestimmt. Hierzu wurden die Zellen mit CTAB aufgeschlossen und der Überstand in die Bestimmungen eingesetzt. Bei pH 5.5 wurde bei einer externen Konzentration von 0.5 mM eine interne Konzentration von 86 mM K^+ ermittelt. Aus den in Abb.2 dargestellten Kaliumgradien-

ten ließen sich so die jeweils tatsächlichen internen bzw. externen Konzentrationen und somit die K^+-Verschiebungen bei den variierenden externen Konzentrationen ermitteln (Tab.2). Es konnte so gezeigt werden, daß bei *Z. mobilis* eine gute K^+-Homöostase vorliegt. Der Abbau des Kaliumgradienten nach Zugabe von CCCP konnte auch ionenchromatographisch bestätigt werden.

3.1.3.3 Ermittlung des Membranpotentials mittels SCN^-

Die Sonde ^{14}C-SCN^- (Thiocyanat) wurde bisher aufgrund ihrer Ladung ausschließlich bei Potentialen mit umgekehrter Polarität (innen positiv), verwendet (Cox et al., 1979; Matin et al., 1982). In dieser Arbeit wurde versucht, aufgrund der beschriebenen Meßprobleme mit positiv geladenen Sonden das Potential von *Z. mobilis* (innen negativ) mittels der negativ geladenen Sonde SCN^- über Abreicherung im Zellinnenraum zu ermitteln. Als vorteilhaft bei dieser Methode erwies sich aufgrund der nun bekannten Schwierigkeiten, daß keine Ionophore notwendig waren. Tatsächlich konnte mit SCN^- zum ersten Mal das Membranpotential bei *Z. mobilis* korrekt ermittelt werden. Infolge der negativen Ladung sank die cytosolische SCN^--Konzentration mit steigenden elektrischen Potentialen (innen negativ) entsprechend des Nernst-Potentials. Bedingt hierdurch wurde der Bereich zur Messung von Membranpotentialen von 0 bis -100 mV limitiert. Höhere Potentiale (bis -100 mV) waren nur mit entsprechend hohen Standardabweichungen meßbar. Eine unspezifische Bindung der Probe wurde nicht festgestellt. Die Sonde äquilibrierte sofort entsprechend des Membranpotentials, wobei über einen Zeitraum von 30 min keine Änderung auftrat.

Generell ist bei Bakterien bekannt, daß die protonenmotorische Kraft (Δp) bei Veränderungen des externen pH in etwa konstant gehalten wird, indem der Anteil von $\Delta\Psi$ und $Z \cdot \Delta pH$ entsprechend der Gleichung $\Delta p = \Delta\psi - Z \cdot \Delta pH$ variiert (Padan et al., 1981, Booth, 1985, 1988). Wurden ΔpH (^{14}C Benzoat) und $\Delta\psi$ (^{14}C-SCN^-) bei niedrigen externen pH-Werten zwischen pH 4.0 und 5.5 gemessen, d.h. in einem Bereich, in dem beide Komponenten von Δp direkt bestimmt werden konnten, wurde auch bei *Z. mobilis* eine relativ konstant bei -132 bis -138 mV gehaltene protonenmotorische Kraft nachgewiesen, wobei auch hier die Komponenten ΔpH und $\Delta\psi$ signifikant variierten (Abb.4). Wie bereits erwähnt, wiesen die Zellen zwischen pH 4.0 und 6.5 eine effektive pH-Homöostase mit einem internen pH von 6.0 - 6.4 auf. Wurde nun entsprechend eine bis

zu pH 6.5 konstant gehaltene protonenmotorische Kraft von -137 mV angenommen, ließ sich die elektrische Komponente von Δp von pH 5.5 bis 6.5 unter Berücksichtigung der direkt ermittelten Werte für ΔpH errechnen (Abb.4, gestrichelte Linie).

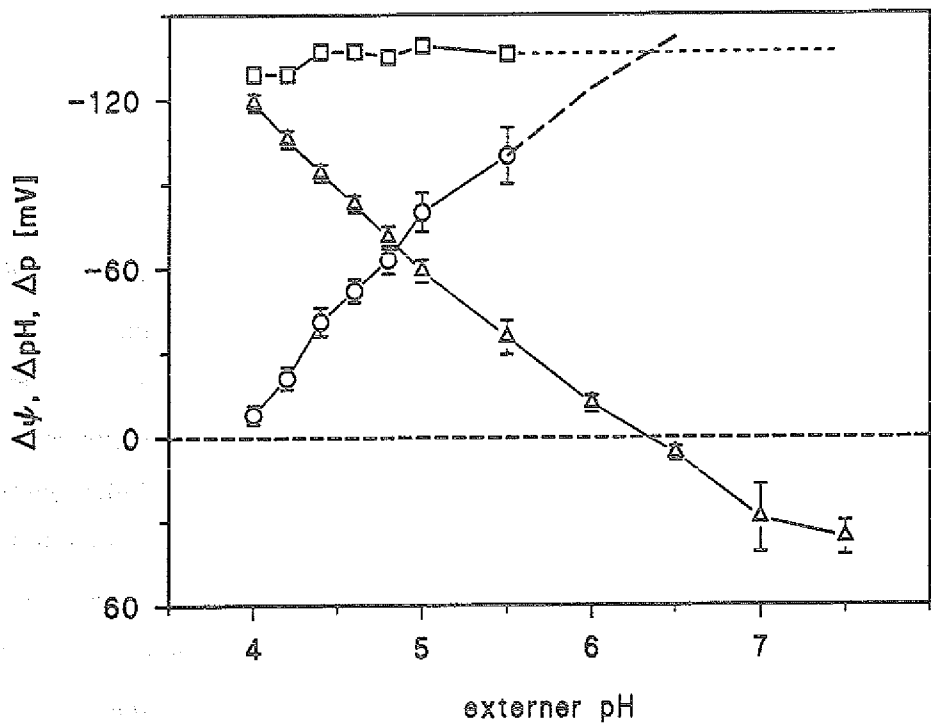


Abb.4: **Abhängigkeit von ΔpH (△), ΔΨ (○) und Δp (□) vom externen pH.** Der pH-Gradient (von pH 4.0 - pH 7.5) und Δψ (von pH 4.0- pH 5.5) wurden wie in Material und Methoden bzw. in Kap. 1.3.3 beschrieben ermittelt. Die Standardabweichungen für Δψ und ΔpH-Messungen basierten auf 6 unabhängigen Bestimmungen. Das Membranpotential für Werte oberhalb von pH 5.5 wurde unter Annahme einer konstanten protonenmotorischen Kraft von -137 mV in diesem Bereich errechnet.

3.1.3.4 Möglichkeiten zur Variierung und Differenzierung der energetischen Parameter.

Glucoseverarmung der Zellen führte zu einem unmittelbaren Abfall sowohl des ATP-Gehaltes als auch der protonenmotorischen Kraft. Nach erneuter Zugabe von Glucose stiegen beide Parameter wieder auf die normalen Werte an (Abb.5). Auffällig war im Vergleich zu anderen Bakterien der vollständige Abbau des ATP-Gehaltes nach Deenergetisierung der Zellen.

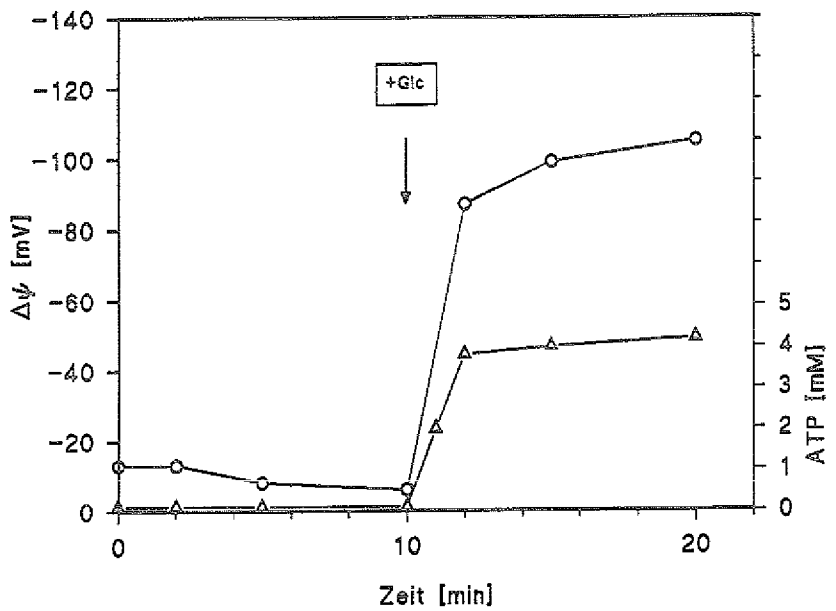


Abb.5: **Anstieg von ΔΨ (O) und ATP-Gehalt (Δ) vollständig deenergetisierter Zellen nach Glucosezugabe.** Der ATP-Gehalt wurde wie in Material und Methoden, Δψ mit der Sonde SCN^- wie in Kap.1.3.3 beschrieben, ermittelt.

Es zeigte sich, daß Zugabe des Protonophors CCCP bei einer ausreichend hohen Konzentration wie erwartet zu einer Entkopplung der Zellen führte. Zur vollständigen Entkopplung waren mindestens 80 μM CCCP notwendig (Abb. 6). Da *Z. mobilis* die protonenmotorische Kraft über eine protonenpumpende ATPase aufbaut und ATP ausschließlich über Substratkettenphosphorylierung gewonnen wird, sollte der ATP-Gehalt durch CCCP nicht abgebaut werden. Dies wurde experimentell bestätigt, wobei der ATP-Gehalt bis zu einer Konzentration von 100 μM CCCP nicht beeinflußt wurde und konstant 4 mM betrug. Über Zugabe des Entkopplers ergab sich somit die Möglichkeit, zum einen das Membranpotential zu variieren, zum anderen zwischen den Parametern ATP und Membranpotential zu differenzieren. Dies war insofern sehr vorteilhaft, da das sonst für diese Fragestellung eingesetzte Valinomycin bei *Z. mobilis* nicht anzuwenden war. Zur Entkopplung der Zellen wurden routinemäßig 100 μM CCCP eingesetzt.

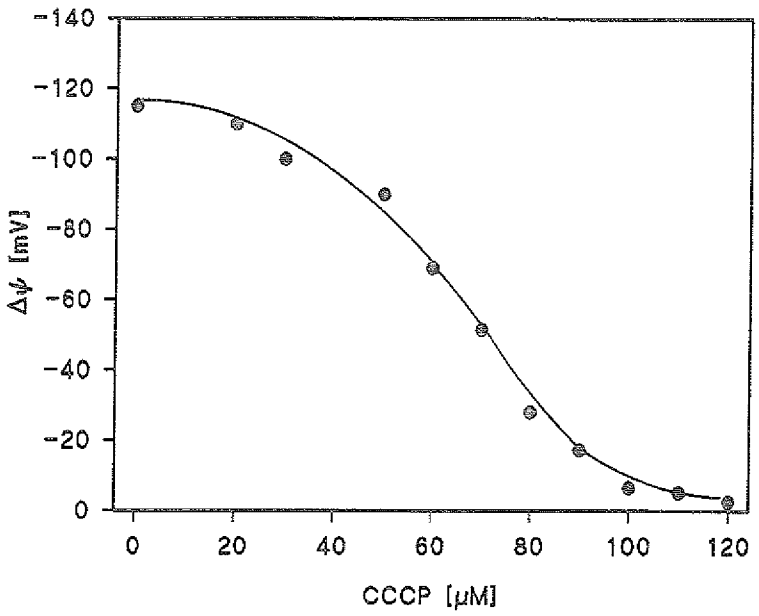
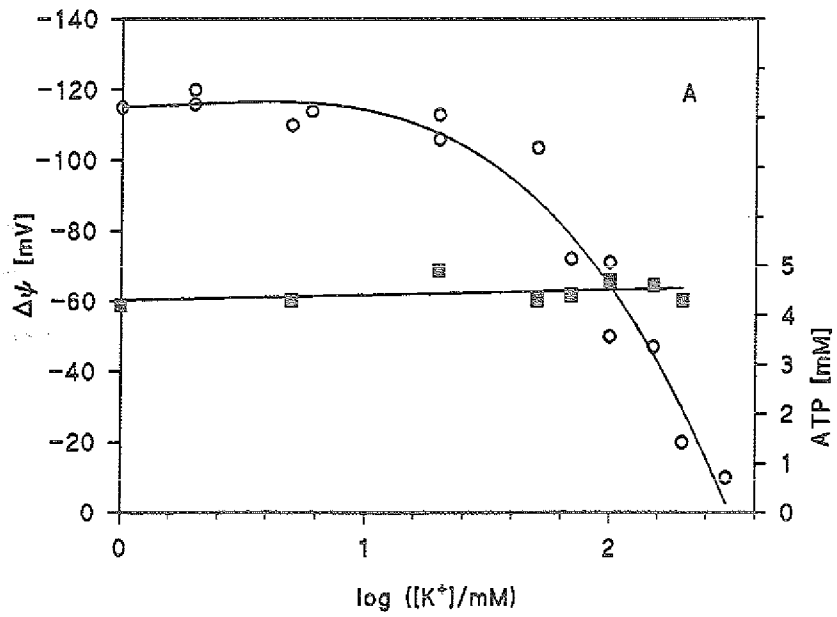


Abb.6: **Abhängigkeit des Membranpotentials von der CCCP-Konzentration.** Den Ansätzen wurden CCCP-Konzentrationen von 0 (Kontrolle) bis 120 μM zugesetzt und 3 min vorinkubiert. Nach Zugabe der Sonde SCN^- wurden die Ansätze weitere 3 min bei 30°C inkubiert und anschließend Δψ ermittelt. Ermittlung von Δψ s. Abb. 4.

Eine weitere Möglichkeit, das Membranpotential zu variieren, bestand in der Zugabe hoher Salzkonzentrationen. In der Literatur wurde bereits die Salzintoleranz von *Z. mobilis* beschrieben, wodurch bei hohen Salzkonzentrationen bei Fermentationen von Molasse nur sehr schlechte Wachstumsraten ermittelt wurden (Rogers et al., 1984). Abb.7a zeigt das Membranpotential (kein K^+-Diffusionspotential) von *Z. mobilis* in Abhängigkeit von der externen Kaliumkonzentration. Oberhalb von 20 mM K^+ war mit steigender Salzkonzentration ein Absinken des Membranpotentials zu beobachten. Die Kurve wies eine Steigung von -60 mV für einen 10-fachen Anstieg der externen Kaliumkonzentration auf. Die Ermittlung der Abhängigkeit des Membranpotentials von der externen Kaliumkonzentration in Gegenwart von Valinomycin bzw. Valinomycin und EDTA in entsprechenden Konzentrationen ergab mit o.g. Durchführung deckungsgleiche Kurven. Die Herabsetzung des Membranpotentials infolge erhöhter, externer Salzkonzentrationen mußte sich, da es sich um kein Diffusionspotential handelt, aufgrund von Carrier-Aktivitäten erklären lassen (siehe Diskussion). Der ATP-Gehalt blieb auch bei sehr hohen K^+-Konzentrationen konstant. Des weiteren wurde überprüft, ob es sich bei der Herabsetzung des Membranpotentials um einen spezifischen Kalium- oder um einen generellen Salzeffekt handelt. Nach Zugabe steigender Konzentrationen von Natrium bzw. Magnesium ergaben sich vergleichbare Befunde (Abb.7b). Zusatz des zweiwertigen

Kations führte, entsprechend der Wertigkeit, bereits bei geringeren Konzentrationen zum Absinken des Potentials.



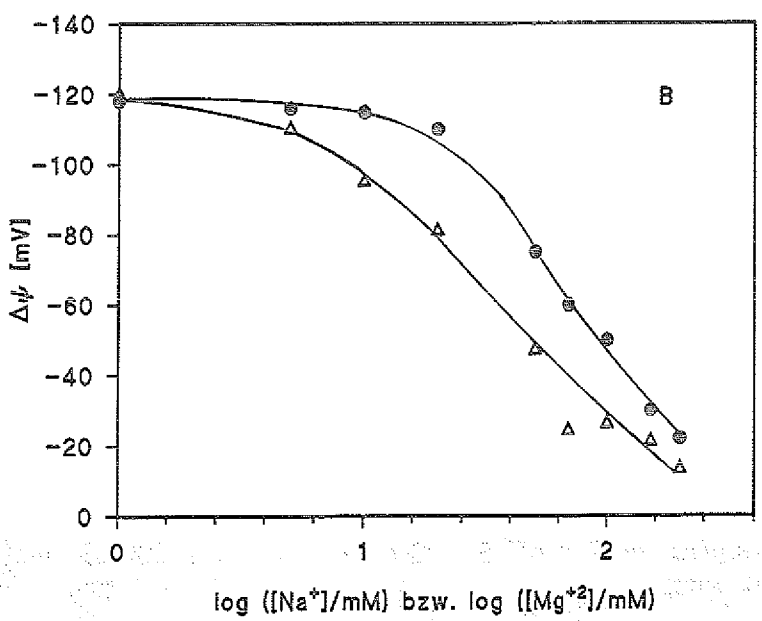


Abb.7: **Abhängigkeit des Membranpotentials von der (A) externen K^+-(○) bzw. (B) Na^+ (●) und Mg^{2+}-Konzentration (△).** Der ATP-Gehalt unter den gegebenen Bedingungen ist unter (A) dargestellt (▣). Die Ansätze wurden jeweils 10 min mit der entsprechenden Salzkonzentration vorinkubiert. Ermittlung von ATP bzw. $\Delta\Psi$ s. Abb.5.

3.2. Die Glutamat-Aufnahme in *Zymomonas mobilis*

3.2.1 Kinetische Parameter und grundlegende Eigenschaften der Glutamat-Aufnahme in *Z.mobilis*

3.2.1.1 Grundlegende Eigenschaften der Glutamat-Aufnahme

Der Wildtyp *Z. mobilis* Zm6 nimmt radioaktiv markiertes L-[^{14}C]-Glutamat nur in Gegenwart einer C-Quelle auf (Abb.8). Sowohl bei Glucoseverarmung der Zellen als auch nach Zusatz des Entkopplers CCCP in ausreichend hohen Konzentrationen wurde nur eine sehr geringe Glutamat-Aufnahme nachgewiesen. In allen weiteren Messungen zum Glutamat-Transport wurde deshalb Glucose zugesetzt (3-5%). Bereits innerhalb der ersten Minuten war eine nichtlineare Aufnahmekinetik festzustellen.

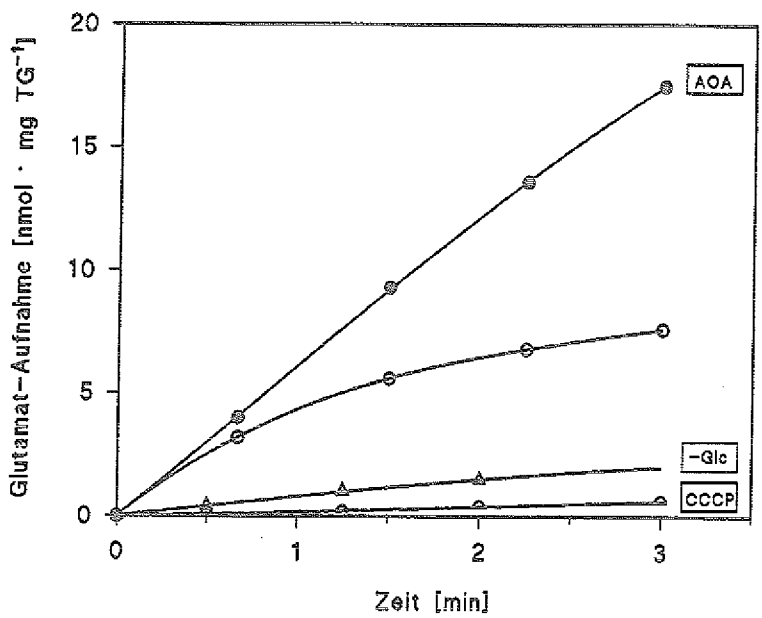


Abb.8: **Glutamat-Aufnahme bei pH 5.5.** Die Aufnahme von 200 μM markiertem L-Glutamat wurde nach 10 min Vorinkubation mit (○) bzw. ohne (△) 150 mM Glucose gemessen. Außerdem wurden glucosesupplementierte Zellen mit 3 mM AOA (●) bzw. 100 μM CCCP inkubiert (⌓).

Wurde jedoch die Glutamat-Aufnahme mittels HPLC durch Messung der Abnahme des externen Glutamates verfolgt, war innerhalb der ersten 4 Minuten eine lineare Aufnahmekinetik meßbar (nicht gezeigt). Bezüglich der initialen Aufnahmeraten führten beide

Methoden zu denselben Ergebnissen. Hieraus konnte geschlossen werden, daß kinetische Messungen über Detektion sowohl von markiertem als auch nicht-markiertem internem Substrat durch die intrazelluläre Metabolisierung des Glutamates beeinflußt wurden. Wurden sehr hohe externe Glutamatkonzentrationen zugesetzt (mindestens 1 mM Anfangskonzentration), so ließ sich nach Gleichgewichtseinstellung der internen Glutamatkonzentration aus der Abnahme der externen Konzentration eine Metabolisierungsrate von max. 4-5 nmol min^{-1} mg TG^{-1} ermitteln. Dies war jedoch nur bei hohen Glutamatkonzentrationen möglich, da unter diesen Bedingungen die Aufnahmerate höher als die Metabolisierungsrate war und die Metabolisierungsrate nicht aufgrund einer limitierenden Aufnahmerate unterschätzt wurde.

Ein signifikanter Einbau von Glutamat bei der Proteinbiosynthese war auszuschließen. So hatten Vorversuche gezeigt, daß Chloramphenicol zu einer Wachstumshemmung führt, andererseits zeigte sich jedoch bei Messungen der Glutamat-Aufnahme mit nicht-markiertem Substrat nach Zusatz von Chloramphenicol zur Hemmung der Proteinbiosynthese keine Änderung der Aufnahmerate (nicht gezeigt).

Es wurde deshalb vermutet, daß die Metabolisierung in einer Transaminierung bestand. Um dieses Problem zu lösen, wurde den Ansätzen zur Messung der Aufnahme Aminooxyacetat (AOA), ein Inhibitor von Aminotransferasen und anderen Pyridoxalphosphat-abhängigen Enzymen, zugesetzt. Abb.9 zeigt Aufnahmekinetiken von Glutamat in

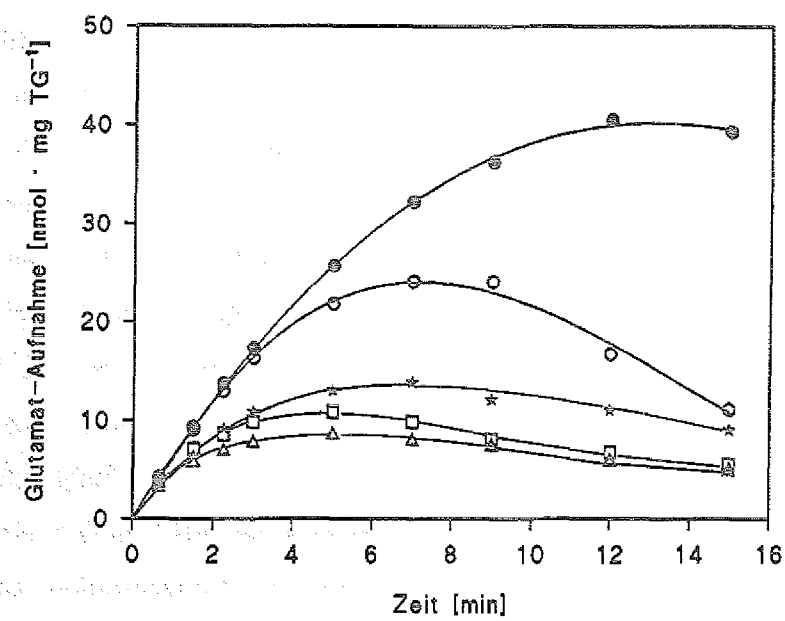


Abb.9: **Glutamat-Aufnahme bei pH 5.5 in Gegenwart steigender AOA-Konzentrationen.** (△) 0 mM, (□) 1 mM, (○) 2 mM, (●) 3 mM, (☆) 5 mM AOA. Eingesetzt wurden 200 μM Glutamat.

Gegenwart verschiedener Konzentrationen von AOA nach 5 minütiger Vorinkubation. Eine Konzentration von 3 mM des Inhibitors (Endkonzentration) erwies sich als optimal geeignet. So wurde bis zu 3 min eine lineare Aufnahme gemessen sowie eine höhere interne Glutamatkonzentration erreicht, während die AOA-Konzentration nicht mit der Glutamat-Aufnahme interferierte. Niedrigere Konzentrationen zeigten keine effektive Verlangsamung des Metabolismus, höhere Konzentrationen führten zu einer zunehmenden Hemmung (Reduzierung) der Glutamat-Aufnahme (Abb.9). In den folgenden Versuchen wurde eine Konzentration von 3 mM AOA eingesetzt.

Es erwies sich als nicht notwendig, die Transportmessungen anaerob durchzuführen. So wurden sowohl unter N_2-Begasung als auch im aerob durchgeführten Kontrollexperiment keine unterschiedlichen Glutamat-Aufnahmeraten ermittelt. Wurde die Aufnahmerate zu verschiedenen Zeitpunkten der Wachstumskurve verfolgt, zeigte sich bis zur spätlogarithmischen Phase keine Änderung der Transportaktivität.

3.2.1.2 Ermittlung der kinetischen Parameter K_m und V_{max}

Abb. 10 zeigt die Glutamat-Aufnahmerate von *Z. mobilis* in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Die Zellen wurden 5 min mit 3 mM AOA vorinkubiert. Die Ermittlung der kinetischen Parameter erwies sich als schwierig. Zur Durchführung des Experimentes wurden extern Glutamatkonzentrationen in einem Bereich von 5 μM bis 5 mM zugesetzt. Bei Konzentrationen oberhalb des K_m-Wertes wurden auch in Gegenwart von AOA nichtlineare Kinetiken gemessen, was in diesem Fall jedoch nicht auf Metabolismus, sondern auf kinetische Effekte entsprechend der hohen internen Glutamat-Akkumulation zurückzuführen war (Driessen et al., 1987, Booth, 1988). Bei den Werten, die in Abb.10 dargestellt sind, handelt es sich um die Anfangsraten der Aufnahme, wobei die o.g. kinetischen Effekte noch keine Rolle spielen. Über nichtlineare Regression wurde so ein apparenter K_m von 1.05 $\pm$ 0.2 mM und eine Maximalgeschwindigkeit von 36.5 $\pm$ 3 nmol $\cdot$ min^{-1} mg $\cdot$ TG^{-1} bei einem externen pH von 5.5 erhalten. Die Streuung der Werte war aufgrund der hohen externen Konzentration zu erklären, wodurch, meßmethodisch bedingt, mit dem interzellulären Raum erhebliche Mengen an Glutamat mitgeschleppt wurden, die bei der Errechnung der internen Konzentration korrigiert werden mußten.

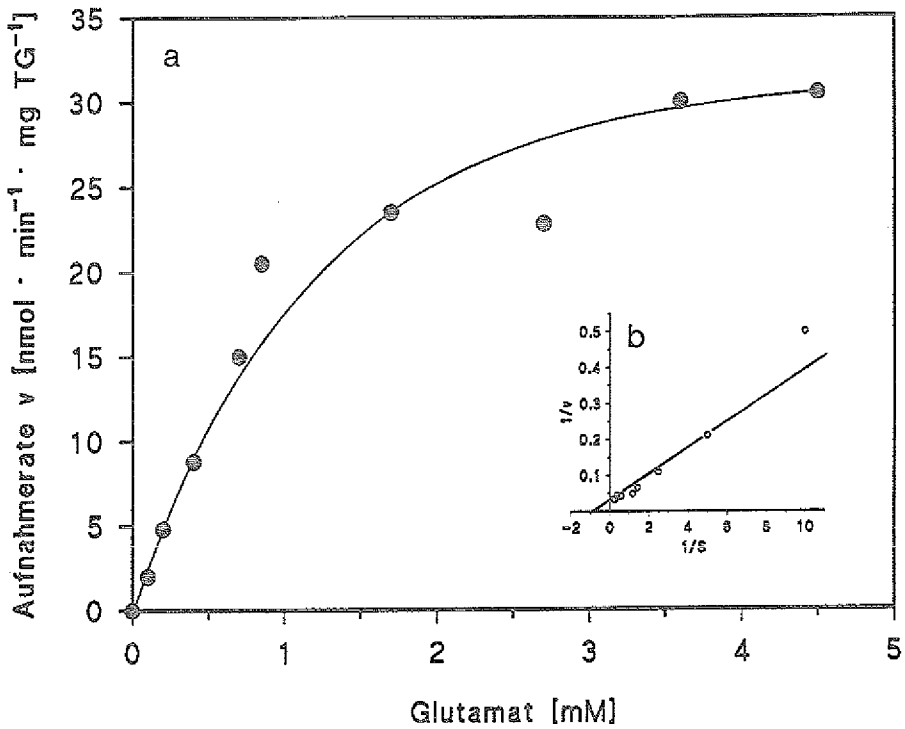


Abb.10: Michaelis-Menten (a) und Lineweaver-Burk-Diagramm (b) der Glutamat-Aufnahme bei pH 5.5.

3.2.1.3 Die pH-Abhängigkeit der Glutamat-Aufnahme

Des weiteren wurde die pH-Abhängigkeit der Glutamat-Aufnahme in einem Bereich von pH 4 bis pH 7 ermittelt (Abb.11). Die externe Konzentration betrug 1 mM. Bei pH 5 wurde die höchste Transportrate gemessen (22.7 nmol · min^{-1} · mg TG^{-1}). Mit steigendem pH nahm die Glutamat-Aufnahmerate ab.

3.2.1.4 Spezifität der Glutamat-Aufnahme

Bezüglich der Spezifität wurde festgestellt, daß Glutamat und Aspartat durch dasselbe Transportsystem in *Z. mobilis* aufgenommen werden. Hierzu wurden den Ansätzen neben Glutamat steigende Konzentrationen Aspartat zugesetzt. Aspartat hemmte kompetitiv die Glutamat-Aufnahme, wobei der Wert der apparenten Hemmkonstante K_i dem K_m-Wert für die Glutamat-Aufnahme entsprach (nicht gezeigt). Dagegen war in Gegenwart sehr hoher Glutaminkonzentrationen (bis zu 30-fachem Überschuß) keine Änderung der Glutamat-Aufnahmerate zu beobachten.

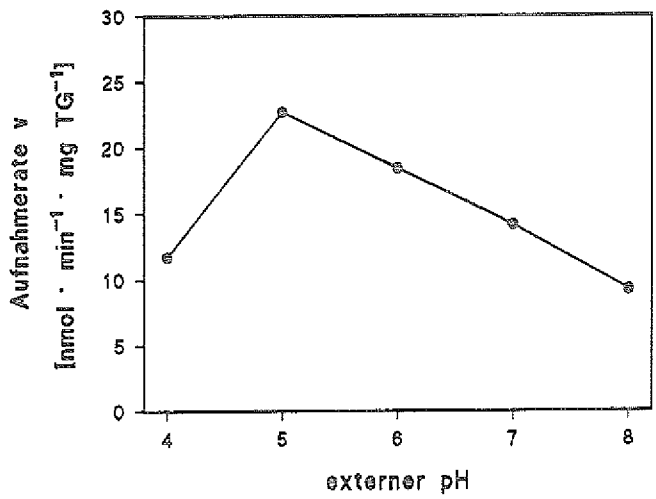


Abb.11 Abhängigkeit der Glutamat-Aufnahmerate vom externen pH-Wert. Glutamat wurde in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt

3.2.1.5 Unterliegt die Glutamat-Aufnahme einer Induktion oder Repression?

Wichtig war auch die Klärung der Frage, ob die Glutamat-Aufnahme in *Z. mobilis* einer Induktion oder Repression unterliegt. Zur Durchführung dieser Experimente wurden die Zellen in Minimalmedium angezogen, wobei entweder Ammoniumsulfat, Glutamat oder beide Komponenten als Stickstoffquelle zugesetzt wurden. Als C-Quelle mußte in jedem Fall Glucose zugesetzt werden, da *Z. mobilis* Glutamat nicht als alleinige C-Quelle nutzen kann. Zu testen war, ob Glutamat als alleinige N-Quelle genutzt werden kann, wie es in der Literatur beschrieben wurde (Galani et al., 1985). Bei Anzucht der Zellen mit Glutamat als Stickstoffquelle zeigte sich, daß zunächst eine mehrstündige lag-Phase auftrat, die bei Stammhaltung der Zellen in Medium mit Glutamat als N-Quelle nach einigen Zellpassagen verschwand. Festgestellt werden konnte, daß *Z. mobilis* auf Glutamat als alleiniger Stickstoffquelle wachsen kann, wobei hier eine Wachstumsrate von 0.2 h^{-1} erreicht wurde. Bezüglich der kinetischen Eigenschaften der Glutamat-Aufnahme wurden keine signifikanten Differenzen nach Anzucht mit den jeweiligen Stickstoffquellen festgestellt. Daraus konnte geschlossen werden, daß es sich bei der Glutamat-Aufnahme bei *Z. mobilis* um ein konstitutives Transportsystem handelt. Zusatz von NH_4^+ zum Versuchsansatz für Transportmessungen führte zu keiner auffälligen Änderung der Glutamat-Aufnahmerate.

3.2.2 Die Ladung des transportierten Substrates

Die Messungen zur Glutamat-Aufnahme wurden bei relativ niedrigen pH-Werten in einem Bereich von pH 5 bis pH 6 durchgeführt, da hier optimale Wachstumsbedingungen für *Z. mobilis* existieren. Deshalb war es notwendig, die transportierte Form des Glutamates näher zu definieren. Glutamat hat einen pK_2-Wert von 4.25, infolgedessen waren sowohl das Glutamat-Anion (Glu^-) als auch die protonierte Form (GluH) mögliche Substrate des Carriers. Zur Untersuchung dieser Frage wurden der K_m-Wert und die Maximalgeschwindigkeit V_{max} der Glutamat-Aufnahme in Abhängigkeit vom externen pH in einem Bereich von pH 4.3 - pH 7.0 ermittelt (Abb.12). Eingesetzt wurden wieder externe Glutamatkonzentrationen bis zu 5 mM. Es zeigte sich, daß die maximale Aufnahmerate nicht signifikant innerhalb dieses pH-Bereiches variierte. Mit zunehmendem pH wurde eine geringfügige Abnahme der Maximalgeschwindigkeit festgestellt. Der relativ geringe Wert bei pH 4 dürfte auf physiologische und nicht auf kinetische Ursachen zurückgeführt werden. Der apparente K_m-Wert wurde für die gesamte Glutamatkonzentration, d.h. für die Summe von Glu^- und GluH, bestimmt. Mit steigendem pH-Wert nahm der K_m-Wert zu, die Affinität des Substrates zum Carrier also ab. Setzte man die protonierte bzw. die unprotonierte Form des Glutamates als Substrat des Carriers voraus und ermittelte nach Henderson-Hasselbalch die jeweilige Konzentration der beiden Formen, so konnten die korrespondierenden K_m-Werte der beiden Glutamat-Spezies in dem angegebenen pH-Bereich errechnet werden. Für eine der beiden Spezies sollte somit ein pH-unabhängiger K_m-Wert erhalten werden, der dem tatsächlichen Wert entspricht. Wie aus Abb.12 zu erkennen, ließ sich kein vollständig pH-unabhängiger K_m-Wert ermitteln. Auffällig ist jedoch, daß die ermittelten K_m-Werte der protonierten Form im physiologischen pH-Bereich (pH 5 - pH 7) von 0.113 - 0.003, d.h. um Faktor 38 variierten. Besonders bei höheren pH-Werten wären extrem geringe K_m-Werte die Konsequenz eines Substrates in protonierter Form. Der K_m der deprotonierten Form dagegen variierte bei entsprechenden externen pH-Werten nur um Faktor 2.5 von 0.64 - 1.6. Hierbei sind die meßmethodisch bedingten Streuungen der Werte zu berücksichtigen. Diese Ergebnisse sind gute Hinweise darauf, daß nur die deprotonierte Form des Glutamates vom Carrier akzeptiert wird.

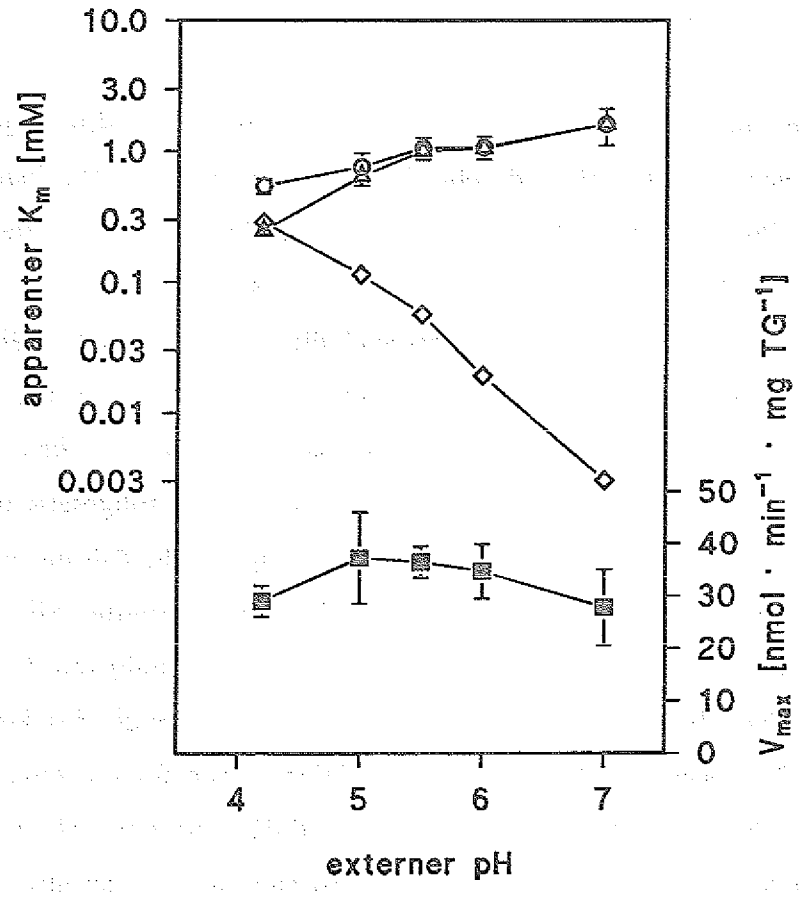


Abb.12: **Abhängigkeit des apparenten K_m-Wertes und V_{max} der Glutamat-Aufnahme vom externen pH.** Die kinetischen Parameter K_m (○) und V_{max} (■) wurden unter Standardbedingungen bei variierenden externen pH-Werten bestimmt. Der K_m wurde ermittelt, indem entweder die gesamte Glutamatkonzentration (○), nur die anionische Form (△) oder die protonierte Form des Glutamates (◇) als Substrat angenommen wurde. Bei den Berechnungen wurde ein pK-Wert von 4.25 verwendet.

3.2.3 Die Energiekopplung der Glutamat-Aufnahme:

3.2.3.1 Charakterisierung als sekundäres Transportsystem

Wie bereits erwähnt, wurde Glutamat-Aufnahme nur in Gegenwart einer geeigneten Energiequelle wie Glucose beobachtet (Abb.8,13), während bei glucoseverarmten Zellen bzw. Zellen nach Zusatz des Entkopplers CCCP keine Glutamat-Aufnahme nachzuweisen war. Wurde glucoseverarmten Zellen erneut Glucose zugesetzt, war nach einer kur-

zen lag-Phase wieder Glutamat-Transport mit der üblichen Rate meßbar (Abb.13). Hierbei ergaben gleichzeitige Messungen der energetischen Parameter, daß nach Zusatz

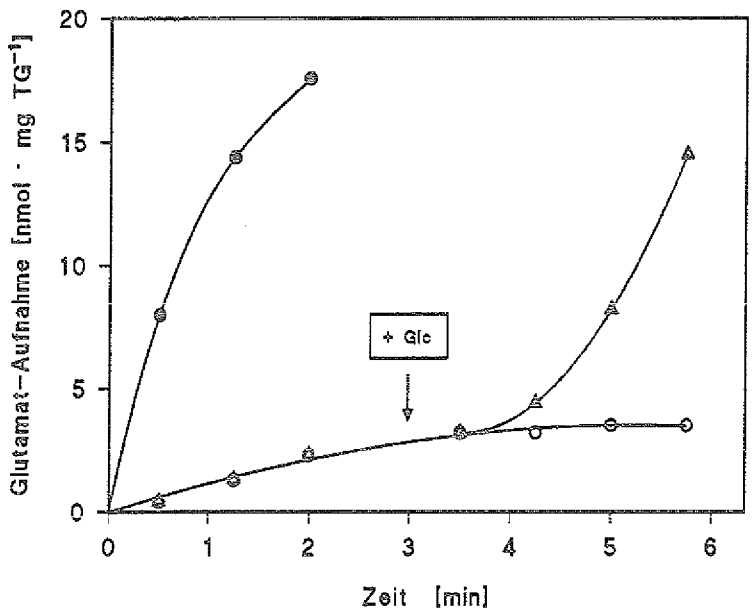
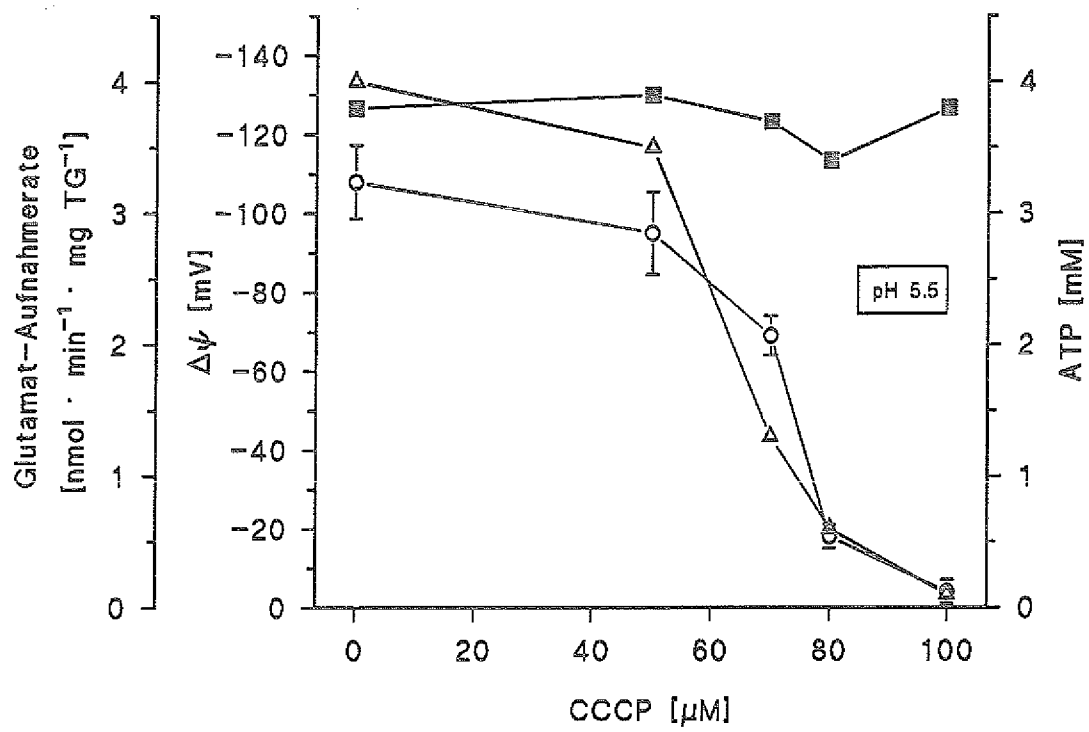


Abb.13: Glutamat-Aufnahme deenergetisierter Zellen (○) und nachfolgende Energetisierung durch Glucose (△). Die eingesetzte Glutamatkonzentration betrug 0.5 mM. Nach 3 min wurden 5% Glucose zugesetzt. Zum Vergleich ist die Glutamat-Aufnahme energetisierter Zellen angegeben (●).

von Glucose bei pH 5.5 einerseits ein Anstieg des internen ATP-Gehaltes von 0.1 (Nachweisgrenze) auf 4 mM, andererseits zeitgleich ein Anstieg des Protonengradienten (von 0 bis 0.6 Einheiten) sowie des Membranpotentials (von -5 mV bis ca. -100mV) nachzuweisen war (s. Abb.5). Eine mögliche Beteiligung der verschiedenen energetischen Parameter mußte somit differenziert werden. Reagenzien, die gewöhnlich bei anderen Bakterien routinemäßig eingesetzt werden, um die einzelnen energetischen Parameter separat zu variieren, wie z. B. Valinomycin oder Nigericin, waren bei *Z. mobilis* nicht anwendbar. Wie bereits beschrieben, inseriert Valinomycin nicht in die Cytoplasmamembran. Eine gezielte Abstufung der elektrischen Komponente der protonenmotorischen Kraft durch Valinomycin war somit nicht möglich. Des weiteren wurde festgestellt, daß auch Nigericin, ein K^+/H^+-Ionophor, und Dicyclohexylcarbodiimid, ein Inhibitor der ATPase vom F_OF_1-Typ, keine Wirkung ausübten (nicht gezeigt). Ein Ausweg bot sich mit der Anwendung des Entkopplers CCCP in hohen Konzentrationen.



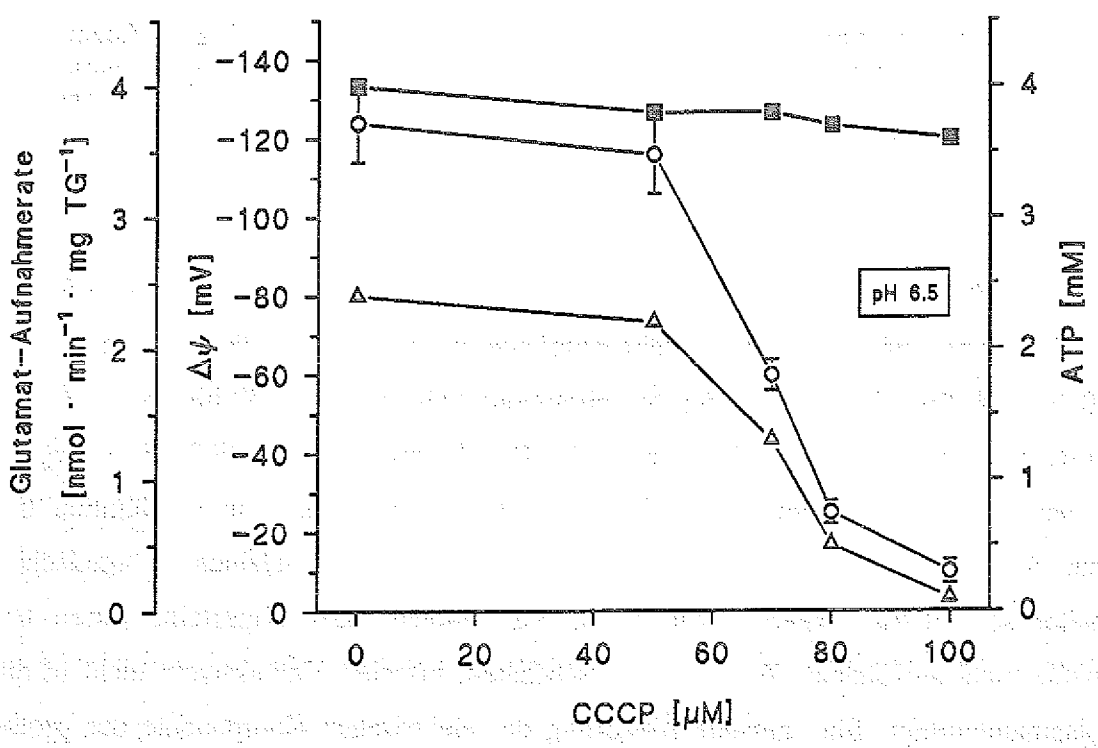


Abb.14: Einfluß von CCCP auf den cytosolischen ATP-Gehalt (■), Δψ (○) und die Glutamat-Aufnahmerate (△) bei pH 5.5 und 6.5. Es wurden 200 μM markiertes Glutamat eingesetzt.

Einsatz von Konzentrationen über 50 μM führte zu einer signifikanten Herabsetzung des Membranpotentials, während der cytosolisch ATP-Gehalt bis zu einer Konzentration von 100 μM konstant hoch blieb. Im Experiment wurden nun parallel sowohl die Aufnahme von Glutamat als auch die energetischen Parameter bestimmt, wobei CCCP-Konzentrationen von 0 (Kontrolle) bis 100 μM eingesetzt wurden (Abb.14a). Mit steigender Konzentration des Entkopplers nahmen sowohl Membranpotential als auch Glutamat-Aufnahme in vergleichbarem Maße ab, während der ATP-Gehalt konstant bei 4 mM lag. Zur effektiven Hemmung des Transportes waren ebenfalls Inhibitorkonzentrationen über 50 μM notwendig (Abb.14a). Aufgrund der Versuchsdurchführung bei pH 5.5 kamen als treibende Kräfte sowohl Membranpotential als auch Protonengradient in Frage. Zu entsprechenden Ergebnissen führten auch Messungen bei pH 6.5 (inverser pH-Gradient, intern sauer, Abb.14b). Auch hier wurde eine sehr gute Korrelation von Glutamat-Aufnahme und Membranpotential gefunden. Die Glutamat-Aufnahmerate war entsprechend des externen pH-Wertes geringer (2.6 nmol $min^{-1} \cdot mg\ TG^{-1}$ im Vergleich zu 4.0 nmol $min^{-1} \cdot mg\ TG^{-1}$, siehe pH-abhängige K_m-Ermittlung).

Eine weitere Möglichkeit, Einfluß auf das Membranpotential zu nehmen, bestand in der Zugabe ausreichend hoher Salzkonzentrationen (Tab.3).

Tab. 3: Einfluß der externen Salzkonzentration auf Membranpotential, ATP-Gehalt und Glutamat-Aufnahmerate bei pH 5.5.

	Glutamat-Aufnahmerate [nmol/min·mg TG]	$\Delta\psi$ [mV]	ATP [mM]
Kontrolle	4.0	-127	3.6
KCl (300 mM)	1.3	-30	3.9
NaCl (300 mM)	1.4	-32	3.9

Bei einer externen Konzentration von 200 mM K^+ bzw. Na^+ war eine signifikante Erniedrigung sowohl des Membranpotentials als auch der Glutamat-Aufnahmerate meß-

bar. Die cytosolische ATP-Konzentration blieb jedoch konstant. Auch diese Experimente zeigten wieder eindeutig die Korrelation von Membranpotential und Glutamat-Aufnahme.

In Hinblick auf die negative Ladung des Glutamates und die Abhängigkeit des Transportes vom Membranpotential (innen negativ), war von einem Cotransport mit mindestens zwei Kationen oder einem Antiport gegen mindestens zwei Anionen auszugehen. Genauer untersucht wurde ein möglicher Cotransport von K^+- oder Na^+-Ionen gemeinsam mit Glutamat. Es zeigte sich, daß variierende Konzentrationen der extern zugesetzten Kationen von 0.02 - 50 mM die Glutamat-Aufnahmerate nicht beeinflußten (Tab.4). Höhere Konzentrationen wurden nicht eingesetzt, da diese das Membranpotential herabsetzten.

Tab. 4: Einfluß verschiedener Na^+ und K^+-Konzentrationen auf die Glutamat-Aufnahmerate

Na^+ bzw. K^+ Zugabe [mM]	Glutamat-Aufnahmerate [nmol/min·mg TG] bei Zugabe von[a)]	
	Na^+	K^+
0[b)]	1.18	0.96
0.1	1.18	0.85
1	1.26	0.96
10	1.17	1.02
20	1.25	0.92
50	1.16	0.93

a) Das jeweils nicht variierte Kation wurde in einer Konzentration von 10 mM zugesetzt, die Glutamatkonzentration im Ansatz betrug 50μM.

b) Der "background" betrug 10 μM Na^+ und 60 μM K^+ (ionenchromatographisch nachgewiesen) und war auf Kationen-Efflux der gewaschenen Zellen in der Suspension zurückzuführen.

In deenergetisierten Zellen konnte durch Zugabe der Kationen keine signifikante Glutamat-Aufnahme getrieben werden (nicht gezeigt). Somit konnten K^+- und Na^+-Ionen sowohl als treibende Gradienten als auch als cotransportierte Kationen ausgeschlossen werden. Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, daß es sich um einen reinen Glutamat/Protonen-Symport handelt.

3.2.3 Die Energie-Kopplung der Glutamat-Aufnahme:

3.2.3.2 Stöchiometrie der Kopplung

Eine Beteiligung von Protonen an Transportvorgängen ist durch direkte Meßmethoden nicht ohne weiteres erfaßbar. Zur Untersuchung der Beteiligung von Protonen und der Stöchiometrie des Glutamat/Protonen-Symports wurde die Akkumulation des internen Glutamates im Fließgleichgewicht bei verschiedenen externen Protonenkonzentrationen gemessen. Versuche mit markiertem Glutamat zeigten bereits eine Abhängigkeit der Akkumulation vom externen pH-Wert, wobei mit steigendem pH eine Abnahme des intern akkumulierten Glutamates festzustellen war. Bei Versuchsdurchführung mit markiertem Glutamat wurden die auftretenden, ebenfalls markierten Metabolisierungsprodukte mitbestimmt (der Glutamat-Metabolismus wurde auch nach Zugabe von AOA nicht vollständig gehemmt). Daher wurde die tatsächliche Glutamat-Akkumulation nicht erfaßt. Die nachfolgenden Versuche wurden deshalb ausschließlich mit nicht-markiertem Glutamat durchgeführt, welches mittels HPLC detektiert wurde. Um die korrekten, hohen Akkumulationsverhältnisse zu erhalten, mußten sehr niedrige externe Glutamatkonzentrationen eingesetzt werden (Driessen et al., 1987, Booth, 1988). Aufgrund des hohen apparenten K_m-Wertes dieses Transportsystems waren die entsprechenden Aufnahmeraten daher sehr gering. Als Folge wurde die Akkumulation durch den Metabolismus des Glutamates negativ beeinflußt. Unter diesen Bedingungen, d.h. bei einer externen Konzentration von 100 μM Glutamat, lag die maximale interne Konzentration, die erreicht werden konnte, nur bei 2 - 3 mM (Abb.15a). Eine Gleichgewichtseinstellung der internen Konzentration wurde nicht erreicht. Die interne Glutamatkonzentration sank sofort wieder ab, da die Metabolisierungsrate offensichtlich höher lag als die Aufnahmerate bei niedrigen externen Glutamatkonzentrationen. Im Verlauf des Experimentes wurde eine Metabolisierungsrate des Glutamates von ca. 4 nmol $\cdot$ min^{-1} $\cdot$ mg TG^{-1}

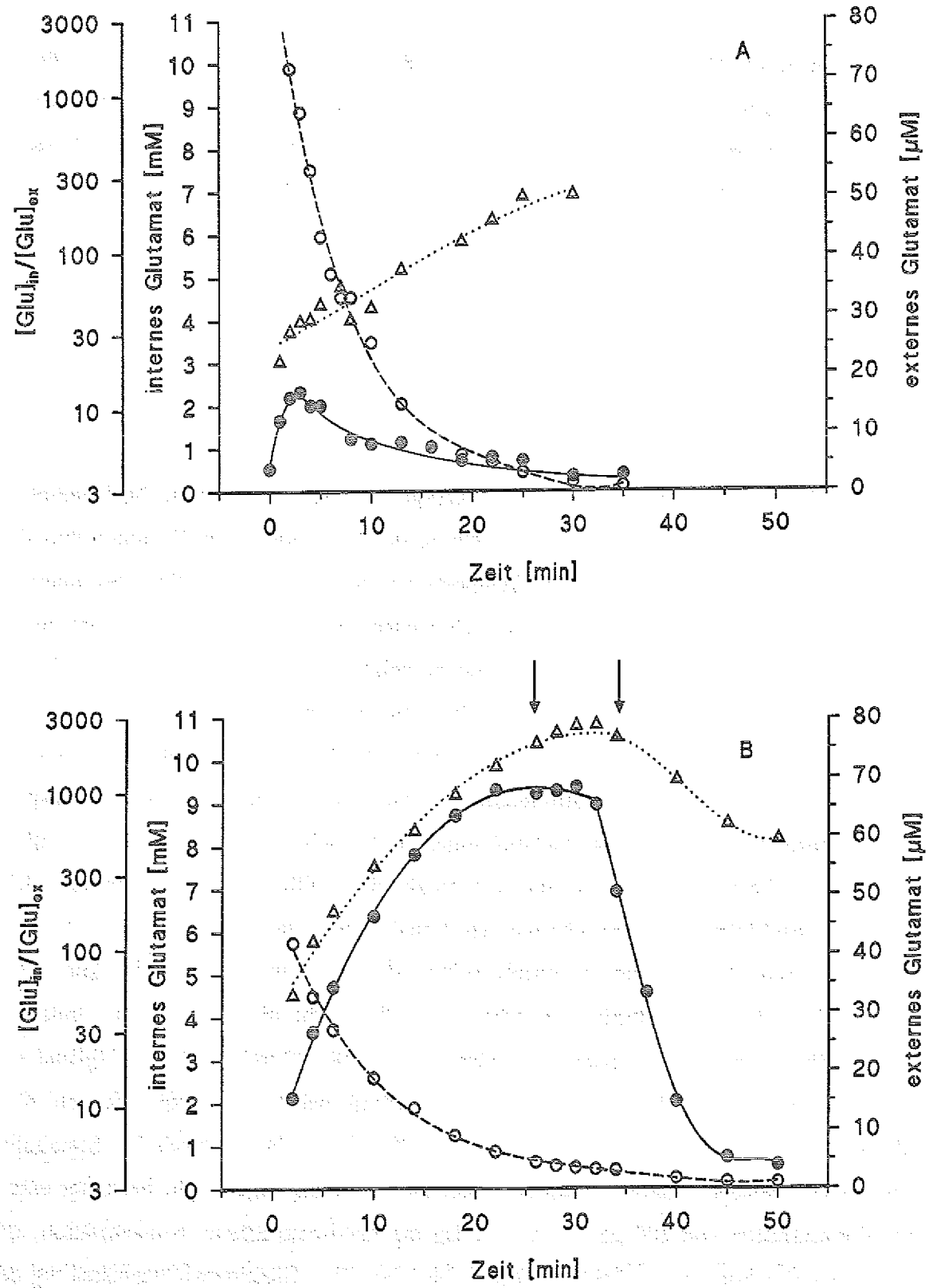


Abb.15: Glutamat-Akkumulation im Fließgleichgewicht bei pH 5.0. (A) Nach Zugabe von 100 µM Glutamat wurden sowohl externes (○) als auch internes (●) Glutamat mittels HPLC gemessen. Die Akkumulationsverhältnisse sind ebenfalls dargestellt (△). (B) Durchführung wie unter (A) dargestellt, jedoch in Gegenwart von 3 mM AOA. Zur Ermittlung der Akkumulation im Fließgleichgewicht (s. Tab.5) wurden die Werte innerhalb eines Zeitabschnittes (Pfeile) gemittelt.

ermittelt, indem die Abnahme des internen Glutamates ab einem Zeitpunkt der Fermentation beobachtet wurde, als die externe Glutamatkonzentration auf einen so niedrigen Wert gefallen war, daß die Aufnahme dieser Aminosäure quantitativ bezüglich der Änderungen der internen Konzentration zu vernachlässigen war. In diesem Fall war es nicht möglich, die Metabolisierungsrate über die Abnahme des externen Glutamates zu ermitteln, da sie aufgrund der geringen Aufnahmerate unterbestimmt würde. Zur Lösung des Problems erwies sich wiederum der Transaminaseinhibitor AOA als geeignet. Die Zellen wurden 5 min mit 3 mM AOA vorinkubiert. Weder die energetischen Parameter noch die Glutamat-Aufnahme wurden hierdurch beeinflußt. Ebenso wurde die HPLC-Analytik nicht gestört. Eine signifikante Verlangsamung des Glutamat-Metabolismus wurde so erreicht. In Gegenwart des Inhibitors wurden, neben einer linearen Glutamat-Aufnahme (bis zu 5 min), auch bei sehr geringen externen Glutamatkonzentrationen interne Glutamatkonzentrationen von 10 mM nachgewiesen. Hervorzuheben ist hierbei, daß jetzt eine Akkumulation im Fließgleichgewicht bis zu 10 min aufrecht erhalten wurde (Abb.15b). Die leichte Ansäuerung des Mediums, die im Verlauf des Experimentes auftrat, wurde bei den späteren Berechnungen berücksichtigt. Da, wie bereits dargestellt, der Metabolismus nicht vollständig gehemmt wurde, war im späteren Verlauf des Versuches wieder ein Absinken des internen Glutamates zu beobachten. Weitere Experimente zur Bestimmung der Stöchiometrie wurden, wie in Abb.15b dargestellt, in Gegenwart von 3 mM AOA bei externen pH-Werten von 4.9 bis 6.2 durchgeführt (Tab.5). Parallel hierzu wurden die Parameter der protonenmotorischen Kraft ermittelt. Es zeigte sich, daß mit steigendem pH die Glutamat-Akkumulation abnahm. Nimmt man einen Cotransport von n Protonen gemeinsam mit dem negativ geladenen Glutamat an, so entspricht das chemische Potential des Glutamates im Gleichgewicht den Komponenten der protonenmotorischen Kraft, wobei Membranpotential und Protonengradient mit unterschiedlichen Faktoren beteiligt sind. Die Glutamat-Akkumulation im Gleichgewicht kann folgendermaßen ausgedrückt werden:

$$-Z \log ([Glu^-]_{in}/[Glu^-]_{ex}) = (n - 1)\, \Delta\psi - n\, Z\, \Delta pH$$

wobei $Z = 2.3\, R\, T/F$

Die Transportstöchiometrie n erhält man nach Umstellen der Gleichung:

$$n = \frac{\Delta\psi - Z \log ([Glu^-]_{in}/[Glu^-]_{ex})}{\Delta\psi - Z\,\Delta pH}$$

Tab. 5: Einfluß des Membranpotentials und des Protonengradienten auf die Glutamat-Akkumulation im Fließgleichgewicht.

pH_{ex}	$Z \cdot \Delta pH$ [a] [mV]	$\Delta\psi$ [b] [mV]	$[Glu]_{in}/[Glu]_{ex}$ experimentell ermittelt	Stöchiometrie n [c]
4.9	65	-72	2450	1.99
5.0	59	-80	2040	1.98
5.1	53	-86	1460	1.96
5.3	44	-95	980	1.95
5.65	27	-110	480	1.96
5.8	18	-119	285	1.93
6.0	11	-126	200	1.91
6.2	3	-134	150	1.92

[a] Chemischer Protonengradient ausgedrückt in mV (Z = 2.3 RT/F)

[b] $\Delta\psi$ -Werte bei pH-Werten über pH 5.5 wurden, wie im Text zu Abb. 4 beschrieben, errechnet, indem eine konstante protonenmotorische Kraft von -137 mV zugrunde gelegt wurde.

[c] Errechnung der Stöchiometrie s. Text.

In dieser Gleichung kommt die Abhängigkeit der Glutamat-Akkumulation sowohl vom Membranpotential als auch vom Protonengradienten zum Ausdruck. Durch Ermittlung

der energetischen Parameter $\Delta\psi$ und ΔpH sowie der Glutamat-Akkumulation bei verschiedenen pH-Werten wurde die Stöchiometrie des Glutamat/Protonen-Cotransportes errechnet (Tab.4). Die ermittelte Stöchiometrie lag auch bei signifikanter Änderung sowohl des Membranpotentials als auch des Protonengradienten jedesmal sehr nahe bei 2. Anhand dieser Ergebnisse konnte somit gezeigt werden, das die negativ geladene Aminosäure Glutamat zusammmen mit 2 Protonen cotransportiert wird.

3.3 Die Alanin-Sekretion in *Z. mobilis* CP4-thi/pZY 73

3.3.1 Alanin-Produktion und Sekretion

Der Wildtyp von *Z. mobilis* erwies sich aufgrund sehr geringer interner Aminosäurekonzentrationen (maximal 3 - 4 mM) als ungeeignet für Messungen von Exportvorgängen von Aminosäuren. Es konnte bereits gezeigt werden, daß zwar nach Zusatz des Transaminasehemmers Aminooxyacetat die interne Glutamatkonzentration auf 10 - 13 mM anstieg, jedoch wurde auch bei hohen Konzentrationsgradienten kein Netto-Efflux festgestellt. Für die Untersuchung eines Sekretionsprozesses bot sich daher der thiaminauxotrophe Stamm *Z. mobilis* CP4-thi/pZY 73 an, der mittels einer klonierten und exprimierten Alanin-Dehydrogenase aus *Bacillus sphaericus* eine hohe interne Alaninkonzentration aufbaut und Alanin sezerniert (Uhlenbusch et al., 1991). Es wurde eine Alanin-Dehydrogenaseaktivität von 0.5 U ermittelt, während der Wildtyp keine Aktivität aufwies (die interne Alaninkonzentration betrug hier ca. 3 mM). Die Pyruvat-Decarboxylaseaktivität wurde durch Anzucht der Zellen unter Thiaminmangel in Minimalmedium innerhalb von 16 h von 3.2 U auf 0.8 U herabgesetzt (Uhlenbusch et al., 1991). Es konnte gezeigt werden, daß diese Hungerphase ausreichte, eine hohe interne Alaninkonzentration zu erreichen. Abb. 16 zeigt eine typische Alanin-Fermentation nach Überimpfen der thiamin-gehungerten Zellen in Alanin-Produktionsmedium (Minimalmedium mit 5% Glucose, 100 mM Ammoniumacetat, pH 7.0). In diesem Medium findet kein Zellwachstum mehr statt. Innerhalb weniger Minuten wurde eine interne Alaninkonzentration von 220 mM aufgebaut (zu 97% aus L-Alanin; Uhlenbusch et al., 1991), wobei mit der Produktion auch sofort die Alanin-Sekretion einsetzte. Auffällig ist die hohe

Sekretionsrate (116 nmol min^{-1} mg TG^{-1}), die bei konstanter interner Alaninkonzentration (metabolisches Gleichgewicht von Alanin-Synthese und Sekretion) linear verläuft.

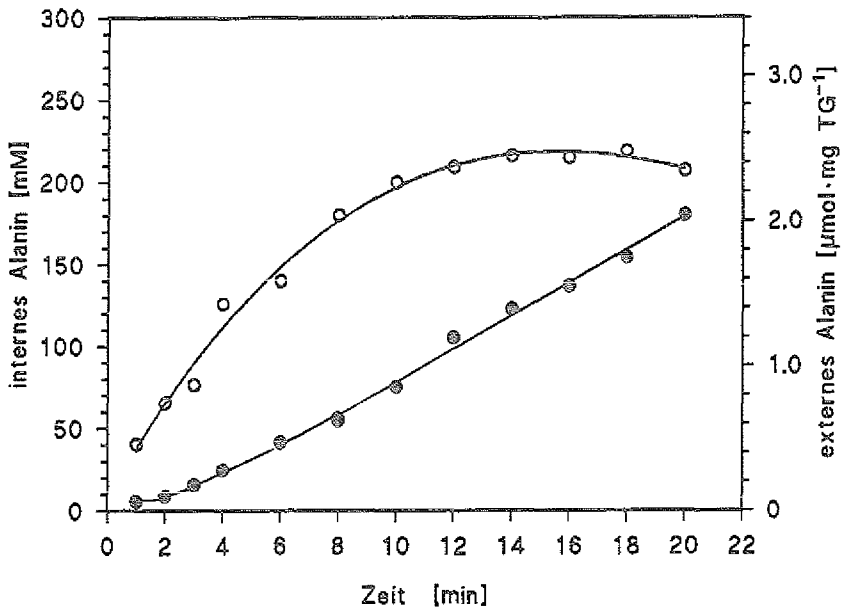


Abb.16: **Interne (○) und externe Alaninkonzentration (●) bei *Z. mobilis* CP4-thi/pZY 73.** Die Zellen wurden in Alanin-Produktionsmedium (5% Glucose, 100 mM Ammoniumacetat) bei 37°C fermentiert.

Für den Alanin-Efflux sind, wie in der Einleitung ausführlich dargestellt, folgende Mechanismen vorstellbar:

1. Diffusion der Aminosäure
2. Export über einen Carrier
   a) erleichterte Diffusion
   b) primäres oder sekundäres Symport- bzw. Antiportsystem
3. Export durch eine Pore
4. unspezifische Permeabilität der Membran für Alanin und andere kleine Metabolite

Vor ausführlichen Untersuchungen des Mechanismus der Alanin-Sekretion sollte zunächst geklärt werden, ob eine unspezifische Membranpermeabilität (Mechanismus 4) ausgeschlossen werden kann.

3.3.2 Energetische Parameter von *Z. mobilis* CP4-thi/pZY 73 Argumente gegen ein "leak"-Modell

Zymomonas mobilis wird unter Alanin-Produktionsbedingungen starkem physiologischem Streß ausgesetzt (Thiaminmangel, 100 mM Ammoniumacetat). In Hinblick auf die Alanin-Sekretion waren deshalb Untersuchungen zum Energiestatus der Zellen während der Sekretion notwendig. Gleichzeitig erlauben Messungen zum Membranpotential Aussagen über die Intaktheit der Membran. Energetisierte Zellen wiesen einen ATP-Gehalt von 3.6 - 4.0 mM auf, der durchaus den Werten des Wildtyps *Z. mobilis* unter normalen Fermentationsbedingungen entsprach (Tab.6).

Tab. 6: Die energetischen Parameter von *Z. mobilis* CP4-thi/pZY 73 unter Alaninproduktionsbedingungen

Zellen	ATP [mM]	$\Delta\Psi$ [a] [mV]	Δp [mV]
glucose-supplementiert	3.6 -4.0	85 ± 5	83 ± 2
glucose-verarmt	0.1[b]	≅ 0	≅ 0
+ CCCP (100 µM)	3.6	≅ 0	≅ 0

[a] ermittelt über Glutamat-Akkumulation
[b] Nachweisgrenze

Auch bei *Z. mobilis* CP4-thi/pZY 73 sank nach Glucoseverarmung der Zellen die ATP-Konzentration bis zur Nachweisgrenze von 0.1 mM ab. Das Membranpotential wurde, wie unter 2.4.3.1 beschrieben, mit SCN^- bestimmt und betrug -85 ± 5 mV. Aufgrund der bekannnten Schwierigkeiten bei der Ermittlung von Membranpotentialen bei *Z. mobilis* wurde zusätzlich als Meßparameter die Glutamat-Akkumulation in Gegenwart

von 3 mM Aminooxyacetat unter Alanin-Produktionsbedingungen bei verschiedenen externen Glutamatkonzentrationen bestimmt. Die Glutamat-Akkumulation ist ein direktes Maß für die Höhe der protonenmotorischen Kraft. Abb. 17 zeigt die Aufnahme von Glutamat bei einer externen Konzentration von 1 mM. Es wurde eine Akkumulation $[Glu^-]_{in}/[Glu^-]_{ex}$ von 24 : 0.95 ermittelt, was einem Δp von -83 mV entspricht. Da kein Protonengradient vorhanden war, waren protonenmotorische Kraft und Membranpotential gleichzusetzen. Verglichen mit dem bei pH 7.0 zu erwartenden Membranpotential von ca. -135 mV war das relativ niedrige Membranpotential auf die entkoppelnde Wirkung der hohen Ammoniumacetatkonzentration zurückzuführen.

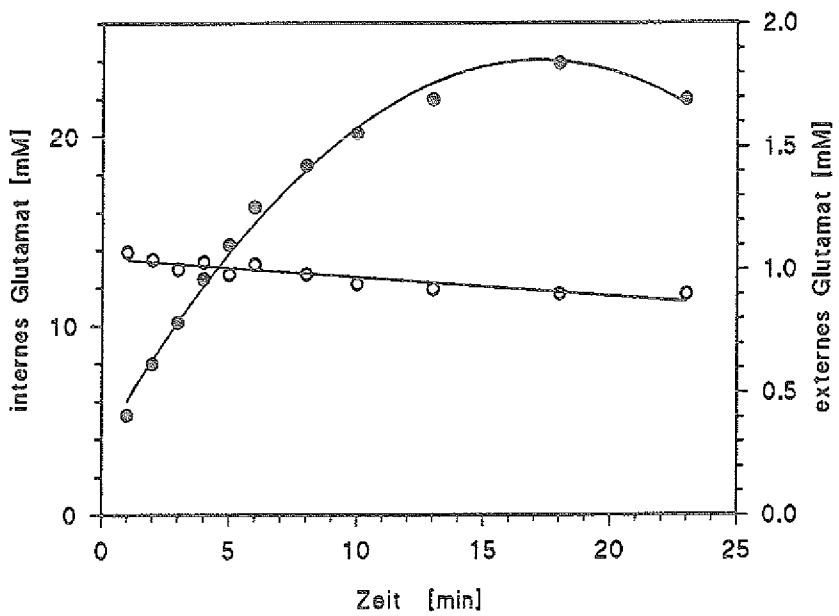


Abb.17: Glutamat-Akkumulation unter Alanin-Produktionsbedingungen. Die Zellen wurden zunächst 10 min in Alanin-Produktionsmedium vorinkubiert. Nach Zugabe von 3 mM AOA wurde die Glutamat-Aufnahme (●) und Abnahme des externen Glutamates (○) chromatographisch ermittelt.

Völlige Deenergetisierung der Zellen über Glucoseverarmung führte aufgrund des vollständigen Abbaus des ATP-Gehaltes auch zu einem Abbau des Membranpotentials. Zugabe des Entkopplers CCCP bewirkte ebenfalls einen Abbau der Potentials und der Glutamat-Aufnahme, der cytosolische ATP-Gehalt blieb konstant. Tab.6 zeigt eine Zusammenfassung der energetischen Parameter der thiaminauxotrophen Rekombinante.

Die Ergebnisse zu den energetischen Parametern sind ein gutes Indiz für eine intakte

Cytoplasmamembran. So war ein Membranpotential meßbar, welches den erwarteten Werten in Hinblick auf die hohe Ammoniumacetatkonzentration entsprach. Des weiteren wurde eine Akkumulation von Glutamat nachgewiesen, wobei der interne Pool nach Erreichen des Fließgleichgewichts für Minuten konstant blieb (Abb. 17). Eine unspezifische Permeabilität der Membran wurde somit ausgeschlossen.
Nachdem auch unter Alanin-Produktionsbedingungen sowohl von einer intakten Membran als auch von einer intakten Energetik der Zellen ausgegangen werden konnte, sollte geklärt werden, ob es sich um einen carrier-vermittelten Transport (hohe Sekretionsrate!) oder um einen reinen Diffusionsprozeß handelt. Zunächst wurde die Energieabhängigkeit des Alanin-Efflux untersucht.

3.3.3 Die Energieabhängigkeit der Alanin-Sekretion

3.3.3.1 Die Alanin-Sekretion nach vollständiger Entkopplung der Zellen

Energetisierte Zellen zeigten eine, bezogen auf die interne Alaninkonzentration, reproduzierbare, hohe Alanin-Sekretionsrate. Um den Einfluß von Δp auf den Export zu untersuchen, wurde energetisierten, sezernierenden Zellen das Protonophor CCCP (100 μM) nach 13 min zugesetzt. Zu diesem Zeitpunkt war, wie aus Vorversuchen bekannt, eine sehr hohe, sich im Gleichgewicht befindende interne Alaninkonzentration erreicht. Die vollständige Entkopplung der Zellen wurde über Messungen der aktiven Glutamat-Aufnahme während des Sekretionsprozesses kontrolliert, die nach Zugabe des Entkopplers vollständig gehemmt war. Im Gegensatz hierzu wurde nach CCCP-Zugabe eine unverändert hohe Alanin-Sekretionsrate (122 nmol min^{-1} mg TG^{-1} bei 240 mM interner Alaninkonzentration) beobachtet (Abb. 18). Eine energetische Kopplung zwischen Alanin-Export und der protonenmotorischen Kraft ist somit auszuschließen. Eine 10 minütige Vorinkubation der Zellen ohne Zugabe von Ammoniumacetat mit CCCP (100μM), wobei die Produktion anschließend mit 100 mM Ammoniumacetat gestartet wurde, führte zu mit Kontrollwerten vergleichbaren Sekretionsraten (nicht gezeigt).

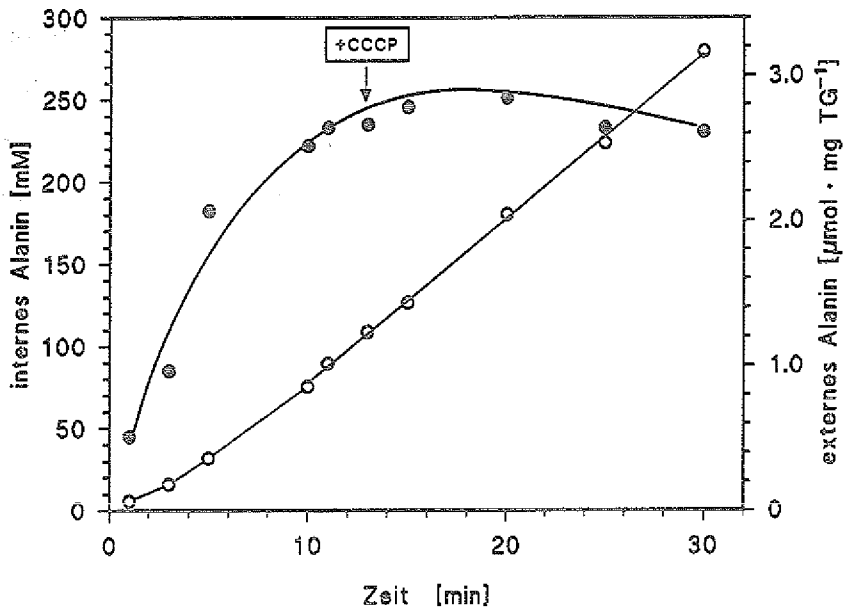


Abb. 18: Interne (●) und externe Alaninkonzentration (○) nach Zugabe von 100 µM CCCP.

3.3.3.2 Alanin-Sekretion unter Glucose-limitierten Bedingungen

Nachdem eine Kopplung der Sekretion mit der protonenmotorischen Kraft ausgeschlossen werden konnte, mußte noch geklärt werden, ob ATP die Alanin-Sekretion antreibt. Da es sich bei *Z. mobilis* um einen anaeroben Organismus handelt, der Δp über eine protonenpumpende ATPase aufbaut, ist ein Abbau des ATP-Gehaltes in jedem Fall mit einem gleichzeitigen Abbau von Δp verbunden. Es bestand somit keine Möglichkeit, nur die ATP-Konzentration unabhängig von Δp zu beeinflussen. Glucoseverarmung führte zu einer vollständigen Deenergetisierung der Zellen. Zur Durchführung des Versuchs wurden die Zellen zunächst glucosesupplementiert in Alanin-Produktionsmedium inkubiert, um den Aufbau einer hohen, internen Alaninkonzentration zu ermöglichen. Hierbei wurde die Glucosekonzentration im Medium so eingestellt, daß bereits nach wenigen Minuten während der Fermentation Glucoseverarmung der Zellen eintrat. Abb. 19 zeigt Alanin-Produktion und Sekretion zunächst unter glucosesupplementierten Bedingungen, wobei nach 2 min keine Glucose mehr nachweisbar war. Glucose diente im Versuchsansatz sowohl als Energie- als auch als Kohlenstoff-Quelle, d.h. nach Glucoseverbrauch sank die interne Alaninkonzentration sofort ab, da kein Pyruvat zur Alanin-Synthese

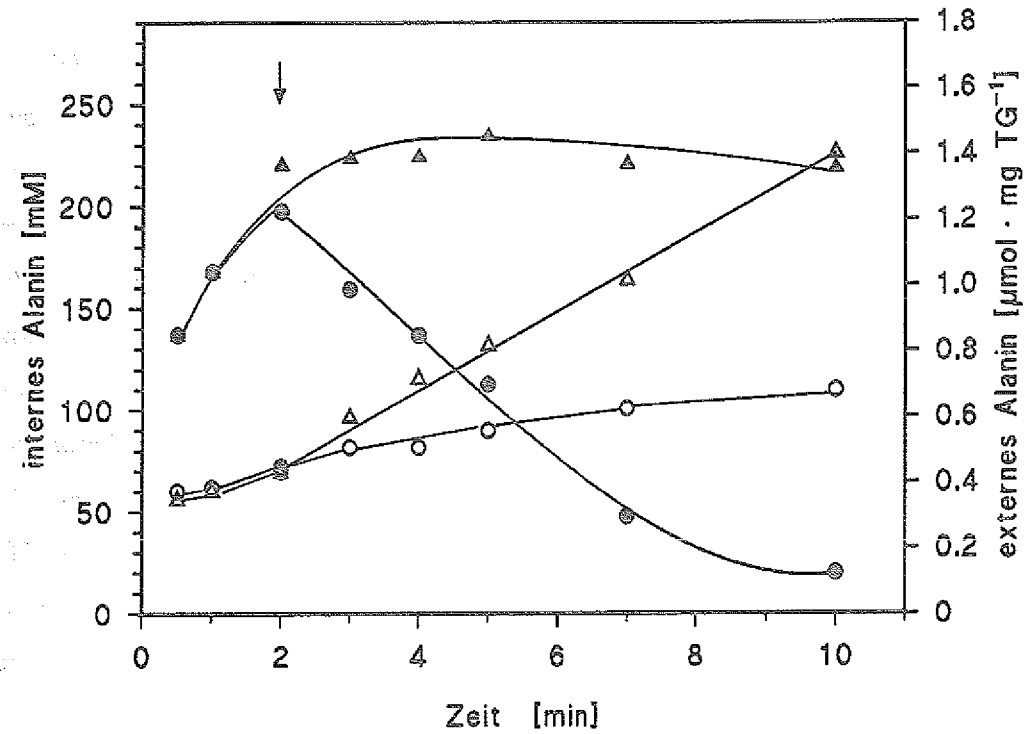


Abb. 19: Alanin-Fermentation unter glucosesupplementierten (▲, △) und glucoselimitierten (●, ○) Bedingungen. Das Experiment wurde in zwei Parallel-Ansätzen durchgeführt. Im ersten Ansatz wurden die Zellen zunächst in Alanin-Produktionsmedium zum Aufbau einer hohen internen Konzentration glucosesupplementiert (0.1%) 5 min vorinkubiert. Hierbei war die Glucosekonzentration nur so hoch eingestellt, daß nach 2 min (Pfeil) keine Glucose mehr nachweisbar war. Zum Zeitpunkt 30 sec wurde der erste Meßwert genommen. Im Parallel-Ansatz wurde eine höhere Glucosekonzentration (5%) eingestellt, so daß über den gesamten Verlauf des Experimentes keine Glucoseverarmung auftrat.
(▲, ●) : interne Alaninkonzentration
(△, ○) : externe Alaninkonzentration

mehr zur Verfügung stand. Auch ATP-Gehalt und Δp sanken sofort ab, ebenso war eine verringerte Sekretionsrate zu beobachten. Die beobachtete Abnahme der internen Alaninkonzentration könnte einerseits auf die Sekretion selbst, andererseits auf die Metabolisierung des Substrates zurückgeführt werden. Zur Kontrolle wurden den Zellen die Aminotransferasehemmer AOA (3mM) bzw. Gabaculin (0.3 mM) zugesetzt. Nach Glucoseverarmung wurde ebenfalls eine Abnahme der internen Konzentration festgestellt, die mit derjenigen der Kontrolle ohne Transferasehemmer vergleichbar war (nicht gezeigt). Eine Metabolisierung des Alanins über eine Transaminierung konnte somit ausgeschlossen werden. Gleichzeitig mit dem Absinken der internen Alaninkonzentration sank die zu diesem Zeitpunkt beobachtete Sekretionsrate. Aus der initialen, abfallenden, internen Alaninkonzentration konnte eine Sekretionsrate ermittelt werden, die in etwa mit der

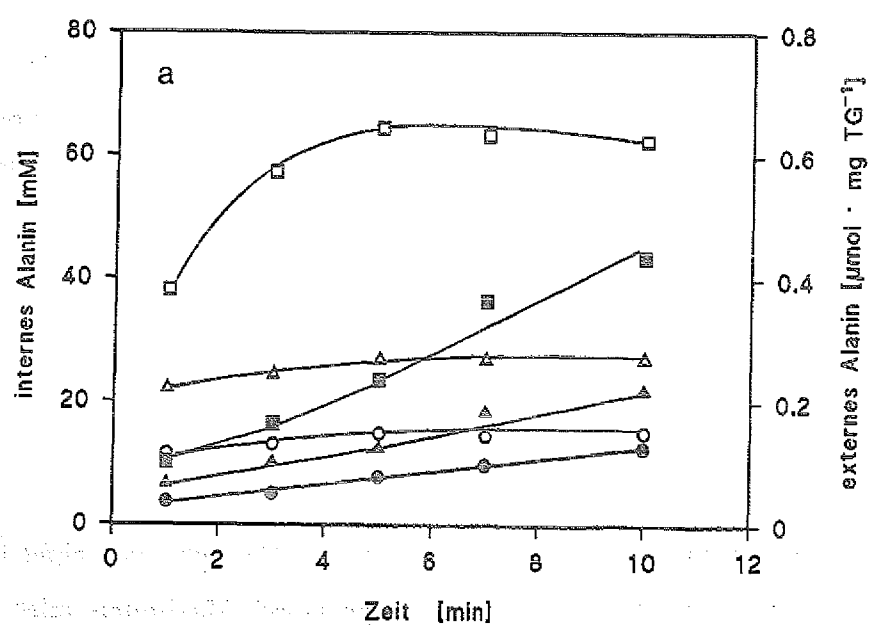
Sekretionsrate unter glucosesupplementierten Bedingungen übereinstimmte. Die intern abgesunkene Alaninkonzentration entsprach unter Berücksichtigung des Zellvolumens der im Überstand auftauchenden Alaninkonzentration. Hieraus konnte geschlossen werden, das der Abfall des internen Alanins nicht auf Metabolisierung des Alanins, sondern tatsächlich auf Sekretion zurückgeführt werden konnte. In einem Parallelansatz wurde den Zellen ausreichend Glucose (5%) zugesetzt, so daß über den gemessenen Zeitraum hin keine Glucoselimitierung auftrat. Nach ca. 3 min war eine sich im Fließgleichgewicht befindende interne Alaninkonzentration von 220 mM erreicht (Abb. 19). Entsprechend wurde eine hohe, linear verlaufende Sekretion beobachtet. Eine über insgesamt 2 h verlaufende Fermentation zeigte nach Glucoseverarmung über einen Zeitraum von 30 min Alanin-Sekretion bis zum Konzentrationsausgleich mit der externen Konzentration (nicht gezeigt). Nach erneuter Zugabe von Glucose war ein sofortiger Anstieg der internen Alaninkonzentration und entsprechend der Sekretionsrate zu beobachten, wobei die Rate derjenigen vor der Hungerphase entsprach. Die Hungerphase sollte jedoch 1 h nicht überschreiten, da die Zellen sehr empfindlich gegenüber Glucoseverarmung waren.
Die Sekretion erwies sich als unabhängig sowohl von der protonenmotorischen Kraft (Abbau von Δp nach Zugabe von CCCP) als auch vom ATP-Gehalt der Zellen, der nach Glucoseverarmung nahezu vollständig abgebaut wurde. In beiden Fällen wurde Alanin-Sekretion beobachtet. Anhand dieser Ergebnisse konnte sowohl ein primäres, ATP-getriebenes, als auch ein sekundäres, Δp-getriebenes Transportsystem, ausgeschlossen werden. Es handelt sich bei der Alanin-Sekretion um einen ausschließlich durch den über der Membran bestehenden Alanin-Gradienten getriebenen Transport.

3.3.4 Mechanismus der Alanin-Sekretion

3.3.4.1 Kinetische Parameter der Alanin-Sekretion

Bezüglich des Mechanismus der Alanin-Sekretion war nun zu klären, ob es sich um einen passiven, carrier-vermittelten Transport (Export über einen "Facilitator") oder um reine Diffusion handelt. Zunächst sollte sich deshalb die kinetische Charakterisierung des Exports anschließen. Im Gegensatz zu Messungen bei Aufnahmesystemen sind die Bestimmungen der Maximalgeschwindigkeit (V_{max}) und der Michaeliskonstante (K_m) bei Exportsystemen wesentlich schwieriger, da hier die intrazelluläre Konzentration des

Substrates variiert werden muß. Zur Einstellung verschiedener interner Alaninkonzentrationen sind prinzipiell zwei Möglichkeiten denkbar. (1) Aufgrund zunehmend längerer Hungerphasen in Minimalmedium ohne Thiamin wird die Aktivität der Pyruvat-Decarboxylase weiter herabgesetzt. Entsprechend wird infolge zunehmender, der Alanin-Dehydrogenase zur Verfügung stehender Pyruvatkonzentrationen mehr Alanin produziert. (2) Die interne Alaninkonzentration wird über extern zugesetzte Ammoniumkonzentrationen eingestellt. Es zeigte sich, daß über variierende, externe Ammoniumacetatkonzentrationen zwischen 15 - 100 mM eine sehr gute, reproduzierbare Abstufung der internen Alaninkonzentration von 15 - 280 mM möglich war. Mit Anstieg der internen Alaninkonzentration war ebenfalls ein Anstieg der entsprechenden Sekretionsrate zu beobachten. Abb. 20a zeigt die Sekretionsraten am Beispiel der eingestellten Alaninkonzentrationen von 15, 25 und 64 mM. Da während einer Fermentation die interne Alaninkonzentration kontinuierlich anstieg und mit ihr die ihr zugeordnete Sekretionsrate, konnte aus den einzelnen Kurven mehrere Wertepaare entnommen werden. In dem eingestellten internen Konzentrationsbereich bis zu 280 mM Alanin wurde keine Sättigung der Alanin-Sekretion festgestellt ($K_m \rightarrow \infty$, Abb. 20b).



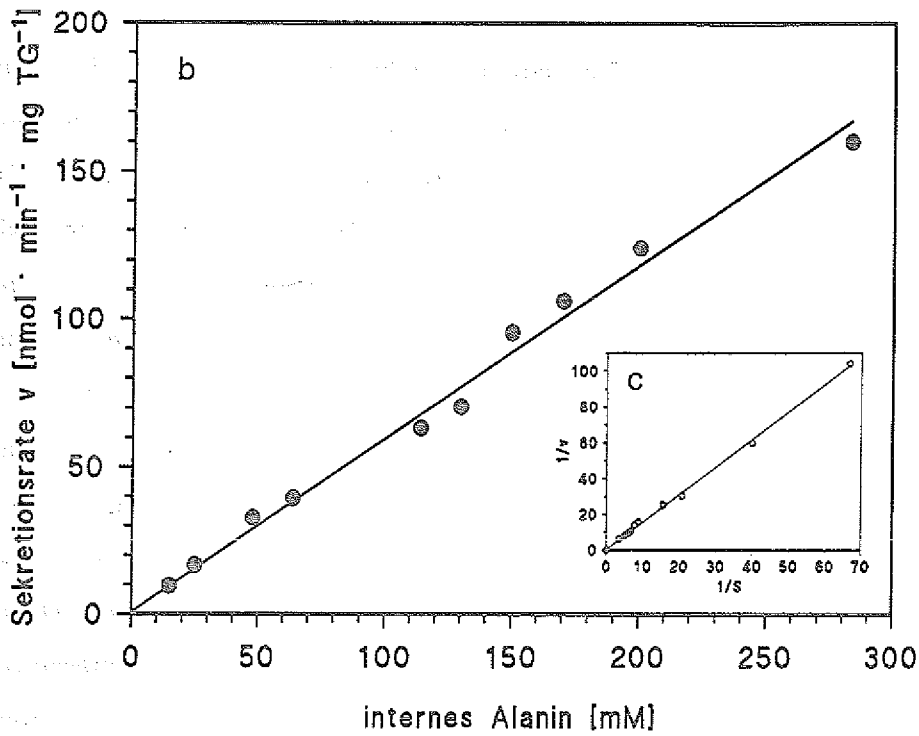


Abb. 20: Ermittlung der kinetischen Parameter (a) Interne (offene Symbole) und externe (geschlossene Symbole) Alaninkonzentrationen bei 15 mM (○,●), 30 mM (△,▲) und 50 mM (□,■) Ammoniumacetat im Fermentationsansatz. (b) Michaelis-Menten und (c) Lineweaver-Burk-Diagramm der Alanin-Sekretion

Ein Schwellenwert bezüglich der internen Konzentration wurde nicht gefunden. Die Alanin-Sekretionsrate ist somit über den gesamten Meßbereich linear abhängig von der internen Alaninkonzentration und gehorcht einer Reaktion "erster Ordnung". Die Sekretionskonstante beträgt $k = 1 \cdot 10^{-8}\ l\ s^{-1}\ mg\ TG^{-1}$. Diese Ergebnisse sprachen gegen einen carrier-vermittelten Transport, der laut Definition eine Sättigung zeigen sollte.

3.3.4.2 Gibt es ein Gegentausch-Maximum?

Eine weitere wichtige Möglichkeit, einen carrier-vermittelten Transport von einer Diffusion abzugrenzen, besteht in der Ermittlung eines Gegentausch-Maximums oder Minimums, welches eine sehr gute Evidenz für einen sekundären Carrier-Mechanismus ist, zu dem auch die erleichterte Diffusion zählen würde. Die Ermittlung eines Gegentausches setzt einen Transportvorgang des betreffenden Substrates in beide Richtungen voraus.

Vor Durchführung der Experimente wurde deshalb die Alanin-Aufnahme mit ^{14}C-markiertem L-Alanin untersucht. Es zeigte sich, daß es sich auch hierbei um einen nicht-akkumulierenden Transport handelt, über den die Aufnahme des markierten Alanins bis zur Equilibrierung mit der internen Alaninkonzentration erfolgt (Abb.21).

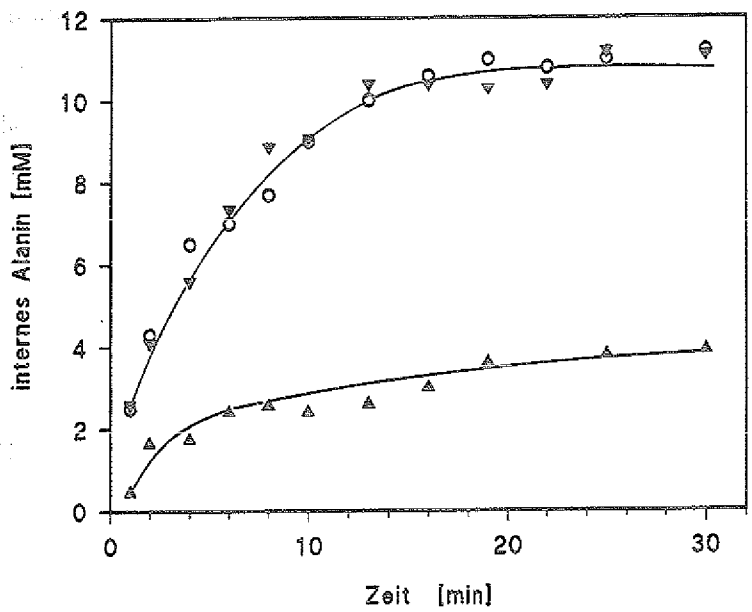


Abb. 21: **Alanin-Aufnahme.** Die Experimente zur Aufnahme wurden mit 3 mM ^{14}C-markiertem L-Alanin durchgeführt. Die interne Alaninkonzentration vor Zugabe des markierten Alanins betrug 3 mM (▲) sowie 10 mM (○,▼) Ein Ansatz wurde 5 min mit 100 μM CCCP vorinkubiert (○).

Um intern eine ausreichend hohe Alaninkonzentration nachweisen zu können, war es aufgrund geringer Zellvolumina aus meßmethodischen Gründen notwendig, extern relativ hohe Alaninkonzentrationen mit einer hohen spezifischen Aktivität zuzusetzen. Zur Ermittlung der Konzentrationsabhängigkeit der Aufnahmerate wurden die Zellen in glucosesupplementiertem Minimalmedium ohne Ammoniumacetat inkubiert, wobei die interne Alaninkonzentration maximal 3 mM erreichte. Die Aufnahmeraten korrelierten unter der Annahme eines Prozesses 1.Ordnung gut mit der außen vorgelegten Konzentration (bis zu 20 mM), wobei die Raten linear mit der Konzentration anstiegen. Es wurde eine mit der Sekretionskonstante übereinstimmende Aufnahmekonstante $k = 0.92 \cdot 10^{-8}\ s^{-1}\ mg\ TG^{-1}$ ermittelt. Hierbei muß berücksichtigt werden, daß bei Sekretionsprozessen die Raten bei Konzentrationen bis zu 280 mM ermittelt werden konnten. Aus meßtechnischen Gründen war es jedoch nicht möglich, bei Aufnahmeex-

perimenten höhere Konzentrationen als 20 mM einzusetzen, da sonst, trotz Korrekturen, aufgrund des mit dem extrazellulären Raum mitgeschleppten Alanins zu hohe Meßungenauigkeiten auftraten.
Bei der Alanin-Aufnahme handelt es sich, wie im folgenden dargelegt, um einen nicht durch ATP bzw. die protonenmotorische Kraft getriebenen Prozeß. (1) Wie bereits erwähnt, wird Alanin nicht akkumuliert. (2) Eine vollständige Entkopplung der Zellen durch CCCP führte zu keiner Veränderung der Aufnahmerate (Abb.21). (3) Ohne Glucose, d.h. bei vollständiger Deenergetisierung der Zellen wurde ebenfalls eine vergleichbare Rate ermittelt und Alanin-Aufnahme bis zum Konzentrationsausgleich verfolgt (Abb.21). Zusammenfassend konnte somit geschlossen werden, daß Alanin-Aufnahme und Sekretion sowohl bezüglich kinetischer als auch energetischer Daten übereinstimmten.

Die Ermittlung eines Gegentausch-Maximums wird mit deenergetisierten Zellen durchgeführt, wobei gewährleistet sein muß, daß das betreffende Substrat nicht metabolisiert wird. Das Vorhandensein eines Gegentausch-Maximums (oder Minimums) beruht darauf, daß zwei Substrate abwechselnd an eine gemeinsame Bindestelle binden (Harold, 1986). Im Falle einer carrier-vermittelten Alanin-Sekretion wäre mit dem Efflux des nichtmarkierten, intrazellulären Alanins entlang seines Konzentrationsgradienten der Influx des externen, markierten Alanins gekoppelt. Dieser Prozeß ist von der internen Alaninkonzentration abhängig, wobei bei einem Gegentausch-Maximum eine hohe interne Alaninkonzentration vorliegen muß, während extern eine niedrige Konzentration des markierten Alanins zugesetzt wird. Hieraus würde eine transiente interne Anreicherung des markierten Alanins ohne Zufuhr metabolischer Energie resultieren. Da es sich bei der Alanin-Sekretion einerseits um ein nicht-akkumulierendes System handelt, andererseits Alanin nicht metabolisiert wird, konnten die nachfolgend beschriebenen Experimente zur Ermittlung des Gegentausch-Maximums mit energetisierten Zellen durchgeführt werden. Die Zellen wurden in Alanin-Produktionsmedium 10 min mit 100 mM Ammoniumacetat vorinkubiert. Es wurde eine interne Konzentration von 240 mM aufgebaut. Die Alanin-Aufnahme wurde mit ^{14}C-markiertem L-Alanin verfolgt, wobei die extern zugesetzte Gesamtkonzentration 3 mM betrug. Bei diesem Experiment waren zwei gegenläufige Prozesse zu beobachten, zum einen die Alanin-Sekretion, zum anderen die Alanin-Aufnahme. Aufgrund der hohen internen Alaninkonzentration und der entsprechend hohen Export-Rate war eine kontinuierlich zunehmende externe Alaninkonzentra-

tion festzustellen. Die daraus resultierenden kontinuierlichen Änderungen der externen spezifischen Aktivität des Alanins mußten in die Berechnungen der tatsächlichen Aufnahmerate mit einbezogen werden. Bezogen auf die jeweilige Konzentration, erfolgte die initiale Aufnahme mit derselben Rate wie die Sekretion (Abb. 22). Ebenfalls gezeigt wird die unkorrigierte Aufnahme des ^{14}C-markierten Alanins. Es konnte somit eindeutig bewiesen werden, daß ein Gegentausch-Maximum nicht vorhanden war (Abb.22).

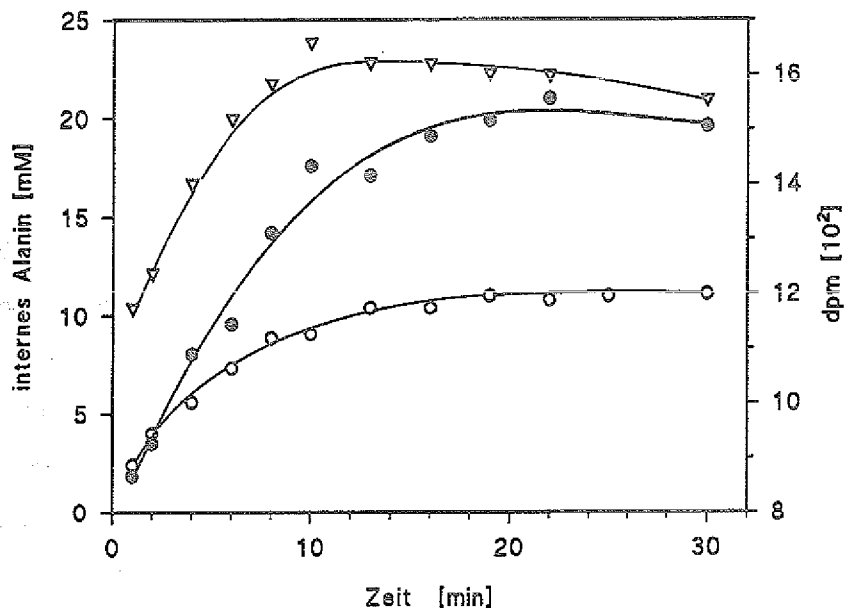


Abb. 22: **Versuch zur Ermittlung eines Gegentausch-Maximums.** Die interne Alaninkonzentration betrug zu Anfang des Experimentes 240 mM (●, ▽). Extern wurden 3 mM ^{14}C-L-Alanin zugesetzt. Gezeigt ist die im Sediment zu findende unkorrigierte Markierung (▽, in dpm) sowie die tatsächliche, korrigierte Alanin-Aufnahmerate (●), bei deren Ermittlung die infolge der hohen Sekretionsrate steigende externe Konzentration berücksichtigt wurde. Des weiteren ist die Alanin-Aufnahme bei einer internen Alaninkonzentration von 10 mM gezeigt (○). Es wurden ebenfalls extern 3 mM ^{14}C- L-Alanin zugesetzt.

Aufgrund der kontinuierlich hohen internen Alanin-Synthese und der entsprechend hohen Sekretionsrate wurde trotz der erreichten Äquilibrierung keine vollständige Markierung des internen Alanin-Pools festgestellt. Die spezifische Aktivität des internen Alanins stellte sich auf ein erniedrigtes Gleichgewicht ein.

Bei einer wesentlich geringeren Alaninkonzentration (10 mM) wurde nach Einstellung

des Gleichgewichtes (nach 10 min) eine vollständige Markierung des internen Alanin-Pools erreicht. Dies war auf die geringe interne Alaninkonzentration (sehr geringe Syntheserate) und die hieraus resultierende sehr niedrige Sekretionrate zurückzuführen. Die spezifische Aktivität des internen Alanins entsprach somit der extern ermittelten spezifischen Aktivität.
Die Ermittlung eines Gegentausch-Minimums wurde aus meßtechnisch bedingten Gründen nicht durchgeführt, da bei den einzusetzenden hohen externen Alaninkonzentrationen Meßungenauigkeiten auftreten würden.

3.3.4.3 Ermittlung der Aktivierungsenergie

Zur Ermittlung der Temperaturabhängigkeit der Alanin-Sekretion wurden die Zellen in Alanin-Produktionsmedium bei 37°C (Temperaturoptimum der Alaninproduktion) 10 min zum Aufbau einer hohen internen Alaninkonzentration vorinkubiert. Anschließend wurden sie in entsprechend vortemperiertes Produktionsmedium inokuliert (15° - 45°C) und die Sekretionsraten bestimmt. Dieser Temperaturbereich wurde gewählt, da aus Vorversuchen bekannt war, daß bis 45°C eine hohe Alanin-Syntheserate vorhanden war. Oberhalb von 50°C begann die Temperaturinaktivierung der an der Alanin-Produktion beteiligten Enzyme. Bei Temperaturen unterhalb von 37°C wurden aufgrund der herabgesetzten Enzymaktivitäten geringere interne Alaninkonzentrationen gemessen. Zur Ermittlung der Aktivierungsenergie wurde der natürliche Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten gegen die reziproke, absolute Temperatur aufgetragen (Arrhenius-Diagramm). In einem Temperaturbereich von 20° - 45°C wurde eine Aktivierungsenergie von 32 kJ/mol ermittelt (Abb.23). Unterhalb von 20°C betrug sie 42 kJ/mol. Die relativ geringe Aktivierungsenergie ist ein weiteres Indiz gegen einen Carrier.

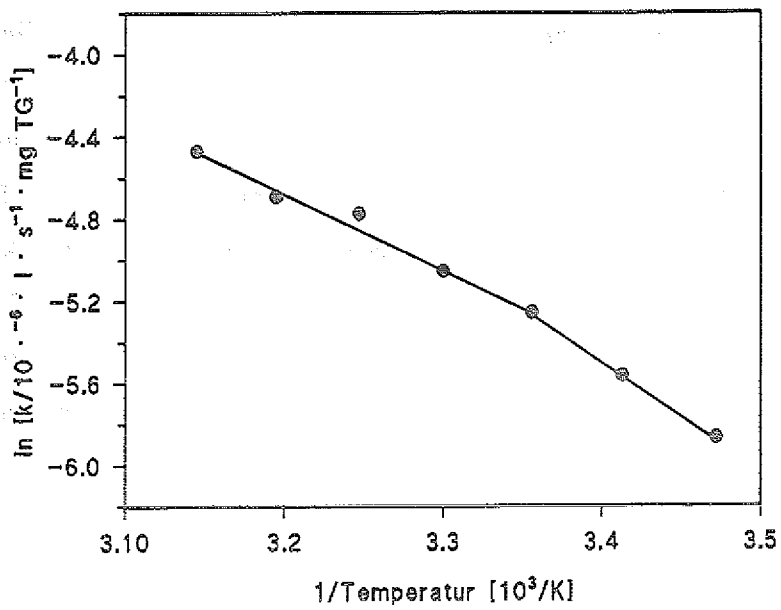


Abb. 23: Temperaturabhängigkeit der Alanin-Sekretion.
Arrhenius-Diagramm

3.3.4.4 Versuche zur Temperaturinaktivierung der Alanin-Sekretion

Wird ein Transport über ein Carrierprotein vermittelt, sollte es bei einer ausreichend hohen Temperatur möglich sein, die Sekretion, vorausgesetzt, daß die Zellmembran noch intakt ist, über Denaturierung des Proteins, d.h. über Carrier-Inaktivierung, zu hemmen. Im Falle einer reinen Diffusion dagegen darf keine Inhibition auftreten. Nach erfolgter Hitzeinaktivierung sollte bei einer bestehenden Konzentrationsdifferenz über der Membran der nun meßbare Efflux von Alanin nur auf Diffusion beruhen. Zur Durchführung des Experiments wurden die Zellen zunächst bei 37°C in Alanin-Produktionsmedium (mit 100 mM Ammoniumacetat) 10 min vorinkubiert, um eine hohe interne Alaninkonzentration zu erhalten. Vor dem Erhitzungsschritt wurde die externe Alaninkonzentration auf 200 mM entsprechend der erreichten internen Konzentration heraufgesetzt. Hiermit wurde verhindert, daß bei hohen Temperaturen, die infolge der Inaktivierung der an der Alaninbildung beteiligten Enzyme eine Einstellung der Alanin-Produktion bewirken, die interne Alaninkonzentration bereits während des Erhitzungsschrittes aufgrund der Sekretion herabgesetzt wurde. Hierbei könnte es sich um Efflux von Alanin infolge der bei dieser Temperatur stark erhöhten Diffusion und/oder um eine temperatur-bedingte

unspezifische Membranpermeabilität handeln. Anschließend wurden die Zellen in 4 parallelen Ansätzen auf 37° (Kontrolle), 55°, 59° und 65°C erhitzt, nach Abkühlen auf 37°C zentrifugiert und in 37°C temperiertem Minimalmedium (ohne Ammoniumacetat) 1 : 100 verdünnt, wodurch mit 2 mM externem Alanin ein ausreichend hoher Konzentrationsgradient vorhanden war. Die Alanin-Sekretionsrate wurde anhand der Abnahme der internen Konzentration ermittelt. Es zeigte sich, daß bei Temperaturen von 59° bzw. 65°C keine Effluxkinetiken meßbar waren, da bereits bei dem ersten Meßpunkt (nach 13 sec) kein internes Alanin mehr nachgewiesen werden konnte. Außerdem wurde ein stark reduziertes bzw. kein Zellvolumen mehr bestimmt. Aufgrund dieser Ergebnisse war bei diesen Temperaturen auf nicht mehr intakte Zellmembranen zu schließen. Bei Temperierung auf 55°C wurde dagegen eine dem Kontrollansatz vergleichbare Efflux-Kinetik beobachtet (Abb.24).

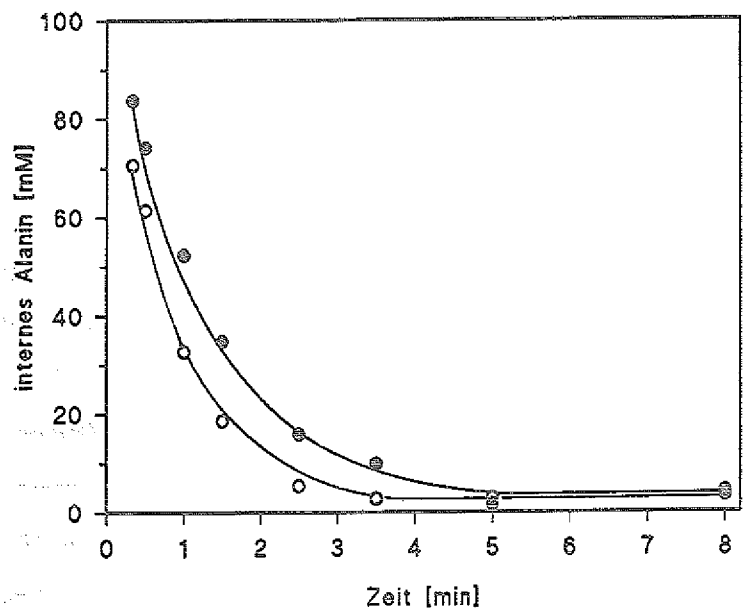


Abb. 24: Alanin-Sekretion bei 37°C (●) bzw. 55°C (○). Der Efflux wurde über den Abfall der internen Alaninkonzentration verfolgt.

Ermittelt wurden Sekretionskonstanten von $1 \cdot 10^{-8}$ l s^{-1} mg TG^{-1} (bei 55°C) bzw. $0.92 \cdot 10^{-8}$ l s^{-1} mg TG^{-1} (bei 37°C). Die Zellen sezernierten Alanin bis zum Konzentrationsausgleich mit dem externen Alanin. Die Intaktheit der Zellmembran wurde über Ermittlung des Zellvolumens nachgewiesen. Eine Proteininaktivierung durch Temperaturerhöhung auf 55°C konnte über eine Herabsetzung der Alanin-Produktion auf 10 %

der ursprünglichen Neubildung nachgewiesen werden. Eine Verfälschung der Sekretionsrate infolge Metabolisierung war nicht zu erwarten (s. Diskussion). Eine Temperaturbedingte Hemmung der Alanin-Sekretion wurde nicht festgestellt.

3.3.4.5 Stereospezifität der Alanin-Sekretion

Typisch für einen Carrier ist der stereoselektive Transport des betreffenden Substrates. Zur Untersuchung der Stereospezifität der Alanin-Sekretion bei *Z. mobilis* wurden die Zellen durch Inkubation mit 200 mM L-bzw. D-Alanin 2 h bei 15°C in Minimalmedium vorgeladen. Zur Unterbindung der zellinternen Alanin-Synthese wurde dem Ansatz kein Ammoniumacetat zugesetzt, dagegen mußten die Zellen aufgrund der langen Versuchsdauer glucosesupplementiert werden. Sowohl Vorinkubation als auch Efflux-Experiment wurden bei 15°C durchgeführt, um die auch bei *Z. mobilis* vorhandene Alanin- Racemase-Aktivität (persönliche Mitteilung, G. Sprenger) herabzusetzen.

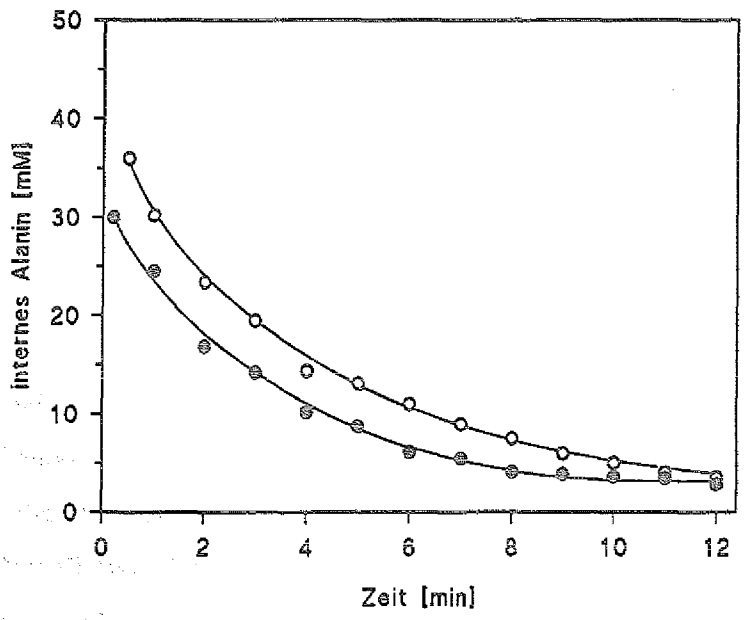


Abb. 25: Stereoselektivität der Alanin-Sekretion. Der Efflux von L-Alanin (○) bzw. D-Alanin (●) wurde bei 15°C über den Abfall der internen Konzentration ermittelt.

Abb. 25 zeigt den Efflux von L-bzw. D-Alanin, ermittelt über die Abnahme der internen Alaninkonzentration. Bei den mit D-Alanin vorgeladenen Zellen wurde der Anteil an L-Alanin enzymatisch bestimmt und betrug 25% der Gesamtkonzentration. Die Sekre-

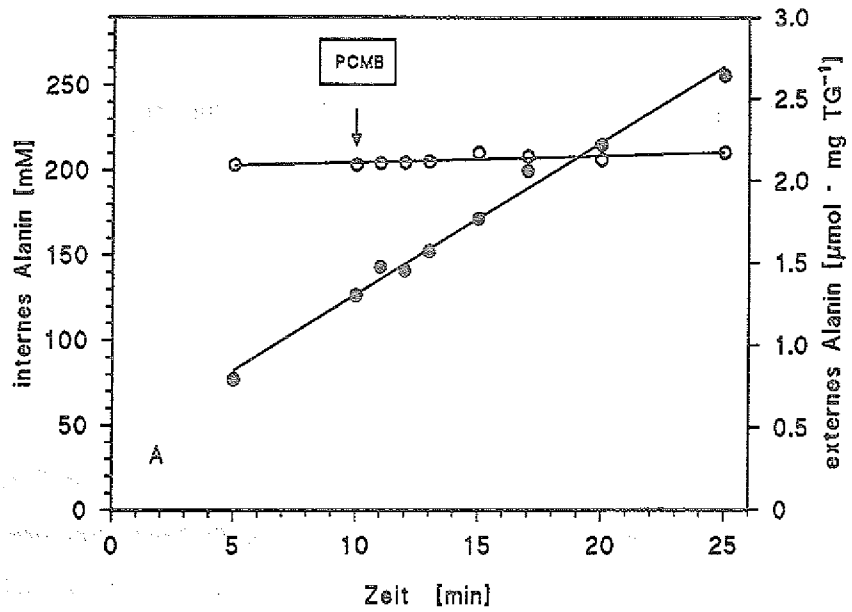
tionsraten der beiden Stereoisomere waren nahezu identisch. In beiden Fällen wurde eine Sekretionskonstante von k = 0.33 10^{-8} bzw. 0.36 10^{-8} s^{-1} mg TG^{-1} ermittelt, die etwas über dem bei dieser Temperatur erwarteten Wert lag. Der Alanin-Efflux wurde bis zum Konzentrationsausgleich beobachtet. Es konnte gezeigt werden, daß die Alanin-Sekretion nicht stereoselektiv verläuft, womit ein weiteres Indiz für einen carrier-vermittelten Transport ausgeschlossen werden konnte.

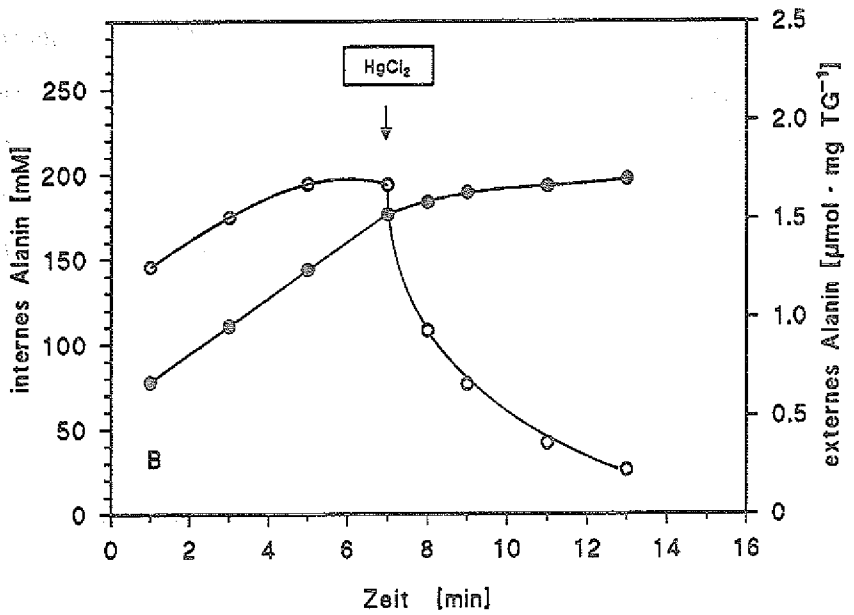
3.3.4.6 Beeinflussung der Alanin-Sekretion durch Hemmstoffe

Anhand der bisher dargestellten Experimente konnte eine carrier-vermittelte Alanin-Sekretion bei *Z. mobilis* ausgeschlossen werden. Um zu prüfen, ob es sich um eine reine Diffusion handelt, wurde untersucht, ob eine Hemmung des Alanin-Efflux durch Zusatz geeigneter Hemmstoffe zu beobachten war. Zur Durchführung der Hemmversuche, die eine hohe interne Alaninkonzentration voraussetzten, war eine Vorinkubation der Zellen in Alanin-Produktionsmedium vor Zugabe des Inhibitors unbedingt notwendig, da nach Zusatz des Inhibitors eine mögliche Hemmung des Glucose-Facilitators und somit der Alanin-Produktion berücksichtigt werden mußte. Entsprechend ließen sich die eingesetzten Inhibitoren bezüglich Wirkung auf Glucose-Aufnahme bzw. Alanin-Sekretion in drei Kategorien einteilen:

1) Keine Hemmung der beoachteten Transportvorgänge

Bei den Inhibitoren PCMB, PCMBS oder BPBA handelt es sich um bei Carriern meist sehr wirksame Agenzien, die über eine SH-Gruppen-Modifizierung oder Alkylierung der Aminosäurereste die Carrierfunktion beeinflussen. Zusatz von jeweils 200 μM eines Inhibitors zum Reaktionsansatz hemmten weder den Glucose-Facilitator noch den Alanin-Efflux. Wie aus Abb. 26A zu erkennen, bleibt nach Zusatz von PCMB die interne Alaninkonzentration konstant (200 mM), die Alanin-Sekretion erfolgt mit der der Konzentration entsprechenden Rate. Experimente zur Aufnahme von ^{14}C-markierter Glucose bestätigten die Ergebnisse, daß auch der Facilitator nicht gehemmt wurde (nicht gezeigt).


PCMB
A
internes Alanin [mM]
externes Alanin [µmol · mg TG⁻¹]
Zeit [min]
0
50
100
150
200
250
0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
0
5
10
15
20
25


HgCl₂
B
internes Alanin [mM]
externes Alanin [µmol · mg TG⁻¹]
Zeit [min]
0
50
100
150
200
250
0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
0
2
4
6
8
10
12
14
16

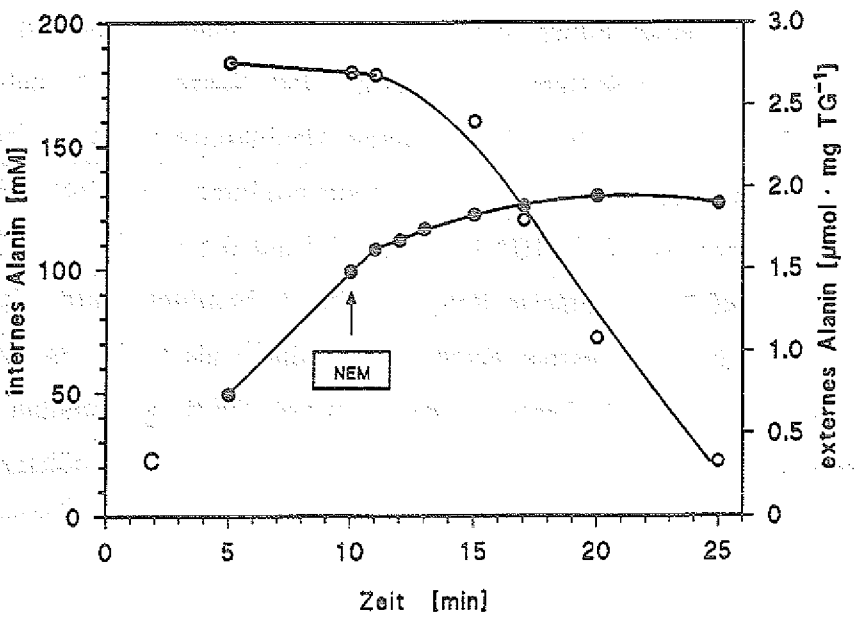

NEM
C
internes Alanin [mM]
externes Alanin [µmol · mg TG⁻¹]
Zeit [min]
0
50
100
150
200
0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
0
5
10
15
20
25

Abb. 26: Interne Alaninkonzentration (O) und Alanin-Sekretion (●) nach Zugabe von PCMB (A), $HgCl_2$ (B) bzw. NEM (C). Die Zellen wurden vor Zugabe der Hemmstoffe bei 37°C in Alanin-Produktionsmedium vorinkubiert. Versuchsdurchführung s. Text

2) Hemmung des Glucose-Facilitators

Zugabe von $HgCl_2$ (bis zu 0.5 mM), einem ebenfalls SH-Gruppen modifizierenden Agenz, führte zu einer vollständigen Hemmung der Glucose-Aufnahme über den Facilitator. Zu erkennen ist dies am Absinken des internen Alanin-Pools, d.h. es wird kein Pyruvat mehr nachgeliefert (Abb.26B). Bestätigt wurde die Inhibierung des Glucose-Facilitators durch direkte Messungen zur Aufnahme von ^{14}C-markierter Glucose (nicht gezeigt). Die Alanin-Sekretionsrate sank ebenfalls nach Zugabe von $HgCl_2$, bezogen auf die abgesunkene interne Konzentration ergab sich eine dem Kontrollansatz ohne $HgCl_2$ vergleichbare Sekretionskonstante. Die Sekretionsrate konnte hierbei sowohl direkt über die Sekretion als auch über die abfallende interne Alaninkonzentration unter Berücksichtigung des internen Zellvolumens ermittelt werden. Bis zu 500 μM $HgCl_2$ wurde die Alanin-Sekretion nicht gehemmt. Höhere Konzentrationen wurden aufgrund der bekannten unspezifischen Wirkungen nicht eingesetzt.

3) Hemmung sowohl der Glucose-Aufnahme als auch der Alanin-Sekretion

Zugabe von NEM (2 mM, alkylierend), führte im Gegensatz zu den übrigen erprobten Hemmstoffen nicht nur zu einer Inhibierung der Glucose-Aufnahme, sondern auch zu einer Beeinflussung der Alanin-Sekretion (Abb.26C). Die Sekretionsrate nahm nach Zugabe von 2 mM NEM ab, ebenfalls sank die interne Alaninkonzentration aufgrund des gehemmten Glucose-Facilitators schnell ab. Bezogen auf die interne Alaninkonzentration sank die Sekretionskonstante von 0.84 10^{-8} l s^{-1} mg TG^{-1} auf 0.5 10^{-8} l s^{-1} mg TG^{-1} ab, d.h. es wurde eine um 40% verminderte Rate beobachtet. Ermittelt wurde die Sekretionsrate wieder sowohl über das extern erscheinende Alanin als auch über die intern abfallende Konzentration unter der Voraussetzung eines vollständig gehemmten Facilitators. Eine vollständige Hemmung der Alanin-Sekretion wurde auch bei höheren NEM-Konzentrationen nicht erreicht.

Die oben genannten Inhibitoren wurden ebenfalls bei Experimenten zur Alanin-Aufnahme eingesetzt. Nach Zugabe von PCMB, PCMBS und $HgCl_2$ wurde die Alanin-Aufnahme nicht gehemmt. BPAB führte zu einer leichten Hemmung der Aufnahme (20%). Vergleichbar mit den Resultaten zu den Efflux-Experimenten wurde nach Zusatz von NEM (2mM) ebenfalls eine geringfügige Hemmung der Aufnahme (max. 30%) beobachtet.

4. DISKUSSION

Zymomonas mobilis ist ein Gram-negatives, anaerobes, jedoch aerotolerantes Bakterium, welches ATP ausschließlich über den Entner-Doudoroff-Weg gewinnt. Obwohl die Komponenten der Atmungskette nachgewiesen werden konnten (Pankova et al., 1985; Strohdeicher et al., 1989, 1990), wurde bisher kein Energiegewinn über oxidative Phosphorylierung gezeigt. Über den Energiestatus dieses Bakteriums, welches unter anaeroben Bedingungen nur über eine geringe Energieausbeute verfügt, lagen bisher noch keine ausreichenden Daten vor. Insbesondere in Hinblick auf Untersuchungen zu primären und sekundären Transportvorgängen ist eine Quantifizierung und Variation der energetischen Parameter essentiell.

4.1 Die energetischen Parameter von *Z. mobilis*

In der vorliegenden Arbeit wurden die energetischen Parameter ATP-Gehalt, der Protonengradient und das Membranpotential ausführlich untersucht. Für den cytosolischen ATP-Gehalt wurde ein Wert von 3 - 4 mM ermittelt, der gut mit früheren Bestimmungen zum ATP/Trockenmasse-Verhältnis in *Z. mobilis* übereinstimmt (Lazdunski, 1972). Die aus eigenen Messungen bekannte Korrelation von Zellvolumen und Trockenmasse wurde für diesen Vergleich zugrunde gelegt. Auffällig war der nach Glucoseverarmung der Zellen nahezu vollständige Abbau des cytosolischen ATP-Gehaltes, der nur noch 0.1 mM (Nachweisgrenze) betrug. Im Vergleich hierzu wiesen durch Entkopplung deenergetisierte Zellen von *Corynebacterium glutamicum* (ohne C-Quelle) noch einen ATP-Gehalt von 1.5 - 2.0 mM auf (Bröer und Krämer, 1991). Offensichtlich besitzt *Z. mobilis* keine signifikanten Energiereserven. Der ATP-Gehalt wurde durch Zugabe hoher Konzentrationen des Entkopplers CCCP nicht beeinflußt. So verfügt das anaerobe Bakterium *Z. mobilis* über keine ATP-Synthase-, sondern ausschließlich über ATPase-Aktivitäten, d.h. die protonenmotorische Kraft wird über ATP-Hydrolyse aufgebaut (Lazdunski und Belaich, 1972, Reyes und Scopes, 1991). Demzufolge war es nicht möglich, die ATP-Konzentration unabhängig von der protonenmotorischen Kraft zu variieren. Die ATPase war durch DCCD nicht hemmbar, da der Hemmstoff vermutlich keine Zugänglichkeit zur Cytoplasmamembran besaß.

Im physiologischen pH-Bereich von pH 4.0 bis pH 7.0 wurde bei *Z. mobilis* eine ausgeprägte pH-Homöostase ermittelt, wobei der interne pH-Wert von pH 6.0 bis 6.4 variierte.

Als problematisch erwies sich die Ermittlung des Membranpotentials. Hier mußten zunächst experimentelle Schwierigkeiten überwunden werden. So wurde bereits in der Literatur von Versuchen zur Bestimmung des Potentials bei *Z. mobilis* berichtet, die jedoch daran scheiterten, daß die Methoden nicht durchführbar waren (Kalnenieks et al. 1987). Zunächst wurden in der vorliegenden Arbeit Methoden erprobt, die routinemäßig bei anderen Bakterien erfolgreich angewandt werden. Hierbei wurde festgestellt, daß die lipophile Sonde Tetraphenylphosphoniumbromid (TPP^+) nicht entsprechend des Membranpotentials akkumuliert. Dies wurde bereits in der Literatur berichtet (Kalnenieks, 1987). Eine Destabilisierung der äußeren Membran durch EDTA oder Absättigung der freien hydrophilen Bindestellen über nicht-markiertes Tetraphenylboron (TPB^-) führten zu keiner Verbesserung der Ergebnisse. Die Bildung eines permeablen, elektroneutralen TPP^+/TPB^- Ionenpaares, entsprechend der in der Literatur beschriebenen permeablen $TPMP^+/TPB^-$ Ionenpaare, konnte ebenfalls ausgeschlossen werden (Jackson und Nicholls, 1986).
Die Ermittlung von Membranpotentialen über die Rb^+/Valinomycin Methode gilt als besonders exakt (Bakker, 1990). Valinomycin ist ein neutrales Ionophor, welches mit einer sehr hohen Spezifität K^+ die Diffusion über die Membran ermöglicht. Neben Messungen des Membranpotentials kann es ebenfalls über variierende, extern zugesetzte Kaliumkonzentrationen zur Abstufung (Kontrolle) des Potentials genutzt werden. Mittels dieser Methode wurden bei *Z. mobilis* Werte für das Membranpotential von -130 mV (bei pH 5.5) bzw. -85 mV (bei pH 5.0) ermittelt. Es zeigte sich jedoch, daß auch in Gegenwart sehr hoher Valinomycinkonzentrationen (bis zu 200 μM) sich das extern zugesetzten $^{86}Rb^+$ nicht innerhalb von Sekunden entsprechend des Membranpotentials bzw. des Kaliumgradienten verteilte. Diese auch bei anderen Gram-negativen Bakterien bekannten Schwierigkeiten (Bakker,1990) wurden in *E. coli* durch Zusatz von EDTA zur Destabilisierung der äußeren Membran bei Anwendung von Ionophoren und auch Sonden umgangen (Ahmed und Booth, 1983; Kashket, 1985). Ein Hauptproblem bei der Anwendung von EDTA ist die Möglichkeit, heterogene Populationen von Zellen in Hinblick auf den Grad der Zerstörung der äußeren Membran zu erhalten. Nach Zugabe

variierender Konzentrationen EDTA zum Versuchsansatz wurde bei *Z. mobilis* keine Veränderung der Ergebnisse erzielt. Hieraus konnte geschlossen werden, daß Valinomycin bei *Z. mobilis* nicht in die Cytoplasmamembran inserieren kann und somit nicht anwendbar ist. Erwähnt werden muß in diesem Zusammenhang, daß auch bei *E. coli* Zugabe von EDTA nicht immer zu den gewünschten Ergebnissen führte. Hier stehen jedoch *E. coli* Mutanten mit einem Defekt in der äußeren Membran zur Verfügung, die keine Permeabilitätsbarriere für die Ionophore aufweisen (Ahmed und Booth, 1983). Entsprechende Mutanten sind bei *Z. mobilis* nicht vorhanden. Des weiteren wurden in der Literatur Messungen des Membranpotentials mittels Valinomycin bei einer Mutante von *E. coli* beschrieben, die ebenfalls, auch in Gegenwart von Valinomycin, einen zeitabhängigen Verlauf aufwiesen (Ahmed und Booth, 1981). Hier stieg das Membranpotential zunächst schnell auf -120 mV, befand sich jedoch erst nach weiteren 15 min im Gleichgewicht bei -140 mV. Dies wurde auf K^+-Transport in diesen Zellen zurückgeführt. Bei *Z. mobilis* wurde eine langsame Aufnahme von $^{86}Rb^+$ ermittelt, die ausschließlich auf K^+-Transportsysteme zurückzuführen war.

Somit wurde sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Valinomycin der unter physiologischen Bedingungen herrschende Kaliumgradient ermittelt, wobei unter den genannten Versuchsbedingungen nach 15 min die Einstellung des Fließgleichgewichtes erreicht wurde. Über den so ermittelten Kaliumgradienten konnte die interne Kaliumkonzentration nach Gleichgewichtseinstellung bei variierenden externen Kaliumkonzentrationen bestimmt werden. Hierzu wurden die internen Kaliumkonzentrationen gewaschener Zellen zunächst ionenchromatographisch ermittelt und über den Gradienten die jeweiligen K^+-Verschiebungen detektiert. Es wurde eine recht gute K^+-Homöostase beobachtet. Nach Zusatz des Protonophors CCCP, welches die protonenmotorische Kraft vollständig abbaut, wurde ebenfalls ein Abbau des Kaliumgradienten beobachtet. Dies könnte als ein Indiz für ein sekundär getriebenes K^+-Transportsystem gewertet werden.

Da die konventionellen Methoden zur Ermittlung des Membranpotentials bei *Z. mobilis* nicht anwendbar waren, wurde die Verteilung der Sonde SCN^- (Thiocyanat) entsprechend des Potentials erprobt. Diese Sonde wird zur Ermittlung von umgekehrt orientierten Potentialen (innen positiv), angewandt, so z.B. bei dem acidophilen Bakterium *Thiobacillus ferrooxidans*, welches im extrem sauren pH-Bereich ein umgekehrt orientiertes Membranpotential aufweist. (Cox et al. 1979; Matin et al., 1982). SCN^-

akkumuliert entsprechend seiner Ladung. Es zeigte sich, daß bei *Z. mobilis* auch ein "normal" orientiertes Membranpotential, innen negativ, mittels SCN^- über eine Abreicherung der Sonde in einem Bereich von pH 4.0 - pH 5.5 ermittelt werden konnte. Als vorteilhaft erwies sich bei dieser Methode, daß nach Anwendung bei *Z. mobilis* einerseits weder unspezifische Bindung noch aktive Aufnahme von SCN^- ermittelt wurden, andererseits keine Ionophore notwendig waren. Somit wurde das unter den gegebenen Bedingungen physiologische Membranpotential gemessen. Bedingt durch die Ladung der Sonde wurde der Bereich zur Messung der Membranpotentiale auf 0 bis -100 mV eingeschränkt, höhere Potentiale (bis -100 mV) waren nur mit entsprechend hohen Standardabweichungen zu ermitteln. Höhere Potentiale in einem Bereich über pH 5.5 wurden, basierend auf den folgenden Überlegungen, errechnet. Generell ist bei Bakterien bekannt, daß Δp bei variierenden externen pH-Werten in etwa konstant gehalten wird (Padan et al., 1981; Booth, 1985; Michels und Bakker 1985; Bakker, 1990). Diese Beobachtungen wurden auch durch eigene Messungen bei *Z. mobilis* in einem pH-Bereich von 4.0 - 5.5 bestätigt, wobei beide Komponenten von Δp direkt ermittelt wurden. Die protonenmotorische Kraft erreichte Werte von -132 bis -139 mV. Sie entsprechen in etwa denen anderer aerober und anaerober Bakterien (Kashket, 1985). Bei externen pH-Werten größer pH 5.5 wurden die Membranpotentiale mittels der direkt gemessenen ΔpH-Werte unter der Annahme einer konstanten protonenmotorischen Kraft errechnet. Somit konnten bei *Z. mobilis* zum ersten Mal Aussagen zu den Komponenten der protonenmotorischen Kraft gemacht werden.

Ionophore werden häufig dazu genutzt, die Parameter von Δp zu variieren. Es wurde bereits gezeigt, daß Valinomycin zur Einstellung von unterschiedlichen K^+-Diffusionspotentialen nicht anzuwenden war. Ebenso zeigte Nigericin, welches den elektroneutralen K^+/H^+-Austausch vermittelt und somit zur Kontrolle des Protonengradienten genutzt werden kann, bei *Z. mobilis* keinen Effekt. Es zeigte sich jedoch, daß mit steigenden CCCP-Konzentrationen das Membranpotential zunehmend herabgesetzt wurde, während der ATP-Gehalt konstant hohe Werte aufwies. Somit konnte das Potential unabhängig vom ATP-Gehalt variiert werden. Die zur vollständigen Entkopplung notwendigen sehr hohen CCCP-Konzentrationen waren darauf zurückzuführen, daß das hydrophobe, lipidlösliche Protonophor bei Gram-negativen Bakterien auch in die äußere Membran inseriert (Booth, 1989). Eine weitere Möglichkeit, das Membranpotential zu beeinflussen, bestand in der Zugabe hoher KCl- oder NaCl-Konzentrationen. Oberhalb von 50 mM war eine

signifikante Herabsetzung des Membranpotentials zubeobachten. Hierbei handelt es sich im Gegensatz zu Diffusionspotentialen um eine direkte Beeinflussung des physiologischen Potentials durch die externe Salzkonzentration. Hierin könnte die Ursache für die hohe Salzempfindlichkeit von *Z. mobilis* liegen (Swings und DeLey, 1977; Rogers et al., 1984, Bringer-Meyer und Sahm, 1988). Vergleicht man die Kurve zur Abhängigkeit des Membranpotentials von der Kaliumkonzentration (Abb. 7a) mit der Darstellung der Abhängigkeit des Kaliumgradienten von der externen Kaliumkonzentration (ausgedrückt als elektrisches Potential), so fällt eine Ähnlichkeit des Kurvenverlaufs auf. In beiden Fällen beträgt die Steigung bei 10-fachem Anstieg der externen Kaliumkonzentration ca.-50 bzw. -60 mV. Wurden bei sehr niedrigen externen Kaliumkonzentrationen die Kaliumgradienten bei pH 5.0 bzw. 5.5 als elektrisches Potential ausgedrückt, so betrugen die Werte -85 bzw. -130 mV und waren so mit den mittels SCN^- erhaltenen Werten für das Membranpotential in etwa vergleichbar. Dies könnte neben dem bereits genannten Abbau des Kaliumgradienten nach CCCP-Zugabe als ein Hinweis auf ein sekundär getriebenes K^+-Aufnahmesystem gewertet werden. Insofern wäre es dann andererseits möglich, daß bei niedrigen externen Kaliumkonzentrationen der Kaliumgradient tatsächlich dem Membranpotential entspricht. Interne Regulationen müßten noch berücksichtigt werden.

Mit Hilfe der beschriebenen Methoden war es nun möglich, die energetischen Parameter von *Z. mobilis* sowohl zu quantifizieren als auch unabhängig voneinander zu variieren (modulieren) und somit auch aktive Transportvorgänge zu untersuchen.

4.2 Die Glutamat-Aufnahme in *Z. mobilis*

Mit Hilfe der oben dargestellten Methoden zur Quantifizierung und Variierung der energetischen Parameter von *Z. mobilis* war es möglich, die Aufnahme von Glutamat auch in Hinblick auf Energiekopplung näher zu definieren. Da *Z. mobilis* sich Sauerstoff gegenüber tolerant verhält (Bringer et. al, 1984), mußten die Aufnahmeexperimente nicht unter streng anaeroben Bedingungen durchgeführt werden. Dagegen erwies sich der Organismus als sehr sensitiv gegenüber durch Glucoseverarmung bedingte Energielimitierung. Während der Versuche mußte deshalb darauf geachtet werden, daß eine experimentell eingestellte Glucoseverarmung der Zellen nicht länger als 60 min (bei Raumtem-

peratur) andauerte, anderenfalls waren bei kinetischen Messungen lag-Phasen zu beobachten und die Reproduzierbarkeit bezüglich der Aufnahmeraten nicht mehr gegeben. Offensichtlich besitzt *Z. mobilis* unter diesen Bedingungen keine signifikanten Speichersubstanzen. Unterstützt wurde dies, wie bereits dargelegt, durch den nach Glucoseverarmung beobachteten sofortigen, nahezu vollständigen Abbau des ATP-Gehaltes.

Sowohl die niedrige interne Glutamat-Konzentration als auch die beobachteten nichtlinearen Aufnahmekinetiken wiesen auf eine Metabolisierung des Glutamates hin, wobei eine Metabolisierungsrate von 4 nmol · min^{-1} · mg TG^{-1} abgeschätzt wurde. Ein signifikanter Einbau des Glutamates bei der Proteinbiosynthese war zum einen aufgrund der kurzen Versuchsdauer unwahrscheinlich, zum anderen führte die Hemmung der Proteinbiosynthese nicht zu einer veränderten Aufnahmekinetik. Durch Zugabe des Transaminasehemmers Aminooxyacetat wurde eine signifikante Verlangsamung der Metabolisierung des Glutamates erreicht, resultierend sowohl in einer erhöhten internen Glutamatkonzentration als auch einer jetzt über Minuten linear verlaufenden Aufnahmekinetik. Somit ist auf eine Metabolisierung des Glutamates über eine Transaminierung zu schließen, wobei eine Beeinflussung anderer, Pyridoxalphosphat abhängiger Enzyme nicht auszuschließen war.

Messungen zu den kinetischen Parametern zeigten eine sehr niedrige Affinität des Carriers zum Substrat (K_m = 1.05 bei pH 5.5) bei einer gleichzeitig hohen Maximalgeschwindigkeit (36.5 nmol · min^{-1} · mg TG^{-1}). Die Messungen der Aufnahmekinetiken erfolgten innerhalb von 3 min, dies führte infolge kinetischer Effekte bei hohen externen Glutamatkonzentrationen oberhalb von 1 mM auch in Gegenwart von Valinomycin zu ungenauen Bestimmungen. Die Affinität des Glutamat-Aufnahmesystems zum Substrat ist, verglichen mit anderen sowohl primären als auch sekundären Aminosäureaufnahmesystemen, ungewöhnlich niedrig. So wurden z. B. bei *E. coli* für primäre Glutamat-Aufnahmesysteme K_m-Werte von 0.5- 0.8 μM ermittelt, für sekundäre Aufnahmesysteme Km-Werte von 1.5 μM - 6 μM (Schellenberg und Furlong, 1977).

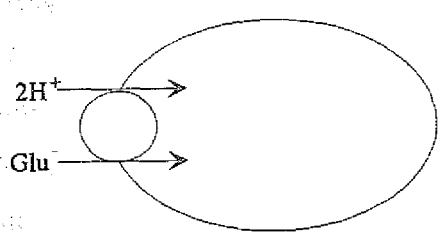
Die Durchführung der Aufnahmeexperimente in einem pH-Bereich von 5.0-6.0 erforderte eine Definition der transportierten Form des Glutamates, wobei sowohl die protonierte (GluH) als auch die deprotonierte Form (Glu^-) als Substrat in Betracht zu ziehen war. In einem physiologischen pH-Bereich von 4.3 - 7.0 nahm der apparente K_m-Wert

mit steigendem pH zu, während die Maximalgeschwindigkeit nur geringfügig variierte. Zur Ermittlung der tatsächlich transportierten Form des Glutamates wurde für jede der beiden Spezies, unter Berücksichtigung der bei dem jeweiligen pH-Wert vorhandenen Konzentrationen, der K_m-Wert errechnet. Die transportierte Form sollte einen pH-unabhängigen K_m-Wert aufweisen. Für das Citrat-Transport-System von *Klebsiella pneunomiae* wurde $HCit^{2-}$ als transportierte Spezies definiert, indem hier ein pH-unabhängiger K_m ermittelt wurde, während die Maximalgeschwindigkeit sich nicht änderte (Van der Rest et al. 1991). Ebenso wies das Glutamat-Glutamin-Tranportsystem von *Streptococcus cremoris* bezüglich des somit als transportierte Form definierten protonierten Glutamates einen pH-unabhängigen K_m-Wert auf (Poolman et al. 1987). Bei *Z. mobilis* zeigte sich, daß der K_m der protonierten Form des Glutamates im physiologischen pH-Bereich um Faktor 38 variierte, wobei bei hohen pH-Werten extrem geringe K_m-Werte die Konsequenz wären. Die anionische Form dagegen variierte in diesem Bereich nur um Faktor 2.5. Unter Berücksichtigung der meßtechnisch bedingten Standardabweichungen ließ sich die deprotonierte Form des Glutamates als die alleinige vom Carrier akzeptierte Spezies definieren. Die pH-bedingten Schwankungen könnten auf einen direkten Einfluß des externen pH auf das Carrierprotein hinweisen. Wie bei den zitierten Transportsystemen war auch beim Glutamat-Transport eine nahezu pH-unabhängige Maximalgeschwindigkeit festzustellen.

Die Energiekopplung der Glutamat-Aufnahme

Bei der Glutamat-Aufnahme konnte eine Beteiligung von Na^+- und K^+-Ionen sowohl als treibende Kraft als auch als cotransportierte Ionen ausgeschlossen werden. Unter verschiedenen Versuchsanordnungen konnte eine strenge Korrelation ausschließlich von protonenmotorischer Kraft und Glutamat-Aufnahme gezeigt werden (Abb.14 a,b). Diese Korrelation war auch bei Versuchsdurchführung bei einem externen pH von 6.5, d.h. in Abwesenheit eines pH-Gradienten, gegeben. Aufgrund der Ladung des Glutamates und der bewiesenen Abhängigkeit der Glutamat-Aufnahme vom Membranpotential mußte ein Cotransport mit mindestens zwei Protonen gefordert werden. Die Glutamat-Akkumulation entsprach im "steady state" der protonenmotorischen Kraft, wobei eine unterschiedliche Beteiligung ihrer Komponenten berücksichtigt werden mußte. Basierend auf dieser Überlegung konnte die Transportstöchiometrie n errechnet werden (siehe Gleichung

unter 2.3.2.), wobei sich ein Cotransport von Glutamat zusammen mit 2 Protonen ergab. Mit steigendem externem pH wurde eine zunehmend geringere Glutamat-Akkumulation nachgewiesen. Hierbei zeigte sich, daß die errechnete Stöchiometrie, den o.g. Mechanismus vorausgesetzt, über einen weiten Bereich von variierender Beteiligung von ΔpH und $\Delta\psi$ konstant war.



Die Glutamat-Aufnahme bei *Z. mobilis* Zm6

Das Glutamat-Aufnahmesystem von *Z. mobilis* konnte somit eindeutig als ein sekundäres, elektrogenes $2H^+/Glu^-$-Cotransportsystem (Symport) definiert werden, womit die erleichterte Diffusion (der Glucose), das bisher bei *Z. mobilis* einzige bekannte Transportsystem, als generelles Motiv auszuschließen ist.

Sollten andere Ionen für die elektrogene Glutamat-Aufnahme verantwortlich sein, wäre ausschließlich eine Korrelation zum Membranpotential, jedoch nicht zum Protonengradienten zu erwarten. Dies würde bedingen, daß mit steigendem externem pH und somit steigendem Membranpotential, bei Beteiligung ausschließlich anderer Kationen als Protonen, ebenfalls eine Erhöhung der Akkumulation zu fordern wäre. Ein Cotransport von Glutamat mit zwei Kationen wird auch bei anderen Bakterien beobachtet. Bei *E. coli* z. B. wird sowohl ein Na^+-unabhängiger, $2H^+$/Glutamat-Aspartat-Symport (Deguchi et al., 1989, Wallace et al., 1990, Tolner et al., 1992) als auch ein Na^+/Glutamat-Symport (Schellenberg und Furlong, 1977, Fujimura et al., 1983, Deguchi et al., 1990) beschrieben. Des weiteren ist bei *Bacillus stearothermophilus* ein Cotransport von Glutamat mit Na^+ und H^+ bekannt (DeVrij et al., 1989). Die Möglichkeit eines primären Glutamat-Transportsystems, wie es sowohl für Gram-negative (Schellenberg und Furlong, 1977) als auch für Gram-positive Bakterien (Poolman et al., 1987, Krämer und Lambert, 1990,2) beschrieben wird, konnte für *Z. mobilis* ausgeschlossen werden (Abb.14 a,b). Auch sprachen die erreichten Glutamat-Gradienten gegen ein primäres Transportsystem, bei dem wesentlich höhere Gradienten zu erwarten gewesen wären (Krämer und Lambert, 1990).

Die sehr niedrige Affinität des Glutamat-Aufnahmesystems wirft die Frage auf, ob Glutamat tatsächlich das richtige Substrat für diesen Carrier ist. So wurde kürzlich eine durch Glutamat kompetitiv hemmbare Aufnahme von Glutamin bei *Z. mobilis* beschrieben (Alexandri et al., 1990). In der vorliegenden Arbeit konnte dagegen gezeigt werden, daß die Glutamat-Aufnahme nicht durch Glutamin kompetiert wird. Auch andere getestete Aminosäuren interferierten nicht mit der Glutamat-Aufnahme (nicht gezeigt). Des weiteren ist dieses Transportsystem aufgrund der ermittelten Daten bezüglich Energetik und Kinetik klar von der Glutamin-Aufnahme abgrenzbar. Ein weiteres Glutamat-Aufnahmesystem wurde nicht gefunden. Bezüglich der Spezifität war die Glutamat-Aufnahme bei *Z. mobilis* mit einer Vielzahl anderer Glutamat-Aufnahmesysteme vergleichbar (Schellenberg und Furlong, 1977). So akzeptiert der Carrier mit derselben Affinität sowohl Glutamat als auch Aspartat. Der Transport von Carboxylkomponenten durch dieses System ist unwahrscheinlich, da *Z. mobilis* außer Glucose, Fructose bzw. Saccharose keine weiteren Kohlenstoffquellen akzeptiert. Andererseits kann *Z. mobilis*, wie auch in der Literatur beschrieben, Glutamat als einzige Stickstoffquelle nutzen (Galani et al., 1985). Zellen, die unter diesen Wachstumsbedingungen angezogen wurden (50 mM Glutamat), wiesen eine Wachstumsrate von von $\mu = 0.2\ h^{-1}$ auf. Über den hierfür notwendigen Stickstoffbedarf wurde eine erforderliche Glutamat-Aufnahmeaktivität von ca. 35 nmol · min^{-1} mg TG^{-1} errechnet. Dies ist in guter Übereinstimmung mit den beobachteten Maximal-Transportraten der Glutamat-Aufnahme bei in sättigenden Konzentrationen vorliegendem externem Glutamat. Somit wirkt sich die Glutamat-Aufnahmerate unter diesen Bedingungen als limitierender Faktor bezüglich der Wachstumsrate aus.

4.3 Die Alanin-Sekretion in *Z. mobilis* CP4-thi/pZY 73

Bisher wurden ausführlich die Grundlagen der Energetik von *Z. mobilis* dargestellt. Am Beispiel der Glutamat-Aufnahme wurde ein Aufnahmeprozeß bezüglich Mechanismus und Energiekopplung geklärt, wobei gezeigt werden konnte, daß dieser Transportprozeß bei *Z. mobilis* mit Transportvorgängen anderer, sowohl anaerober als auch aerober Organismen grundsätzlich vergleichbar ist. Auf der Grundlage der Kenntnisse zu Energetik und Glutamat-Aufnahme sollte nun grundsätzlich ein Sekretionsprozeß geklärt werden. Am Beispiel des thiaminauxotrophen Stammes *Z. mobilis* CP4-thi/pZY 73 wurde

die Alanin-Sekretion untersucht. Aufgrund der exprimierten Alanin-Dehydrogenase aus *B. sphaericus* (Uhlenbusch et al., 1991) wurde ein hoher interner Alanin-Pool aufgebaut, wobei eine hohe Sekretionsrate beobachtet werden konnte. Sowohl der Wildstamm *Z. mobilis* Zm6 als auch *Z. mobilis* CP4 wies nur sehr niedrige interne Aminosäurekonzentrationen auf (3 - 4 mM Glutamat bzw. Alanin), ein signifikanter Netto-Efflux wurde in keinem Fall beobachtet. Es war somit interessant, den Mechanismus der Alanin-Sekretion zu klären. Die Untersuchung der thiaminauxotrophen Mutante ermöglichte über die Thiaminkonzentration Einfluß auf die Aktivität der thiaminpyrophosphat-abhängigen Pyruvat-Decarboxylase zu nehmen. Bezüglich des Alanin-Exports waren verschiedene Mechanismen denkbar. Da es sich bei Alanin um eine kleine, nicht verzweigte Aminosäure handelt, die bei physiologischen pH-Werten keine Netto-Ladung aufweist, ist auch eine Diffusion in Betracht zu ziehen. Anderseits könnte die sehr hohe Effluxrate auf einen Carrier hinweisen. Eine Kombination der beiden Vorgänge wäre ebenfalls vorstellbar. Weitere Möglichkeiten wären die Diffusion durch ein Pore oder eine unspezifische Permeabilität ("leak") der Membran. Aufgrund der physiologischen Streßsituation im Alanin-Produktionsstatus war eine unspezifische Membrandurchlässigkeit durchaus möglich, konnte jedoch aufgrund eines intakten Energiestatus der Zellen ausgeschlossen werden. Die protonenmotorische Kraft war unter den Versuchsbedingungen dem Membranpotential gleichzusetzen ($\Delta pH = 0$ bei $pH_{ex}=7$) und betrug -83 mV. Die Herabsetzung des Membranpotentials war aufgrund der entkoppelnden Wirkung der hohen externen Ammoniumacetatkonzentration zu erwarten. Jedoch war trotz der hohen Konzentration keine vollständige Entkopplung zu beobachten. Der ATP-Gehalt betrug 4 mM und war mit den bei dem Wildtyp *Z. mobilis* Zm6 ermittelten Werten vergleichbar. Auch wurde ein über einen längeren Zeitraum aufrecht erhaltener Glutamat-Konzentra-tionsgradient nachgewiesen, womit ein unspezifisches "leak" von Aminosäuren ausgeschlossen werden konnte. Es wurde bereits gezeigt, daß ein K^+-Konzentra-tionsgradient über Stunden aufrecht erhalten wird (Uhlenbusch et al., 1991). Diese Befunde sprachen auch gegen eine unspezifische Pore. Zu klären war nun, ob es sich um eine carrier-vermittelte Alanin-Sekretion oder um eine reine Diffusion handelt. Bei *Z. mobilis* ergäbe sich bei einem Carrier die Frage, ob es sich um ein primäres oder sekundäres Transportsystem oder um eine erleichterte Diffusion wie im Falle des Glucosetransportes handelt. Auch eine Sekretion von Alanin über den Glucose-Facilitator war nicht auszuschließen. Untersuchungen zur Energieabhängigkeit des Alanin-Exportes bei *Z. mobilis* zeigten, daß es sich um einen nur von der über der Membran bestehenden Alanin-Konzentrationsdifferenz getrie-

benen Efflux handelt, wobei der Efflux bis zum Konzentrationsausgleich erfolgte. Alanin-Sekretion war sowohl nach Entkopplung mittels CCCP ($\Delta p = 0$) als auch nach vollständiger Deenergetisierung der Zellen durch Glucoseverarmung ($\Delta p = 0$, ATP = 0.1 mM) mit unveränderter Rate zu beobachten. Sie unterschied sich somit von spezifischen Aminosäure-Exportsystemen, wie sie bei *C. glutamicum* für Lysin (Bröer und Krämer, 1991), Isoleucin (Ebbighausen et al., 1989, Zittrich 1992) und Glutamat (Hoischen und Krämer, 1989 und 1990) nachgewiesen wurden, wobei es sich bei der Lysin- und Isoleucin-Sekretion um sekundären Transport (Symport) handelt.

Die Unterscheidungskriterien, ob es sich um einen carrier-vermittelten Transport (hier Facilitator) oder eine Diffusion handelt, sind hauptsächlich auf kinetischer Basis zu finden (Harold, 1986). Bestimmungen der Maximalgeschwindigkeit V_{max} und der Michaeliskonstanten K_m sind bei Exportsystemen wesentlich schwieriger durchzuführen als bei Aufnahmesystemen, da hierbei die intrazellulären Konzentrationen des Substrates variiert werden müssen. Über variierende, extern zugesetzte Ammoniumacetatkonzentrationen gelang eine gute, reproduzierbare Abstufung der internen Alaninkonzentration von 15 - 280 mM mit entsprechenden Alanin-Sekretionsraten. Höhere interne Konzentrationen konnten auch nach längeren Thiamin-Hungerphasen der Zellen nicht erreicht werden. Innerhalb dieses Konzentrationsbereiches wurde keine Sättigung der Sekretion ermittelt ($K_m \rightarrow \infty$), d.h. die Alanin-Sekretionsrate war über den gesamten Bereich linear von der internen Alaninkonzentration abhängig und gehorcht somit einer Reaktion erster Ordnung. Für die Sekretionskonstante k wurde ein Wert von $1 \cdot 10^{-8} \cdot 1 \cdot s^{-1} \cdot$ mg TG^{-1} bestimmt. Dieses Ergebnis ist ein gutes Indiz gegen einen Carrier, der laut Definition ein Sättigungsverhalten aufweisen sollte. Dies konnte hiermit widerlegt werden. Aufgrund der hohen Sekretionsrate konnte jedoch nicht ohne weiteres auf eine reine Diffusion geschlossen werden. Bei *C. glutamicum* z.B. wurde für Alanin eine um Faktor 10 geringere Diffusionskonstante ermittelt (Zittrich, 1992). Weitere Experimente zur Klärung der Alanin-Sekretion waren somit notwendig.

Eine überzeugende Evidenz für einen Carrier-Mechanismus ist das Auftreten eines Gegentausch-Maximums oder Minimums, da es voraussetzt, daß zwei Substrate abwechselnd an eine gemeinsame, "mobile" Bindungsstelle binden (Harold, 1986). Die Alanin-Sekretion wurde auf das Auftreten eines Gegentausch-Maximums hin überprüft, wobei Zellen unter Produktionsbedingungen untersucht wurden, die eine sehr hohe interne

Alaninkonzentration aufwiesen (200 mM). Im Falle eines Gegentausch-Maximums wäre bei hohen internen Alaninkonzentrationen eine transiente Anreicherung des extern zugesetzten markierten Alanins ohne Zufuhr metabolischer Energie zu erwarten. Bei *Z. mobilis* wurde jedoch ausschließlich Isotopenaustausch ermittelt, wobei aufgrund der kontinuierlichen intrazellulären Alanin-Synthese mit entsprechend hoher Sekretionsrate trotz des erreichten Äquilibriums keine vollständige Markierung der internen Alaninkonzentration erreicht wurde. Somit konnte eindeutig gezeigt werden, daß bei dem Alanin-Transport von *Z. mobilis* kein Gegentausch-Maximum auftrat, wie es z.B. bei dem Glucose-Carrier in *Z. mobilis* (DiMarco und Romano, 1985) nachzuweisen war. Bei niedrigen internen Alaninkonzentrationen (4 mM) unter "Nicht-Produktionsbedingungen" wurde nach Einstellung des Gleichgewichtes ein vollständiger Konzentrationsausgleich erreicht, wobei die interne der externen spezifischen Aktivität des Alanins entsprach.

Die Stereospezifität eines Transportvorganges bezüglich des transportierten Substrates ist ein weiteres aussagekräftiges Indiz für eine Carrier-Beteiligung. Zur Untersuchung der Stereospezifität der Alaninsekretion wurden die Zellen mit L- bzw. D-Alanin unter nicht-produzierenden Bedingungen inkubiert und anschließend die Sekretion beobachtet. Die Versuchsdurchführung erfolgte bei einer niedrigen Temperatur (15°C), um die auch bei *Z. mobilis* vorhandenene Racemase-Aktivität herabzusetzen. Es zeigte sich, daß die Stereoisomere L-bzw. D-Alanin (25% L-Alanin) mit derselben Rate bis zum Konzentrationsausgleich sezerniert wurden. Somit konnte eine stereospezifische Alanin-Sekretion ausgeschlossen werden.

Die Aktivierungsenergie der Alanin-Sekretion betrug in einem Temperaturbereich von 20 - 45°C 32 kJ · mol^{-1}, unterhalb von 20°C 42 kJ · mol^{-1}. Im Vergleich hierzu wies der Lysin-Exportcarrier von *C. glutamicum* in entsprechenden Temperaturbereichen Aktivierungsenergien von 54 kJ · mol^{-1} bzw. 260 kJ · mol^{-1} auf (Bröer und Krämer, 1991). Die in der Literatur beschriebenen Aktivierungsenergien für Carrier liegen häufig bei höheren Werten von 60 - 80 kJ · mol^{-1}.

In einem Temperaturbereich von 50°C bis 55°C sind häufig Temperatur-Inaktivierungen von Carrier-Proteinen zu beobachten. So wurde der Lysin-Exportcarrier von *C. glutamicum* bei 50°C (Bröer und Krämer, 1991), bei 55°C der Isoleucin-Exportcarrier inaktiviert (Zittrich, 1992). Bei *Z. mobilis* dagegen war auch nach Inkubation der

Zellen bei 55°C noch Alanin-Sekretion nachzuweisen, wobei der Export nach Abkühlen der Zellen auf 37°C mit vergleichbarer Rate verlief wie im Kontrollansatz, der bei 37°C inkubiert wurde. Dagegen konnte bei 55°C eine Protein-Inaktivierung der homologen Enzyme des Entner-Doudoroff-Weges (Scotnicki et al., 1981, Scopes und Griffiths-Smith, 1986) bei *Z. mobilis* gezeigt werden, d.h. eine Protein-Inaktivierung möglicherweise beteiligter Carrierproteine sollte vorausgesetzt werden. Ein unspezifisches "leak" durch die Cytoplasmamembran war auszuschließen, da die ermittelten Zellvolumina Werte aufwiesen, die denen unbehandelter Zellen entsprachen. Bei diesen Experimenten wurde der Efflux anhand der Abnahme der internen Alaninkonzentration ermittelt, der bis zum Konzentrationsausgleich zu beobachten war. Hierbei wurde festgestellt, daß die Abnahme der internen Alaninkonzentration, unter Berücksichtigung des Zellvolumens, der Zunahme der externen Alaninkonzentration entsprach, d.h. die Abnahme des internen Alanins war tatsächlich auf Efflux und nicht auf Metabolismus zurückzuführen. Eine Temperaturerhöhung um nur 4°C auf 59°C führte zu einer stark erhöhten, unspezifischen Durchlässigkeit der Membran. So konnte zum einen kein Zellvolumen mehr bestimmt werden, zum anderen wiesen die Zellen bereits nach 13 sec kein internes Alanin mehr auf. Aufgrund der noch vorhandenen Alanin-Sekretion bei 55 C ließ sich diese, vorausgesetzt, daß eine Protein-Inaktivierung stattgefunden hatte, nur auf einen nicht carrier-vermittelten Efflux zurückführen.

In einem gewissen Widerspruch hierzu stehen die Experimente zur Hemmung der Alanin-Sekretion. Ein durch reine Diffusion vermittelter Export sollte nicht durch Inhibitoren, in diesem Fall SH-Gruppen modifizierende und alkylierende Reagenzien, zu beeinflussen sein. Hierbei mußte berücksichtigt werden, daß es sich um Hemmstoffe handelt, die in der Regel bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen auf Carrier-Proteine wirken. In den bei *Z. mobilis* durchgeführten Experimenten wurden sie in sehr hohen Konzentrationen eingesetzt, da die im folgenden beschriebenen Effekte nur bei diesen Konzentrationen festzustellen waren. Die Inhibitoren ließen sich bezüglich ihrer Wirkung auf die beiden beobachteten Transportprozesse in drei Kategorien einteilen. (1) Die eingesetzten Inhibitoren hemmten weder die Glucose-Aufnahme noch den Alanin-Export. Hierzu gehören die Inhibitoren PCMB, PCMBS und BPAB. (2) Zugabe von $HgCl_2$ führte ausschließlich zu einer Hemmung des Glucose-Facilitators. Dies zeigte deutlich, daß kein Export des Alanins über den Facilitator erfolgen kann. (3) NEM hemmte sowohl die Glucoseaufnahme als auch geringfügig den Alanin-Export. Die unter (1) beschriebenen

Hemmstoffe PCMB und PCMBS konnten vermutlich deshalb nicht wirken, da die großmolekularen Mercuribenzoate aufgrund sterischer Hinderung keinen Zugang zu den reaktiven Seitenketten des aktiven Zentrums des Carriers hatten. Untersuchungen zur Einflußnahme der oben genannten Inhibitoren auf die Alanin-Aufnahme zeigten entsprechende Resultate. Auch hier wurde eine, wenn auch geringere, Hemmung der Aufnahmerate beobachtet.
Tab. 7 zeigt noch einmal zusammenfassend die Ergebnisse unter besonderer Berücksichtigung eines Diffusionsprozesses und eines carrier-vermittelten Transportes.

Wie im allgemeinen auch für andere Membranen beschrieben, ist bei *Z. mobilis* keine hohe, unspezifische Permeabilität der Membran für Aminosäuren oder andere kleine Metabolite vorhanden. Ebenso ist eine carrier-vermittelte Sekretion aufgrund sich ergänzender Indizien, insbesondere der kinetischen Daten, auszuschließen. Die geringfügige Hemmung des Alanin-Exportes durch NEM könnte auf unspezifische Wirkungen oder Reaktionen mit Lipiden (mit der Aminogruppe von Phosphatidylserin) zurückzuführen sein. Trotzdem kann eine Proteinbeteiligung, wobei es sich nicht um Carrier-Proteine handeln soll, nicht ganz ausgeschlossen werden. Vorstellbar wäre eine Diffusion an der Grenzfläche zwischen Lipidphase und Membranprotein, die durch eine Modifizierung des Proteins gestört, jedoch in keinem Fall vollständig gehemmt wird. Ähnliche Befunde wurden bereits in der Literatur für Kationen beschrieben. Bei Erythrozyten und Proteoliposomen aus Erythrozytenmembranen wurde nach Zugabe von Quabain ein gegenüber einer Diffusion erhöhter Kationen-Efflux festgestellt, der nicht auf Carrier-vermittelten Transport zurückzuführen, jedoch auch an die Anwesenheit von Proteinen gebunden war. (Bernhardt et al., 1988). Dies wurde auf Defekte bei der Lipid-Protein Interphase zurückgeführt. Es wurde vorgeschlagen, daß sowohl die Protein-Konformation als auch die Lipid-Zusammensetzung, die die Lipid-Protein-Interaktion beeinflußt, ausschlaggebend ist. Die Proteinkomponente könnte dann z. B. durch chemisch modifizierende Reagenzien beeinflußt werden. Inwieweit die das Protein umgebenden Lipide, wie eventuell auch die bei *Z. mobilis* vorkommenden Hopanoide (pentazyklische Triterpenoide, Strukturäquivalente zu Sterolen bei Eukaryoten), hierbei eine Rolle spielen könnten, bleibt unklar.

Tab. 7: Charakteristische Eigenschaften eines carrier-vermittelten Transportes bzw. einer Diffusion im Vergleich zu den bei der Alanin-Sekretion von *Z. mobilis* CP4 thi/pZY 73 ermittelten Befunde.

	Carrier (Facilitator)	Diffusion	Alanin-Sekretion
K_m-Wert	5 - 15 mM[a)]	∞	∞
Gegentausch-maximum[b)]	+	-	-
Stereo-selektivität	+	-	-
Aktivierungs-energie	≥ 50 kJ/mol	?	32 kJ/mol
Temperatur-inaktivierung	+	-	-
Hemmbarkeit[c)]	+	-	±

a) K_m-Wert des Glucose-Carriers von *Z. mobilis* (DiMarco und Romano, 1985)
b) bei sekundärem Transport
c) durch chemische Modifizierung

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zum zellulären Energiestatus und zu Transportvorgängen bei *Zymomonas mobilis* durchgeführt.

Die Ermittlung der energetischen Parameter zeigte, daß das anaerobe Bakterium unter glucosesupplementierten Bedingungen einen mit anderen anaeroben und aeroben Bakterien vergleichbar hohen Energiestatus aufwies. Über einen weiten externen pH-Bereich wurde eine ausgeprägte pH-Homöostase festgestellt. Auffällig war die völlige Deenergetisierung der Zellen nach Glucoseverarmung, ein Indiz dafür, daß *Z. mobilis* über keine Speicherstoffe verfügt. Die in der Literatur häufig erwähnte Salzintoleranz konnte auf einen Abbau des Membranpotentials bei erhöhten Salzkonzentrationen zurückgeführt werden.

Bei der konstitutiven Aufnahme von Glutamat handelt es sich um einen Na^+-unabhängigen, reinen Protonen/Glutamat (Aspartat) -Symport, der sowohl vom Membranpotential als auch vom Protonengradienten getrieben werden kann. Hierbei wurde ausschließlich die deprotonierte Form des Glutamates vom Carrier akzeptiert, wobei eine Stöchiometrie von $2H^+$/Glutamat bestimmt wurde. Der Carrier weist neben einer hohen Maximalgeschwindigkeit einen für Aminosäuretransportsysteme ungewöhnlich hohen K_m-Wert auf. Glutamat konnte von *Z. mobilis* als alleinige Stickstoffquelle genutzt werden.

Die Alanin-Sekretion des rekombinanten Stammes *Z. mobilis* CP4-thi/pZY 73 unter Alanin-Produktionsbedingungen konnte als Diffusion charakterisiert werden. Der Export wurde ausschließlich von dem über der Membran bestehenden Alaningradienten getrieben. Die Zellen wiesen einen mit dem Wildtyp von *Z. mobilis* vergleichbaren ATP-Gehalt auf. Das Membranpotential war aufgrund der entkoppelnden Wirkung der hohen Ammoniumkonzentrationen herabgesetzt. Ein unspezifisches "leak" anderer Aminosäuren wurde nicht festgestellt. Die Beteiligung eines Carrierproteins konnte aufgrund sich ergänzender, aussagekräftiger Indizien ausgeschlossen werden. So zeigte die Sekretion keine Sättigung, ein Gegentausch-Maximum war nicht vorhanden. Neben einer geringen Aktivierungsenergie war keine Stereoselektivität des Transportes festzustellen.

6. LITERATUR

Abee, T., Van der Wal, F.-J., Hellingwerf, K., Konings, W.N. (1989). Binding-protein-dependent alanine transport in *Rhodobacter sphaeroides* is regulated by the internal pH. J.Bacteriol. 171:5148-5154.

Aharonowitz, Y., Friedrich, C.G. (1980). Alanine dehydrogenase of the ß-lactam antibiotic producer *Streptomyces clavulgerus*. Arch. Microbiol. 125:137-142.

Ahmed, S. und Booth, I.R. (1981) Quantitative measurements of the proton-motive force and its relation to steady state lactose accumulation in *Escherichia coli*. Biochem. J. 200:573-581.

Ahmed, S. und Booth, I.R. (1983) The use of valinomycin, nigericin and trichlorocarbanilide in control of the protonmotive force in *Escherichia coli* cells. Biochem. J. 212:105-112.

Alexandri, E., Drainas, C., Typas, M.A. (1990). Glutamine uptake in *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Lett. 12:457-462.

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.

Ames, G. F.-L. (1986). Bacterial periplasmic transport systems:structure, mechanism, and evolution. Ann. Rev. Biochem.55:397-425.

Anantharam, V., Allison, M., Maloney, P.C. (1989). Oxalate:Formiat Exchange. J. Biol. Chem. 264:7244-7250.

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-cation transport in energy coupling of neutrophilic and acidophilic bacteria: an assessment of methods and concepts. FEMS Microbiol.Rev. 75:319-334.

Barash, H., Halpern,Y. (1975). Purification and properties of glutamate binding protein from the periplasmic space of *Escherichia coli* K-12. Biochim. Biophys. Acta 386: 168-180.

Baratti, J.C., Bu Lock, J.D. (1986) *Zymomonas mobilis:* a bacterium for ethanol production. Biotechnol. Adv. 4: 95-115.

Barnell, W.O., Yi, K.C., Conway, T. (1990). Sequence and genetic organization of *Zymomonas mobilis* gene cluster that encodes several enzymes of glucose metabolism. J. Bacteriol. 172:7227-7240.

Belaich, J.P., Senez, J.C. (1965) Influence of aeration and pantothenate on growth yields of *Zymomonas mobilis*. J. Bacteriol. 89: 1195-1200.

Bellion, E., Tan, F. (1987). An NAD^+-dependent alanine dehydrogenase from a methylotrophic bacterium. Biochem. J. 244:565-570.

Bernhardt, I., Hall, A.C., Ellory, J.C. (1988) Transport pathways for monovalent cations through erythrocyte membranes. Studia Biophysica 126:5-21.

Boenigk, R., Dürre, P., Gottschalk, G. (1989). Carrier-mediated acetate transport in *Acetobacter woodii.* Arch. Microbiol. 152:589-593.

Booth, I.R. (1985) Regulation of cytoplasmic pH in bacteria.
Microbiol. Rev. 49:359-378.

Booth, I-R. (1988). Bacterial Transport: Energetics and mechanisms, S. 377-428. In C. Anthony (Ed.), Bacterial energy transduction - 1988. Academic Press, London.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal.Biochem. 72:248-254.

Bräu,B., Sahm, H. (1986). Cloning and expression of the structural gene for pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis* in *Escherichia coli.* Arch. Microbiol. 144:296-301.

Bringer, S., Finn, R.K., Sahm, H. (1984). Effect of oxygen on the metabolism of *Zymomonas mobilis.* Arch. Microbiol. 139:376-381.

Bringer, S., Haertner, T., Poralla, K., Sahm, H. (1985). Influence of ethanol on the hopanoid content and the fatty acid pattern in batch and continuous cultures of *Zymomonas mobilis.* Arch. Microbiol. 140:312-316.

Bringer-Meyer, S. und Sahm, H. (1988) Metabolic shifts in Zymomonas mobilis in response to growth conditions. FEMS Microbiol. Rev. 54:131-142.

Bringer-Meyer, S., Schimz, K.L., Sahm, H. (1986). Pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis.* Isolation and partial characterization. Arch. Microbiol. 146:105-110.

Bröer, S. (1991) Dissertation, Universität Düsseldorf

Bröer, S., Krämer, R. (1990). Lysin uptake and exchange in *Corynebacterium glutamicum.* J. Bacteriol. 172:7241-7248

Brooker,R.J. (1990). The lactose permease of *Escherichia coli.* Res. Microbiol.141:309-315.

Caballero, F.J., Cardenas, J., Castillo, F. (1989). Purification and properties of L-alanine dehydrogenase of the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1. J. Bacteriol. 171:3205-3210.

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

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.

Conway, T., Osman, Y.A., Konnan, J.I., Hoffman, E.M., Ingram, L.O. (1987) Promotor und nucleotide sequences of the *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. J. Bacteriol. 169:949-954.

Cox, J.C., Nicholls, D.G. und Ingledew, W.J. (1979) Transmembrane electrical potential and transmembrane pH gradient in the acidophile *Thiobacillus ferro-oxidans*. Biochem.J. 178:195-200.

Crown, V.L. (1987). Properties of alanine dehydrogenase and aspartase from *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. Appl. Environ. Microbiol. 53:1885-1892.

Dawes, E.A., Ribbons, D.W., Large, P.J. (1966) The route of ethanol formation in *Zymomonas mobilis*. Biochem. J. 98: 795-803.

Deguchi, Y., Yamato, I., Anraku, Y. (1989). Molecular cloning of gltS and gltP, which encode glutamate carriers of *Escherichia coli* B. J. Bacteriol. 171:1314-1319.

Deguchi, Y., Yamato, I., Anraku, Y. (1990). Nucleotide sequence of *gltS*, the Na^+/glutamate symport carrier gene of *Escherichia coli* B. J. biol. Chem. 265:21704-21708.

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

DiMarco, A.A., Romano, A.H. (1985). D-glucose transport system of *Zymomonas mobilis*. Environ. Microbiol. 49:151-157.

DeVrij, 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.

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., Kodde, J., De Jong, S., Konings, W.N. (1987). Neutral amino acid transport by membrane vesicles of *Streptococcus cremoris* is subject to regulation by internal pH. J. Bacteriol. 169:2748-2754.

Driessen, A.J.M., Poolman, B., Kiwiet, R., Konings, W.N. (1987). Arginine transport in *Streptococcus lactis* is catalysed by a cationic exchanger. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:6093-6097.

Duperray, F., Jezequel, D., Ghazi, A., Letellier,L., Shechter, E. (1992). Excretion of glutamate from *Corynebacterium glutamicum* triggered by amine surfactants. Biochim. Biophys. Acta 1103:250-258.

Ebbighausen, H., Weil, B., Krämer, R. (1989). Isoleucin 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 succinat uptake in *Corynebacterium glutamicum*. FEMS Microbiol.Lett. 77:61-66.

Entner, N., Doudoroff, M. (1952). Glucose und gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila*. J. Biol.Chem.196:853-862.

Fein, J.E., Charley, R.C., Hopkins, K.A., Lavers, B., Lawford, H.G. (1983). Development of a simple defined medium for continuous ethanol production by *Zymomonas mobilis*. Biotech. Lett. 5:1-6.

Foster, T. J. (1983) Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. Microbiol. Rev. 47: 361-409.

Fujimura, T., Yamoto, I., Anraku, Y. (1983). Mechanism of glutamate transport in *Escherichia coli* B. 1. Proton dependent and sodium ion dependent binding of glutamate to a glutamate carrier in the cytoplasmic membrane. Biochemistry 22:1954-1959.

Fujimura, T., Yamato, I., Anraku, Y. (1983). Mechanism of glutamate transport in *Escherichia coli* B. Kinetics of glutamate transport driven by artificially imposed proton and sodium ion gradients across the cytoplasmic membrane. Biochemistry 22:1959-1965.

Furlong, C.E. Osmotic-shock-sensitive transport systems. *In:* Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaechter, M., Umbarger, H.E. (eds) (1987). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium,* cellular and molecular biology. Vol 1. American society for microbiology, Washington D.C.

Gätje, G., Müller, V. Gottschalk G. (1991) Lactic acid excretion via carrier-mediated facilitated diffusion in *Lactobacillus helveticus*. Appl. Microbiol. Biotechnol 34:778-782.

Germano, J.J., Anderson, K.E (1968) Purification and properties of L-alanine dehydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans*.J. Bacteriol. 96: 55-60

Gibbs M., DeMoss, R.D. (1954) Anaerobic dissimilationof ^{14}C-labelled glucose and fructose by *Pseudomonas lindneri*. J. Biol.Chem. 207:689-694.

Hanada, K., Yoshida, T., Yamato, I., Anraku, Y. (1992) Sodium ion and proline binding sites in the Na^+/proline symport carrier of *Escherichia coli*. Biochim. Biophys.Acta 1105:61-66

Harold, F.M. (1986) The vital force: a study of bioenergetics. W. H. 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.

Heller, K., Lin, E., Wilson, T. (1980). Substrate specifity and transport properties of the glycerol facilitator of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 144:274-278.

Hellingwerf, K.J., Konings, W.N. (1985). The energy flow in bacteria: the main free energy intermediates and their regulatory role. Adv. Microbiol. Physiol. 26:125-154.

Herbert, R.A., Siefert, E., Pfennig, N. (1978) Nitrogen assimilation in *Rhodopseudomonas acidophila*. Arch. Microbiol. 199:1-5.

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.

Hoppner, T.C., Doelle, H.W. (1983) Purification and kinetic characteristics of pyruvate decarboxylase and ethanol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis* in relation to ethanol production. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.17:152-157.

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.

Iwashima, A., Matsura, A., Nose, Y. (1971) Thiamine-binding protein of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 108: 1419-1421.

Jackson, J.B., Nicholls, D.G. (1986) Methods for the determination of membrane potential in bioenergetic systems. In: Fleischer,S.; Packer, L. (eds.), Methods Enzymol. 127: 557-577. Academic Press, Inc. New York..

Johansson B.C., Gest, H. (1976) Inorganic nitrogen assimilation by the photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas capsulata*.J. Bacteriol. 128:683-688.

Jones, C.W., Doelle, H.W. (1991). Kinetic control of ethanol production by *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35:4-9.

Jones, B.N., Gilligan, J.P. (1983). *o*-Phtaldialdehyde precoloumn derivatization and reversed phase high performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids. J. Chromatogr. 266:471-482.

Kaback, H.R., Bibi, E., Roepe, P.D. (1990). ß-Galactoside transport in *E. coli*: a functional dissection of *lac* permease. TIBS 15:309-314.

Kahane, S., Marcus, M., Barash, H., Halpern, Y.S., Kaback, H.R. (1975) Sodium-dependent glutamate transport in membrane vesicles of *Escherichia coli* K12. FEBS Lett. 56: 235-239.

Kalnenieks, U.Z., Pankova, L.M., Shvinka, Yu.E. (1987). Proton motive force in the bacterium *Zymomonas mobilis*. Biochemistry USSR. 52:617-620.

Kalnenieks, U.Z., Pankova, L.M., Shvinka, Yu. E. (1987). Energy expenditure for maintaining the transmembranous pH gradient in *Zymomonas mobilis*.

Kaneko, M., Yamaguchi, A., Sawai, T. (1985). Energetics of tetracycline efflux system encoded by Tn10 in *Escherichia coli*. FEBS Lett. 193:194-198.

Kashket, E.R. (1985) The proton motive force in bacteria: a critical assessment of methods. Ann. Rev. Microbiol. 39:219-242

Kersters, K., DeLey, J. (1968) The occurence of the Entner-Doudoroff pathway in bacteria. Antonie van Leeuwenhoek; J. Microbiol. Serol. 31:393-408.

Klingenberg, M., Pfaff, E. (1967). Means of terminating reactions. In: Colowick S.P., Kaplan, N.O., Estabrook, R.W., Pullman, M.E. (Eds). Methods in enzymology, vol 10. Academic Press, New York, pp 680-684.

Krämer, R., Lambert, C. (1990) Uptake of glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. 1. Kinetic properties and regulation by internal pH and potassium. Eur. J. Biochem. 194: 929-935.

Krämer, R., Lambert, C. (1990). Uptake of glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. 2. Evidence for a primary active transport system. Eur. J. Biochem. 194:937-944.

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

Krulwich, T.A., Guffanti, A.A., Seto-Young, D. (1990) pH homeostasis and bioenergetic work in alkalophiles. FEMS Microbiol. Rev. 75:271-278.

Kuroda, S., Tanizawa, K., Sakamoto, Y., Tanaka, H., Soda, K. (1990). Alanine dehydrogenases from two *Bacillus* species with distinct thermostabilities: molecular cloning, DNA and protein sequence determination, and structural comparison with other $NAD(P)^+$-dependent dehydrogenases. Biochemistry 29:1009-1015.

Kustu, S.G., McFarland, N.C., Hui, S.P., Esmon, B., Ames, G.F. (1979) Nitrogen control in *Salmonella typhimurium:* coregulation of synthesis of glutamine synthetase and amino acid transport systems. J. Bacteriol. 138: 218-234.

Landick, R., Oxender, D.L., Ames, G.F.L. (1984). Bacterial amino acid transport systems, p 577-615. *In* A.N. Martonosi (Ed.), The enzymes of biological membranes. Plenum Press, New York.

Lazdunski,A. und Belaich J.P. (1972) Uncoupling in bacterial growth: ATP pool variation in *Zymomonas mobilis* cells in relation to different uncoupling conditiions of growth. J. Gen. Microbiol. 70:187-197.

Lolkema, J.S. (1990) The membrane-bound domain of the phosphotransferase enzyme II^{mtl} of *Escherichia coli* constitutes a mannitol translocating unit. Biochemistry 29: 10659-10663

Lolkema, J.S. (1991) Mechanistic coupling of transport and phosphorylation activity by enzyme II^{mtl} of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. Biochemistry 30: 6716-6721.

Lolkema, J.S. (1991). Interaction between the cytoplasmic and membrane-bound domains of enzyme II^{mtl} of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. Biochemistry 30: 6721-6726

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.

Maiden, M.C.J., Davis, E.O., Baldwin, S.A., Moore, D.C.M., Henderson, P.J.F. (1987) Mammalian and bacterial sugar transport proteins are homologous. Nature 325:641-643.

Maloney, M.C.J. (1987) Coupling to an energized membrane: role of ion-motive gradients in the transduction of metabolic energy. *In:* Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaechter, M., Umbarger, H.E. (eds) (1987). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium,* cellular and molecular biology. Vol 1. American society for microbiology, Washington D.C.

Maloney, P.C. (1990) A consensus structure for membrane transport. Res. Microbiol. 141: 374-383.

Matin, A., Konings, W.N. (1973) Transport of lactate and succinate by membrane vesicles of *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and a *Pseudomonas* spezies. Eur. J. Biochem. 34: 58-67.

McCormick, N.G., Halvorson, H.O. (1964). Purification and properties of L-alanine dehydrogenase from vegetative cells of *Bacillus cereus*. J. Bacteriol. 87:68-74.

McCowen, S.M., Phibbs, P.V. (1974). Regulation of alanine dehydrogenase in *Bacillus licheniformis*. J. Bacteriol. 118:590-597.

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.

Meers, J.L., Pedersen, L.K. Nitrogen assimilation by *Bacillus licheniformis* organisms growing in chemostat cultures. J. Gen. Microbiol. 70:277-286.

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.

Michels, M. und Bakker, E.P. (1985) Generation of a large, protonophore sensitive proton motive force and pH difference in the acidophilic bacteria *Thermoplasma acidophilum* and *Bacillus acidocaldarius*. J. Bacteriol. 161:231-237.

Milner, J.L., Vink, B., Wood, J.M. (1987). Transmembrane aminoacid flux in bacterial cells. CRC Critical Rev. Biotechnol.5:1-47.

Montenecourt, B.S. (1985). *Zymomonas*, a unique genus of bacteria. In: Demain, A.L. und Solomon, N.A. (eds.),
Biology of industrial microorganisms. Benjamin-Cummings Publishing Co., Menlo Park, Calif. 261-289.

Moreno-Vivian, C., Cejudo, F.J., Cardenas, J., Castillo, F. (1983) Ammonia assimilation pathways in *Rhodopseudomonas capsulata* E1F1. Arch. Microbiol. 136:147-151.

Neale, A.D., Scopes, R.K., Kelly, J.M., Wettenhall, R.E.H. (1986) The two alcohol dehydrogenases of *Zymomonas mobilis*. Eur. J.Biochem. 154:119-124.

Neale, A.D., Scopes, R.K., Wettenhall, R.E.H., Hoogenraad, N.J. (1987) Pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis*: Isolation, properties, and genetic expression in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 169: 1024-1028.

Nishimune, T., Hayashi, R. (1971) Thiamine-binding protein and thiamine uptake by Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta 224: 573-583.

Noji, S., Sato, Y., Suzuki, R., Taniguchi, S. (1988) Effect of intracellular pH and potassium ions on a primary transport system for glutamate/aspartate in *Streptococcus mutans*. Eur. J. Biochem. 175: 491-495.

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.

Ohshima, T., Soda, K. (1979). Purification and properties of alanine dehydrogenase from *Bacillus sphaericus*. Eur. J. Biochem. 100:29-39.

Ohshima, T., Sakane, M., Yamazaki, T., Soda,K. (1990). Thermostable alanine dehydrogenase from thermophilic *Bacillus sphaericus* DSM 462. Purification, characterization and kinetic mechanism. Eur. J.Biochem. 191:715-720.

Padan, E., Rottenberg, H. (1973). Respiratory control and the proton electrochemical gradient in *Escherichia coli*. Eur. J. Biochem. 40:431-437.

Padan, E., Zilberstein, D. und Schuldiner, S. (1981) pH homeostasis in bacteria. Biochim. Biophys. Acta. 650:151-166.

Pankova, L.M., Shvinka,J.E., Beker, M.E. und Slava, E.E. (1985) Effect of aeration on *Zymomonas mobilis*. Mikrobiologiya 54:120-124.

Pankova,L.M., Shvinka, J.E., Beker, M.J. (1988). Regulation of intracellular H^+ balance in *Zymomonas mobilis* 113 during the shift from anaerobic to aerobic conditions. Appl. Microbiol. Biotechnol. (1988) 28:583-588.

Pawluk, A., Scopes, R.K., Griffiths-Smith, K. (1986) Isolation and properties of the glycolytic enzymes from *Zymomonas mobilis*. Biochem. J. 238:275-281.

Poolman, B., Hellingwerf, K.J., Konings, W.N. (1987) Regulation of the glutamate-glutamine transport system by intracellular pH in *Streptococcus lactis*. J. Bacteriol. 169: 2272-2276.

Poolman, B., Smid, E.J., Konings, W.N. (1987) Kinetic properties of a phosphate-bond-driven glutamate-glutamine transport system in *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. J. Bacteriol. 169: 2755-2761.

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.

Rancourt, D.E., Stephenson, J.T., Vickell, G.A., Wood, J.M. (1983). Proline excretion by *Escherichia coli* K12. Biotechnol.Bioeng. 26:74-80

Reyes, L., Scopes, R.K. (1991). Membrane-associated ATPase from *Zymomonas mobilis*; purification and characterization. Biochim. Biophys. Acta 1068:174-178.

Rogers, P.L., Lee, K.J., Scotnicki, M.L., Tribe, D.E. (1982). Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. Adv. Biochem. Engineering 22:37-84.

Rogers, P.L., Goodman, A.E., Heyes, R.H. (1984) *Zymomonas* ethanol fermentations. Microbiol.Sci. 1: 133-136.

Rosen, B.P., Borbolla, M.G. (1984) A plasmid-encoded arsenite pump produces arsenite resistance in *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 124: 760-765.

Rottenberg, H. (1976) The driving force for proton(s) metabolite cotransport in bacterial cells. FEBS Letters 66:159-163.

Rottenberg, H. (1979). The measurement of membrane potential and pH in cells, organelles, and vesicles. In: Fleischer, S.; Packer,L. (eds.), Methods Enzymol. 55:547-569, Academic Press, Inc. New York.

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. Environ. Microbiol. 56:3304-3307.

Sanno, Y., Wilson, T.H., Lin, E.C.C. (1968). Control of permaetion to glycerol in cells of *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Research Communications. 32:344-349.

Sato, Y., Noji, S., Suzuki, R., Taniguchi, S. (1989). Dual mechanism for stimulation of glutamate transport by potassium ions in *Streptococcus mutans*. J. Bacteriol. 171:4963-4966.

Schellenberg, G.D., Furlong, C.E. (1977). Resolution of the multiplicity of the glutamate and aspartate transport systems of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 252:9055-9064.

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.

Scopes, R.K. (1983) An iron-activated alcohol dehydrogenase. FEBS Lett. 156: 303

Scopes, R.K., Griffiths-Smith, K. (1986). Fermentation capabilities of *Zymomonas mobilis* glycolytic enzymes. Biotechnol. Lett. 8:653-656.

Scopes, R.K., Testolin, V., Stoter, A., Griffiths-Smith, K., Algar, E.M. (1985) Simultaneous purification and characterization of glucokinase, fructokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*. Biochem. J. 228: 622-634.

Seol, W.G., Shatkin, A.J. (1992) *Escherichia coli* alpha-ketoglutarate permease is a constitutively expressed proton symporter. J. Biol. Chem. 267: 6409-6413.

Shiio, I., Otsuka, S.I., Katsuya, M. (1963) Cellular permeability and extracellular formation of glutamic acid in *Brevibacterium flavum*. J. Biochem. 53: 333-344.

Silva, S., Misra, T. (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.

Skotnicki, M.L., Warr, R.G., Goodman, A.E., Lee, K.J., Rogers, P.L. (1983). High-productivity alcohol fermentation using *Zymomonas mobilis*. Biochem. Soc. Symp. 48:53-86

Smid, E.J., Konings, W.N. (1990). Relationship between utilization of proline and proline-containing peptides and growth of *Lactococcus lactis*. J. Bacteriol. 172:5286-5292.

Strohdeicher, M., Schmitz, B., Bringer-Meyer, S., Sahm, H. (1988). Formation and degradation of gluconate by *Zymomonas mobilis*. Appl Microbiol Biotechnol 27:378-382.

Strohdeicher, M., Bringer-Meyer, S., Neuß, B., van der Meer, R., Duine, J.A., Sahm, H. (1989). Glucose dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*: evidence for a quinoprotein. In: Jongejan, J.A., Duine, J.A. (eds.) PQQ and quinoproteins. Kluwer, Dordrecht, pp 103-105.

Strohdeicher, M., Neuss, B., Bringer-Meyer, S. und Sahm, H. (1990) Electron transport chain of *Zymomonas mobilis*. Interaction with the membrane-bound glucose dehydrogenase and identification of ubiquinone 10. Arch Microbiol 154:536-543.

Struch, T., Neuss, B., Bringer-Meyer, S., Sahm, H. (1991). Osmotic adjustment of *Zymomonas mobilis* to concentrated glucose solutions. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34:518-523.

Swings, J., Deley, J. (1977). The biology of *Zymomonas*. Bacteriol. Rev. 41:1-46.

Tolner, B., Poolman, B., Wallace, B., Konings W.N. (1992) Revised nucleotide sequence of the gltP gene, which encodes the proton-glutamate-aspartate transport protein of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 174:2391-2393.

Tsuchiya, T., Wilson, T.H. (19787) Cation-sugar cotransport in the melibiose transport system of *Escherichia coli*. Membr. Biochem. 2: 63-79.

Tynecka, Z., Gos, Z., Zajak, J. (1981) Energy-dependent efflux of cadmium coded by a plasmid resistance determinant in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 147: 313-319.

Uhlenbusch, I., Sahm, H., Sprenger, G.A. (1991). Expression of an alanine dehydrogenase gene in *Zymomonas mobilis* and excretion of L-alanine. Appl. Environ. Microbiol. 57:1360-1366.

Van der Rest, M. E., Abee, T., Molenaar, D., Konings, W.N. (1991). Mechanism and energetics of a citrate-transport system of Klebsiella pneumoniae. Eur. J. Biochem. 195:71-77.

Viikari, L. (1988). Carbohydrate metabolism in *Zymomonas*. CRC Crit Rev Biotechnol 7:237:261.

Wallace, B., Yang, Y.-J., Hong, J., Lum, D. (1990). Cloning and sequencing of a gene encoding a glutamate and aspartate carrier of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 172:3214-3220.

Williamson, D.H. (1985). L-alanine . Determination with alanine dehydrogenase. In: Bergmeyer, H.U. (ed.): Methods of enzymatic analysis. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim 3. Auflage 8:341-344.

Willis, R.C., Furiong, C.E. (1975) Purification and properties of a periplasmic glutamate-aspertate binding protein from *Escherichia coli* strain W3092. J. Biol. Chem. 250: 2574-2580.

Wills, C., Kratofil, P., Lando, D., Martin, T. (1981) Characterization of the two alcohol dehydrogenases of *Zymomonas mobilis*. Arch. Biochem. Biophys. 210: 775-

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.

Yamato, I., Anraku, Y. (1990) Mechanism of Na^+/proline symport in *Escherichia coli:* reappraisal of the effect of cation binding to the Na^+/proline symport carrier. J.Membrane Biol. 114:143-151.

Zittrich, S. (1992) Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. R. Krämer für seine engagierte Betreuung sowie für zahlreiche konstruktive Diskussionen und wertvolle Ratschläge, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Professor Dr. H. Sahm danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Bei Herrn Professor Dr. H. Weiss bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferates.

Danken möchte ich auch den Mitarbeitern des Institutes für Biotechnologie I, insbesondere meiner Arbeitsgruppe Angelika und Stefan Bröer, Andreas Erdmann, Marcella Gutmann, Christian Hoischen, Norbert Peekhaus, Ruth Siewe, Reiner Stappen, Brita Weil und Stefan Zittrich, für die kollegiale Zusammenarbeit und das gute Arbeitsklima.

Diese Arbeit wurde mit Mitteln der deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) finanziert.

FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH

KFA

Jül-2708
Dezember 1992
ISSN 0366-0885