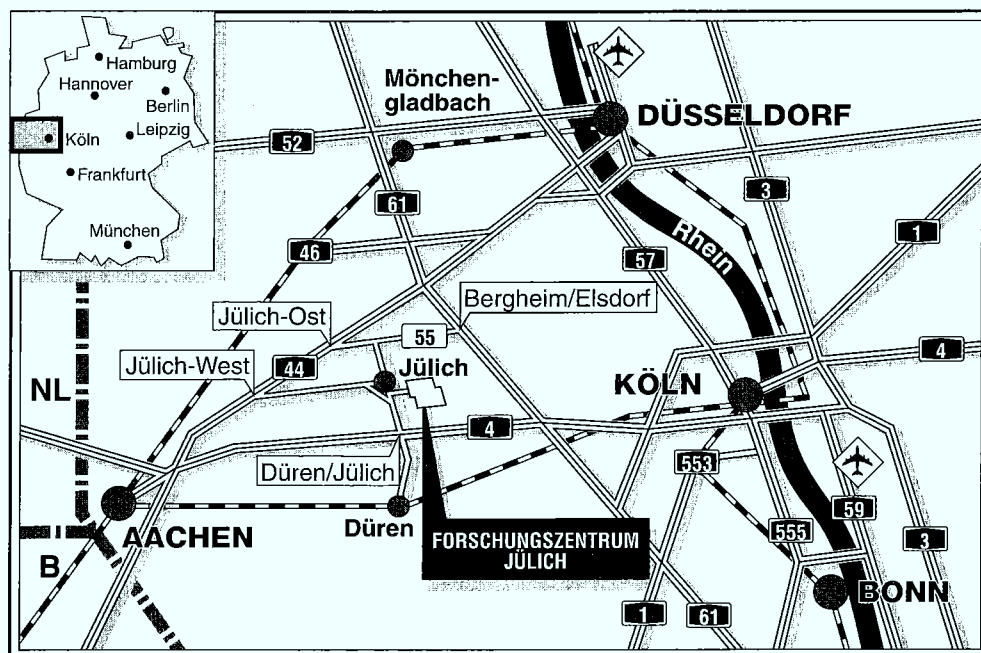


Institut für Biotechnologie

**Stoffwechselphysiologische Untersuchungen
bei *Ashbya gossypii* im Hinblick auf die
Riboflavinbiosynthese**

Georg Schmidt



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3260

ISSN 0944-2952

Institut für Biotechnologie Jül-3260

D61 (Diss. Universität Düsseldorf)

Zu beziehen durch : Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

Telefon : 02461/61-61 02 · Telefax : 02461/61-61 03 · Telex : 833 556-70 kfa d

**Stoffwechselphysiologische Untersuchungen
bei *Ashbya gossypii* im Hinblick auf die
Riboflavinbiosynthese**

Georg Schmidt

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen

I. EINLEITUNG	1
II. MATERIAL UND METHODEN	9
1. Chemikalien	9
2. Enzyme und andere Proteine	10
3. Medien und Kulturbedingungen	10
3.1. Stammhaltung	10
3.2. Screening-Medien	10
3.3. Kultivierung in Schüttelkolben	11
3.4. Kultivierung im Braun Biostat E Fermenter	12
4. Bestimmung von Substraten und Stoffwechselprodukten	13
4.1. Bestimmung von Glucose	13
4.2. Bestimmung von Riboflavin	13
4.3. Bestimmung von Ethanol und Acetat	13
5. Biotrockenmassebestimmung und Proteinbestimmung	14
6. Sporenisolierung und UV-Mutagenese	14
7. Überexpression der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase in <i>E. coli</i>	15
8. Herstellung von Zellextrakten	15
8.1. Zellextrakte zur Bestimmung der Isocitrat-Lyase-Aktivität	15
8.2. Zellextrakte zur Bestimmung der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase-Aktivität	16
9. Bestimmung von Enzymaktivitäten	16
10. Proteinreinigung	20
11. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen	23
12. Immuno-Blotting	24
13. Organellisolierung durch Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation	26
14. Elektronenmikroskopische Untersuchungen	28

III. ERGEBNISSE	30
1. Untersuchungen zur Isocitrat-Lyase aus <i>A. gossypii</i> im Hinblick auf die Riboflavinbiosynthese	30
1.1. Riboflavinbildung und spezifische Isocitrat-Lyase-Aktivität während des Wachstums auf Glucose- oder Sojaöl-Medium	30
1.2. Isolierung der Isocitrat-Lyase	31
1.3. Eigenschaften der gereinigten Isocitrat-Lyase	34
1.4. Itaconat-Effekt und Mutanten-Screening	43
1.5. Änderung der Riboflavinbildung und der spezifischen Isocitrat-Lyase-Aktivität bei einer Itaconat-resistenten Mutante von <i>A. gossypii</i>	46
1.6. Einfluß der Kohlenstoffquelle auf die spezifische Isocitrat-Lyase-Aktivität	49
1.7. Lokalisation von Isocitrat-Lyase und Isocitrat-Dehydrogenasen in der Zelle	54
1.8. Lokalisation weiterer Enzyme	59
2. Nebenproduktbildung von <i>A. gossypii</i> WT bei Wachstum auf Glucose (Crabtree-Effekt)	60
3. Untersuchungen zur Regulation der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase aus <i>A. gossypii</i>	64
3.1. Entwicklung eines neuen 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase (HBS)-Enzymtests	64
3.2. Eigenschaften der HBS	71
3.3. Riboflavinbildung und spezifische HBS-Aktivität von <i>A. gossypii</i> WT und Itaconat-resistenter Mutante bei Wachstum auf Glucose- oder Sojaöl-Medium	72
IV. DISKUSSION	77
Die Isocitrat-Lyase aus <i>A. gossypii</i>	77
Der Crabtree-Effekt bei <i>A. gossypii</i>	85
Die 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase aus <i>A. gossypii</i>	88
V. ZUSAMMENFASSUNG	90
VI. LITERATUR	92

Abkürzungen

AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1-propan-Sulfonsäure
CoA	Coenzym A
DHB	3,4-Dihydroxy-2-butanon
DHB-P	3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskopie
FAD	Flavinadenindinucleotid
FMN	Flavinmononucleotid
GC	Gaschromatographie
GDH	Glutamat-Dehydrogenase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HBS	3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICL	Isocitrat-Lyase
ICDH	Isocitrat-Dehydrogenase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
IUPAC	International Organization of Pure and Applied Chemistry
K_i	Inhibitionskonstante
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
MDH	Malat-Dehydrogenase
MES	4-Morpholinethansulfonsäure
M_r	relative molekulare Masse
NAD(P)	Nicotinamid-adenin-dinucleotid(-phosphat), oxidiert
NAD(P)H	Nicotinamid-adenin-dinucleotid(-phosphat), reduziert
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
OD600	Optische Dichte (bei $\lambda = 600$ nm)
PBS	Phosphate-buffered saline
PEP	Phosphoenolpyruvat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRI	Phosphoriboisomerase
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMA	Tetramethylammoniumchlorid
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
UV	Ultraviolett
$v_{\max}$	Maximale Umsatzrate
WT	Wildtyp

I. EINLEITUNG

In der Natur kommt der filamentöse Pilz *Ashbya gossypii* (Ashby and Nowell) Guilliermond (1928) in den Tropen und Subtropen als Phytopathogen vor. Er wurde erstmals von Baumwolle isoliert (Ashby & Nowell, 1926), wo er die sogenannte Stigmatomykose hervorruft. Diese von Insekten mit stechend-saugenden Mundwerkzeugen übertragene Krankheit machte bis vor ca. 20 Jahren den Anbau von Baumwolle in einigen Teilen der Erde nahezu unmöglich (Batra, 1973). Als Folge der Infektion kommt es zum vorzeitigen Abwurf der braun gefleckten Baumwollkapseln sowie zu einer schmutzig-gelben Verfärbung der eingetrockneten Baumwollfasern (Pearson, 1948). Neben Baumwolle können auch andere Pflanzen infiziert werden, z.B. Zitrus- und Bohnenarten (Pridham & Raper, 1950; Batra, 1973). Als Phytopathogen spielt der Pilz heute nur noch eine untergeordnete Rolle, da dessen Überdauerung und Verbreitung durch Kontrolle der als Zwischenwirt dienenden Unkräuter und der die Krankheit übertragenden Insekten eingedämmt werden konnte (Dammer & Ravallo, 1990).

A. gossypii besitzt ein septiertes, sich dichotom verzweigendes Myzel und bildet nach mehreren Tagen Wachstum charakteristische spindelförmige Sporen in interkalar entstehenden Sporangien aus. Diese werden in der Literatur als Asci bezeichnet (Batra, 1973), obwohl bisher nicht gezeigt ist, daß es sich dabei um Meiosporangien handelt. *A. gossypii* wurde ursprünglich der Familie der Nematosporaceae (Hemiascomycetidae) (Guilliermond, 1928) zugeordnet. Anhand der erst kürzlich durchgeführten phylogenetischen Analysen basierend auf Teilsequenzen der 18S rDNA, 25S rDNA und 26S rDNA wird er nun mit den ebenfalls phytopathogenen Hemiascomyceten *Eremothecium ashbyi* und *Nematospora coryli* einerseits zur Familie Eremotheciaceae Kurtzman (1995) zusammengefaßt, andererseits mit den Gattungen *Zygosaccharomyces*, *Torulaspora*, *Kluyveromyces* und *Saccharomyces* in die Familie der Saccharomycetaceae eingeordnet (Messner et al., 1995; s. Abb. 1). Ein knospendes Wachstum, wie es für *Saccharomyces cerevisiae* typisch ist, konnte jedoch bisher nicht beobachtet werden. Die enge Verwandtschaft zu *S. cerevisiae* zeigte sich allerdings auch bei der DNA- und Protein-Sequenzanalyse des TEF-Gens von *A. gossypii*, bei der die höchsten Übereinstimmungen mit entsprechenden Sequenzen von *S. cerevisiae* festgestellt werden konnten. Das Fehlen von Introns in dem untersuchten Gen und die sehr ähnliche Codon Usage stellen weitere Belege für die enge Verwandtschaft dieser beiden Pilze dar (Steiner & Philippsen, 1994).

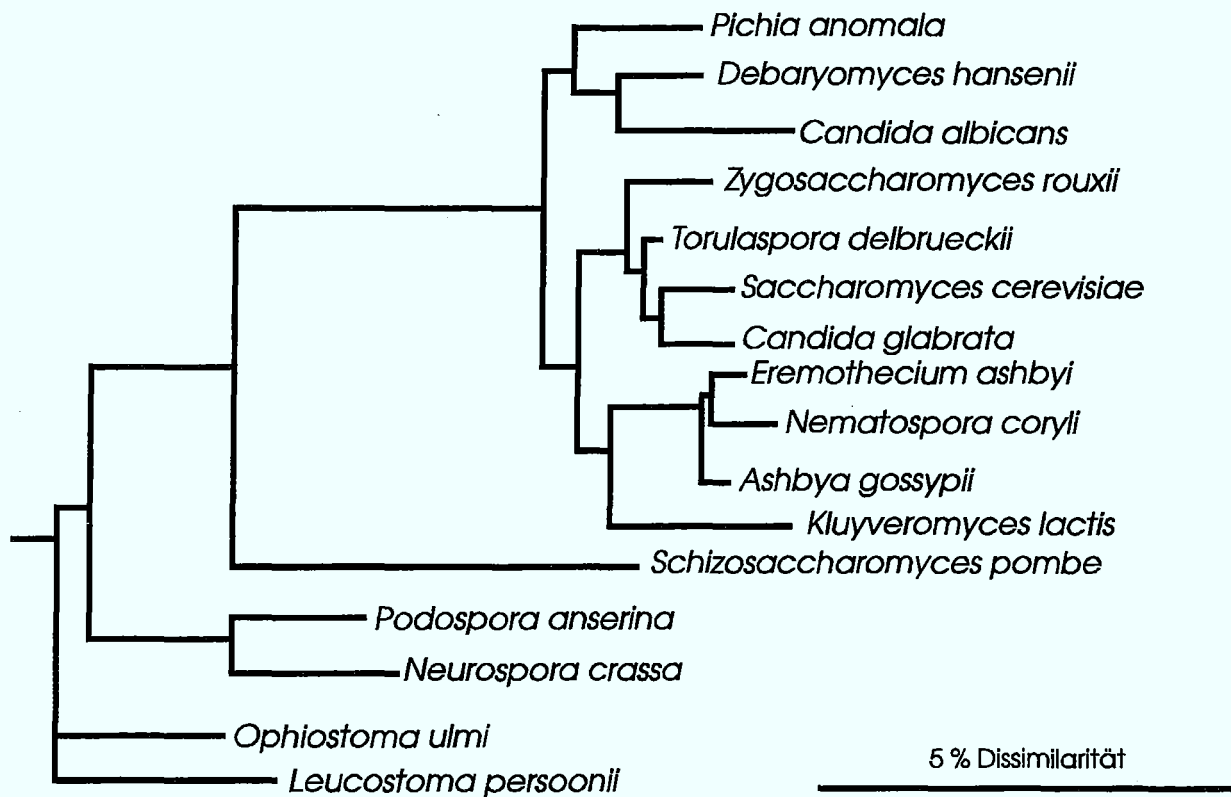


Abb. 1. Phylogenetischer Stammbaum von 16 Pilzen abgeleitet aus Sequenzen zweier Teilbereiche der 18S rDNA (aus Messner et al., 1995).

Wirtschaftliche Bedeutung erlangte der Pilz durch die erstmals von Wickerham et al. (1946) beschriebene Fähigkeit zur Riboflavinüberproduktion. Riboflavin, nach IUPAC-Nomenklatur auch als 7,8-Dimethyl-10-ribityl-isoalloxazin zu bezeichnen, ist eine biochemische Vorstufe der Coenzyme Flavinadenindinucleotid (FAD) und Flavinmononucleotid (FMN). Durch sein Isoalloxazin-Ringsystem kann es in einer Vielzahl Enzym-katalysierter Redoxreaktionen als Wasserstoff-Überträger fungieren, so z. B. bei der Succinat-Dehydrogenase und der Monoamin-Oxidase (Walpole & Wigglesworth, 1987). Es gehört als Vitamin B₂ zu den Vitaminen der B-Gruppe, zu der die ebenfalls wasserlöslichen Vitamine Thiamin (Vitamin B₁), Nicotinamid (B₃), Pantothersäure (B₅), Pyridoxin (B₆), Biotin (H, B₈), *myo*-Inosit, *p*-Aminobenzoessäure, Folsäure und Cobalamin (B₁₂) zählen, und ist hauptsächlich in Fleisch, Eiern und Milchprodukten enthalten. Vitamin B₂-Mangel führt beim Menschen zu Wachstumsstillstand sowie zu Haut- und Augenerkrankungen. Diese Symptome, begleitet von einer erhöhten Krankheitsanfälligkeit, treten auch bei Nutztieren im Falle eines Vitamin B₂- Mangels auf (Harris et al., 1972; Yoneda, 1984; Cooperman & Lopez, 1984). Pro Jahr werden ca. 2000 t Riboflavin sowohl für therapeutische Zwecke, größtenteils jedoch als Futtermittelzusatz für die Tierhaltung produziert, wobei neben der chemischen Synthese die mikrobielle Produktion zunehmend an Bedeutung gewinnt (Vandamme, 1992).

Neben den stark Riboflavin-überproduzierenden Hemiascomyceten *A. gossypii* und *E. ashbyi* sind auch Hefen, z.B. *Candida guilliermondii* und *Candida famata* (bei ATCC synonym mit *Candida flareri*), zur Riboflavinüberproduktion in der Lage (Goodwin, 1959; Demain, 1972). Bei den *Candida*-Arten setzt die Vitamin B₂-Bildung im Verlauf der Kultivierung erst nach Unterschreiten einer bestimmten Eisenkonzentration (10 µg l⁻¹) im Medium ein (Goodwin, 1959). Dies konnte auf eine Regulation der Gene für die Riboflavinbiosynthese auf Ebene der Transkription zurückgeführt werden, an der das Fe²⁺-Kation in Verbindung mit einem Repressor-Protein beteiligt ist (Logvinenko et al., 1984, 1985). Seit kurzer Zeit wird ein Stamm von *C. famata* zur Produktion eingesetzt, der durch eine herabgesetzte Sensitivität gegenüber Eisen bis zu 20 g l⁻¹ Vitamin B₂ bildet (Heefner et al., 1992). Im Hinblick auf die Verwendung eisenhaltiger Materialien bei der industriellen Nutzung im großtechnischen Maßstab ist diese Sensitivität jedoch insofern nachteilig, als zur Kultivierung keine Fermenter aus Stahl eingesetzt werden können, und damit eine entsprechend aufwendigere, kostenintensivere Prozeßtechnik erforderlich wird. Die Produktion mit *E. ashbyi* und *A. gossypii* ist dagegen nicht von einer kritischen Eisenkonzentration abhängig und daher diesbezüglich unproblematisch (Demain, 1972). Obwohl diese beiden Pilze vergleichbare Mengen an Vitamin B₂ synthetisieren können, wird *A. gossypii* für den industriellen Prozeß bevorzugt, da er im Vergleich zu *E. ashbyi* genetisch stabiler und damit leichter zu handhaben ist (Demain, 1972). Die Optimierung der Fermentationsbedingungen hinsichtlich geeigneter Kohlenstoffquellen, wie z.B. Pflanzenölen (Lago & Kaplan, 1981; Özbas & Kutsal, 1986), und hinsichtlich der Prozeßführung, wie z.B. pH-Wert und Belüftung der Kultur (Kutsal & Özbas, 1989; Özbas & Kutsal, 1992), sowie die Selektion neuer Produktionsstämme nach Sporenmutagenese führten für *A. gossypii* zur Steigerung der Riboflavinausbeute auf mindestens 15 g l⁻¹ (Bigelis, 1989). Mit einem in der Purinsynthese mutierten *Bacillus subtilis* Stamm, in den außerdem die Riboflavinsynthesegene als Operon unter der Kontrolle eines starken, konstitutiven Promotors eingebracht worden waren, konnten vor kurzem ebenfalls Ausbeuten in dieser Größenordnung erzielt werden (Perkins & Pero, 1993).

Die Biosynthese des Riboflavins kann in zwei Abschnitte eingeteilt werden, indem substratabbauende, zur Bereitstellung der Ausgangsmetabolite GTP und Ribulose-5-P dienende Schritte getrennt von den Umsetzungen betrachtet werden, die spezifisch für die Riboflavinbiosynthese sind. Eine Erhöhung der Produktivität ist durch eine Medien-Supplementierung mit Vorstufen dieser Ausgangsmetabolite zu erreichen. So konnte durch Zugabe von Glycin, einer Vorstufe der Purinbiosynthese und damit von GTP, die Riboflavinsynthese von *A. gossypii* gesteigert werden (Hanson, 1967; Kaplan & Demain, 1970; Lago & Kaplan, 1981). Derselbe Effekt wurde durch Zufütterung von Purinen, z.B. Hypoxanthin, erreicht (Kaplan & Demain, 1970). Einen deutlichen Einfluß auf die Vitamin B₂-Bildung von *A. gossypii* üben auch die für die Kultivierung verwendeten Kohlenstoffquellen aus. Bei Verwendung von Glucose setzt die Riboflavinbildung interessanterweise erst nach Glucoseverbrauch ein (Pfeifer et al., 1950). Während des Wachstums auf diesem Substrat werden intrazellulär Triglyceride akkumuliert

und nach Verbrauch der Glucose wieder abgebaut (Kupp, 1993; Stahmann et al., 1994). Diese Beobachtung spricht dafür, daß bei *A. gossypii* das gespeicherte Neutralfett als Kohlenstoffquelle für die Riboflavinbildung dient. Die höchsten Riboflavinausbeuten werden durch den Einsatz von Pflanzenölen (Hanson, 1967; Kaplan & Demain, 1970; Lago & Kaplan, 1981) oder tierischen Fetten (Szczesniak et al., 1971) als Kohlenstoffquelle erzielt. Zur Bildung von Ausgangsmetaboliten für die Riboflavinbiosynthese, die aus dem Zentral-, speziell aus dem Kohlenhydratstoffwechsel hervorgehen, müssen dabei die Reaktionen der β -Oxidation, des Glyoxylatzyklus und der Gluconeogenese durchlaufen werden (Abb. 2).

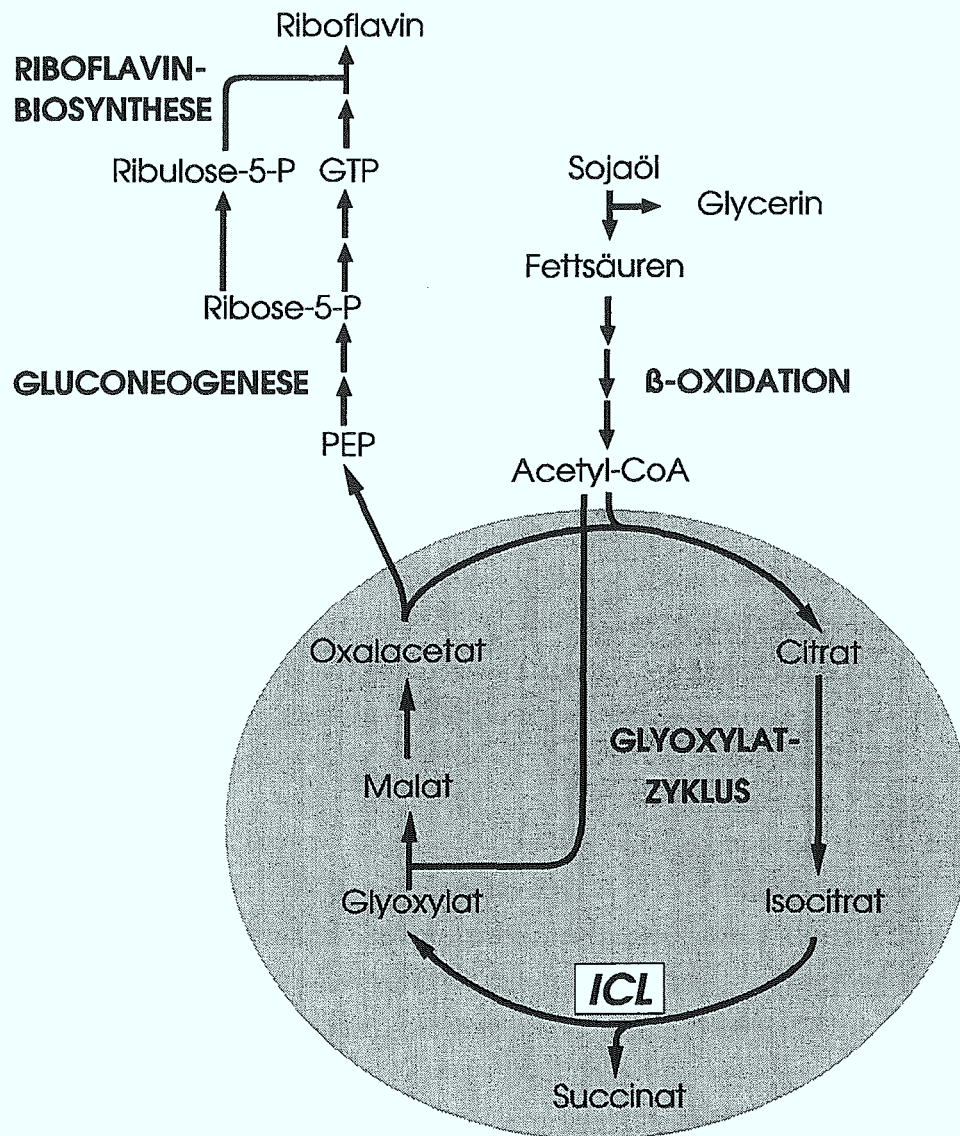


Abb. 2. Schematische Darstellung des Kohlenstoffflusses in Richtung Riboflavin mit den bei der Verwendung von Sojaöl als Kohlenstoffquelle zu durchlaufenden Stoffwechselwegen.

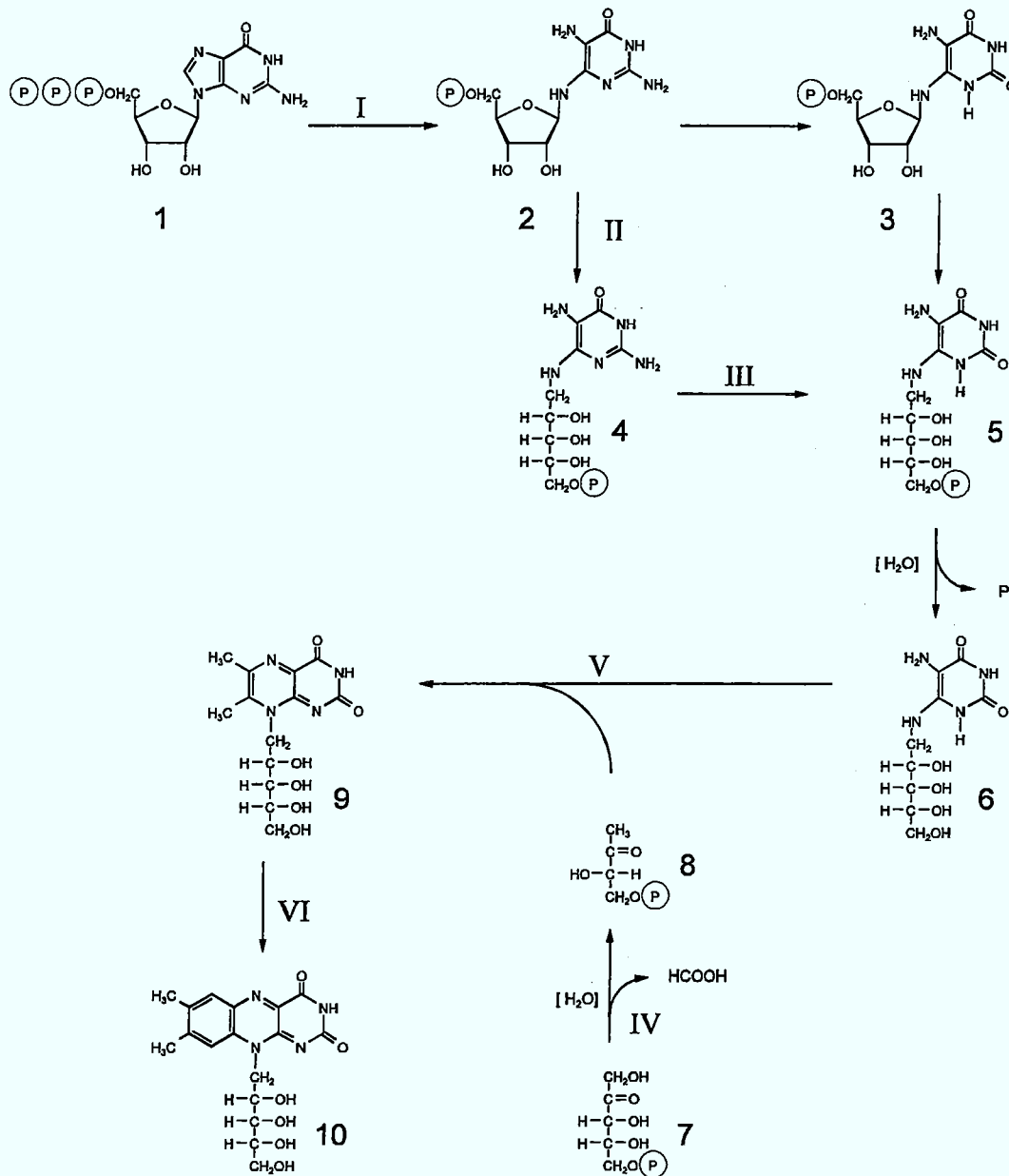
Für das Wachstum auf Triglyceriden ist der Glyoxylatzyklus erforderlich. Dieser unter dem Begriff der "anaplerotischen Reaktionen" (Kornberg, 1965a, b) einzuordnende Zyklus sorgt dafür, daß der nach der β -Oxidation als Acetyl-CoA vorliegende Kohlenstoff nicht im Tricarbonsäurezyklus in Form von CO_2 verlorengeht, sondern zum Aufbau von Biomasse genutzt werden kann. Als reguliertes Enzym in diesem Zyklus ist für viele Mikroorganismen die Isocitrat-Lyase (ICL) beschrieben worden (Cioni et al., 1981). Sie katalysiert die Spaltung von Isocitrat in Succinat und Glyoxylat. Durch die Malatsynthese wird aus Glyoxylat unter Verwendung eines Moleküls Acetyl-CoA zunächst Malat gebildet, aus dem durch die Malat-Dehydrogenase wieder Oxalacetat als Akzeptor für ein weiteres Molekül Acetyl-CoA regeneriert wird. In der Bilanz entsteht somit aus zwei C_2 -Körpern ein C_4 -Körper bei gleichzeitiger Regeneration des spezifischen Akzeptors. Betrachtet man beispielhaft die Kohlenstoffverteilung im Neutralfett-Molekül Tristearin (1,2,3-Trioctadecanoylglycerin; $\text{C}_{57}\text{H}_{110}\text{O}_6$), und sieht man von der Biosynthese des Isopentenylpyrophosphates und des Malonyl-CoA ab, dann müssen 95 % des Kohlenstoffs über die ICL metabolisiert werden, sofern daraus Anaboliten gebildet werden sollen. Das Glycerin stellt nur einen Anteil von 5 % des Kohlenstoffs in diesem Neutralfett-Molekül. Der ICL dürfte somit eine Schlüsselrolle bei der Kohlenstoffbereitstellung für die Riboflavinbiosynthese zukommen. Ein Ziel dieser Arbeit war deshalb die biochemische Charakterisierung, sowie die Untersuchung der ICL-Regulation in *A. gossypii*, um deren Bedeutung für die Riboflavinbiosynthese beurteilen zu können.

Wie aus Abb. 3 zu ersehen ist, sind für die Riboflavinbiosynthese sechs enzymatische Schritte spezifisch (Bacher, 1991). Nach Öffnung des Imidazol-Rings am GTP (1) sowie anschließender Reduktion und Desaminierung zu einer Zwischenstufe (6) entsteht durch Kondensation mit 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (DHB-P; 8), einem C_4 -Körper, dessen Synthese aus Ribulose-5-phosphat (7) mittels der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase (HBS) erst kürzlich nachgewiesen wurde (Volk & Bacher, 1990), das 6,7 Dimethyl-8-ribityllumazin (9). In einer Dismutation wird aus zwei Molekülen 6,7 Dimethyl-8-ribityllumazin (9) letztlich ein Molekül Riboflavin gebildet (10). Bei Betrachtung dieser für die Riboflavinbiosynthese spezifischen Umsetzungen fällt auf, daß 50 % des im Riboflavinmolekül eingebauten Kohlenstoffs über die HBS als DHB-P bereitgestellt wird. Dadurch kommt diesem Enzym eine besondere Bedeutung innerhalb der Riboflavinbiosynthese zu. Die Aufklärung des von der HBS katalysierten Schrittes begann mit den Arbeiten von Plaut (1954), der mittels verschiedener radioaktivmarkierter Vorstufen die Xylenring-Synthese untersuchte, und wurde letztlich mit der Isolierung und Charakterisierung des Enzyms sowie des Enzymprodukts von Volk & Bacher (1988, 1990) abgeschlossen. Daß zur Bildung des Xylen-Ringsystems ein aus einer Pentose- bzw. einem Pentulose-5-P hervorgehender Metabolit, der in der Literatur auch als "Component X" bezeichnet wurde, erforderlich ist, zeigten sowohl Untersuchungen mit Zell-extrakten aus *C. guilliermondii* (Logvinenko et al., 1982), als auch Fütterungsexperimente mit radioaktivmarkierten Zuckern und Zuckerphosphaten, die mit *A. gossypii* Kulturen durchge-

führt wurden (Bacher et al., 1982, 1983, 1985). Die Eliminierung des intramolekularen C₄-Atoms aus einer Pentose konnte dabei als die zum C₄-Körper führende Reaktion nachgewiesen werden (Floss et al., 1983). Durch Untersuchungen mit Zellextrakten aus *C. guilliermondii* ließ sich diese Eliminierung auf eine enzymatische Reaktion zurückführen (Nielsen et al., 1984, 1986; Neuberger & Bacher, 1985). Die Fraktionierung von Zellextrakten durch Anionenaustauscher-Chromatographie und die anschließende Charakterisierung der erhaltenen Fraktionen zeigte, daß Ribose-5-P durch eine Isomerase zu Ribulose-5-P umgesetzt wird, welches dann als Substrat für die Synthese des C₄-Körpers durch ein anderes Enzym dient (Bacher et al., 1986). Mit Hilfe dieses aus *C. guilliermondii* aufgereinigten Enzyms konnte der C₄-Körper als 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat identifiziert werden (Volk & Bacher, 1988). Das daraufhin als 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase zu bezeichnende Enzym wurde sowohl für *C. guilliermondii* (Volk & Bacher, 1990) als auch für *Escherichia coli* (Richter et al., 1992) als Monomer mit einem M_r von 24 000 beschrieben. Untersuchungen zur Regulation dieses Enzyms liegen bisher nicht vor. Sie könnten bei *A. gossypii* Hinweise zur Klärung des Phänomens liefern, daß die Riboflavinproduktion hauptsächlich erst nach der Wachstumsphase einsetzt (Demain, 1972). Unter diesem Aspekt ist der Nachweis der HBS-Aktivität in *A. gossypii* sowie die Aufklärung einer möglichen HBS-Regulation sehr interessant.

Abb. 3. Schema zur Riboflavinbiosynthese (nach Bacher, 1991).

Ausgangsmetabolite für die Riboflavinbildung sind GTP (1) und Ribulose-5-phosphat (7). Die für Eukaryonten durch Charakterisierung von *S. cerevisiae* Mutanten (Bacher & Lingens, 1971) beschriebene Reaktionssequenz über einen Reduktionsschritt mit nachfolgender Desaminierung ist tabellarisch aufgelistet. Diese Sequenz wurde auch für *A. gossypii* nachgewiesen (Hollander & Brown, 1979). Bei Prokaryonten (*E. coli*; Burrows & Brown, 1978) geht dagegen die Desaminierung der Reduktion voraus. In den nachfolgenden Reaktionen werden sowohl in Eukaryonten (*C. guilliermondii*; Logvinenko et al., 1985; Bacher et al., 1986), als auch in Prokaryonten (*B. subtilis*; Neuberger & Bacher, 1986) die jeweils dephosphorilierten Intermediate effektiver umgesetzt, wobei bisher ungeklärt ist, ob die Dephosphorilierung durch ein Riboflavinsynthese-spezifisches Enzym oder durch eine Phosphatase mit breitem Substratspektrum katalysiert wird. Für die codierenden Gene wurden die bei *S. cerevisiae* benutzten Bezeichnungen herangezogen. Weitere Erklärungen im Text.



Reaktion	Enzym (Gen)
I Ringöffnung am GTP (1) führt zu 2,5-Diamino-6-(ribosylamino)-4(3H)-pyrimidinon-5'-phosphat (2)	GTP-Cyclohydrolase II (RIB 1)
II Reduktion zu 2,5-Diamino-6-(ribitylamino)-4(3H)-pyrimidinon-5'-phosphat (4)	Reduktase (RIB 7)
III Desaminierung zu 5-Amino-6-(ribitylamino)-2,4(1H,3H)-pyrimidindion-5'-phosphat (5)	Desaminase (RIB 2)
IV Synthese von 3,4 Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (8) aus Ribulose-5-phosphat (7)	3,4 Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase (RIB 3)
V Kondensation von 5-Amino-6-(ribitylamino)-2,4(1H,3H)-pyrimidindion (6) und (8) zu 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (9)	Lumazin-Synthase (RIB 4)
VI Dismutation von zwei Molekülen (9) zu (6) und Riboflavin (10)	Riboflavin-Synthase (RIB 5)

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Stoffwechsel von *A. gossypii* hinsichtlich neuer Ansatzpunkte für eine mögliche Steigerung der Riboflavinproduktivität zu untersuchen. Dabei standen zwei Enzyme im Mittelpunkt.

Zum einen sollte die ICL isoliert und anschließend bezüglich ihrer Regulation durch Metabolite charakterisiert werden. Um die Bedeutung der ICL für die Riboflavinbiosynthese beurteilen zu können, war zudem zu klären, ob es eine Korrelation zwischen der Riboflavinbildung und der spezifischen Enzymaktivität gibt. Weiterhin sollte die Wirkung potentieller ICL-Hemmstoffe auf die Riboflavinbildung untersucht werden, um so einen Antimetaboliten für ein Screening nach Mutanten mit veränderter ICL-Aktivität zu erhalten. Von der Charakterisierung dieser Mutanten hinsichtlich ihrer Enzymaktivität und ihrer Riboflavinbildung waren eindeutige Hinweise auf die Rolle der ICL bei der Riboflavinbiosynthese von *A. gossypii* zu erwarten.

Zum anderen sollte die HBS von *A. gossypii* nachgewiesen und im Hinblick auf ihre Regulation charakterisiert werden. Dazu war zunächst ein neuer, vereinfachter Enzymtest zu etablieren, um die Untersuchung der Enzymregulation in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle und in Abhängigkeit von der Wachstumsphase zu ermöglichen.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien

Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt), Enzymsubstrate und Cofaktoren sowie Ampicillin, BCIP, NBT wurden von der Firma Boehringer Mannheim (Mannheim) bezogen. Produkte anderer Hersteller sind nachfolgend aufgeführt.

Difco (Detroit, Michigan, USA):

Agar
Bacto-Trypton

Kattus (Ratingen):

Sojaöl

Roth (Karlsruhe):

Glycerin, 99,5 %

Fluka (Neu-Ulm):

DL-Äpfelsäure
Cytochrom c
D-Glucose
myo-Inositol
Natriumdithionit
Ölsäure
Phenylhydrazin·HCl
Sorbitol
Succinat
TMA

Serva (Heidelberg):

Acrylamid
Bisacrylamid
BSA
BSA, Fraction V
CAPS
MES
Nicotinsäureamid
Serva Blau G
TRIS
TWEEN 20

Sigma Chemie (Deisenhofen):

Acetoacetyl-CoA
Antipain
CoA
threo-DL-Isocitrat

Leupeptin
PMSF
Ribose-5-phosphat
Schiff's Reagenz
Streptomycin
TEMED

2. Enzyme und andere Proteine

Boehringer Mannheim (Mannheim):

Alkalische Phosphatase
Anti-Kaninchen-IgG-AP (aus Schaf)
Eichproteine II combithek® (Gelchromatographie), M_r 18 000-300 000
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (aus *Leuconostoc mesenteroides*)

Novo Nordisk (Mainz):

Novozym 234

Sigma Chemie (Deisenhofen):

Lysing Enzyme
Phosphoriboisomerase
Phosphorylase b
SDS-7, Dalton Mark VII-L, Kit for molecular weights
SDS-7b, Prestained SDS molecular weight standard mixture

3. Medien und Kulturbedingungen

3.1. Stammhaltung

Für die Stammhaltung wurde *A. gossypii* Stamm ATCC 10895 auf HA-Agarplatten mit folgender Zusammensetzung kultiviert (Stahmann et al., 1994):

10 g l⁻¹ Hefeextrakt
10 g l⁻¹ Glucose
3 g l⁻¹ Glycin
20 g l⁻¹ Agar

pH 6,0 (vor dem Autoklavieren mit 1 N HCl eingestellt)

Die Stammkulturen wurden alle 4 Wochen überimpft und nach 4-5 Tagen Inkubation bei 30 °C bei 4 °C gelagert.

3.2. Screening-Medien

Zum Screening einer Itaconat-resistenten Mutante wurden zwei Medien konzipiert:

Medium 1: 2,0 g l⁻¹ KH₂PO₄, (pH 6,7 mit 6 N KOH eingestellt)

1,5 g l⁻¹ NH₄Cl
0,5 g l⁻¹ Asparagin
0,2 g l⁻¹ NaCl

0,4 g l⁻¹ MgSO₄·7 H₂O
0,05 g l⁻¹ MnSO₄·H₂O
0,04 g l⁻¹ CaCl₂·H₂O
0,10 g l⁻¹ *myo*-Inositol
0,25 g l⁻¹ Nicotinsäureamid
0,025 % (v/v) Ölsäure
20 mM Itaconat
20 g l⁻¹ Agar

Medium 2: 10 g l⁻¹ Hefeextrakt
0,05 % (v/v) Ölsäure
50 mM Itaconat
20 g l⁻¹ Agar

Die Medien wurden, solange sie nach dem Autoklavieren noch flüssig waren, zur Emulgierung der Ölsäure ca. 5 s mit einem Ultrathurrax (IKA-Labortechnik, Staufen) aufgerührt und anschließend in Petrischalen gegossen.

3.3. Kultivierung in Schüttelkolben

Die Kultivierung in Schüttelkolben erfolgte auf Glucose-Medium bzw. Sojaöl-Medium bestehend aus:

10 g l⁻¹ Hefeextrakt
10 g l⁻¹ Glucose bzw. 10 g l⁻¹ Sojaöl

Vor dem Autoklavieren wurde bei beiden Medien ein pH-Wert 6,0 mit 1 N HCl eingestellt.

Für die Versuche wurden

- 100 ml Medium in 500 ml-Kolben mit zwei Schikanen mit 1 ml Vorkultur angeimpft und bei 28 °C auf einem Schüttler (Certomat R; B.Braun, Melsungen) mit 110 rpm kultiviert,
- 300 ml Medium in 1 l-Kolben ohne Schikanen mit 3 ml Vorkultur angeimpft und bei 28 °C auf einem Schüttler (Pilot Shake, B.Braun, Melsungen) mit 220 rpm kultiviert.

Vorkulturen zur Bereitstellung von Myzel als Inokulum wurden bei den unter a) genannten Bedingungen jeweils über Nacht auf dem Medium hergestellt, das anschließend auch für die Kultivierung verwendet wurde. Zum Animpfen von Glucose-Medien wurden nur Vorkulturen verwendet, bei denen mit Glucose-Teststäbchen (Diabur-Test 5000; Boehringer Mannheim) noch Glucose nachweisbar war.

3.4. Kultivierungen im Braun Biostat E Fermenter

In einem 3 l-Rührkessel-Fermenter wurden mit den unter 3.3. angegebenen Medien Kultivierungen des Pilzes bei den wie folgt zu beschreibenden Bedingungen durchgeführt:

Kulturmedium:	1,5 l
Inkubationstemperatur:	28 °C
Drehzahl:	100 rpm (Glucose-Medium) 200 rpm (Sojaöl-Medium)
Belüftung:	1 vvm

Der pH-Wert lag sowohl bei Glucose- als auch bei Sojaöl-Medium zu Beginn zwischen 6,4 und 6,7. Zur Unterdrückung bakterieller Kontaminationen wurden Ampicillin und Streptomycin in einer Konzentration von jeweils 150 mg l⁻¹ zugegeben. Das Animpfen des jeweiligen Mediums erfolgte mit 30 ml einer wie unter 3.3. a) angezogenen Vorkultur. Bei Kultivierungen auf Glucose-Medium war die Zugabe des Antischaummittels Dehysan Z 2611 (0,2 ml l⁻¹; Henkel KGaA, Düsseldorf) erforderlich. Die Änderungen des Sauerstoffpartialdruckes (pO₂) und des pH-Wertes wurden über den Fermentationsverlauf aufgezeichnet, und zu verschiedenen Zeiten wurden Proben zur Bestimmung der Biotrockenmasse, des Glucoseverbrauchs, sowie von Fermentationsprodukten und von Enzymaktivitäten steril entnommen.

Zur Bestimmung der ICL-Aktivität in Gegenwart von Glucose und Ethanol als Kohlenstoffquelle wurde folgendes Medium für die Kultivierung benutzt:

10 g l ⁻¹ Hefeextrakt
10 g l ⁻¹ Glucose
3 g l ⁻¹ Ethanol

Die Rührerdrehzahl lag bei 100 rpm. Eine Zugabe von Antischaummittel war nicht erforderlich.

Zur Untersuchung des Crabtree-Effekts wurde der Pilz auf Glucose-Medium kultiviert. Indem mit der in einem elektronischen Regelkreis vorhandenen Clark-Elektrode die Rührerdrehzahl automatisch zwischen 200-500 rpm reguliert wurde, konnte ein pO₂-Wert von mindestens 30 % im Medium sichergestellt werden, so daß eine Sauerstofflimitierung der Kultur ausgeschlossen werden konnte.

4. Bestimmung von Substraten und Stoffwechselprodukten**4.1. Bestimmung von Glucose**

Die im Medium vorhandene Restglucosekonzentration wurde zunächst mit Glucose-Teststäbchen (Diabur-Test 5000; Boehringer Mannheim) abgeschätzt. Die genaue Quantifizierung erfolgte durch Doppelbestimmungen mit dem auf der enzymatischen Umsetzung von NADP zu NADPH durch Hexokinase/Glucose-6-P-Dehydrogenase beruhenden D-Glucose-Test (Boehringer Mannheim).

4.2. Bestimmung von Riboflavin

Zur quantitativen Bestimmung von intra- und extrazellulärem Riboflavin wurden

- a) 5 ml Kultur mit Hilfe der French Press (Aminco, Silver Spring, USA) bei 19 000 psi aufgeschlossen,
- b) 1 ml Kultur mit Lysing Enzyme (Endkonzentration: 10 mg ml⁻¹) versetzt und 1 h bei 30 °C auf einem Schüttler (Eppendorf Thermomixer 5436) inkubiert. Zur Freisetzung intrazellulären Riboflavins wurden die so entstandenen Protoplasten durch anschließendes Auffüllen mit H₂O (Endvolumen: 2 ml) zum Platzen gebracht.

Das jeweils resultierende Homogenat wurde filtriert (0,22 µm; Millipore, Eschborn), so daß Riboflavin im Filtrat mittels HPLC (Merck, Darmstadt) unter den nachfolgend beschriebenen Trennbedingungen quantifiziert werden konnte:

Säule: RP 18 125/4 Säule (Merck, Darmstadt)

Laufmittel: 50 mM NaH₂PO₄/H₃PO₄ Puffer, pH 3,0,
mit 12 % Acetonitril und 1 mM TMA

Fluß: 1 ml min⁻¹

Elution: isokratisch

Detektionswellenlänge: 270 nm

4.3. Bestimmung von Ethanol und Acetat

Zur Bestimmung von Ethanol und Acetat wurden die aus einer Kultur entnommenen Proben filtriert (0,22 µm; Filtron, Karlstein) und mit einem Gaschromatographen (Chrompack, Frankfurt) unter folgenden Bedingungen analysiert:

Säule: Permabond FFAP-DF-0,25 (25 m×0,32 mm ID; Macherey & Nagel, Düren)

Trägergas: N₂ (3 bar)

Split: 100 ml min⁻¹

Injektionsvolumen: 0,6 µl

Temperaturprogramm: 50 °C (4 min) → 190 °C (4 min), 13 °C min⁻¹

Injektionstemperatur: 220 °C

Detektortemperatur: 260 °C

5. Biotrockenmassebestimmung und Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Biotrockenmasse von auf Glucose-Medium gewachsenem Pilzmyzel wurden Aliquots der Kultur über Membranfilter (0,8 µm; Millipore, Eschborn) abfiltriert. Das auf den Filtern zurückbleibende Myzel wurde 30 h bei 110 °C im Trockenschrank getrocknet und anschließend gewogen.

Zur Bestimmung der Biotrockenmasse von auf Sojaöl-Medium gewachsenem Pilzmyzel mußte zunächst durch Schütteln (1 min) mit dem in gleichem Volumenanteil zur Probe zugegebenen Extraktionsmittel Hexan-Isopropanol (Volumenanteile 3:2) extrazellulär anhaftendes Öl entfernt werden. Anschließend konnten alle weiteren Schritte wie oben beschrieben durchgeführt werden.

Proteinkonzentrationen wurden photometrisch (Shimadzu UV-160 Photometer) mit der Methode nach Bradford (1976) bestimmt. Der Proteingehalt der Probe wurde über eine mit BSA als Standard erstellte Eichkurve ermittelt.

6. Sporenisolierung und UV-Mutagenese

Zur Sporenisolierung wurde 4-5 Tage altes Myzel auf HA-Platten (s. 3.1.) mit Novozym 234-Lösung (10 mg ml⁻¹) überschichtet und 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Novozym 234 baut die Zellwände der Asci ab und setzt so die gegen das Enzym unempfindlichen Sporen frei. Nachdem das Lysat 5 min bei 1500 g zentrifugiert worden war, konnte der Überstand abdekantiert werden. Das Pellet wurde in sterilem H₂O resuspendiert, mit Paraffin im Verhältnis 1:1 überschichtet, kräftig geschüttelt und anschließend bis zur Phasentrennung stehen gelassen. Die hydrophoben Sporen reichert sich in der Paraffinphase an, während die Zelltrümmer in der wässrigen Phase zurückblieben. Die Sporen konnten mehrere Monate bei 4 °C gelagert werden, ohne ihre Keimfähigkeit zu verlieren.

Nach Auszählen der Sporensuspension mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer wurde eine Sporenzahl von 5×10^4 (ml Paraffin)⁻¹ eingestellt. Zur Aufnahme einer Abtötungskinetik wurde zunächst eine Petrischale mit Sporensuspension (40 ml) in 20 cm Abstand von einer UV-Lampe (Schütt, Göttingen) mit UV-Licht ($\lambda = 260$ nm) bestrahlt, und 1 ml-Aliquots wurden nach 0, 10, 20, 30, 60, 90, 120 und 240 s entnommen. Jeweils 100 µl von diesen Aliquots wurden pro HA-Platte ausplattiert und 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Für das Screening auf ICL-Mutanten wurde eine Sporensuspension mit 10^5 Sporen (ml Paraffin)⁻¹ 30 s lang bei ansonsten gleichen Bedingungen bestrahlt. Die Sporenkonzentration wurde für das Screening verdoppelt, da die Keimungseffizienz der Sporen auf Agarplatten mit Medium 2 (s. 3.2), auf denen nach der Mutagenese jeweils 100 µl Sporensuspension ausgespatelt und 3 Tage bei 30 °C inkubiert wurden, nur 50 % im Vergleich zum HA-Medium betrug.

7. Überexpression der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase in *E. coli*

Die Herstellung kompetenter Zellen des *E. coli* Stammes JM 109 (DE 3), bei dem das IPTG-induzierbare T7 Polymerase-Gen chromosomal integriert vorliegt, und die Transformation dieser Zellen mit dem Plasmid pJR 958 (von Prof. Revuelta, Universität Salamanca), welches das für die *E. coli* HBS codierende Gen RIB 3 unter der Kontrolle eines T7-Promotors sowie das Ampicillin-Resistenzgen als Marker trägt, erfolgte nach der von Reinscheid (1994) beschriebenen Methode. Transformanden wurden auf Agarplatten mit LB-Medium, das Ampicillin enthielt (50 mg l^{-1}), ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Das LB-Medium bestand aus folgenden Komponenten:

- 10 g l^{-1} Bacto-Trypton
- 5 g l^{-1} Hefeextrakt
- 10 g l^{-1} NaCl
- 20 g l^{-1} Agar

Zur Induktion der HBS-Expression wurden transformierte Zellen über Nacht in 50 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 mg l^{-1}) bei 37°C und 110 rpm kultiviert, abzentrifugiert und in 4 ml LB-Medium resuspendiert. Daraus wurden je 2 Kolben Ampicillin enthaltendes LB-Medium mit IPTG ($0,4 \text{ mg ml}^{-1}$) bzw. ohne IPTG (Kontrolle) angeimpft. Nach weiteren 3 h Inkubation bei 37°C und 110 rpm wurden die Zellen abgeerntet und aufgeschlossen.

8. Herstellung von Zellextrakten

8.1. Zellextrakte zur Bestimmung der Isocitrat-Lyase-Aktivität

Zur Herstellung von Zellextrakten wurde Myzel aus der Kultur über Membranfilter ($0,8 \mu\text{m}$; Millipore, Eschborn) abfiltriert und mit Aufschlußpuffer im Verhältnis 1:2-1:5 (Feuchtgewicht:Puffervolumen) aufgenommen.

Aufschlußpuffer:

- Imidazol 50 mM
- EDTA 1 mM
- MgSO_4 5 mM
- DTT 5 mM
- PMSF 1 mM
- Glycerin 30 % (v/v)

pH 7,5 (mit HCl eingestellt)

Die Zellen wurden mit der French Press (Aminco, Silver Spring, USA) bei 19 000 psi aufgeschlossen. Nach 30 min Zentrifugation des Homogenates bei 20 000 g konnte der Überstand zur Bestimmung der ICL-Enzymaktivität eingesetzt werden. Sämtliche Präparationsschritte wurden bei 4°C bzw. mit eisgekühlten Lösungen durchgeführt.

8.2. Zellextrakte zur Bestimmung der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase Aktivität

Für die Bestimmung der HBS-Aktivität aus *A. gossypii* Myzel wurde eine aus der Kultur entnommene Probe über einen Membranfilter (0,8 µm; Millipore, Eschborn) abfiltriert und im Verhältnis 1:2 (Feuchtgewicht:Puffervolumen) mit Aufschlußpuffer aufgenommen:

Aufschlußpuffer:

TRIS/HCL, pH 7,5	100 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT	5 mM
PMSF	1 mM
Antipain	10 µM
Leupeptin	10 µM

Die Zellen wurden mit der French Press (Aminco, Silver Spring, USA) bei 19 000 psi aufgeschlossen. Nach 30 min Zentrifugation des Homogenates bei 20 000 g wurde ein Aliquot (1,5-2,0 ml) des Überstandes zur Fraktionierung löslicher Proteine auf eine Sephacryl S-200-Gelchromatographie-Säule (40×1,6 cm; Pharmacia, Freiburg) aufgetragen und mit S200-Puffer bei einem Fluß von 18 ml h⁻¹ in 1,8 ml Fraktionen eluiert.

S200-Puffer:

TRIS/HCl, pH 7,5	50 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT	1 mM
NaCl	150 mM
NaN ₃	0,02 %

Die Fraktionen wurden in Aliquots zu 200 µl für den Enzymtest verwendet.

Zur Messung der HBS-Aktivität aus Zellen des *E. coli* Stammes JM109 (DE3) wurden 50 ml Bakterienkultur nach Überexpression der HBS durch IPTG-Induktion abzentrifugiert und in 2 ml des oben für *A. gossypii* Myzel angegebenen Puffers, der allerdings kein Antipain und Leupeptin enthielt, durch Ultraschall (3 min) aufgeschlossen. Nach 30 min Zentrifugation des Homogenates bei 20 000 g konnte der Überstand zur Bestimmung der HBS-Aktivität eingesetzt werden.

Sämtliche Schritte wurden bei 4 °C bzw. mit eisgekühlten Lösungen durchgeführt.

9. Bestimmung von Enzymaktivitäten

Alle photometrischen Enzymtests, die mit einem Photometer (Shimadzu UV-160) kontinuierlich gemessen werden konnten, sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Enzym	Puffer	Weitere Komponenten	Substrat	Wellenlänge Temperatur Extinktions- koeffizient	Referenz
Hexokinase (EC 2.7.1.1)	50 mM TRIS/HCl, pH 7,5	MgCl ₂ [30 mM]; NADP [2,5 mM]; ATP [5,0 mM], pH 7,5; G-6P-DH (0,35 U)	Glukose [50 mM]	340 nm 30 °C 6.3 mM ⁻¹ cm ⁻¹	Easterby & Qadri (1982)
Cytochrom c Oxidase (EC 1.9.3.1)	50 mM Kaliumphosphat, pH 7,2		Cytochrom c [0,038 mM] reduziert mit Natriumdithionit	550 nm 30 °C 21,1 mM ⁻¹ cm ⁻¹	Smith, L. (1955)
Malat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.37)	100 mM Kaliumphosphat, pH 7,5	NADH [0,2 mM]	Oxalacetat [2,0 mM]	340 nm 30 °C 6,3 mM ⁻¹ cm ⁻¹	Ochoa, S. (1955)
NADP-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.42)	200 mM TRIS/HCl, pH 8,0	NADP [1,0 mM] MnSO ₄ [1,0 mM]	Isocitrat [4,0 mM]	340 nm 37 °C 6.3 mM ⁻¹ cm ⁻¹	Nabeshima et al. (1977b)

Tab. 1. Kontinuierliche photometrische Enzymassays. Die jeweiligen Endkonzentrationen im Testansatz sind angegeben.

NAD-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.41)	200 mM TRIS/HCl, pH 8,0	NAD [1,0 mM] MnSO ₄ [1,0 mM] AMP [1,5 mM]	Isocitrat [4,0 mM]	340 nm 37 °C 6,3 mM ⁻¹ cm ⁻¹	Nabeshima et al. (1977b)
Isocitrat-Lyase (EC 4.1.3.1)	25 mM Imidazol/HCl, pH 7,0	MgCl ₂ [5,0 mM] DTT [5,0 mM] EDTA [1,0 mM] Phenylhydrazin·HCl [4,0 mM]	Isocitrat [4,0 mM]	324 nm 30 °C 14,63 mM ⁻¹ cm ⁻¹	Dixon & Kornberg (1959) Rua et al. (1989)
3-Ketoacyl-CoA Thiolase (EC 2.3.1.16)	100 mM TRIS/HCl, pH 8,3	MgCl ₂ [30 mM] KCl [50 mM] CoA [0,1 mM]	Acetoacetyl-CoA [0,01 mM]	303 nm 30 °C 16,9 mM ⁻¹ cm ⁻¹	Middleton, B. (1975)
Katalase (EC 1.11.1.6)	50 mM Kaliumphosphat, pH 7,0	MgCl ₂ [30 mM]	H ₂ O ₂ [30 mM]	240 nm 30 °C 40,0 mM ⁻¹ cm ⁻¹	Aebi, H.E. (1974)
NAD-abhängige Glutamat-Dehydrogenase (EC 1.4.1.2)	100 mM TRIS/HCl, pH 8,3	NADH [0,25 mM] CaCl ₂ [1,0 mM] NH ₄ Cl [150 mM]	2-Oxoglutarat [20 mM]	340 nm 30 °C 6,3 mM ⁻¹ cm ⁻¹	Robinson et al. (1991)

Tab. 1. Kontinuierliche photometrische Enzymassays. Die jeweiligen Endkonzentrationen im Testansatz sind angegeben.
(Forts.)

Die Bestimmung der HBS-Aktivität bei *A. gossypii* Kulturen erfolgte direkt in den Sephacryl S-200-Gelchromatographie-Fractionen durch Zugabe des Substrats Ribose-5-phosphat und der Phosphoriboisomerase (PRI). Der Test bestand aus folgenden Komponenten, für die jeweils die Endkonzentrationen angegeben sind:

TRIS/HCl, pH 7,5	50 mM	} Sephacryl S-200-Fraktion mit HBS (200 µl Aliquot)
MgCl ₂	10 mM	
DTT	1 mM	
NaCl	150 mM	
NaN ₃	0,02 %	

dazu:

Ribose-5-P	10 mM
PRI	2 U

Gesamtvolumen: 240 µl

Inkubation: 4 h bei 37 °C

Anschließend erfolgte eine Dephosphorilierung des Substrates und der im Test entstandenen Produkte durch Zugabe von 5 U alkalischer Phosphatase (Boehringer Mannheim) bei 37 °C. Diese nach 2 h abgeschlossene Dephosphorilierung war erforderlich, da bei der nachfolgend angewendeten HPLC-Methode nur nicht phosphorilierte Substanzen aufgetrennt wurden. Für die HPLC-Analyse wurden die Testansätze mit Ultrafree-MC 10 kDa Ultrafiltrationseinheiten (Millipore, Eschborn) proteinfrei gemacht, und das Filtrat wurde mit einer HPLC-Anlage (Merck, Darmstadt) unter folgenden Bedingungen auf DHB hin analysiert:

Säule:	Polyspher OAKC-Säule (300×7,8 mm; Merck, Darmstadt)
Säulentemperatur:	45 °C
Laufmittel:	5 mM H ₂ SO ₄
Fluß:	0,4 ml min ⁻¹
Elution	isokratisch
Detektion:	RI-Detektor und UV-Detektor (λ=188 nm)

Zur HBS-Aktivitätsmessung aus Zellen des transformierten bzw. des nicht transformierten *E. coli* Stammes JM109 (DE3) wurden Aliquots (100 µl) von Zellextrakten in den wie folgt modifizierten Test gegeben:

TRIS/HCl, pH 7,5	100 mM
MgCl ₂	10 mM
Ribose-5-P	50 mM
PRI	2 U

Gesamtvolumen: 400 µl

Die Dephosphorilierung, Ultrafiltration und HPLC-Analyse der Ansätze wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt.

Zur Quantifizierung von DHB wurde eine Eichgerade mit der freundlicherweise von Dr. K. Kis (Institut für Organische Chemie und Biochemie der TU München) zur Verfügung gestellten Referenzsubstanz erstellt. Als spezifische HBS-Enzymaktivität wurde die pro Stunde und mg Protein im Enzymtest gebildete Menge DHB [$\text{nmol h}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$] angegeben.

Die Michaelis-Konstanten (K_m -Wert) der untersuchten Enzyme wurden mit dem ENZFITTER-Programm (Leatherbarrow, 1987) aus Michaelis-Menten-Kinetiken errechnet. Inhibitionskonstanten (K_i -Werte) und Inhibitionstypen wurden nach Segel (1975) bestimmt. Allen errechneten Daten lagen unabhängige Dreifachbestimmungen zugrunde.

10. Proteinreinigung

Zur Reinigung der ICL von *A. gossypii* wurde Myzel einer auf Sojaöl-Medium gewachsenen Kultur mit einem Blauband-Papierfilter (Schleicher & Schüll, Dassel) abfiltriert und in Aufschlußpuffer resuspendiert.

Aufschlußpuffer:

Imidazol	50 mM
EDTA	1 mM
MgSO ₄	5 mM
DTT	5 mM
PMSF	1 mM
Glycerin	30 % (v/v)
pH 7,5 (mit 3 N HCl eingestellt)	

Nach French Press-Aufschluß (Aminco, Silver Spring, USA) mit 19 000 psi wurde das Homogenat 30 min bei 40 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Abtrennung einer aufschwimmenden Schicht aus Fett durch eine Lage Verbandmull ZZ (8-fach gelegt; Wero-medical, Taunusstein) filtriert. Nach portionsweiser Zugabe von Ammoniumsulfat zum Zell-extrakt auf 35 % Sättigung beim ersten, bzw. auf 60 % Sättigung beim zweiten Fällungsschritt wurde die jeweils entstandene Fällung noch weitere 30 min vor dem darauf folgenden Zentrifugationsschritt gerührt. Das aus dem zweiten Fällungsschritt resultierende Pellet wurde in S300-Puffer resuspendiert, der wie folgt zusammengesetzt war:

S300-Puffer:

Imidazol	20 mM
EDTA	1 mM
MgSO ₄	5 mM
KCl	300 mM
NaN ₃	0,02 % (w/v)
pH 7,0 (mit 3 N HCl eingestellt)	

Nach Filtration (0,22 μm ; Filtron, Karlstein) wurde die Proteinlösung auf eine Sephacryl S-300-Gelchromatographie-Säule (90×2,5 cm; Pharmacia, Freiburg) aufgetragen. Die Elution erfolgte mit S300-Puffer bei einem Fluß von 20 ml h⁻¹. Fraktionen (5 ml) mit der höchsten ICL-Aktivität wurden vereinigt und mit einer 10 kD-Ultrafiltrationsmembran (Amicon, Witten) eingengt. Für die nachfolgende Kationenaustauscher-Chromatographie konnte die Proteinlösung durch wiederholtes Einengen (3×) über die 10 kD-Ultrafiltrationsmembran (Amicon, Witten) mit dem Mono S-Puffer auf einen pH-Wert von 5,8 eingestellt werden.

Mono S-Puffer:

Acetat/Essigsäure	25 mM, pH 5,8
EDTA	1 mM
MgSO ₄	5 mM

Für diesen Kationenaustauscher-Chromatographieschritt wurde eine Mono S HR 5/5 Säule (Pharmacia, Freiburg) in Verbindung mit einer FPLC Apparatur (Pharmacia, Freiburg) benutzt, wobei die Elution der Proteine durch Mischen eines bis auf 1 M NaCl ansteigenden, linearen Gradienten mit einem Fluß von 1 ml min⁻¹ erfolgte. Fraktionen (1 ml) mit ICL-Aktivität wurden vereinigt und nach Zugabe von Glycerin (50 %, v/v), DTT (5 mM) und NaN₃ (0,02 %, w/v) in Aliquots bei -20 °C gelagert. Alle Reinigungsschritte wurden auf Eis bzw. mit eiskühlten Geräten und Lösungen durchgeführt.

Die Schritte zur Aufreinigung der ICL sind in Abb. 4 schematisch wiedergegeben. Um die später zu erstellende Aufreinigungsbilanzierung besser darstellen zu können, erhielt jede im Verlaufe der Reinigung auftretende Fraktion eine im Schema fett gedruckte Codierung.

Um die relative molekulare Masse der nativen ICL bestimmen zu können, wurde ein Aliquot der gereinigten ICL mit den Markerproteinen Ferritin, Katalase, Albumin und Cytochrom c (Boehringer Mannheim) gemischt und auf die Sephacryl S-300-Gelchromatographie-Säule aufgetragen. Nach Elution der Proteine unter den oben angegebenen Bedingungen und Ermittlung der Fraktion mit maximaler ICL-Aktivität konnte durch Auftragung des log M_r gegen das Elutionsvolumen über eine lineare Regression das M_r für die native ICL berechnet werden.

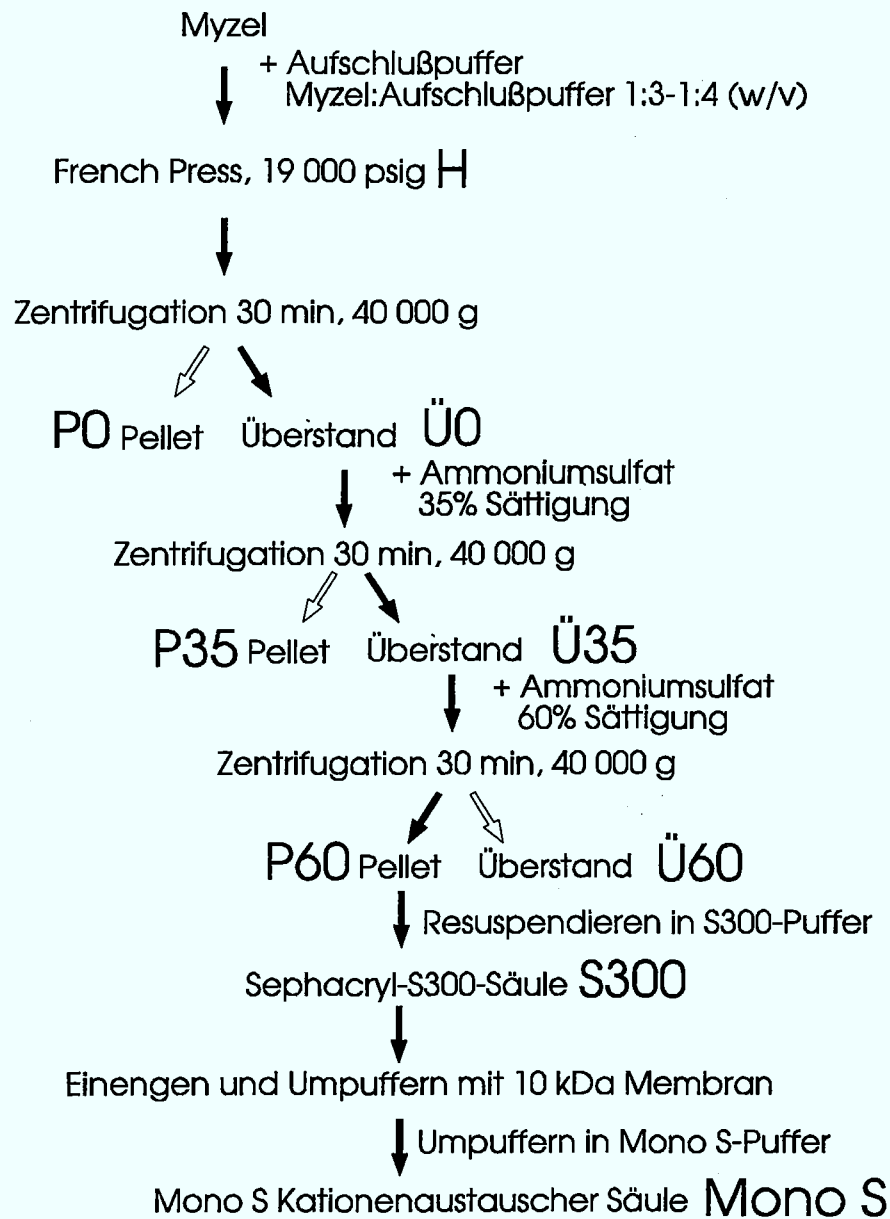


Abb. 4. Schema zur Aufreinigung der ICL aus *A. gossypii*. Zur besseren Darstellung in einer Aufreinigungsbilanz erhielt jede im Verlauf der Reinigung auftretende Fraktion eine Codierung (fett gedruckt).

11. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte nach der von Laemmli et al. (1970) beschriebenen Methode in 12,5 % SDS-Polyacrylamidgelen mittels einer Gelelektrophorese-Apparatur von Hoefer (Hoefer SE 400, Serva, Heidelberg). Aliquots von Zellextrakten wurden für die Elektrophorese mit dem nachfolgend beschriebenen Denaturierungspuffer (Volumenverhältnis Probe:Puffer 1:2-1:4) gemischt und 5 min bei 95 °C inkubiert.

Denaturierungspuffer:

TRIS/HCl, pH 6,8	0,25 M
Glycerin	40 % (v/v)
2-Mercaptoethanol	20 % (v/v)
SDS	8 % (w/v)
Bromphenolblau	0,01 % (w/v)

Trenngel, Sammelgel und Laufpuffer waren wie folgt zusammengesetzt:

<u>Komponente</u>	<u>Trenngel</u>	<u>Sammelgel</u>
1,5 M TRIS/HCl, pH 8,8	6,75 ml	-
0,5 M TRIS/HCl, pH 6,8	-	2,00 ml
Acrylamid: Bisacrylamid (30:0,8)	11,30 ml	1,04 ml
45 % Glycerin	5,40 ml	-
10 % SDS	270 µl	80 µl
TEMED	13 µl	8 µl
10 % APS	135 µl	40 µl
H ₂ O	ad 27 ml	ad 8,0 ml

Laufpuffer (5-fach konzentriert):

30 g l ⁻¹ TRIS
144 g l ⁻¹ Glycin
5 g l ⁻¹ SDS

Nach Beendigung des bei einem konstanten Strom von 8,0 mA durchgeführten Laufes, wurde das SDS-Gel mit Coomassie-Blue Färbelösung, die aus 0,5 g Serva Blau in 200 ml Methanol/H₂O (Volumenverhältnis 1:1) und 20 ml Essigsäure hergestellt wurde, gefärbt und anschließend mit Entfärber bestehend aus Essigsäure/Methanol/H₂O (Volumenverhältnis 1:3,5:6,5) bis zur Entfärbung des Gel-Hintergrundes behandelt.

Die Bestimmung der relativen molekularen Masse (M_r) der ICL-Untereinheiten erfolgte anhand von Molekulargewichtsmarkern (SDS 7 mit Phosphorylase b; Sigma), die zusätzlich auf das SDS-Gel aufgetragen wurden. Durch Darstellung des $\log M_r$ dieser Molekular-

II. MATERIAL UND METHODEN

gewichtsmarker gegen die jeweils im Gel zurückgelegte Strecke konnte über eine lineare Regression das M_r für die ICL-Untereinheit errechnet werden.

Zum Nachweis der Glykosilierung der ICL-Untereinheiten wurde ein mit gereinigter ICL beladenes SDS-Gel nach dem Lauf entsprechend der bei Zacharius et al. (1969) beschriebenen Methode mit Schiff's-Reagenz gefärbt.

Für Gele, die nachfolgend geblottet werden sollten, wurde eine Acrylamid-Konzentration von 8 % für das Trenngel und von 5 % für das Sammelgel gewählt.

Trenngel und Sammelgel waren wie folgt zusammengesetzt:

<u>Komponente</u>	<u>Trenngel</u>	<u>Sammelgel</u>
1,5 M TRIS/HCl, pH 8,8	5,6 ml	-
0,5 M TRIS/HCl, pH 6,8	-	2,00 ml
Acrylamid: Bisacrylamid (30:0,8)	7,5 ml	1,35 ml
10 % SDS	280 μ l	80 μ l
TEMED	14 μ l	8 μ l
10 % APS	140 μ l	40 μ l
H ₂ O	ad 28 ml	ad 8,0 ml

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei einem konstanten Strom von 8,0 mA. Das Laufverhalten der Proteine im Gel wurde durch vorgefärbte SDS-Molekulargewichtsmarker (SDS-7b; Sigma) kontrolliert.

12. Immuno-Blotting

Das Blotten der SDS-Gele erfolgte nach dem "Semi-Dry-Verfahren" (s. Users Manual, Multiphor II Electrophoresis System, Pharmacia LKB Biotechnology) mit einer Pharmacia Multiphor II NovaBlot Electrophoretic Transfer-Apparatur. ICL spezifische Antikörper wurden nach der bei Cooper (1981) beschriebenen Methode durch Immunisierung eines Kaninchens mit der gereinigten ICL gewonnen. Zudem wurden die nachfolgend aufgeführten Puffer und Lösungen benötigt:

Blot-Puffer:

CAPS/NaOH; pH 11 10 mM
MeOH 10 % (v/v)

Block-Puffer:

TRIS/HCl; pH 7,5 10 mM
BSA, Fraction V 3,0 % (w/v)
NaCl 0,9 % (w/v)

Wasch-Puffer:

TRIS/HCl; pH 7,5	10 mM
BSA, Fraction V	0,3 % (w/v)
NaCl	0,9 % (w/v)
TWEEN 20	0,1 % (w/v)

AP-Puffer:

TRIS/HCl; pH 9,5	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	5 mM

Nachweisreagentien (lichtgeschützt lagern):

0,50 g NBT in 10 ml 70 % (v/v) Dimethylformamid
0,25 g BCIP in 10 ml 50 % (v/v) Dimethylformamid

Zunächst wurden die SDS-Gele 30 min unter leichtem Schütteln mit Blot-Puffer äquilibriert. Anschließend erfolgte der Aufbau des Blot-Sandwiches, wobei das Filterpapier direkt mit Blot-Puffer benetzt wurde, während die hydrophobe Immobilon-P-Membran (Millipore, Eschborn) zuerst mit MeOH, dann mit H₂O, und schließlich mit Blot-Puffer benetzt werden mußte. Der Blot-Vorgang wurde bei einem konstanten Stromfluß von 0,8 mA (cm²)⁻¹ über 90 min durchgeführt. Die nachfolgend aufgelisteten Inkubations- und Waschschrte, sowie die Blot-Entwicklung erfolgten in Anlehnung an das bei Harlowe und Lane (1988) beschriebene Verfahren. Um die unspezifische Adsorption der Antikörper an die Membran zu verhindern, wurde sie zunächst 1 h mit Block-Puffer behandelt. Daran schloß sich die 1 h dauernde Inkubation mit ICL-Antiserum in Wasch-Puffer (Verdünnung 1:2000) an. Nachdem die Membran zum Entfernen nicht gebundener Antikörper mit Wasch-Puffer zweimal gespült und dann zweimal 15 min gewaschen worden war, wurde für die spätere Detektion des entstandenen Immunkomplexes ein Anti-Kaninchen-Antikörper-AP-Konjugat in Wasch-Puffer (Verdünnung 1:5000) zugegeben. Nach 1 h wurde die Membran erneut mit Wasch-Puffer zweimal gespült und zweimal 15 min gewaschen. Zur Blotentwicklung wurde sie anschließend 30 min in AP-Puffer äquilibriert, bevor die enzymkatalysierte Farbreaktion durch Zugabe von NBT-Lösung und BCIP-Lösung (Verdünnung 1:150) gestartet wurde. Durch Absaugen der Reagentien sowie durch mehrmaliges Spülen der Membran mit H₂O konnte die Reaktion bei genügender Farbintensität der Banden gestoppt werden. Bis auf die Blotentwicklung, die bei Raumtemperatur erfolgte, wurden alle Schritte unter leichtem Schütteln bei 37 °C durchgeführt.

13. Organellisolierung durch Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation

Zur Untersuchung der Fragestellung, ob die ICL kompartmentiert in Zellen von *A. gossypii* vorliegt, wurden Organellen, die mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert werden konnten, hinsichtlich ihrer Enzymausstattung charakterisiert. Dazu wurde das Myzel einer auf Sojaöl-Medium gewachsenen Kultur abfiltriert (0,8 µm; Millipore, Eschborn) und in Protoplastierungspuffer im Verhältnis 1:5 (w/v) resuspendiert.

Protoplastierungspuffer:

K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ , pH 7,2	50 mM
EDTA	0,5 mM
Sorbit	1,0 M

Der Protoplastierungsvorgang, der durch Zugabe von Novozym 234 (5 mg ml⁻¹) gestartet und bei 28 °C auf einem Schüttler mit 110 rpm durchgeführt wurde, war in der Regel nach 25-30 min abgeschlossen. Nach einmaligem Waschen der Protoplasten in Protoplastierungspuffer wurden diese anschließend in Aufschlußpuffer resuspendiert und zum schonenden Scheren der Cytoplasmamembran mit einem Potter-Elvehjem Homogenisator in ein Glasgefäß mit Teflon-Stab (B.Braun, Melsungen) überführt.

Aufschlußpuffer:

K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ , pH 7,2	50 mM
EDTA	0,5 mM
Sorbit	0,65 M

Das Homogenisieren erfolgte in 5 Intervallen zu je 1 min. Zum Abführen der dabei entstehenden Wärme wurde das Homogenat zwischen den Intervallen jeweils für 1 min auf Eis gestellt. Die im Homogenat enthaltenen Organellen konnten durch zwei aufeinanderfolgende Zentrifugationsschritte angereichert werden. Dazu wurden in einem ersten Schritt (10 min, 3000 g) zunächst nicht aufgeschlossene Protoplasten abgetrennt, während in einem zweiten Schritt (15 min, 27 000 g) die im Überstand enthaltenen Organellen sedimentiert werden konnten. Das folgende Schema (Abb. 5) faßt die Schritte nochmals zusammen, die zum Erhalt einer mit Organellen angereicherten Fraktion führten.

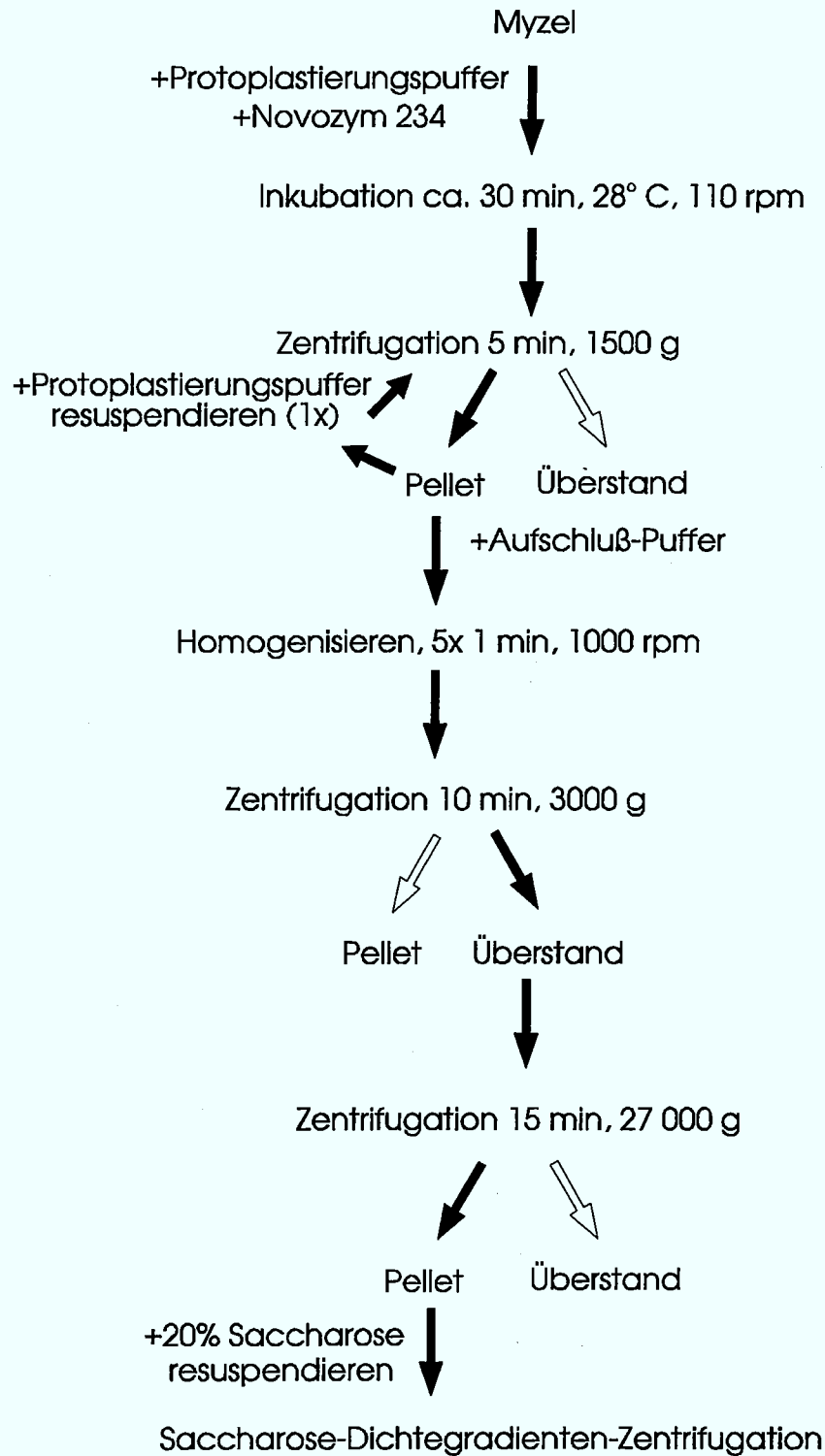


Abb. 5. Schema zur Anreicherung von Organellen aus *A. gossypii* Myzel.

II. MATERIAL UND METHODEN

Durch vorsichtiges Übereinanderschichten von Saccharose-Lösungen, die in 50 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 -Puffer (pH 7,2) mit 0,5 mM EDTA hergestellt worden waren, wurde in Zentrifugationsröhrchen (Beckman, München) ein Saccharose-Dichtegradient aufgebaut:

30 % (w/w)	2,0 ml
35 %	2,5 ml
40 %	2,5 ml
45 %	2,5 ml
50 %	2,5 ml (Becherboden)

Die Organellen enthaltende Fraktion wurde in 20 % Saccharose-Lösung resuspendiert und auf den Gradienten aufgetragen. Dieser wurde anschließend 4 h bei 70 000 g in einer Ultrazentrifuge mit Ti 50 Rotor (Beckman, München) zentrifugiert. Nach Beendigung der Zentrifugation wurde von oben eine Kanüle bis zum Boden des Zentrifugationsröhrchens geführt, so daß der Gradient anschließend mit einer Peristaltikpumpe (LKB Pharmacia, Freiburg) in Fraktionen zu je 30 Tropfen aufgeteilt werden konnte. In den so erhaltenen Fraktionen wurden die Aktivitäten der in Tab. 1 aufgeführten Enzyme sowie der Proteingehalt bestimmt. Außerdem konnte über die Messung des Brechungsindex mit einem Refraktometer (Krüss Optronic) die Saccharose-Konzentration in jeder Fraktion, und damit die spezifische Dichte ermittelt werden, die ein Kriterium für die Beschreibung von Organellen darstellt.

14. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die aus der Organellisolierung durch Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation erhaltenen Daten zur intrazellulären Lokalisation der ICL sollten durch elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigt werden. Dazu wurden zunächst eine 15 h alte Sojaöl-Kultur bzw. eine 10 h alte Glucose-Kultur wie unter 3.3. a) beschrieben hergestellt, abfiltriert (0,8 μ m; Millipore, Eschborn) und in steriler PBS (1/10 des abfiltrierten Kulturvolumens) resuspendiert.

PBS:

8,0 g l⁻¹ NaCl
0,2 g l⁻¹ KCl
1,44 g l⁻¹ Na₂HPO₄
0,24 g l⁻¹ KH₂PO₄
pH 7,4 mit HCl eingestellt

Zur Fixierung wurde diese Zellsuspension mit Formaldehyd (Endkonzentration: 2 %) und Glutaraldehyd (Endkonzentration: 0,05 %) versetzt und anschließend für 2 h auf Eis gestellt. Alle weiteren Schritte wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Y.-D. Stierhof (Max-Planck-Institut für Biologie, Tübingen) durchgeführt und werden im folgenden nur kurz dargestellt. Zur Entwässerung wurden die fixierten Zellen nach Einbettung in Agarose zunächst mit

Ethanol in zunehmender Konzentration bei stetiger Absenkung der Temperatur behandelt, so daß anschließend eine Einbettung in Lowicryl HM20 erfolgen konnte (Carlemalm et al., 1982). Die Herstellung von Ultradünnschnitten, die Markierung mit ICL-spezifischen Antikörpern, die aus Kaninchen durch Immunisierung mit gereinigter ICL nach der bei Cooper (1981) beschriebenen Methode gewonnen worden waren, sowie die Markierung mit Protein A-13 nm Goldpartikeln und die anschließende Schwermetallkontrastierung wurden wie bei Steverding et al. (1994) beschrieben durchgeführt.

III. ERGEBNISSE

1. Untersuchungen zur Isocitrat-Lyase aus *A. gossypii* im Hinblick auf die Riboflavinbiosynthese

1.1. Riboflavinbildung und spezifische Isocitrat-Lyase-Aktivität während des Wachstums auf Glucose- oder Sojaöl-Medium

Auf eine Beziehung zwischen der Riboflavinbiosynthese und dem Fettstoffwechsel deuten der bei *A. gossypii* nach Glucoseverbrauch einsetzende Abbau intrazellulär akkumulierter Triglyceride (Stahmann et al., 1994) und die ab diesem Zeitpunkt einsetzende Riboflavinproduktion hin (Pfeifer et al., 1950). Um zu überprüfen, ob die Riboflavinbildung entsprechend mit der ICL-Aktivität korreliert, die für die Verwertung der Triglyceride im Anabolismus sorgt, wurde *A. gossypii* WT zunächst in Schüttelkolben auf Sojaöl kultiviert (Abb. 6a). Bei Verwendung dieser Kohlenstoffquelle stieg die spezifische ICL-Aktivität während des Wachstums von $0,11 \text{ U (mg Protein)}^{-1}$ auf einen Maximalwert von $0,36 \text{ U (mg Protein)}^{-1}$. Parallel dazu setzte die Riboflavinbildung ein. Nach 36 h Kulturdauer kam es beim Übergang in die stationäre Phase zu einer Abnahme der spezifischen Enzymaktivität begleitet von einer abnehmenden Riboflavinsynthese. Bei den parallel mit Glucose als Kohlenstoffquelle angezogenen Kulturen konnte keine ICL-Aktivität gemessen werden, solange Glucose im Medium vorhanden war (Abb. 6b). Erst nach Verbrauch der Glucose war die ICL meßbar. Die in dieser Phase zu beobachtende Zunahme der Biotrockenmasse von $2,5 \text{ g l}^{-1}$ auf $3,4 \text{ g l}^{-1}$ deutete auf ein zweiphasiges Wachstum des Pilzes auf Glucose hin. Interessanterweise konnte mit dem Anstieg der spezifischen ICL-Aktivität auf einen Maximalwert von $0,41 \text{ U (mg Protein)}^{-1}$ auch ein Einsetzen der Riboflavinbildung bzw. -akkumulation festgestellt werden.

Diese Daten konnten in jeweils drei Ansätzen unabhängig voneinander reproduziert werden. Sie wiesen auf eine Riboflavinsynthese aus dem Abbau intrazellulär vorliegender Triglyceride hin, da kürzlich für *A. gossypii* bei Wachstum auf Glucose die Speicherung von Neutralfettmolekülen sowie anhand eines entsprechend niedrigen Respirationsquotienten von 0,6-0,7 nach Glucoseverbrauch deren Abbau nachgewiesen werden konnte (Stahmann et al., 1994). Sowohl auf Glucose-Medium als auch auf Sojaöl-Medium war die spezifische ICL-Aktivität nicht konstant, sondern zeigte eine Optimumkurve. Die Riboflavinbildung korrelierte mit dieser Optimumkurve. Die ICL kam damit als limitierendes Enzym im Bezug auf die Bereitstellung von Ausgangsmetaboliten für die Riboflavinbiosynthese, wie z.B. GTP, in Betracht, so daß die Untersuchung der Enzymregulation sowohl auf enzymatischer Ebene als auch auf Proteinbildungsebene sinnvoll erschien.

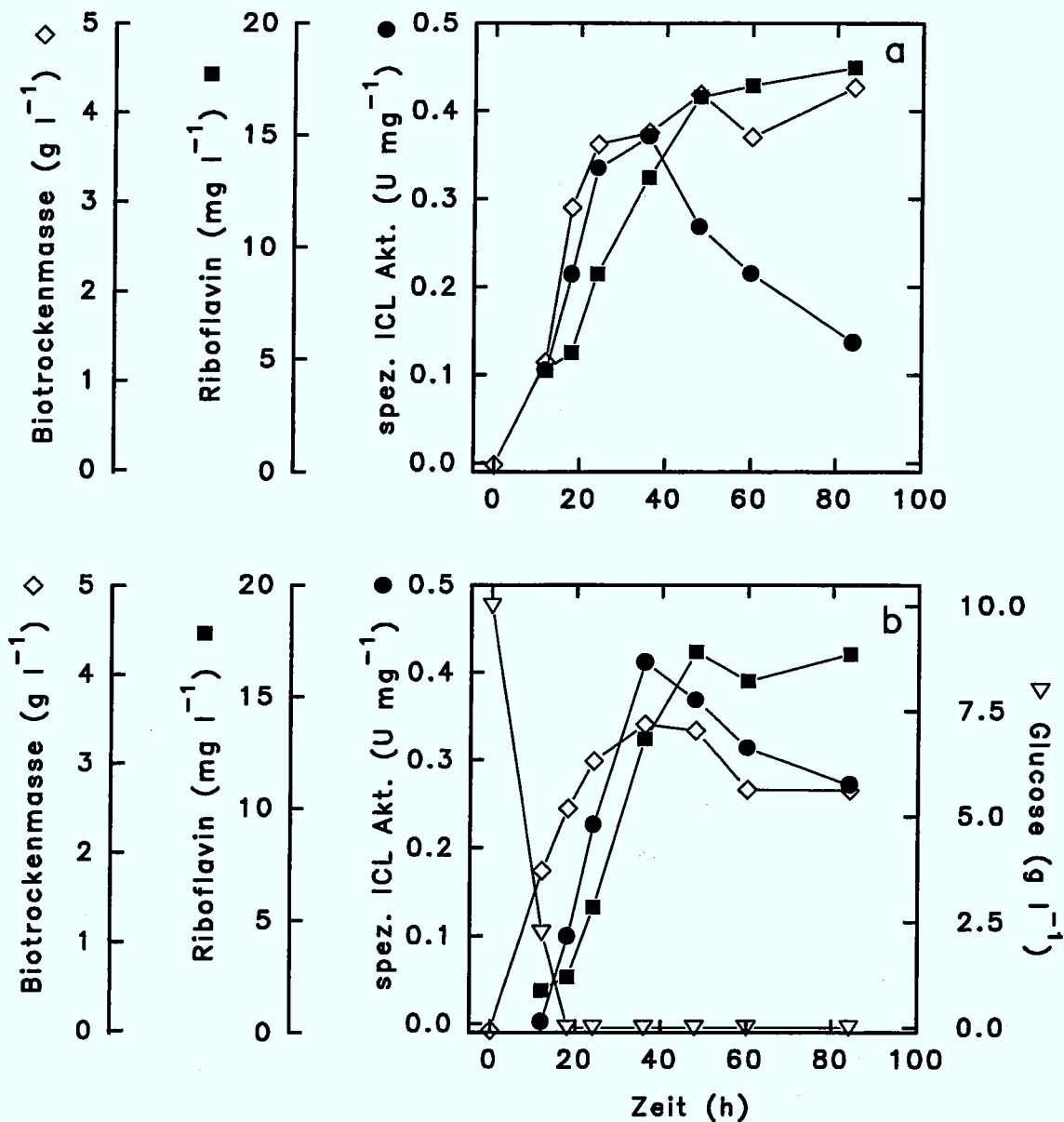


Abb. 6. Wachstum von *A. gossypii* WT auf Sojaöl- (a) oder Glucose-Medium (b). Dargestellt sind die Änderungen von Biotrockenmasse, Riboflavingehalt, spezifischer ICL-Aktivität und Glucose im Medium während der Kulturdauer.

1.2. Isolierung der Isocitrat-Lyase

Um Effektorwirkungen, d.h. eine mögliche Regulation der Enzymaktivität durch Stoffwechselmetabolite, bestimmen zu können, war eine Aufreinigung der ICL erforderlich. Außerdem sollten mit dem aufgereinigten Enzym Antikörper hergestellt werden, um Enzymbildungskinetiken mittels der Immuno-Blot-Technik erstellen zu können.

Das Enzym wurde in sechs Schritten gereinigt (Tab. 2). Das Zellhomogenat aus 25 g Myzel Feuchtgewicht enthielt 220 U ICL-Aktivität. Nach einem Zentrifugationsschritt konnten noch

III. ERGEBNISSE

78 % der Ausgangsaktivität im Überstand nachgewiesen werden. Die folgenden Ammoniumsulfat-Fällungsschritte bis auf 60 % Sättigung (Rua et al., 1990) erlaubten eine dreifache Anreicherung des Enzyms. Bei der weiteren Aufreinigung stellte die Katalase-Aktivität, die auch mit der abschließend eingesetzten Kationenaustauscher-Chromatographie nicht von der ICL abgetrennt werden konnte, ein großes Problem dar. Die für *Pinus pinea* Samen beschriebene Chromatographie über Octyl-Sepharose (Pinzauti et al., 1986) sowie der Einsatz der weniger hydrophoben Phenyl-Sepharose als Reinigungsschritt führten zu einer Inaktivierung der ICL. Auch der Versuch einer Reinigung mit Blue-Sepharose, wie sie für die ICL von *Zea mays* durchgeführt worden war (Khan et al., 1992), führte nicht zum Erfolg. Eine deutliche Abreicherung der Katalase gelang durch Gelfiltration mit einer Sephacryl S-300-Säule (Abb. 7). Um eine im SDS-Gel homogene ICL zu erhalten, mußten allerdings Fraktionen mit Katalase-Aktivität verworfen werden. Dieses Vorgehen reduzierte die Ausbeute auf 23 %. Mit der abschließenden Mono S Kationenaustauscher-Chromatographie konnte die ICL letztlich 108-fach mit einer Ausbeute von 16 % aufgereinigt werden. Die Übereinstimmung von Protein- und Aktivitätsprofil (Abb. 8) und die Homogenität im SDS-Gel (Abb. 9) zeigen die Qualität der Reinigung auf.

Fraktion	Gesamtaktivität (Units)	Protein (mg)	Spezifische Enzymaktivität [U (mg protein) ⁻¹]	Reinigungs-faktor (-fach)	Ausbeute (%)
Zellhomogenat (H)	220	1310	0,17	1,0	100
40 000 g Überstand (Ü0)	170	730	0,23	1,3	78
35% (NH ₄) ₂ SO ₄ Überstand (Ü35)	160	630	0,25	1,5	72
60% (NH ₄) ₂ SO ₄ Pellet (P60)	160	300	0,53	3,1	72
Sephacryl S-300 (S300)	52	5	10,8	63	23
Mono S (Mono S)	35	0,5	18,4	108	16

Tab. 2. Aufreinigungsbilanzierung für die ICL aus Myzel von *A. gossypii*.

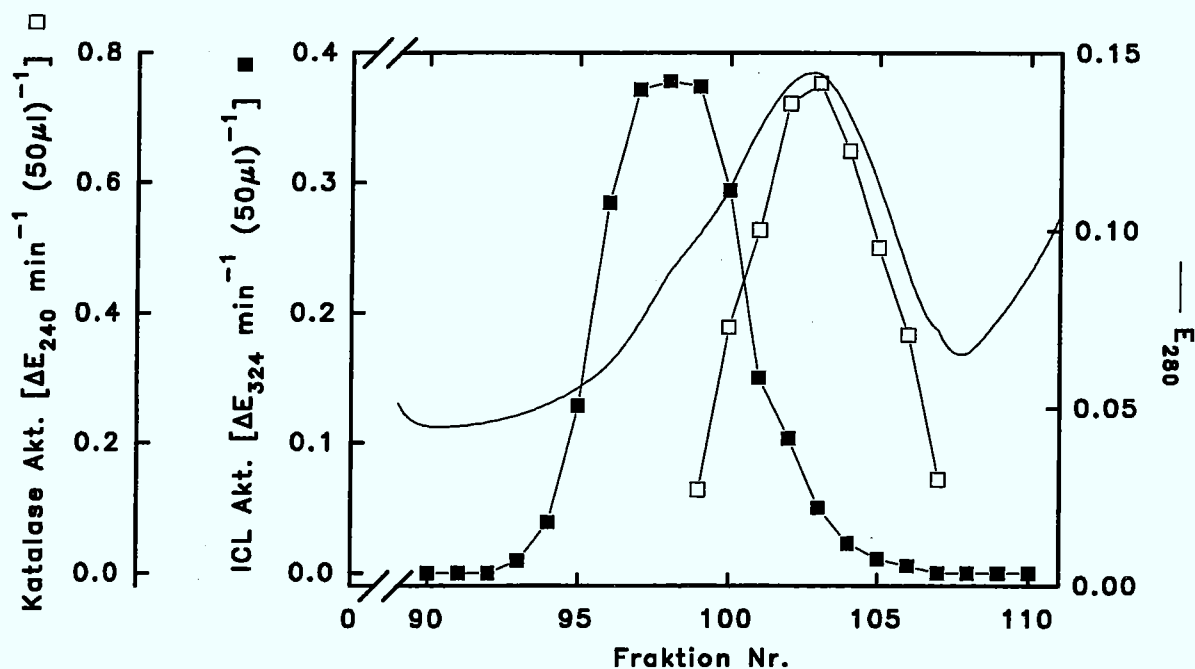


Abb. 7. Elutionsprofil einer Sephacryl S-300-Chromatographie mit einem Zellextrakt aus *A. gossypii* nach Ammoniumsulfat-Fällung. Die ICL wurde durch diesen Chromatographie-Schritt von der Katalase abgetrennt.

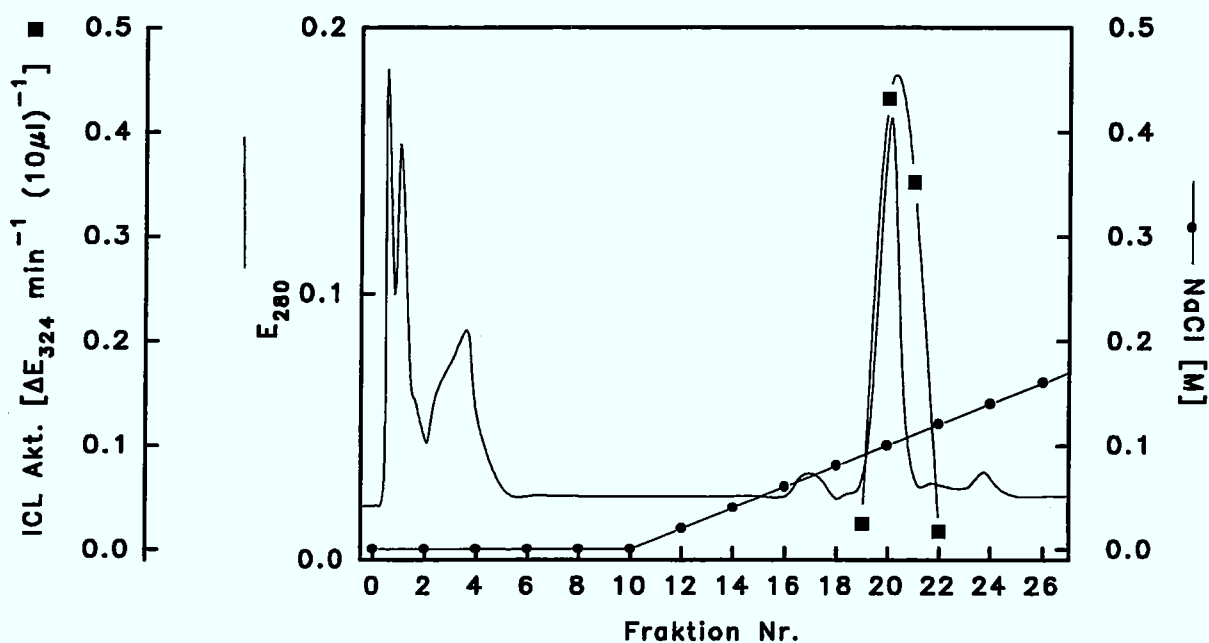


Abb. 8. Chromatogramm der Mono S Kationenaustauscher-Chromatographie. Die aus der Sephacryl S-300-Gelfiltration erhaltene ICL wurde auf die Mono S Kationenaustauscher-Säule aufgetragen und mit einem NaCl-Gradient eluiert.

1.3. Eigenschaften der gereinigten Isocitrat-Lyase

Durch SDS-PAGE läßt sich für Proteinen, die vorher denaturiert wurden, das M_r von Enzym-untereinheiten bestimmen. Für die bis zur Homogenität gereinigte ICL konnte dadurch ein M_r von 66 000 ermittelt werden (Abb. 9). Eine Glykosilierung der ICL-Untereinheit war mit der Glykoprotein-Färbung nach Zacharius et al. (1969) nicht nachweisbar.

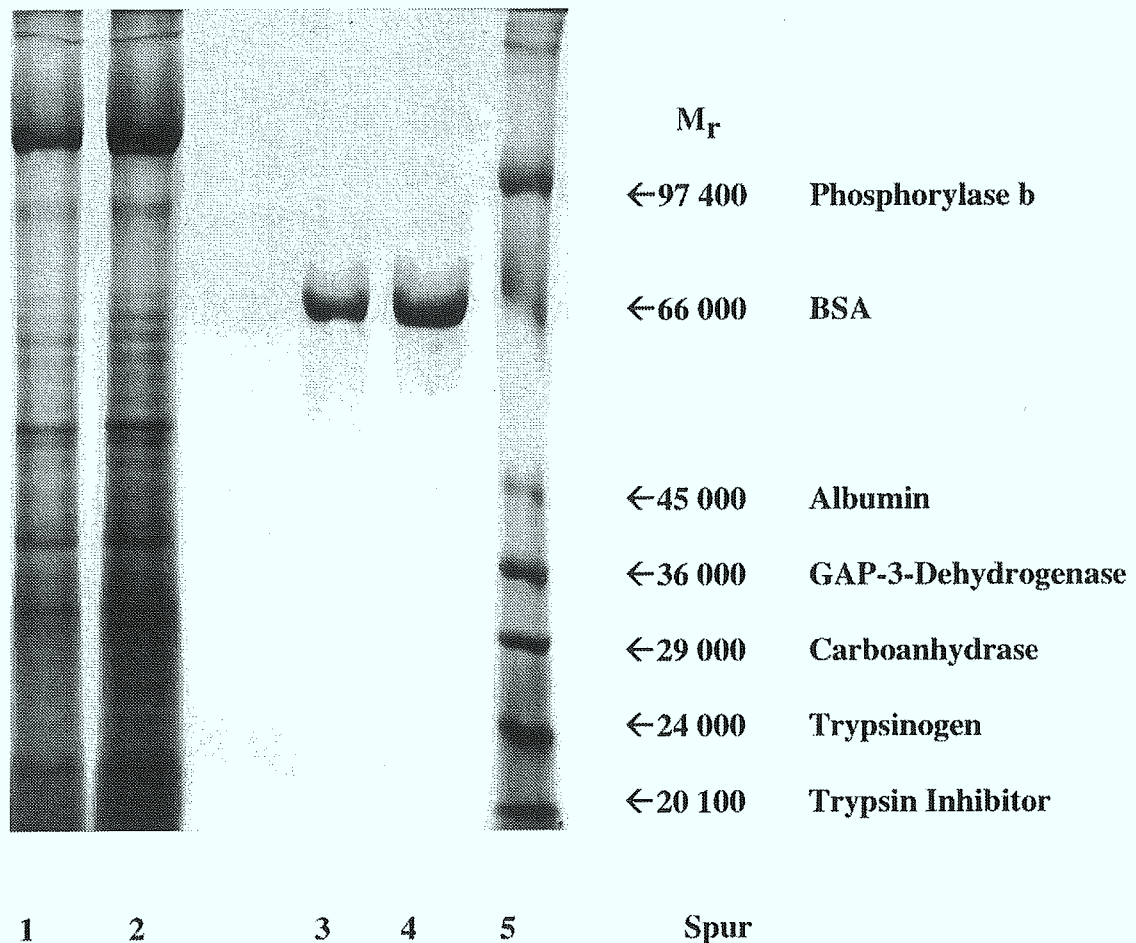


Abb. 9. SDS-PAGE der gereinigten ICL (**Mono S-Fraktion**).
 Spur 1: $\ddot{U}0$, 100 μ g Protein; Spur 2: $\ddot{U}0$, 200 μ g Protein
 Spur 3: gereinigte ICL, 5 μ g;
 Spur 4: gereinigte ICL, 10 μ g
 Spur 5: Molekulargewichtsmarker (Phosphorylase b, 97 400; BSA, 66 000;
 Albumin, 45 000; GAP-3-Dehydrogenase, 36 000; Carboanhydrase,
 29 000; Trypsinogen, 24 000; Trypsin Inhibitor, 20 100).
 Die ICL-Untereinheit weist ein M_r von 66 000 auf.

Durch Gelfiltration ließ sich für das native Enzym ein M_r von 254 000 ermitteln (Abb. 10). Diese Daten legten für die ICL aus *A. gossypii* eine tetramere Struktur aus vier identischen Untereinheiten nahe.

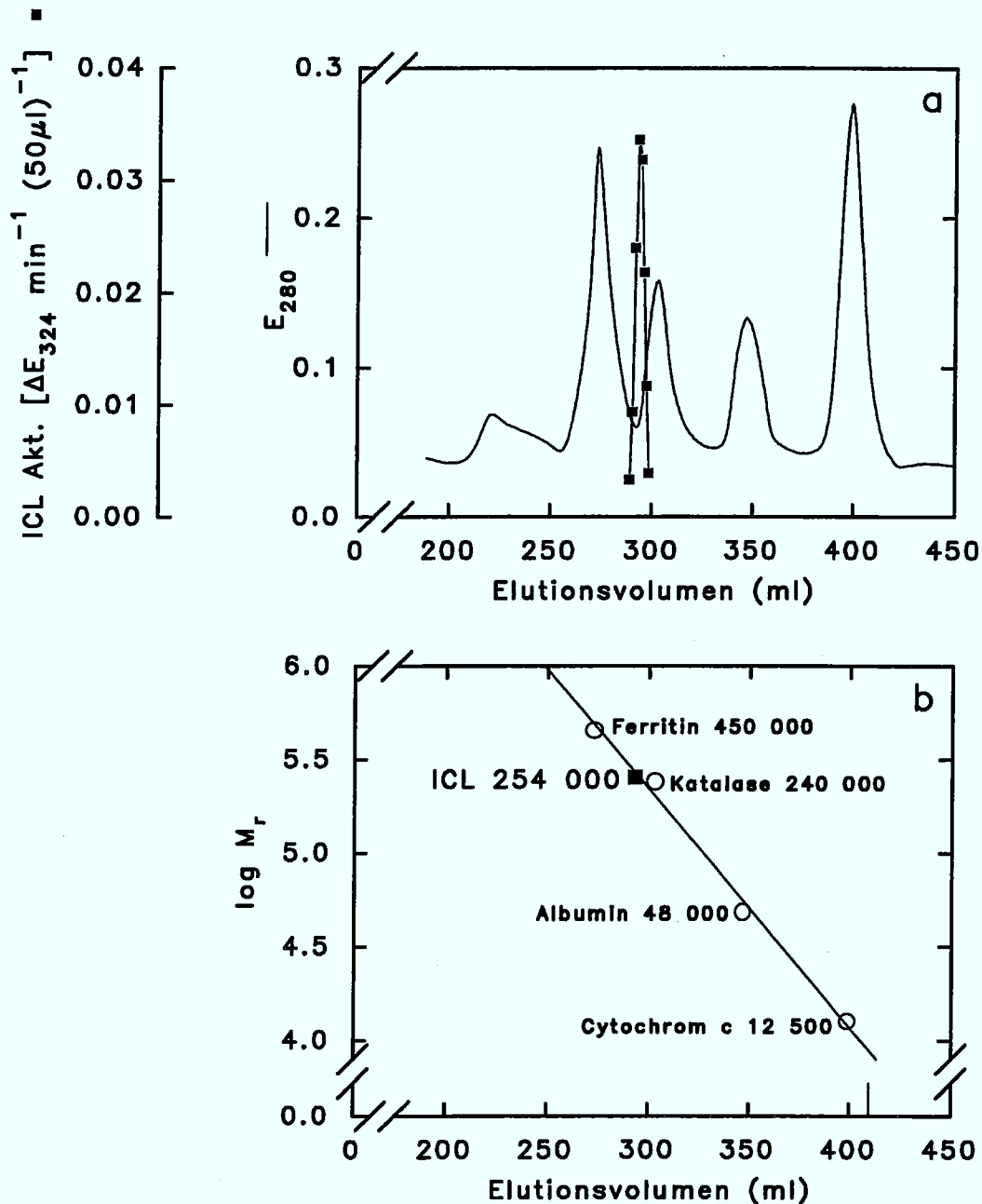


Abb. 10. Elutionsprofil einer Sephacryl S-300-Chromatographie von Markerproteinen und der gereinigten ICL (a). Markerproteine (Ferritin, 450 000; Katalase, 240 000; Albumin, 45 000, Cytochrom c, 12 500) und gereinigte ICL wurden gemischt und auf die Sephacryl S-300-Säule aufgetragen. Durch lineare Regression von $\log M_r$ der Markerproteine gegen die jeweiligen Elutionsvolumina wurde für die native ICL ein M_r von 254 000 errechnet (b).

Das gereinigte Enzym konnte nach Zugabe von Glycerin (50 %, v/v) bei -20°C zwei Wochen ohne signifikanten Aktivitätsverlust gelagert werden. Einfrieren ohne Glycerinzugabe führte dagegen zum kompletten Aktivitätsverlust. Der Einsatz von PMSF verhinderte sehr effektiv den bei Lagerung auf Eis bzw. 4 °C auftretenden proteolytischen Abbau der ICL. Das pH-Optimum der ICL-Aktivität wurde in einem pH-Bereich von 5,0-8,0 sowohl mit einem 25 mM Imidazol/HCl-, als auch mit einem 25 mM MES/NaOH-Puffersystem bestimmt. Mit beiden Puffersystemen konnte für die Enzymaktivität ein pH-Optimum von $7,0 \pm 0,25$ ermittelt werden.

In einem Bereich von 20-60 °C wurde die Temperaturstabilität der ICL in 5 °C Intervallen untersucht. Nach 3 min Vorinkubation der ICL ohne Substrat bei der jeweiligen Temperatur wurde die Enzymaktivität nach Substratzugabe über einen Zeitraum von 4 min verfolgt. Das Enzym zeigte die höchste Aktivität bei 50 °C. Bei Temperaturen über 50 °C kam es zur Hitzeinaktivierung des Enzyms, was im kontinuierlichen Assay zu nicht-linearen Aktivitätsmessungen führte.

Wegen der Interaktion des Mg^{2+} -Kations mit dem Substrat Isocitrat und mit der ICL selbst (Rua et al., 1989; Vanni et al., 1990) wurde der Effekt verschiedener Mg^{2+} -Konzentrationen auf die Enzymaktivität bestimmt. Dazu wurde die gereinigte ICL durch dreimalige Ultrafiltration mit einer Centricon-10 Ultrafiltrationsmembran (Amicon, Witten) in einen $MgSO_4$ - und EDTA-freien Imidazol/HCl-Puffer (25 mM, pH 7,0; 5 mM DTT enthaltend) umgepuffert. Bei einer jeweils konstant im Enzymtest vorgegebenen Isocitrat-Konzentration von 4 mM konnte bis zu einer Zugabe von 2,5 mM Mg^{2+} ein starker Anstieg der ICL-Aktivität gemessen werden (Abb. 11), während eine weitere Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration zu verringerten Umsatzraten führte. Ohne Zusatz von Mg^{2+} -Kationen war keine Enzymaktivität meßbar.

Um eine den Kohlenstofffluß zwischen Tricarbonsäurezyklus und Glyoxylatzyklus kontrollierende Regulation der ICL auf Aktivitätsebene nachweisen zu können, wurde die Affinität des gereinigten Enzyms zum Substrat Isocitrat und die Hemmung der Reaktion durch Effektoren bestimmt. Die Darstellung der Umsatzraten als Funktion der Isocitrat-Konzentrationen ergab eine charakteristische Michaelis-Menten-Kinetik, aus der sich ein K_m -Wert von 0,55 mM für Isocitrat errechnen ließ (Abb. 12).

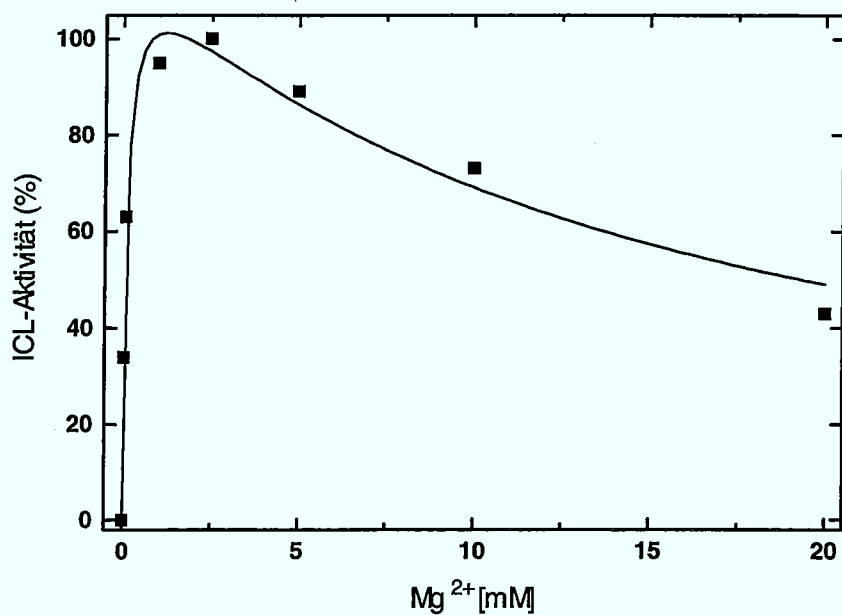


Abb. 11. Abhängigkeit der ICL-Aktivität von der Mg^{2+} -Konzentration. Der Enzymtest mit maximaler Aktivität wurde als 100 %-Wert definiert.

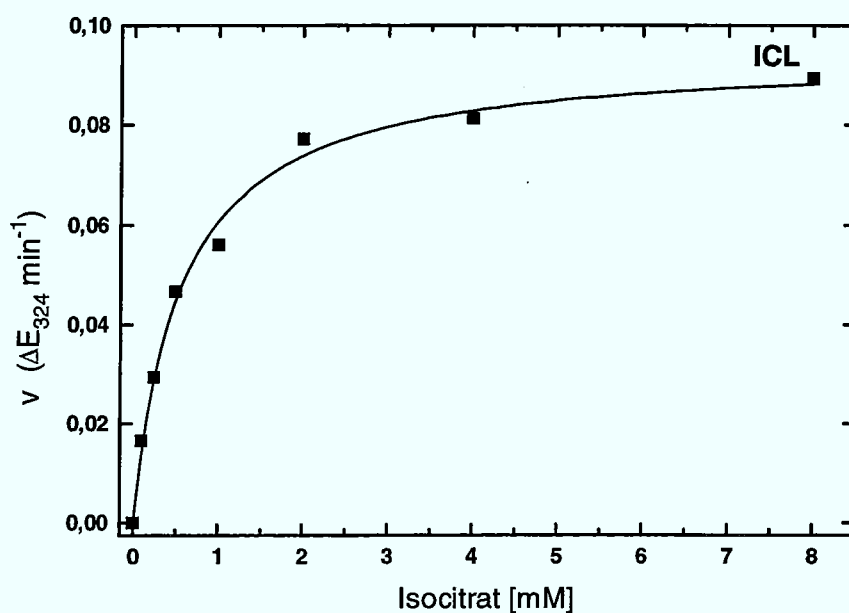


Abb. 12. Umsatzraten der gereinigten ICL als Funktion der Isocitrat-Konzentrationen im Enzymtest. Aus der Michaelis-Menten-Kinetik wurde ein K_m von 0,55 mM für Isocitrat ermittelt.

Als physiologisch relevante Inhibitoren kamen im Glyoxylatzyklus auftretenden Metabolite, wie z.B. Succinat, Glyoxylat, Malat und Citrat in Betracht. Succinat konnte für *Phycomyces blakesleeenanus* (Rua et al., 1989) und *Neurospora crassa* (Johanson et al., 1974) als ICL-Inhibitor nachgewiesen werden. Auch phosphorylierte Verbindungen, wie z.B. PEP und 6-P-Gluconat, sind als wirksame Inhibitoren für die ICL beschrieben worden. So hat PEP einen hemmenden Einfluß auf die ICL-Aktivität von *P. blakesleeenanus* (Rua et al., 1989), *N. crassa* (Johanson et al., 1974), *Candida tropicalis* (Tanaka et al., 1977), *Yarrowia lipolytica* (Hönes et al., 1991) und *S. cerevisiae* (Hanozet & Gueritore, 1972).

Von den für die ICL aus *A. gossypii* untersuchten Metaboliten zeigten die phosphorylierten Verbindungen PEP bzw. 6-P-Gluconat den deutlichsten Effekt, indem sie jeweils in einer Konzentration von 10 mM zu einer 55 %igen bzw. 60 %igen Hemmung der Enzymaktivität führten (Tab. 3).

Inhibitor	Konzentration [mM]	Inhibition (%)	Inhibitionstyp; Inhibitionskonstante (K_i)
6-P-Gluconat	10	60	n.d.*
PEP	10	55	hyperbolisch-unkompetitiv
Glucose-6-P	10	<5	n.d.*
Malat	10	36	n.d.*
Succinat	10	34	nicht-kompetitiv; $K_i = 15,8$ mM
Fumarat	10	25	n.d.*
Citrat	10	22	n.d.*
Glutamat	10	15	n.d.*
Aspartat	10	13	n.d.*
Glycin	10	<5	n.d.*
Oxalat	1	95	nicht-kompetitiv; $K_i = 0,004$ mM
Itaconat	1	78	linear gemischt; $K_i = 0,17$ mM
Maleat	10	68	n.d.*
Phenylphosphat	10	7	n.d.*

*n.d.: nicht bestimmt

Tab. 3. Hemmung der ICL-Aktivität im Enzymtest durch physiologische oder unphysiologische Inhibitoren.

Nach der Analyse der kinetischen Daten konnte PEP, unter Bezug auf die Nomenklatur nach Segel (1975), als hyperbolisch-unkompetitiver Inhibitor (Abb. 13) in die Klasse der unter dem Begriff "gemischte Hemmungen" zusammengefaßten Hemmtypen eingeordnet werden. Im Unterschied zum klassischen unkompetitiven Inhibitor, der ausschließlich an den Enzym-Substrat-Komplex (E-S-Komplex) bindet und damit zur Bildung eines katalytisch inaktiven Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplexes (E-S-I-Komplex) führt, kann ein hyperbolisch-unkompetitiver Inhibitor zusätzlich auch an das freie Enzym binden, und der E-S-I-Komplex ist katalytisch aktiv. Durch den Inhibitor werden sowohl $v_{\max}$ als auch der K_m -Wert des Enzyms beeinflußt.

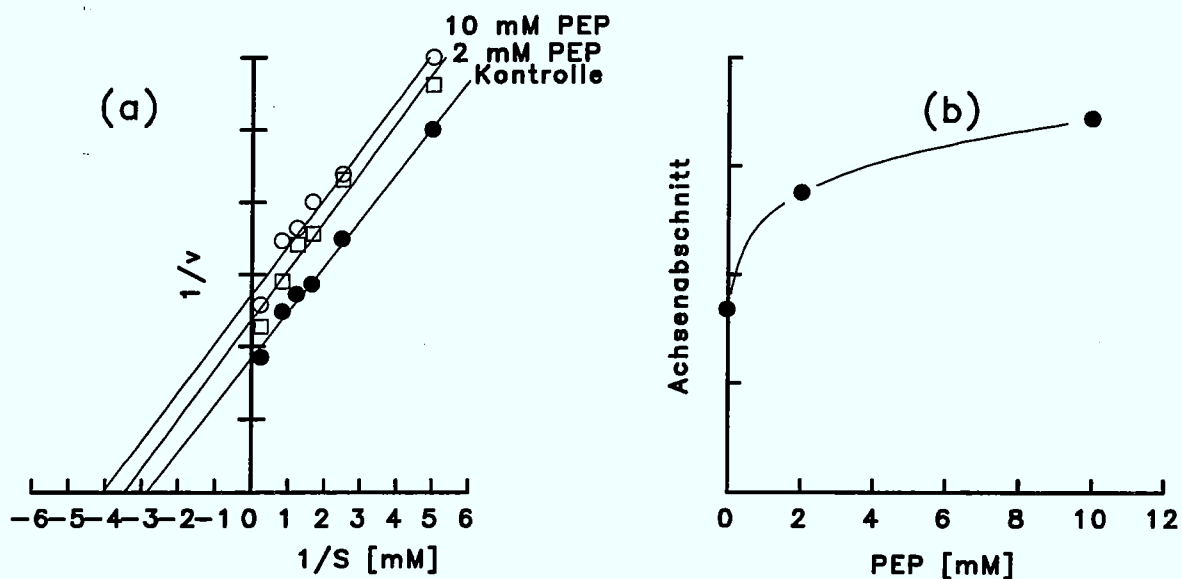


Abb. 13. Einfluß des ICL-Inhibitors PEP auf die Isocitrat-Umsatzraten im Enzymtest. PEP wurde als hyperbolisch-gemischter Inhibitor klassifiziert. Dieser Hemmtyp ist durch eine Parallelverschiebung der Geraden im Lineweaver-Burk-Plot (a) und durch eine hyperbolische Kurve bei Auftragung der $1/v$ -Achsenabschnitte aus der Lineweaver-Burk-Darstellung gegen die Inhibitorkonzentration gekennzeichnet (b).

Succinat und Malat führten in einer Konzentration von je 10 mM zu 34 % bzw. 36 % Hemmung der ICL-Aktivität (Tab. 3). Die weiteren getesteten Metabolite zeigten schwächere oder gar keine Hemmwirkung. Für Succinat ergab die Auswertung der kinetischen Daten eine Klassifizierung als nicht-kompetitiver Inhibitor mit einem K_i -Wert von 15,8 mM (Abb. 14). Die in dieser Klasse zusammengefaßten Inhibitoren binden reversibel und unabhängig vom Substrat an das freie Enzym und an den E-S-Komplex. Der entstehende E-S-I-Komplex ist katalytisch nicht aktiv. In Gegenwart des Inhibitors verringert sich $v_{\max}$, während der K_m -Wert des Enzyms unverändert bleibt.

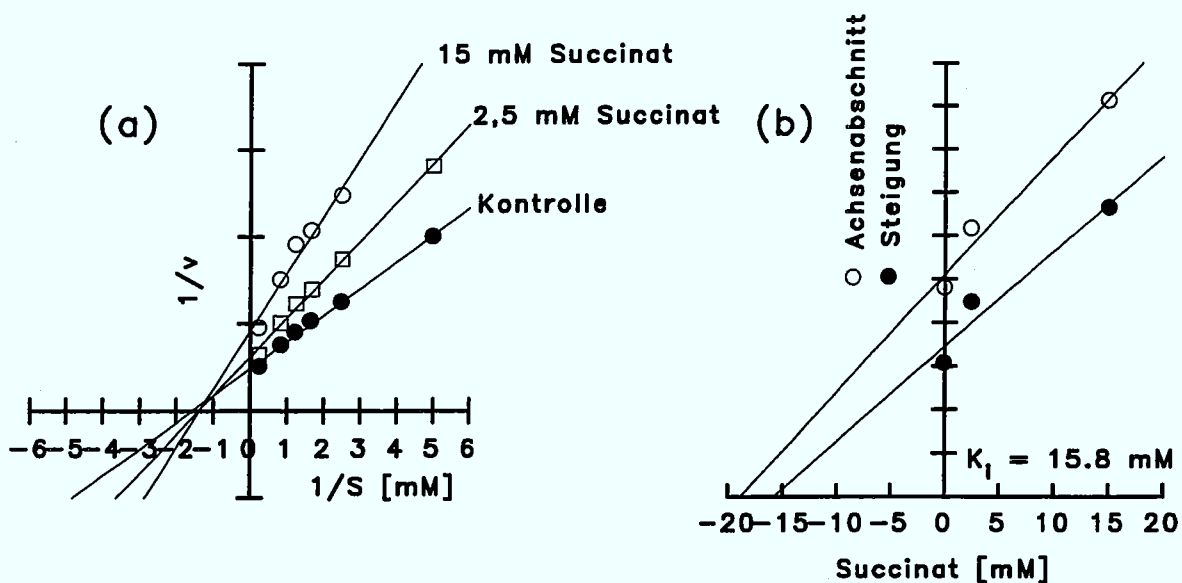


Abb. 14. Einfluß des ICL-Inhibitors Succinat auf die Isocitrat-Umsatzraten im Enzymtest. Succinat konnte als nicht-kompetitiver Inhibitor klassifiziert werden. Dieser Hemmtyp ist dadurch charakterisiert, daß sich die Geraden in der Lineweaver-Burk-Auftragung (a) auf der $1/S$ -Achse schneiden, und daß die Auftragung der Steigungsfaktoren und der $1/v$ -Achsenabschnitte aus der Lineweaver-Burk-Darstellung gegen die Inhibitorkonzentration jeweils eine Gerade ergibt (b).

Die Effektoruntersuchungen mit unphysiologischen Verbindungen dienten dazu, einen möglichst spezifischen und hoch wirksamen Antimetabolit für die ICL zu finden, der zur Selektion von Mutanten mit gesteigerter ICL-Aktivität eingesetzt werden sollte. Für *N. crassa* sind mit Oxalat, Maleat und Itaconat einige unphysiologische Inhibitoren beschrieben worden (Rua et al., 1990). Von diesen drei Hemmstoffen zeigten Itaconat und Oxalat die stärksten Hemmwirkungen auf die ICL-Aktivität von *A. gossypii* (Tab. 3). Mit jeweils 1 mM dieser Substanzen konnten 78% bzw. 95 % Hemmung erreicht werden. Oxalat konnte, wie Succinat, als nicht-kompetitiver Inhibitor mit einem K_i -Wert von $4,1 \mu\text{M}$ klassifiziert werden (Abb. 15).

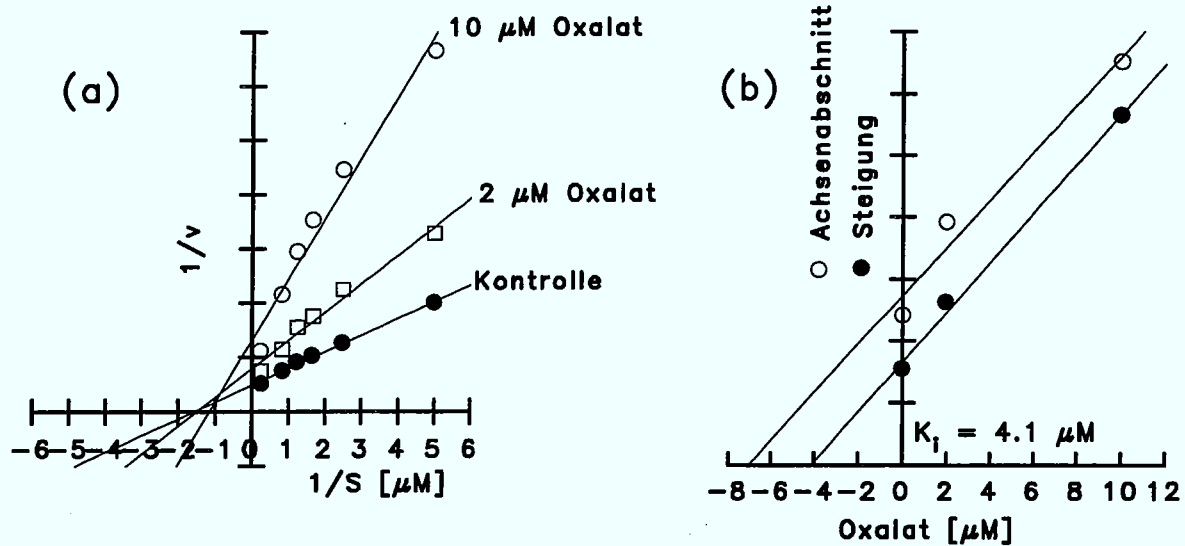


Abb. 15. Einfluß des ICL-Inhibitors Oxalat auf die Isocitrat-Umsatzraten im Enzymtest. Oxalat wurde als nicht-kompetitiver Inhibitor klassifiziert. Dieser Hemmtyp ist dadurch charakterisiert, daß sich die Geraden in der Lineweaver-Burk-Auftragung (a) auf der $1/S$ -Achse schneiden, und daß die Auftragung der Steigungsfaktoren und der $1/v$ -Achsenabschnitte aus der Lineweaver-Burk-Darstellung gegen die Inhibitor-konzentration jeweils eine Gerade ergibt (b).

Die Auswertung der kinetischen Daten für Itaconat führte zur Klassifizierung als linear-gemischter Inhibitor mit einem K_i -Wert von 170 μM (Abb. 16). Die Inhibition durch Itaconat gehört damit, ebenso wie die von PEP, zu den unter dem Begriff "gemischte Hemmungen" zusammengefaßten Hemmtypen, bei denen der Inhibitor sowohl an den E-S-Komplex als auch an das freie Enzym bindet. Im Unterschied zu einem hyperbolisch-unkompetitiven Inhibitor ist der E-S-I-Komplex katalytisch nicht aktiv. In Gegenwart des Inhibitors liegt immer ein Teil des Enzyms als inaktiver E-S-I-Komplex vor, so daß v_{max} verringert ist, und ein Teil des Substrates bindet an den E-I-Komplex, was den apparenten K_m -Wert des Enzyms erhöht.

Für alle beschriebenen Hemmtypen ist eine Inhibitor-Bindungsstelle am Enzym zu fordern (Segel, 1975), die allerdings für die ICL bisher nicht nachgewiesen werden konnte. Die Wirkungsweise der Inhibitoren kann jedoch damit erklärt werden, daß entweder die Succinat- oder die Glyoxylat-Bindungsstelle im aktiven Zentrum der ICL als Bindungsstelle für die untersuchten Inhibitoren fungiert. Bedingt durch deren sterischen Einfluß im aktiven Zentrum kommt es zwar noch zur Anlagerung des Substrates Isocitrat, dessen Spaltung jedoch, mit Ausnahme der bei PEP beschriebenen Situation, nicht mehr erfolgen kann.

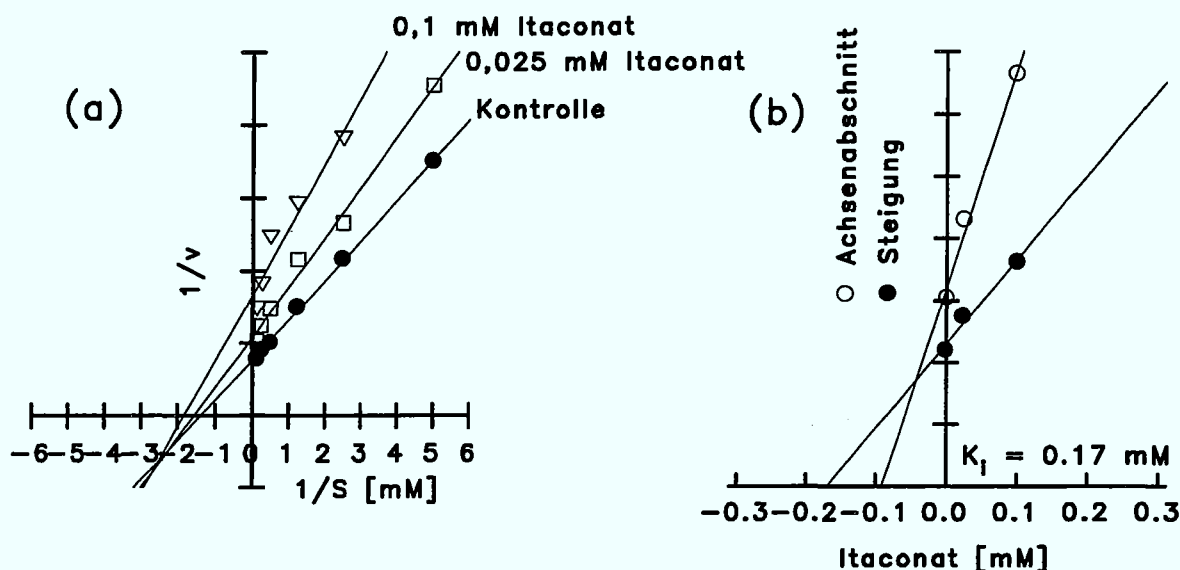


Abb. 16. Einfluß des ICL-Inhibitors Itaconat auf die Isocitrat-Umsatzraten im Enzymtest. Itaconat konnte als linear-gemischter Inhibitor klassifiziert werden. Dieser Hemmtyp ist dadurch charakterisiert, daß sich die Geraden in der Lineweaver-Burk Auftragung (a) unterhalb der $1/S$ -Achse schneiden, und daß die Auftragung der Steigungsfaktoren und der $1/v$ -Achsenabschnitte aus der Lineweaver-Burk-Darstellung gegen die Inhibitorkonzentration jeweils eine Gerade ergibt (b).

1.4. Itaconat-Effekt und Mutanten-Screening

Da Itaconat in der Literatur als spezifischer Isocitrat-Lyase-Inhibitor beschrieben worden ist (McFadden & Purohit, 1977; Khan & McFadden, 1979), und da sich dieser Antimetabolit bei den Effektoruntersuchungen als sehr wirksam bei der ICL von *A. gossypii* erwiesen hatte, wurde er zur Selektion einer Mutante mit erhöhter ICL-Aktivität genutzt. Zunächst mußte ein geeignetes Medium für die Selektion entwickelt werden. Als Kohlenstoffquelle wurde dabei Ölsäure verwendet, so daß sämtlicher Kohlenstoff über die ICL metabolisiert werden mußte, sofern daraus Biomasse gebildet werden sollte. Der Zusatz von 20 mM Itaconat zum Medium 1 hemmte das Myzelwachstum von *A. gossypii*. Da das Myzelwachstum auf Platten mit Medium 1 und 0,5 % Glucose anstatt Ölsäure als Kohlenstoffquelle durch 20 mM Itaconat nicht beeinträchtigt wurde, konnte ein unspezifischer Effekt des Itaconats ausgeschlossen werden. Außerdem konnte bei diesen mit Glucose und Itaconat hergestellten Platten im Vergleich zur Kontrolle ohne Itaconat eine verminderte Gelbfärbung des Myzels beobachtet werden. Dies deutete auf eine Hemmung der ICL-Aktivität nach Glucoseverbrauch, und damit auf eine Hemmung der Riboflavinbiosynthese hin. Bei Wachstum des Pilzes auf Medium 2 ohne Itaconat zeigte sich eine deutliche Gelbfärbung der Kolonien, die allein mit Hefeextrakt und bei Zugabe von 50 mM Itaconat nicht auftrat (Abb. 17). Damit konnte anhand des einen Systems die spezifisch durch Itaconat hervorgerufene Wachstumshemmung gezeigt werden, während mit beiden Systemen die Hemmung der Riboflavinbildung durch Itaconat demonstriert werden konnte. Für ein Screening nach Mutanten, die in der Lage sind die Itaconat-Hemmung zu kompensieren, wurde zunächst Medium 1 verwendet. Sporen von *A. gossypii* WT wurden dazu einer UV-Mutagenese unterzogen. Da bei 90 s Bestrahlung eine komplette Abtötung der Sporen auftrat (Abb. 18), wurde eine Sporensuspension 30 s (87 % Abtötung) mit UV-Licht bestrahlt und anschließend ausplattiert. Auf Medium 1 konnte jedoch selbst mit nicht UV-bestrahlten Sporen keine Sporenkeimung beobachtet werden. Folglich mußte für das Mutanten-Screening Medium 2 herangezogen werden. Mit diesem konnte aus ca. 5000 Kolonien eine stabile Itaconat-resistente Mutante (Ita-GS01) selektioniert werden (Abb. 19). Sie wurde nachfolgend hinsichtlich ihrer ICL-Aktivität und ihrer Riboflavinbildung untersucht.

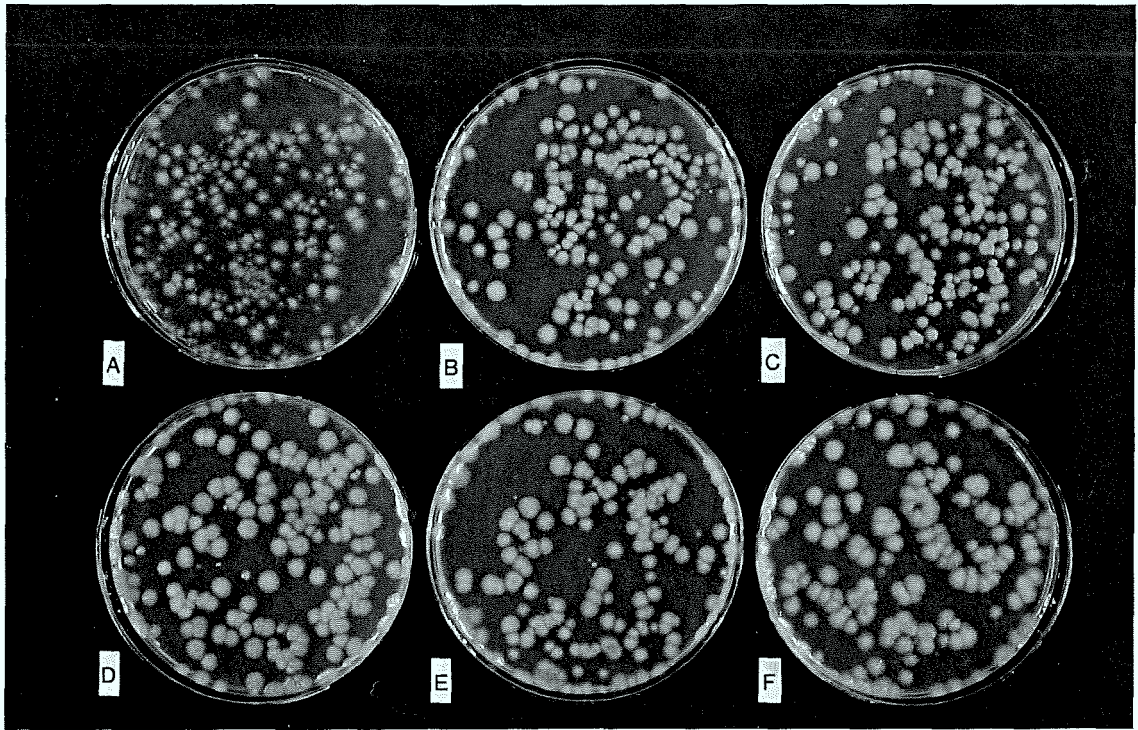


Abb. 17. Hemmung der Riboflavinbildung durch Itaconat bei Wachstum von *A. gossypii* auf Hefeextrakt mit Ölsäure als Kohlenstoffquelle. Medienzusammensetzung:

A Hefeextrakt (1,0 %)

B Hefeextrakt (1,0 %) + Ölsäure (0,05 %)

C Hefeextrakt (1,0 %) + Ölsäure (0,05 %) + 2 mM Itaconat

D Hefeextrakt (1,0 %) + Ölsäure (0,05 %) + 10 mM Itaconat

E Hefeextrakt (1,0 %) + Ölsäure (0,05 %) + 20 mM Itaconat

F Hefeextrakt (1,0 %) + Ölsäure (0,05 %) + 50 mM Itaconat

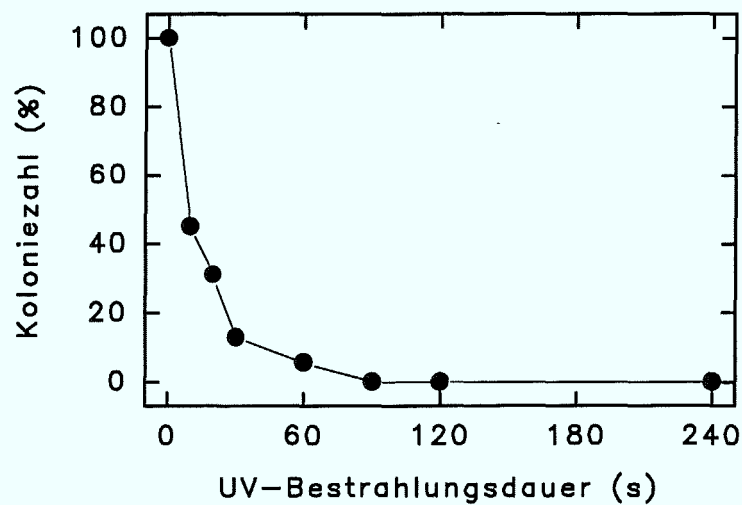


Abb. 18. Überlebensrate von *A. gossypii* WT Sporen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer mit UV-Licht.

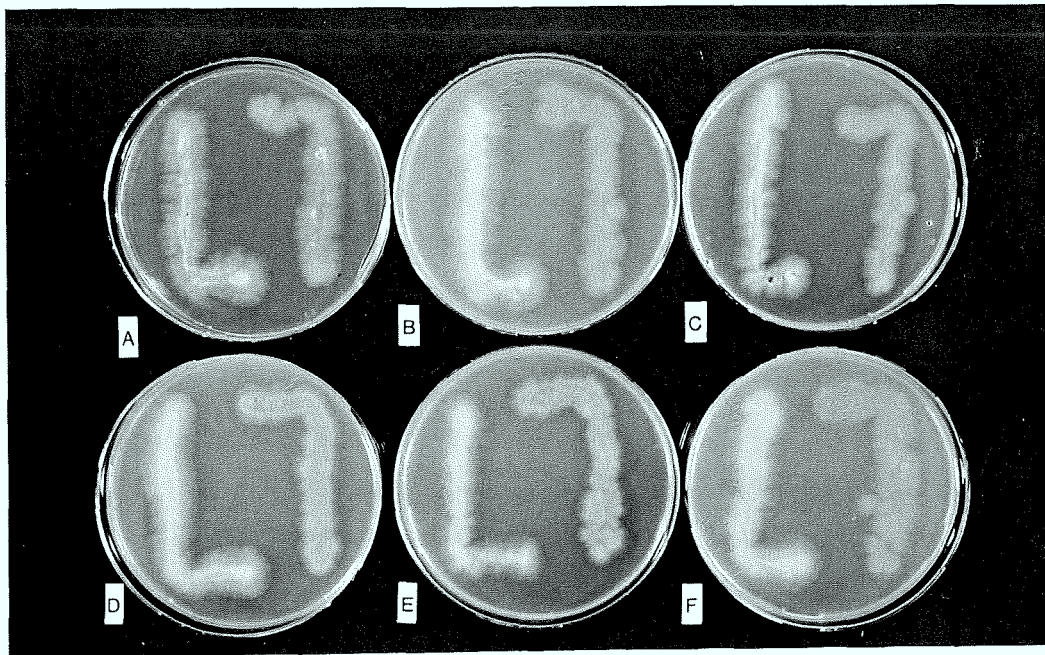


Abb. 19. Riboflavinbildung von *A. gossypii* WT und Mutante Ita-GS01 auf Hefeextrakt mit Ölsäure als Kohlenstoffquelle und verschiedenen Itaconat-Zugaben.

Während 50 mM Itaconat (F) beim WT (linke Spur) die Riboflavinbildung hemmt, bleibt die Mutante Ita-GS01 (rechte Spur) unbeeinflusst. Medienzusammensetzung:

A Hefeextrakt (1,0 %)

B Hefeextrakt (1,0 %) + Ölsäure (0,05 %)

C Hefeextrakt (1,0 %) + Ölsäure (0,05 %) + 2 mM Itaconat

D Hefeextrakt (1,0 %) + Ölsäure (0,05 %) + 10 mM Itaconat

E Hefeextrakt (1,0 %) + Ölsäure (0,05 %) + 20 mM Itaconat

F Hefeextrakt (1,0 %) + Ölsäure (0,05 %) + 50 mM Itaconat

1.5. Änderung der Riboflavinbildung und der spezifischen Isocitrat-Lyase-Aktivität bei einer Itaconat-resistenten Mutante von *A. gossypii*

Die Itaconat-resistente *A. gossypii* Mutante Ita-GS01 wurde auf Sojaöl-Medium (Abb. 20a) bzw. Glucose-Medium (Abb. 20b) in Schüttelkolben kultiviert. Die spezifische ICL-Aktivität und der Riboflavingehalt wurden dabei mit den für *A. gossypii* WT ermittelten Daten verglichen. Mutante und WT wiesen qualitativ für die ermittelten Parameter die gleichen Kurvenverläufe über die Kulturdauer auf. Der Riboflavingehalt in der Kultur der Mutante lag jedoch auf Sojaöl-Medium mit 231 mg l^{-1} Riboflavin um den Faktor 25 und auf Glucose-Medium mit 60 mg l^{-1} Riboflavin um den Faktor 7,5 über den entsprechenden Werten des WT ($9,0 \text{ mg l}^{-1}$ bzw. $8,0 \text{ mg l}^{-1}$ Riboflavin). Während die spezifische ICL-Aktivität der Mutante nach Beginn der Riboflavinbildung auf Sojaöl signifikant erhöht war (115 %), konnte auf Glucose in der entsprechenden Phase eine signifikant verringerte spezifische Aktivität (67 %) im Vergleich zum WT gemessen werden.

Die Kultivierung von *A. gossypii* WT und Mutante im Fermenter lieferte für Sojaöl-Medium (Abb. 21a) qualitativ dasselbe Ergebnis wie in Schüttelkolben. Die spezifische ICL-Aktivität lag hier zu Beginn der Riboflavinbildungsphase für die Mutante mit maximal $0,56 \text{ U (mg Protein)}^{-1}$ und später mit $0,48 \text{ U (mg Protein)}^{-1}$ 1,25- bis 2-fach höher im Vergleich zu den entsprechenden spezifischen Aktivität des WT. Dies ging mit einem um den Faktor 8,5 erhöhten Endwert (179 mg l^{-1} Riboflavin) beim Riboflavingehalt einher.

Im Unterschied zu den Schüttelkolben-Versuchen mit Glucose-Medium konnte bei Wachstum im Fermenter für die Itaconat-resistente Mutante mit maximal $0,51 \text{ U (mg Protein)}^{-1}$ ein um den Faktor 2,5 erhöhter Wert im Vergleich zum Maximalwert des WT [$0,2 \text{ U (mg Protein)}^{-1}$] bestimmt werden. Bei diesen Kultivierungen wies die Mutante mit 109 mg l^{-1} Riboflavin ebenfalls eine 8,5-fach erhöhte Riboflavinakkumulation im Vergleich zum WT auf (Abb. 21b).

Die Abweichungen in der Riboflavinbildung zwischen Schüttelkolben- und Fermenter-Kultivierungen dürften durch die bei diesen beiden Kulturverfahren unvermeidlich auftretenden Unterschiede bei der Medien-Sterilisation (Pfeifer et al., 1950) sowie durch die veränderte Begasung und Durchmischung der Medien (Özbas & Kutsal, 1986, 1992) bedingt sein. In der späten stationären Phase der Kultur zeigte sich eine auffällige Divergenz der Kurven für die spezifische ICL-Aktivität und die Riboflavinakkumulation insofern, als trotz sinkender spezifischer Enzymaktivität die Riboflavinkonzentration weiterhin zunahm. Diese Divergenz war bei der Mutante ausgeprägter als beim WT zu beobachten. Da zu diesem Zeitpunkt der Kultivierung die Biomassebildung, deren Kohlenstoffbedarf drei Größenordnungen über dem der Riboflavinbildung liegt, nicht mehr mit Metaboliten aus dem Glyoxylatzyklus versorgt werden muß, ist die verbleibende ICL-Aktivität sowohl bei der Mutante als auch beim WT zur Bereitstellung von Vorstufen für die Riboflavinbiosynthese ausreichend. Die Unterschiede in den spezifischen ICL-Aktivitäten zwischen Mutante und WT rührten nicht von einer Mutation her, die zu einer Veränderung der kinetischen Eigenschaften der ICL in der Mutante geführt hatte, da der aus

Zellextrakten der Mutante ermittelte K_m -Wert für Isocitrat sowie der K_i -Wert für Itaconat mit dem jeweils entsprechenden Wert des WT übereinstimmte.

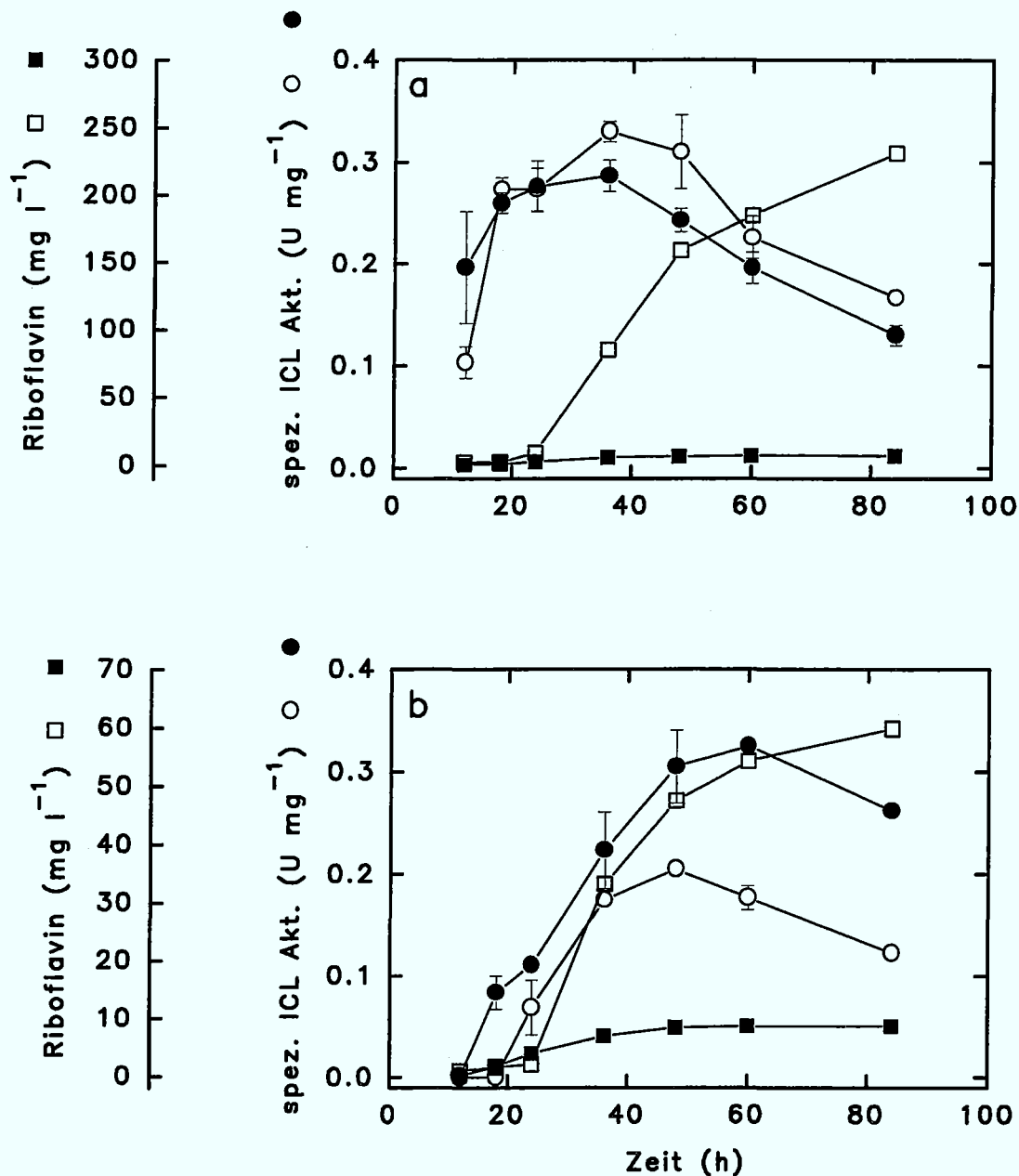


Abb. 20. Riboflavingehalt (■, □) und spezifische ICL-Aktivität (●, ○) während der Kultivierung von *A. gossypii* WT (■, ●) und Itaconat-resistenter Mutante Ita-GS01 (□, ○) auf Sojaöl-Medium (a) und Glucose-Medium (b) in Schüttelkolben. Für die spezifische ICL-Aktivität sind Mittelwerte mit Standard-Abweichungen aus jeweils drei Kultivierungen auf Sojaöl und zwei Kultivierungen auf Glucose dargestellt. Für den Riboflavingehalt sind nur die Mittelwerte angegeben (Streuung < 23 %).

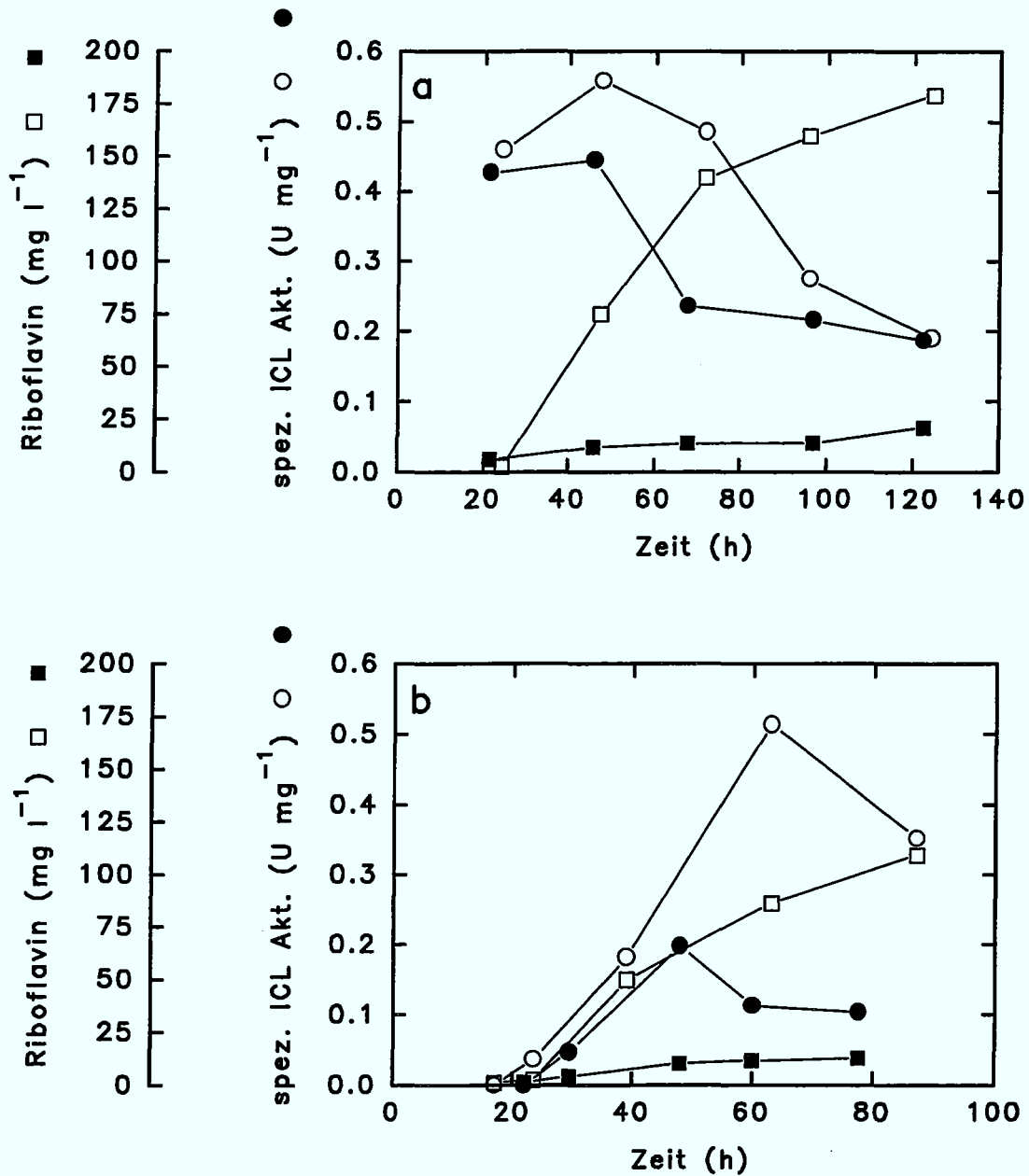


Abb. 21. Riboflavingehalt (■,□) und spezifische ICL-Aktivität (●,○) während Batch-Kultivierungen im 3 l-Fermenter von *A. gossypii* WT (■,●) und Itaconat-resistenter Mutante Ita-GS01 (□,○). Die Daten sind jeweils aus einer Kultivierung auf Sojaöl-Medium (a) und Glucose-Medium (b) ermittelt worden.

1.6. Einfluß der Kohlenstoffquelle auf die spezifische Isocitrat-Lyase-Aktivität

Da die Unterschiede in der spezifischen ICL-Aktivität zwischen dem WT und der Itaconat-resistenten Mutante nicht auf veränderten katalytischen Eigenschaften des Enzyms beruhten, wurde die Regulation auf Enzymbildungsebene mittels der Immuno-Blot-Technik untersucht. Diese Technik ermöglichte die Detektion des ICL-Proteins in Zellextrakten mit Hilfe ICL-spezifischer Antikörper. Damit sollte geklärt werden, ob die Itaconat-Resistenz der Mutante auf einer erhöhten ICL-Proteinmenge beruht, und ob die beobachtete Abnahme der spezifischen ICL-Aktivität in der letzten Phase der Kultivierung mit einer Abnahme der Proteinmenge korreliert.

Die Spezifität der ICL-Protein-Antikörper-Reaktion wurde zunächst durch Einsetzen eines vor der Immunisierung dem Kanninchen entnommen Null-Serums im Immuno-Blot-Verfahren überprüft. Mit diesem Serum konnte kein Blot-Signal detektiert werden. Von einer auf Glucose gewachsenen Kultur wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (Abb. 22) Zellextrakte hergestellt. Nach Bestimmung der jeweiligen ICL-Aktivität und des Proteingehaltes wurde ein SDS-Gel, auf das gleiche Proteinmengen (20 µg) aufgetragen worden waren, geblottet und nach Inkubation mit dem ICL-Antiserum hinsichtlich der vorhandenen ICL-Proteinmenge analysiert (Abb. 22a). Die spezifische ICL-Aktivität korrelierte dabei mit der vorhandenen Enzymmenge, d.h. mit ansteigender spezifischer ICL-Aktivität wurde ein größeres und intensiver gefärbtes Blot-Signal sichtbar. Diese Korrelation konnte auch durch den Immuno-Blot eines SDS-Gels gezeigt werden, auf das gleiche absolute Enzymaktivitäten aufgetragen worden waren (Abb. 21b). Dadurch konnte die Farbintensität sämtlicher Immuno-Blot-Signale amplifiziert werden, mit Ausnahme des Signals in Spur 1, bei dem diese Amplifikation selbst durch Auftragen von 100 µg Protein nicht erreicht werden konnte. Untersuchungen für die Mutante bei Wachstum auf Glucose-Medium, sowie für Mutante und WT bei Wachstum auf Sojaöl-Medium bestätigten diese Korrelation zwischen ICL-Aktivität und Blot-Signalintensität. Die ICL-Aktivität in *A. gossypii* wird folglich auf der Ebene der *de novo* Proteinsynthese reguliert. Beim Auftragen von Proteinmengen mit gleicher ICL-Aktivität auf ein SDS-Gel lieferte der auf einem Blot durchgeführte, direkte Vergleich von WT und Mutante ebenfalls Blot-Signale gleicher Intensität, was eine gesteigerte ICL-Synthese der Mutante auf Sojaöl anzeigt.

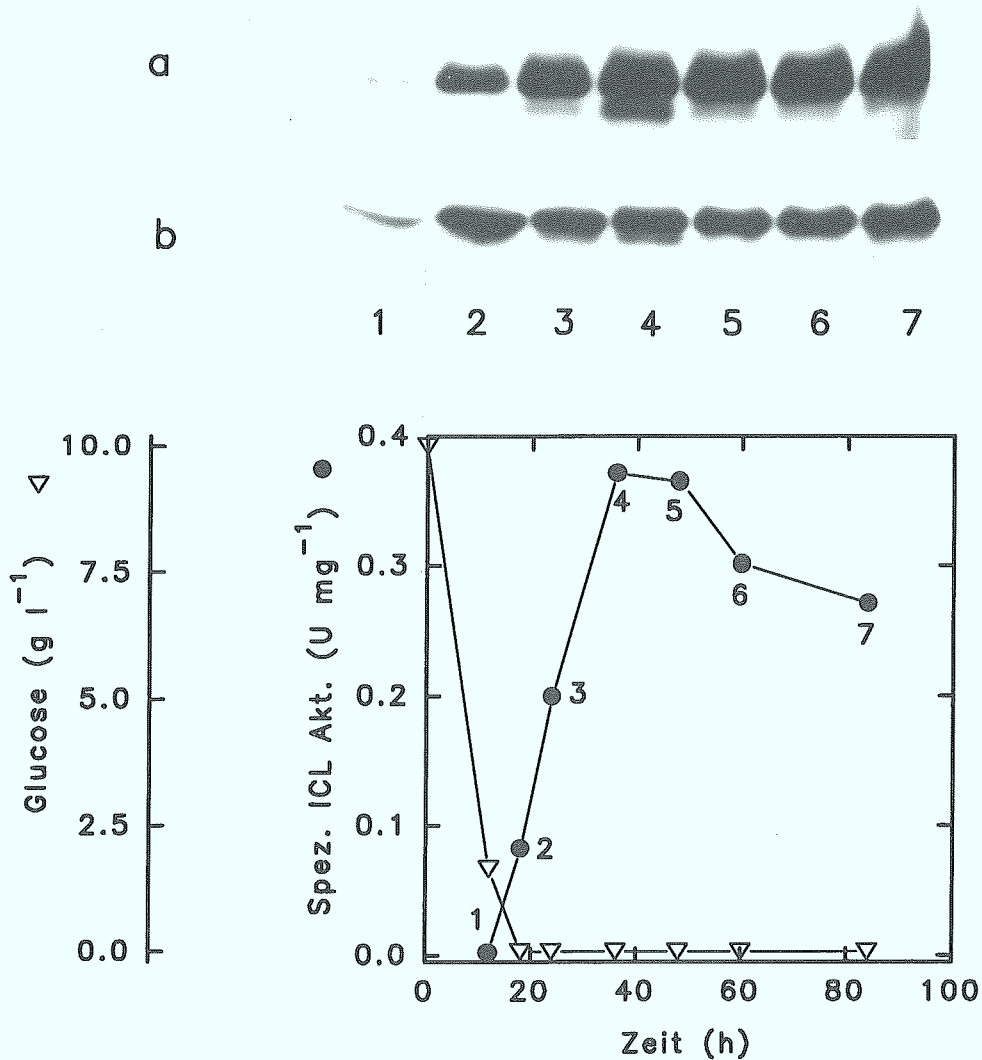


Abb. 22. Nachweis der ICL mittels Immuno-Blotting bei Wachstum von *A. gossypii* WT auf Glucose als Kohlenstoffquelle. Zu den in der Graphik angegebenen Zeiten wurde die spezifische ICL-Aktivität der jeweils aus Kulturproben hergestellten Zellextrakte bestimmt. Aliquots dieser Zellextrakte mit gleichem Proteingehalt (a) wurden nach SDS-PAGE mit der Immuno-Blot-Technik auf vorhandenes ICL-Protein hin untersucht. Auf einem zweiten SDS-Gel wurde jede Spur mit der jeweils dieselbe absolute ICL-Aktivität enthaltenen Menge Zellextrakt beladen, mit Ausnahme von Spur 1, auf die 100 μg Protein aufgetragen wurden (b). Den Spuren 1-7 entsprechen die in der Graphik dargestellten Datenpunkte für die spezifische ICL-Aktivität.

Der negativ regulierende Effekt der Glucose auf die spezifische Aktivität der ICL, der bei Wachstum auf Glucose-Medium gezeigt worden war, konnte durch einen Puls-Versuch auf Sojaöl-Medium verifiziert werden. Dazu wurde eine exponentiell auf Sojaöl-Medium wachsende Kultur von *A. gossypii* WT mit Glucose (Endkonzentration: 10 g l^{-1}) versetzt. Anschließend wurden zu verschiedenen Zeiten nach dem Glucose-Puls Zellextrakte aus dieser Kultur sowie einer unbehandelten Kontrolle hergestellt und hinsichtlich ihrer spezifischen ICL-

Aktivität verglichen. Durch die Immuno-Blot-Analyse konnte bei Auftragung gleicher Proteinmengen auf das SDS-Gel eine Abnahme der Signalintensität für die 3 h bzw. 5 h nach dem Glucose-Puls entnommenen Proben nachgewiesen werden (Abb. 23). Entsprechend lagen die spezifischen Enzymaktivitäten der gepulsten Kultur ca. 30 % bzw. 50 % unter den jeweiligen Werten für die Kontrolle. Diese nach 3 h nachzuweisende ICL-Inaktivierung sprach erneut für eine ICL-Regulation auf Ebene der Enzymmenge.

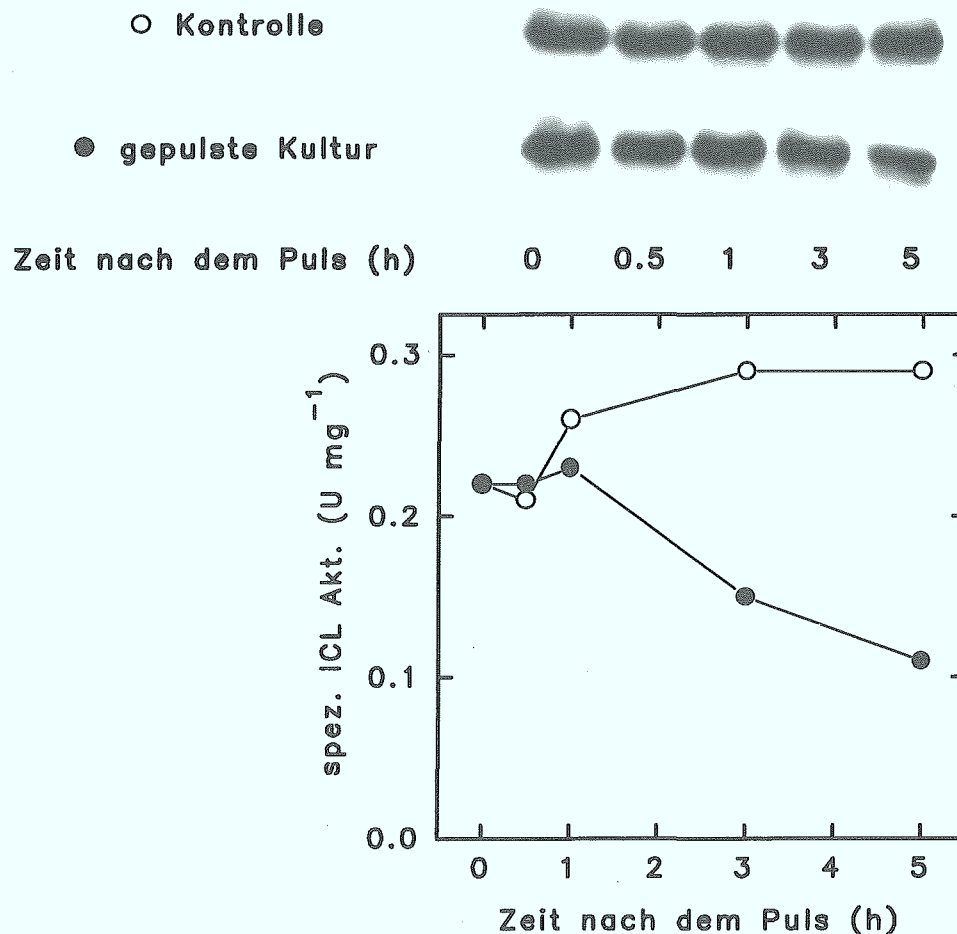


Abb. 23. Einfluß von Glucose auf die spezifische ICL-Aktivität von *A. gossypii* WT. Eine 18 h auf Sojaöl-Medium gewachsene Kultur wurde mit Glucose (Endkonzentration 10 g l⁻¹) gepulst (●). Eine Kontrolle blieb unbehandelt (○). Während der weiteren Kultivierung wurde die spezifische ICL-Aktivität der jeweils aus Kulturproben hergestellten Zellextrakte bestimmt. Aliquots dieser Zellextrakte mit gleichem Proteingehalt (20 µg) wurden nach SDS-PAGE mit der Immuno-Blot-Technik auf vorhandenes ICL-Protein hin untersucht. Den Spuren 1-5 entsprechen die in der Graphik dargestellten Datenpunkte für die spezifische ICL-Aktivität von gepulster Kultur und Kontrolle.

Zur Untersuchung einer Repression der ICL-Bildung durch Glucose wurde *A. gossypii* WT im Fermenter auf Mischsubstrat bestehend aus Glucose (10 g l^{-1}) und Ethanol (3 g l^{-1}) kultiviert. In diesem Versuch konnte, wie bei Wachstum auf Glucose als einziger Kohlenstoffquelle, erst nach Glucoseverbrauch ICL-Aktivität gemessen werden (Abb. 24a). Die ICL-Bildung wird offenbar durch Glucose reprimiert. Interessanterweise nahm bis zum Zeitpunkt des vollständigen Glucoseverbrauchs die Ethanolkonzentration im Medium auf $5,8 \text{ g l}^{-1}$ zu (Abb. 24b), was eine Ethanolbildung aus Glucose anzeigte. Diese Ethanolbildung durch *A. gossypii* wird im Abschnitt 2. eingehend untersucht. Im weiteren Verlauf der Kultivierung kam es mit dem Anstieg der spezifischen ICL-Aktivität auf einen Maximalwert von $0,23 \text{ U (mg Protein)}^{-1}$ zum Verbrauch des Ethanols und zu einer weiteren Zunahme der Biotrockenmasse von $3,0 \text{ g l}^{-1}$ nach Glucoseverbrauch auf $3,7 \text{ g l}^{-1}$. Dieses Wachstumsverhalten von *A. gossypii*, das durch Repression der ICL bei Vorhandensein einer leicht verwertbaren Kohlenstoffquelle wie Glucose zu charakterisieren ist, wird als "Diauxie" bezeichnet (Monod, 1942).

Zur Klärung der Frage, ob die ICL-Bildung nur auf eine Derepression zurückzuführen ist, oder ob eine Induktion durch C_2 -Körper liefernde Kohlenstoffquellen erforderlich ist, wurde *A. gossypii* WT in Schüttelkolben allein auf Hefeextrakt kultiviert. Die spezifische ICL-Aktivität betrug dabei $0,016 \text{ U (mg Protein)}^{-1}$, was deutlich unter der beobachteten maximalen spezifischen Aktivität von $0,4 \text{ U (mg Protein)}^{-1}$ lag. Dies deutet auf eine Induktion der ICL hin, z.B. durch freie Fettsäuren.

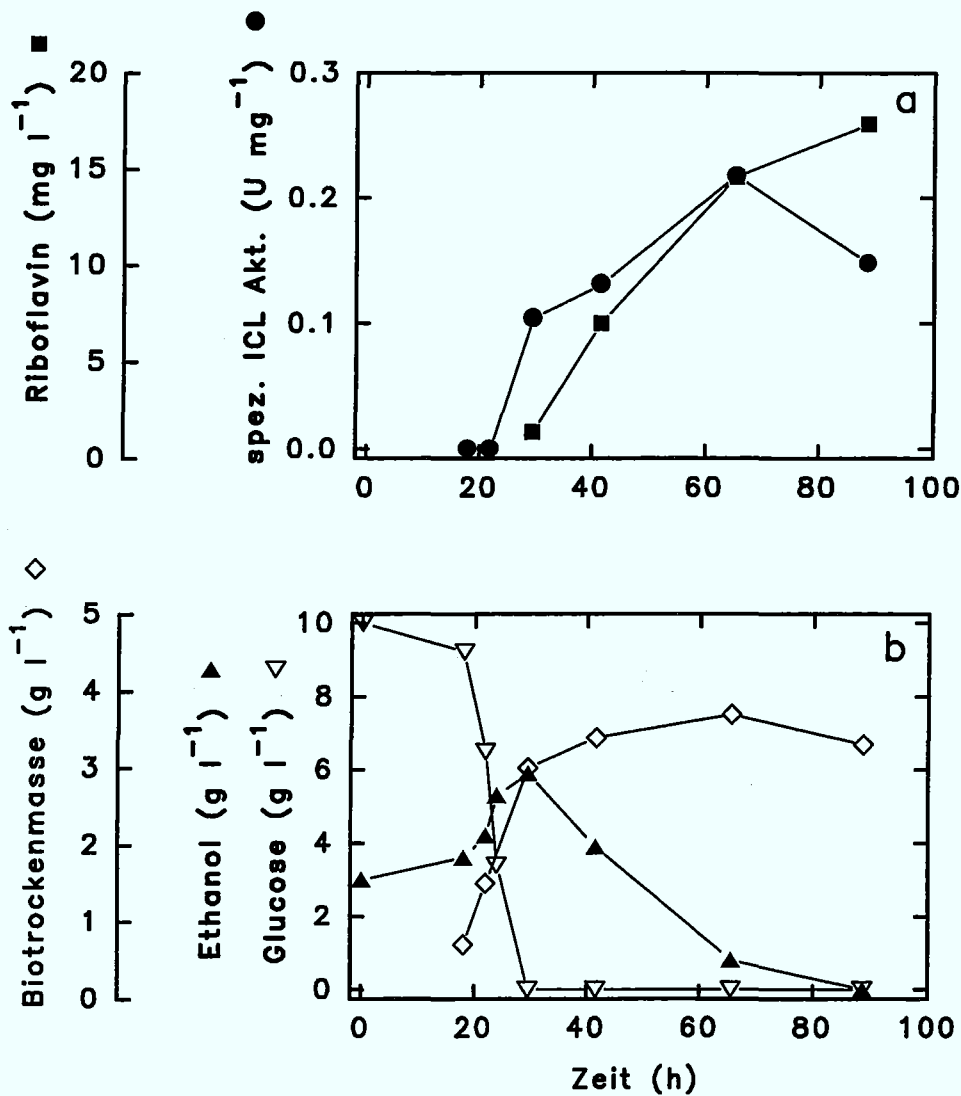


Abb. 24. Repression der ICL-Bildung bei Wachstum von *A. gossypii* WT auf Hefeextrakt mit Glucose/Ethanol-Mischsubstrat als Kohlenstoffquelle. Während der Kultivierung im 3 l-Fermenter wurde die spezifische ICL-Aktivität und der Riboflavingehalt bestimmt (a). Zudem wurden die Änderungen in der Biotrockenmasse, sowie von Glucose und Ethanol im Medium über die Kulturdauer gemessen (b).

1.7. Lokalisation von Isocitrat-Lyase und Isocitrat-Dehydrogenasen in der Zelle

In den bisher untersuchten filamentösen Pilzen ist die ICL in Peroxisomen lokalisiert (Maxwell et al., 1975; Carson & Cooney, 1990). Diese Kompartimentierung trennt die ICL von der ICDH und verhindert damit eine Kompetition dieser beiden Enzyme um das gemeinsame Substrat Isocitrat. In Endospermzellen von Rizinussamen (Donaldson, 1982) sowie in *C. tropicalis* bei Wachstum auf n-Alkanen (Tanaka et al., 1982) konnte jedoch eine NADP-abhängige ICDH zusammen mit der ICL im gleichen Organell lokalisiert werden. Eine solche Situation würde in *A. gossypii* einen potentiellen Nebenweg im Stofffluß vom Substrat Sojaöl in Richtung Gluconeogenese darstellen. Zur Überprüfung einer möglichen Kompetition zwischen der ICL und NAD- oder NADP-abhängigen Isocitrat-Dehydrogenasen wurden diese Enzymaktivitäten zunächst in Zellextrakten von *A. gossypii* nachgewiesen. Weiterhin wurden zur Lokalisierung dieser Enzyme Organellen aus dem Myzel einer auf Sojaöl-Medium gewachsenen Kultur durch Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert und hinsichtlich ihrer Enzymausstattung charakterisiert.

Zellextrakte aus Glucose-Kulturen von *A. gossypii* WT wiesen bei noch vorhandener Glucose wie erwartet keine ICL-Aktivität auf, während NAD- und NADP-abhängige ICDH-Aktivitäten nachgewiesen werden konnten (Tab. 4). Nach Verbrauch der Glucose war die ICL meßbar, und die spezifischen Aktivitäten der beiden Isocitrat-Dehydrogenasen stiegen an. Die höchsten spezifischen Aktivitäten für alle untersuchten Enzyme konnten bei Wachstum auf Sojaöl-Medium ermittelt werden. Diese Daten wiesen auf eine von der Kohlenstoffquelle abhängige Regulation der Isocitrat-Dehydrogenasen hin.

Kohlenstoffquelle	ICL	NADP-ICDH	NAD-ICDH
Glucose (11 h alte Kultur)	<0,005	0,68	0,25
Glucose verbraucht (15 h alte Kultur)	0,15	1,38	0,35
Sojaöl	0,30	2,70	0,53

Tab. 4: Spezifische Enzymaktivitäten Isocitrat-umsetzender Enzyme [in U (mg Protein)⁻¹] bei Wachstum von *A. gossypii* WT auf Glucose- bzw. Sojaöl-Medium.

In den Fraktionen des Saccharose-Dichtegradienten konnten die maximale ICL-Aktivität und die maximale Aktivität der Katalase, die als Markerenzym das Vorhandensein von Peroxisomen anzeigt, in derselben Fraktion gemessen werden (Abb. 25a). Damit war ein erstes Indiz für eine Lokalisierung der ICL von *A. gossypii* in Organellen erbracht. Diese Lokalisierung wurde durch Immunogold-markierte Ultradünnschnitte von exponentiell auf Sojaöl-Medium gewachsenen Zellen bestätigt (Abb. 26). Die Gold-Markierung war intrazellulär auf distinkte, elektronen-optisch dichte Strukturen, die Peroxisomen, begrenzt. In einem Kontrollversuch,

bei dem auf Glucose-Medium gewachsene Zellen vor Verbrauch der Glucose geerntet wurden, konnte in den Zellen keine Markierung nachgewiesen werden.

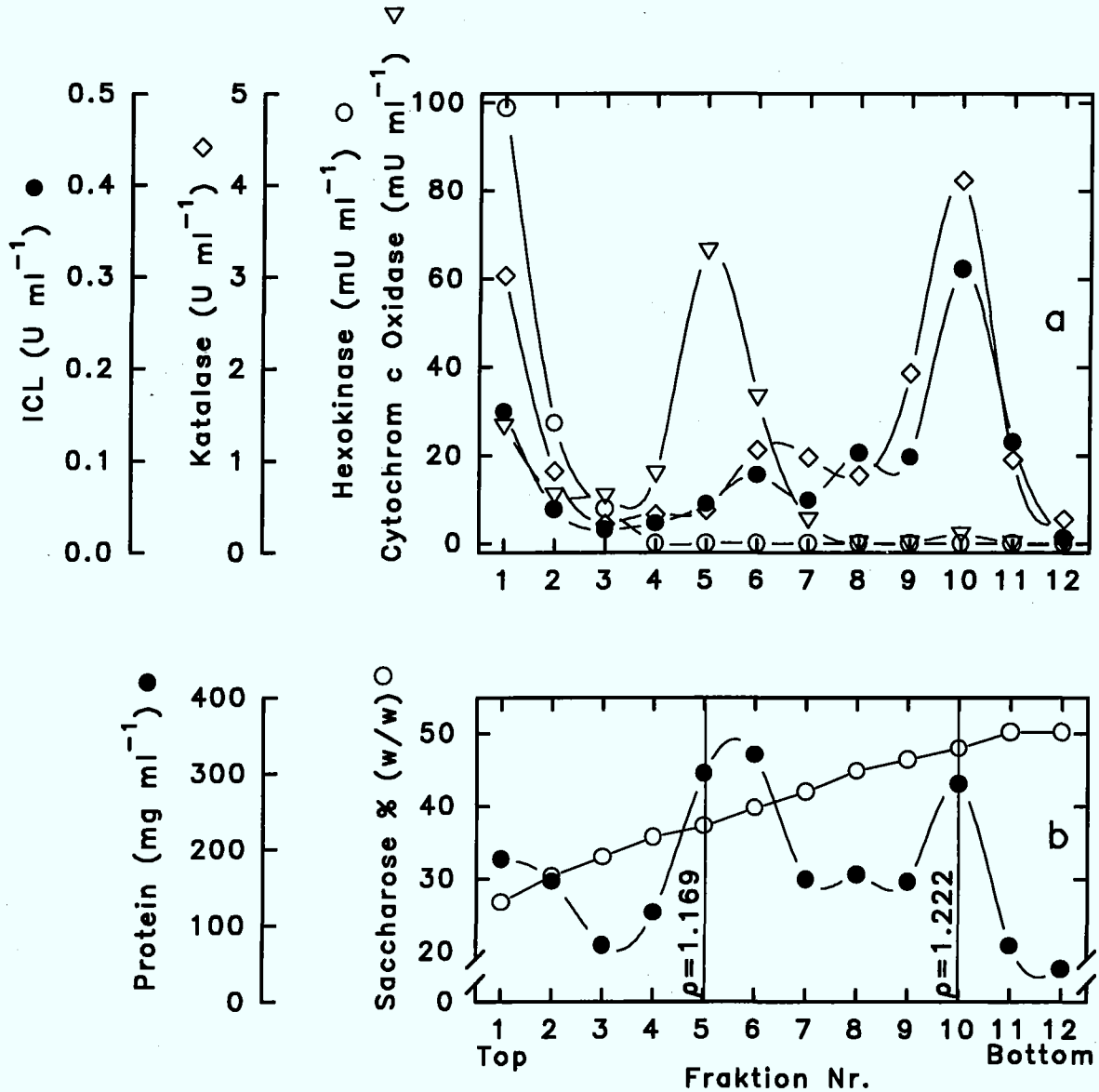


Abb. 25. Verteilung der Enzyme Hexokinase, Cytochrom c Oxidase, Katalase und ICL in einem Saccharose-Dichtegradienten, der mit Organellen aus dem Myzel einer auf Sojaöl gewachsenen Kultur von *A. gossypii* WT beladen worden war (a). In den Fraktionen wurde zudem die Saccharose-Konzentration sowie der jeweilige Proteingehalt bestimmt (b). Deutlich abgetrennt von den durch das Markerenzym Cytochrom c Oxidase angezeigten Mitochondrien ($\rho = 1,169 \text{ g cm}^{-3}$) konnte die ICL anhand des Markerenzym Katalase in Peroxisomen ($\rho = 1,222 \text{ g cm}^{-3}$) lokalisiert werden.



Abb. 26. Elektronenmikroskopische Aufnahmen Immunogold-markierter Ultradünnschnitte von exponentiell auf Sojaöl- bzw. Glucose-Medium gewachsenen *A. gossypii* WT Zellen. Die ICL konnte bei den auf Sojaöl gewachsenen Zellen durch spezifische Markierungen ($\Rightarrow$) intrazellulär in elektronenoptisch dichten Strukturen, den Peroxisomen, lokalisiert werden. Die extrazelluläre Markierung der Ultradünnschnitte von auf Glucose gewachsenen Zellen ist unspezifisch.

Die NADP-abhängige ICDH wies ihre maximale Aktivität in derselben Fraktion wie die ICL auf (Abb. 27). Das Maximum der NAD-abhängigen ICDH deckte sich dagegen mit dem der Cytochrom c Oxidase, dem Markerenzym für Mitochondrien. Für diese Organellen konnte eine Dichte von $\varphi = 1,169 \text{ g cm}^{-3}$ bestimmt werden.

Um die Funktion der Isocitrat-Dehydrogenasen im Stoffwechsel von *A. gossypii* einordnen zu können, erfolgte eine erste kinetische Charakterisierung dieser Enzyme. Die peroxisomale NADP-abhängige ICDH zeigte eine Michaelis-Menten-Kinetik mit einem K_m für Isocitrat von 0,11 mM (Abb. 28). Das mit einem TRIS/HCl Puffer bestimmte pH-Optimum lag bei pH 8,0. Für die Enzymaktivität war die Gegenwart zweiwertiger Kationen erforderlich, wobei mit Mn^{2+} -Kationen (1 mM) eine doppelt so hohe Aktivität erzielt werden konnte wie mit Mg^{2+} -Kationen (1 mM). Die Zugabe von ATP (3,0 mM) führte zu einer Hemmung (60 %) der Enzymaktivität, wohingegen AMP-Zugabe keinen Effekt zeigte.

Die mitochondriale NAD-abhängige ICDH wies eine sigmoide Aktivitätskurve auf (Abb. 29), wie sie für ein allosterisch reguliertes Enzym charakteristisch ist. Der $S_{0,5}$ -Wert für Isocitrat betrug im Enzymtest ohne Zusatz von Effektoren 1,3 mM. Zugabe von ATP (1,3 mM) wirkte inhibierend und führte zu einem höheren $S_{0,5}$ -Wert (3,2 mM), ohne den Wert für $v_{\max}$ zu verändern. Die Aktivierung des Enzyms durch AMP konnte mit einen herabgesetzten

$S_{0,5}$ -Wert (0,32 mM) nachgewiesen werden. Bezüglich der Mn^{2+} -Abhängigkeit und des pH-Optimums der Aktivität zeigte die NAD-abhängige ICDH Eigenschaften, die denen der NADP-abhängigen ICDH entsprachen.

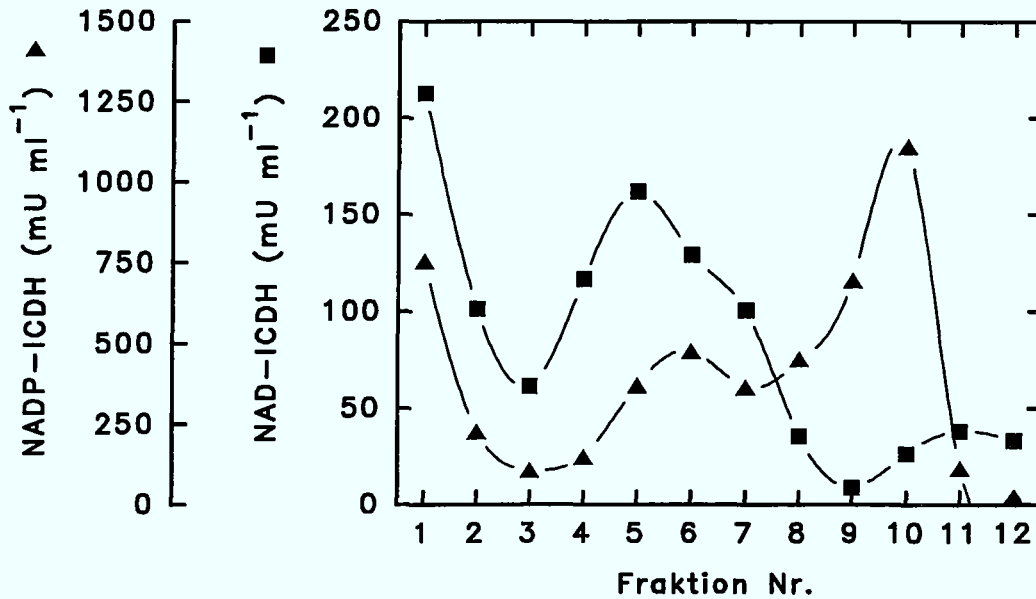


Abb. 27. Verteilung der NAD- und NADP-abhängigen Isocitrat-Dehydrogenasen in einem Saccharose-Dichtegradienten, der mit Organellen aus dem Myzel einer auf Sojaöl gewachsenen Kultur von *A. gossypii* WT beladen worden war. Anhand der Markerenzyme Katalase und Cytochrom c Oxidase (s. Abb. 25a) konnte die NAD-abhängige ICDH in Mitochondrien und die NADP-abhängige ICDH in Peroxisomen lokalisiert werden.

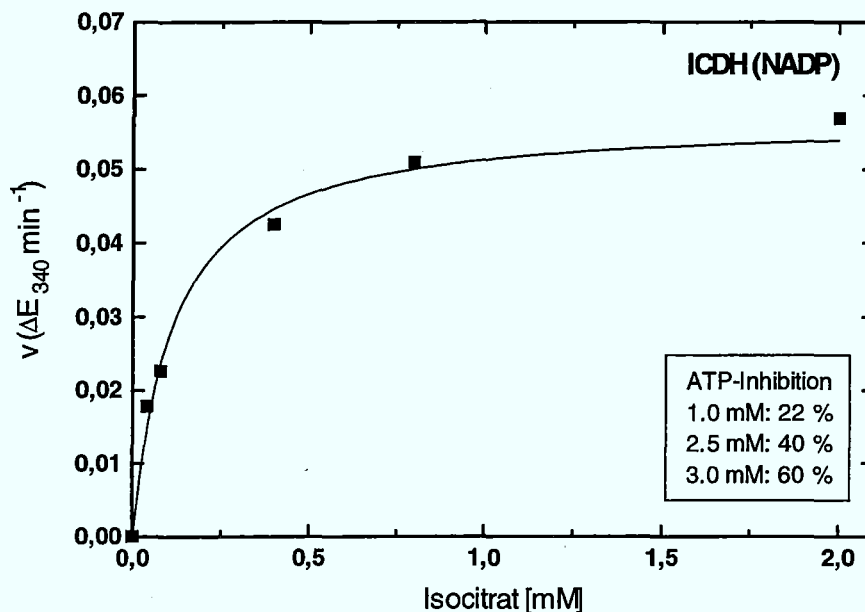


Abb. 28. Umsatzraten für die peroxisomale NADP-abhängige ICDH als Funktion der Isocitrat-Konzentration. Aus der Michaelis-Menten-Kinetik wurde ein K_m -Wert von 0,11 mM für Isocitrat ermittelt. ATP (3 mM) führte zu einer 60 %igen Inhibition der Enzymaktivität.

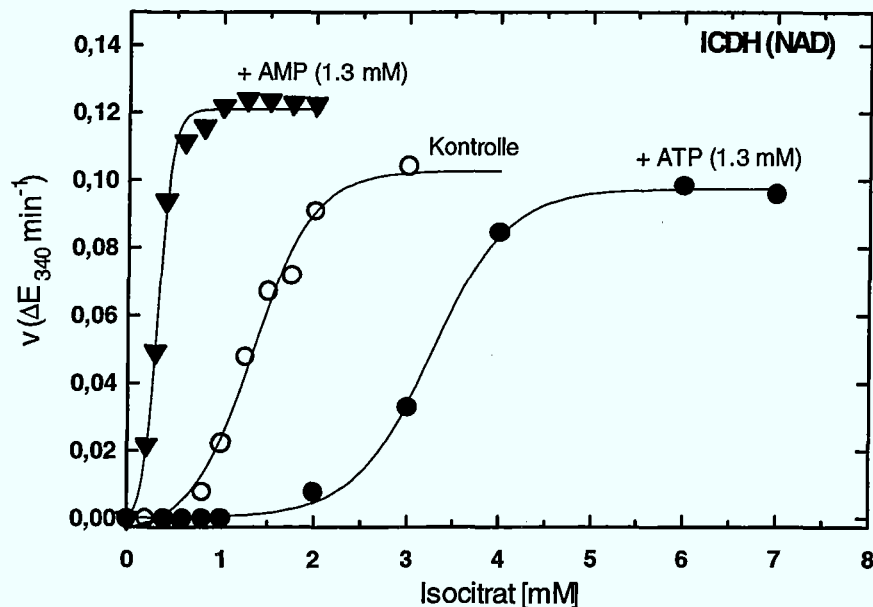


Abb. 29. Umsatzraten für die mitochondriale NAD-abhängige ICDH als Funktion der Isocitrat-Konzentration bei konstant im Enzymtest vorgegebenen Adenin-Nucleotid-Konzentrationen. Ohne Effektorzugabe ergab sich eine sigmoidale Sättigungskurve, aus der ein $S_{0,5}$ -Wert von 0,32 mM für Isocitrat bestimmt wurde.

Ein Vergleich der kinetischen Daten von ICL und NADP-abhängiger ICDH (Tab. 5) verdeutlicht die höhere Affinität der NADP-abhängigen ICDH zum Substrat Isocitrat und macht insofern eine *in vivo* Konkurrenz zwischen diesen beiden Enzymen um das gemeinsame Substrat möglich.

	ICL	NADP-ICDH	NAD-ICDH
Kinetische Charakterisierung	hyperbolisch, Michaelis-Menten	hyperbolisch, Michaelis-Menten	sigmoid, Kooperativität
K_m-Wert Isocitrat	K_m -Wert: 0,550 mM	K_m -Wert: 0,110 mM	$S_{0,5}$ -Wert: 1,32 mM
Metall-Abhängigkeit	Mg ²⁺ -abhängig	Mn ²⁺ -abhängig	Mn ²⁺ -abhängig
Physiologische Effektoren	keine	Hemmung durch ATP (3 mM → 60% Hemmung)	Hemmung durch ATP, Aktivierung durch AMP
Lokalisation	Peroxisom	Peroxisom	Mitochondrium

Tab. 5. Vergleich der Eigenschaften Isocitrat-umsetzender Enzyme in *A. gossypii*.

1.8. Lokalisation weiterer Enzyme

Da das Vorhandensein der ICDH in Peroxisomen von *A. gossypii*, analog zu den mit ICDH-Defektmutanten bei *S. cerevisiae* erhaltenen Ergebnissen (Haselbeck & McAlister-Henn, 1991, 1993), in Zusammenhang mit der Glutamat-Synthese gesehen werden konnte, wurde der Saccharose-Dichtegradient auf NAD- und NADP-abhängige Glutamat-Dehydrogenase-Aktivitäten (GDH) hin untersucht. In den Fraktionen konnte jedoch keine GDH-Aktivität detektiert werden. Da Zellextrakte von auf Glucose- bzw. auf Sojaöl-Medium gewachsenem Myzel eine spezifische NAD-abhängige GDH-Aktivität von 0,35 bzw. 0,81 U (mg Protein)⁻¹ aufwiesen, lag eine Lokalisierung der GDH im Cytosol nahe. Diese konnte jedoch in Saccharose-Dichtegradienten-Fractionen nicht erfaßt werden, da cytosolische Proteine sehr effektiv durch die differentiellen Zentrifugationsschritte abgetrennt worden waren, wie an der stark abgereicherten Hexokinase-Aktivität auf dem Gradienten (Abb. 25a) abzulesen ist. Eine Umsetzung des durch die Aktivität der NADP-abhängigen ICDH-Aktivität entstehenden 2-Oxoglutarats zu Glutamat durch eine im selben Kompartiment lokalisierte GDH konnte folglich für *A. gossypii* nicht gezeigt werden.

Peroxisomen von *C. tropicalis* weisen von den Enzymen des Glyoxylatzyklus nur die ICL und die Malatsynthase auf (Kawamoto et al., 1977; Tanaka et al., 1982). Die anaplerotische Funktion des Glyoxylatzyklus wird in dieser Hefe durch das Zusammenwirken mit Enzymen des Tricarbonsäure-Zyklus in den Mitochondrien realisiert. Dabei entsteht in Peroxisomen einerseits Malat, indem durch die ICL-Reaktion entstehendes Glyoxylat über die Malatsynthase mit einem Acetyl-CoA-Molekül umgesetzt wird, andererseits Succinat, das als zweites Produkt aus der ICL-Reaktion hervorgeht. Diese beiden Metabolite werden über Shuttle-Mechanismen ins Mitochondrium transportiert, wo aus ihnen mit Hilfe der Enzyme des Tricarbonsäurezyklus, unter anderem mit der mitochondrialen Malat-Dehydrogenase (MDH), Isocitrat als Substrat für die ICL regeneriert wird. Um die Situation in *A. gossypii* diesbezüglich beschreiben zu können, wurden die Dichtegradienten-Fractionen auf NAD- und NADP-abhängige Malat-Dehydrogenase-Aktivitäten hin analysiert. Im Unterschied zur Hefe *C. tropicalis*, die nur über eine mitochondriale MDH verfügt (Tanaka et al., 1982), konnte für *A. gossypii* sowohl eine mitochondriale NAD-abhängige MDH, als auch eine peroxisomale NAD-abhängige MDH detektiert werden (Abb. 30). Dies ist ein Indiz für einen enzymatisch vollständig ausgestatteten Glyoxylatzyklus in Peroxisomen von *A. gossypii*. Eine NADP-abhängige MDH-Aktivität konnte in den Organellen nicht nachgewiesen werden.

Die Lokalisierung der β -Oxidation stellte insofern einen wichtigen Aspekt dar, als darüber festgelegt wird, ob der Glyoxylatzyklus in Peroxisomen oder der Tricarbonsäurezyklus in Mitochondrien direkten Zugang zu dem bei der β -Oxidation entstehenden Acetyl-CoA haben. In Säugerzellen ist die β -Oxidation in Mitochondrien lokalisiert (Staak et al., 1978), während sie in *C. tropicalis* bei Wachstum auf n-Alkanen in Peroxisomen stattfindet (Kawamoto et al., 1978; Ueda et al., 1985). Als Markerenzym für die β -Oxidation wurde die 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase in den Saccharose-Dichtegradienten-Fractionen bestimmt. Das Maximum dieser

Enzymaktivität konnte zusammen mit dem Katalase-Aktivitätsmaximum in einer Fraktion gemessen werden, was für eine peroxisomale Lokalisierung der β -Oxidation in *A. gossypii* spricht (Abb. 30).

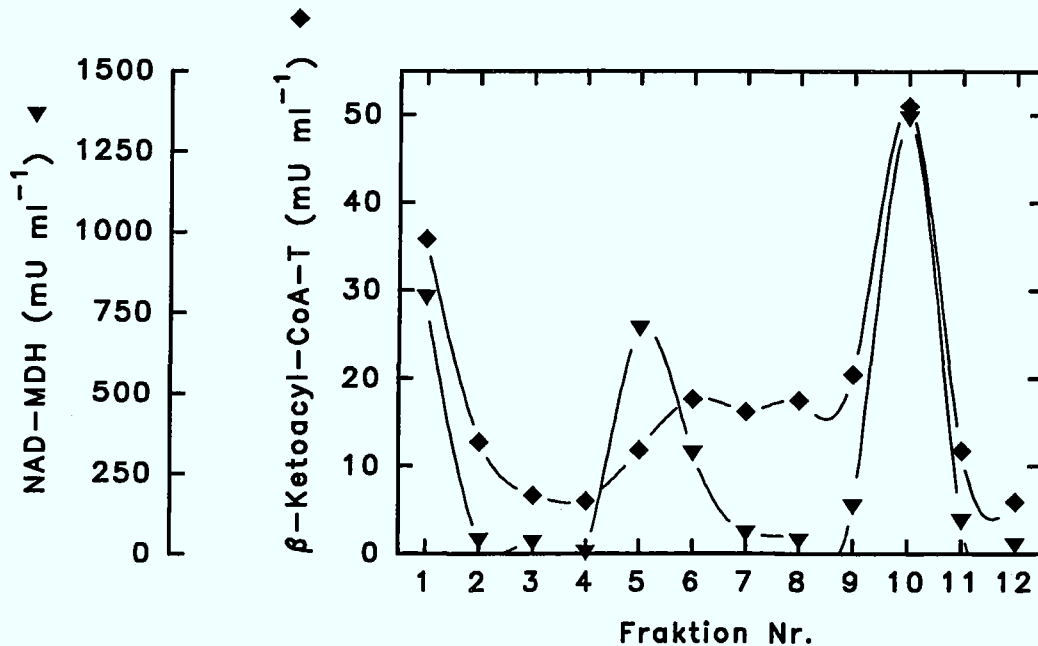


Abb. 30. Verteilung der NAD-abhängigen MDH und der 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase in einem Saccharose-Dichtegradienten, der mit Organellen aus dem Myzel einer auf Sojaöl gewachsenen Kultur von *A. gossypii* WT beladen worden war. Anhand der Markerenzyme Katalase und Cytochrom c Oxidase (s. Abb. 25a) konnte jeweils eine NAD-abhängige MDH in Mitochondrien und Peroxisomen lokalisiert werden, während die 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase ausschließlich peroxisomal vorlag.

2. Nebenproduktbildung von *A. gossypii* WT bei Wachstum auf Glucose

(Crabtree-Effekt)

Die bei Wachstum auf Mischsubstrat Glucose/Ethanol gemessene Zunahme der Ethanolkonzentration bei noch vorhandener Glucose (s. Abb. 24, S. 53) sowie der in Schüttelkolben-Kulturen zu beobachtende Anstieg der ICDH-Aktivitäten nach Glucoseverbrauch (s. Tab. 4, S. 54) deuteten auf die Fähigkeit von *A. gossypii* zu einem Gärungsstoffwechsel hin. Der Pilz wurde daher zur Charakterisierung des Stoffwechsels auf Glucose über 78 h im Fermenter kultiviert. Über die Kulturdauer wurde in zellfreien Kulturüberständen die Glucose-, die Ethanol- und die Acetat-Konzentration gemessen. Dabei konnte bei einer Anfangskonzentration von 10 g l⁻¹ Glucose eine Ethanolbildung bis auf maximal 4,3 g l⁻¹ bestimmt werden (Abb. 31a). Gleichzeitig konnte eine geringe Acetatbildung (0,2 g l⁻¹) nachgewiesen werden, was mit dem Absinken des pH-Wertes auf pH 5,5 (Abb. 31b) in dieser frühen Phase der Kultivierung korrelierte. Nach Verbrauch der Glucose, d.h. sobald die ICL-Aktivität meßbar wurde, sanken die Konzentrationen dieser Nebenprodukte wieder ab, und der pH-Wert stieg auf 7,7 an.

Die beobachtete Ethanol- und Acetatbildung konnte durch die bei dieser Kultivierung aufgetretene Sauerstoff-Limitierung (Abb. 31b) hervorgerufen worden sein. Dies würde auf eine für *S. cerevisiae* in der Literatur als "Pasteur-Effekt" beschriebene Stoffwechselregulation bei Wachstum auf Glucose hindeuten (Käppeli, 1986; Fiechter et al., 1981). Sofern diese Regulation auch bei *A. gossypii* vorliegt, sollte durch überschüssigen Sauerstoffeintrag die Nebenproduktbildung aus Glucose unterdrückt werden können.

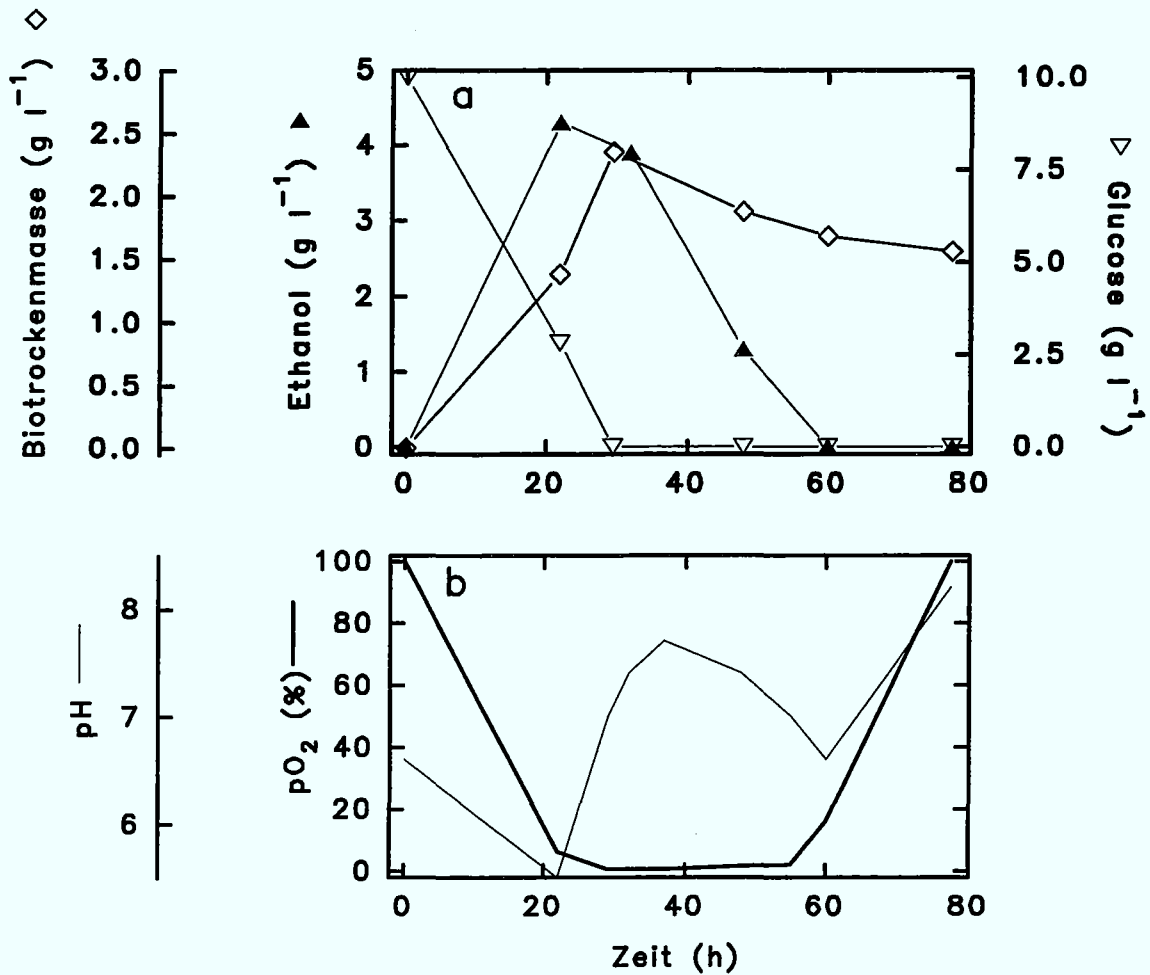


Abb. 31. Wachstum von *A. gossypii* WT auf Glucose-Medium im 3 l-Fermenter. Die Änderungen von Biotrockenmasse sowie von Glucose und Ethanol während der Kultivierung sind dargestellt (a). Der pH-Wert und der Sauerstoffpartialdruck (pO₂) im Medium wurden über die Kulturdauer aufgezeichnet (b).

III. ERGEBNISSE

In einer weiteren Kultivierung auf Glucose-Medium wurde daher ein Sollwert für den Sauerstoffpartialdruck im Medium von 30 % vorgegeben. In diesem Fall kam es zur Ethanolbildung auf maximal $2,2 \text{ g l}^{-1}$ (Abb. 32a), die von einer mit dem Absinken des pH-Wertes auf pH 5,6 (Abb. 32b) korrelierenden Acetatbildung ($0,3 \text{ g l}^{-1}$) begleitet wurde. Die zu Beginn der Kultivierung bei hoher Glucosekonzentration und starker Ethanolbildung bestimmten, geringen spezifischen Enzymaktivitäten von ICL, NAD-abhängiger ICDH und NADP-abhängiger ICDH stiegen mit Verbrauch der Glucose auf Maximalwerte von $0,26 \text{ U (mg Protein)}^{-1}$ für die ICL, $0,52 \text{ U (mg Protein)}^{-1}$ für die NAD-abhängige ICDH und $2,60 \text{ U (mg Protein)}^{-1}$ für die NADP-abhängige ICDH an (Tab. 6). Setzt man die bei hoher Glucosekonzentration bestimmten spezifischen Aktivitäten in Relation zu dem jeweils nach Glucoseverbrauch erreichten Maximalwert, so ließ sich für die ICL ein Repressionsfaktor von mindestens 50 kalkulieren, während für die NAD-abhängige ICDH und die NADP-abhängige ICDH kleinere Repressionsfaktoren von 2 bzw. 18 errechnet werden konnten.

Der negativ regulierende Effekt hoher Glucosekonzentrationen auf die untersuchten Enzymaktivitäten, sowie die trotz ausreichender Sauerstoffversorgung aufgetretene Nebenproduktbildung sind charakteristisch für eine als "Crabtree-Effekt" beschriebene Regulation des Stoffwechsels bei Wachstum auf Medien mit hoher Glucose-Konzentration (de Deken, 1966; Käppeli, 1986; Postma et al., 1989). *A. gossypii* konnte folglich als "Crabtree-positiver" Pilz (van Dijken et al., 1993) klassifiziert werden.

	ICL	NADP-ICDH	NAD-ICDH
Glucose vorhanden (21 h alte Kultur)	<0,005	0,14	0,23
Glucose verbraucht (50 h alte Kultur)	0,26	2,60	0,52
Repressionsfaktor	50	18	2

Tab. 6. Spezifische Enzymaktivitäten Isocitrat-umsetzender Enzyme [in $\text{U (mg Protein)}^{-1}$] während einer Kultivierung von *A. gossypii* WT auf Glucose unter überschüssigem Sauerstoffeintrag. Aus den angegebenen Daten für die spezifische Enzymaktivität vor und nach Verbrauch der Glucose (aus Abb. 32 entnommen) wurden Repressionsfaktoren für die untersuchten Enzyme berechnet.

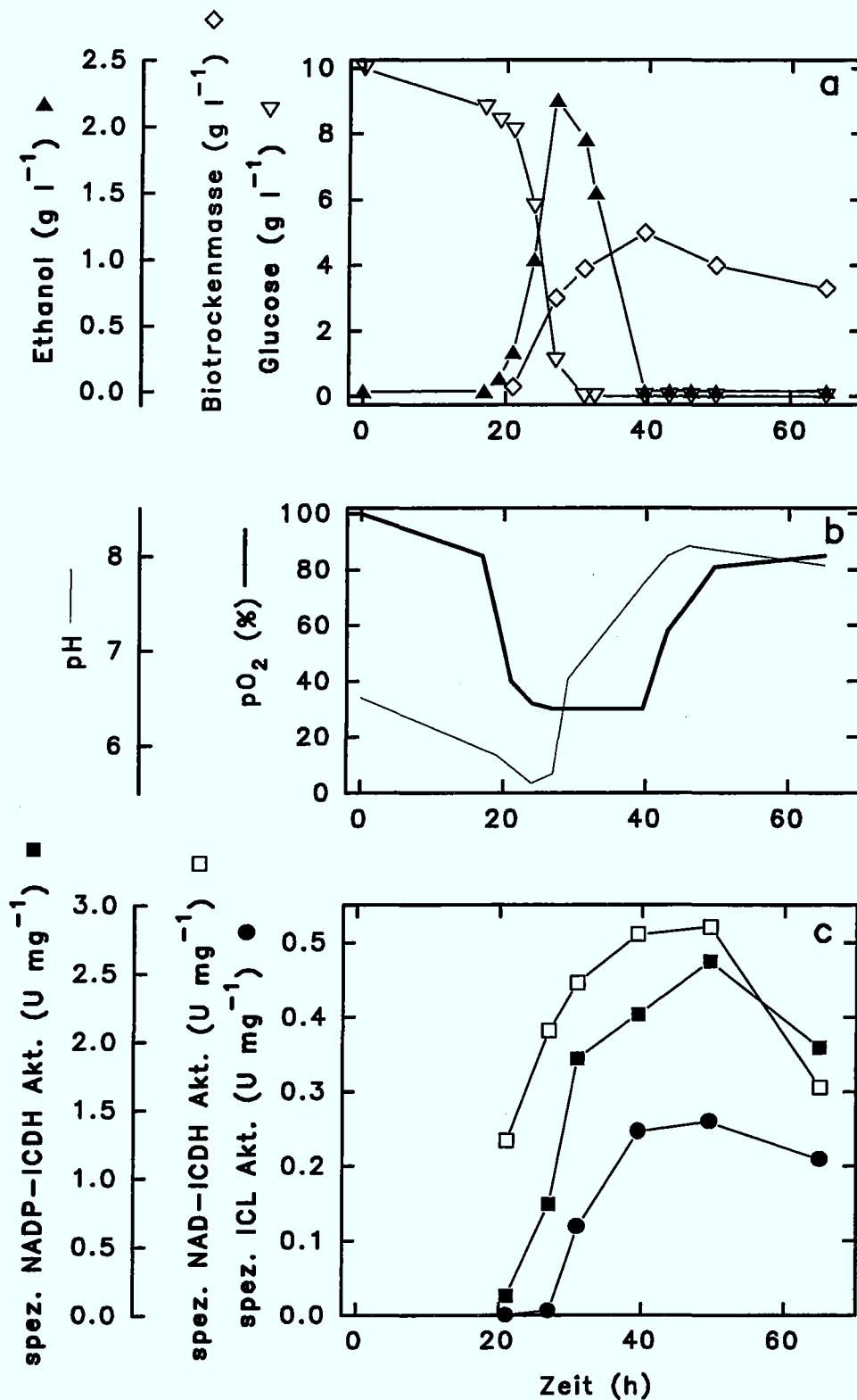


Abb. 32. Wachstum von *A. gossypii* WT auf Glucose-Medium im 3 l-Fermenter bei überschüssigem Sauerstoffeintrag. Änderungen von Biotrockenmasse sowie von Glucose und Ethanol im Medium während der Kultivierung sind dargestellt (a). Der pH-Wert und der Sauerstoffpartialdruck (pO₂) wurden über die Kulturdauer aufgezeichnet (b). Zudem wurde die spezifische Enzymaktivität von ICL, NAD- und NADP-abhängiger ICDH zu den angegebenen Zeiten bestimmt (c).

3. Untersuchungen zur Regulation der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase aus *A. gossypii*

3.1. Entwicklung eines neuen 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase(HBS) - Enzymtests

Durch die HBS-Aktivität wird aus Ribulose-5-P ein C₄-Körper, das 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (DHB-P), für die Xylenring-Bildung der Riboflavinvorstufe 6,7-Dimethylribityllumazin bereitgestellt. Aus zwei Molekülen dieser Vorstufe wird dann in einer Dismutationsreaktion das Isoalloxazin-Ringsystem des Riboflavinmoleküls gebildet, so daß letztlich über die HBS die Hälfte des Kohlenstoffs in das Riboflavinmolekül eingebracht wird. Das Enzym ist bisher nur für *C. guilliermondii* (Volk & Bacher, 1990) und *E. coli* (Richter et al., 1992) beschrieben worden. Untersuchungen hinsichtlich der Regulation liegen nicht vor. Mit *A. gossypii* sollten daher erstmals Regulationsstudien zu diesem Enzym durchgeführt werden, um dessen Rolle bei der Regulation der Riboflavinbiosynthese erkennen zu können.

Der von Volk & Bacher (1990) entwickelte diskontinuierliche Test zur Messung der HBS ist methodisch insofern aufwendig, als für den Nachweis des Enzymprodukts DHB-P eine Vorstufe des 6,7-Dimethylribityllumazins chemisch synthetisiert und die Riboflavinsynthese von *B. subtilis* isoliert werden muß. Ein neues Testsystem sollte daher einen vereinfachten, spezifischen Nachweis des Enzymprodukts ermöglichen. Um eine möglichst große Enzymmenge für die Entwicklung eines solchen Tests zur Verfügung zu haben, wurde die *E. coli* eigene, auf einem Expressionsvektor (pJR 958) vorliegende HBS im *E. coli* Stamm JM 109 (DE 3) überexprimiert. Dabei zeigte sich, daß zur Überexpression bereits eine Derepression der T7-Polymerase ausreichend war, da die HBS nach 3 h Wachstum von *E. coli* in Glucose-freiem Medium unabhängig von der IPTG-Zugabe stark überexprimiert wurde (Abb. 33).

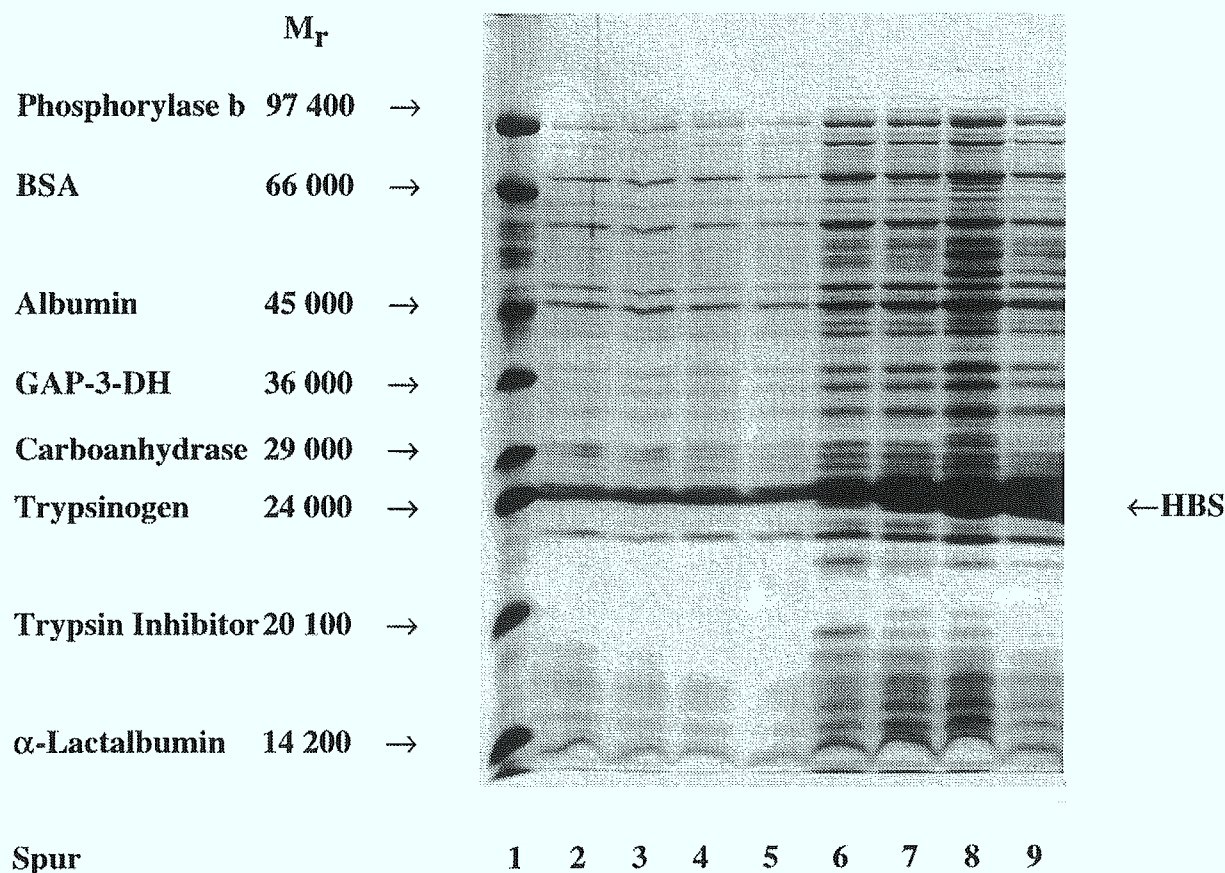


Abb. 33. HBS-Überexpression durch Transformation von *E. coli* JM 109 (DE 3) mit dem Plasmid pJR958. Durch Messung der OD600 wurden von jeder Kultur anhand der Zellzahl entsprechend gleiche Proteinmengen auf ein SDS-Gel aufgetragen.

Spur 1: Marker,

Start der IPTG-Induktion

Spur 2: LB-Medium + Glucose

Spur 3: LB-Medium + Glucose + IPTG

Spur 4: LB-Medium

Spur 5: LB-Medium + IPTG

nach 3 h IPTG-Induktion

Spur 6: LB-Medium + Glucose

Spur 7: LB-Medium + Glucose + IPTG

Spur 8: LB-Medium

Spur 9: LB-Medium + IPTG

III. ERGEBNISSE

Mit einem Zellextrakt, der aus einer HBS-überexprimierenden Kultur von *E. coli* JM 109 (DE 3) hergestellt wurde, konnte die HBS-Aktivität mit dem neuen Test nachgewiesen werden, indem das entstandene Enzymprodukt (DHB-P) nach Inkubation mit alkalischer Phosphatase als 3,4-Dihydroxy-2-butanon (DHB) durch HPLC detektiert wurde (Abb. 34). Durch die Übereinstimmung der Retentionszeit des im Test gebildeten Hauptproduktes (26.79 min) mit der der Referenzsubstanz (26.80 min; Tab. 7) konnte der entsprechende Peak im Chromatogramm als DHB identifiziert werden (Abb. 34 a+b). Durch die Zugabe der DHB-Referenzsubstanz zur HPLC-Probe erhöhte sich ausschließlich der DHB-Peak im Chromatogramm. Dieses sogenannte "Spiking" bestätigte damit das Vorhandensein von DHB im Testansatz. Weiterhin sprach das UV/RI-Signal-Verhältnis (Binder, 1980), das sich aus den jeweiligen Flächenwerten von UV- und RI-Detektion für eine Substanz errechnen ließ, für die Bildung von DHB (Tab. 7). Das im Testansatz detektierte DHB wies ein UV/RI-Signal-Verhältnis von 22,6 auf, was mit dem Wert der Referenzsubstanz (24,0) gut übereinstimmte. Kontrollen mit Zellextrakten aus *E. coli* JM 109 (DE 3)-Zellen ohne Plasmid (Abb. 34c) und mit gekochtem Zellextrakt des HBS-Überexprimierers zeigten keine nachweisbare Produktbildung.

Substanz	Retentionszeit (min)	UV/RI-Signal- Quotient
Glucose	17.28	0,05
Fructose	18.85	0,32
Ribose	20.80	3,2
Ribulose	20.80	-
Dihydroxyaceton	25.04	6,0
Glycerinaldehyd	25.04	-
DHB	26.80	24,0

Tab. 7. Retentionszeiten und UV/RI-Signal-Verhältnis einiger Referenzsubstanzen. Die Daten wurden aus HPLC-Analysen mit aufeinanderfolgender UV- und RI-Detektion bestimmt.

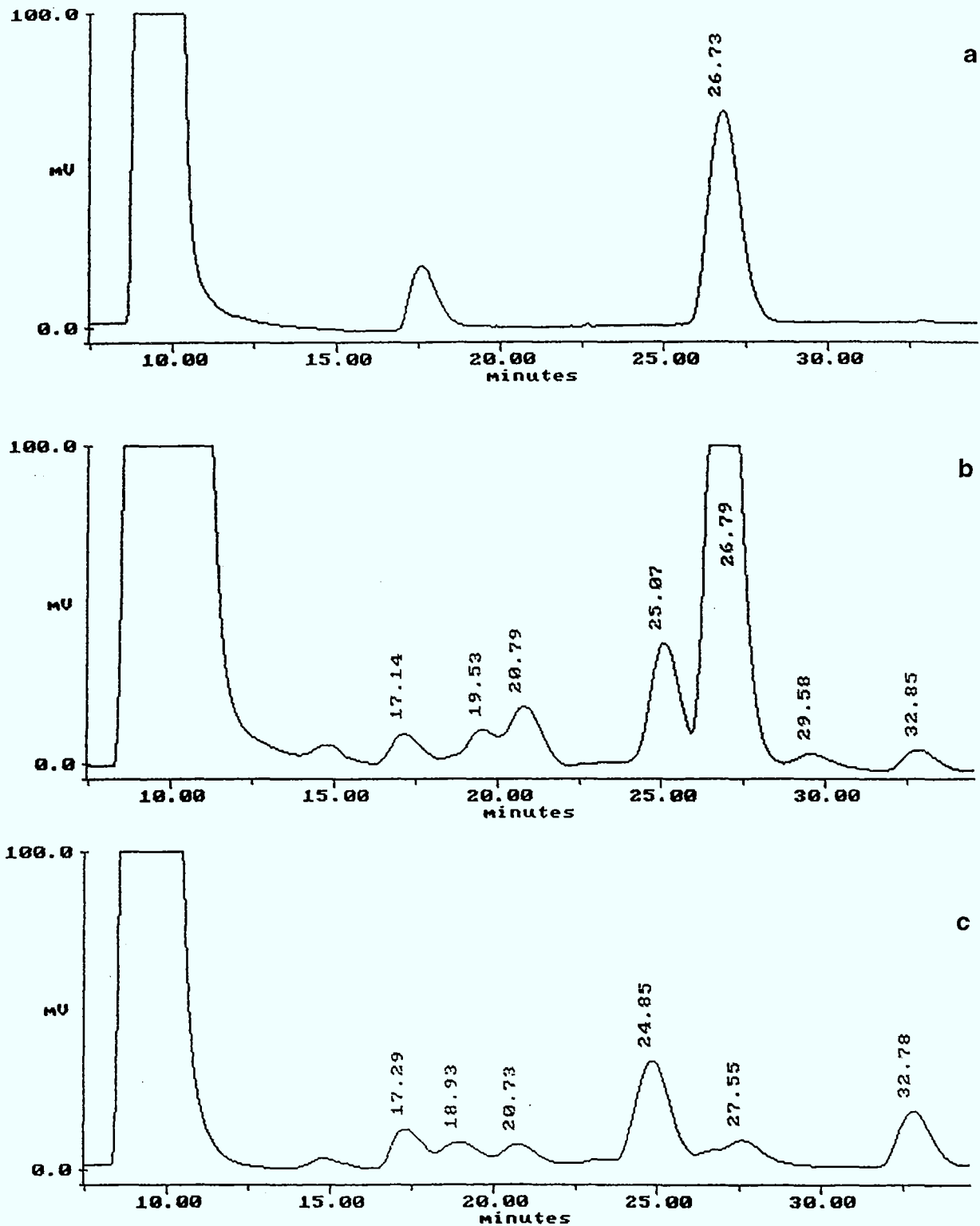


Abb. 34. Nachweis der HBS-Aktivität mit dem HBS-überexprimierenden *E. coli* Stamm JM 109 (DE 3) pJR958.

Die HPLC-Chromatogramme (UV-Detektion) der Referenzsubstanz (a) und der im Enzymtest mit Zellextrakten von *E. coli* JM 109 (DE 3) pJR958 (b) und *E. coli* JM 109 (DE 3) (Kontrolle ohne Plasmid; c) entstandenen Produkte sind dargestellt. Das im Test (b) detektierte Hauptprodukt (26.79 min) wies dieselbe Retentionszeit wie die DHB-Referenzsubstanz (a) auf.

Mit Zellextrakten aus *A. gossypii* konnte zunächst keine HBS-Aktivität gemessen werden. Die Auswertung entsprechender HPLC-Chromatogramme zeigte eine Bildung von C₃-, C₄- C₅- und C₆-Körpern im Test an (Abb. 35a). Dabei dürfte es sich um Zuckermoleküle aus dem Pentose-Phosphat-Weg handeln, die im Testansatz ausgehend von Ribose-5-P durch die Enzyme dieses Stoffwechselweges, z.B. die Transketolase, synthetisiert werden können. Zusammen mit der offenbar im Zellextrakt vorhandenen Phosphatase-Aktivität (Abb. 35b), durch die sowohl das eingesetzte Substrat Ribose-5-P, als auch die über die Enzyme des Pentose-Phosphat-Weges entstehenden Zuckerphosphate dephosphoryliert wurden, dürfte es so zu einer schnellen Verarmung des Ansatzes an Substrat gekommen sein. Dadurch konnte eine DHB-Bildung im Testansatz nicht nachgewiesen werden. Erst nach der Proteinfractionierung mit einer Sephacryl S-200-Säule konnte die HBS-Aktivität in einem Zellextrakt von *A. gossypii* Ita-GS01 detektiert werden. Dazu wurden die S-200-Gelchromatographie-Fractionen zu 4 Pools vereinigt (Abb. 36; I, II, III, IV) und nach Aufkonzentrierung durch Ultrafiltration hinsichtlich ihrer HBS-Aktivität untersucht. Mit Aliquots aus Pool III konnte eine DHB-Bildung nachgewiesen werden. Ein aus HBS-Bestimmungen in neun S-200-Säulenfraktionen erhaltenes Aktivitätsprofil bestätigte dieses Ergebnis (Abb. 36). Das im Enzymtest gebildete DHB wies ein UV/RI-Signal-Verhältnis von 22,6 auf, was gut mit dem UV/RI-Signal-Verhältnis der Referenzsubstanz (24,0) übereinstimmte. Mit weiteren Enzymtests wurde die Protein- und Zeitabhängigkeit der DHB-Bildung gezeigt, so daß die Produktbildung eindeutig auf eine enzymatische Reaktion zurückgeführt werden konnte. Mit diesem neuen Test-System stand nun eine Methode zur Untersuchung der HBS aus *A. gossypii* zur Verfügung.

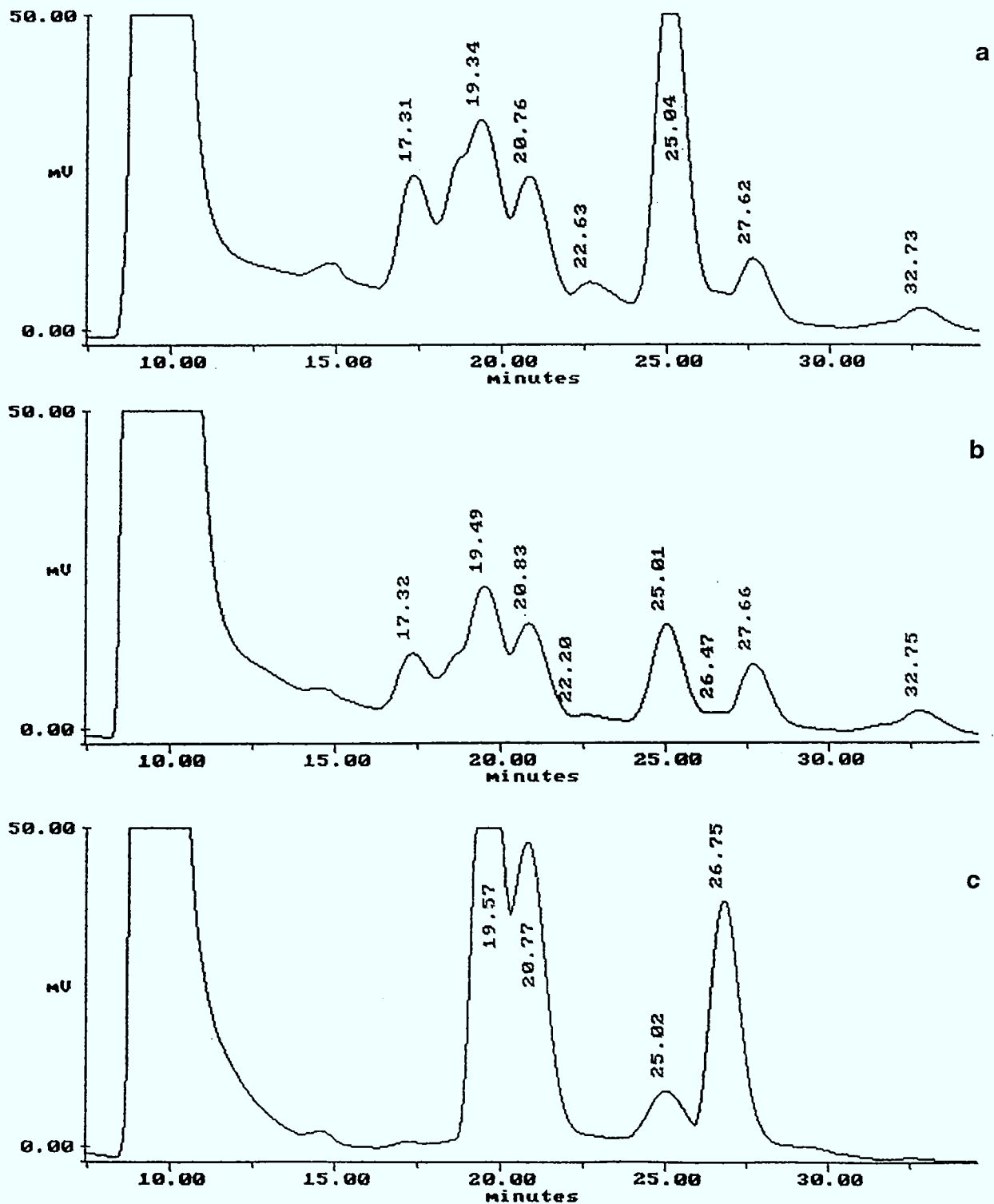


Abb. 35. Nachweis der HBS-Aktivität aus *A. gossypii* Ita-GS01 Zellextrakten.

HPLC-Chromatogramme (UV-Detektion) der Testansätze, in die Zellextrakte ohne vorherige Proteinfractionierung eingesetzt worden waren, nach Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase (a) bzw. ohne Dephosphorylierung (b) sind dargestellt. In dem mit einer S-200-Gelchromatographie-Fraktion durchgeführten Test (c) konnte DHB (26.75 min) und damit HBS-Aktivität nachgewiesen werden.

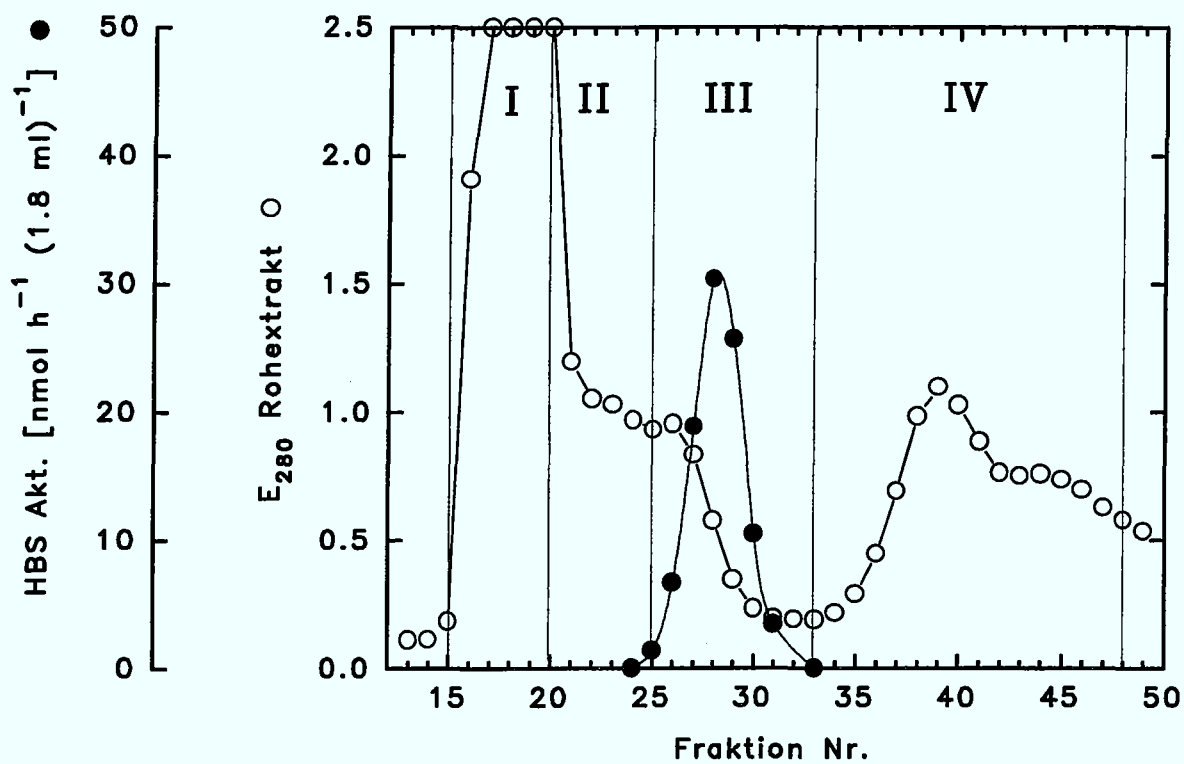


Abb. 36. Elutionsprofil einer Sephacryl S-200-Chromatographie mit einem Zellextrakt von *A. gossypii* Ita-GS01. Die HBS-Aktivität konnte durch HPLC-Analyse der Testansätze in Fraktionen von Pool III detektiert werden

3.2. Eigenschaften der HBS

Die Darstellung der Umsatzraten für die HBS aus der *A. gossypii* Mutante Ita-GS01 als Funktion der im Test eingesetzten Ribose-5-P-Konzentrationen ergaben eine Michaelis-Menten-Kinetik, aus der ein K_m für Ribose-5-P von 0,8 mM bestimmt werden konnte (Abb. 37). Bei Bewertung dieser Konstante ist zu berücksichtigen, daß nicht Ribose-5-P, sondern Ribulose-5-P das eigentliche Substrat für die HBS darstellt. Ribose-5-P wurde im Enzymtest eingesetzt, da es stabiler ist als Ribulose-5-P und deshalb in Verbindung mit einer Phosphoriboisomerase bei den langen Inkubationszeiträumen des Tests höhere Umsätze liefert (Volk & Bacher, 1990). Das mit einem TRIS/HCl Puffer bestimmte pH-Optimum der enzymatischen Umsetzung lag bei pH 7,5. Das Enzym ist bei 4 °C in Gegenwart von Proteasehemmstoffen (PMSF, Antipain, Leupeptin) nur begrenzt haltbar (20 % Aktivitätsverlust nach 4 Tagen). Durch Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und anschließende Lagerung bei -70 °C konnten S-200-Säulenfraktionen ohne Aktivitätsverlust über mindestens 3 Wochen aufbewahrt werden.

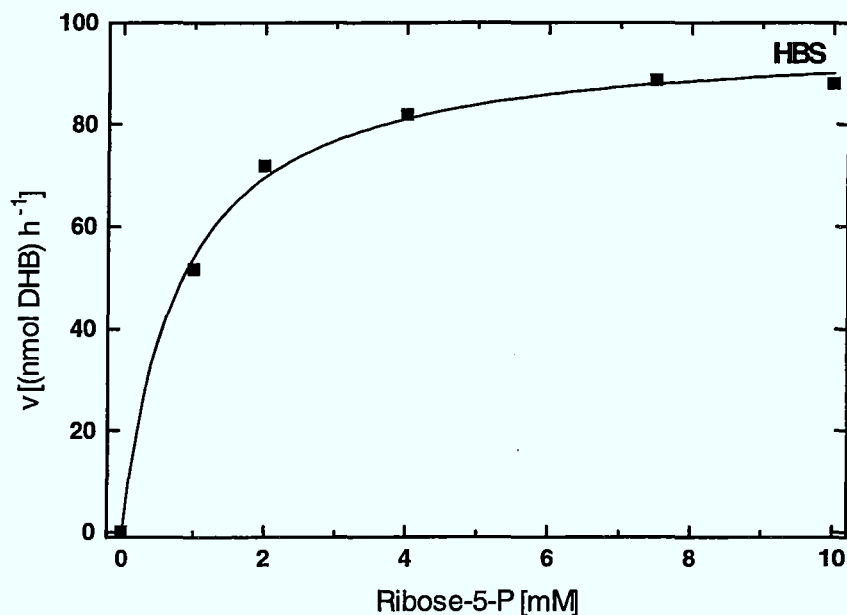


Abb. 37. Umsatzraten der HBS aus der *A. gossypii* Mutante Ita-GS01 als Funktion der im Enzymtest eingesetzten Ribose-5-P-Konzentrationen.

3.3. Riboflavinbildung und spezifische HBS-Aktivität von *A. gossypii* WT und Itaconat-resistenter Mutante bei Wachstum auf Glucose- oder Sojaöl-Medium

Mit dem neu entwickelten Enzymtest zur Bestimmung der HBS sollte geklärt werden, ob das Enzym in *A. gossypii* reguliert wird, und ob sich der *A. gossypii* WT und die Itaconat-resistente Mutante in ihrer spezifischen HBS-Aktivität unterscheiden.

Bei Kultivierungen auf Glucose-Medium im Fermenter war, im Gegensatz zur ICL, die HBS-Aktivität bei noch vorhandener Glucose sowohl beim WT, als auch bei der Mutante Ita-GS01 nachweisbar (Abb. 38). In dieser frühen Phase der Kultivierung, in der mit der vorhandenen HBS-Aktivität allein die für das Wachstum erforderliche Riboflavinmenge synthetisiert werden dürfte, lag die spezifische HBS-Aktivität der Mutante mit $11,7 \text{ nmol h}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ ca. 5-fach höher als beim WT [$2,5 \text{ nmol h}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$]. Im Verlauf der Riboflavinbildung erreichten der WT und die Mutante eine maximale spezifische HBS-Aktivität von ca. $150 \text{ nmol h}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$. Der für die Kultur der Mutante am Ende der Kultivierung bestimmte Riboflavingehalt (109 mg l^{-1} Riboflavin) lag um den Faktor 8,5 über dem des WT.

Bei Wachstum auf Sojaöl-Medium kam es beim WT ausgehend von $41,5 \text{ nmol h}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ im weiteren Verlauf der Kultivierung zu einer stetigen Abnahme der spezifischen HBS-Aktivität (Abb. 39). Bei der Mutante Ita-GS01 dagegen erreichte die spezifische HBS-Aktivität nach $41,5 \text{ nmol h}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ zu Beginn der Kultivierung mit einsetzender Riboflavinbildung ihren Maximalwert [$93,0 \text{ nmol h}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$] und nahm erst in der späten Phase der Kultivierung ab. Während der Riboflavinbildungsphase lag die spezifischen HBS-Aktivität der Mutante zunächst um den Faktor 3 (46 h Kulturdauer), später ca. um den Faktor 8 (97 h Kulturdauer) über der spezifischen Enzymaktivität des WT. Der für die Kultur der Mutante ermittelte Endwert für Riboflavin (179 mg l^{-1} Riboflavin) lag um den Faktor 8,5 über dem des WT. Trotz geringerer spezifischer HBS-Aktivität auf Sojaöl-Medium synthetisierten sowohl WT als auch die Mutante Ita-GS01 auf diesem Medium 1,6 mal mehr Riboflavin.

Die Änderung der spezifischen HBS-Aktivität im Verlauf der Kultivierungen weist auf eine Regulation der HBS-Aktivität hin. Diese korreliert mit der Riboflavinbildung insofern, als es mit beginnender Riboflavinproduktion zu einem Anstieg der spezifischen Enzymaktivität kommt. Während der Riboflavinbildung liegen die Werte der spezifischen HBS-Aktivität für die Itaconat-resistente Mutante, mit Ausnahme des zuletzt ermittelten Datenpunktes bei Wachstum auf Glucose-Medium (Abb. 38), deutlich über den entsprechenden Werten für den WT. Dies weist für die Itaconat-resistente Mutante von *A. gossypii* auf eine veränderte Regulation hin, die nicht nur die ICL, sondern auch die HBS betrifft.

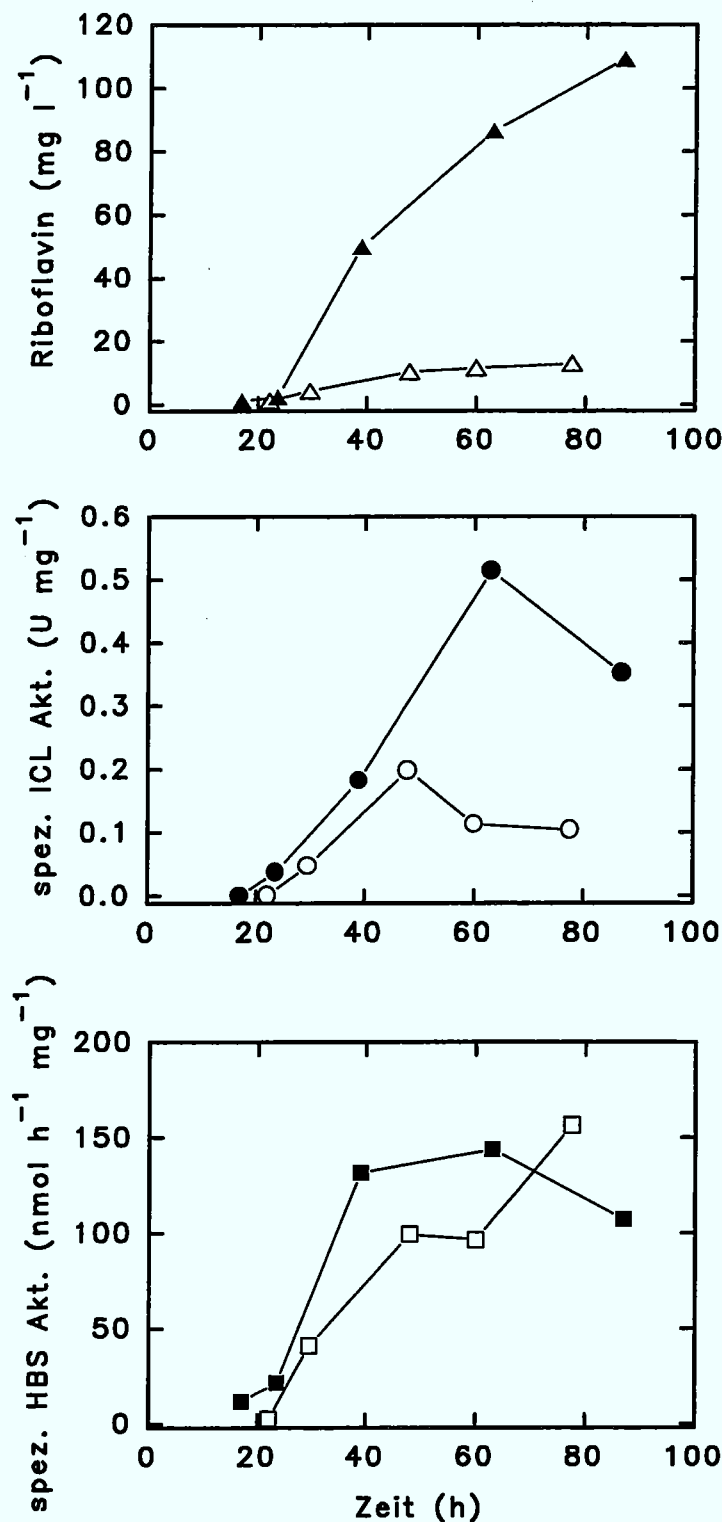


Abb. 38. Riboflavingehalt (▲,△), spezifische ICL-Aktivität (●,○) und spezifische HBS-Aktivität (■,□) während Kultivierungen von *A. gossypii* WT (□,○,△) und Itaconat-resistenter Mutante Ita-GS01 (■,●,▲) auf Glucose. Die Daten sind aus je einer Kultivierung im 3 l-Fermenter ermittelt worden.

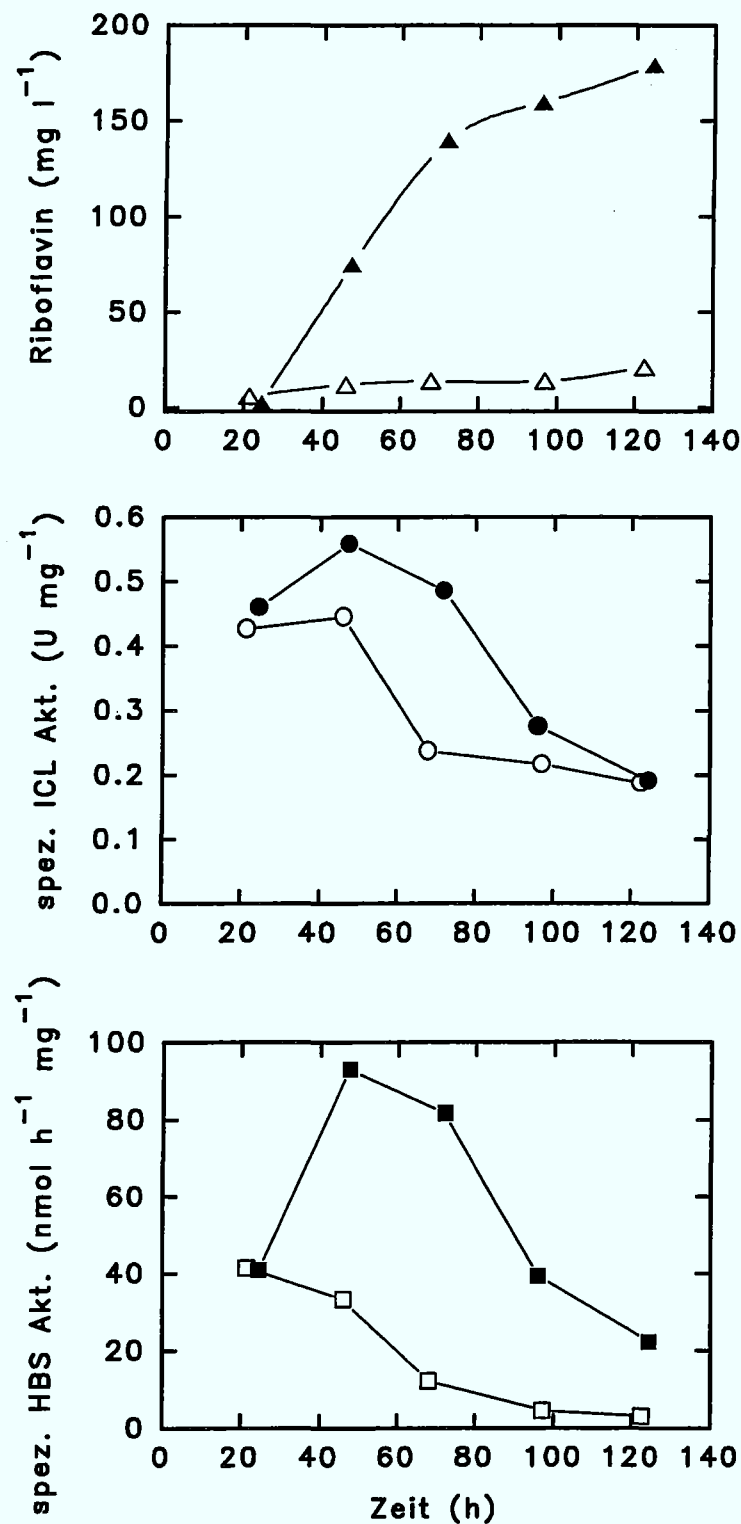


Abb. 39. Riboflavingehalt ($\blacktriangle, \Delta$), spezifische ICL-Aktivität ($\bullet, \circ$) und spezifische HBS-Aktivität ($\blacksquare, \square$) während Kultivierungen von *A. gossypii* WT ($\square, \circ, \Delta$) und Itaconat-resistenter Mutante Ita-GS01 ($\blacksquare, \bullet, \blacktriangle$) auf Sojaöl. Die Daten sind aus je einer Kultivierung im 3 l-Fermenter ermittelt worden.

Daß die HBS-Aktivität unter den hier gewählten Bedingungen nicht der limitierende Faktor für die Riboflavinbiosynthese war, konnte aus den Riboflavinbildungsrate der Mutante Ita-GS01 geschlossen werden. Die bei Wachstum auf Glucose-Medium errechnete Rate von 3,06 mg Riboflavin $l^{-1} h^{-1}$ zu Beginn der Riboflavinsynthese (Abb. 40) sollte auch im weiteren Verlauf der Kultivierung aufrecht erhalten werden können, da die spezifische Enzymaktivität auf einem hohem Level von ca. 140 $nmol h^{-1} (mg Protein)^{-1}$ blieb. Während der Riboflavinbildungsphase sank die Rate aber von 3,06 über 1,53 auf 0,95 mg Riboflavin $l^{-1} h^{-1}$ ab. Anhand einer Kalkulation, in die die *in vitro* Enzymaktivität von 132 $nmol h^{-1} (mg Protein)^{-1}$ (39 h alte Kultur) sowie die im Fermenter vorhandene Biomassekonzentration und deren Proteingehalt eingingen, konnte eine theoretisch mögliche Riboflavinbildungsbildungsrate von ca. 6,0 mg Riboflavin $l^{-1} h^{-1}$ errechnet werden, d. h. eine doppelt so hohe Rate als die effektiv in dieser Phase der Kultivierung gefundene.

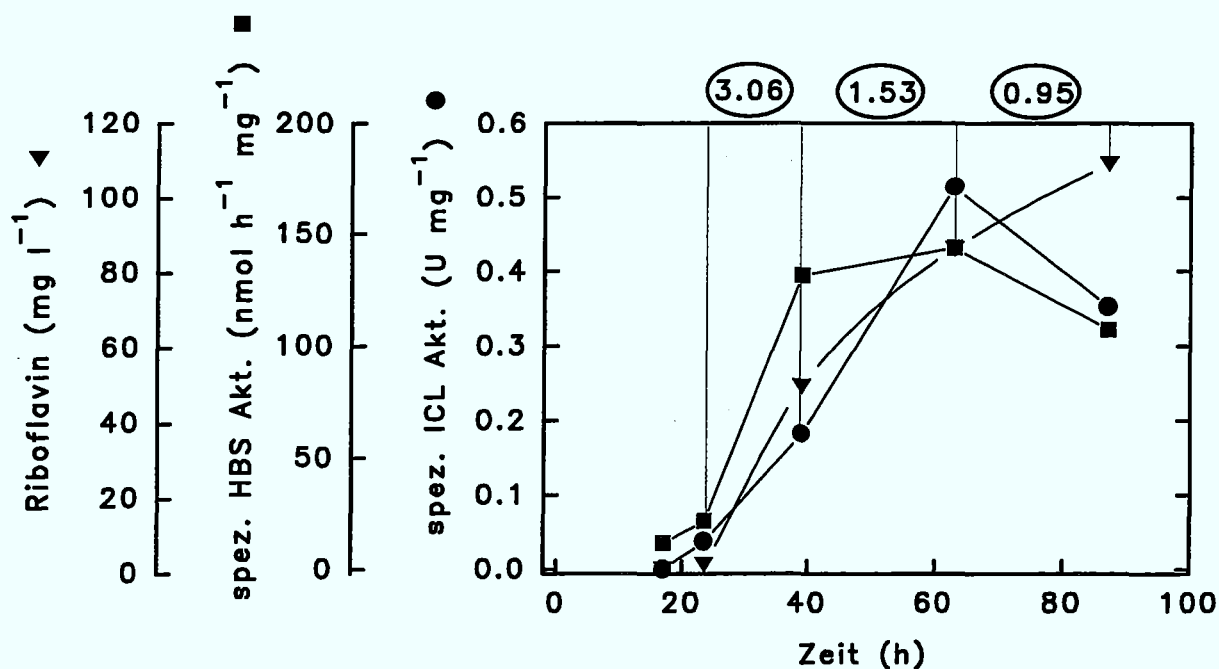


Abb. 40. Kultivierung von *A. gossypii* Ita-GS01 auf Glucose-Medium im 3 l-Fermenter. Die Änderungen von Riboflavingehalt, sowie von spezifischer ICL- und HBS-Aktivität während der Kultivierung sind dargestellt. Die Riboflavinbildungsrate (eingekreist; Angaben in mg Riboflavin $l^{-1} h^{-1}$) wurden aus einer für das jeweilige Intervall linearisierten Kurve berechnet.

Bei Wachstum auf Sojaöl-Medium (Abb. 41) konnte für die Mutante zu Beginn der Riboflavinbildung, trotz der im Vergleich zum Wachstum auf Glucose verringerten spezifischen HBS-Aktivität von $93 \text{ nmol h}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$, eine vergleichbare Rate von $3,15 \text{ mg Riboflavin l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ errechnet werden, die im weiteren Verlauf auf $2,65$ bzw. $0,83 \text{ mg Riboflavin l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ absank. Da sich der Proteingehalt der Biomasse und die Biomassekonzentration im Medium bei Wachstum auf Sojaöl und auf Glucose nicht unterscheiden, sollte immer noch eine 1,5-fach höhere als die effektiv vorliegende Riboflavinsyntheserate möglich sein. Diese Daten deuten auf eine Substratlimitierung der HBS-Reaktion in *A. gossypii* hin.

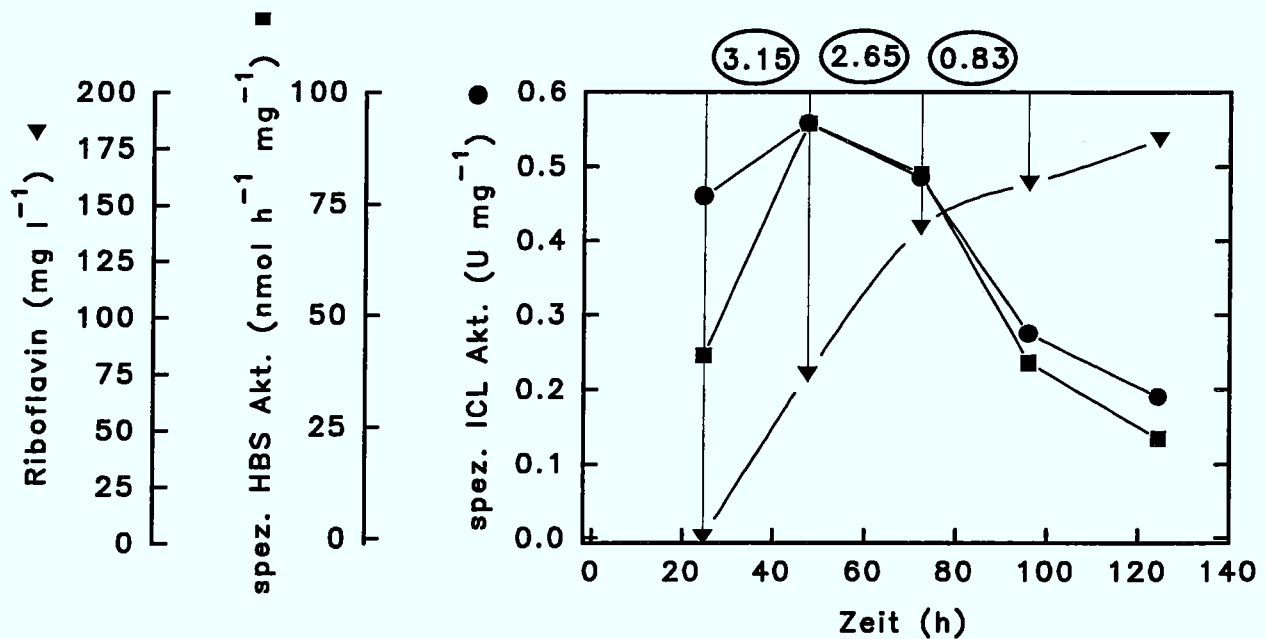


Abb. 41. Kultivierung von *A. gossypii* Ita-GS01 auf Sojaöl-Medium im 3 l-Fermenter. Die Änderungen von Riboflavingehalt, sowie von spezifischer ICL- und HBS-Aktivität während der Kultivierung sind dargestellt. Die Riboflavinbildungsrate (eingezeichnet; Angaben in $\text{mg Riboflavin l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) wurden aus einer für das jeweilige Intervall linearisierten Kurve berechnet.

IV. DISKUSSION

Die ICL aus *A. gossypii*

Der Pilz *A. gossypii* produziert bei Wachstum auf Sojaöl erhebliche Mengen an Riboflavin. Um die Fettsäuren im Triacylglycerid zu metabolisieren, ist die Aktivität der ICL, des Schlüsselenzyms aus dem Glyoxylatzyklus, erforderlich. Wie erwartet konnte die ICL von *A. gossypii* bei Wachstum auf Sojaöl gemessen werden. Dagegen konnte die ICL-Aktivität bei Wachstum mit Glucose als Kohlenstoffquelle erst nach Glucoseverbrauch detektiert werden. Auf beiden Medien setzte mit ansteigender ICL-Aktivität auch die Riboflavinbildung ein. Insbesondere die auf Glucose-Medium zu beobachtende Korrelation zwischen ICL-Aktivität und Riboflavinproduktion war der Grund für eine eingehende Untersuchung der ICL-Regulation. Für diese Untersuchungen zur Regulation war die Aufreinigung des Enzyms erforderlich. Dabei ließ sich eine Katalase nur schwer von der ICL abtrennen. Dieses Problem war bisher nur bei ICL-Aufreinigungen aus Pflanzen aufgetreten (Vanni et al., 1990, Pinzauti et al., 1986), wurde aber bisher nicht für Pilze beschrieben. Der überwiegende Teil der für Eukaryonten beschriebenen Isocitrat-Lyasen weist eine tetramere Struktur bestehend aus nicht glycosilierten Untereinheiten mit einem M_r im Bereich von 60 000-70 000 auf (Vanni et al., 1990). Das für die ICL von *A. gossypii* bestimmte M_r für die auch hier nicht glycosilierte Untereinheit von 66 000, sowie das M_r des nativen Enzyms von 254 000 stimmen mit diesen Literaturdaten sehr gut überein.

Für die ICL aus *A. gossypii* konnte *in vitro* eine Abhängigkeit der Enzymaktivität von Mg^{2+} -Kationen gezeigt werden. Mg^{2+} -Konzentrationen über 5 mM hatten unter den hier im Test vorgegebenen Bedingungen einen hemmenden Effekt auf die Enzymaktivität. Diese Mg^{2+} -Abhängigkeit mit einem Optimum der Enzymaktivität im Bereich von 1,5 bis 8,0 mM Mg^{2+} ist als ein generelles Merkmal aller Isocitrat-Lyasen beschrieben worden (Vanni, 1990) und stimmt explizit mit den für die Isocitrat-Lyasen von *Cephalosporium acremonium* (Perdiguero et al., 1995) und von *P. blakesleeana* (Rua et al., 1990) erhaltenen Daten überein. Am Beispiel von *P. pinea* erklärten Giachetti et al. (1988) dieses Verhalten der ICL gegenüber variierenden Mg^{2+} -Konzentrationen anhand eines Modells, in dem der Mg^{2+} -Isocitrat-Komplex das eigentliche Substrat darstellt, und in dem das Mg^{2+} -Ion als sogenannter "nicht essentieller Aktivator" (Segel, 1975) der ICL fungiert. Ferner wird eine Mg^{2+} -bindende Aktivatorstelle am Enzym mit hoher Affinität zusätzlich zu einer Mg^{2+} -bindenden Stelle im katalytischen Zentrum mit niedriger Affinität postuliert. Während freies Mg^{2+} nur an das katalytische Zentrum des aktivierten Enzyms (Mg^{2+} -Enzym-) bindet, besetzt freies Isocitrat das katalytische Zentrum des nicht aktivierten Enzyms (-Enzym-). Dadurch kommt es bei hohen Mg^{2+} -Konzentrationen zur Bildung eines Mg^{2+} -Enzym- Mg^{2+} -Komplexes, während bei geringen Mg^{2+} -Konzentrationen ein Isocitrat-Enzym-Komplex vorliegt. Diese beiden Komplexe sind katalytisch nicht aktiv. Die Charakteristika der ICL von *A. gossypii* in Bezug auf die eingesetzten Mg^{2+} -Konzentrationen stimmen gut mit diesem Modell überein. Da intrazelluläre

Konzentrationen von Mg^{2+} und auch von Isocitrat bisher nicht bekannt sind, ist eine Funktion von Mg^{2+} als Regulator der ICL *in vivo* nicht einschätzbar.

Bei Berücksichtigung des oben dargestellten Modells wird deutlich, daß der für die Spaltung von *threo*-DL-Isocitrat bestimmte K_m -Wert von 0,55 mM von den in dieser Arbeit gewählten Enzymtest-Bedingungen abhängt. Diese moderate Affinität der ICL von *A. gossypii* zum Substrat Isocitrat ist jedoch durchaus vergleichbar mit den Daten anderer, aus Pilzen isolierter Isocitrat-Lyasen. So weist die ICL von *Candida brassicae* (Nakamura et al., 1989) einen K_m von 0,62 mM, die von *Y. lipolytica* (Hönes et al., 1991) einen K_m von 0,6 mM und die von *C. tropicalis* (Tanaka et al., 1977) einen K_m von 1,2 mM für *threo*-DL-Isocitrat auf.

Die von der *A. gossypii* ICL katalysierte Isocitrat-Spaltung wurde in Übereinstimmung mit den bisher für Isocitrat-Lyasen ermittelten Daten (Vanni, 1990) durch verschiedene Metabolite inhibiert. Allerdings waren vergleichsweise hohe Inhibitor-Konzentrationen zur Erzielung eines Hemmeffektes erforderlich. Mit 10 mM PEP, einem der effektivsten Inhibitoren für die ICL von *A. gossypii*, konnte eine 55 %ige Hemmung der Enzymaktivität erreicht werden. Ashworth & Kornberg (1963) beschrieben eine sogenannte "fine-control" des Glyoxylatzyklus basierend auf einer 50 %igen allosterischen Inhibition der ICL von *E. coli* durch 0,1 mM PEP. Dieser Hemmtyp, sowie eine entsprechend hohe Sensitivität gegenüber PEP sind bei *A. gossypii* nicht gegeben. Bei Pilzen konnten die niedrigsten K_i -Werte für PEP mit 0,2 mM für die ICL von *N. crassa* (Johanson et al., 1974) und mit 0,6 mM für die ICL von *P. blakesleeana* (Rua et al., 1990) bestimmt werden. Dies verdeutlicht den geringen Einfluß von PEP auf die ICL von *A. gossypii* und macht somit eine Regulation der ICL auf Enzymaktivitätsebene sehr unwahrscheinlich.

Mit Itaconat und Oxalat konnten allerdings zwei unphysiologische Inhibitoren mit K_i -Werten von 170 μ M bzw. 4 μ M gefunden werden. Diese Substanzen sind auch für die Isocitrat-Lyasen von *P. blakesleeana* (Rua et al., 1990) und *N. crassa* (Rogers & McFadden, 1977) als sehr effektive Hemmstoffe beschrieben worden. Die Inhibierung der Riboflavinbildung durch Itaconat sowohl auf Glucose als auch auf Ölsäure demonstrierte die Bedeutung der ICL für die Riboflavinbiosynthese von *A. gossypii* und unterstützte die Hypothese, daß die ICL-Aktivität des Pilzes einen limitierenden Faktor im Kohlenstofffluß vom Substrat Sojaöl zum Produkt Riboflavin darstellt. Eine Itaconat-resistente Mutante (Ita-GS01) zeigte in Übereinstimmung mit dieser Hypothese bei Wachstum auf Sojaöl im Vergleich zum WT eine signifikante Erhöhung der spezifischen ICL-Aktivität begleitet von einer verstärkten Riboflavinbildung. Dieser Effekt deutete auf eine veränderte Regulation der ICL hin, wenngleich eine Mutation in einem übergeordneten Regulationssystem nicht ausgeschlossen werden kann. Gegen eine Korrelation von ICL-Aktivität und Riboflavinbildung sprach die in der späten Phase der Kultivierung zu beobachtende Divergenz dieser beiden Parameter. Dasselbe Phänomen, also maximale Riboflavinproduktion bei absinkenden Aktivitäten der Enzyme, die zur Bereitstellung von Vorstufen für die Riboflavinbiosynthese notwendig sind, wurde für die Ribitol-Kinase, die Ribose-5'-Phosphatase und die GMP-Nucleosidase in *E. ashbyi* beobachtet und mit einer Beteiligung

dieser Enzyme am Aufbau von Vorstufen-Pools erklärt, die in der Riboflavinbiosynthese verbraucht werden (Metha et al., 1972). Diese Funktion kommt auch der ICL in *A. gossypii* zu. In der betreffenden Phase der Kultivierung müssen zudem keine Wachstumsprozesse mehr durch die ICL unterstützt werden, so daß eine verringerte spezifische ICL-Aktivität, berücksichtigt man den im Vergleich zum Aufbau von Biomasse viel geringeren Kohlenstoffbedarf der Riboflavinbildung, dennoch ausreichend ist für die Bereitstellung von Metaboliten zur Riboflavinbiosynthese. Wie bereits für Kultivierungen von *A. gossypii* im industriellen Maßstab beschrieben worden war (Pfeifer et al., 1950; Goodwin et al., 1959), setzte mit Glucose als Kohlenstoffquelle die Riboflavinbildung erst nach Glucoseverbrauch ein. Bei Wachstum im Fermenter auf dieser Kohlenstoffquelle stellte sich für den WT und die Itaconat-resistente Mutante bezüglich der spezifischen ICL-Aktivität und der Riboflavinbildung dasselbe Bild wie auf Sojaöl dar, d.h. die erhöhte Riboflavinbildung der Mutante ging mit einer erhöhten spezifischen ICL-Aktivität einher. In Schüttelkolben dagegen synthetisierte die Mutante im Vergleich zum WT mehr Riboflavin trotz einer signifikant niedrigeren spezifischen ICL-Aktivität. Inwieweit die verschiedenen Kultivierungsmethoden für diese konträren Ergebnisse eine Rolle spielten, wurde nicht untersucht. Endgültige Klarheit über eine mögliche "Flaschenhals"-Funktion der ICL in der Riboflavinbiosynthese dürfte zukünftig durch Disruption oder Überexpression des Gens für dieses Enzym in *A. gossypii* und eine nachfolgende Charakterisierung dieser gezielt hergestellten Mutanten gewonnen werden.

Da in der vorliegenden Arbeit keine physiologisch relevanten Effektoren für die ICL von *A. gossypii* gefunden wurden, lag eine Regulation des Enzyms auf Ebene der Enzymmenge nahe. Während Glucose auf die ICL-Bildung einen reprimierenden Effekt ausübte, ließ sich mit C₂-Körper liefernden Kohlenstoffquellen ein induzierender Effekt auf die ICL feststellen. Repression und Induktion als Regulationsmechanismen wurden sowohl für die Isocitrat-Lyasen der filamentösen Pilze *N. crassa* (Sjogren & Romano, 1967; Gainey et al., 1991), *A. nidulans* (McCullough & Roberts, 1980; Bowyer et al., 1994) und *P. blakesleeana* (Rua et al., 1989), als auch für die von Hefen beschrieben, so z.B. für verschiedene *Candida*-Arten (Nabeshima et al., 1977a; Okada et al., 1987), für *Y. lipolytica* (Barth, 1985; Barth et al., 1990) und für *S. cerevisiae* (Witt et al., 1966; Gonzales, 1977). Diese Regulationsmechanismen sind Teil eines als "Diauxie" bezeichneten Regulationsphänomens, wie es zuerst von Monod (1942) für *E. coli* bei Wachstum auf Glucose/Sorbit-Gemischen beobachtet werden konnte.

Für *A. gossypii* konnte entsprechend eine Diauxie bei Wachstum auf Glucose/Ethanol-Mischsubstrat gezeigt werden. Diesem Phänomen liegt eine bei Pilzen als "Glucose-Repression" bezeichnete Regulation derjenigen Enzyme zugrunde, die zur Metabolisierung einer schwer verwertbaren Kohlenstoffquelle benötigt werden (Ronne, 1995; Entian & Barnett, 1992; Gancedo, 1992). Während *S. cerevisiae* dieses diauxische Wachstumsverhalten in Batch-Kultivierungen auf Glucose/Acetat-Mischsubstrat ebenfalls zeigt (Witt et al., 1966), konnte im Chemostat unter Glucose-limitierten Bedingungen eine simultane Verwertung von Glucose und Ethanol in Verbindung mit einer moderaten ICL-Aktivität nachgewiesen werden (Herrero et

al., 1985; de Jong-Gubbels et al., 1995), was auf einen von der Glucose-Konzentration abhängigen Regulationsmodus hindeutet. Neben diesen die *de novo* Enzymsynthese betreffenden Regulationsmechanismen wird die ICL von *A. gossypii* über den Proteinabbau reguliert, wie anhand eines Pulsexperiments gezeigt werden konnte. Holzer (1976) führte für dieses Phänomen des Glucose-induzierten proteolytischen Abbaus von Enzymen den Begriff "Katabolit-Inaktivierung" ein. In *S. cerevisiae* erfolgt diese Inaktivierung im Anschluß an eine kovalente Modifizierung der ICL durch Phosphorylierung, die zunächst zu einer reversiblen Abnahme der ICL-Aktivität führt (Lopez-Boado et al., 1988). Die anschließende irreversible Abnahme der Enzymaktivität korreliert mit einer Abnahme an nachweisbarem ICL-Protein (Lopez-Boado et al., 1987). Die Spezifität der abbauenden Proteasen beruht auf der Lokalisierung und den Eigenschaften des Zielproteins (Fiechter et al., 1981). So wird die ICL in *S. cerevisiae* durch eine Decapeptid-Sequenz innerhalb des ICL-Proteins für den proteolytischen Abbau markiert (Ordiz et al., 1995). Für *P. blakesleeanus* konnte nach Transfer von auf Acetat gewachsenem Myzel in Glucose-haltiges Medium ebenfalls eine reversible und eine irreversible Phase der ICL-Aktivitätsabnahme beobachtet werden (Rua et al., 1989). Eine reversible Modifikation der ICL durch Phosphorylierung dürfte für *A. gossypii*, obwohl dies durch Tracer-Experimente nicht explizit gezeigt wurde, ausgeschlossen sein, da es in der ersten Stunde nach dem Glucose-Puls nicht zu einer signifikanten Abnahme der spezifischen Enzymaktivität kam. Eine durch Phosphorylierung hervorgerufene Abnahme der Enzymaktivität vollzieht sich jedoch, wie am Beispiel Fructose-1,6-Bisphosphatase aus Hefe gezeigt wurde (Müller & Holzer, 1981; Mazon et al., 1982), innerhalb von Minuten nach dem Puls. Bei *A. gossypii* wird die Abnahme der ICL-Aktivität folglich allein durch den Abbau des Enzyms bewirkt, was mit der für *A. nidulans* beschriebenen Situation übereinstimmt (De Lucas et al., 1994).

Während in *S. cerevisiae* eine ICL-Aktivitätsabnahme durch Phosphorylierung auftritt, wird in prokaryontischen Organismen wie *E. coli* (Robertson et al., 1988; Hoyt et al., 1994) und *Acinetobacter calcoaceticus* (Hoyt et al., 1994) derselbe Effekt durch Dephosphorylierung der ICL erzielt. Generell scheint eine vergleichsweise schnelle Regulation der ICL durch kovalente Modifikation des Enzyms für die Organismen geboten, bei denen die ICL nicht in Organellen lokalisiert ist. In *S. cerevisiae* konnte bisher tatsächlich eine ICL-Kompartimentierung in Microbodies nicht eindeutig nachgewiesen werden (McCammon et al., 1990), obschon diese Kompartimentierung bei den meisten anderen bisher untersuchten Eukaryonten vorliegt (Cioni et al., 1981). Microbodies werden in *S. cerevisiae* allein bei Wachstum auf Ölsäure induziert, nicht jedoch auf C₂-Körpern oder Aminosäuren, was auf eine enge Assoziation dieser Organellen mit der β -Oxidation schließen läßt (Veenhuis et al., 1987). *C. tropicalis* bildet zahlreiche Microbodies bei Wachstum auf n-Alkanen (Osumi et al., 1975; Tanaka et al., 1982) und auf C₁-Körpern (Veenhuis et al., 1983). Auch in filamentösen Pilzen kann die Induktion von Microbodies in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle beobachtet werden (Maxwell et al., 1975), so z.B. in *N. crassa* bei Wachstum auf Acetat (Desel et al., 1982) bzw. auf Oleat (Kionka & Kunau, 1985). In *A. gossypii* werden Microbodies bei Wachstum auf Sojaöl

induziert. Da diese Microbodies, die durch Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert werden konnten, eine hohe Katalase-Aktivität aufweisen, sind sie als "Peroxisomen" zu bezeichnen (De Duve & Baudhuin, 1966; de Duve, 1983). Die ICL konnte durch enzymatische Bestimmung in den Saccharose-Dichtegradienten-Fraktionen, aber auch durch Immunogold-Markierung von Ultradünnschnitten auf Sojaöl gewachsener Pilzzellen eindeutig in diesen Peroxisomen lokalisiert werden. Sie enthalten folglich sowohl die Enzyme des H_2O_2 -Metabolismus als auch die des Glyoxylatzyklus. Die für die Organellen von *A. gossypii* ermittelten Dichten von $1,222\text{ g cm}^{-3}$ für Peroxisomen und $1,169\text{ g cm}^{-3}$ für Mitochondrien stimmen mit den für Saccharose-Dichtegradienten typischen Werten von $1,24\text{--}1,26\text{ g cm}^{-3}$ für Peroxisomen und von $1,16\text{--}1,18\text{ g cm}^{-3}$ für Mitochondrien gut überein (Tolbert, 1974). Zwei Arten von Microbodies wie bei *N. crassa*, bei dem neben den die Enzyme des H_2O_2 -Metabolismus beherbergenden Peroxisomen mit einer Dichte von $1,23\text{--}1,24\text{ g cm}^{-3}$ noch die Enzyme des Glyoxylatzyklus enthaltenden Glyoxysomen mit einer Dichte von $1,22\text{ g cm}^{-3}$ vorkommen (Wanner & Theimer, 1982; de Zoysa & Connerton, 1994), konnten in *A. gossypii* nicht nachgewiesen werden.

Zusammen mit der ICL ist in Peroxisomen von *A. gossypii* eine NADP-abhängige ICDH lokalisiert. Diese peroxisomale NADP-abhängigen ICDH weist bezüglich des K_m -Wertes und weiterer kinetischer Daten sehr große Ähnlichkeit mit der NADP-abhängigen ICDH aus *C. tropicalis* auf, die als einzige peroxisomale ICDH bisher isoliert und charakterisiert wurde (Yamamoto et al., 1995). In *A. gossypii* eröffnet dieses Enzym bedingt durch seine im Vergleich zur ICL höhere Affinität zum gemeinsamen Substrat Isocitrat, einen potentiellen Nebenweg für den Kohlenstofffluß vom Substrat in Richtung Gluconeogenese. Die in der vorliegenden Arbeit für die NADP-abhängige ICDH von *A. gossypii* nachgewiesene ATP-Hemmung der Enzymaktivität ist dagegen für die ICDH aus *C. tropicalis* nicht beschrieben worden. Bei Wachstum von *A. gossypii* auf Sojaöl könnte diese ATP-Hemmung insofern eine grundlegende Bedeutung erlangen, als nur eine in der Aktivität gehemmte peroxisomale NADP-abhängige ICDH einen Kohlenstofffluß über die ICL erlaubt, die, wie bereits gezeigt, durch Metabolite in physiologisch relevanten Konzentrationen nicht reguliert wird. Eine vergleichbare Situation stellt sich in *E. coli* dar, wo es durch reversible Phosphorylierung katalysiert von einer spezifischen Kinase /Phosphatase, die zusammen mit den im selben Operon liegenden Genen der Glyoxylatzyklus-Enzyme exprimiert wird, zu einer bis zu 80 %igen Hemmung der NADP-abhängigen ICDH-Aktivität kommen kann. Nur so wird der ICL mit einem im Vergleich zur NADP-abhängigen ICDH deutlich höheren K_m -Wert für Isocitrat eine Konkurrenz um das gemeinsame Substrat ermöglicht (LaPorte & Koshland, 1982; Koshland et al., 1985; LaPorte, 1993).

Die Rolle der peroxisomalen NADP-abhängigen ICDH bei Wachstum von *A. gossypii* auf Sojaöl konnte nicht geklärt werden. Für *S. cerevisiae* wird eine Funktion der NADP-abhängigen ICDH dahingehend diskutiert, daß dieses in diesem Pilz bei Wachstum auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen cytosolisch lokalisierte Enzym 2-Oxoglutarat für eine

Glutamat-Biosynthese über die GDH bereitstellt (Haselbeck & McAlister-Henn, 1993). Zell-extrakte von *A. gossypii* weisen eine NAD-abhängige GDH-Aktivität auf. Allerdings konnte in den Fraktionen der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation keine entsprechende Enzymaktivität detektiert werden. Dies zeigt die cytosolische Lokalisierung der NAD-abhängigen GDH in *A. gossypii*, wie sie auch für die NAD-abhängige GDH von *S. cerevisiae* (Hollenberg et al., 1970) sowie für NAD- und NADP-abhängige Glutamat-Dehydrogenasen von *C. tropicalis* (Hirai et al., 1976; Tanaka et al., 1982), *N. crassa* (Flavell & Woodward, 1971) und *A. nidulans* (Osmani & Scrutton, 1983) beschrieben wurde. In *A. gossypii* scheint es somit keine Umsetzung des durch die NADP-abhängige ICDH gebildeten 2-Oxoglutarats zu Glutamat im selben Kompartiment zu geben. Stattdessen dürfte das 2-Oxoglutarat ins Cytosol transportiert werden, wo es der Glutamatbildung durch die GDH zur Verfügung steht.

Die NAD-abhängige ICDH von *A. gossypii* wurde, wie in allen bisher untersuchten Pilzen, in Mitochondrien vorgefunden. Die allosterischen Eigenschaften des Enzyms sowie die Beeinflussung der Enzymaktivität durch Adenylat-Nucleotide sind charakteristisch für dieses funktionell dem Tricarbonsäurezyklus zuzuordnende Enzym (Hathaway & Atkinson, 1963; Gabriel & Plaut, 1991). Bei Wachstum auf Glucose könnte dieser allosterischen ICDH-Regulation durch Adenylat-Nucleotide eine Rolle bei der Initiierung der Fettakkumulation in *A. gossypii* zukommen. In fettakkumulierenden Pilzen wird die mitochondriale NAD-ICDH ebenfalls durch ATP gehemmt, ist jedoch andererseits extrem AMP-abhängig. Durch die Abnahme des intrazellulären AMP-Pools, die z.B. bei Stickstoffmangel auftritt, wird vorhandener überschüssiger Kohlenstoff in Folge einer verringerten NAD-ICDH-Aktivität als Citrat ins Cytosol eingebracht. Über die ATP-Citrat-Lyase steht er dort in Form von Acetyl-CoA dem Eingangsenzym der Fettsäuresynthese, der Acetyl-CoA Carboxylase, zur Verfügung (Evans & Ratledge, 1985).

Die Lokalisierung der β -Oxidation stellte insofern einen wichtigen Aspekt dar, als dadurch der direkte Zugang, entweder des in Peroxisomen lokalisierten Glyoxylatzylus oder des in Mitochondrien arbeitenden Tricarbonsäurezyklus, zum produzierten Acetyl-CoA festgelegt wird. Durch Bestimmung der maximalen 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase-Aktivität in der Saccharose-Dichtegradienten-Fraktion mit maximaler Katalase-Aktivität konnte die β -Oxidation von *A. gossypii* eindeutig den Peroxisomen zugeordnet werden. Dies stimmt mit der für *C. tropicalis* bei Wachstum auf n-Alkanen (Kawamoto et al., 1978; Ueda et al., 1985) sowie mit der für *S. cerevisiae* bei Wachstum auf Ölsäure (McCammon et al., 1990) beschriebenen Situation überein.

Für *A. gossypii* konnte weiterhin, neben einer mitochondrialen NAD-abhängigen MDH, ein NAD-abhängiges MDH-Isoenzym in Peroxisomen lokalisiert werden. Diese beiden MDH-Isoenzyme konnten für *N. crassa* ebenfalls nachgewiesen werden (Kobr et al., 1969). *C. tropicalis* verfügt dagegen nur über eine mitochondriale NAD-abhängige MDH. In dieser Hefe sind von den Enzymen, die dem Glyoxylatzylus zugeordnet werden, allein die ICL und die Malatsynthase in Peroxisomen lokalisiert. Bedingt durch diese reduzierte enzymatische

Ausstattung entsteht in den Peroxisomen Malat und Succinat, aus denen nur über die mitochondrial lokalisierten Enzyme des Tricarbonsäurezyklus, z.B. die NAD-abhängige MDH, Isocitrat als Substrat für die ICL-Reaktion regeneriert werden kann (Kawamoto et al., 1977; Tanaka et al., 1982). Die Detektion der peroxisomalen NAD-abhängigen MDH in *A. gossypii* stellt ein Indiz für das Vorhandensein eines enzymatisch komplett ausgestatteten Glyoxylatzyklus dar, der in Bezug auf die Regeneration von Metaboliten nicht der Unterstützung durch mitochondriale Enzyme bedarf.

Zusammenfassend kann aus den bisherigen Ergebnissen in Anlehnung an das von Ap Rees (1987) für fettabbauende Pflanzenkeimlinge vorgestellte Modell folgendes Schema für das Wachstum von *A. gossypii* auf Pflanzenölen entworfen werden (Abb. 42): Die β -Oxidation von Fettsäuren ist in Peroxisomen lokalisiert. Darauf deuten das Vorhandensein von 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase und Katalase in diesem Kompartiment hin. Die Regeneration von NAD, das für die β -Oxidation der Fettsäuren benötigt wird, erfolgt durch Reduktion von Oxalacetat zu Malat mit der peroxisomalen MDH, die in diesem Modell also nicht zur direkten Regeneration von Oxalacetat benötigt wird. Das gebildete Malat kann im Mitochondrium durch die dort vorhandene MDH zu Oxalacetat aufoxidiert werden, welches anschließend über einen Shuttle-Mechanismus wieder zurück ins Peroxisom transportiert wird. Dort kann es als Akzeptor für Acetyl-CoA mit der Citrat-Synthase umgesetzt oder erneut zur NAD-Regeneration genutzt werden. Auf diese Weise können Reduktionsäquivalente aus der β -Oxidation in die Atmungskette eingebracht werden. Aus dem in der ICL-Reaktion entstehenden Succinat kann nach Transport ins Mitochondrium analog Oxalacetat regeneriert werden. Die eigentlich Kohlenstoff-konservierende Reaktion ist die von der Malatsynthase katalysierte Malat-Bildung aus Glyoxylat und Acetyl-CoA. Die Funktion der NADP-abhängigen ICDH in Peroxisomen samt ihrer Regulation durch ATP bleibt ungeklärt. Bei dem beschriebenen Modell kommt der cytosolischen Malat-Konzentration bzw. den Malat umsetzenden Enzymen eine Schlüsselrolle zu, da Malat sowohl Eingangssubstrat für die gluconeogenetischen Reaktionen als auch Shuttle-Metabolit für Reduktionsäquivalente ist. Die Untersuchung der PEP-Carboxykinase, des regulierten Eingangsenzyms für die Gluconeogenese, und der Nachweis sowie die Charakterisierung der zu fordernden Malat-Shuttle-Systeme in Peroxisomen und Mitochondrien von *A. gossypii* könnten somit weitere Ansatzpunkte für eine Einflußnahme auf den Kohlenstofffluß in Richtung Riboflavin sein. Für *S. cerevisiae* wird die PEP-Carboxykinase als limitierender Schritt am Beginn der Gluconeogenese diskutiert (Haarasilta & Oura, 1975).

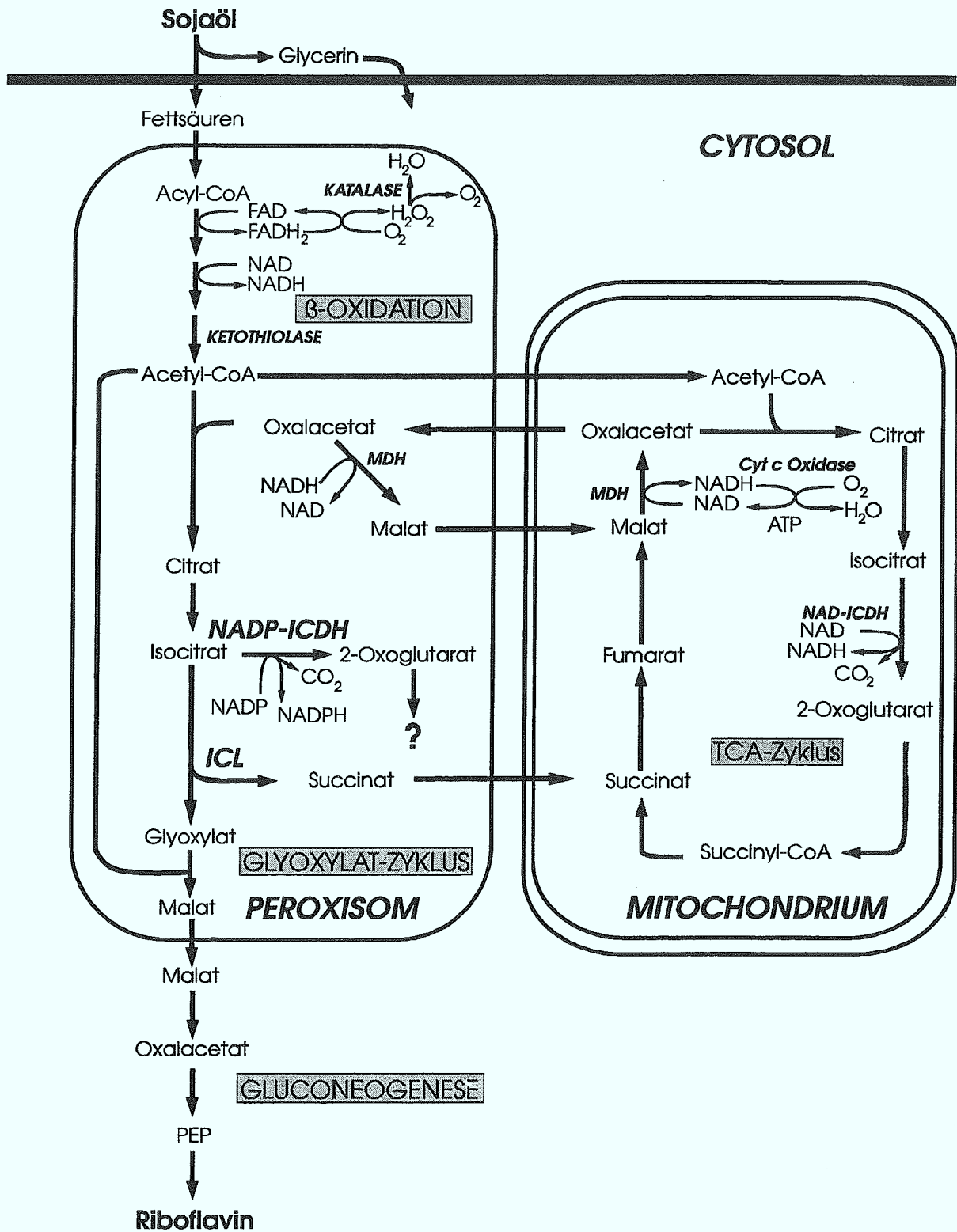


Abb. 42. Schema zur möglichen Lokalisierung von Enzymen in *A. gossypii* bei Wachstum auf Sojaöl. Die aufgeführten Enzyme (fett gedruckt) und deren Lokalisation sind für *A. gossypii* experimentell nachgewiesen worden. Weitere Erklärungen im Text.

Ein anderer Weg zur Regeneration von Reduktionsequivalenten ist für Rizinussamen beschrieben worden, in denen die Elektronen aus der β -Oxidation, der Malat-Oxidation oder der Isocitrat-Oxidation direkt auf Redox-Komponenten in der Glyoxysomen-Membran transferriert werden können (Fang et al., 1987). Interessanterweise liegt der Flavingehalt dieser Organellen im Vergleich zu dem von Mitochondrien mehr als doppelt so hoch (Hicks & Donaldson, 1982). Sollten ähnliche flavinreiche Redox-Komponenten auch in Peroxisomen von *A. gossypii* nachgewiesen werden können, so könnte über die Riboflavinüberproduktion als Folge einer streng mit der β -Oxidation assoziierten, im Verlauf der Evolution deregulierten Flavinsynthese spekuliert werden, denn selbst auf Glucose-Medium ist die Riboflavinüberproduktion von *A. gossypii* eng mit dem Fettmetabolismus verknüpft.

Der Crabtree-Effekt bei *A. gossypii*

Der Crabtree-Effekt, der für Pilze erstmals bei der Hefe *S. cerevisiae* beschrieben wurde (De Deken, 1966), wird dadurch charakterisiert, daß Zellen bei einem Überangebot an fermentierbaren Zuckern trotz aerober Bedingungen Fermentationsprodukte bilden (Van Dijken et al., 1993). Dieser Effekt wird, neben anderen Faktoren, durch die Regulation von Enzymen des Tricarbonsäurezyklus, des Glyoxylatzyklus und der für die Ethanolbildung verantwortlichen Enzyme hervorgerufen. Bei hohen Glucose-Konzentrationen, sogenannten reprimierenden Bedingungen (Fiechter et al., 1981), sind dabei die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Tricarbonsäurezyklus und des Glyoxylatzyklus verringert, während die zur Ethanolbildung erforderlichen Enzyme eine hohe Aktivität aufweisen (Fiechter et al., 1981). Diese Charakteristika ließen sich auch für *A. gossypii* im Verlauf von Batch-Kultivierungen auf Glucose anhand der spezifischen Enzymaktivitäten von ICL, NAD-abhängiger ICDH und NADP-abhängiger ICDH nachweisen. Die dabei ermittelten Repressionsfaktoren sind mit 50 für die ICL, 2 für die NAD-abhängige und 18 für die NADP-abhängige ICDH allerdings nicht so groß wie bei *S. cerevisiae*, wo unter vergleichbaren Bedingungen (0,9 % Glucose) Repressionsfaktoren von 200 für die ICL (Beck & von Meyenburg, 1968) sowie 4 für die NAD-abhängige ICDH und 80 für die NADP-ICDH bestimmt wurden (Polakis & Bartley, 1965). Für *C. tropicalis* ist ein geringeres Level der Repression beschrieben worden, d. h. bei der für *S. cerevisiae* reprimierenden Glucose-Konzentration von 1 % zeigten Enzyme des Tricarbonsäurezyklus und des Glyoxylatzyklus Repressionsfaktoren von 1,5 bzw. 25. Vergleichbare Repressionsfaktoren wie bei *S. cerevisiae* wurden erst bei 5 % Glucose erreicht (Fiechter et al., 1981). Hinsichtlich der Enzymrepression durch Glucose nimmt *A. gossypii* eine intermediäre Stellung relativ zu diesen beiden Pilzen ein.

Der Nachweis einer NADP-abhängigen ICDH bei vorhandener Glucose und gleichzeitig nicht meßbarer ICL deutete zudem auf das Vorhandensein von NADP-abhängigen ICDH-Isoenzymen in *A. gossypii* hin. Somit verfügt *A. gossypii* neben der peroxisomalen NADP-abhängigen ICDH, die dem Metabolismus auf Sojaöl zugeordnet werden konnte, über eine weitere, möglicherweise cytosolische, NADP-abhängige ICDH bei Wachstum auf Glucose,

was der für *C. tropicalis* bei Wachstum auf n-Alkanen bzw. auf Glucose (Hirai et al., 1976; Kawamoto et al., 1977) beschriebenen Situation entsprechen würde.

Die als Hauptcharakteristikum für den Crabtree-Effekt beschriebene Nebenproduktbildung bei Wachstum auf Glucose trotz überschüssiger Sauerstoffversorgung konnte für *A. gossypii* eindeutig nachgewiesen werden. Bezogen auf den im Verlauf der Kultivierung von *A. gossypii* erreichten Maximalwert werden 22 % der eingesetzten Glucose zu Ethanol umgesetzt. Die Ethanolbildung ist damit im Vergleich zu *S. cerevisiae*, wo unter entsprechenden Bedingungen 39 % in Ethanol umgesetzt werden (Fiechter et al., 1981), etwa halb so stark. Die relativ zur Ethanolbildung ca. 10-fach geringere Acetat-Bildung zeigt eine weitere Parallele zum Stoffwechsel von *S. cerevisiae* auf (Postma et al., 1989). Unter Sauerstofflimitierung ist die Biomassebildung von *A. gossypii* verringert, während 43 % der eingesetzten Glucose für die Ethanolbildung verbraucht werden.

Die Nebenproduktbildung bei hohen Glucose-Konzentrationen wird in *S. cerevisiae* dadurch hervorgerufen, daß sich unter diesen Bedingungen Pyruvat im Cytosol anhäuft, welches über die Pyruvat-Decarboxylase (②) in den sogenannten Pyruvat-Dehydrogenase-Bypass eingebracht wird (Abb. 43; Pronk et al., 1994). In Folge einer Glucose-Repression der Acetyl-CoA Synthetase (④) kann dieses nicht wieder vollständig als Acetyl-CoA in den Tricarbonsäurezyklus eingeschleust werden. Daraufhin kommt es zur Akkumulation von Acetat, das einen entkoppelnden Effekt auf die Reaktionen der Atmungskette hat. Um den hohen Energiebedarf der wachsenden Kultur weiterhin abdecken zu können, muß ATP auf einem anderen Weg bereitgestellt werden. Dies wird durch die fermentative Metabolisierung der Glucose über die in der spezifischen Aktivität erhöhte Pyruvat-Decarboxylase (②) und über die Alkohol-Dehydrogenase (⑤) erreicht und führt in der Folge zur Ethanolbildung (Postma et al., 1989; van Urk et al., 1990). Eine zusätzliche Sauerstofflimitierung führt zu einer weiteren Erhöhung des cytosolischen Pyruvat-Pools bedingt durch die dann eingeschränkte Respiration. Daraus resultiert eine verstärkte Ethanolbildung. Bei *A. gossypii* wird dieser Effekt einer Sauerstofflimitierung anhand der in Richtung Ethanol verschobenen Kohlenstoffbilanz deutlich. Die dabei verringerte Biomassebildung dürfte, analog zur Situation in *S. cerevisiae*, aus dem hohen Energiebedarf resultieren (2 ATP), der nach Glucoseverbrauch zum Einbringen des vermehrt gebildeten Ethanols in den Stoffwechsel im Zuge Acetyl-CoA-Synthetase Reaktion (④) benötigt wird (Pronk et al., 1994). Neben dem zum Ausschleusen der mit undissoziierten Säuren in die Zelle eindiffundierten Protonen, sowie zum Ausgleich des entkoppelnden Effekts dieser Säuren muß dafür also zusätzlich ATP aufgewendet werden (Verduyn, 1991; van Dijken et al., 1993). In Folge des erhöhten Energiebedarfs und des damit erhöhten Bedarfs an reduzierten Reduktionsäquivalenten geht ein großer Teil des aufgenommenen Ethanols nach Umsetzung zu Acetyl-CoA im Tricarbonsäurezyklus als CO₂ verloren und steht damit nicht mehr zum Aufbau von Biomasse zur Verfügung.

Bei *A. gossypii* konnte der Crabtree-Effekt, der bisher nur für Hefen beschrieben worden ist, zum erstenmal für einen filamentösen Pilz nachgewiesen werden. Dadurch kommen, neben dem

intrazellulären Triglycerid (Stahmann et al., 1994), potentiell auch die bei Wachstum auf Glucose gebildeten Nebenprodukte als Substrate für die Riboflavinbiosynthese von *A. gossypii* in Betracht.

Zur weitergehenden Untersuchung dieses Effekts müßte für *A. gossypii* eine enzymatische Charakterisierung des Pyruvat-Dehydrogenase-Bypass, z.B. der Pyruvat-Decarboxylase und der Acetyl-CoA-Synthetase, sowie der Pyruvat-Dehydrogenase unter Chemostat-Bedingungen erfolgen, um so die äußerst variable Regulation der verschiedenen Stoffwechselwege als Antwort auf veränderte Nährstoffbedingungen, wie sie für *S. cerevisiae* beschrieben wurde (De Jong-Gubbels et al., 1995), erfassen zu können.

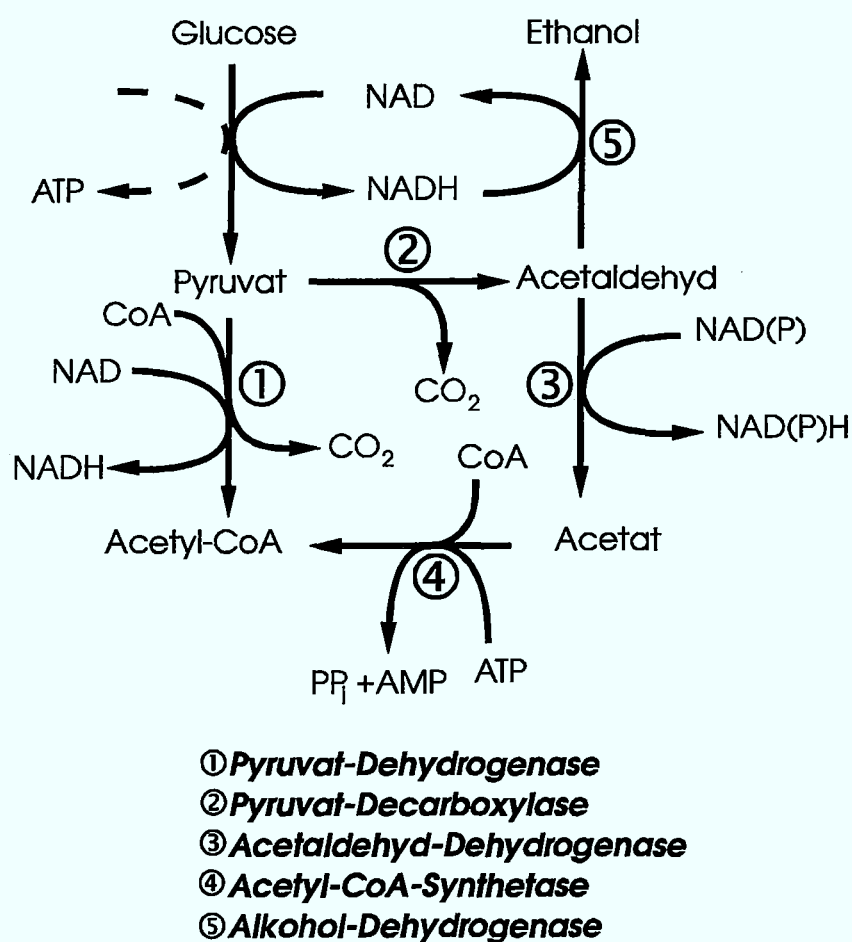


Abb. 43. Schema zum Crabtree-Effekt (nach Pronk et al., 1994, verändert)

Die HBS aus *A. gossypii*

Obgleich erste Untersuchungen zur Struktur des für die Xylenring-Synthese im Riboflavinmolekül benötigten C₄-Körpers mit *A. gossypii*-Kulturen durchgeführt wurden (Plaut, 1954; Bacher et al., 1982, 1983, 1985), wurde der enzymatische Syntheseweg dieses C₄-Körpers durch die HBS doch mit Zellextrakten von *C. guilliermondii* (Volk & Bacher, 1988, 1990) erstmals nachgewiesen. Mit dem nun entwickelten, vereinfachten HBS-Enzymtest, gelang es, die HBS-Aktivität erstmals auch in *A. gossypii* zu detektieren. Allerdings konnte mit *A. gossypii* Rohextrakten keine Produktbildung detektiert werden. Ursache dafür dürften die im Rohextrakt vorhandenen Enzyme des Pentose-Phosphat-Weges sein, die ausgehend von Ribose-5-P sämtliche für diesen Stoffwechselweg charakteristischen Zuckerphosphate im Enzymtest bilden können. Zudem dürfte eine im Zellextrakt vorhandene Phosphatase-Aktivität zu einer schnellen Verarmung des Testansatzes an Substrat Ribose-5-P bzw. Ribulose-5-P geführt haben. Durch eine Proteinfractionierung der Rohextrakte konnten diese den HBS-Enzymtest störenden Enzymaktivitäten entfernt werden. Mit diesem neuen Test-System konnte für *A. gossypii*, und damit erstmals für einen Mikroorganismus überhaupt, eine Regulation der HBS im Verlaufe von Batch-Kultivierungen nachgewiesen werden. Die dabei während der Riboflavinbildung sowohl auf Sojaöl-Medium als auch auf Glucose-Medium bestimmten maximalen spezifischen HBS-Aktivitäten liegen in der Größenordnung des für einen Zellextrakt von *C. guilliermondii* ermittelten Wertes von 20 nmol h⁻¹ (mg Protein)⁻¹ (Volk & Bacher, 1990). In Abhängigkeit von der Wachstumsphase treten jedoch bei *A. gossypii* WT und der Mutante Ita-GS01 deutliche Unterschiede in der jeweils vorhandenen spezifischen HBS-Aktivität auf. Dabei zeigte sich für die Mutante das gleiche auch bei der ICL beobachtete Phänomen einer während der Riboflavinsynthese im Vergleich zum WT erhöhten spezifischen Enzymaktivität. Sie weist offenbar eine Mutation in einem übergeordneten, für die Regulation der Riboflavinsynthese relevanten Gen auf. Daß die HBS-Aktivität nicht der limitierende Faktor für die Riboflavinsynthese war, konnte aus den Riboflavinbildungsraten der Mutante in Relation zu den *in vitro* bestimmten Enzymaktivitäten abgeleitet werden. Außerdem stellten die Kalkulation der theoretisch möglichen Riboflavinbiosyntheserate der Mutante, sowie der gleiche Steigerungsfaktor im Riboflavingehalt der Mutante unabhängig von der verwendeten Kohlenstoffquelle weitere Indizien für die These dar, daß nicht die HBS, sondern die Bereitstellung von Vorstufen limitierend für die Riboflavinbiosynthese ist.

Neue Ansatzpunkte für eine Optimierung dieser Vorstufensynthese in *A. gossypii* dürften zukünftig durch Analyse der relativen Stoffflüsse im Pentose-Phosphat-Weg und in der Riboflavinbiosynthese zu verschiedenen Zeiten der Kultivierung und auf verschiedenen Medien zu erwarten sein. In diesem Zusammenhang müßten allerdings zunächst auch die Enzyme des von der Vorstufe GTP ausgehenden Zweiges des Riboflavinbiosyntheseweges hinsichtlich ihrer Regulation und einer daraus resultierenden möglichen Limitierung des Stoffflusses in Richtung Riboflavin untersucht werden. Weitere vergleichende Untersuchungen von *A. gossypii* WT und der Mutante Ita-GS01 im Hinblick auf ein übergeordnetes Regulationssystem, das die an der

Riboflavinbiosynthese beteiligten Enzyme kontrolliert, könnten einen Beitrag zum Verständnis der Riboflavinbiosynthese leisten. Für diese Untersuchungen gibt es drei Ansatzpunkte. Zum einen kann eine übergeordnete Regulation durch einen universellen Repressor bedingt sein, der die Transkription kontrolliert. Zum anderen kann über die Halbwertszeit der mRNA eine Regulation erfolgen, und schließlich muß auch eine in ihrer Geschwindigkeit modifizierte Enzyminaktivierung als Regulationsmodus in Betracht gezogen werden (Gancedo, 1992). Für die Hefe *S. cerevisiae*, zu der *A. gossypii* nach den Ergebnissen dieser Arbeit trotz seines filamentösen Wachstums bezüglich der Physiologie große Ähnlichkeit aufweist, sind übergeordnete Regulationsmechanismen beschrieben worden. So konnte z.B. im Zusammenhang mit der Glucose-Repression die Bindung eines Zinkfinger-Protein, des sogenannten Mig1-Repressors, im Komplex mit zwei weiteren Proteinen an zahlreiche Promotoren nachgewiesen werden. Von dieser Regulation sind unter anderem Promotoren der Gene betroffen, die für gluconeogenetische und respiratorische Enzyme codieren (Ronne, 1995).

V. ZUSAMMENFASSUNG

Der filamentöse Pilz *Ashbya gossypii* wird industriell zur Riboflavinproduktion genutzt. Hierbei werden die höchsten Riboflavinausbeuten durch die Verwendung von Pflanzenölen als Substrat erzielt. Um die Produktion gezielt verbessern zu können, ist das Verständnis der Physiologie des Ölabbau und der Riboflavinproduktion unerlässlich. Im Glyoxylatzyklus, der Mikroorganismen das Wachstum auf Triglyceriden ermöglicht, stellt die Isocitrat-Lyase (ICL) das Schlüsselenzym dar. Die 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat Synthase (HBS), die aus Ribulose-5-P einen ausschließlich für die Biosynthese des Riboflavinmoleküls benötigten C₄-Körper liefert, stellt ein weiteres Schlüsselenzym dar.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Enzyme Isocitrat-Lyase und HBS in *A. gossypii* zu charakterisieren und deren Regulation zu untersuchen.

Bei Wachstum auf Sojaöl konnte die Isocitrat-Lyase in *A. gossypii* mit einer maximalen spezifischen Aktivität von 0,4 U (mg Protein)⁻¹ nachgewiesen werden. Dagegen ließ sich während des Wachstums auf Glucose keine ICL-Aktivität detektieren; erst nach Glucoseverbrauch wurde beim Abbau des intrazellulären Reservefetts die ICL gebildet. Die experimentellen Daten zeigten eine Korrelation zwischen der spezifischen ICL-Aktivität und der Riboflavinbiosynthese. Um die Regulation des Enzyms auf Aktivitätsebene durch Stoffwechselmetabolite untersuchen zu können, wurde es mit Hilfe einer fraktionierten Ammoniumsulfat-Fällung, einer anschließenden Gelfiltration und einer Kationenaustauscher-Chromatographie 108-fach aufgereinigt. Das native Enzym ist ein Tetramer mit einem M_r von 254 000 bestehend aus vier identischen Untereinheiten (M_r von 66 000). Für Isocitrat wurde bei einem pH-Optimum von pH 7,0 ein K_m-Wert von 0,55 mM bestimmt. Die Enzymaktivität ist Mg²⁺-abhängig und wird durch Metabolite auf Ebene der Enzymaktivität nicht reguliert. Ein sehr wirksamer unphysiologischer ICL-Hemmstoff ist Itaconat (K_i-Wert: 0,17 mM); bei Hemmung der ICL durch Itaconat synthetisierte der *A. gossypii* Wildtyp kein Riboflavin mehr. In einem Screening auf Itaconat-resistente Mutanten konnte ein Stamm von *A. gossypii* (Ita-GS01) isoliert werden, der bei Wachstum auf Sojaöl einen im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöhten Riboflavin-gehalt zusammen mit einer um mindestens 15 % erhöhten spezifischen ICL-Aktivität aufwies. Dies deutet auf eine limitierende Rolle der ICL im Kohlenstofffluß vom Substrat zum Produkt hin. Mit Hilfe der Immuno-Blot-Technik ließ sich über eine Korrelation der Enzymaktivität mit der vorhandenen Enzymmenge die Regulation der ICL auf Ebene der Enzymbildung nachweisen. Lokalisierungsstudien ergaben, daß die ICL bei Wachstum auf Sojaöl zusammen mit einer NADP-abhängigen Isocitrat-Dehydrogenase (ICDH) in Peroxisomen vorliegt. Die im Vergleich zur ICL höhere Affinität dieses Enzyms zu Isocitrat (K_m-Wert: 0,11 mM) macht eine *in vivo* Konkurrenz dieser beiden Enzyme um das gemeinsame Substrat möglich. Obgleich die Funktion der NADP-abhängigen ICDH ungeklärt ist, so eröffnet sie doch einen potentiellen Nebenweg im Kohlenstofffluß vom Substrat in Richtung Gluconeogenese.

Bei Wachstum auf Glucose konnte bei *A. gossypii* erstmals für einen filamentösen Pilz der Crabtree-Effekt nachgewiesen werden. Bei überschüssigem Sauerstoffeintrag zeigte der Pilz eine Repression der Isocitrat-Lyase und der NAD- und NADP- abhängigen Isocitrat-Dehydrogenasen begleitet von einer Ethanol- und Acetatbildung. Für die Riboflavinbildung auf Glucose müssen folglich neben dem intrazellulären Triglycerid nun auch die für den Crabtree-Effekt charakteristischen Nebenprodukte als Substrate in Betracht gezogen werden.

Für die HBS, die 50 % des Kohlenstoffs im Riboflavinmolekül bereitstellt, konnte ein neuer Enzymtest basierend auf einer Polyol-HPLC-Analytik etabliert werden. Nach Abtrennung störender Enzymaktivitäten durch eine Gelfiltration ließ sich dieses Enzym erstmals in Zell-extrakten von *A. gossypii* nachweisen. Die HBS war während des Wachstums sowohl auf Glucose als auch auf Sojaöl vorhanden. Die auf Glucose parallel zur ICL verlaufende spezifische HBS-Aktivität weist auf eine für beide Enzyme gleiche Regulation hin. Allerdings war schon in der Wachstumsphase eine spezifische HBS-Aktivität von mindestens $2,5 \text{ nmol h}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ nachweisbar, die dann bis auf maximal $150 \text{ nmol h}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ anstieg. Aus den *in vitro* gemessenen Enzymaktivitäten der Mutante Ita-GS01 konnte eine doppelt so hohe Riboflavinbildungsrate kalkuliert werden als die effektiv während der Kultivierung beobachtete. Dies deutet auf eine Limitierung der Riboflavinbiosynthese durch die Bereitstellung von Vorstufen und nicht durch die HBS-Aktivität hin. Daneben konnte für die Itaconat-resistente Mutante während der Riboflavinbildungsphase, zu einer erhöhten ICL-Aktivität, auch eine erhöhte spezifische HBS-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Eine Erklärung dafür könnte eine Veränderung in einem übergeordneten Regulationssystem sein, das die Expression der zur Riboflavinbiosynthese benötigten Enzyme kontrolliert.

VI. LITERATUR

- Aebi, H.E. (1974).** Catalase. In *Methods of Enzymatic Analysis*, pp 673-686. Edited by H.U. Bergmeyer. New York: Academic Press.
- Ap Rees, T. (1987).** Compartmentation of plant metabolism. In *The Biochemistry of Plants*, vol. 12, pp. 87-115. New York: Academic Press.
- Ashby, S.F. & Nowell, W. (1926).** The fungi of stigmatomycosis. *Ann Botany* **40**, 69-84.
- Ashworth, J.M. & Kornberg, H.L. (1963).** Fine control of the glyoxylate cycle by allosteric inhibition of isocitrate lyase. *Biochim Biophys Acta* **73**, 519-522.
- Bacher, A. (1991).** Biosynthesis of flavins. In *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*, vol.1, pp. 215-249. Edited by F. Müller. Boca Raton: CRC Press.
- Bacher, A. & Lingens, F. (1971).** Biosynthesis of riboflavin. Formation of 6-Hydroxy-2,4,5-Triaminopyrimidine in RIB⁷ mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **246**, 7018-7022.
- Bacher, A., Le Van, Q. & Bühler, M. (1982).** Biosynthesis of riboflavin. Incorporation of D-[1-¹³C] Ribose. *J Am Chem Soc* **104**, 3754-3755.
- Bacher, A., Le Van, Q., Keller, P.J. & Floss, H.G. (1983).** Biosynthesis of riboflavin. Incorporation of ¹³C-labelled precursors into the xylene ring. *J Biol Chem* **258**, 13431- 13437.
- Bacher, A., Le Van, Q., Keller, P.J. & Floss, H.G. (1985).** Biosynthesis of riboflavin. Incorporation of multiply ¹³C-labelled precursors into the xylene ring. *J Am Chem Soc* **107**, 6380-6385.
- Bacher, A., Neuberger, G. & Volk, R. (1986).** Enzymatic synthesis of 6,7-Dimethyl-ribityllumazine. In *Chemistry and Biology of Pteridines*, pp. 227-230. Edited by B.A. Cooper & V.M. Whitehead. Berlin New York: Walter de Gruyter & Co.
- Barth, G. (1985).** Genetic regulation of isocitrate lyase in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Curr Genet* **10**, 119-124.
- Barth, G., Linder, P. & Hinnen, A. (1990).** Regulation of the glyoxylate cycle in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* **6**, spec. iss., S227.
- Batra, L.R. (1973).** Nematosporeaceae (Hemiascomycetidae): taxonomy, pathogenicity, distribution, and vector relations. *USDA Technol Bull* **1469**, 1-71.
- Beck, C. & von Meyenburg, H.K. (1968).** Enzyme pattern and aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* under various degrees of glucose limitation. *J Bacteriol* **96**, 497-486.
- Bigelis, R. (1989).** Industrial products of biotechnology: Application of gene technology. In *Biotechnology*, vol. 7b, p. 243. Edited by H.J. Rehm & G. Reed. Weinheim: VCH.

- Binder, H. (1980).** Separation of monosaccharides by high-performance liquid chromatography: comparison of ultraviolet and refractive index detection. *J Chromatogr* **189**, 414-421.
- 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.
- Bowyer, P., De Lucas, J.R. & Turner, G. (1994).** Regulation of the expression of isocitrate lyase gene (*acuD*) of *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* **242**, 484-489.
- Burrows, R.B. & Brown, G.M. (1978).** Presence in *Escherichia coli* of deaminase and a reductase involved in biosynthesis of riboflavin. *J Bacteriol* **136**, 657-667.
- Carson, B.D. & Cooney, J.J. (1990).** Microbodies in fungi: a review. *J Indust Microbiol* **6**, 1-18.
- Carlemalm, E., Garavito, R.M. & Villiger, W. (1982).** Resin development for electron microscopy and an analysis of embedding at low temperatures. *J Micros (Oxford)* **126**, 123-134.
- Cioni, M. Pinzauti, G. & Vanni, P. (1981).** Comparative biochemistry of the glyoxylate cycle. *Comp Biochem Physiol* **70B**, 1-26.
- Cooper, T.G. (1981).** *The Tools of Biochemistry*. Edited by R. Neumeier & H.R. Maurer. Berlin: Walter de Gruyter.
- Cooperman, J.M. & Lopez, R. (1984).** Riboflavin. In *Handbook of Vitamins*, pp. 299-327. Edited by L.J. Machlin. New York: Marcel Dekker Inc.
- Dammer, K.H. & Ravelo, H.G. (1990).** Verseuchung von *Leptoglossus gonagra* (Fabr.) mit *Nematospora coryli* Peglion und *Ashbya gossypii* (Ashby et Nowell) Guilliermond in einer Zitrusanlage der Republik Kuba. *Arch Phytopathol Pflanzenschutz* **26**, 71-78.
- De Deken, R.H. (1966).** The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *J Gen Microbiol* **44**, 149-156.
- De Duve, C. & Baudhuin, P. (1966).** Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev* **46**, 323-357.
- De Duve, C. (1983).** Microbodies in the living cell. *Sci Amer* **248**, 74-84.
- De Lucas, J.R., Valenciano, S., Laborda, F. & Turner, G. (1994).** Glucose-induced inactivation of isocitrate lyase in *Aspergillus nidulans*. *Arch Microbiol* **162**, 409-413.
- Demain, A.L. (1972).** Riboflavin oversynthesis. *Annu Rev Microbiol* **26**, 369-388.
- De Jong-Gubbels, P., Vanrolleghem, P., Heijnen, S., van Dijken, J.P. & Pronk, J.T. (1995).** Regulation of carbon metabolism in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae* grown on mixtures of glucose and ethanol. *Yeast* **11**, 407-418.
- Desel, H., Zimmermann, R., Janes, M., Miller, F., & Neupert, W. (1982).** Biosynthesis of glyoxysomal enzymes in *Neurospora crassa*. *Ann NY Acad Sci* **386**, 377-388.

- De Zoysa, P.A. & Connerton, I.A. (1994).** The function and specificity of the C-terminal tripeptide glyoxysomal targeting signal in *Neurospora crassa*. *Curr Genet* **26**, 430-437.
- Dixon, G.H. & Kornberg, H.L. (1959).** Assay methods for key enzymes of the glyoxylate cycle. *Biochem J* **72** 3P.
- Donaldson, R.P. (1982).** Nicotinamide cofactors (NAD and NADP) in glyoxysomes, mitochondria, and plastids isolated from castor bean endosperm. *Arch Biochem Biophys* **215**, 274-279.
- Easterby, J.S. & Qadri, S.S. (1982).** Hexokinase Type II from rat skeletal muscle. *Methods Enzymol* **90**, 11-15.
- Entian, K.-D. & Barnett, J.A. (1992).** Regulation of sugar utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Biochem Sci* **17**, 506-510.
- Evans, T.C. & Ratledge, C. (1985).** The physiological significance of citric acid in the control of metabolism in lipid-accumulating yeasts. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* **3**, 349-375.
- Fang, T.K., Donaldson, R.P. & Vigil, E.L. (1987).** Electron transport in purified glyoxysomal membranes from castor-bean endosperm. *Planta* **172**, 1-13.
- Fiechter, A., Fuhrmann, G.F. & Käppeli, O. (1981).** Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *Adv Microb Physiol* **22**, 123-183.
- Flavell, R.B. & Woodward, D.O. (1971).** Metabolic role, regulation of synthesis, cellular localization and genetic control of the glyoxylate cycle enzymes in *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* **105**, 200-210.
- Floss, H.G., Le Van, Q., Keller, P.J. & Bacher, A. (1983).** Biosynthesis of riboflavin. An unusual rearrangement in the formation of 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazine. *J Am Chem Soc* **105**, 2493-2494.
- Gabriel, J.L. & Plaut, G.W.E. (1991).** Kinetic regulation of yeast NAD-specific isocitrate dehydrogenase by citrate. *Biochemistry* **30**, 2594-2599.
- Gainey, L.D.S., Kölble, K. & Connerton, I.F. (1991).** Isolation and expression of the acetate-inducible isocitrate lyase gene (*acu-3*) from *Neurospora crassa*: evidence for a second constitutive enzyme. *Mol Gen Genet* **229**, 253-260.
- Gancedo, J.M. (1992).** Carbon catabolite repression in yeast. *Eur J Biochem* **206**, 297-313.
- Gonzales, E. (1977).** Two-carbon assimilative capacity and the induction of isocitrate lyase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **129**, 1343-1348.
- Giachetti, E., Pinzauti, G., Bonaccorsi, R. & Vanni, P. (1988).** Isocitrate lyase from *Pinus pinea*. *Eur J Biochem* **172**, 85-91.
- Goodwin, T.W. (1959).** Production and biosynthesis of riboflavin in micro-organisms. In *Progress in Industrial Microbiology*, vol.1, pp. 139-177. Edited by D.J.D. Hockenhull. London: Heywood & Company.

- Guilliermond, P. (1928).** Recherches sur quelques Ascomycetes inferieurs isoles de la stigmatomycose des graines de cotonnier. Essai sur la phylogenie des Ascomycetes. *Rev Gen Bot* **40**, 328-342, 397-414, 474-485, 555-574, 606-624, 690-704.
- Haarasilta, S. & Oura, E. (1975).** On the activity and regulation of anaplerotic and gluconeogenic enzymes during the growth process of baker's yeast. *Eur J Biochem* **52**, 1-7.
- Hanozet, G.M. & Gueritore, A. (1972).** Role of phosphoenolpyruvate and 6-phosphogluconate in the short-term control of yeast isocitrate lyase. *Arch Biochem Biophys* **149**, 127-135.
- Hanson, A.M. (1967).** Microbial production of pigments and vitamins. In *Microbial technology*, pp. 222-250. Edited by H.J. Peppler. New York: Reinhold.
- Harlowe, E. & Lane, D. (1988).** Antibodies, a laboratory manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Harris, R.S., Wagner-Jauregg, T. & Horwitt, M.K. (1972).** Chapter 14. Riboflavin. In *The Vitamins*, Vol. V, 2nd Ed., pp. 2-88. Edited by W.H. Sebrell, Jr., R.S. Harris. New York, London: Academic Press.
- Haselbeck, R.J. & McAlister-Henn, L. (1991).** Isolation, nucleotide sequence, and disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding mitochondrial NADP(H)-specific isocitrate dehydrogenase. *J Biol Chem* **266**, 2339-2345.
- Haselbeck, R.J. & McAlister-Henn, L. (1993).** Function and expression of yeast mitochondrial NAD- and NADP-specific isocitrate dehydrogenases. *J Biol Chem* **268**, 12116-12122.
- Hathaway, J.A. & Atkinson, D.E. (1963).** The effect of adenylic acid on yeast nicotinamide adenine dinucleotide isocitrate dehydrogenase, a possible metabolic control mechanism. *J Biol Chem* **238**, 2875-2881.
- Heefner, D.L., Weaver, C.A., Yarus, M.J. & Burdzinski, L.A. (1992).** Method for producing riboflavin with *Candida famata*. *Patent US* 5 164 303.
- Herrero, P., Fernandez, R. & Moreno, F. (1985).** Differential sensitivities to glucose and galactose repression of gluconeogenic and respiratory enzymes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* **143**, 216-219.
- Hicks, D.B. & Donaldson, R.P. (1982).** Electron transport in glyoxysomal membranes. *Arch Biochem Biophys* **215**, 280-288.
- Hirai, M., Shiotani, T., Tanaka, A. & Fukui, S. (1976).** Intracellular localization of several enzymes in *Candida tropicalis* grown on different carbon sources. *Agr Biol Chem* **40**, 1979-1985.
- Hönes, I., Simon, M. & Weber, H. (1991).** Characterization of isocitrate lyase from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Basic Microbiol* **31** (4), 251-258.
- Hollander, I. & Brown, G.M. (1979).** Biosynthesis of riboflavin. Reductase and deaminase of *Ashbya gossypii*. *Biochem Biophys Res Commun* **89**, 759-763.

- Hollenberg, C.P., Riks, W.F. & Borst, P. (1970).** The glutamate dehydrogenase of yeast: Extra-mitochondrial enzymes. *Biochim Biophys Acta* **201**, 13-19.
- Holzer, H.(1976).** Catabolite inactivation in yeast. *Trends Biochem Sci* **1**, 178-181.
- Hoyt, J.C., Lin, H.-P.P. & Reeves, H.C. (1994).** In vivo phosphorylation of isocitrate lyase in *Escherichia coli* and *Acinetobacter calcoaceticus*. *Curr Microbiol* **28**, 67-69.
- Johanson, R.A., Hill, J.M. & McFadden, B.A. (1974).** Isocitrate lyase from *Neurospora crassa*. I. Purification, kinetic mechanism, and interaction with inhibitors. *Biochim Biophys Acta* **364**, 327-340.
- Käppeli, O. (1986).** Regulation of carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and related yeasts. *Adv Microb Physiol* **28**, 181-209.
- Kaplan, C. & Demain, A.L. (1970).** Nutritional studies on riboflavin overproduction by *Ashbya gossypii*. In *Recent trends in yeast research*, pp. 137-159. Edited by D.G. Aheon. Atlanta: Georgia State University.
- Kawamoto, S., Tanaka, A., Yamamura, N., Teranishi, Y., Fukui, S. & Osumi, M. (1977).** Microbody of n-alkane-grown yeast. *Arch Microbiol* **112**, 1-8.
- Kawamoto, S., Nozaki, C., Tanaka, A. & Fukui, S. (1978).** Fatty acid β -oxidation system in microbodies of n-alkane-grown *Candida tropicalis*. *Eur J Biochem* **83**, 609-613.
- Khan, F.R. & McFadden, B.A. (1979).** Enzyme profiles in seedling development and the effect of itaconate, an isocitrate lyase-directed reagent. *Plant Physiol* **64**, 228-231.
- Khan, A.S., Van Driessche, E., Kanarek, L. & Beeckmans, S. (1992).** The purification and physicochemical characterization of maize (*Zea mais* L.) isocitrate lyase. *Arch Biochem Biophys* **297** (1), 9-18.
- Kionka, C. & Kunau, W-H. (1985).** Inducible β -oxidation pathway in *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* **161**, 153-157.
- Kobr, M.J., Vanderhaege, F. & Combepine, G. (1969).** Particulate enzymes of the glyoxylate cycle in *Neurospora crassa*. *Biochem Biophys Res Commun* **37**, 640-645.
- Kornberg, H.L. (1965a).** Anaplerotische Sequenzen im mikrobiologischen Stoffwechsel. *Angew Chem* **77**, 601-609.
- Kornberg, H.L. (1965b).** The co-ordination of metabolic routes. *Symp Soc Gen Microbiol* **15**, 8-31.
- Koshland, D.E., Jr., Walsh, K. & Laporte, D.C. (1985).** Sensitivity of metabolic fluxes to covalent control. *Curr Top Cell Regul* **27**, 13-22.
- Kupp, C. (1993).** Untersuchungen zur Fettbildung und zum Fettabbau des Vitamin B₂-Produzenten *Ashbya gossypii*. Diplomarbeit im Studiengang Chemieingenieurwesen, Studienschwerpunkt Biotechnologie. Fachhochschule Aachen, Abteilung Jülich.

- Kurtzman, C.P. (1995).** Relationship among the genera *Ashbya*, *Eremothecium*, *Holleya* and *Nematospora* determined from rDNA divergence. *J Indust Microbiol* **14**, 523-530.
- Kutsal, T. & Özbas, M.T. (1989).** Microbial production of vitamin B₂ (riboflavin). In *Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors*, pp.149-168. London New York: Elsevier Applied Science.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lago, B.D. & Kaplan, L. (1981).** Vitamin fermentations: B₂ and B₁₂. *Adv Biotechnol* **3**, 241-246.
- LaPorte, D.C. (1993).** The isocitrate dehydrogenase phosphorylation cycle: Regulation and enzymology. *J Cell Biochem* **51**, 14-18.
- LaPorte, D.C. & Koshland, D.E., Jr. (1982).** A protein with kinase and phosphatase activities involved in regulation of tricarboxylic acid cycle. *Nature* **300**, 458-460.
- Leatherbarrow, R.J. (1987).** *Enzfitter Manual*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV.
- Logvinenko, E.M., Shavlovskii, G.M., Zakal'skii, A.E. & Zakhodylo, I.V. (1982).** Biosynthesis of 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazine in extracts of the yeast *Pichia guilliermondii*. *Biochemistry* **47**, 778-783.
- Logvinenko, E.M., Shavlovskii, G.M. & Tsarenko, N. Yu. (1984).** The role of iron in regulation of 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazine synthase synthesis in flavinogenic yeast. *Biochemistry* **49**, 38-46.
- Logvinenko, E.M., Shavlovskii, G.M. & Tsarenko, N. Yu. (1985).** Proteins of the 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazine synthase system of the yeast *Pichia guilliermondii* and regulation of their biosynthesis. *Biochemistry* **50**, 625-629.
- Lopez-Boado, Y.S., Herrero, P., Gascon, S. & Moreno, F. (1987).** Catabolite inactivation of isocitrate lyase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* **147**, 231-234.
- Lopez-Boado, Y.S., Herrero, P., Fernandez, T., Fernandez, R. & Moreno, F. (1988).** Glucose-stimulated phosphorylation of yeast isocitrate lyase in vivo. *J Gen Microbiol* **134**, 2499-2505.
- Maxwell, P.D., Maxwell, M.D., Hänssler, G., Armentrout, V.N., Murray, G.M. & Hoch, H.C. (1975).** Microbodies and glyoxylate enzymes in filamentous fungi. *Planta* **124**, 109-123.
- Mazon, M.J., Gancedo, J.M. & Gancedo, C. (1982).** Inactivation of yeast fructose-1,6-bisphosphatase. *J Biol Chem* **257**, 1128-1130.
- McCammon, M.T., Veenhuis, M., Trapp, S.B. & Goodman, J.M. (1990).** Association of glyoxylate and beta-oxidation enzymes with peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **172**, 5816-5827.
- McCullough, W. & Roberts, C.F. (1980).** Genetic regulation of isocitrate lyase activity in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* **120**, 67-84.

- McFadden, B.A. & Purohit, S. (1977).** Itaconate, an isocitrate lyase-directed inhibitor in *Pseudomonas indigofera*. *J Bacteriol* **131**, 136-144.
- Mehta, S.M., Mattoo, A.K. & Modi, V.V. (1972).** Ribitol and flavinogenesis in *Eremothecium ashbyi*. *Biochem J* **130**, 159-166.
- Messner, R., Prillinger, H., Ibl, M. & Himmler, G. (1995).** Sequence of ribosomal genes and internal transcribed spacers move three plant parasitic fungi, *Eremothecium ashbyi*, *Ashbya gossypii*, and *Nematospora coryli*, towards *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Appl Microbiol* **41**, 31-42.
- Middleton, B. (1975).** 3-Ketoacyl-CoA thiolases of mammalian tissues. *Methods Enzymol* **35**, 128-136.
- Monod, J. (1942).** Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes. Paris: Hermann et Cie.
- Müller, D. & Holzer, H. (1981).** Regulation of fructose-1,6-bisphosphatase in yeast by phosphorylation/dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* **103**, 926-933.
- Nabeshima, S., Tanaka, A. & Fukui, S. (1977a).** Effect of carbon sources on the level of glyoxylate cycle enzymes in n-alkane-utilizable yeasts. *Agric Biol Chem* **41** (2), 275-279.
- Nabeshima, S., Ishiyama, S., Tanaka, A. & Fukui, S. (1977b).** Partial purification and some kinetic properties of NAD-linked and NADP-linked isocitrate dehydrogenases from *Candida tropicalis*. *Agric Biol Chem* **41**, 509-516.
- Nakamura, K., Amano, Y., Nakadate, M. & Kagami, M. (1989).** Purification and properties of isocitrate lyase from *Candida brassicae* E-17. *J Fermentation and Bioengineering* **67** (3), 153-157.
- Neuberger, G. & Bacher, A. (1985).** Biosynthesis of riboflavin. An aliphatic intermediate in the formation of 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazine from pentose phosphate. *Biochem Biophys Res Commun* **127**, 175-181.
- Neuberger, G. & Bacher, A. (1986).** Biosynthesis of riboflavin. Enzymatic formation of 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazine by heavy riboflavin synthase from *Bacillus subtilis*. *Biochem Biophys Res Commun* **139**, 1111-1116.
- Nielsen, P., Neuberger, G., Floss, H.G. & Bacher, A. (1984).** Biosynthesis of riboflavin. Enzymatic formation of the xylene moiety from [¹⁴C] Ribulose 5-phosphate. *Biochem Biophys Res Commun* **118**, 814-820.
- Nielsen, P., Neuberger, G., Fujii, I., Brown, D.H., Keller, P.J., Floss, H.G. & Bacher, A. (1986).** Biosynthesis of riboflavin. Enzymatic formation of 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazine from pentose phosphates. *J Biol Chem* **261**, 3661-3669.
- Ochoa, S. (1955).** Malic dehydrogenase from pig heart. *Methods Enzymol* **I**, 735-739.
- Okada, H., Ueda, M., Uchida, M. & Tanaka, A. (1987).** Isocitrate lyase and malate synthase of *Candida tropicalis* grown on different carbon sources. *Agric Biol Chem* **51** (3), 869-875.

- Ordiz, I., Herrero, P., Rodicio, R. & Moreno, F. (1995).** Glucose-induced inactivation of isocitrate lyase in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by an internal decapeptid sequence. *FEBS Lett* **367**, 219-222.
- Osmani, S.A. & Scrutton, M.C. (1983).** The sub-cellular localisation of pyruvate carboxylase and some other enzymes in *Aspergillus nidulans*. *Eur J Biochem* **147**, 119-128.
- Osumi, M., Fukuzumi, F., Teranishi, Y., Tanaka, A. & Fukui, S. (1975).** Development of microbodies in *Candida tropicalis* during incubation in an n-alkane medium. *Arch Microbiol* **103**, 1-11.
- Özbas, T. & Kutsal, T. (1986).** Comparative study of riboflavin production from two microorganisms: *Eremothecium ashbyi* and *Ashbya gossypii*. *Enzyme Microb Technol* **8**, 593-596.
- Özbas, T. & Kutsal, T. (1992).** Oxygen transfer kinetics of riboflavin fermentation by *Ashbya gossypii* in agitated fermentors. *Enzyme Microb Technol* **14**, 984-990.
- Pearson, E.O. (1948).** The development of internal boll disease of cotton in relation to time of infection. *Ann Appl Biol* **34**, 527-545.
- Perdiguero, E., de Arriaga, D., Busto, F. & Soler, J. (1995).** Isocitrate lyase from *Cephalosporium acremonium*. Role of Mg^{2+} ions, kinetics, and evidence for a histidine residue in the active site of the enzyme. *Biochemistry* **34**, 6059-6068.
- Perkins, J.B. & Pero, J.G. (1993).** Biosynthesis of Riboflavin, Biotin, Folic Acid, and Cobalamin. In *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics*, pp. 319-325. Edited by A.L. Sonenshein (Editor in Chief), J.A. Hoch, R. Losick. Washington: American Society for Microbiology.
- Pfeifer, V.F., Tanner Jr., F.W., Vojnovich, C. & Traufler, D.H. (1950).** Riboflavin by fermentation with *Ashbya gossypii*. *Indust Engn Chem* **42**, 1776-1781.
- Pinzauti, G., Giachetti, E., Camici, G., Manao, G., Cappugi, G. & Vanni, P. (1986).** An isocitrate lyase of higher plants: Analysis and comparison of some molecular properties. *Arch Biochem Biophys* **244** (1), 85-93.
- Plaut, G.W.E. (1954).** Biosynthesis of riboflavin. II. Incorporation of C^{14} -labelled compounds into ring A. *J Biol Chem* **211**, 111-116.
- Polakis, E.S. & Bartley, W. (1965).** Changes in enzyme activities of *Saccharomyces cerevisiae* during aerobic growth on different carbon sources. *Biochem J* **97**, 284-297.
- Postma, E., Verduyn, C., Scheffers, W.A. & van Dijken, J.P. (1989).** Enzymic analysis of the Crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Env Microbiol* **55**, 468-477.
- Pridham, T.G. & Raper, K.B. (1950).** *Ashbya gossypii* - Its significance in nature and in the laboratory. *Mycologia* **42**, 603-623.

- Pronk, J.T., Wenzel, T.J., Luttik, M.A.H., Klaassen, C.C.M., Scheffers, W.A., Steensma, H.Y. & van Dijken, J.P. (1994). Energetic aspects of glucose metabolism in a pyruvate-dehydrogenase-negative mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **140**, 601-610.
- Reinscheid, D.J. (1994). Physiologische und genetische Untersuchungen des Acetat-Stoffwechsels in *Corynebacterium glutamicum*. Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Richter, G., Volk, R., Krieger, C., Lahm, H.-W., Röthlisberger, U. & Bacher, A. (1992). Biosynthesis of riboflavin. Cloning, sequencing, and expression of the gene coding for 3,4-dihydroxy-butanone-4-phosphate synthase of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**, 4050-4056.
- Robinson, S.A., Slade, A.P., Fox, G.G., Phillips, R., Ratcliffe, R.G. & Stewart, G.R. (1991). The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism. *Plant Physiol* **95**, 509-516.
- Rua, J., De Arriaga, D., Busto, F. & Soler, J. (1989). Effect of glucose on isocitrate lyase in *Phycomyces blakesleeanus*. *J Bacteriol* **171**, 6391-6393.
- Rua, J., Arriaga, D. de, Busto, F. & Soler, J. (1990). Isocitrate lyase from *Phycomyces blakesleeanus*. *Biochem J* **272**, 359-367.
- Robertson, E.F., Hoyt, J.C. & Reeves, H.C. (1988). Evidence of histidine phosphorylation in isocitrate lyase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **263**, 2477-2482.
- Rogers, J.E. & McFadden, B.A. (1977). Isocitrate lyase from *Neurospora crassa*: pH dependence of catalysis and interaction with substrates and inhibitors. *Arch Biochem Biophys* **180**, 348-353.
- Ronne, H. (1995). Glucose repression in fungi. *Trends Gen Sci* **11**, 12-17.
- Segel, I.H., (1975). *Enzyme Kinetics*. New York: Wiley Interscience.
- Sjogren, R.E. & Romano, A.H. (1967). Evidence for multiple forms of isocitrate lyase in *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* **93**, 1638-1643.
- Smith, L. (1955). Cytochromes a, a₁, a₂ and a₃. *Methods Enzymol* **II**, 732-740.
- Staak, H., Binstock, J.F. & Schulz, H. (1978). Purification and properties of a pig heart thiolase with broad chain length specificity and comparison of thiolases from pig heart and *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **253**, 1827-1831.
- Stahmann, K.-P., Kupp, C., Feldmann, S.D. & Sahm, H. (1994). Formation and degradation of lipid bodies found in the riboflavin-producing fungus *Ashbya gossypii*. *Appl Microbiol Biotechnol* **42**, 121-127.
- Steiner, S. & Philippsen, P. (1994). Sequence and promoter analysis of the highly expressed *TEF* gene of the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Mol Gen Genet* **242**, 263-271.
- Steverding, D., Stierhof, Y.-D., Chaudhri, M., Ligtenberg, M., Schell, D., Beck-Sickinger, A.G. & Overath, P. (1994). ESAG 6 and 7 products of *Trypanosoma brucei* form a transferrin binding protein complex. *Eur J Cell Biol* **64**, 78-87.

- Szczesniak, T., Karabin, L., Szczepankowska, M. & Wituch, K. (1971).** Biosynthesis of riboflavin by *Ashbya gossypii*. Part I. The influence of fat of the animal origin on the riboflavin production. *Acta Microbiol Polon*, Ser B3, 29-34.
- Tanaka, A., Nabeshima, S., Tokuda, M. & Fukui, S. (1977).** Partial purification of isocitrate lyase from *Candida tropicalis* and some kinetic properties of the enzyme. *Agric Biol Chem* 41 (5), 795-801.
- Tanaka, A., Osumi, N. & Fukui, S. (1982).** Peroxisomes of alkane grown yeast: fundamental and practical aspects. *Ann NY Acad Sci* 386, 183-199.
- Tolbert, E. (1974).** Isolation of subcellular organelles of metabolism on isopycnic sucrose gradients. *Methods Enzymol* 31, 734-746.
- Ueda, M., Yamanoi, K., Morikawa, T., Okada, H. & Tanaka, A. (1985).** Peroxisomal localization of enzymes related to fatty acid β -oxidation in an n-alkane-grown yeast, *Candida tropicalis*. *Agric Biol Chem* 49, 1821-1828.
- Vandamme, E.J. (1992).** Production of vitamins, coenzymes and related biochemicals by biotechnological processes. *J Chem Tech Biotechnol* 53, 313-327.
- Van Dijken, J.P., Westhuis, R.A. & Pronk, J.T. (1993).** Kinetics of growth and sugar consumption in yeast. *Antonie van Leeuwenhoek* 63, 343-352.
- Vanni, P., Giachetti, E., Pinzauti, G. & McFadden, B.A. (1990).** Comparative structure, function and regulation of isocitrate lyase, an important assimilatory enzyme. *Comp Biochem Physiol* 95B, (3), 431-458.
- Van Urk, H., Voll, W.S.L., Scheffers, A.W. & van Dijken, J.P. (1990).** Transient-state analysis of metabolic fluxes in crabtree-positive and crabtree-negative yeasts. *Appl Env Microbiol* 56, 281-287.
- Veenhuis, M., van Dijken, J.P. & Harder, W. (1983).** The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeast. *Adv Microb Physiol* 24, 1-82.
- Veenhuis, M., Mateblowski, M., Kunau, W.H. & Harder, W. (1987).** Proliferation of microbodies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 3, 77-84.
- Verduyn, C. (1991).** Physiology of yeasts in relation to biomass yields. *Antonie van Leeuwenhoek* 60, 325-353.
- Volk, R & Bacher, A. (1988).** Biosynthesis of riboflavin. The structure of the four-carbon precursor. *J Am Chem Soc* 110, 3651-3653.
- Volk, R. & Bacher, A. (1990).** Studies on the 4-carbon precursor in the biosynthesis of riboflavin. *J Biol Chem* 265, 19479-19485.
- Walpole, C.S.J. & Wrigglesworth, R. (1987).** Oxido-reductases - Flavoenzymes. In *Enzyme mechanisms*, pp.506-533. Edited by M.I. Page & A. Williams. Belfast: Universities Press.
- Wanner, G. & Theimer, R.R. (1982).** Two types of microbodies in *Neurospora crassa*. *Ann NY Acad Sci* 386, 269-284.

- Wickerham, L.J., Flickinger, M.H. & Johnsten, R.M. (1946).** The production of riboflavin by *Ashbya gossypii*. *Arch Biochem* **9**, 95-98.
- Witt, I., Kronau, R. & Holzer, H. (1966).** Repression von Alkoholdehydrogenase, Malatdehydrogenase, Isocitratlyase und Malatsynthase in Hefe durch Glucose. *Biochim Biophys Acta* **118**, 522-537.
- Yamamoto, S., Atomi, H., Ueda, M. & Tanaka, A. (1995).** Novel NADP-linked isocitrate dehydrogenase present in peroxisomes of *n*-alkane-utilizing yeast, *Candida tropicalis*: comparison with mitochondrial NAD-linked isocitrate dehydrogenase. *Arch Microbiol* **163**, 104-111.
- Yoneda, F. (1984).** Riboflavin (B₂). In *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, pp. 108-124. Edited by M. Grayson & D. Ekroth. New York: Wiley.
- Zacharius, M.R., Zell, T.M., Morrison, J.H. & Woodlock, J.J. (1969).** Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Anal Biochem* **30**, 148-152.

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

Herrn Prof. Dr. H. Sahm danke ich für die Überlassung des Themas, seine großzügige Unterstützung und sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. K.-P. Stahmann, der durch seine ständige Diskussionsbereitschaft und seine wertvollen Anregungen maßgeblich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen hat. Sein Einsatz und Engagement sowie seine immer konstruktive Kritik hat mir das Arbeiten ungemein erleichtert und zudem für ein sehr gutes Arbeitsklima gesorgt.

Weiterhin bedanke ich mich bei den "permanenten bzw. zeitweiligen" Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der *Ashbya*-Arbeitsgruppe, als da wären Claudia Kupp, Cornelia Gätgens, Nicole Monschau, Theo Boedekker und Matthias Mahle, für die tatkräftige Unterstützung und die tolle Zusammenarbeit im *Ashbya*-Projekt.

Herrn Dr. K.-L. Schimz danke ich für die Bereitstellung der Isocitrat-Lyase-Antikörper und Herrn Dr. M. Klein für die Einführung in die "hohe Schule des Immuno-Blottings".

Den Wissenschaftlern der BASF AG, Herrn Dr. R. Kurth, Herrn Dr. B. Kaesler und Herrn Dr. H. Seulberger, gilt mein Dank für viele wertvolle Hinweise und anregende Diskussionen.

Herrn Dr. Y.-D. Stierhof (MPI für Biologie, Tübingen) bin ich dankbar für die Durchführung der Immunogold-Markierungen und für die Erstellung der EM-Bilder.

Herrn Dr. K. Kis (Institut für Organische Chemie und Biochemie, Technische Universität München) und Herrn Prof. Dr. Revuelta (Institut für Mikrobiologie und Genetik, Universität Salamanca) danke ich für die prompte Übersendung von Referenzsubstanzen bzw. für die Bereitstellung des HBS-codierenden Plasmids. Ohne ihre Unterstützung wäre die schnelle Etablierung des neuen HBS-Assays nicht möglich gewesen.

Nicht zuletzt ein Dankeschön allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Biotechnologie 1 sowie der Enzymgruppe des Institutes für Biotechnologie 2 für die ständige Hilfsbereitschaft und die, oftmals institutsübergreifende, gute Zusammenarbeit.

Jül-3260
August 1996
ISSN 0944-2952