

BBA 75294

DIE INDUKTION DES AKTIVEN TRANSPORTES NEUTRALER AMINO-SÄUREN BEI *STREPTOMYCES HYDROGENANS*

K. RING

*Institut für vegetative Physiologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität, 6 Frankfurt/Main, Ludwig-Rehn-Strasse 14 (Theodor-Stern-Haus) (Germany)*

(Eingegangen am 27. Februar, 1969)

## SUMMARY

*Induction of active transport of neutral amino acids in *Streptomyces hydrogenans**

1. The transport system for neutral amino acids in *Streptomyces hydrogenans* is inducible. Its synthesis is suppressed by the known inhibitors of DNA synthesis, DNA-dependent RNA synthesis, and protein synthesis. Alanine and glycine as well as the non-metabolizable  $\alpha$ -aminoisobutyric acid show good inducing qualities. The concentration for maximal induction of the transport by these amino acids is 0.1 M. The induction can be augmented by the simultaneous addition of certain other amino acids which, added alone, have either no or only weak inducing qualities. The most effective of these amino acids is asparagine which enhances the induction by alanine more than 4 times. The mechanism of action of these stimulating amino acids is still unknown.

2. Kinetic investigations showed that induction enhances the maximal velocity of the influx of  $\alpha$ -aminoisobutyric acid, its steady state distribution, the influx constant  $k_{in}$ , and the efflux constant  $k_{ex}$ . The "Michaelis constant", however, remained unaltered.

3. The experimental results are interpreted in terms of the carrier concept. It can be assumed that induction regulates (enhances) the concentration for active carrier molecules within the membrane. The results exclude the possibility that an outer "permease" is the primary object of regulation. The physiological role of the induction as a part of the rather complex regulatory system for amino acid transport in this organism is discussed.

## EINLEITUNG

In einer früheren Mitteilung<sup>1</sup> wurde gezeigt, dass *Streptomyces hydrogenans* neutrale Aminosäuren, darunter die nicht-metabolisierbare  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure, aktiv transportiert und im Zellinneren stark anreichert. Die kinetischen Eigenschaften des Transportsystems wurden näher beschrieben.

Die vorliegende, auf HÜBENER<sup>2</sup> und RING *et al.*<sup>3</sup> zurückgehende Arbeit zeigt, dass dieses Transportsystem induzierbar ist. Die Eigenschaften der genetischen Regulation werden näher beschrieben. In Bezug auf den Mechanismus ergeben sich keine grundlegenden Unterschiede zur Induktion anderer Transportsysteme, ins-

besondere der den Aminosäuretransport betreffenden<sup>4-6</sup>. Abweichungen sind in erster Linie darin zu sehen, dass auch "nicht-induzierte" Zellen über eine relativ hohe, wenn auch inkonstante, basale Transportaktivität verfügen und scheinbar erst darüber hinaus induziert werden. Die hierfür erforderlichen Induktor-Konzentrationen liegen mit ihrem Wirkungsmaximum von  $10^{-1}$  M etwas höher als bei den vergleichbaren Fällen<sup>4-6</sup>, jedoch sehr viel höher als bei den zahlreichen induzierbaren Zuckerpemeasen von *Escherichia coli*.

Die Bedeutung der genetischen Regulation des Aminosäuretransports bei *S. hydrogenans* ist neben seinen Konsequenzen für den intermediären N-Stoffwechsel<sup>7</sup> vor allem wohl im Zusammenhang mit den an anderer Stelle beschriebenen<sup>8-13</sup> übergeordneten Regelkreisen für das gleiche Transportsystem zu sehen. Mit Hilfe zweier getrennter Feedback-Mechanismen steuern bestimmte Aminosäuren vom Zellinneren aus die aktive Aufnahme weiterer Aminosäuremoleküle in die Zelle. Diese Rückkoppelungssysteme arbeiten auf der Ebene des Transportsystems direkt. Insgesamt betrachtet, besitzt *S. hydrogenans* damit ein System sehr ökonomisch arbeitender Regelkreise für den aktiven Aminosäuretransport: Mit Hilfe der Induktion wird eine langfristige Anpassung der Zellen an die Kulturbedingungen durch Veränderung der Carrier-Konzentration in der Membran ermöglicht, während durch Feedback-Regulation die Aktivität des Transportsystems nahezu momentan dem aktuellen Bedarf der Zelle an Aminosäuren angeglichen werden kann (Hemmung oder Aktivierung). Damit ist dieses System jenen Systemen sowohl enzymatischer als auch genetischer Regelkreise analog, die etwa die Biosynthese von Aminosäuren in Mikroorganismen steuern.

#### MATERIAL UND METHODEN

##### *Präparation der Zellen*

Die Stammkultur von *S. hydrogenans*<sup>14</sup> wurde auf Haferflocken-Agar<sup>1</sup> bei 8-10° im Kühlschrank aufbewahrt und in Abständen von 6-8 Wochen neu abgeimpft und weitergezüchtet.

Für die Induktion wurden Kulturmölbchen (50 ml Mineralmedium (Tabelle I) in 100-ml Erlenmeyerkölbchen) mit der Stammkultur beimpft, 48 Std. bei 30° geschüttelt (Frequenz: 180/Min) und zum Animpfen von 1.5 l Mineralmedium (in 2-l Stehkolben) benutzt. Diese Kultur wurde bei 30° unter starker Belüftung mit Hilfe eines Belüftungsrohres mit feinporiger Glasfritte (Schott G1) inkubiert. Nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase, im Durchschnitt nach 48-65 Std., wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen bei  $3500 \times g$  geerntet, dreimal mit kaltem, steriles, bidestilliertem Wasser gewaschen und in steriles Phosphatpuffer (nach Sörensen, mit 1% Glucosezusatz, pH 7.1) suspendiert. Vorversuche hatten ergeben, dass während dieses Waschvorgangs der grösste Teil des in der Zelle in freier Form existierenden, osmotisch labilen Aminosäurepools herausgelöst wird.

Wenige ml der konzentrierten Zellsuspension wurden zu Induktionsansätzen gegeben, die im allgemeinen in 300-ml Erlenmeyerkölbchen 100 ml Mineralmedium mit entsprechenden Aminosäurezusätzen enthielten und gleichfalls bei 30° unter Schütteln inkubiert wurden. Etwa 12 Std. nach Beginn der Induktion wurden die Zellen bei  $3500 \times g$  geerntet, dreimal in bidestilliertem Wasser und einmal in Phosphatpuffer gewaschen und im gleichen Puffer suspendiert.

TABELLE I  
NÄHRLÖSUNGEN FÜR *S. hydrogenans*

Vollmedium		Mineralmedium		Aminosäuregemisch als Zusatz zum Mineralmedium	
Substanz	Menge (g)	Substanz	Menge (g)	Aminosäure	Menge (mg)
Glucose	10	Glucose	5	Glycin	50
Bacto Beef Extract	4	Succinat	5	DL-Alanin	50
Bacto Yeast Extract	1	NH <sub>4</sub> Cl	2	DL-Valin	50
Casein-Pepton, trypt. verdaut (Merck)	4	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Sörensen)	3	L-Leucin	25
NaCl	2.5	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Sörensen)	8	DL-Isoleucin	50
		NaCl	3	DL-Serin	50
		Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.3	DL-Threonin	50
Mit dest. Wasser auf 1 l aufgefüllt, pH auf 7.4 eingestellt und 15 Min bei 1.5 atm autoklaviert.		MgSO <sub>4</sub>	0.1	DL-Methionin	25
		FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.0025	L-Cystin	25
		In dest. Wasser gelöst, pH mit NaOH auf 7.2 eingestellt, mit dest. Wasser auf 1 l aufgefüllt. Anschliessend		DL-Asparaginsäure	125
				L-Glutaminsäure	125
				L-Phenylalanin	25
				L-Tyrosin	25
				L-Tryptophan	25
				L-Prolin	25
		Zugabe folgender Vitamine (mg)		L-Lysin	50
		Vitamin B <sub>1</sub>	0.2	L-Arginin	50
		Vitamin B <sub>2</sub>	0.2	L-Histidin	25
		Nicotinsäure	0.6	In 1 l Mineralmedium gelöst, pH eingestellt und sterilisiert durch Filtrieren.	
		Ca-Pantothenat	0.4		
		Biotin	0.001		
		pH überprüft; sterilisiert durch Filtrieren.			

Die Zellsuspension wurde nephelometrisch (Zusatz zum Photometer ELKO III, C. Zeiss) auf eine Trübung von etwa 110 eingestellt, was einer Zelltrockenmasse von 1-2 mg/ml entspricht.

#### Aminosäuren

$\alpha$ -Amino[1-<sup>14</sup>C]isobuttersäure bezogen wir von The Radiochemical Centre, Amersham, England. Alle nichtmarkierten Aminosäuren waren reinste oder p.a. Präparate der Firmen Hoffmann-La Roche, Basel, und Serva Entwicklungslabor, Heidelberg. Sämtliche verwendeten Aminosäuren waren chromatographisch rein.

#### Hemmstoffe

Puromycin und Mitomycin C bezogen wir von Serva Entwicklungslabor, Heidelberg, Chloramphenicol als "Paraxin" puriss. crist. von C. F. Boehringer, Mannheim. Actinomycin C wurde uns in reinster Form von den Farbenfabriken Bayer, Leverkusen, zur Verfügung gestellt, Proflavin-Sulfat erhielten wir von EGA-Chemie, Steinheim/Albuchs.

#### Transportexperimente

Die früher beschriebene<sup>1</sup> Versuchsanordnung zur Messung der Aufnahme von  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure wurde ohne Änderung übernommen. Die Zellen wurden unter

Schütteln bei 30° im Wasserbad mit  $\alpha$ -Amino[1-<sup>14</sup>C]isobuttersäure (1 mM) inkubiert. Zu bestimmten Zeiten wurden je 2 ml der Suspension entnommen und sofort anschließend durch Membranfilter (MF 15, gewichtskonstant, Membranfiltergesellschaft, Göttingen) filtriert.

Die Ergebnisse sind, wie früher beschrieben<sup>1</sup>, ausgedrückt als:  $u'_c$  = die Radioaktivität pro g Zelltrockenmasse, und  $Ru'_t = u'_c/a'_t$ , wobei  $Ru'$  den Verteilungsquotienten der Radioaktivität zwischen g Zellen (Trockengewicht) und ml Aussenflüssigkeit ( $a'_t$ ) zur Zeit  $t$  darstellt.  $Ra$  beschreibt den Verteilungsquotienten zwischen ml Zellwasser und ml Aussenflüssigkeit.

Zur Berechnung der Influxkonstanten  $k_{in}$  und der Effluxkonstanten  $k_{ex}$  ist der Wassergehalt der Zellen ( $W_c = \text{ml Zellwasser/g Trockenzellen}$ ) zu berücksichtigen. Er beträgt bei *S. hydrogenans* etwa 4. Die Fluxkonstanten  $k_{in}$  und  $k_{ex}$  wurden nach den früher angegebenen Ableitungen<sup>1,15</sup> berechnet. Danach gilt im Gleichgewicht für den Austauscheflux:

$$2,3 \cdot \log \frac{u_{ct} - u_{c\infty}}{u_{c_0} - u_{c\infty}} = - \frac{I}{W_c} \cdot k_{ex} t \quad (1)$$

Im steady state ist ferner:

$$k_{in} = k_{ex} \cdot Ra \quad (2)$$

#### Radioaktivitätsmessung

Die Radioaktivitäten der Zellen und Filtrate wurden, wie früher beschrieben<sup>1</sup>, mit dem Geiger-Müller-Zählrohr der Firma Frieseke und Hoepfner, Erlangen, bestimmt.

#### ERGEBNISSE

##### Substratabhängigkeit der Transportsteigerung

Influx und Gleichgewichtsverteilung von  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure werden bei *S. hydrogenans* wesentlich durch die Wachstumsbedingungen mitbestimmt, denen die Kultur unterworfen war. Die Zellen reichern  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure am stärksten an, wenn sie in einem Mineralmedium gewachsen waren, das bestimmte Aminosäuren enthielt. Fig. 1 zeigt, dass die Zellen nach zwölfstündiger Züchtung in einem Gemisch aus 18 Aminosäuren  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure mehr als viermal so schnell aufnehmen wie nach Züchtung im gleichen, jedoch aminosäurefreien Basalmedium.

Wenn der Nährlösung anstelle des Aminosäuregemisches  $10^{-1}$  M L-Alanin zugesetzt war, liess sich fast die gleiche Stimulierung der  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure-Aufnahme beobachten. Dies zeigt, dass der Anstieg der Transportaktivität nicht an ein komplexes Medium mit nahezu sämtlichen natürlichen Aminosäuren gebunden ist, sondern sich auf die Anwesenheit bestimmter einzelner Aminosäuren zurückführen lässt. Wie wenig ein komplexes Medium für die Stimulierung des Transportes optimal sein kann, ist im Extremfall am "Vollmedium" zu erkennen, das durch seinen Gehalt an Pepton, Hefe- und Fleischextrakt sehr reich an freien Aminosäuren ist. Dennoch stimuliert es das  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure-Transportsystem erheblich schwächer als das Mineralmedium mit Zusatz von  $10^{-1}$  M L-Alanin oder eines Gemisches aus 18 verschiedenen Aminosäuren, wie aus Tabelle II und einem Vergleich der darin angeführten Werte mit denen der Fig. 1 zu entnehmen ist.

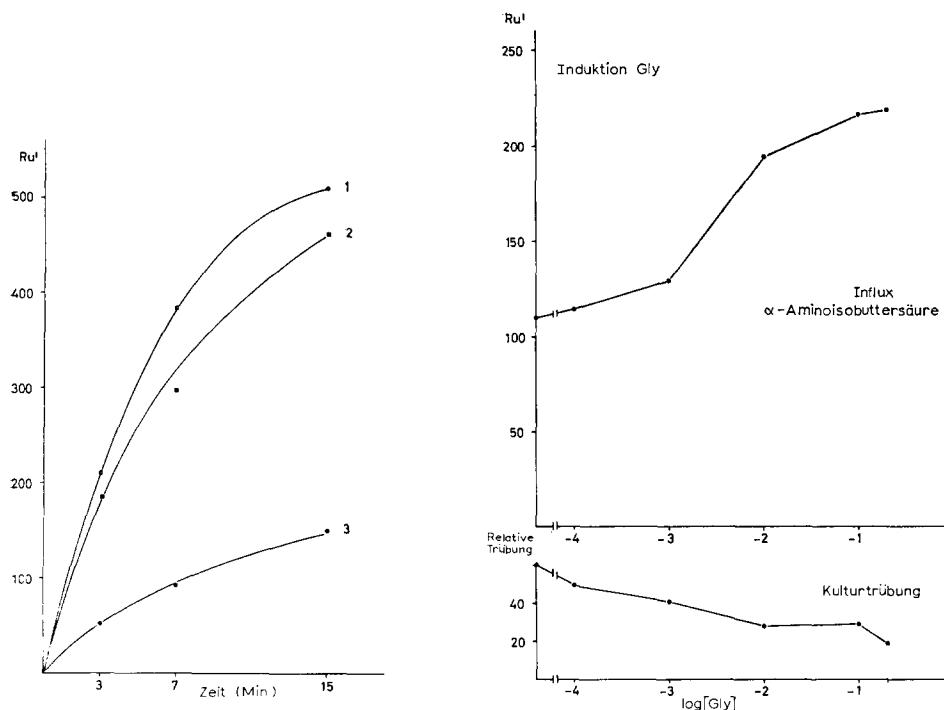


Fig. 1. Einfluss der Züchtungsbedingungen auf den  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure-Transport in *S. hydrogenans*. 1, Züchtung der Zellen in Mineralmedium mit einem Gemisch aus 18 Aminosäuren; 2, Züchtung der Zellen in Mineralmedium mit 0.1 M L-Alanin; 3, Züchtung der Zellen in Mineralmedium ohne Zusatz. Ordinate: Relative Aufnahme von  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure; Abszisse: Aufnahmedauer in Minuten.

Fig. 2. Einfluss der Glycin-Konzentration der Nährösung auf  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure-Transport und Kulturwachstum. Ordinaten: Relative Aufnahme von  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure nach 5 Min und relative Trübung der Kulturen nach 12-stündiger Induktion; Abszisse: Logarithmus der Glycin-Konzentration (M).

## TABELLE II

### INDUKTION DES $\alpha$ -AMINOISOBUTTERSÄURE TRANSPORTES DURCH VERSCHIEDENE FAKTOREN

Die Zellen wurden 13 Std. bei 30° in den angegebenen Nährösungen gezüchtet, anschliessend gewaschen und in Phosphatpuffer suspendiert, wie angegeben. Danach erfolgte die Messung der Aufnahme von  $\alpha$ -Amino[<sup>14</sup>C]isobuttersäure nach 6 Min (Bestimmung des Verteilungsquotienten).

Nährösung	$\alpha$ -Aminoisobuttersäure Transport (Verteilung nach 6 Min)
Mineralmedium	3.6
Mineralmedium + Aminosäuregemisch (1:10 verdünnt)	23.6
Mineralmedium + Aminosäuregemisch (1:100 verdünnt)	21.5
Vollmedium	12.2

Nicht nur Alanin, sondern auch Glycin besitzt transportsteigernde Wirkung. Fig. 2 zeigt, dass die Influxsteigerung von der Konzentration der Aminosäure abhängt. Gleiches wurde auch für Alanin gefunden (Fig. 3). Beide Aminosäuren scheinen ihr Wirkungsmaximum im Bereich von  $10^{-1}$  M zu besitzen.

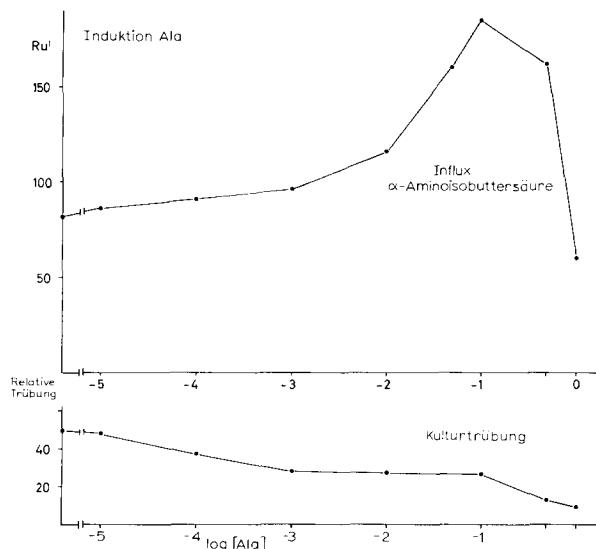


Fig. 3. Einfluss der L-Alanin-Konzentration der Nährösung auf  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure-Transport und Kulturwachstum. Ordinaten: Relative Aufnahme von  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure nach 5 Min und relative Trübung der Kulturen nach 12-stündiger Induktion; Abszisse: Logarithmus der Alanin-Konzentration (M).

Vergleicht man Transportaktivität und Kulturwachstum bei den verschiedenen Aminosäure-Konzentrationen miteinander, so ist festzustellen, dass die Stimulierung des Transportes offenbar unabhängig von der Zellvermehrung erfolgt. Wachstum und Stimulierung verlaufen sogar gegensinnig: im Bereich maximaler Transportstimulierung ist die Zellvermehrung bereits stark gehemmt.

Transportsteigerung durch Zusatz eines Transportsubstrates zur Nährösung und Unabhängigkeit der Transportsteigerung von Zellwachstum und -vermehrung deuten auf eine Induktion des Transportsystems hin. Dieser Befund wird durch die Feststellung gestützt, dass der Transport in gleicher Weise wie durch L-Alanin und Glycin auch durch  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure gesteigert werden kann (Fig. 4). Wie früher festgestellt worden ist<sup>1</sup>, wird  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure in *S. hydrogenans* weder decarboxyliert oder desaminiert, noch in Protein eingebaut. Der Transportsteigerung durch Züchten der Zellen in Gegenwart von  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure muss demnach eine Primärwirkung der  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure zugrunde liegen. Die Möglichkeit eines indirekten Effektes (etwa eine unspezifische Stimulierung der Proteinsynthese oder eine Intensivierung des intermediären N-Stoffwechsels auf Grund der Anhäufung etwaiger Metabolite der Aminosäure) scheidet aus.

Die Transportsteigerung durch  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure (Fig. 4) zeigt die gleichen Merkmale wie die durch Alanin oder Glycin hervorgerufene: Abhängigkeit von der

Aminosäurekonzentration in der Nährlösung mit einem Maximum bei  $10^{-1}$  M und Abnahme der Kulturdichte mit steigender Aminosäurekonzentration.

In den bisher geschilderten Experimenten wurde die Induktion mit Zellen durchgeführt, die (entsprechend der oben beschriebenen Methodik) vor Induktionsbeginn mehrfach gewaschen und kältegeschöckt worden waren. Fig. 5 zeigt ein Experiment, bei dem Zellen aus der exponentiellen Wachstumphase unmittelbar, d.h. ohne die oben beschriebenen Vorbehandlungen, mit Induktoren ( $0.1$  M L-Alanin +  $0.05$  M L-Asparagin) zusammengegeben wurden. Wie Fig. 5 zeigt, ist auch unter diesen Versuchsbedingungen eine erhebliche Induktion festzustellen, die, bezogen auf die Anfangsgeschwindigkeit des Influxes, einen Faktor von etwa 8-9 ausmacht.

#### Spezifität der Transportsteigerung

Die Untersuchung einer Reihe verschiedener Aminosäuren auf ihre transportsteigernden Fähigkeiten führte zu den in Tabelle III zusammengefassten Resultaten. Da die Experimente an verschiedenen Tagen durchgeführt wurden und die Induktionsraten von Kultur zu Kultur stark schwanken können, sind die Ergebnisse nicht in absoluten Werten eingesetzt, sondern jeweils auf die durch Alanin induzierten Kontrollkulturen der einzelnen Experimente bezogen worden. Wie die Tabelle zeigt, steigern die kurzkettigen neutralen Aminosäuren, mit Ausnahme von Valin, die Transportaktivität deutlich. Im Sinne der Induktionshypothese wären hiernach die das gleiche Transportsystem benutzenden Aminosäuren<sup>16</sup> auch gleichzeitig Induktoren mit abgestufter Wirksamkeit. Dem scheint zu widersprechen, dass andere Aminosäuren wie Glutamat, Aspartat oder Tryptophan, die mit Sicherheit keine strukturellen

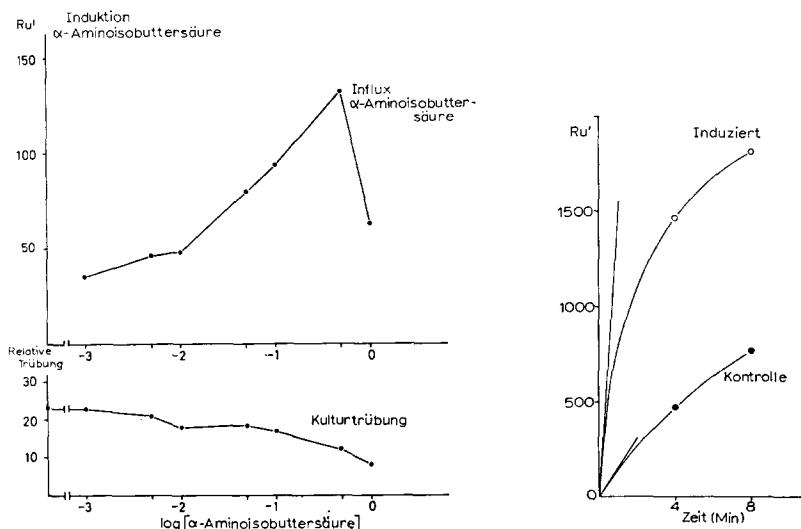


Fig. 4. Einfluss der  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure-Konzentration der Nährlösung auf  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure-Transport und Kulturwachstum. Ordinaten: Relative Aufnahme von  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure nach 5 Min und relative Trübung der Kulturen nach 12-stündiger Induktion; Abszisse: Logarithmus der  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure-Konzentration (M).

Fig. 5. Induktion des  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure-Transportes durch Zugabe von L-Alanin und L-Asparagin (Endkonzentrationen  $0.1$  M, resp.  $0.05$  M) zu einer exponentiell wachsenden Kultur in Mineralmedium. Messung der  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure-Aufnahme 8 Std. nach Induktorkugabe.

TABELLE III

INDUKTION DES  $\alpha$ -AMINOISOBUTTERSÄURE-TRANSPORTSYSTEMS DURCH VERSCHIEDENE AMINOSÄUREN

Induktionsbedingungen: Mineralmedium, 0,1 M an Aminosäuren, 14 Std. bei 30° in Ansätzen von je 100 ml geschüttelt. Die Ergebnisse der Einzelversuche wurden zusammengefasst und auf die Induktionsrate von L-Alanin als Kontrollansatz mit jeweils 100% Induktion bezogen.

Induktor	Induktion (%)
L-Alanin	100
Glycin	289
L-Valin	0
L-Leucin	74
DL- $\alpha$ -Aminobuttersäure	55
L-Serin	159
L-Glutamat	118
L-Aspartat	65
L-Arginin	6
L-Tryptophan	36
L-Methionin	0
L-Prolin	0

Beziehungen zum Transportsystem für neutrale Aminosäuren haben (W. GROSS UND K. RING, unveröffentlicht), ebenfalls Induktorqualitäten aufzuweisen scheinen. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass diese Aminosäuren im Verlauf ihrer Verstoffwechselung in Alanin übergeführt und somit sekundär ebenfalls zu Induktoren werden können.

*Kinetische Eigenschaften des induzierten Transportsystems*

Die in Fig. 1-5 dargestellten Versuche zeigen, dass die Zellen auch bei Abwesenheit einer induzierenden Aminosäure in der Nährlösung teilweise beträchtliche Transportaktivitäten ausbilden. Die Induktion durch von aussen zugesetzte Aminosäuren führt demnach nicht zum Aufbau eines vollkommen neuen Transportsystems, sondern nur zur Vergrösserung bereits vorhandener basaler Transportkapazitäten. Das System unterscheidet sich in diesem Merkmal von den zahlreichen induzierbaren Zucker-Permeasen anderer Mikroorganismen, die im uninduzierten Zustand gewöhnlich kaum nachweisbar sind, und auch von den meisten der induzierbaren bakteriellen Enzymsysteme. Diese erhebliche Abweichung warf daher die Frage auf, ob der Transportsteigerung nicht lediglich eine Veränderung der kinetischen Eigenschaften des Carrier-Systems zugrunde liege, etwa durch Anpassung bereits vorhandener wenig spezifischer Systeme an das neue Substrat. Ferner wäre eine Aktivierung inaktiver Vorstufen nach dem Modell der Verdauungsenzyme denkbar.

Auf die zweite Möglichkeit wird weiter unten im Zusammenhang mit Untersuchungen über die Proteinsynthese eingegangen. Die erste Frage haben wir durch kinetische Messungen zu klären versucht. Im Falle der Anpassung eines wenig spezifischen Systems müsste im Verlauf der Stimulierung die Affinität zwischen Substrat und Carrier-System ansteigen, und die "Michaelis Konstante" für  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure entsprechend kleiner werden. Die Messung der Substratabhängigkeit des  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure-Influxes an induzierten und uninduzierten Zellen zeigte jedoch (Fig. 6), dass die "Michaelis Konstanten" der einzelnen Transportsysteme unabhängig vom Induktionszustand bleiben und die Auftragung der reziproken Fluxe gegen die

reziproken  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure-Konzentrationen nach Lineweaver-Burk über den gesamten Messbereich linear bleibt. Dagegen nimmt die Maximalgeschwindigkeit des Influxes mit der Induktion zu. Dieses Ergebnis macht die Annahme eines Anpassungsmechanismus' unwahrscheinlich. Es ist allerdings nur dann eindeutig, wenn die transportsteigernde Reaktion primär den ersten Schritt im Gesamttransport, nämlich die durch die Messung erfasste Bindung zwischen Carrier und Substratmolekül, betrifft.

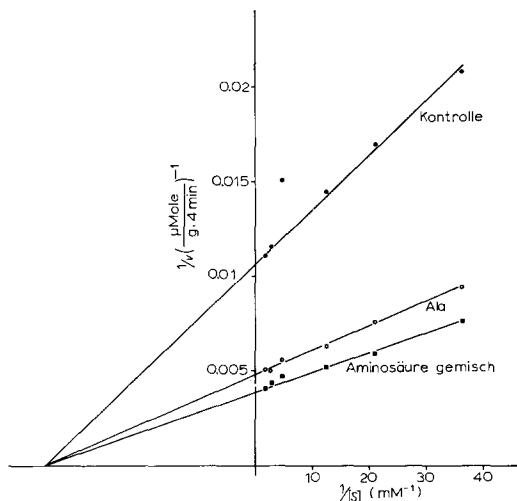


Fig. 6. Einfluss der Induktionsbedingungen auf die kinetischen Eigenschaften des  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure-Transportsystems. Abszisse:  $1/[S]$ ; Ordinate:  $1/v = 1/R_u'$ , ( $[S]$  = mM,  $v$  =  $\mu$ Mole/g · 4 Min).

Erfolgt die Steigerung an einem der anderen, nach der Carrier-Hypothese einen Kreisprozess von Aktivierung, Translokation und Inaktivierung des Carriers bildenden Schritte, so lässt sich allein auf Grund des in Fig. 6 dargestellten Versuchs keine definitive Aussage über den Einfluss der Induktion auf die kinetischen Konstanten ableiten.

#### Transportsteigerung und Efflux

Fig. 7 zeigt, dass mit der Erhöhung des Influxes gleichzeitig auch die maximale Anreicherung im Gleichgewicht zunimmt. Dieser Befund kann verschiedene Ursachen haben. Die kinetische Auswertung der Aufnahme- und Effluxmessungen nach früher abgeleiteten Gleichungen<sup>1</sup> zeigt, dass durch Induktion mit Alanin die Influxkonstante  $k_{in}$  und die Verteilung im steady state,  $R_u^\infty$  oder  $R_a^\infty$ , zunehmen, gleichzeitig aber auch die Effluxkonstante  $k_{ex}$  grösser wird. Die kinetischen Parameter eines derartigen Experimentes sind in Tabelle IV zusammengefasst. Da hiernach beide einseitig gerichteten Flüsse, Influx und Efflux, durch Induktion zunehmen, könnte zunächst vermutet werden, dass der erhöhte Influx auf einer gesteigerten Carrier-Beweglichkeit in der Membran beruhe. Im Zusammenhang mit den weiter unten beschriebenen Experimenten zur Kopplung zwischen Proteinsynthese und Steigerung des Transportes ist jedoch sehr viel wahrscheinlicher, dass die induzierten Zellen über eine grössere Anzahl aktiver Carrier-Moleküle in der Membran verfügen. Daraus ist weiter zu folgern, dass die Induktion den von beiden Seiten der Membran her zugänglichen

(hypothetischen) Carrier erfasst und nicht etwa ein vorgeschaltetes Enzym wie eine (hypothetische) Permease<sup>17,18</sup>. Während in der von COHEN UND MONOD<sup>19</sup> diskutierten "Minimal"-Hypothese die Permease in vielen Punkten dem älteren Carrier-Konzept

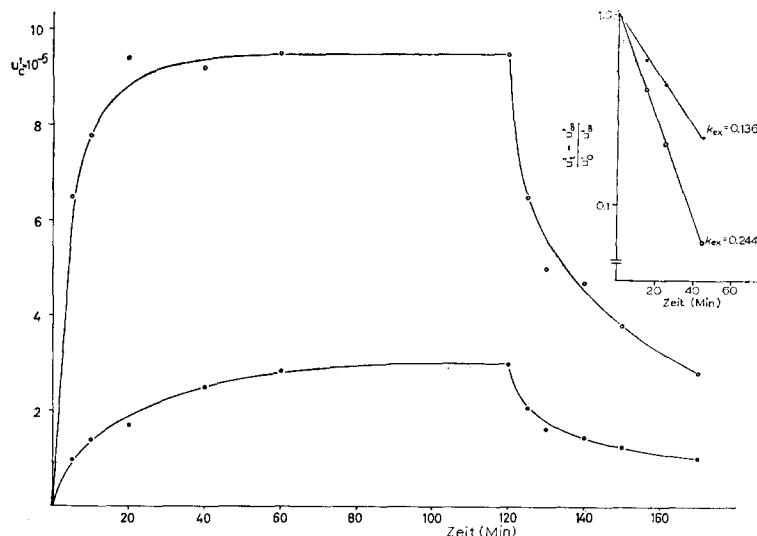


Fig. 7. Einfluss der Induktion auf Influx, Gleichgewichtsverteilung und Efflux (Austauschdiffusion) von  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure. ○—○, Zellen induziert (Mineralmedium mit Aminosäuregemisch); ●—●, Zellen uninduziert (Mineralmedium ohne Zusatz). Ordinate: Zellulärer  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure-Gehalt; Abszisse: Zeit in Minuten. Einschubzeichnung: Auftragung der Effluxe nach Gleichung 1.

TABELLE IV

KINETISCHE PARAMETER DES  $\alpha$ -AMINOISOBUTTERSÄURE-TRANSPORTES INDUIZIERTER UND "NICHT-INDUIZIERTER" ZELLEN VON *S. hydrogenans*

Die "nicht-induzierten" Zellen waren 13 Std. in Mineralmedium, die induzierten in Mineralmedium mit Zusatz von  $2 \cdot 10^{-1}$  M DL-Alanin gezüchtet.

Parameter	"Nicht-induziert"	Induziert
Influxkonstante ( $k_{in}$ ) ( $\text{ml} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{Min}^{-1}$ )	10.20	37.82
Effluxkonstante ( $k_{ex}$ ) ( $\text{ml} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{Min}^{-1}$ )	0.136	0.244
Influx ( $v_{in}$ ) ( $\mu\text{Mole} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{Min}^{-1}$ )	25.2	81.0
Verteilungsquotient (1 Min) ( $Ru'_{1 \text{ Min}}$ )	28.0	90.0
Verteilungsquotient (steady state) ( $Ru'_{\infty}$ )	300.0	620.0
"Michaelis Konstante" (M)	$2.73 \cdot 10^{-5}$	$2.73 \cdot 10^{-5}$

entspricht, wurde durch KEPES<sup>17</sup> in seinem weitergehenden Modell die Permease-Reaktion von der eigentlichen Translokation des Substrates über die Membran in Form des Transporter-Substratkplexes getrennt und an die Aussenseite (*cis*-Seite) der Membran verlegt. KOCH<sup>18</sup> hat das Modell, für welches bei *E. coli* viele Befunde sprechen, ausführlich diskutiert. Wie aus Tabelle IV hervorgeht, ist dieses Modell auf den Aminosäuretransport bei *S. hydrogenans* nicht anwendbar, sofern die Permease als alleinige induzierbare Komponente des Transportsystems angesehen wird. In diesem

Fall hätte durch Induktion lediglich  $k_{in}$  grösser werden dürfen, wogegen  $k_{ex}$  konstant bleiben sollte.

Wie Tabelle IV ferner zeigt, steigen die Fluxkonstanten  $k_{in}$  und  $k_{ex}$  nicht gleichsinnig an: in allen bisher untersuchten Fällen nimmt die Influxkonstante bei Induktion stets stärker zu als die Effluxkonstante. Obwohl hierfür zur Zeit keine plausible mechanistische Erklärung gegeben werden kann, ist in dieser Diskrepanz doch die Ursache für die Erhöhung der Gleichgewichtsverteilung der  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure bei Induktion zu sehen, da auf Grund der Beziehung  $R_a = k_{in}/k_{ex}$  (Gl. 2) bei gleichsinniger Steigerung von  $k_{in}$  und  $k_{ex}$  eine Erhöhung der Gleichgewichtsverteilung nicht erwartet werden kann.

### Kinetik der Induktion

In Fig. 8 ist der zeitliche Verlauf der Induktion des  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure-Transportsystems in Mineralmedium unter Verwendung von  $2 \cdot 10^{-1}$  M DL-Alanin dargestellt. Der Anstieg der Transportkapazität beginnt etwa 2 Std. nach Zugabe des Induktors und erreicht nach weiteren 4 Std. seinen Höchstwert. Ein Vergleich des Kulturwachstums mit dem zeitlichen Ablauf der Induktion ergibt, dass der vermehrte Aufbau des Carrier-Systems bereits gegen Ende der Ruheperiode der Kultur (lag-Phase) einsetzt. Im Anfangsteil der exponentiellen Vermehrungsphase ist die Induktion nahezu abgeschlossen und hat ihren Maximalwert von

$$\frac{R_u'_{5 \text{ Min}} \text{ induzierter Zellen}}{R_u'_{5 \text{ Min}} \text{ Kontrollen}} = 5.6$$

bei diesem Versuch erreicht.

### Induktion und Proteinsynthese

Den Nachweis, dass die Transportsteigerung an die Neusynthese von Protein gebunden ist, erbrachten Versuche mit Hemmstoffen der DNA-, RNA- und Protein-

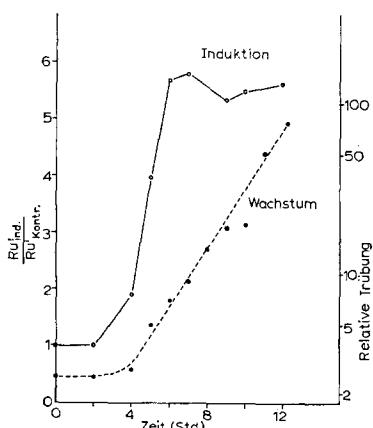


Fig. 8. Kinetik von Transportinduktion und Kulturwachstum. Linke Ordinate: Verhältnis der Transportaktivitäten induzierter und nichtinduzierter Zellen zueinander. Rechte Ordinate: Relative Trübung der induzierten Kultur; Abszisse: Induktionsdauer in Std. Induktionsmedium: Mineralmedium mit Zusatz von  $2 \cdot 10^{-1}$  M DL-Alanin +  $5 \cdot 10^{-2}$  M L-Asparagin. Züchtungstemperatur:  $30^\circ$ . Aufnahme von  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure durch gewaschene Zellen: 3 Min bei  $30^\circ$  in Phosphatpuffer.

Synthese. HÜBENER<sup>2</sup> hatte schon vor mehreren Jahren am gleichen System nachgewiesen, dass der Zusatz von Aethionin anstelle von Methionin zum mineralischen Induktionsmedium den Transport von  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure hemmt. Die Hemmung konnte durch Zugabe von Methionin aufgehoben werden. Da Aethionin nicht ausschliesslich die Proteinsynthese hemmt<sup>29</sup>, wurden bei den folgenden Versuchen zunächst die spezifischer wirkenden Aminosäureanalogen 5-Methyltryptophan und  $\beta$ -Fluorphenylalanin als Hemmstoffe eingesetzt. Von beiden Analogen ist der Wirkungsmechanismus bekannt.  $\beta$ -Fluorphenylalanin kann in Protein eingebaut werden und zum Aufbau defekter, inaktiver Enzyme führen. Demgegenüber hemmt 5-Methyltryptophan die Proteinsynthese über den Umweg einer "falschen" Feedback-Hemmung der Tryptophansynthese. Beide Analogen unterbinden bei *S. hydrogenans* den durch  $10^{-1}$  M L-Alanin induzierten Aufbau des  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure-Transportsystems. Fig. 9 zeigt, dass die Hemmung bei Konzentrationen oberhalb von  $10^{-4}$  M erfolgt.

Anschliessend wurde versucht, die Hemmung durch  $\beta$ -Fluorphenylalanin durch Zusatz aequimolarer Mengen von L-Phenylalanin abzuschwächen. Wie Fig. 10 zeigt, hemmt  $2 \cdot 10^{-2}$  M  $\beta$ -Fluorphenylalanin die Induktion zu etwa 90%. Die gleiche Konzentration von L-Phenylalanin hat geringe stimulierende Wirkung. Gleichzeitige Zugabe beider Substanzen zur Kultur setzt die Hemmung auf etwa 50% herab.

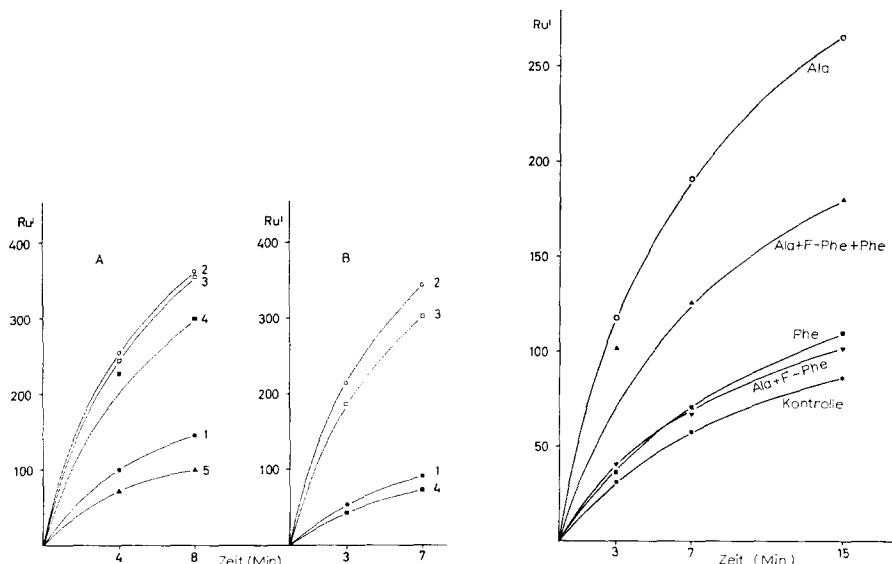


Fig. 9. Einfluss von Hemmstoffen auf die Induktion des  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure-Transportes. Ordinate: Relative Aufnahme von  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure; Abszisse: Aufnahmemezeit in Min. (A) Zellen aus folgenden Induktionskulturen: 1, Kontrolle, uninduziert; 2, Kontrolle, induziert mit  $2 \cdot 10^{-1}$  M DL-Alanin +  $5 \cdot 10^{-2}$  M L-Leucin; 3, wie 2 mit Zusatz von  $10^{-4}$  M DL-5-Methyltryptophan; 4, wie 2 mit Zusatz von  $10^{-3}$  M DL-5-Methyltryptophan; 5, wie 2 mit Zusatz von  $10^{-2}$  M DL-5-Methyltryptophan. (B) Induktionskulturen: 1, Kontrolle, uninduziert; 2, Kontrolle, induziert mit  $10^{-1}$  M DL-Alanin; 3, wie 2 mit Zusatz von  $5 \cdot 10^{-3}$  M DL- $\beta$ -Fluorphenylalanin; 4, wie 2 mit Zusatz von  $5 \cdot 10^{-2}$  M DL- $\beta$ -Fluorphenylalanin.

Fig. 10. Einfluss von L-Phenylalanin und  $\beta$ -Fluorphenylalanin auf die Induktion des  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure-Transportes. Konzentrationen der Aminosäuren im Kulturmedium: L-Alanin,  $10^{-1}$  M; L-Phenylalanin,  $2 \cdot 10^{-2}$  M; DL- $\beta$ -Fluorphenylalanin,  $2 \cdot 10^{-2}$  M.

TABELLE V

HEMMUNG DER INDUKTION DES  $\alpha$ -AMINOISOBUTTERSÄURE-TRANSPORTSYSTEMS DURCH VERSCHIEDENE INHIBITOREN

Die eingeklammerten Trübungswerte sind unsicher, da die Messungen durch die starke Fluoreszenz von Zellen und Medium in Gegenwart von Proflavinsulfat gestört werden.

Expt. No.	Ansatz	Hemmstoff	Menge ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Transportaktivität	Kulturtrübung
				(in % der induzierten Kontrollansätze)	
1	Induzierte Kontrolle ( $2 \cdot 10^{-1}$ M DL-Alanin) + $5 \cdot 10^{-2}$ M L-Leucin	—		100.0	100.0
2	Nicht-induzierte Kontrolle	—		25.9	82.0
3	Wie Expt. 1	Mitomycin C	50 20 10 5	6.0 47.1 43.5 60.0	6.6 49.4 40.6 60.4
4	Wie Expt. 1	Actinomycin C	20 10 5 1	1.6 2.0 6.9 16.2	6.1 6.5 3.8 9.2
5	Wie Expt. 1	Proflavinsulfat	80 40 20 10	1.0 1.45 14.1 50.0	(1.0) (1.0) (10.8) (38.4)
6	Wie Expt. 1	Chloramphenicol	50 30 20 10	6.7 8.9 7.1 65.8	7.8 9.4 10.9 50.0
7	Wie Expt. 1	Puromycin	50 20 10 5	100.0 100.0 100.0 100.0	100.0 100.0 100.0 100.0

Auch Hemmstoffe, die (an anderen Stellen angreifend) direkt oder indirekt die Proteinsynthese blockieren, beeinträchtigen die Induktion des Transportsystems (Tabelle V). Ausser Chloramphenicol, das die Eiweisssynthese auf der Stufe der Ribosomen hemmt, erwiesen sich Actinomycin C, Mitomycin C und Proflavin (Hemmstoffe der DNA- bzw. DNA-abhängigen RNA-Synthese) als Inhibitoren von Induktion und Zellvermehrung. Lediglich Puromycin zeigte keine Wirkung. Da jedoch Nucleoside auf Grund ihres polaren Charakters und der Grösse ihres Riboseteiles Zellmembranen häufig nur schlecht oder überhaupt nicht zu durchdringen vermögen, ist dieses negative Ergebnis wahrscheinlich auf die Struktureigenschaft des Puromycins als Amino-Nucleosid zurückzuführen. Die Versuche zeigen, dass die durch Züchtung mit  $10^{-1}$  M L-Alanin ausgelöste Steigerung des  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure-Transportes auf einer *de novo*-Synthese von Eiweiss beruht, und dass hierfür funktionsfähige DNA und Synthese von RNA erforderlich sind. Damit kann auch die bis dahin noch offene Möglichkeit einer Aktivierung inaktiver Vorstufen nach dem Modell der Verdauungsenzyme aufgegeben werden.

### Einfluss von Aminosäurekombinationen auf die Induktion

Die in den Fig. 2-4 dargestellten Versuche hatten gezeigt, dass die Induktion des Transportes eine Funktion der Induktorkonzentration ist und dass diese im Bereich von  $10^{-1}$  M ein Wirkungsmaximum durchläuft. Bei weiteren Versuchen hat sich herausgestellt, dass die Induktionsrate sich noch steigern lässt, wenn dem Kulturmedium zusätzlich zum Induktor eine weitere Aminosäure zugesetzt wird, die in der angewendeten Konzentration selber keine Induktorkualität aufzuweisen braucht. In Tabelle VI sind vier Einzelexperimente dieser Art zusammengefasst. In Kombination mit Alanin (Expt. 1-3) erhöhen Leucin,  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure, Glutamin, Asparagin und Arginin teilweise beträchtlich die Induktion des Transportes, wobei Asparagin mit einer Influxsteigerung um 537% (in Bezug auf die ohne Aminosäuren gezüchtete Kontrolle) weitaus am stärksten wirkt. Von diesen "Helper"-Aminosäuren besaßen (einzelnen verwendet) Leucin,  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure, Glutamin und Arginin geringere Induktorkualitäten als Alanin. Demgegenüber hemmten Valin und Methionin in Kombination mit Alanin bzw. Glycin die Induktion.

Die Ursache der Stimulierung ist noch nicht bekannt. Offenbar handelt es sich nicht um Vorgänge rein additiven Charakters. Allein die rechnerische Auswertung der in Tabelle VI aufgeführten Zahlen spricht gegen eine derartige Interpretation. In keinem Fall ergibt die Addition der einzelnen Induktionsgrößen den im Kombina-

TABELLE VI

EINFLUSS VERSCHIEDENER AMINOSÄUREN UND IHRER KOMBINATIONEN AUF DIE INDUKTION DES  $\alpha$ -AMINOISOBUTTERSÄURE-TRANSPORTSYSTEMS IN MINERALMEDIUM

AIB,  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure.

Expt.	Kultur:	1. Amino- säure Konzn. (M)	2. Amino- säure Konzn. (M)	Ru' AIB (4 Min)	Aktivität (%)	Aktivitäts- anstieg
1	Kontrolle, Aminosäure-frei	—	—	183	100	—
	L-Alanin	$10^{-1}$	—	241	132	+ 32
	$\alpha$ -Aminoisobuttersäure	$10^{-1}$	—	207	113	+ 13
	L-Leucin	$5 \cdot 10^{-2}$	—	154	84	- 16
	L-Alanin + L-Leucin	$10^{-1}$	$5 \cdot 10^{-2}$	430	235	+ 135
	L-Alanin +					
	$\alpha$ -Aminoisobuttersäure	$10^{-1}$	$10^{-1}$	308	168	+ 68
2	Kontrolle	—	—	60	100	—
	DL-Alanin	$2 \cdot 10^{-1}$	—	144	240	+ 140
	L-Valin	$5 \cdot 10^{-2}$	—	72	120	+ 20
	L-Glutamin	$5 \cdot 10^{-2}$	—	99	165	+ 65
	DL-Alanin + L-Valin	$2 \cdot 10^{-1}$	$5 \cdot 10^{-2}$	94	157	+ 57
	DL-Alanin + L-Glutamin	$2 \cdot 10^{-1}$	$5 \cdot 10^{-2}$	226	377	+ 277
3	Kontrolle	—	—	72	100	—
	DL-Alanin	$2 \cdot 10^{-1}$	—	171	237	+ 137
	L-Asparagin	$5 \cdot 10^{-2}$	—	204	283	+ 183
	L-Arginin	$5 \cdot 10^{-2}$	—	87	121	+ 21
	DL-Alanin + L-Asparagin	$2 \cdot 10^{-1}$	$5 \cdot 10^{-2}$	459	637	+ 537
	DL-Alanin + L-Arginin	$2 \cdot 10^{-1}$	$5 \cdot 10^{-2}$	234	325	+ 225
4	Kontrolle	—	—	80	100	—
	Glycin	$2 \cdot 10^{-1}$	—	379	474	+ 374
	L-Methionin	$5 \cdot 10^{-2}$	—	83	104	+ 4
	Glycin + L-Methionin	$2 \cdot 10^{-1}$	$5 \cdot 10^{-2}$	209	261	+ 161

tionsversuch tatsächlich gefundenen Wert, was am deutlichsten im ersten Experiment für Leucin zu zeigen ist. Weiter ist zu berücksichtigen, dass die Induktoren Alanin und Glycin in maximalen Wirkungsdosen eingesetzt wurden. Betrachtet man die "Helper"-Aminosäuren, im günstigsten Fall Asparagin, ebenfalls als normale Induktoren, so würde die Gesamtkonzentration an Induktoren im Expt. 3 von  $2 \cdot 10^{-1}$  M auf  $2.5 \cdot 10^{-1}$  M angestiegen sein. Auf Grund des Wirkungsspektrums von Alanin (Fig. 3) ist jedoch nicht zu erwarten, dass diese Konzentrationserhöhung noch eine Vervierfachung der Transportsteigerung auszulösen vermag. Da jedoch immerhin die Möglichkeit besteht, dass im Experiment der Fig. 3 die Lage des Maximums experimentell nicht genau erfasst worden ist und im Bereich der Zwischenwerte die Induktion noch erhebliche Steigerung erfährt, bleibt die endgültige Klärung weiteren Versuchen vorbehalten.

#### DISKUSSION

Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, dass der aktive Transport neutraler Aminosäuren bei *S. hydrogenans* auf genetischer Ebene reguliert wird und zumindest partiell induzierbar ist.

*S. hydrogenans* vermag in vitaminhaltigem Salzmedium mit Ammoniumchlorid als N-Quelle nach längerer "lag"-Phase zu wachsen und sich zu vermehren. Dabei bilden die Zellen ein aktives Transportsystem für  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure aus, das beträchtliche Kapazität besitzen kann. Die Transportaktivität lässt sich weiter steigern, wenn dem Salzmedium bestimmte Aminosäuren zugesetzt werden: insbesondere Glycin oder Alanin, aber auch  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure, Leucin,  $\alpha$ -Aminobuttersäure oder andere (Tabelle III). Der stärkste bisher beobachtete Anstieg betrug unter diesen Bedingungen etwa das Zehnfache der Ausgangskapazität. Die Annahme, dass die adaptive Steigerung des Transportes durch Induktion erfolgt, wird durch die folgenden Beobachtungen begründet:

1. Die besten Induktoren sind diejenigen Aminosäuren, die Substrate des betreffenden Aufnahmesystems sind, in erster Linie Glycin und Alanin. Auch  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure hat induzierende Eigenschaften. Insbesondere dieser Befund ist wichtig, da  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure von *S. hydrogenans* aktiv transportiert und angereichert wird, ohne anschliessend metabolisiert werden zu können. Seine Funktion bei der Transportsteigerung kann demnach nur die eines Induktors sein.

In Tabelle III sind einige Aminosäuren aufgeführt, die induzierend wirken, ohne strukturelle Beziehungen zum  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure-Transportsystem zu besitzen. Ohne Ausnahme stehen diese Aminosäuren jedoch mit ihrem Stoffwechsel in naher Beziehung zu Alanin oder Glycin, so dass ihre Wirkung als Sekundäreffekt über die erhöhte intermediäre Synthese eines der Induktoren verstanden werden kann. Dennoch kann die Frage gestellt werden, inwieweit die in Tabelle III zusammengefassten Ergebnisse mit der Theorie der Enzyminduktion<sup>21</sup> in Einklang zu bringen sind, welche eine relativ hohe Spezifität der Reaktion zwischen Repressor und Induktor fordert. Ein Vergleich mit anderen induzierbaren Transportsystemen<sup>22, 23</sup> zeigt jedoch, dass die Induktionspezifität im vorliegenden System keinesfalls ungewöhnlich niedrig ist. Zudem erscheint es plausibel, dass die Bindungsspezifität des Repressormoleküls nicht grösser ist als diejenige des von ihm regulierten Carrier- oder Enzymmoleküls.

2. Der vermehrte Aufbau des Transportsystems erfolgt unabhängig von der Zellvermehrung. Hohe Induktorkonzentrationen hemmen die Zellvermehrung, steigern jedoch gleichzeitig den Aufbau des Transportsystems maximal. Die geringe Vermehrung der Zellen bei hohen Aminosäurekonzentrationen, die in manchen Fällen nur einer Verdreifachung der Zellmenge während der Inkubation entspricht, lässt darauf schliessen, dass nicht etwa durch Selektion transportaktiverer Mutanten eine Induktion vorgetäuscht wird. Ein derartiger Einwand wird auch durch die in Fig. 8 dargestellte Kinetik gegenstandslos, nach welcher der vermehrte Aufbau des Transportsystems zu Beginn der exponentiellen Vermehrungsphase bereits abgeschlossen ist.

3. Die kinetischen Untersuchungen des  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure-Transportes induzierter und "nicht-induzierter" Zellen haben gezeigt, dass durch Induktion der Influxkoeffizient, die Maximalgeschwindigkeit des Influxes, die Gleichgewichtsverteilung und der Efflux durch Austauschdiffusion (also die Größen  $k_{in}$ ,  $v_{max}$ ,  $Ru'_{\infty}$  und  $k_{ex}$ ) vergrössert werden. Die Affinität zwischen Carrier und  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure (" $K_m$ ") wird nicht beeinflusst. Der  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure-Transport durch "un-induzierte" Zellen scheint demnach durch das gleiche System wie in induzierten Zellen zu erfolgen; der wesentliche Unterschied muss in der Anzahl aktiver Carrier-Moleküle gesehen werden. Hier ergibt sich jedoch eine gewisse Schwierigkeit. Wie an anderer Stelle berichtet wurde<sup>8,12,13</sup>, besteht Grund zu der Annahme, dass in Zellen aus dem Vollmedium der die aktive Aufnahme der Aminosäuren limitierende Schritt wahrscheinlich die Aktivierung des inaktivierten Carriers ist, also die chemo-osmotische Kopplung. Wenn diese Annahme richtig ist, dürfte eine alleinige Vermehrung der Carrier-Moleküle im Verlauf der Induktion keine Transportsteigerung auslösen. Diese Diskrepanz lässt sich durch die Annahme auflösen, dass die Limitierung des Transportes nur bei voll induzierten Zellen tatsächlich in der Reaktivierung des Carriers liegt, bei uninduzierten Zellen dagegen in der sehr viel niedrigeren Carrier-Konzentration. Als Alternativlösung ist nach den vorliegenden Versuchen jedoch auch denkbar, dass das nach dem Transportmodell<sup>8,12</sup> Carrier-aktivierende Enzym gleichzeitig mit dem Carrier induziert wird. Zur Klärung dieser Fragen sind weitere Untersuchungen erforderlich.

In Zusammenhang mit der Steigerung des Influxes ist die Beobachtung wichtig, dass simultan mit der Fluxkonstanten  $k_{in}$  auch die Konstante  $k_{ex}$  ansteigt. Dies ist eine notwendige Voraussetzung, wenn die erhöhte Transportkapazität der Zellen mit einem erhöhten Gehalt an Carrier-Molekülen erklärt werden soll. Andererseits zeigt sie, wie weiter oben diskutiert, dass die Induktion nicht, oder nicht allein, den Aufbau einer an der Aussenseite der Membran lokalisierten Permease<sup>17,18</sup> beschleunigt, sondern den beweglichen und von beiden Seiten der Membran her zugänglichen Carrier direkt erfasst. Ferner sind keine Anhaltspunkte dafür vorhanden, dass Anpassungsmechanismen an das neue Substrat mit der Steigerung der Transportaktivität in Zusammenhang stehen könnten.

4. Für eine erhöhte Synthese aktiver Carrier-Moleküle sprechen insbesondere auch die Versuche mit verschiedenen Hemmstoffen der DNA-, DNA-abhängigen RNA- und der Protein-Synthese. Hieraus geht eindeutig hervor, dass Synthese von Protein zum Aufbau des Transportsystems erforderlich ist. Wie für einen Induktionsmechanismus ferner erwartet werden muss, sind RNA-Synthese und funktionell intakte DNA gleichfalls essentiell.

5. Schliesslich weist das Vorhandensein einer "lag"-Phase beim vermehrten Aufbau des Transportsystems gleichfalls auf einen Induktionsvorgang hin.

Ungeklärt ist noch der Wirkungsmechanismus der "Helfer"-Aminosäuren. Mehrere Erklärungen bieten sich an: (a) Die Aminosäuren besitzen gute Eigenschaften als intermediaire N-Donatoren und stimulieren unspezifisch die zelluläre Biosynthese von Aminosäuren. (b) Der aktive Aminosäuretransport wird durch ein zweites Protein, das durch diese Aminosäure induziert wird, gefördert. (c) Die Aminosäuren besitzen regulatorische Eigenschaften auf der Ebene der "Translation" bei der Proteinsynthese<sup>24</sup> oder haben Funktionen als Coinduktoren<sup>25</sup>. (d) Schliesslich ist es möglich, dass das induzierte Carrier-Protein einen besonders hohen Gehalt an diesen Aminosäuren aufweist. Klärung dieser Fragen ist erst nach weiteren Untersuchungen zu erwarten.

Einige Abweichungen vom normalen Erscheinungsbild der Induktion sind festzustellen. Die auffälligsten betreffen die Höhe des Konzentrationsoptimums für die Induktion und in manchen Fällen grosse basale Transportaktivität "uninduzierter" Zellen. Beide Phänomene stehen vermutlich jedoch in engem Zusammenhang miteinander. Sie scheinen im übrigen in ähnlicher Weise auch bei den drei weiteren bisher bekanntgewordenen induzierbaren Aminosäuretransportsystemen<sup>4-6</sup> zu existieren. Zur Zeit kann noch nicht sicher entschieden werden, ob die basale Transportaktivität konstitutiv ist und etwa einem zweiten  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure-transportierenden System zugeordnet werden muss, oder ob sie ebenfalls induziert ist. Im Falle der Existenz eines zweiten Transportsystems müsste dessen Affinität für  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure im gleichen Bereich liegen wie die des induzierbaren Systems. Obwohl noch unveröffentlichte Befunde zeigen, dass die neutralen Aminosäuren bei *S. hydrogenans* durch mindestens zwei Systeme aktiv transportiert werden, erscheint es zur Zeit wahrscheinlicher, dass auch die basale Transportaktivität induziert ist. In Experimenten mit Zellen aus verschiedenen Kulturen schwanken die Transportaktivitäten "uninduzierter" Zellen sehr stark. In ähnlichem Ausmass variieren die Induktionsraten. Diese Befunde lassen sich insgesamt am einfachsten interpretieren, wenn man vollständige Induzierbarkeit des Transportsystems annimmt. Während des Wachstums im synthetischen Medium werden die Zellen in dem Ausmass den Transport induzieren, in dem sie Aminosäuren selbst synthetisieren und ihrem Pool zuführen. Da maximale Induktion sehr hohe Aminosäurekonzentrationen erfordert, wird die permanente "Autoinduktion" auch in den günstigsten Fällen den Höchstwert nicht erreichen. Dies wird erst durch Zugabe von Induktoren zum Nährmedium möglich. Bei Züchtung in Gegenwart höherer Konzentrationen einer rasch verstoffwechselbaren Aminosäure wie Alanin ist anzunehmen, dass die Biosynthese der übrigen Aminosäuren so weit wie möglich von dieser Aminosäure ausgeht. Unter derartigen Umständen wäre es—teleologisch betrachtet—for die Zelle von Vorteil, ihr Transportsystem für neutrale Aminosäuren über das normalerweise erforderliche Mass hinaus induktiv steigern zu können.

Wie in zwei weiteren Arbeiten beschrieben wird<sup>12,13</sup>, existiert bei *S. hydrogenans* noch ein übergeordnetes Steuerungssystem für die aktive Aminosäureaufnahme, das jedoch auf der Ebene des Transportsystems selbst wirkt. Im Sinne eines Feedback-Mechanismus wird die Aminosäureaufnahme durch die Konzentration der intrazellulären Aminosäuren bestimmt. Beide Regulationssysteme, zusammen genommen, ergeben für die Zelle ein sehr empfindliches und schnell reagierendes Steuerungsprinzip:

Während die Anpassung der Zellen an die Kulturbedingungen induktiv (also auf genetischer Ebene) erfolgt, wird der momentane Bedarf an Transportkapazität über einen übergeordneten Feedback-Mechanismus durch die zelluläre Aminosäurekonzentration bestimmt.

#### DANK

Für stimulierende Diskussionen und wertvolle Hinweise bei der Abfassung dieser Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. E. Heinz und Herrn Dr. W. Gross. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Gewährung einer Sach- und Personalbeihilfe. Den Farbenfabriken Bayer, Leverkusen, danken wir für die grosszügige Überlassung von Actinomycin C.

#### ZUSAMMENFASSUNG

1. Das Transportsystem neutraler Aminosäuren in *Streptomyces hydrogenans* ist induzierbar. Sein Aufbau wird durch Hemmstoffe der DNA-, der DNA-abhängigen RNA- sowie der Protein-Synthese unterbunden. Als gute Induktoren erwiesen sich L-Alanin, Glycin, aber auch die nichtmetabolisierbare  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure. Das Wirkungsmaximum der Induktoren liegt bei 0.1 M. Stark fördernd auf die Induktionsrate wirkt sich der Zusatz bestimmter, allein nicht oder nur wenig induzierender Aminosäuren zum Induktor aus. Die wirksamste dieser "Helper"-Aminosäuren ist Asparagin, das die Induktion durch Alanin um einen Faktor von etwa 4 steigert. Die Funktion der "Helper"-Aminosäuren ist noch ungeklärt.

2. Kinetische Untersuchungen zeigten, dass durch Induktion die Maximalgeschwindigkeit des Influxes von  $\alpha$ -Amino $^{14}\text{C}$ isobuttersäure, ihre Verteilung im steady state, die Influxkonstante  $k_{in}$  sowie die Effluxkonstante  $k_{ex}$  gesteigert werden. Die "Michaelis Konstante"  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure bleibt hingegen unverändert.

3. Die experimentellen Ergebnisse werden in dem Sinne interpretiert, dass die Konzentration aktiver Carrier-Moleküle in der Membran durch Induktion gesteigert und reguliert werden kann. Sie sprechen zumindest gegen eine alleinige Beteiligung von Permeasen an der Regulation. Die physiologische Bedeutung der Induktion als Regelsystem für den Aminosäuretransport und -stoffwechsel wird diskutiert.

#### REFERENZEN

- 1 K. RING UND E. HEINZ, *Biochem. Z.*, 344 (1966) 446.
- 2 H.-J. HÜBENER, in E. HEINZ, *Biochemie des aktiven Transportes*, Springer, Berlin, 1961, S. 167.
- 3 K. RING, H.-J. HÜBENER UND E. HEINZ, *Proc. Gem. Tagung Deut. Ges. Biophys., Oesterreich. Ges. reine u. angewandte Biophys. und Schweiz. Ges. Strahlenbiologie*, Wien, 1964, Kongressdienst Wiener Med. Acad., Wien, 1964, S. 35.
- 4 J. A. BOEZI UND R. D. DEMOSS, *Biochim. Biophys. Acta*, 49 (1961) 471.
- 5 W. R. BIBB UND W. R. STRAUGHN, *J. Bacteriol.*, 87 (1964) 815.
- 6 R. H. LYON, P. ROGERS, W. H. HALL UND H. LICHSTEIN, *J. Bacteriol.*, 94 (1967) 92.
- 7 A. KEPES, in J. F. HOFFMANN, *The Cellular Functions of Membrane Transport*, Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J., 1964, S. 155.
- 8 K. RING, W. GROSS UND E. HEINZ, *Ber. Bunsenges.*, 71 (1967) 893.
- 9 K. RING UND E. HEINZ, *Abstr. 2nd Intern. Biophys. Congr.*, Wien, 1966, 1966, No. 330.
- 10 W. GROSS, K. RING UND E. HEINZ, *Abstr. 4th Meeting Federation European Biochem. Soc.*, Oslo, 1967, 1967, No. 218.
- 11 W. GROSS, K. RING UND E. HEINZ, *Abstr. 5th Meeting Federation European Biochem. Soc.*, Prague, 1968, 1968, No. 69.

- 12 K. RING, W. GROSS UND E. HEINZ, *Arch. Biochem. Biophys.*, im Druck.
- 13 W. GROSS, K. RING UND E. HEINZ, *Arch. Biochem. Biophys.*, im Druck.
- 14 F. LINDNER, R. JUNK, G. NESEMANN UND J. SCHMIDT-THOMÉ, *Z. Physiol. Chem.*, 313 (1958) 117.
- 15 E. HEINZ, *J. Biol. Chem.*, 225 (1957) 305.
- 16 K. RING, W. GROSS, J. RUDORFF UND W. HÖHLE, *Physiol. Chem.*, 349 (1968) 1257.
- 17 A. KEPES, *Biochim. Biophys. Acta*, 40 (1960) 70.
- 18 A. L. KOCH, *Biochim. Biophys. Acta*, 79 (1964) 177.
- 19 G. N. COHEN UND J. MONOD, *Bacteriol. Rev.*, 21 (1957) 169.
- 20 A. MEISTER, *Biochemistry of the Amino Acids*, Vol. I, Academic Press, New York, 1965, S. 231.
- 21 F. JACOB UND J. MONOD, *J. Mol. Biol.*, 3 (1961) 318.
- 22 W. BOOS, P. SCHÄDEL UND K. WALLENFELS, *European J. Biochem.*, 1 (1967) 382.
- 23 H. WINKLER, *Biochim. Biophys. Acta*, 117 (1966) 231.
- 24 H. J. VOGEL UND R. H. VOGEL, *Ann. Rev. Biochem.*, 37 (1967) 519.
- 25 Y. SANNO, T. TANAKA, S. HAYASHI UND M. SUDA, *Biken's J.*, 8 (1965) 35.

*Biochim. Biophys. Acta*, 183 (1969) 375-393