

Konstitutive Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase bei Glucose verwertenden Mutanten von einem kryptischen Wildstamm

CHR. KÖNIG, I. SAMMLER, E. WILDE und H. G. SCHLEGEL

Institut für Mikrobiologie der Gesellschaft für Strahlenforschung, Göttingen

Eingegangen am 20. März 1969

Constitutive Glucose-6-phosphate Dehydrogenase in Mutants Utilizing Glucose, which are Derived from Cryptic Wildtype Strains

Summary. Wildtype cells of *Hydrogenomonas H 16* and of similar strains of *Hydrogenomonas* utilize only fructose; they are unable to use glucose as a carbon source. Mutants were isolated which are able to grow on glucose. Ten of these mutants were investigated and found to be similar with regard to the following properties: 1. they are constitutively derepressed for the formation of glucose-6-phosphate dehydrogenase, 2. the substrate saturation curve of the respiration of glucose is unlike of the fructose curve. While the respiratory rate with fructose as a substrate is already maximal at 1.66 mM fructose, the respiratory rate for glucose as a substrate (at 1.66 mM) amounts only to 15 to 55% of the maximal rate (substrate saturation). The relationships between these pleiotropic effects (glucose utilization and constitutive glucose-6-phosphate dehydrogenase) are unknown.

Zusammenfassung. Von Wildtyppopulationen von *Hydrogenomonas H 16* und anderen Stämmen, die lediglich Fructose, aber nicht Glucose zu verwerten vermögen, wurden Glucose verwertende Mutanten isoliert. Sämtliche Mutanten stimmen in zwei Merkmalen überein: 1. sie bilden Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase konstitutiv und 2. die Substratsättigungskurve der Veratmung von Glucose verläuft flacher als die für Fructose. Während die Atmungsrate bei 1,66 mM Fructose schon maximal ist, erreicht die Veratmung von Glucose bei 1,66 mM Glucose erst 15 bis 55%. Die Beziehungen zwischen diesen pleiotropen Effekten (Glucoseverwertung und konstitutive Bildung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase) sind unbekannt.

Hydrogenomonas H 16 verwertet Fructose als einzige Hexose (GOTTSCHALK et al., 1964). Gegenüber Glucose verhalten sich die Wildtypzellen kryptisch, d. h. auch auf Fructose gewachsene Zellen, die über alle zum Glucoseabbau notwendigen Enzyme verfügen, vermögen Glucose nicht umzusetzen (GOTTSCHALK, 1964). Von den Wildstämmen *Hydrogenomonas H 16* und *H 20* abgeleitete Mutanten verwerten zwar Glucose, oxydieren sie aber erst bei hohen Glucosekonzentrationen (1—10%) mit maximaler Rate, während die Fructoseoxydation schon bei 0,02% Fructose ihre maximale Rate erreicht (SCHLEGEL u. GOTTSCHALK, 1965).

Die Mutante *Hydrogenomonas H 16 G⁺ 1* unterscheidet sich vom Wildstamm nicht nur durch die Fähigkeit, Glucose zu verwerten, sondern auch durch eine konstitutive Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (SCHLEGEL u. TRÜPER, 1966).

Zur Prüfung der Frage, ob zwischen der Mutation zur Glucoseverwertung und der konstitutiven Bildung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase generell eine Beziehung besteht, wurden von *Hydrogenomonas* Stamm *H 16* und von anderen ebenfalls für Glucose kryptischen Wildstämmen Glucose verwertende Mutanten isoliert und nach auto- und heterotrophem Wachstum auf die Aktivitäten der Enzyme des einleitenden Hexoseabbaus hin untersucht.

Material und Methoden

Organismen. Neben *Hydrogenomonas* Stamm *H 16* (WILDE, 1961) wurde die Mutante *H 16 G⁺1* (SCHLEGEL u. TRÜPER, 1966) erneut geprüft. Die Glucose verwertenden Mutanten *H 16 G⁺5*, *G⁺6* und *G⁺7* waren bei der kontinuierlichen Kultur von *Hydrogenomonas H 16* im Chemostaten mit Fructose als begrenzendem Substrat nach jeweils mehrwöchigem Wachstum spontan aufgetreten und unter diesen Bedingungen selektiert worden (KÖNIG, 1967). Weitere Mutanten wurden von den *Hydrogenomonas*-Stämmen *H 1* (BARTHA, 1961), *J 17*, *G 29*, *J 10* und *G 9* (SCHUSTER, 1967) nach Nitritbehandlung isoliert. Die Mutante *F 31* wurde als Defektmutante des Wildtyps *H 16* isoliert, die Fructose nicht zu verwerten vermag.

Kultivierung. Die Zellen wurden sowohl unter chemolithotrophen Bedingungen als auch unter organotrophen Bedingungen herangezogen (SCHLEGEL et al., 1961).

Bestimmung der Enzymaktivitäten. Die spezifischen Aktivitäten wurden im optischen Test bestimmt; die Methoden wurden kürzlich beschrieben (BLACKKOLB u. SCHLEGEL, 1968).

Ergebnisse

Zur Prüfung der Frage, ob Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase von allen G^+ -Mutanten konstitutiv gebildet wird, wurden diese und der Wildstamm *H 16* unter chemolithotrophen Bedingungen (Mineralnährlösung; unter $H_2 + CO_2 + O_2$) und organotrophen Bedingungen herangezogen, durch Beschallung aufgebrochen und im Rohextrakt auf Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Hexokinase und die Enzyme des Entner-Doudoroff-Systems geprüft (Tab. 1 und 2). In den unter nicht-induzierenden Bedingungen gewachsenen Zellen aller Mutanten lag Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase in der 25–45fachen spezifischen Aktivität des Wildstammes vor. Induzierte Zellen hatten eine noch höhere Aktivität. Das Enzym wird demnach von allen Mutanten konstitutiv gebildet; durch Induktion erhöht sich die Aktivität maximal nur auf das Doppelte. Bezüglich der beiden anderen geprüften Enzyme verhalten sich die Mutanten wie der Wildstamm. Während die der Hexoseverwertung dienenden Enzyme im Wildstamm induzierbar sind und durch H_2 reprimiert werden, unterliegt Glucose-6-phosphat-Dehydro-

Tabelle 1. *Spezifische Aktivitäten von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Hexokinase und 6-Phosphogluconsäure-Dehydrase + 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconsäure-Aldolase (Entner-Doudoroff-System) in chemolithotroph und organotroph gewachsenen Zellen von Hydrogenomonas H 16 und Glucose verwertenden Mutanten*

Wachstums- bedingungen	Enzyme	Spezifische Enzymaktivität μmole/min/g Protein						
		H 16	G+1	G+3	G+4	G+5	G+6	G+7
chemolithotroph	G-6-P-DH	17	418	480	582	588	567	764
	Hexokinase	10	12	12	12	16	11	13
	ED-System	4	7	10	12	9	8	11
organotroph mit H 16: 0,8% Fructose	G-6-P-DH	282	903	651	885	803	815	1250
	Hexokinase	16	12	15	12	16	11	17
	ED-System	132	128	103	112	111	95	45
Mutanten: 1,0% Glucose								

Tabelle 2. *Spezifische Aktivitäten von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Hexokinase und 6-Phosphogluconsäure-Dehydrase + KDPG-Aldolase (Entner-Doudoroff-System) in chemolithotroph und organotroph gewachsenen Zellen von Glucose verwertenden Mutanten, die von kryptischen Wildstämmen abgeleitet worden sind*

Wachstums- bedingungen	Enzyme	Spezifische Enzymaktivitäten in μmole/min/g Protein						
		J 17	J 17 G+4	J 10	J 10 G+3	G 29	G 29 G+1	F 31
chemolithotroph	G-6-P-DH	5	425	23	329	13	174	128
	Hexokinase	38	25	24	22	19	20	45
	ED-System	—	13	13	2	6	15	37
organotroph	G-6-P-DH	130	1090	274	968	242	896	840
	Hexokinase	18	27	17	17	27	23	46
	ED-System	60	111	215	24	291	222	340

Organotroph wurden die Zellen mit 0,5% Fructose (Wildtyp), bzw. 0,5% Glucose (Mutante) herangezogen. Die Zellen wurden durch Beschallung aufgebrochen. In dieser Tabelle sind auch die spezifischen Aktivitäten einer Mutante (F 31) wiedergegeben, die als Fructose-Defekt-Mutante isoliert worden ist; sie vermag Fructose nicht zu verwerten, wächst auf Glucose und bildet Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase konstitutiv.

genase bei den Mutanten der H₂-Repression nicht. Dieses Enzym wird folglich nicht koordiniert mit den einleitenden Enzymen des Hexose-abbaus reguliert.

Es war bereits aufgefallen, daß die Atmungsrate mit Glucose als Substrat in anderer Weise von der Substratkonzentration beeinflußt

wird als die Fructoseveratmung. Während Fructose schon bei den geringsten verabfolgten Konzentrationen mit maximaler Rate veratmet wird, erreichte die Atmungsrate mit Glucose erst bei 1% Glucose (55 mM)

Tabelle 3

Atmungsraten von verschiedenen Wildstämmen und davon abgeleiteten Glucose verwertenden Mutanten (G^+) bei verschiedenen Fructose- bzw. Glucose-Konzentrationen

Stamm	Fructose		Glucose	
	1,33 mM	166 mM	1,33 mM	166 mM
<i>G 29</i>	73,3	46,8	—	—
<i>G 29 G⁺1</i>	30,9	25,8	17,5	42,6
<i>J 10</i>	102,7	80,6	—	—
<i>J 10 G⁺3</i>	50,7	35,4	16,3	107,4
<i>J 17 G⁺4</i>	75,6	67,2	16,4	65,0
<i>G 9 G⁺5</i>	129,9	129,8	20,2	79,0
<i>H 1 G⁺4</i>	50,3	41,6	16,0	39,0

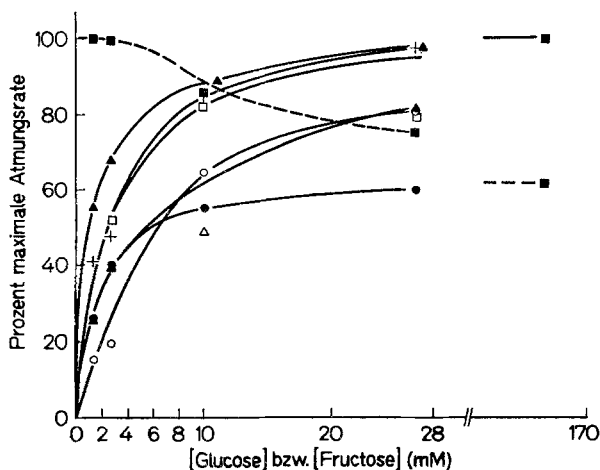


Abb. 1. Abhängigkeit der Atmungsrate mehrerer Glucose verwertender Mutanten von der Glucosekonzentration. Die Zellen waren in einer 0,5% Glucose enthaltenden Nährlösung herangezogen und anschließend gewaschen worden. Bei den angegebenen Glucosekonzentrationen wurde die Atmungsrate manometrisch bestimmt; die endogene Atmungsrate wurde abgezogen. Die jeweilige Atmungsrate ist in Prozenten der maximalen (bei Substratsättigung) erreichten Rate angegeben. Lediglich für *Hydrogenomonas G 29* ist die Rate der Fructoseveratmung (gestrichelte Kurve) eingetragen worden

■—■ Wildstamm *Hydrogenomonas G 29*; +—+ Mutante *G 29 G⁺1*;
 ○—○ Mutante *J 10 G⁺3*; △—△ Mutante *J 17 G⁺4*; ●—● Mutante *G 9 G⁺5*;
 □—□ Mutante *H 1 G⁺4*; ▲—▲ Mutante *F 31 (H 16)*

ihren maximalen Wert (SCHLEGEL u. GOTTSCHALK, 1965). Die Ergebnisse der Prüfung weiterer Glucose verwertender Mutanten gibt Tab. 3 wieder. Die Atmungsraten sind von Stamm zu Stamm verschieden. Fructose wird jedoch in allen Fällen bei der geringen Konzentration von 1,33 mM mit höherer Rate oxydiert als bei der hohen Konzentration (166 mM). Im Falle der Glucoseoxydation besteht das umgekehrte Verhältnis; Glucose wird bei geringen Konzentrationen langsamer oxydiert als bei hohen. In Abb. 1 ist die Abhängigkeit der Glucoseoxydationsrate von der Glucosekonzentration für mehrere Stämme graphisch dargestellt. Die Atmungsrate folgt also mit zunehmender Glucosekonzentration einer Sättigungskurve. Fructose wird demgegenüber bereits bei der geringsten angewandten Konzentration mit maximaler Rate veratmet, und hohe Fructosekonzentrationen üben eine Hemmung aus. In Abb. 1 sind die Atmungsraten für Fructose nur für den Stamm *G 29* aufgenommen worden.

Diskussion

Untersuchungen an Kulturhefen hatten empirisch eine Regelmäßigkeit erkennen lassen: Hefen, die Glucose vergären, vergären auch Fructose und Mannose; Hefe, die Glucose nicht vergärt, setzt auch keinen anderen Zucker um (STELLING-DEKKER, 1931). Diese Regel gilt für Bakterien keineswegs. Zwar ist auch bei ihnen eine Hexokinase verbreitet, die Glucose, Mannose und Fructose zu phosphorylieren vermag; die Verwertbarkeit der Substrate ist jedoch vom Vorhandensein des substratspezifischen Transportsystems abhängig. Beispielsweise wächst der Wildtyp von *Pseudomonas putrefaciens* nur mit Saccharose oder Maltose als Substraten, nicht mit Fructose oder Glucose. Eine spontane Mutante verwertet auch Glucose (KLEIN u. DOUDOROFF, 1950). Daß *Hydrogenomonas H 16* lediglich Fructose verwertet, ist oben erwähnt worden. Die Unfähigkeit, Glucose zu verwerten, ist kürzlich auch für *Hydrogenomonas eutropha* nachgewiesen worden (COOK et al., 1967). Den Wildtypzellen der meisten bisher eingehend untersuchten *Hydrogenomonas*-Stämme fehlt demnach das System zum aktiven Transport der Glucose. Es ist gelungen, von mehreren Stämmen Glucose verwertende Mutanten zu isolieren; Mannose verwertende Mutanten wurden bisher trotz mehrfacher Bemühungen nicht isoliert. Es ist anzunehmen, daß Glucose nicht aktiv transportiert wird, sondern durch „erleichterte Diffusion“ in die Zellen gelangt.

Die vorgelegten, an mehreren von verschiedenen Wildtypen abgeleiteten Mutanten erhobenen Befunde lassen erkennen, daß zwischen der Glucoseaufnahme bzw. -verwertung und der konstitutiven Bildung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase eine Beziehung besteht. Diese Korrelation wird durch die Auffindung einer anderen Mutante bestätigt.

Im Zuge der Isolierung katabolischer Defektmutanten von *H 16* wurde eine Mutante *F 31* (Tab. 2) isoliert, die nicht auf Fructose wächst und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase konstitutiv bildet. Auch diese Mutante verwertet Glucose und ist durch die oben erwähnte geringe Affinität für Glucose gekennzeichnet.

Die Beziehungen zwischen der Befähigung zur Glucoseverwertung und der erhöhten und konstitutiven Bildung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase bleiben zunächst offen. Nachdem GOTTSCHALKs Untersuchungen (1964) gezeigt hatten, daß sich *H 16* gegenüber Glucose kryptisch verhält, wurde geprüft, ob nach Wachstum auf Acetat während 24stündiger Inkubation mit Acetat und 1% Glucose eine leichte Erhöhung der Enzyme des Hexoseabbaus eintritt. Der negative Befund beweist erneut, daß Glucose weder aktiv noch durch erleichterte Diffusion in die Zellen aufgenommen wird. Es ist demnach auch unwahrscheinlich, daß für die durch Mutation gewonnene Fähigkeit, Glucose zu verwerten, lediglich die konstitutive Bildung eines einzigen am Hexoseabbau beteiligten Enzyms verantwortlich ist. Durch die Mutation haben sich neben der Regulation der Enzymbildung auch die Permeabilitätseigenschaften verändert (pleiotroper Effekt).

Für die Untersuchungen wurden Apparate in Anspruch genommen, die von der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Verfügung gestellt worden sind.

Literatur

- BARTHA, R.: Physiologische Untersuchungen über den chemolithotrophen Stoffwechsel neu isolierter *Hydrogenomonas*-Stämme. Diss. der math.-naturwiss. Fakultät, Göttingen 1961.
- BLACKKOLB, F., u. H. G. SCHLEGEL: Regulation der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus *Hydrogenomonas H 16* durch ATP und NADH_2 . Arch. Mikrobiol. **63**, 177—196 (1968).
- COOK, D. W., R. G. TISCHER, and L. R. BROWN: Carbohydrate metabolism in *Hydrogenomonas eutropha*. Canad. J. Microbiol. **13**, 701—709 (1967).
- GOTTSCHALK, G.: Die Verwertung organischer Substrate durch *Hydrogenomonas* in Gegenwart von molekularem Wasserstoff. Biochem. Z. **341**, 260—270 (1965).
- U. EBERHARDT u. H. G. SCHLEGEL: Verwertung von Fructose durch *Hydrogenomonas H 16* (I). Arch. Mikrobiol. **48**, 95—108 (1964).
- KLEIN, H. P., and M. DOUDOROFF: The mutation of *Pseudomonas putrefaciens* to glucose utilization and its enzymatic basis. J. Bact. **59**, 739—750 (1950).
- KÖNIG, CH.: Über die Kultur von *Hydrogenomonas H 16* im Chemostaten unter chemoorganotrophen Bedingungen. Diss. der math.-naturwiss. Fakultät, Göttingen 1967.
- SCHLEGEL, H. G., u. G. GOTTSCHALK: Verwertung von Glucose durch eine Mutante von *Hydrogenomonas H 16*. Biochem. Z. **341**, 249—259 (1965).
- H. KALTWASSER u. G. GOTTSCHALK: Ein Submersverfahren zur Kultur wasserstoffoxydierender Bakterien: Wachstumsphysiologische Untersuchungen. Arch. Mikrobiol. **38**, 209—222 (1961).

- SCHLEGEL, H. G., and H. G. TRÜPER: Repression of enzyme formation in *Hydrogenomonas* strain, *H 16 G⁺* by molecular hydrogen and by fructose. *Antonie v. Leeuwenhoek* **32**, 277—292 (1966).
- SCHUSTER, E.: Chemolithotrophes Wachstum von *Hydrogenomonas H 16* im Chemostaten mit elektrolytischer Knallgaserzeugung. Diss. der math.-naturwiss. Fakultät, Göttingen 1967.
- STELLING-DEKKER, N. M.: Die sporogenen Hefen. Kon. Akad. van Wetenschappen, Amsterdam 1931.
- WILDE, E.: Untersuchungen über Wachstum und Speicherstoffsynthese von *Hydrogenomonas*. Diss. der math.-naturwiss. Fakultät, Göttingen 1961.

Prof. Dr. H. G. SCHLEGEL
Institut für Mikrobiologie
der Gesellschaft für Strahlenforschung
3400 Göttingen, Goßlerstr. 16