

Untersuchungen zum Export
von Tryptophan
in *Escherichia coli*

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von:

Tobias Mohrbach

aus Neunkirchen/Saar

Berichterstatter:

Professor Dr. Reinhard Krämer

Professor Dr. Karin Schnetz

Tag der Disputation 05.02.2010

Untersuchungen zum Export von Tryptophan in *Escherichia coli*

In *E. coli* wurde bereits eine Vielzahl von Aminosäureexportern beschrieben. Allerdings liegen zum Export aromatischer Aminosäuren bisher nur wenige Daten vor. Ziel dieser Arbeit war es, den Export von Tryptophan zu charakterisieren und beteiligte Transportproteine zu identifizieren. Dazu kamen biochemische, mikrobiologische und genetischen Methoden zum Einsatz

Durch Beladung mit Tryptophan-haltigen Dipeptiden konnte der darauf folgende Export von Tryptophan charakterisiert werden. Die Messung bedingte den Einsatz von Zellen mit *AtnaAB* Hintergrund, um den internen Abbau und die Wiederaufnahme bereits exkretierten Tryptophans zu unterbinden. Es konnte gezeigt werden, dass der Export von Tryptophan ein sekundär aktiver Prozess ist und dass die dafür verantwortlichen Transporter konstitutiv exprimiert werden.

Die Identifikation putativer Tryptophanexporter geschah einerseits mittels eines bioinformatischen Ansatzes und gezielter Deletion bzw. Expression von Kandidaten. Eine Alternative stellte die Transformation von *E. coli* mit Genbanken und die Selektion auf Resistenz gegen das toxische Aminosäureanalogon 5-Methyl-Tryptophan (5MTrp) dar. Die Analyse der Plasmide, die dabei eine Resistenz verliehen, erlaubte die Identifikation putativer Tryptophanexporter.

In der Dipeptidfütterung konnte gezeigt werden, dass die Expression von *yddG* bzw. *yedA* unter Kontrolle ihrer nativen Promoter zu einer Verringerung der internen Akkumulation von Tryptophan um ca. 50% führte. In Messungen mit radioaktiv markiertem Tryptophan wurde für Expressionsstämme dieser Gene ebenfalls eine gegenüber dem Wildtyp verringerte interne Akkumulation von Tryptophan nachgewiesen. Weiterhin vermitteln die beiden Kandidaten eine erhöhte Resistenz gegen 5MTrp und YddG auch eine Resistenz gegen 3-Fluoro-Phenylalanin.

Die Deletion von *yddG* und *yedA* bzw. beider Gene führte zu keiner erhöhten Akkumulation von Tryptophan. Es muss also noch mindestens ein weiterer Tryptophanexporter existieren.

Investigations on the export of tryptophan in *Escherichia coli*

A number of amino acid exporters has already been described in *E. coli*. However, the export of aromatic amino acids has not been studied in detail so far. The aim of this work was to characterise the export of tryptophan and to identify transporters involved in tryptophan excretion. For this purpose biochemical, microbiological and genetic methods have been used. By loading cells with tryptophan containing dipeptides the subsequent export of tryptophan could be characterised. Δ *tnaAB* cells were used to exclude internal degradation and re-import of already excreted tryptophan. It could be shown that the export of tryptophan is a secondary active process and that the transporter coding gene is constitutively expressed.

The identification of putative tryptophan exporters was done using a bioinformatic approach with deletion and expression of candidates. An alternative approach was the use of *E. coli* gene banks and the selection of clones that are resistant to the toxic amino acid analog 5-methyl-tryptophan (5MTrp). By analysing plasmids that conferred resistance, the identification of putative tryptophan transporters was possible.

Dipeptide feeding assays in cells that expressed *yddG* and *yedA* under control of their native promoters showed a decrease of internal accumulation of tryptophan of about 50% compared to the reference strain. In measurements with radioactive labelled tryptophan it also was possible to demonstrate a reduced level of tryptophan accumulation. Furthermore, both candidates conferred higher resistance towards 5MTrp and *yddG* expression even increased the resistance towards 3-fluoro-phenylalanine.

Deletion of *yddG* or *yedA* or both did not lead to a higher accumulation of tryptophan. Hence, there must be at least one as of yet undiscovered exporter of tryptophan on *E. coli*.

1	Einleitung	9
1.1	<i>Escherichia coli</i> als biotechnologisch bedeutsames Bakterium.....	9
1.2	Die essentielle Aminosäure Tryptophan und ihre Synthese.....	10
1.3	Import und Export von Aminosäuren in <i>E. coli</i>	14
1.4	Möglichkeiten zur Identifikation und Charakterisierung von Exportern	17
1.5	Ziele dieser Arbeit	20
2	Material und Methoden	21
2.1	Bakterienstämme und Plasmide	21
2.1.1	Bakterienstämme.....	21
2.1.2	Plasmide.....	23
2.2	Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	24
2.2.1	Nährmedien.....	24
2.2.1.1	Vollmedium.....	24
2.2.1.2	Minimalmedium	25
2.2.1.3	Antibiotika.....	25
2.2.1.4	Kultivierungsbedingungen	26
2.3	Molekularbiologische Techniken.....	27
2.3.1	DNA-Techniken.....	27
2.3.1.1	Präparation chromosomaler DNA aus <i>E. coli</i>	27
2.3.1.2	Plasmid-Präparation aus <i>E. coli</i>	27
2.3.1.3	Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	27
2.3.1.4	Restriktion und Ligation von DNA	27
2.3.1.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	28
2.3.1.6	Klonierung von PCR-Fragmenten	28
2.3.1.7	DNA-Sequenzierung	29
2.3.2	Nachweis von Expressionen	29
2.3.2.1	SDS-PAGE Gelelektrophorese und Western Blot.....	29
2.4	Techniken zur Manipulation von Zellen	29
2.4.1	Herstellung kompetenter Zellen und Transformation	29
2.4.1.1	Herstellung chemisch kompetenter Zellen und Transformation.....	29
2.4.1.2	Herstellung elektro-kompetenter Zellen und Transformation	30
2.4.2	Konstruktion von Deletionsmutanten	30
2.5	Biochemische Techniken	30

2.5.1	Herstellung von invertierten Membranvesikeln aus <i>E. coli</i>	30
2.5.2	Energetisierung von IMV	31
2.5.3	Bestimmung der Aminosäureaufnahme	31
2.5.3.1	Fluorimetrische Bestimmung der Aminosäureaufnahme in IMV	31
2.5.3.2	Aufnahme radioaktiv markierter Aminosäuren in IMV	32
2.5.4	Bestimmung der Aminosäureexkretion	32
2.5.4.1	Silikonölzentrifugation und Dipeptidfütterung	32
2.5.4.2	HPLC-Analyse	34
2.5.5	Resistenztests und Selektionierung in Anwesenheit von Inhibitoren	35
2.5.5.1	Selektion mit Hilfe von <i>E. coli</i> Genbanken	35
2.5.5.2	Herstellung von Gradientenplatten	36
2.5.5.3	Wachstumstests in Reagenzgläsern	37
2.5.6	Transportmessungen mit radioaktiv markierten Aminosäuren	37
2.6	Bioinformatische Ansätze	38
2.6.1	Ähnlichkeitssuche	38
2.6.2	Sekundärstrukturvorhersage	39
3	Ergebnisse	40
3.1	Etablierung der Dipeptidfütterung in <i>E. coli</i> zur Untersuchung des Tryptophanexports	40
3.1.1	Konstruktion eines Stammes mit geeignetem genetischen Hintergrund	40
3.1.2	Etablierung des Fütterungsprotokolls	43
3.1.3	Untersuchungen zur Energetik des Exports	44
3.1.4	Analyse der Induktion des Exports	45
3.1.4.1	Untersuchung der Induktion des Tryptophanexports mit Hilfe von CAM	46
3.1.4.2	Deletion von <i>gcvB</i> für die Dipeptidfütterung	46
3.2	Biochemische Charakterisierung des Tryptophanexports in IMV	48
3.2.1	Indirekte Messung des Transports von Aminosäuren in IMV	50
3.2.2	Direkte Messung des AS-Transports in IMV	53
3.3	Ungerichtete Mutagenese zur Identifikation von Tryptophanexportern	55
3.3.1	Selektion von <i>E. coli</i> zur Identifikation von Exportphänotypen	55
3.3.2	Selektion auf Resistenz gegen 5MTrp mit Hilfe von <i>E. coli</i> Genbanken	58
3.3.3	Restriktionsanalyse & Sequenzierung 5MTrp-resistenter Klone	59
3.4	Gezielte Mutagenese zur Identifikation von Tryptophanexportern	66

3.4.1	Test von Deletionsstämmen vermuteter Tryptophanexporter in der Dipeptidfütterung.....	67
3.4.2	Konstruktion von Expressionsstämmen putativer Tryptophanexporter	70
3.4.3	Test von pUC19_ <i>YddG</i> und pUC19_ <i>YedA</i> in der Dipeptidfütterung	74
3.4.4	Untersuchung stationärer Zellen mit pQE30_ <i>yedA</i> in der Dipeptidfütterung	76
3.4.5	Test von YedA in der Dipeptidfütterung durch Einsatz eines Plasmids aus der pBR322 Genbank ..	77
3.5	Charakterisierung des Exports durch Transportmessungen mit radioaktiv markiertem Tryptophan.....	78
3.5.1	Bestimmung des Fließgleichgewichts zwischen Import und Export von Tryptophan	80
3.5.2	Expressionskonstrukte von <i>yddG</i> und <i>yedA</i> in Exportmessungen mit radioaktiv markiertem Tryptophan.....	81
3.6	Untersuchung von Tryptophanexportern durch Resistenz gegen aromatische Verbindungen	83
3.6.1	Test der Sensitivität gegen toxische Substanzen auf Agarplatten	84
3.6.2	Test der Sensitivität gegen 5MTrp in Flüssigkultur	88
4	Diskussion	91
4.1	Nur mit ausgewählten Methoden ist der Tryptophanexport in <i>E. coli</i> messbar	92
4.2	Der Tryptophanexport ist sekundär aktiv energetisiert und konstitutiv induziert....	95
4.3	Durch Selektion von <i>E. coli</i> Genbanken gelang die Identifikation eines putativen Tryptophanexporters	98
4.4	Die Beteiligung von Multidrug Exportern am Tryptophanexport bleibt unklar	100
4.5	<i>YddG</i> exportiert Tryptophan und andere aromatische Aminosäuren	102
4.6	<i>YedA</i> stellt einen weiteren Exporter für Tryptophan dar.....	105
4.6.1	Untersuchung der Funktion von YedA bei Expression durch pQE30_ <i>yedA</i>	106
4.6.2	Untersuchung der Funktion von YedA bei Expression durch pBR322-4 (<i>yedA</i>).....	107
4.7	Tryptophan wird über weitere, noch unbekanntem Transporter exportiert.....	109
5	Literatur	111
6	Danksagung	119
7	Erklärung	120
8	Lebenslauf	121

Abkürzungen	Bezeichnung
3FPhe	3-Fluoro-Phenylalanin
5MTrp	5-Methyltryptophan
AO	Acridin Orange, N,N,N,N-Tetramethylacridin- 3,6-diamin
Ap ^R	Resistenz gegen Ampicillin
Ala-Trp	Dipeptid Alanin-Tryptophan
CAA	Casaminoacids
CAM	Chloramphenicol
Carb	Carbenicillin
CCCP	Carbonylcyanid-M-Chlorophenyhydrizon
Cm ^R	Resistenz gegen Chloramphenicol
dpm	Zerfälle pro Minute
Kan	Kanamycin
Km ^R	Resistenz gegen Kanamycin
LB	Lysogeny Broth Medium
Phe	Phenylalanin
Trp	Tryptophan

1 Einleitung

1.1 *Escherichia coli* als biotechnologisch bedeutsames Bakterium

Das Gram-negative, stäbchenförmige Enterobakterium *Escherichia coli* ist heute wohl der wichtigste Organismus der mikrobiologischen Forschung. Zu Beginn der modernen Mikrobiologie wurde *E. coli* aufgrund seiner leichten Zugänglichkeit bezüglich struktureller, biochemischer, genetischer und physiologischer Fragestellungen relativ schnell als Modellorganismus etabliert. In Folge dieser Wahl wurden einige der grundlegenden mikrobiologischen Prinzipien, wie z.B. das Operonmodell von Jaques Monod, am Beispiel *E. coli* erstmals beschrieben. Die Fülle an Grundlagenwissen erlaubte bald auch komplexere Themen an diesem Modellorganismus zu erforschen, sowie die gewonnenen Erkenntnisse praktisch umzusetzen. Im Zuge dieser Entwicklung wurde *E. coli* bald zu einem der wichtigsten Organismen bezüglich biotechnologischer Anwendungen. Die fermentative Produktion von Aminosäuren stellt eine solche Anwendung dar. Hierbei ist vor allem die industrielle Produktion von L-Threonin, L-Tryptophan, L-Phenylalanin und L-Isoleucin zu nennen, die mit Ausbeuten von 100 [g/l], 45 [g/l], 51 [g/l] und 30 [g/l] (IKEDA, 2003) bereits betrieben wird. Auch L-Lysin wird im industriellen Maßstab mit Hilfe von genetisch modifizierten *E. coli*-Stämmen hergestellt (pers. Mitteilung R. Krämer).

E. coli eignet sich besonders für diese Anwendungen, da wie bereits erwähnt eine breite Basis an Grundlagenwissen bzgl. seiner Physiologie und Genetik vorliegt. Im Hinblick auf die effektive fermentative Produktion von Aminosäuren müssen jedoch gewisse Vorbedingungen erfüllt sein. So kann *E. coli* zwar ein breiteres Spektrum an Aminosäuren als Kohlen- oder Stickstoffquelle nutzen, erreicht dabei aber nur selten hohe Wachstumsraten (McFALL und NEWMAN, 1996). Dies verhindert, dass die gerade produzierten Aminosäuren durch das Bakterium gleich wieder verstoffwechselt werden. Weiterhin können die Aufnahmesysteme einzelner Aminosäuren ausgeschaltet und somit die Entstehung von sog. *futile cycles*, also der Wiederaufnahme zuvor exkretierter Aminosäuren, verhindert werden (BURKOVSKI und KRÄMER, 2001). Dies ist wichtig, da der mit einem *futile cycle* verbundene Energieverlust sich erheblich auf die Produktionsrate auswirken kann. Ein anschauliches Beispiel hierfür lieferten IKEDA und KATSUMATA (1995), indem sie den Tryptophanimport in einem Produktionsstamm des Actinomyceten *Corynebacterium glutamicum* inaktivierten. Damit erhöhte sich die Tryptophanausbeute in diesem Stamm um bis zu 20%.

Bei Biosynthesen muss außerdem bedacht werden, dass die mitwirkenden Enzyme in der Regel einer Feedbackregulation durch das Syntheseprodukt unterliegen. Diese ist

Einleitung

beispielsweise im Fall der Tryptophansynthese besonders ausgeprägt, das sie sich auf drei Ebenen erstreckt. Neben der Repression der Synthesegene werden die RNA-Levels reguliert und die Synthesenzyme unterliegen der Feedbackinhibition (BHARTIYA *et al.*, 2005).

Einen relativ neuen Ansatz der Stammoptimierung stellt die Steigerung der Effizienz des Exports dar. Nachdem KRÄMER (1994) das Prinzip des Exports von Aminosäuren in biotechnologisch bedeutsamen Bakterien etabliert hatte rückte dieser vorher oft vernachlässigte Aspekt der Stammoptimierung mehr in den Vordergrund. Um eine konstant hohe Produktionsrate zu erzielen ist es wichtig, neben der Optimierung der Synthese möglichst effiziente Exportmechanismen zu nutzen und so die intrazelluläre Konzentration auf möglichst geringem Niveau zu halten. So kann verhindert werden, dass eine hohe interne Akkumulation des Produkts sich negativ auf die Effizienz der Synthese und auf den gesamten Metabolismus der Zelle auswirkt. Erreicht werden kann dieses Ziel durch Identifikation und anschließende Überexpression entsprechender Exporter. Den Effekt einer solchen Überexpression konnten PARK *et al.* (2007) eindrucksvoll nachweisen. Nach Überexpression von *ygaZH*, einem Homolog des Isoleucinexporters BrnFE aus *C. glutamicum*, in einem Valin Produktionsstamm von *E. coli* erreichte dieser eine um ca. 40% höhere Valin-Akkumulation im Medium als zuvor. Neben dem aktiven Export könnten lipophile Aminosäuren wie Tryptophan aufgrund ihrer Struktur möglicherweise auch per Diffusion die Zelle verlassen. Jedoch konnte in früheren Arbeiten an *C. glutamicum* bereits gezeigt werden, dass der Export von Tryptophan ein energieabhängiger Prozess ist. Durch den Zusatz von CCCP zu einer Suspension von Zellen, die durch Fütterung mit tryptophanhaltigem Dipeptid mit Tryptophan gesättigt waren konnte die Exkretion des Tryptophan signifikant vermindert werden (MOHRBACH, 2006).

1.2 Die essentielle Aminosäure Tryptophan und ihre Synthese

Im Jahre 1901 gelang es dem englischen Biochemiker Sir Frederick Gowland Hopkins erstmals, aus einer Proteinlösung Tryptophan ((*S*)-1-Amino-2-Indolylpropionsäure) zu isolieren, seine Struktur zu beschreiben und den essentiellen Charakter dieser Aminosäure zu beweisen (WEATHERALL und KAMMINGA, 1996). In Fütterungsversuchen mit Ratten gelang es ihm dabei Tryptophan als wachstumslimitierenden Faktor zu definieren. Tryptophan spielt außerdem eine wichtige Rolle im Hormonhaushalt des Menschen. Es wird enzymatisch über die Zwischenstufe 5-Hydroxytryptophan zu Serotonin umgewandelt, welches als Neurotransmitter eine wichtige Rolle bei der Steuerung des Schlafzyklus spielt

Einleitung

(SCHULZ, 1979 und SCHAECHTER *et al.*, 1990). Die Umwandlung von Tryptophan zu 5-Hydroxytryptophan mittels Tryptophan-Hydroxylase ist durch vielfältige Faktoren, wie z.B. Vitamin B₆-Mangel, Insulinresistenz oder Stress, hemmbar. Ein so entstehender Serotoninmangel führt zu Depressionen, worin sich die Anwendung von L-Tryptophan als Antidepressivum begründet. L-Tryptophan kann weiterhin durch das Enzym Tryptophan-2,3-dioxygenase in N-Formylkynurenin überführt werden. Dies wird im Körper zu Kynurein hydrolysiert und geht damit in die Synthese des essentiellen Vitamins Nicotinsäure ein (IKEDA *et al.* 1965), dessen Mangel zunächst zu unspezifischen Störungen wie Appetitlosigkeit, Konzentrations- und Schlafstörungen und schließlich zu der Krankheit Pellagra führen kann. Mit einem durchschnittlichen Anteil von ca. 1% am gesamten Aminosäurepool stellt Tryptophan die seltenste Aminosäure in den meisten Proteinen dar (SOMERVILLE, 1983), weshalb seine Verwendung als Futtermittelzusatz die Proteinverfügbarkeit von Mastviehfutter deutlich erhöhen kann. Tryptophan wird somit hauptsächlich als Futterzusatz in der industriellen Tierzucht und als natürliches Antidepressivum in der Medizin verwendet.

Die für Menschen essentielle Aminosäure kann von vielen Mikroorganismen selbst hergestellt werden. Am Beispiel von *E. coli* soll der Syntheseweg nun kurz erläutert werden. Prinzipiell kann die Tryptophansynthese (Abbildung 1-1) in zwei Abschnitte unterteilt werden. In einen gemeinsamen Syntheseweg aller aromatischen Aminosäuren und in den darauf aufbauenden spezifischen Syntheseweg des Tryptophans (PITTARD, 1996).

Ausgangsprodukte des gemeinsamen Synthesewegs sind Phosphoenolpyruvat (PEP) und Erythrose-4-Phosphat (E4P), die aus der Glycolyse bzw. dem Pentosephosphatweg bereitgestellt werden. Sie werden zunächst durch die drei DAHP(3-Deoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat)-Synthasen AroF, AroG und AroH fixiert. Die drei Synthasen werden je durch eine korrespondierende Aminosäure gehemmt (RAY *et al.* 1988). Tyrosin hemmt AroF, Phenylalanin hemmt AroG und Tryptophan hemmt AroH. Die Aufspaltung in drei DAHP-Synthaseenzyme ist hochkonserviert. PANINA *et al.* (2001) konnten mittels bioinformatischer Analysen zeigen, dass sie schon vor der divergierenden Entwicklung der Familien *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae* und *Alteromonadaceae* stattgefunden haben musste. Die Regulation der einzelnen DAHP-Synthasen ist dabei in verschiedenen Arten unterschiedlich hoch entwickelt. In *E. coli* werden AroF und AroG von den jeweiligen Aminosäuren zu 95% inhibiert, AroH durch Tryptophan jedoch nur zu 60 %.

Einleitung

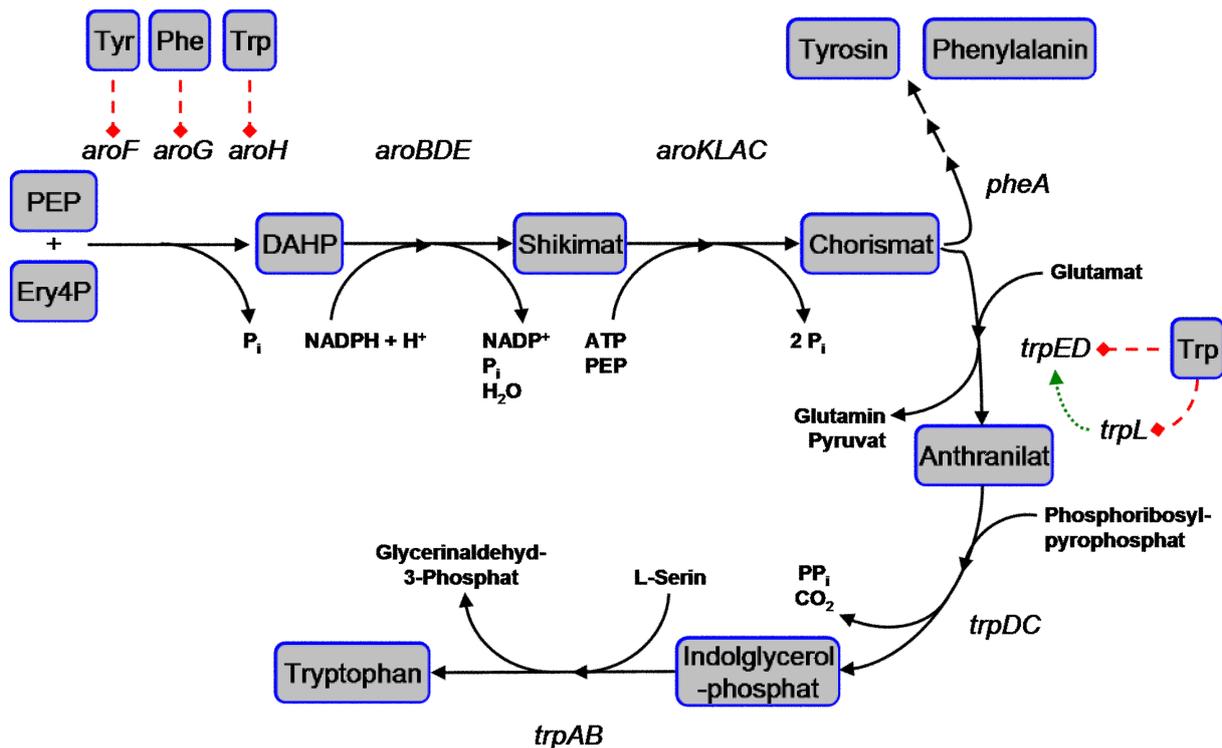


Abbildung 1-1: Schema der Biosynthese von Tryptophan in *E.coli* (nach PITTARD, 1996) mit für die Synthesenzyme codierenden Genen (kursiv) und deren Repression durch die jeweiligen Inhibitoren (gestrichelte rote Linie) bzw. Induktion (grüne, gepunktete Linie).

Die codierende Gene der DAHP-Synthasen unterliegen zusätzlich einer Feedbackrepression durch aromatische Aminosäuren, wobei Tyr oder hohe Levels an Phe die Transkription von *aroF* hemmen und Phe oder Tryptophan *aroG* hemmt. *aroH* nimmt auch hier eine Sonderfunktion ein, da dieses Gen nur durch Tryptophan reprimiert werden kann. Im Gegensatz zur strikten Regulation in *E. coli* unterliegt die Tryptophansynthese in anderen Enterobakterien, wie z.B. dem Blattlausendosymbionten *Buchnera sp. APS* keinerlei Kontrolle. In den nächsten Schritten der Synthese wird DAHP durch AroB, AroD und AroE zu Shikimat umgewandelt. Die Gene *aroB*, *aroD* und *aroE* werden konstitutiv exprimiert und unterliegen somit keiner Feedbackrepression. Unter Verbrauch von ATP und weiterem PEP findet anschließend, vermittelt durch AroKLAC, die Synthese von Chorismat, der letzten gemeinsamen Vorstufe in der Synthese der aromatischen Aminosäuren, statt.

Im Tryptophan-spezifischen Syntheseweg wird Chorismat nun unter Verbrauch von Glutamin und Freisetzung von Glutamat und Pyruvat durch TrpED zu Anthranilat umgewandelt. Diese Reaktion ist als "Eingang" in den Tryptophan Syntheseweg durch dessen Endprodukt, also Tryptophan, feedbackreguliert (ITO *et al.*, 1969). Im weiteren Verlauf der Synthese wird Anthranilat durch TrpDC zu Indol-3-Glycerol-Phosphat, dem direkten Vorläufer von Tryptophan prozessiert (CREIGHTON *et al.*, 1966). Dies wird im letzten Reaktionsschritt mit

Einleitung

Hilfe der Tryptophansynthase TrpAB und unter Verbrauch von Serin zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Tryptophan umgesetzt. Dabei katalysiert die von *trpA* codierte Untereinheit der Tryptophansynthase die Reaktion von Indol-3-Glycerol-Phosphat zu Indol und Glycerinaldehyd-3-Phosphat. Im Tryptophansynthasekomplex, den TrpA und TrpB bilden wird das entstehende Indol nun durch einen intermolekularen Tunnel (HUANG *et al.*, 2001) sofort zum aktiven Zentrum von TnaB weitergeleitet, wo die zweite Teilreaktion, die Synthese von Tryptophan aus Indol und L-Serin stattfindet.

Die angesprochene Feedback-Inhibition durch Tryptophan wird über drei Ebenen gesteuert. Die Regulation der Genexpression der Tryptophan Synthesegene wird mit Hilfe des Proteins TrpR bewirkt. Es bildet Dimere, die sich nach Bindung von zwei Molekülen Tryptophan an spezifische Operatorsequenzen der zu hemmenden Gene anlagern und so deren Transkription blockieren. Bei den verschiedenen Genen werden dabei unterschiedlich viele Repressor-Dimere gebunden. Im Fall des *trpLEDCBA*-Clusters liegen beispielsweise drei Bindestellen für TrpR im Bereich des Promoters, im Bereich des *aroH* Promoters liegt nur eine Bindestelle (YANG *et al.*, 1996). Dies bedingt eine unterschiedlich starke Hemmung der verschiedenen reprimierten Gene. So wird das *trp*-Operon durch TrpR um den Faktor 300 gehemmt während *aroH* lediglich um den Faktor 6 gehemmt wird. Die zweite Regulationsebene stellt die RNA-Attenuation dar. Hierbei spielt ein so genanntes „Leader“-Peptid eine Rolle. Es wird von *trpL* codiert und verhindert in Anwesenheit von Tryptophan die Interaktion von Ribosomen mit der *trpLEDCBA* mRNA (YANOVSKY *et al.*, 1981). Die dritte Ebene der Regulation stellt die allosterische Hemmung von Synthesenzymen durch Tryptophan dar. Auch bei der Regulation haben sich in verschiedenen Organismen verschiedene Wege entwickelt. So findet diese in *Bacillus subtilis* rein auf Ebene der Attenuation statt, wobei der Regulator TRAP in Anwesenheit von Tryptophan und beladener Tryptophan-tRNA die Transkription und Translation der Synthesegene unterbindet. Sinken die Levels von Tryptophan bzw. Tryptophan-tRNA, so reagiert die Zelle mit Bildung des TRAP-Antagonisten Anti-TRAP, welcher die Attenuation aufhebt und so die Synthese ermöglicht (GOLLNICK *et al.*, 2005).

Grundlage zur Stammoptimierung mit dem Zweck der Produktion von Tryptophan ist zunächst die Deregulation des Synthesewegs. Die TrpR-Bindestellen der Zielgene bzw. das *trpR*-Gen selbst stellen potentielle Ziele dar, die zur Induktion einer deregulierten Tryptophansynthese manipuliert werden könnten. Zusätzlich können konkurrierende Stoffwechselwege, wie die der Phenylalanin- und Tyrosinsynthese inaktiviert werden. Eine weitere Ebene umfasst die Optimierung der Versorgung mit Synthesevorstufen. Im Fall der Tryptophansynthese böte sich z.B. eine Verbesserung der Synthese von Serin an, da dies im

Einleitung

In der Regel stellen aromatischen Aminosäuren einen seltenen Bestandteil der Umgebung der Zellen dar. Die drei bekannten Aufnahmesysteme für Tryptophan unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Spezifität und Affinität. Dies stellt sicher, dass Tryptophan entsprechend des jeweiligen Angebots und der Bedürfnisse der Zelle optimal aufgenommen werden kann. AroP stellt dabei ein Aufnahmesystem für alle aromatischen Aminosäuren dar. Seine Affinität für die einzelnen aromatischen Aminosäuren liegt jeweils bei 1 μM (COSGRIFF *et al.*, 2000) und jede der drei Aminosäuren kann die Aufnahme der anderen kompetitiv aber nur unvollständig hemmen (BROWN *et al.*, 1970). Aufgrund seiner hohen Affinität erlaubt AroP der Zelle, auch kleinste Mengen aromatischer Aminosäuren aus der Umgebung zu verwerten. Der von AroP geformte Pool aromatischer Aminosäuren dient hauptsächlich der Proteinsynthese. Die beiden anderen Importer Mtr und TnaB gehören beide zur Familie der Hydroxy/Aromatic Amino Acid Permease (HAAAP) Transporter (SARSERO *et al.*, 1991). Sie sind spezifisch für die Aufnahme von Tryptophan und dienen der Versorgung der Zelle unter anderen Bedingungen. Der Importer Mtr hat einen K_M von 2 μM (BROWN *et al.*, 1970) und kann neben Tryptophan auch Indol importieren (YANOFSKY *et al.*, 1991), welches als unmittelbare Vorstufe in die Tryptophansynthese eingehen kann. In Anwesenheit von Tryptophan wird die Expression von *mtr* durch TrpR reprimiert, während seine Expression in Anwesenheit der anderen aromatischen Aminosäuren induziert wird (SARSERO *et al.*, 1991). Im Gegensatz dazu wird die Expression von *tnaB*, welches für einen Tryptophanimporter geringer Affinität (70 μM) codiert in Anwesenheit hoher Tryptophankonzentrationen induziert (EDWARDS *et al.*, 1982 und YANOVSKY *et al.*, 1991). TnaB liegt in einem Operon mit dem Gen der Tryptophanase TnaA und dient hauptsächlich dazu, die Zelle in Anwesenheit hoher Tryptophankonzentrationen mit genug Tryptophan für dessen katabole Nutzung zu versorgen. In diesem Fall wird internes Tryptophan abgebaut und die entstehenden Produkte wie Indol, Pyruvat und Amminoum können in andere Stoffwechselwege eingehen. Zwar stellt die Tryptophanase TnaA eine sehr effektive Möglichkeit dar, internes Tryptophan abzubauen, doch kann es für die Zelle zu Situationen kommen, in denen es nötig ist, überschüssiges Tryptophan auszuscheiden. Dies könnte beispielsweise beim Wachstum auf Peptiden als C- und N-Quelle der Fall sein. Eine stark erhöhte interne Tryptophanakkumulation könnte für die Zelle einen erheblichen Stressfaktor darstellen, da Tryptophan aufgrund seiner lipophilen Struktur z.B. mit der Membran interagieren könnte.

Der Export von Aminosäuren unter Bedingungen des Überflusstoffwechsels wurde von KRÄMER (1994) für *C. glutamicum* ausführlich beschrieben. In *E. coli* sind bisher nur

Einleitung

wenige Aminosäureexporter beschrieben worden. So wurde RhtC aus der Familie der sekundär aktiven Rht-Transporter als Threonin-Exporter in *E. coli* beschrieben, da seine Expression eine Resistenz gegen Threonin verlieh (ALESHIN *et al.*, 1999 und ZAKATAEVA *et al.*, 1999). Kürzlich konnte dabei gezeigt werden, dass bei heterologer Expression von *rhtC* aus *E. coli* in *C. glutamicum* eine Steigerung der Exkretionsrate von 2,3 nmol*min⁻¹*mg⁻¹ auf 11,2 nmol*min⁻¹*mg⁻¹ möglich war (DIESVELD *et al.*, 2009). Leucin und strukturell verwandte Aminosäuren werden laut KUTUKOVA *et al.* (2005) von LeuE exportiert, was durch Steigerung der Akkumulation von Leucin, Methionin und Histidin im Medium bei Produktionsstämmen, die ein Überexpressionskonstrukt von *leuE* trugen gezeigt werden konnte. Auch für Arginin ist ein Exporter bekannt. Dieser Exporter, ArgO genannt, wurde von NANDINENI *et al.* (2004) beschrieben und weist neben einer hohen Ähnlichkeit zu dem aus *C. glutamicum* bekannten Lysin und Arginin Exporter LysE einen gesteigerten Efflux von Arginin auf. Ein weiteres Beispiel stellt der Export von Cystein dar, für den neben YdeD auch YifK als Exporter beschrieben wurde (FRANKE *et al.* 2003). YifK, welches zur Familie der RhtB Transporter gehört steigerte die Exkretion von Cystein in einem Produktionsstamm, der eine feedbackresistente Serin-Transacetylase besaß. Einen ähnlichen Phänotyp wies YdeD auf, wenn es plasmidcodiert exprimiert wurde. Für Cystein wurde außerdem auch Bcr als Exporter beschrieben (YAMADA *et al.*, 2006). Der Multi Drug Transporter Bcr wird konstitutiv exprimiert und führt bei Überexpression in einem Cystein Produktionsstamm zu einer erhöhten Akkumulation der Aminosäure im Medium. Der gleiche Effekt wurde für die Expression von *tolC* in einem Produktionsstamm beschrieben (WIRIYATHANAWUDHIWONG *et al.*, 2009). TolC war bisher hauptsächlich als in der äußeren Membran lokalisierter Kanal für Peptide bekannt (BENZ *et al.*, 19993) bzw. für seine Rolle als Teil von Multi-Drug Effluxpumpen wie er sie z.B. zusammen mit AcrAB bildet (FRALICK, 1996).

Das besondere wissenschaftliche Interesse am Tryptophanexport begründet sich in der Tatsache, dass bislang kaum Informationen zum Export aromatischer Aminosäuren in Prokaryoten vorliegen. Bekannt ist, dass viele lipophile Substanzen über relativ unspezifische Transporter der MDR-Familie ausgeschieden werden. Die Multi-Drug Effluxpumpe AcrAB verleiht *E. coli* in Interaktion mit TolC beispielsweise Resistenz gegen hydrophobe Inhibitoren wie Gallensalze, Decanoat (MA *et al.*, 1995) oder Methylviologen und wird beispielsweise in Anwesenheit von letzterem stark induziert (ROSNER *et al.*, 1997). Es wäre gut möglich, dass solche Effluxpumpen auch Tryptophan exportieren können. Sie werden schnell und stark exprimiert und können somit in plötzlich auftretenden Stresssituationen

Einleitung

reagieren. Ähnlich verhält es sich mit *emrE*, welches für einen sekundär aktiven Transporter der DMT Superfamilie codiert (YERUSHALMI *et al.* 1995). Das Substratspektrum von EmrE umfasst unter anderem aromatische und stark lipophile Substanzen wie Methylviologen (MORIMYO *et al.*, 1992) und Benzalkoniumsalze (NISHINO *et al.*, 2001), die ebenfalls potentielle Verursacher von Membranstress sind. Ein weiterer Kandidat ist die Effluxpumpe AaeXAB. Diese wird durch ihr wichtigstes Substrat p-Hydroxybenzoesäure induziert (VANDYCK *et al.*, 2004) und könnte aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit ebenfalls Tryptophan exportieren. Sie wurde als eine Art „metabolisches Überdruckventil“ beschrieben, welches in Anwesenheit plötzlich auftretender, hoher Konzentrationen des lipophilen Substrats für einen schnellen und effizienten Efflux aus der Zelle sorgt.

Zum Export von aromatischen Aminosäuren liegen bisher nur sehr wenige Arbeiten vor. Eine Veröffentlichung von DOROSHENKO *et al.* (2007) beschreibt YddG als Exporter aromatischer Aminosäuren. Dabei wurde zwar gezeigt, dass in Produktionsstämmen der aromatischen Aminosäuren Phe, Tyr und Tryptophan bei Expression von *yddG* unter Kontrolle eines starken Promoters eine um die Faktoren 3 (für Phe und Tyr) bzw. 1,5 (Tryptophan) höhere Akkumulation der entsprechenden Aminosäure im Medium beobachtet werden konnte, doch waren diese Effekte erst nach 72 h Inkubation nachzuweisen. Zusätzlich war die Akkumulation der Aminosäuren im Medium bei Deletion von *yddG* in den Produktionsstämmen um 40% (Phe), 10% (Tyr) und <10% (Tryptophan) verringert. Dies weist darauf hin, dass YddG, wenn er auch wahrscheinlich eine Rolle beim Export von Tryptophan spielt, nicht der einzige Exporter sein kann. In einer weiteren Arbeit wurde beschrieben, dass *yddG* konstitutiv auf geringem Niveau exprimiert wird, wobei die Expression in Anwesenheit von hohen Phenylalaninkonzentrationen verstärkt werden konnte (TSYRENZHAPOVA *et al.*, 2009). Auch hier fehlen leider Aussagen zum Einfluss von Tryptophan. Zusammengefasst deuten die Ergebnisse auf eine Beteiligung von YddG am Export aromatischer Aminosäuren hin, ohne jedoch einen eindeutigen Beweis für eine Transportaktivität von YddG bezüglich Tryptophan zu liefern.

1.4 Möglichkeiten zur Identifikation und Charakterisierung von Exportern

Prinzipiell stehen zur Identifikation von Exportern in *E. coli* zwei Wege offen. Erstens könnte der Export von Substanzen indirekt durch Resistenz gegen diese oder ihren toxischen Analoga erforscht werden. Die Selektion von resistenten Klonen stellte früher den gängigen Weg bei der Suche nach Produktionsstämmen der entsprechenden Substanz dar. Mittlerweile wurde

Einleitung

diese Methode jedoch durch das gezielte Design von Stämmen mit deregulierten Synthesegenen und -proteinen abgelöst. Um die Ausbeute nach Optimierung der Synthese noch zu steigern können zusätzlich putative Exporter im Produktionsstamm exprimiert werden. Die Expression eines solchen Exporters geht in der Regel mit einer gesteigerten Resistenz gegen toxische Analoga des Substrats einher, wenn beide Substanzen den gleichen Exporter nutzen. Dies konnte beispielsweise im Fall des Threoninexporters RhtC nachgewiesen werden. Im Vergleich zum Wildtyp war eine Insertionsmutante sehr viel sensitiver gegenüber L-Homoserin und dessen Analogon L-Homoserinlacton oder DL-Hydroxynorvalin. Exprimierte man *rhtC*, so war die Sensitivität gegen dieser Verbindungen durchweg geringer. Dies konnte in Beziehung zum Export gesetzt werden, da bekannt war, dass RhtC zur RhtB-Transporterfamilie gehörte und zusätzlich bei Expression von *rhtC* in einem Threoninproduktionsstamm eine erhöhte Akkumulation der Aminosäure im Medium nachgewiesen wurde (ZAKATAEVA *et al.*, 1999). Auch für TolC und dessen Substrat L-Cystein konnte kürzlich eine solche Kombination von erhöhter Resistenz und gesteigerter Transportaktivität nachgewiesen werden (WIRIYATHANAWUDHIWONG *et al.*, 2009).

Im Fall von Tryptophan kann als toxisches Analogon 5-Methyl-Tryptophan (5MTrp) benutzt werden. Dies bewirkt die gleiche Inhibition der Tryptophansynthese wie hohe interne Tryptophankonzentrationen und wurde beispielsweise schon benutzt, um feedbackresistente Produktionsstämme in *C. glutamicum* zu selektionieren (HAGINO *et al.*, 1975). Werden Tryptophan und 5MTrp durch die gleichen Exporter aus der Zelle transportiert, so könnte die Resistenz gegen 5MTrp als Nachweis für die Expression eines Tryptophanexporters dienen. Dies könnte relativ einfach nachgewiesen werden, wenn entsprechende Kandidaten bekannt wären, die dann gezielt exprimiert und auf eine Steigerung der Resistenz hin getestet würden. Einer Selektion von resistenten Spontanmutanten hingegen müsste immer die Identifikation der Mutation, die die Resistenz bedingt, nachfolgen. Neben der Steigerung des Exports als Ursache kämen dabei auch die Deregulation von Synthesenzymen oder die Inaktivierung des Imports in Frage. Hierin liegt einer der Schwachpunkte dieser Methode. Die Identifikation des entsprechenden Gens wäre in diesem Fall nämlich mit großem Aufwand verbunden und da Synthesenzyme die wahrscheinlicheren Kandidaten für die Entwicklung einer Resistenz sind wäre der Erfolg fragwürdig.

Eine einfache Identifikation von Genen, die eine 5MTrp Resistenz verleihen wäre durch Einsatz einer Genbank von *E. coli* möglich. Transformiert man den Wildtyp mit einer Genbank, die die Expression genomischer Gene erlaubt, so könnten resistente Klone

Einleitung

selektioniert werden. Die Identifikation der Gene, die die Resistenz verliehen wäre dann durch Sequenzierung des entsprechenden Genbankplasmids möglich.

Der zweite Weg zur Identifikation eines Exporters, die direkte Untersuchung geschieht idealerweise durch Messung des Exports in einem Produktionsstamm der zu untersuchenden Substanz. Ist ein solcher nicht verfügbar, muss zunächst für eine interne Akkumulation der zu exportierenden Substanz gesorgt werden. Dies kann z.B. durch Methoden wie die Dipeptidfütterung erfolgen, welche von BRÖER *et al.* (1991) bereits erfolgreich zur Charakterisierung des Lysinexports in *C. glutamicum* angewendet wurde. Zur Untersuchung des Exports von Tryptophan würden die Zellen beispielsweise mit einem tryptophanhaltigen Dipeptid inkubiert. Dieses würde zunächst in der Zelle akkumulieren und in Anwesenheit eines Exporters sollte dann mit Verbrauch des Dipeptids die Konzentration von Tryptophan im Medium ansteigen. Durch Deletion und Expression von Genen putativer Exporter in diesem System sollte es möglich sein, diese anhand der Veränderung des Exportphänotyps zu identifizieren. Eine weitere Alternative zur Messung des Exports bestünde in radioaktiven Transportmessungen. Hierbei würde man sich das Prinzip eines *Pulse-Chase*-Experiments zu nutze machen. Dies beruht auf eine Beladungsphase mit einer radioaktiv markierten Aminosäure, gefolgt von deren Verdrängung durch einen Überschuss der unmarkierten Aminosäure. Die Verteilung der radioaktiv markierten Aminosäure kann dann im Zeitverlauf verfolgt werden (QUICK *et al.* 1999). Dies wird in der Regel durchgeführt, um Proteine durch den Einbau der markierten Aminosäure während ihrer Synthese zu markieren, kann aber auch zur Untersuchung des Transports benutzt werden. In diesem Fall würden die Zellen unter Bedingungen, bei denen die Aufnahme von Tryptophan voll induziert ist mit markiertem Tryptophan beladen. Durch den gleichzeitig einsetzenden Export sollte es zur Einstellung eines Fließgleichgewichts zwischen Aufnahme und Exkretion kommen, was sich in der Akkumulation eines Grundniveaus an Radioaktivität in der Zelle äußern würde. Durch Zugabe eines Überschuss unmarkierten Tryptophans würde die markierte Aminosäure so sehr verdünnt werden, dass es zu keiner messbaren Aufnahme von Radioaktivität mehr kommt. Die bereits akkumulierte Radioaktivität würde somit im Zeitverlauf komplett exkretiert und ihre Abnahme in der Zelle könnte zur Bestimmung kinetischer Parameter des Exports herangezogen werden. Durch die Untersuchung von Mutanten putativer Exporter sollte es möglich sein, einen verbesserten oder eingeschränkten Export gegenüber dem Referenzstamm nachzuweisen.

1.5 Ziele dieser Arbeit

Erstes Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Messsystems zur Charakterisierung des Tryptophanexports in *E. coli*. Dies umfasst die Etablierung eines geeigneten genetischen Hintergrundes, in dem sowohl die interne Verstoffwechslung von Tryptophan als auch der Reimport bereits exkretierten Tryptophans minimiert sind. Wenn dies erreicht wurde sollte ein Protokoll der Dipeptidfütterung mit tryptophanhaltigen Dipeptiden erarbeitet werden, welches eine möglichst effiziente Beladung der Zellen mit Tryptophan erlaubt. Damit sollte es dann möglich sein, bestimmte Charakteristika des Exporters wie z.B. dessen Energetisierung oder die Kontrolle seiner Expression zu untersuchen.

Ein weiteres Ziel war die Identifikation des oder der Tryptophanexporter in *E. coli*. Hier sollten parallel zwei Wege beschritten werden. Zum einen ein ungerichteter Ansatz der Mutagenese, bei dem Zellen auf ihre Resistenz gegen das toxische Tryptophanalogon 5MTrp selektiert werden. Durch Einsatz von *E. coli* Genbanken sollte es dabei möglich sein, Gene zu identifizieren, deren Expression der Zelle eine erhöhte Resistenz gegen diese Substanz vermittelt. Der zweite Ansatz der Mutagenese sollte die Erstellung von Deletions- und Expressionsmutanten putativer Tryptophanexporter umfassen. Die Kandidaten hierfür sollten so gewählt werden, dass ihre Charakteristika bzgl. Energetisierung und Induktion mit den für den Tryptophanexport bestimmten Parametern übereinstimmen. Weiterhin sollte ihr bisher bekanntes Substratspektrum möglichst lipophile, aromatische Substrate umfassen. Nach der Erstellung dieser Mutanten sollten sie im Hinblick auf ihre Beteiligung am Export von Tryptophan oder auf ihren Einfluss auf die Resistenz der Zellen gegen bestimmte Inhibitoren untersucht werden. Dazu sollten die Methoden der Dipeptidfütterung, der radioaktiven Exportmessung und Wachstumstests in Flüssigkultur oder auf Gradientenplatten in Anwesenheit verschiedener Inhibitorkonzentrationen durchgeführt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme und Plasmide

2.1.1 Bakterienstämme

Die nachfolgend gezeigte Tabelle gibt die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme, sowie relevante Geno- und Phänotypen wieder.

Tabelle 2-1: In dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stämme und ihre Eigenschaften

Stamm	Genotyp, Phänotyp	Referenz/Quelle
K12 MG1655	<i>F</i> λ <i>ilvG</i> ⁻ <i>rfb</i> -50 <i>rph</i> ⁻¹	BLATTNER <i>et al.</i> , 1997
DH5 α (mcr)	<i>endA1 supE44 thi</i> ⁻¹ λ ⁻ <i>recA1 gyrA96 relA1 deoR</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 Φ 80 Δ <i>lacZ</i> Δ M15 <i>mcrA</i> Δ (<i>mmr hsdRMS mcrBC</i>)	GRANT <i>et al.</i> , 1990
BL21 (DE3)	<i>F</i> <i>ompT gal dcm lon hsdS_B</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻) (DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>])</i>	STUDIER <i>et al.</i> (1986)
DH5 α pCP20	DH5 α mit pCP20, Ap ^R , Cm ^R	AG Prof. K. Schnetz, Institut f. Genetik, Univ. Köln
DH5 α pKD3	DH5 α mit pKD3, Ap ^R	AG Prof. K. Schnetz, Institut f. Genetik, Univ. Köln
DH5 α pKD4	DH5 α mit pKD4, Km ^R	AG Prof. K. Schnetz, Institut f. Genetik, Univ. Köln
DH5 α pKD13	DH5 α mit pKD13, Ap ^R , Km ^R	AG Prof. K. Schnetz, Institut f. Genetik, Univ. Köln
DH5 α pKD46	DH5 α mit pKD46, Ap ^R	AG Prof. K. Schnetz, Institut f. Genetik, Univ. Köln
pKD4- Δ <i>tnaAB</i>	MG1655 mit pKD4-Rekombination in <i>tnaAB</i> , Km ^R	diese Arbeit
MG1655 Δ <i>tnaAB</i>	MG1655 mit Deletion von <i>tnaAB</i>	diese Arbeit
MG1655 Δ <i>tnaAB</i> pKD4- Δ <i>emrE</i>	MG1655 mit pKD4-Rekombination in <i>emrE</i> , Km ^R	diese Arbeit
MG1655 Δ <i>tnaAB</i> pKD4- Δ <i>tolC</i>	MG1655 mit pKD4-Rekombination in <i>tolC</i> , Km ^R	diese Arbeit
MG1655 Δ <i>tnaAB</i> pKD4- Δ <i>yddG</i>	MG1655 mit pKD4-Rekombination in <i>yddG</i> , Km ^R	diese Arbeit
MG1655 Δ <i>tnaAB</i> pKD4- Δ <i>aaeXAB</i>	MG1655 mit pKD4-Rekombination in <i>aaeXAB</i> , Km ^R	diese Arbeit
MG1655 Δ <i>tnaAB</i> pKD4- Δ <i>gcvB</i>	MG1655 mit pKD4-Rekombination in <i>gcvB</i> , Km ^R	diese Arbeit

Material und Methoden

Stamm	Genotyp, Phänotyp	Referenz/Quelle
MG1655 $\Delta tnaAB$ pKD4- $\Delta yedA$	MG1655 mit Deletion von <i>tnaAB</i> und pKD4-Rekombination von <i>yedA</i> , Km ^R	diese Arbeit
MG1655 $\Delta tnaAB \Delta yddG$ pKD4 $\Delta yedA$	MG1655 mit Deletion von <i>tnaAB</i> und <i>yddG</i> und pKD4-Rekombination von <i>tnaA</i> , Km ^R	diese Arbeit
MG1655 5MTr 1	MG1655 selektioniert auf 5MTrp Resistenz, Klon 1	diese Arbeit
MG1655 5MTr 2	MG1655 selektioniert auf 5MTrp Resistenz, Klon 2	diese Arbeit
MG1655 5MTr 3	MG1655 selektioniert auf 5MTrp Resistenz, Klon 3	diese Arbeit
MG1655 5MTr 4	MG1655 selektioniert auf 5MTrp Resistenz, Klon 4	diese Arbeit
MG1655 5MTr 5	MG1655 selektioniert auf 5MTrp Resistenz, Klon 5	diese Arbeit
MG1655 5MTr 6	MG1655 selektioniert auf 5MTrp Resistenz, Klon 6	diese Arbeit
DH5 α pBR322 4	DH5 α mit Genbankplasmid pBR322 4, Ap ^R	diese Arbeit
DH5 α pBR322 9	DH5 α mit Genbankplasmid pBR322 9, Ap ^R	diese Arbeit
DH5 α pBR322 10	DH5 α mit Genbankplasmid pBR322 10, Ap ^R	diese Arbeit
DH5 α pBR322 20	DH5 α mit Genbankplasmid pBR322 20, Ap ^R	diese Arbeit
DH5 α pBR322 22	DH5 α mit Genbankplasmid pBR322 22, Ap ^R	diese Arbeit
DH5 α pBR322 46	DH5 α mit Genbankplasmid pBR322 46, Ap ^R	diese Arbeit
DH5 α pMW218 1	DH5 α mit Genbankplasmid pMW218 1, Cm ^R	diese Arbeit
DH5 α pMW218 10	DH5 α mit Genbankplasmid pMW218 10, Cm ^R	diese Arbeit
DH5 α pMW218 15	DH5 α mit Genbankplasmid pMW218 15, Cm ^R	diese Arbeit
DH5 α pMW218 19	DH5 α mit Genbankplasmid pMW218 19, Cm ^R	diese Arbeit
DH5 α pMW218 21	DH5 α mit Genbankplasmid pMW218 21, Cm ^R	diese Arbeit
DH5 α pMW218 24	DH5 α mit Genbankplasmid pMW218 24, Cm ^R	diese Arbeit
MG1655 pBR322 4	MG1655 mit Genbankplasmid pBR322 4, Ap ^R	diese Arbeit
MG1655 pKD4- $\Delta tnaA$	MG1655 mit pKD4-Rekombination von <i>tnaA</i> , Km ^R	diese Arbeit
MG1655 pKD4- $\Delta yedA$	MG1655 mit pKD4-Rekombination von <i>yedA</i> , Km ^R	diese Arbeit
MG1655 pKD4- $\Delta yddG$	MG1655 mit pKD4-Rekombination von <i>yddG</i> , Km ^R	diese Arbeit
MG1655 $\Delta yddG$ pKD4 $\Delta yedA$	MG1655 mit Deletion von <i>yddG</i> und pKD4-Rekombination von <i>yedA</i> , Km ^R	diese Arbeit
MG1655 pUC19	MG1655 mit pUC19, Ap ^R	diese Arbeit

Material und Methoden

Stamm	Genotyp, Phänotyp	Referenz/Quelle
MG1655 pBR322	MG1655 mit pBR322, Ap ^R	diese Arbeit
MG1655 pUC19_yddG	MG1655 mit pUC19_yddG, Ap ^R	diese Arbeit
MG1655 pUC19_PyddG	MG1655 mit pUC19_PyddG, Ap ^R	diese Arbeit
MG1655 pUC19_yedA	MG1655 mit pUC19_yedA, Ap ^R	diese Arbeit
MG1655 pUC19_PyedA	MG1655 mit pUC19_PyedA, Ap ^R	diese Arbeit
MG1655 pQE30	MG1655 mit pQE30, Ap ^R	diese Arbeit
MG1655 pQE30_yedA	MG1655 mit pQE30_yedA, Ap ^R	diese Arbeit
MG1655 pKD4_ΔtnaA pUC19	MG1655 mit pKD4-Rekombination von <i>tnaA</i> und pUC19, Km ^R , Ap ^R	diese Arbeit
MG1655 pKD4_ΔtnaA pUC19_PyddG	MG1655 mit pKD4-Rekombination von <i>tnaA</i> und pUC19_PyddG, Km ^R , Ap ^R	diese Arbeit
MG1655 pKD4_ΔtnaA pUC19_PyedA	MG1655 mit pKD4-Rekombination von <i>tnaA</i> und pUC19_PyedA, Km ^R , Ap ^R	diese Arbeit
MG1655 pKD4_ΔtnaA pBR322	MG1655 mit pKD4-Rekombination von <i>tnaA</i> und pBR322, Km ^R , Ap ^R	diese Arbeit
MG1655 pKD4_ΔtnaA pBR322-4	MG1655 mit pKD4-Rekombination von <i>tnaA</i> und pBR322-4, Km ^R , Ap ^R	diese Arbeit
MG1655 pKD4_ΔtnaA pQE30	MG1655 mit pKD4-Rekombination von <i>tnaA</i> und pQE30, Km ^R , Ap ^R	diese Arbeit
MG1655 pKD4_ΔtnaA pQE30_yedA	MG1655 mit pKD4-Rekombination von <i>tnaA</i> und pQE30_yedA, Km ^R , Ap ^R	diese Arbeit

2.1.2 Plasmide

Die verwendeten Plasmide und ihre Eigenschaften sind in der nachfolgend gezeigten Tabelle aufgeführt.

Tabelle 2-2: Benutzte Plasmide und deren Eigenschaften.

Plasmid	Eigenschaft	Referenz/Quelle
pUC19	Ap ^R , <i>lacZa</i> , rep (pMB1)	YANISH-PERRON <i>et al.</i> (1985)
pQE30	Ap ^R , PT5, <i>lacO</i> , RBS, 6xHis, Col E1	QUIAGEN (Hilden, BRD)
pBR322		
pBR322 Genbank	Genbank aus <i>E. coli</i> MG1655 in pBR322	NOVAK, 2006
pMW218 Genbank	Genbank aus <i>E. coli</i> MG1655 in pMW218	NOVAK, 2006
pBR322 4	pBR322 aus Genbank, selektioniert auf 5MTrp-Resistenz, siehe Tab. 3-3	diese Arbeit
pBR322 9	pBR322 aus Genbank, selektioniert auf 5MTrp-Resistenz, siehe Tab. 3-3	diese Arbeit
pBR322 10	pBR322 aus Genbank, selektioniert auf 5MTrp-Resistenz, siehe Tab. 3-3	diese Arbeit
pBR322 20	pBR322 aus Genbank, selektioniert auf 5MTrp-Resistenz, siehe Tab. 3-3	diese Arbeit
pBR322 22	pBR322 aus Genbank, selektioniert auf 5MTrp-Resistenz, siehe Tab. 3-3	diese Arbeit

Material und Methoden

Plasmid	Eigenschaft	Referenz/Quelle
pBR322 46	pBR322 aus Genbank, selektioniert auf 5MTrp-Resistenz, siehe Tab. 3-3	diese Arbeit
pMW218 1	pMW218 aus Genbank, selektioniert auf 5MTrp-Resistenz, siehe Tab. 3-3	diese Arbeit
pMW218 10	pMW218 aus Genbank, selektioniert auf 5MTrp-Resistenz, siehe Tab. 3-3	diese Arbeit
pMW218 15	pMW218 aus Genbank, selektioniert auf 5MTrp-Resistenz, siehe Tab. 3-3	diese Arbeit
pMW218 19	pMW218 aus Genbank, selektioniert auf 5MTrp-Resistenz, siehe Tab. 3-3	diese Arbeit
pMW218 21	pMW218 aus Genbank, selektioniert auf 5MTrp-Resistenz, siehe Tab. 3-3	diese Arbeit
pMW218 24	pMW218 aus Genbank, selektioniert auf 5MTrp-Resistenz, siehe Tab. 3-3	diese Arbeit
pQE30_yedA	pQE30 mit <i>yedA</i> -Gen für <i>yedA</i> -Überexpression	diese Arbeit
pUC19_yddG	pUC19 mit <i>yddG</i> -Gen für <i>yddG</i> -Überexpression	diese Arbeit
pUC19_PyddG	pUC19 mit 269 bp <i>upstream</i> -Fragment von <i>yddG</i> und <i>yddG</i> für <i>yddG</i> -Überexpression	diese Arbeit
pUC19_yedA	pUC19 mit <i>yedA</i> -Gen für <i>yedA</i> -Überexpression	diese Arbeit
pUC19_PyedA	pUC19 mit 214 bp <i>upstream</i> -Fragment von <i>yedA</i> und <i>yedA</i> für <i>yedA</i> -Überexpression	diese Arbeit
pET16b	Ap ^R , PT7, 6xHis, <i>lacI</i> , pBR322 ori	Merck KGaA (Darmstadt, BRD)
pET16b_yddG	pET16b mit <i>yddG</i> -Gen für <i>yddG</i> -Überexpression	diese Arbeit
pET16b_yedA	pET16b mit <i>yedA</i> -Gen für <i>yedA</i> -Überexpression	diese Arbeit

2.2 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

2.2.1 Nährmedien

2.2.1.1 Vollmedium

E. coli wurde standardmäßig in LB-Medium (SAMBROOK *et al.*, 1989) kultiviert. Diesem Medium konnten 15 g/l Bacto-Agar (Difco, Detroit, USA) für die Herstellung von Agarplatten zugesetzt werden. Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurden die bei INOUE *et al.* (1990) bzw. CHUNG *et al.* (1998) angegebenen Puffer und Medien benutzt.

2.2.1.2 Minimalmedium

Für die Messung von Aminosäureaufnahme bzw. -exkretion sowie für radioaktive Exportmessungen und Resistenztests wurde 56/2 Minimalmedium (EVONIK DEGUSSA GmbH) verwendet. Dazu wurde eine Stammlösung (Tabelle 2-3) angefertigt und sterilisiert. Die weiteren Bestandteile wurden getrennt angesetzt und ebenfalls sterilisiert.

Tabelle 2-3: Zusammensetzung des 56/2 Minimalmediums

Substanz	Konzentration
<u>Stammlösung</u>	
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g/l
K ₂ HPO ₄	10,5 g/l
NaH ₂ PO ₄ (*2H ₂ O)	7,8 g/l
Glucose	20 g/l
MgSO ₄	200 mg/l
CaNO ₃	10 mg/l
FeSO ₄	0,5 mg/l
Thiamin	12 mg/l

Bei der Vorkultur für Dipeptidfütterungen wurde das Medium weiterhin mit 1% (v/w) CAA substituiert. Diese wurden dazu als 20% (w/w) Lösung in H₂O_{dd} angesetzt und sterilfiltriert. Für Exportmessungen mit radioaktiv markierten Aminosäuren wurde dem Medium als C-Quelle statt Glucose 22,2 g/l Na-Pyruvat zugesetzt. Dies wurde als 222 g/l Stammlösung in H₂O_{dd} angesetzt und ebenfalls sterilfiltriert. Weiterhin wurden dem Medium in diesem Fall 0,1 g/l Tryptophan aus einer sterilfiltrierten Stocklösung einer Konzentration von 10 g/l zugegeben.

Für die Herstellung von Gradientenplatten wurde eine zweifach konzentrierte Stocklösung von 56/2 angesetzt, die dann unmittelbar vor dem Gießen der Platten im Verhältnis 1:1 mit 2% Bacto-Agar, welcher in Wasser gelöst und durch autoklavieren sterilisiert wurde, vermischt wurde.

2.2.1.3 Antibiotika

Die zur Selektion auf Antibiotikaresistenz eingesetzten Antibiotika wurden in destilliertem Wasser (Kan), einer Mischung aus Wasser und Ethanol (50% v/w) (Carb) oder Ethanol (Cam) gelöst, sterilfiltriert und den sterilen Medien in den aufgeführten Endkonzentrationen beigegeben (Tabelle 2-4).

Material und Methoden

Tabelle 2-4: Verwendete Antibiotika und benutzte Endkonzentrationen

Antibiotikum	Stammlösung [mg/ml]	Endkonzentration [µg/ml]
Kanamycin	25	25
Carbenicillin*	100	100
Chloramphenicol	25	25

* für Ampicillinresistenz

2.2.1.4 Kultivierungsbedingungen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C auf einem Rotationsschüttler. Standardmäßig wurden Vorkulturen in Vollmedium in Reagenzgläsern über 10 h inkubiert. Aus diesen Ansätzen konnten Vorkulturen in 20 bis 50 ml des jeweiligen Minimalmediums in 100 bis 500 ml Schüttelkolben mit Schikanen angeimpft werden. Die Kultivierung erfolgte über 12 bis 14 Stunden. Danach wurden die Kulturen zweimal mit dem entsprechenden Minimalmedium gewaschen. Es folgte die Messung der OD₆₀₀ durch Doppelbestimmungen der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm mit Hilfe eines Photometers (Novaspec II oder Ultrospec 3000, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Aus diesen Zellsuspensionen wurden die in den Versuchen benutzen Ansätze angeimpft.

Zur Herstellung von Zellsuspensionen für Gradientenplatten oder Wachstumsexperimente in Reagenzgläsern wurde prinzipiell nach demselben Schema vorgegangen, wobei mit 100 µl der Vorkultur in LB nur 5 ml 56/2 in einem Reagenzglas beimpft wurden. Nach einer Inkubationsdauer von 12 h wurde aus 4 ml dieser Kultur durch Zentrifugation (4000 rpm, 2 min, RT) ein Pellet hergestellt, welches in 1,5 ml frischem 56/2 einmal gewaschen, wieder zentrifugiert und schließlich in 500 µl 56/2 resuspendiert wurde. Nach Bestimmung der OD₆₀₀ konnten daraus die jeweils benötigten Zellsuspensionen hergestellt werden.

Zur Herstellung kompetenter Zellen kamen besondere Anzuchtprotokolle zum Einsatz, die unter 2.4.1 beschrieben werden.

2.3 Molekularbiologische Techniken

2.3.1 DNA-Techniken

2.3.1.1 Präparation chromosomaler DNA aus *E. coli*

Chromosomale DNA wurde durch Phenol/Chloroform-Extraktion gewonnen. Dazu wurde eine kleine Menge Zellmaterial von einer Agarplatte abgestrichen und in 200 µl H₂O resuspendiert. Nach der Zugabe von 200 µl Phenol und kräftigem Schütteln der Mischung wurde diese 10 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend kühlten die Proben 2 min auf Eis ab bevor 200 µl Chloroform zugesetzt und geschüttelt wurde. Durch eine Zentrifugation (4 °C, 15.300 rpm, 5 min) wurde die Phasentrennung beschleunigt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µl Chloroform versetzt. Nach nochmaligem Mischen und Zentrifugieren konnte der so gewonnene Überstand, der die extrahierte DNA enthielt, in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Die Lagerung erfolgte bei –20 °C.

2.3.1.2 Plasmid-Präparation aus *E. coli*

Die Plasmid-Mini-Präparation aus *E. coli* wurde mittels des NucleoSpin® Plasmid QuickPure Miniprep Kit (Machery-Nagel, Düren BRD) durchgeführt. Die Elution der gereinigten Plasmide erfolgte in je 30 µl H₂O.

2.3.1.3 Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Hierbei wurden TAE-Agarosegele mit einer Agarosekonzentration von 0,8% eingesetzt und entsprechend den Angaben bei SAMBROOK *et al.* (1989) aufgetrennt. Als Größenstandard wurden immer 7 µl 1kb Ladder Marker (MBI Fermentas, St. Leon-Roth) eingesetzt. Nach Ende des Laufs wurden die Gele in einem Ethidiumbromidbad gefärbt und die Ergebnisse mit einem Image Master VDS (Amersham Biosciences, Freiburg) dokumentiert.

Die Isolierung von DNA aus Gelen wurde mit dem NucleoSpin Extract-II-Kit (Machery-Nagel, Düren) durchgeführt, wobei die erhaltene DNA in 15-20 µl H₂O eluiert wurde.

2.3.1.4 Restriktion und Ligation von DNA

In dieser Arbeit wurden verschiedene Restriktionsenzyme und die entsprechenden Schnittstellen benötigt. Bei den Enzymen und den entsprechenden Puffern handelte es sich um Produkte der Firma NEB (Frankfurt/Main). Die Restriktion wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Reinigung des Restriktionsansatzes fand entweder mit Hilfe des NucleoSpin® Extract II Kit ((Machery-Nagel, Düren) nach der Arbeitsanweisung, wobei in 20 µl H₂O eluiert wurde,

oder durch Agarose-Gelelektrophorese statt. Die Ligation der DNA-Fragmente wurde mit dem Rapid DNA Ligation Kit (MBI Fermentas, St. Leon-Roth) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurde in der Regel 2 µl Vektor und entsprechend 12 µl DNA-Fragment eingesetzt.

2.3.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung von DNA wurde die Polymerase-Kettenreaktion benutzt. Die Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, BRD) bezogen und in Wasser auf eine Konzentration von 100 pmol/µl gelöst. Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde bei Nachweis-PCRs mit 2x EconoTaq Mastermix (Lucigen, Middleton, USA) bei PCRs zur Erstellung von Deletions- oder Expressionskonstrukten mit Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finland) jeweils nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.3.1.6 Klonierung von PCR-Fragmenten

Zur gerichteten Klonierung von PCR-Fragmenten in Vektoren wurden die Fragmente mit Primern amplifiziert, deren 5'-Ende mit einer 2 bis 4 Basenpaar lange Cap-Sequenz (in der Regel AA oder GCGC), gefolgt von der gewünschten Schnittstelle versehen war. Die so erstellten PCR-Fragmente konnten dann bei 37 °C für 2 h mit den gewünschten Restriktionsenzymen inkubiert, mittels des NucleoSpin[®] Extract II Kit ((Machery-Nagel, Düren) aufgereinigt, in 15 µl H₂O eluiert und mit dem entsprechend geschnittenen Vektor ligiert werden.

In einigen Fällen wurde eine Zwischenklonierung des PCR-Fragments in pDrive vorgenommen. Hierzu wurde das jeweilige Fragment nach seiner Erstellung sofort mit einer entsprechenden Menge EconoTaq Mastermix versetzt und 10 min bei 72 °C inkubiert um es mit A-Überhängen für die Klonierung in pDrive zu versehen. Diese erfolgte dann nach Angaben des Herstellers für das QIAGEN PCR Cloning Kit (Qiagen, Hilden). Die so erzeugten Vektoren konnten durch Transformation in chemisch kompetenten DH5α (mcr)-Zellen vermehrt und durch Plasmidpräparation gewonnen werden. Das PCR-Fragment konnte so im Vektor sequenziert und bei korrekter Sequenz durch Restriktion, Aufreinigung und nachfolgende Ligation im den endgültigen Zielvektor kloniert werden

2.3.1.7 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden bei der Firma GATC Biotch AG (Konstanz) durchgeführt. Dazu wurde eine Probe der jeweiligen DNA (30-100 ng/ μ l) in 30 μ l H₂O zusammen mit dem nötigen Sequenzierprimer (10 pmol in 30 μ l H₂O) bei der Firma eingesendet.

2.3.2 Nachweis von Expressionen

2.3.2.1 SDS-PAGE Gelelektrophorese und Western Blot

Die SDS-Page zum Proteinnachweis wurde nach SCHÄGGER *et al.* (1987) durchgeführt. Dabei wurden 5% Sammelgele und 15% Trenngele benutzt. Zur Erstellung der Proben wurde aus der entsprechenden Zellkultur ein Aliquot von 1 ml zum Auftrag auf das Gel aufgearbeitet. Als Größenstandard dienten jeweils 5 μ l PageRuler™ Prestained Protein Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Roth). Nach der Elektrophorese wurden die Proben mittels eines semi-dry Western Blot nach TOWBIN *et al.* (1919) auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Nachweis markierter Proteine erfolgte dann über sequenzielle Inkubation mit zwei Antikörpern, wobei der erste spezifisch den Tag band (His-, bzw. Strep-Tag), der zweite den Erstantikörper band und mit alkalischer Phosphatase fusioniert war. Damit war der Nachweis des Proteins durch die enzymatische Reaktion von BCIP/NBT (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat / Nitro Tetrazolium Blue Chloride) an der Phosphatase möglich.

2.4 Techniken zur Manipulation von Zellen

2.4.1 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation

2.4.1.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen und Transformation

Bei der Herstellung und Transformation chemisch kompetenter Zellen von *E. coli* wurde nach dem Protokoll von INOUE *et al.* (1990) vorgegangen. Die kompetenten Zellen wurden zu je 100 μ l aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

Um Zellen für die verschiedenen Klonierungen mit Plasmiden des Deletionsprotokolls nach DATSENKO *et al.* (2000) chemisch kompetent zu machen wurden sie nach den Angaben bei CHUNG *et al.* (1989) mit TSS-Puffer behandelt und nach Standardprotokoll transformiert.

2.4.1.2 Herstellung elektro-kompetenter Zellen und Transformation

Für die Herstellung elektro-kompetenter Zellen zur Deletion wurden zunächst chemisch kompetente *E. coli* mit dem Helferplasmid pKD46 transformiert und dann gemäß den Angaben von DATSENKO *et al.* (2000) kompetent gemacht und entsprechend den Angaben elektroporiert. Die Elektroporation erfolgte in einem MicroPulser Elektroporator der Firma BioRad Laboratories GmbH (München) mit einer Spannung von 2,5 kV bei 600 Parallelwiderstand und 25 μ F Kapazität.

2.4.2 Konstruktion von Deletionsmutanten

Die Konstruktion von Deletionsmutanten in *E. coli* erfolgte nach DATSENKO *et al.* (2000). Zur Erstellung der Deletionskonstrukte wurde das Template-Plasmid pKD4 benutzt. Der Nachweis der Deletion erfolgte mittels PCR mit den bei DATSENKO *et al.* angegebenen Primern. Durch Sequenzierung konnte die Deletion nochmals verifiziert werden.

Sollten in einem Deletionsstamm weitere Deletionen durchgeführt werden, so musste die pKD4-Kassette zunächst durch Transformation des chemisch kompetent gemachten Stammes mit dem Helferplasmid pCP20 und Inkubation entsprechend der Vorgaben von DATSENKO *et al.* entfernt werden. Dies konnte anhand der dann wiederhergestellten Sensitivität für Kan nachgewiesen werden. Für die folgende Deletion wurden die Zellen dann wieder wie zu Beginn beschrieben behandelt.

2.5 Biochemische Techniken

2.5.1 Herstellung von invertierten Membranvesikeln aus *E. coli*

Zur Herstellung von invertierten Membranvesikeln aus *E. coli* wurde der Stamm MG6155 zunächst in 20 ml LB in einem Schüttelkolben für 12 h inkubiert (37 °C, 125 rpm). Nun wurde die OD₆₀₀ der Zellsuspension bestimmt und damit 1 l LB auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. Diese Kultur wurde nun 5 h bei 37 °C und 125 rpm inkubiert. Es folgte die Zellernte durch Zentrifugation (4.500 rpm, 20 min, 4 °C) in einer BECKMAN Avanti J25 Zentrifuge und anschließendes Waschen der Zellen in 100 ml Waschpuffer (100 mM TRIS/HCl, pH 7,5). Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen in 50 ml des genannten Puffers aufgenommen, in 50 ml Falcon Tubes überführt und nochmals zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Pellet bis zu seiner weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Zum Aufschluss der Zellen wurden die Zellpellets mit je 25 ml Aufschlusspuffer (100 mM KH₂PO₄, 5 mM MgSO₄, pH 8), dem eine halbe Tablette Complete

Material und Methoden

Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) zugesetzt war, überschichtet. Das Pellet wurde dann bei 4 °C aufgetaut und schließlich im Puffer resuspendiert. Nun erfolgte der Aufschluss mittels dreimaligen Durchlaufs der French Press bei 1200 psi, wobei die Suspension konstant auf Eis gehalten wurde. Anschließend wurden die präparierten Membranvesikel durch Zentrifugation (12.500 rpm, 60 min, 4 °C) gewaschen. Dabei setzten sich die Zelltrümmer ab während die Membranfraktion im Überstand verblieb. Dieser wurde dann einer Ultrazentrifugation unterzogen (55.000 rpm, 60 min, 4 °C, BECKMAN Optima, TLX Ultrazentrifuge). Das erhaltene Membranpellet wurde mittels einer Hamilton-Spritze unter Vermeidung von Schaumbildung in ca. 5 ml vorgekühltem Waschpuffer auf Eis resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Schließlich erfolgte die letzte Resuspension der gereinigten Vesikel in 1 ml Membranpuffer (50 mM MOPS, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 10% Glycerol, pH 7,5). Die Suspension wurde dann zu je 50 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.5.2 Energetisierung von IMV

Die Energetisierung von IMV wurde fluorimetrisch anhand des Quenchings der Fluoreszenz von Acridin Orange (AO) bestimmt. Dazu wurden IMV in einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml in 2 ml Messpuffer (50 mM MOPS, 140 mM Cholinchlorid, 5 mM MgCl₂, pH 8,5) angesetzt und mit AO Endkonzentrationen von 1 µM versetzt. Die Lösung wurde in einer Küvette im Fluorimeter bei 37 °C inkubiert und gerührt. Die Messung erfolgte in einem SLM AMINCO Bowman Series 2 Luminescence Spectrometer, bei einer Excitationswellenlänge von 493 nm, einer Emissionswellenlänge von 528 nm und einer Signalverstärkung von 615 Volt. Nach ca. 120 s wurde die Energetisierung durch Zugabe von NADH (Endkonzentration 3 bis 4 mM) oder Lactat (6 mM) gestartet. Nach Erreichen des maximalen Quenchings, was in der Regel 120 s später der Fall war, konnten die Vesikel durch Zugabe von CCCP (Endkonzentration 10 µM) deenergetisiert werden. Wurde Piericidin A zur Inaktivierung der NADH Dehydrogenase eingesetzt, so erfolgte die Applikation ebenfalls 120 s nach Zugabe von NADH in einer Endkonzentration von 20 µM.

2.5.3 Bestimmung der Aminosäureaufnahme

2.5.3.1 Fluorimetrische Bestimmung der Aminosäureaufnahme in IMV

Für die fluorimetrische Bestimmung der Aminosäureaufnahme in IMV wurden die Vesikel nach dem gleichen Schema wie unter 2.5.2 genannt angesetzt. Allerdings wurden die IMV mit Messpuffer gemischt, der entweder eine Aminosäurenmischung, die Arginin, Leucin, Valin,

Material und Methoden

Isoleucin, Cystein und Methionin in einer Konzentration von je 50 mM und Tryptophan in einer Konzentration von 25 mM, bzw. die einzelnen Aminosäuren in der genannten Konzentration enthielt (Tryptophan in diesem Fall auch 50 mM). Für die Untersuchung des Quenchings mit Tryptophan in Anwesenheit von Met wurde der Versuchsansatz zunächst in einem Gesamtvolumen von 1,5 ml Met-haltigem Puffer angesetzt. Diesem wurde nach maximaler Energetisierung dann entweder 0,5 ml des Met-haltigen Puffers zugegeben oder 0,5 ml eines Puffers, der 50 mM Tryptophan enthielt.

2.5.3.2 Aufnahme radioaktiv markierter Aminosäuren in IMV

Für die Messung der Aufnahme von Aminosäuren in IMV wurde die Proteinkonzentration der Vesikel auf einen Wert von 5 bis 7 mg/ml in einem Gesamtvolumen von 200 µl Messpuffer (10 mM TRIS/HCl, 140 mM KCl, pH8) eingestellt und dieser bei 30° C inkubiert. Diese Suspension wurde in einem 2 ml Eppendorfgefäß gerührt.

Es folgte die Zugabe von 5 µl der jeweiligen radioaktiv markierten Aminosäure zu einer Endkonzentration von 80 µM und von Lactat zu einer Endkonzentration von 20 mM. Dies stellte den Beginn der Messung dar. In bestimmten Zeitintervallen wurden dann je 30 µl Proben entnommen und in je 1 ml vorgekühlte Stop-Lösung (0,1 M LiCl, 1 mM CaCl₂) pipettiert. Nach Entnahme der letzten Probe wurden die Proben nacheinander auf Nitrocellulosefilter (Porengröße 0,22 µm, Millipore, Bedford, Massachusetts) aufgetragen, der Puffer über eine Vakuumfiltrationsanlage abgesaugt und die IMV mit je 4 ml vorgekühltem Waschpuffer (0,1 M LiCl) gewaschen. Die gewaschenen Filter wurden in Szintillationsröhrchen überführt und mit 3,8 ml Szintillationsflüssigkeit (Ecoszint, Roth, Karlsruhe) überschichtet. Die Bestimmung der Gesamtaktivität erfolgte, indem eine Probe ohne Filtration direkt mit Szintillationsflüssigkeit gemischt wurde. Anschließend folgte die Messung der Radioaktivität in einem Flüssig-Scintillationszähler (LS 6500, Beckman Instruments GmbH, München).

2.5.4 Bestimmung der Aminosäureexkretion

2.5.4.1 Silikonölzentrifugation und Dipeptidfütterung

Hierfür wurden Vorkulturen der jeweils benutzten Stämme in je 5 ml LB, falls nötig mit dem entsprechenden Antibiotikum, angezogen. Nach einer Inkubationszeit von ca. 8 h konnten mit 1 ml dieser Kultur 20 ml einer Kultur in 56/2 +1% CAA angesetzt werden, der gegebenenfalls das entsprechende Antibiotikum zugegeben wurde und die danach für 15 h inkubiert wurde.

Material und Methoden

Am nächsten Morgen wurden die Kulturen in 50 ml-Falcon Tubes umgefüllt und bei 4000g und RT für 10 min (Eppendorf-Zentrifuge 5810 R) zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 10 ml 56/2 resuspendiert und die OD₆₀₀ der Suspension bestimmt. Nun konnten in 500 ml-Schüttelkolben je 50 ml frisches 56/2 +1% CAA auf eine OD₆₀₀ von 0,3 angeimpft werden. Diese wurden auf einem Rotationsschüttler bei 37 °C für 3 h inkubiert. Nun erfolgten zwei Waschschriffe in 50 ml und 10 ml 56/2 (je bei 4000 rpm und RT für 10 min) und die Bestimmung der OD₆₀₀ nach Resuspension in 10 ml 56/2. Die OD₆₀₀ wurde dann für den Versuch auf einen Wert von 2,5 bis 3 in 18 ml Medium eingestellt. Wurde eine Probe vor Zugabe des Dipeptids bzw. eine zum Test der Expression mittels Western Blot entnommen, so wurden die Zellen in je 1 ml mehr Medium beimpft.

Für die Messung von stationären Zellen wurden aus der 5 ml LB-Vorkultur 50 ml frisches LB beimpft. Dies wurde dann 12 h bei 37 °C und 125 rpm inkubiert. Nach zwei Waschschriffen in je 50 ml 56/2 wurden die Zellen in 10 ml 56/2 resuspendiert, die OD₆₀₀ bestimmt und damit 18 ml 56/2 auf eine OD₆₀₀ von 2,5 bis 3 beimpft.

Mit Beimpfen des Mediums begann die Messung. Für die Silikonölzentrifugation wurden pro Messpunkt 3 Mikrozentrifugenröhrchen (milian Labware, Genf, Schweiz) mit je 30 µl Perchlorsäure (PCA) 20% und 70 µl Silikonöl der Dichte 1,04 g/cm³ beschickt und kurz bei 13.750 rpm zentrifugiert (Mikrofuge E, Beckmann). Zu jedem Messpunkt wurde dann in jedes der drei Mikrozentrifugenröhrchen je 200 µl der Kultur pipettiert und ca. 45 s zentrifugiert. Des Weiteren wurden Proben zur Bestimmung der OD₆₀₀ entnommen. 10 min nach Beginn der Messung wurden den Kulturen je 2 ml einer 20mM Lösung des Dipeptids Ala-Tryptophan in 56/2 zugesetzt, womit eine Endkonzentration von 2 mM im Ansatz erreicht wurde. Weitere Proben wurden nun in vorher festgelegten Zeitintervallen entnommen. Wurde CCCP zur Untersuchung der Energetik des Exports genutzt, so wurde dies dem Versuchsansatz zu einem bestimmten Zeitpunkt zu einer Endkonzentration von 50 µM aus einer 5 mM Stocklösung in EtOH zugegeben. Wurde CAM zur Untersuchung der Induktion benutzt, so wurde dies dem Versuchsansatz zu einem bestimmten Zeitpunkt in der unter 2.1.3 genannten Endkonzentration zugegeben.

Für die Proben zur Bestimmung der externen Dipeptid- und Aminosäurekonzentrationen wurden pro Mikrozentrifugenröhrchen je 150 µl des Überstandes abgenommen und in einem Reaktionsgefäß, in dem bereits 225 µl PCA 20% vorgelegt waren, vereinigt. Somit konnten eventuell vorhandene externe Hydrolasen inaktiv gemacht werden. Durch die Zugabe von 186 µl 5 M KOH / 1 M Triethanolamin erfolgte die Neutralisation der Probe. Nach einer

Material und Methoden

Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C für 20 min wurde der Übersand vorsichtig abgenommen und konnte bis zur Vermessung in der HPLC bei -20 °C gelagert werden.

Zur Bestimmung der internen Konzentrationen wurden die drei Mikrozentrifugenröhrchen jedes Messpunkts jeweils in der Mitte der Silikonölphase durchtrennt. Die Enden wurden nun mit der Öffnung nach unten in ein 2 ml-Reaktionsgefäß vereinigt und bei 13.000 rpm und RT für 1 min zentrifugiert. Anschließend konnten die zwei oberen der drei Enden aus dem Reaktionsgefäß entfernt werden. Nach Zugabe von 135 µl H₂O und 100 µl Silikonöl der Dichte 1,06 g/cm³ wurde das Pellet resuspendiert und durch ein 10-minütiges Ultraschallbad aufgeschlossen. Die Neutralisation des Ansatzes geschah nun durch Zugabe von 75 µl 5 M KOH / 1 M Triethanolamin. Die Mischung wurde kurz gevortext und für ca. 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C für 20 min wurden 180 µl des Überstandes entnommen und bis zur Messung in der HPLC bei -20 °C gelagert.

2.5.4.2 HPLC-Analyse

Die Bestimmung der Konzentrationen von Aminosäuren und Dipeptiden in den Proben der Dipeptidfütterung erfolgte mittels "High Pressure Liquid Chromatography" (HPLC) in der Anlage HP 1100 (Hewlett-Packard, Waldbronn). Dabei wird die Probe jeweils mit einem zehnfachen Überschuss an o-Phtaldialdehyd-Borat-2-Mercaptoethanol-Reagenz derivatisiert. Diese Substanz reagiert mit primären Aminogruppen unter Bildung von fluoreszierenden, thiolsubstituierten Isoindolen (LINDROTH und MOPPER, 1979), deren Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 230 nm und einer Emissionswellenlänge von 455 nm detektiert werden kann. Bei der Auftrennung kam eine "reversed phase" Säule RP-18 (Vorsäule Multospher: 40 x 4 mm, CS Chromatographie, Langwehe; Trennsäule Nucleodur RP-18: 125 x 4 mm, Machery-Nagel, Düren) bei einer Temperatur von 35 °C und einem Fluss von 0,8 ml/min zum Einsatz. Die mobile Phase bestand aus einem Puffer A (50% Methanol, 50% Acetonitril) und einem Puffer B (95% 40 mM Na⁺-acetatpuffer, pH = 6,5, 0,06% Na-azid; 5% Puffer A), die beim Durchlauf jeder Probe anhand eines Gradientenprogramms von 100% Puffer A zu 0% Puffer A gemischt wurden. Um die Konzentrationen der gesuchten Substanzen zu bestimmen wurden zunächst zwei Kalibrierungsreihen erstellt. Dabei wurden sowohl für die Aminosäurebestimmung als auch für die Dipeptidkonzentration Standards mit den definierten Konzentrationen von 25 µM, 50 µM, 100 µM und 200 µM angesetzt. Anhand dieser Kalibrierungsreihen konnten die gemessenen *Peak*-Flächen in den Proben direkt in entsprechende Konzentrationen umgerechnet werden. Um die Messwerte im Bereich der Kalibrierung zu halten wurden die externen Proben in der Regel mit H₂O 1:5 verdünnt bevor

sie die HPLC durchliefen. Bei den internen Proben wurde die Konzentration auf das Trockengewicht bezogen. Die Berechnung geschah nach folgender Gleichung:

$$c = (\text{HPLC-Wert} * (300 / (\text{OD}_{600} * 0,36 * 0,6))) / 1000$$

c = interne Stoffmenge [$\mu\text{mol/g}$ BTM]

HPLC-Wert = aus der Probe ermittelte Konzentration [μM]

300 = Verdünnungsfaktor der Probenaufarbeitung

OD_{600} = optische Dichte der Kultur zum Messzeitpunkt

0,36 = Trockengewicht-Relation von *E. coli* [mg/ml pro $\text{OD}=1$]

0,6 = Volumen der Probe [ml]

Bei der Berechnung der Konzentrationen in den externen Proben war lediglich der Verdünnungsfaktor von 1,91 zu berücksichtigen.

2.5.5 Resistenztests und Selektionierung in Anwesenheit von Inhibitoren

2.5.5.1 Selektion mit Hilfe von *E. coli* Genbanken

Die von NOVAK (2006) hergestellten und der Evonik Degussa GmbH zur Verfügung gestellten *E. coli* Genbanken in pBR322 und pMW218 wurden benutzt, um durch Selektionierung auf dem toxischen Tryptophanalogon 5-Mehtyl-Tryptophan putative Tryptophanexporter zu identifizieren. Es wurde zunächst eine Testtransformation durchgeführt, um zu Überprüfen, ob die Transformationseffizienz hoch genug war, das gesamte Genom bei einer Transformation abzudecken. Hierzu wurden chemisch kompetente *E. coli* DH5 α (mcr) nach dem unter 2.4.1.1 genannten Protokoll mit je 1 ml der jeweiligen Genbank transformiert. Für den Ausstrich wurden 100 μl unverdünnte Zellsuspension, sowie zwei Verdünnungen des Transformationsansatzes (1:2 und 1:10) auf LB-Platten, die das jeweilige Antibiotikum enthielten ausgestrichen und bei 37 °C für 24 h inkubiert. Danach erfolgte die Auszählung der gewachsenen Klone, für die je nach Dichte der Population die ganze Platte oder ein bestimmter Anteil der Platte benutzt wurden. Aus diesen konnte anschließend die Gesamtzellzahl im Transformationsansatz rückberechnet werden. Als Indikator für die Rückgewinnung einer bestimmten Genfunktion, und damit für die Abdeckung von Genen in der Genbank wurde die Wiederherstellung der LacZ-Funktion getestet. Das *lacZ*-Gen ist in *E. coli* DH5 α unterbrochen. Trägt ein Plasmid der Genbank nun ein Insert, in dem *lacZ* enthalten ist, so wird die Genfunktion in dem entsprechenden Klon wiederhergestellt, was sich durch Blau-Weiß-Selektion mit Hilfe von IPTG und X-Gal nachweisen lässt. Ein Aliquot von 100 μl des Transformationsansatzes wurde dazu auf entsprechenden LB-Platten ausgestrichen und nach Inkubation die Zahle der blauen Kolonien

bestimmt. Durch Rückberechnung auf die Gesamtzellzahl konnte angegeben werden, wie oft ein funktionelles *lacZ* in der Genbank enthalten war.

Für die Selektionierung der Genbank auf 5MTrp-Resistenz wurden die Zellen zunächst nach dem gleichen Schema mit den beiden Genbanken transformiert. Parallel dazu wurden 100 μ l *E. coli* DH5 α (mcr) ohne Zusatz eines Plasmids der Transformation unterzogen, um als Negativkontrolle zu dienen. Nach der einstündigen Inkubation wurde dann der komplette Transformationsansatz der Genbanken in Portionen zu je 100 μ l ausgestrichen. Von der Negativkontrolle wurden nur zweimal 100 μ l ausgestrichen. Dies geschah auf 56/2-Agarplatten, die je 300 μ M 5MTrp und gegebenenfalls das jeweilige Antibiotikum enthielten. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37 °C im Dunkeln für 72 h. Danach wurden alle sichtbaren Einzelkolonien auf frische 56/2-Agarplatten mit 500 μ M 5MTrp und Zusatz des entsprechenden Antibiotikums überimpft und bei 37 °C für 24 h im Dunkeln inkubiert. Mit den dabei erhaltenen Kolonien wurden Plasmidpräparationen (siehe 2.3.1.2) durchgeführt.

Die erhaltenen Plasmide wurden nun zunächst durch einen Restriktionsverdau kontrolliert, um die Größe des jeweiligen Inserts bestimmen zu können. Dazu wurden pBR322-Plasmide mit den Restriktionsenzymen SphI und HindIII, pMW218-Plasmide mit SphI nach den Angaben unter 2.3.1.4 verdaut. Zur Analyse der Restriktion wurden auf dem benutzten Agarosegel je ein Aliquot unverdautes Plasmid neben dem verdauten Plasmid aufgetragen. Plasmide, bei denen hier eine Bestimmung der Insertgröße möglich war wurden dann sequenziert (siehe 2.3.1.7). Zur Sequenzierung wurden Primer benutzt, die 50 bis 100 bp vor bzw. nach dem Insert in im Plasmid binden konnten. Durch Vergleich der erhaltenen Sequenz mit der des jeweiligen Plasmids konnte exakt die Stelle der Sequenz ermittelt werden, an der das Insert begann. Nun wurden jeweils die ersten 200 bp des sequenzierten Inserts als Template für die Suche des entsprechenden Sequenzabschnitts im Genom von *E. coli* MG155 K-12 benutzt. So konnten das 5' und das 3'-Ende des Inserts festgelegt werden.

2.5.5.2 Herstellung von Gradientenplatten

Für die Herstellung von Gradientenplatten wurde eine untere Schicht 56/2-Agar mit einer Schicht 56/2-Agar, die den jeweils benutzten Inhibitor enthielt so überschichtet, dass sich durch Diffusion des Inhibitors aus der oberen in die untere Schicht ein Konzentrationsgradient über die Längsseite der Petrischale einstellte. Hierfür wurde zunächst die 56/2-Agar Lösung in eine schräg aufgestellte Petrischale gegossen, so dass sie den gesamten Boden benetzte. Nach Erstarren der ersten Schicht wurde die Platte ebenerdig aufgestellt und die zweite Schicht, der der jeweilige Inhibitor in einer bestimmten Konzentration zugegeben war

Material und Methoden

eingegossen. Stocklösungen von 56/2 Minimalmedium und Bacto Agar wurden dazu in zweifacher Konzentration hergestellt und unmittelbar vor dem Gießen der Platten miteinander vermischt. Pro Schicht wurde je ein Volumen von 15 ml eingesetzt. Wenn zusätzlich zum Inhibitor noch Tryptophan in den Platten enthalten war, so wurde dies auch der unteren Schicht in der entsprechenden Konzentration zugegeben, so dass die gewünschte Tryptophankonzentration über die gesamte Länge der Platte die gleiche war.

Zum Beimpfen der Platten wurden Zellsuspensionen der benutzten Stämme in 1 ml 56/2 auf eine OD_{600} von 0,05 eingestellt und mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt. Die Suspensionen wurden in ein 8-Kammer Multikanalreservoir überführt und bis zu ihrer Verwendung auf Eis gelagert. Das Auftropfen der Suspension geschah mit Hilfe einer Mehrkanalpipette (Charlotte 8-Kanal, 2-125 μ l, SÜD-LABORBEDARF GMBH, Gauting). Mit dem Programm „MULTI“ wurde die jeweilige Menge Zellsuspension aufgenommen und in elf 3 μ l Portionen im Abstand von je 1 cm auf die Platte entlang des Gradienten aufgetropft. Nach 5 min waren die Tropfen auf der Platte soweit eingetrocknet, dass sie ohne zu verschwischen umgedreht werden konnte. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 24 h im Dunkeln. Auch während der Herstellung der Platten und dem Auftropfen der Suspension wurde darauf geachtet, die Platten möglichst wenig Licht auszusetzen, da viele der benutzten Inhibitoren photosensitiv sind. Nach der Inkubation konnte das Wachstum der Stämme auf den Platten durch fotografieren der Platten mit einem Image Master VDS (Amersham Biosciences, Freiburg) oder durch scannen in einem Canon dokumentiert werden.

2.5.5.3 Wachstumstests in Reagenzgläsern

Die Resistenz von verschiedenen *E. coli* Stämmen gegen bestimmte Inhibitoren wurde auch durch Wachstumstests in 56/2 in Reagenzgläsern bestimmt. Dazu wurde der jeweils benutzte Stamm aus einer 56/2 Vorkultur in insgesamt 5 ml 56/2 auf eine OD_{600} von 0,02 angeimpft. Der entsprechende Inhibitor in einer bestimmten Endkonzentrationen und das jeweilige Antibiotikum wurden zugegeben und sofort die OD_{600} mit Hilfe eines ULTROSPEC10 Photometers (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) direkt im Reagenzglas gemessen. Die Reagenzgläser wurden dann für 24 h bei 37 °C und 125 rpm im Dunkeln inkubiert und nach kurzem vortexen anschließend nochmals die OD_{600} gemessen. Es wurde die Differenz der OD bestimmt und als Indikator für die Resistenz benutzt.

2.5.6 Transportmessungen mit radioaktiv markierten Aminosäuren

Hierfür wurde von den benutzten Stämmen zunächst eine Vorkultur in 5 ml LB in Reagenzgläsern mit Zusatz des entsprechenden Antibiotikums beimpft und für ca. 8 h bei 37

Material und Methoden

°C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Mit 1 ml dieser Kultur wurde dann eine zweite Vorkultur in 20 ml 56/2 Minimalmedium, welches als C-Quelle 200 mM Na-Pyruvat enthielt (im Folgenden 56/2-Pyr genannt) und dem 500 µM Tryptophan zugesetzt waren angeimpft. Nach 12 bis 18 stündiger Inkubation (37 °C, 125 rpm) wurden die Zellen durch Zentrifugation gesammelt (4000 rpm, 10 min, RT) und nach einem Waschschrift in 20 ml 56/2-Pyr in 5 ml 56/2-Pyr resuspendiert. Nach Bestimmung der OD₆₀₀ wurden 50 ml 56/2-Pyr mit Zusatz von 500 µM Tryptophan mit der Zellsuspension auf eine OD₆₀₀ von 0,2 angeimpft und für 4 h inkubiert (37 °C, 125 rpm).

Nun wurden die Zellen wiederum durch Zentrifugation (4000 rpm, 10 min, RT) gesammelt, zweimal in je 50 ml 56/2-Pyr gewaschen und in 5 ml 56/2-Pyr resuspendiert. Nach Bestimmung der OD₆₀₀ wurden der Zellsuspension gegebenenfalls so viel Medium zugesetzt, dass sie eine OD₆₀₀ von 3 bis 4 hatte. Die Tryptophanaufnahme wurde mit radioaktiv markiertem L[¹⁴C]-Tryptophan (spezifische Aktivität: 57,2 mCi/mmol; Hartmann Analytic, Braunschweig) in verschiedenen Endkonzentrationen bestimmt.

Für die Messung wurden je 2,5 ml der Zellsuspension in Reagenzgläsern bei 37 °C im Wasserbad gerührt. Nach 5 min wurden 10 µl einer 50 mM Lösung markierten Tryptophans zugegeben und damit die Messung gestartet. Nun wurden in bestimmten Zeitintervallen je 200 µl Proben entnommen und mit 800 µl eiskaltem 0,1 M LiCl, 4 mM Tryptophan vermischt. Nach Beendigung der Probennahme wurden die Proben auf Glasfaserfilter (Milipore, Eschborn) pipettiert. Durch eine Vakuumfiltrationsanlage wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden mit 8 ml 0,1 M LiCl, 4 mM Tryptophan gewaschen. Die Filter wurden dann in Scintillationsgefäße überführt, mit 3,8 ml Scintillatorflüssigkeit überschichtet und in einem Flüssig-Scintillationszähler analysiert. Die Gesamtaktivität im Ansatz wurde durch Messung von 200 µl Zellsuspension ohne Filtration ermittelt.

Für Exportmessungen mit radioaktiv merkiertem Tryptophan wurden die Zellen zunächst 45 min mit markiertem Tryptophan inkubiert. Dann erfolgte der Start der Exportmessung durch Zugabe von unmarkiertem Tryptophan in einer Endkonzentration von 4 mM im Ansatz.

2.6 Bioinformatische Ansätze

2.6.1 Ähnlichkeitssuche

Die Datenbanksuche nach homologen Sequenzen wurde online bei <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> durchgeführt.

2.6.2 Sekundärstrukturvorhersage

Sekundärstrukturvorhersagen wurden anhand der Proteinsequenz online bei <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/> durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der Dipeptidfütterung in *E. coli* zur Untersuchung des Tryptophanexports

3.1.1 Konstruktion eines Stammes mit geeignetem genetischen Hintergrund

Um den Export von Tryptophan in *E. coli* untersuchen zu können, sind bestimmte Vorbedingungen nötig. Bei der Dipeptidfütterung mit Ala-Tryptophan werden die Zellen nach Aufnahme des Dipeptids durch dessen interne Spaltung in die freien Aminosäuren mit Tryptophan beladen, welches dann im Verlauf der Messung ins Medium exkretiert wird. Um eine störungsfreie Umsetzung des aufgenommenen Dipeptids und den nachfolgenden Export von Tryptophan ins Medium verfolgen zu können, darf Tryptophan weder von den Zellen verstoffwechselt werden, noch darf bereits exportiertes Tryptophan wieder aufgenommen werden. Die interne Verstoffwechslung von Tryptophan kann in *E. coli* durch die induzierbare Tryptophanase TnaA geschehen. Da TnaA *E. coli* dazu befähigt, auf Tryptophan als N-Quelle zu wachsen, war ein deutlicher Abbau von Tryptophan durch TnaA zu erwarten. Im Hinblick auf den Import müssen neben den Tryptophanspezifischen Aufnahmesystemen TnaB und Mtr noch AroP, welches ein Aufnahmesystem für alle aromatischen Aminosäuren ist, berücksichtigt werden. Die Aktivität dieser Importer würde durch Reimport bereits exkretierten Tryptophans die Bilanz des Exports verfälschen.

Um diese störenden Einflüsse zu eliminieren war es zunächst nötig, einen Stamm zu erzeugen, in dem sowohl Abbau als auch Import von Tryptophan nicht mehr möglich sind. Dies war durch Konstruktion der Mutante *E. coli* $\Delta tnaAB$ möglich. Durch Deletion nach DATSENKO *et al.* (2000) konnte der Gencluster *tnaAB* entfernt werden. Der Nachweis der Deletion erfolgte zunächst mittels PCR.

Ergebnisse

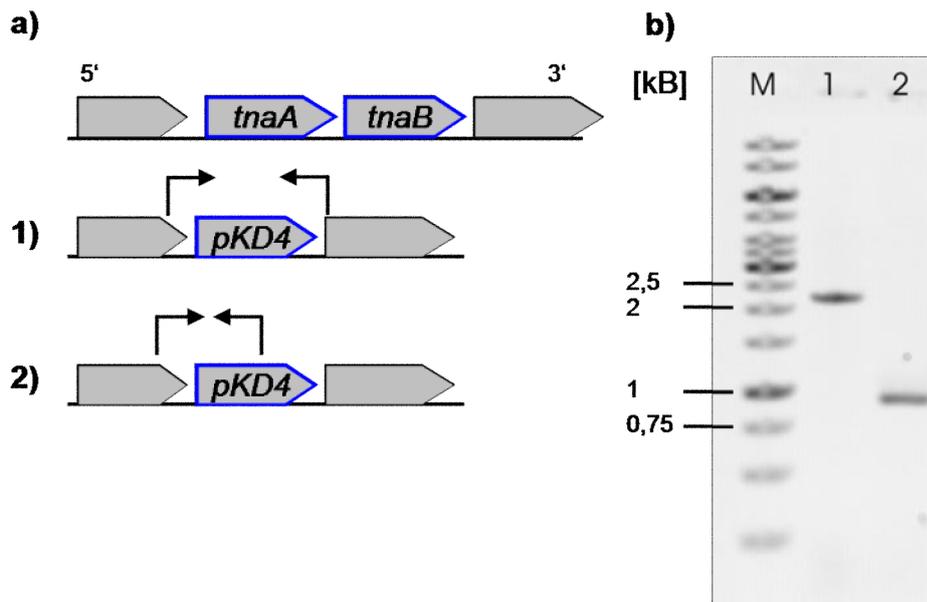


Abbildung 3-1: PCR Nachweis von pKD4-*ΔtnaAB*. a) Organisation des *tnaAB*-Clusters im Genom und nach Rekombination mit pKD4 mit eingezeichneten Bindestellen der benutzten Primer für die in Teil b) gezeigten PCR-Produkte. b) Agarosegel der PCR Produkte für den Nachweis von pKD4-*ΔtnaAB*, M: Marker mit ausgewählten Größenstandards, 1) PCR-Produkt der unter a1) dargestellten Primerkombination, 2) PCR-Produkt der unter a2) dargestellten Primerkombination.

Bei der PCR zum Nachweis der Deletion wurde einerseits mit einer Kombination von Primern, die außerhalb des deletierten Clusters banden dessen Ersatz durch die pKD4-Kassette nachgewiesen. Diese ist nur 1,4 kb groß, während der komplette *tnaAB*-Cluster ca. 2,8 kb groß ist. Die benutzten Primer binden je vor bzw. nach *tnaAB* (Abbildung 3-1a1), so dass das entstehende Produkt im Fall einer erfolgreichen Deletion nur noch ca. 2 kb groß sein sollte. Dies ist in Abbildung 3-1b1 zu sehen. Abbildung 3-1b2 zeigt das PCR-Produkt einer Reaktion, bei der der 5' Nachweisprimer, der vor dem *tnaAB*-Cluster bindet mit einem 3' Primer kombiniert wurde, der spezifisch in pKD4 bindet. Hier konnte nur dann ein Produkt entstehen, wenn die pKD4-Kassette *tnaAB* ersetzt hatte. Nachdem die Deletion genetisch nachgewiesen wurde, erfolgte der funktionelle Nachweis des Verlusts der *tnaAB* Genfunktionen. Zunächst wurde die Deletion von *tnaB* durch radioaktive Aufnahmemessungen nachgewiesen. Da *E. coli* neben TnaB noch über zwei weitere Tryptophanaufnahmesysteme, namentlich Mtr und AroP, verfügt, war es zur Bestimmung der Aktivität von TnaB nötig, diese in ihrer Aktivität zu hemmen. Weil AroP alle aromatischen Aminosäuren transportieren kann, konnte dessen Aktivität bezüglich der Tryptophanaufnahme gehemmt werden, indem die Messung in Anwesenheit eines Überschusses Phenylalanin stattfand. Durch Zugabe von Tryptophan zum Kulturmedium bei der Anzucht der Zellen war es weiterhin möglich, einerseits die Expression von *mtr* zu

Ergebnisse

reprimieren (SARSERO *et al.*, 1991), andererseits die Expression von *tnaB* zu induzieren (EDWARDS *et al.*, 1982). Weiterhin wurde als C-Quelle während der Kultivierung Glycerol eingesetzt, um eine Katabolitrepression der Genexpression zu vermeiden. Der in Abbildung 3-2 gezeigte Vergleich der Aufnahmearten von Tryptophan im Wildtypstamm MG1655 und in der Mutante *E. coli* pKD4- *tnaAB* macht deutlich, dass die Deletion von *tnaB* erfolgreich war. Während die Aufnahmeart im Wildtyp 0,35 [(nmol/mgTG)*min] betrug waren es in der Mutante lediglich 0,006 [(nmol/mgTG)*min]. Dieser Wert bewegte sich schon fast unterhalb der Nachweisgrenze.

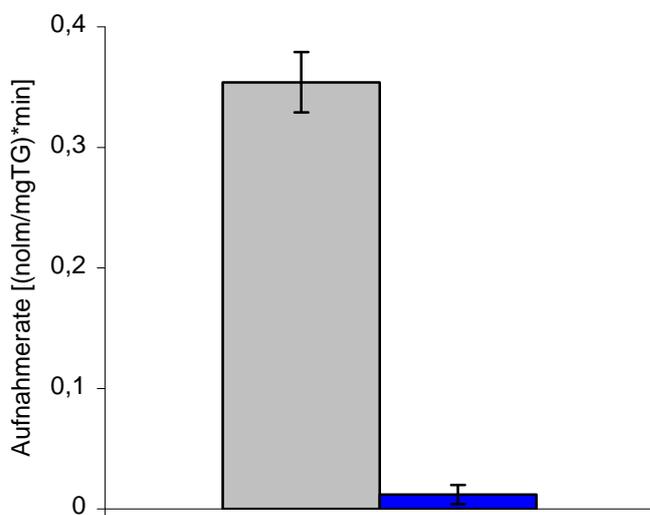


Abbildung 3-2: Bestimmung der Aufnahmeart für Tryptophan im *E. coli* Wildtyp MG1655 (grauer Balken) und der Mutante *E. coli* pKD4- *tnaAB* (blauer Balken) bei einer Tryptophankonzentration von 10 μ M.

Um auch einen funktionellen Nachweis für die Inaktivierung der Tryptophanase TnaA zu führen, wurden Wachstumstests in Schüttelkolben in 56/2-Minimalmedium durchgeführt, in denen die C- oder N-Quelle des Mediums durch je 5 mM des Dipeptids TrpTrp ersetzt wurde. Dipeptide werden durch unspezifische Aufnahmesysteme importiert und intern sofort zu freien Aminosäuren hydrolysiert. Damit sollte sichergestellt werden, dass zellintern eine ausreichend hohe Tryptophankonzentration vorlag, um den Zellen theoretisch dessen Verstoffwechslung auch in Abwesenheit des stärksten Aufnahmesystems TnaB zu erlauben.

Ergebnisse

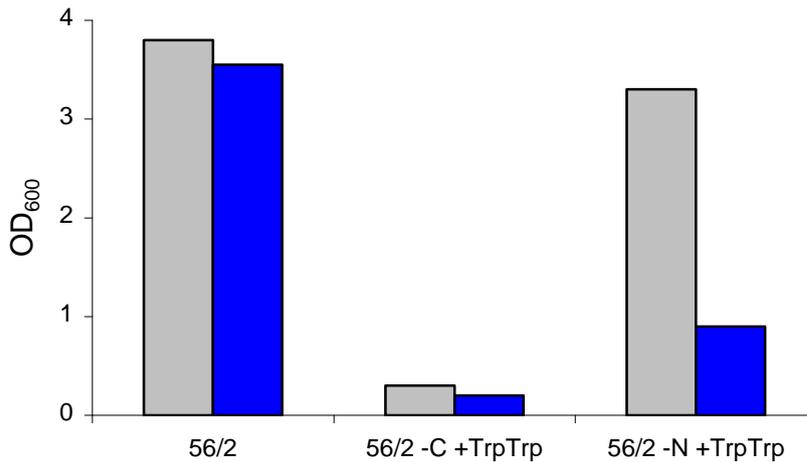


Abbildung 3-3: OD₆₀₀ nach siebentägiger Inkubation von *E. coli* MG1655 (graue Balken) und pKD4- *tnaAB* (blaue Balken) in 56/2-Minimalmedium, bzw. in substituiertem Minimalmedium (siehe Text). OD₆₀₀ zu Beginn der Inkubation: 0,2.

Der in Abbildung 3-3 dargestellte Vergleich der OD₆₀₀ von Wildtyp und *E. coli* pKD4-*tnaAB* nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen bei einer Start-OD₆₀₀ von 0,2 macht deutlich, dass die Mutante Tryptophan nicht mehr verstoffwechseln konnte. In unsubstituiertem Medium erreichten sowohl Wildtyp als auch *E. coli* pKD4-*tnaAB* eine OD₆₀₀ von ca. 4. Während der Wildtyp beim Wachstum mit dem Dipeptid TrpTrp als N-Quelle eine annähernd so hohe OD₆₀₀ von 3,3 erreicht wächst die Mutante nur bis zu einem Wert von 0,9, schafft also lediglich zwei Verdopplungen. In Medium, bei dem die C-Quelle mit TrpTrp substituiert wurde, wurde weder in der Mutante noch im Wildtyp ein nennenswertes Wachstum beobachtet.

3.1.2 Etablierung des Fütterungsprotokolls

Erste Versuche zur Dipeptidfütterungen beschäftigten sich mit der Optimierung des Fütterungsprotokolls, welches auf der Vorlage des von TRÖTSCHER *et al.* (2005) benutzten Protokolls für Dipeptidfütterungen in *C. glutamicum* entwickelt wurde. Zunächst wurden die Bedingungen der Vorkultivierung untersucht, da durch diese eine möglichst optimale Aufnahme des Dipeptids gewährleistet werden sollte. Hierzu wurden parallel Kulturen in LB und 56/2 Minimalmedium vorkultiviert und anschließend in der Dipeptidfütterung getestet. Es zeigte sich, dass es bei Vorkultivierung in Minimalmedium nur zu einer ungenügenden Aufnahme des Dipeptids und damit zu einer mangelhaften internen Akkumulation von Tryptophan kam.

Ergebnisse

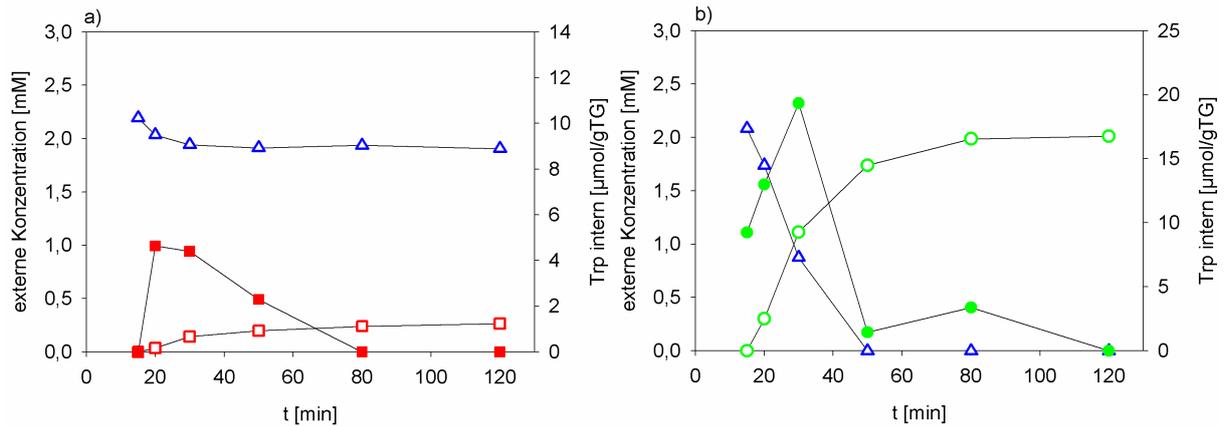


Abbildung 3-4: Konzentration von Ala-Tryptophan im Medium (blaues Δ) und von Tryptophan in Cytoplasma (■, ●) und Medium (□, ○) in *E. coli* pKD4- Δ tnaAB nach Fütterung von 2 mM Ala-Trp ($t=15$ min). a) Vorkultivierung in 56/2-Minimalmedium (rote Symbole), b) Vorkultivierung in LB-Medium (grüne Symbole).

Wie aus Abbildung 3-4a hervorgeht wurde das Dipeptid bei Vorkultivierung in 56/2 nicht aufgenommen. Im gesamten Versuchszeitraum nahm dessen Konzentration lediglich um ca. 0,3 mM ab. Daraus folgte eine sehr geringe interne Akkumulation von maximal 4,5 $\mu\text{mol/gTG}$. Bei Vorkultivierung in LB (Abbildung 3-4b) war das Dipeptid 45 min nach seiner Zugabe bereits komplett verbraucht. Die interne Akkumulation erreichte 15 min nach Beginn der Fütterung einen maximalen Wert von 19 $\mu\text{mol/gTG}$ und fiel parallel mit dem Verbrauch des Dipeptids wieder auf null. Hieraus abgeleitet wurden die Vorkulturen für Dipeptidfütterungen in peptidhaltigem Medium (LB, bzw. 56/2 +1% CAA) angezogen.

3.1.3 Untersuchungen zur Energetik des Exports

Mit Hilfe des nun etablierten Protokolls der Dipeptidfütterung war es möglich, Untersuchungen zur Energetik des Exports anzustellen. Aus früheren Arbeiten an *C. glutamicum* war bekannt, dass der Tryptophan Export dort ein sekundär aktiver Prozess ist (MOHRBACH, 2006). Es wurde nun überprüft, ob dies im Fall von *E. coli* auch zutrifft. Dazu wurden Zellen einer Dipeptidfütterung unterzogen und 15 min nach Zugabe des Dipeptids der Entkoppler CCCP in einer Endkonzentration von 50 μM zugegeben.

Ergebnisse

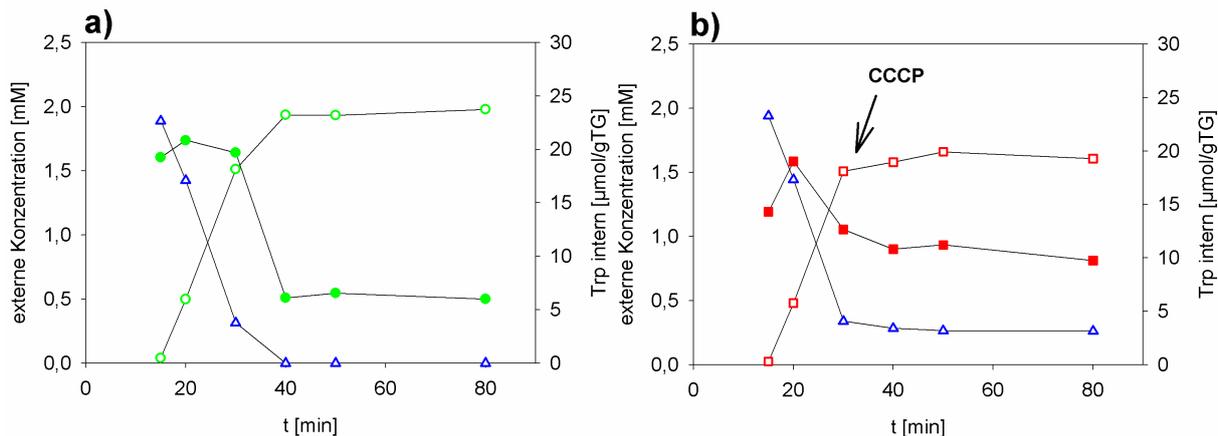


Abbildung 3-5: Konzentration von Ala-Trp im Medium (blaues Δ) und von Tryptophan in Cytoplasma (■, ●) und Medium (□, ○) in *E. coli* pKD4- Δ tnaAB nach Fütterung von 2 mM Ala-Trp ($t=15$ min). a) unbehandelter Referenzstamm (grüne Symbole), b) Zugabe von CCCP nach 30 min (rote Symbole).

Der in Abbildung 3-5a dargestellte Referenzstamm zeigte hierbei den normalen Verlauf der Dipeptidfütterung. Mit Aufbrauchen des Dipeptids sank die interne Tryptophanmenge auf ein minimales Niveau von ca. 5 $\mu\text{mol/gTG}$. Nach Zugabe von CCCP (Abbildung 3-5b) verblieb die interne Tryptophanmenge jedoch nahezu auf dem Stand, den sie zu diesem Zeitpunkt hatte (10 bis 12 $\mu\text{mol/gTG}$). Dies zeigte eindeutig, dass der Export von Tryptophan ein energieabhängiger, sekundär aktiver Prozess ist.

3.1.4 Analyse der Induktion des Exports

In vielen Fällen werden Aminosäureexporter von der Zelle nicht konstitutiv exprimiert. Ein so hohes Angebot an Tryptophan, dass es für die Zelle nötig wird, aufgenommene Überschüsse wieder zu exportieren ist eher ein seltener Zustand, so dass es für die Zelle nicht effizient wäre die dafür nötigen Exporter immer verfügbar zu haben. Eine öfter auftretende Situation ist ein Überschuss an Peptiden. Diese werden von der Zelle aufgenommen und in freie Aminosäuren gespalten. Dabei kann es zu dem von KRÄMER (1994) beschriebenen Effekt eines Überschussstoffwechsels kommen. Im Fall des Wachstums auf Peptiden würde dies bedeuten, dass einzelne Aminosäuren in der Zelle stark akkumulieren und somit exportiert werden müssten. Es ist bekannt, dass beispielsweise die Expression der Arginin- und Leucinexporter *argO* und *leuE* erst in Anwesenheit hoher Konzentrationen der entsprechenden Aminosäuren induziert wird ((NANDINERI *et al.*, 2004 und KUTUKOVA *et al.*, 2005). Durch Einsatz des Proteinbiosynthesehemmers Chloramphenicol (CAM) sollte die Expression des Tryptophanexporters unterdrückt werden, was dann zu einer deutlichen Verstärkung der internen Tryptophanakkumulation führen sollte. Kommt es in Anwesenheit

Ergebnisse

hoher, interner Tryptophankonzentrationen zur Induktion des Exports, so könnten die daran beteiligten Gene nachfolgend möglicherweise in DNA Microarrays durch den Vergleich der Expressionslevels unter induzierenden und unter Standardbedingungen identifiziert werden.

3.1.4.1 Untersuchung der Induktion des Tryptophanexports mit Hilfe von CAM

Um die mögliche Induktion des Tryptophanexports zu untersuchen wurde dem Ansatz der Dipeptidfütterung gleichzeitig mit Zugabe des Dipeptids 25 µg/ml CAM zugegeben.

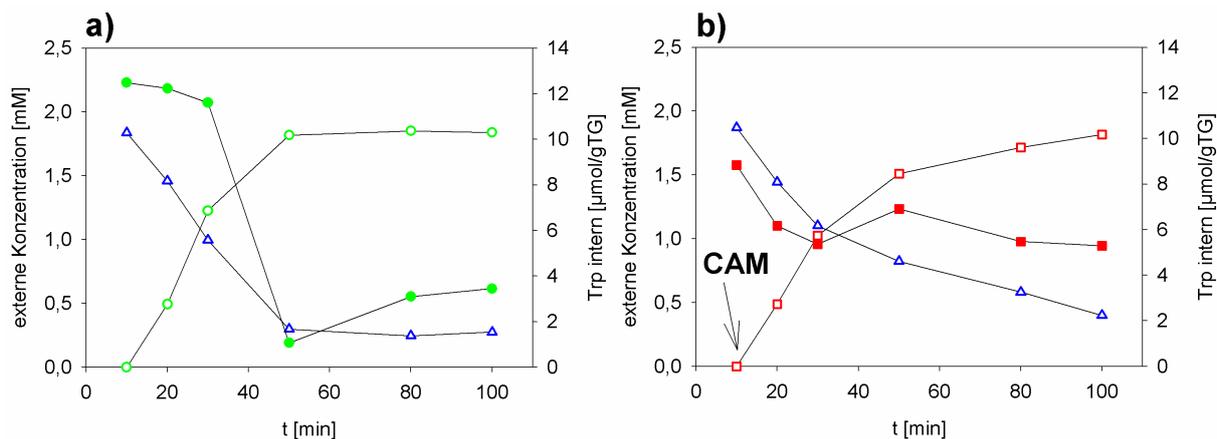


Abbildung 3-6: Konzentration von Ala-Trp im Medium (blaues \triangle) und von Tryptophan in Cytoplasma (■, ●) und Medium (□, ○) in *E. coli* pKD4- Δ tnaAB nach Fütterung von 2 mM Ala-Trp ($t=10$ min). a) unbehandelter Referenzstamm (grüne Symbole), b) Zugabe von CAM nach 10 min (rote Symbole).

Die Zugabe von CAM hatte in dem in Abbildung 3-6 gezeigten Versuch nicht den erwarteten Einfluss auf die interne Tryptophanakkumulation. Der erwartete Anstieg der internen Tryptophanmenge in Anwesenheit von CAM blieb aus. Während der Referenzstamm maximal 13 μ mol/gTG Tryptophan akkumulierte waren es in Anwesenheit von CAM nur ca. 9 μ mol/gTG. Es fiel gleichzeitig auf, dass die Aufnahme des Dipeptids in Anwesenheit von CAM deutlich langsamer geschah als in der Referenz. Das könnte eine Ursache der geringeren internen Tryptophanakkumulation gewesen sein. Die Exkretion von Tryptophan war gleichzeitig kaum beeinträchtigt. Dies könnte an der Induktion der Exkretionssysteme durch die Vorkultivierung in peptidreichem Medium liegen. Damit hätte der Zusatz von CAM während der Fütterung keinen Effekt mehr. Um dies untersuchen zu können, musste ein Testsystem entwickelt werden, in dem die Dipeptidfütterung ohne vorherige Inkubation der Zellen unter induzierenden Bedingungen möglich war.

3.1.4.2 Deletion von *gcvB* für die Dipeptidfütterung

Es ist bekannt, dass die kleine regulatorische RNA, die von *gcvB* codiert wird, die Expression von Di- und Oligopeptidaufnahmesystemen wie z.B. DppA und OppA kontrolliert. Die *gcvB*-

Ergebnisse

RNA bindet dazu wahrscheinlich an den Promoterregionen der entsprechenden Gene und blockiert deren Expression (PULVERMACHER *et al.* 2008). In Anwesenheit von Peptiden wird diese Repression aufgehoben, was zur effektiven Aufnahme von Peptiden durch die Zelle führt. Durch Deletion von *gcvB* nach DATSENKO *et al.* (2000) war es möglich, diesen Regulationsmechanismus auszuschalten.

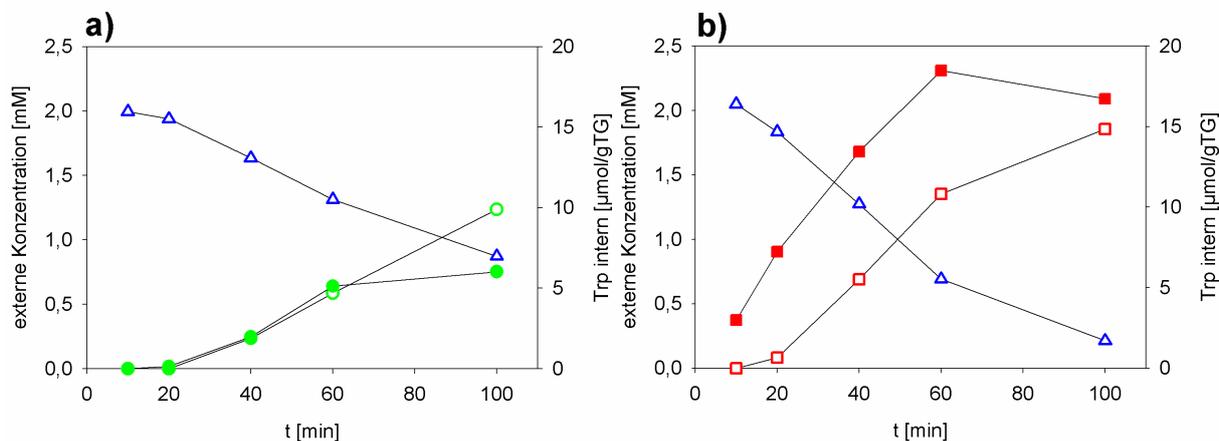


Abbildung 3-7: Konzentration von Ala-Trp im Medium (blaues \triangle) und von Tryptophan in Cytoplasma (\blacksquare, \bullet) und Medium (\square, \circ) in *E. coli* bei Vorinkubation in 56/2 Minimalmedium, nach Fütterung von 2 mM Ala-Trp (t=10 min). a) in *E. coli* pKD4- Δ tnaAB (grüne Symbole), b) in *E. coli* Δ tnaAB pKD4- Δ gcvB (rote Symbole).

Wurden der Referenzstamm *E. coli* pKD4- Δ tnaAB und der Stamm *E. coli* Δ tnaAB pKD4- Δ gcvB nun ohne vorherige Inkubation in peptidreichem Medium, also nur in 56/2, angezogen und in der Dipeptidfütterung getestet, so zeigte sich, dass im Referenzstamm keine ausreichende Aufnahme des Dipeptids möglich war (Abbildung 3-7a). Während des gesamten Versuchszeitraums nahm die Dipeptidkonzentration lediglich um 1 mM ab. Dementsprechend kam es nur zu einer geringen internen Akkumulation von Tryptophan (6 $\mu\text{mol/gTG}$). Im Δ gcvB-Hintergrund spielte die Vorinkubation keine Rolle. Wie in Abbildung 3-7b zu sehen ist wurde das Dipeptid im Versuchszeitraum komplett verbraucht und eine maximale interne Tryptophanakkumulation von ca. 18 $\mu\text{mol/gTG}$ erreicht.

Im Δ gcvB-Hintergrund sollte es somit möglich sein, die Induktion des Tryptophanexports ohne den störenden Einfluss, der Vorinkubation in peptidreichem Medium zu untersuchen. Dies wurde getan, indem der Testkultur 2 min vor Zugabe des Dipeptids CAM zugegeben wurde. Abbildung 3-8 zeigt das Ergebnis dieses Versuchs.

Ergebnisse

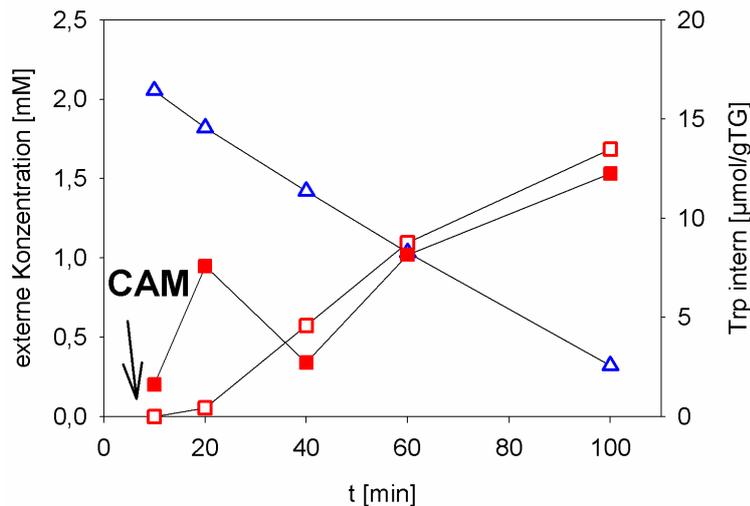


Abbildung 3-8: Konzentration von Ala-Trp im Medium (blaues Δ) und von Tryptophan in Cytoplasma (\blacksquare) und Medium (\square) in *E. coli* Δ atnaAB pKD4- Δ gcvB bei Vorinkubation in 56/2 Minimalmedium, Zugabe von CAM (t=8min) und nach Fütterung von 2 mM Ala-Trp (t=10 min).

Es konnte jedoch auch hier nicht die erwartete Steigerung der internen Tryptophanakkumulation nachgewiesen werden. Im Vergleich zu der in Abbildung 3-7b gezeigten Messung wurden bei Zusatz von CAM im Stamm *E. coli* pKD4- Δ gcvB intern sogar nur 12 μ mol/gTG Tryptophan akkumuliert (Abbildung 3-8). Dies zeigte, dass der Tryptophanexport nicht erst in Anwesenheit hoher Tryptophankonzentrationen induziert wurde. Ob der Exporter möglicherweise wie die Peptidaufnahmesysteme auch unter Kontrolle von *gcvB* steht konnte in diesem Ansatz nicht untersucht werden. Nachdem auch unter diesen Bedingungen keine Induktion des Exports nachgewiesen werden konnte, wurde eine Untersuchung der Genexpression in DNA Microarrays (siehe 3.1.4) nicht durchgeführt.

3.2 Biochemische Charakterisierung des Tryptophanexports in IMV

Mit Hilfe eines *in vitro* Assays sollte der Tryptophanexport biochemisch charakterisiert werden. Hierzu wurden invertierte Membranvesikel (IMV) aus *E. coli* hergestellt. In diesem System wäre der Exporter aufgrund der umgekehrten Orientierung der Membran zum Import von Tryptophan in die Vesikel fähig. Unter der Vorbedingung einer geeigneten Energetisierung der Membran wäre es dann möglich, die Aufnahme von Tryptophan zu messen und dabei biochemische Charakteristika wie Substrataffinität oder Kinetik zu bestimmen.

Da bereits nachgewiesen werden konnte, dass der Export von Tryptophan ein sekundär aktiver Prozess ist, war es nötig, zur Energetisierung der IMV einen Protonengradienten an

Ergebnisse

der Membran zu erzeugen. Hierzu wurden zwei Ansätze getestet. Zum einen die Energetisierung der in der Membran gebundenen Atmungskettenkomplexe, namentlich der Komplex I der NADH Dehydrogenase. In Anwesenheit von NADH sollten Protonen in die IMV gepumpt und so den nötigen Gradienten erzeugt werden. Als zweite Option der Energetisierung wurde die ebenfalls membrangebundene Lactatdehydrogenase getestet. Sie sollte in Anwesenheit von Lactat ebenfalls eine Akkumulation von Protonen im Lumen der IMV erlauben. Zum Nachweis der Protonenakkumulation wurde Acridin Orange benutzt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff ist im neutralen Milieu unprotoniert und damit membranpermeabel. In saurer Umgebung erfolgt die Protonierung, welche mit dem Verlust der Membranpermeabilität einhergeht. Sinkt der pH in den IMV durch Akkumulation von Protonen, so kommt es zur Akkumulation von AO in diesen. Die Akkumulation ist mit einem „Quenching“ der Fluoreszenz verbunden, welches dann im Fluorimeter verfolgt werden kann. Durch Zusatz von CCCP sollte es nach Aufbau eines Protonengradienten möglich sein, diesen wieder aufzulösen, was zur Wiederherstellung des Fluoreszenzsignals von AO führen sollte.

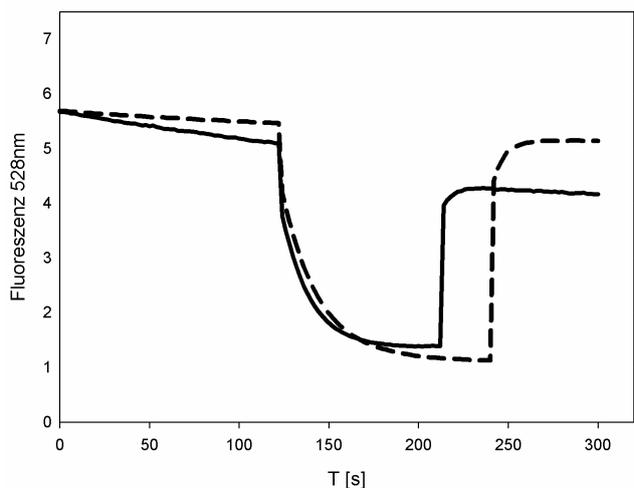


Abbildung 3-9: Fluoreszenzmessung von Acridinorange in IMV aus *E. coli* MG1655. Zugabe von 2,5 mM NADH (durchgehende Linie) bzw. 6 mM Lactat (gestrichelte Linie) nach 120 s und 30 μ M CCCP nach 210 s bzw. 240 s.

Die in Abbildung 3-9 dargestellten Versuche belegten, dass die Energetisierung der IMV sowohl durch NADH wie auch durch Lactat möglich war. Durch Zugabe der entsprechenden Substanz wurde das Fluoreszenzsignal auf etwa 20% seiner ursprünglichen Stärke vermindert. Die Auflösung des Protonengradienten durch CCCP führte zu einer sofortigen Rückbildung des Signals mit 70% bis 85% der ursprünglichen Signalstärke.

3.2.1 Indirekte Messung des Transports von Aminosäuren in IMV

Nun wurde getestet, ob die Zugabe verschiedener Aminosäuren zu energetisierten IMV ebenfalls zu einer Wiederherstellung des Fluoreszenzsignals führte. Ziel dieses Versuchs der Nachweis der Aktivität bekannter Aminosäureexporter, die laut Literatur sekundär aktiv sind und ihre Substrate im Antiport mit Protonen transportieren. Hierzu wurden die IMV mit je 5 mM der Aminosäuren Arginin, Cystein, Leucin und Threonin versetzt. Weiterhin wurde auch Tryptophan in diesem System getestet. Erwartet wurde, dass sich der Protonengradient im Zuge der Transportaktivität abbaut und dies durch die wieder ansteigende Signalstärke nachgewiesen werden kann.

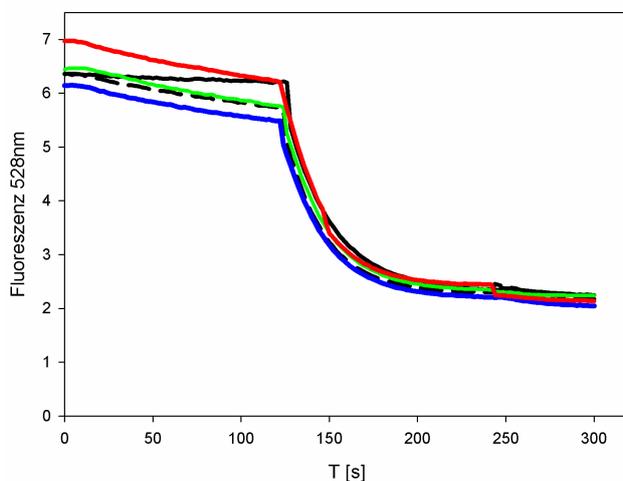


Abbildung 3-10: Fluoreszenzmessung von IMV aus *E. coli* MG1655 versetzt mit Acridinorange. Zugabe von 2,5 mM NADH nach 140 s und je 5 mM Arg (schwarze Linie), Cys (gestrichelte Linie), Leu (grüne Linie), Thr (blaue Linie) oder Tryptophan (rote Linie) nach 240 s

Aus Abbildung 3-10 geht jedoch hervor, dass dies in Anwesenheit von je 5 mM der genannten Aminosäuren nicht der Fall war. Als mögliche Ursache dieses Problems wurde vermutet, dass Import stattfand, jedoch zu keiner Änderung der Fluoreszenz führte, da parallel immer noch NADH umgesetzt wurde und der Protonengradient somit nicht messbar reduziert wurde. Dieses Problem sollte durch den Einsatz von Hemmstoffen der NADH-Dehydrogenase behoben werden können. Ein solcher Hemmstoff, Piericidin A, wurde freundlicherweise von Thorsten Friedrich von der Universität Freiburg bereitgestellt und im folgenden Versuch getestet.

Ergebnisse

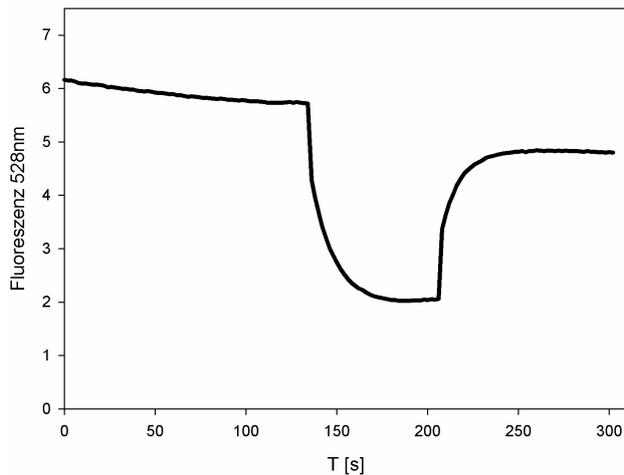


Abbildung 3-11: Fluoreszenzmessung von IMV aus *E. coli* MG1655 versetzt mit Acridinorange. Zugabe von 3 mM NADH nach 140 s und 20 μ M Piericidin A nach 210 s.

Die Abbildung 3-11 zeigt den Verlauf dieses Versuchs. Nach Zugabe von NADH kam es zu einem sofortigen Abfall des Signals, welcher auf den Aufbau eines Protonengradienten an der IMV-Membran schließen ließ. Nach Erreichen des maximalen Ausschlags (nach ca. 210 s) wurde Piericidin A mit einer Konzentration von 20 μ M zugegeben, was als ausreichend für eine 100%-ige Hemmung der Atmungskettenkomplexe angesehen wurde (pers. Mitteilung Thorsten Friedrich). Im Idealfall sollte das Signal nun so lange auf dem gleichen Level bleiben, bis der Gradient bei Zugabe von Aminosäuren zu deren Transport verbraucht werden sollte. Dies ist jedoch nicht der Fall gewesen. Bei Zusatz des Hemmstoffs löste sich der Protonengradient sofort und nahezu vollständig auf. Die Protonen schienen bei Inaktivierung der Dehydrogenase wieder aus den Vesikeln auszuströmen.

Da es so nicht möglich war, den Protonengradienten zur Untersuchung des Aminosäuretransports zu benutzen, wurde ein alternativer Ansatz gewählt. Inkubierte man IMV mit NADH über einen längeren Zeitraum, so begann das Fluoreszenzsignal nach Erreichen seines maximalen Ausschlags bald wieder leicht anzusteigen (Abbildung 3-12a). Dies wurde damit erklärt, dass mit zunehmendem Verbrauch des NADH der diffusionsbedingte Ausstrom von Protonen deren aktiven Import durch noch vorhandenes NADH langsam überwiegt.

Ergebnisse

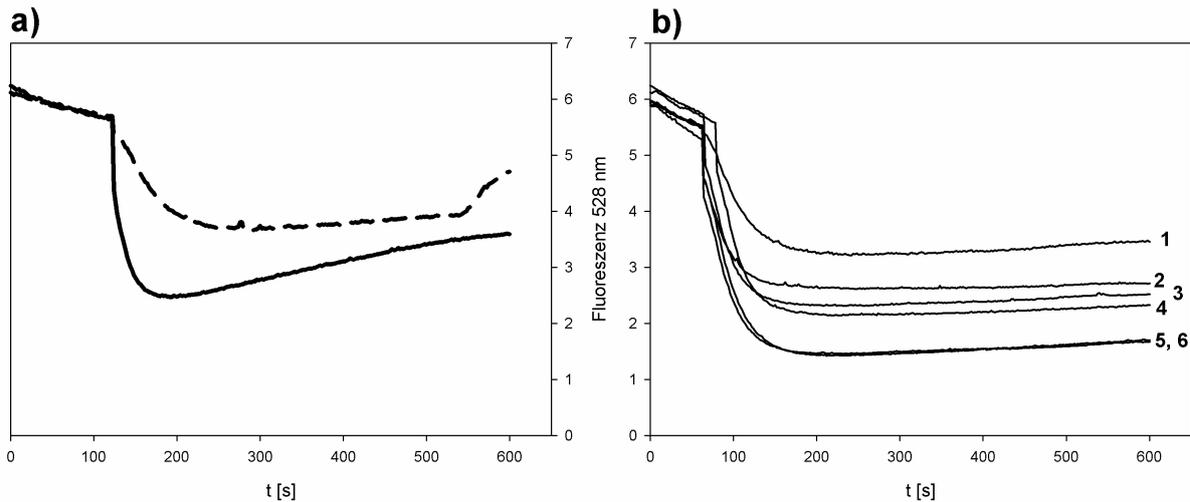


Abbildung 3-12: Fluoreszenzmessung von IMV aus *E. coli* MG1655 versetzt mit Acridinorange; a) Zugabe von NADH nach 120 s in Messpuffer ohne Aminosäurezusatz (durchgehende Linie) und mit Zusatz von Arg, Leu, Val, Ile, Cys, Met (je 50 mM) und Tryptophan (25 mM) (gestrichelte Linie); b) Zugabe von NADH nach 90 s, Messung mit je 50 mM der folgenden AS im Puffer: 1) Tryptophan, 2) Val, 3) Leu, 4) Ile, 5) Thr, 6) Met.

Führte man diesen Versuch in einem Puffer durch, der eine Aminosäuremischung durch (Abbildung 3-12a), so beobachtete man, dass der Abfall der Signalstärke deutlich langsamer und schwächer ausfiel. Möglicherweise wurde in diesem Ansatz nach Zusatz des NADH der Protonengradient parallel zu seiner Ausbildung direkt zum Import von Aminosäuren genutzt und war deswegen schwächer als in Abwesenheit von Aminosäuren.

Im Folgenden sollte festgestellt werden, ob einzelne Aminosäuren mehr oder weniger gut transportiert wurden, indem 50 mM Lösungen der einzelnen AS in Messpuffer hergestellt und im gleichen Versuchsaufbau getestet wurden. Wie Abbildung 3-12b zeigt, schienen Threonin und Methionin keinen Einfluss auf die Ausbildung des Protonengradienten zu haben (Abbildung 3-12b, 5 & 6), während dieser in Anwesenheit von Tryptophan (Abbildung 3-12b, 1) am schwächsten ausgebildet wurde. Dies würde bedeuten, dass Methionin nicht oder nur sehr schlecht transportiert wurde. Tryptophan sollte dementsprechend gut transportiert werden, da der Abfall der Signalstärke in seiner Anwesenheit nur gering war.

Zur Prüfung dieser Theorie wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem zunächst eine Energetisierung der IMV in Methionin-haltigem Puffer durchgeführt wurde. Die anschließende Zugabe von Tryptophan sollte dazu führen, dass der Protonengradient zu dessen Transport genutzt und das Fluoreszenzsignal bis auf Höhe des Signals für Tryptophan ansteigen und würde.

Ergebnisse

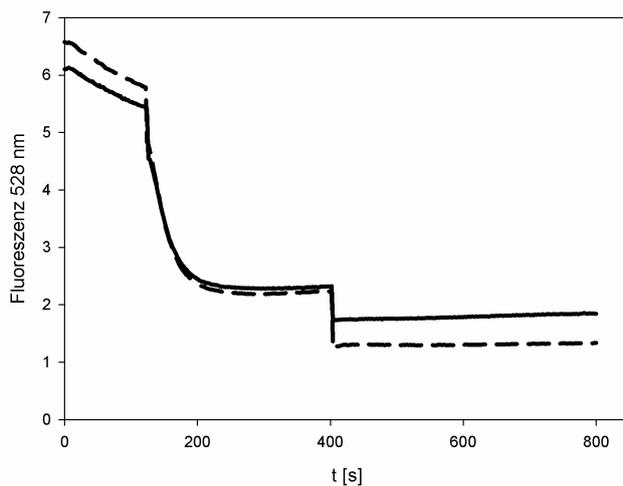


Abbildung 3-13: Fluoreszenzmessung von IMV aus *E. coli* MG1655 versetzt mit Acridinorange. Zusatz von NADH nach 120 s. Zusatz von $\frac{1}{4}$ Volumen Puffer mit 50 μ M Met nach 400 s (durchgehende Linie), bzw. Puffer mit 25 μ M Tryptophan (gestrichelte Linie).

Aus Abbildung 3-13 geht hervor, dass dies nicht möglich war. Bei Zugabe von Met-haltigem Puffer kam es zu einer Verschiebung des Fluoreszenzsignals durch die Verdünnung. Benutzt man Tryptophan-haltigen Puffer, so kam es auch nur zur Verschiebung des Signals durch die Verdünnung der IMV-Konzentration, nicht jedoch zu einem Ansteigen des Signals durch Verbrauch des Protonengradienten. Eine indirekte Messung von Transportprozessen über die Membran anhand des Quenchings von AO war somit nicht möglich. Alternativ wurde versucht, eine direkte Messung durch die Akkumulation radioaktiv markierter Aminosäuren in IMV zu etablieren.

3.2.2 Direkte Messung des AS-Transports in IMV

Da die indirekte Messung des Transports im Fluorimeter über den Aufbau eines Protonengradienten und das Quenching von Acridinorange keine verwertbaren Ergebnisse lieferte wurde versucht, eine direkte Messung zu etablieren. Dazu bot sich an, die Akkumulation radioaktiv markierter Aminosäuren in energetisierten IMV zu verfolgen. Es musste dafür ein modifiziertes Protokoll der Messung erarbeitet werden.

Durch FrenchPress-Behandlung hergestellte IMV liegen zwar laut ALTENDORF *et al.* (1974) zu 60 – 80% in Inside-out Orientierung vor, sind allerdings auch sehr klein (40 – 110 nm Durchmesser). Dies führt, wie LANCASTER *et al.* (1977) zeigen konnten, dazu, dass ein Großteil der Vesikel nicht von den zur Messung benutzten Nitrocellulosefiltern mit einer Porengröße von 0,22 μ m gesammelt werden konnte. Das Problem des mangelhaften Rückhalts der IMV im Filter konnte gelöst werden, indem die Messproben zunächst mit

Ergebnisse

einem Stop-Puffer, der 1 mM CaCl_2 enthielt, gemischt wurden. Dies sollte zur Aggregation der IMV und somit zu einem ausreichenden Rückhalt auf den Filtern führen.

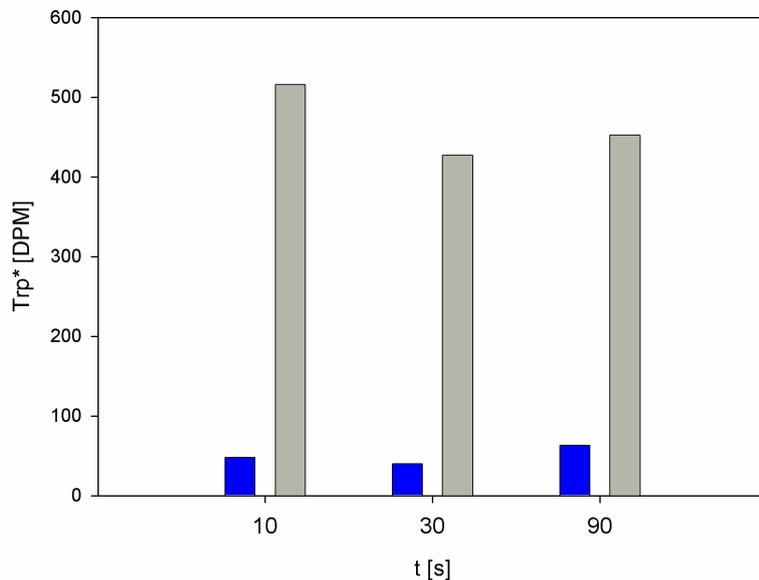


Abbildung 3-14: Akkumulation von radioaktiv markiertem Tryptophan (Trp^* [DPM]) in IMV ohne CaCl_2 -Behandlung (blaue Balken) und mit $0,1 \text{ mM CaCl}_2$ im Stoppuffer (graue Balken).

Ein Vergleich der Messungen nach den beiden Protokollen (Abbildung 3-14) zeigt, dass die gemessene Radioaktivität um den Faktor 6 bis 10 gesteigert werden konnte. Die eingesetzten Konzentrationen an IMV und radioaktiv markiertem Tryptophan waren in den Ansätzen mit und ohne Zusatz von CaCl_2 vergleichbar. Aus Abbildung 3-14 geht allerdings auch hervor, dass immer noch keine Aufnahme von Tryptophan in IMV messbar war. Als Ursache dieser Probleme wurde angenommen, dass das interne Volumen der IMV so gering war, dass eine Aufnahme radioaktiv markierter Aminosäuren evtl. nicht messbar war.

Abhilfe sollte die Vergrößerung des IMV-Volumens durch Membranfusion mittels Freeze-and-Thaw Behandlung schaffen. Durch wiederholte Zyklen aus Einfrieren in flüssigem Stickstoff und langsamem Auftauen bei Raumtemperatur sollte eine Fusion der Membranen und damit die Entstehung größerer Vesikel erreicht werden. Da die entstandenen Fusionsvesikel nicht einheitlich groß waren und sich möglicherweise auch multilamellare Vesikel bildeten, mussten die Fusionsvesikel anschließend durch Extrudieren durch einen Filter (Porengröße 400 nm) unilamellar und einheitlich groß gemacht werden (pers. Mitteilung S. Nicklisch). Ein fluorimetrischer Test der Energetisierbarkeit der Fusions-IMV zeigte, dass diese nach Zusatz von 3 mM Lactat unvermindert möglich war, genau wie die Deenergetisierung durch CCCP (Abbildung 3-15).

Ergebnisse

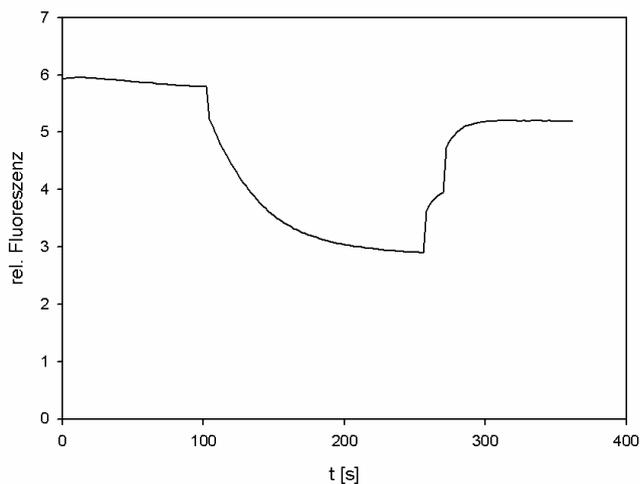


Abbildung 3-15: Fluoreszenzmessung von 0,05 mg Fusions-IMV aus *E. coli* MG1655 versetzt mit Acridinorange; Zusatz von 3 mM Lactat nach 120 s und 20 mM CCCP nach 260 s.

Die Fusions-IMV wurden danach für eine radioaktive Aufnahmemessung eingesetzt. Getestet wurde die Aufnahme von Isoleucin, Lysin, Methionin, Prolin und Tryptophan. Es konnte dabei für keine der getesteten Aminosäuren eine signifikante und reproduzierbare Akkumulation in den IMV nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Somit war die direkte Messung des Aminosäuretransports in IMV nicht erfolgreich.

3.3 Ungerichtete Mutagenese zur Identifikation von Tryptophanexportern

Im Folgenden soll dargestellt werden, welche Schritte zur Identifikation des Tryptophanexporters unternommen wurden. Hierbei wurden ein ungerichteter Ansatz und ein gerichteter Ansatz der Mutagenese parallel verfolgt.

3.3.1 Selektion von *E. coli* zur Identifikation von Exportphänotypen

Bei der ungerichteten Mutagenese wurde eine Selektion von *E. coli* mit Hilfe eines toxischen Tryptophananalogons durchgeführt. 5MTrp wird von der Zelle wie Tryptophan aufgenommen, wirkt jedoch bereits in geringen Konzentrationen toxisch. Dabei wirkt 5MTrp als Feedbackinhibitor der Tryptophansynthese (O'GARA *et al.*, 1995) und verursacht damit beim Wachstum in Minimalmedium einen Tryptophanmangel in der Zelle. Die Sensitivität von *E. coli* für 5MTrp wurde zunächst durch einen Wachstumstest in Mikrotiterplatten bestimmt.

Ergebnisse

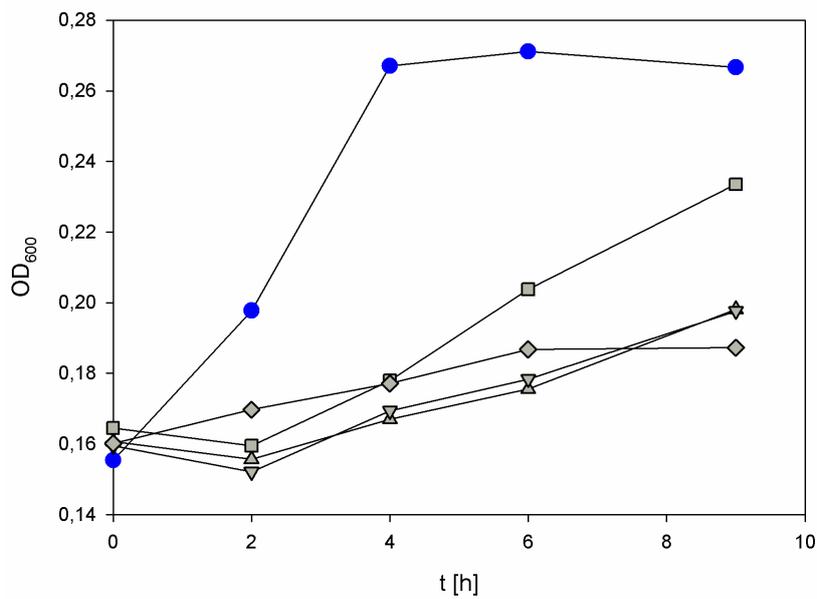


Abbildung 3-16: Wachstum von *E. coli* MG1655 in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen 5MTrp. Blaue O: Referenzkultur in 56/2, graue Symbole: Kulturen mit 5MTrp im Medium; Konzentrationen, □: 50 µM, △: 100 µM, ▽: 150 µM, ◇: 200 µM.

Wie aus Abbildung 3-16 hervorgeht, erreichte der Referenzstamm unter den gegebenen Bedingungen schon nach 4 h seine maximale OD_{600} von 0,27. Bereits in Anwesenheit von 50 µM 5MTrp war das Wachstum von *E. coli* deutlich eingeschränkt. Dieser Effekt trat bei höheren Konzentrationen noch stärker zutage. Es wurde daraufhin eine Konzentration von 30 bis 50 µM als MIC von 5MTrp für *E. coli* festgelegt.

Es sollte nun nachgewiesen werden, dass 5MTrp nicht passiv in die Zelle diffundierte, sondern aktiv über Tryptophanimporter ausgenommen werden musste. Dazu wurde das Wachstum einer Referenzkultur ohne 5MTrp mit dem zweier Testansätze vergleichen. Einem Ansatz, dem eine inhibitorisch wirksame 5MTrp-Konzentration von 100 µM zugegeben war und einem, in dem zusätzlich ein zehnfacher Überschuss Tryptophan enthalten war.

Ergebnisse

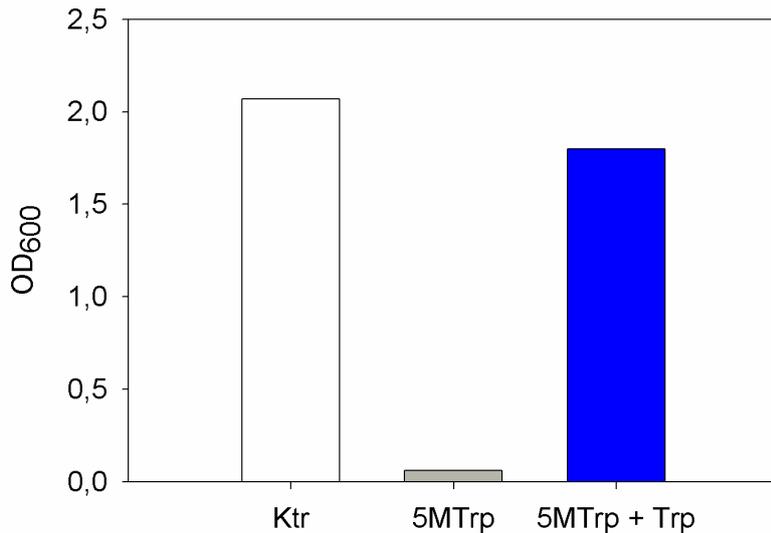


Abbildung 3-17: OD₆₀₀ von *E. coli* MG1655 nach 24 h Inkubation ohne 5MTrp (weißer Balken, Ktr), in Anwesenheit von 100 µM 5MTrp (grauer Balken, 5MTrp) und in Anwesenheit von 100 µM 5MTrp und 1 mM Tryptophan (blauer Balken, 5MTrp + Tryptophan).

Vergleicht man die in Abbildung 3-17 nebeneinander gestellten Werte der OD₆₀₀ nach 24 h Inkubation, so sieht man, dass es in Anwesenheit von 5MTrp zu keinem Wachstum kam. War der Kultur jedoch zusätzlich ein Überschuss Tryptophan zugesetzt, so wuchs diese ähnlich gut wie die Referenzkultur ohne 5MTrp-Zusatz. Dies wies darauf hin, dass 5MTrp mit Tryptophan um die gleichen Importer konkurrierte, oder dass eine hohe interne Tryptophankonzentration das 5MTrp verdrängen könnte.

Nun konnte die Selektion von 5MTrp resistenten Klonen in Mikrotiterplatten durchgeführt werden. Hierzu wurde 56/2-Agar mit Zusatz von 200 µM 5MTrp in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gegeben. Jede Vertiefung wurde nun mit einer stark verdünnten Zellsuspension beimpft. Nach einer bestimmten Inkubationszeit sollte es dann möglich sein, einzelne Kolonien zu isolieren. Diese Kolonien wurden auf frische Platten mit 200 µM 5MTrp überimpft, um ihre Resistenz zu verifizieren. Damit war es möglich, 6 Klone zu isolieren, die spontan eine Resistenz gegen 5MTrp entwickelt hatten. Die Selektionierung auf 5MTrp-Resistenz war also möglich.

Da 5MTrp mit Tryptophan möglicherweise um die Aufnahme in die Zelle konkurriert, musste getestet werden, ob die Resistenz der isolierten Klone auf der Inaktivierung des Tryptophanimports beruhte. Dies geschah, indem die Klone parallel in 56/2 und 56/2, dessen N-Quelle durch Tryptophan substituiert worden war, kultiviert wurden. Es zeigte sich dabei für keinen der Klone ein schlechteres Wachstum als in der Referenzansatz. Das hieß, dass die Inaktivierung des Tryptophanimports nicht die Ursache der Resistenz war. Somit kamen

Ergebnisse

prinzipiell zwei mögliche Ursachen der Resistenz in Frage. Zum einen eine spontane Mutation in Genen des Tryptophanstoffwechsels, was dazu führen könnte, dass die entsprechenden Enzyme nicht mehr durch 5MTrp gehemmt werden konnten. Zum anderen hätte eine Mutation den Export von Tryptophan und damit auch 5MTrp betreffen können. Um die Gene identifizieren zu können, die eine Resistenz gegen 5MTrp bewirken können sollten Genbanken aus *E. coli* zum Einsatz kommen. Freundlicherweise wurden vom Kooperationspartner dieser Doktorarbeit, der Evonik Degussa GmbH, zwei Genbanken aus *E. coli* zur Verfügung gestellt, so dass diese direkt benutzt werden konnten.

3.3.2 Selektion auf Resistenz gegen 5MTrp mit Hilfe von *E. coli* Genbanken

Die von der Evonik Degussa GmbH zur Verfügung gestellten Genbanken lagen in den Vektoren pBR322 und pMW218 vor und waren von NOVAK (2005) hergestellt worden. Sie sollten nun auf die Verleihung von Resistenz gegen 5MTrp untersucht werden, um anschließend die Identifikation der dafür verantwortlichen Gene zu erlauben. Zunächst war es nötig, die Transformationseffizienz der beiden Genbanken zu bestimmen.

Da die durchschnittliche Insertgröße mit 4000 bp angegeben war und das Genom von *E. coli* etwa $4,64 \cdot 10^6$ bp umfasst, waren rein rechnerisch ca. 10600 Klone notwendig, um zu gewährleisten, dass mit 99%iger Wahrscheinlichkeit jedes Gen abgedeckt wurde. Hierzu wurden chemisch kompetente *E. coli* DH5 α Zellen mit je einer der beiden Genbanken transformiert. Durch Ausstreichen verschiedener Verdünnungen war es möglich, die Anzahl transformierter Zellen zu bestimmen. Parallel wurde die Rückgewinnung der *lacZ*-Genfunktion in DH5 α als Maß für die Abdeckung eines bestimmten Gens in den Genbanken überprüft.

Abbildung 3-18 fasst die Ergebnisse dieser Untersuchung zusammen. So wurden bei Transformation der pBR322 Genbank ca. 16000 Klone pro Ansatz transformiert, bei der pMW218 Genbank immerhin noch ca. 10000 (Abb.3-18a). Damit wurde gezeigt, dass beide Genbanken mehr als genug Klone zur Abdeckung des gesamten Genoms lieferten. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Genbank in pBR322 das als Beispiel gewählte *lacZ* Gen ca. 80-mal pro Transformationsansatz enthielt, in pMW218 war das Gen knapp 30-mal pro Transformationsansatz vertreten (Abbildung 3-18b).

Ergebnisse

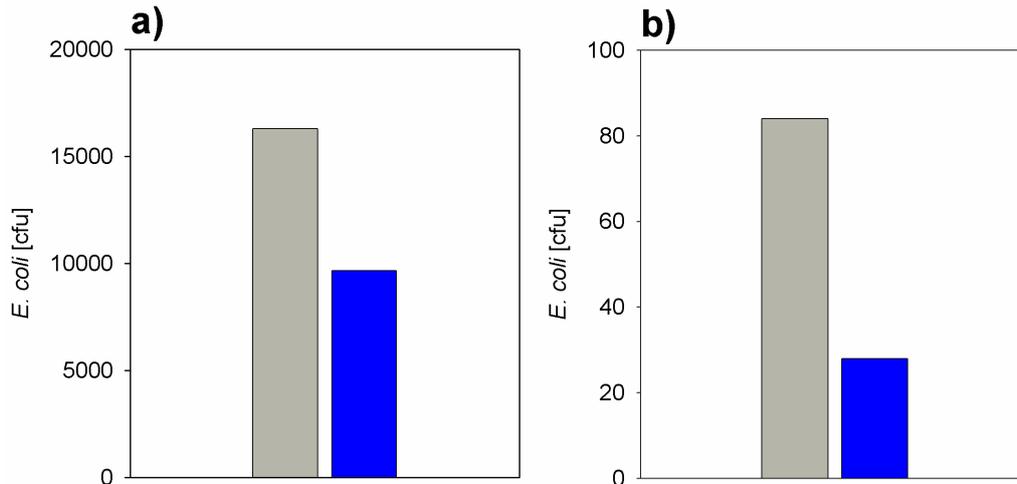


Abbildung 3-18: Transformationseffizienz von *E. coli* Genbanken in pBR322 (graue Balken) und pMW218 (blaue Balken). a) Transformierte Zellen pro Transformationsansatz, b) Zellen mit wiederhergestellter *lacZ*-Genfunktion pro Transformationsansatz.

Die Genbanken waren also beide in der Lage, Zellen mit einer Genfunktion auszustatten, die diese vorher nicht besaßen. Dies war wichtig, denn die Verleihung einer Resistenz gegen 5MTrp sollte auf ebendiesem Mechanismus beruhen.

Nun erfolgte die Transformation von *E. coli* mit den Genbanken und sie Selektion auf 5MTrp. Da die inhibitorisch wirksame Konzentration für 5MTrp mit 20 bis 50 μM bestimmt wurde, wurde für die Selektion der Genbank eine Konzentration von 300 μM gewählt um einen ausreichend hohen Selektionsdruck zu gewährleisten. In einer zweiten Selektionsrunde wurden die nach der Transformation erhaltenen Einzelkolonien auf Platten, die 500 μM 5MTrp enthielten, überimpft. So konnten für die pBR322 Genbank 10 Klone isoliert werden, für pMW218 waren es 6 Klone. Es wurden Plasmidpräparationen durchgeführt und die erhaltenen Plasmide durch einen Restriktionsverdau analysiert.

3.3.3 Restriktionsanalyse & Sequenzierung 5MTrp-resistenter Klone

Für die Restriktionsanalyse der Genbankplasmide wurden diese je vor und hinter der Insertionschnittstelle geschnitten. Dies sollte prinzipiell zu zwei Fragmenten führen. Einem plasmidspezifischen Fragment und einem Fragment, welches das Insert enthielt. Sollten sich im Insert Schnittstellen für die benutzten Enzyme finden, so sollte man mehr Fragmente erhalten. Damit war die Bestimmung der Größe des Inserts möglich.

Ergebnisse

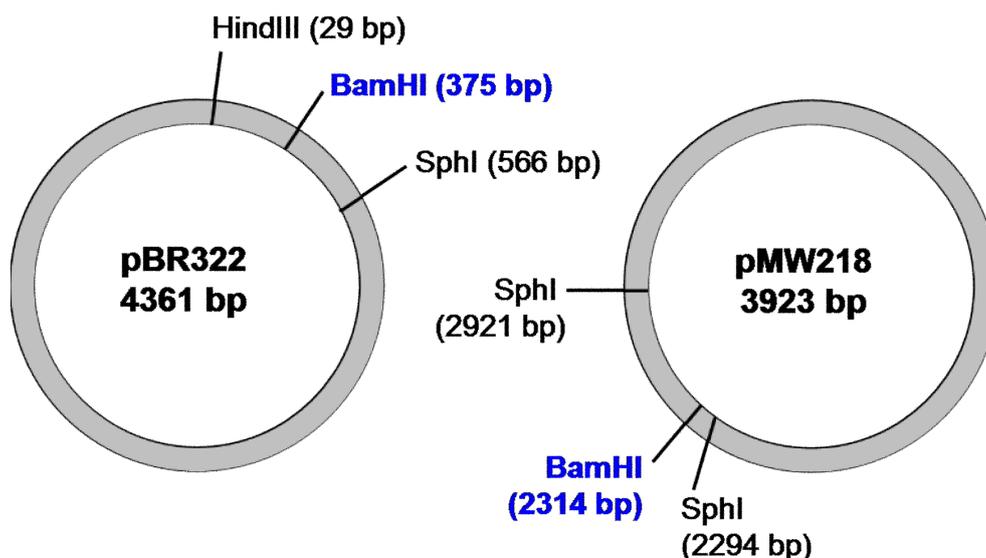


Abbildung 3-19: Plasmidkarten von pBR322 und pMW218. Dargestellt sind die Schnittstellen für die Enzyme BamHI, HindIII und SphI einschließlich ihrer Positionen im Plasmid. In die BamHI-Schnittstelle wurde jeweils das genomische Insert kloniert. Abbildungen modifiziert nach NOWAK (2006).

Abbildung 3-19 illustriert die beiden Plasmide und die Schnittstellen der benutzten Enzyme. Dabei wurde das Insert jeweils über eine BamHI-Schnittstelle in den Vektor gebracht. Beim Leervektor pBR322 führt die Restriktion mit HindIII und SphI zu Fragmenten der Länge 3824 bp und 537 bp. Bei pMW218 führt die Restriktion mit SphI zu Fragmenten der Größen 3296 bp und 627 bp. Die Insertion des Genomfragments erfolgte jeweils in die BamHI-Schnittstelle der Vektoren. Somit konnte die Größe des Inserts anhand der Größen der Restriktionsprodukte berechnet werden. Nach Restriktion der präparierten Genbankplasmide wurde je die gleiche Menge des ungeschnittenen Plasmids in dem nachfolgend gezeigten Agarosegelen als Kontrolle benutzt. Abbildung 3-20 zeigt die Restriktionsanalyse der Genbankplasmide in pBR322,

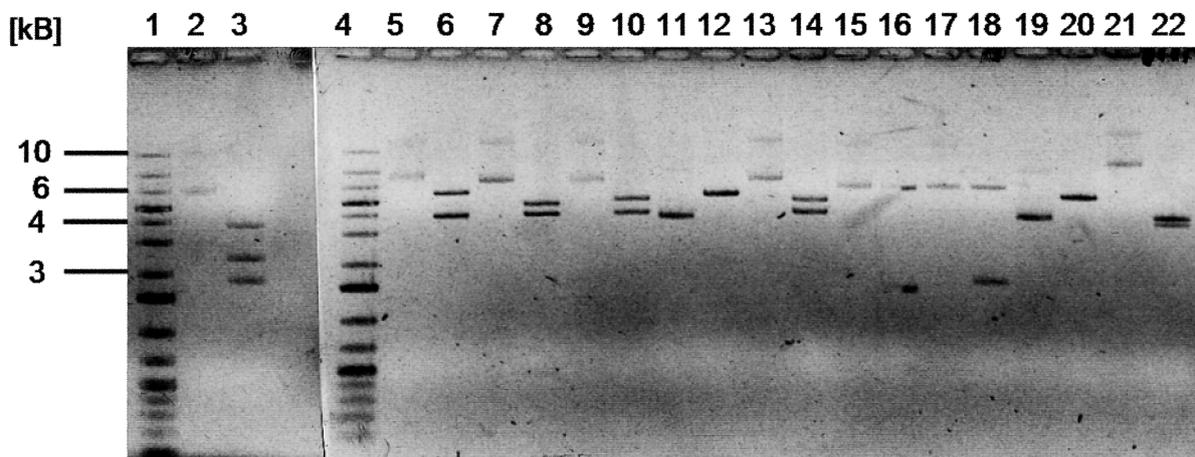


Abbildung 3-20: Agarosegel mit Produkten der Restriktionsanalyse der Genbank in pBR322. Belegung der Slots siehe Tabelle 3-1. Größenmarker: Fermentas 1 kb Ladder PLUS, ausgewählte Größen markiert.

Ergebnisse

Tabelle 3-1: Restriktionsanalyse der Genbank-Plasmide in pBR322; Slot Nr. bezogen auf das in **Abbildung 3-20** gezeigte Agarosegel. Plasmid: aufgetragene Plasmidpräparation, unverdaut, bzw. mit SphI und HindIII verdaut (S/H); Insertgröße: Berechnete Größe des Inserts. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Slot Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
Plasmid	M	4	4 S/H	M	9	9 S/H	10	10 S/H	20	20 S/H	21	21 S/H	22	22 S/H	23	23 S/H	32	32 S/H	41	41 S/H	46	46 S/H	
Insert [kb]	-	-	3,8	-	-	6,5	-	4,5	-	5	-	-	-	4,5	-	-	-	-	-	-	-	-	4

In **Abbildung 3-21** ist die Restriktionsanalyse der Plasmide der Genbank in pMW218 dargestellt.

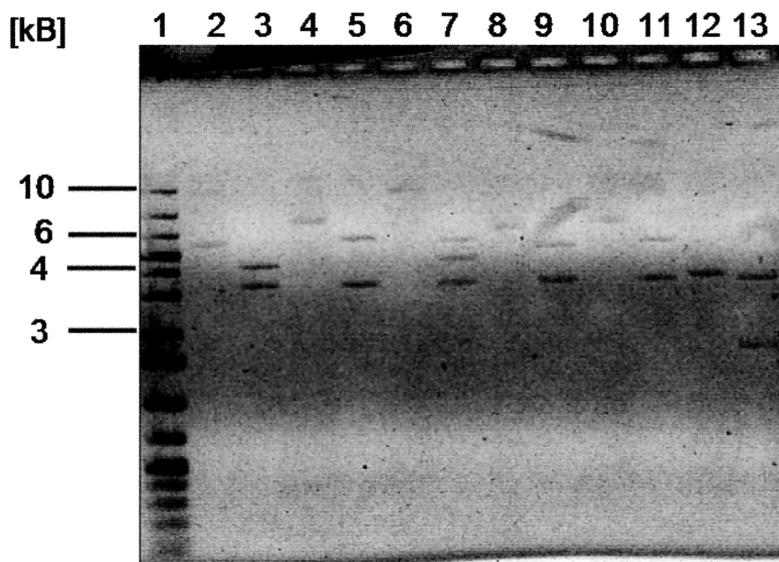


Abbildung 3-21: Agarosegel mit Produkten der Restriktionsanalyse der Genbank in pMW218. Belegung der Slots siehe **Tabelle 3-2**. Größenmarker: Fermentas 1 kb Ladder PLUS, ausgewählte Größen markiert.

Tabelle 3-2: Restriktionsanalyse der Genbank-Plasmide in pBR322; Slot Nr. bezogen auf das in **Abbildung 3-21** gezeigte Agarosegel. Plasmid: aufgetragene Plasmidpräparation, unverdaut, bzw. mit SphI verdaut (S); Insertgröße: Berechnete Größe des Inserts. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Slot Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Plasmid	M	1	1 S	10	10 S	15	15 S	19	19 S	21	21 S	24	24 S
Insert [kb]	-	-	3,4	-	5,4	-	9,9	-	4,4	-	4,4	-	1

Die Zeile „Insertgröße [kb]“ in **Tabelle 3-1** und **Tabelle 3-2** gibt die Größe des im jeweiligen Plasmid enthaltenen Inserts wieder. Plasmide, bei deren Verdau kein plasmidspezifisches Fragment nachgewiesen werden konnte wurden in der nun folgenden Sequenzierung der Inserts nicht berücksichtigt. Somit wurden die Inserts der Genbankplasmide pBR322 4, 9, 10, 20, 22 und 46, sowie pMW218 1, 10, 15, 19, 21 und 24 sequenziert.

Ergebnisse

Die erhaltenen Sequenzergebnisse wurden diese mit Hilfe des Programms „BLAST“ mit dem Genom von *E. coli* K-12 MG1655 verglichen. Da die Inserts meist deutlich größer als 1 kb waren, wurden jeweils Start- und Endpositionen der Sequenzierungen im Genom notiert und in Tabelle 3-3 alle Gene mit ihrer zugehörigen Annotation aufgelistet, die innerhalb dieses Bereichs vollständig vorlagen.

Tabelle 3-3: Sequenzierungsergebnisse der Plasmide der Genbanken in pBR322 und pMW218; Start- und Endposition Genom: annotierte Bindepotion der Sequenz im *E. coli* K-12 MG1655 Genom; Größe: Summe [bp] zwischen Start- und Endposition; komplette Gene in Sequenz: Gene, die von Start- bis Stop-Codon enthalten waren; annotierte Genfunktion: nach <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>

Plasmid	Startposition Genom	Endposition Genom	Größe [bp]	komplette Gene in Sequenz	annotierte Genfunktion
pBR322 4	2024268	2028531	4263	<i>hypothetical protein</i>	
				<i>hypothetical protein</i>	
				<i>yedI</i>	conserved inner membrane protein
				<i>yedA</i>	predicted inner membrane protein
pBR322 9	1782831	1788116	5285	<i>ydiA</i>	hypothetical protein
				<i>aroH</i>	DAHPh synthase, Tryptophan repressible
				<i>ydiE</i>	unknown, essential
pBR322 10	1783930	1788444	4514	<i>aroH</i>	DAHPh synthase, Tryptophan repressible
				<i>ydiE</i>	unknown, essential
pBR322 20	3299773	3304066	4293	<i>mtr</i>	Tryptophan transporter of high affinity
				<i>yhbV</i>	predicted protease
				<i>yhbW</i>	predicted enzyme
pBR322 22	1783929	1788116	4187	<i>ydiA</i>	hypothetical protein
				<i>aroH</i>	DAHPh synthase, Tryptophan repressible
				<i>ydiE</i>	unknown, essential
pBR322 46	2025126	2029496	4370	<i>yecl</i>	ferritin-like protein
				<i>hypothetical protein</i>	
				<i>hypothetical protein</i>	
				<i>yedI</i>	conserved inner membrane protein
				<i>yedA</i>	predicted inner membrane protein
				<i>vsr</i>	DNA mismatch endonuclease of very short patch repair
pMW218 1	622929	626538	3609	<i>entC</i>	isochorismate synthase
pMW218 10	1316324	1322004	5680	<i>trpC</i>	fused I3GP synthetase/ N-(5-phosphoribosyl)anthranilate isomerase
				<i>trpD</i>	fused GAT (component II) of anthranilate synthase/anthranilate phosphoribosyl transferase
				<i>trpE</i>	component I of anthranilate synthase
				<i>trpL</i>	Tryptophan operon leader peptide
pMW218 15	786114	1890591	1104477	-	

Ergebnisse

Plasmid	Startposition Genom	Endposition Genom	Größe [bp]	komplette Gene in Sequenz	annotierte Genfunktion
pMW218 19	1312641	1317251	4610	<i>yciE</i>	conserved protein
				<i>yciF</i>	conserved protein
				<i>yciG</i>	predicted protein
				<i>trpA</i>	tryptophan synthase, alpha subunit
				<i>trpB</i>	tryptophan synthase, beta subunit
pMW218 21	1792638	1797335	4697	<i>himA</i>	ihfA integration host factor (IHF), DNA-binding protein, alpha subunit
				<i>pheT</i>	Phe tRNA synthetase, beta subunit
				<i>pheS</i>	Phe tRNA synthetase, alpha subunit
pMW218 24	4571832	4572871	1039	Fragment <i>yjiU</i>	pseudo gene

Die Plasmide pMW218 15 und 24 wiesen kein verwertbares Ergebnis auf, da im Fall von pMW218 15 laut BLAST eine Insertgröße von ca. 100 kb bestimmt wurde. Dies stimmt jedoch nicht mit den Ergebnissen des Restriktionsverdaus überein und stellt wohl ein Artefakt der Klonierung dar. Denkbar wäre die Ligation von zwei entfernten Genomfragmenten bevor diese in das geschnittene Plasmid ligiert wurden. Für pMW218 24 wurde eine korrekte Sequenz bestimmt, diese umfasste allerdings kein einziges komplettes Gen, sondern lediglich ein Fragment des Gens *yjiU*, das jedoch kein Startcodon enthielt und somit zu keiner Expression eines Genprodukts führen konnte.

Die übrigen Ergebnisse waren jedoch eindeutig und teilweise redundant. Betrachtete man die in den Inserts vollständig enthaltenen Gene, so konnten im Fall von pMW218 in 4 von 6 Plasmiden (pMW218 1, 10, 19, 21) Gene gefunden werden, die für Enzyme zur Synthese von Tryptophan oder anderer aromatischer Verbindungen dienen. Im Einzelnen waren dies die Gencluster *trpLEDC*, *trpAB* und *pheTS*, sowie *entC*.

Dabei ist ein Einfluss der ersten beiden Gencluster gut nachvollziehbar, da sie an der Synthese von Tryptophan bzw. Zwischenprodukten der Tryptophansynthese beteiligt sind. *trpLEDC* (pMW218-10) codiert für die Enzyme, die den Einstieg in den Tryptophanspezifischen Teil der Synthese aromatischer Aminosäuren darstellen und die Synthese von der Fixierung von Chorismat mit L-Glutamin zu Anthranilat (ITO *et al.*, 1969) bis zur Bildung von Indol-3-Glycerinphosphat (CREIGHTON *et al.*, 1966) katalysieren.

Der *trpAB*-Cluster (pMW218-19) codiert für die beiden Untereinheiten der Tryptophansynthase, welche die Umwandlung von Indol-3-Glycerinphosphat zu Indol und dessen sofortige Fixierung zu Tryptophan unter Verbrauch von L-Serin katalysiert (PITTARD, 1996). Eine verstärkte Tryptophansynthese könnte dazu führen, dass trotz der starken,

Ergebnisse

inhibierenden Wirkung des 5MTrp genug Tryptophan synthetisiert wird, um der Zelle eine ausreichende Proteinbiosynthese für Wachstum und Teilung zu ermöglichen.

Im Fall von *pheTS* (pMW218-21) war eine solche Erklärung nicht möglich, da die von PheTS katalysierte Synthese der Phe-tRNA nicht direkt mit dem Tryptophanmetabolismus in Verbindung steht (IBBA *et al.* 2000). Ähnlich verhielt es sich mit *entC* (pMW218-1). Die von ihm codierte Isochorismatsynthase entzieht Chorismat der Synthese aromatischer Aminosäuren und führt dies durch die Umwandlung zu Isochorismat der Synthese von Enterobactin, einem starken Eisenchelator, zu (BUSS *et al.*, 2001).

Insgesamt waren die aus der pMW218 Genbank isolierten Plasmide im Hinblick auf eine Steigerung des Tryptophanexports nicht interessant, da keines der selektionierten Plasmide Gene eines Transporters trug.

Anders sah es bei den Plasmiden aus der pBR322 Genbank aus. Hier wurden auch in 3 Fällen ein Gen der Tryptophansynthese, nämlich *aroH*, identifiziert (pBR322-9, -10, -22). Die von ihm codierte DAHP-Synthase wird spezifisch von Tryptophan inhibiert, während die von *aroF* und *aroG* codierten Isoenzyme durch Tyrosin, respektive Phenylalanin inhibiert werden (RAY *et al.* 1988). Möglicherweise wurde die 5MTrp-Resistenz durch die Erhöhung der Kopienzahl von Genen der Tryptophansynthese bewirkt.

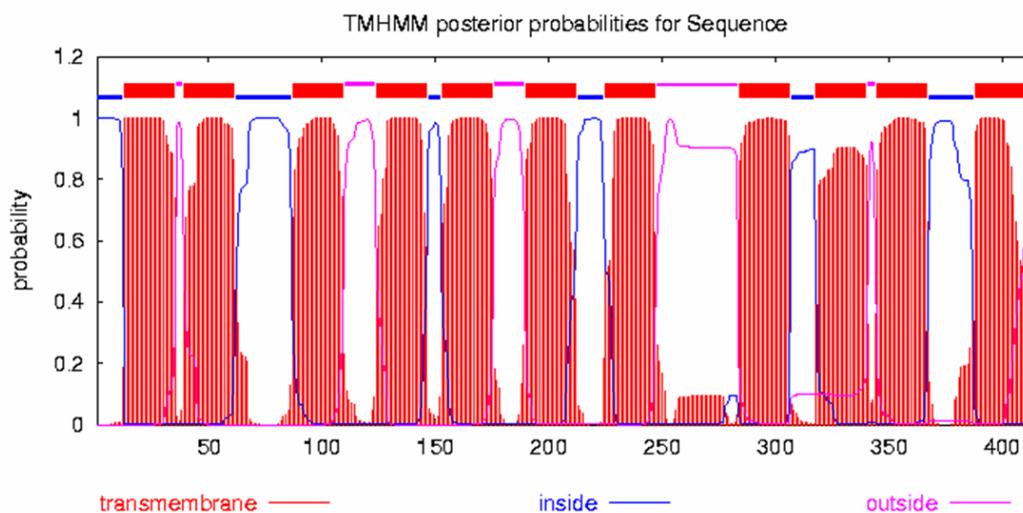


Abbildung 3-22: Vorhersage von Transmembrandomänen in Mtr durch www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/

Neben Genen des Synthesewegs wurden auch drei Plasmide isoliert, die Genabschnitte enthielten, die für Transporter codierten. pBR322-20 enthielt unter anderem das Gen *mtr*, welches für ein Tryptophan- und Indolauftnahmesystem hoher Affinität, aber geringer Kapazität codiert (BROWN, 1970). Mtr ist 414 Aminosäuren lang und hat ein Molekulargewicht von ca. 44 kDa. Es werden 11 Transmembrandomänen vorhergesagt,

Ergebnisse

wobei der N-Terminus des Proteins im Cytoplasma, der C-Terminus außerhalb der Zelle liegt (Abbildung 3-22).

Die Plasmide pBR322-4 und -46 enthielten beide ein Genomfragment, in welchem unter anderem *yedA* codiert war. Der laut www.membrantransport.org zur DMT Superfamilie gehörende sekundär aktive Transporter YedA ist 306 Aminosäuren lang und hat ein Molekulargewicht von ca. 32 kDa. Eine Vorhersage der Transmembrandomänen ergab 10 membrandurchspannende Regionen, wobei C- und N-Terminus des Proteins im Cytoplasma liegen (Abbildung 3-23).

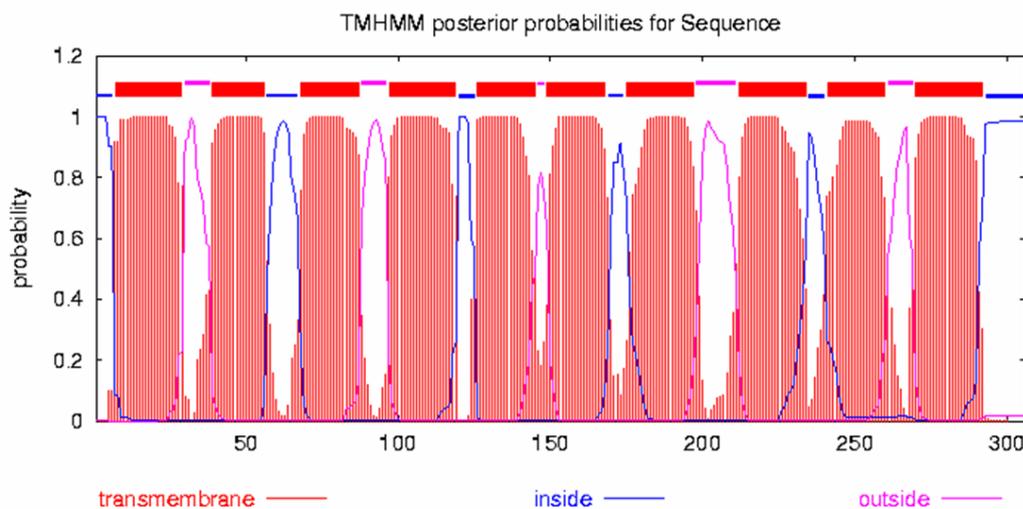


Abbildung 3-23: Vorhersage von Transmembrandomänen in YedA durch www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/

Laut LIVSHITS *et al.* (2007) kommt es bei Überexpression von YedA zu einer Steigerung der Ausbeute an aromatischen Aminosäuren in einem Produktionsstamm. Es wäre somit denkbar, dass YedA auch 5MTrp exportiert und so dessen toxische Wirkung auf die Zelle vermindern könnte.

Unmittelbar vor bzw. hinter *yedA* lagen in den Inserts die Gene *yedI* bzw. *vsr*. Das Gen *yedI* codiert für ein nicht näher beschriebenes, 305 Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von 32 kDa, für welches 5 bis 6 Transmembrandomänen vorhergesagt wurden. Allerdings liegt sein Leseraster entgegengesetzt zu dem von *yedA* im Genom, weswegen eine gemeinsame Expression nicht wahrscheinlich ist. Ebenfalls im entgegengesetzten Leseraster liegt *vsr*, welches für eine DNA *mismatch repair* Endonuclease codiert (HENNEKE *et al.*, 1991). Eine Funktion hinsichtlich der Verleihung einer Resistenz gegen 5MTrp ist hier ebenfalls unwahrscheinlich.

Mit der Analyse der Genbankplasmide waren zwei sehr wichtige Informationen für die weitere Verwendung der Plasmide gewonnen. Erstens konnte gezeigt werden, dass die Selektion der Genbanken in pMW218 und pBR322 zur Isolation von Genen führte, die in 8

von 12 Fällen direkt und spezifisch mit dem Stoffwechsel oder Transport von Tryptophan in Verbindung gebracht werden konnten. Zweitens konnten 3 Plasmide isoliert werden, in denen bekannte bzw. putative Tryptophantransporter codiert waren.

3.4 Gezielte Mutagenese zur Identifikation von Tryptophanexportern

Parallel zur ungerichteten Mutagenese mit Hilfe der *E. coli* Genbanken in pBR322 und pMW218 und deren Selektion auf 5MTrp Resistenz wurde eine gezielte Mutagenese zur Identifikation des Tryptophanexporters durchgeführt. Dazu wurden Exporter deletiert, die bekanntermaßen sekundär aktiv sind und deren Substratspektrum besonders lipophile Substanzen umfasst.

Ein Kandidat hierfür war beispielsweise AcrAB aus der Familie der RND-Transporter. Diese Transporter exkretieren typischerweise membrangebundene, lipophile Substanzen und könnten somit auch den Export von Tryptophan katalysieren. Auch der RND-Transporter AcrEF sollte untersucht werden, da er nachweislich eine wichtige Rolle im Export von Indol, dem Abbauprodukt von Tryptophan spielt (KAWAMURA-SATO *et al.*, 1999).

Da diese beiden Transporter in der Regel als Komplex zusammen mit TolC auftreten (FRALICK, 1996) und kürzlich die Beteiligung von TolC am Export von Cystein nachgewiesen wurde (WIRIYATHANAWUDHIWONG *et al.*, 2009), sollte auch dieses Gen deletiert werden.

Weiterhin sollte *emrE*, als Mitglied der Familie der SMR (Small Multidrug Resistance)-Transporter untersucht werden, denn die Substrate dieser sekundär aktiven Transporterklasse sind ebenfalls typischerweise lipophile Substanzen (PAULSEN *et al.*, 1996).

Schließlich soll auch *yhcPQ* (neue Nomenklatur: *aaeXAB*) deletiert werden. Die durch diesen Gencluster kodierte Effluxpumpe ist in *E. coli* für die Exkretion von aromatischen Carbonsäuren wie z.B. Benzoesäure zuständig (VAN DYK *et al.*, 2004) und könnte somit auch beim Export von Tryptophan eine Rolle spielen.

Außerdem wurde eine Deletion von *yddG* erstellt, da dies von DOROSHENKO *et al.* (2007) als Exporter aromatischer Aminosäuren beschrieben wurde.

Der letzte Kandidat für eine Deletion war *yedA*, welches beim Screening der *E. coli* Genbanken zwei Mal isoliert wurde und neben dem Tryptophan Importer *mtr* den einzigen in diesem Screening isolierten Transporter darstellte.

Zur Erstellung der Deletionen wurde die Technik nach DATSENKO *et al.* (2000) benutzt. Sie erfolgte im *AtnaAB* Hintergrund um die jeweiligen Stämme für Dipeptidfütterungen einsetzen zu können.

3.4.1 Test von Deletionsstämmen vermuteter Tryptophanexporter in der Dipeptidfütterung

Die Mutagenese der Kandidaten wurde mit einer PCR, nach dem in Abbildung 3-1 dargestellten Prinzip überprüft. Dabei war es jedoch nicht möglich, für *ΔacrAB* und *ΔacrEF* den Nachweis der Deletion zu erbringen. Da diese beiden Komplexe jedoch wie bereits erwähnt meist zusammen mit TolC ihre Funktion ausüben wurde angenommen, dass im Stamm *E. coli AtnaAB pKD4-ΔtolC* auch die Funktion von AcrAB und AcrEF unterbunden wäre. Für alle anderen Deletionsstämmen war der Nachweis der Rekombination des deletierten Gens durch die pKD4-Kassette möglich (Daten nicht gezeigt).

Die Deletionsstämmen *E. coli AtnaAB pKD4-ΔaaeXAB*, *-ΔemrE* und *-ΔtolC* wurden nun in der Dipeptidfütterung untersucht, wobei der Stamm *E. coli pKD4-AtnaAB* als Referenz diente. Die Ergebnisse dieser Messung sind in Abbildung 3-24 gezeigt. Die Aufnahme des Dipeptids und die damit korrelierende Exkretion von Tryptophan ins Medium verliefen in allen Stämmen in etwa gleich schnell. Weiterhin wurde in keinem der getesteten Stämme eine signifikant höhere interne Akkumulation von Tryptophan als im Referenzstamm erreicht. Die maximale Akkumulation betrug im Referenzstamm wie in den Mutanten etwa 20 bis 25 $\mu\text{mol/gTG}$. Zum Ende der Messung betrug sie im Referenzstamm 20 $\mu\text{mol/gTG}$, bei *E. coli AtnaAB pKD4-ΔemrE* 23 $\mu\text{mol/gTG}$ und bei *E. coli AtnaAB pKD4-ΔtolC* 13 $\mu\text{mol/gTG}$. Im Stamm *E. coli AtnaAB pKD4-ΔaaeXAB* wurde eine gegenüber dem Referenzstamm verringerte interne Akkumulation beobachtet. Allerdings konnte dieses Phänomen nicht reproduziert werden.

Ergebnisse

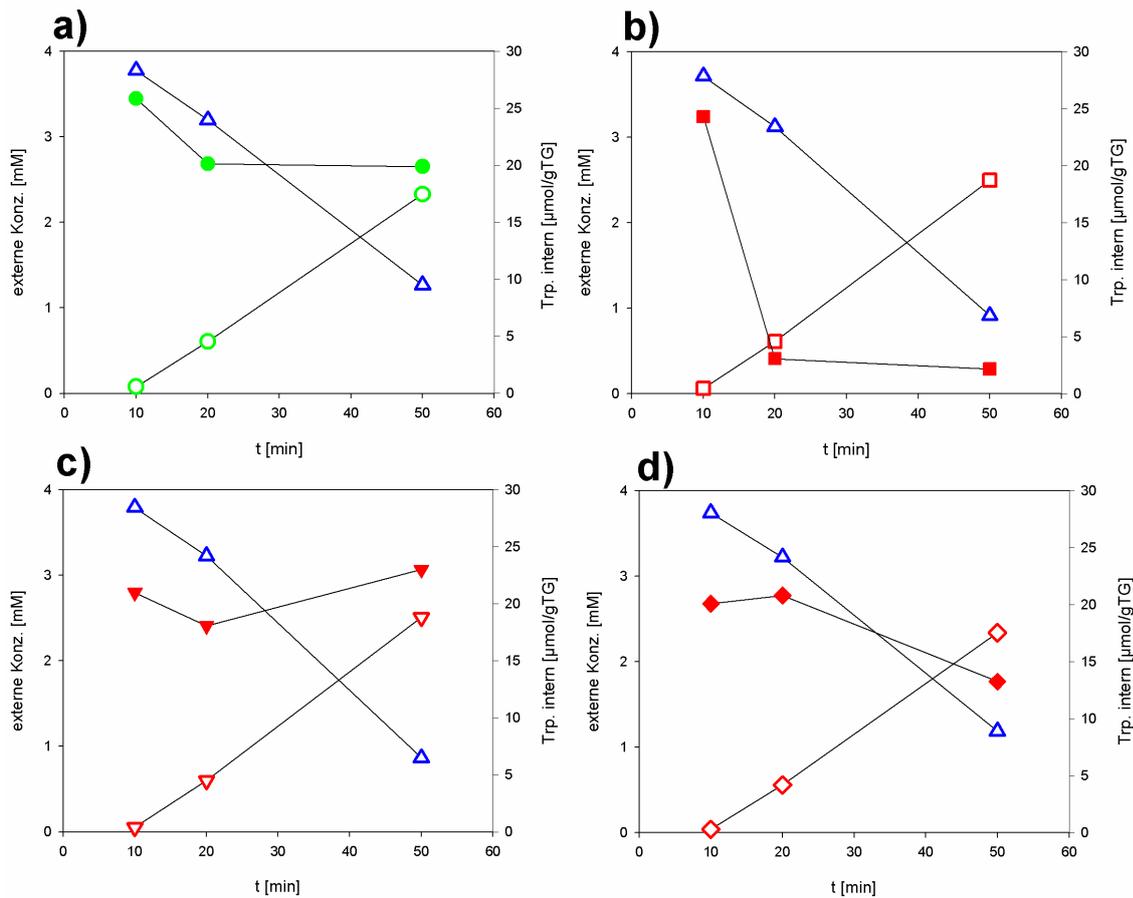


Abbildung 3-24: Konzentration von Ala-Trp im Medium (blaues \triangle) und von Tryptophan in Cytoplasma (geschlossene Symbole) und Medium (offene Symbole) in *E. coli* nach Zugabe von 4 mM Ala-Trp ($t = 10$ min). a) *E. coli tnaAB* (grüne \bullet, \circ), b) *E. coli tnaAB pKD4- aaeXAB* (rote \blacksquare, \square), c) *E. coli tnaAB pKD4- emrE* (rote $\blacktriangledown, \triangledown$) und d) *E. coli tnaAB pKD4- tolC* (rote \blacklozenge, \lozenge).

Die Deletionen von *yddG* und *yedA* wurden ebenfalls in Dipeptidfütterungen im Vergleich zum Referenzstamm *E. coli* $\Delta tnaAB$ getestet. Wie aus Abbildung 3-25 hervorgeht, zeigte sich hier ein ähnliches Bild wie beim Test der anderen Deletionsstämme. Die Aufnahme des Dipeptids und Exkretion von Tryptophan ins Medium verliefen in allen Ansätzen etwa gleich schnell. Es kam in keinem Fall zu einer signifikanten Steigerung der internen Tryptophanakkumulation.

Ergebnisse

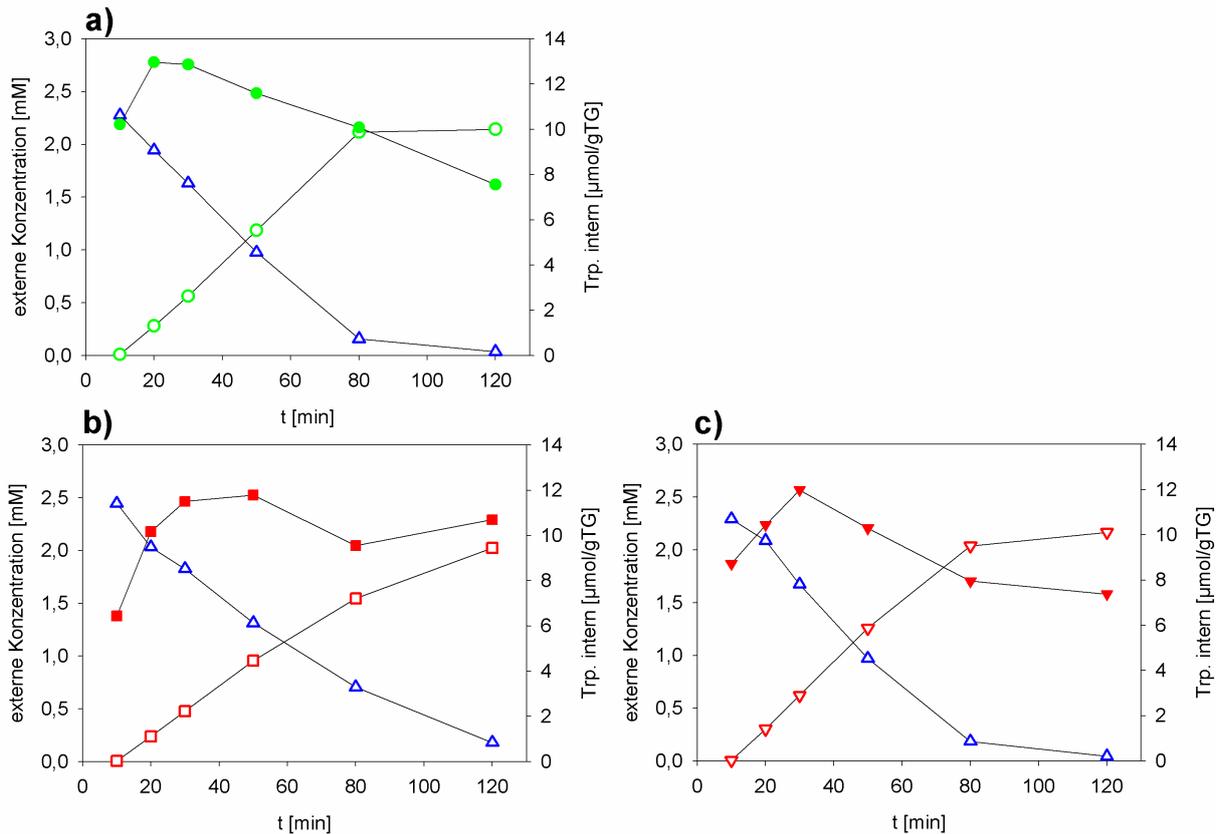


Abbildung 3-25: Konzentration von Ala-Trp im Medium (blaues Δ) und von Tryptophan in Cytoplasma (geschlossene Symbole) und Medium (offene Symbole) in *E. coli* nach Fütterung von 2 mM Ala-Trp ($t=10$ min). a) Referenzstamm *E. coli* pKD4- *tnaAB* (grüne ●,○), b) *E. coli* *tnaAB* pKD4- *yedA* (rote ■,□), c) *E. coli* *tnaAB* pKD4- *yddG* (rote ▼,▽).

Sowohl der Referenzstamm als auch die Deletionsstämme erreichten 10 bis 20 min nach Zugabe des Dipeptids eine maximale interne Akkumulation von etwa 12 $\mu\text{mol/gTG}$ Tryptophan. Im Referenzstamm und bei *E. coli* $\Delta\textit{tnaAB}$ pKD4- $\Delta\textit{yddG}$ fiel die Tryptophanmenge zum Ende der Messung auf ca. 7 $\mu\text{mol/gTG}$. Im Stamm $\Delta\textit{tnaAB}$ pKD4- $\Delta\textit{yedA}$ sank sie nur mäßig auf 10 $\mu\text{mol/gTG}$. Die Einzeldeletion von *yddG* und *yedA* riefen somit keine deutlich erhöhte Akkumulation von Tryptophan in der Dipeptidfütterung hervor.

Der Phänotyp einer gesteigerten internen Akkumulation von Tryptophan würde sich unter diesen Bedingungen allerdings nur zeigen, wenn es nur einen Tryptophanexporter gäbe. Nimmt man an, dass es mehrere Exporter gibt, so könnte der Ausfall eines Systems durch die gesteigerte Aktivität alternativer Transporter ausgeglichen werden. Keiner der getesteten Transporter konnte also der einzige Tryptophanexporter sein.

Da für die Kandidaten *yddG* und *yedA* aus der Literatur (DOROSHENKO *et al.*, 2007) bzw. den Ergebnissen der Selektion der Genbanken (Plasmide pBR322-4 und -46) die deutlichsten

Ergebnisse

Hinweise auf eine Beteiligung am Tryptophanexport vorlagen wurde eine Doppeldeletion erstellt, für die im $\Delta tnaAB \Delta yddG$ -Hintergrund zusätzlich noch $yedA$ deletiert wurde.

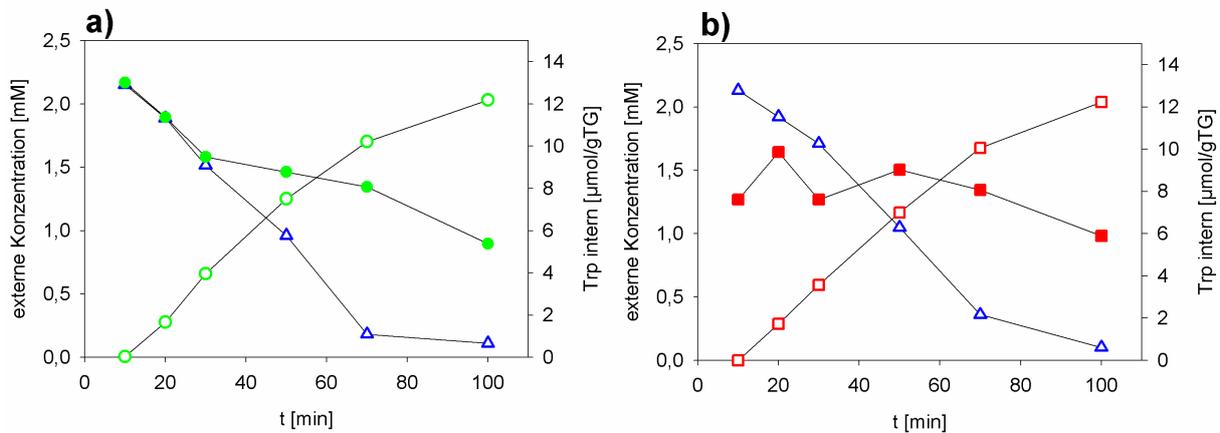


Abbildung 3-26: Konzentration von Ala-Trp im Medium (blaues Δ) und von Tryptophan in Cytoplasma (geschlossene Symbole) und Medium (offene Symbole) in *E. coli* nach Fütterung von 2 mM Ala-Trp ($t=10$ min). a) Referenzstamm pKD4- *tnaAB* (grüne \bullet, \circ), b) *tnaAB\Delta yddG* pKD4- *yedA* (rote \blacksquare, \square).

Die in Abbildung 3-26 dargestellte Dipeptidfütterung der Doppeldeletion *E. coli* $\Delta tnaAB \Delta yddG$ pKD4- $\Delta yedA$ im Vergleich zur Referenzstamm verdeutlicht, dass hier kein Phänotyp eines deletierten Exporters vorlag. Aufnahme des Dipeptids und Exkretion von Tryptophan entsprachen einander in beiden Ansätzen. Der Referenzstamm (Abbildung 3-26a) akkumulierte zu Beginn ca. $12 \mu\text{mol/gTG}$ Tryptophan intern und dieser Wert fiel zum Ende des Versuchs auf $5 \mu\text{mol/gTG}$ ab. In *E. coli* $\Delta tnaAB \Delta yddG$ pKD4- $\Delta yedA$ wurde demgegenüber keine verstärkte Akkumulation von Tryptophan in den Zellen beobachtet (Abbildung 3-26b). Es wurde zu Beginn eine maximale Akkumulation von $10 \mu\text{mol/gTG}$ gemessen, die zum Ende des Versuchs auf $6 \mu\text{mol/gTG}$ absank.

Da es offenkundig nicht möglich war, die Beteiligung der untersuchten Kandidaten am Tryptophanexporter durch Untersuchungen an Deletionsstämmen in der Dipeptidfütterung nachzuweisen wurden parallel Expressionskonstrukte ausgewählter, putativer Tryptophanexporter erstellt.

3.4.2 Konstruktion von Expressionsstämmen putativer Tryptophanexporter

Da durch die Analyse von Einzelmutanten und einer Doppelmutante eine Beteiligung der Transportsysteme am Tryptophanexport unter den gewählten Bedingungen nicht gezeigt werden konnte, könnte es sein, dass mehrere Transporter diesen Prozess katalysieren.

Für den Nachweis der Beteiligung eines Carriers bot sich somit die Überexpression der jeweiligen Gene an. Dafür wurden Expressionskonstrukte der putativen Exporter YddG und

Ergebnisse

YedA erstellt. Diese sollten idealerweise zu einer gegenüber dem Referenzstamm verringerten internen Tryptophanakkumulation führen.

Da die Expression von Membranproteinen mitunter zu Stress für die Zelle führen kann, wurden mehrere Expressionsvektoren parallel genutzt. Diese unterschieden sich hauptsächlich in der Stärke und Regulierbarkeit der Genexpression. Getestet wurden die Vektoren pUC19, pQE30 und pET16b. pUC19 stellt einen *high copy*-Vektor dar, in dem die Expression darin klonierter Gene mittels des enthaltenen *lac*-Operons induziert werden kann. In ihm wurden je zwei Konstrukte der entsprechenden Gene kloniert. Dabei enthielt ein Konstrukt nur das Gen, vom Start- bis zum Stop-Codon (Abbildung 3-27b), in dem zweiten Konstrukt war zusätzlich der *upstream* des Start-Codons gelegene Bereich des Genoms, einschließlich des nativen Promoters und der Ribosomenbindestellen enthalten (Abbildung 3-27c).

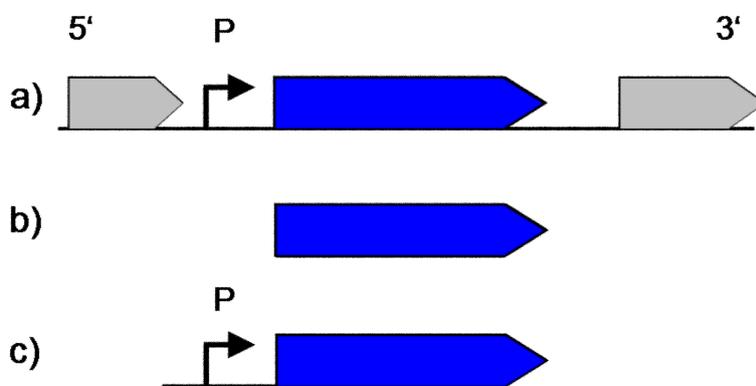


Abbildung 3-27: a) Schematische Organisation von *yddG* bzw. *yedA* (blau) im Genom (benachbarte Gene in grau). Zur Expression in verschiedenen Vektoren erstellte Konstrukte: b) Gensequenz von *yddG* bzw. *yedA*. c) Gensequenz mit Anhang des *upstream* gelegenen Genomabschnitts inklusive Promoter und regulatorischer Bereiche (P) für die Konstrukte *PyddG* und *PyedA*

Während die erste Version der Konstrukte die gesteuerte Kontrolle der Expression erlauben sollte, sollte diese in der zweiten Version (*PyddG* und *PyedA*) unter Kontrolle der nativen Regulationsmechanismen der Zelle stehen.

In pET16b, einem *high copy*-Vektor, ist die Expression darin klonierter Gene strikt kontrolliert und kann über Aktivierung eines T7-Promoters gesteuert werden. Der Vektor pQE30 ist ein *low copy*-Vektor, in dem die Expression darin klonierter Gene nicht so strikt reguliert wird. In solchen „leaky“ Vektoren ist meist auch ohne Induktion ein geringes Grundniveau der Expression vorhanden. Die Gene *yddG* und *yedA* (Abbildung 3-27b) wurden in pET16b und pQE30 jeweils so kloniert, dass sie zusammen mit dem im Vektor enthaltenen Tag exprimiert wurden. Da in pUC19 kein Tag in der Vektorsequenz enthalten ist wurde ein Strep-Tag über die benutzten Primer C-terminal an das exprimierte Gen fusioniert.

Ergebnisse

Nach ihrer Erstellung durch PCR, Restriktion und gerichteter Klonierung wurde zunächst durch Sequenzierung geprüft, ob die inserierte Gensequenz korrekt war. Dies war für alle benutzten Vektoren der Fall. Nun wurden die Expressionsplasmide in *E. coli*, transformiert und getestet, ob sie exprimierbar waren. In Standardexpressionstests wurde Gesamtzellextrakt der Expressionsstämme einer SDS-PAGE unterzogen und die Expression durch einen anschließenden Western Blot nachgewiesen.

Ein solcher Nachweis war für die Expression in pET16b und pQE30 nicht möglich. Die angefertigten Western Blots zeigten keinerlei spezifische Banden (Daten nicht gezeigt). Im Fall von pQE30-*yedA* führte die Induktion der Expression allerdings dazu, dass Zellen, die mit diesem Plasmid transformiert wurden, sich nach 48 h Inkubation in LB rosa färbten. Wurde nur der Leervektor pQE30 transformiert, so kam es nicht zu diesem Phänotyp. In Abbildung 3-28 sind Zellen dargestellt, die auf LB-Agarplatten nach 48 h Inkubation bei 37 °C gewachsen waren.

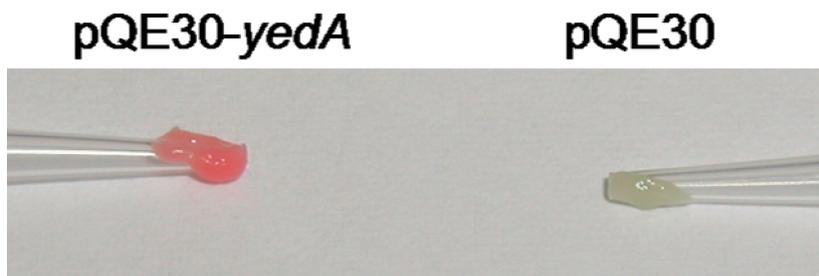


Abbildung 3-28: Zellproben von *E. coli* pQE30-*yedA* bzw. pQE30; entnommen von LB-Agarplatten nach 48 h Induktionsdauer.

Ein Zellaufschluss durch Ultraschallbehandlung mit anschließender Zentrifugation zeigte, dass der Farbstoff sich dabei im Überstand löste. Freundlicherweise führte die Evonik Degussa GmbH eine Analyse dieses Überstandes durch, um den Farbstoff zu identifizieren. Dies geschah durch HPLC und GCMS-TOF (Gaschromatographie mit Massenspektrometrie Kopplung, Time-of-Flight). Es wurde dabei die Konzentration von Intermediaten des Tryptophanstoffwechsels und verwandter Verbindungen wie z.B. Anthranilsäure, Hydroxy-Tryptophan, Indolessigsäure, Indolmilchsäure, Tryptamin oder Indol gemessen. Allerdings konnte keine erhöhte Konzentration der genannten Substanzen nachgewiesen werden.

Für die Expression von *yddG* und *yedA* in pUC19 war der Nachweis mittels Western Blot möglich. Es wurde ein Standardtest zur Expression durchgeführt, dessen Ergebnisse in Abbildung 3-29 dargestellt sind. Dabei wurde kein IPTG zugegeben, da vermutet wurde, dass eine zu starke Induktion für die Zellen letal sein könnte.

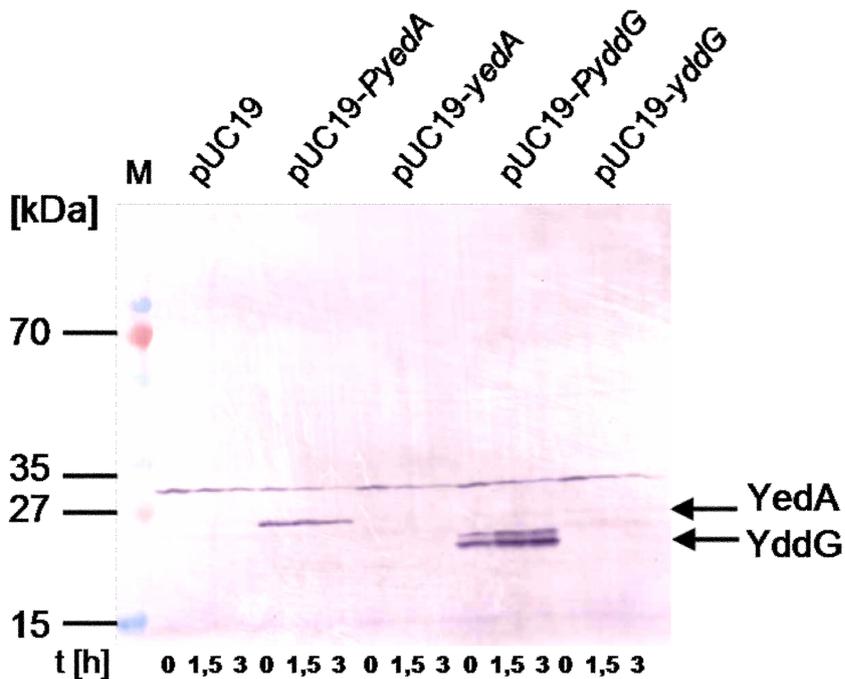


Abbildung 3-29: Western Blot zur Expression von *yedA*- und *yddG*-Konstrukten in pUC19 in *E. coli*. Nachweis mittels Strep-Tag. M: Page Ruler, Prestained Protein Ladder, ausgewählte Größen indiziert.

Wie aus Abbildung 3-29 zu entnehmen ist, war unter Standardbedingungen lediglich die Expression mittels der Plasmide pUC19_*PyddG* und pUC19_*PyedA* erfolgreich. Für YedA konnte im Konstrukt pUC19-*PyedA* eine Bande auf Höhe von ca. 27 kDa nachgewiesen werden. Für YddG wurde im Konstrukt pUC19-*PyddG* eine Bande auf Höhe von ca. 25 kDa nachgewiesen. Beide Proteine liefen auf einer geringeren Höhe als erwartet wurde (je 32 kDa). Es ist allerdings bekannt, dass stark hydrophobe Membranproteine in SDS-Gelen dieses Verhalten zeigen. Die Bande, die in allen Proben auf Höhe von 32 kDa zu sehen ist, scheint auf einem unspezifischen Signal zu beruhen, da sie auch im Leervektor pUC19 nachgewiesen wurde.

Nun sollte die Expression unter Versuchsbedingungen nachgewiesen werden. Dazu wurden Stämme, die die Plasmide pUC19-*PyddG* und pUC19-*PyedA* sowie der Leervektor trugen in 56/2 Minimalmedium kultiviert, wobei pro Plasmid je eine uninduzierte und eine durch Zugabe von 0,1 M IPTG induzierte Kultur getestet wurden. 5 h nach Überimpfung der Zellen in frisches Medium wurde eine Probe entnommen und für den Proteinnachweis aufgearbeitet.

Ergebnisse

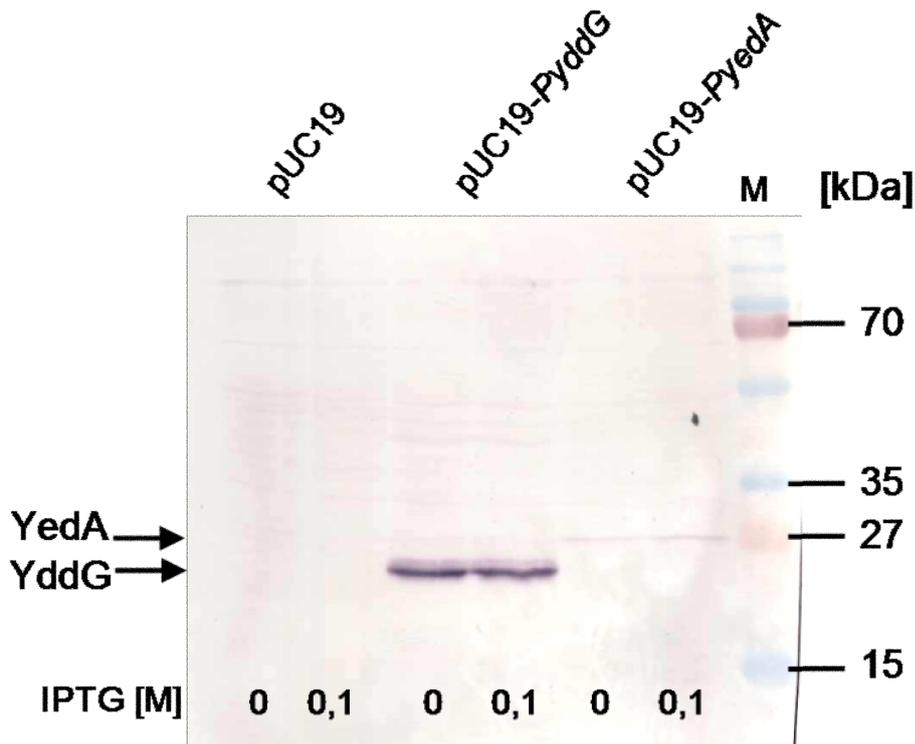


Abbildung 3-30: Western Blot zur Expression von pUC19-*PyddG* und pUC19-*Pyeda* in *E. coli*. Nachweis mittels Strep-Tag. M: Page Ruler, Prestained Protein Ladder, ausgewählte Größen indiziert.

Abbildung 3-30 zeigt, dass die Expression des *PyddG*-Konstrukts in *E. coli* in 56/2 Minimalmedium zu einem deutlichen Signal führte. Dabei machte es keinen Unterschied, ob IPTG zugegeben wurde oder nicht. Für *Pyeda* konnte nur ein sehr viel schwächeres Signal nachgewiesen werden, wobei es auch hier unerheblich war, ob IPTG zugegeben wurde oder nicht.

Da pUC19-*PyddG* und pUC19-*Pyeda* somit unter Versuchsbedingungen und unter Kontrolle ihres jeweiligen, nativen Promoters zu einer stabilen Expression fähig waren konnten die Expressionsplasmide nun in weiteren Tests untersucht werden.

3.4.3 Test von pUC19-*PyddG* und pUC19-*Pyeda* in der Dipeptidfütterung

Zu diesem Zweck wurden die beiden Plasmide sowie der Leervektor pUC19 zunächst in *E. coli* pKD4- Δ *tnaAB* transformiert. Nun konnten die erhaltenen Stämme der Dipeptidfütterung unterzogen werden, wobei im Fall der Expression eines Tryptophanexporters mit einer gegenüber dem Referenzstamm verringerten internen Tryptophanakkumulation gerechnet wurde.

Ergebnisse

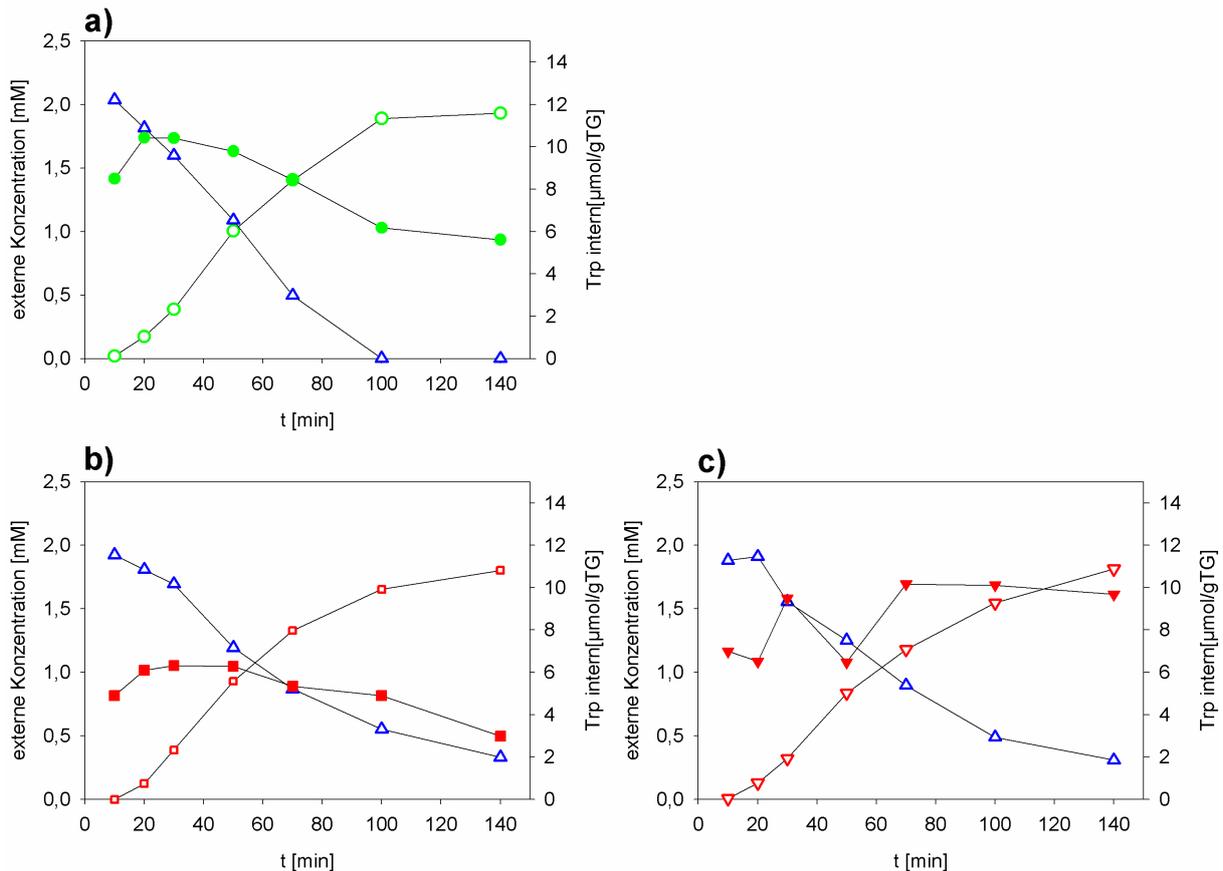


Abbildung 3-31: Konzentration von Ala-Trp im Medium (blaues Δ) und von Tryptophan in Cytoplasma (geschlossene Symbole) und Medium (offene Symbole) in *E. coli AtnaAB* nach Zugabe von 2 mM Ala-Trp ($t=10$ min). a) Referenzstamm pUC19 (grüne \bullet, \circ), b) pUC19_PyddG (rote \blacksquare, \square), c) pUC19_PyedA (rote $\blacktriangledown, \triangledown$)

Während, wie aus Abbildung 3-31 zu entnehmen ist, die externe Akkumulation von Tryptophan immer dem Verbrauch des Dipeptids entsprach, zeigten sich bei der internen Tryptophanakkumulation Unterschiede zwischen Referenzstamm und Expressionsstämmen. Die interne Tryptophanakkumulation im Referenzstamm fiel nach Erreichen eines Maximums von $11 \mu\text{mol/gTG}$ in den ersten 40 min nach Fütterung des Dipeptids zum Ende der Messung wieder auf knapp $6 \mu\text{mol/gTG}$ ab (Abbildung 3-31a).

Im Stamm pUC19_PyddG (Abbildung 3-31b) wurde im gleichen Zeitraum lediglich eine maximale Akkumulation von etwa $6 \mu\text{mol/gTG}$ erreicht, die dann auf ein Minimum von ca. $3 \mu\text{mol/gTG}$ abfiel. Im Gegensatz zu pUC19_PyddG war bei der Dipeptidfütterung mit pUC19_PyedA (Abbildung 3-31c) keine verringerte interne Tryptophanakkumulation messbar. Es stellte sich eine maximale Akkumulation von etwa $10 \mu\text{mol/gTG}$ ein, die dann während des gesamten Messzeitraums erhalten blieb.

In Anwesenheit von pUC19_PyddG konnte somit eine verringerte interne Akkumulation von Tryptophan nachgewiesen werden. Diese lag während des gesamten Versuchszeitraums etwa 50% unter der des Referenzstammes.

Ergebnisse

Um sicherzustellen, dass *yddG* und *yedA* während des Versuchs exprimiert wurden, wurde parallel zur Dipeptidfütterung ein Western Blot angefertigt. Dabei wurden Proben zu Beginn und zum Ende der Messung gezogen und für den Nachweis genutzt. Abbildung 3-32 zeigt exemplarisch einen solchen Blot, bei dem Proben des Referenzstamms und der zwei Expressionsstämme mit pUC19_*PyddG* und pUC19_*PyedA* aufgetragen wurden.

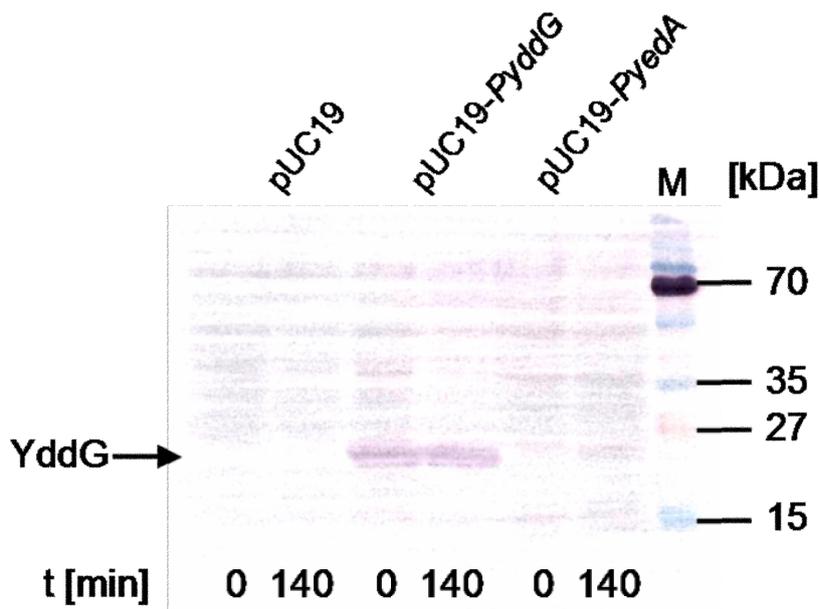


Abbildung 3-32: Western Blot zur Dipeptidfütterung in *E. coli* pKD4- Δ *tnaAB* mit pUC19 Expressionsstämmen. Nachweis mittels Strep-Tag. M: Page Ruler, Prestained Protein Ladder, ausgewählte Größen indiziert.

Der in Abbildung 3-32 gezeigte Western Blot beweist, dass *yddG* während des Versuchs konstant exprimiert wurde. Für *yedA* war jedoch keine Expression nachweisbar. Die in der Kontrollexpression (Abbildung 3-30) noch vorhandene Bande bei 27 kDa tauchte hier nicht auf. Dies muss in direkten Bezug zu den Ergebnissen der Dipeptidfütterung gesetzt werden. Wurde *yedA* nicht exprimiert, war auch mit keinem Effekt im Fütterungsversuch zu rechnen. Es zeigte sich, bei mehrfachen Wiederholungen, dass die Expression von *yedA* durch pUC19_*PyedA* nicht stabil reproduzierbar war. Da *yedA* in dem benutzten Vektor unter Kontrolle seines nativen Promotors exprimiert wurde und dessen Kontrolle unklar war, konnte nicht geklärt werden, was die Ursache der mangelhaften Expression war.

3.4.4 Untersuchung stationärer Zellen mit pQE30_*yedA* in der Dipeptidfütterung

Da die Expression von *yedA* in pUC19_*PyedA* sich als problematisch erwies, wurde versucht, den Effekt der *yedA*-Expression in anderen Vektoren zu überprüfen. Hierzu wurde zunächst

Ergebnisse

das Konstrukt pQE30_yedA herangezogen. Dieses Plasmid führte in stationären Zellen zur Akkumulation eines unbekanntes rosa Farbstoffs.

Für die Dipeptidfütterung wurden nun pQE30_yedA und der Leervektor pQE30 in Zellen mit *AtnaAB*-Hintergrund transformiert. Auch hier stellte sich bei Inkubation in Vollmedium nach Erreichen der stationären Phase die charakteristische rosa Färbung ein. Diese Zellen wurden dann in Minimalmedium gewaschen und sofort für die Dipeptidfütterung eingesetzt.

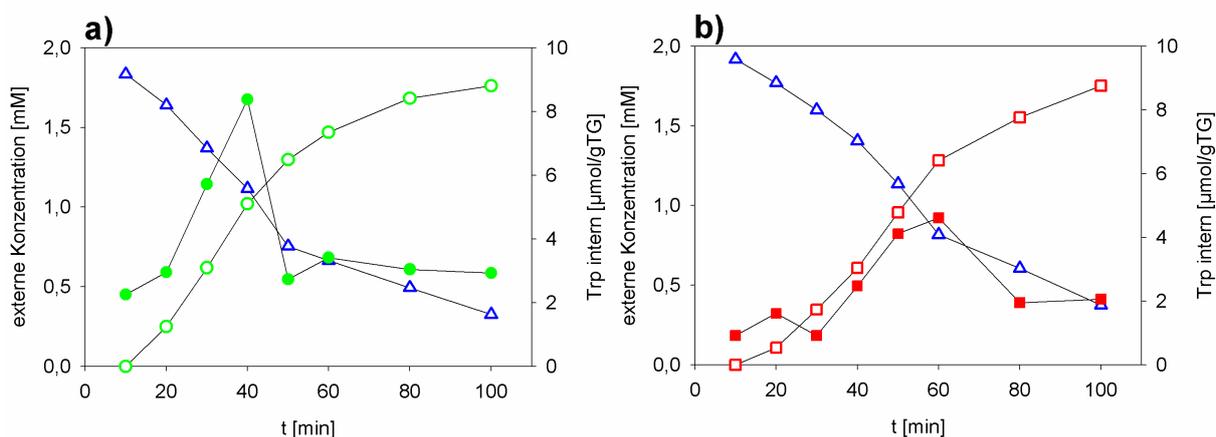


Abbildung 3-33: Konzentration von Ala-Trp im Medium (blaues Δ) und von Tryptophan in Cytoplasma (geschlossene Symbole) und Medium (offene Symbole) in *E. coli AtnaAB* nach Zugabe von 2 mM Ala-Trp ($t=10$ min). a) Referenzstamm *E. coli AtnaAB* pQE30 (grüne \bullet, \circ), b) *E. coli AtnaAB* pQE30_yedA (rote \blacksquare, \square).

Das Ergebnis der Dipeptidfütterung in stationären Zellen ist in Abbildung 3-33 dargestellt. Aufnahme von Ala-Trp und Exkretion von Tryptophan standen auch in diesem Fall im Gleichgewicht. Hier erreichte die interne Tryptophanakkumulation im Referenzstamm (Abbildung 3-33a) 30 min nach Zugabe des Dipeptids mit 9 $\mu\text{mol/gTG}$ ihr Maximum und fiel danach schnell wieder auf knapp 3 $\mu\text{mol/gTG}$ ab. In Anwesenheit von pQE30_yedA (Abbildung 3-33b) fiel zunächst auf, dass die Akkumulation von Tryptophan langsamer vonstatten ging. Zu einer signifikanten Steigerung des internen Tryptophan kam es erst ca. 30 min nach Zugabe des Dipeptids. Der Anstieg fiel auch schwächer aus und erreichte maximal nur ca. 4 $\mu\text{mol/gTG}$. Zum Ende fiel der Wert wieder auf 2 $\mu\text{mol/gTG}$. Es kam also in den rosa Zellen zu einer verspäteten und verringerten Akkumulation von Tryptophan.

3.4.5 Test von YedA in der Dipeptidfütterung durch Einsatz eines Plasmids aus der pBR322 Genbank

Da *yedA*, wie bereits erwähnt, in pUC19_yedA nur schlecht exprimierbar war, wurde sein Einfluss in einem weiteren System getestet. Dazu wurde das aus der Selektion der pBR322 Genbank isolierte Plasmid pBR322-4 (*yedA*) genutzt. In diesem waren neben *yedA* noch einige Gene aus dessen Umgebung codiert. Die Expression sollte wie in *PyedA* unter

Ergebnisse

Kontrolle des genomischen Promoters stehen, da das Insert in pBR322-4 (*yedA*) auch den upstream von *yedA* gelegenen Bereich des Genoms umfasste. Da hier keine Möglichkeit zum Nachweis der Expression bestand, konnte diese nur anhand eines evtl. auftretenden Effekts in der Dipeptidfütterung geschlussfolgert werden. Als Referenzstamm diente *E. coli* Δ *tnaAB*, der mit dem pBR322 Leervektor transformiert wurde.

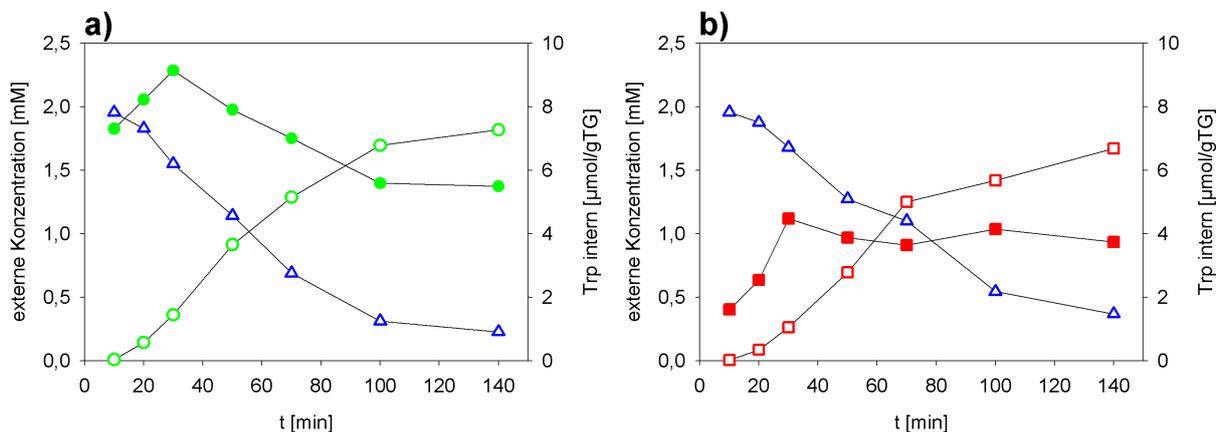


Abbildung 3-34: Konzentration von Ala-Trp im Medium (blaues \triangle) und von Tryptophan in Cytoplasma (geschlossene Symbole) und Medium (offene Symbole) in *E. coli* Δ *tnaAB* nach Zugabe von 2 mM Ala-Trp ($t=10$ min). a) Referenzstamm *E. coli* Δ *tnaAB* pBR322 (grüne \bullet, \circ), b) *E. coli* Δ *tnaAB* pBR322-4 (*yedA*) (rote \blacksquare, \square).

Wie in den anderen Fütterungsexperimenten entsprachen sich auch hier Aufnahme des Dipeptids und Exkretion von Tryptophan ins Medium in beiden Ansätzen (Abbildung 3-34). Die interne Akkumulation war im Referenzstamm allerdings deutlich höher als in Anwesenheit von pBR322-4 (*yedA*). Wurde in der Referenz 20 min nach Zugabe des Dipeptids ein Maximum von 9 $\mu\text{mol/gTG}$ erreicht, welches dann zum Ende des Messzeitraums auf etwa 5,5 $\mu\text{mol/gTG}$ absank (Abbildung 3-34a), so kam es im Expressionsstamm im gleichen Zeitraum nur zur Akkumulation von 4 $\mu\text{mol/gTG}$ (Abbildung 3-34b). Die Akkumulation von Tryptophan war also gegenüber dem Referenzstamm deutlich verringert.

3.5 Charakterisierung des Exports durch Transportmessungen mit radioaktiv markiertem Tryptophan

Eine weitere Möglichkeit, den Tryptophanexport zu charakterisieren stellte die Messung des Exports von radioaktiv markiertem Tryptophan dar. Dabei wurden die Zellen zunächst unter Bedingungen kultiviert, unter denen die Induktion des Tryptophan Aufnahmesystems TnaB optimal war. Dies beinhaltete die Umgehung der Katabolitrepression durch Glucose indem als

Ergebnisse

alternative C-Quelle Pyruvat genutzt wurde. Zusätzlich wurde die Expression von *tnaB* durch Zugabe von Tryptophan zur Vorkultur induziert. Die Messungen erfolgten stets in Stämmen mit *AtnaA*-Hintergrund um den internen Abbau des akkumulieren Tryptophan zu unterbinden. Da die Umsetzung von Tryptophan durch die Tryptophanyl-t-RNA-Synthase als vernachlässigbar anzusehen war, sollte intern akkumuliertes Tryptophan unter diesen Bedingungen effektiv exportiert werden. Ein Schema zum Prinzip dieser Messung ist in Abbildung 3-35 dargestellt.

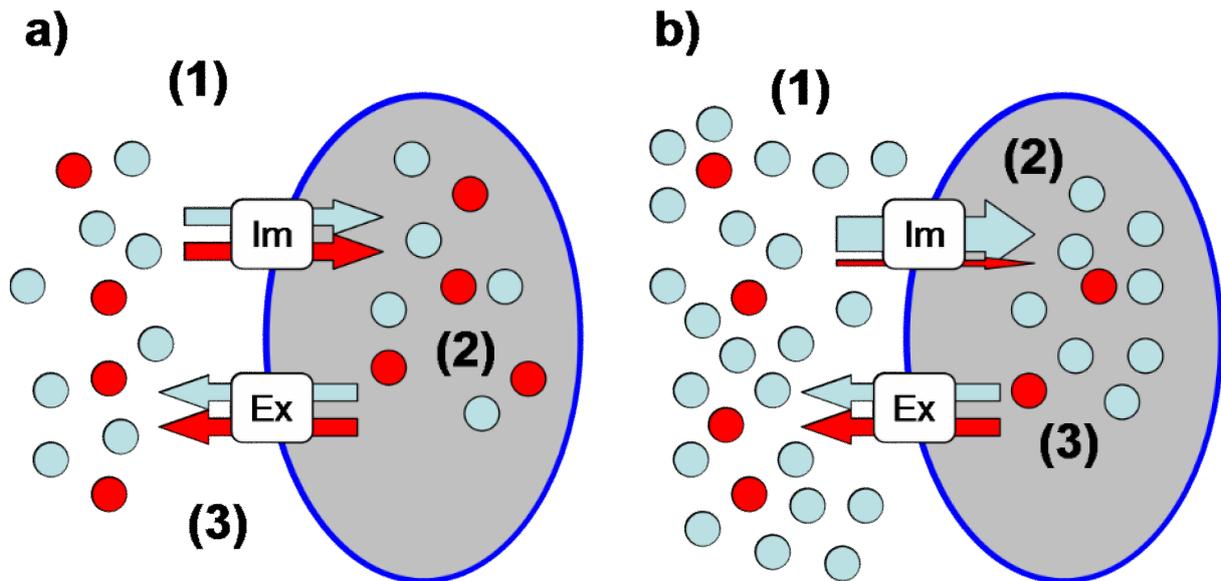


Abbildung 3-35: Schema zu Exportmessungen von Tryptophan (hellblau) mit Hilfe von ^{14}C -Tryptophan (rot). a) Einstellung des Fließgleichgewichts, b) Exportmessung. Weitere Erläuterungen im Text.

Für die Messung werden die Zellen zunächst mit einer Lösung radioaktiv markierten Tryptophans versetzt, welches zusammen mit dem unmarkierten Tryptophan aufgenommen wird (Abbildung 3-35a1). Dies sollte zur internen Akkumulation von Tryptophan führen, welche als Anstieg der intern nachweisbaren Radioaktivität verfolgt werden könnte (Abbildung 3-35a2). Der gleichzeitig einsetzende Export sollte nach einer Weile ein Gleichgewicht mit dem Import herstellen, so dass sich nach einer bestimmten Zeit ein konstantes Niveau an Radioaktivität in der Zelle nachweisen lässt (Abbildung 3-35a3). Im zweiten Teil des Versuchs sollte dann der Export charakterisiert werden. Dazu würden die Zellen nach Einstellung des Fließgleichgewichts mit einem Überschuss unmarkierten Tryptophans versetzt (Abbildung 3-35b1). Dies sollte das markierte Tryptophan bei der Aufnahme verdrängen (Abbildung 3-35b2). Ab diesem Zeitpunkt würde praktisch nur noch bereits akkumuliertes, markiertes Tryptophan exportiert, aber kein markiertes Tryptophan mehr importiert (Abbildung 3-35b3). Der Export sollte damit durch die Abnahme der internen Radioaktivität messbar werden.

Ergebnisse

Zunächst wurde versucht, die Einstellung dieses Fließgleichgewichts und dessen Messung zu etablieren. Nachdem dies möglich war, konnte die Expression putativer Tryptophanexporter in diesem System untersucht werden. Schließlich folgten Experimente zum Export von Tryptophan.

3.5.1 Bestimmung des Fließgleichgewichts zwischen Import und Export von Tryptophan

Um die Einstellung eines Fließgleichgewichts der Tryptophanakkumulation verfolgen zu können, wurden Zellen mit *AtnaA*-Hintergrund zunächst unter Bedingungen, die eine optimale Aufnahme von Tryptophan erlaubten, kultiviert und anschließend für die Messung vorbereitet.

Gab man zu der Zellsuspension nun radioaktiv markiertes Tryptophan, so konnte im Zeitverlauf ein Anstieg der internen Radioaktivität verfolgt werden. Dies wurde bei verschiedenen Konzentrationen durchgeführt, um die optimale Konzentration für eine möglichst effiziente Beladung der Zellen zu ermitteln. Es zeigte sich, dass eine Konzentration von 200 μM Tryptophan hierfür gut geeignet war, da die Zellen hierbei nach 45 min Inkubation eine hohe Akkumulation erreichten, gleichzeitig extern noch 80 % der verfügbaren Radioaktivität nachweisbar waren (Daten nicht gezeigt). Somit war die Etablierung eines stabilen Fließgleichgewichts möglich.

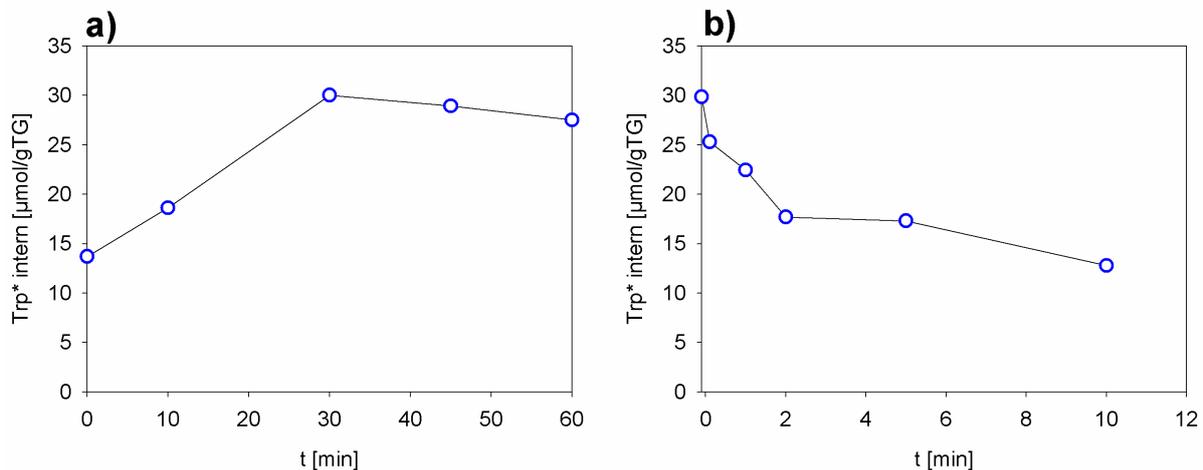


Abbildung 3-36: Aufnahme und Export von radioaktiv markiertem Tryptophan (Trp^* , 200 μM) in *E. coli* *AtnaA*. a) Beladung der Zellen durch Inkubation mit Trp^* ; b) Exportmessung nach 45 min Inkubation mit 200 μM Trp^* und Zugabe von 4 mM Tryptophan ($t = 0$ min).

Abbildung 3-36a stellt die Aufnahme von 200 μM markiertem Tryptophan im Zeitverlauf dar. Dabei zeigte sich, dass nach 30 min mit einer Akkumulation von 30 $\mu\text{mol/gTG}$ das Maximum erreicht wurde. Danach blieb der Wert in etwa auf diesem Niveau, was für die Einstellung

Ergebnisse

eines Fließgleichgewichts zwischen Im- und Export sprach. Dies stellte die Beladung der Zellen mit markiertem Tryptophan dar.

Für die Messung des Exports wurde den Zellen dann ein zwanzigfacher Überschuss nicht markiertes Tryptophan zugesetzt. Dies verdrängte das markierte Tryptophan beim Import und machte so den Export des bereits akkumulierten, markierten Tryptophans, wie in Abbildung 3-36b gezeigt, sichtbar. Unmittelbar nach Start der Exportmessung fiel die interne Menge von markiertem Tryptophan innerhalb von 10 min wieder auf das Niveau zu Beginn der Beladungsphase ab.

3.5.2 Expressionskonstrukte von *yddG* und *yedA* in Exportmessungen mit radioaktiv markiertem Tryptophan

Nachdem die Etablierung eines Fließgleichgewichts der Tryptophanakkumulation und die Möglichkeit, den Export von Tryptophan in diesem System nachzuweisen bestand, konnten Expressionskonstrukte putativer Tryptophanexporter in diesem System getestet werden.

Dies wurde für pUC19_*PyddG* und für *yedA*-Expressionskonstrukte durchgeführt. Im Fall von pQE30_*yedA* war es nicht möglich, eine reproduzierbare Messung durchzuführen. Das aus der Genbank isolierte Plasmid pBR322-4 (*yedA*), welches *yedA* exprimiert, erlaubte jedoch die Durchführung einer Exportmessung. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 3-37 dargestellt.

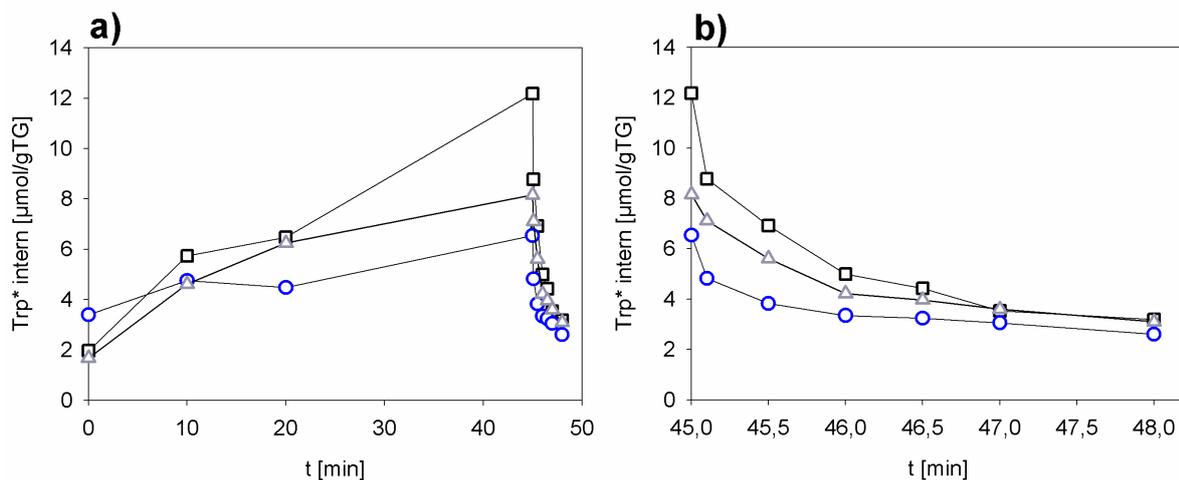


Abbildung 3-37: Einstellung des Fließgleichgewichts und Export von markiertem Tryptophan in *E. coli* MG1655 *AtnaA* pUC19 (schwarze \square), *E. coli* *AtnaA* pUC19_*PyddG* (blaue \circ) und *E. coli* *AtnaA* pBR322-4 (*yedA*) (graue \triangle) bei Beladung mit 200 μM Trp* und Zugabe von 4 mM Tryptophan nach 45 min. a) kompletter Zeitverlauf, b) Detaildarstellung nach Zugabe von 4 mM Tryptophan.

Abbildung 3-37a zeigt, dass schon bei der Einstellung des Fließgleichgewichts eine deutlich geringere Akkumulation von Tryptophan in Anwesenheit der Expressionsplasmide erreicht

Ergebnisse

wurde. Während der Referenzstamm nach Zugabe des markierten Tryptophan eine maximale Akkumulation von 12 $\mu\text{mol/gTG}$ erreichte, waren es bei *E. coli* pUC19_*PyddG* lediglich 6 $\mu\text{mol/gTG}$ und bei *E. coli* pBR322-4 (*yedA*) 8 $\mu\text{mol/gTG}$.

Die akkumulierte Tryptophanmenge sank, wie in Abbildung 3-37b gezeigt, mit Beginn der Exportphase im Referenzstamm innerhalb von ca. 2 min wieder auf einen Grundwert von ca. 4 $\mu\text{mol/gTG}$ ab. Bei *E. coli* pUC19_*PyddG* wurde dieser Wert bereits nach 0,5 min erreicht. Im Fall von *E. coli* pBR322-4 (*yedA*) wurde das Grundniveau nach etwa 1 min erreicht. Die Bestimmung kinetischer Parameter war aus den Daten nicht möglich. Dazu wäre es nötig, die erste Minute der Messung mit mehreren Messpunkten genauer aufzulösen. Deutlichstes Zeichen der erhöhten Exportaktivität in den Expressionsstämmen blieben damit die geringeren Niveaus des Fließgleichgewichts in diesen.

Um die Expression von *yddG* während des Versuchs nachzuweisen, wurde vor Zugabe von markiertem Tryptophan eine Probe der Zellsuspensionen entnommen und für den Proteinnachweis mittels Western Blot aufgearbeitet.

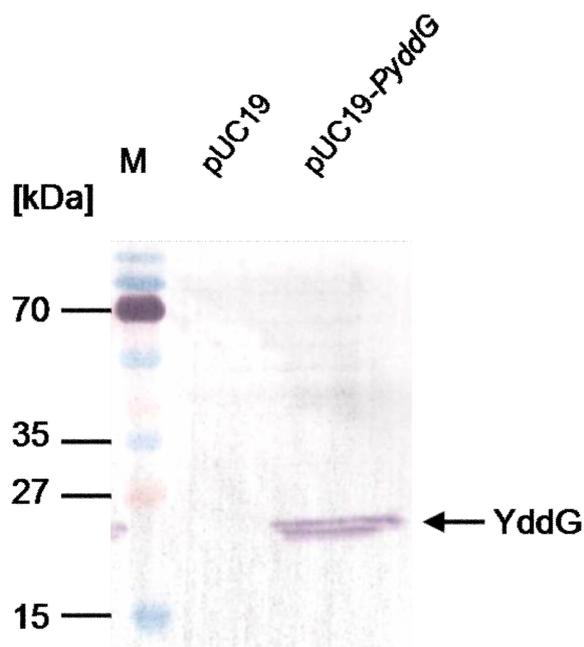


Abbildung 3-38: Western Blot zur Expression von pUC19 und pUC19_*PyddG* in *E. coli* MG1655 ΔtnaA ; M: Page Ruler, Prestained Protein Ladder, ausgewählte Größen indiziert.

Der damit hergestellte Blot ist in Abbildung 3-38 dargestellt und zeigt, dass *yddG* gut exprimiert wurde. Die Bande auf Höhe von 25 kDa war deutlich zu erkennen.

3.6 Untersuchung von Tryptophanexportern durch Resistenz gegen aromatische Verbindungen

Neben der direkten Messung des Transports kann der Nachweis einer Steigerung der Resistenz gegen aromatische Verbindungen mit struktureller Ähnlichkeit zu Tryptophan die Identifikation des oder der Exporter unterstützen. Dafür erfolgte zunächst die Bestimmung sensitiver Konzentrationen durch Wachstumstests auf Gradientenplatten. Danach konnten Wachstumstests in Flüssigkultur durchgeführt werden. Untersucht wurden in diesen Tests die Deletionsstämme $\Delta yddG$, $\Delta yedA$ und $\Delta yddG$ pKD4- $\Delta yedA$, sowie die Expressionsstämme mit pUC19- $\Delta yddG$, pUC19- $\Delta yedA$, pBR322-4 (*yedA*) und pQE30-*yedA*. Als Referenz diente der mit dem Leervektor pUC19 transformierte *E. coli* Wildtyp.

Für diese Tests wurden die toxischen Aminosäureanaloge 3-Fluoro-Phenylalanin (3FPhe) und 5MTrp benutzt. Beide sollten über den generellen Importer aromatischer Aminosäuren AroP, sowie die spezifischen Aufnahmesysteme der jeweiligen Aminosäuren importiert werden können. Für 3FPhe wäre dies der Phenylalaninimporter PheP (PI *et al.*, 1991), für 5MTrp die Tryptophanimporter Mtr und TnaB.

Eine gesteigerte Resistenz gegen 5MTrp könnte auf die Expression eines spezifischen Tryptophanexporters hinweisen, die Resistenz gegen 3FPhe auf die Expression eines generellen Exporters für aromatische Aminosäuren. Daneben kamen Intermediate des Tryptophanstoffwechsels wie Anthranilat und Indol, sowie Tryptophan selbst zum Einsatz.

Anthranilat stellt die erste Zwischenstufe des Tryptophan-spezifischen Synthesewegs der aromatischen Aminosäuren dar. Es war bekannt, dass es in *trpD*-Mutanten von *E. coli* zu einer Akkumulation von Anthranilat im Medium kommt, da der Tryptophan Syntheseweg durch die Mutation keine weitere Prozessierung des Anthranilats erlaubt (YANOFSKY *et al.*, 1971). Ob die Exkretion ins Medium durch einen Transporter vermittelt wird oder auf Diffusion beruht, war jedoch nicht bekannt. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von Tryptophan und Anthranilat könnte ein Tryptophanexporter auch Anthranilat als Substrat akzeptieren. Allerdings war unklar, ob Anthranilat in die Zelle gelangen kann und, ob es dort in bestimmten Konzentrationen eine toxische Wirkung entfaltet.

Indol stellt die unmittelbare Vorstufe von Tryptophan in dessen Synthese dar. Weiterhin wird überschüssiges Tryptophan von der Zelle zu Indol abgebaut. Aufgrund seiner stark hydrophoben Struktur könnte Indol mit der Zellmembran interagieren und damit in hohen Konzentrationen eine inhibierende Wirkung auf die Zelle haben. Weiterhin existiert mit Mtr ein Aufnahmesystem für Indol. Ob dies auch im Fall des Exports zutrifft war bisher nicht

Ergebnisse

bekannt. Ähnlich wie bei Anthranilat wäre es auch hier möglich, dass ein Tryptophanexporter aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit ebenfalls Indol als Substrat akzeptieren könnte.

Tryptophan wurde in diesem Versuch auch getestet. Es sollte dabei zunächst geklärt werden, ob Tryptophan selbst eine toxische Wirkung auf die Zelle haben kann. Weiterhin sollte Tryptophan in Kombination mit den anderen Inhibitoren getestet werden. Sollte ein putativer Tryptophanexporter neben Tryptophan auch den Inhibitor transportieren, so würde dies dazu führen, dass der Inhibitor in Anwesenheit von hohen Konzentrationen Tryptophan bereits in geringeren Konzentrationen toxisch wirkt.

3.6.1 Test der Sensitivität gegen toxische Substanzen auf Agarplatten

Für diesen Versuch wurden Agarplatten erstellt, die entlang ihrer Längsseite einen Gradienten des jeweiligen Inhibitors aufwiesen. Entlang dieser Achse wurden Zellsuspensionen der verschiedenen Stämme aufgetropft und dann unter Lichtausschluss inkubiert. Zur Dokumentation des Wachstums wurden Fotos der Platten angefertigt. Die Dokumentation des Wachstums auf Gradientenplatten war mitunter nicht unproblematisch, da die Zellen auch bei optimalen Wachstumsbedingungen nur geringe Dichten erreichten.

Für dieses Experiment mußten weiterhin drei Vorbedingungen zutreffen. Zuerst musste gewährleistet sein, dass die benutzten Inhibitoren in die Zelle gelangen können. 3FPhe beispielsweise sollte über AorP und PheP importiert werden können. Im Fall von Anthranilat hingegen ist kein Transporter beschrieben. Zweitens muss die Aufnahme des Inhibitors zu einer möglichst hohen Akkumulation in der Zelle führen um möglicherweise toxische Konzentrationen erreichen zu können. Dies führt zur dritten Vorbedingung - die akkumulierte Substanz muss oberhalb einer gewissen Konzentration toxisch wirken.

Für die Gradientenplatte mit Zusatz von Inhibitoren wurden zunächst Platten angefertigt, die einen Gradienten des Inhibitors enthielten. Dabei reichte dessen Konzentration von praktisch Null an einem Ende der Platte bis zur maximal löslichen Konzentration am gegenüberliegenden Ende der Platte. Die Platten wurden mit dem Referenzstamm *E. coli* pUC19 beimpft und inkubiert um jeweils den wirksamen Konzentrationsbereich der Inhibition zu bestimmen. Für den eigentlichen Versuch wurden dann Konzentrationen gewählt, bei denen der Referenzstamm in etwa bis zur Mitte der Platte wachsen konnte. In jeder Versuchsreihe wurde parallel eine Kontrollplatte ohne Zusatz von Inhibitoren getestet. Die in Abbildung 3-39 dargestellte Kontrolle legte den Maßstab für das maximal zu erwartende Wachstum auf den nachfolgenden Gradientenplatten fest und zeigte außerdem, dass alle Stämme unter den gegebenen Bedingungen vergleichbar gut wuchsen.

Ergebnisse

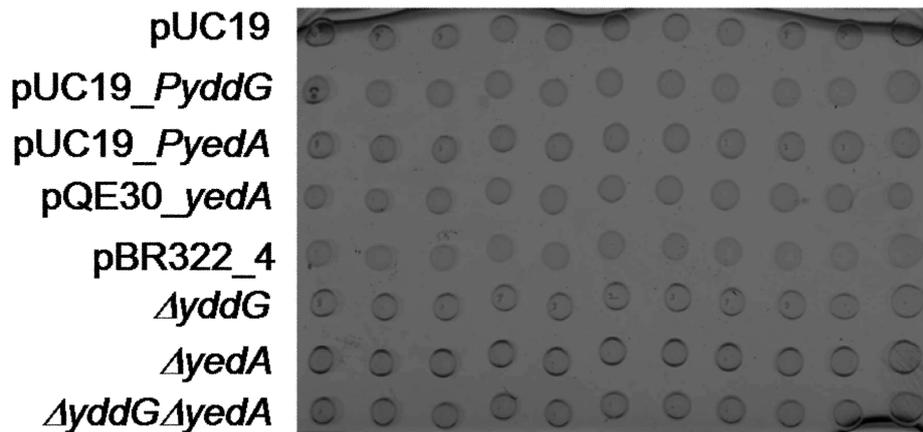


Abbildung 3-39: Wachstum von verschiedenen *E. coli*-Stämmen auf der Kontrollplatte ohne Zusätze.

Nun wurde Tryptophan auf seine Eignung als Inhibitor untersucht. Ein gegenüber dem Referenzstamm *E. coli* pUC19 veränderter Wachstumsphänotyp unter dieser Bedingung hätte zur Identifikation eines Tryptophanexporters beigetragen.

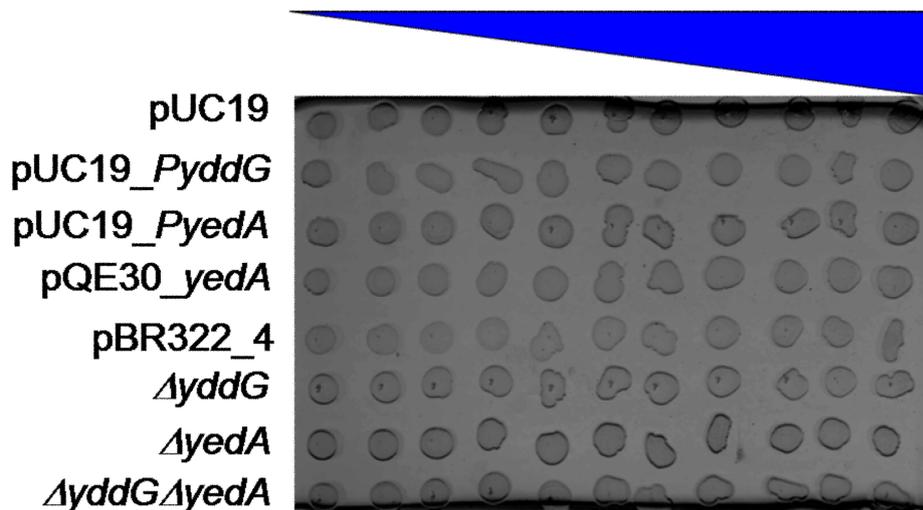


Abbildung 3-40: Wachstum von verschiedenen *E. coli*-Stämmen auf 0 – 40 mM Tryptophan; Verlauf des Gradienten durch blaues Dreieck indiziert.

Allerdings war, wie Abbildung 3-40 zeigt, keine Inhibition des Wachstums in einem der getesteten Stämme nachweisbar. Tryptophan alleine hatte also selbst in der maximalen Konzentration von 40 mM keinen Effekt, wenn auch aus vorherigen Versuchen bekannt war, dass Tryptophan sowohl importiert als auch in hohen Konzentrationen akkumuliert werden konnte.

Tryptophan alleine hatte zwar keine inhibierende Wirkung auf das Wachstum, es wurde jedoch angenommen, dass es in Kombination mit Inhibitoren deren Wirkung beeinflussen könnte. Es wurden neben den Platten, die nur den Inhibitor enthielten, auch Platten, die zusätzlich 40 mM Tryptophan enthielten angefertigt. Können beide Substanzen über den

Ergebnisse

gleichen Transporter exportiert werden, so könnte unter diesen Bedingungen die Toxizität des Inhibitors verstärkt sein. Allerdings zeigte sich auf keiner der getesteten Platten ein solcher Effekt, weswegen auf die Darstellung dieser Ergebnisse verzichtet wurde.

Anthranilat stellt das erste Zwischenprodukt des Tryptophan-spezifischen Abschnitts der Synthese aromatischer Aminosäuren dar. Bezüglich seiner Wirkung als Inhibitor ergab sich ein uneindeutiges Bild, was auch mit dem allgemein schlechten Wachstum der Stämme auf den Platten zusammenhing. Dies machte die genaue Auswertung schwierig.

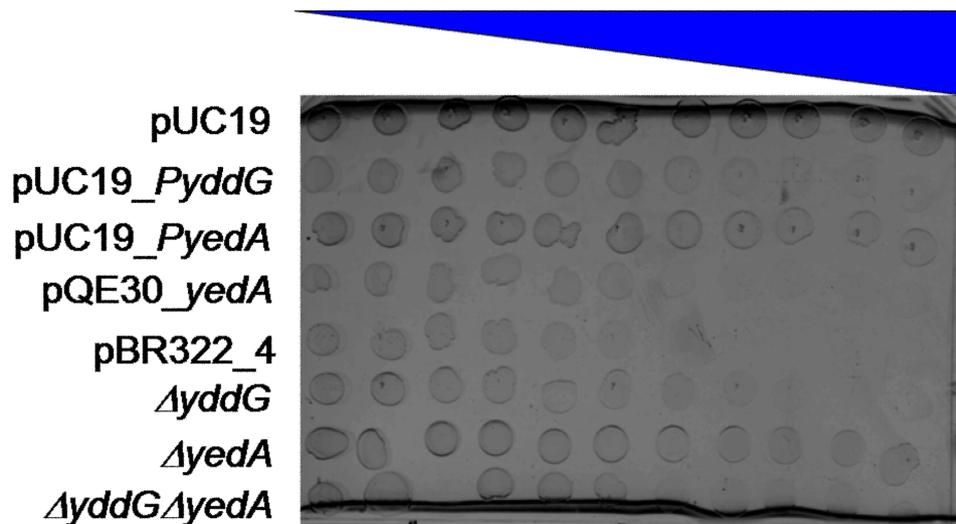


Abbildung 3-41: Wachstum von verschiedenen *E. coli*-Stämmen auf 0 – 3 mM Anthranilat; Verlauf des Gradienten durch blaues Dreieck indiziert.

Der Referenzstamm wuchs auf der in Abbildung 3-41 gezeigten Platte bis zur maximalen Konzentration. Interessanterweise waren die verschiedenen Expressionsstämme durch Anthranilat durchweg stärker inhibiert als dieser und konnten nur bis zu maximalen Konzentrationen von etwa 1,5 mM wachsen. Die Deletionsstämme zeigten einen ähnlichen Phänotyp. Es war damit kein eindeutiger Phänotyp einer erhöhten oder verringerten Resistenz nachweisbar. Da unklar war, ob und wenn ja, in welcher Konzentration Anthranilat in die Zelle gelangte, war eine Interpretation dieser Ergebnisse kaum möglich.

Die nächste Abbildung (Abbildung 3-42) zeigt eine Platte, der das toxische Aminosäureanalogon 3FPhe zugegeben wurde.

Ergebnisse

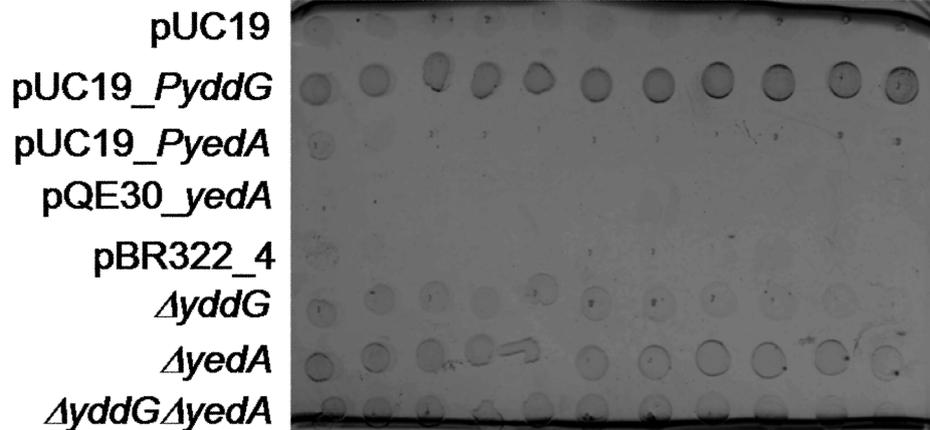


Abbildung 3-42: Wachstum von verschiedenen *E. coli*-Stämmen auf 0 – 3 mM 3FPhe; Verlauf des Gradienten durch blaues Dreieck indiziert.

Es konnte beobachtet werden, dass der Expressionsstamm *E. coli* pUC19_PyddG eine sehr hohe Resistenz gegen 3FPhe aufwies. Selbst bei der maximalen Konzentration von 3 mM war keine Inhibition des Wachstums sichtbar. Alle anderen Expressionsstämme sowie der Referenzstamm wurden hingegen schon bei geringen Konzentrationen dieser Substanz gehemmt. Ein gewisses Maß an Resistenz wiesen auch die Deletionsstämme auf. Dabei wuchsen *E. coli* $\Delta yddG$ und die Doppeldeletion *E. coli* $\Delta yddG\Delta yedA$ ungefähr bis zu Konzentrationen von 0,6 bis 0,8 mM, bei *E. coli* $\Delta yedA$ war in etwa eine Resistenz bis zur Grenze von 1,3 mM nachweisbar. Interessant war, dass es auf dieser Platte vermehrt zum Wachstum von Spontanmutanten kam. Dies konnte z.B. beim Stamm *E. coli* $\Delta yedA$ bei den drei letzten Tropfen beobachtet werden, wo die Spontanmutanten als schwarze Punkte am Rand des Tropfens erkennbar sind. Die Entstehung solcher Mutanten war schon aus den Versuchen zur Selektion auf 5MTrp bekannt.

Ergebnisse

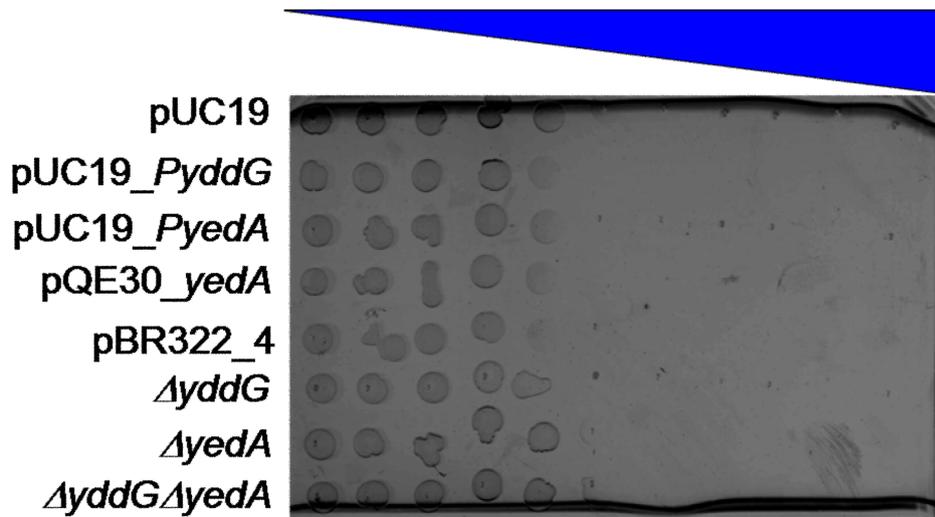


Abbildung 3-43: Wachstum von verschiedenen *E. coli*-Stämmen auf 0 – 10 mM Indol; Verlauf des Gradienten durch blaues Dreieck indiziert.

Beim Wachstum auf Indol konnten keine Unterschiede in der Resistenz der verschiedenen Stämme beobachtet werden (Abbildung 3-43). Weder zeigten die Expressionsstämme eine höhere Toleranz als der Referenzstamm, noch war diese in den Deletionsstämmen schwächer. Sie betrug stets ca. 4 mM.

3.6.2 Test der Sensitivität gegen 5MTrp in Flüssigkultur

Eine weitere Möglichkeit, die Resistenz gegen Inhibitoren zu testen bestand in Wachstumstests in Flüssigkultur. Dabei konnte das Wachstum durch Messung der OD direkt im Reagenzglas genauer quantifiziert werden als bei den Gradientenplatten.

Durchgeführt wurde ein solcher Test mit dem toxischen Tryptophanalogon 5MTrp, welches bereits bei der Selektion der *E. coli* Genbanken eingesetzt wurde. Für die Messung wurden für jeden getesteten Stamm drei Kulturen angesetzt. Eine Kontrolle, der kein Inhibitor zugesetzt wurde, eine Kultur mit geringer Inhibitorkonzentration und eine mit hoher Inhibitorkonzentration.

Ziel war es, nachzuweisen, dass der Referenzstamm bei der geringen Konzentration noch wachsen konnte, die Deletionsstämme jedoch nicht mehr. Bei der hohen Konzentration hingegen sollte der Referenzstamm schon im Wachstum eingeschränkt sein, während Expressionsstämme putativer Tryptophanexporter noch keine Einschränkung des Wachstums aufweisen sollten.

Zunächst wurden Deletionsstämme der putativen Tryptophanexporter *yddG* und *yedA*, sowie eine Doppeldeletion beider Gene getestet. Dabei wurden 20 μ M 5MTrp und 40 μ M zugegeben. Da für 5MTrp in früheren Versuchen (siehe 3.3.1) bei einer Konzentration von 30

Ergebnisse

bis 50 μM eine Inhibition des Wachstums festgelegt wurde, sollte es der Kontrolle möglich sein, bei 20 μM 5MTrp noch zu wachsen, bei 40 μM war jedoch bereits mit einer deutlichen Einschränkung des Wachstums zu rechnen. In Abbildung 3-44 ist das Ergebnis dieses Versuchs dargestellt.

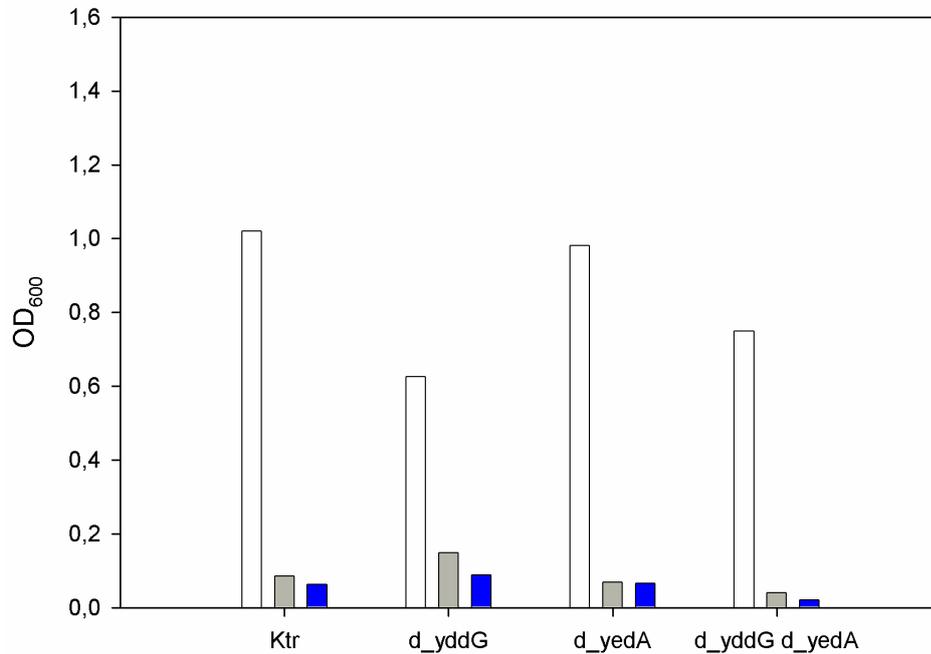


Abbildung 3-44: Zunahme der OD₆₀₀ nach 24 h Inkubation von verschiedenen *E. coli*-Stämmen in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen 5MTrp; weiße Balken: 0 μM ; graue Balken: 20 μM , blaue Balken: 40 μM . Ktr: pUC19; d_yddG: pKD4- $\Delta yddG$; d_yedA: pKD4- $\Delta yedA$; d_yddG d_yedA: $\Delta yddG$ pKD4- $\Delta yedA$.

Wie aus Abbildung 3-44 deutlich zu entnehmen ist, waren alle getesteten Stämme auch in Anwesenheit von nur 20 μM 5MTrp bereits stark im Wachstum eingeschränkt. Da auch die Kontrolle in Anwesenheit von 20 μM 5MTrp nur minimales Wachstum zeigte konnte nicht auf eine Verstärkung der Inhibition bei Deletion von *yddG* oder *yedA* geschlossen werden. Die Doppeldeletion *E. coli* $\Delta yddG \Delta yedA$ wuchs zwar etwas schlechter als die Einzeldelationen, doch aufgrund des geringen absoluten Wachstums konnte daraus kein eindeutiger Phänotyp abgeleitet werden.

Wurde der gleiche Versuch mit Expressionsstämmen von *yddG* und *yedA* durchgeführt, so zeigte sich ein deutlicheres Bild. Dabei wurde als geringe 5MTrp-Konzentration 40 μM benutzt, als hohe Konzentration 120 μM .

Ergebnisse

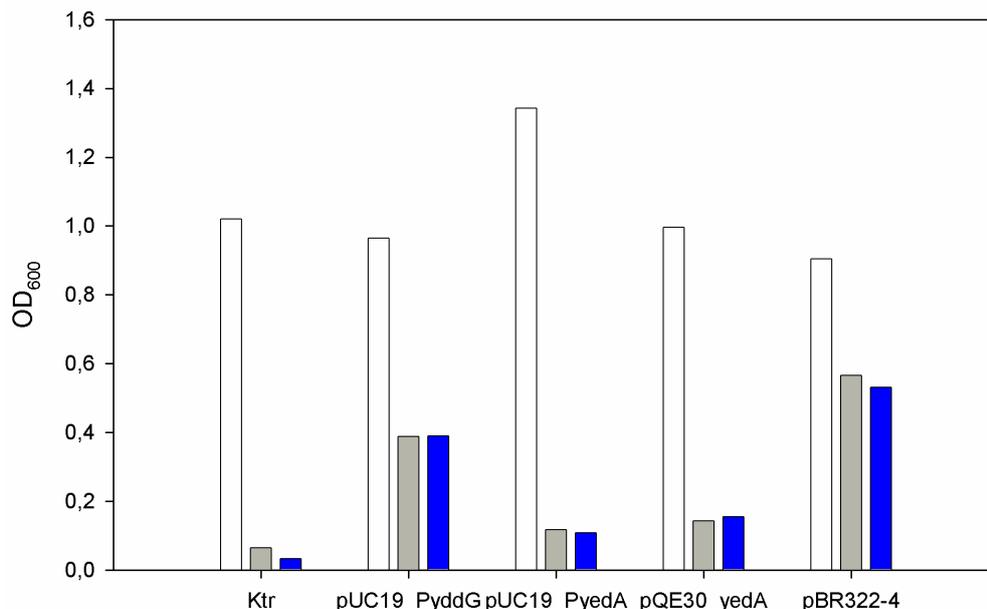


Abbildung 3-45: ΔOD_{600} nach 24 h Inkubation von *E. coli* MG1655 in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen 5MTrp; weiße Balken: 0 μM ; graue Balken: 40 μM , blaue Balken: 120 μM . Ktr: pUC19; pUC19_PyddG; pUC19_PyedA; pQE30_yedA und pBR322-4 (*yedA*).

Während die Kontrolle in Abbildung 3-45 auch in Anwesenheit beider 5MTrp-Konzentrationen nahezu kein Wachstum zeigte, konnte dies in den Expressionsstämmen beobachtet werden. dabei war die Resistenz in den verschiedenen Stämmen unterschiedlich stark ausgeprägt. Die Stämme *E. coli* pUC19_PyedA und *E. coli* pQE30_yedA zeigten hierbei die geringste Resistenz gegen 5MTrp. Im Vergleich zum jeweiligen Kontrollansatz ohne 5MTrp stieg die OD_{600} in den Ansätzen mit 5MTrp nur minimal. Allerdings war zu beobachten, dass auch in Anwesenheit der hohen Konzentration von 120 μM 5MTrp eine ähnlich hohe OD wie in Anwesenheit der geringeren Konzentration erreicht wurde. Im Kontrollstamm *E. coli* pUC19 hingegen war die Inhibition abhängig von der 5MTrp-Konzentration. Der Expressionsstamm *E. coli* pUC19_PyddG erreichte sowohl in Anwesenheit der geringen als auch der hohen 5MTrp-Konzentration eine gleich hohe OD_{600} , die etwa 40% der OD bei Wachstum ohne Zusatz von 5MTrp entsprach. Noch ausgeprägter war die Resistenz im Stamm *E. coli* pBR322-4 (*yedA*). Dieser erreichte in Anwesenheit von 5MTrp etwa 60% der OD_{600} seines Referenzansatzes ohne 5MTrp.

4 Diskussion

Die Nutzung von Mikroorganismen in Industrie und Forschung stellt heute eine Selbstverständlichkeit dar. Nachdem mittlerweile die kompletten Genome vieler Bakterien sequenziert und die Funktion vieler Gene und der darin codierten Proteine zu großen Teilen erforscht sind, bieten Mikroorganismen vielfältige und einfach zugängliche Möglichkeiten zur Manipulation zellulärer Systeme.

Von besonderem Interesse für die Industrie ist hierbei die Beeinflussung des Stoffwechsels zur gezielten Produktion von Biomolekülen. Vor allem die Produktion von komplexen Verbindungen, die nur unter großem Aufwand oder unter Einsatz teurer Ausgangsverbindungen chemisch synthetisiert werden können, spielt eine wichtige Rolle. Vitamine, Antibiotika und vor allem Aminosäuren werden so durch Fermentation hergestellt. Hierfür kommt vor allem das Gram-negative Enterobakterium *E. coli* zum Einsatz, in welchem unter anderem die Aminosäure L-Tryptophan mit relativ hohen Ausbeuten hergestellt werden kann. L-Tryptophan kann sowohl in der industriellen Tierhaltung als Futtermittelzusatz, als auch bei medizinischen Anwendungen als Antidepressivum genutzt werden.

Neben der Manipulation des Synthesewegs stellen Import und Export wichtige Stellschrauben der Effektivität einer biotechnologischen Produktion dar. Durch Inaktivierung des Imports kann die Entstehung so genannter *futile cycles* unterbunden werden, die zu einem Energieverlust für die Zelle führen. Eine Steigerung des Exports hat mehrere Vorteile. Zunächst verringert sie die interne Tryptophankonzentration, welche sich sonst negativ auf die Effektivität der Synthese auswirken könnte. Gleichzeitig verhindert eine geringe interne Konzentration, dass die Tryptophanase TnaA aktiv wird, welche bei hohen internen Konzentrationen sonst Tryptophan zu Indol abbaut.

Während die Aufnahmesysteme für Tryptophan in *E. coli* schon lange Zeit bekannt und beschrieben sind ist bezüglich des Exports bisher nur wenig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun versucht, den Tryptophanexport zu charakterisieren, den oder die Tryptophanexporter zu identifizieren und diese zu genauer zu beschreiben.

4.1 Nur mit ausgewählten Methoden ist der Tryptophanexport in *E. coli* messbar

Für die Beschreibung des Tryptophanexports in *E. coli* war es zunächst nötig, geeignete Methoden zu dessen Messung zu etablieren. In dieser Arbeit wurden dafür *in vivo* die Methoden der Dipeptidfütterung und radioaktive Exportmessungen genutzt. Als *in vitro* Messung wurde versucht, die Aufnahme von Aminosäuren in IMV zu messen.

Die Dipeptidfütterung wurde bereits von BRÖER *et al.* (1991) erfolgreich genutzt um den Export von Lysin in *C. glutamicum* zu charakterisieren. Sie basiert darauf, durch Aufnahme eines Dipeptids eine Akkumulation der entsprechenden Aminosäuren zu bewirken und parallel deren Exkretion ins Medium zu verfolgen. Bei den Exportmessungen mit markiertem Tryptophan macht man sich das Prinzip eines *Pulse-Chase* Experiments zu nutze. Bei Inkubation der Zellen mit der radioaktiv markierten Aminosäure stellt sich bald ein Fließgleichgewicht zwischen Import und Export ein. Nach Zugabe eines Überschuss unmarkierter Aminosäure wird die markierte Aminosäure beim Import verdrängt. Damit wird der Export als Abnahme der intern akkumulierten Radioaktivität messbar. Bei der Messung in IMV arbeitet der Exporter aufgrund der invertierten Orientierung der Vesikel als Importer und sollte bei geeigneter Energetisierung die Messung des Transports anhand eines Fluoreszenzmarkers bzw. mit radioaktiv markierten Aminosäuren erlauben.

Für die verschiedenen Methoden gab es mehrere grundlegende Anforderungen, die zunächst erfüllt sein mussten. Zuerst war es nötig, in *E. coli* einen genetischen Hintergrund zu etablieren, in dem störende Stoffflüsse eliminiert waren. Für die Dipeptidfütterung mussten Import und interner Abbau von Tryptophan eliminiert werden, was durch Deletion des *tnaAB* Genclusters möglich war. Dies konnte durch Messungen zur Aufnahme und durch Wachstumstests mit Tryptophan bewiesen werden. Für die Exportmessungen mit radioaktiv markiertem Tryptophan musste die Aufnahme von Tryptophan noch möglich sein, die interne Verstoffwechslung jedoch unterbunden werden. Hierzu wurde ein Stamm genutzt, in dem die Tryptophanase *tnaA* deletiert war. Für die Messung in IMV war es nötig, sicherzustellen, dass durch Energetisierung von Protonenpumpen wie dem Komplex I der NADH Dehydrogenase oder der Lactatdehydrogenase, ein Protonengradient an der Vesikelmembran erzeugt werden konnte. Dieser sollte dazu dienen, den als sekundär aktiv charakterisieren Export von Tryptophan zu ermöglichen.

Zwar konnte mehrfach gezeigt werden, dass diese Energetisierung von IMV und auch die Auflösung des Protonengradienten durch CCCP möglich war, doch war eine Nutzung des Gradienten zur Akkumulation von Aminosäuren in den Vesikeln nicht möglich.

Diskussion

Die Wiederherstellung der Fluoreszenz von Acridinorange und damit der Abbau des Gradienten durch Transportaktivität sollten dabei als Indikator des Imports dienen. Beim Nachweis der Aufnahme von Aminosäuren anhand des Quenchings der Fluoreszenz schien es jedoch, dass der parallel stattfindende Protonenimport den Verbrauch von Protonen zum Transport der Aminosäuren maskierte. Es war möglich, den fortlaufenden Import von Protonen nach Errichtung des Gradienten durch Zugabe von Piericidin A zu unterbinden. Allerdings zeigte sich unter diesen Bedingungen, dass gleichzeitig das Quenching der Fluoreszenz stark nachließ. Die IMV waren also nicht komplett dicht und erlaubten den passiven Ausstrom von Protonen.

Auch der Versuch, den Aminosäuretransport durch Einsatz radioaktiv markierter Aminosäuren zu messen war nicht erfolgreich. Es konnte keine signifikante und reproduzierbare Aufnahme in energetisierten Vesikeln nachgewiesen werden. Dass die Energetisierung der Vesikel möglich war legte nahe, dass die IMV intakt waren und auch die in der Membran verankerten Proteine wahrscheinlich noch funktional waren. Ebenso wenig konnte die Konzentration der IMV, welche 2 bis 5 mg/ml betrug, die Ursache sein. PITTMAN *et al.* führten 2002 ähnliche Messungen zur Aufnahme von Cystein in invertierten Vesikeln durch und benutzten dabei erfolgreich Konzentrationen von 1 mg/ml. Eine Klärung der Ursache des mangelnden Transports war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Dies ist zu bedauern, da die Messung des Exports im *in vitro*-System der IMV eine interessante Alternative zur Messung in lebenden Zellen dargestellt hätte. Durch Variation der Messparameter sollte es prinzipiell jedoch möglich sein, ein System zur Verfolgung des Aminosäuretransports in IMV zu etablieren. Dies wäre besonders interessant, um den Einfluss von Expressionskonstrukten putativer Tryptophanexporter zu untersuchen.

Mit der erfolgreichen Etablierung eines Dipeptidfütterungsprotokolls in *E. coli* war es möglich, die Aufnahme des Dipeptids Ala-Trp und die nachfolgende Exkretion von Tryptophan zu verfolgen. Die Geschwindigkeit der Dipeptidaufnahme variierte dabei erheblich. Wurden die eingesetzten 2 mM in einigen Versuchen innerhalb von 30 bis 40 min komplett aufgebraucht, so war in anderen auch nach einer Inkubationsdauer von 130 min noch Dipeptid nachweisbar. Dabei lag die Dipeptidaufnahme aber praktisch immer im Gleichgewicht mit der Exkretion von Tryptophan ins Medium. Dies legte nahe, dass die Aufnahme des Dipeptids den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion darstellte.

Bei der internen Tryptophanmenge waren die Schwankungen noch deutlicher ausgeprägt. Zum einen variierte die Höhe der Akkumulation. Bei Fütterung von 2 mM Ala-Trp betrug sie in einigen Messungen maximal 20 $\mu\text{mol/gTG}$, in anderen wurden nur 10 bis 12 $\mu\text{mol/gTG}$

Diskussion

erreicht. Schwankungen waren auch bei der internen Tryptophanakkumulation in den Exportmessungen mit markiertem Tryptophan zu beobachten. Bei den Versuchen zur Etablierung des Fließgleichgewichts konnte im Referenzstamm *E. coli ΔtnaA* eine interne Akkumulation von etwa 30 $\mu\text{mol/gTG}$ markiertem Tryptophan nachgewiesen werden. Demgegenüber wurde bei den Versuchen zum Export nur eine Beladung mit 12 $\mu\text{mol/gTG}$ markiertem Tryptophan durch die Aktivität des Tryptophanimporters TnaB erreicht. Hierfür waren Inkubationszeiten von 30 bis 45 min nötig, während in der Dipeptidfütterung die maximale Akkumulation sehr viel schneller erreicht wurde. In vielen Messungen war dies innerhalb der ersten 20 min nach Zugabe des Dipeptids der Fall. Wurde das Dipeptid im Lauf der Messung komplett verbraucht, so sank die interne Tryptophanmenge kurz darauf auf Werte zwischen 0 und 5 $\mu\text{mol/gTG}$. War zum Ende der Messung noch Ala-Trp im Medium nachzuweisen, so lag die interne Tryptophanmenge oft noch auf einem höheren Niveau. Insgesamt muss gesagt werden, dass die Messung der internen Tryptophanmenge mitunter schwierig war. Die jeweils gemessenen Werte sollten für jeden Versuch im Hinblick auf ihre Entwicklung im Zeitverlauf und im Vergleich mit dem jeweils parallel gemessenen Referenzstamm betrachtet werden.

Eine wichtige Erkenntnis, die aus den Dipeptidfütterungen gewonnen werden konnte war, dass externe Hydrolasen bei der Dipeptidfütterung mit Ala-Trp keine Rolle spielen. Bei den Arbeiten zur Exkretion von Methionin in *C. glutamicum* (TRÖTSCHEL *et al.*, 2005) hatten externe Hydrolasen einen deutlichen Einfluss auf die externe Methioninkonzentration, da sie 10 bis 15% des Dipeptids spalteten. Das Dipeptid Ala-Trp wurde in *E. coli* jedoch nur intern gespalten. Dies konnte z.B. aus den Messungen zur Energetik des Transports abgeleitet werden. Bei Zugabe von CCCP kamen die Dipeptidaufnahme sowie die Exkretion von Tryptophan komplett zum Erliegen. Hätten externe Hydrolasen einen Einfluss, so hätten in diesem Fall eine weitere Abnahme der Dipeptid- und ein Anstieg der externen Tryptophankonzentration beobachtet werden müssen.

Auch in Messungen mit radioaktiv markiertem Tryptophan war es möglich, den Export zu verfolgen. Dazu wurde nach Beladung der Zellen mit markiertem Tryptophan über einen Zeitraum von 45 min die Aufnahme markierten Tryptophans durch Zugabe eines 20-fachen Überschusses unmarkierten Tryptophans maskiert. Die darauf folgende Abnahme der zuvor akkumulierten Radioaktivität konnte dann mit dem Export von Tryptophan gleichgesetzt werden. Dabei fiel die akkumulierte Tryptophanmenge von ca. 12 $\mu\text{mol/gTG}$ innerhalb von 2 min auf einen Wert von ca. 4 $\mu\text{mol/gTG}$. Ob diese 4 $\mu\text{mol/gTG}$ wirklich noch in der Zelle

vorhanden waren oder evtl. auf Tryptophan, welches sich in der Membran festgesetzt hatte, zurückzuführen waren, konnte im Rahmen der durchgeführten Versuche nicht geklärt werden.

4.2 Der Tryptophanexport ist sekundär aktiv energetisiert und konstitutiv induziert

Bei Anwendung der Dipeptidfütterung in Messungen zur Energetik des Exports zeigte sich, dass die interne Tryptophanmenge nach Zugabe des Entkopplers CCCP, welcher den Protonengradienten an der Membran ausgleicht und damit sekundär aktiven Transportprozessen die Energiequelle entzieht, stagnierte. Mit Zerstörung des Gradienten kamen sowohl die Aufnahme des Dipeptids als auch die Exkretion von Tryptophan zum Erliegen. Dass dies neben dem mangelnden Nachschub auch auf die Unterbindung des Exports zurückzuführen war, zeigte sich daran, dass sich die interne Tryptophanmenge nach Zugabe des Entkopplers nicht mehr änderte. Für bekannte Aminosäureexporter wurde bereits beschrieben, dass diese sekundär aktiv sind. So wurde für den Leucinexporter *LeuE* nachgewiesen, dass es in Anwesenheit von CCCP bei dessen Expression in einem Leucin Produktionsstamm zu einer verminderten Akkumulation der Aminosäure im Medium kam (KUTUKOVA *et al.*, 2005). Auch der Threoninexporter *RhtC* wurde als sekundär aktiv beschrieben (ZAKATAEVA *et al.*, 1999). Neben den vielen beschriebenen sekundär aktiven Exportern gibt es auch einen beschriebenen primär aktive Aminosäureexporter, nämlich den Cysteinexporter *CydDC* (PITTMAN *et al.*, 2002). Die Beteiligung eines primär aktiven Transporters am Export von Tryptophan wurde jedoch ausgeschlossen. Dieser wäre unter den Versuchsbedingungen in Anwesenheit von CCCP nicht beeinflusst worden und hätten damit die Exkretion von Tryptophan auch nach Zugabe des Entkopplers erlauben sollen.

Die Stagnation der internen Tryptophanakkumulation bewies weiterhin, dass Diffusion bei der Exkretion von Tryptophan keine Rolle spielt. Der Vergleich der externen mit der internen Tryptophankonzentration verdeutlichte dies. Letztere betrug nach Zugabe des CCCP umgerechnet etwa 7 mM, während extern 1,5 mM nachweisbar waren. Könnte Tryptophan durch die Membran diffundieren, so wäre aufgrund des Konzentrationsgradienten zwischen Cytoplasma und Medium mit einem Absinken der internen Tryptophanmenge zu rechnen gewesen.

Nun sollte geprüft werden, wie der Export reguliert ist. Es war bekannt, dass die Expression des Argininexporters *argO* erst in Anwesenheit von Arginin induziert wird (NANDINERI *et al.*, 2004). Ähnlich verhält es sich im Fall des Leucinexporters *leuE*, der abhängig von der

Diskussion

internen Leucinkonzentration synthetisiert wird (KUTUKOVA *et al.*, 2005). Die Präsenz hoher, interner Tryptophankonzentrationen kann beispielsweise beim Wachstum auf Peptiden für *E. coli* zum Problem werden. Da sehr hohe Tryptophankonzentrationen sonst aber ein seltenes Phänomen darstellen könnte man annehmen, dass der Tryptophanexport auch erst in Anwesenheit hoher interner Konzentrationen induziert wird. Dies konnte beispielsweise für den Export von Methionin in *C. glutamicum* nachgewiesen werden (TRÖTSCHHEL *et al.*, 2005). Dabei stieg die interne Konzentration der Aminosäure sofort nach Zugabe des Dipeptids an, die externe Konzentration begann jedoch erst 10 min später signifikant anzusteigen. Bei Unterdrückung der Proteinbiosynthese stieg die interne Konzentration deutlich stärker an, während der Export vermindert war.

Ein solcher induktiver Effekt war für den Tryptophanexport in *E. coli* nicht zu beobachten. Die interne Tryptophanmenge stieg bei Unterdrückung der Proteinbiosynthese in der Dipeptidfütterung nicht stärker an als im Referenzstamm. Es fiel bei Zugabe von Chloramphenicol (CAM) jedoch auf, dass die Aufnahme des Dipeptids gegenüber der Referenz deutlich verlangsamt war. Diese sollte eigentlich durch die Vorkubation mit Casaminoacids (CAA) voll induziert sein. Es wäre jedoch möglich, dass dies noch nicht der Fall war und eine zusätzliche Induktion in Anwesenheit von Tryptophan stattfand. Tryptophan ist eine seltene und damit für die Zelle „wertvolle“ Aminosäure. Da CAA kein Tryptophan enthalten (MÜLLER *et al.*, 1940) wäre es nachvollziehbar, dass die Peptidaufnahmesysteme in Anwesenheit Tryptophan-haltiger Peptide stärker induziert werden als durch CAA alleine.

Weiterhin konnte nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Vorinkubation bereits Exkretionssysteme induziert wurden. Es wäre möglich, dass Tryptophan nicht nur über spezifische Exkretionssysteme, sondern auch über *Multi-Drug-Exporter* ausgeschieden wird. In diesem Fall könnten ein oder mehrere Exporter zu Beginn der Messung schon voll induziert gewesen sein. Das würde erklären, warum CAM unter den Bedingungen der Dipeptidfütterung keinen Einfluss auf den Export hatte.

Die Vorinkubation in peptidhaltigem Medium konnte durch Einführung des $\Delta gcvB$ -Hintergrundes im Stamm *E. coli* $\Delta tnaAB$ umgangen werden. Das Gen *gcvB* codiert für eine regulatorische RNA, die die Expression der Peptidaufnahmesysteme der Zelle reprimiert. Die Deletion von *gcvB* sollte erlauben, dass die Peptidaufnahmesysteme der Zelle konstitutiv exprimiert werden. Im $\Delta gcvB$ Hintergrund sollte untersucht werden, ob der Exporter induziert oder konstitutiv exprimiert wurde. Führte man ein Fütterungsexperiment ohne Vorinkubation der Zellen mit Peptiden durch, so wurden im Referenzstamm im Verlauf der Fütterung

Diskussion

lediglich 50 % des eingesetzten Dipeptids verbraucht und es kam nur zu einer geringen internen Akkumulation von Tryptophan. Im Stamm *E. coli* $\Delta tnaAB$ pKD4- $\Delta gcvB$ wurde das Dipeptid unter diesen Bedingungen nahezu komplett verbraucht und Tryptophan stark akkumuliert. Die Behandlung von *E. coli* $\Delta tnaAB$ pKD4- $\Delta gcvB$ mit CAM zu Beginn der Dipeptidfütterung führte allerdings nicht zu einer Erhöhung der internen Tryptophanakkumulation. Während das Dipeptid in diesem Fall mit ähnlicher Rate wie zuvor aufgenommen wurde, beobachtete man keine Veränderung der internen Akkumulation von Tryptophan.

Dies legte nahe, dass der Tryptophanexporter konstitutiv exprimiert wird. Damit kämen zwei mögliche Regulationsmechanismen in Frage. Zum einen könnte die Regulation des Tryptophanexports, genau wie die der Peptidaufnahme, durch *gcvB* kontrolliert werden. In diesem Fall wäre der Export im $\Delta gcvB$ -Hintergrund dereguliert und damit konstitutiv exprimiert. Zum anderen könnte der Exporter unabhängig von *gcvB* konstitutiv exprimiert sein. Im Fall des Gens des putativen Aminosäureexporters YddG konnten TSYRENTZHAPOVA *et al.* (2009) nachweisen, dass dieser auf geringem Niveau konstitutiv exprimiert wird. Die konstitutive Expression von *yddG* wurde auch im Expressionskonstrukt pUC19_*PyddG* sowohl bei Zellen, die sich in der exponentiellen Phase befanden, wie auch bei Zellen in der stationären Phase, nachgewiesen. In diesem Konstrukt war neben dem eigentlichen Gen noch der gesamte *upstream* gelegene Bereich bis zum Stop-Codon des vorangehenden Gens (*fdnG*) enthalten. Dies beinhaltete den nativen Promoter und die zugehörige Ribosomenbindestelle. Laut TSYRENTZHAPOVA *et al.* (2009) konnten sowohl Bindestellen gefunden werden, die charakteristisch für den so genannten „housekeeping“ Sigma-Faktor 70 sind, als auch solche für den Sigma-Faktor 38, der die generelle Stressantwort in *E. coli* reguliert. Eine solche doppelte Regulation könnte erklären, warum *yddG* möglicherweise in allen Wachstumsphasen der Zelle exprimiert wird. Auch für pUC19_*Pyeda* konnte eine konstitutive Expression nachgewiesen werden. Jedoch war diese selbst im besten Fall deutlich schwächer als im Konstrukt pUC19_*PyddG*. Teilweise war sie im Western Blot deswegen nicht mehr nachweisbar. Über den Promoter von *yeda* und dessen Regulation ist bisher nichts bekannt.

4.3 Durch Selektion von *E. coli* Genbanken gelang die Identifikation eines putativen Tryptophanexporters

Zu Identifikation von Tryptophanexportern in *E. coli* wurden parallel zwei Ansätze verfolgt. Eine ungerichtete Mutagenese kombiniert mit der Selektion auf Resistenz gegen das toxische Tryptophananalogon 5MTrp wurde begleitet von einem klassischen, gerichteten Ansatz der Mutagenese durch bioinformatische Suche nach bekannten, sekundär aktiven Transportern mit lipophilem Substratspektrum und anschließender Deletion bzw. Überexpression der Kandidaten. Dabei zeigten sich teilweise Überschneidungen, die die einzelnen Ergebnisse bestätigen.

Für die Selektion resistenter Spontanmutanten mittels toxischer Aminosäureanaloge wurde in dieser Arbeit 5MTrp benutzt, welches bei *E. coli* bereits in Konzentrationen von 20 bis 50 μM zu einer deutlichen Inhibition des Wachstums führte. Die Selektion erfolgte hierbei in Anwesenheit erhöhter 5MTrp-Konzentrationen anhand des Wachstumsphänotyps. Dabei konnte die Inaktivierung der Aufnahme als mögliche Ursache der Resistenz ausgeschlossen werden. Dies geschah, indem man die Klone auf ihr Wachstum in Anwesenheit von Tryptophan als einziger N-Quelle testete, welches bei allen sechs isolierten Klonen noch möglich war. Es war also möglich, Klone zu isolieren, die eine Resistenz gegen 5MTrp aufwiesen und deren Resistenz nicht auf einer Inaktivierung der Aufnahme beruhte.

Um Gene zu identifizieren, deren Expression eine solche Resistenz verleihen konnte, wurden die von Frank Schneider (Evonik Degussa GmbH) zur Verfügung gestellten *E. coli*-Genbanken in den Plasmiden pBR322 und pMW218 benutzt. Transformierte man diese in *E. coli*, so konnten sofort Klone isoliert werden, die eine erhöhte 5MT-Resistenz aufwiesen. Die Genbanken erlauben die Expression des jeweils im transformierten Plasmid enthaltenen Genomfragments. Dies stellte sicher, dass die Resistenz nicht durch die Inaktivierung der Tryptophanaufnahme erreicht wurde.

Zu Beginn wurde die Transformationseffizienz der beiden Genbanken getestet. Im Fall von pBR322 konnte eine 1,5-fache Abdeckung des Genoms erreicht werden, bei pMW218 betrug der Faktor 0,95, was als ausreichend angesehen wurde. Ein parallel durchgeführter Test zur Rückgewinnung einer spezifischen Genfunktion – hier *lacZ* – durch Transformation mit den Genbanken verlief ebenfalls zufrieden stellend.

Die Transformation der Genbanken mit anschließender Selektion auf 5MTrp lieferte ca. 80 Klone, die eine Resistenz aufwiesen. Diese wurden einer weiteren Selektion auf einer höheren Konzentration von 5MTrp unterzogen, wobei die Resistenz in 16 Klonen verifiziert werden konnte. Nach Präparation der Plasmide wurden diese zunächst durch einen spezifischen

Diskussion

Verdau kontrolliert. Anschließend wurden 12 Plasmide sequenziert, um die darin enthaltenen Genomfragmente zu bestimmen. Dabei zeigte sich, dass in dem Großteil der sequenzierten Plasmide Gene kloniert waren, die für Enzyme der Tryptophansynthese codierten. Lediglich in 3 der 12 Plasmide waren Gene für Transporter kloniert. Abbildung 4-1 zeigt eine Übersicht der identifizierten Enzyme.

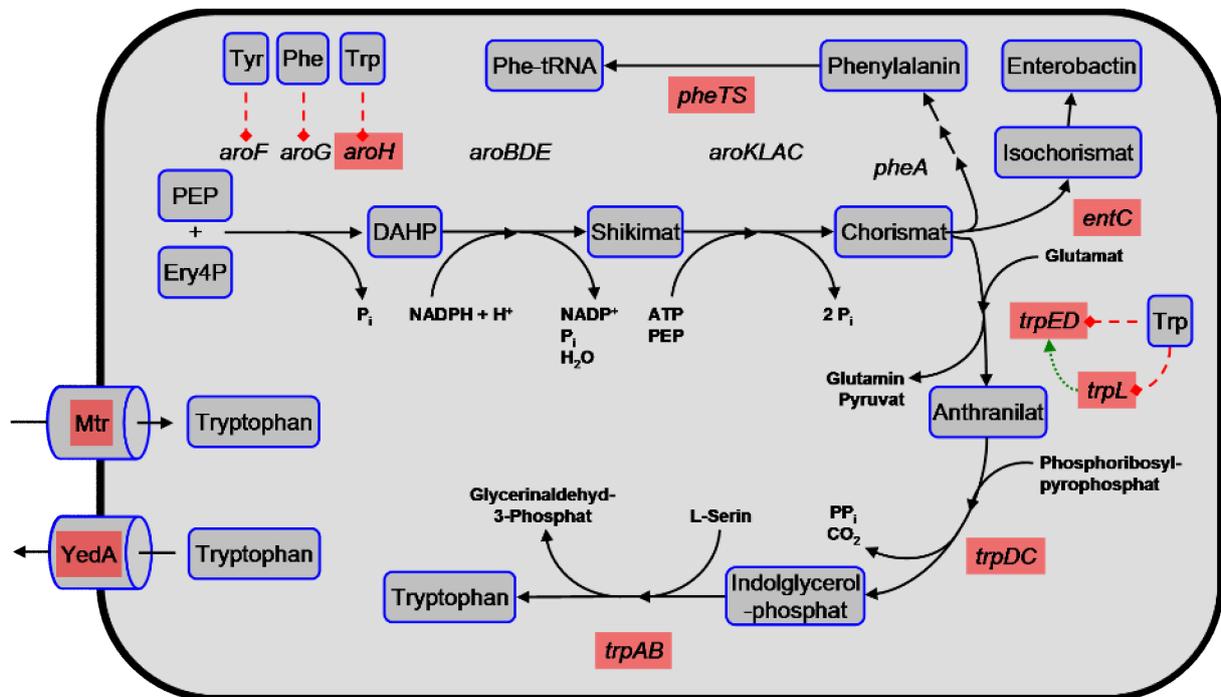


Abbildung 4-1: Schema ausgewählter Aspekte der Synthese und des Transports von Tryptophan in *E. coli*. Rot hervorgehoben sind Gene, die in Plasmiden der Genbanken in pBR322 und pMW218 eine Resistenz gegen 5MTrp verliehen. Weitere Erläuterungen siehe **Abbildung 1-1**.

Die toxische Wirkung von 5MTrp beruht wahrscheinlich darauf, dass es als Inhibitor der Tryptophansynthese beim Wachstum auf Minimalmedium einen Tryptophanmangel in der Zelle verursacht. Dies erklärt, warum so viele Gene aus der Tryptophansynthese bei der Selektion der Genbanken gefunden wurden. Durch die Erhöhung der Kopienzahl von *aroH*, *trpLEDC* bzw. *trpAB* war es den Zellen offensichtlich möglich, trotz der Repression durch 5MTrp noch genug Tryptophan zu synthetisieren, um Wachstum und Teilung zu erlauben.

Im Fall von *pheTS* und *entC* ist eine solche Erklärung jedoch nicht möglich. Es ist bekannt, dass die DAHP-Synthase AroH durch Tryptophan oder dessen Analoga nur zu 60 % inhibierbar ist (HUDSON *et al.*, 1991). Ihre Isoenzyme AroF und AroG werden nur durch ihre korrespondierenden Aminosäuren gehemmt. Der unspezifische Teil der Synthese aromatischer Aminosäuren wird somit durch 5MTrp nur gering inhibiert. Da die Inhibition von TrpED jedoch sehr strikt ist könnte es sein, dass die gesteigerte Expression von *pheTS* bzw. *entC* eine Akkumulation von Chorismat verhindert.

Diskussion

Neben Synthesenzymen wurden auch zwei Gene, die für Membranproteine codieren gefunden. Ein Plasmid enthielt einen Genomabschnitt, in dem *mtr* codiert war. Mtr ist als Tryptophanimporter hoher Affinität beschrieben, dessen Hauptsubstrat jedoch Indol ist. Die Resistenz gegen 5MTrp könnte in diesem Fall darauf beruhen, dass durch die gesteigerte Aktivität von Mtr genug Indol aufgenommen wird, um nach Umsetzung durch TrpAB eine für das Wachstum ausreichende Versorgung mit Tryptophan zu gewährleisten. Eine Indolquelle könnte dabei 5MTrp selbst sein. Die Verbindung ist photosensitiv und während der Herstellung und Beimpfung der Platten könnte genug 5MTrp zerfallen, um den Zellen daraus die Synthese von Tryptophan zu erlauben.

Weiterhin wurde in zwei Plasmiden das Gen *yedA* gefunden. Es codiert für ein bisher schlecht charakterisiertes Membranprotein von 32 kD, für das 10 Transmembrandomänen vorhergesagt wurden. Laut einer Patentschrift von LIVSHITS *et al.* (2007) führt die Expression von *yedA* in einem Produktionsstamm für Phenylalanin zu einer erhöhten Akkumulation der Aminosäure im Medium. Dies könnte bedeuten, dass YedA 5MTrp exportieren kann und damit evtl. auch Tryptophan. Um dies zu prüfen wurden Expressionskonstrukte für *yedA*, sowie das Genbankplasmid pBR322-4 (*yedA*) benutzt, um die vermutete Exportfunktion von YedA zu untersuchen (siehe 4.6). Es war möglich, die Exportfunktion von YedA für Tryptophan nachzuweisen. Daraus konnte geschlussfolgert werden, dass die Resistenz gegen 5MTrp bei diesen Plasmiden der Genbanken auf einer Verringerung der internen Konzentration von 5MTrp beruhte.

Interessant war, dass *yddG* bei diesem Screening nicht gefunden wurde. YddG wurde ja bereits als Exporter aromatischer Aminosäuren beschrieben und diese Funktion konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals auch biochemisch nachgewiesen werden. Es blieb zu klären, ob YddG 5MTrp nicht transportierte oder ob es lediglich aus statistischen Gründen beim Screening der 12 isolierten Klone nicht auftauchte. Da das Expressionskonstrukt pUC19_*PyddG* in den Resistenztests mit 5MTrp jedoch eine ähnlich hohe Resistenz verlieh, wie beispielsweise das Genbankplasmid pBR322-4 (*yedA*) war anzunehmen, dass YddG auch 5MTrp exportieren konnte.

4.4 Die Beteiligung von Multidrug Exportern am Tryptophanexport bleibt unklar

Im Rahmen der gerichteten Mutagenese wurden gezielt Deletionen putativer Tryptophantransporter erstellt. Die hierfür ausgewählten Kandidaten wurden in der Literatur

Diskussion

als Exporter mit einem Spektrum lipophiler Substrate beschrieben. Im Hinblick auf die Substrate wurden besonders Methylviologen und p-Hydroxybenzoesäure dabei berücksichtigt, da sie eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu Tryptophan aufweisen (Abbildung 4-2). Methylviologen wurde als Substrat des vorgeschlagenen Exporters aromatischer Aminosäuren YddG beschrieben (DOROSHENKO *et al.*, 2007). p-Hydroxybenzoesäure weist wie Tryptophan stark hydrophobe Bereiche durch den aromatischen Ring auf, sowie eine hydrophile Carbonsäuregruppe.

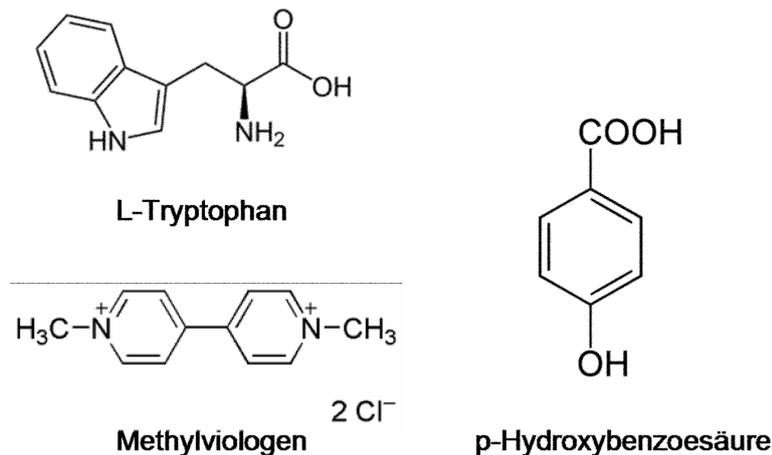


Abbildung 4-2: Strukturformeln ausgewählter lipophiler Substrate putativer Tryptophanexporter im Vergleich zu L-Tryptophan.

Daraufhin wurden Deletionen der Kandidaten *emrE*, *tolC*, *aaeXAB*, *yddG* und *yedA* erstellt und in der Dipeptidfütterung getestet.

Das Gen *emrE* codiert für einen sekundär aktiven Transporter der DMT Superfamilie mit einem breiten Spektrum stark lipophiler Substrate wie z.B. Methylviologen (MORIMYO *et al.*, 1992), was eine Übereinstimmung mit dem Substratspektrum des bereits beschriebenen YddG darstellt. Über die Regulation der Expression von *emrE* ist bisher noch nichts bekannt. Der Stamm $\Delta emrE$ zeigte in der Dipeptidfütterung keinen auffälligen Phänotyp im Sinn einer verstärkten internen Akkumulation von Tryptophan. Sollte *emrE* jedoch nur einer von mehreren redundanten Tryptophanexportern sein, so wäre auch nicht zwangsläufig mit einem Effekt in der Dipeptidfütterung zu rechnen gewesen.

Das in der äusseren Membran lokalisierte Protein TolC ist zwar als Kanal für Peptide annotiert (BENZ *et al.* 1993), ist jedoch auch wichtig für den Cysteinexport in *E. coli*. Dabei spielt die für TolC sonst als Hauptmerkmal der Funktionalität angesehene Interaktion mit AcrAB oder AcrEF, die in der inneren Membran lokalisiert sind, keine Rolle (WIRIYATHANAWUDHIWONG *et al.*, 2009). Die Expression von *tolC* ist komplex reguliert, da vier benachbarte Promoterbereiche über verschiedene Steuermechanismen

aktiviert werden können (ZHANG *et al.*, 2008). Ob diese verschiedenen Steuermechanismen auch mit verschiedenen Funktionen von TolC in Verbindung stehen ist nicht klar. So wurde beispielsweise bei den Effluxpumpen, die TolC zusammen mit AcrAB und AcrEF bildet nachgewiesen, dass sie konstitutiv exprimiert werden (TOUZÉ *et al.*, 2004). TolC in seiner Funktion als Cystein- und vermutet Tryptophanexporter müsste also konstitutiv exprimiert werden, da ja nachgewiesen wurde, dass der Tryptophanexporter konstitutiv exprimiert wurde. Wie schon im Fall von *ΔemrE* zeigte sich auch bei *ΔtolC* in der Dipeptidfütterung kein Phänotyp eines deletierten Tryptophanexporters.

Die von *aaeXAB* codierte Effluxpumpe wird durch ihr wichtigstes Substrat p-Hydroxybenzoesäure induziert (VAN DYCK *et al.*, 2004). Sie exportiert weiterhin andere aromatische Carbonsäuren und könnte somit auch Tryptophan transportieren. Im Test durch Dipeptidfütterung mit *ΔaaeXAB* im *ΔtnaAB*-Hintergrund zeigte sich kein Phänotyp.

Um das noch recht unklare Bild der Beteiligung der in dieser Arbeit untersuchten Kandidaten am Export von Tryptophan aufzuhellen, könnten DNA-Mikroarrays angefertigt werden. Dabei sollten die Expressionslevels in Zellen untersucht werden, die beispielsweise in Anwesenheit von 5MTrp oder Methylviologen, inkubiert wurden. Methylviologen wurde bereits als Substrat potentieller Tryptophanexporter wie EmrE und YddG beschrieben. Für potentielle Tryptophanexporter sollte sich so möglicherweise eine Steigerung der Expression nachweisen lassen. HIRAKAWA *et al.*, (2005) konnten in einem ähnlichen Ansatz in Anwesenheit von Indol die Steigerung der Expression ausgewählter *Multi-Drug*-Exporter, wie z.B. *acrEF*, nachweisen. Sollte sich in einem DNA-Mikroarray unter geeigneten Bedingungen eine erhöhte Expression bestimmter, für Membranproteine codierender Gene einstellen, so sollte diese in Expressionskonstrukten auf eine Beteiligung am Export von Tryptophan getestet werden.

4.5 YddG exportiert Tryptophan und andere aromatische Aminosäuren

Das Protein YddG wurde bereits als Exporter beschrieben und soll neben Tryptophan auch die anderen aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin exportieren (DOROSHENKO *et al.*, 2007). Allerdings wurden dabei für Tryptophan nur geringe Einflüsse bei der Deletion von *yddG* nachgewiesen. Daraus folgt die Annahme, dass YddG, auch wenn es am Export von Tryptophan beteiligt ist, nicht der einzige Exporter sein kann. Dies wurde durch die Dipeptidfütterung im Deletionsstamm *ΔtnaAB* pKD4-*ΔyddG* bestätigt. Es kam dabei zu keiner gegenüber dem Referenzstamm gesteigerten Akkumulation von

Diskussion

Tryptophan in den Zellen. Beide Stämme akkumulierten ca. 20 min nach Zugabe des Dipeptids eine gleich hohe Menge von Tryptophan, welche zum Ende der Messung auf ein geringes Niveau abfiel. Das hieß, es muss noch alternative Tryptophanexporter geben, welche den Ausfall von YddG voll kompensieren konnten. Durch Untersuchung von Expressionskonstrukten kann der störende Einfluss redundanter Systeme umgangen werden. Dazu wurden verschiedene Expressionskonstrukte in den Vektor pUC19 kloniert. Es konnte jedoch nur im Vektor pUC19_PyddG eine stabile Expression erreicht werden. In diesem Vektor war neben der Gensequenz von *yddG* noch der *upstream* des Gens gelegene Bereich einschließlich des nativen Promoters enthalten.

Die Untersuchung von YddG bei Expression durch pUC19_PyddG in der Dipeptidfütterung zeigte den Phänotyp eines gesteigerten Exports. Der Referenzstamm *E. coli ΔtnaAB* pUC19 lieferte das bekannte Bild von paralleler Aufnahme des Dipeptids und Exkretion von Tryptophan bei gleichzeitiger interner Akkumulation von Tryptophan. Mit *E. coli ΔtnaAB* pUC19_PyddG wurde lediglich eine halb so hohe Akkumulation erreicht, die zum Ende der Messung auf einen geringen Wert abfiel. Dass bei der Entwicklung der externen Konzentrationen keine Abweichungen festzustellen waren hing mit der Aufnahme des Dipeptids zusammen. Diese stellt, wie bereits beschrieben den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Tryptophanexkretion dar.

Unterstützt wurden die Erkenntnisse der Dipeptidfütterung durch die Exportmessungen mit radioaktiv markiertem Tryptophan im Stamm *E. coli* pKD4-*tnaA* pUC19_PyddG. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass sich das Fließgleichgewicht der internen Tryptophanakkumulation auf einem gegenüber dem Referenzstamm deutlich verringerten Niveau einstellte. Wie schon bei der Dipeptidfütterung lag auch hier die intern akkumulierte Tryptophanmenge bei Expression von *yddG* um ca. 50 % unter der des Referenzstammes. Die Geschwindigkeit des Exports konnte in diesem Versuch nicht bestimmt werden. Allerdings zeigte das verringere Niveau der Akkumulation im Fließgleichgewicht schon, dass im Expressionsstamm der Export gegenüber dem Import verstärkt sein musste. Damit wurde zum ersten Mal die Beteiligung von YddG am Export von Tryptophan direkt nachgewiesen.

Unterstützt wurde diese Erkenntnis durch Ergebnisse aus den Resistenztests. Im Deletionsstamm *E. coli ΔyddG* konnte keine höhere Sensitivität gegenüber der Referenz nachgewiesen werden. Dies lag zum einen am Wachstum des Referenzstammes, welches schlechter als erwartet war. In Anwesenheit der minimalen 5MTrp-Konzentration von 20 μM wurde erwartet, dass der Referenzstamm noch eingeschränkt wachsen könnte, während Deletionen putativer Tryptophanexporter dazu bereits nicht mehr fähig sein sollten. Es zeigte

Diskussion

sich jedoch, dass keiner der unter diesen Bedingungen getesteten Stämme noch ein signifikantes Wachstum aufwies. Nimmt man an, dass es mehrere redundante Tryptophanexporter gibt, so wäre bei den Resistenztests nicht unbedingt mit einem Effekt bei Deletion eines einzelnen Exporters zu rechnen gewesen. Das entspräche den Erkenntnissen aus der Dipeptidfütterung mit *E. coli* Δ *tnaAB* pKD4-*YyddG*, in der ebenfalls kein Effekt erzielt wurde.

Bei Expression von *yddG* war es den Zellen allerdings möglich, auch in Gegenwart einer hohen 5MTrp-Konzentration noch zu wachsen. Während im Referenzstamm *E. coli* pUC19 bereits mit der geringsten Konzentration (20 μ M) eine nahezu komplette Inhibition des Wachstums erreicht wurde konnte der Stamm *E. coli* pUC19-*PyddG* auch in Gegenwart von 120 μ M noch 40 % der OD₆₀₀ erreichen, die bei Wachstum ohne Inhibitor möglich war. In der Dipeptidfütterung und in radioaktiven Exportmessungen konnte eine Verringerung der internen Tryptophanakkumulation bei Expression von *yddG* nachgewiesen werden. Daraus wurde geschlussfolgert, dass die Resistenz gegen 5MTrp, welche die Expression verlieh, auf einer Verringerung der internen 5MTrp-Konzentration und damit wahrscheinlich auf dem Export dieser Substanz beruhte.

Ein weiteres Substrat von YddG ist wahrscheinlich 3FPhe und damit evtl. auch Phenylalanin. Der Stamm *E. coli* pUC19-*PyddG* zeigte beim Wachstum auf Gradientenplatten eine stark erhöhte Resistenz gegen 3FPhe, was im Hinblick auf die bisherigen Erkenntnisse wohl auch dem Export dieser Substanz zugeschrieben werden könnte. In der Arbeit von DOROSHENKO *et al.* (2007) wurde gezeigt, dass bei Expression von *yddG* in einem Phe Produktionsstamm eine geringere interne Phe-Konzentration nachzuweisen war. Diese Annahme könnte durch eine Dipeptidfütterung des Expressionsstammes mit Phenylalanin-haltigen Dipeptiden bzw. durch Exportmessungen mit markiertem Phenylalanin überprüft werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass *yddG* mit hoher Wahrscheinlichkeit für einen Exporter aromatischer Aminosäuren codiert. Bei Expression von *yddG* unter Kontrolle des nativen Promoters in pUC19 war die interne Tryptophanmenge sowohl in der Dipeptidfütterung als auch in Exportmessungen mit radioaktiv markiertem Tryptophan gegenüber dem Referenzstamm ohne Expression um ca. 50 % vermindert.

Neben Tryptophan transportiert YddG offensichtlich auch 5MTrp. Die Expression von YddG in pUC19-*PyddG* vermittelte *E. coli* eine gegenüber dem Wildtyp um den Faktor 6 erhöhte Resistenz gegen dieses toxische Tryptophananalogon. Ein weiteres Substrat stellt 3FPhe und damit wahrscheinlich auch Phenylalanin dar, welches den Expressionsstamm *E. coli*

pUC19_*PyddG* auch bei der maximal getesteten Konzentration von 3 mM nicht im Wachstum beeinträchtigte.

Proteine mit hoher Ähnlichkeit zu YddG aus *E. coli* sind in den Gattungen *Escherichia*, *Salmonella* und *Shigella* weit verbreitet. Eine BLAST-Suche ergab alleine in den genannten Gruppen mehr als 40 Treffer mit E-Werten $<1 \cdot 10^{-100}$, was für eine sehr hohe Übereinstimmung der Proteinsequenzen spricht. Dies deutet auf eine hoch konservierte Funktion des Proteins hin.

Die Verringerung der internen Tryptophanakkumulation in Dipeptidfütterung und radioaktiver Transportmessung bei Expression von YddG konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals nachgewiesen werden und impliziert die Funktion von YddG als Exporter von Tryptophan. Bestätigt wurde dies durch die erhöhte Resistenz des Expressionsstamms gegen 5MTrp. Die parallel beobachtete Resistenz gegen 3FPhe legt nahe, dass YddG auch andere aromatische Aminosäuren exportieren könnte.

4.6 YedA stellt einen weiteren Exporter für Tryptophan dar

Aus der Selektion von *E. coli* mit Hilfe der Genbank in pBR322 ging hervor, dass die Expression von *yedA* eine Resistenz gegen 5MTrp verlieh. Für YddG konnte bereits gezeigt werden, dass dessen Expression unter Kontrolle des nativen Promoters neben einer Resistenz gegen 5MTrp auch zu einer signifikanten Verringerung der internen Tryptophanakkumulation führte. Es wurde angenommen, dass die Expression von YedA einen ähnlichen Effekt haben könnte.

Zunächst wurde jedoch die Deletion von *yedA* in der Dipeptidfütterung untersucht. Dabei konnte keine signifikante Erhöhung der internen Tryptophanakkumulation nachgewiesen werden. Wie im Fall von *E. coli* *AtnaAB* pKD4-*ΔyddG* zeichnet auch hier die Redundanz mehrerer Exportsysteme wahrscheinlich verantwortlich für diese Beobachtung. Durch Versuche mit entsprechenden Expressionskonstrukten sollte es auch hier möglich sein, den maskierenden Effekt der Redundanz zu umgehen.

Zur Untersuchung der Exportfunktion von YedA wurden Messungen mit den alternativen Expressionssystemen pQE30_*yedA* bzw. pBR322-4 (*yedA*), in dem *yedA* zusammen mit seiner Genumgebung, also auch dem nativen Promoter, kloniert war, herangezogen. In diesen Vektoren konnte die Expression von *yedA* zwar nicht direkt nachgewiesen werden, doch traten oft deutliche physiologische Effekte auf, die der Expression zugeordnet werden konnten.

4.6.1 Untersuchung der Funktion von YedA bei Expression durch pQE30_yedA

Für pQE30_yedA war der Nachweis des im Vektor codierten His-Tags nicht möglich, allerdings zeigten Zellen, die mit dem Plasmid transformiert wurden eine charakteristische Akkumulation eines nicht näher identifizierten rosa Farbstoffes wenn sie bei Inkubation in Vollmedium in die stationäre Phase eintraten. Bei Transformation mit dem Leervektor pQE30 trat dieser Phänotyp nicht auf. Eine Identifikation der akkumulierten Substanz war auch mit Hilfe der Analysen, die vom Kooperationspartner dieser Arbeit, der Evonik Degussa GmbH, durchgeführt wurden nicht möglich. Mittels HPLC und GCMS-TOF konnte keine der vermuteten Substanzen Anthranilsäure, Hydroxy-Tryptophan, Indolessigsäure, Indolmilchsäure, Tryptamin oder Indol in erhöhter Konzentration nachgewiesen werden. Neben der Identifikation der Substanz blieb auch die Frage offen, warum diese bei der vermuteten Expression von yedA in der Zelle akkumuliert wurde. Bei der für YedA vorgeschlagenen Funktion als Exporter aromatischer Aminosäuren wäre eher mit einer Akkumulation der Substanz im Medium zu rechnen gewesen. Da dieser Phänotyp aber nur beim Konstrukt pQE30_yedA auftrat und nicht bei anderen Expressionskonstrukten wie z.B. pBR322-4 (yedA) oder -46 (yedA) konnte nicht definitiv geklärt werden, in welchem Zusammenhang zur Funktion von YedA er stand.

Für den Test von pQE30_yedA in der Dipeptidfütterung wurden stationäre Zellen des Expressionsstammes benutzt, da sie die charakteristische rosa Färbung aufwiesen, die als Indikator der Expression von yedA verstanden wurde. Im Vergleich zum Referenzstamm, der den Leervektor pQE30 trug, wurde eine verspätete und verringerte interne Akkumulation von Tryptophan beobachtet. Während im Referenzstamm die maximale Akkumulation von Tryptophan nach ca. 30 min erreicht wurde, wurde diese im Stamm *E. coli ΔtnaAB* pQE30_yedA erst nach 50 min erreicht. Gleichzeitig wurde im Expressionsstamm weniger als 50 % der Akkumulation des Referenzstammes erzielt. Auch in diesem Versuch entsprach die Konzentration exkretierten Tryptophans in beiden Ansätzen zu jedem Zeitpunkt dem Verbrauch des Dipeptids. Mit der Dipeptidaufnahme als geschwindigkeitsbestimmendem Schritt stellte die verringerte interne Tryptophanakkumulation einen deutlichen Nachweis des verstärkten Exports dar.

In den Resistenztests zeigte pQE30_*yedA* nur einen sehr schwachen Phänotyp. So war die Resistenz gegen 5MTrp gegenüber dem Referenzstamm nur marginal, wenn auch nachweislich, erhöht.

Der unterschiedliche Effekt, der in Dipeptidfütterung und Resistenztest beobachtet wurde, ist höchst wahrscheinlich mit der Wachstumsphase, in der die Zellen sich befanden zu erklären. Für die Dipeptidfütterung wurden stationäre Zellen, die den rosa Phänotyp zeigten, benutzt. In diesen Zellen sollte *yedA* stark exprimiert sein. Die für den Resistenztest benutzten Zellen wurden dagegen in frischem Medium auf eine sehr geringe Dichte angeimpft. Sie traten somit in die exponentielle Wachstumsphase ein und in dieser wurde pQE30_*yedA* möglicherweise nur schwach exprimiert. Aus dem gleichen Grund zeigte pQE30_*yedA* wohl auch in den Exportmessungen mit markiertem Tryptophan keinen Effekt. Die Messung des Exports in stationären Zellen stellt jedoch eine interessante Option dar und sollte in Zukunft noch durchgeführt werden.

4.6.2 Untersuchung der Funktion von YedA bei Expression durch pBR322-4 (*yedA*)

Deutlicher ausgeprägt waren die Merkmale eines exprimierten Exporters in dem aus der Selektion der Genbank isolierten Plasmid pBR322-4 (*yedA*). Dabei enthielt das Insert des Plasmids mit der Umgebung von *yedA* auch die *upstream* gelegene Region, in der sich der Promoter und mögliche Ribosomenbindestellen finden sollten. Die Expression von *yedA* unterlag in diesem Plasmid also der gleichen Regulation wie im Genom. Es bestand jedoch keine Möglichkeit, die Expression direkt nachzuweisen.

In der Dipeptidfütterung zeigte pBR322-4 (*yedA*) einen deutlichen Exportphänotyp. Die maximale Akkumulation betrug in Anwesenheit von pBR322-4 (*yedA*) nur 45 % der des Referenzstamms, wobei die benötigte Zeit zum Erreichen dieses Werts in beiden Stämmen gleich war. Aufnahme des Dipeptids und Exkretion von Tryptophan standen auch in diesem Versuch im Gleichgewicht. Da das Expressionsniveau von *yedA* in diesem Hintergrund nicht messbar war, kann nicht gesagt werden, ob noch eine Steigerung dieses Effektes bei Optimierung der Expression möglich wäre.

Die Ergebnisse der Dipeptidfütterung mit *E. coli* Δ *tnaAB* pBR322-4 (*yedA*) konnten durch die Exportmessung mit radioaktiv markiertem Tryptophan bestätigt werden. In dieser Messung akkumulierte der Stamm *E. coli* pKD4- Δ *tnaA* pBR322-4 (*yedA*) in der 45-minütigen Beladungsphase nur 65 % der Menge, die der Referenzstamm aufnahm. Der Effekt war zwar schwächer ausgeprägt als bei *E. coli* pKD4- Δ *tnaA* pUC19-*PyddG*, aber trotzdem deutlich von

Diskussion

der Referenz verschieden. In der Exportphase erreichte *E. coli* pKD4-*AtnaA* pBR322-4 (*yedA*) nach etwa einer Minute ein Minimum der internen Tryptophanakkumulation. Der Referenzstamm benötigte dafür fast zwei Minuten. Aufgrund der zu geringen zeitlichen Auflösung der Messung konnte keine Kinetik und damit keine Aussage über die Geschwindigkeit des Exports gemacht werden. Das geringere Niveau des Fließgleichgewichts weist aber deutlich darauf hin, dass in Anwesenheit von pBR322-4 (*yedA*) der Export gegenüber dem Import verstärkt sein musste.

In den Resistenztests zeigte die Expression von *yedA* in keinem der untersuchten Konstrukte pUC19-*PyedA*, pQE30-*yedA* und pBR322-4 (*yedA*) einen Effekt beim Wachstum auf Gradientenplatten. Besonders im Fall von 3FPhe war dies überraschend, da die Expression von *yedA* laut LIVSHITS *et al.* (2007) zu einer erhöhten Akkumulation von Phenylalanin im Medium eines entsprechenden Produktionsstammes führen sollte.

Beim Wachstum in Flüssigkultur war jedoch ein deutlicherer Effekt zu beobachten. pBR322-4 (*yedA*) verlieh den Zellen die höchste Resistenz gegen 5MTrp, die in diesem Versuch nachgewiesen werden konnte. Im Vergleich zur Kultur ohne Zusatz von 5MTrp erreichte die OD₆₀₀ in Anwesenheit von 120 µM noch 60 % des maximal möglichen Wachstums. Dies war zu erwarten, da das Genbankplasmid bei der Selektion auf 5MTrp-Resistenz isoliert wurde. In Zusammenhang mit den Versuchen zum Export bestätigte dies jedoch nochmals die Annahme, dass Tryptophan ein Substrat von YedA ist.

Eine Idee, warum das Plasmid pBR322-4 (*yedA*) eine hohe Resistenz verlieh, während sie in anderen Expressionskonstrukten nur gering ausgeprägt war, bezog sich auf die Genumgebung von *yedA*. In den Plasmiden pBR322-4 (*yedA*) und -46 (*yedA*) der Genbank ist in den genomischen Inserts nicht nur *yedA*, sondern auch ein ca. 3,3 kb großer Bereich der Umgebung des Gens enthalten. Denkbar wäre es, dass YedA seine volle Funktionalität erst bei Interaktion mit einem weiteren Protein erlangt. Dieses könnte in der Nähe von *yedA* im Genom codiert sein. Allerdings liegen beide benachbarten Gene von *yedA* in entgegengesetzter Leserichtung zu diesem im Genom, was eine parallele Expression in einem Operon unwahrscheinlich macht. Das *downstream* von *yedA* gelegene Gen *vsr* codiert für eine Endonuclease (HENNECKE *et al.*, 1991) und hat damit höchst wahrscheinlich keinerlei Anteil an irgendwelchen Transportprozessen. *Upstream* von *yedA* liegt das Gen *yedI*. Das von ihm codierte Protein wurde bisher lediglich als konserviertes Membranprotein beschrieben. YedI besitzt laut Vorhersage fünf Transmembrandomänen und könnte damit potentiell in der Membran lokalisiert und an Transportprozessen beteiligt sein. Die genomische Organisation der Umgebung von *yedA* ist in den Gattungen *Escherichia*, *Shigella*, *Klebsiella* und

Salmonella sehr ähnlich, also konserviert. Dies könnte möglicherweise doch auf eine Interaktion von YedA und YedI hindeuten. Geklärt werden könnte diese Frage, indem ein Expressionskonstrukt, das nur *yedA* und den *upstream* gelegenen Genombereich bis zum Beginn der Sequenz von *yedI* enthält, in pBR322 kloniert würde. Wenn dabei die gleichen Effekte wie in Anwesenheit von pBR322-4 (*yedA*) auftreten wäre nachgewiesen, dass YedA alleine dafür verantwortlich ist.

Ähnlich wie bei YddG, konnte durch eine BLAST-Suche gezeigt werden, dass Proteine mit sehr hoher Ähnlichkeit (E-Werte $<1 \cdot 10^{-100}$) zu YedA in den Gattungen *Escherichia*, *Shigella*, *Klebsiella* und *Yersinia* weit verbreitet sind. Dies spricht für eine konservierte Funktion von YedA.

Durch die Senkung der internen Akkumulation von Tryptophan in der Dipeptidfütterung und den Exportmessungen mit markiertem Tryptophan bei Expression von *yedA*, konnte gezeigt werden, dass YedA am Transport von Tryptophan beteiligt sein sollte. Dies wurde durch die erhöhte Resistenz gegen 5MTrp in *yedA* Expressionsstämmen nochmals bestätigt. Die von LIVSHITS *et al.* (2007) implizierte Rolle beim Export von Phenylalanin ist aufgrund der mangelnden Resistenz gegen 3FPhe fraglich. Es ist anzunehmen, dass YedA neben YddG einen weiteren Tryptophanexporter in *E. coli* darstellt.

4.7 Tryptophan wird über weitere, noch unbekanntes Transporter exportiert

Für Expressionskonstrukte von *yddG* und *yedA* konnte bereits gezeigt werden, dass sie am Export von Tryptophan beteiligt sind. Weiterhin führte die Deletion nur eines der beiden Exporter zu keinem veränderten Bild in der Dipeptidfütterung. Daraufhin wurde eine Doppeldeletion der beiden Gene im *AtnaAB*-Hintergrund erstellt, um zu klären, ob damit der Export komplett unterbunden werden konnte. Da im Stamm *E. coli AtnaAB ΔyddG pKD4-ΔyedA* in der Dipeptidfütterung eine sofortige Exkretion von Tryptophan mit Aufnahme des Dipeptids einsetzte, muss davon ausgegangen werden, dass es noch mindestens einen weiteren Exporter gibt.

Die Regulation dieses noch unbekanntes Kandidaten scheint, wie die Beobachtungen aus der Dipeptidfütterung nahe legen, nicht von der internen Tryptophankonzentration abzuhängen. Es kam zu keiner verstärkten internen Akkumulation von Tryptophan nach Zugabe des Dipeptids und zu keiner Verzögerung der Exkretion von Tryptophan ins Medium. Beides wären Hinweise auf eine Induktion des noch unbekanntes Exporters in Anwesenheit hoher interner Tryptophankonzentrationen gewesen.

Diskussion

Betrachtet man die Angaben der Literatur, so wurden beispielsweise bei DOROSHENKO *et al.* (2007) von allen getesteten aromatischen Aminosäuren für Tryptophan die geringsten Steigerungen der Ausbeute bei Expression von *yddG* nachgewiesen. Da in den Deletionsstämmen von *yddG* und *yedA* und in der Doppeldeletion keine signifikante Akkumulation von Tryptophan in der Dipeptidfütterung zu sehen war, muss man annehmen, dass der noch unbekannt Exporter eine große Kapazität besitzen muss und konstitutiv exprimiert oder zumindest nicht spezifisch durch Tryptophan induziert wird. Es wäre sehr interessant, im Hintergrund der Doppeldeletion ein DNA Microarray-Experiment durchzuführen, um zu untersuchen, ob es in diesem Stamm in Anwesenheit von Tryptophanhaltigen Peptiden bzw. Tryptophan zu einer Steigerung der Induktion bestimmter Gene kommt. Auch die Erstellung einer Genbank in diesem genetischen Hintergrund und die anschließende Selektion auf 5MTrp-Resistenz könnte die Identifikation noch unbekannter Tryptophanexporter erlauben.

5 Literatur

ABE, S., TAKAYAMA, K., KINOSHITA, S. (1967). Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **13**: 279-301

ALESHIN, V. V., ZAKATAEVA, N. P., LIVSHITS, V. A. (1999). A new family of amino-acid-efflux proteins. *Trends Biochem Sci.* **24(4)**:1 33-5.

ALTENDORF, K. H., STAEHELIN, L. A. (1974) Orientation of membrane vesicles from *Escherichia coli* as detected by freeze-cleave electron microscopy. *J. Bacteriol.* **117**: 888-899

BABA, T., ARA, T., HASEGAWA, M., TAKAI, Y., OKUMURA, Y., BABA, M., DATSENKO, K.A., TOMITA, M., WANNER, B.L., MORI, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* **2**:2006.0008

BENZ, R., MAIER, E., GENTSCHIEV, I. (1993). TolC of *Escherichia coli* functions as an outer membrane channel. *Zentralbl Bakteriol.* **278(2-3)**: 187-96.

BHARTIYA, S., CHAUDHARY, N., VENKATESH, K. V., DOYLE, F. J., (2006). Multiple feedback loop design in the tryptophan regulatory network of *Escherichia coli* suggests a paradigm for robust regulation of processes in series. *J. R. Soc. Interface* **3**, 383–391

BLATTNER, F. R., PLUNKETT, G. 3rd., BLOCH, C. A., PERNA, N. T., BURLAND, V., RILEY, M., COLLADO-VIDES, J., GLASNER, J. D., RODE, C. K., MAYHEW, G. F., GREGOR, J., DAVIS, N. W., KIRKPATRICK, H. A., GOEDEN, M. A., ROSE, D. J., MAU, B., SHAO, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277(5331)**: 1453-62

BURKOVSKI, A., KRÄMER, R. (2001). Bacterial amino acid transport proteins: occurrence, functions and significance for biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* **58**: 265-274

BUSS, K., MÜLLER, R., DAHM, C., GAITATZIS, N., SKRZYPCZAK-PIETRASZEK, E., LOHMANN, S., GASSEN, M., LEISTNER, E. (2001). Clustering of isochorismate synthase genes *menF* and *entC* and channeling of isochorismate in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta.* **1522(3)**:151-7.

BRÖER, S., KRÄMER, R. (1991). Lysine excretion by *Corynebacterium glutamicum*. 1. Identification of a specific secretion carrier system. *Eur J Biochem.* **202(1)**: 131-5

BROWN, K. D. (1970). Formation of aromatic amino acids pools in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **104(1)**: 177-88

CAMAKARIS, H., COWAN, P., PITTARD, J. (1998). Production of Tryptophan by the Bacterium *Escherichia coli*. *United States Patent*. Patent No.:5,756,345

- CHUNG, C. T., NIEMELA, S. L., MILLER, R. H. (1989).** One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86(7)**: 2172-5.
- COSGRIFF, A. J., BRAISER, G., PI, J., DOGOVSKI, C., SARSERO, J. P., PITTARD, A. J. (2000).** A study of AroP-PheP chimeric proteins and identification of a residue involved in tryptophan transport. *J Bacteriol.* **182(8)**: 2207-17.
- CREIGHTON, T. E., YANOFSKY, C. (1966).** Indole-3-glycerol phosphate synthetase of *Escherichia coli*, an enzyme of the tryptophan operon. *J Biol Chem.* **241(20)**: 4616-24.
- DAHM, C., MÜLLER, R., SCHULTE, G., SCHMIDT, K., LEISTNER, E. (1998).** The role of isochorismate hydroxymutase genes *entC* and *menF* in enterobactin and menaquinone biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **1425(2)**: 377-86
- DATSENKO, K.A., WANNER, B.L. (2000).** One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *PNAS.* **97**: 6640-6645
- DIESVELD, R., TIETZE, N., FÜRST, O., RETH, A., BATHE, B., SAHM, H., EGGELING, L. (2009).** Activity of Exporters of *Escherichia coli* in *Corynebacterium glutamicum*, and Their Use to Increase *L*-Threonine Production. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **16**:198-207
- DOROSHENKO, V., AIRICH, L., VITUSHKINA, M., KOLOKOLOVA, A., LIVSHITS, V., MASHKO, S. (2007).** YddG from *Escherichia coli* promotes export of aromatic amino acids. *FEMS Microbiol. Lett.* **275**: 312-318
- EDWARDS, R.M., YUDKIN, M.D. (1982).** Location of the gene for the low-affinity tryptophan-specific permease of *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **204**: 617-619
- FERGUSON, S.A., KEIS, S., COOK, G.M. (2006).** Biochemical and Molecular Characterization of a Na⁺-Translocating F₁F₀-ATPase from the Thermoalkaliphilic Bacterium *Clostridium paradoxum*. *J. Bacteriology.* **188**: 5045-5054
- FRALICK, J. A. (1996).** Evidence that TolC is required for functioning of the Mar/AcrAB efflux pump of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **178(19)**: 5803-5.
- FRANKE, I., RESCH, A., DASSLER, T., MAIER, T., BÖCK, A. (2003).** YifK from *Escherichia coli* promotes export of O-acetylserine any cysteine. *J. Bacteriol.* **185(4)**: 1161-6
- GOLLNICK, P., BABITZKE, P., ANSTON, A., YANOFSKY, C. (2005).** Complexity in regulation of tryptophan biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Genet.* **39**: 47-68.
- GRANT, S. G., JESSEE, J., BLOOM, F. R., HANAHAN, D. (1990).** Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87(12)**: 4645-9
- HAGINO, H., NAKAYAMA, K., (1975).** L-Tryptophan production by analog-resistant mutants derived from a phenylalanine and tyrosine double auxotroph of *Corynebacterium glutamicum*. *Agric. Biol. Chem.* **39**: 343-349

- HAMADA, A., HIBINO, T., NAKAMURA, T., TAKABE, T. (2001).** Na⁺/H⁺ Antiporter from *Synechocystis Species* PCC 6803, Homologous to SOS1, Contains an Aspartic Residue and Long C-Terminal Tail Important for the Carrier Activity. *Plant Physiology* **125**: 437-446
- HENNECKE, F., KOLMAR, H., BRÜNDL, K., FRITZ, H. J. (1991).** The *vsr* gene product of *E. coli* K-12 is a strand- and sequence-specific DNA mismatch endonuclease. *Nature* **353(6346)**: 776-8
- HIRAO, T., NAKANO, T., AZUMA, T., SUGIMOTO, M., and NAKANISHI, T. (1989).** L-Lysine production in continous culture of an L-lysine hyperproducing mutant of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 269-273
- HUANG, X., HOLDEN, H. M., RAUSHEL, F. M. (2001).** Channeling of substrates and intermediates in enzyme-catalyzed reactions. *Annu. Rev. Biochem.* **70**: 149–80
- HUDSON, G. S., RELLOS, P., DAVIDSON, B. E. (1991).** Two promoters control the *aroH* gene of *Escherichia coli*. *Gene* **102(1)**: 87-91
- IKEDA, M., TSUJI, H., NAKAMURA, S., ICHIYAMA, A., NISHIZUKA, Y., HAYAISHI, O. (1965).** Studies on the biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotide. II. A role of picolinic carboxylase in the biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotide from tryptophan in mammals. *J. Biol. Chem.* **240**: 1395–401
- IKEDA, M., KATSUMATA, R. (1995).** Tryptophan Production by Transport Mutants of *Corynebacterium glutamicum*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**: 1600-1602
- IKEDA, M., KATSUMATA, R. (1999).** Hyperproduction of Tryptophan by *Corynebacterium glutamicum* with the Modified Pentose Phosphate Pathway. *Appl. and Env. Mircobiol.* **65**: 2497-2502
- IBBA, M., SOLL, D. (2000).** Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu Rev Biochem.* **69**: 617-50.
- INOUE, H., NOJIMA, H., OKAYAMA, H. (1990).** *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28
- ITO, J., YANOFSKY, C. (1969).** Anthranilate synthetase, an enzyme specified by the tryptophan operon of *Escherichia coli*: Comparative studies on the complex and the subunits. *J Bacteriol.* **97(2)**: 734-42.
- KADNER, R. J. (1974).** Transport systems for L-methionine in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **117**: 232-241
- KAMAMOTO, A. A., MILLER, W. S. GUNSALUS, R. P. (1987).** *Escherichia coli* tryptophan repressor binds multiple sites within the *aroH* and *Tryptophan* operators. *Genes Dev.* **1**: 556-564
- KAWAMURA-SATO, K, SHIBAYAMA, K, HORII, T, IIMUMA, Y, ARAKAWA, Y, OHTA, M. (1999).** Role of multiple efflux pumps in *Escherichia coli* in indole expulsion. *FEMS Microbiol Lett.* **179**: 345-52

- KINOSHITA, S., UDAKA, S., SHIMONO, M. (1957).** Studies on the amino acid fermentation. Part I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **3**: 193-205
- KRÄMER, R. (1994).** Secretion of amino acids by bacteria. Physiology and mechanism. *FEMS Microbiol Rev* **13**: 75–94
- KUTUKOVA, E. A., LIVSHITS, V. A., ALTMAN, I. P., PTITSYN, L. R., ZYIATDINOV, M. H., TOKMAKOVA, I. L., ZAKATAEVA, N. P. (2005).** The *yeaS* (*leuE*) gene of *Escherichia coli* encodes an exporter of leucine and the Lrp protein regulates its expression. *FEBS Lett.* **579(21)**: 4629-34
- LAKOWICZ, J.R. (1999).** Principles of Fluorescence Spectroscopy. *Plenum Publishing Corporation*, 2. Ausgabe
- LEUCHTENBERGER, W. (1996).** Amino acids – technical production and use. In: Rehm, H.J., Reeds, G. (eds.) Product of primary metabolism. *Biotechnology, Vol 6. VCH, Weinheim, Germany.* pp. 455-502
- LINDROTH, P., MOPPER, K. (1979).** High performance liquid determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn derivatization with o-phthalaldehyde. *Anal. Chem.* **51**: 1667-1674
- LIVSHITS, V.A., VITUSHINKA, M.V., GUSYATINER, M.M., ZIYATDINOV, M.K., AKHVERDIAN, V.Z., SAVRASOVE, E.A., DOROSHENKO, V.G., MASHKO, S.V. (2007)** Escherichia bacteria transformed with a *yedA* homolog to enhance L-amino acid producing activity, and methods for producing an L-amino acid using same. **7259003** <http://www.freepatentsonline.com/7259003.html>
- LOMBARDI, F. J., KABACK, H. R. (1972).** Mechanisms of active transport in isolated bacterial membrane vesicles. 8. The transport of amino acids by membranes prepared from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **247** (24): 7844-57
- MA, D., COOK, D. N., ALBERTI, M., PON, N. G., NIKAIDO, H., HEARST, J.E. (1995).** Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **(1)**: 45-55
- MARIN, K., KRÄMER, R. (2007).** Amino Acid Transport Systems in Biotechnologically Relevant Bacteria. In: *Wendisch V (Hrsg) Amino Acid Biosynthesis, Springer Verlag Berlin Vol. 5*: 289-325
- McFALL, E.; NEWMAN, E.B. (1996).** Amino Acids as Carbon Sources. In: *Neidhardt, F.C. (ed) Escherichia coli und Salmonella. ASM Press, Washington.* pp. 358-380
- MOHRBACH, T., (2006).** Untersuchungen zum Import und Export von Tryptophan in *Corynebacterium glutamicum*. *Diplomarbeit im Fach Biologie an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln.*
- MORIMYO, M., HONGO, E., HAMA-INABA, H., MACHIDA, I. (1992).** Cloning and characterization of the *mvrC* gene of *Escherichia coli* K-12 which confers resistance against methyl viologen toxicity. *Nucleic Acids Res.* **20(12)**: 3159-65.

- MÜLLER, J. H., JOHNSON, E. R. (1940).** Acid Hydrolysates of Casein to replace peptone in the preparation of bacteriological media. *Journal of Immunology* **40**: 33-38
- NANDINENI, M. R., GOWRISHANKAR, J. (2004).** Evidence for an Arginine Exporter Encoded by *yddA* (*argO*) That Is Regulated by the LysR-Type Transcriptional Regulator ArgP in *Escherichia coli*. *J. Bact.* **186(11)**: 3539-3546
- NISHINO, K., YAMAGUCHI, A. (2001).** Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183(20)**: 5803-12.
- NOVAK, M. (2006).** Konstruktion und Analyse von *Escherichia coli* Genbanken. *Diplomarbeit, Fachhochschule Lippe und Höxter*
- O'GARA, J. P., DUNICAN, L. K. (1995).** Mutations in the *trpD* gene of *Corynebacterium glutamicum* confer 5-methyltryptophan resistance by encoding a feedback-resistant anthranilate phosphoribosyltransferase. *Appl Environ Microbiol.* **61(12)**: 4477-9
- PANINA, E. M., VITRESCHAK, A. G., MIRONOV, A. A., GELFAND, M. S. (2001).** Regulation of aromatic amino acid biosynthesis in gamma-proteobacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **3(4)**: 529-43.
- PALACÍN, M., NUNES, V., FONT-LLITJOS, M., JIMENEZ-VIDAL, M., FORT, J., GASOL, E., PINEDA, M., FELIUBADALO, L., CHILLARON, J., ZORZANO, A. (2005).** The Genetics of Heteromeric Amino Acid Transporters. *Physiology.* **20**: 112-124
- PAULSEN, I.T., BROWN, M.H., SKURRAY, R.A. (1996).** Proton-Dependent Multidrug Efflux Systems. *Microbiol. Reviews.* **60**: 575-608
- PI, J., WOOKEY, P. J., PITTARD, A. J. (1991).** Cloning and sequencing of the *pheP* gene, which encodes the phenylalanine-specific transport system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **173(12)**: 3622-9
- PITTARD, A. J. (1996).** Biosynthesis of Aromatic Amino Acids. In: *Neidhardt, F.C. (ed) Escherichia coli und Salmonella.* ASM Press, Washington. pp. 458-505
- PITTMAN, M. S., CORKER, H., WU, G., BINET, M. B., MOIR, A. J., POOLE, R. K. (2002).** Cysteine is exported from the *Escherichia coli* cytoplasm by CydDC, an ATP-binding cassette-type transporter required for cytochrome assembly. *J Biol Chem.* **277(51)**: 49841-9
- PULVERMACHER, S. C., STAUFFER, L. T., STAUFFER, G. V. (2008).** The role of the small regulatory RNA GcvB in GcvB/mRNA posttranscriptional regulation of *oppA* and *dppA* in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* **208 (1)**: 42-50
- QUICK, M., STÖLTING, S., JUNG, H. (1999).** Role of conserved Arg40 and Arg117 in the Na⁺/proline transporter of *Escherichia coli*. *Biochemistry.* **38(41)**: 13523-9.
- RAY, J. M., YANOVSKY, C., BAUERLE, R. (1988).** Mutational analysis of the catalytic and feedback sites of the tryptophan-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase of *Escherichia coli*. *J. Bactreiol.* **170(12)**: 5500-6

- ROSNER, J. L., STORZ, G. (1997).** Regulation of bacterial responses to oxidative stress. *Curr. Top. Cell. Regul.* **35**: 163-177
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. E., MANIATIS, T. (1989).** Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.*
- SARSERO, J. P., WOOKEY, P. J., PITTARD, A. J. (1991).** Regulation of expression of the *Escherichia coli* K-12 *mtr* gene by TyrR protein and Tryptophan repressor. *J. Bacteriol.* **173**: 4133–4143
- SARSERO, J. P., WOOKEY, P. J., GOLLNICK, P., YANOFSKY, C., PITTARD, A. J. (1991).** A new family of integral membrane proteins involved in transport of aromatic amino acids in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **173(10)**: 3231-4.
- SCHAECHTER, J. D., WURTMAN, R. J. (1990)** Serotonin release varies with brain tryptophan levels. *Brain Res.* **532**:203-10
- SCHÄGGER, H., VON JANOW, G. (1987).** Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379
- SCHULZ, H. (1979).** Sleep and wake-cycle as circadian rhythm. *Wien Klin Wochenschr Suppl.* **106**: 3-5.
- SOMERVILLE, R. L. (1983).** Tryptophan: biosynthesis, regulation, and large-scale production. In: *K. M. Herrmann and R. L. Somerville (ed.), Amino acids: biosynthesis and genetic regulation. Addison-Wesley, Reading, Mass.* pp. 351–378
- STUDIER, F. W., MOFFATT, B. A., (1986).** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* **189(1)**: 113-30.
- TOUZÉ, T., ESWARAN, J., BOKMA, E., KORONAKIS, E., HUGHES, C., KORONAKIS, V. (2004).** Interactions underlying assembly of the *Escherichia coli* AcrAB-TolC multidrug efflux system. *Mol Microbiol.* **53(2)**: 697-706.
- TOWBIN, H., STAEBLIN, T., GORDON, J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **76** (9): 4350–4354
- TRÖTSCHEL, C., DEUTENBERG, D., BATHE, B., BURKOVSKI, A., KRÄMER, R. (2005).** Characterization of Methionine Export in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol.* **187(11)**: 3786–3794
- TSYRENZHAPOVA, I. S., DOROSHENKO, V. G., AIRIKH, L. G., MIRONOV, A. S., MASHKO, S. V. (2009).** Gene *yddG* of *Escherichia coli* encoding the putative exporter of aromatic amino acids: constitutive transcription and dependence of the expression level on the cell growth rate. *Genetika.* **45(5)**: 601-9.
- UDAKA, S. (1960).** Screening method for microorganisms accumulating metabolites and its use in the isolation of *Micrococcus glutamicus*. *J. Bacteriol.* **79**: 754-755

- URBANOWSKI, M.L., STAUFFER, L.T., STAUFFER, G.V. (2000).** The *gcvB* gene encodes a small untranslated RNA involved in expression of the dipeptide and oligopeptide transport systems of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **37**: 856-868
- VAN DYK, T.K., TEMPLETON, L.J., CANTERA, K.A., SHARPE, P.L., SARIASLANI, F.S. (2004).** Characterization of the *Escherichia coli* AaeAB Efflux Pump: a Metabolic Relief Valve? *J. Bacteriol.* **186**: 7196-7204
- VRLJIC, M., SAHM, H., EGGELING, L. (1996).** A new type of transporter with a type of cellular function: L-lysine export in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* **22**: 815-826
- WEATHERALL, M.W., KAMMINGA, H. (1996).** The making of a biochemist: the construction of Frederick Gowland Hopkins' reputation. *Medical History* **Vol. 40**: 415-436
- WENDISCH, V. (Ed.) (2007).** Amino Acid Biosynthesis – Pathways, Regulation and Metabolic Engineering. Microbiology Monographs, **Vol. 5**. Springer, Berlin.
- WIRIYATHANAWUDHIWONG, N., OHTSU, I., LI, Z., D., MORI, H., TAKAGI, H. (2009).** The outer membrane TolC is involved in cysteine tolerance and overproduction in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **81(5)**: 903-13
- WOHLLEBEN, W., MUTH, G., KALINOWSKI, J. (1993).** Genetic engineering of gram positive bacteria. In: *Rehm, H. J., Reed, G., Pühler, A., Stadler, P. (eds.) Biotechnology, VCH, Weinheim, Germany.* **Vol. 2**. pp. 457-505
- YAMADA, S., AWANO, N., INUBUSHI, I., MAEDA, E., NAKAMORI, S., NISHINO, K., YAAGUCHI, A., TAKAGI, H. (2006).** Effect of drug transporter genes on cysteine export and overproduction in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* **72**: 4735-42.
- YANG, J., GUNASEKERA, A., LAVOIE, T. A., JIN, L., LEWIS, D. E., CAREY, J. (1996).** In vivo and in vitro studies of TryptophanR-DNA interactions. *J Mol Biol.* **258(1)**: 37-52.
- YANISH-PERRON, C., VIERA, J., MESSING, J. (1985).** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* **Bd. 33**, S. 103-119.
- YANOFSKY, C., HORN, V., BONNER, M., STASIOWSKI, S. (1971).** Polarity and enzyme functions in mutants of the first three genes of the tryptophan operon of *Escherichia coli*. *Genetics.* **69(4)**: 409-33.
- YANOFSKY, C., PLATT, T., CRAWFORD, I. P., NICHOLS, B. P., CHRISTIE, G. E., HOROWITZ, H., VAN CLEEMPUT, M., WU, A. M. (1981).** The complete nucleotide sequence of the tryptophan operon of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **9(24)**: 6647-68.
- YANOFSKY, C., HORN, V., GOLLNICK, P. (1991).** Physiological studies of tryptophan transport and tryptophanase operon induction in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **173(19)**: 6009-17

Literatur

YERUSHALMI, H., LEBENDIKER, M., SCHULDINER, S. (1995). EmrE, an *Escherichia coli* 12-kDa multidrug transporter, exchanges toxic cations and H⁺ and is soluble in organic solvents. *J Biol Chem.* **270(12)**: 6856-63.

ZAKATAEVA, N., P., ALESHIN, V., V., TOKMAKOVA, I., L., TROSHIN, P., V., LIVSHITS, V., A. (1999). The novel transmembrane *Escherichia coli* proteins involved in the amino acid efflux. *FEBS Lett.* **452(3)**: 228-32.

ZHANG, A., ROSNER, J.L., MARTIN, R., G. (2008). Transcriptional activation by MarA, SoxS and Rob of two *tolC* promoters using one binding site: a complex promoter configuration for *tolC* in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **69(6)**: 1450-5

6 Danksagung

Herrn Prof. Krämer möchte ich herzlich für die Bereitstellung des interessanten Themas und dafür danken, dass er mir ermöglicht hat, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Neben den interessanten und anregenden Diskussionen möchte ich mich auch für sein Engagement bezüglich der Unternehmungen der AG jenseits der Wissenschaft bedanken.

Frau Prof. Karin Schnetz danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats und die unkomplizierte Hilfe bei der einen oder anderen Tücke praktisch angewandter Genetik.

Großer Dank gilt auch Kay dafür, dass er immer ein offenes Ohr und eine praktische Idee bei jedem anfallenden Problem hatte. Danke für die gute Betreuung, die einzigartige Motivationstechnik und dafür, dass die letzte Tasse Kaffee immer brüderlich geteilt wurde.

Mechthild Rieping und Nicole Dusch von der Evonik Degussa GmbH danke ich für die gute Zusammenarbeit und konstruktive Kooperationstreffen.

Martin möchte ich dafür danken, dass er stets freundlich und besonnen war und es immer schaffte, mich durch geschickt platzierte Komplimente aufzumuntern. Auch unsere gemeinsamen Aktionen, wie die wilde Maibaumjagd in Ehrenfeld werde ich nie vergessen. Suey danke ich dafür, dass ich mit ihr über alles reden kann für das ein oder andere gemeinsame Anti-Frust-Shopping. Beiden möchte ich ganz herzlich dafür danken, dass wir nicht nur Arbeitskollegen, sondern gute Freunde wurden.

Meinen Laborkollegen danke ich für den schönen gemeinsamen Alltag und das entspannte Arbeitsklima. Ich danke Elena für ihren unerbittlichen Humor und ihre Zielstrebigkeit, Ines dafür, dass sie mich öfter „diese Musik“ hören lies, Jens für seine pragmatische Art und dass er mich auf den Geschmack von Pomelos gebracht hat und Steffi dafür, dass nichts sie aus der Ruhe bringt.

Auch allen anderen Kollegen, sowie unseren TAs und Sekretärinnen möchte ich herzlich für den freundlichen und harmonischen Arbeitsalltag, den wir miteinander teilten danken.

Ganz lieben Dank auch meiner Familie, die mir immer den Rücken gestärkt hat, meiner „Kölner Ersatzfamilie“ André, Kerstin und Niklas und natürlich ganz besonders Dennis. Ich liebe euch alle sehr und bin glücklich, dass ihr Teil meines Lebens seid.

7 Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. R. Krämer am Institut für Biochemie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln betreut worden.

Teilpublikationen:

keine

Köln, 5.12.2009

(Tobias Mohrbach)

8 Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Tobias Mohrbach
Geburtsdatum und Ort: 26.05.1980 in Neunkirchen/Saar
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Adresse: Klarastr. 27, 50823 Köln

Universitäre Laufbahn:

November 2006 – Februar 2010

Doktorarbeit am Institut für Biochemie der Universität zu Köln in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Krämer.

Thema: „Untersuchungen zum Export aromatischer Aminosäuren in *Escherichia coli*.“

Dezember 2005 - August 2006

Diplomarbeit am Institut für Biochemie der Universität zu Köln in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Krämer.

Thema: „Untersuchungen zum Import und Export von Tryptophan in *Corynebacterium glutamicum*.“

September 2000 – August 2005

Diplomstudiengang Biologie an der Universität zu Köln mit den Schwerpunkten Biochemie, Entwicklungsbiologie und Ökologie

Schulische Laufbahn:

August 1990 – Juni 1999

Besuch des Christian-von-Mannlich Gymnasiums in Homburg/Saar, Abschluss: Abitur

Juli 1986 – Juli 1990

Besuch der Grundschule Pestalozzistrasse, Schönenberg-Kübelberg

Sonstiges:

September 1999 – Juli 2000

Zivildienst im Blutspendedienst der Universitätsklinik in Homburg/Saar