

Threoninaufnahme und Threoninexkretion in
***Escherichia coli*: molekularbiologische,**
biochemische und biotechnologische Aspekte

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Daniela Kruse

aus Düsseldorf

Köln, Oktober 2000

Berichtersteller:

Prof. Dr. R. Krämer

Prof. Dr. H. W. Klein

Tag der Disputation:

11.12.2000

Threonine uptake and excretion in *E. coli*: molecular, biochemical and biotechnological aspects

Since 35 years amino acid production is in the focus of industrial microbiology. Glutamate and lysine are produced with *C. glutamicum*, while *E. coli* is used for threonine production. Putative interesting steps in strain improvement for threonine production are the uptake of this amino acid from the medium into the cytoplasm and the excretion into the medium.

Three uptake systems for threonine in *E. coli* have been described on the molecular level: LIV1, TdcC and SstT. SstT a Na⁺-dependent threonine / serine uptake system was described as the main threonine uptake system. We found, however, that deletion of this gene did not diminish the complete serine compatible threonine uptake activity. Additional threonine uptake systems were characterised on the functional level.

Two candidates for threonine exporters have been described in *E. coli*: RhtB and RhtC (resistance against homoserine and threonine). The genes for these putative transporters were both deleted and overexpressed in *E. coli* threonine production strains in order to study the function of the gene products and their relationship to threonine excretion. Moreover *thrE*, the gene for the threonine exporter of *C. glutamicum* was overexpressed in *E. coli* to test its function in a heterologous host. The effect of an increased threonine excretion and a diminished threonine uptake on the production process is discussed.

Threoninaufnahme und Threoninexkretion in *Escherichia coli*: molekularbiologische, biochemische und biotechnologische Aspekte

Escherichia coli wird zur industriellen Produktion von Threonin eingesetzt. Bei der Produktion spielen Transportprozesse durch die Zellmembran eine wichtige Rolle, da die Threoninaufnahme ein der Produktion entgegengesetzter Prozess ist und die Threoninexkretion limitierend sein kann. Ziel dieser Arbeit war deshalb die Analyse der Threonintransportprozesse in *E. coli* und deren Implikation in die Threoninproduktion. Eine gesteigerten Exkretionsrate und eine verringerten Aufnahmeaktivität sollte der Optimierung von Threoninproduktionsstämmen dienen.

In *E. coli* sind drei Threoninaufnahmesysteme molekular charakterisiert: LIV1, TdcC und SstT. Letzteres, ein Na⁺-abhängiges Threonin- / Serinaufnahmesystem, wurde als Hauptaufnahmesystem für Threonin beschrieben. Doch durch Deletion des *sstT*-Gens konnte nicht die komplette Threoninaufnahmeaktivität, die durch Serin kompetitierbar ist, ausgeschaltet werden. Diese Aufnahmeaktivität wurde auf funktioneller Ebene untersucht.

Für die zwei Proteine RhtB und RhtC ("*resistance against homoserine and threonine*") war die Funktion eines Threonin- und Homoserinexporters in *E. coli* zugewiesen worden. Die Gene für diese putativen Transporter wurden in Threoninproduktionsstämmen deletiert und überexprimiert, um die Funktion der Genprodukte und deren Implikation in die Threoninproduktion zu klären. *thrE*, das Gen für den Threoninexporter in *C. glutamicum*, wurde in *E. coli* überexprimiert, um zu überprüfen, ob es auch in einem heterologen Wirt seine Funktion ausübt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Industrielle Produktion von L-Threonin	1
1.2	Threoninmetabolismus in <i>E. coli</i>	3
1.3	Threoninkatabolismus in <i>E. coli</i>	5
1.4	Genealogie der verwendeten <i>E. coli</i> -Threoninproduktionsstämme	7
1.5	Aufnahme von Aminosäuren bei Prokaryoten	8
1.6	Exkretion von Aminosäuren bei Prokaryoten	10
2	Material und Methoden	14
2.1	Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	14
2.2	Bakterienstämme und Plasmide	15
2.3	Biochemische Methoden	18
2.3.1	Silikonölzentrifugation	18
2.3.2	Bestimmung von Aminosäurekonzentrationen mittels HPLC	18
2.3.3	Aufnahmemessungen	19
2.3.4	K_m -Wert Berechnung	20
2.3.5	Bestimmung von ATP-Konzentrationen	20
2.3.6	Bestimmung von Saccharose-Konzentrationen	21
2.4	Molekularbiologische Methoden	22
2.4.1	Techniken zur DNA-Rekombination	22
2.4.2	Präparation genomischer DNA aus <i>E. coli</i>	22
2.4.3	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	22
2.4.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	23
2.4.5	Transformation von <i>E. coli</i> -Wildtypzellen	23
2.4.6	Transformation / Plasmidkurierung von L-Threoninproduktionszellen	24
2.4.7	Polymerasekettenreaktion (PCR)	25
2.4.8	Sequenzierung von DNA und Sequenzanalyse	25
2.4.9	Konstruktion von Deletionen in <i>E. coli</i>	26
2.5	Fermentationstechnische Methoden	27
2.5.1	Einheitsmedium für fermentationstechnische Untersuchungen	28
2.5.2	Animpfschiene für Untersuchungen im Fermenter	28
2.5.3	Fermentationstechnische Untersuchungen	28
2.5.4	Bestimmung von Ausbeute, Selektivität und Produktivität	29

3	Ergebnisse	30
3.1	Charakterisierung der Threoninaufnahme	30
3.1.1	Die Threoninaufnahme des <i>E. coli</i> -Wildtypstammes DH5 α <i>mcr</i>	30
3.1.2	Die Threoninaufnahme der Threoninproduktionsstämme	31
3.1.3	Die Threoninaufnahme der <i>sstT</i> -Deletionsmutanten der Threoninproduktionsstämme	32
3.1.3.1	K_M -Bestimmung der Threoninaufnahme	35
3.1.3.2	K_T -Wert Bestimmung der Threoninaufnahme für Serin	37
3.1.4	Versuche zur molekularbiologischen Zuordnung der Threoninaufnahmeaktivitäten	38
3.1.5	Die Na ⁺ -Abhängigkeit der zwei Threoninaufnahmesysteme	39
3.2	Charakterisierung der Serinaufnahme	41
3.2.1	Die Serinaufnahme des <i>E. coli</i> -Wildtypstammes AN387	41
3.2.2	Die Serinaufnahme der <i>sstT</i> -Deletionsmutanten der Threoninproduzenten	41
3.2.3	Die Serinaufnahme des Stammes AN387 <i>yhao::Kan yhjv::Cam $\Delta o409 \Delta sstT$</i>	44
3.2.4	Die Na ⁺ -Abhängigkeit der zwei Serinaufnahmesysteme	44
3.3	Charakterisierung der Threoninexkretion	46
3.3.1	Deletionen von Genen putativer Threoninexporter	47
3.3.2	Überexpressionen von Genen putativer Threoninexporter	52
3.3.3	Überexpression von <i>thrE</i> , dem Gen für den Threoninexporter aus <i>C. glutamicum</i>	60
4	Diskussion	64
4.1	Die Threoninaufnahme	64
4.2	Das Threonin- / Serinaufnahmeaufnahmemeodell für <i>E. coli</i>	67
4.3	Threoninexkretion	68
5	Zusammenfassung	73
6	Literaturverzeichnis	74
7	Abbildungsverzeichnis	79
8	Tabellenverzeichnis	81

Abkürzungen

AHV	β -Hydroxynorvaline
Amp	Ampicillin
Antibiotikum ^R	resistent gegenüber Antibiotikum
ATCC	American Type Culture Collection
BTM	Biotrockenmasse
Cam	Chloramphenicol
FBR	„feed-back-resistent“, resistent gegenüber Endprodukthemmung
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid
Kan	Kanamycin
Nal	Nalidixinsäure
Strep	Streptomycin
TG	Trockengewicht
Tris	2-Amino-Hydroxymethylpropan-1,3-Diol

1 Einleitung

Mehr als eine Million Tonnen verschiedener Aminosäuren werden weltweit pro Jahr mit Hilfe von Bakterien produziert. Den Hauptanteil haben dabei L-Glutamat mit mehr als 1.000.000 t und L-Lysin mit mehr als 400.000 t pro Jahr (Kinoshita, persönliche Mitteilung). Auch L-Phenylalanin, L-Glutamin, L-Arginin, L-Tryptophan, L-Isoleucin, L-Histidin und L-Threonin werden im großtechnischen Maßstab hergestellt (Leuchtenberger, 1996). Die Anwendungsgebiete für Aminosäuren sind vielfältig. Neben Geschmacksverstärkern (L-Glutamat), Vorstufen für chemische Synthesen (L-Phenylalanin und L-Valin), Bestandteilen von Infusionen und diätetischen Produkten (L-Isoleucin, L-Valin und L-Leucin) werden Aminosäuren auch für pharmazeutische Zwecke (L-Histidin) oder als Futtermittelzusätze (L-Lysin und L-Threonin) eingesetzt. Die zur Aminosäureproduktion eingesetzten Organismen sind hauptsächlich *Corynebacterium* und *Brevibacterium* aber auch *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, diverse Hefearten und *Escherichia coli* (Abe *et al.*, 1967; Krämer, 1994).

L-Threonin ist eine für Vertebraten essentielle Aminosäure. Der Zusatz von Threonin zum Futter von Nutztieren steigert die Futtermittelverwertbarkeit, da Threonin zu den Aminosäuren gehört, die im Soja-Eiweiß und anderen Futterstoffen wenig vertreten sind (Furukawa *et al.*, 1988; Okamoto und Ikeda, 1998).

1.1 Industrielle Produktion von L-Threonin

L-Threonin kann durch chemische Synthese, durch Extraktion aus hydrolysierten Proteinen, durch fermentative Synthese und durch direkte Fermentation produziert werden. Bei der chemischen Synthese ist die Ausbeute der L-Form von Threonin gering, da alle vier optisch aktiven Isomere (D-, L-, D-*allo*, und L-*allo*) entstehen, in denen Threonin aufgrund seiner zwei asymmetrischen Kohlenstoffatome vorkommt. Zur Isolierung der L-Form aus dem Gemisch müssen die anderen drei optisch aktiven Formen durch Enzyme gespaltet werden, was die Kosten erhöht. Die Extraktion von L-Threonin aus Aminosäuregemischen ist sehr aufwendig und in größerem Maßstab problematisch (Okamoto und Ikeda, 1998). Daher ist die Extraktion nicht geeignet, L-Threonin wirtschaftlich zu produzieren. Die fermentative Synthese von L-Threonin aus L-Homoserin im industriellen Maßstab ist aufgrund des sehr teuren eingesetzten Substrates ebenfalls nicht rentabel (Okamoto und Ikeda, 1998).

Im Gegensatz dazu ist die Produktion von L-Threonin durch bakterielle Fermentation eine wirtschaftliche Methode, da günstige Ausgangsstoffe auf Zuckerbasis sowie anorganische Stickstoffverbindungen verwendet werden und stereospezifisch die biogene L-Form synthetisiert wird. Threoninproduktionsstämme sind unter anderem für *Brevibacterium flavum* (Shiio *et al.*, 1970), *Corynebacterium glutamicum* (Eikmanns *et al.*, 1991) und für *E. coli* (Shiio und Nakamori, 1969) beschrieben. Moderne Produktionsverfahren für Threonin verwenden *E. coli* in „batch“- und „fed batch“-Prozessen. Industrielle Verfahren erreichen auf diese Weise Threoninkonzentrationen von bis zu 85 g/l (Debabov *et al.*, 1992). Die Menge an produziertem L-Threonin beträgt weltweit mehr als 10.000 t pro Jahr (Okamoto und Ikeda, 1998), wobei die Nachfrage wie auch nach den anderen Aminosäuren stetig steigt (Crueger und Crueger, 1984).

In Wildtypstämmen verhindern Regulationsmechanismen die über den Eigenbedarf hinausgehende Produktion von Stoffwechselprodukten wie Aminosäuren und deren Abgabe ins Medium. Die Konstruktion Threonin überproduzierender Stämme erfordert deshalb, diese Stoffwechselregulationen zu überwinden. Die Beseitigung der Kontrollmechanismen kann sowohl durch ungerichtete Mutagenese der Stämme als auch durch einen mikrobiologisch-molekularbiologischer Ansatz, bei dem die gezielte Optimierung des eingesetzten Organismus angestrebt wird („metabolic design“), erreicht werden.

Bei der Stammentwicklung wird industriell auch heute noch überwiegend die ungerichtete Mutagenese angewandt. Seit den achtziger Jahren arbeiten jedoch zahlreiche Arbeitsgruppen an der gezielten Entwicklung von Aminosäureproduzenten (Übersichten bei: Bailey, 1991; Stephanopoulos und Vallino, 1991; Sahn, 1995; Jetten und Sinskey, 1995; Krämer, 1996; Sahn *et al.*, 1995). Das „metabolic design“ von industriell interessanten Stämmen basiert auf dem Verständnis der physiologischen Reaktionen bei der Produktion eines Metaboliten. Vier Aspekte sind dabei von besonderer Bedeutung: (1) Die Aufklärung der Stoffwechselwege und korrespondierenden Enzyme, (2) die Aufklärung der Regulation der Stoffwechselwege, (3) die quantitative Flussanalyse der Kohlenstoff- und Stickstoffflüsse und schließlich (4) die Analyse der beteiligten Transportvorgänge.

1.2 Threoninmetabolismus in *E. coli*

L-Threonin ist ein Mitglied der Aspartatfamilie, der auch L-Lysin, L-Methionin, L-Isoleucin und Diaminopimelat - ein Bestandteil der Peptidogluanschicht der Zellwand - angehören. Sie werden ausgehend vom L-Aspartat gebildet. Um in diesem verzweigten Weg eine ausgewogene Versorgung der Zelle mit allen Metaboliten zu gewährleisten, ist eine komplexe Regulation notwendig. In *E. coli* werden daher bei der von L-Aspartat ausgehenden Threoninsynthese alle fünf beteiligten Reaktionen auf genetischer und / oder enzymatischer Ebene reguliert (vgl. Abb. 1). Die Gene für die Threoninbiosyntheseenzyme (*thrABC*) sind in einem Operon organisiert, das sowohl durch L-Threonin als auch durch L-Isoleucin reprimiert wird (Neidhardt, 1996).

Für den ersten Biosyntheseschritt besitzt *E. coli* drei Isoenzyme der Aspartatkinase, die durch die Endprodukte L-Threonin, L-Isoleucin, L-Lysin und L-Methionin reguliert werden. Das für den Biosyntheseweg zum L-Threonin verantwortliche Enzym ist die Aspartatkinase I (ThrA), ein bifunktionelles Protein, das zusätzlich noch den dritten Biosyntheseschritt katalysiert. Dort wirkt es als Homoserindehydrogenase, die das Aspartatsemialdehyd zum L-Homoserin reduziert. L-Threonin inhibiert beide Aktivitäten des Proteins (Cohen, 1983; Cohen und Saint-Geront, 1987). Die Aspartatkinase II, verantwortlich für die Methioninsynthese, wird auf Transkriptionsebene durch L-Methionin reprimiert. Die Aktivität der für die Lysinsynthese zuständigen Aspartatkinase III wird durch L-Lysin inhibiert und die Expression des entsprechenden Gens (*lysC*) durch L-Lysin reprimiert. Der zweite Reaktionsschritt vom Aspartylphosphat zum Aspartatsemialdehyd wird von der Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase katalysiert. Die Expression des entsprechenden Gens (*asd*) wird durch L-Lysin reprimiert. L-Homoserin wird im vierten Biosyntheseschritt durch die Homoserinkinase (ThrB) mit einem Phosphat verestert. Diese Reaktion wird kompetitiv durch L-Threonin inhibiert. Die Pyridoxalphosphat-abhängige Threoninsynthese (ThrC) katalysiert den letzten Schritt der Threoninbiosynthese (Cohen, 1983; Cohen und Saint-Geront, 1987).

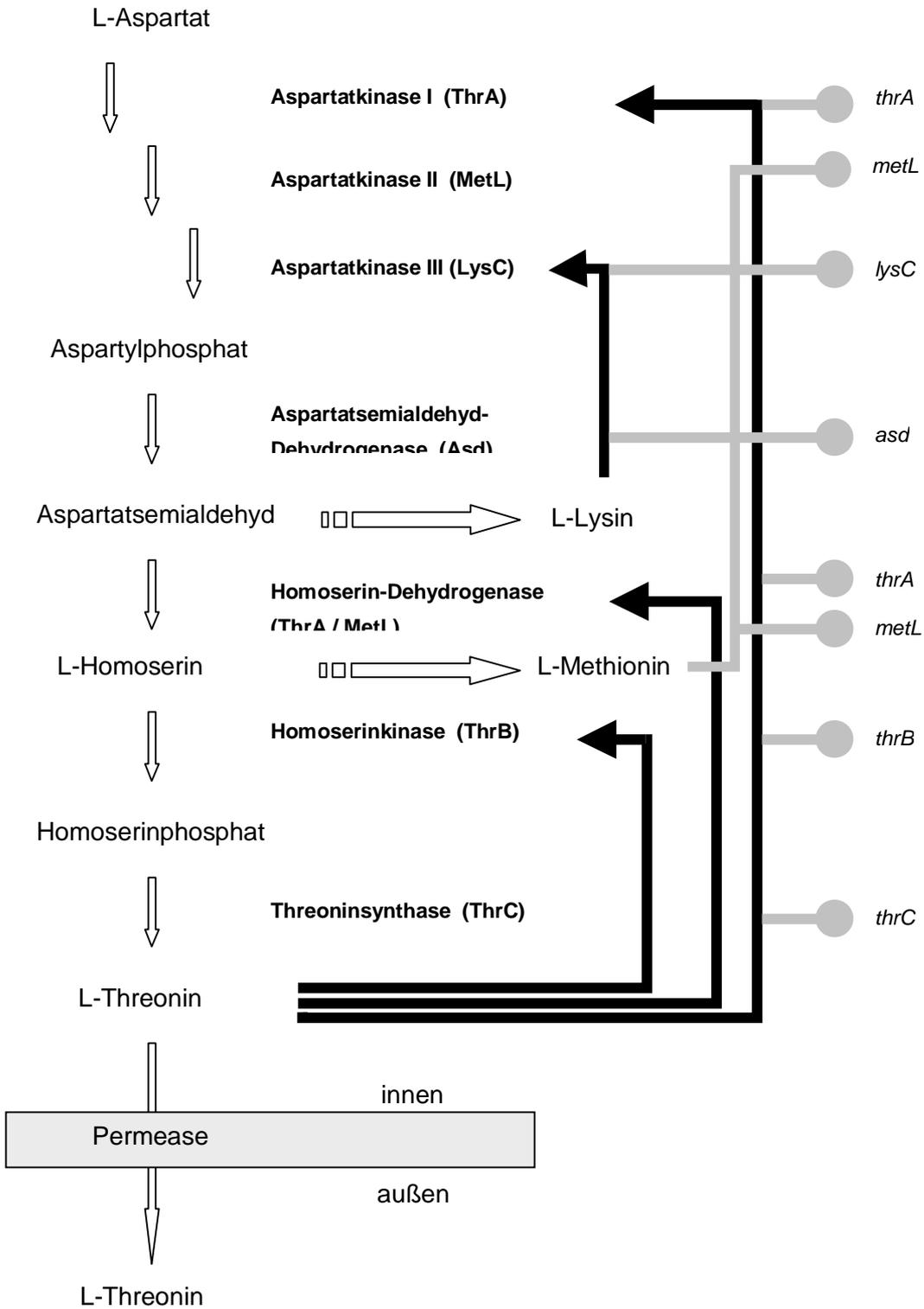


Abb. 1: Schema der Biosynthese von L-Threonin. Schwarze Pfeile repräsentieren Inhibierung der Enzyme, graue Kreise Repression der Gene

Die Regulation der Enzyme dieses Biosyntheseweges verhindert im *E. coli*-Wildtyp die Überproduktion von Threonin. Durch die Aufhebung von Regulationsmechanismen auf Proteinebene und die konstitutive plasmidkodierte Expression der Gene des Threoninoperons kommt es zu einer Deregulation des Stoffwechselweges. Ein deutlicher Anstieg der Threoninausbeute kann allerdings nur erreicht werden, wenn auch der Katabolismus von Threonin eingeschränkt wird.

1.3 Threoninkatabolismus in *E. coli*

In *E. coli* sind vier L-Threonin metabolisierende Enzyme beschrieben (vgl. Abb. 2). Zwei von ihnen, die biosynthetische bzw. biodegradative Threonin-Deaminase, auch Threonin-Dehydratase genannt, katalysieren die Reaktion von L-Threonin zu 2-Ketobutyrat (Umbarger und Brown, 1957). Das Produkt der biosynthetischen Threonin-Deaminase (IlvA) wird zur Isoleucinsynthese eingesetzt (Umbarger, 1978). Da jedoch die Aktivität dieser Deaminase schon durch geringe Mengen an Isoleucin inhibiert wird und 2-Ketobutyrat unter aeroben Bedingungen nicht als Kohlenstoffquelle benutzt wird, kann sie nicht für einen Threoninabbau verantwortlich sein, der produktionstechnisch relevant wäre (Neidhardt, 1996).

Der Abbau von L-Threonin zu Propionat wird durch Enzyme katalysiert, deren Gene im *tdcABCDEFG* Operon organisiert sind. Dieses Operon unterliegt der Kohlenstoffkatabolitenrepression und wird zudem nur unter anaeroben Bedingungen exprimiert. In diesem Stoffwechselweg wird L-Threonin über die biodegradative Threonin-Deaminase (TdcB), die Pyruvat-Formiat-Lyase (TdcE oder Pfl), die Phosphotransferase (Pta) und die Propionatkinase (TdcD oder AckA) unter ATP-Bildung zu Propionat umgebaut (Hesslinger *et al.*, 1998).

Das dritte bekannte L-Threonin metabolisierende Enzym, die Threonin-Aldolase, spaltet ihr Substrat in Acetaldehyd und Glycin (Marcus und Dekker, 1993). Die Aktivität dieses Systems ist in *E. coli* allerdings nicht detektierbar (Marcus und Dekker, 1993).

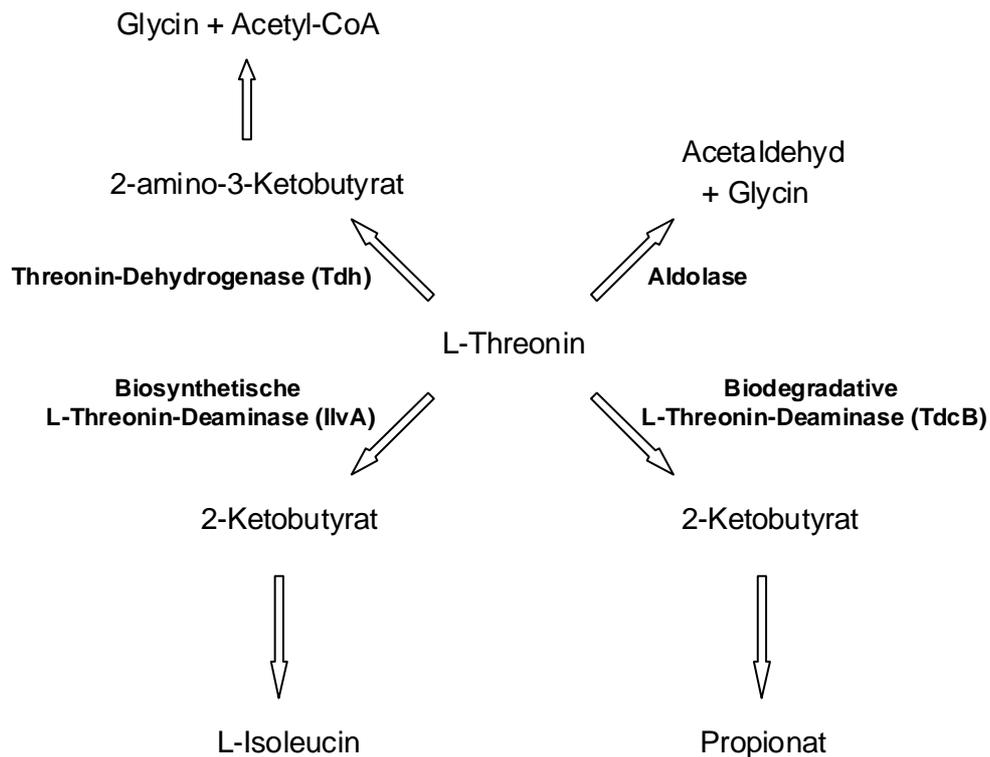


Abb. 2: Abbauschema von L-Threonin

Das vierte und am besten charakterisierte Enzym ist die Threonin-Dehydrogenase, kodiert durch das *tdh*-Gen (Potter *et al.*, 1977). Die Threonin-Dehydrogenase oxidiert L-Threonin in einer NAD^+ -abhängigen Reaktion zu 2-amino-3-Ketobutyrat (AKB), welches anschließend in Glycin und Acetyl-CoA gespalten wird (Potter *et al.*, 1977). Das dafür verantwortliche Enzym ist die AKB-CoA-Lyase, kodiert durch das *kbl*-Gen. Das entstandene Glycin kann dann wiederum in L-Serin umgewandelt werden, welches in Pyruvat und Ammoniak gespalten werden kann. An dieser Stelle des Stoffwechselweges wird der Stickstoff des L-Threonins für die Zelle verfügbar. Das *tdh*-Gen und das *kbl*-Gen sind als Operon organisiert, das unter aeroben Bedingungen mit Glukose als Kohlenstoffquelle und Leucin als Induktor exprimiert wird. Das „Leucine responsive protein“ (LRP), ein Transkriptionsregulator, reprimiert in Abwesenheit von L-Leucin im Medium die Expression des Operons (Neidhardt, 1996). Die Möglichkeit, L-Threonin über diesen Stoffwechselweg sowohl als Kohlenstoff- als auch als Stickstoffquelle zu benutzen, ist der Zelle nur möglich, wenn das *kbl-tdh* Operon überexprimiert wird (Neidhardt, 1996).

1.4 Genealogie der verwendeten *E. coli*-Threoninproduktionsstämme

Alle vier in dieser Arbeit verwendeten Threoninproduktionsstämme sind Teil einer Stammentwicklungslinie und wurden vom Patentamt Moskau bezogen. Ausgangspunkt der Entwicklung ist der *E. coli*-Wildtyp K12, der unspezifisch mutagenisiert wurde. Der erhaltene Stamm MG442 ist resistent gegenüber β -Hydroxynorvalin, einem Threoninanalogen. Diese Resistenz beruht auf einer Threonin sensitiven Aspartatkinase I (Debabov *et al.*, 1981). Das Threoninoperon dieses Stammes wurde in den Vektor pBR322 kloniert und so der Vektor pYN7 erhalten. Der zweite Stamm, der durch unspezifische Mutagenese des K12-Wildtyps konstruiert wurde, ist der Stamm VL 334. Dieser trägt Mutationen, die die Synthese von L-Threonin und L-Isoleucin blockieren. Diese Blockade ist für L-Isoleucin nur partiell und kann durch eine hohe zellinterne Threoninkonzentration kompensiert werden. Die Mutationen tragen zu einem selektiven Vorteil der Zellen bei, die mit pYN7 (*thrA*^{FBR}BC, Amp^R) transformiert sind, da beide Auxotrophien des Stammes mit pYN7 aufgehoben werden (Debabov *et al.*, 1981). Der erhaltene Produktionsstamm VL 334 / pYN7 wurde weitergehend optimiert, um Saccharoseverwertbarkeit und Threoninresistenz zu erreichen. Der Bakteriophage P1 wurde zunächst auf einem Saccharose assimilierenden Stamm gezogen und anschließend in den Threoninproduzenten transduziert. Diese Transduktante wurde auf Verwertbarkeit von Saccharose selektiert (Debabov *et al.*, 1997). Saccharose ist Hauptbestandteil von Melasse, welche eine kostengünstige Substratquelle für die industrielle Produktion ist. Der Stamm wurde nachfolgend noch auf Resistenz gegenüber hohen Threoninkonzentrationen selektiert, die ab 5 g/l wachstumshemmend wirken. Der so konstruierte Stamm wurde ATCC 98082 / pYN7 genannt (Debabov *et al.*, 1997). In dem effektivsten Produzenten dieser Stammlinie, BKIIM B-3996 / pVIC40, wurde der Hauptabbauweg des L-Threonins über die Threonin-Dehydrogenase (vgl. Abb. 2) durch Disruption des Gens *tdh* entfernt (Debabov *et al.*, 1992). Das Threoninoperon mit dem Gen für die „feedbackresistente“ Aspartatkinase I wurde aus pYN7 in das pAYC32-Plasmid umklont, welches den Replikationsursprung des Plasmids pRSF 1010 trägt. Dieser Vektor ist durch eine höhere Persistenz in der Zelle auch ohne Zugabe des Antibiotikums gekennzeichnet (Debabov *et al.*, 1992). Die Verwendung von Antibiotika im industriellen Maßstab ist teuer und auch problematisch, da bei der Produktaufbereitung die Antibiotika von Threonin getrennt werden müssten, weil L-Threonin als ein Futterzusatzstoff für Nutztiere verwendet wird.

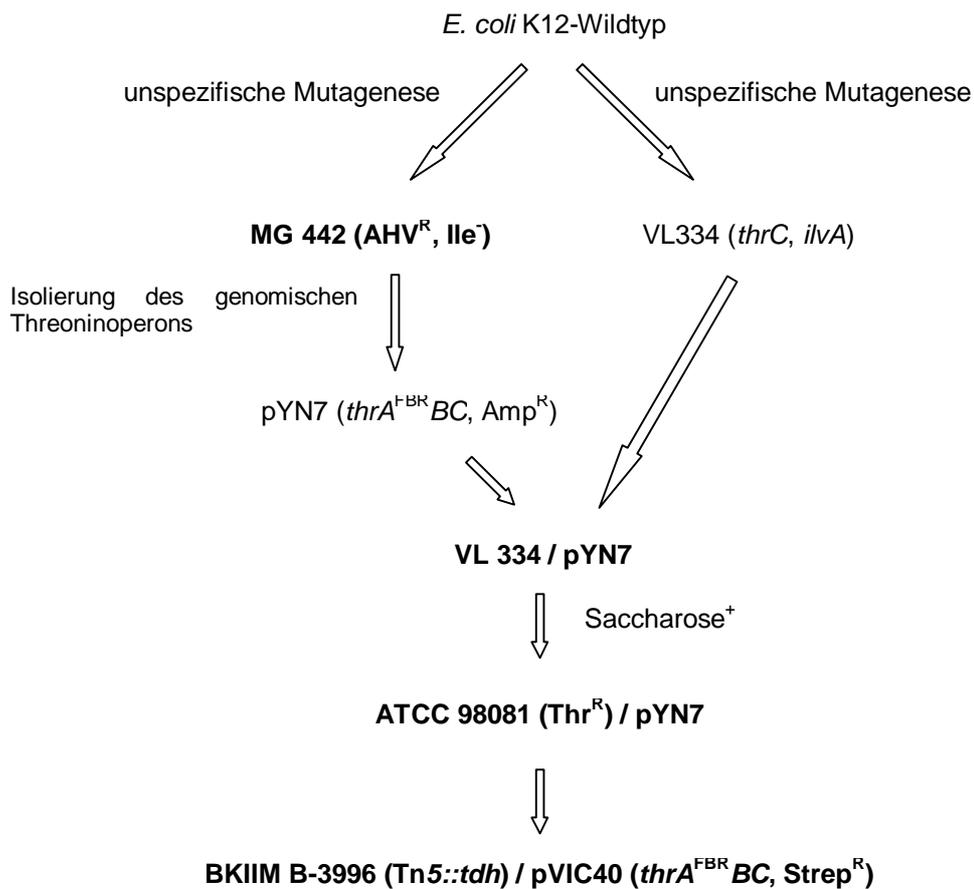


Abb. 3: Stammentwicklung der in dieser Arbeit verwendeten Threoninproduktionsstämme

1.5 Aufnahme von Aminosäuren bei Prokaryoten

Am Schnittpunkt zwischen Biochemie und angewandter Biotechnologie stehen Arbeiten der letzten Jahre, die den Einfluss der Aufnahmesysteme bestimmter Aminosäuren auf die Produktion der jeweiligen Aminosäuren untersuchen. Dabei wurde bei einem L-Tryptophan-Produzenten von *C. glutamicum* durch Mutagenese die Aufnahme für aromatische Aminosäuren erniedrigt und damit die Produktivität erhöht (Ikeda *et al.*, 1994). Durch eine Verringerung der Aufnahme von Tryptophan um 50 % konnte die Tryptophanproduktion um 10-20 % gesteigert werden (Ikeda und Katsumata, 1995). Durch ungerichtete Mutagenese wurde von Okamoto *et al.* (1997) ein *E. coli*-Threoninproduzent erzeugt, der sich gegenüber anderen Stämmen durch eine defekte Threoninaufnahme auszeichnet. Die im Vergleich zu anderen Mutanten gesteigerte Produktivität solcher Stämme ($1,3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) und die Fähigkeit, bis zu

100 g/l L-Threonin in 77 Stunden zu produzieren, zeigt den bedeutenden Einfluss, den Aufnahmesysteme auf die Aminosäureproduktion ausüben.

In der Literatur sind vier Aufnahmesysteme in *E. coli* beschrieben, die Threonin und / oder Serin transportieren (vgl. Abb. 4).

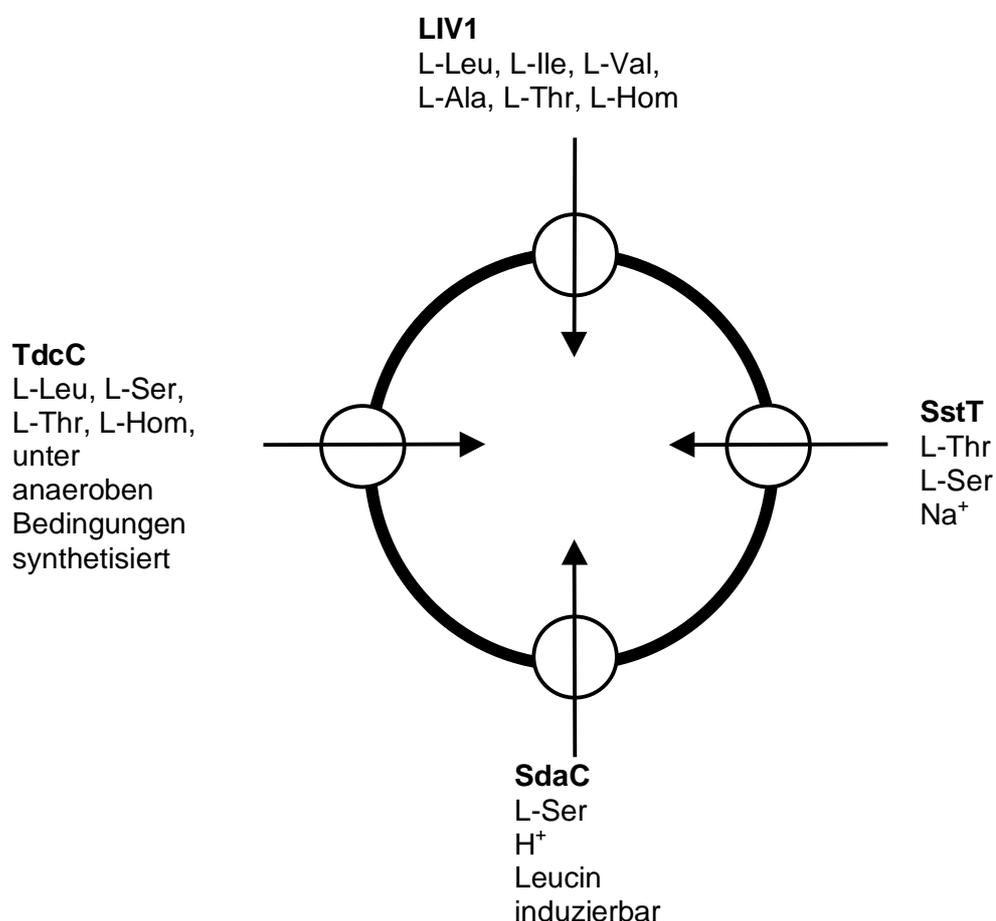


Abb. 4: Die bekannten Aufnahmesysteme für Threonin und / oder Serin in *E. coli*

Das LIV1-System ist ein ABC-Transporter, das durch die Gene *livH*, *livM* und *livG* kodiert wird und abhängig von dem Bindeprotein LivJ ist. LRP reprimiert bei Leucin-Anwesenheit im Medium die Expression der *liv*-Gene (Calvo und Matthews, 1994). Das LIV1-System besitzt ein breites Substratspektrum, transportiert aber hauptsächlich verzweigtkettige Aminosäuren wie L-Leucin, L-Isoleucin und L-Valin (Templeton und Savageau, 1974). Außerdem transportiert es L-Threonin, L-Homoserin und L-Alanin. Das zweite Threoninaufnahmesystem, das Protonen-gekoppelte TdcC-System, ist ausschließlich unter anaeroben Bedingungen in aminosäurereichem Medium aktiv. Das kodierende Gen ist Teil des *tdc*ABCDEF-Operon, das auch Proteine des Threoninkatabolismus kodiert (vgl. 1.3). L-Serin, L-Leucin und L-Homoserin sind ebenfalls Substrate dieses Systems (Sumantran *et al.*, 1990). Das dritte

Threoninaufnahmesystem ist unter aeroben Bedingungen mit Glukose als Kohlenstoffquelle in Minimalmedium aktiv. L-Threonin und L-Serin werden im Cotransport mit einem Na⁺-Ion über die Membran transportiert. Dieses sekundäre System wird in aminosäurereichem Medium reprimiert (Hama *et al.*, 1987). Ogawa *et al.* (1998) konnten in einer für die Serinaufnahme defekten Mutante eine an Na⁺-Ionen gekoppelte, durch Threonin inhibierbare Serinaufnahmeaktivität durch Komplementation mit einer Genbank von genomischer *E. coli*-DNA wieder herstellen. Eine Sequenzierung ergab, dass das *sstT*-Gen für diese Aktivität verantwortlich war (Ogawa *et al.*, 1998). Das System, das spezifisch Serin transportiert, ist der SdaC-Transporter. Dieses Protonen-gekoppelte System wird bei Anwesenheit von Leucin im Medium induziert (Hama *et al.*, 1988).

1.6 Exkretion von Aminosäuren bei Prokaryoten

Der Export eines Metaboliten kann der geschwindigkeitslimitierende Schritt bei der Produktion sein. Unter Produktionsbedingungen kann es zu einem Anstieg intermediärer Metabolite im Cytoplasma kommen, die nach außen transportiert werden müssen. Daher ist das Verständnis und die Kontrolle des Exports von entscheidender Bedeutung für die Produktivität. Die Tatsache, dass der Export von Aminosäuren ein aktiver Transport ist, war lange Zeit umstritten. In der Literatur wurden passive Diffusion durch Poren oder aber Inversionsmodelle diskutiert, die, einen entsprechenden Gradienten des Substrats vorausgesetzt, einen Export durch das Aufnahmesystem vorsahen (Konings *et al.*, 1992). Die Hypothese des aktiven Exports durch Transporter konnte inzwischen bei *C. glutamicum*, einem für die industrielle Produktion vieler Aminosäuren eingesetztes gram-positives Bodenbakterium, für L-Glutamat, (Krämer, 1994), L-Lysin (Vrljic *et al.*, 1996), L-Isoleucin (Hermann und Krämer, 1996) und L-Threonin (Ziegler *et al.* 2000), und bei *E. coli* für L-Cystein gezeigt werden (Daßler *et al.* 2000). Molekular charakterisiert ist mit *orf299* der L-Cysteinexport in *E. coli* (Daßler *et al.* 2000), mit *brnEF* sowohl die L-Isoleucinexkretion (Kennerknecht, persönliche Mitteilung), als auch mit *thrE* die L-Threoninexkretion in *C. glutamicum*. ThrE ist ein hydrophobes Protein mit 489 Aminosäuren und 8-10 putativen Transmembranhelices. Es zeigt keine Ähnlichkeit zu bekannten Transportern (Ziegler *et al.* 2000). Der erste Aminosäureexporter, der molekular charakterisiert werden konnte, ist LysE für den Lysinexport in *C. glutamicum* (Vrljic *et al.*, 1996). LysE ist Teil einer neuen Proteinfamilie, die in einer Vielzahl von Prokaryoten verbreitet ist (Aleshin *et al.*, 1999).

RhtB subfamily	Motif I	Motif II	Motif III
RhtB_Ec	17 LSPGSGAINTMTTS	27 VVG-TFSRSVIAFEVKKAGAAAYLIWLGIQWRRA	17 FORAVTVNLSNPKSVLFLAALFPQS
YrhP_Bs	15 IIFGADTMLVMKNT	28 GLS-VVIKASVILFTTKKLGAAAYLIYLGVKSFPAK	26 FMQGSLSNLSNPKSVLFLVVTIMPQS
YeaS_Ec	21 LVFGEENTLEVLKNS	28 GVA-TLIKFTPIILFNIVKLGAFYLLYLGSKIYAT	18 FKRALLLSLTPKALDFVVSFEVQS
YcaR_Pa	20 LLPGENSLEVLATS	28 GVA-SLKAEPMLFIGKVLGAAAYLFYLVGMRLGA	22 FRQALLLSNPKALDFVVSFEVQS
DeiN_Dr	18 LLPGGFLMYILARS	28 GLS-ADIMASSLAFSVVKKAGAAAYLIYLGIRVLLSK	22 FTQGMATELTPKALDFVFLAVIPQS
C365_Ct	18 LSPGDNLEVLQAQS	28 GLA-AVVKASALAFVTLKAGALYLLWLAQAWRAG	16 YRRGMVNLTPKSVLFLVFLAALFPQS
C666_Bp	14 ITPGEGIAVYVART	28 GLS-VLIVESALAFSLKAGAAAYLVYLGIRMLLRP	16 LAEGVIVEALNVAVLFLVFLAALFPQS
C888_Bp	? ..FGDNLEVLMOQS	28 RLA-AVFAASPAFTADKAGAAAYLALYLAQVLRAP	17 YRRGITMNLTPKSVLFLVFLAALFPQS
MlgA_Sc	18 ITPGCMCTLAMTLG	28 GVA-SMLNYPQLFDIKKIVGGYLYIGYSMWRRAK	18 ITQGFVTLTPKALDFVVSFEVQS
Yg27_Sy	20 ALPSSLVLTVSSKS	28 GLA-FVRGAMGDFVTKKIVGGYLYIGYSWLGINTIRAK	17 FSAGLLITLADQAVLFLVFLAALFPQS
YahN_Ec	31 FNFGANLFVVVQTS	28 GLA-TLITQCEEIFSLIRVVGAYLLWFAWCSMRRO	19 FRRGLITDLSNPKSVLFLVFLAALFPQS
A2-5_Ba	14 FTPEGNNFMAMSG	28 FNV-VLINFPLTIEIPLTLEVGVMYLAEKTLTSK	17 FVMGVLLQSLNPKSVLFLVFLAALFPQS
YigJ_Ec	17 MSPGEDFFVVSQTA	28 GLH-LIEKMAWLHTLDMVGGGLYLCWVGYQMLRGA	21 FLKGLLTLTPKALDFVVSFEVQS
C794_Aa	12 LSPGEDFFVVSQTA	28 GLA-IVFKTSPALQGVVVALGSSYDFYLVGMTRVK	20 LLKGLLVNLSNPKSVLFLVFLAALFPQS
YD07_Hi	13 MTPGEDFFVVSQTA	28 GLA-VDFVTIPALHGVMLGSSYDFYLVGMTRVK	27 ILKGLLVNLSNPKSVLFLVFLAALFPQS
TheR_Tm	16 VAFGELMMLAVYQS	27 FQV-WVLK-SPLVTKVIGLGGSPVAFMVGVSQLTAI	16 PITGALVSNPKSVLFLVFLAALFPQS
1494_Mt	19 MAPGELLTVTVSDS	28 GLG-YLHRSQPAPA-ILGTAGAVLWMLGLGFRDS	11 ILRGALISANPKSVLFLVFLAALFPQS
1703_Af	17 LAFGELTAATAAIG	28 GVA-VLTHSSALSLLSVAGVMLLSSAFVLAQSAF	13 FSTGVALSALNPKSVLFLVFLAALFPQS
CmaU_Ps	12 LMFGEPTNLLLRSG	28 LLR-HIGDSAPWCLKVQVQASMAVYFKTSHRLWRNP	13 GMYFLGLTTPKALDFVVSFEVQS
YfiK_Ec	17 MTPGNNILALSSA	27 GISFS-DAVIDPAAVHLSAGAAIVVWLAWKIATSP	12 FWASFALQVSNPKSVLFLVFLAALFPQS
RhoD_Rc	14 LAFGELTNTLMAVAG	29 GAG--EMARAPGAALLKALAPALVMVLAVALWCSA	10 AGRIFVTTALNPKSVLFLVFLAALFPQS
YcgF_Bs	15 APVGFVNAAQIDKG	28 GLS--QFLTAPFKTEFLWDFGFFVETVYTGSETLKNV	18 FASGFLISLNSPKSVLFLVFLAALFPQS
CamP_Cj	16 VPFGEINILITTYA	27 GLL--NFLDNVIFMRFLDFGFCPTLYMAYLMLRKK	18 YIKGALFNGSNPKSVLFLVFLAALFPQS
PorP_Pg	17 APMGEGILCIRRT	28 GIG-LMNFIDSNELAWQLGSSVVMFLPGIYLYRTA	17 VLSFGLTTPKALDFVVSFEVQS
169I_Ca	>17 APIGMQNAVYVINTA	28 VVG-FELQKSVILKDIILTLGICVYIIGLSLIKSV	16 SLQCLIVTTPKALDFVVSFEVQS
LysE subfamily			
LysE_Cg	18 LSTGSEQNVLVIRQG	26 GVD-LISNAAPIVLDIMRGGIAYLLWFAVMAAKDA	52 MLMAIVLTPKALDFVVSFEVQS
YggA_Ec	16 LPLGGEQNAFVMNQG	26 GGS-ADLMQSPWLLALVYVGGVAFLLWYGFQAFKTA	20 IATMLAVTTPKALDFVVSFEVQS
YggA_Ah	16 IPTGAQNAFVLSRG	26 GGA-NELAASPIGLALLVGGVLELGGWEGFRSLRSA	20 DAMTLGVTPKALDFVVSFEVQS
1651_Yp	16 LPLGGEQNVFVMNQG	26 GGS-ALLSRSPILLALVYVGGVAFVLMYVGGWALMAA	20 LVTLAVTTPKALDFVVSFEVQS
YisU_Bs	32 LPLGGEQNVFVIRQG	29 GVS-VVQELPVEETVVMAGGFLFLYMGVVTWNI	18 AAFAAAVSVPKALDFVVSFEVQS
YV14_My	5 VAFGGEQNAFVLRQG	26 GFA-ALHHAHPNMTIVARGGAAFLIGYALAAARNA	19 VQMCVVVTPKALDFVVSFEVQS
YW33_My	16 AALGGEQNAFVLRQG	26 GFG-ALIGAHPRALNVKGGAAFLIGYGLLAARRA	19 LVTCAAVTTPKALDFVVSFEVQS
H718_Hp	16 AAVGGEQNAFVLRQG	26 GVG-AVFAKNLYLSLSDVFFALFEGVAFVLAALTKL	20 IFLTLGVTPKALDFVVSFEVQS
VibR_Vc	? ..LNQG	26 GGG-ALISQNTSLIGVYVAGLLELFCGVEGSLSLRAA	21 IFGAAVTPKALDFVVSFEVQS

PHDhtm	Consensus	RhtB subfamily	LysE subfamily
	U..GP...bUU..s	U..PGP...bbUU...s	UPUGQPQN.FUU..QG
	Gbs...bb...P...bU.b.s..aLbabsb..b+s.	GUs...bb...P...bU.b.s.s.YLbabsb..b+s.	Gbs...bb...P...bU.b.s.s.FLbaasb..sb+sA
	b...b.U.b.NP+.bU..b.bbs.b	F...sbbU.LsNPKSbUaabsbbs.F	U...bsUsbLNPVUYLDTbbUGsb

Abb. 5: Einteilung der LysE-Superfamilie nach Aleshin *et al.* (1999). An Positionen, an denen in mehr als 50 % der Sequenzen der gleiche oder ein ähnlicher Aminosäurerest vorkommt, wurde eine Konsensussequenz erstellt [a = aromatischer Aminosäurerest (F, Y, W); U = großer aromatischer Aminosäurerest (I, L, V, M); b = großer aliphatischer aromatischer Aminosäurerest (I, L, V, M, F, Y, W), s = kleiner Rest ((G, S, T, A); + = positiv geladener Aminosäurerest (K, R, H)]. Konservierte Aminosäuren sind farbig unterlegt: rot für Aminosäurereste, die gut zu der generellen Konsensussequenz passen; gelb für Aminosäurereste, die der generellen Konsensussequenz nur ähneln; blau für Aminosäurereste, die zur Konsensussequenz der RhtB Unterfamilie passen; grün für Aminosäurereste, die der Konsensussequenz der LysE Unterfamilie entsprechen. Die schwarzen Balken veranschaulichen die Lagen der putativen Transmembranhelices. Aa, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*; Af, *Archaeoglobus fulgidus*; Ah, *Aeromonas hydrophila*; Ba, *Bacillus* sp.; Bp, *Bordetella pertussis*; Bs, *Bacillus subtilis*; Ca, *Clostridium acetobutylicum*; Cg, *C. glutamicum*; Cj, *Campylobacter jejuni*; Ct, *Chlorobium tepidum*; Dr, *Deinococcus radiodurans*; Ec, *E. coli*; Hi, *Haemophilus influenzae*; Hp, *Helicobacter pylori*; Mt, *Methanobacterium thermoautotrophicum*; My, *Mycobacterium tuberculosis*; Pa, *Pseudomonas aeruginosa*; Pg, *Porphyromonas gingivalis*; Ps, *Pseudomonas syringae*; Rc, *Rhodobacter capsulatus*; Sc, *Shewanella colwelliana*; Sy, *Synechocystis* sp. PCC 6803; Th, *Thermotoga maritima*; Vc, *Vibrio cholerae*; Yp, *Yersinia pestis*.

Die Einteilung und der Umfang dieser Familie wird in der Literatur verschieden beurteilt. Während Vrljic *et al.* (1999) die Superfamilie in drei Familien (LysE, YahN und CadD) unterteilen, gehen Aleshin *et al.* (1999) von einer Zweiteilung in die LysE- und die RhtB-Familie aus und berücksichtigen die CadD Familie nicht. Alle Proteine dieser LysE-Superfamilie ähneln sich in Hinsicht ihrer Größe und der Verteilung hydrophober und hydrophiler Aminosäuren. Zusätzlich sind allen Proteinen drei Motive gemeinsam: ein Drei-Reste Motiv in der Nähe des Aminoterminus (PGP in der RhtB Familie und PXGP in der LysE Familie), ein Motiv mit vielen aromatischen Aminosäureresten ungefähr 60 Aminosäurereste vom Aminoterminus entfernt und ein FX-LXNP^K/_HX₂LX₈F-Motiv, das 16-58 Aminosäurereste vom zweiten Motiv in Richtung des Carboxyterminus entfernt liegt (Aleshin *et al.*, 1999). Die Funktionen der Proteine dieser Familie sind weitgehend unbekannt. Neben LysE – dem Lysintransporter aus *C. glutamicum* - ist RhtB als L-Homoserin / Homoserinlactoncarrier in *E. coli* beschrieben (Zakataeva *et al.*, 1999). RhtC wird die Funktion eines Threoninexporters zugewiesen, da Zellen, die dieses Gen zusätzlich zur genomischen Kopie plasmidkodiert exprimieren, eine erhöhte Resistenz gegenüber hohen Threoninkonzentrationen (50 g/l) haben sollen (Zakataeva *et al.*, 1999). In der CadD-Familie wurden drei der vier Mitglieder Funktionen zugeordnet: CadB und CadD sind für Cadmium-Resistenz verantwortlich, QacF ist vermutlich für den Export quartärer Amine zuständig. Es wird vermutet, dass alle Mitglieder der Superfamilie für den Export von verschiedenen Metaboliten aus unterschiedlichen Prokaryoten verantwortlich sind (Aleshin *et al.*, 1999; Vrljic *et al.*, 1999).

Ziele der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Threonintransport in *E. coli*-Produktionsstämmen charakterisiert. Transportprozesse spielen bei der Threoninproduktion eine wichtige Rolle, da die Threoninaufnahme der Produktion entgegensteht und die Threoninexkretion limitierend sein kann.

In *E. coli* sind drei Threoninaufnahmesysteme bekannt. Zu Beginn des Projektes waren nur das Bindeprotein-abhängige LIV-System sowie der anaerob-induzierte, Protonengekoppelte Threonintransporter molekular charakterisiert. Ogawa *et al.* konnten 1998 auch dem dritten System, dem Na⁺-abhängigen Threonin- / Serintransporter, und damit dem Hauptaufnahmesystem unter aeroben Bedingungen, mit *sstT* ein Gen zuordnen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Threoninaufnahme der verwendeten Threoninproduktionsstämmen charakterisiert und deren Einfluß auf die Produktion ermittelt werden.

Für das Gen eines Threoninexporters in *E. coli* gibt es zwei Kandidaten. Zakataeva *et al.* haben die Proteine RhtB und RhtC (*resistance against homoserine and threonine*) als verantwortlich für eine Resistenz gegen hohe Threonin- und Homoserinkonzentrationen publiziert (Aleshin *et al.*, 1999), (Zakataeva *et al.*, 1999). Die Deletion und Überexpression der zwei *rht*-Gene in Threoninproduktionsstämmen sollte klären, ob diese Gene einen Threoninexporter kodieren. Sollte sich das als zutreffend erweisen, war es naheliegend zu untersuchen, ob eine Überexpression dieser Gene die Produktivität dieser Stämme erhöhen kann.

In *C. glutamicum* konnte kürzlich ein Gen kloniert werden, das vermutlich für den Threoninexporter (ThrE) kodiert (Ziegler *et al.*, 2000). Die Überexpression in einem *E. coli*-Produktionsstamm sollte klären, ob dieses Gen auch in einem heterologen Wirt aktiv ist und zu einer Optimierung der Threoninproduzenten führen kann.

2 Material und Methoden

2.1 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

E. coli-Stämme wurden zur Stammhaltung und DNA-Isolierung sowie zur Bereitstellung elektrokompenter Zellen in Luria-Bertani (LB)-Medium kultiviert (Sambrook *et al.*, 1989). Bacto-Agar, Bacto-Trypton und Hefe-Extrakt wurden von der Firma Difco Laboratories, Detroit, USA bezogen.

Für Wachstumsmessungen wurde das Minimalmedium M9 benutzt: 6 g/l Na_2HPO_4 , 3 g/l KH_2PO_4 , 0,5 g/l NaCl, 1 g/l NH_4Cl , 0,25 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 11 mg/l CaCl_2 , 50 mg/l Thiamin (Sambrook *et al.*, 1989). Diesem wurde sowohl eine 100fach konzentrierte Vitaminlösung als auch eine 100fach konzentrierte Spurenelementlösung zugesetzt. Die Vitaminlösung setzte sich wie folgt zusammen: 8 mg/l Thiamin, 56 mg/l Inosit, 72 mg/l Ca-Pantothenat, 1080 mg/l Pyridoxin-HCl, 300 mg/l Nicotinsäure, 16 mg/l p-Aminobenzoat, 2 mg/l Riboflavin, 22 mg/l Folsäure, 20 mg/l Nicotinamid, 2,2 mg/l Biotin. Die verwendete Spurenelemente-Stammlösung enthielt folgende Komponenten: 2800 ng/l $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 180 ng/l H_3BO_3 , 2060 mg/l $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, 23 ng/l $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 1220 ng/l $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$, 4700 $\mu\text{g/l}$ $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 220 μg $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 1200 $\mu\text{g/l}$ $\text{AlCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 120 $\mu\text{g/l}$ KI, 280 $\mu\text{g/l}$ $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 25 mg/l $\text{Fe(II)SO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$. Wenn nicht anders angegeben, enthielt das Medium als Kohlenstoffquelle 0,2 % (w/v) Glukose. Zur Selektion auf Resistenzmarker in Plasmiden wurde den Medien die entsprechenden Antibiotika in folgenden Endkonzentrationen zugesetzt: Kanamycin 25 $\mu\text{g/ml}$, Carbenicillin 50 $\mu\text{g/ml}$, Streptomycin 100 $\mu\text{g/ml}$ und Chloramphenicol 50 $\mu\text{g/ml}$. Bei der Anzucht von Stämmen mit Aminosäureauxotrophien wurden die entsprechenden Aminosäuren dem Medium in einer Endkonzentration von 0,004 % (w/v) zugesetzt. Alle Stämme wurden auf LB-Agarplatten bei 4 °C gelagert und monatlich auf frische Platten übertragen. Zur Langzeitlagerung von Stämmen dienten Immobilisate in Glycerin des Herstellers Pro-Lab-Diagnostica, Ontario, Canada („Microbank“); die Lagerung dieser Kulturen erfolgte bei -20 °C.

2.2 Bakterienstämme und Plasmide

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 1 aufgeführten *E. coli*-Stämme von verwendet. Tabelle 2 zeigt die verwendeten Plasmide.

Tab. 1: In dieser Arbeit verwendete Stämme

Stamm	Beschreibung	Quelle oder Referenz
DH5 α <i>mcr</i> ^r	F ⁻ <i>endA1 supE44 thi-1 λ^- recA1 gyrA96 relA1 deoR Δ(alcZYA-argF) U169 ϕ80Δ (lacZ)M15<i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS mcrBC)</i></i>	(Grant et al., 1990)
DH5 α λ <i>pir</i>	Lysogen von DH5 α [<i>supE44 ΔlacU169 (ϕ 80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA</i>]	(Donnenberg und Kaper, 1991)
SY327 λ <i>pir</i>	Lysogen von SY327 [<i>Δ(lac pro) argE(Am) ri nalA recA56</i>] mit <i>pir</i> -Gen des R6K Plasmides	(Donnenberg und Kaper, 1991)
JM109	F ⁺ <i>traD36 lacI^r Δ(lacZ)M15 proA⁺B⁺/e14⁻ (McrA⁻) Δ(lac-proAB) thi gyrA96 (Nal^R) endA1 hsdR17 (r_k⁻m_k⁺) relA1 supE44 recA1</i>	(Yanisch-Perron et al., 1985)
AN387	K-12 Wildtyp, λ -sensitiv	Young, 1977
AN387 Δ <i>ygga</i>	Deletion von <i>ygga</i>	diese Arbeit
AN387 <i>yhao::Kan yhjv::Cam</i>	Disruption von <i>yhao</i> und <i>yhjv</i> mit Resistenzkassetten	Six, unveröffentlicht
AN387 <i>yhao::Kan yhjv::Cam Δo409</i>	Deletion von <i>o409</i>	diese Arbeit
AN387 <i>yhao::Kan yhjv::Cam Δo409 ΔsstT</i>	Deletion von <i>sstT</i>	diese Arbeit
MG 442	AHV ^R , <i>ilvA-442</i>	(Debabov et al., 1981)
VL 334	<i>thrC-1010, thrA^{FBR}</i>	(Debabov et al., 1981)
VL 334 Δ <i>ygga</i>	Deletion von <i>ygga</i>	diese Arbeit
VL 334 Δ <i>sstT</i>	Deletion von <i>sstT</i>	diese Arbeit

VL 334 $\Delta phoA$	Deletion von <i>phoA</i> ; <i>phoA</i> negativ	diese Arbeit
ATCC 98082	<i>thrC</i> -1010, <i>thrA</i> ^{FBR} , Saccharose ⁺ , Thr ^R	(Debabov <i>et al.</i> , 1997)
ATCC 98081	ATCC 98082 / pYN7	(Debabov <i>et al.</i> , 1997)
ATCC 98082 $\Delta sstT$	Deletion von <i>sstT</i>	diese Arbeit
ATCC 98082 $\Delta yigK$	Deletion von <i>yigK</i>	diese Arbeit
ATCC 98082 $\Delta yigJ$	Deletion von <i>yigJ</i>	diese Arbeit
BKIIM B-3996 / pVIC40	<i>thrC</i> -1010, <i>thrA</i> ^{FBR} , Sucrose ⁺ , Thr ^R , <i>tdh</i> ::Tn5	(Debabov <i>et al.</i> , 1992)

Tab. 2: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle oder Referenz
pUC18	Klonierungsvektor, Amp ^R , <i>lacZ</i> α , Δrop , ColE1; 2,7 kb	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
pUC18- <i>yigK</i>	0,77 kb Fragment mit <i>yigK</i>	Eggeling, unveröffentlicht
pUC18- <i>rhtC</i>	0,62 kb Fragment mit <i>rhtC</i>	diese Arbeit
pUC18- <i>o409</i> -5'	1,5 kb Fragment stromaufwärts von <i>o409</i>	diese Arbeit
pUC18- <i>o409</i> -3'	1,5 kb Fragment stromabwärts von <i>o409</i>	diese Arbeit
pUC18- <i>ygga</i> -5'	1,5 kb Fragment stromaufwärts von <i>ygga</i>	diese Arbeit
pUC18- <i>ygga</i> -3'	1,5 kb Fragment stromabwärts von <i>ygga</i>	diese Arbeit
pUC18- <i>sstT</i> -5'	1,5 kb Fragment stromaufwärts von <i>sstT</i>	diese Arbeit
pUC18- <i>sstT</i> -3'	1,5 kb Fragment stromabwärts von <i>sstT</i>	diese Arbeit
pTrc99A	Expressionsvektor, Amp ^R , <i>lacI</i> ^q	(Amann <i>et al.</i> , 1988)
pTrc99A- <i>yigK</i>	0,77 kb Fragment mit <i>yigK</i>	Eggeling, unveröffentlicht

pTrc99A- <i>rhtC</i>	0,62 kb Fragment mit <i>rhtC</i>	diese Arbeit
pTrc99A- <i>thrE</i>	1,9 kb Fragment mit <i>thrE</i> aus <i>C. glutamicum</i>	Rieping, unveröffentlicht
pCVD442	Deletionsvektor, <i>sacB</i> mobRP4 oriR6K <i>bla</i>	(Donnenberg und Kaper, 1991)
pCVD442- $\Delta o409$	Flankierende Sequenzen von <i>o409</i> (1,5 kb + 1,5 kb) zusammenklont	diese Arbeit
pCVD442- $\Delta yggA$	Flankierende Sequenzen von <i>yggA</i> (1,5 kb + 1,5 kb) zusammenklont	diese Arbeit
pCVD442- $\Delta sstT$	Flankierende Sequenzen von <i>sstT</i> (1,5 kb + 1,5 kb) zusammenklont	diese Arbeit
pKO3	Deletionsvektor, <i>sacB</i> , Cam ^R pSC101-ts	(Link <i>et al.</i> , 1997)
pKO3- $\Delta yigJ$	Flankierende Sequenzen von <i>yigJ</i> zusammenklont	Eggeling, unveröffentlicht
pKO3- $\Delta yigK$	Flankierende Sequenzen von <i>yigK</i> (1,1 kb) zusammenklont	Eggeling, unveröffentlicht
pKO3- $\Delta yigJK$	Flankierende Sequenzen von <i>yigJ</i> und <i>yigK</i> (1,1 kb) zusammenklont	Eggeling, unveröffentlicht
pYN7	pBR322-Derivat mit <i>thrA</i> ^{FBR} BC, Amp ^R	(Debabov <i>et al.</i> , 1981)
pVIC40	pAYC32 Derivat mit <i>thrA</i> ^{FBR} BC, Strep ^R	(Debabov <i>et al.</i> , 1981)

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Silikonölzentrifugation

Zur Bestimmung interner Metabolitkonzentrationen wurde die Silikonölzentrifugation verwendet. Zellen wurden dabei gleichzeitig vom umgebenden Medium abgetrennt und in 20 %-iger Perchlorsäure inaktiviert (Klingenberg und Pfaff, 1977). Dazu wurden die Proben einer Zellsuspension (100 µl) in 300 µl-Mikrozentrifugenröhrchen (Beckman Instruments GmbH, München, D) überführt, die zuvor mit 30 µl 20 %-iger Perchlorsäure und 70 µl Silikonöl (Wacker, Burghausen, D) bestückt wurden. Je nach Dichte des benutzten Kulturmediums wurde die Dichte des verwendeten Silikonöls von $d=1,04$ zu $1,05 \text{ g/cm}^3$ variiert. Bei der nachfolgenden Zentrifugation der Reaktionsgefäße (45 s in einer Microfuge E (Beckman Instruments GmbH, München, D) bei maximaler Geschwindigkeit) wurden die Zellen, aufgrund des Dichteunterschieds zwischen Zellen und umgebenden Kulturmedium, durch das Silikonöl getrieben, während das Medium im Überstand verblieb. Die extrazellulären Konzentrationen der Metabolite konnten direkt in den zellfreien Überständen gemessen werden. Für die Bestimmung der internen Konzentrationen mußten die Zellextrakte aufgearbeitet werden.

Dazu wurden die Zellsedimente nach Durchtrennung der Reaktionsgefäße in der Ölschicht in 500 µl Eppendorf Reaktionsgefäßen zentrifugiert. Durch Beschallung im Ultraschallbad (10 min) wurde eine vollständige Extraktion der Zellen gewährleistet. Durch Zugabe von 10 µl Silikonöl mit einer Dichte von $d=1,09 \text{ g/cm}^3$ (AP 1000, Wacker, Burghausen, D) wurde die Dichte des mitgeschleppten Silikonöls erhöht. Nach Neutralisierung und Pufferung der Extrakte mit 25 µl 5 M KOH und 1 M Triethanolamin wurde Kaliumperchlorat auf Eis präzipitiert. Nach einer Zentrifugation der Zellextrakte (5 min, $13.000 \times g$) wurde die Konzentration an Metaboliten im Überstand bestimmt.

2.3.2 Bestimmung von Aminosäurekonzentrationen mittels HPLC

Die Bestimmung der Aminosäurekonzentration aus den zellfreien Überständen und aufgearbeiteten Proben der Silikonölzentrifugation erfolgte mit Hilfe der HPLC („high performance liquid chromatography“). Es wurde eine HPLC-Anlage HP 1100 (Hewlett-Packard, Waldbronn, D) mit angeschlossenem Fluoreszenzdetektor der Serie HP 1100

verwendet. Die in den Proben enthaltenen Aminosäuren wurden der automatischen Vorsäulenderivatisierung mit 10fachem Überschuß an o-Phthaldialdehyd/Borat/2-Mercaptoethanol-Reagenz (Pierce Europe, B.V. Oud-Beijerland, NL) unterzogen (Lindroth und Mopper, 1979). Dabei werden primäre Aminosäuren zu fluoreszierenden thiosubstituierten Isoindolen derivatisiert, deren Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 230 nm und einer Emissionswellenlänge von 455 nm detektiert werden kann. Die Auftrennung erfolgte über eine „reversed phase“-Säule RP-18 (Hypersil OD 18, 5 µm; Vorsäule: 40 x 4 mm, Hauptsäule 125 x 4 mm; CS-Chromatographie-Service GmbH, Langerwehe) bei 40 °C. Als mobile Phase wurde eine Mischung aus Methanol und 0,1 M Na⁺-acetatpuffer pH 7,2 mit 0,06 % Na⁺-azid verwendet. Die Mischung wurde gemäß eines Gradientenprogramms während des Laufs von 75 % Puffer auf 27 % Puffer geändert. Als interner Standard wurde Ornithin eingesetzt. Die Aminosäurekonzentration wurde anhand eines „externen Standards“ (Eichmessung) bestimmt.

2.3.3 Aufnahmemessungen

Zur Bestimmung der L-Threonin- oder L-Serinaufnahme wurden die Bakterien in M9-Medium kultiviert und in ihrer exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit kalter Pufferlösung (0,1 M MOPS/Tris pH 7, 10 mM Glukose, 2 mM MgSO₄, 0,1 mM NaCl) wurden sie im gleichen Puffer resuspendiert und bis zur Messung eisgekühlt aufbewahrt. Für Wettbewerbsversuche wurde der Inhibitor dem Wasch-/Messpuffer zugesetzt. Für die Aufnahmemessung wurden nach Vorlage von 1,5 ml Puffer jeweils 50 µl Zellsuspension im Wasserbad bei 37 °C unter Rühren drei Minuten vorinkubiert. Die Aufnahme wurde durch Zugabe von 50 µl einer 2,4 mM Substratlösung, der [¹⁴C]-markiertes Substrat (Amersham Buchler International, Buckinghamshire, GB) zugesetzt war, gestartet. Die spezifische Aktivität lag bei 77 MBq/mmol. Pro Ansatz wurden in dem angegebenen Zeitintervall (15-75 Sekunden) jeweils 200 µl Zellsuspension entnommen und die Zellen über Glasfaserfilter Typ F, Porengröße 0,45 µm (Millipore, Eschborn, D) mit Hilfe einer Mehrfachfiltrationsanlage (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D) schnell vom umgebenden Medium abgetrennt. Um anhaftende Mediumreste zu entfernen, wurde der Filter unmittelbar mit 2 x 1,5 ml kalter Pufferlösung gewaschen. Die Filter wurden anschließend abgenommen, in Szintillationsgefäße gelegt und mit 3,8 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint Eco Plus, Roth, Karlsruhe, D) versetzt. Die Radioaktivität wurde mit einem

Szintillationszähler (Multi Purpose-Scintillations Counter LS 6500, Beckman Coulter) bestimmt.

2.3.4 K_i -Wert Berechnung

K_i -Werte wurden mit Hilfe vorher bestimmter K_M - und V_{max} -Werte in Verbindung mit Aufnahmezeiten, die unter Zugabe verschiedener Mengen an Inhibitor gemessen wurden, und folgender Formel berechnet:

$$K_i = \frac{[I] * K_M}{[S] * (V_{max} / V - 1) - K_M}$$

mit [I] als Inhibitorkonzentration in μM und [S] als Substratkonzentration in μM in den Wettbewerbsversuchen.

2.3.5 Bestimmung von ATP-Konzentrationen

Die Lichtemission bei Umsatz von ATP durch das Luciferin / Luciferase-System bildet die Grundlage des Nachweises des Adeninnukleotid ATP (modifiziert nach Lundin *et al.*, 1976 und Schimz *et al.*, 1981).



Der verwendete Luciferin / Luciferase-Rohextrakt lieferte keine zeitlich konstante Lichtemission im Gegensatz zu hochgereinigten Extrakten, so dass statt der Emissionsrate die Lichtemission während der ersten 20 Sekunden nach Start der Reaktion bestimmt wurde. Die Proportionalität dieses Meßwertes zum ATP-Gehalt der Probe wurde mit Hilfe eines ATP-Standards überprüft. ATP-Standardlösungen wurden ebenfalls zur internen Standardisierung der Messung verwendet.

Für einen schnellen Probenaufschluß wurden 40 μl der Zellsuspension in 360 μl Dimethylsulfoxid (DMSO) pipettiert. Anschließend wurde 1600 μl eiskaltes Wasser zu dieser Suspension gegeben und die Lösung bei -20°C bis zur Analyse aufbewahrt. Der ATP-Standard wurde 1 μM in einem Puffer mit 50 mM Tris/ H_2SO_4 , pH 7,4, 3,5 mM MgSO_4 , 2,5 mM K_2SO_2 , 0,6 mM EDTA angesetzt und bis auf 1 nM verdünnt. Der Luciferin / Luciferase-Extrakt wurde aus einer Suspension von 50 mg Lyophilisat (Sigma, *Buffered Firefly Lantern Extract*) in 5 ml Wasser hergestellt, unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert. Für die Messung wurden 100 μl der ATP-

Standardreihe oder 100 μ l der Probe mit 100 μ l Luciferin / Luciferase-Extrakt vermischt. Die Anzahl der Lichtblitze während der ersten 20 Sekunden nach Start der Reaktion wurden mit einem Biolumineszenzanalysator (Lumat LB 9507, EG&G Berthold, Wildbad, D) erfaßt und daraus die entsprechende ATP-Konzentration der Probe über eine Eichkurve bestimmt.

2.3.6 Bestimmung von Saccharose-Konzentrationen

Die Konzentration von Saccharose im Mediumüberstand wurde durch den Saccharose / Glukose-Test der Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D) bestimmt. Bei diesem Test wird zunächst die freie D-Glukosekonzentration bestimmt und in einer zweiten Reaktion die Saccharose durch die Invertase bei pH 4,6 in D-Fruktose und D-Glukose aufgespalten. Nachfolgend wird der Gesamtanteil an D-Glukose gemessen. Die Konzentration von Saccharose entspricht dann der Differenz von Gesamt-D-Glukose und freier D-Glukose. Der Nachweis der D-Glukose erfolgte dabei photometrisch über die NADPH-Zunahme bei Zugabe des Enzymgemisches Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase:

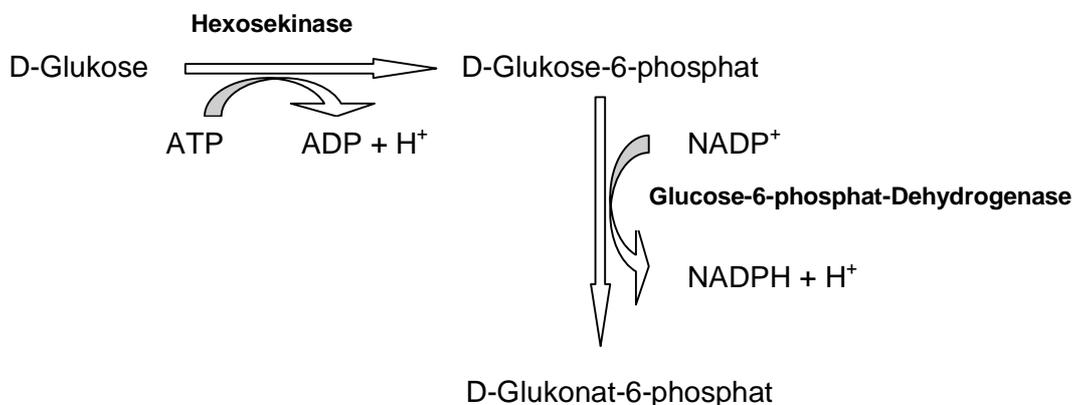


Abb. 6: Enzymreaktionen der Hexosebestimmung

Die Extinktion des entstehenden NADPH wurde in 1 ml Halbmikroküvetten bei 340 nm mit dem Ultrospec 3000 der Fa. Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland) gemessen und über folgende Gleichungen die D-Glukosekonzentration berechnet.

Die allgemeine Gleichung zur Konzentrationsbestimmung

$$C = \frac{V}{\varepsilon * d * v * 1000} * \Delta E \text{ [g/l]}$$

wurde mit $V = 1,007 \text{ ml}$, $M_{\text{Glucose}} = 180,16 \text{ g/mol}$, $\varepsilon_{340 \text{ nm}} = 6,3 \text{ l} * \text{mmol}^{-1} * \text{cm}^{-1}$, $d = 1 \text{ cm}$ und $v = 0,033 \text{ ml}$ im Testansatz zur Gleichung für die Glukosebestimmung

$$C_{\text{Glukose}} = \Delta E * 0,87 * F \text{ [g/l]}$$

spezifiziert. ΔE ist die Extinktion nach Enzymzugabe minus die Extinktion vor Enzymzugabe; F der Verdünnungsfaktor (z.B. ist F bei einer 1:10 Verdünnung gleich 10).

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Techniken zur DNA-Rekombination

Standard-DNA-Techniken wie Restriktionen, DNA-Fällungen, Phenol-Extraktionen, Ligationen, Klenow-Reaktionen und Behandlungen mit alkalischer Phosphatase wurden nach (Sambrook *et al.*, 1989) bzw. nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.4.2 Präparation genomischer DNA aus *E. coli*

Genomische bakterielle DNA wurde nach einer Methode nach Ausubel *et al.* (1998) isoliert. Die gereingte Genom-DNA wurde in 100 μl „Merckwasser“ (*LiChrosolv*, Merck Darmstadt) resuspendiert und in einer Verdünnung von 10^{-2} und 10^{-3} als „template“ für PCR-Ansätze eingesetzt.

2.4.3 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Die Präparation von Plasmiden erfolgte aus 2 ml einer LB-Übernachtskultur nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Hierfür wurde das GFXTM Micro Plasmid Prep Kit der Fa. Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, D) verwendet. Hierbei wird nach Lyse der Zellen und Abtrennung der denaturierten, nicht-löslichen Zellbestandteile die verbliebene Lösung mit Hilfe

von Säulen aus Glasfibernmatrix aufgearbeitet. Das positiv geladene Säulenmaterial bindet dabei die negativ geladene Plasmid-DNA, während andere Zellbestandteile in Waschschrinen entfernt werden. Die DNA wurde dann mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ von der Säule eluiert. Die Präparationen wurden nach dem Protokoll der Fa. Pharmacia durchgeführt.

2.4.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurden die DNA-Fragmente mit Hilfe des QIAquickTM Gel Extraction Kit der Firma Qiagen (Hilden, D) aus Agarosegelen isoliert. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

2.4.5 Transformation von *E. coli*-Wildtypzellen

Herstellung kompetenter Zellen

Die Herstellung von kompetenten Zellen erfolgte mit Modifikation nach einer Methode von Inoue *et al.* (1990). Hierzu wurde 1 ml Bakteriensuspension aus einer 5 ml LB-Tagkultur in 250 ml SOB-Medium (20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,5 g/l NaCl, 186,4 mg/l KCl, 2,033 g/l MgCl_2) überimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,6 bei Raumtemperatur und 120 Upm kultiviert. Durch die Anzucht bei Raumtemperatur kann eine ähnlich hohe Transformationseffizienz wie bei der Elektrotransformation erreicht werden. Nach Inkubation der Zellsuspension für 10 min auf Eis wurden die Zellen durch eine zehninütige Zentrifugation bei 4 °C und 4000 Upm geerntet und anschließend in insgesamt 80 ml TB (10 mM Pipes / KOH pH 6,7, 15 mM CaCl_2 , 250mM KCl, 55 mM MnCl_2) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation erfolgte eine Resuspension in 20 ml TB. Dieser Suspension wurde unter ständigem Mischen tropfenweise insgesamt 1,4 ml DMSO zugegeben. Nach einer weiteren Inkubation von 10 min auf Eis wurden die Zellen in Aliquots zu 400 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C verwahrt.

Transformation durch Hitzeschock

Zum Transfer von Plasmid-DNA wurden kompetente Zellen des zu transformierenden Stammes auf Eis aufgetaut. Jeweils 200 µl kompetente Zellen wurden mit DNA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock im Wasserbad bei 42 °C für 30 Sekunden. Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen mit 800 µl SOC-Medium (SOB + 3,6 g/l Glukose) versetzt und nach 60-minütiger

Regeneration (37 °C) und Expression des Phänotyps bei 37 °C auf LB-Agarplatten mit Antibiotikum ausplattiert.

2.4.6 Transformation / Plasmidkurierung von L-Threoninproduktionszellen

Mit der oben beschriebenen Methode konnte für die verwendeten Threoninproduktionsstämme (VL 334 / pYN7, ATCC 98082 / pYN7, BKIIM B-3996 / pVIC40) keine befriedigende Transformationseffizienz erreicht werden. Durch eine Optimierung der Anzucht für die Elektroporation konnte die Effizienz allerdings deutlich erhöht werden. Bei der Elektroporation werden durch einen starken elektrischen Puls in der Membran kurzzeitig Poren erzeugt, durch die Plasmide oder andere Makromoleküle in die Zellen gelangen können.

Herstellung elektrokompetenter Zellen

Die Herstellung von elektrokompetenten Zellen erfolgte durch Kombination verschiedener beschriebener Methoden zur Erhöhung der Transformations-effizienz bei Elektroporation (Chuang *et al.*, 1995; Zabarovsky und Winberg, 1990). Hierzu wurde eine 5 ml LB-Kultur bis in die spätlogarithmische Phase gezogen. Von dieser Kultur wurde 1 ml in 50 ml LB-Medium überimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 über Nacht bei 18 °C und 120 Upm kultiviert. Nach Inkubation der Suspension für 30 min auf Eis wurden die Zellen bei 4000 Upm (15 min, 4 °C) sedimentiert. Nach zweimaligem Waschen mit je 50 ml eiskaltem, sterilfiltriertem 10 % Glycerin wurden die Zellen in 2 ml GYT (10 % (v/v) Glycerin, 0,125 % (w/v) Hefeextrakt, 0,25 % (w/v) Trypton) aufgenommen, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Transformation mittels Elektroporation

Zur Elektroporation wurden derart kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, vorsichtig mit DNA vermischt und in eisgekühlte, sterile Küvetten (Typ 16 S 2086, BioRad, München, D) überführt. Die Poration erfolgte in einem BioRad Gene Pulser II (BioRad, München, D) bei einer Spannung von 2,5 kV (= 12,5 kV/cm), einem Parallelwiderstand von 200 Ω und einem kapazitiven Widerstand von 25 µF. Die Entladung geschah innerhalb von 5,1 ms (Zeitkonstante). Nach Beendigung des Pulses wurden die Zellen sofort in 1 ml SOC-Medium überführt und zur Regeneration 60 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden sie auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Plasmidkurierung

Zur Kurierung der Stämme von ihrem Plasmid wurde die Methode von (Heery *et al.*, 1998) mit der oben beschriebenen Methode zur Elektroporation verknüpft. Elektrokompetente Zellen des plasmidtragenden Stammes wurden auf Eis aufgetaut und in eisgekühlte, sterile Küvetten (Typ 16 S 2086, BioRad, München) überführt. Die Poration erfolgte wie oben beschrieben. Nach Beendigung des Pulses wurden die Zellen sofort in 1 ml SOC-Medium überführt und zur Regeneration 20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden Verdünnungen auf LB-Agarplatten ohne Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einzelkolonien wurden anschließend auf Antibiotikasensitivität überprüft.

2.4.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) wurde zur *in vitro*-Vervielfältigung von DNA-Fragmenten entwickelt. In dieser Arbeit wurde die PCR zur Konstruktion von Plasmiden eingesetzt, die der Deletion von Genen oder der Überexpression von Genen dienen. Für diese Anwendungen wurde genomische DNA als „template“ verwendet. Außerdem wurde die PCR eingesetzt, um Gendelektionen oder die Existenz von Genen in Stämmen zu überprüfen. Hierfür wurde die „template“-DNA dadurch gewonnen, dass Zellen einer Kolonie in 50 µl sterilem Merck Wasser suspendiert und durch Erhitzen (6 min, 95 °C) lysiert wurden. In einem 50 µl Reaktionsansatz wurden dann 1 µl dieses Lysates, die synthetisierten Oligonukleotide (MWG-Biotech GmbH, Ebersberg, D; je 50 pmol), eine *Taq*-Polymerase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D), PCR-Puffer und dNTP-Mix (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D; 2,4 mM je dNTP) gegeben. Die Sequenz der Oligonukleotide wurde anhand der *E. coli*-Genomsequenz im Internet ermittelt (www.ncbi.nlm.nih.gov/). Die Reaktionsfolge der PCR erfolgte in einem Mastercycler gradient der Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, (Hamburg, D). Die PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend isoliert.

2.4.8 Sequenzierung von DNA und Sequenzanalyse

Für die Sequenzierung von DNA wurde Plasmid-DNA mit Hilfe des GFX™ Micro Plasmid Prep Kit der Fa. Amersham Pharmacia Biotech Inc., Freiburg, D isoliert und gereinigt. Die Sequenzierreaktion selbst wurde nach der

Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* (1977) mit Modifikationen nach Zimmermann *et al.* (1990) durchgeführt. Bei der hier beschriebenen Methode wurden die Sequenzierungsprodukte über die Oligonukleotide mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Reaktion wurde mit Hilfe des ABI PRISM™ Big Dye Reaction Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt, D) nach dem Protokoll des Herstellers ausgeführt. Die Sequenzierungsprodukte wurden kapillarelektrophoretisch mit Hilfe der automatischen Sequenzierapparatur ABIPRISM 310 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt, D) getrennt und detektiert.

2.4.9 Konstruktion von Deletionen in *E. coli*

Die Konstruktion von Deletionsmutanten erfolgte nach den Methoden von Blomfield *et al.* (1991) und Link *et al.* (1997).

Konstruktion von Deletionsmutanten nach Blomfield *et al.* (1991)

Das Deletionsplasmid pCVD442 besitzt den Replikationsursprung des Bakteriophagen R6K, der abhängig von dem *pir*-Genprodukt ist. Außerdem besitzt es eine Ampicillinresistenz als positiven und das *sacB*-Gen als negativen Selektionsmarker. Das *sacB*-Gen kodiert eine Levansucrase, die in Anwesenheit von 5 % Saccharose cytotoxische Polymere produziert. Die Konstruktion der von pCVD442 abgeleiteten Deletionsvektoren wurde folgendermaßen durchgeführt. Per PCR wurden 1,5 kb DNA-Fragmente unmittelbar stromauf- und stromabwärts des Gens amplifiziert. Durch die eingesetzten Oligonukleotide waren die Fragmente an ihren 5'-Enden mit einer Erkennungssequenz für eine Restriktionsendonuclease versehen. Mit Hilfe des *SureClone Ligation-kits* (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D) wurden die Fragmente nach Herstellerangaben zunächst in pUC18 inseriert. Erfolgreiche Insertionen wurden über eine Blau-Weiss-Selektion detektiert und mit geeigneten Restriktionsendonucleasen aus dem Plasmid geschnitten. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurden die Fragmente ausgeschnitten und gereinigt. pCVD442 wurde mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten und anschließend dephosphoryliert. Ein eluiertes genflankierendes Fragment wurde mit Hilfe des *Ready-to-go-ligation-kits* (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D) mit geschnittenem, dephosphoryliertem pCVD442 ligiert. Mit diesem Ligationsansatz wurde der *E. coli*-Stamm DH5 α *pir* transformiert. Der entstandene Vektor wurde isoliert, geschnitten, dephosphoryliert und mit dem zweiten genflankierenden Fragment ligiert. Auf diese Weise wurden beide genflankierende Fragmente in dem Deletionsvektor direkt zusammenkloniert. Der so

konstruierte Deletionsvektor wurde dann in den Zielstamm transformiert. Diese Stämme können den Deletionsvektor nicht amplifizieren, da sie kein *pir*-Gen besitzen. Eine Ampicillinresistenz kann daher nur durch Integration des gesamten Vektors in das Chromosom erfolgen. Die Integration erfolgt durch homologe Rekombination bevorzugt in der Nähe des zu deletierenden Gens aufgrund der homologen Sequenzen im Vektor. Während eines Kurierschrittes durch Anzucht in nicht selektivem Medium über Tag wird ein zweites Rekombinationsereignis ermöglicht, durch das der Vektor wieder aus dem Chromosom herausgeschnitten wird. Auf Verlust des Plasmides wurde durch Ausplattieren der Zellen auf LB-Medium mit 5 % Saccharose gescreent. Saccharoseresistente Klone wurden auf Carbenicillinsensitivität überprüft. Saccharoseresistente, carbenicillinsensitive Klone wurden über PCR auf die erfolgreiche Deletion überprüft.

Konstruktion von Deletionsmutanten nach Link *et al.* (1997).

Das Deletionsplasmid pKO3 besitzt den temperatursensitiven Replikationsursprung des Plasmides pSC101, das Gen für die Chloramphenicol-Acetyltransferase und das *sacB*-Gen für die Levansucrase. Die Konstrukte für die Deletionen mit diesem Vektor wurden von Eggeling (Forschungszentrum Jülich) zur Verfügung gestellt. Die Integration des Vektors über homologe Rekombination in der Nähe des Zielgens erfolgte bei 43 °C, bei der der Vektor nicht repliziert werden kann. Chloramphenicolresistenz konnte nur durch Integration erreicht werden. Die Rückrekombination fand bei 30 °C in LB ohne Chloramphenicol statt. Die Selektion auf Verlust des Vektors wurde anschließend in Anwesenheit von 5 % Saccharose durchgeführt. Saccharoseresistente Klone wurden auf Chloramphenicolsensitivität und anschließend über PCR auf die erfolgreiche Deletion überprüft.

2.5 Fermentationstechnische Methoden

Für jeden der in dieser Arbeit untersuchten L-Threoninproduktionsstamm ist in den Patenten (Debabov *et al.*, 1981; 1992 und 1997) ein eigenes Medium und eine eigene Animpfschiene beschrieben. Da sich diese aber nicht sehr unterschieden, wurde im Hinblick auf eine maximale L-Threoninproduktion und der Vergleichbarkeit der Stämme sowohl ein einheitliches Medium als auch eine identische Animpfschiene neu entwickelt.

2.5.1 Einheitsmedium für fermentationstechnische Untersuchungen

Das aus den beschriebenen Threoninproduktionsmedien entwickelte Einheitsmedium setzte sich wie folgt zusammen: 15 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g/l KH_2PO_4 , 1 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 2 g/l Hefeextrakt, 0,02 g/l FeSO_4 , 30 g/l Glukose (für VL 334 / pYN7) oder 30 g/l Saccharose (für ATCC 98082 / pYN7 und BKIIM B-3996 / pVIC40). In Schüttelkolben erfolgte die pH-Pufferung durch 20 g/l CaCO_3 und im Fermenter durch automatisches Zutropfen von 3 M NaOH. Im Fermenter wurde als Calciumquelle 0,074 g/l CaCl_2 zugesetzt.

2.5.2 Animpfschiene für Untersuchungen im Fermenter

Der zu untersuchende Stamm wurde auf eine M9-Platte ausgestrichen, die mit den entsprechenden C-Quellen und Antibiotika versetzt war. Nach 2 Tagen Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen mit 10 ml 0,9 % NaCl_2 Lösung abgeschwemmt. Mit dieser Suspension wurde ein 1 l Kolben mit 100 ml Threonineinheitsmedium angeimpft, der 15 h (120 Upm, 37 °C) inkubiert wurde. 10 ml von dieser Kultur wurde verwendet, um eine zweite 100 ml Vorkultur anzuimpfen. Nach 9 h diente diese Kultur als Inoculum für den Fermenter.

2.5.3 Fermentationstechnische Untersuchungen

Die L-Threonin-Produktion erfolgte in Biostat B Fermenter des Herstellers Braun Biotech (Melsungen, D). Das hierzu verwendete Fermentationsgefäß hatte ein Gesamtvolumen von 2 Litern, das Arbeitsvolumen betrug 1 Liter. Die Sterilisation des Biostaten erfolgte mit eingebauten Sonden und mit 1 Liter Medium, dem nach der Sterilisation 0,1 M CaCl_2 -Lösung, Antibiotika und die C-Quelle zugeführt wurden. Der Fermenter war mit einer pH-Regelung und einer pO_2 -Regelung auf Ebene von PID- (Proportional-Integral-Differential)-Reglern ausgestattet. Es wurde eine konstante Rührerdrehzahl von 1200 Upm, eine stetige Zuluft von 0,5 l/min und eine Temperatur von 37 °C eingestellt. Der pH-Wert wurde mit 3 M NaOH, geregelt über Stabsonde und Pumpe, automatisch auf 7 konstant gehalten. Ebenso wurde Polypropylenglycol 2000 (Fluka, Buchs, CH) als Antischaummittel bei Bedarf zugesetzt. Die Proben, die stündlich entnommen wurden, wurden auf Zelldichte, externe Threonin- und Substratkonzentration und auf zellinterne Threonin- und ATP-Konzentration überprüft.

2.5.4 Bestimmung von Ausbeute, Selektivität und Produktivität

Die Charakterisierung eines Produktionsstammes umfaßt neben der Bestimmung der Produktkonzentration verschiedene Parameter, die den Produktbildungsprozeß näher beschreiben. Dabei beschreibt die integrale Ausbeute η (g/g) das Verhältnis vom erhaltenen Produkt zum eingesetzten Substrat:

$$\eta = C_{\text{Produkt}} / C_{\text{Substrat}}$$

C_{Produkt} = Konzentration des entstandenen Produktes in g/l

C_{Substrat} = Konzentration des eingesetzten Substrates in g/l

Die differentielle spezifische Selektivität Y_{PS} (g/g) ist ein Maß dafür, wieviel Kohlenstoff im Verhältnis zum Gesamtverbrauch zu einem bestimmten Zeitpunkt der Fermentation vom Substrat zum Produkt fließt:

$$Y_{PS} = \frac{dP/dt}{dS/dt}$$

dP/dt = Änderung der Produktbildung (g/l) über die Zeit

dS/dt = Änderung der Substratkonzentration (g/l) über die Zeit

Die spezifische Produktivität q_P (mmol * mgTG⁻¹) beschreibt das Verhältnis aus dem gebildeten Produkt (P) und der Zellmasse (X) und ist damit ein Maß für die Aktivität der Zellen zur Produktbildung:

$$q_P = \frac{P}{X}$$

P = Produktbildung (mM)

X = Biotrockenmasse (mgTG / ml)

Die differentielle spezifische Produktivität q_P (nmol * min⁻¹ * mgTG⁻¹) - auch spezifische Produktionsrate oder spezifische Produktbildungsrate genannt - beschreibt das Verhältnis aus dem gebildeten Produkt und der Zellmasse über den Zeitlauf der Fermentation und ist damit ein Maß für die Aktivität der Zellen zur Produktbildung zu einem bestimmten Zeitpunkt:

$$q_P = \frac{dP/dt}{X}$$

dP/dt = Änderung der Produktbildung (mM) über die Zeit

X = Biotrockenmasse (mgTG / ml) zum Zeitpunkt t

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Threoninaufnahme

3.1.1 Die Threoninaufnahme des *E. coli*-Wildtypstammes DH5 α mcr

Das wichtigste Aufnahmesystem für Threonin in *E. coli* ist bei Wachstum in Minimalmedium unter aeroben Bedingungen ein Threonin- / Serintransporter (Krebs, 1995). Kinetische Daten dieses Transporters wurden nur für die Serinaufnahme publiziert: der K_M für Serin wurde mit 8 μM angegeben, der für Na^+ -Ionen mit 21 μM (Hama *et al.*, 1987). Zur Charakterisierung dieses Transporters in Hinblick auf die Threoninaufnahme wurden zunächst die kinetischen Parameter des *E. coli*-Wildtypstammes DH5 α mcr bestimmt (vgl. Abb. 7). Hiermit wurde gleichzeitig eine Vergleichsgrundlage für die nachfolgend gemessene Threoninaufnahme der Produktionsstämme gelegt.

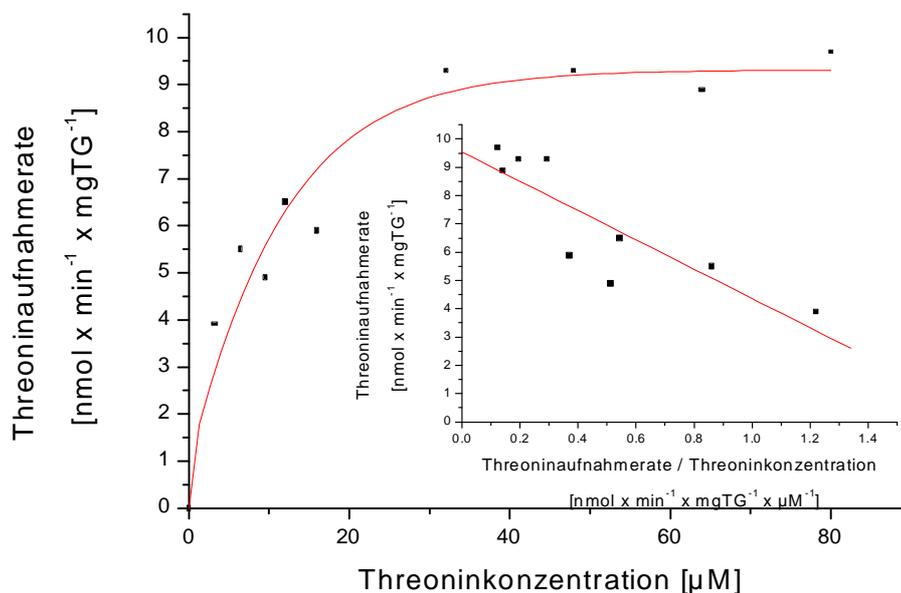


Abb. 7: Michaelis-Menten- und Eadie-Hofstee-Auftragung der Threoninaufnahmekinetik des in M9-Glukose-Medium gezogenen *E. coli*-Wildtypstammes DH5 α mcr

Die Threoninaufnahmeaktivität des *E. coli*-Wildtypstammes DH5 α mcr ist durch einen K_M -Wert von $7 \pm 1 \mu\text{M}$ für Threonin und einer maximalen Geschwindigkeit von $10 \pm 1 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ gekennzeichnet. Sie wird durch einen 100-fachen Überschuss an Serin um 91 % verringert (Daten nicht gezeigt).

3.1.2 Die Threoninaufnahme der Threoninproduktionsstämme

Die Threoninproduzenten VL 334 / pYN7, ATCC 98082 / pYN7 und BKIIM B-3996 / pVIC40 wurden auf ihre Threoninaufnahmeaktivität untersucht. Da die Aufnahme ein der Produktion entgegengesetzter Prozess ist, lag es nahe, dass durch die unspezifische Mutagenese, durch die die Stämme entwickelt wurden, auch die Aktivitäten der Threoninaufnahmesysteme verändert wurden. Diese Vermutung konnte, wie in Tabelle 3 zu sehen ist, bestätigt werden.

Tab. 3: Threoninaufnahmeraten in $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ von in M9-Glukose-Medium gezogenen Stämmen mit und ohne Kompetitionen durch Serinzugabe. Doppelmessungen sind durch Schrägstriche gekennzeichnet.

	75 μM [^{14}C]-Threonin	75 μM [^{14}C]-Threonin + 5 mM Serin
VL 334 / pYN7	4,7 / 6,5	0,2
ATCC 98082 / pYN7	2,8 / 2,6	0,2
BKIIM B-3996 / pVIC40	1,6 / 0,8	0,5

Im Vergleich zum Wildtyp mit einem V_{max} von $10 \pm 1 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ (vgl. Abb. 7) zeigten alle drei Threoninproduzenten eine verringerte Aufnahmerate. Interessanterweise gibt es auch eine Abnahme der Aufnahmeaktivität innerhalb der Stammentwicklung von VL 334 / pYN7 über ATCC 98082 / pYN7 hin zu BKIIM B-3996 / pVIC40, die mit dem Anstieg der Produktivität der Stämme korreliert. In allen drei Stämmen sind die Threoninaufnahmeaktivitäten durch Serin kompetitierbar, was auf die Aktivität des Threonin- / Serinsystem hinweist.

3.1.3 Die Threoninaufnahme der *ssfT*-Deletionsmutanten der Threoninproduktionsstämme

Da die Unterbindung der Threoninaufnahme zu einer gesteigerten Produktion von Threonin führen kann (Okamoto *et al.*, 1997), sollte die Deletion eines Gens für ein Threoninaufnahmesystem ein geeignetes Mittel zur Optimierung von Produktionsstämmen sein. Die drei Threoninproduktionsstämme (VL 334 / pYN7, ATCC 98082 / pYN7 und BKIIM B-3996 / pVIC40) zeigten die Aktivität eines durch Serin kompetitibaren Threoninaufnahmesystems (vgl. Tab. 3). Das *ssfT*-Gen als Kandidat für das Gen des Na⁺-Ionen-abhängigen Serin- / Threonintransportsystems sollte in den Produktionsstämmen deletiert werden, um eine Stammoptimierung zu erreichen. Das Gen konnte in den drei Produktionsstämmen mittels PCR nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Threoninproduktionsstämme VL 334 / pYN7 und ATCC 98082 / pYN7 wurden zunächst von ihrem Plasmid kuriert (vgl. 2.4.6), da das Deletionsplasmid pCVD442- Δ *ssfT*, mit dem die Deletion durchgeführt wurde, wie pYN7 eine Carbenicillinresistenz trägt. Anschließend konnte das *ssfT*-Gen sowohl in VL 334 als auch in ATCC 98082 deletiert werden. Da VL 334 und ATCC 98082 ohne pYN7 Threonin und Isoleucin auxothroph sind, sollte die Deletion des Gens für das Threoninaufnahmesystem einen Wachstumsnachteil in Threonin und Isoleucin supplementierten Minimalmedium bewirken. Dies konnte jedoch nicht beobachtet werden. Die Deletionsmutanten hatten ein ähnliches Wachstumsverhalten wie die Ausgangsstämme. Wie aus Tabelle 4 zu ersehen ist, zeigten die Aufnahmemessungen von in M9-Glukose-Medium gezogenen VL 334 Δ *ssfT* und ATCC 98082 Δ *ssfT* außerdem weder einen signifikanten Unterschied in den Threoninaufnahmeraten noch in der Serinkompetition dieser Aufnahme im Vergleich zu den Ausgangsstämmen.

Tab. 4: Threoninaufnahmeraten in $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ von in M9-Glukose-Medium gezogenen Stämmen mit und ohne Kompetitionen durch Serinzugabe. Doppelmessungen sind durch Schrägstriche gekennzeichnet.

	75 μM [^{14}C]-Threonin	75 μM [^{14}C]-Threonin + 5 mM Serin
VL 334	2,2 / 1,2	0,2
VL 334 ΔsstT	2,1 / 2,3	0,6
ATCC 98082	0,9 \pm 0,1	0,1 / 0,2
ATCC 98082 ΔsstT	0,7 \pm 0,3	0,1 / 0,2

Da sich mit diesen Anzucht- und Messbedingungen weder Unterschiede im Wachstum noch in den Threoninaufnahmeraten und deren Kompetition durch Serin von VL 334 ΔsstT und ATCC 98082 ΔsstT zu den Ausgangsstämmen ergaben, wurde Glukose nach Ogawa *et al.* (1998) sowohl im Medium als auch im Wasch- und Messpuffer durch Lactat ersetzt. Die Ergebnisse der Messungen mit den veränderten Anzucht- und Messbedingungen sind in Tabelle 5 und 6 dargestellt.

Tab. 5: Threoninaufnahmeraten in $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ von in M9-Lactat-Medium gezogenen Stämmen mit und ohne Kompetitionen durch Serinzugabe.

	50 μM [^{14}C]-Threonin	50 μM [^{14}C]-Threonin + 5 mM Serin
ATCC 98082	1,0 \pm 0,2	0,3
ATCC 98082 ΔsstT	1,2 \pm 0,3	0

Auch mit Lactat als Kohlenstoffquelle konnte kein Effekt der *sstT*-Deletion in dem Stammvergleich ATCC 98082 / ATCC 98082 ΔsstT beobachtet werden. Weder das Wachstum des Stammes ATCC 98082 ΔsstT in M9-Lactat-Medium supplementiert mit Isoleucin und Threonin noch dessen Threoninaufnahmerate oder die Kompetition der Aufnahme durch Serin unterschieden sich vom Ausgangsstamm (vgl. Tab. 5). Die weiteren Messungen wurden die Stämme VL 334 ΔsstT transformiert mit pYN7 (*thrA*^{FBR}BC, Amp^R) und VL 334 / pYN7 verglichen.

Tab. 6: Threoninaufnahmeraten in $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ von in M9-Lactat-Medium gezogenen Stämmen mit und ohne Kompetitionen durch Serinzugabe. Doppelmessungen sind durch Schrägstriche gekennzeichnet.

	100 μM [^{14}C]-Threonin	100 μM [^{14}C]-Threonin +10mM Serin
VL 334 / pYN7	6,6 / 7,1	1,5
VL 334 ΔsstT / pYN7	4,2	0,8

Tabelle 6 zeigt eine leicht verringerte Threoninaufnahmerate von VL 334 ΔsstT / pYN7 im Vergleich zum Ausgangsstamm, die jedoch immer noch durch Serin kompetitierbar war. Es muss folglich noch ein weiteres Threoninaufnahmesystem in *E. coli* vorhanden sein, dass durch Serin kompetitiert wird.

Da die Deletion des *sstT*-Gens kaum Auswirkungen auf die Aufnahmerate der Threoninproduktionsstämme hatte, wurde die Threoninproduktion des Stammes VL 334 ΔsstT / pYN7 im Vergleich zum Patentstamm VL 334 / pYN7 untersucht. Die Deletion eines Aufnahmesystems sollte sich in einer erhöhten Produktivität der Stämme auswirken und dies ist somit eine zweite Möglichkeit den Effekt dieser Deletion zu überprüfen (vgl. Tab. 7).

Tab. 7: Threoninkonzentrationen im Mediumüberstand der Stämme VL 334 ΔsstT / pYN7 und VL 334 / pYN7

Stamm	Medium	OD ₆₀₀	Threoninkonzentration [mM]
VL 334 / pYN7	M9-Glukose	0,14	1,4
	M9-Lactat	0,24	1
		0,8	2
VL 334 ΔsstT / pYN7	M9-Glukose	0,19	1,6
	M9-Lactat	0,14	1,3
		0,9	1,8

Wie aus Tabelle 7 ersichtlich, differiert die Threoninproduktion des Stammes VL 334 ΔsstT / pYN7 nicht signifikant von der des Ausgangsstammes VL 334 / pYN7. Da die geringen Effekte der Deletion sowohl auf die Aufnahme als auch auf die

Produktion ein überraschendes Ergebnis waren, wurde eine detaillierte Charakterisierung der Threoninaufnahme dieser Stämme durchgeführt.

3.1.3.1 K_M -Bestimmung der Threoninaufnahme

Zur besseren Charakterisierung der Threoninaufnahme der Deletionsmutante VL 334 Δ sstT/pYN7 im Vergleich zum Ausgangsstamm wurden die kinetischen Parameter der beiden Stämme ermittelt, um Unterschiede aufzuzeigen. Zunächst wurde die Aufnahmeaktivität von VL 334 / pYN7 mittels einer K_M -Wert Bestimmung genauer charakterisiert (vgl. Abb. 8).

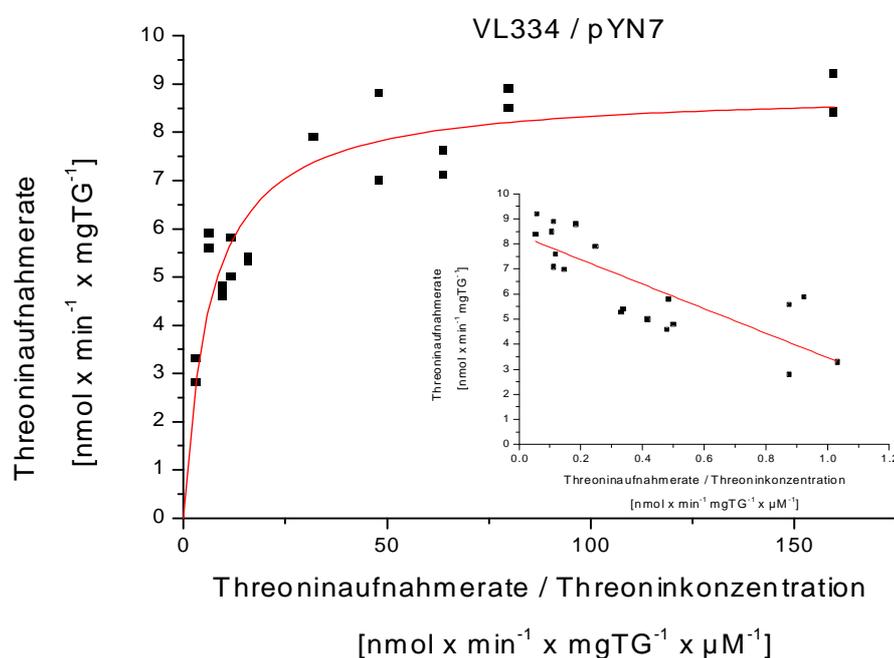


Abb. 8: Michaelis-Menten- und Eadie-Hofstee-Auftragung der Threoninaufnahmekinetik des in M9-Lactat-Medium gezogenen Stammes VL334 / pYN7

Die Michaelis-Menten- und die Eadie-Hofstee-Auftragung der Threoninaufnahmekinetik des Stammes VL 334 / pYN7 zeigt einen K_M -Wert für Threonin von $10 \pm 2 \mu\text{M}$ und eine maximale Geschwindigkeit von $8 \pm 1 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$. Im Vergleich zur Threoninaufnahmeaktivität des *E. coli*-Wildtypstammes (vgl. Abb. 7) hat der Threoninproduzent VL 334 / pYN7 eine Threoninaufnahme mit einer tendenziell geringeren Affinität zu Threonin, da die halbmaximale Geschwindigkeit erst bei einer Threoninkonzentration von $10 \pm 2 \mu\text{M}$, im Wildtyp dagegen schon mit $7 \pm 1 \mu\text{M}$ erreicht wird. Ebenso ist eine leicht geringere Maximalgeschwindigkeit von $8 \pm 1 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$

mgTG⁻¹ gegenüber $10 \pm 1 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ des Wildtyps zu verzeichnen. Die Unterschiede sind aber aufgrund der Standardabweichungen nicht sehr markant.

Wie aus Abbildung 9 zu ersehen, beträgt der K_M -Wert der Deletionsmutante VL334 Δ sstT / pYN7 für die Threoninaufnahme $30 \pm 6 \mu\text{M}$, die maximale Geschwindigkeit $5,5 \pm 0,4 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$. Der Stamm VL 334 Δ sstT / pYN7 hat also ein Threoninaufnahmeverhalten mit einen 3-fach höheren K_M -Wert ($30 \pm 6 \mu\text{M}$) als der Ausgangsstamm ($10 \pm 2 \mu\text{M}$) (vgl. Abb. 8). Die Maximalgeschwindigkeit der sstT-Deletionsmutante ist mit $5,5 \pm 0,4 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ geringer als die des Stammes VL 334 / pYN7 ($8 \pm 1 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$). Diese Unterschiede sind auch unter Berücksichtigung der Standardabweichungen deutlich und signifikant. Gemeinsam ist den Threoninaufnahmeverhalten der beiden Stämme die Kompetitierbarkeit durch Serin.

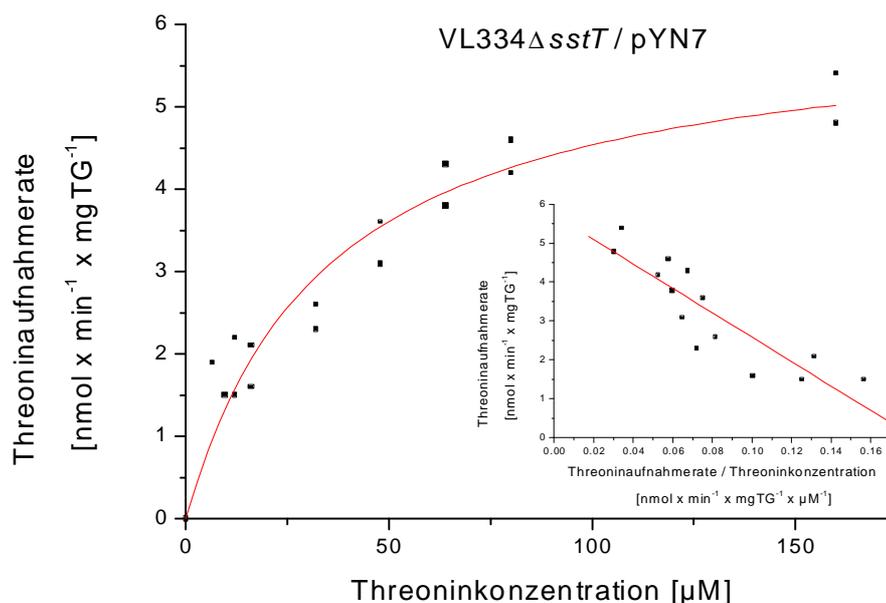


Abb. 9: Michaelis-Menten- und Eadie-Hofstee-Auftragung der Threoninaufnahmekinetik des in M9-Lactat-Medium gezogenen Stammes VL334 Δ sstT / pYN7

Der Grund für die Differenz in den Threoninaufnahmeraten ist die Deletion des sstT-Gens. Das SstT-System ist also nur für circa 30 % oder $2,5 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ der Threoninaufnahme im Stamm VL 334 / pYN7 verantwortlich. Da die verbleibende Threoninaufnahmeaktivität des Stammes VL 334 Δ sstT / pYN7 immer noch durch Serin kompetitierbar ist, muß noch ein weiterer Threonin- / Serintransporter in den Stämmen vorhanden sein.

3.1.3.2 K_i -Wert Bestimmung der Threoninaufnahme für Serin

Um weitere Unterscheidungsmerkmale zwischen dem Threoninaufnahmeverhalten des Stammes VL 334 Δ *sstT* / pYN7 und dem des Ausgangsstammes zu erhalten, wurden die K_i -Werte der beiden Threonintransporter für Serin bestimmt. Dazu wurden Threoninaufnahmemessungen in Gegenwart von unterschiedlichen Mengen Serin mit VL 334 / pYN7 und VL 334 Δ *sstT* / pYN7 durchgeführt (vgl. Tab. 8).

Tab. 8: Threoninaufnahmeraten in $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ von in M9-Lactat-Medium gezogenen Stämmen mit und ohne Kompetitionen durch Serinzugabe. Doppelmessungen sind durch Schrägstriche gekennzeichnet.

	200 μM [^{14}C]-Threonin	50 μM [^{14}C]-Threonin	50 μM [^{14}C]-Threonin + 0,1 mM Serin	50 μM [^{14}C]-Threonin + 0,5 mM Serin	50 μM [^{14}C]-Threonin + 2 mM Serin
VL 334 / pYN7	9,2 / 13,1	7,8 \pm 0,9	4,9 / 4,7	2,1 / 2,1	1,0 / 1,0
VL 334 Δ <i>sstT</i> / pYN7	5,1 \pm 0,8	4,3 \pm 0,8	2,5 \pm 0,2	1,8 \pm 0,1	1,2 \pm 0,1

Zum einen erkennt man in Tabelle 8 erneut die geringere Threoninaufnahmerate des Stammes VL 334 Δ *sstT* / pYN7 gegenüber dem Ausgangsstamm, zum anderen die Kompetitierbarkeit dieser verringerten Rate durch Serin bis auf eine Restaktivität von $1 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$. Diese Restaktivität ist identisch mit der des Stammes VL 334 / pYN7. Die K_i -Werte wurden wie unter 2.3.4 beschrieben berechnet: Für VL 334 / pYN7 beträgt der K_i -Wert $47 \pm 6 \mu\text{M}$, für VL 334 Δ *sstT* / pYN7 $606 \pm 95 \mu\text{M}$. Trotz der großen Standardabweichung ist dieser Unterschied prägnant. Somit besitzt der zweite Threonin- / Serintransporter, dessen Aktivität in dem Stamm VL 334 Δ *sstT* / pYN7 isoliert von der des SstT-Systems gemessen werden kann, einen 3-fach höherem K_M -Wert und einem mehr als 10-fach höheren K_i -Wert für Serin als die Aktivität im Ausgangsstamm. Durch den neu charakterisierten Transporter kann erklärt werden, warum trotz der Deletion des *sstT*-Gens eine Serin kompetitierbare Threoninaufnahmerate messbar ist.

3.1.4 Versuche zur molekularbiologischen Zuordnung der Threoninaufnahmeaktivitäten

Im Vorfeld der Identifizierung des *sstT*-Gens sind von Six (unveröffentlicht) und im Rahmen dieser Arbeit Experimente durchgeführt worden, um der Threonin- / Serinaufnahmeaktivität ein Gen zuzuordnen. Hierfür wurden Datenbankrecherchen mit *tdcC* durchgeführt, um Gene zu finden, die dem Gen des H⁺-Threonintransporter ähnlich sind und dementsprechend ein Protein ähnlicher Funktion kodieren könnten. Zunächst wurden in einer Nukleinsäuredatenbank die zwei offenen Leseraster *yhao*, *yhjv* gefunden, die Ähnlichkeiten zu *tdcC* zeigen. Beide wurden zunächst einzeln und später zusammen in dem *E. coli*-Wildtypstamm AN387 disruptiert. Weder die Einzelmutanten noch der Stamm AN387 *yhao::Kan yhjv::Cam* zeigten ein zum Wildtyp verändertes Threoninaufnahmeverhalten (Six, unveröffentlicht). In einer Proteindatenbank wurde nachfolgend ein putatives Transmembranprotein identifiziert, das Ähnlichkeit zu TdcC zeigte. Das Gen für dieses putative Protein, *o409*, wurde im Rahmen dieser Arbeit in dem Stamm AN387 *yhao::Kan yhjv::Cam* deletiert. Die Threoninaufnahme des Stammes AN387 *yhao::Kan yhjv::Cam Δo409* wurde im Vergleich zu dem Stamm AN387 *yhao::Kan yhjv::Cam* untersucht (vgl. Tab. 9).

Tab. 9: Threoninaufnahmeraten in nmol * min⁻¹ * mgTG⁻¹ von in M9-Glukose-Medium gezogenen Stämmen mit und ohne Kompetitionen durch Serinzugabe. Doppelmessungen sind durch Schrägstriche gekennzeichnet.

	75 μM [¹⁴ C]-Threonin	50 μM [¹⁴ C]-Threonin + 5 mM Serin
AN387 <i>yhao::Kan yhjv::Cam</i>	5,2 ± 0,3	0,5 / 0,6
AN387 <i>yhao::Kan yhjv::Cam Δo409</i>	5,5 ± 0,5	0,5 / 0,6

Sowohl die Threoninaufnahmeraten der in M9-Glukose gezogenen Stämme AN387 *yhao::Kan yhjv::Cam* und dessen *o409*-Deletionsmutante als auch die Serinkompetition dieser Raten sind identisch. Wie für die beiden offenen Leseraster *yhao* und *yhjv* ist folglich auch für *o409* die Funktion der kodierten Proteine nicht offensichtlich.

Der Stamm AN387 *yhao::Kan yhjv::Cam Δo409* wurde weitergehend untersucht, um zu überprüfen, ob die drei offenen Leseraster *yhao*, *yhjv* und *o409* das Protein mit der Serin kompetitibaren Threoninaufnahmeaktivität der *sstT*-Deletionsmutanten (vgl. 3.1.3) kodieren. Das *sstT*-Gen wurde in dem Stamm AN387 *yhao::Kan yhjv::Cam Δo409* deletiert und der so erhaltene Stamm AN387 *yhao::Kan yhjv::Cam Δo409 ΔsstT*

im Vergleich zum Ausgangsstamm auf seine Threoninaufnahmerate getestet. Die Konkurrenz der Rate durch Serin wurde ebenfalls untersucht (vgl. Tab. 10).

Tab. 10: Threoninaufnahmeraten in $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ von in M9-Lactat-Medium gezogenen Stämmen mit und ohne Kompetitionen durch Zugabe von Serin.

	50 μM [^{14}C]-Threonin	50 μM [^{14}C]-Threonin + 5 mM Serin
AN387 <i>yhao::Kan yhjv::Cam $\Delta o409$</i>	$21,6 \pm 2,3$	$3,3 \pm 0,2$
AN387 <i>yhao::Kan yhjv::Cam $\Delta o409 \Delta sstT$</i>	$12,9 \pm 1,4$	$3,4 \pm 0,2$

Tabelle 10 ist zu entnehmen, dass die Threoninaufnahmerate des in M9-Lactat gezogenen Stammes AN387 *yhao::Kan yhjv::Cam $\Delta o409$* drastisch erhöht ist im Vergleich zu der Rate des in M9-Glukose-Medium gezogenen Stammes (vgl. Tab. 9). Durch die hohen Raten im Vergleich zu den Threoninproduzenten ist hier der Effekt der *sstT*-Deletion in der Verringerung der Threoninaufnahmerate deutlicher als in VL 334 / pYN7 zu sehen. Die Verringerung der Threoninaufnahmerate durch die *sstT*-Deletion beträgt mit $8,7 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ 40 % der Ausgangsaktivität. Die Threoninaufnahmeaktivitäten sowohl von AN387 *yhao::Kan yhjv::Cam $\Delta o409$* als auch von AN387 *yhao::Kan yhjv::Cam $\Delta o409 \Delta sstT$* sind bis auf eine Restaktivität von $3,4 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ durch Zugabe von Serin kompetitierbar. Die drei offenen Leseraster *yhao*, *yhjv* und *o409*, die ähnlich zu *tdcC* sind, haben also weder einen Effekt auf die weiterhin Serin kompetitierbare Threoninaufnahme als auch auf die Threoninaufnahme, die nicht durch Serin kompetitierbar ist.

3.1.5 Die Na^+ -Abhängigkeit der zwei Threoninaufnahmesysteme

Die Na^+ -Ionen-Abhängigkeit der zwei Threonin- / Serinaufnahmetransporter sollte überprüft werden, um neben den kinetischen Daten (K_M , V_{max} und K_i) eine zweite Unterscheidungsmöglichkeit der zwei Systeme zu erhalten. Der K_M -Wert von Na^+ -Ionen des Na^+ -gekoppelten Serin- / Threonintransportes beträgt $21 \mu\text{M}$ (Hama *et al.*, 1987). Normale Pufferverunreinigungen bei Benutzung von Glasgefäßen weisen allerdings schon eine Na^+ -Konzentration von ungefähr $50 \mu\text{M}$ auf, so dass Messungen unter dieser Konzentration mit hohem technischen Aufwand verbunden sind. Um die Na^+ -Abhängigkeit der beiden Threoninaufnahmesysteme zu untersuchen, wurde deshalb der Inhibitor Harmalin verwendet. Chen *et al.* (1985) setzten diese organische Base

zur Inhibition des Na⁺-abhängigen Prolintransportes in *E. coli* ein. Die Harmalinkonzentration, die bei 90 µM NaCl zu 50 % Inhibition der Prolinrate führte, lag bei 0,5 mM. Die Threoninaufnahmeraten der Stämme AN387 *yhao::Kan yhjv::Cam Δo409* und AN387 *yhao::Kan yhjv::Cam Δo409 ΔsstT* wurden mit den Aufnahmeraten bei Zugabe von Harmalin oder Serin verglichen (vgl. Tab. 11).

Tab. 11: Threoninaufnahmeraten in nmol * min⁻¹ * mgTG⁻¹ von in M9-Lactat-Medium gezogenen Stämmen mit und ohne Kompetitionen durch Zugabe von Serin. Doppelmessungen sind durch Schrägstriche gekennzeichnet.

	50 µM [¹⁴ C]-Threonin	50 µM [¹⁴ C]-Threonin + 2,5 mM Harmalin	50 µM [¹⁴ C]-Threonin + 5 mM Serin
AN387 <i>yhao::Kan yhjv::Cam Δo409</i>	21,6 ± 2,3	10,6 / 10,9	3,3 ± 0,2
AN387 <i>yhao::Kan yhjv::Cam Δo409 ΔsstT</i>	12,9 ± 1,4	8,1 / 10	3,4 ± 0,2

Zum einen erkennt man in Tabelle 11 den deutlichen Effekt der *sstT*-Deletion in der geringeren Threoninaufnahmerate des Stammes AN387 *yhao::Kan yhjv::Cam Δo409 ΔsstT* gegenüber dem Ausgangsstamm, zum anderen die Kompetitierbarkeit dieser verringerten Rate durch Serin bis auf eine Restaktivität von 3,4 nmol * min⁻¹ * mgTG⁻¹. Diese Restaktivität ist identisch mit der des Stammes AN387 *yhao::Kan yhjv::Cam Δo409*. Die Threoninaufnahmeaktivität des Stammes AN387 *yhao::Kan yhjv::Cam Δo409* wird durch Harmalin auf die Hälfte der Rate beschränkt. Die Aufnahmeaktivität der *sstT*-Deletionsmutante wird durch den Zusatz von Harmalin kaum reduziert, woraus sich schliessen läßt, dass diese Threonin- / Serinaufnahmeaktivität im Gegensatz zum SstT-System Na⁺-Ionen-unabhängig sein könnte.

3.2 Charakterisierung der Serinaufnahme

Durch die Threoninaufnahmemessungen konnte gezeigt werden, dass es in *E. coli* neben dem SstT-System noch ein weiteres Threonin- / Serinsystem gibt, das möglicherweise unabhängig vom Symport von Na⁺-Ionen ist. Dieses System wurde auch durch Serinaufnahmemessungen untersucht.

3.2.1 Die Serinaufnahme des *E. coli*-Wildtypstammes AN387

Um einen Vergleich für die Serinaufnahmemessungen der Threoninproduktionsstämme zu haben, wurde zuerst die Aufnahme rate des *E. coli*-Wildtypstammes AN387 bestimmt.

Tab. 12: Serinaufnahmeraten in nmol * min⁻¹ * mgTG⁻¹ von in M9-Lactat-Medium gezogenen Zellen mit und ohne Kompetitionen durch Zugabe von Threonin. Doppelmessungen sind durch Schrägstriche gekennzeichnet.

	50 µM [¹⁴ C]-Serin	[¹⁴ C]-Serin + 0,1 mM Threonin	[¹⁴ C]-Serin + 0,5 mM Threonin	[¹⁴ C]-Serin + 2 mM Threonin
AN387	14 / 12,8	5,2 / 5,6	4,7 / 4,3	4,0 / 4,3

Wie aus Tabelle 12 ersichtlich hat AN387 eine Serinaufnahmeaktivität von circa 13 nmol * min⁻¹ * mgTG⁻¹, die durch Threonin auf eine Restaktivität von ungefähr 4 nmol * min⁻¹ * mgTG⁻¹ inhibierbar ist.

3.2.2 Die Serinaufnahme der *sstT*-Deletionsmutanten der Threoninproduzenten

Zunächst wurde die Serinaufnahme und deren Competition durch Threonin des Stammes ATCC 98082 und dessen *sstT*-Deletionsmutante ATCC 98082Δ*sstT* untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tab. 13: Serinaufnahmeraten in $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ von in verschiedenen Medien gezogenen Stämmen mit und ohne Kompetitionen durch Zugabe von Threonin.

	Medium	75 μM [^{14}C]-Serin	[^{14}C]-Serin + 5 mM Threonin
ATCC 98082	M9-Glukose	8,8	4,2
ATCC 98082 Δ <i>ssfT</i>	M9-Glukose	6,8	5,2
ATCC 98082	M9-Lactat	11,9	4,4
ATCC 98082 Δ <i>ssfT</i>	M9-Lactat	8,4	4,9

Vergleicht man die Serinaufnahmeaktivität des in M9-Lactat gezogenen Stammes ATCC 98082 (siehe Tab. 13) mit der des *E. coli*-Wildtypstammes DH5 α *mcr* (vgl. Tab. 12), zeigt ATCC 98082 eine leicht verringerte Serinaufnahmeaktivität. Diese Reduktion der Rate bei der Entwicklung des Threoninproduzenten ist nicht so deutlich wie bei den Threoninaufnahmeraten von ATCC 98082, was darauf hindeutet, dass die Abnahme der Threoninaufnahme spezifisch und wichtig für die Threoninproduktion ist.

Tabelle 13 zeigt den Vergleich der Serinaufnahmeraten und deren Competition durch Threonin der Stämme ATCC 98082 und dessen *ssfT*-Deletionsmutante in M9-Glukose- und M9-Lactat-Medium. Beide Stämme zeigen eine erhöhte Rate, wenn sie statt in M9-Glukose- in M9-Lactat-Medium gezogen wurden. Unter beiden Anzuchtbedingungen zeigt ATCC 98082 Δ *ssfT* eine leicht geringere Serinaufnahmerate als der Ausgangsstamm. Diese reduzierten Aufnahmeaktivitäten sind weiterhin durch Threonin auf eine Restaktivität kompetitierbar, die in den beiden Stämmen unter gleichen Anzuchtbedingungen nahezu identisch sind. Wie auch die Grundaktivitäten sind auch die Restaktivitäten von in M9-Lactat-Medium gezogenen Stämmen tendenziell höher als von Stämmen, die in M9-Glukose-Medium gezogen wurden.

Die Serinaufnahme des Produktionsstammes VL 334 und seiner Deletionsmutante VL 334 Δ *ssfT* wurde nach vorhergehender Transformation der Stämme mit pYN7 (*thrA*^{FBR}*BC*, Amp^R) gemessen. Mit dem Plasmid sind die Stämme nicht mehr Threonin und Isoleucin auxotroph, so dass eine Anzucht in un-supplementiertem Minimalmedium möglich war. Dies hat den Vorteil, dass das nur in aminosäurehaltigem Medium oder durch Leucin induzierte, Serin spezifische System SdaC-System unter diesen Bedingungen inaktiv ist (Sumantran *et al.*, 1990). Die Ergebnisse der Messungen mit VL 334 / pYN7 und VL 334 Δ *ssfT* / pYN7 sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tab. 14: Serinaufnahmeraten in $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ von in M9-Lactat-Medium gezogenen Stämmen mit und ohne Kompetitionen durch Zugabe von Threonin. Doppelmessungen sind durch Schrägstriche gekennzeichnet. Die grauen Zellen zeigen Ergebnisse aus Messungen mit 200 μM eingesetztem $[^{14}\text{C}]$ -Serin, die hellgrauen mit 100 μM und die weissen die mit 50 μM eingesetztem $[^{14}\text{C}]$ -Serin.

	$[^{14}\text{C}]$ -Serin	$[^{14}\text{C}]$ -Serin + 0,1 mM Threonin	$[^{14}\text{C}]$ -Serin + 0,5 mM Threonin	$[^{14}\text{C}]$ -Serin + 2 mM Threonin	$[^{14}\text{C}]$ -Serin + 10 mM Threonin
VL 334 / pYN7	18,1 / 14,9				
	7,8 / 7,9				5,1 / 5,0
	$9 \pm 0,7$	$4,9 \pm 0,1$	$4 \pm 0,5$	$4,2 \pm 0,2$	
VL 334 Δ sstT / pYN7	$7,2 \pm 0,7$				
	5,4 / 6,7				4,3 / 4,1
	$4,4 \pm 0,4$	$3,3 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,1$	$4,5 \pm 0,7$	

Vergleicht man zunächst die Serinaufnahmerate des Stammes VL 334 / pYN7 bei 50 μM $[^{14}\text{C}]$ -Serin (vgl. Tab. 14) mit der des Wildtypstammes DH5 α mcr aus Tabelle 12, so ist nur ein kleiner Rückgang in der Serinaufnahme zu verzeichnen. Dies deutet wiederum auf einen spezifischen Rückgang in der Threoninaufnahme bei der Stammentwicklung hin.

Bei dem Stammvergleich VL 334 / pYN7 und VL 334 Δ sstT / pYN7 (vgl. Tab. 14) zeigte die Deletionsmutante eine deutlich verringerte Serinaufnahmerate gegenüber dem Ausgangsstamm. Im Gegensatz zu der deutlichen Threoninkompetitierbarkeit der Serinaufnahme des Stammes VL 334 / pYN7 zeigte die sstT-Deletionsmutante in ihrer Serinaufnahme nur eine geringe Threoninkompetitierbarkeit. Zusammen mit den Ergebnissen des Stammvergleiches ATCC 98082 und ATCC 98082 Δ sstT kann man aber aus den Ergebnissen dieser Messungen schliessen, dass durch die Deletion des sstT-Gens nicht die komplette Threonin- / Serinaufnahmeaktivität unterbunden wird, so dass ein weiteres Threonin- / Serinsystem wahrscheinlich ist.

3.2.3 Die Serinaufnahme des Stammes AN387 *yhao::Kan yhjv::Cam Δo409 ΔsstT*

Durch den Vergleich der Stämme AN387 *yhao::Kan yhjv::Cam Δo409* und AN387 *yhao::Kan yhjv::Cam Δo409 ΔsstT* wurde überprüft, ob die nicht Threonin kompetitierbare Serinaufnahme mit einem der drei zu *tdcC*-ähnlichen Gene in Verbindung gebracht werden kann (vgl. Tab. 15).

Tab. 15: Serinaufnahmeraten in $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ von in M9-Lactat-Medium gezogenen Stämmen.

	50 μM [^{14}C]-Serin	50 μM [^{14}C]-Serin + 5 mM Threonin
AN387 <i>yhao::Kan yhjv::Cam Δo409</i>	22,3 \pm 1,4	5,3 \pm 1,2
AN387 <i>yhao::Kan yhjv::Cam Δo409 ΔsstT</i>	13,1 \pm 1,1	4,8 \pm 0,5

Wie Tabelle 15 zeigt, konnte in beiden Stämmen trotz Zugabe eines 100-fachen Überschusses an Threonin eine Serinaufnahmeaktivität gemessen werden, die nicht durch Threonin kompetitierbar ist. Die drei zu *tdcC* ähnlichen Gene sind somit für diese Aktivität nicht verantwortlich. Die Serinaufnahme der *sstT*-Deletionsmutante von AN387 *yhao::Kan yhjv::Cam Δo409* ist deutlich geringer als die des Ausgangsstammes, jedoch weiterhin durch Threonin kompetitierbar, so dass auch dieser Stammvergleich ein zweites Threonin / Serinsystem aufzeigt.

3.2.4 Die Na^+ -Abhängigkeit der zwei Serinaufnahmesysteme

Um die beiden Threonin- / Serinsysteme weiter zu charakterisieren, wurde auch für die Serinaufnahme die Abhängigkeit der zwei Transporter von Na^+ -Ionen durch die Konkurrenz mit Harmalin untersucht. Hierfür wurde wie auch für die Bestimmung der Threoninaufnahmeraten die Stämme AN387 *yhao::Kan yhjv::Cam Δo409* und AN387 *yhao::Kan yhjv::Cam Δo409 ΔsstT* verwendet (vgl. Tab. 16).

Tab. 16: Serinaufnahmeraten in $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ mit und ohne Konkurrenz durch Zugabe von Harmalin oder Threonin. Doppelmessungen sind durch Schrägstriche gekennzeichnet.

	50 μM [^{14}C]-Serin	50 μM [^{14}C]-Serin + 2,5 mM Harmalin	50 μM [^{14}C]-Serin + 5 mM Threonin
AN387 <i>yhao::Kan yhjv::Cam $\Delta o409$</i>	22,3 \pm 1,4	10 / 13,1	5,3 \pm 1,2
AN387 <i>yhao::Kan yhjv::Cam $\Delta o409 \Delta sstT$</i>	13,1 \pm 1,1	7,2 / 12,2	4,8 \pm 0,5

Dieses Experiment zeigt eine Reduzierung der Serinaufnahme durch die *sstT*-Deletion, die der Aktivität des SstT-Systems entspricht. Der Zusatz von Harmalin zu den Messungen bewirkt eine deutliche Abnahme der Serinaufnahme in dem Stamm AN387 *yhao::Kan yhjv::Cam $\Delta o409$* (vgl. Tab. 16). Die Aufnahmeaktivität der *sstT*-Deletionsmutante bleibt weitgehend unberührt von dem Zusatz von Harmalin. Die Konkurrenz durch Zusatz von Threonin ist in beiden Stämmen deutlich und die Restaktivität, die nicht durch Threonin kompetierbar ist mit $5 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ in beiden Stämmen identisch. Somit belegen die Serinaufnahme- wie die Threoninaufnahmemessungen, dass es ein zweites Serin- / Threoninaufnahmesystem geben muss, dass vermutlich unabhängig vom Symport von Na^+ -Ionen ist.

3.3 Charakterisierung der Threoninexkretion

Die Threoninexkretion der verwendeten *E. coli*-Threoninproduzenten ist ein produktionslimitierender Schritt, da diese Stämme sowohl in Schüttelkolbenexperimenten als auch in Fermentationen intern Threonin akkumulieren. Die internen Konzentrationen erreichten Werte, die 10-fach höher lagen als die externen Threoninwerte. Diese interne Akkumulation ist beispielhaft an einer Fermentation des Produzenten BKIIM B-3996 / pVIC40 in Abbildung 10 gezeigt.

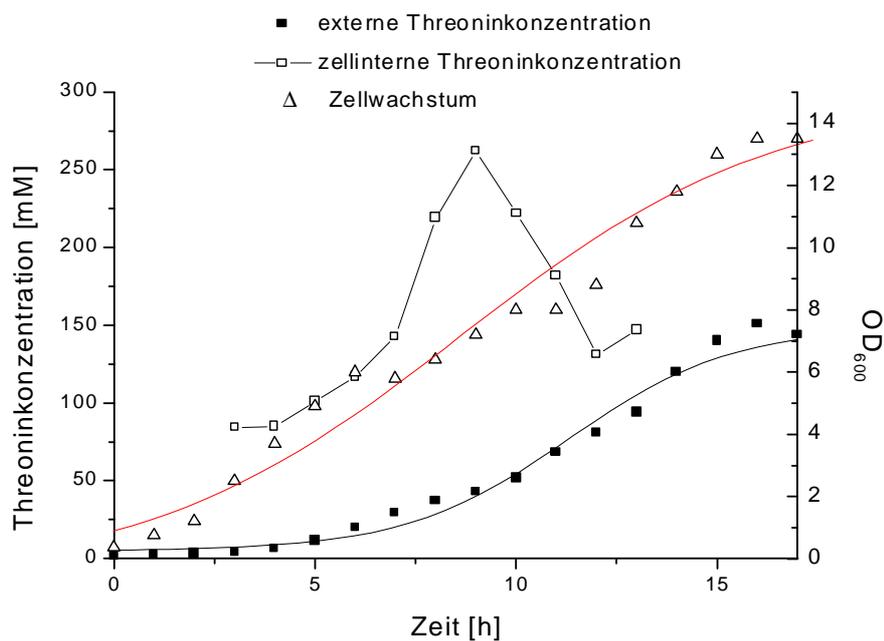


Abb. 10: Vergleich interner zu externer Threoninkonzentration bei der Fermentation von BKIIM B-3996 / pVIC40

Der Vergleich der internen gegenüber den externen Threoninkonzentrationen zeigt eine extreme Threoninakkumulation in der Zelle. Diese Limitierung der Threoninproduktion durch den Export macht es interessant, dieser Exportaktivität ein Gen zuzuordnen, dessen Überexpression der Stammoptimierung nützlich sein könnte. Von der Arbeitsgruppe um Livshits wurden nacheinander zwei Proteine für die Threoninexkretion in *E. coli* verantwortlich gemacht: RhtB und RhtC („resistance against homoserine and threonine“) (Aleshin *et al.*, 1999; Zakataeva *et al.*, 1999). Die Funktion von RhtB wurde in der zweiten Veröffentlichung auf die Exkretion von Homoserin und Homoserinlacton beschränkt (Zakataeva *et al.*, 1999). RhtB und RhtC gehören zu der LysE Superfamilie, die aus kleinen Proteinen (199-236 Aminosäuren)

mit fünf oder sechs Transmembrandomänen besteht. Durch Deletion und Überexpression der *rht*-Gene sollte geklärt werden, welches der beiden Gene einen Threoninexporter kodiert.

3.3.1 Deletionen von Genen putativer Threoninexporter

rhtB

Das Gen *rhtB* (auch *yigk*) wurde in dem Stamm ATCC 98082 unter Verwendung des Deletionsplasmides pKO3- $\Delta yigk$ deletiert. Die Mutante wurde mit dem Vektor pYN7 (*thrA*^{FBR}, Amp^R) transformiert in M9-Medium gezogen. Im Vergleich mit dem parallel gezogenen Ausgangsstamm ATCC 98082 / pYN7 wurden die internen und externen Threoninkonzentrationen bestimmt. Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse dieses Versuches. Die Erwartung, dass die Deletionsmutante intern mehr Threonin akkumuliert und / oder eine geringere spezifische Produktivität besitzt, konnte nicht bestätigt werden.

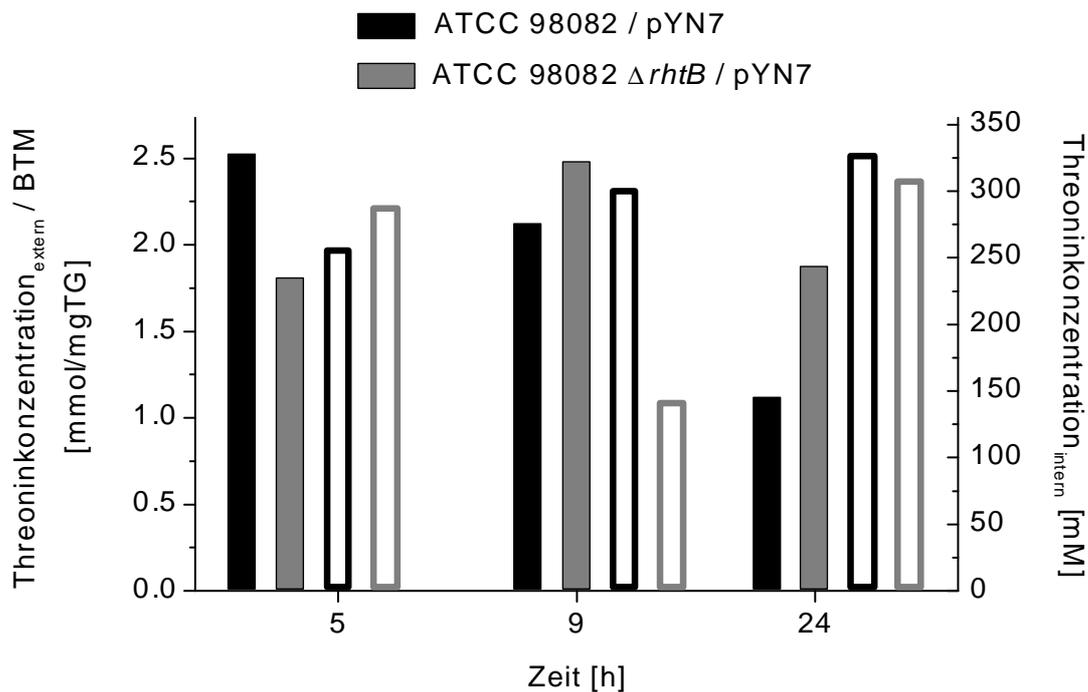


Abb. 11: Spezifische Produktivität (ausgefüllte Balken) und interne Threoinkonzentrationen (umrahmte Balken) von in M9-Medium gezogenen Stämmen.

Die Deletion des *rhtB*-Gens hatte weder einen Effekt auf die Exkretion von Threonin noch auf die interne Akkumulation von Threonin in der Zelle. RhtB ist demnach, wenn die Zuordnung als Threoninexporter überhaupt zutrifft, nicht der einzige Threoninexporter in *E. coli*.

rhtC

Das Gen *rhtC* (auch *yigJ*) wurde unter Verwendung des Deletionsvektor pKO3- $\Delta yigJ$ in dem Stamm ATCC 98082 deletiert. Um die Threoninproduktion dieser Deletionsmutante zu überprüfen, wurde sie mit den Plasmiden pYN7 (*thrA*^{FBR}, Amp^R) und pVIC40 (*thrA*^{FBR}, Strep^R) transformiert. Die Stämme ATCC 98082 $\Delta yigJ$ / pYN7 und ATCC 98082 $\Delta yigJ$ / pVIC40 wurden sowohl in M9-Medium als auch in M9-Medium, dem in Angleichung an die Produktionsbedingungen 17 g/l Ammoniumsulfat zugesetzt worden war, auf die Produktion und den zellinternen Anstau von Threonin untersucht. Als Vergleich wurden die Ausgangsstämme ATCC 98082 / pYN7 und ATCC 98082 / pVIC40 hinzugezogen. Die Ergebnisse des Stammvergleiches ATCC 98082 $\Delta yigJ$ / pVIC40 und ATCC 98082 / pVIC40 in M9-Ammoniumsulfat-Medium sind in den Abbildungen 12, 13 und 14 dargestellt. Sowohl der Verlauf des Zellwachstum der beiden Stämme (Abb. 12) als auch der Verlauf der externen Threoninkonzentrationen (Abb. 13) waren nahezu identisch. In Abbildung 14 sieht man die zellinternen Threoninkonzentrationen, die ebenfalls keine Stammunterschiede erkennen lassen.

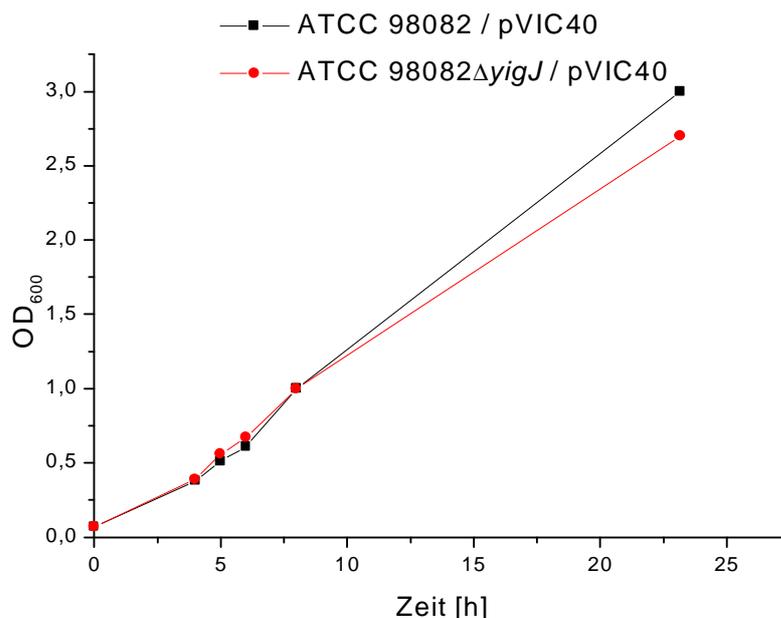


Abb. 12: Wachstumskurven der Stämme ATCC 98082 / pVIC40 und ATCC 98082 $\Delta yigJ$ / pVIC40 in M9-Medium mit 4 % Saccharose und 17,4 g/l Ammoniumsulfat.

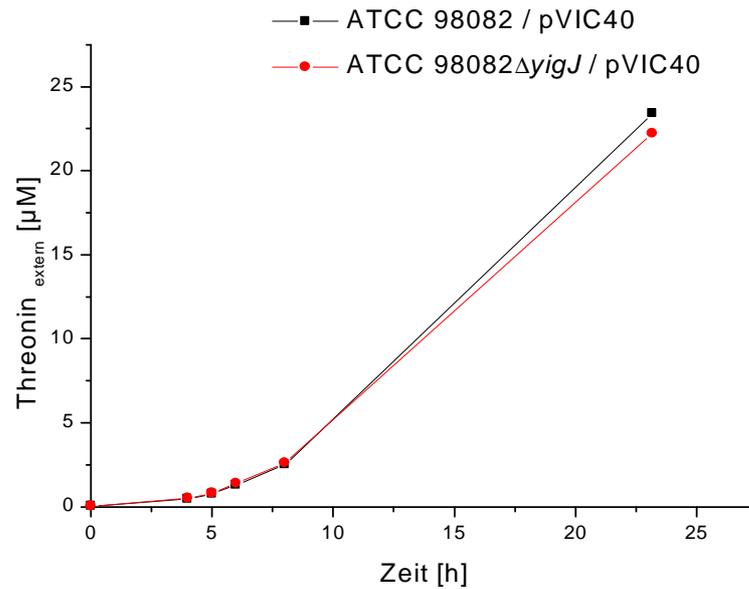


Abb. 13: Externe Threoninkonzentrationen der Stämme ATCC 98082 / pVIC40 und ATCC 98082 Δ yigJ / pVIC40 in M9-Medium mit 4 % Saccharose und 17,4 g/l Ammoniumsulfat.

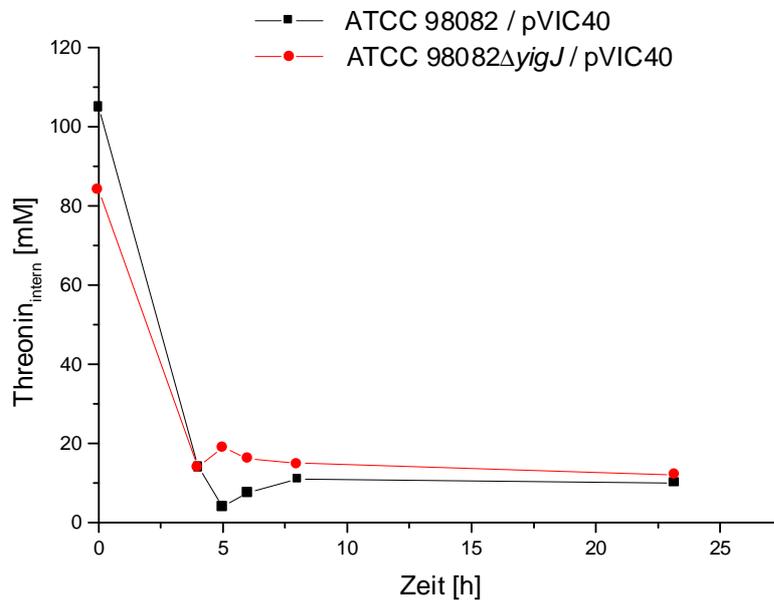


Abb. 14: Zellinterne Threoninkonzentration der Stämme ATCC 98082 / pVIC40 und ATCC 98082 Δ yigJ / pVIC40 in M9-Medium mit 4 % Saccharose und 17,4 g/l Ammoniumsulfat.

Sowohl mit pYN7 als auch mit pVIC40 wuchs die *yigJ* Deletionsmutante in M9-Medium wie auch in M9-Medium mit 4 % Saccharose und 17,4 g/l Ammoniumsulfat wie der Produktionsstamm und produzierte in gleichem Maße Threonin. Auch die internen

Threoninkonzentrationen stimmten überein. Die Deletion des *rhtC*-Gens hat also weder einen Einfluss auf die interne Akkumulation von Threonin noch auf die Produktion von Threonin. Folglich kann auch RhtC nicht der einzige Threoninexporter sein.

rhtB / *rhtC*

Um auszuschließen, dass sich RhtB und RhtC in den Einzeldelentionsmutanten gegenseitig komplementieren, wurden die Gene beider Proteine in dem Stamm ATCC 98082 deletiert und der erhaltene Stamm ATCC 98082 Δ *rhtBC* mit pVIC40 transformiert. Der Stamm ATCC 98082 Δ *rhtBC* / pVIC40 wurde im Vergleich zu ATCC 98082 / pVIC40 auf seine Threoninproduktionsrate untersucht, die in Abbildung 17 a und b dargestellt sind. Dazu wurden sowohl durch die Werte der externen Threoninkonzentrationen (Abb. 15 und 16) als auch durch die Werte der Wachstumskurven (Abb. 15 und 16) eine sigmoide Kurve gelegt. Diese Kurven dienen als Rechengrundlage für die Produktionsratenbestimmung (vgl. 2.5.4).

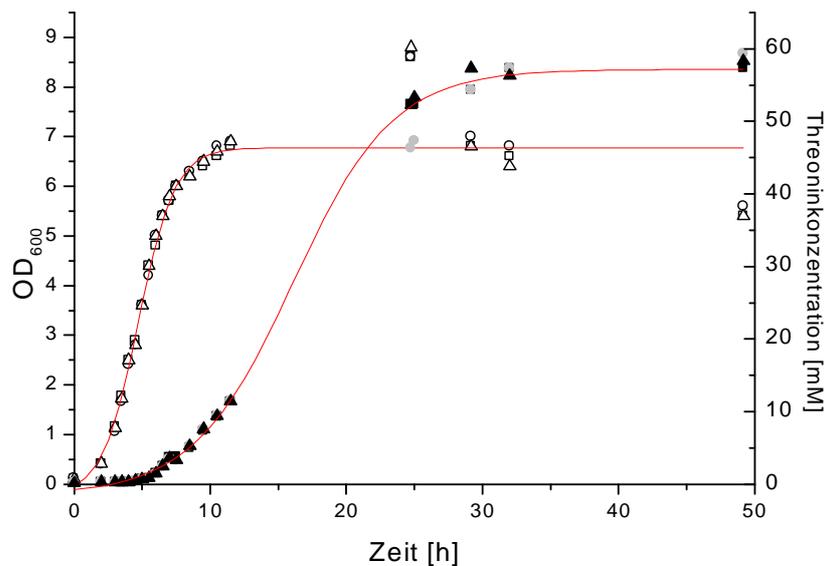


Abb. 15: Zellwachstum (offene Symbole) und externe Threoninkonzentrationen (gefüllte Symbole) von in Einheitsmedium gezogenen ATCC 98082 / pVIC40. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Messungen.

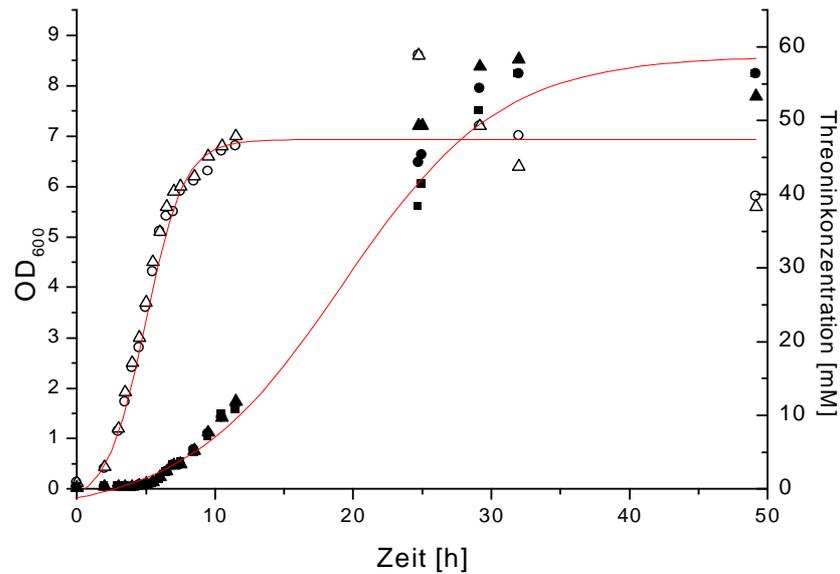
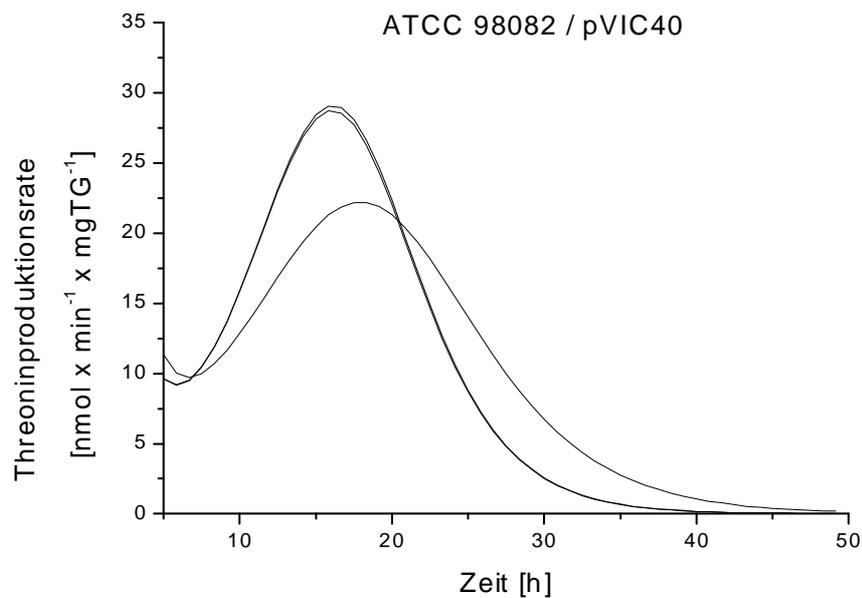


Abb. 16: Zellwachstum (offene Symbole) und externe Threoninkonzentrationen (gefüllte Symbole) von in Einheitsmedium gezogenen ATCC 98082 Δ rhtBC / pVIC40. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Messungen.

Bei dem Wachstum der Stämme ATCC 98082 / pVIC40 und ATCC 98082 Δ rhtBC / pVIC40 ist kein Unterschied festzustellen, jedoch beginnt die Threoninproduktion der Deletionsmutante etwas später als im Ausgangsstamm. Die Endkonzentrationen an Threonin im Medium sind aber identisch (vgl. Abb. 15 und 16).

a)



b)

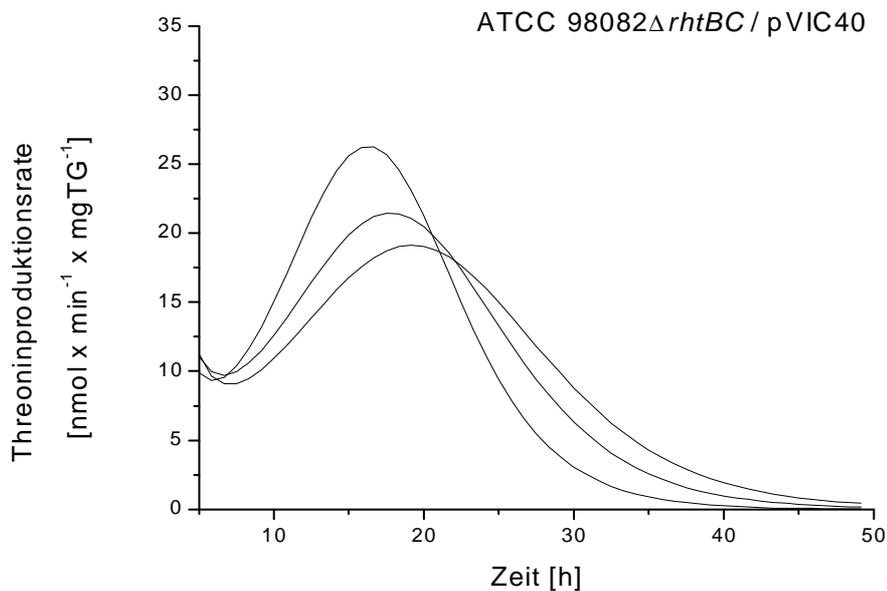


Abb. 17: Threoninproduktionsraten von a) ATCC 98082 / pVIC40 und b) ATCC 98082 Δ *rhtBC* / pVIC40 in $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$. Die Kurven wurden aus drei unabhängigen Messungen mit jeweils 21 Messpunkten gewonnen.

Die gemittelte maximale Threoninproduktionsrate des Stammes ATCC 98082 Δ *rhtBC* / pVIC40 ist mit $21,9 \pm 2,9 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ etwas geringer als die des Ausgangsstammes mit $26,5 \pm 3,2 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$. Dieser Unterschied ist statistisch aber nicht eindeutig, da sich die Standardabweichungen leicht überlappen. Durch die Doppeldeletion der Gene *rhtB* und *rhtC* konnte die Exkretion von Threonin nicht verhindert werden. Somit muss die Existenz eines weiteren Threoninexporters postuliert werden. Da bei Redundanz der Funktion eines Threonineporters durch Deletion eine eindeutige Aussage nicht möglich ist, wurden sowohl *rhtB* als auch *rhtC* in den Produktionsstämmen überexprimiert.

3.3.2 Überexpressionen von Genen putativer Threoninexporter

Die zwei Gene für putative *E. coli*-Threoninexporter *rhtB* und *rhtC* wurden aus pUC18 ausgeschnitten und in den Expressionsvektor pTrc99A ligiert. Für die Überexpression der *rht*-Gene wurden die so erhaltenen Plasmide in Threoninproduktionsstämme transformiert. Für diesen Ansatz wurde das Leerplasmid pTrc99A und die Plasmide mit den Genen (pTrc99A-*rhtB* und pTrc99A-*rhtC*) zunächst in die Produktionsstämme MG 442 und VL 334 / pVIC40 transformiert. pVIC40 wurde gewählt, da es einen zu pTrc99A unterschiedlichen Replikationsursprung trägt und zusätzlich noch über eine

andere Antibiotikaresistenz verfügt. So kann durch Zusatz von Streptomycin und Carbenicillin im Medium auf den Verbleib beider Plasmide in den Zellen selektiert werden. Die Stämme wurden sowohl in Minimalmedium, dem zur Angleichung an die Produktionsbedingungen 2 % Glukose und 17,4 g/l Ammoniumsulfat zugesetzt wurde, als auch in Einheitsmedium (vgl. 2.5.1) auf Wachstum und Threoninproduktion überprüft. Um die Stämme besser vergleichen zu können, wurde die spezifische Produktivität bestimmt, in dem die externe Threoninkonzentration auf die Zellmasse bezogen wurde. Der letzte Wert der Kontrolle (Stamm mit Leervektor) wurde gleich 100 % gesetzt, so dass es möglich war, die Veränderung der Zellaktivität zur Produktbildung durch die Überexpression der *rht*-Gene direkt in Prozent abzulesen. Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse des Experimentes, bei dem die drei Stämme MG 442 / pTrc99A, MG 442 / pTrc99A-*rhtB* und MG 442 / pTrc99A-*rhtC* in M9-Medium mit 2 % Glukose und 17,4 g/l Ammoniumsulfat gezogen wurden.

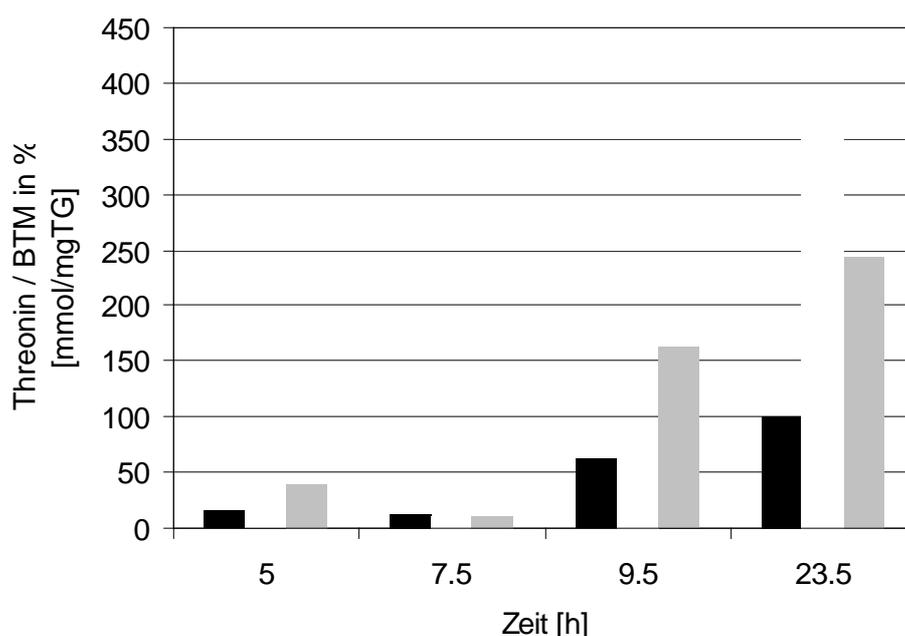


Abb. 18: Spezifische Produktivität der in M9-Medium mit 2 % Glukose und 17,4 g/l Ammoniumsulfat gezogenen drei Stämmen in Prozent. Schwarze Balken: MG 442 / pTrc99A, weiße Balken: MG 442 / pTrc99A-*rhtB*, graue Balken: MG 442 / pTrc99A-*rhtC*. Die Stämme wurden nach 5 Stunden mit 200 µg/ml IPTG induziert. Der letzte Wert der Kontrolle MG 442 / pTrc99A wurde gleich 100 % gesetzt.

In dem Stamm MG 442 konnte in M9-Medium mit 2 % Glukose und 17,4 g/l Ammoniumsulfat mit beiden Konstrukten nach Induktion des Expressionsplasmides ein Anstieg der spezifischen Produktivität erzielt werden: *rhtC* führte zu einem Anstieg von

140 %, *rhtB* sogar von 290 % Threonin pro BTM. Dieses Ergebnis macht die publizierte Funktion von RhtB und RhtC als Threoninexporter wahrscheinlich. Der Anstieg der spezifischen Produktivität der Zellen durch Überexpression der *rht*-Gene konnte unter Produktionsbedingungen reproduziert wurde. Das Einheitsmedium für die Produktion (vgl. 2.5.1) ist mit CaCO_3 gepuffert, was ein längeres Wachstum der Zellen als in M9-Medium ermöglicht, so dass über 50 Stunden gemessen wurde. Abbildung 19 zeigt das Ergebnis dieses Experimentes.

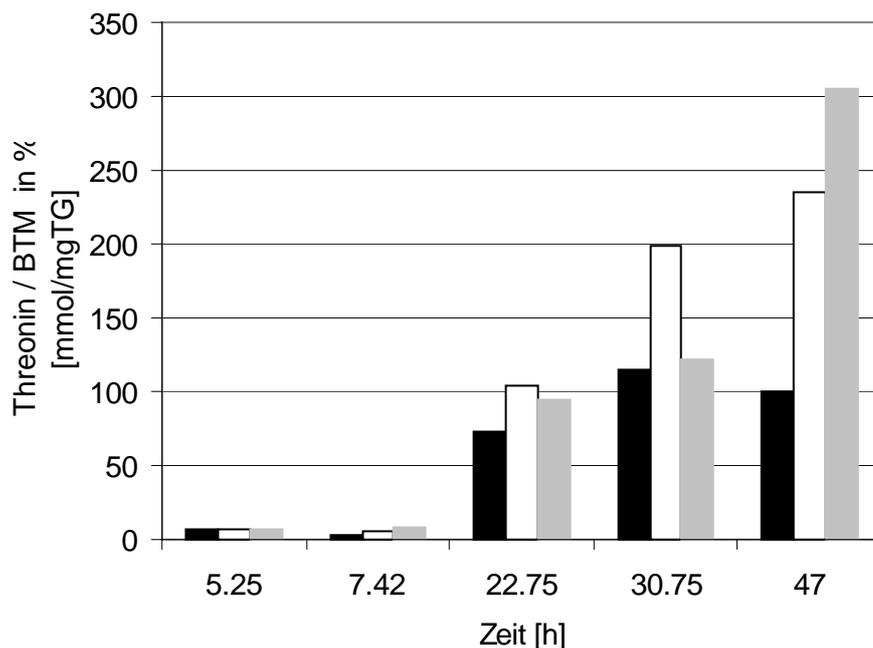


Abb. 19: Spezifische Produktivität der in Einheitsmedium gezogenen drei Stämme in Prozent. Schwarze Balken: MG 442 / pTrc99A, weiße Balken: MG 442 / pTrc99A-*rhtB*, graue Balken: MG 442 / pTrc99A-*rhtC*. Die Stämme wurden nach 5,25 Stunden mit 200 $\mu\text{g/ml}$ IPTG induziert. Der letzte Wert der Kontrolle MG 442 / pTrc99A wurde gleich 100 % gesetzt.

Auch unter Produktionsbedingungen haben beide Konstrukte einen erheblichen Anstieg der spezifischen Produktivität zur Folge. Diese Steigerung tritt aber für *rhtC* in Einheitsmedium später auf als in Minimalmedium und ist von der Gewichtung des Effektes durch *rhtB* und *rhtC* am Ende der Fermentation umgekehrt. Während in Minimalmedium die Expression von *rhtB* die grössere Auswirkung auf die spezifische Produktivität hat, führt in Einheitsmedium die Expression von plasmidkodiertem *rhtC* zu einem Anstieg von 200 % die von *rhtB* zu einer Steigerung von 130 % in der spezifischen Produktivität im Vergleich zur Kontrolle.

MG 442 produziert in Einheitsmedium bis zu 14 mM Threonin (entspricht 1,7 g/l). Im Gegensatz dazu erreichen externe Konzentrationen des Threoninproduzenten VL 334 /

pYN7 Werte bis 66 mM (entspricht 8 g/l). Um zu überprüfen, ob die beiden Konstrukte auch in diesem Stammhintergrund zur Produktivitätssteigerung führen, wurden sie jeweils zusammen mit pVIC40 in VL 334 transformiert. Zunächst wurden die drei Stämme VL 334 / pVIC40 / pTrc99A, VL 334 / pVIC40 / pTrc99A-*rhtB* und VL 334 / pVIC40 / pTrc99A-*rhtC* in M9-Medium mit 2 % Glukose und 17,4 g/l Ammoniumsulfat gezogen und die spezifische Produktivität bestimmt. Der letzten Kontrollwert wurde gleich 100 % gesetzt. Die Ergebnisse dieses Experimentes sind in Abbildung 20 dargestellt.

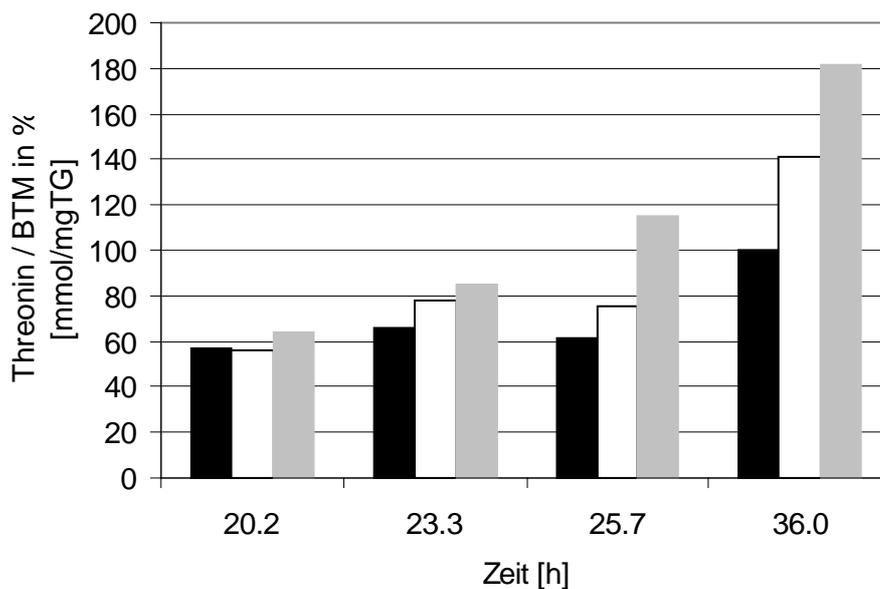


Abb. 20: Spezifische Produktivität der in M9-Medium mit 2 % Glukose und 17,4 g/l Ammoniumsulfat gezogenen Stämme in Prozent. Schwarze Balken: VL 334 / pVIC40 / pTrc99A, weiße Balken: VL 334 / pVIC40 / pTrc99A-*rhtB*, graue Balken: VL 334 / pVIC40 / pTrc99A-*rhtC*. Die Stämme wurden nach 20,2 Stunden mit 200 µg/ml IPTG induziert. Der letzte Wert der Kontrolle VL 334 / pTrc99A wurde gleich 100 % gesetzt.

Der Vergleich der Stämme VL 334 / pVIC40 / pTrc99A, VL 334 / pVIC40 / pTrc99A-*rhtB* und VL 334 / pVIC40 / pTrc99A-*rhtC* zeigte eine 40 %-ige Steigerung der spezifischen Produktivität durch die plasmidkodierte Expression von *rhtB* im Vergleich zur Kontrolle. Die Expression von *rhtC* hatte eine Zunahme von 80 % zur Folge. Unter Produktionsbedingungen (vgl. Abb. 21) konnte der 80 %igen Anstieg der spezifischen Produktivität durch die Expression von *rhtC* reproduziert werden. Die *rhtB*-Expression hatte einen Anstieg von bis zu 50 % zu Folge.

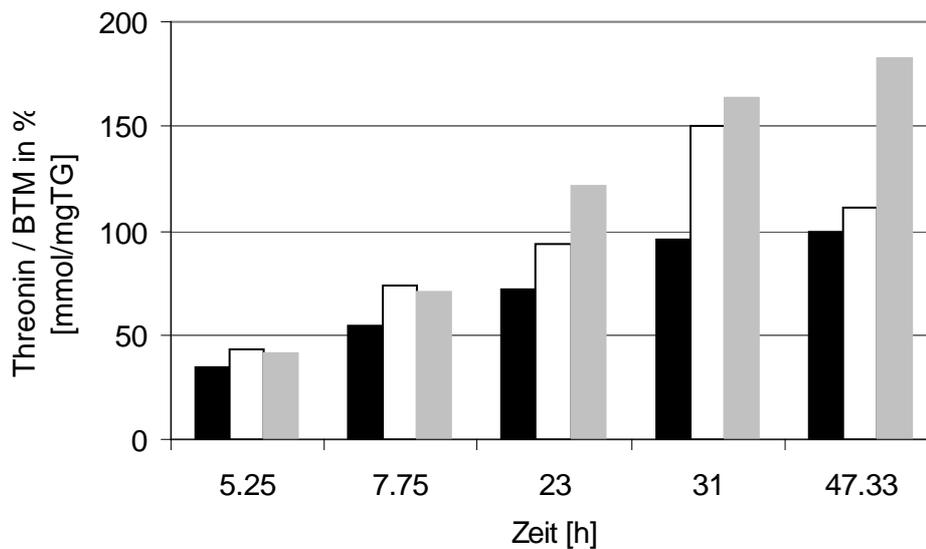


Abb. 21: Spezifische Produktivität der in Einheitsmedium gezogenen Stämme in Prozent. Schwarze Balken: VL 334 / pVIC40 / pTrc99A, weiße Balken: VL 334 / pVIC40 / pTrc99A-*rhtB*, graue Balken: VL 334 / pVIC40 / pTrc99A-*rhtC*. Die Stämme wurden nach 5,25 Stunden mit 200 µg/ml IPTG induziert. Der letzte Wert der Kontrolle VL 334 / pTrc99A wurde gleich 100 % gesetzt.

Selbst in diesem industriell verwendeten Produktionsstamm hat die Überexpression der beiden Gene also eine Steigerung der spezifischen Produktivität zur Folge. Dies läßt auf deren Aktivität als Threoninexporter schließen und macht sie somit biotechnologisch interessant.

Die Gene *rhtB* und *rhtC* wurden auch in dem Stamm ATCC 98082 / pVIC40 überexprimiert, um auszuschließen, dass die Effekte der Überexpression in MG442 und VL 334 / pVIC40 stammspezifischer Natur sind. Bei der Deletion der beiden Gene in ATCC 98082 konnten keine Effekte beobachtet werden. Die Stämme ATCC 98082 / pVIC40 / pTrc99A, ATCC 98082 / pVIC40 / pTrc99A-*rhtB* und ATCC 98082 / pVIC40 / pTrc99A-*rhtC* wurden in Einheitsmedium über 50 Stunden kultiviert und auf Zellwachstum und externe Threoninkonzentration überprüft (vgl. Abb. 22a, b und c). Aus drei unabhängigen Messreihen wurden die spezifischen Produktionsraten der Stämme ermittelt, die in Abbildung 23a, b und c dargestellt sind.

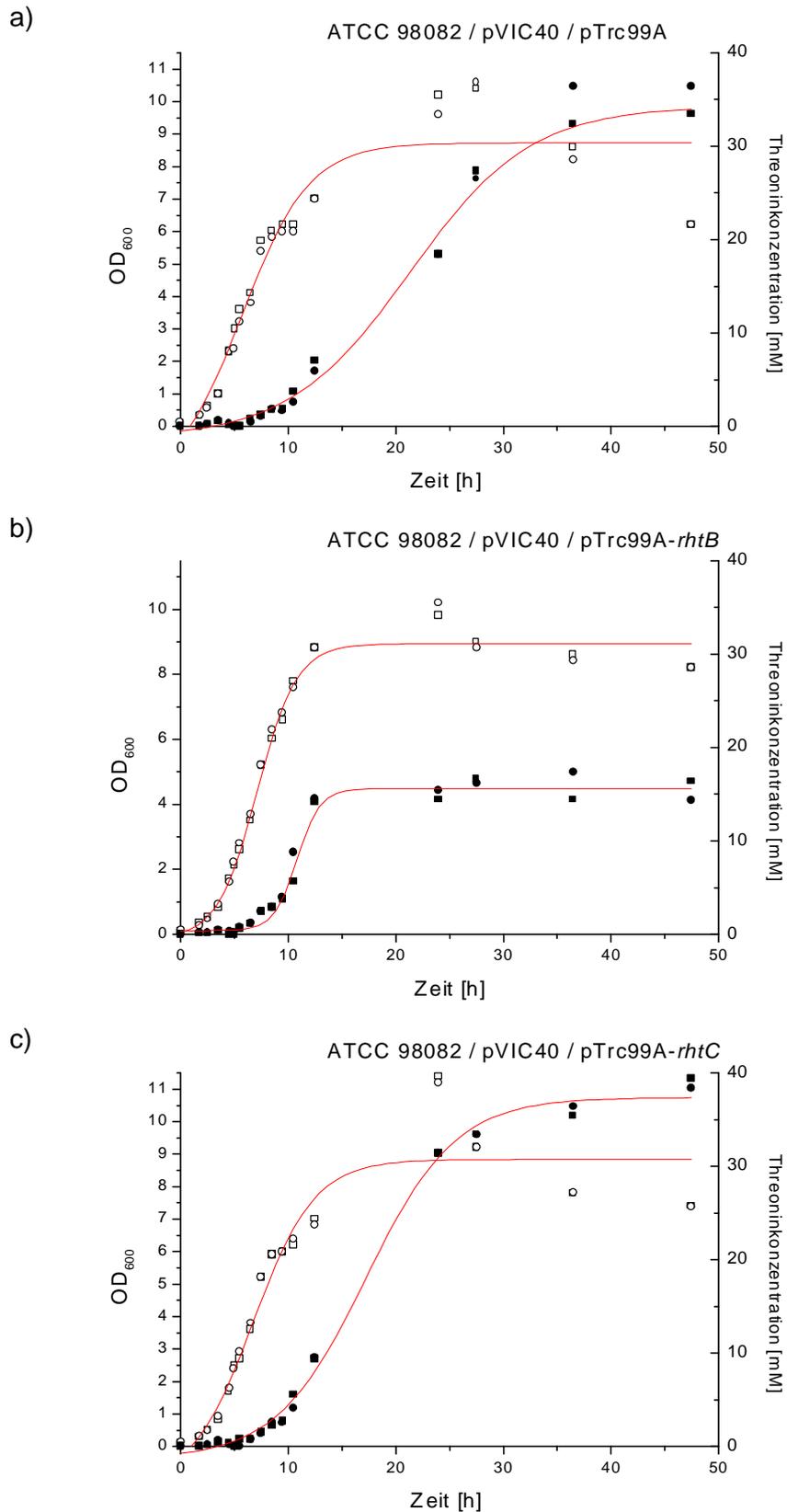


Abb. 22: Zellwachstum und externe Threoninkonzentration der in Einheitsmedium gezogenen Stämme a) ATCC 98082 / pVIC40 / pTrc99A, b) ATCC 98082 / pVIC40 / pTrc99A-*rhtB* und c) ATCC 98082 / pVIC40 / pTrc99A-*rhtC*. Die Stämme wurden nach 2,5 Stunden mit 200 $\mu\text{g/ml}$ IPTG induziert.

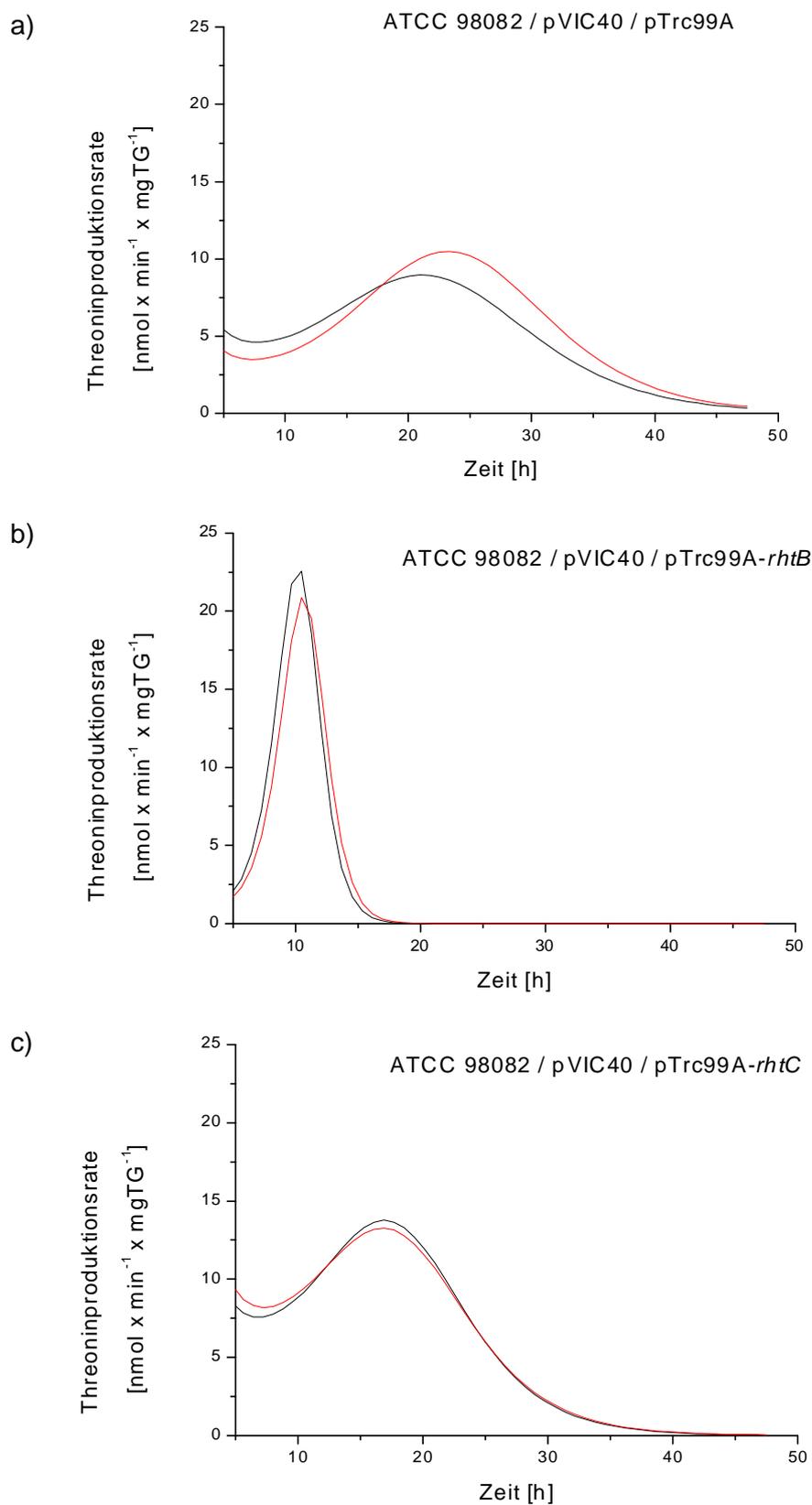


Abb. 23: Graphische Darstellung der Threoninproduktionsraten in $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ über den Fermentationsverlauf von a) ATCC 98082 / pVIC40 / pTrc99A, b) von ATCC 98082 / pVIC40 / pTrc99A-*rhtB* und c) von ATCC 98082 / pVIC40 / pTrc99A-*rhtC*. Gezeigt sind die Ergebnisse aus je zwei unabhängigen Messreihen mit jeweils 18 Messpunkten.

Wie Abbildung 22a zeigt, beginnt die Threoninproduktion des Kontrollstammes ATCC 98082 / pVIC40 / pTrc99A zeitlich versetzt zum Wachstum der Zellen. Die Threoninkonzentration steigt bis zum Ende der Fermentation auf einen Wert von ungefähr 34 mM. Die Kurve der spezifischen Threoninproduktionsrate des Kontrollstammes ATCC 98082 / pVIC40 / pTrc99A durchläuft nach 20 Stunden ein breites Maximum. Die maximale Threoninproduktionsrate liegt für diesen Stamm bei $10 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ (vgl. Abb. 23a). Sowohl das Wachstum als auch die Threoninproduktion des Stammes ATCC 98082 / pVIC40 / pTrc99A-*rhtB* beginnen früher als die des Kontrollstammes (vgl. Abb. 22b). Da die Threoninproduktion gleichzeitig mit dem Wachstum der Zellen stoppt, ist eine Kohlenstofflimitierung dieser Fermentation wahrscheinlich. Die spezifische Threoninproduktionsrate dieses Stammes zeigt, dass die Zellen in dieser kurzen Zeit der Threoninproduktion eine sehr viel höhere Aktivität zur Produktbildung haben als der Kontrollstamm ATCC 98082 / pVIC40 / pTrc99A (vgl. Abb. 23b). Für den Stamm ATCC 98082 / pVIC40 / pTrc99A-*rhtB* ist der Verlauf der Threoninproduktionsrate daher durch ein viel schmaleres, höheres und früheres Maximum als der für die Kontrolle gekennzeichnet. Die maximale Rate von $22,6 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ wurde bereits nach 10 Stunden erreicht. Sie entspricht einem Anstieg von 140 % in der spezifischen Produktionsrate gegenüber der Kontrolle. Das Wachstum des Stammes ATCC 98082 / pVIC40 / pTrc99A-*rhtC* verhält sich ähnlich wie das des Ausgangsstammes (vgl. Abb. 22c), jedoch ist eine etwas früher beginnende Produktion zu verzeichnen. Diese setzt sich bis zum Ende der Fermentation fort und erreicht hier mit etwa 39 mM etwas höhere Threoninkonzentrationen als der Kontrollstamm. Dies zeigt sich in der Threoninproduktionsrate des Stammes ATCC 98082 / pVIC40 / pTrc99A-*rhtC*, die mit $14 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ eine um 40 % höhere maximale Rate erreicht als ATCC 98082 / pVIC40 / pTrc99A (vgl. 23a und c).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Überexpression der zwei Gene *rhtB* und *rhtC* in *E. coli*-Threoninproduzenten die Threoninproduktion steigert. Die Größe dieses Einflusses variiert in verschiedenen Stämmen und Medien aber ist ein klarer Hinweis darauf, dass sowohl RhtB als auch RhtC bei der Threoninexkretion eine Rolle spielen. Die Funktionszuordnung der beiden Proteine als putative Threoninexporter ließ sich durch die gleichzeitige Deletion ihrer Gene nicht ableiten, da die Exkretion nicht beseitigt werden konnte. In dieser Arbeit wurde deshalb ein weiterer Threoninexporter postuliert.

3.3.3 Überexpression von *thrE*, dem Gen für den Threoninexporter aus *C. glutamicum*

In *C. glutamicum* konnte kürzlich mit *thrE* das Gen für den Threoninexporter identifiziert und kloniert werden (Ziegler *et al.*, 2000). Bei einer plasmidkodierten Expression des Gens in dem *E. coli*-Threoninproduktionsstamm MG 442 konnte eine erhöhte Threoninkonzentration im Mediumüberstand im Vergleich zur Kontrolle mit dem Leervektor festgestellt werden (M. Rieping, pers. Mitteilung). Um die Aktivität dieses Gens aus *C. glutamicum* in *E. coli* zu überprüfen, wurden in dieser Arbeit genauere Untersuchungen durchgeführt.

Der Effekt des *thrE*-Gens wurde sowohl in MG 442 als auch in VL 334 / pVIC40 untersucht, der für diese Messung auch mit pTrc99A-*thrE* transformiert wurde. Die Transformanten wurden zunächst in Minimalmedium gezogen und auf externe Threoninkonzentrationen untersucht (vgl. Abb. 24).

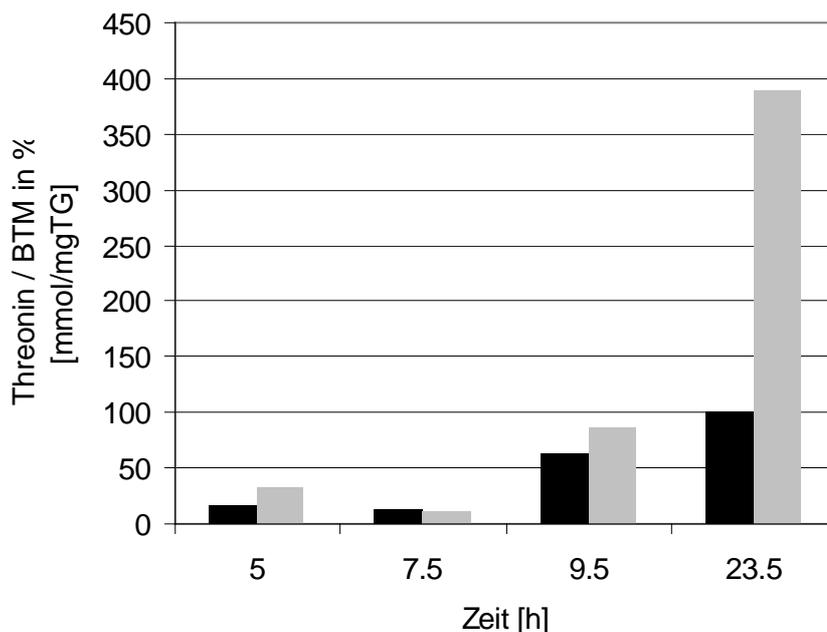


Abb. 24: Spezifische Produktivität der in M9-Medium mit 2 % Glukose und 17,4 g/l Ammoniumsulfat gezogenen Zellen in Prozent. Schwarze Balken: MG 442 / pTrc99A, graue Balken: MG 442 / pTrc99A-*thrE*. Die Stämme wurden nach 5 Stunden mit 200 µg/ml IPTG induziert. Der letzte Wert der Kontrolle MG 442 / pTrc99A wurde gleich 100 % gesetzt.

In Abbildung 24 erkennt man einen deutlichen Anstieg der spezifischen Produktivität durch die plasmidkodierte Expression des *thrE*-Gens aus *C. glutamicum*. Im Vergleich zur Kontrolle (MG 442 / pTrc99A) betrug dieser Effekt 290 % Anstieg in der

spezifischen Produktivität. Auch unter Produktionsbedingungen konnte dieses Ergebnis reproduziert werden (vgl. Abb. 25).

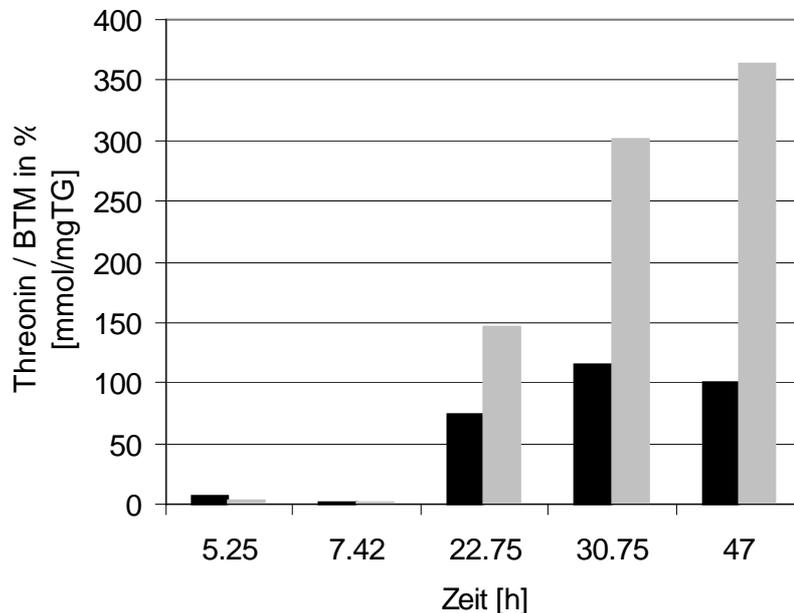


Abb. 25: Spezifische Produktivität der in Einheitsmedium gezogenen Zellen in Prozent. Schwarze Balken: MG 442 / pTrc99A, graue Balken: MG 442 / pTrc99A-thrE. Die Stämme wurden nach 5,25 Stunden mit 200 µg/ml IPTG induziert. Der letzte Wert der Kontrolle MG 442 / pTrc99A wurde gleich 100 % gesetzt.

Unter Produktionsbedingungen hat MG 442 / pTrc99A-thrE eine 250 %-fach höhere Aktivität, Threonin zu produzieren als MG 442 / pTrc99A (vgl. Abb. 25). Diese Ergebnisse lassen auf Aktivität des ThrE-Proteins aus *C. glutamicum* in *E. coli* schließen. Um die Ergebnisse zu bestätigen, und zu überprüfen, ob in einem effizienteren Threoninproduzenten, dieser Effekt zu reproduzieren ist, wurden die Experimente in dem Stammhintergrund VL 334 wiederholt. Die Ergebnisse der Messungen in M9-Medium mit 2 % Glukose und 17,4 g/l Ammoniumsulfat und in Einheitsmedium sind in Abbildung 26 und 27 dargestellt.

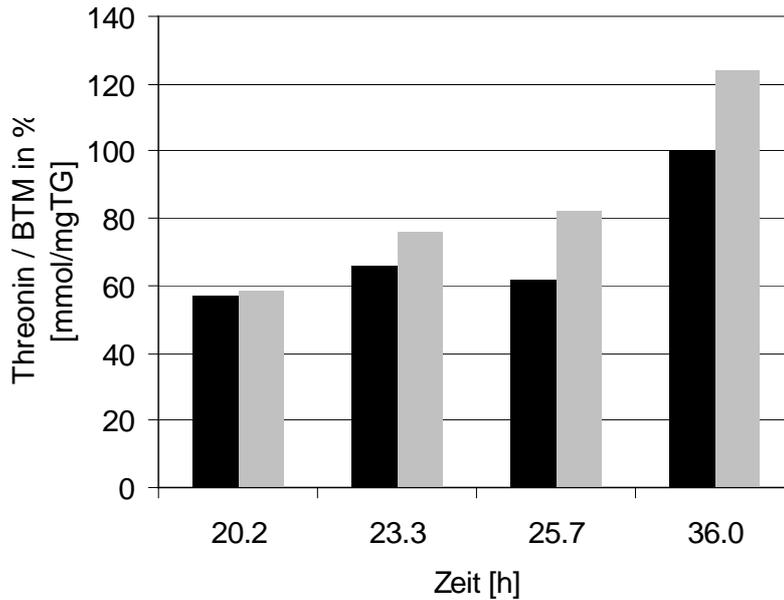


Abb. 26: Spezifische Produktivität der in M9-Medium mit 2 % Glukose und 17,4 g/l Ammoniumsulfat gezogenen Zellen in Prozent. Schwarze Balken: VL 334 / pVIC40 / pTrc99A, graue Balken: VL 334 / pVIC40 / pTrc99A-*thrE*. Die Stämme wurden nach 20,2 Stunden mit 200 µg/ml IPTG induziert. Der letzte Wert der Kontrolle VL 334 / pTrc99A wurde gleich 100 % gesetzt.

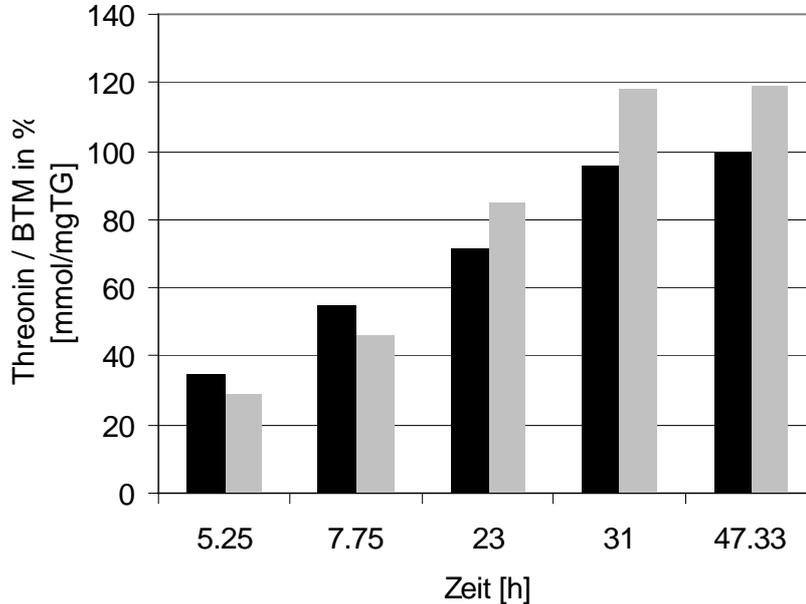


Abb. 27: Spezifische Produktivität der in Einheitsmedium gezogenen Zellen in Prozent. Schwarze Balken: VL 334 / pVIC40 / pTrc99A, graue Balken: VL 334 / pVIC40 / pTrc99A-*thrE*. Die Stämme wurden nach 5,25 Stunden mit 200 µg/ml IPTG induziert. Der letzte Wert der Kontrolle VL 334 / pTrc99A wurde gleich 100 % gesetzt.

In dem Stamm VL 334 / pVIC40 bewirkt die Expression des plasmidkodierten *thrE*-Gens aus *C. glutamicum* eine 20 %-ige Steigerung der externen Threoninkonzentration bezogen auf die Biotrockenmasse. Diese Beobachtung gilt sowohl für Zellen, die in Minimalmedium gezogen wurden (vgl. Abb. 26) als auch für solche, deren Anzucht unter Produktionsbedingungen stattfand (vgl. Abb. 27).

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass die plasmidkodierte Expression des *thrE*-Gens aus *C. glutamicum* zu einer Steigerung der spezifischen Threoninproduktivität in *E. coli*-Produzenten führt. Da der Stamm VL 334 / pVIC40 mehr produziert als MG 442 – 66 mM im Vergleich zu 14 mM – und weiter entwickelt ist, wirken sich Effekte nicht mehr so stark aus wie in dem Vorläuferstamm. Da aber selbst in VL 334 / pVIC40 ein deutlicher Effekt auszumachen ist, ist von der Aktivität des ThrE-Proteins aus *C. glutamicum* in dem heterologen Wirt *E. coli* auszugehen.

4 Diskussion

E. coli wird für die Threoninproduktion im industriellen Maßstab eingesetzt. Bei der Produktion spielen Transportprozesse durch die Zellmembran der Bakterien eine wichtige Rolle, da die Threoninaufnahme ein der Produktion entgegengesetzter Prozess ist und die Threoninexkretion limitierend sein kann. Ziel dieser Arbeit war deshalb die Analyse der Threonintransportprozesse in *E. coli* und deren Implikation in die Threoninproduktion. Eine gesteigerten Exkretionsrate sowie eine verringerte Aufnahmeaktivität sollte der Optimierung von Threoninproduktionsstämmen dienen.

4.1 Die Threoninaufnahme

In *E. coli* sind drei Threoninaufnahmesysteme bekannt. Zu Beginn dieser Arbeit waren nur das Bindeprotein-abhängige LIV-System, kodiert durch die Gene *livH*, *livM*, *livG*, und der unter anaeroben Bedingungen induzierte, Protonen-gekoppelte Threonintransporter (TdcC) molekular charakterisiert. Ogawa *et al.* konnten 1998 auch einem dritten System, dem Na⁺-Ionen-abhängigen Threonin- / Serintransporter, mit *sstT* ein Gen zuordnen. Interessanterweise konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch Deletion des *sstT*-Gens weder in *E. coli*-Threoninproduktionsstämmen noch in dem Nicht-Produzenten AN387 *yhao::Kan yhjv::Cam Δo409* die komplette durch Serin kompetitierbare Threoninaufnahmeaktivität ausgeschaltet werden. Durch die Charakterisierung der Threonin- / und Serinaufnahme dieser *sstT*-Deletionsmutanten wurde die Anwesenheit eines weiteren Threonin- / Serintransporters gezeigt, der wahrscheinlich im Gegensatz zum SstT-System Na⁺-Ionen-unabhängig ist. Dieses Transportsystem konnte in dem *sstT*-definierten Threoninproduktionsstamm VL 334 / pYN7 kinetisch charakterisiert werden. Mit einem K_M -Wert von $30 \pm 6 \mu\text{M}$, einem K_i -Wert für Serin von $606 \pm 95 \mu\text{M}$ und einer maximalen Geschwindigkeit von $4,5 \pm 0,4 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ konnte es von der Threoninaufnahmeaktivität des Ausgangsstammes VL 334 / pYN7 mit einem K_M -Wert von $10 \pm 2 \mu\text{M}$, einem K_i -Wert von $47 \pm 6 \mu\text{M}$ und einer maximalen Geschwindigkeit von $8 \pm 1 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ differenziert werden. Desweiteren konnte die Aktivität sowohl eines Threonin als auch eines Serin spezifischen Systems in den Stämmen bestimmt werden. Die Aktivität des Threonin spezifischen Systems entspricht wahrscheinlich der Aktivität des LIV-Systems. In früheren Messungen konnte Krebs (1995) für in Minimalmedium gezogene Wildtyp *E. coli*-Zellen die nicht Serin kompetitierbare Threoninaufnahme durch Zugabe

von Leucin, Isoleucin und Valin noch weiter reduzieren. Da das LIV1-System neben Leucin, Isoleucin, Valin, Alanin und Homoserin auch Threonin transportiert, weisen diese Wettbewerbsversuche auf die Aktivität dieses Systems hin (Krebs, 1995).

Die Aktivitäten der drei Threoninaufnahmesysteme wurden in den zwei Threoninproduktionsstämmen VL 334 / pYN7 und ATCC 98082 im Vergleich zu dem Nichtproduzenten AN387 *yhao::Kan yhjv::Cam Δo409* untersucht, um die Rolle der Aufnahme für die Produktion von Threonin zu ermitteln. Tabelle 17 gibt für die Stämme AN387 *yhao::Kan yhjv::Cam Δo409*, VL 334 / pYN7 und ATCC 98082 den Anteil der drei Systeme an der Gesamtaktivität der Threoninaufnahme nach Anzucht in M9-Lactat-Medium an.

Tab. 17: Threoninaufnahmeraten von in M9-Lactat-Medium gezogenen Stämmen in $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$. Spalte 1 gibt die Menge des eingesetzten Substrates an, für VL 334 / pYN7 und dessen *sstT*-Deletionsmutante sind die K_m -Bestimmungen zugrunde gelegt worden. Spalte 2 gibt die Gesamtaktivitäten der Ausgangsstämme wieder, Spalte 3 die Gesamtaktivitäten der jeweiligen *sstT*-Deletionsmutanten. Die Aktivitäten des SstT-Systems in den verschiedenen Stämmen in Spalte 4 ergibt sich durch Differenz der Gesamtaktivitäten der Ausgangsstämme und deren Deletionsmutanten (Spalte 2 minus Spalte 3). Spalte 5 zeigt die Aktivitäten des neu identifizierten Threonin- / Serinsystems, die der Differenz der Gesamtaktivitäten der Deletionsmutanten und deren spezifischen Threoninaufnahmeaktivitäten (Spalte 6), entspricht. Doppelmessungen sind mit Schrägstrichen gekennzeichnet.

	1	2	3	4	5	6
	μM [^{14}C]- Threonin	$\Sigma =$ Gesamt- aktivität	$\Sigma_{\Delta sstT} =$ Threonin / Serin + Threonin	SstT = $\Sigma - \Sigma_{\Delta sstT}$	Threonin / Serin = $\Sigma_{\Delta sstT} -$ Threonin	Threonin
AN387 <i>yhao::Kan</i> <i>yhjv::Cam</i> $\Delta o409$	50	$21,6 \pm 2,3$	$12,9 \pm 1,4$	8,7	9,5	$3,4 \pm 0,2$
VL 334 / pYN7	3,2-160	8 ± 1	$5,5 \pm 0,4$	2,5	4,5	1
ATCC 98082	50	$1,0 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,3$	0	0,9 / 1,2	0 / 0,3

Die Gesamtaktivität des Stammes AN387 *yhao::Kan yhjv::Cam Δo409* (vgl. Tabelle 9 und 10) von $21,6 \pm 2,3 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ teilt sich in drei Systeme auf (vgl. Tab. 17). 44 % der Threoninaufnahme ($9,5 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$) wird durch das neu identifizierte Threonin- / Serinsystem aufgenommen. Dieser Wert ergibt sich aus der Differenz der Threoninaufnahmeaktivität der *sstT*-Deletionsmutante ($\Sigma_{\Delta sstT}$) und der

spezifischen Threoninaufnahmeaktivität dieses Stammes. 40 % der Threoninaufnahme ($8,7 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$) kann durch Subtraktion der Aktivität der *sstT*-Mutante ($\Sigma_{\Delta sstT}$) von der Gesamtaktivität (Σ) dem SstT-System zugeordnet werden. Diese fast gleiche Verteilung der Threoninaufnahmeaktivität auf die beiden Threonin- / Serinsysteme widerlegen, dass SstT als Na^+ -abhängiges System das wichtigste Threoninaufnahmesystem ist. 16 % der Threoninaufnahmeaktivität ($3,4 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$) ist nicht durch Serin kompetitierbar und wahrscheinlich dem LIV1-System zuzuordnen. Die maximale Threoninaufnahmerate des Stammes VL 334 / pYN7 beträgt $8 \pm 1 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ (vgl. Abb. 8), die sich ebenfalls in drei Systeme aufteilt. Das Na^+ -Ionen-unabhängige Threonin- / Serinsystem zeigt eine maximale Aufnahmegeschwindigkeit von $4,5 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ (56 %), die sich aus dem V_{max} -Wert der *sstT*-Deletionsmutante (vgl. Abb. 9) abzüglich der Threonin spezifischen Aktivität ergibt. Die maximale Aufnahmegeschwindigkeit des SstT-Systems ist mit $2,5 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ (32 %) die Differenz der maximalen Aufnahmerate des Stammes VL 334 / pYN7 (vgl. Abb. 8) und der des Stammes VL 334 $\Delta sstT$ / pYN7 (vgl. Abb. 9). Die Threonin spezifische Restaktivität von $1 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ (12,5 %) ist wahrscheinlich dem LIV1-System zuzuordnen. Zusammenfassen läßt sich dieser Vergleich der Threoninaufnahmeaktivitäten der Stämme AN387 *yhao::Kan yhjv::Cam $\Delta o409$* und VL 334 / pYN7 damit, dass alle drei Threoninaufnahmesysteme des Threoninproduzenten VL 334 / pYN7 eine geringere Aktivität als die des Nichtproduzenten AN387 *yhao::Kan yhjv::Cam $\Delta o409$* aufweisen. Diese Aktivitätsreduktion der drei Threoninaufnahmesysteme im Produktionsstamm VL334 / pYN7 setzt sich in der Stammentwicklung zum Produktionsstamm ATCC 98082 fort. Weil im Stamm ATCC 98082 keinerlei Differenz der Aufnahmeaktivität zwischen Ausgangsstamm und *sstT*-Deletionsmutante messbar war, kann davon ausgegangen werden, dass das SstT-System in ATCC 98082 nicht aktiv am Threonintransport beteiligt ist. Da das *sstT*-Gen im Genom nachgewiesen und deletiert werden konnte, kann der Grund für diesen Aktivitätsverlust in Einzelmutationen im Gen oder im Promoterbereich oder aber auf Aktivitätsebene liegen. Durch Sequenzierung des Gens und des Promoters sowie durch Expressionsstudien der verschiedenen Produktionsstämmen könnten daher interessante Einblicke in die Expressionsregulation des Gens gewonnen werden.

Die Aktivitäten der drei Threoninaufnahmesysteme sind in dem Produktionsstamm VL 334 / pYN7 im Gegensatz zum Nichtproduzenten reduziert und diese Verminderung setzt sich in der Stammgenealogie zum Stamm ATCC 98082 / pYN7 fort. Dies bestätigt die Vermutung, dass eine Verringerung der Threoninaufnahme zu einer höheren Produktion führt, da die Aufnahme ein der Produktion entgegengesetzter Prozess ist.

Durch den Vergleich der Serinaufnahme der zwei Threoninproduktionsstämme und eines Nichtproduzenten wurde überprüft, ob diese Reduktion spezifisch für die Threoninaufnahme ist oder auch für die Serinaufnahme gilt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der Serinaufnahmeaktivität vom Nichtproduzenten AN387 *yhao::Kan yhjv::Cam Δo409* zu den Produzenten VL 334 / pYN7 und ATCC 98082 sowohl bezüglich der Aktivität der Ausgangsstämme als auch in der Aktivität der *sstT*-Deletionsmutanten vorliegt. Der Anteil der Aktivitäten der zwei Threonin- / Serinsysteme an der Gesamtaktivität zeigt eine Verringerung beider Systeme in den Produktionsstämmen im Vergleich zum Nichtproduzenten, was mit den Ergebnissen der Threoninaufnahmemessungen übereinstimmt. Unverändert ist allerdings die Serin spezifische Aufnahmeaktivität der Produktionsstämme im Vergleich zum Nichtproduzenten. Die Reduktion der Serinaufnahme in den Produktionsstämmen im Vergleich zum Nichtproduzenten beschränkt sich folglich auf die Reduktion der zwei Threonin- / Serinsysteme. Das spezifische Serinsystem ist nicht betroffen durch die Entwicklung der Threoninproduktionsstämme. Dies zeigt die Spezifität der Aufnahmereduktion für Threonin und damit die Wichtigkeit dieser Reduktion für eine erhöhte Threoninproduktion.

4.2 Das Threonin- / Serinaufnahmeaufnahmemodell für *E. coli*

Durch die im Ergebnissteil beschriebenen Threonin- und Serinaufnahmemessungen sowohl in den Threoninproduktionsstämmen als auch in den unterschiedlichen Mutanten konnte das in Abb. 28 dargestellte Modell für die Threonin- und Serinaufnahme in *E. coli* erstellt werden. Die in der Literatur für *E. coli*-Wildtypstämme beschriebenen Systeme sind (1) das nur unter anaeroben Bedingungen induzierte TdcC-System, welches L-Leucin, L-Serin, L-Threonin und L-Homoserin transportiert, (2) das LIV1-System, dessen Substrate L-Leucin, L-Isoleucin, L-Valin, L-Alanin, L-Threonin und L-Homoserin sind, (3) der SdaC-Transporter, der spezifisch L-Serin transportiert und durch Leucin induziert wird, und (4) das SstT-System, welches sowohl L-Serin als auch L-Threonin als Substrat akzeptiert. Zusätzlich konnte in dieser Arbeit noch eine zweite Threonin- / Serinaufnahmeaktivität identifiziert werden, für die es Hinweise gibt, dass sie im Gegensatz zum SstT-System Na⁺-Ionenunabhängig ist. Es konnte ausgeschlossen werden, dass die drei offenen Leseraster *yhao*, *yhjv* und *o409*, die Sequenzähnlichkeit zu *tdcC* zeigen, für dieses System kodieren. Außerdem muss durch die oben beschriebenen Messungen die Existenz eines L-Serin spezifischen Aufnahmesystems gefordert werden. Die nicht durch

L-Serin kompetitierbare Threoninaufnahmeaktivität könnte mit dem LIV1-System zusammenhängen, worauf bereits frühere Messungsergebnisse von Krebs hinweisen (1995).

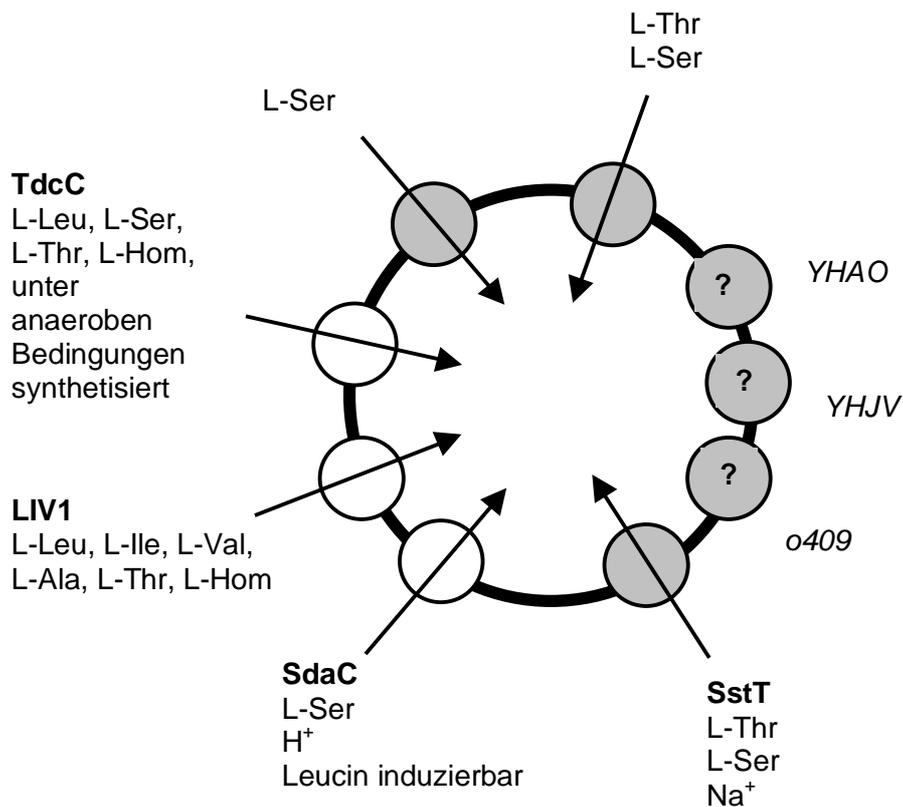


Abb. 28: Modell der Threonin- / Serinaufnahmesysteme in *E. coli*. Grau gefüllte Kreise stehen für in dieser Arbeit untersuchte Systeme, Aktivitäten oder Gene. Die Namen der Aufnahmesysteme sind fett gekennzeichnet.

4.3 Threoninexkretion

Den zwei Proteinen RhtB und RhtC („*resistance against homoserine and threonine*“) wurde die Funktion von Homoserin- bzw. Threoninexportern in *E. coli* zugewiesen, da sie den Zellen Resistenz gegenüber hohen Homoserin- bzw. Threoninkonzentrationen verleihen (Aleshin *et al.*, 1999; Zakataeva *et al.*, 1999). Die Funktion von RhtB als ein Homoserinexporter wurde durch Überexpression und Disruption des *rhtB*-Gens in einem Homoserinproduktionsstamm gezeigt (Zakataeva *et al.*, 1999). Daten über

Messungen zum Threoninexport sind nicht publiziert. Von den Autoren wurde zunächst durch Überexpression des chromosomalen DNA-Abschnitts, auf dem das *rhtB*-Gen liegt, eine erhöhte Resistenz gegenüber Homoserin / Homoserinlacton und Threonin festgestellt (Aleshin *et al.*, 1999). In der nachfolgenden Veröffentlichung dieser Arbeitsgruppe (Zakataeva *et al.*, 1999) wurde durch die Überexpression des gleichen chromosomalen DNA-Abschnitts nur eine Resistenz gegenüber hohen Homoserin- und Homoserinlactonkonzentrationen gezeigt, die Resistenz gegenüber Threonin aber dem zu *rhtB* benachbarten Gen *rhtC* zugeschrieben, obwohl dieses Gen nicht Teil des oben erwähnten DNA-Abschnitts ist. Im *E. coli*-Wildtypstamm wurde durch eine Überexpression des *rhtB*-Gens eine Resistenz gegenüber hohen Konzentrationen an L-Homoserin, L-Homoserinlacton, DL- β -Hydroxynorvalin, L-Serin, 4-aza-DL-Leucin, L-Glutaminsäure- γ -hydrazid, aber auch an L-Threonin festgestellt. Letzteres ist nicht in Einklang mit der oben zitierten Aussage dieser Veröffentlichung, dass das *rhtC*-Gen und nicht das *rhtB*-Gen für eine Resistenz gegenüber hohen Threoninkonzentrationen verantwortlich ist. Die Disruption des *rhtB*-Gens resultierte in einer erhöhten Sensitivität gegenüber L-Homoserin, L-Homoserinlacton und DL- β -Hydroxynorvalin, aber nicht gegenüber L-Threonin. Diese Daten stehen in Widerspruch zu *E. coli*-Wachstumstests von Eggeling (persönliche Mitteilung), die durch die Überexpression des *rhtB*-Gens eine erhöhte Resistenz gegenüber L-Homoserin, L-Homoserinlacton und L-Threonin zeigten und durch Deletion des *rhtB*-Gens Sensitivität gegenüber allen drei Metaboliten aufwiesen. Um die Funktionszuordnung eines Proteins als Threoninexporter nicht nur basierend auf Resistenzmessungen vorzunehmen, wurden die *rht*-Gene in *E. coli*-Threoninproduktionsstämmen deletiert und überexprimiert. Es sollte geklärt werden, ob und welches der beiden *rht*-Gene einen Threoninexporter kodiert und ob die Überexpression dieser Gene ein geeignetes Mittel für eine Stammoptimierung darstellt.

Die Einzeldelationen der Gene *rhtB* und *rhtC* in dem Stamm ATCC 98082 zeigten keine Auswirkung auf die Threoninproduktion. Die Deletion beider Gene in diesem Stamm und eine detaillierte Charakterisierung der Stämme ATCC 98082 / pVIC40 und ATCC 98082 Δ *rhtBC* / pVIC40 ergaben einen statistisch gesehen nicht eindeutigen Unterschied in den maximalen Produktionsraten. ATCC 98082 Δ *rhtBC* / pVIC40 hatte mit $21,9 \pm 2,9 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ eine um $4,6 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ geringere Rate als ATCC 98082 / pVIC40 mit $26,5 \pm 3,2 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$. Aufgrund dieser Daten konnte weder für RhtB noch für RhtC gezeigt werden, dass diese Proteine die Funktion von Threoninexportern ausüben.

In dieser Arbeit hat sowohl die Charakterisierung der Threoninaufnahme als auch der Threoninexkretion gezeigt, dass die Auswirkungen von Deletionen einzelner Gene in *E. coli* nicht offensichtlich waren. Dies lässt sich durch eine hohe Redundanz der Gene in *E. coli* erklären: die Genomgröße macht es möglich, dass mehrere Gene für Proteine mit ähnlichen Funktionen kodieren. Dieses Phänomen konnten auch Daßler *et al.* (2000) beobachten, die kürzlich dem Produkt des offenen Leserasters, *orf299*, die Funktion des Exportes von Metaboliten des Cysteinbiosyntheseweges zuordneten. Die Disruption von *orf299* in einem industriellen Cysteinproduktionsstamm zeigte keinen Effekt, während die Überexpression in dem gleichen Stamm zu einem höheren Cysteinertrag führte. Aus diesem Grund wurde die Funktion der Rht-Proteine bei der Threoninproduktion nicht nur durch die Deletion der Gene, sondern auch durch deren Überexpression überprüft.

Sowohl für das *rhtB*-Gen als auch für das *rhtC*-Gen konnte unter unterschiedlichen Anzuchtbedingungen in drei verschiedenen Threoninproduktionsstämmen (MG 442, VL 334 / pVIC40 und ATCC 98082 / pVIC40) durch die plasmidkodierte Überexpression ein Anstieg der spezifischen Produktionsrate bzw. der spezifischen Produktivität gezeigt werden. Die folgende Tabelle fasst die Ergebnisse der Überexpressionen der Gene *rhtB* und *rhtC* zusammen.

Tab. 18: Anstieg der spezifischen Produktivität [mmol/mgTG] der Stämme MG 442 und VL 334 / pVIC40 und der spezifischen Threoninproduktionsrate [nmol * min⁻¹ * mgTG⁻¹ * mgTG] für den Stamm ATCC 98082 / pVIC40 mit den Plasmiden pTrc99A-*rhtB* und pTrc99A-*rhtC* im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle mit pTrc99A, die gleich 100 % gesetzt wurde (vgl. Abb. 18-23).

	pTrc99A- <i>rhtB</i>		pTrc99A- <i>rhtC</i>	
	M9-Medium	Einheitsmedium	M9-Medium	Einheitsmedium
MG 442	290 %	130 %	140 %	200 %
VL 334 / pVIC40	40 %	50 %	80 %	80 %
ATCC 98082 / pVIC40	-	140 %	-	50 %

Im Stamm MG 442 ist der Anstieg der spezifischen Produktivität durch die plasmidkodierte Expression der Gene *rhtB* und *rhtC* am auffälligsten, doch auch in den

beiden anderen Threoninproduktionsstämmen VL 334 / pVIC40 und ATCC 98082 / pVIC40 sind die Effekte signifikant. Diese Ergebnisse belegen, dass der Export von Threonin ein limitierender Faktor in der Produktion darstellt, welcher durch eine Überexpression von Exportproteinen umgangen werden kann. Innerhalb der Entwicklung der Threoninproduzenten durch unspezifische Mutagenese scheint diese Limitierung schon teilweise reduziert zu sein, da in dem Produzenten MG 442, der der erste in der Stammentwicklungslinie ist (vgl. Abb. 3), die Expression der *rht*-Gene die gravierendsten Effekte zeigt. Diese Ergebnisse machen sowohl für RhtB als auch für RhtC die Funktion eines Threoninexporters wahrscheinlich. Da die Deletion der beiden *rht*-Gene keine Effekte zeigte, wurde ein weiterer Threoninexporter postuliert. Möglich wäre RhtA, dessen Einfluss in die Threoninresistenz von Zakataeva *et al.* 1997 postuliert wurde.

Für die industrielle Verwertung dieser Ergebnisse würde man eine Plasmid-vermittelte Expression der *rht*-Gene vermeiden und stattdessen die Integration der *rht*-Gene ins Genom präferieren. Hierdurch kann der Einsatz von Antibiotika für die Plasmidstabilität vermieden werden. Die Verwendung von Antibiotika im industriellen Maßstab ist teuer und auch problematisch, da bei der Produktaufbereitung die Antibiotika von Threonin getrennt werden müssten, weil L-Threonin als ein Futterzusatzstoff für Nutztiere verwendet wird. Die beiden *rht*-Gene könnten durch homologe Rekombination jeweils stromabwärts ihres eigenen Promotors integrieren und somit zu einer Genduplikation führen. Eine weitere Möglichkeit wäre das Einbringen der Gene mit einem konstitutiven Promoter in fremde Gene, deren Funktionen unter den verwendeten Bedingungen nicht relevant sind. Der somit erzielte Gendosis-Effekt sollte für eine höhere Produktivität und damit einhergehende Optimierung der Threoninproduktionsstämme sorgen.

Die Funktion von RhtB und RhtC wurde durch die Überexpression ihrer Gene in Threoninproduktionsstämmen untersucht. Aus diesen Experimenten wurde den beiden Proteinen die Funktion von Threoninexportern zugeordnet. Um dieses zu kontrollieren, wurde das Gen des Threoninexporters aus *C. glutamicum*, dessen Funktion beschrieben ist (Ziegler *et al.* 2000), auch in den *E. coli*-Threoninproduktionsstämmen überexprimiert. Gleichzeitig sollte überprüft werden, ob der Transporter in *E. coli* aktiv ist und zu einer gesteigerten Threoninproduktion führt. In Tabelle 19 sind die Ergebnisse der Abbildungen 24-27 gegenübergestellt.

Tab. 19: Anstieg der spezifischen Produktivität [mmol/mgTG] der Stämme MG 442 und VL 334 / pVIC40 mit dem Plasmid pTrc99A-*thrE* im Vergleich zur Kontrolle mit pTrc99A, die gleich 100 % gesetzt wurde (vgl. Abb. 23-26).

	pTrc99A- <i>thrE</i>	
	M9-Medium	Einheitsmedium
MG 442	290 %	250 %
VL 334 / pVIC40	20 %	20 %

Der sehr deutliche Effekt der *thrE*-Überexpression auf die spezifische Produktivität des Stammes MG 442 zeigt klar, dass ThrE aus *C. glutamicum* in *E. coli* aktiv ist. Dieser Effekt ist in dem Produzenten VL 334 / pVIC40 mit einem Anstieg von 20 % zwar geringer als im Stamm MG 442, aber dennoch signifikant.

Biotechnologisch würde ein *E. coli*-Stamm mit einem Gen von *C. glutamicum* nicht eingesetzt werden, da Fermentationen gentechnisch veränderter Organismen unter strengeren Auflagen durchgeführt werden müssen als die von selbstklonierten Organismen. Doch für eine präzise biochemische Charakterisierung des Threonin-transportes durch ThrE ist dieses heterologe System geeignet, da Einflüsse der Membranzusammensetzung oder Einflüsse durch Regulationsfaktoren, die in *C. glutamicum* auf den Transport einwirken könnten, in *E. coli* nicht vorhanden sind.

5 Zusammenfassung

E. coli wird zur großtechnischen Gewinnung von L-Threonin eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Threonintransportprozesse in *E. coli*, deren Implikation in die Threoninproduktion und deren Einsetzbarkeit für die Optimierung von Threoninproduktionsstämmen untersucht.

- ✓ Neben den bereits bekannten Threoninaufnahmesystemen, die unter aeroben Bedingungen aktiv sind (SstT und LIV1) konnte ein Threonin- / Serinaufnahmesystem charakterisiert werden, das sich durch einen K_m -Wert von $30 \pm 6 \mu\text{M}$, einem K_i -Wert für Serin von $606 \pm 95 \mu\text{M}$ und einer maximalen Geschwindigkeit von $4,5 \pm 0,4 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ auszeichnet. Außerdem wurden Hinweise erhalten, dass dieses Threonin- / Serinsystem im Unterschied zum SstT-System unabhängig vom Symport mit Na^+ -Ionen ist.
- ✓ Alle drei Threoninaufnahmeaktivitäten sind in dem Threoninproduktionsstamm VL 334 / pYN7 gegenüber dem Nichtproduzenten reduziert. Diese Reduktion setzt sich in der Stammentwicklung vom VL 334 / pYN7 zum Stamm ATCC 98082 fort. Diese Beobachtung belegt die Annahme, dass eine Verringerung der Threoninaufnahmeaktivität als ein der Produktion entgegenstehender Prozess die Produktion steigert.
- ✓ Eine bisher nicht charakterisierte Serinaufnahmeaktivität, die nicht durch Threonin zu kompetitieren ist, konnte beobachtet werden.
- ✓ Ein limitierender Faktor der Produktion - die Exkretion von Threonin - konnte durch Überexpression des *rhtB*- und des *rhtC*-Gens in Threoninproduktionsstämmen beseitigt werden. Die plasmidkodierte Überexpression dieser Gene erhöht die spezifische Produktivität, bzw. die spezifische Threoninproduktionsrate. RhtB und RhtC sind somit als Exportproteine für Threonin wahrscheinlich und können einer Stammoptimierung dienlich sein. Da die Deletion der *rht*-Gene allerdings keinen Effekt zeigte, wurde in dieser Arbeit die Existenz mindestens eines weiteren Threoninexporters postuliert.
- ✓ Die Überexpression des *thrE*-Gens aus *C. glutamicum* in *E. coli*-Threoninproduzenten führte ebenfalls zu einer höheren spezifischen Produktivität. Das zeigt, dass ThrE seine beschriebene Funktion als Threoninexporter auch in dem heterologen Wirt *E. coli* ausübt. Dies bietet eine gute Basis für die weitere biochemische Charakterisierung dieses Transporters in einem heterologen System.

6 Literaturverzeichnis

- Abe, S., Takayama, K. und Kinoshita, S. (1967). Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **13**: 279-301.
- Aleshin, V. V., Zakataeva, N. P. und Livshits, V. A. (1999). A new family of amino-acid-efflux proteins. *Trends Biochem. Sci.* **24**(4): 133-135.
- Amann, E., Ochs, B. und Abel, K. J. (1988). Tightly regulated *tac* promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* **69**(2): 301-315.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. und Struhl, K. (1998). *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc.
- Bailey, J. E. (1991). Toward a science of metabolic engineering. *Science* **252**(5013): 1668-1675.
- Blomfield, I. C., Vaughn, V., Rest, R. F. und Eisenstein, B. I. (1991). Allelic exchange in *Escherichia coli* using the *Bacillus subtilis sacB* gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon. *Mol Microbiol.* **5**(6): 1447-1457.
- Calvo, J. M. und Matthews, R. G. (1994). The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli* [published erratum appears in *Microbiol Rev* 1995 Jun;59(2):323]. *Microbiol. Rev.* **58**(3): 466-490.
- Chen, C., Tsuchiya, T., Yamane, Y, Wood, J. M. und Wilson, T. H. (1985). Na⁺ (Li⁺)-Proline Cotransport in *Escherichia coli*. *J. Membrane Biol.* **84**: 157-164.
- Chuang, S. E., Chen, A. L., Chao, C. C. (1995). Growth of *E. coli* at low temperature dramatically increases the transformation frequency by electroporation. *Nucleic Acids Res.* **23**(9): 1641.
- Cohen, G. N. (1983). The common pathway to lysine, methionine, and threonine. *Amino acids: Biosynthesis and genetic regulation*. K. M. Hermann und R. L. Somerville. Reading, Mass., Addison-Qesley Publishing Co., Inc.:147-171.
- Cohen, G. N. und Saint-Geront, I. (1987). Biosynthesis of threonine, lysine and methionine. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Cellular and Molecular Biology*. F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. Brooks Lowet *al.* Washington, D. C., American Society for Microbiology. **1**: 429-444.
- Crueger, W. und Crueger, A. (1984). *Biotechnologie-Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie*. München, R. Oldenbourg Verlag GmbH.
- Daßler, T., Maier, T., Winterhalter, C. und Bock, A. (2000). Identification of a major facilitator protein from *Escherichia coli* involved in efflux of metabolites of the cysteine pathway [In Process Citation]. *Mol. Microbiol.* **36**(5): 1101-1112.
- Debabov, V. G., Kozlov J. I., Zhdanova, N. I., Khurges, E. M., Yankovsky, N. K., Rozinov, M. N., Shakulov, R. S., Rebentish, B. A., Livshits, V. A., Gusyativer, M. M., Mashko, S. V., Mashentseva, V. N., Kozyreva, L. F. und Arsatiants, R. A.

- (1981). Method for Preparing Strains Which Produce Aminoacids. United States Patent. Ajinomoto Co., Inc., Tokyo, Japan. **4,278,765**
- Debabov, V. G., Kozlov, J. I., Khurges, E. M., Livshits, V. A., Zhdanova, N. I., Gusyativer, M. M., Sokolov, A. K., Bacchina, T. A., Yankovsky, N. K., Tsygankov, J. D., Chistoserdov, A. J., Plotnikova, T. G., Shakalis, I. O., Belareva, A. V., Arsatiants, R. A., Sholin, A. F. und Pozdnyakova, T. M. (1992). Bacterial Strain of *Escherichia coli* BKIIM B-3996 as the Producer of L-Threonine. United States Patent, Ajinomoto Co., Inc., Tokyo, Japan. **5,175,107**
- Debabov, V. G., Kozlov, J. I., Khurges, E. M., Livshits, V. A., Zhdanova, N. I., Gusyativer, M. M., Sokolov, A. K. und Bacchina, T. A. (1997). Bacterial Strain of *Escherichia coli* VNII Genetika 472T23 as the Producer of L-Threonine. United States Patent, Ajinomoto Co., Inc., Tokyo, Japan. **5,631,157**.
- Donnenberg, M. S. und Kaper, J. B. (1991). Construction of an *ee* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. Infect. Immun. **59**(12): 4310-4317.
- Eikmanns, B. J., Metzger, M., Reinscheid, D., Kircher, M. und Sahn, H. (1991). Amplification of three threonine biosynthesis genes in *Corynebacterium glutamicum* and its influence on carbon flux in different strains. Appl. Microbiol. Biotechnol. **34**(5): 617-22.
- Furukawa, S., Ozaki, A., Kotani, Y. und Nakanishi, T. (1988). Breeding of L-threonine hyperproducer of *Escherichia coli* K12. Biochim. Biophys. Res. Commun. **18**: 788-795.
- Grant, S. G., Jessee, J., Bloom, F. R. und 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): 4645-4649.
- Hama, H., Shimamoto T., Tsuda, M. und Tsuchiya, T. (1987). Properties of a Na⁺-coupled serine-threonine transport system in *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta **905**(2): 231-239.
- Hama, H, Shimamoto T., Tsuda, M. und Tsuchiya, T. (1988). Characterization of a Novel L-Serine Transport System in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **170**(5): 2236-2239.
- Heery, D. M., Powell, R., Gannon, F. und Dunican, L. K. (1998). Curing of a plasmid from *E. coli* using high-voltage electroporation. Nucleic Acids Res. **17**(23): 10131.
- Hermann, T. und Krämer, R. (1996). Mechanism and Regulation of Isoleucine Excretion in *Corynebacterium glutamicum*. App. Environ. Microbiol. **62**(9): 3238-3244.
- Hesslinger, C., Fairhurst, S. A. und Sawers, G. (1998). Novel keto acid formate-lyase and propionate kinase enzymes are components of an anaerobic pathway in *Escherichia coli* that degrades L- threonine to propionate. Mol. Microbiol. **27**(2): 477-492.
- Ikeda, M. und Katsumata, M. (1995). Tryptophan production by transport mutants of *Corynebacterium glutamicum*. Biosci. Biotechnol. Biochem. **59**: 1600-1602.

- Ikeda, M., Nakanishi, K., Kino, K. und Katsumata, R. (1994). Fermentative production of tryptophan by a stable recombinant strain of *Corynebacterium glutamicum* with a modified serine-biosynthetic pathway. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**(4): 674-678.
- Inoue, H., Nojima, H., und Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**(1): 23-28.
- Jetten, M. S. und Sinskey, A. J. (1995). Recent advances in the physiology and genetics of amino acid-producing bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* **15**(1): 73-103.
- Klingenberg, M. und Pfaff, E. (1977). Means of terminating reactions. *Methods in Enzymology* **10**: 680-684.
- Konings, W. N., Poolman, B., *et al.* (1992). Can the excretion of metabolites by bacteria be manipulated? *FEMS Microbiol. Rev.* **8**(2): 93-108.
- Krämer, R. (1994). Secretion of amino acids by bacteria: Physiology and mechanism. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**: 75-94.
- Krämer, R. (1996). Genetic and physiological approaches for production of amino acid. *J. Biotechnol.* **45**: 1-21.
- Krebs, A. (1995). Charakterisierung der Threoninproduktion in einem rekombinanten *E. coli*-Stamm. Diplomarbeit am Institut für Biotechnologie I - Forschungszentrum Jülich.
- Leuchtenberger, W. (1996). Amino acids-technical production and use. Products of primary metabolism. *Biotechnology* **6**. H. J. Rehm und R. G. Weinheim, Germany, VHC Verlagsgesellschaft GmbH.
- Lindroth, P. und Mopper, K. (1979). High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthaldialdehyde. *Anal. Chem.* **51**(1667-1674).
- Link, A. J., Phillips, D. und Church, G. M. (1997). Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J. Bacteriol.* **179**(20): 6228-6237.
- Lundin, A., Rickardson, A. und Thore, A. (1976). Continuous monitoring of ATP-converting reactions by purified firefly luciferase. *Anal. Biochem.* **75**: 611-620.
- Marcus, J. P. und Dekker, E. E. (1993). Threonine formation via the coupled activity of 2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A lyase and threonine dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **175**(20): 6505-6511.
- Neidhardt, F. C. (1996). *Escherichia coli* and *Salmonella*. Washington, DC, ASM Press.
- Ogawa, W., Kim, Y. M. Mizushima, T. und Tsuchiya, T. (1998). Cloning and expression of the gene for the Na⁺-coupled serine transporter from *Escherichia coli* and characteristics of the transporter. *J. Bacteriol.* **180**(24): 6749-6752.
- Okamoto, K. und Ikeda, M. (1998). Herstellung von L-Threonin durch Hyperfermentation. *Bio Industry* **15**(10): 54-62.

- Okamoto, K., Kino, K., Ikeda M. (1997). Hyperproduction of L-threonine by an *Escherichia coli* mutant with impaired L-threonine uptake. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**(11): 1877-1882.
- Potter, R., Kapoor, V. und Newman, E. B. (1977). Role of threonine dehydrogenase in *Escherichia coli* threonine degradation. *J. Bacteriol.* **132**(2): 385-391.
- Sahm, H. (1995). Metabolic design in the amino-acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Folia Microbiol.* **40**: 23-30.
- Sahm, H., Eggeling, L., Eikmanns, B. und R. Krämer (1995). Metabolic design in amino acid producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Rev.* **16**: 234-252.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Schimz, K. L., Rütten, B., und Tretter, M. (1981). Determination of adenosine nucleotides with luciferin / luciferase from crude firefly lantern extract on bioluminescence analyser. *Adv. Biotechnol.* **1**:457-462.
- Shiio, I., Miyajima, R. and Nakamori, S. (1970). Homoserine dehydrogenase genetically desensitized to the feedback inhibition in *Brevibacterium flavum*. *J. Biochem. (Tokyo)* **68**(6): 859-866.
- Shiio, I. und Nakamori, S. (1969). Microbial Production of L-Threonine. *Agr. Biol. Chem.* **33**(8): 1152-1160.
- Stephanopoulos, G. und Vallino, J. J. (1991). Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. *Science* **252**(5013): 1675-1681.
- Sumantran, V. N., Schweizer, H. P. und Datta, P. (1990). A Novel Membrane-Associated Threonine Permease Encoded by the *tdcC* Gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**(8): 4288-4294.
- Templeton, B. A. und Savageau, M. A. (1974). Transport of biosynthetic intermediates: homoserine and threonine uptake in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **117**(3): 1002-1009.
- Umbarger, H. E. (1978). Amino acid biosynthesis and its regulation. *Ann. Rev. Biochem.* **47**: 533-606.
- Umbarger, H. E. und Brown, B. (1957). Threonine Deaminases in *Escherichia coli*. Evidence for two L-Threonine deaminases. *J. Bacteriol.* **73**: 105-112.
- Vrljic, M., Garg, J., Bellmann, A., Wachi, S., Freudl, R., Malecki, M. J., Sahm, H., Kozina, V. J., Eggeling, L. und Saier Jr., M. H. (1999). The LysE Superfamily: Topology of the Lysine Exporter LysE of *Corynebacterium glutamicum*, a Paradyme for a Novel Superfamily of Transmembrane Solute Translocators. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**(2): 327-336.

- Vrljic, M., Sahm, H. und Eggeling L. (1996). A new type of transporter with a new type of cellular function: L-lysine export from *Corynebacterium glutamicum*. Mol. Microbiol. **22**(5): 815-826.
- Yanisch-Perron, C., Viera, J. und Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene **33**: 103-119.
- Zabarovsky, E. R. und Winberg, G. (1990). High efficiency electroporation of ligated DNA into bacteria. Nucleic Acids Res. **18**(19): 5912.
- Zakataeva, N. P., Aleshin, V. A. und Livshits, V. A. (1997). Characterization of a pleiotropic mutation that confers upon *Escherichia coli* resistance to high concentrations of homoserine and threonine. Poster. 17th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, San Francisco, California, FASEB J.
- Zakataeva, N. P., Aleshin, V. V. Tokmakova, I. L., Troshin, P. V. und Livshits, V. A. (1999). The novel transmembrane *Escherichia coli* proteins involved in the amino acid efflux. FEBS Lett. **452**(3): 228-232.
- Ziegler, P., Eggeling, L. und Sahm, H. (2000). The threonine export carrier ThrE of *Corynebacterium glutamicum*. Poster. Microbiology 2000 - Gesundheit - Ökologie - Biotechnologie, München.
- Zimmermann, J., H. Voss, *et al.* (1990). A simplified protocol for fast plasmid DNA sequencing. Nucleic Acids Res. **18**: 1067.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schema der Biosynthese von L-Threonin. Schwarze Pfeile repräsentieren Inhibierung der Enzyme, graue Kreise Repression der Gene	4
Abb. 2: Abbauschema von L-Threonin	6
Abb. 3: Stammentwicklung der in dieser Arbeit verwendeten Threoninproduktionsstämme	8
Abb. 4: Die bekannten Aufnahmesysteme für Threonin und / oder Serin in <i>E. coli</i>	9
Abb. 5: Einteilung der LysE-Superfamilie nach Aleshin <i>et al.</i> (1999).	11
Abb. 6: Enzymreaktionen der Hexosebestimmung	21
Abb. 7: Michaelis-Menten- und Eadie-Hofstee-Auftragung der Threoninaufnahmekinetik des in M9-Glukose-Medium gezogenen <i>E. coli</i> -Wildtypstammes DH5 α <i>mcr</i>	30
Abb. 8: Michaelis-Menten- und Eadie-Hofstee-Auftragung der Threoninaufnahmekinetik des in M9-Lactat-Medium gezogenen Stammes VL334 / pYN7	35
Abb. 9: Michaelis-Menten- und Eadie-Hofstee-Auftragung der Threoninaufnahmekinetik des in M9-Lactat-Medium gezogenen Stammes VL334 Δ <i>sst7</i> / pYN7	36
Abb. 10: Vergleich interner zu externer Threoninkonzentration bei der Fermentation von BKIIM B-3996 / pVIC40	46
Abb. 11: Spezifische Produktivität (ausgefüllte Balken) und interne Threoinkonzentrationen (umrahmte Balken) von in M9-Medium gezogenen Stämmen.	47
Abb. 12: Wachstumskurven der Stämme ATCC 98082 / pVIC40 und ATCC 98082 Δ <i>yigJ</i> / pVIC40 in M9-Medium mit 4 % Saccharose und 17,4 g/l Ammoniumsulfat.	48
Abb. 13: Externe Threoninkonzentrationen der Stämme ATCC 98082 / pVIC40 und ATCC 98082 Δ <i>yigJ</i> / pVIC40 in M9-Medium mit 4 % Saccharose und 17,4 g/l Ammoniumsulfat.	49
Abb. 14: Zellinterne Threoninkonzentration der Stämme ATCC 98082 / pVIC40 und ATCC 98082 Δ <i>yigJ</i> / pVIC40 in M9-Medium mit 4 % Saccharose und 17,4 g/l Ammoniumsulfat.	49
Abb. 15: Zellwachstum (offene Symbole) und externe Threoninkonzentrationen (gefüllte Symbole) von in Einheitsmedium gezogenen ATCC 98082 / pVIC40. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Messungen.	50
Abb. 16: Zellwachstum (offene Symbole) und externe Threoninkonzentrationen (gefüllte Symbole) von in Einheitsmedium gezogenen ATCC 98082 Δ <i>rhtBC</i> / pVIC40. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Messungen.	51
Abb. 17: Threoninproduktionsraten von a) ATCC 98082 / pVIC40 und b) ATCC 98082 Δ <i>rhtBC</i> / pVIC40 in $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$. Die Kurven wurden aus drei unabhängigen Messungen mit jeweils 21 Messpunkten gewonnen.	52
Abb. 18: Spezifische Produktivität der in M9-Medium mit 2 % Glukose und 17,4 g/l Ammoniumsulfat gezogenen drei Stämmen in Prozent. Schwarze Balken: MG 442 / pTrc99A, weiße Balken: MG 442 / pTrc99A- <i>rhtB</i> , graue Balken: MG 442 / pTrc99A- <i>rhtC</i> . Die Stämme wurden nach 5 Stunden mit 200 $\mu\text{g/ml}$ IPTG induziert. Der letzte Wert der Kontrolle MG 442 / pTrc99A wurde gleich 100 % gesetzt.	53

- Abb. 19: Spezifische Produktivität der in Einheitsmedium gezogenen drei Stämmen in Prozent. Schwarze Balken: MG 442 / pTrc99A, weiße Balken: MG 442 / pTrc99A-*rhtB*, graue Balken: MG 442 / pTrc99A-*rhtC*. Die Stämme wurden nach 5,25 Stunden mit 200 µg/ml IPTG induziert. Der letzte Wert der Kontrolle MG 442 / pTrc99A wurde gleich 100 % gesetzt. _____ 54
- Abb. 20: Spezifische Produktivität der in M9-Medium mit 2 % Glukose und 17,4 g/l Ammoniumsulfat gezogenen Stämme in Prozent. Schwarze Balken: VL 334 / pVIC40 / pTrc99A, weiße Balken: VL 334 / pVIC40 / pTrc99A-*rhtB*, graue Balken: VL 334 / pVIC40 / pTrc99A-*rhtC*. Die Stämme wurden nach 20,2 Stunden mit 200 µg/ml IPTG induziert. Der letzte Wert der Kontrolle VL 334 / pTrc99A wurde gleich 100 % gesetzt. 55
- Abb. 21: Spezifische Produktivität der in Einheitsmedium gezogenen Stämme in Prozent. Schwarze Balken: VL 334 / pVIC40 / pTrc99A, weiße Balken: VL 334 / pVIC40 / pTrc99A-*rhtB*, graue Balken: VL 334 / pVIC40 / pTrc99A-*rhtC*. Die Stämme wurden nach 5,25 Stunden mit 200 µg/ml IPTG induziert. Der letzte Wert der Kontrolle VL 334 / pTrc99A wurde gleich 100 % gesetzt. _____ 56
- Abb. 22: Zellwachstum und externe Threoninkonzentration der in Einheitsmedium gezogenen Stämme a) ATCC 98082 / pVIC40 / pTrc99A, b) ATCC 98082 / pVIC40 / pTrc99A-*rhtB* und c) ATCC 98082 / pVIC40 / pTrc99A-*rhtC*. Die Stämme wurden nach 2,5 Stunden mit 200 µg/ml IPTG induziert. _____ 57
- Abb. 23: Graphische Darstellung der Threoninproduktionsraten in $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ über den Fermentationsverlauf von a) ATCC 98082 / pVIC40 / pTrc99A, b) von ATCC 98082 / pVIC40 / pTrc99A-*rhtB* und c) von ATCC 98082 / pVIC40 / pTrc99A-*rhtC*. Gezeigt sind die Ergebnisse aus je zwei unabhängigen Messreihen mit jeweils 18 Messpunkten. ____ 58
- Abb. 24: Spezifische Produktivität der in M9-Medium mit 2 % Glukose und 17,4 g/l Ammoniumsulfat gezogenen Zellen in Prozent. Schwarze Balken: MG 442 / pTrc99A, graue Balken: MG 442 / pTrc99A-*thrE*. Die Stämme wurden nach 5 Stunden mit 200 µg/ml IPTG induziert. Der letzte Wert der Kontrolle MG 442 / pTrc99A wurde gleich 100 % gesetzt. _____ 60
- Abb. 25: Spezifische Produktivität der in Einheitsmedium gezogenen Zellen in Prozent. Schwarze Balken: MG 442 / pTrc99A, graue Balken: MG 442 / pTrc99A-*thrE*. Die Stämme wurden nach 5,25 Stunden mit 200 µg/ml IPTG induziert. Der letzte Wert der Kontrolle MG 442 / pTrc99A wurde gleich 100 % gesetzt. _____ 61
- Abb. 26: Spezifische Produktivität der in M9-Medium mit 2 % Glukose und 17,4 g/l Ammoniumsulfat gezogenen Zellen in Prozent. Schwarze Balken: VL 334 / pVIC40 / pTrc99A, graue Balken: VL 334 / pVIC40 / pTrc99A-*thrE*. Die Stämme wurden nach 20,2 Stunden mit 200 µg/ml IPTG induziert. Der letzte Wert der Kontrolle VL 334 / pTrc99A wurde gleich 100 % gesetzt. _____ 62
- Abb. 27: Spezifische Produktivität der in Einheitsmedium gezogenen Zellen in Prozent. Schwarze Balken: VL 334 / pVIC40 / pTrc99A, graue Balken: VL 334 / pVIC40 / pTrc99A-*thrE*. Die Stämme wurden nach 5,25 Stunden mit 200 µg/ml IPTG induziert. Der letzte Wert der Kontrolle VL 334 / pTrc99A wurde gleich 100 % gesetzt. _____ 62
- Abb. 28: Modell der Threonin- / Serinaufnahmesysteme in *E. coli*. Grau gefüllte Kreise stehen für in dieser Arbeit untersuchte Systeme, Aktivitäten oder Gene. Die Namen der Aufnahmesysteme sind fett gekennzeichnet. _____ 68

8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: In dieser Arbeit verwendete Stämme	15
Tab. 2: In dieser Arbeit verwendete Plasmide	16
Tab. 3: Threoninaufnahmeraten in $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ von in M9-Glukose-Medium gezogenen Stämmen mit und ohne Kompetitionen durch Serinzugabe. Doppelmessungen sind durch Schrägstriche gekennzeichnet.	31
Tab. 4: Threoninaufnahmeraten in $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ von in M9-Glukose-Medium gezogenen Stämmen mit und ohne Kompetitionen durch Serinzugabe. Doppelmessungen sind durch Schrägstriche gekennzeichnet.	33
Tab. 5: Threoninaufnahmeraten in $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ von in M9-Lactat-Medium gezogenen Stämmen mit und ohne Kompetitionen durch Serinzugabe.	33
Tab. 6: Threoninaufnahmeraten in $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ von in M9-Lactat-Medium gezogenen Stämmen mit und ohne Kompetitionen durch Serinzugabe. Doppelmessungen sind durch Schrägstriche gekennzeichnet.	34
Tab. 7: Threoninkonzentrationen im Mediumüberstand der Stämme VL 334 Δ sstT / pYN7 und VL 334 / pYN7	34
Tab. 8: Threoninaufnahmeraten in $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ von in M9-Lactat-Medium gezogenen Stämmen mit und ohne Kompetitionen durch Serinzugabe. Doppelmessungen sind durch Schrägstriche gekennzeichnet.	37
Tab. 9: Threoninaufnahmeraten in $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ von in M9-Glukose-Medium gezogenen Stämmen mit und ohne Kompetitionen durch Serinzugabe. Doppelmessungen sind durch Schrägstriche gekennzeichnet.	38
Tab. 10: Threoninaufnahmeraten in $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ von in M9-Lactat-Medium gezogenen Stämmen mit und ohne Kompetitionen durch Zugabe von Serin.	39
Tab. 11: Threoninaufnahmeraten in $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ von in M9-Lactat-Medium gezogenen Stämmen mit und ohne Kompetitionen durch Zugabe von Serin. Doppelmessungen sind durch Schrägstriche gekennzeichnet.	40
Tab. 12: Serinaufnahmeraten in $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ von in M9-Lactat-Medium gezogenen Zellen mit und ohne Kompetitionen durch Zugabe von Threonin. Doppelmessungen sind durch Schrägstriche gekennzeichnet.	41
Tab. 13: Serinaufnahmeraten in $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ von in verschiedenen Medien gezogenen Stämmen mit und ohne Kompetitionen durch Zugabe von Threonin.	42
Tab. 14: Serinaufnahmeraten in $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ von in M9-Lactat-Medium gezogenen Stämmen mit und ohne Kompetitionen durch Zugabe von Threonin. Doppelmessungen sind durch Schrägstriche gekennzeichnet. Die grauen Zellen zeigen Ergebnisse aus Messungen mit 200 μM eingesetztem [^{14}C]-Serin, die hellgrauen mit 100 μM und die weissen die mit 50 μM eingesetztem [^{14}C]-Serin.	43
Tab. 15: Serinaufnahmeraten in $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ von in M9-Lactat-Medium gezogenen Stämmen.	44

- Tab. 16: Serinaufnahmeraten in $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ mit und ohne Konkurrenz durch Zugabe von Harmalin oder Threonin. Doppelmessungen sind durch Schrägstriche gekennzeichnet. _____ 45
- Tab. 17: Threoninaufnahmeraten von in M9-Lactat-Medium gezogenen Stämmen in $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1}$. Spalte 1 gibt die Menge des eingesetzten Substrates an, für VL 334 / pYN7 und dessen *ssT*-Deletionsmutante sind die K_m -Bestimmungen zugrunde gelegt worden. Spalte 2 gibt die Gesamtaktivitäten der Ausgangsstämme wieder, Spalte 3 die Gesamtaktivitäten der jeweiligen *ssT*-Deletionsmutanten. Die Aktivitäten des Sst-Systems in den verschiedenen Stämmen in Spalte 4 ergibt sich durch Differenz der Gesamtaktivitäten der Ausgangsstämme und deren Deletionsmutanten (Spalte 2 minus Spalte 3). Spalte 5 zeigt die Aktivitäten des neu identifizierten Threonin- / Serinsystems, die der Differenz der Gesamtaktivitäten der Deletionsmutanten und deren spezifischen Threoninaufnahmeaktivitäten (Spalte 6), entspricht. Doppelmessungen sind mit Schrägstrichen gekennzeichnet. _____ 65
- Tab. 18: Anstieg der spezifischen Produktivität [mmol/mgTG] der Stämme MG 442 und VL 334 / pVIC40 und der spezifischen Threoninproduktionsrate [$\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgTG}^{-1} \cdot \text{mgTG}$] für den Stamm ATCC 98082 / pVIC40 mit den Plasmiden pTrc99A-*rhtB* und pTrc99A-*rhtC* im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle mit pTrc99A, die gleich 100 % gesetzt wurde (vgl. Abb. 18-23). _____ 70
- Tab. 19: Anstieg der spezifischen Produktivität [mmol/mgTG] der Stämme MG 442 und VL 334 / pVIC40 mit dem Plasmid pTrc99A-*thrE* im Vergleich zur Kontrolle mit pTrc99A, die gleich 100 % gesetzt wurde (vgl. Abb. 23-26). _____ 72

Gedankt sei.....

Prof. Reinhard Krämer für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die engagierte Betreuung, die stete Bereitschaft zur Diskussion und für zahlreiche wertvolle Ratschläge.

Prof. Helmut W. Klein für die Übernahme des Korreferates.

Der Degussa Hüls AG für die finanzielle Unterstützung meines Projektes. Mechthild Rieping (Degussa) und Lothar Eggeling (Forschungszentrum Jülich) für die gute Zusammenarbeit im Threoninprojekt.

Andreas für die Anleitungen im Labor und das Korrekturenlesen nicht nur dieser Arbeit.

Maria del Pilar für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und für Einblicke in die spanische Küche.

Jana für ihre bösen Sprüche und ihr liebes Wesen.

Anne, Carole, Dirk, Frank, Gabi, Gregor, Lars, aber auch den beiden anderen Welten sowie der Hefegruppe für ein Arbeitsklima, das ich vermissen werde.

Konfuzius für seine treffenden Situationsanalysen per e-mail und meiner Ma für die vielen Kerzen, die sie für mich und meine Zellen angezündet hat.

Rainer für seine bösertige Kleinlichkeit beim Korrigieren und Martina für die Leihgabe ihres Computers.

Jörn für seine Toleranz gegenüber meinen launischen Panikattacken und Phasen mentaler Abwesenheit.

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 - besehen 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 betreut worden.

Teilpublikation

Schiller, D., Kruse, D., Kneifel, H., Krämer, R. und Burkovski, A. (2000). Polyamine Transport and Role of *potE* in Response to Osmotic Stress in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **182** (21) im Druck.