

Entwicklung eines synthetischen Modellsystems zur Untersuchung mutualistischer Interaktionen: Aminosäurequantifizierung und Markierungsstrategie

Diplomarbeit

im Studiengang Pharmabiotechnologie der Fachhochschule Jena

angefertigt am Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie in der
Abteilung Bioorganische Chemie

vorgelegt von

Felix Bertels

Geboren am 13.04.1986 in Suhl

Jena, im Juni 2010

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
Zusammenfassung	I
1 Einleitung	1
1.1 Interspezifische Interaktionen.....	1
1.2 Mutualismus	2
1.3 Evolution mutualistischer Interaktionen	2
1.4 Vorteile von Evolutionsexperimenten mit Bakterien.....	3
1.5 Das mutualistische Modellsystem	4
1.6 Aminosäuremetabolismus	5
1.7 Markierungsstrategie.....	7
1.7.1 Selektierbare Marker	7
1.7.2 Phänotypische Marker	8
1.7.3 Transposons	9
1.7.4 Tn7 Transposon.....	10
1.8 <i>E. coli</i> als Aminosäurebiosensor	11
1.9 Zielstellungen	13
2 Material und Methoden	15
2.1 Material	15
2.1.1 Plasmide und Bakterien	15
2.1.2 Primer.....	16
2.1.3 Enzyme.....	17
2.1.4 Medien und Puffer	17
2.2 Methoden	20
2.2.1 Bestimmung der optischen Dichte (OD) von Bakteriensuspensionen.....	20
2.2.2 Anlegen einer -80°C Glycerolkultur	20

2.2.3	Präparation chemisch kompetenter Zellen	20
2.2.4	Einwaage von Aminosäuren zur Erstellung einer Stammlösung	20
2.2.5	Identifizierung von essentiellen Aminosäure-Biosynthesegenen.....	21
2.2.6	Molekularbiologische Methoden.....	23
2.2.7	Tn7 Transgen-Insertionsprotokoll.....	27
2.2.8	Funktionelle Charakterisierung der Fluoreszenzproteine	28
2.2.9	Modellorganismen: Kultivierung und Ernte der Überstände	29
2.2.10	Aminosäureanalytik mittels RP-HPLC	30
2.2.11	Quantifizierung bioverfügbarer Aminosäuren.....	31
2.2.12	Berechnung der Aminosäurekonzentration in den Überständen	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Identifizierung essentieller Aminosäurebiosynthesegene	33
3.1.1	In silico-Analyse	33
3.1.2	in vivo-Experimente	35
3.2	Vergleich der Fluoreszenzintensität verschieden markierter <i>E. coli</i>	37
3.3	Aminosäurebiosensoren.....	39
3.3.1	Aminosäure abhängiges Wachstum der Biosensoren.....	40
3.3.2	Aminosäurequantifizierung mit <i>E. coli</i> Biosensoren	41
4	Diskussion	48
4.1	Aminosäureauxotrophie	48
4.2	Entwicklung einer Markierungsstrategie	50
4.2.1	Markergene.....	50
4.2.2	Chromosomale Integration.....	53
4.3	Vergleich der Fluoreszenzintensitäten	53
4.4	Aminosäurebiosensoren.....	54
5	Ausblick.....	59
6	Anhang.....	60
7	Literaturverzeichnis	62
8	Selbstständigkeitserklärung	68
	Danksagung	69

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Mutualistisches Modellsystem.	
Abbildung 1-2: Eintritt des Ammoniums in den Glutamin-Glutamat-Stoffwechsel.	
Abbildung 1-3: Anregungs und Emmisionsspektren des natürlichen GFP.	
Abbildung 1-4: Transponierbare Elemente.	
Abbildung 1-5: Tn7 Transpositionswege.	
Abbildung 2-1 Schematische Darstellung der Vorgehensweise beim Identifizieren essentieller Aminosäure-Biosynthesegene.	
Abbildung 2-2: Klonierungsstrategie:	
Abbildung 2-3: Zeitlicher Gradient der RP-HPLC:	
Abbildung 3-1: Wachstumstest 15 potentiellen Auxotrophie-Mutanten nach 18 h.	
Abbildung 3-2: Wachstumstest der potentiellen Auxotrophie-Mutanten nach 48 h.	
Abbildung 3-3: Fluoreszenzunterschied zwischen markierten und unmarkierten JW0336.	
Abbildung 3-4: Fluoreszenz-OD Plot.	
Abbildung 3-5: Wachstumskurve von markierten und unmarkierten <i>E. coli</i> JW0336.	
Abbildung 3-6: Kalibrationsgeraden der Aminosäurebiosensoren.	
Abbildung 3-7: Vergleich der Aminosäurekonzentrationen, die mit den Biosensor und der HPLC ermittelt wurden.	
Abbildung 3-8 Variationskoeffizient der einzelnen Messung mit den Biosensoren:	
Abbildung 3-9: Variationskoeffizient der Biosensoren in den Überständen der Modellorganismen.	
Abbildung 3-10: Absolute Abweichung der Biosensor zu den mit der HPL bestimmten Aminosäure Konzentrationen.	
Abbildung 6-2: Wachstumverhalten der drei Aminosäurebiosensoren in Abhängigkeit von der zugegebenen Aminosäurekonzentration	

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Schematische Einteilung interspezifischer Interaktionen.	1
Tabelle 1-2: Modellorganismen und deren Eigenschaften.....	5
Tabelle 1-3: Gruppierung aller 20 proteinogenen Aminosäuren nach ihren metabolischen Vorstufen.....	6
Tabelle 2-1: Übersicht über die verwendeten und im Laufe der Arbeit generierten Plasmide.	15
Tabelle 2-2: Übersicht über die verwendeten und genetisch veränderten <i>E. coli</i> -Stämme sowie der Modellorganismen.	15
Tabelle 2-3: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide und deren Eigenschaften. ...	17
Tabelle 2-4: Übersicht über die verwendeten Enzyme.	17
Tabelle 2-5: Zur Markierung der Modellorganismen und Aminosäurebiosensoren verwendete Fluoreszenzproteine.	27
Tabelle 2-6: Fluoreszenz markierte <i>E. coli</i> und deren maximale Anregungs- und Emissionswellenlängen der Fluoreszenzproteine.	29
Tabelle 3-1: Aminosäuren, die in der <i>in silico</i> -Analyse ausgeschlossen wurden, deren Vorstufen und involvierten Gene.....	34
Tabelle 3-2: Ergebnis der <i>in silico</i> -Analyse zur Identifikation potentiell essentieller Aminosäure-Biosynthesegene.	34
Tabelle 3-3: Fluoreszenzmarkierte Aminosäurebiosensoren und deren Spezifikationen.	40
Tabelle 3-4: Formeln und Bestimmtheitsmaß R^2 der Trendlinien aus Abbildung 6-2.	41
Tabelle 6-1: OD-Werte der Deletionsmutanten nach Wachstum in Minimalmedium	60

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BSA	Bovine Serum Albumin
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DNA	„ <i>deoxyribonucleic acid</i> “ (Desoxyribonukleinsäure, DNS)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
g	Erdgravitation, als Maßeinheit für die Kraftwirkung bei der Zentrifugation
GFP	grün fluoreszierendes Protein
kb	Kilobase, Sequenz von 10 ³ Nukleotiden
kDa	Kilodalton
h	„ <i>hour</i> “ (Stunde)
IS	“Insertion sequences” (Insertionssequenzen)
min	Minute(-n)
MMAB	Minimalmedium <i>Acinetobacter baylyi</i>
OD	optische Dichte
<i>P. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
PCR	„ <i>Polymerase Chain Reaction</i> “ (Polymerase-Ketten-Reaktion)
RFU	„ <i>Relative fluorescent units</i> “ (relative Fluoreszenzeinheiten)
rpm	„ <i>Rounds per minute</i> “ (Umdrehungen pro minute)
s	Sekunde
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
T _M	Temperatur, bei der 50% eines DNA Doppelstranges einzelsträngig vorliegen

Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es grundlegende Beiträge zur Entwicklung eines bakteriellen Modellsystems zu leisten, mit dessen Hilfe die ökologischen Faktoren experimentell untersucht werden sollen, welche ursächlich für die evolutionäre Entstehung mutualistischer Interaktionen sind. Das geplante Modellsystem basiert auf zwei Aminosäure-auxotrophen Bakterienstämmen (Modellorganismen), die die für das Wachstum des jeweils anderen Partners benötigte Aminosäure als Stoffwechselnebenprodukt ausscheiden.

Im Rahmen dieser übergeordneten Fragestellung sollten zunächst. in *Escherichia coli* essentielle Aminosäurebiosynthese-Gene identifiziert werden, deren Essentialität dann in entsprechenden Deletionsmutanten überprüft werden sollte. Schließlich sollte die Eignung der so charakterisierten Stämme als Aminosäurebiosensoren zur Quantifizierung der entsprechenden Aminosäuren über deren Wachstum verifiziert werden. Hierzu war es notwendig eine geeignete Markierungsstrategie zu entwickeln die es erlaubt auch geringe Zelldichten reproduzierbar zu quantifizieren.

Die Gene, die bei der *in silico* Analyse des *E. coli* Metabolismus als essentielle Aminosäurebiosynthesene identifiziert wurden sind *argH*, *hisD*, *leuB* und *proC*. Die so vorhergesagte Auxotrophie konnte in entsprechenden Experimenten mit den jeweiligen *E. coli*-Deletionsmutanten nachgewiesen werden. Die entwickelte Markierungsstrategie basierte auf der Tn7-vermittelten Insertion von Fluoreszenzprotein-kodierenden Genen unter der Kontrolle des Plac-ähnlichen Promotors $P_{A1/04/03}$ ins bakterielle Chromosom. Mit dieser Methode war es möglich die Aminosäurebiosensoren für Arginin, Histidin und Leucin mit mCerulean, einem cyan fluoreszierenden Protein, zu markieren. Mit diesen Biosensoren wurde die jeweilige Aminosäure, die die Modellorganismen ins Medium abgegeben haben, quantifiziert.

Die mit den Biosensoren ermittelten Aminosäurekonzentrationen schwankten in Abhängigkeit vom jeweiligen Biosensor unterschiedlich stark. Die Aminosäurekonzentrationen wurden zum Vergleich mit einer HPLC-Methode gemessen. Der Vergleich beider Werte ergab, dass die mittlere Abweichung des Histidin-sensitiven Biosensors um $-0,17 \mu\text{M}$ des Arginin-sensitiven Biosensors um $-1,15 \mu\text{M}$ und des Leucin-sensitiven Biosensors um $-12,1 \mu\text{M}$ vom ermittelten HPLC abwich.

Bisher wurden noch keine Aminosäurebiosensoren für die Aminosäuren Arginin, Histidin und Leucin entwickelt, zudem wurde mCerulean bisher noch nicht als quantifizierbarer Marker in Biosensoren verwendet. Damit stellt diese Diplomarbeit den ersten Versuch dar, Aminosäuren in Überständen von Bakterien mit diesen Biosensoren zu quantifizieren.

1 Einleitung

1.1 Interspezifische Interaktionen

Arten, die sich einen Lebensraum, wie beispielsweise eine Wiese, einen See oder einen Wald teilen interagieren in vielfältiger Art und Weise miteinander. Klassischerweise werden die daraus resultierenden Interaktionen hinsichtlich ihres Effektes auf die Fitness der beiden beteiligten Partner unterschieden: dieser kann positiv, negativ oder neutral sein. Neben antagonistischen Interaktionen (Prädation, Konkurrenz, Amensalismus), bei denen mindestens ein Partner einen Fitnessnachteil hat, wird bei neutralistischen Interaktionen die Fitness beider Partner nicht beeinflusst (Tabelle 1-1). Daneben gibt es kommensalistische bzw. mutualistische Interaktionen (Tabelle 1-1), bei denen mindestens ein Partner einen Fitnessvorteil aus der Interaktion bezieht. Oft ist die jeweilige Ausprägung einer Interaktion zwischen zwei bestimmten Arten nicht konstant, sondern ändert sich in Abhängigkeit der jeweiligen Umweltbedingungen (Thompson und Cunningham 2002). Zum Beispiel können Putzerfische, die sich von Ektoparasiten (Parasiten, die auf dem Wirt leben) des Riffbarsches, ernähren selbst zu Ektoparasiten werden, wenn sich nicht genügend Nahrung auf ihrem Wirt befindet (Cheney und Cote 2005). Deshalb wird der langfristige Effekt beider Arten aufeinander bewertet (Tabelle 1-1).

In der vorliegenden Arbeit sind mutualistische Interaktionen und deren Evolution von Bedeutung, auf die in den nachfolgenden Abschnitten eingegangen wird.

Tabelle 1-1: Schematische Einteilung interspezifischer Interaktionen.

Interspezifische Interaktionen werden aufgrund langfristiger Effekte zweier Arten aufeinander bewertet. Die Effekte können positiv (+), negativ (-) oder neutral (0) sein und wirken sich dementsprechend auf Fitness, Wachstum, Fortpflanzung oder Überleben aus (Bronstein 1994).

		Effekt von Art 2 auf Art 1		
		Positiv (+)	Neutral (0)	Negativ (-)
Effekt von Art 1 auf Art 2	Positiv (+)	Mutualismus (+/+)	Kommensalismus (+/0)	Räuber-Beute/ Parasitismus (+/-)
	Neutral (0)		Neutralismus (0/0)	Amensalismus (0/-)
	Negativ (-)			Konkurrenz (-/-)

1.2 Mutualismus

Der Begriff „Mutualismus“ wird generell dazu verwendet, das kooperative Verhalten zwischen zwei Arten zu beschreiben, aus dem beide Partner einen Vorteil erhalten. West *et al.* (2007) bezeichnen dieses Verhalten als „*mutual benefit*“, was so viel heißt wie „zu beidseitigem Nutzen“. Eine solche Interaktion kann zum einen auf dem Austausch von Ressourcen (z.B. wechselseitige Ernährung) als auch auf dem Gewähren von Dienstleistungen (z.B. Bestäubung, Samenverbreitung, Schutz und Verteidigung) beruhen (Smith und Smith 2009).

Im deutschen Sprachraum ist in diesem Zusammenhang der Begriff „Symbiose“ gebräuchlicher. Im englischsprachigen Raum hingegen wird unter Symbiose (griech.: *syn/sym*, zusammen; *bios*, Leben) das allgemeine Zusammenleben zweier oder mehrerer Arten verstanden, wobei dieser Begriff neben mutualistischen auch parasitische, kommensalistische oder andere ökologische Interaktionen mit einbezieht. Für diese Arbeit soll der Begriff Mutualismus als die Form von interspezifischen Interaktionen definiert werden, aus der beide interagierenden Partner einen Vorteil beziehen.

Mutualistische Interaktionen sind von großer ökologischer Bedeutung und in jedem Ökosystem der Erde zu finden. Wie wichtig sie in der Pflanzenwelt sind, zeigt sich am Beispiel der Mykorrhiza, einem Mutualismus im Bereich der Rhizosphäre (Bodenschicht, die vom Wurzelsystem der Pflanze durchwuchert wird) der Pflanzen. Hier helfen Pilze (u.a. aus der Gattung *Mykorrhizae*) der Pflanze bei der Aufnahme von Nährstoffen wie zum Beispiel Stickstoff und Phosphat und werden im Gegenzug von Ihrer Wirtspflanze mit Kohlenhydraten versorgt (Smith und Smith 2009). Es wird vermutet, dass dieser Mutualismus über 400 Millionen Jahre alt ist und circa 80 % aller Landpflanzenarten in eine solche Interaktion involviert sind. Wahrscheinlich hat diese Interaktion maßgeblich zum evolutionären Erfolg terrestrischer Pflanzenarten beigetragen. Allerdings ist im Vergleich zur Bedeutung mutualistischer Interaktionen in der Natur über deren evolutionäre Entstehung relativ wenig bekannt (Bronstein 1994).

1.3 Evolution mutualistischer Interaktionen

Die Faktoren, die zur Evolution antagonistischen Interaktionen beitragen, wurden bereits intensiv erforscht und werden demzufolge vergleichsweise gut verstanden. Hierbei werden Individuen, die ihre Fitness eigennützig und auf Kosten anderer steigern, von der natürlichen Selektion bevorzugt. Auch mutualistische Interaktionen können durch natürliche Selektion begünstigt sein, allerdings nur, wenn der mutualistische Akt für die

Art selbst von Vorteil ist. Dies trifft zu, wenn der Fitnessgewinn, der aus dieser Interaktion resultiert, größer ist als der Fitnessverlust, der dadurch entsteht, dass Ressourcen in die andere Art investiert werden müssen (Bull und Rice 1991; Sachs *et al.* 2004). Dazu schreibt Darwin 1859 in „On the origin of species“:

“Natural selection will produce nothing in one species for the exclusive good or injury of another; though it may well produce parts, organs, and excretions highly useful or even indispensable, or highly injurious to another species, but in all cases at the same time useful to their owner.”

Wie aber konnten mutualistische Interaktionen diese evolutionäre Hürde überwinden und wie können sie über die Zeit evolutionär stabil bleiben? Jede mutualistische Interaktion kann von Individuen unterbrochen werden, wenn diese nicht mehr in den Partner investieren, aber dennoch den positiven Effekt nutzen dessen Nutzen (Sachs *et al.* 2004). Diese Individuen, werden allgemein als „cheater“ bezeichnet (engl. to cheat = betrügen).

Das Ziel der Arbeitsgruppe „Experimental ecology and evolution“ um Dr. Kost ist es, experimentell zu untersuchen, unter welchen in der Literatur beschriebenen evolutionären Mechanismen Mutualismen entstehen können und welche Mechanismen dazu geeignet sind, eine einmal entstandene mutualistische Interaktion zu stabilisieren. Die hierzu in Frage kommenden Faktoren sollen experimentell mittels eines bakteriellen Modellsystems überprüft werden.

1.4 Vorteile von Evolutionsexperimenten mit Bakterien

Ein generelles Problem bei der Untersuchung evolutionärer Fragestellungen ist, dass die Beobachtung von Veränderungen in der Natur oft eine sehr große Zeitspanne in Anspruch nimmt. Vor allem aber ist es schwierig, kleine Veränderungen zu beobachten, die nur auf genetischer Ebene auftreten, zu beobachten. Um diese Probleme zu vermeiden, sind einige Arbeitsgruppen dazu übergegangen, bakterielle Modellsysteme zu verwenden, um ökologische und evolutionäre Fragestellungen experimentell zu beantworten. Der Umgang mit Bakterien ist in der Regel unkompliziert und seit langem etabliert. Vorteilhaft bei dieser Herangehensweise ist, dass die Umweltbedingungen vollständig kontrollierbar sind und konstant gehalten werden können. Des Weiteren eignen sich Bakterien aufgrund ihrer kurzen Generationszeit besonders gut für Evolutionsexperimente, die ohne Probleme über mehrere tausend Generationen betrieben werden können (Barrick *et al.* 2009). Somit haben auch Mutationen, die lediglich einen sehr kleinen Fitnessvorteil ausmachen, genug Zeit, sich in einer Population zu etablieren. Diese können anschließend durch

Sequenzierung des Genomes der evolvierten Stämme identifiziert werden (Elena und Lenski 2003). Ein weiterer Vorteil ist, dass zu jedem Zeitpunkt ein Teil der Population eingefroren werden kann, um ihn zu einem späteren Zeitpunkt wiederzubeleben. Diese evolvierten Populationen können anschließend mit den isogenen Ausgangsstämmen verglichen werden, um zum Beispiel im Evolutionsexperiment entstandene Fitnessunterschiede zum Gründerstamm detektieren zu können. Aus diesen Gründen sind bakterielle Modellsysteme hervorragend dazu geeignet, um die in der Literatur beschriebenen Mechanismen zur Entstehung und Aufrechterhaltung mutualistischer Interaktionen experimentell zu untersuchen.

1.5 Das mutualistische Modellsystem

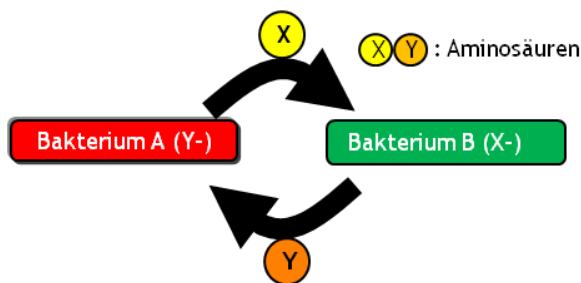


Abbildung 1-1: Mutualistisches Modellsystem.

Dieses Modellsystem beruht auf dem Austausch von Aminosäuren. Bakterium A ist für eine Aminosäure Y auxotroph und gibt eine Aminosäure X ins Medium ab, für welche das Bakterium B auxotroph ist. Bakterium B scheidet im Gegenzug die Aminosäure Y aus, welche Bakterium A für dessen Wachstum benötigt.

Aminosäure Y ist und Bakterium B auxotroph für eine Aminosäure X. Beide Bakterien haben zusätzlich die Fähigkeit, die Aminosäure (AS) zu produzieren, zu deren Synthese der jeweils andere Stamm nicht mehr in der Lage ist (Abbildung 1-1). Die Aminosäuren, die die beiden Partner produzieren und ins Medium abgeben, sind Stoffwechselnebenprodukte („by-products“), welche beim Wachstum der Zellen anfallen (Kramer 1994).

Die in diesem Modellsystem verwendeten Bakterien werden als Modellorganismen bezeichnet (Tabelle 1-2). Sie wurden ausgewählt, da ihre Genome vollständig sequenziert und sie biochemisch sowie genetisch sehr gut charakterisiert sind. Zudem ist von diesen Bakterien bekannt, dass sie Aminosäuren ausscheiden (Tempest und Neijssel 1992; Gonzalezlopez *et al.* 1995) (Holger Merker, unpublizierte Daten).

Tabelle 1-2: Modellorganismen und deren Eigenschaften.

Stammbezeichnung	gram	Genomgröße (Mbp)	Habitat
<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1	(-)	3,6	Darm
<i>Azospirillum</i> <i>brasiliense</i> SP245	(-)	7,1	Boden
<i>Bacillus subtilis</i> 168	(+)	4,2	Boden
<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i> PF01	(-)	7,1	Blattoberfläche
<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i> PF5	(-)	7,1	Blattoberfläche
<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i> SBW25	(-)	7,1	Blattoberfläche
<i>Pseudomonas putida</i> F1	(-)	6,2	Boden

Dieses System ist allerdings noch unvollständig, da die verwendeten Modellorganismen in der Lage sind, alle 20 proteinogenen Aminosäuren selbständig zu synthetisieren. Ziel der Arbeit war es daher zunächst, Gene zu identifizieren, deren Deletion eine Aminosäureauxotrophie in den jeweiligen Stämmen hervorruft. Weiterhin sollten die Bakterien mit einem phänotypischen Marker versehen werden, um diese in den anschließend geplanten Evolutions- und Fitnessexperimenten differenzieren zu können. Schließlich sollten die von den Modellorganismen in das Medium abgegebenen Aminosäuren auf deren Bioverfügbarkeit überprüft und durch Aminosäure-auxotrophe Biosensoren quantifiziert werden. In den folgenden Abschnitten werden diese drei Fragestellungen im Detail vorgestellt.

1.6 Aminosäuremetabolismus

Das geplante mutualistische Modellsystem beruht auf dem Austausch essentieller Aminosäuren (Abschnitt 1.5). Hierzu müssen die verwendeten Modellorganismen für die jeweilige Aminosäure auxotroph sein, die der entsprechende Partner produziert. Um dies zu erreichen ist es notwendig, essentielle Gene im Aminosäuremetabolismus per Deletion zu deaktivieren.

Die Wildtypstämme der verwendeten Mikroorganismen sind dazu in der Lage, alle 20 für die Proteinbiosynthese benötigten Aminosäuren *de novo* zu synthetisieren. Die grundlegende Stickstoffquelle der Aminosäurebiosynthese bildet dabei das Ammoniumion, welches durch die Enzyme Glutamin-Synthetase und Glutamatdehydrogenase auf die Aminosäuren Glutamin und Glutamat übertragen wird und damit in den Aminosäure-

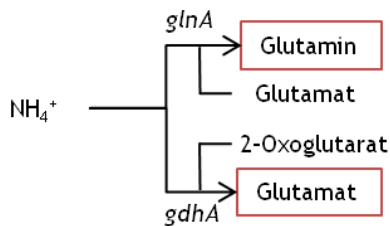


Abbildung 1-2: Eintritt des Ammoniums in den Glutamin-Glutamat-Stoffwechsel.

glnA (Glutamin-Synthetase) und *gdhA* (Glutamatdehydrogenase) katalysieren die Reaktionen, bei der ein Ammonium Ion mit Glutamat oder 2-Oxoglutarat zu Glutamin oder Glutamat umgesetzt wird. (Schlegel 1992).

Metabolismus eintreten (Schlegel 1992) (Abbildung 1-2). Diese beiden Aminosäuren stellen die Stickstoffquelle für alle weiteren Aminosäuren dar. Die Aminogruppe wird dabei über eine Transaminierungsreaktion, die durch Transaminasen und Aminotransferasen katalysiert werden, übertragen (Schlegel 1992). Die Kohlenstoffgerüste der Aminosäuren hingegen leiten sich aus Zwischenprodukten des Citrat-Zyklus, dem Pentosephosphatweg oder der Glykolyse ab. Je nachdem aus welchen Vorstufen die Aminosäuren hervorgehen, lassen sie sich in sechs verschiedene Gruppen einteilen (Tabelle 1-3).

Tabelle 1-3: Gruppierung aller 20 proteinogenen Aminosäuren nach ihren metabolischen Vorstufen.

α -Ketoglutarat	3-Phosphoglycerat	Oxalacetat	Pyruvat	Phosphoenolpyruvat und erythrose 4-phosphat	Ribose 5-Phosphat
Glutamat	Serin	Asparat	Alanin	Tryptophan	Histidin
Glutamin	Glycin	Asparagin	Valin	Phenylalanin	
Prolin	Cystein	Methionin	Leucin	Tyrosin	
Arginin		Lysin	Isoleucin		
		Threonin			
		Isoleucin			

Durch Ausschalten bestimmter Gene im Syntheseweg der Aminosäuren kann es vorkommen, dass der Organismus nicht mehr dazu in der Lage ist, die jeweilige Aminosäure selbstständig zu synthetisieren - es kann sich also eine Auxotrophie der entsprechenden Aminosäure einstellen. Organismen mit einer solchen Aminosäureauxotrophie müssen die entsprechende Aminosäure aus der Umgebung aufnehmen um wachsen zu können, d.h. die Aminosäure ist essentiell für den Organismus geworden. Dies sollte auch in den Modellorganismen (Tabelle 1-2) erreicht werden.

Eine Möglichkeit, schnell und effizient essentielle Aminosäurebiosynthesegene zu identifizieren, ist die Verwendung bereits verfügbarer Deletionsmutanten wie z.B. der „*Keio collection*“. Die „*Keio collection*“ bezeichnet eine Sammlung von *E. coli*-Mutanten, in denen systematisch jedes Gen „*in frame*“ durch homologe Rekombination mit einer Kanamycin-Resistenz ausgetauscht wurde (Baba *et al.* 2006). Ausgehend von *E. coli* BW25113 wurden so insgesamt 3985 Deletionsmutanten generiert. Somit stellt die „*Keio collection*“ das optimale Werkzeug dar, um essentielle Aminosäurebiosynthesegene rasch zu identifizieren, ohne selbst die entsprechenden Deletionsmutanten generieren zu müssen.

Mit Hilfe der „*Keio collection*“-Mutanten, in denen Gene des Aminosäuremetabolismus ausgeschaltet sind, sollten durch geeignete Experimente die

Mutanten und damit auch die Gene identifiziert werden, die bei Deletion eine Aminosäureauxotrophie verursachen. Die so identifizierten Gene sollen dann in den zuvor genannten Modellorganismen (Tabelle 1-2) via homologer Rekombination mit einem Deletionsfragment deletiert werden, um dort die gleiche Auxotrophie zu erzeugen. Dies wird durch den Umstand ermöglicht, dass die in den Aminosäuremetabolismus involvierten Gene innerhalb der Prokaryonten relativ konserviert sind.

1.7 Markierungsstrategie

Da in den zukünftigen Evolutionsexperimenten mit verschiedenen Arten von Bakterien gearbeitet wird und diese anhand ihrer Koloniemorphologie nicht oder nur unzureichend unterschieden werden können, sollte eine Markierungsstrategie entwickelt werden, die es erlaubt, die verwendeten Bakterienstämme zuverlässig voneinander zu unterscheiden. Weiterhin ist es notwendig, jeden der verwendeten Modellorganismen mit mindestens zwei unterschiedlichen Markern zu markieren, um so in Fitnessexperimenten Unterschiede zwischen dem isogenen Ausgangsstamm und dem jeweils evolvierten Stamm ermitteln zu können.

Prinzipiell können die zur Auswahl stehenden Markierungsmethoden in zwei Kategorien unterteilt werden. In der ersten werden die Bakterien mit einem selektierbaren und in der zweiten mit einem nicht-selektierbaren, phänotypischen Marker genetisch modifiziert.

1.7.1 Selektierbare Marker

Bei der ersten Methode werden die beiden zu markierenden Bakterienstämme genetisch so verändert, dass nach Ausplattieren einer gemischten Bakteriensuspension auf zwei selektiven Agarplatten nur jeweils eine Bakterienart aufgrund der genetischen Modifikation wachsen kann. Somit können die beiden Bakterienarten getrennt voneinander ausgezählt werden. Hierbei können die Bakterien zum Beispiel verschiedene Antibiotikaresistenzen tragen (Leclercq und Courvalin 1991; Frere 1995; Davies und Wright 1997; Chopra und Roberts 2001). Es können aber auch zwei verschiedene Gene, wie z.B. *thy* und *thi-1* im Metabolismus der Bakterien ausgeschaltet werden, die jeweils eine Thymidin- und Thiamin-Auxotrophie erzeugen.

1.7.2 Phänotypische Marker

Eine Alternative zu den selektierbaren Markern sind phänotypische Marker. Hierbei werden Bakterien mit einem phänotypischen Markergen wie z.B. dem *lux*-Operon (King *et al.* 1990), dem *lacZ*-Gen (Tuffnell und Payne 1985) oder dem „green fluorescent protein“ (GFP) und seinen Derivaten markiert (Chalfie *et al.* 1994; Tsien 1998; Shaner *et al.* 2004; Shaner *et al.* 2005). Das *lux* Operon ist ein phänotypischer Marker, der u.a. für das Enzym Luciferase kodiert. In Anwesenheit von Luftsauerstoff oxidiert die Luciferase Luciferin, bei dieser Reaktion kommt es zu einer Lichtemission (Biolumineszenz) (Greer und Szalay 2002). Ausgestrichen auf einer Agarplatte heben sich die schwach leuchtenden, *lux*-markierten Bakterien von nicht-markierten Bakterien ab. Mit Hilfe eines Luminometers können die markierten Bakterien auch in einer Flüssigkultur quantifiziert werden.

Eine ähnliche Methode ist die in der Mikrobiologie weit verbreitete „Blau-Weiß-Selektion“, bei der ein gewünschter Bakterienstamm mit einem *lacZ*-Gen markiert wird, welches für eine β -Galactosidase kodiert. Die *lacZ*-markierten Zellen erscheinen auf Agarplatten in Anwesenheit von X-Gal blau und sind so gut von unmarkierten Zellen unterscheidbar.

Weitere phänotypische Marker sind Fluoreszenzproteine, die im folgenden Abschnitt näher erläutert werden.

1.7.2.1 Fluoreszenzproteine

Diese Proteine fluoreszieren, nachdem sie mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt worden sind. Die so entstehende Fluoreszenz zeigt ein für jedes Protein

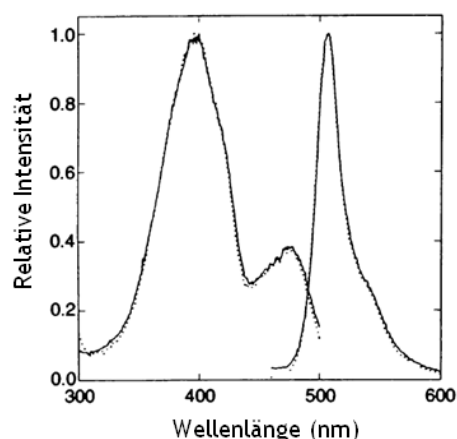


Abbildung 1-3: Anregungs und Emmissionsspektren des natürlichen GFP.

Das globale Anregungsmaximum liegt bei 395 nm wobei ein weiteres lokales Maximum bei 488 nm zu finden ist. Das einzige Emmissionsmaximum ist bei 508 nm lokalisiert (Chalfie *et al.* 1994).

charakteristisches Emissionsspektrum. Das erste isolierte Fluoreszenzprotein war das *green fluorescent protein* (GFP). Es stammt aus der Quallenart *Aequorea victoria*, die im pazifischen Ozean beheimatet ist und wurde 1961 durch Osamu Shimomura entdeckt (Shimomura *et al.* 1962). Das GFP befindet sich in Form feiner Partikel in den Leuchtorganen am äußeren Rand des Medusenschirmes (Shimomura *et al.* 1962). In diesen sogenannten Granula wirkt neben GFP ein zweites Protein, das sogenannte Aequorin (Shimomura und Johnson 1969). Aequorin emittiert ein blaues Licht, das durch Kalziumbindung initiiert wird (Shimomura und Johnson 1970). Dieses blaue

Licht wird durch GFP in grünes Licht umgewandelt (Tsien 1998). GFP ist ein 238 Aminosäuren langes, 27 kDa schweres Protein (Prasher *et al.* 1992). Im Inneren einer von 11 β -Faltblättern geformten „Rolle“ befindet sich das Fluorophor (Yang *et al.* 1996), welches sich aus einer Tripeptidsequenz Ser65-Tyr66-Gly67 (Cody *et al.* 1993) unter Anwesenheit von Sauerstoff formt. Dazu werden keine weiteren spezifischen Substrate oder posttranslationalen Kofaktoren der Qualle benötigt (Chalfie *et al.* 1994; Inouye und Tsuji 1994; Kahn *et al.* 1997). In seiner natürlichen Form besitzt GFP zwei Anregungsmaxima: ein lokales Maximum bei einer Wellenlängen von 475 nm und ein globales Maximum bei 395 nm. Das emittierte Licht zeigt ein Emissionsmaximum bei 508 nm (Tsien 1998) (Abbildung 1-3). Durch eine Vielzahl von Mutationen, die gezielt („*site directed Mutagenesis*“) und zufällig („*random Mutagenesis*“) auf DNA-Ebene eingefügt wurden, konnten die Eigenschaften des GFP bezüglich Faltung, Leuchtintensität, Emissionsmaxima und -intensität, Kodonnutzung, Faltungsgeschwindigkeit, Löslichkeit, Halbwertszeit und Temperaturoptima optimiert werden (Heim *et al.* 1994; Cubitt *et al.* 1995; Heim *et al.* 1995; Cramer *et al.* 1996; Siemering *et al.* 1996; Tsien 1998). Des Weiteren konnten durch Mutationen im Fluorophor des GFPs blau, cyan und gelb fluoreszierende Proteine entwickelt werden (Tsien 1998). Allerdings gelang es mit dieser Herangehensweise nicht, ein Protein zu generieren, welches ein Emissionsmaximum von mehr als 529 nm besaß (Tsien 1998; Baird *et al.* 2000). 1999 gelang es Matz und Kollegen aus Riff-Korallen (*Discosoma sp.*) sechs GFP-ähnliche Proteine zu isolieren (Matz *et al.* 1999), die eine Sequenzhomologie von 26-30 % zu GFP zeigten. Unter den neu isolierten Fluoreszenzproteinen befand sich auch ein GFP-ähnliches Protein, welches ein Emissionsmaximum von 583 nm aufwies: das sogenannte „*DsRed*“. Ausgehend von diesem wurden fluoreszierende Proteine entwickelt, deren Emissionsmaximum im orangen, roten oder infraroten Bereich liegen.

1.7.3 Transposons

Bei der Markierung der Bakterien sollte sich das Markergen nicht auf einem Plasmid befinden, sondern ins bakterielle Chromosom eingefügt werden, um einem möglichen Verlust des Plasmids vorzubeugen. Zudem ist durch die chromosomale Lokalisation des Markergenes eine Uniformität der Expression gewährleistet und nicht von der Kopienzahl des Plasmids abhängig. Die Integration in das Chromosom kann u.a. mit Hilfe eines Transposons erreicht werden.

Transposons sind mobile DNA-Elemente, die nahezu in allen Organismen vorkommen. Diese DNA-Elemente können sich frei innerhalb der DNA einer Zelle bewegen, ohne auf homologe DNA-Sequenzen angewiesen zu sein (Peters und Craig 2001). Mobile

genetische Elemente in Bakterien lassen sich in drei Klassen unterteilen: die „*Insertion Sequences*“ (IS)-Elemente (Abbildung 1-4), Transposons und Bakteriophagen, die sich über den Weg der Transposition vermehren (Kleckner 1981). Transposons wiederum werden je nach Aufbau in zusammengesetzte und komplexe Transposons unterschieden (Abbildung 1-4). Erstere (z.B.: Tn5, Tn9, Tn10) werden von IS-Elementen (IS50, IS1, IS10) flankiert, von denen üblicherweise nur ein IS-Element an dem Transpositionsvorgang beteiligt ist.

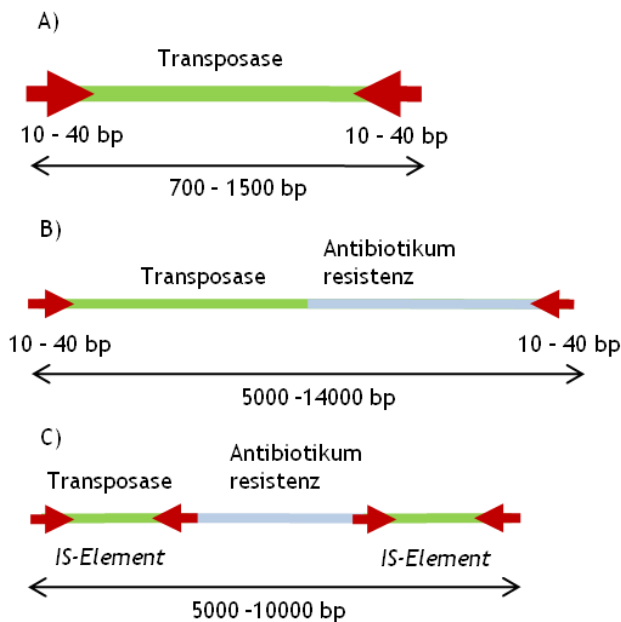


Abbildung 1-4: Transponierbare Elemente.

„*Insertions Sequence*“ (IS) Elemente bestehen aus einem 700 - 1500 Basenpaar langem DNA-Segment (kodiert für eine Transposase), das von 10 - 40 Basenpaar langen, terminalen gegenläufigen Endsequenzen flankiert wird (A). Das Komplexe Transposon ist identisch aufgebaut wie ein IS-Element. Das DNA-Segment kodiert für mehrere Proteine, neben der Transposase können zusätzlich Resistenzgene kodiert werden (B). Das Zusammengesetzte Transposon ist ein DNA-Segment, welches von IS-Elementen flankiert wird. Diese bewegen sich mit der von ihnen eingerahmten DNA, dabei zeigt nur ein IS-Element eine Transposase-Aktivität. Das DNA-Segment kodiert dabei oft für eine Antibiotika- oder Toxin-Resistenz. Quelle: www.mun.ca

Komplexe Transposons (z.B.: Tn7, Tn3, Tn501) sind von gegenläufigen Sequenzwiederholungen an beiden Enden flankiert. Die Transpositionsproteine werden hier im zentralen Bereich kodiert (Knippers 2006).

Die meisten Transposons integrieren unspezifisch (d.h. zufällig) in das Genom des Wirtes. Im Gegensatz dazu inseriert das Tn7-Transposon mit hoher Wahrscheinlichkeit in eine bestimmte Stelle im Chromosom, die als *attTn7* bezeichnet wird. Dieser *attTn7* Locus ist in vielen Bakterienarten konserviert und enthält kein funktionelles Gen. Aus diesem Grunde ist es möglich, ein breites Artenspektrum an Bakterien mittels Tn7-Transposition zu modifizieren (Kuduvalli *et al.* 2005).

1.7.4 Tn7 Transposon

1976 wurde das Tn7-Transposon von Barth und Mitarbeitern auf dem Plasmid R483 als ein Element entdeckt, welches Resistenzgene für Trimethoprim und Streptomycin trägt (Barth *et al.* 1976). Das entsprechende Transposon ist 14 kb groß, beinhaltet fünf Gene, die in den Transpositionsprozess involviert sind, sowie die zwei oben genannten Resistenzgene. Diese insgesamt sieben Gene werden am 3'-Ende von Tn7-L und am 5'-Ende von Tn7-R, den

beiden Enden des Transposons, flankiert (Barth *et al.* 1976; Lichtenstein und Brenner 1982; Rogers *et al.* 1986). Jeder endständige Abschnitt enthält Wiederholungen einer 22 Basenpaar langen Erkennungssequenz, an die die Transposase bindet. Das Tn7-

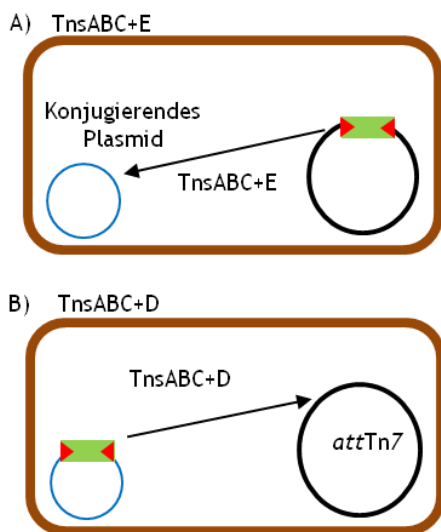


Abbildung 1-5: Tn7 Transpositionswege.

Es sind Schematisch dargestellt: Bakterienzellen (braun), Kojugierendes Plasmid (blauer Ring) Bakteriellles Chromosom (schwarzer Ring). TnsABC+E Proteinkomplex vermittelt die Transposition in konjugierende Plasmide (A). TnsABC+D vermittelt die Transposition in die chromosomal spezifische Seite *attTn7* (B). (Peters und Craig 2001)

Transposon kodiert für die fünf Strukturgene *tnsABCDE*, wobei *tnsA+B* die Enden des Transposons erkennt und dieses dort durch Doppelstrangbrüche aus dem Chromosom herauschneidet. Zudem sind diese beiden Gene für das darauffolgende Einfügen der DNA in das Chromosom bzw. das konjugierende Plasmid verantwortlich (Sarnovsky *et al.* 1996). TnsC ist ein Regulatorprotein, welches an den TnsAB-Komplex bindet und ATP-abhängig unspezifisch DNA bindet (Bainton *et al.* 1993). Der TnsABC-Komplex wird auch als Kernkomplex bezeichnet, da er die wichtigsten Proteine für eine Transposition trägt. TnsD und TnsE werden als „*alternative target selectors*“ bezeichnet, sie bestimmen, an welcher Stelle die DNA eingebaut wird (Abbildung 1-5)(Peters und Craig 2001).

Hierbei fungiert TnsD als das Protein, welches für die chromosomale Integration verantwortlich ist. TnsE hingegen zeigt eine Präferenz für die Integration in konjugierende Plasmide. Gleichzeitig wirken TnsD und TnsE aber auch als Aktivatoren der ganzen Maschinerie, d.h. ohne sie erfolgt keine Rekombination (Waddell und Craig 1988). Für die Integration der DNA ins Chromosom ist hauptsächlich das *TnsD*-Genprodukt verantwortlich. Der TnsABCD-Komplex inseriert an eine bestimmte Stelle im Genom, die als *attTn7* bezeichnet wird. Dabei ist TnsD das Protein, welches die DNA spezifisch erkennt und an diese bindet (Bainton *et al.* 1993). Die *attTn7*-Seite liegt am 3'-Ende des essentiellen Gens *glmS*, welches für eine Glucosamin-Synthetase kodiert und in die Biosynthese der Zellwandsynthese involviert ist.(Bainton *et al.* 1993).

1.8 *E. coli* als Aminosäurebiosensor

Die Abgabe von Aminosäuren ins Kulturmedium wird mittels eines chemisch-analytischen Verfahrens detektiert. Da diese Methode allerdings nur die Menge der ins Medium abgegebenen Aminosäure misst und keine Aussage über die Bioverfügbarkeit zulässt, sollte zusätzlich die Menge an bioverfügbaren Aminosäuren bestimmt werden. Ausgehend von

den Mutanten der „*Keio collection*“, die Deletionen in essentiellen Genen des Aminosäuremetabolismus aufweisen (Abschnitt 1.6), sollten unter Verwendung der zuvor beschriebenen Methoden (Abschnitt 1.7) fluoreszenzmarkierte Aminosäurebiosensoren entwickelt werden.

Ein Biosensor ist ein Messgerät oder ein System, in dem eine biologische Komponente als Messfühler benutzt wird (Bousse 1996). Biosensoren können prinzipiell in vier hierarchisch angeordnete Ebenen unterteilt werden, bei denen nach der Komplexität des biologischen Messfühlers unterschieden wird. An oberster Stelle stehen Makromoleküle wie Enzyme und Antikörper, danach folgen „*Lipid bilayer*“ und Liposomen. Ganze Zellen nehmen die dritte Ebene ein, gefolgt von vollständigen Organen oder Geweben (Bousse *et al.* 1994). In dieser Arbeit wurden ausschließlich Bakterienzellen (*E. coli*) als Biosensoren verwendet. Mikrobielle Biosensoren werden vor allem in der Umweltbiotechnologie eingesetzt (Chalova *et al.* 2009), um z.B. die Aufnahme und Biodegradation von Naphthalin (King *et al.* 1990) zu quantifizieren, die Bioverfügbarkeit von Quecksilber zu messen oder die Konzentration von Arsenit und Antimonit in bestimmten Proben zu analysieren (Ramanathan *et al.* 1997).

Die Aminosäurequantifizierung mit mikrobiellen Biosensoren ist einfach, relativ exakt und kostengünstig (Chalova *et al.* 2009). Die hierzu eingesetzten Bakterien sollten dabei ausschließlich in Anwesenheit der gewünschten Aminosäure wachsen und keine anderen Substanzen in die entsprechende Aminosäure umwandeln können. Hierbei sollte das Wachstum des Biosensors mit der Konzentration der jeweiligen Aminosäure korrelieren. Neben *E. coli* werden zum Beispiel auch *Streptococcus faecalis*, *Leuconostoc mesenteroides* (Blackmore und Parry 1972) und andere Mikroorganismen eingesetzt, um Aminosäuren auf diesem Weg zu quantifizieren (Chalova *et al.* 2009). Allerdings benötigen die meisten Mikroorganismen lange Kultivierungszeiten, komplexe Minimalmedien sowie oftmals mehr als eine Aminosäure um wachsen zu können. Im Gegensatz dazu zeichnet sich *E. coli* durch eine kurze Generationszeit (d.h. 20 min bei 37°C (Ingraham *et al.* 1983)) sowie Wachstum auch in einfachen Minimalmedien aus. *E. coli*-Mutanten wurden bereits zur Quantifizierung der Bioverfügbarkeit der Aminosäuren Cystein, Glutamin, Methionin, Lysin, Threonin und Tryptophan verwendet (Chalova *et al.* 2009).

Um das Wachstum der Biosensoren in Abhängigkeit der jeweiligen Aminosäure zu bestimmen, gibt es neben konventionellen Methoden wie der Bestimmung der optischen Dichte auch die sogenannte β -Galactosidase-Methode. Bei dieser Methode wird die β -Galactosidase-Aktivität bestimmt und mit der vorhandenen Aminosäurekonzentration im Medium verglichen (Putnam und Koch 1975). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, *E. coli* mit einem Markergen zu modifizieren. Die beiden häufigsten Markergene sind das GFP und das *lux*-Operon (siehe 1.7). Hierbei nimmt mit steigender Aminosäurekonzentration die

Fluoreszenz oder die Lichtemission zu. Mit so modifizierten Biosensoren wurde bisher hauptsächlich die Bioverfügbarkeit von Aminosäuren in Tiernahrung untersucht (Froelich und Ricke 2005; Chalova *et al.* 2009).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, *E. coli* Aminosäurebiosensoren zu entwickeln. Hierzu sollten zunächst Gene identifiziert werden, deren Deletion eine Aminosäure auxotrophie hervorruft. Zur Quantifizierung der entsprechenden Zellen sollte ferner eine Möglichkeit erarbeitet werden, die entsprechenden *E. coli*-Zellen mit einem fluoreszenten Markergen chromosomal zu markieren.

1.9 Zielstellungen

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, notwendige Voraussetzungen für die Entwicklung eines mikrobiellen Modellsystems zu schaffen, anhand dessen Theorien zur Entstehung und Aufrechterhaltung mutualistischer Interaktionen empirisch überprüft werden können. Das geplante Modellsystem basiert dabei auf einer wechselseitigen Abhängigkeit zweier aminosäure-auxotropher Bakterienstämme. Dabei scheidet jeder der beiden Bakterienstämme eine Aminosäure aus, für die der entsprechende Partner auxotroph ist. Die folgenden Aufgabestellungen sollten in der vorliegenden Arbeit bearbeitet werden:

1. Unter Verwendung von *in silico*-Methoden sollten Gene des bakteriellen Aminosäuremetabolismus identifiziert werden, deren Deletion eine Aminosäureauxotrophie hervorruft. Diese theoretisch gewonnenen Ergebnisse sollten mit Hilfe von Mutanten aus der „*Keio collection*“ verifiziert werden.
2. Es sollte eine geeignete Markierungsstrategie entwickelt werden, die es erlaubt, verschiedene Bakterienstämme mit Fluoreszenzproteinen zu markieren. Hierzu sollten die entsprechend kodierenden Gene unter die Kontrolle eines geeigneten Promotors gebracht und in das mini-Tn7 Transpositionsplasmid pGRG36 kloniert werden, um damit *E. coli*-Zellen chromosomal zu markieren. Abschließend sollte die Emission verschiedener in *E. coli* eingebrachter Fluoreszenzproteine miteinander verglichen werden.
3. Ein weiteres Ziel war die Entwicklung fluoreszierender Aminosäurebiosensoren basierend auf als auxotroph identifizierter Mutanten der „*Keio collection*“ (# 1) die mit einem fluoreszierenden Marker chromosomal markiert sind (# 2). Ferner sollte die Verwendbarkeit der so entwickelten Biosensoren für die Messung der

Bioverfügbarkeit der durch die Modellorganismen ausgeschiedenen Aminosäuren überprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Plasmide und Bakterien

Die in den folgenden Tabellen aufgeführten Plasmide und Bakterien wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

Tabelle 2-1: Übersicht über die verwendeten und im Laufe der Arbeit generierten Plasmide.

Plasmid	Charakteristika	Referenz
pGRG36	mini Tn7-Transpositionsplasmid	McKenzie und Craig (2006)
pJBA24	Amp ^r ; pUC18NotI-P _{A1/04/03} -RBSII-T0-T1	Andersen <i>et al.</i> (1998)
pBad-EBFP2	Amp ^r ; EBFP2	Ai <i>et al.</i> (2007) Addgene Plasmid 20956
pFPV-mcherry	Amp ^r ; mCherry	Drecktrah <i>et al.</i> (2008) Addgene Plasmid 14891
CMV-Brainbow-1.0L	Amp ^r ; mCerulean	Livet <i>et al.</i> (2007) Addgene Plasmid 18721
pJBA24_mcerulean	Amp ^r ; pUC18NotI-P _{A1/04/03} -RBSII-mCerulean-T0-T1	diese Arbeit
pJBA24_mcherry	Amp ^r ; pUC18NotI-P _{A1/04/03} -RBSII-mCherry-T0-T1	diese Arbeit
pJBA24_EBFP2	Amp ^r ; pUC18NotI-P _{A1/04/03} -RBSII-EBFP2-T0-T1	diese Arbeit
pGRG36_Plac_mcerulean	Amp ^r ; pGRG36NotI-P _{A1/04/03} -RBSII_mCerulean_T0-T1	diese Arbeit
pGRG36_Plac_mcherry	Amp ^r ; pGRG36NotI-P _{A1/04/03} -RBSII_mCherry_T0-T1	diese Arbeit
pGRG36_Plac_EBFP2	Amp ^r ; pGRG36NotI-P _{A1/04/03} -RBSII_EBFP2_T0-T1	diese Arbeit

Tabelle 2-2: Übersicht über die verwendeten und genetisch veränderten *E. coli*-Stämme sowie der Modellorganismen.

JW Nummern bezeichnen den Stammmamen und das Gen, dass in BW25113 deletiert wurde (Referenzstamm *E. coli* W3110)

Bakterienstamm	Charakteristika	Referenz
<i>E. coli</i> TopTen	Klonierungswirt	Invitrogen
<i>E. coli</i> BW25113	„Keio collection“ Ausgangsstamm	Datsenko und Wanner (2000)
JW3932	BW25113 ΔargH::Kan ^R	Baba <i>et al.</i> (2006)
JW2002	BW25113 ΔhisD::Kan ^R	Baba <i>et al.</i> (2006)
JW3745	BW25113 ΔilvA::Kan ^R	Baba <i>et al.</i> (2006)
JW5807	BW25113 ΔleuB::Kan ^R	Baba <i>et al.</i> (2006)

JW2806	BW25113 Δ lysA::Kan ^R	Baba <i>et al.</i> (2006)
JW0377	BW25113 Δ proC::Kan ^R	Baba <i>et al.</i> (2006)
JW3841	BW25113 Δ glnA::Kan ^R	Baba <i>et al.</i> (2006)
JW2580	BW25113 Δ pheA::Kan ^R	Baba <i>et al.</i> (2006)
JW1253	BW25113 Δ trpB::Kan ^R	Baba <i>et al.</i> (2006)
JW1254	BW25113 Δ trpC::Kan ^R	Baba <i>et al.</i> (2006)
JW1255	BW25113 Δ trpD::Kan ^R	Baba <i>et al.</i> (2006)
JW1256	BW25113 Δ trpE::Kan ^R	Baba <i>et al.</i> (2006)
JW2581	BW25113 Δ tyrA::Kan ^R	Baba <i>et al.</i> (2006)
JW4014	BW25113 Δ tyrB::Kan ^R	Baba <i>et al.</i> (2006)
JW0336	BW25113 Δ lacI::Kan ^R	Baba <i>et al.</i> (2006)
JW3932_ Δ lacI	BW25113 Δ lacI::KanR, Δ argH	Samay Pande
JW2002_ Δ lacI	BW25113 Δ lacI::KanR, Δ hisD	Samay Pande
JW5807_ Δ lacI	BW25113 Δ lacI::KanR, Δ leuB	Samay Pande
JW0336_attTn7::mcerulean	Insertion der Plac_mcerulean_Kasette in attTn7	diese Arbeit
JW0336_attTn7::mcherry	Insertion der Plac_mcherry_Kasette in attTn7	diese Arbeit
JW0336_attTn7::EBFP2	Insertion der Plac_EBFP2_Kasette in attTn7	diese Arbeit
JW3932_ Δ lacI_attTn7::mcerulean	Insertion der Plac_mcerulean_Kasette in attTn7	diese Arbeit
JW2002_ Δ lacI_attTn7::mcerulean	Insertion der Plac_mcerulean_Kasette in attTn7	diese Arbeit
JW5807_ Δ lacI_attTn7::mcerulean	Insertion der Plac_mcerulean_Kasette in attTn7	diese Arbeit
Modellorganismen	Charakteristika	Herkunft
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp245	Wildtyp	Florence Wisniewski-Dye
<i>Bacillus subtilis</i> DSM10	Wildtyp	Dieter Spiteller
<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1	Wildtyp	Uni Ulm
<i>Pseudomonas fluorescens</i> PF5	Wildtyp	Uni Bonn
<i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW25	Wildtyp	Paul Rainey
<i>Pseudomonas fluorescens</i> PF01	Wildtyp	?
<i>Pseudomonas putida</i> F1	Wildtyp	?

2.1.2 Primer

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon GmbH (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Die Berechnung der mittleren Schmelztemperatur erfolgte nach der modifizierten Breslauer Methode (Breslauer *et al.* 1986).

Tabelle 2-3: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide und deren Eigenschaften.

In der Primersequenz sind die Sequenzmotive der entsprechenden Restriktionsendonukleasen dargestellt (doppelt unterstrichen) und Start- bzw. Stoppkodons der Fluoreszenzprotein-kodierenden Sequenzen (fett gedruckt). T_M : Mittlere Schmelztemperatur der Primer.

Fluoreszenzproteinprimer	Amplifiziertes Fragment	Sequenz (5'-3')	T_M (°C)
EECT up SphI	mCherry, mCerulean, EBFP2	ATATAGCATGCTGAGCAAGGGCGAG <i>Sph I</i>	71,71
EECT down HindIII		CTCTCAAGCTTACTTGTACAGCTCGTCCATG <i>Hind III</i>	72,4
Kontrollprimer	Amplifiziertes Fragment	Sequenz	T_M (°C)
Tn7Plasmid f	Region um <i>NotI</i> Schnittstelle des pGRG-Plasmids	AAAAATCATGGCAATTCTGG	61,7
Tn7Plasmid r		CTGTCAAACATGAGCAGATCC	62,8
<i>attTn7</i> GlmS 1	Region um <i>attTn7</i> Seite des Bakteriums	GATGCTGGTGGCGAAGCTGT	70,2
<i>attTn7</i> GlmS 2		GATGACGGTTTGTACATGGA	66,2

2.1.3 Enzyme

Tabelle 2-4: Übersicht über die verwendeten Enzyme.

Name	Konzentration (U/μl)	Puffer	Inkubations-temperatur	Hersteller
<i>NotI</i> HF	20	NEB4+BSA	37° C	New England Biolabs
<i>SphI</i>	10	NEB2	37° C	New England Biolabs
<i>HindIII</i>	20	NEB2	37° C	New England Biolabs
T4 DNA Ligase	400	T4 DNA-Ligase Reaction Buffer	Raumtemperatur	New England Biolabs
Antarctic Phosphatase	5	Antarctic Phosphatase reaction Bufer	37° C	New England Biolabs
JumpStart™ <i>Taq</i> DNA Polymerase	2,5	PCR Buffer	72° C	Sigma-Aldrich

2.1.4 Medien und Puffer

Transformationspuffer I (TFBI)

12 g/l	RbCl
10 g/l	MnCl ₂ · 4 H ₂ O
30 ml/l	1 M Kaliumacetat pH 7,5
1,6 g/l	CaCl ₂
15 % (v/v)	Glycerin

pH auf 5,8 mit 0,2 M Essigsäure eingestellt, steril-filtriert

Transformationspuffer II (TFBII)

20 ml/l	0,5 M MOPS Puffer; pH 6,8
1,2 g/l	RbCl
11 g/l	CaCl ₂ · 2H ₂ O
15 % (v/v)	Glycerin

steril-filtriert

LB Medium

10 g/l	Trypton
5 g/l	Hefeextrakt
10 g/l	NaCl

gegebenenfalls 15 g/l Kobe Agar

autoklaviert 121 °C 20 min

Minimalmedium *Azospirillum brasilense* (MMAB) (Vanstockem *et al.* 1987)

3 g/l	K ₂ HPO ₄
0,15 g/l	KCl
1 g/l	NaH ₂ PO ₄
1g/l	NH ₄ Cl
50 mg	Na ₂ MoO ₄

Kohlenstoffquelle variierte:

5g/l	Malat (Apfelsäure)
5g/l	Fruktose

pH auf 6,85-7,0 eingestellt, autoklaviert 121 °C 20 min

weiterhin wurde steril hinzugefügt:

5 ml/l	MgSO ₄ (60g/l)
0,5 ml/l	CaCl ₂ (20g/l)
0,25 ml/l	FeSO ₄ -EDTA (12,62 g/l FeSO ₄ ·7H ₂ O; 11,84 g/l EDTA)

SOB Medium

20 g/l	Trypton
5 g/l	Hefeextrakt (Difco)
0,6 g/l	NaCl
0,5 g/l	KCl

autoklaviert 120 °C 20 min

weiterhin wurde steril hinzugefügt:

10 ml/l Magnesiumlösung (203 g/l MgCl₂, 247g/l MgSO₄) autoklaviert 121 °C 20 min

SOC Medium

entspricht SOB Medium mit 20 ml/l einer sterilen 1 M Glukoselösung.

6x Loading Dye

1,576 g/l	Tris-HCl (pH 7.6)
0,3 g/l	Bromophenol blau
0,3 g/l	Xylene cyanol FF
60%	Glycerol
17,5 g/l	EDTA

TAE-Puffer

7,2 g/l	Tris-Acetat
0,3 g/l	EDTA

pH auf 8,3 eingestellt

Boratpuffer

0,5 mM	Kaliumborat
--------	-------------

pH auf 11 eingestellt

2.2 Methoden

2.2.1 *Bestimmung der optischen Dichte (OD) von Bakteriensuspensionen*

Für die OD-Bestimmung wurden 200 µl der Bakteriensuspension in eine 96-Mikrotiterplatte pipettiert. Die anschließende OD-Bestimmung erfolgte bei 600 nm in einem Spektrophotometer (SpectraMax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, USA).

2.2.2 *Anlegen einer -80°C Glycerolkultur*

Von den erhaltenen Bakterien wurde ein Vereinzelausstrich auf LB-Platten angefertigt und im Brutschrank bei 37°C für 24 h inkubiert. Danach wurde ein Klon gepickt und in LB-Medium mit gewünschtem Antibiotikum und bei 37°C für 8 - 16 h bei 220 rpm schüttelnd inkubiert. Im Anschluss wurde steril 1 ml Bakteriensuspension entnommen und mit 1 ml 60 % Glycerol in einem Kryoröhrchen vermischt. Das Kryoröhrchen wurde bis zu seiner Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.3 *Präparation chemisch kompetenter Zellen*

Die Präparation chemisch kompetenter Zellen erfolgte nach der Rubidiumchlorid-Methode (Sambrook und Russell 2001). Hierfür wurde mit einer Kolonie des entsprechenden *E. coli*-Stammes 30 ml LB-Medium inokuliert und schüttelnd bei 220 rpm und 37°C für 16 h inkubiert. Danach wurden 200 ml LB-Medium mit 8 ml der zuvor kultivierten Bakteriensuspension angeimpft und bei 37°C und 220 rpm schüttelnd inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von ca. 0,5 - 0,7 erreicht war. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden die Zellen durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 4000 x g und 4°C präzipitiert, das überstehende Medium entfernt und die Zellen in 16 ml kaltem TFBI-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden 15 min auf Eis inkubiert und anschließend erneut durch Zentrifugation pelletiert. Nach Abnehmen des Überstandes und Aufnehmen des Pellets in 4 ml kaltem TFBII-Puffer wurden die Zellen in 50 µl Aliquots aufgeteilt und bei -80°C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

2.2.4 *Einwaage von Aminosäuren zur Erstellung einer Stammlösung*

Die Stammlösungen von Aminosäuren wurden zur Supplementierung von Medien verwendet. Von jeder Aminosäure wurde die jeweilige Masse für eine 150 mM konzentrierte

Stammlösung eingewogen und in ca. 8 ml ddH₂O aufgenommen. Bei nicht vollständiger Lösung der Aminosäure in ddH₂O wurde konzentrierte (32%) HCl-Lösung zugegeben, bis die Aminosäure vollständig gelöst war. Anschließend wurde die Lösung mit ddH₂O auf 10 ml aufgefüllt und durch einen Filter mit der Porengröße von 0,22 µm steril-filtriert.

2.2.5 Identifizierung von essentiellen Aminosäure-Biosynthesegenen

2.2.5.1 Übersicht

Um Gene zu identifizieren, deren Deletion eine Aminosäureauxotrophie in *E. coli* hervorruft, wurde der Aminosäuremetabolismus von *E. coli* in Internet-Stoffwechselweg-Datenbanken abgerufen. Anhand dieser Datenbanken wurden Gene identifiziert, deren Deletion eine bestimmte Aminosäureauxotrophie bedingen könnte. Die entsprechenden Mutanten der „Keio collection“, denen jeweils ein identifiziertes Gen fehlt, sollten dann auf die entsprechende Auxotrophie getestet werden (Abbildung 2-1).

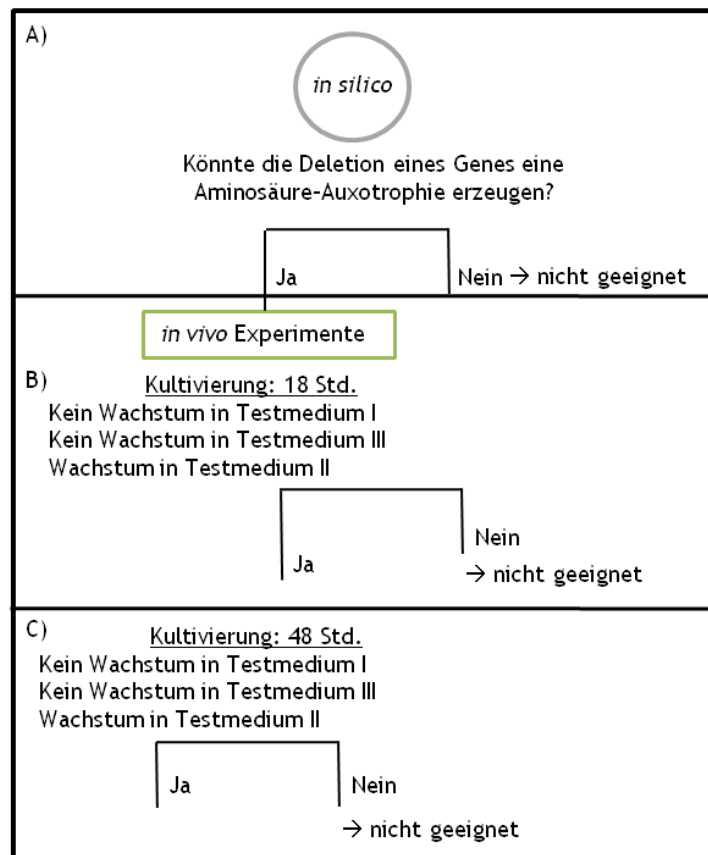


Abbildung 2-1 Schematische Darstellung der Vorgehensweise beim Identifizieren essentieller Aminosäure-Biosynthesegene.

A) *In silico*-Analyse zur Identifizierung einzelner Gene, deren Deletion eine bestimmte Aminosäure auxotrophie in *E. coli* generieren könnte.

B) *In vivo*-Test der entsprechenden Mutanten der „Keio collection“ denen das *in silico* identifizierte Gen fehlt. Kultivierung der Mutanten erfolgte in den drei beschriebenen Testmedien für 18 Stunden.

C) Erneute Testung der Mutanten, die nach 18 Stunden nur ein Wachstum in Testmedium III zeigten. Kultivierung für 48 Stunden.

2.2.5.2 *in silico*-Analyse

Die *in silico*-Analyse wurde mit Hilfe der Stoffwechselweg-Datenbanken EcoCyc (Keseler *et al.* 2009) und KEGG-Pathway (Kanehisa und Goto 2000) durchgeführt. Diese Datenbanken repräsentieren die molekularen Interaktionsnetzwerke in *E. coli* K-12 MG1655 und sind in Form von Stoffwechselwegkarten dargestellt, die u.a. auch Informationen zum Aminosäuremetabolismus enthalten. Die Auswahl potentieller Zielgene, deren Deletion zur Erzeugung auxotropher Mutanten der 20 proteinogenen Aminosäuren führen soll, wurde nach folgenden Kriterien getroffen:

1. Es darf nur ein Biosyntheseweg zu der jeweiligen Aminosäure führen.
2. Keine andere Aminosäure soll durch Degradation in die betreffende Aminosäure umgeformt werden können.

Innerhalb der Biosynthesewege, die diese beiden Kriterien erfüllten, wurden die Gene identifiziert, deren Genprodukt das einzige ist, welches einen Syntheseschritt katalysiert. Die so erhaltenen Gene sollten bei Deletion in *E. coli* eine Aminosäureauxotrophie erzeugen.

2.2.5.3 *In vivo*-Experimente

Im nächsten Schritt sollten nun die Mutanten der „*Keio collection*“, denen das *in silico* identifizierte Gen fehlt, *in vivo* auf die jeweilige Auxotrophie getestet werden. Dafür wurde die Wachstumsfähigkeit der Mutanten in drei verschiedenen Testmedien überprüft.

Testmedium I: Minimalmedium (MMAB)

Testmedium II: MMAB, welches mit 3 mM einer Aminosäure versetzt war (gemeint ist die Aminosäure, für die der *E. coli*-Mutant möglicherweise auxotroph ist).

Testmedium III: MMAB, welches mit 19 Aminosäuren versetzt war (es fehlte die Aminosäure, für die der Mutant möglicherweise auxotroph ist).

Hierzu wurden die entsprechenden Mutanten der „*Keio collection*“ (Tabelle 3-2) aus einem -80°C-Glycerolstock auf LB-Platten (50 µg/ml Kanamycin) ausgestrichen und im 37°C-Brutschrank für 16 h inkubiert. Von jedem Stamm wurden jeweils drei Kolonien in LB-Medium (50 µg/ml Kanamycin) für 16 h bei 220 rpm und bei 37°C inkubiert. Alle weiteren Inkubationsschritte wurden in MMAB-Medium durchgeführt, welches mit Malat als einziger Kohlenstoffquelle und 50 µg/ml Kanamycin supplementiert war. 1 ml der Bakteriensuspensionen wurden 5 min bei 5.000 x g abzentrifugiert und in 1 ml MMAB resuspendiert. Dieser Vorgang wurde ein Mal wiederholt, anschließend wurden die Bakterien in ein Reagenzglas mit 1 ml MMAB für 4 h bei 37°C und 220 rpm kultiviert. Dieser Schritt sollte den Zellen die Zeit geben, die in ihnen verbliebenen Aminosäuren zu verbrauchen. Danach wurden die Biosensoren mit MMAB auf eine OD₆₀₀ von 0,1 verdünnt. Mit der so entstandenen Verdünnung wurde jeweils dreimal 1 ml der drei Testmedien 1:100 in 96-Deepwellplatten angeimpft. Für das Testmedium III wurde 1,6-faches MMAB-Medium

mit den Aminosäuren (20 µl von jeder Aminosäure) auf die einfache Konzentration verdünnt und ein pH-Wert von 7,0 mit NaOH eingestellt. Dies war notwendig, da einige Aminosäuren zur Verbesserung der Löslichkeit mit HCl versetzt worden waren (siehe 2.2.4). Die Endkonzentration jeder Aminosäure betrug 3 mM. Die 96-Deepwellplatte wurde mit einer Alufolie abgedeckt und für 18 h bzw. 48 h bei 37°C und 220 rpm schüttelnd inkubiert. Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurde die OD wie zuvor beschrieben bestimmt (2.2.1).

2.2.6 Molekularbiologische Methoden

2.2.6.1 Siehe Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode, mit der DNA-Fragmente in einem zyklischen Verfahren spezifisch vervielfältigt werden. Im ersten Schritt, der Denaturierung, werden die DNA-Doppelstränge in Einzelstränge aufgetrennt. Im zweiten Schritt hybridisieren die Oligonukleotide (Primer) bei einer spezifischen „Annealing“-Temperatur an die komplementäre Region der DNA-Einzelstränge. Zuletzt wird ausgehend von den Primern als Startpunkt einer DNA-Polymerase der komplementäre DNA-Strang unter Inkorporation von dNTPs synthetisiert. Die gewählte „Annealing“-Temperatur der Primer entsprach der größten T_M der beiden eingesetzten Primer. Die PCR wurde mit einem Thermocycler ausgeführt (GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystem, Carlsbad, USA).

Der Standard *Taq* DNA-Polymerase-Mix enthielt in der Endkonzentration folgende Bestandteile:

- 200 µM dNTP (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- jeweils 0,2 µM Vorwärts- und Rückwärts-Primer
- 150 µM MgCl₂
- PCR-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 0,001% (w/v) Gelatine)
- 0,05 U/µl JumpStart *Taq* DNA-Polymerase

Als Template wurde Plasmid-DNA (ca. 0,2 µg/µl) oder 2 µl einer in 50 µl ddH₂O resuspendierten Bakterienkolonie (Kolonie-PCR) verwendet.

Die Ansätze wurden anschließend mit folgendem Programm für 35 Zyklen durchgeführt:

Initiale Denaturierung:	98 °C	1 min
---Zyklus Beginn---		
Denaturierung:	98 °C	10 s
Annealing:	(°C siehe Tabelle 2-3)	30 s
Elongation:	72 °C	x min
---Zyklus Ende---		
Finale Elongation:	72 °C	5 min

2.2.6.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient dazu, DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge aufzutrennen. Dazu werden die DNA-Proben in die Taschen eines Agarose-Gels pipettiert und eine elektrische Spannung angelegt. Im elektrischen Feld wandert die DNA aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode. Dabei bewegen sich kleinere DNA-Fragmente schneller als große, wodurch die Auftrennung erfolgt. Generell wurden 1 %ige (w/v) Gele verwendet. Dafür wurde die Agarose in TAE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Das abgekühlte Gel ($\approx 60^\circ\text{C}$) wurde mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von $0,5 \mu\text{g/ml}$ versetzt, um die DNA nach der Auftrennung unter UV-Licht sichtbar zu machen. Vor der Auftrennung wurden die DNA-Proben mit 6 x Loading Dye vermischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Je nach Größe des Gels wurde eine Spannung von 50 bis 100 Volt angelegt.

2.2.6.3 Verdau mit Restriktionsenzymen

Zum Schneiden der DNA wurden Restriktionsendonukleasen verwendet, die an spezifischen, meist palindromischen Erkennungssequenzen binden und dort die DNA durchtrennen. Prinzipiell wurde $1 \mu\text{g}$ gereinigte DNA mit 10 Einheiten (U) des entsprechenden Enzyms 2 h in dem für das Enzym optimalen Puffer und bei 37°C verdaut (Tabelle 2-4). Das Endvolumen eines Restriktionsenzymverdaus betrug $50 \mu\text{l}$.

2.2.6.4 DNA-Aufreinigung

Um DNA nach einem Restriktionsverdau bzw. nach dem Ausschneiden aus dem Agarosegel aufzureinigen, wurde der „Qiaquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.6.5 Ligation

Ligationen wurden mit gereinigter DNA durchgeführt (siehe 2.2.6.4). Hierfür wurde eine DNA-Menge von 50 bis 100 ng in einem molaren Verhältnis von 1:3 (Vektor zu „Insert“) in einem Gesamtvolumen von $20 \mu\text{l}$ eingesetzt. Die Reaktion wurde mit 20 U T4 DNA-Ligase (Tabelle 2-4) in einfachen T4 DNA-Ligasepuffer bei Raumtemperatur für ca. 1 h inkubiert. Der hierzu eingesetzte Vektor wurde zuvor mit geeigneten Restriktionsenzymen linearisiert und bei Bedarf (d.h. wenn der Vektor mit nur einem Restriktionsenzym linearisiert wurde) anschließend mit 5 U der antarktischen Phosphatase (Tabelle 2-4) im gleichen Reaktionsansatz für 1 h bei 37°C dephosphoryliert.

2.2.6.6 Transformation

Mittels Hitzeschocktransformation wurde Plasmid-DNA in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen (siehe 2.2.3) eingebracht. Hierzu wurde zu einem Aliquot kompetenter Zellen jeweils $10 \mu\text{l}$ des Ligationsansatzes (2.2.6.5) gegeben und auf Eis für 30 min inkubiert.

Dieser Ansatz wurde anschließend im Wasserbad bei 42 °C für 45 s einem Hitzeschock ausgesetzt und anschließend erneut für 2 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 800 µl SOC-Medium versetzt und für 1 h bei 37 °C zur Ausprägung der Ampicillinresistenz geschüttelt. Anschließend wurden 200 µl des Transformationsansatzes auf ampicillin-haltigen (100µg/ml) LB-Platten zur Selektion der positiven Klone ausplattiert.

2.2.6.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

5 ml LB-Medium wurden mit einem sterilen Zahnstocher mit *E. coli*-Zellen, welche das benötigte Plasmid beinhalten, aus Kryokulturen oder von Klonen auf Nährbodenplatten angeimpft. Die Kultur wurde für 16 h bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Am nächsten Tag konnten die Plasmide mit dem „Purelink™ Quick Plasmid Miniprep Kit“ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) nach Herstellerprotokoll isoliert werden.

2.2.6.8 Klonierungsstrategie

Die in dieser Arbeit angewandte Methode zur Klonierung von DNA-Fragmenten basiert auf der in Andersen et al. (1998) beschriebenen Klonierungsstrategie. Dabei wurden die für Fluoreszenzprotein-kodierenden Nukleotidsequenzen aus ihren ursprünglichen Plasmiden (Tabelle 2-1) in das Plasmid pJBA24 kloniert. Das neu inserierte Fragment steht unter der Kontrolle des vom *lacZ* abgeleiteten Promotors P_{A1/04/03} (Lanzer und Bujard 1988) und ist zwischen den Sequenzmotiven der „*ribosome binding site*“ (RBSII) und den Transkriptionsterminatoren T₁ und T₀ lokalisiert. Anschließend wurde diese Kasette in den pGRG36 Vektor (zwischen die Enden des Tn7 Transposons) kloniert (dieser Klonierungsschritt wird im Folgenden als Umklonierung bezeichnet) (Abbildung 2-2). Nach erfolgreicher Transformation dieses Plasmids in eine Bakterienzelle wird die zuvor beschriebene Kasette durch die auf dem Plasmid kodierte Tn7 Transpositionsmaschinerie in das bakterielle Genom integriert. Die so integrierte Kasette vermittelt dem Bakterium eine spezifische Fluoreszenz.

Die Gensequenzen der Fluoreszenzproteine aus den jeweiligen Plasmiden wurden mittels PCR (siehe 2.2.6.1) mit den Fluoreszenzproteinprimern (Tabelle 2-3) amplifiziert. Hierbei wurden für alle Fluoreszenzproteinsequenzen die Primer „EECT up *Sph*I“ und „EECT down *Hind*III“ verwendet. Diese Primer wurden so konstruiert, dass die Amplifikate vor dem Startkodon eine *Sph*I-Schnittstelle und nach dem Stoppkodon eine *Hind*III-Schnittstelle aufwiesen (Tabelle 2-3). Ausserdem wurden 5 zusätzliche Nukleotide angehängt, um die Bindung der Restriktionsendonukleasen zu gewährleisten. Die so erhaltenen PCR-Produkte

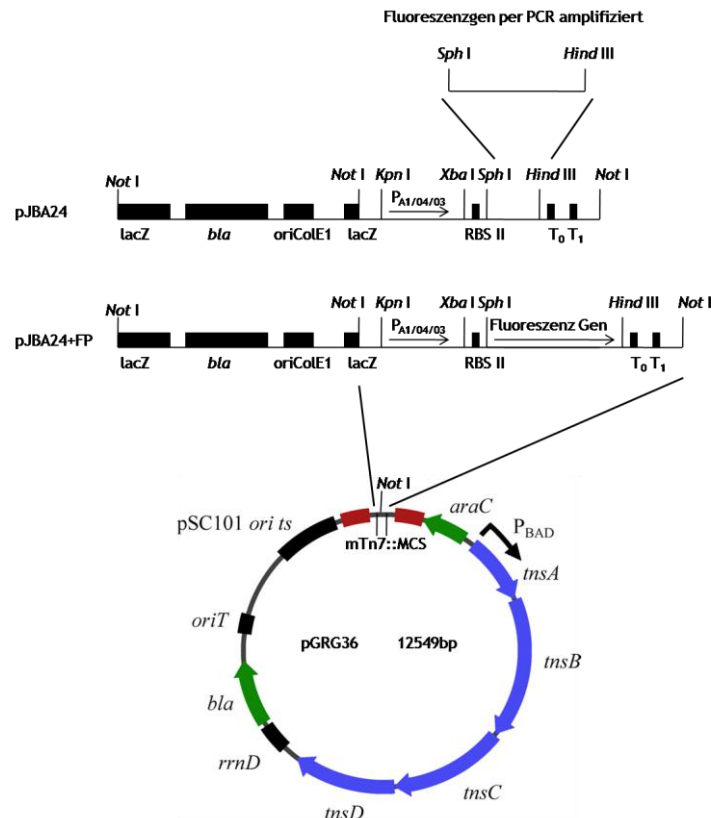


Abbildung 2-2: Klonierungsstrategie:

Die Fluoreszenzproteine wurden ausgehend von ihren ursprünglichen Plasmiden mit den Fluoreszenzprimern amplifiziert. Die mit der PCR erzeugten Überhänge beinhalten die Restriktionsschnittstellen *Sph*I und *Hind*III, diese wurden dazu benutzt, um die Amplifikate in den Vektor pJBA24 zwischen den *lacZ*-derivativen Promotor $P_{A1/04/03}$ und anschließender „Ribosome binding site“ (RBS II) sowie den Transkriptionsterminatoren T_0 (Phage lamda) und T_1 (*rrnB* Operon) zu ligieren. Die so entstandene Expressionskassette in pJBA24+FP wurde mit dem Restriktionsenzym *Not*I HF herausgeschnitten und in die „multiple cloning site“ (MCS) von pGRG36 ligiert. pJBA24 enthält weiterhin das Ampicillin-Resistenzgen *bla*, ein unterbrochenes Gen für β -Galactosidase (*lacZ*) sowie einen „origin of replication“ (*ori*).

Das Plasmid pGRG36 enthält eine „multiple cloning site“ (MCS), die von den Enden des Tn7-Transposons flankiert wird. *araC* ist der Regulator des Arabinose-Promoters P_{BAD} . *tnsABCD* kodieren für Transposasen, die die Transposition in den chromosomalen *attTn7* Locus vermitteln. Dabei wird das genetische Element, welches in die MCS kloniert wurde, in das bakterielle Chromosom inseriert. *rrnD* ist ein Transkriptionsterminator. *bla* kodiert für β -Lactamase, zur Selektion des Plasmids gegen Ampicillin. *oriT* ist ein RP4 konjugeller Transfer-Replikationsursprung. pSCS101 *ori ts* bezeichnet den temperatursensitiven Replikationsursprung, der das Plasmid unter 32°C repliziert, aber nicht bei 37°C. (Andersen *et al.* 1998; McKenzie und Craig 2006)

wurden elektrophoretisch durch ein Agarosegel getrennt (2.2.6.2), die Fragmente erwarteter Größe wurden ausgeschnitten und aufgereinigt (2.2.6.4). Die aufgereinigten Amplifikate wurden ebenso wie der Zielvektor pJBA24 mit *SphI* und *HindIII* restringiert (2.2.6.3). Anschließend wurde der jeweilige Restriktionsansatz erneut aufgereinigt und das verdaute PCR-Fragment in den linearisierten Vektor pJBA24 ligiert (2.2.6.5). Nach Transformation des Ligationsansatzes in *E. coli Top Ten*-Zellen und der Isolierung des Plasmids (2.2.6.7) wurde dieses mit *NotI*-HF restringiert. Der Verdau wurde mittels einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Von den beiden aufgetrennten Fragmenten (2 kb und 2,5 kb) wurde das gewünschte 2 kb lange DNA-Fragment ausgeschnitten und aufgereinigt. Dieses wurde anschließend in den ebenfalls mit *NotI*-HF geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pGRG36 ligiert (2.2.6.5). Der Erfolg der Klonierung wurde mit einer Kolonie-PCR (2.2.6.1), den Primern Tn7Plasmidf und Tn7Plasmidr (Tabelle 2-3) sowie einem Kontrollverdau des Plasmids mit dem Restriktionsenzym *NotI*-HF überprüft.

Tabelle 2-5: Zur Markierung der Modellorganismen und Aminosäurebiosensoren verwendete Fluoreszenzproteine.

Fluoreszenz-protein	Anregungs-maximum (nm)	Emissions-maximum(nm)	Ursprungs-Organismus	Spektralklasse	Referenz
mcherry	587	610	<i>Discosoma sp.</i>	Rot	Shaner <i>et al.</i> (2004)
mCerulean	433	475	<i>Aequorea victoria</i>	Cyan	Rizzo <i>et al.</i> (2004)
EBFP2	383	448	<i>Aequorea victoria</i>	-	Ai <i>et al.</i> (2007)

2.2.7 Tn7 Transgen-Insertionsprotokoll

Zur Markierung der *E. coli*-Biosensoren wurde das Plasmid pGRG36 verwendet, welches alle nötigen Faktoren beinhaltet, die notwendig sind, um das gewünschte Transgen in das *E. coli*-Chromosom zu inserieren. Die Transgene *mCerulean*, *mCherry* und *EBFP2*, die unter der Kontrolle eines *LacZ* abgeleiteten Promotors ($P_{A1/04/03}$) stehen, wurden in die „multiple cloning Site“ (MCS) zwischen die Tn7-Enden kloniert. Die so entstandenen Plasmide (Tabelle 2-1) wurden in entsprechenden *E. coli*-Stämme transformiert (2.2.6.6). Die LB-Platten der Transformation wurden im Brutschrank bei 30°C statt bei 37°C für 16 h inkubiert, da das pGRG36 Plasmid einen temperatursensitiven Replikationsursprung trägt (Abbildung 2-2). Von den positiven Transformanten wurden jeweils drei Kolonien gepickt und ein Vereinzlungsausstrich auf LB-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin angefertigt. Die so entstandenen Platten wurden dann erneut bei 30°C für 16 h im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag (d.h. nach 18 h) wurde jeweils eine Kolonie gepickt und damit 1 ml LB-

Medium ohne Ampicilin angeimpft und für 16 h bei 32°C schüttelnd inkubiert. Die Inkubation ohne Ampicillin dient dem Verlust des Plasmids. Aus dieser Bakteriensuspension wurden erneut Einzelausstriche auf LB-Platten ohne Ampicillin angefertigt und diese für 16 h bei 42°C inkubiert. Bei 42 °C wird das Plasmid durch den temperatursensitiven Replikationsursprung pSCS101 nicht mehr repliziert, damit wird der komplette Verlust des Plasmids sichergestellt. Nach dieser Prozedur sollte das gewünschte Gen nach McKenzie und Craig (2006) mit einer Wahrscheinlichkeit von 50-95 % in das Zielgenom inseriert sein. Um dies zu überprüfen, wurde eine Kolonie-PCR (2.2.6.1) mit den Primern attTn7 Glms 1 und 2 (Tabelle 2-3) angefertigt; diese flankieren die attTn7-Stelle im Genom. Bei einer erfolgreichen Insertion war so eine Bande von 3.5 kb in dem danach angefertigten Agarosegel sichtbar (1,5 kb flankierende Region plus 2 kb Zielgen), während eine Bande von 600 bp auf eine erfolglose Prozedur hindeute.

2.2.8 Funktionelle Charakterisierung der Fluoreszenzproteine

Um die Eignung verschiedener Fluoreszenzproteine für die geplanten Biosensorexperimente zu überprüfen, wurden Wachstumskurven von mit mCerulean, mCherry und EBFP2 markierten *E. coli* Δ lacI-Mutanten angefertigt (Tabelle 2-6).

Hierzu wurden 96-Mikrotiterplatten mit 200 μ l M9-Medium mit 50 μ g/ml Kanamycin befüllt. Die entsprechend markierten *E. coli*-Stämme (Tabelle 2-6) wurden vom jeweiligen -80°C-Glycerolstock ausgehend ausgestrichen und für 16 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden von jedem Stamm drei Kolonien gepickt, in LB-Medium inokuliert und für 16 h bei 37°C und 220 rpm schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurde 1 ml der Bakteriensuspension bei 5.000 x g für 3 min abzentrifugiert. Die entstandenen Pellets wurden in 1 ml MMAB+Fruktose resuspendiert und der Vorgang erneut durchgeführt. Die so behandelte Bakteriensuspension wurde anschließend mit MMAB+Fruktose auf eine OD₆₀₀ von 0,1 verdünnt. Mit dieser Verdünnung wurden die Wells der 96-Mikrotiterplatte 1:20, also mit 10 μ l pro Well angeimpft. Für jeden der drei *E. coli* wurden 18 Replikate angefertigt. Die fertig inokulierte Platte wurde dann bei 30°C in einem Mikrotiterplattenmessgerät (Tecan® Infinite® F200, Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) inkubiert, der alle 15 min die Platte für 5 s schüttelte und unmittelbar danach die OD₆₀₀ sowie die Fluoreszenzemission der Proben maß. Die Fluoreszenz der Proteine wurden bei den spezifischen maximalen Wellenlängen (Tabelle 2-6) angeregt und deren jeweilige Emission (Tabelle 2-6) gemessen. Die Genauigkeit des Tecan Infinite F200 lag in der Anregung bei \pm 5 nm und in der Emission bei \pm 20 nm

Tabelle 2-6: Fluoreszenz markierte *E. coli* und deren maximale Anregungs- und Emissionswellenlängen der Fluoreszenzproteine.

Alle Proteine stehen unter der Kontrolle des gleichen *lacZ* abstammenden Promotors P_{A1/04/03} und wurden bei den angegebenen Wellenlängen angeregt und deren Emission gemessen.

Stamname	mit Fluoreszenzprotein markiert	Maximale Anregungswellenlänge (nm)	Maximale Emissionwellenlänge (nm)
JW0336_attTn7::mcerulean	mcerulean	435	477
JW0336_attTn7::mcherry	mcherry	583	614
JW0336_attTn7::EBFP2	EBFP2	383	448

2.2.9 Modellorganismen: Kultivierung und Ernte der Überstände

Um die Aminosäureproduktion der Modellorganismen (Tabelle 2-2) mit Aminosäurebiosensoren und „*High-performance liquid chromatography*“ (HPLC) zu bestimmen, wurden zunächst die zu testenden Bakterien kultiviert. Hierzu wurden die Bakterien aus einem -80 °C-Glycerolstock auf LB-Agarplatten ausgestrichen und je nach Wachstumsgeschwindigkeit für 24 h bis 48 h bei 28 °C (*Pseudomonas putida* und *Pseudomonas fluorescens*), 30 °C (*Azospirillum brasilense* und *Bacillus subtilis*) und 37 °C (*Acinetobacter baylyi*) im Brutschrank inkubiert. Von jedem Stamm wurden dann mit einer Impföse drei Kolonien gepickt und damit jeweils 2 ml LB-Medium der Vorkultur angeimpft. Nach einer schüttelnden Inkubation für 16 h bei der jeweiligen Temperatur und 220 rpm wurde 1 ml jeder Bakteriensuspension durch Zentrifugation bei 5.000 x g und 5 min pelletiert. Die Zellpellets wurden in 1 ml MMAB+Fruktose (0) aufgenommen und die OD₆₀₀ bestimmt. Durch Zugabe von MMAB+Fruktose wurden die Bakterien auf eine OD₆₀₀ von 0,1 verdünnt. Die so erhaltene Verdünnung wurde dazu benutzt, um 5 ml MMAB+Fruktose der Hauptkultur von der dann die Überstände geerntet wurden, 1:100 anzuimpfen (d.h. 50 µl Bakteriensuspension). Die Hauptkultur, wurde dann erneut bei der für den Stamm spezifischen Temperatur für 24 h und 48 h bei 220rpm schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen durch Zentrifugation bei 5000 x g und 5 min pelletiert, der erhaltene Überstand abgenommen und mit einem 0,22 µm Filter steril filtriert. Der so behandelte Überstand wurde dann sofort mit den Aminosäurebiosensoren beimpft bzw. bis maximal eine Woche nach Probenahme bei 4 °C zur Messung mit der HPLC aufbewahrt.

2.2.10 Aminosäureanalytik mittels RP-HPLC

Die hier verwendete Methode basiert auf der Vorsäulenderivatisierung von Aminosäuren mit o-Phthaldialdehyd (OPA) in Anwesenheit von 2-Mercaptoethanol. Die entstandenen fluoreszierenden Derivate werden mittels „reversed-phase high-performance liquid chromatography“ (RP-HPLC) entsprechend ihrer Polarität aufgetrennt und im Anschluss mit einem Fluoreszenz-Detektor quantifiziert (Lindroth und Mopper 1979; Jones *et al.* 1981). Der Nachteil dieser Methode ist, dass Prolin als einzige proteinogene Aminosäure nicht detektiert werden kann, da es sich dabei um eine sekundäre Aminosäure handelt, welche nicht mit OPA reagiert.

Für die Aminosäurequantifizierung durch HPLC wurden die Überstände wie in Abschnitt 2.2.9 beschrieben geerntet. Diese wurden danach 1:2 bzw. 1:5 mit Boratpuffer verdünnt. Zur Erstellung einer Kalibrationsgeraden wurde ein Aminosäuremix (0,5 mM,

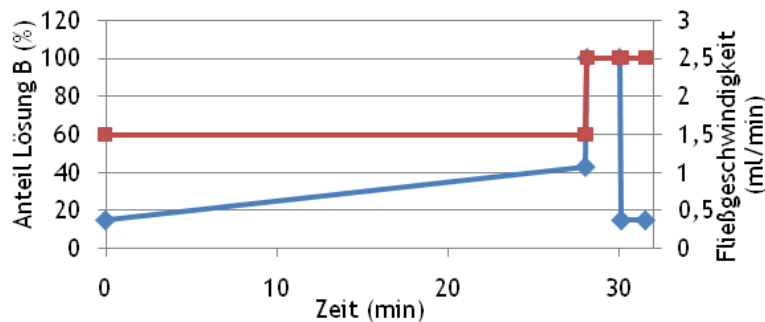


Abbildung 2-3: Zeitlicher Gradient der RP-HPLC:

Der dargestellte zeitliche Gradient wurde verwendet um die Aminosäuren aufzutrennen. Lösung B entspricht einer Mischung aus Methanol und Acetonitril (65/35; v/v, blaue Kurven, primäre Y-Achse). Die Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase wurde ab Minute 28 erhöht (sekundäre Y-Achse, rote Kurve)

Fluka) 1:100, 1:50, 1:20 und 1:10 ebenfalls mit Boratpuffer verdünnt und auf die Säule aufgetragen. Bevor das Standardgemisch oder die Überstände über die Hauptsäule aufgetrennt wurde, erfolgte die Derivatisierung automatisiert im „Autosampler“. Dazu wurden 100 µl der entsprechenden Probe mit 30 µl des OPA Reagenz (OPA/Methanol: 85 mM/130 mM) gemischt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 30 µl des Reaktionsansatzes auf die Säule injiziert. Die mobile Phase bestand aus zwei Lösungen: (A) 0,02 M Zitronensäure (pH 5,5) und (B) Methanol-Acetonitril (65/35 v/v). Um eine möglichst kurze Analysezeit und trotzdem eine vollständige Trennung mit Basislinien-separierten Peaks zu erhalten, wurde ein zeitlicher Gradient der beiden Komponenten gefahren (Abbildung 2-3). Die Flussgeschwindigkeit der mobilen Phase wurde ab Minute 28 von 1,5 ml/min auf 2,5 ml/min erhöht. Die Detektion erfolgte über die Fluoreszenz der OPA-derivatisierten Aminosäuren, die bei 340 nm angeregt und das emittierte Licht bei einer Wellenlänge von 445 nm gemessen wurden. Die HPLC-Messungen wurden von Holger Merker (MPI Abteilung Bioorganische Chemie) durchgeführt.

2.2.11 Quantifizierung bioverfügbarer Aminosäuren

Die Quantifizierung der bioverfügbaren Aminosäuren die von den Modellorganismen ins Medium abgegeben werden, erfolgte mit mCerulean markierten *E. coli*-Biosensoren (Tabelle 3-3) in 96-Mikrotiterplatten. Die Aminosäurekonzentration in den Überständen wurde anhand einer zuvor generierten Kalibrationsgeraden bestimmt. Die so ermittelten Werte wurden anschließend mit den entsprechenden Werten der HPLC-Messung verglichen (2.2.10).

Zur Erstellung einer Kalibrationsgeraden wurden 196 μ l MMAB+Fruktose in jedes Well gefüllt, das mit 50 μ g/ml Kanamycin supplementiert war. Weiterhin wurden die Wells mit den eingewogenen Aminosäuren auf die jeweils finale Aminosäurekonzentration von 100 μ M; 33 μ M; 11,1 μ M; 3,7 μ M; 1,2 μ M 0,4 μ M und 0 μ M der Aminosäuren Arginin, Histidin und Leucin supplementiert (2.2.4). Von jeder Aminosäure und jeder Konzentration wurden 3 Wells vorbereitet. Diese wurden schließlich mit 2 μ l der mit demselben Medium auf eine OD von 0,1 verdünnten Biosensoren angeimpft, die wie in Abschnitt 2.2.5.3 beschrieben vorkultiviert worden waren. Hierbei wurde jede Verdünnungsreihe mit je einem Klon der drei Biosensoren angeimpft. Die Mittelwerte des Differenzbetrages der Fluoreszenz- bzw. OD-Werte der Biosensoren nach 24 h und nach 0 h, wurden nach Abzug des Leerwertes (d.h. steriles Medium) gegenüber der entsprechenden Aminosäurekonzentration aufgetragen. In dem Bereich linearer Korrelation zwischen Fluoreszenz- bzw. OD-Werten und zugegebener Aminosäurekonzentration wurde eine lineare Regressionsgerade errechnet, die als Kalibrationsgerade bezeichnet und deren Funktion zur Berechnung der Aminosäurekonzentrationen in Proben unbekannter Konzentration diente.

Zur Quantifizierung der Aminosäuren in den Überständen der Modellorganismen wurden die Überstände wie in Abschnitt 2.2.9 beschrieben nach 24 h und 48 h Kultivierung geerntet. Von jedem Modellorganismus und jeder Kultivierungszeit wurden 1,62 ml Überstand geerntet, welcher verwendet wurde, um jeweils drei verschiedene Biosensormessungen und eine HPLC-Messung durchzuführen. In jedes Well wurden 180 μ l Überstand pipettiert, welcher mit 18 μ l 5-fach konzentriertem MMAB+Fruktose-Medium, welches 250 μ g/ml Kanamycin enthielt, zu versetzen, um eine Endkonzentration der Medieninhaltsstoffe zu erreichen, die einer einfachen Konzentration entsprach. Schließlich wurden zu jedem Well noch 2 μ l des jeweiligen Biosensors gegeben, die wie schon in Abschnitt 2.2.9 beschrieben vorkultiviert und auf eine OD₆₀₀ von 0,1 mit 5-fach konzentriertem MMAB-Medium verdünnt wurde. Insgesamt wurden drei Platten belegt: Eine beinhaltete die Kalibrationskurven der drei Biosensoren und zwei weitere waren mit dem Medium, Überstand-Mix der beiden nach 24 h und nach 48 h geerntet Überständen belegt. Diese drei Platten wurden an drei aufeinander folgenden Tagen mit jeweils drei

unterschiedlichen Biosensorklonen gemessen (Tabelle 3-3). Die belegten 96-Mikrotiterplatten wurde bei 30°C in ein Mikrotiterplattenmessgerät (Tecan® Infinite® F200, Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) gestellt, das die Platten alle 15 min für 5 s schüttelte und unmittelbar danach sowohl die OD₆₀₀ als auch die entsprechende Fluoreszenz bei den spezifischen maximalen Anregungs- und Emissionswellenlängen von mCerulean maß (Tabelle 2-6).

2.2.12 Berechnung der Aminosäurekonzentration in den Überständen

Die Aminosäurekonzentrationen, die durch die Biosensoren generiert wurden, ergaben sich nach Abzug des Leerwertes (d.h. steriles Medium) aus dem Differenzbetrag der Fluoreszenz bzw. OD des jeweiligen Biosensors nach 24 h und nach 0 h. Dieser Wert wurde zur Berechnung der Aminosäurekonzentration in die Formel der jeweiligen Geradensteigung (Tabelle 3-4) eingesetzt. Die berechnete Aminosäurekonzentration wurde dann mit dem Verdünnungsfaktor 1,1 multipliziert, um die durch Zugabe von 5-fachem MMAB zum Überstand entstandene Verdünnung auszugleichen (2.2.11).

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung essentieller Aminosäurebiosynthesegene

Der Aminosäuremetabolismus von *E. coli* wurde *in silico* hinsichtlich essentieller Aminosäurebiosynthesegene, d.h. Gene, deren Deletion eine Aminosäureauxotrophie hervorrufen, untersucht. Die so erhaltenen Vorhersagen wurden anschließend unter Verwendung der entsprechenden Mutanten der „Keio collection“ experimentell überprüft.

3.1.1 *In silico*-Analyse

Unter Verwendung von Online-Datenbanken wurde der Metabolismus von *E. coli* hinsichtlich der Synthese und des Abbaus der 20 proteinogenen Aminosäuren analysiert (2.2.5.2). Dabei konnten neun Aminosäuren identifiziert werden, in deren Biosynthese es nicht möglich ist, durch die Deletion eines Genes eine Auxotrophie zu erzeugen. So weist die Biosynthese von Alanin und Glutamat mehrere alternative Synthesewege aus verschiedenen Vorstufen auf, aus denen unabhängig voneinander die betreffende Aminosäure synthetisiert werden kann. Zudem kann Glutamin zu Glutamat abgebaut werden. Die Synthese der Aminosäuren Glutamin und Asparagin besteht aus nur einem Syntheseschritt, bei dem die jeweils carboxylierte Form der Aminosäure die entsprechende Vorstufe darstellt. Dieser Schritt wird aber von mehreren Enzymen katalysiert, die durch jeweils ein Gen kodiert werden kann. Zu den Aminosäuren Aspartat, Glycin, Serin und Threonin führt zwar jeweils nur ein Biosyntheseweg, in denen je mindestens ein Syntheseschritt auch nur von einem Enzym katalysiert wird, welches durch ein Gen kodiert ist. Jedoch führen die Abbauewege strukturähnlicher Aminosäuren zu diesen drei Aminosäuren (Tabelle 3-1), wodurch diese als potentielle Auxotrophie-Kandidaten ausscheiden. Auch eine reine Valin-Auxotrophie zu erzeugen ist nicht möglich, da in der Valin-Biosynthese Enzyme involviert sind, die ebenfalls Schritte in der Biosynthese von Isoleucin katalysieren. Das Ausschalten eines dieser Gene würde also zu einer doppelt auxotrophen Mutante führen.

Tabelle 3-1: Aminosäuren, die in der *in silico*-Analyse ausgeschlossen wurden, deren Vorstufen und involvierten Gene.

Aminosäure	Vorstufe	involvierte Gene
Alanin*	Cystein Valin Pyruvat	<i>iscS</i> <i>avtA</i> <i>alaB</i>
Glutamat* [‡]	α-Ketoglutarat α-Ketoglutarat+Glutamin Glutamin (Degradation)	<i>[gltB,gltD]</i> <i>gdhA</i> <i>ybaS</i>
Threonin*	O-phospho-L-Homoserin Glycin	<i>thrC</i> <i>ltaE</i>
Glutamin [†]	Glutamat	<i>glnA, ybaS</i>
Asparagin [†]	Aspartat	<i>ansA, ansB, iaaA</i>
Asparatat [‡]	Asparagin Glutamat (Degradation)	<i>ansA, ansB, iaaA</i> <i>aspC</i>
Glycin [‡]	Serin Threonin (Degradation)	<i>glyA</i> <i>ltaE</i>
Serin [‡]	3-Phospho-L-Serin Glycin (Degradation)	<i>serB</i> <i>glyA</i>

* Betreffende Aminosäure wird aus verschiedenen Vorstufen synthetisiert. [†] Syntheseschritt der Aminosäure wird von mehreren Enzymen katalysiert. [‡]Degradationsweg einer Aminosäure geht über die betreffende Aminosäure.

Schließlich wurden in den Biosynthesewegen der verbleibenden elf Aminosäuren 15 Gene identifiziert, deren Genprodukte Enzyme darstellen, die im Biosyntheseweg der jeweiligen Aminosäure einen möglichst terminalen Syntheseschritt katalysieren (Tabelle 3-2).

Tabelle 3-2: Ergebnis der *in silico*-Analyse zur Identifikation potentiell essentieller Aminosäure-Biosynthesegene.

identifiziertes Gen	„Keio collection“ knock out Mutante	Genprodukt	Überprüfte Aminosäureauxotrophie
<i>argH</i>	JW3932	Argininosuccinat-lyase	Arginin
<i>cysB</i>	JW1267	CysB transkriptioneller dual regulator	Cystein
<i>cysE</i>	JW3582	serine acetyltransferase	Cystein
<i>hisD</i>	JW2002	Histidinol-Dehydrogenase	Histidin
<i>ilvA</i>	JW3745	Threonin-Deaminase	Isoleucin
<i>leuB</i>	JW5807	3-Isopropylmalat-Dehydrogenase	Leucin
<i>lysA</i>	JW2806	Diaminopimelat-Decarboxylase	Lysin

<i>metA</i>	JW3973	homoserine O-succinyltransferase	Methionin
<i>metB</i>	JW3910	O-succinylhomoserine(thiol)-lyase	Methionin
<i>pheA</i>	JW2580	Chorismat-Mutase / Prephenat-Dehydrogenase	Phenylalanin
<i>proC</i>	JW0377	Pyrrolin-5-Carboxylat-Reduktase	Prolin
<i>trpB</i>	JW1253	Tryptophan Synthase, β Untereinheit	Tryptophan
<i>tyrA</i>	JW2581	Chorismat-Mutase / Prephenat-Dehydrogenase	Tyrosin

3.1.2 *in vivo*-Experimente

Die 15 entsprechenden Knockout-Mutanten der „Keio collection“ für die zuvor identifizierten Gene (3.1.1, Tabelle 3-2) wurden *in vivo* hinsichtlich einer möglichen Aminosäure-Auxotrophie getestet (2.2.5.3). Hierzu wurde die Wachstumsfähigkeit der Mutanten in drei Testmedien untersucht, welche sich in der Zusammensetzung der enthaltenen Aminosäuren unterschieden: Testmedium 1 war ein Minimalmedium, das mit 19 Aminosäuren supplementiert wurde, dabei aber die entsprechende Aminosäure, für die aufgrund der jeweiligen Deletion eine Auxotrophie vermutet wurde, nicht enthielt. Testmedium 2 war ein Minimalmedium, das einzig mit der Aminosäure komplementiert wurde, die in Testmedium 1 nicht verwendet wurde. Bei Testmedium 3 handelte es sich um ein aminosäure-freies Minimalmedium.

3.1.2.1 Wachstumstest der potentiellen Auxotrophie-Mutanten nach 18 h

Zunächst wurde die OD als Maß des Wachstums der 15 Knockout-Mutanten (Tabelle 3-2) nach 18-stündiger Kultivierungszeit in den drei Testmedien bestimmt. Für neun Knockout-Mutanten, welche für die Aminosäuren Cystein, Methionin, Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin potentiell auxotroph waren, konnte Wachstum entweder in Testmedium 1 ($\Delta metA$, $\Delta metB$, $\Delta pheA$, $\Delta trpB$, $\Delta trpC$), in Testmedium 3 ($\Delta trpB$) oder in beiden Testmedien ($\Delta cysB$, $\Delta cysE\Delta$, $trpD$) ermittelt werden (Abbildung 3-1, B). Dagegen zeigten die sechs potentiellen Auxotrophie-Mutanten für Arginin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin und Prolin ein Wachstum ausschließlich im Testmedium 2, welches mit der jeweiligen Aminosäure komplementiert wurde (Abbildung 3-1, A).

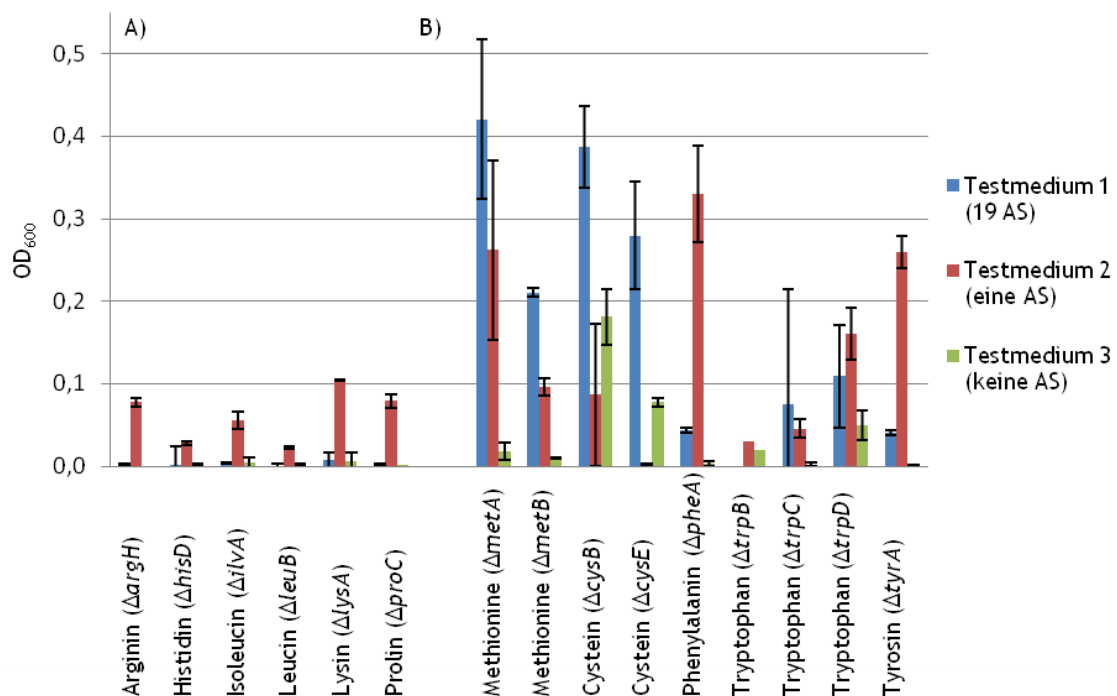


Abbildung 3-1: Wachstumstest 15 potentiellen Auxotrophie-Mutanten nach 18 h.

Ermittelte optische-Dichte (OD_{600} , Y-Achse) der entsprechende *E. coli*-Mutante der „Keio collection“ mit dem deletierten Gen (Klammerausdruck) nach 18-stündiger Kultivierung in Minimalmedium (MMAB+Malat), mit der angegebenen Aminosäure (Testmedium 2), ohne Aminosäuren (Testmedium 3) und mit allen Aminosäuren außer der angegebenen (Testmedium 1). Angegebener Fehlerbalken ist jeweils das 95% Konfidenzintervall einer Triplikatbestimmung.

3.1.2.2 Wachstumstest sechs potentieller Auxotrophie-Mutanten nach 48 h

Jene in 3.1.2.1 ermittelten Mutanten, die nicht die Fähigkeit besaßen, in Testmedium 1 oder Testmedium 3 zu wachsen, wurden einem weiteren Kultivierungsexperiment unterzogen. Hierbei wurde die optische Dichte nach 48-stündiger Kultivierungszeit bestimmt. Nach dieser zeigten die potentiellen Auxotrophie-Mutanten für Lysin ($\Delta lysA$) eine OD_{600} von 0,42 und jene für Isoleucin ($\Delta ilvA$) eine OD_{600} von 0,03 im Testmedium 1 (Abbildung 3-2, B). Dies ist ein Indiz dafür, dass diese Mutanten möglicherweise den Mangel der Aminosäure, für die eine Auxotrophie vermutet wurde, durch Umbau anderer Aminosäuren kompensieren konnten. Die vier Deletionsmutanten der Gene *argH*, *hisD*, *leuB* und *proC* hingegen wuchsen ausschließlich im Minimalmedium, das mit der für sie notwendigen Aminosäure komplementiert worden war (Abbildung 3-2, A; Testmedium 2). Somit zeigte sich, dass die Gene *argH*, *hisD*, *leuB* und *proC* dazu geeignet sind, diese in den Modellorganismen zu deletieren, um so eine entsprechende Auxotrophie zu generieren. Diese auxotrophen Mutanten stellen ferner geeignete Kandidaten zur Verwendung als Biosensoren dar, mit deren Hilfe die Menge der bioverfügbaren Aminosäuren (d.h. Arginin, Histidin, Leucin und Prolin) quantifiziert werden können.

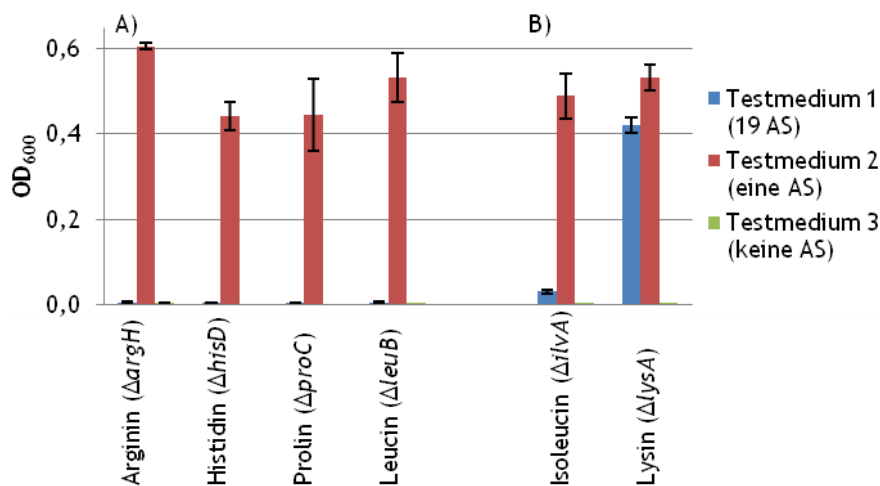


Abbildung 3-2: Wachstumstest der potentiellen Auxotrophie-Mutanten nach 48 h.

Ermittelte optische-Dichte (OD_{600} , Y-Achse) der entsprechende *E. coli*-Mutante der „Keio collection“ mit dem deletierten Gen (Klammerausdruck) nach 48-stündiger Kultivierung in Minimalmedium (MMAB+Malat), mit der angegebenen Aminosäure (Testmedium 2), ohne Aminosäuren (Testmedium 3) und mit allen Aminosäuren außer der angegebenen (Testmedium 1). Angegebener Fehlerbalken ist jeweils das 95% Konfidenzintervall einer Triplikatbestimmung.

3.2 Vergleich der Fluoreszenzintensität verschieden markierter *E. coli*

Um bei der phänotypischen Markierung der Aminosäurebiosensoren hinsichtlich der Auswahl an unterschiedlichen Fluoreszenzproteinen möglichst flexibel zu bleiben, stand aus jeder Spektralklasse die kodierende Sequenz eines der stärksten Fluoreszenzproteine nach Shaner *et al.* (2005) zur Verfügung. Dieser unterteilte die Fluoreszenzproteine in sechs Spektralklassen, wobei jede Klasse Licht einer anderen Farbe emittiert. Zudem stand noch ein durch UV-Licht anregbares, blaues Fluoreszenzprotein zur Verfügung (EBFP2).

Die kodierenden Sequenzen der Fluoreszenzproteine mCherry, mCerulean und EBFP2 wurden erfolgreich in die Expressionskassette zwischen die künstliche „Ribosome binding Site“ (RBSII) und die beiden Transkriptionsterminatoren (T_0 und T_1) im Plasmid

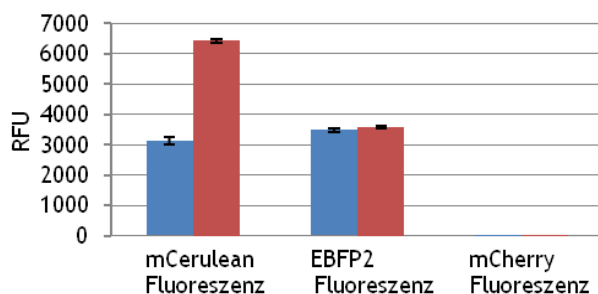


Abbildung 3-3: Fluoreszenzunterschied zwischen markierten und unmarkierten JW0336.

Dargestellt sind die relative Fluoreszenzeinheiten (Blaue Balken, RFU) des verwendeten *E. coli* JW0336 bei den Anregungs und Emissionswellenlängen der entsprechenden Fluoreszenzproteine (X-Achse), im Vergleich zu den mit den mit diesem Fluoreszenzproteinen markierten *E. coli* Stämmen nach einer 24-stündigen Wachstum in MMAB+Fruktose. Dargestellt sind Mittelwerte einer 18-fachen Bestimmung der relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) und die dazugehörigen 95% Konfidenzintervalle. mCerulean (Anregung 435 nm, Emission 477 nm) EBFP2 (Anregung: 383 nm, Emission 448 nm) mCherry (Anregung: 583 nm, Emission: 614 nm)

pJBA24 kloniert, wo sie unter der Kontrolle des LacZ-ähnlichen Promotors $P_{A1/04/03}$ stehen. Die Expressionskassetten für die drei Fluoreszenzproteine konnten nach Restriktion und anschließender Ligation mit *NotI* HF erfolgreich in pGRG36 umklontiert werden. Mit den drei daraus resultierenden pGRG36 Plasmiden (pGRG36_Plac_mcerulean, pGRG36_Plac_mcherry, pGRG36_Plac_EBFP2) wurde der *E. coli*-Stamm JW0336 ($\Delta lacI$) transformiert. Somit werden die inserierten Fluoreszenzproteine in diesem $\Delta lacI$ -Mutant konstitutiv exprimiert. Die Expressionskassette der Fluoreszenzproteine wurde durch die auf dem Plasmid kodierenden Transposasen ins Chromosom des Bakteriums inseriert und das Plasmid anschließend aus dem daraus resultierenden Stamm entfernt (2.2.7). Von den erhaltenen markierten Stämmen JW0336_attTn7::mcerulean, JW0336_attTn7::mcherry und JW0336_attTn7::EBFP2 wurden Wachstumskurven über einen Zeitraum von 24 h aufgenommen (Abbildung 3-5). Dabei wurde jeweils die spezifische Fluoreszenz und die OD in Intervallen von jeweils 15 min bestimmt. Die Fluoreszenzintensität der markierten Stämme wurde mit der Autofluoreszenz des unmarkierten Kontrollstammes (JW0336) nach 24 h verglichen. Dabei zeigte sich, dass der mit mCerulean markierte *E. coli*-Stamm (JW0336_attTn7::mcerulean) eine Verdopplung der Fluoreszenz gegenüber der Autofluoreszenz des unmarkierten Kontrollstammes aufwies (Abbildung 3-3). Die mit EBFP2 und mCherry markierten Stämme (JW0336_attTn7::EBFP2, JW0336_attTn7::mcherry) zeigten nur eine geringfügig höhere Fluoreszenz von jeweils circa 2 % und 45 % gegenüber der Autofluoreszenz des Kontrollstammes (Abbildung 3-3).

Die Fluoreszenzprotein-kodierenden Sequenzen stehen unter der Kontrolle eines vom LacZ abstammenden Promotors, dessen Transkriptionsaktivität durch das Genprodukt des *lacI*-Gens negativ reguliert wird. Da der hier verwendete Ausgangsstamm (JW0336) eine *lacI*-Deletionsmutante ist, werden die Fluoreszenzproteine konstitutiv exprimiert. In diesem Fall sollte die jeweilig emittierte Fluoreszenz der Proteine linear mit der

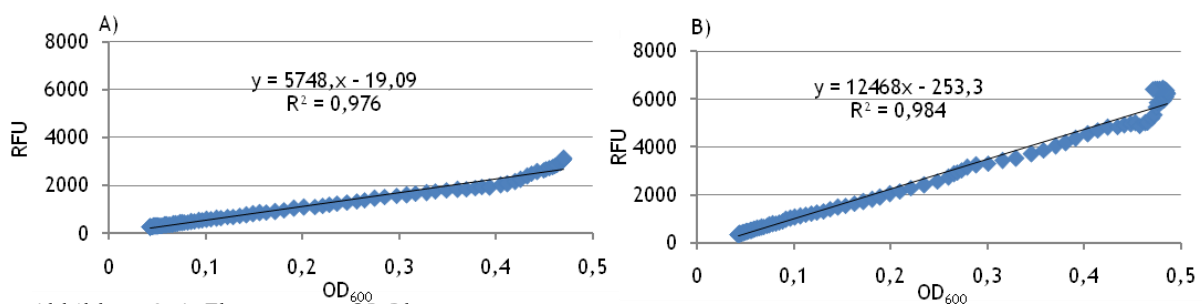


Abbildung 3-4: Fluoreszenz-OD Plot.

Hier wurden die mittlere optische Dichte (OD_{600}) gegenüber der mittleren relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) des unmarkierten Ausgangsstammes JW0336 (A) und des mit mCerulean markierten JW0336_attTn7::mcerulean (B) aufgetragen. Diese Daten wurden während eines 24-stündigen Wachstumsexperiments mit 18 Replikaten erhoben. RFU wurde mit den für mCerulean spezifischen Wellenlängen der Anregungs- und Emissionsmaxima bestimmt.

gemessenen OD korrelieren. Um dies zu überprüfen, wurden die relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) gegen die dazugehörigen OD-Werte aufgetragen (Abbildung

3-4). Tatsächlich zeigte die Fluoreszenz des mit mCerulean markierten Stammes eine lineare Korrelation mit den gemessenen OD_{600} -Werten ($R=0,984$). Im Wachstumsverlauf der fluoreszenzmarkierten *E. coli*-Kultur war jedoch zu beobachten, dass selbst nach Eintritt in die stationäre Phase die gemessene Fluoreszenzintensität weiterhin exponentiell zunahm (Abbildung 3-5, B). Ein ähnliches Verhalten konnte bei der unmarkierten *E. coli*-Kultur beobachtet werden (Abbildung 3-5, A).

Folglich wurde das Plasmid pGRG36_Plac_mcerulean zur Markierung der Aminosäurebiosensoren verwendet, da es die größten Differenzen zwischen der Fluoreszenz des mit mCerulean markierten *E. coli*-Stammes und der Eigenfluoreszenz des Kontrollstammes aufweist.

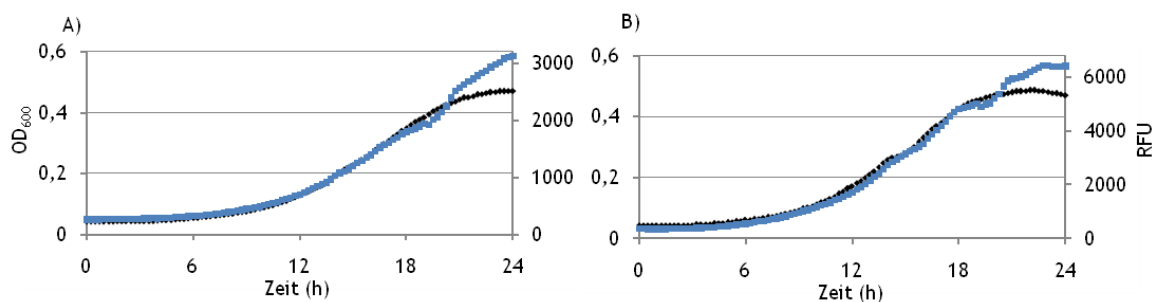


Abbildung 3-5: Wachstumskurve von markierten und unmarkierten *E. coli* JW0336.

Wachstumsverlauf der optische Dichte (OD_{600} , schwarze Vierecke, primäre Y-Achse) und relative Fluoreszenz Einheiten (RFU, blaue Vierecke, sekundäre Y-Achse) der mit mCerulean markierten JW0336_attTn7::Plac_mCerulean (A) und der unmarkierten JW0336. Dargestellt sind die Mittelwerte einer 18 fachen Bestimmung. RFU wurde mit den für mCerulean spezifischen Wellenlängen der Anregungs und Emissionsmaxima bestimmt.

3.3 Aminosäurebiosensoren

Die Deletionsmutanten JW3932 ($\Delta argH$), JW2002 ($\Delta hisD$), JW5807 ($\Delta leuB$) und JW0377 ($\Delta proC$) der „Keio collection“, für die nachgewiesen werden konnte, dass die Deletion eine Aminosäureauxotrophie zur Folge hat, wurden zur Entwicklung von Aminosäurebiosensoren verwendet. Da Prolin mit dem verwendeten HPLC-Verfahren nicht detektiert und quantifiziert werden konnte (2.2.10), wurde der Prolin-auxotrophe Stamm im Weiteren Verlauf nicht mehr verwendet. Somit wurde den Deletionsmutanten JW3932, JW2002 und JW0377 das Gen *lacI* zusätzlich deletiert, um eine konstitutive Expression des Fluoreszenzproteins zu gewährleisten. Unter Verwendung des Plasmids pGRG36_Plac_mcerulean wurden diese anschließend chromosomal mit der Plac_mCerulean Expressionskassette markiert (2.2.7). Mit den drei entstandenen fluoreszierenden Aminosäure sensitiven Biosensoren für Arginin (JW3932_ΔlacI_attTn7::mcerulean), Histidin (JW2002_ΔlacI_attTn7::mcerulean) und Leucin (JW5807_ΔlacI_attTn7::mcerulean) (Tabelle 3-3) wurden anschließend die jeweiligen Aminosäurekonzentrationen in den Überständen

der Modellorganismen nach 24- und 48-stündiger Kultivierungszeit bestimmt und die erhaltenen Werte mit denen der HPLC-Messungen verglichen.

Tabelle 3-3: Fluoreszenzmarkierte Aminosäurebiosensoren und deren Spezifikationen.

Stammname	deletierte Gene	Biosensor für:	<i>attTn7</i> markiert mit:
JW3932_Δ <i>lacl_attTn7::mcerulean</i>	<i>argH, lacl</i>	Arginin	Plac_mcerulean
JW2002_Δ <i>lacl_attTn7::mcerulean</i>	<i>hisD, lacl</i>	Histidin	Plac_mcerulean
JW5807_Δ <i>lacl_attTn7::mcerulean</i>	<i>leuB, lacl</i>	Leucin	Plac_mcerulean

3.3.1 Aminosäure abhängiges Wachstum der Biosensoren

Um die Aminosäurekonzentration in den Überständen der Modellorganismen zu quantifizieren, wurde zunächst eine Kalibrationsgerade erstellt, um später Rückschlüsse von der gemessenen Fluoreszenz auf die im Medium vorhandene Aminosäurekonzentration ziehen zu können. Hierzu wurden die drei fluoreszierenden Aminosäurebiosensoren für

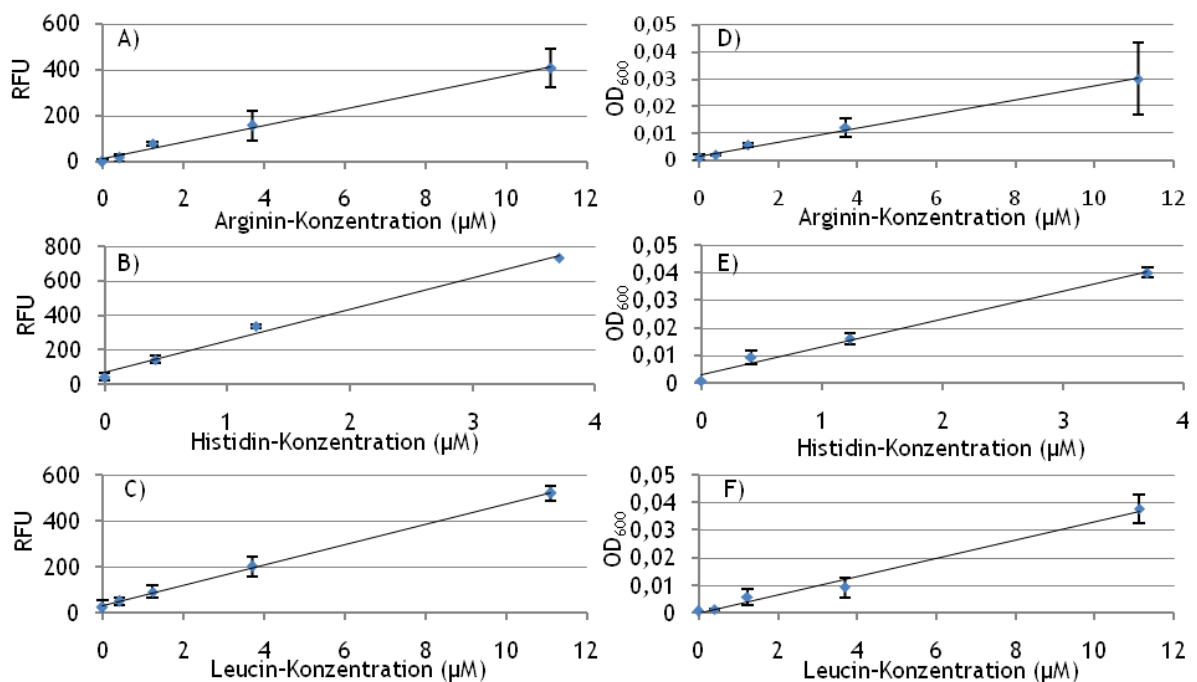


Abbildung 3-6: Kalibrationsgeraden der Aminosäurebiosensoren.

Die drei Aminosäurebiosensoren für Arginin (A, D), Histidin (B, E) und Leucin (C, F) wurden in Minimalmedium (MMAB+Fruktose) mit der jeweilig definierter Aminosäurekonzentration (X-Achse) kultiviert. Jeder Punkt repräsentiert dabei die Differenz der optischen Dichte (OD₆₀₀; D, E, F) oder der relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU; A, B, C) zwischen den Zeitpunkten t=24 h und t=0 h, die nach Abzug des Leerwertes gebildet wurden.

Arginin, Histidin und Leucin in Minimalmedium kultiviert, welches mit definierten Konzentrationen der entsprechenden Aminosäure komplementiert worden war. Die Endkonzentration der Aminosäure im eingesetzten Medium variierte von 0 µM bis 100 µM. Aus dem Differenzbetrag der Fluoreszenz- und OD-Werte nach 0 h und 24h Kultivierung wurde das Wachstumsverhalten in Abhängigkeit zu der jeweils komplementierten

Aminosäurekonzentration des jeweiligen Biosensors abgeleitet (Anhang: Abbildung 6-1). Der Bereich, in dem sich die OD₆₀₀ bzw. Fluoreszenz linear in Abhängigkeit der komplementierten Aminosäurekonzentration änderte, lag für den Arginin-bzw. Leucin-sensitiven Biosensor zwischen 0 µM und 11.1 µM. Für den Histidin-sensitiven Biosensor besteht dieser zwischen 0 µM bis 3,7 µM (Abbildung 3-6). Die für diesen Bereich ermittelte Regressionsgerade entspricht der Kalibrationsgeraden.

Die aus den Kalibrationsgeraden resultierenden Formeln (Tabelle 3-4) wurden dazu verwendet, die Aminosäurekonzentrationen in den Überständen der Modellorganismen über das Wachstum der darin kultivierten Biosensoren zu bestimmen. Das Bestimmtheitsmaß der Fluoreszenz- Kalibrationsgeraden betrug für die drei Biosensoren $R^2 > 0,99$ und für die OD-Kalibrationsgeraden $R^2 > 0,98$. Die dosisabhängigen Wachstumskurven zeigten, dass die *E. coli*-Biosensoren für Arginin und Leucin im Vergleich zum Biosensor für Histidin ungefähr vier Mal so viel von den jeweiligen Aminosäuren benötigten, um eine vergleichbare OD zu erreichen. Der Anstieg der Kalibrationsgeraden des Histidin-sensitiven Biosensors war dabei dreimal so hoch wie die der beiden anderen Biosensoren.

Tabelle 3-4: Formeln und Bestimmtheitsmaß R^2 der Trendlinien aus Abbildung 6-1.

	Gemessene Variable	Geradengleichung der Kalibrationsgeraden	Bestimmtheitsmaß R^2
Arginin	Fluoreszenz	$y=35,96x+14,88$	0,992
	OD	$y=0,0026x+0,0017$	0,997
Histidin	Fluoreszenz	$y=183,49x+69,96$	0,991
	OD	$y=0,0101x+0,0032$	0,989
Leucin	Fluoreszenz	$y=44,17x+33,38$	0,999
	OD	$y=0,0033x+0,0001$	0,986

3.3.2 Aminosäurequantifizierung mit *E. coli* Biosensoren

Die Quantifizierung der Konzentrationen von Arginin, Histidin und Leucin in den Überständen der Modellorganismen erfolgte mit zwei Methoden: a) als Einfachbestimmung mit der HPLC, sowie b) in Dreifachbestimmung mit den jeweiligen Aminosäurebiosensoren. Das Wachstum der Biosensoren wurde durch Messung der optischen Dichte und der Fluoreszenz des ins Chromosom inserierten mCeruleans bestimmt.

Die HPLC wurde mit einem kommerziell erhältlichen Aminosäuremix kalibriert. Die eingewogenen Aminosäure-Stammlösungen, die wiederum zur Kalibration der Biosensoren dienten, wurden zum Vergleich ebenfalls mit der HPLC vermessen. Dabei traten Differenzen zwischen erwarteter (eingewogener) und HPLC-quantifizierter

Aminosäurekonzentration auf. So waren die HPLC ermittelte Massen für Arginin und Leucin durchschnittlich um den Faktor 2,68 und die Masse an Histidin um den Faktor 2,77 kleiner als tatsächlich eingewogen wurden. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen beiden Methoden zu gewährleisten, erfolgte eine Messwertkorrektur der durch die HPLC-Messungen bestimmten Aminosäurekonzentration um den jeweiligen Faktor (die HPLC-Messwerte wurden mit entsprechenden Faktor multipliziert).

Die Mehrheit der ermittelten OD-Werte der Biosensoren, die in den Überständen der Modellorganismen kultiviert wurden, lagen innerhalb des vom Hersteller angegebenen Fehlerbereiches des Gerätes von 0,001. Somit sind die mittels der OD-ermittelten Aminosäurekonzentrationen nicht aussagekräftig und wurden daher in die weitere Auswertung nicht einbezogen. Die Fluoreszenzwerte der Aminosäurebiosensoren wurden dagegen ausgewertet und sind im Folgenden dargestellt.

A) Vergleich der Biosensorwerte mit den HPLC-Messungen

Die Berechnung der Aminosäurekonzentration anhand der Fluoreszenz der Aminosäurebiosensoren erfolgte nach der in 2.2.12 beschriebenen Methode. Anschließend wurden die berechneten Konzentrationen mit den per HPLC ermittelten Werten verglichen (Abbildung 3-7). Die beiden Proben wurden als übereinstimmend klassifiziert, wenn sich der mittels HPLC-erhobene Wert innerhalb des 99% Konfidenzintervalls der Biosensor-Messwerte befand. Das Konfidenzintervall berechnet sich anhand der Anzahl der Messwerte (3) und des verwendeten Konfidenzniveaus (0,01).

Allgemein betrachtet ergaben die ermittelten Aminosäurekonzentrationen der Biosensoren in sechs von 42 Fällen einen negativen Wert († in Abbildung 3-7). Am häufigsten wurde dies bei den Überständen von *Bacillus subtilis* (3mal) und *Pseudomonas fluorescens* PF5 (2mal) beobachtet. In Bezug auf die beiden Erntezeitpunkte tritt dies in den 24 h-Überständen häufiger (5mal) als in den 48 h-Überständen (2mal) auf. Beim Vergleich dieser 48 h-Überstände mit den äquivalenten 24 h-Überständen fällt auf, dass dort ein positiver Wert ermittelt wurde.

Der Vergleich der Aminosäurekonzentrationen, die mit der Fluoreszenz der Biosensoren und der HPLC ermittelt wurden, zeigte, dass 15 der HPLC-Werte innerhalb des 99% Konfidenzintervalls der Biosensoren lagen (* in Abbildung 3-7). Von den 27 ermittelten Biosensorwerten, die nicht mit denen der HPLC übereinstimmten, lag in 22 Fällen die ermittelte Aminosäurekonzentration unter den HPLC-Messwerten und in fünf Fällen darüber.

Beim Betrachten der Übereinstimmungen in Bezug auf die drei verschiedenen Biosensoren ist erkennbar, dass zehn von 15 Übereinstimmungen mit dem Argininsensitiven Biosensor bestimmt wurden (Abbildung 3-7, A und D). Dabei teilten sich die

Übereinstimmungen zu gleichen Teilen auf die beiden Erntezeitpunkte der Überstände auf, also nach 24 h und 48 h. Für den Histidin-sensitiven Biosensor wurden zwei Übereinstimmungen ermittelt (Abbildung 3-7, B und E), für den Leucin-sensitiven Biosensor waren es drei (Abbildung 3-7, C und F).

Werden die Übereinstimmungen nun in Bezug auf die Modellorganismen betrachtet, dann treffen vier Übereinstimmungen auf die Überstände von *P. putida* F1, drei auf *Acinetobacter baylyi* ADP1 und auf die restlichen Modellorganismen zwei bzw. eine zu.

Beachtet werden muss hierbei, dass die Streuung der Messwerte einen Einfluss auf die Übereinstimmung der Werte hat. Im nächsten Abschnitt wird daher die Übereinstimmung in Bezug auf die Streuung der Messwerte näher betrachtet.

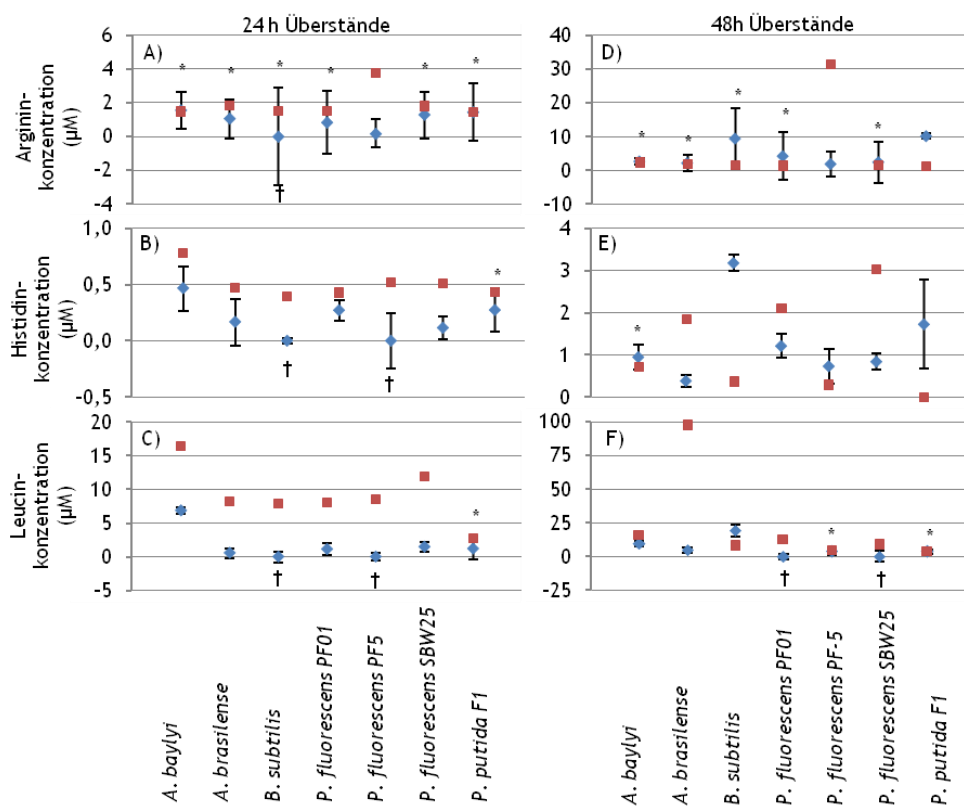


Abbildung 3-7: Vergleich der Aminosäurekonzentrationen, die mit den Biosensor und der HPLC ermittelt wurden.

Dargestellt sind die Aminosäurekonzentrationen, die mit der HPLC- (Rote Vierecke) und mit den Biosensoren- (Blaue Vierecke) ermittelt wurden. Die Aminosäurekonzentrationen wurden in den Überständen der dargestellten Modellorganismen nach 24- (24 h Überstände, A, B, C) bzw. 48 stündiger Kultivierung (48 h Überstände, D, E, F) geerntet. Dabei wurden die Konzentrationen der Aminosäuren Arginin (A, D), Histidin (B, E) und Leucin (C, F) mit den beiden Methoden bestimmt. Fehlerbalken repräsentieren das 99% Konfidenzintervall einer Dreifachbestimmung der Biosensoren.

* HPLC-Wert liegt innerhalb des 99% Konfidenzintervalls des Biosensors. † Errechneter Mittelwert der mittels Biosensor ermittelt wurde, wurde auf Null korrigiert, da er unter Null lag.

B) Messwertstreuung der Biosensoren

Die Streuung der Dreifachbestimmungen um den ermittelten Mittelwert ist ein Maß für die Reproduzierbarkeit der biosensorbasierten Aminosäurequantifizierung. Um zwischen den Messungen verschiedener Überstände, die sich durch die darin enthaltenen Aminosäure-

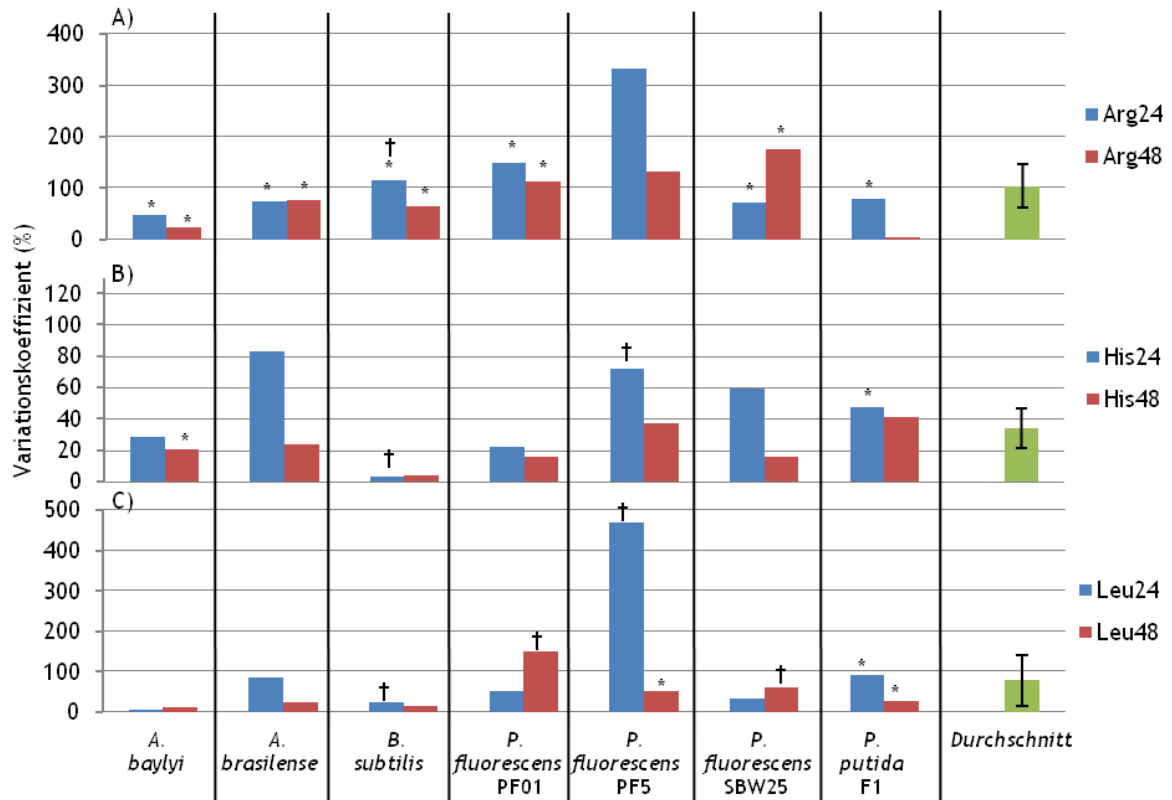


Abbildung 3-8 Variationskoeffizient der einzelnen Messung mit den Biosensoren:

Variationskoeffiziente der Dreifachbestimmung in den nach 24-stündiger Kultivierung geernteten Überständen (Blau) und in den nach 48-stündiger Kultivierung geernteten Überständen (Rot). Überstände dessen Aminosäurekonzentrationen mit denen der HPLC übereinstimmen (*) (aus Abbildung 3-7). Überstände bei denen der Mittelwert der Biosensor-ermittelten Aminosäurekonzentration negativ war (†) (für diese Darstellung wurde der Betrag des negativen Mittelwertes verwendet). Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren das 95% Konfidenzintervall.

A) Variationskoeffiziente der Dreifachbestimmung des Arginin-sensitiven Biosensors, der in den Überständen der Modellorganismen nach 24- (Arg24) und 48-stündiger Kultivierung (Arg48), kultiviert wurde.

B) Variationskoeffiziente der Dreifachbestimmung des Histidin-sensitiven Biosensors, der in den Überständen der Modellorganismen nach 24- (His24) und 48-stündiger Kultivierung (His48), kultiviert wurde.

C) Variationskoeffiziente der Dreifachbestimmung des Leucin sensitiven Biosensors, der in den Überständen der Modellorganismen nach 24- (Leu24) und 48-stündiger Kultivierung (Leu48), kultiviert wurde.

konzentrationen unterschieden, vergleichen zu können, wurde die Standardabweichung relativ zum Mittelwert in Form des Variationskoeffizienten analysiert (Abbildung 3-8). Auf diese Weise ist es möglich die Genauigkeit der einzelnen Messungen unabhängig von den absoluten Messwerten untereinander zu vergleichen. Insgesamt erstreckte sich der Variationskoeffizient zwischen $\pm 3\%$ bis $\pm 470\%$ um den jeweiligen Mittelwert. Auffällig ist, dass die Streuung in den 24 h-Überständen im Vergleich zu denen in den 48 h-Überständen in 15 von 21 Fällen größer ist.

Die Messungen des 24 h-Überstandes von *P. fluorescens* PF5 streute mit ± 333 % (Arginin), ± 71 % (Histidin) und ± 469 % (Leucin) insgesamt am stärksten. In diesen Überständen wurde mit dem Arginin-sensitiven Biosensor eine sehr geringe Aminosäurekonzentrationen von $0,17 \mu\text{M}$ bzw. keine Aminosäuren ermittelt (Histidin und Leucin). In den 24 h-Überständen von *B. subtilis* wurden ebenfalls keine Aminosäuren detektiert, die Streuung in diesen Überständen war aber im Vergleich zu *P. fluorescens* PF5 mit ± 116 % (Arginin), ± 3 % (Histidin) und ± 24 % (Leucin) relativ gering. Werden die Streuungen betrachtet, bei denen in Abbildung 3-7 eine Übereinstimmung festgestellt wurde, so differieren diese zwischen ± 30 % und ± 260 %.

Beim Vergleich des durchschnittlichen Variationskoeffizienten der drei verschiedenen Biosensoren war zu erkennen, dass der Histidin-sensitive Biosensor mit ± 34 % die geringste Streuung aufwies. Die Variationskoeffizienten des Arginin- und des Leucin-sensitiven Biosensor waren dreifach bzw. doppelt so hoch.

Um die Streuung zwischen den Modellorganismen zu vergleichen, wurden die Mittelwerte aller Variationskoeffizienten der jeweiligen Überstände gebildet (Abbildung 3-9). Bei dieser Analyse zeigte sich, dass sich die Streuung um die Mittelwerte der verschiedenen Überstände zwischen $\pm 44\%$ und $\pm 214\%$ bewegt. Die geringste mittlere

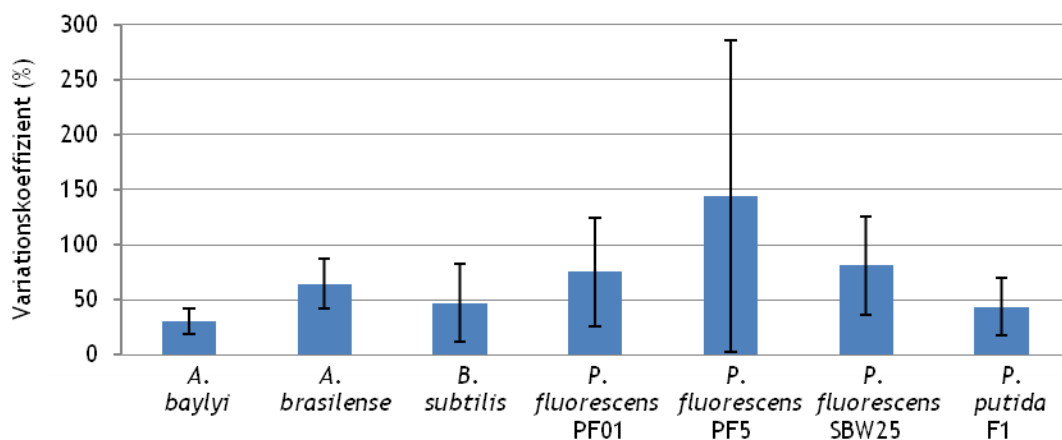


Abbildung 3-9: Variationskoeffizient der Biosensoren in den Überständen der Modellorganismen.

Ermittelt wurde der Variationskoeffizient aller Biosensor Messungen im Überstand eines Modellorganismus unabhängig von dem verwendeten Biosensor und dem Erntezeitpunkt der Überstände. Fehlerbalken repräsentieren die das 95 % Konfidenzintervall.

Streuung von $\pm 44\%$ wies dabei der Überstand von *A. baylyi* auf. Für die Überstände von *B. subtilis* und *P. putida* lag sich der mittlere Variationskoeffizient der Aminosäurekonzentrationen jeweils unter $\pm 70\%$. Die höchsten mittleren Streuungen von über ± 90 % wiesen die Aminosäurekonzentrationen auf, die in den Überständen der Pseudomonaden und *A. brasilense* gemessen wurden. Dabei variierte auch der Variationskoeffizient innerhalb der Überstände eines Modellorganismus sehr stark (Abbildung 3-9). Die größte Variation innerhalb des Variationskoeffizienten war bei

P. fluorescens PF5 zu finden. Dieses Ergebnis war abhängig von dem verwendeten Aminosäurebiosensor und dem Erntezeitpunkt des Überstandes (*P. fluorescens* PF5, Abbildung 3-9). Während die Variation innerhalb des Variationskoeffizienten bei allen Modellorganismen mehr als $\pm 40\%$ betrug, zeigte *A. baylyi* mit $\pm 20\%$ die kleinste Variation.

C) Abweichung zur HPLC

Die absolute Abweichung der Biosensor- zu den HPLC-ermittelten Werten repräsentiert die Differenz zwischen diesen. Eine negative Differenz bedeutet, dass die Konzentrationen, die mit den Biosensoren ermittelt wurden, im Vergleich zur HPLC geringer sind. Eine positive Differenz steht hingegen für einen höheren Biosensorwert.

In Bezug auf die drei verschiedenen Biosensoren wird deutlich, dass der Arginin- und Histidin-sensitive Biosensor die geringste Abweichung von jeweils $-1,15\ \mu\text{M}$ und $-0,17\ \mu\text{M}$ aufweist. Der Leucin-sensitive Biosensor zeigte hier die größte Abweichung von $-12,1\ \mu\text{M}$ (Abbildung 3-10).

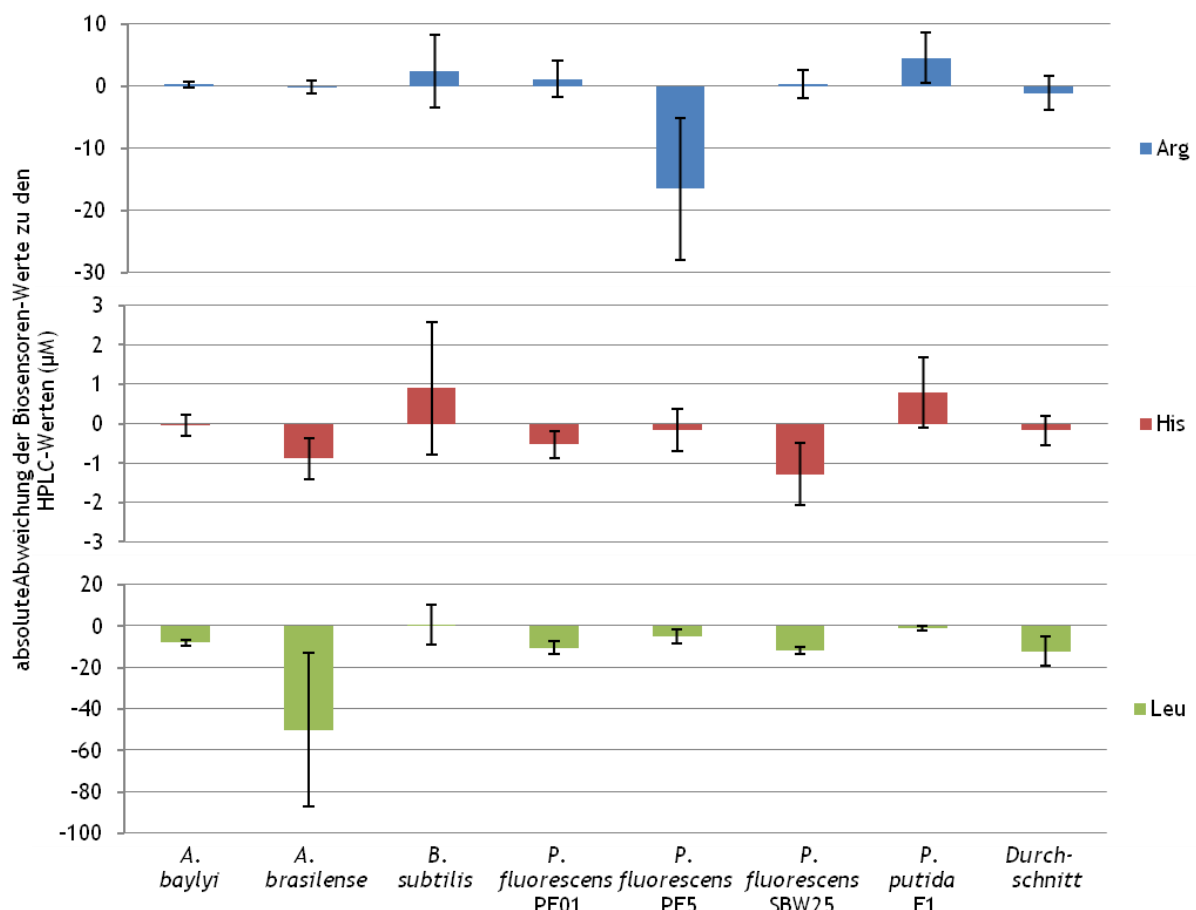


Abbildung 3-10: Absolute Abweichung der Biosensor zu den mit der HPL bestimmten Aminosäure Konzentrationen.

Dargestellt ist die Differenz des Arginin-sensitiven Biosensors (Arg), des Histidin-sensitiven Biosensors (His) und des Leucin-sensitiven Biosensors (Leu) zu den jeweils gemessenen HPLC-Werten (μM der jeweiligen Aminosäure). Die angegebenen Fehlerbalken repräsentieren das 95% Konfidenzintervall einer Dreifachbestimmung

Werden die absoluten Abweichungen in Bezug auf die einzelnen Modellorganismen betrachtet, so ist zu erkennen, dass *A. baylyi* und *P. fluorescens* PF01 die geringsten Abweichungen unabhängig von dem Biosensor aufweisen. Hingegen zeigen die Abweichungen der Modellorganismen *A. brasilense* und *P. fluorescens* SBW25 relativ große Abweichungen bei Histidin und Leucin, aber kleine Abweichungen bei Arginin. Ebenso zeigen *B. subtilis* und *P. putida* größere Abweichungen bei Arginin und Histidin, aber eher geringe bei Leucin. *P. fluorescens* PF5 zeigt bei Arginin die größte Abweichung aber bei den beiden anderen Aminosäure eher kleinere.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Beitrag zur Entwicklung eines Modellsystems zu leisten, mit dessen Hilfe die Untersuchung von Mechanismen die zur evolutionären Entstehung mutualistischer Interaktionen beitragen, möglich sein wird. Dieses Modellsystem soll auf einer wechselseitigen Aminosäure-Abhängigkeit zweier Bakterienarten beruhen, die Aminosäuren ins Medium abgeben und gleichzeitig auxotroph für eine Aminosäure sind.

4.1 Aminosäureauxotrophie

Für dieses Modellsystem war es zunächst notwendig, Gene zu identifizieren, die bei Deletion in den Modellorganismen eine Aminosäureauxotrophie erzeugen, d.h. für das Wachstum des auxotrophen Stammes in einem Minimalmedium essentiell sind. Dafür wurde zunächst eine *in silico*-Analyse durchgeführt, um potentielle Gene im Aminosäuremetabolismus ausfindig zu machen. In dieser Analyse konnten neun Aminosäuren ausgeschlossen werden, bei denen die Generierung einer Aminosäureauxotrophie mittels einer Gen-Deletion nicht möglich war. Für die verbleibenden elf Aminosäuren konnten entsprechende Gene identifiziert werden. Um den Phänotyp der entsprechenden Deletionsmutanten genauer zu charakterisieren, wurde zu diesem Zweck auf die „*Keio collection*“ zurückgegriffen. Dabei handelt es sich um eine Sammlung von *E. coli*-Deletionsmutanten, in denen u.a. auch die Gene des Aminosäuremetabolismus durch eine Antibiotikaresistenz substituiert wurden. Aus dieser Sammlung wurden die entsprechenden Mutanten ausgewählt und auf die betreffende Auxotrophie überprüft (2.2.5.3).

Gerdes *et al.* (2003) identifizierten essentielle Gene in *E. coli* ohne die der Organismus nicht fähig ist, in einem Vollmedium zu wachsen. Unter den in dieser Arbeit getesteten Mutanten mit den deletierten Genen *proC* und *cysB* stellte Gerdes *et al.* fest, dass diese Gene essentiell für *E. coli* sind. Dieser Befund konnte jedoch in dieser Diplomarbeit nicht bestätigt werden, da beide Mutanten ein Wachstum in mindestens einem der drei Minimalmedien zeigten (Abbildung 3-1). Auch konnte Baba *et al.* (2006) diesen Deletionsmutanten ein Wachstum in LB-Medium nachweisen. Daraus kann geschlussfolgert werden dass die Ursache hierfür in der Methodik liegt, mit der die Gene in den beiden Arbeiten deletiert wurden. Baba *et al.* substituierten jedes Gen durch eine

Kanamycin-Resistenzgen, Gerdes *et al.* hingegen unterbrachen den Leserahmen durch die Insertion des Kanamycin Resistenzgens.

Baba *et al.* (2006) bestimmten für alle Mutanten der „Keio collection“ das Wachstum in MOPS-Minimalmedium nach 24- und 48-stündiger Kultivierung. Dieser experimentelle Ansatz gibt aber keinen Aufschluss darüber, ob die Mutante nur für eine Aminosäure auxotroph ist. Da die Modellorganismen aber mehrere Aminosäuren ausscheiden, war eine zusätzliche Überprüfung des Wachstums in einem Minimalmedium notwendig, welches mit den 19 restlichen Aminosäuren supplementiert wurde (Testmedium 1). Damit sollte getestet werden ob der entsprechende Deletionsmutant nur für eine Aminosäure auxotroph war. Bei acht der 15 getesteten Deletionsmutanten konnte ein Wachstum nach 18 stündiger Kultivierung in Testmedium 1 festgestellt werden, aber keines in Minimalmedium ohne Aminosäuren (Testmedium 3). Dies lässt vermuten, dass die in diese Mutanten eingefügte Deletion eines Aminosäurebiosynthesegens eine Auxotrophie der entsprechenden Aminosäure verursacht, diese aber durch Modifikation anderer Aminosäuren kompensiert werden kann. Dabei zeigte der Mutant mit dem deletierten Gen *trpC* einen sehr hohen Fehler ($OD_{600}=0,075\pm 0,14$). Hier konnte nicht eindeutig gezeigt werden, dass dieser Mutant nur für eine Aminosäure auxotroph ist.

Die OD-Werte der Mutanten, die nach 18-stündiger Kultivierung in MMAB Minimalmedium ohne Aminosäuren (Abschnitt 3.1.2.1) getestet wurden, zeigten ähnliche Ergebnisse, wie jene von Baba *et al.* nach 24-stündiger Kultivierung in MOPS Minimalmedium. Eine Ausnahme stellten die beiden Deletionsmutanten der Cysteinbiosynthese Δ cysB und Δ cysE dar. Diese zeigten in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten ein deutlich höheres Wachstum als bei Baba *et al.* (2006) (Tabelle 6-1). Die Unterschiede hierfür lassen sich in der Wahl des Minimalmediums sowie in der Art der Kultivierung erklären (in dieser Arbeit wurden die Kulturen geschüttelt im Gegensatz zu Baba *et al.*).

Die Mutanten, die nur in Testmedium 2 (Minimalmedium mit einer, für den Mutant nötigen Aminosäure) Wachstum zeigten (3.1.2.1), wurden einem weiteren Wachstumstest unterzogen, wobei sie anstatt 18 h für 48 h kultiviert wurden. Dieses Experiment wurde durchgeführt, um eventuelle Änderungen auszuschließen die nach einer verlängerten Inkubation auftreten könnten. Nach dieser längeren Inkubationszeit stellte sich heraus, dass die Deletionsmutanten der Gene *lysA* und *ilvA* ein Wachstum in Testmedium 1 zeigten, was wiederum bedeutet, dass diese Deletionsmutanten andere Aminosäuren zu jener umbauen können, für die eine Auxotrophie vermutet wurde.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Deletionsmutanten der Gene *argH*, *hisD*, *leuB* und *proC* ausschließlich in Testmedium 2 (Minimalmedium mit der Aminosäure, für die Auxotrophie vermutet wurde) wuchsen, was dem gesuchten Wachstumsprofil entsprach. Diese Mutanten besaßen eine Aminosäureauxotrophie der Aminosäuren Arginin, Histidin, Leucin und Prolin. Da die Modellorganismen, die für die geplanten Evolutionsexperimente verwendet werden sollen, große Übereinstimmung hinsichtlich ihres Aminosäuremetabolismus aufweisen, ist es mit großer Wahrscheinlichkeit möglich, entsprechende Auxotrophien durch Ausschalten der oben genannten Gene zu erzeugen. Dennoch sollten die so hervorgerufenen Auxotrophien erneut getestet werden. Die identifizierten *E. coli* Auxotrophie-Mutanten wurden anschließend auf ihre Eignung als Aminosäurebiosensoren überprüft. Mit deren Hilfe wurde die Menge an bioverfügbaren Aminosäuren quantifiziert, die von den Modellorganismen ins Medium abgegeben wurden.

In anderen Arbeiten wurden zwar bereits Aminosäurebiosensoren für die Aminosäuren Cystein, Glutamin, Methionin, Lysin, Threonin und Tryptophan entwickelt (Chalova *et al.* 2009), Allerdings sind diese teilweise genetisch unzureichend charakterisiert und ausschließlich für den Einsatz als Biosensoren geeignet. In dieser Arbeit sollte aber jeweils ein Gen gefunden werden, dessen Deletion nur für eine Aminosäure eine Auxotrophie erzeugte. Dessen Deletionsmutanten sollten in Testmedium 1 kein Wachstum zeigen. Dies war nötig, weil die hier identifizierten Gene auch in den Modellorganismen ausgeschaltet werden sollen und diese in Evolutionsexperimenten mit anderen Modellorganismen co-kultiviert werden, die auch andere Aminosäure ausscheiden. Zudem sollte kein Wachstum nach 48 h Kultivierung zu ermitteln sein, da die Modellorganismen in Evolutionsexperimenten eingesetzt werden, die mehrere hundert bis tausend Generationen umfassen können. Für diese speziellen Anforderungen waren in der Literatur keine vergleichbaren Studien zu finden.

4.2 Entwicklung einer Markierungsstrategie

4.2.1 Markergene

Um in den zukünftigen Evolutions- und Fitnessexperimenten die Modellorganismen und die evolvierten von dem isogenen Ausgangstamm voneinander zu differenzieren sollten sie mit einem Gen markiert mit dem dies möglich ist. Bakterien können mit unterschiedlichen selektierbaren (1.7.1) und phänotypischen Markergenen markiert werden (1.7.2).

Bei der Markierung mit selektiven Markergenen wie z.B. Antibiotikaresistenzen können die Bakterien einer gemischten Suspension auf selektiven Agarplatten differentiell ausgezählt werden. Vorteilhaft an dieser Methode ist, dass große Häufigkeitsunterschiede zwischen zwei Bakterienstämmen sowie geringe Zellzahlen bestimmt werden können. Der Nachteil dieser Methode ist, der höhere Zeitaufwand, da für beide Bakterienstämme jeweils einmal ausplattiert werden muss. Um große Häufigkeitsunterschiede zwischen den beiden Bakterienstämmen genau bestimmen zu können, müssen aber zwei verschiedene Verdünnungen angefertigt werden. Die dabei entstehenden Zählungenauigkeiten potenzieren sich beim Vergleich der beiden unterschiedlichen Verdünnungen und werden somit sehr ungenau.

Die Markierung von Bakterien mit phänotypischen Markern wie z.B. dem Lux-Operon bietet den Vorteil, dass die gemischte Bakteriensuspension nur einmal ausplattiert werden muss, um die Zellzahl zweier verschiedener Bakterienstämme zu bestimmen. Somit ist der Fehler, der beim Verdünnen und Ausplattieren der Suspension entsteht, gleich groß. Allerdings hat diese Methode den Nachteil, dass bei einem stark asymmetrischen Verhältnis der beiden Stämme möglicherweise zu viele Bakterien von Stamm A und zugleich zu wenig oder gar keine Bakterien von Art B auf der Agarplatte vorhanden sind. In Evolutionsexperimenten besteht außerdem die Gefahr, dass sich unter den unmarkierten Stämmen markierte Stämme befinden, bei denen eine Mutation im Markergen aufgetreten ist. Deshalb sollten möglichst beide Bakterienstämme mit unterschiedlichen Markergenen markiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde sich für eine Markierung mit Fluoreszenzproteinen gearbeitet. Diese Proteine fluoreszieren, nachdem sie mit Licht einer spezifischen Wellenlänge angeregt wurden. Die daraus resultierende emittierte Fluoreszenz ist dabei für jedes Protein spezifisch. Durch die Wahl geeigneter Fluoreszenzproteine ist es möglich, eine Vielzahl von Bakterien zu markieren und in einer Flüssigkultur über ihre spezifische Fluoreszenz zu differenzieren. Dabei muss sichergestellt werden, dass die Anregungs- und Emissionsspektren der verwendeten Fluoreszenzproteine sich möglichst nicht überschneiden. Mit Hilfe eines Durchflusszytometers können anschließend die zwei unterschiedlichen Bakterienarten schnell und mit hoher Sensitivität differentiell quantifiziert werden. Die Markierung von Bakterien mit Fluoreszenzproteinen wurde bereits in anderen Evolutionsexperimenten angewandt (Gore *et al.* 2009; Lee *et al.* 2009).

Bei der Markierung der Aminosäurebiosensoren lag der Fokus darauf, deren Wachstum in Abhängigkeit von der im Medium enthaltenen Aminosäurekonzentration zu bestimmen. Das Wachstum von Aminosäurebiosensoren wurde in älteren Publikationen anhand der β -Galactosidase-Aktivität von *E. coli* oder durch Bestimmung der optischen

Dichte ermittelt. In späteren Publikationen wurde die Zelldichte über die Lichtemission der mit dem lux-Operon markierten Bakterien oder über die Fluoreszenz des ‚green fluorescent protein‘(GFP) bestimmt. Die einfachste und zugleich sensitivste dieser Methoden ist die Markierung der Biosensoren mit Fluoreszenzproteinen. Diese benötigen neben Sauerstoff keine weiteren spezifischen Substrate. Die Quantifizierung von Bakterien über die Fluoreszenz ist zudem sensitiver als die OD-Bestimmung, ferner kann die Fluoreszenz präzise gemessen werden (Hurst *et al.* 2002; Chalova *et al.* 2008). Die Quantifizierung der mit einem Fluoreszenzprotein markierten Aminosäurebiosensoren wurde mittels eines Spektrophotometer durchgeführt. Fluoreszenz-markierte Biosensoren wurde bereits in anderen Studien verwendet (Chalova *et al.* 2008; Tecon *et al.* 2009).

Der Promotor, unter dessen Kontrolle die Fluoreszenzproteine stehen, sollte dieses konstitutiv auf einem moderatem Level exprimieren. Eine zu starke Expression würde die Fitness der Modellorganismen beeinflussen, bei einem zu schwachen Promotor wäre hingegen die emittierte Fluoreszenz zu schwach und möglicherweise nicht ausreichend detektierbar. Zudem sollte sichergestellt werden, dass der Promotor in allen verwendeten Modellorganismen (Tabelle 1-2) funktionsfähig ist. Die Wahl des Promotors fiel daher in diesem Fall auf den LacZ abstammenden Promotor P_{A1/03/04}. (Lanzer und Bujard 1988). In Abwesenheit des Repressorgens (*lacI*) ist dieser Promotor konstitutiv (alle Modellorganismen aus Tabelle 1-2 sind *lacI* negativ). Er wurde bereits in vergangenen Studien zur Expression von GFP verwendet. Dabei wurde die Expressionskassette ins das bakterielle Chromosom von *E. coli* in einer Biosensor-Applikation (Chalova *et al.* 2008) sowie in *Pseudomonas putida* und *Pseudomonas fluorescens* (Andersen *et al.* 1998; Koch *et al.* 2001; Lambertsen *et al.* 2004) inseriert.

Unter Abwägung der Vor- und Nachteile fiel die Wahl in dieser Arbeit auf die Fluoreszenzproteine in Kombination mit dem genannten Promotor, um die Modellorganismen und Aminosäurebiosensoren zu markieren. Die hier verwendete Klonierungsstrategie basiert dabei auf der von Andersen *et al.* (1998). Die für ein Fluoreszenzprotein kodierende Sequenz wird hier zwischen eine künstliche ‚ribosome binding Site‘ (RBSII) und zwei Transkriptionsterminatoren T₁ und T₀ kloniert. Die oben genannte Promotorsequenz ist dabei vor der RBSII lokalisiert (2.2.6.8). Diese Expressionskassette wurde zur Markierung der Aminosäurebiosensoren verwendet und soll auch zur Markierung der Modellorganismen dienen.

4.2.2 Chromosomale Integration

Da die Modellorganismen in Evolutionsexperimenten eingesetzt werden, die sich teilweise über mehrere tausend Generationen erstrecken können, wurde die chromosomale Integration gegenüber der Transformation eines Reporterplasmids bevorzugt, um einen möglichen Verlust des Plasmids innerhalb der Populationen zu vermeiden. Bei der Markierung der Aminosäurebiosensoren war zudem eine einheitliche Markierung aller Zellen innerhalb einer Population von zentraler Bedeutung, welche bei einer plasmidbasierten Markierung aufgrund unterschiedlicher Kopienanzahl von Plasmiden nicht gewährleistet werden konnte. Daher sollte die oben beschriebene Expressionskassette in das bakterielle Chromosom integriert werden. Die am häufigsten verwendete Methode ist dabei die Transposon-vermittelte Insertion von Transgenen (1.7.3). Die Integration der oben genannten Expressionskassette wurde über ein Tn7-Transposon durchgeführt. Diese integrieren im Gegensatz zu anderen Transposons an eine spezifische Stelle des bakteriellen Chromosoms, dem *attTn7* Locus (Lichtenstein und Brenner 1982). Zudem unterbricht dieser Integrationsort kein funktionelles Gen und lässt somit das Bakterium in seinem Wachstum unbeeinträchtigt (Peters und Craig 2001). Das Vorhandensein dieses spezifischen Integrationslokusses, die stabile Insertion des Transgens sowie die Neutralität einer Tn7-vermittelten Markierung wurde bereits für verschiedene Bakterien dokumentiert: *P. fluorescens* (Barry 1986; Hojberg *et al.* 1999; Zuber *et al.* 2003), *P. putida* (Staley *et al.* 1997; Lambertsen *et al.* 2004), und *E. coli* (Lichtenstein und Brenner 1982; Grinter 1983).

4.3 Vergleich der Fluoreszenzintensitäten

Mit der oben beschriebenen Markierungsstrategie wurden *E. coli lacI*-Deletionsmutanten mit den Fluoreszenzgenen mCherry, EBFP2 und mCerulean markiert. Die Fluoreszenzintensitäten der drei markierten Stämme wurden mit dem unmarkierten Stamm verglichen. Dabei zeigten die mit mCherry und EBFP2 markierten *E. coli* einen sehr geringen Anstieg der Fluoreszenz gegenüber der Eigenfluoreszenz. Es wird allerdings bezweifelt, dass dieser Unterschied ausreichend ist, um die Bakterien damit zu differenzieren. Um die relativ schwache Fluoreszenz dieser beiden markierten Stämme zu steigern, sollte ein stärkerer Promotor verwendet werden. In zwei neueren Veröffentlichungen wurde der Promotor Ptac verwendet, um *mCherry* chromosomal zu exprimieren (Tecon *et al.* 2009; Lagendijk *et al.* 2010). Die so markierten *P. putida* Zellen (Lagendijk *et al.* 2010) konnten mit einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Ferner wurden die in gleicher Weise markierten *Burkholderia sartisoi* erfolgreich als Biosensor für Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe eingesetzt. Die Substitution dieses Promotors mit dem hier verwendeten könnte eine intensivere Fluoreszenz der so markierten Bakterien erzeugen.

Die mit mCerulean markierten *E. coli* hingegen fluoreszierten doppelt so intensiv wie die Kontrollprobe. Der gemessene Unterschied war somit ausreichend, um das Protein als Marker für die Aminosäurebiosensoren zu verwenden. Ob diese Differenz jedoch ausreichend ist, um dieses Protein als chromosomalen Marker für die Modellorganismen einzusetzen, sollte in zukünftigen Experimenten überprüft werden. Mit diesem Protein wurden im Anschluss die *E. coli*-Mutanten der „Keio collection“ mit den ausgeschalteten Genen *argH*, *hisD* und *leuB* chromosomal über ein mini-Tn7-Plasmid (pGRG36) markiert. Diese fluoreszierenden Aminosäurebiosensoren wurden dazu verwendet, die Bioverfügbarkeit der durch die Modellorganismen ins Medium abgegebenen Aminosäuren (Arginin, Histidin und Leucin) zu bestimmen.

Zu erwarten war, dass die Zellzahl in einer Kultur, die über die optische Dichte gemessen wurde linear mit der von mCerulean emittierten Fluoreszenz korreliert. Das berechnete Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,98$ (Abbildung 3-4) bestätigte diese Erwartung. Jedoch zeigte sich, dass die Fluoreszenz beim Eintreten der Bakterien in die stationäre Phase stärker zunahm als die optische Dichte. Dies könnte an dem relativ langen Zeitraum liegen, den mCerulean für die Ausbildung der vollen Fluoreszenz benötigt (Goedhart *et al.* 2010). Diese Möglichkeit erscheint angesichts der Tatsache, dass die unmarkierte Kontrollprobe ein ähnliches Muster zeigte, jedoch wenig plausibel. Höchstwahrscheinlich wurde dieses Muster durch fluoreszierende Sekundärmetabolite verursacht, welche möglicherweise erst bei Eintritt der Kultur in die stationäre Phase einsetzte. Belege hierfür konnten allerdings nicht gefunden werden.

4.4 Aminosäurebiosensoren

Mikrobielle Aminosäurebiosensoren sind aminosäure-auxotrophe Bakterien, deren Wachstumsverhalten von der im Medium vorliegenden Aminosäurekonzentration abhängig ist. Bisher wurden *E. coli*-Aminosäurebiosensoren hauptsächlich eingesetzt, um die Bioverfügbarkeit von Aminosäuren in Tiernahrung zu bestimmen (Hitchins *et al.* 1989; Froelich und Ricke 2005; Chalova *et al.* 2009). Im Gegensatz dazu wurden die in dieser Arbeit entwickelten fluoreszierenden Aminosäurebiosensoren dazu verwendet, die

Bioverfügbarkeit der durch die Modellorganismen ins Medium abgegebenen Aminosäuren (Arginin, Histidin und Leucin) zu bestimmen.

Zur Kalibration der Biosensoren wurden Aminosäuren eingewogen und in eine wässrige Lösung überführt. Die Biosensoren wurden anschließend in Minimalmedium mit definierten Aminosäurekonzentrationen ausgehend von der erwähnten Aminosäurelösung kultiviert. Die HPLC-Messungen hingegen wurden mit einem kommerziell erhältlichen Aminosäuremix kalibriert. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der beiden Methoden zu gewährleisten, wurden die eingewogenen Aminosäurelösungen, die zur Kalibration der Biosensoren dienten, mit der HPLC gemessen. Dabei stellte sich heraus, dass mit dieser Methode nur ca. 40 % der tatsächlich eingewogenen Aminosäuren nachgewiesen werden konnten. Dieser drastische Unterschied zwischen der Einwaage und der tatsächlichen gemessenen Aminosäurekonzentration kann nicht mit Fehlern in der Einwaage oder Degradation der Aminosäure erklärt werden, da alle drei Aminosäure um fast den gleichen Wert differieren. Eine Begründung der Unterschiede könnte in einer zu hohen Konzentration des Aminosäuremixes liegen, der für die Kalibration der HPLC verwendet wurde. Vielmehr aber kann die Ursache des Problems in der HPLC-Messanordnung liegen. Da die HPLC einen Tag vor der Messung der Proben und der eingewogenen Aminosäuren kalibriert wurde, könnte sich die Messanordnung der HPLC verändert haben (z.B. schwächere UV-Lampe im Vergleich zum Vortag). Um diesen fehlerhaften Wert der HPLC auszublenden, wurden die HPLC-Werte um den jeweiligen Faktor korrigiert (multipliziert). Um aber in Zukunft diese Art von Fehler zu vermeiden, sollte ein interner Standard bei jeder Messung mitgeführt werden, der bei jeder Messung mitgeführt wird und damit solche eventuellen Veränderungen in der Messanordnung aufzeigt (Graser *et al.* 1985).

Die mCerulean-markierten Arginin-, Histidin- und Leucin-sensitiven Biosensoren wurden in den Überständen (nach 24 h und 48 h Kultivierung) der Modellorganismen kultiviert. Die jeweilige Aminosäurekonzentration wurde dabei über die Änderung der emittierten Fluoreszenz bzw. OD der Biosensoren bestimmt. Die OD-Änderungen der Biosensoren waren in mehr als 70 % der gemessenen Überstände so gering, dass sie innerhalb des vom Hersteller angegebenen gerätetypischen Messschwankungen lagen und deshalb nicht weiter ausgewertet wurden. Die Fluoreszenzwerte hingegen lagen nahezu vollständig innerhalb der jeweiligen Kalibrationsgeraden.

Beim Vergleich der Aminosäurekonzentrationen, die mit der HPLC und den Biosensoren in den Überständen der Modellorganismen gemessen wurden, zeigt sich, dass die Übereinstimmungen (Abbildung 3-7) von den gemessenen Aminosäuren abhängig sind. Somit lässt sich annehmen, dass einige Biosensoren genauer messen als andere. Beim Betrachten der durchschnittlichen Variationskoeffizienten (Abbildung 3-8) und Anstiege der

jeweiligen Kalibrationsgeraden (Tabelle 3-4) wurde deutlich, dass ein größerer Anstieg einen kleineren Variationskoeffizienten nach sich zog. Dieser Zusammenhang lässt sich damit erklären, dass die gemessenen Unterschiede in der Fluoreszenz zwischen gleicher zugegebener Aminosäurekonzentration bei einem steileren Anstieg größer sind als bei einem flachen. Daher ist mit einer steileren Kalibrationsgeraden eine sensitivere und präzisere Messung möglich, da die gerätespezifischen Messschwankungen einen kleineren Einfluss haben. Die Unterschiede in den Anstiegen der jeweiligen Biosensoren lässt sich durch eine unterschiedliche Aufnahmegeschwindigkeit der Aminosäure, sowie dem unterschiedlich großen Bedarf dieser erklären (Kramer 1994; Okayasu *et al.* 1997). Somit haben die unterschiedlichen Aminosäurebiosensoren einen Einfluss auf die Präzision der Messung der jeweiligen Aminosäuren.

Ein größerer Anstieg der Kalibrationsgeraden kann durch eine Wachstums-optimierung der Biosensoren erreicht werden. So würde das Schütteln der Biosensorkultur den Sauerstoffeintrag erhöhen, damit reduziert sich nicht nur die Messzeit sondern lässt auch das Wachstum einer höheren Zelldichte zu (Li *et al.* 2000). Die Arbeitsgruppe um Chalova (2008) entwickelte als einzige auch einen Fluoreszenz-markierten Aminosäurebiosensor, dieser war für Lysin sensitiv. Die Markierung wurde mit GFPmut3 chromosomal über ein mini Tn5-Plasmid vorgenommen und stand unter der Kontrolle desselben Promotors, der auch in dieser Arbeit verwendet wurde. Chalova (2008) erreichte einen Anstieg der Fluoreszenz-Kalibrationsgeraden von 2098 RFU/mol Aminosäure und in der OD-Kalibrationsgeraden von 0,028 OD/mol Aminosäure. Damit liegt der Anstieg der OD-Kalibrationsgeraden im Vergleich zu dem in dieser Arbeit entwickelten Histidin-sensitiven Biosensor um fast das Dreifache höher, der Anstieg der Fluoreszenz-Kalibrationsgeraden um das 11-fache. Diese Unterschiede lassen sich zum einen durch die oben genannten Gründe erklären und zum anderen durch die höhere Fluoreszenzintensität des GFPmut3 im Vergleich zu mCerulean (Shaner *et al.* 2005).

Somit würde die Markierung der Biosensoren mit einem intensiver fluoreszierenden Protein und einer Wachstumsoptimierung einen steileren Anstieg der Kalibrationsgeraden bewirken und damit präzisere Messergebnisse erzielen.

Insgesamt konnte allerdings kein Muster erkannt werden, welches eine Abhängigkeit des Variationskoeffizienten von dem Überstand, in dem die Biosensoren kultiviert wurden (3.3.2-B) bestätigen würde. Die Mittelwerte liegen zwar teilweise weit auseinander, unterscheiden sich aber nicht stark genug voneinander (Abbildung 3-9). Die Betrachtung des Variationskoeffizienten in Abhängigkeit der beiden Erntezeitpunkte macht aber deutlich, dass dieser sich in mehr als 70 % der Fälle verkleinert (Abbildung 3-8). Dies lässt

sich durch die durchschnittliche Zunahme der Aminosäurekonzentration in den Überständen erklären und eine damit verbundene sensitivere Messung.

In Bezug auf die Messabweichung der beiden Methoden voneinander kann gesagt werden, dass alle Biosensoren im Durchschnitt zu wenig messen (3.3.2). Die mit Abstand größte Abweichung ist allerdings beim Leucin-sensitiven Biosensor zu beobachten. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Modellorganismen neben der Aminosäure Leucin auch Norleucin ausscheiden, welches in der HPLC-Bestimmung aufgrund gleicher Retentionszeiten nicht diskriminierbar ist. Dies wurde bei späteren Messungen mit einem Triple Quadrupol-Spektrometer, das diese beiden Stoffe getrennt voneinander detektieren konnte, erkannt. Die Leucin-sensitiven Biosensoren können allerdings Norleucin nicht als Leucin-Analogon verwenden, wodurch dieser drastische Unterschied hervorgerufen wird. Die durchschnittlichen Abweichungen der beiden anderen Biosensoren waren im Gegensatz dazu relativ gering.

Ob die Überstände der einzelnen Modellorganismen einen Einfluss auf das Wachstum der Biosensoren haben, ist nicht festzustellen. Dies wäre an den Abweichungen der Biosensorwerte von den HPLC-Werten zu sehen. Bei einer erheblichen einheitlichen negativen Abweichung aller drei Biosensoren könnte vermutet werden, dass der Überstand das Wachstum dieser negativ beeinflusst, gleiches gilt für positive Abweichungen. Die Abweichungen der drei Aminosäurebiosensoren scheinen aber zufällig mal mehr und mal weniger, mal positiv und mal negativ um den Nullpunkt zu variieren (Abbildung 3-10). In Agardiffusionstests konnte gezeigt werden, dass die Überstände der Modellorganismen das Wachstum von *E. coli* nicht hemmen (Holger Merker, unpublizierte Daten). Allerdings schließt dies nicht aus, dass die Überstände einen wachstumsfördernden Einfluss auf die Biosensoren haben. Dass keine dieser beiden Fälle zutrifft, kann mit hoher Sicherheit nur vom *A. baylyi*-Überstand gesagt werden. Die Ursache hierfür ist darin zu sehen, dass mit Ausnahme des Leucin-sensitiven Biosensors die erhobenen Messwerte der Biosensoren, die in diesem Überstand kultiviert wurden, den kleinsten Variationskoeffizienten und zugleich die geringsten Abweichungen gegenüber den HPLC-Werten aufweisen. Bei den restlichen Überständen der Modellorganismen kann diese Feststellung weniger eindeutig getroffen werden. Im Überstand von *B. subtilis* wurden in der Vergangenheit *E. coli*-Zellen kultiviert, dabei wurde aber kein Einfluss auf das Wachstum festgestellt (Fukuda *et al.* 2008). Bei Pseudomonaden hingegen ist ein negativer Einfluss auf das Wachstum von *E. coli* wahrscheinlicher, da diese Bakteriozine ausscheiden, die das Wachstum von *E. coli* hemmen könnten (Parret und De Mot 2002; Parret *et al.* 2005). Deshalb sollte untersucht werden, ob im Überstand Substanzen enthalten sind, die das Wachstum der auxotrophen *E. coli*-Aminosäurebiosensoren beeinflussen. Dies könnte durch einem Zusatz einer

definierten Aminosäurekonzentration zum Überstand erreicht werden. Auf diese Weise könnte das Wachstum des Biosensors mit dem Wachstum ohne Aminosäurezusatz verglichen werden.

Mit den hier entwickelten Biosensoren war es dennoch möglich, Aminosäuren zu quantifizieren, die durch Modellorganismen ausgeschieden werden. Damit stellt diese Methode eine Alternative zur HPLC-Messung dar. Um aber eine sensitivere und präzisere Messung zu gewährleisten, sollten die in diesem Abschnitt aufgeführten Verbesserungen eingeführt werden.

5 Ausblick

Die in dieser Arbeit identifizierten essentiellen Aminosäurebiosynthesegene bilden die Grundlage für das zu entwickelnde Modellsystem. Des Weiteren wurde die Menge der jeweiligen Aminosäuren quantifiziert, die von den Modellorganismen ins umgebende Medium abgegeben werden. Die nächsten, zur Fertigstellung des Modellsystems notwendigen Schritte bestehen darin, eine geeignete Kombination unterschiedlicher bakterieller Species anhand ihrer jeweiligen Aminosäureausscheidung zu identifizieren. Hierzu wird es notwendig sein die involvierten Bakterienstämme mit der hier beschriebenen Markierungsstrategie in Kombination mit geeigneten Fluoreszenzproteinen zu markieren.

Die hier entwickelten Biosensoren stellen eine methodische Alternative zur HPLC-basierten Aminosäurequantifizierung dar. Hierbei könnten die Biosensoren zur Hochdurchsatzquantifizierung von Aminosäuren eingesetzt werden, die von den jeweiligen Modellorganismen ausgeschieden werden. Hauptvorteil gegenüber der HPLC-basierten Messung ist, dass die Biosensoren eventuell auch in unsterilen Überstand der Bakterien eingesetzt werden kann. Somit würde der Zeitaufwendigste Arbeitsschritt, das sterilfiltrieren der Überstände, wegfallen. Ob dies möglich ist muss aber noch getestet werden.

6 Anhang

Tabelle 6-1: OD-Werte der Deletionsmutanten nach Wachstum in Minimalmedium

Deletionsmutante n	OD nach 18 h Kultivierung in MMAB+Malat*	OD nach 48 h Kultivierung in MMAB+Malat*	OD nach 24 h Kultivierung in MOPS+Glukose**	OD nach 48 h Kultivierung in MOPS+Glukose**
$\Delta argH$	0,000	0,002	0,002	0,001
$\Delta hisD$	0,002	0,001	0,010	0,002
$\Delta ilvA$	0,005	0,004	0,014	0,014
$\Delta leuB$	0,002	-0,006	0,018	0,033
$\Delta lysA$	0,006	0,003	0,012	0,021
$\Delta proC$	0,002	0,003	0,002	0,001
$\Delta metA$	0,018		0,014	0,012
$\Delta metB$	0,010		0,042	0,046
$\Delta cysB$	0,181		0,006	0,007
$\Delta cysE$	0,077		0,008	0,018
$\Delta pheA$	0,003		0,048	0,185
$\Delta trpB$	0,019		0,008	0,023
$\Delta trpC$	0,002		0,005	0,029
$\Delta trpD$	0,050		0,030	0,039
$\Delta tyrA$	0,001		0,006	0,016

* OD-Werte wurden in dieser Arbeit generiert

** OD-Werte aus Baba *et al.* (2006) Kultivierung in MOPS Minimalmedium mit Glukose

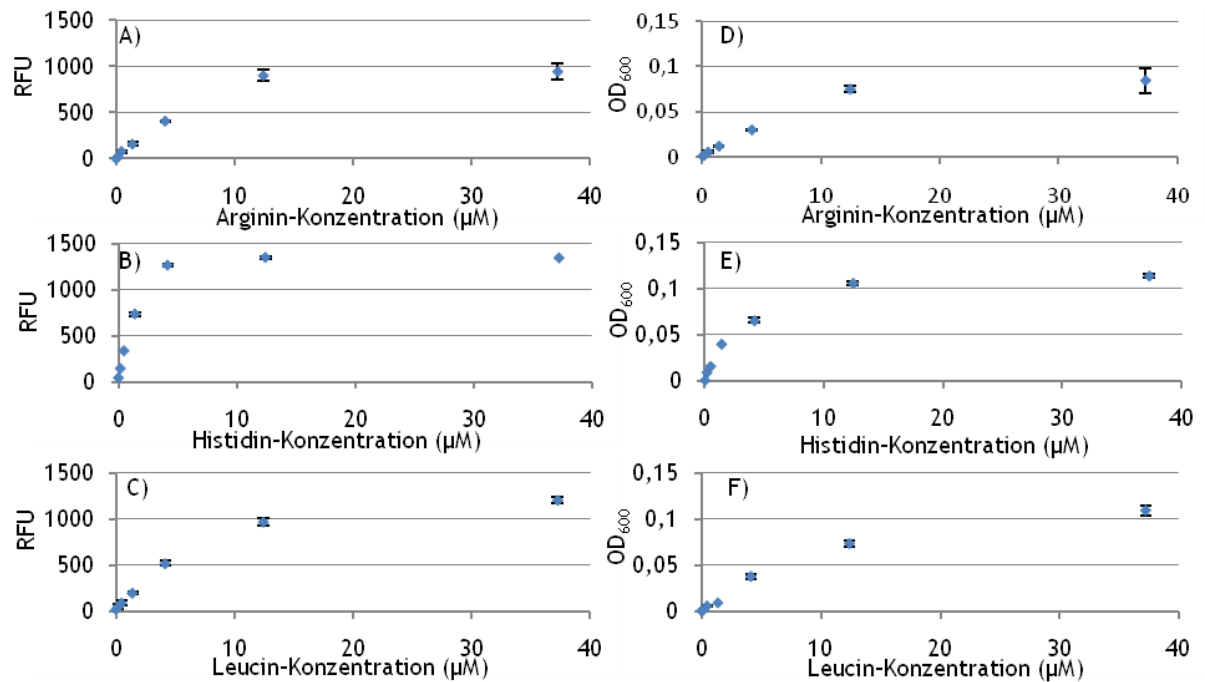


Abbildung 6-1: Wachstumverhalten der drei Aminosäurebiosensoren in Abhängigkeit von der zugegebenen Aminosäurekonzentration

Die drei Aminosäurebiosensoren für Arginin (A, D), Histidin (B, E) und Leucin (C, F) wurden in Minimalmedium (MMAB+Fruktose) mit der jeweilig definierter Aminosäurekonzentration (X-Achse) kultiviert. Jeder Punkt repräsentiert dabei die Differenz der optischen Dichte (OD_{600} ; D, E, F) oder der relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU; A, B, C) zwischen den Zeitpunkten $t=24$ h und $t=0$ h, die nach Abzug des Leerwertes gebildet wurden

7 Literaturverzeichnis

- Andersen, J. B., C. Sternberg, L. K. Poulsen, S. P. Bjorn, M. Givskov und S. Molin (1998). "New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria." Applied and Environmental Microbiology **64**(6): 2240-2246.
- Baba, T., T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner und H. Mori (2006). "Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection." Molecular Systems Biology **2**.
- Bainton, R. J., K. M. Kubo, J. N. Feng und N. L. Craig (1993). "TN7 TRANSPOSITION - TARGET DNA RECOGNITION IS MEDIATED BY MULTIPLE TN7-ENCODED PROTEINS IN A PURIFIED INVITRO SYSTEM." Cell **72**(6): 931-943.
- Baird, G. S., D. A. Zacharias und R. Y. Tsien (2000). "Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**(22): 11984-11989.
- Barrick, J. E., D. S. Yu, S. H. Yoon, H. Jeong, T. K. Oh, D. Schneider, R. E. Lenski und J. F. Kim (2009). "Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with Escherichia coli." Nature **461**(7268): 1243-U1274.
- Barry, G. F. (1986). "PERMANENT INSERTION OF FOREIGN GENES INTO THE CHROMOSOMES OF SOIL BACTERIA." Bio-Technology **4**(5): 446-449.
- Barth, P. T., N. Datta, R. W. Hedges und N. J. Grinter (1976). "TRANSPOSITION OF A DEOXYRIBONUCLEIC-ACID SEQUENCE ENCODING TRIMETHOPRIM AND STREPTOMYCIN RESISTANCES FROM R483 TO OTHER REPLICONS." Journal of Bacteriology **125**(3): 800-810.
- Blackmore, J. A. und T. E. Parry (1972). "MICROBIOLOGICAL ASSAY OF AMINO-ACIDS IN SERUM - VALINE, LEUCINE, AND METHIONINE." Journal of Clinical Pathology **25**(2): 171-&.
- Bousse, L. (1996). "Whole cell biosensors." Sensors and Actuators B-Chemical **34**(1-3): 270-275.
- Bousse, L., R. J. McReynolds, G. Kirk, T. Dawes, P. Lam, W. R. Bemiss und J. W. Farce (1994). "MICROMACHINED MULTICHANNEL SYSTEMS FOR THE MEASUREMENT OF CELLULAR-METABOLISM." Sensors and Actuators B-Chemical **20**(2-3): 145-150.
- Breslauer, K. J., R. Frank, H. Blocker und L. A. Marky (1986). "PREDICTING DNA DUPLEX STABILITY FROM THE BASE SEQUENCE." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **83**(11): 3746-3750.
- Bronstein, J. L. (1994). "CONDITIONAL OUTCOMES IN MUTUALISTIC INTERACTIONS." Trends in Ecology & Evolution **9**(6): 214-217.
- Bronstein, J. L. (1994). "OUR CURRENT UNDERSTANDING OF MUTUALISM." Quarterly Review of Biology **69**(1): 31-51.
- Bull, J. J. und W. R. Rice (1991). "Distinguishing mechanisms for the evolution of cooperation." Journal of Theoretical Biology **149**(1): 63-74.
- Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward und D. C. Prasher (1994). "GREEN FLUORESCENT PROTEIN AS A MARKER FOR GENE-EXPRESSION." Science **263**(5148): 802-805.

- Chalova, V. I., S. A. Sirsat, C. A. O'Bryan, P. G. Crandall und S. C. Ricke (2009). "Escherichia coli, an Intestinal Microorganism, as a Biosensor for Quantification of Amino Acid Bioavailability." Sensors **9**(9): 7038-7057.
- Chalova, V. I., C. L. Woodward und S. C. Ricke (2009). "Induction of cadBA in an Escherichia coli lysine auxotroph transformed with a cad-gfp transcriptional fusion." Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology **95**(4): 305-310.
- Chalova, V. I., I. B. Zabala-Diaz, C. L. Woodward und S. C. Ricke (2008). "Development of a whole cell green fluorescent sensor for lysine quantification." World Journal of Microbiology & Biotechnology **24**(3): 353-359.
- Cheney, K. L. und I. M. Cote (2005). "Mutualism or parasitism? The variable outcome of cleaning symbioses." Biology Letters **1**(2): 162-165.
- Cody, C. W., D. C. Prasher, W. M. Westler, F. G. Prendergast und W. W. Ward (1993). "CHEMICAL-STRUCTURE OF THE HEXAPEPTIDE CHROMOPHORE OF THE AEQUOREA GREEN-FLUORESCENT PROTEIN." Biochemistry **32**(5): 1212-1218.
- Cramer, A., E. A. Whitehorn, E. Tate und W. P. C. Stemmer (1996). "Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling." Nature Biotechnology **14**(3): 315-319.
- Cubitt, A. B., R. Heim, S. R. Adams, A. E. Boyd, L. A. Gross und R. Y. Tsien (1995). "UNDERSTANDING, IMPROVING AND USING GREEN FLUORESCENT PROTEINS." Trends in Biochemical Sciences **20**(11): 448-455.
- Elena, S. F. und R. E. Lenski (2003). "Evolution experiments with microorganisms: The dynamics and genetic bases of adaptation." Nature Reviews Genetics **4**(6): 457-469.
- Froelich, C. A. und S. C. Ricke (2005). "Rapid bacterial-based bioassays for quantifying methionine bioavailability in animal feeds: A review." Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology **13**(1): 1-10.
- Fukuda, T., S. Yamamoto und H. Morita (2008). "Changes in the antibiotic production by co-culture of Rhizopus peka P8 and Bacillus subtilis IFO3335." World Journal of Microbiology & Biotechnology **24**(9): 1893-1899.
- Goedhart, J., L. van Weeren, M. A. Hink, N. O. E. Vischer, K. Jalink und T. W. J. Gadella (2010). "Bright cyan fluorescent protein variants identified by fluorescence lifetime screening." Nature Methods **7**(2): 137-U174.
- Gonzalezlopez, J., M. V. Martinez toledo, B. Rodelas, C. Pozo und V. Salmeron (1995). "PRODUCTION OF AMINO-ACIDS BY FREE-LIVING HETEROTROPHIC NITROGEN-FIXING BACTERIA." Amino Acids **8**(1): 15-21.
- Gore, J., H. Youk und A. van Oudenaarden (2009). "Snowdrift game dynamics and facultative cheating in yeast." Nature **459**(7244): 253-256.
- Graser, T. A., H. G. Godel, S. Albers, P. Foldi und P. Furst (1985). "AN ULTRA RAPID AND SENSITIVE HIGH-PERFORMANCE LIQUID-CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR DETERMINATION OF TISSUE AND PLASMA-FREE AMINO-ACIDS." Analytical Biochemistry **151**(1): 142-152.
- Greer, L. F. und A. A. Szalay (2002). "Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review." Luminescence **17**(1): 43-74.
- Grinter, N. J. (1983). "A BROAD-HOST-RANGE CLONING VECTOR TRANSPOSABLE TO VARIOUS REPLICONS." Gene **21**(1-2): 133-143.
- Heim, R., A. B. Cubitt und R. Y. Tsien (1995). "IMPROVED GREEN FLUORESCENCE." Nature **373**(6516): 663-664.

- Heim, R., D. C. Prasher und R. Y. Tsien (1994). "WAVELENGTH MUTATIONS AND POSTTRANSLATIONAL AUTOXIDATION OF GREEN FLUORESCENT PROTEIN." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**(26): 12501-12504.
- Hitchins, A. D., F. E. McDonough und P. A. Wells (1989). "THE USE OF ESCHERICHIA-COLI MUTANTS TO MEASURE THE BIOAVAILABILITY OF ESSENTIAL AMINO-ACIDS IN FOODS." Plant Foods for Human Nutrition **39**(1): 109-120.
- Hojberg, O., U. Schnider, H. V. Winteler, J. Sorensen und D. Haas (1999). "Oxygen-sensing reporter strain of *Pseudomonas fluorescens* for monitoring the distribution of low-oxygen habitats in soil." Applied and Environmental Microbiology **65**(9): 4085-4093.
- Hurst, C. J., R. L. Crawford, G. R. Knudsen, M. J. McInerney und L. D. Stetzenbach (2002). "Manual of environmental microbiology. Second Edition." Manual of environmental microbiology. Second Edition: i-xviii, 1-1137.
- Ingraham, J. L., O. Maaloe und F. C. Neidhardt (1983). "GROWTH OF THE BACTERIAL CELL." Ingraham, J. L., O. Maaloe and F. C. Neidhardt. Growth of the Bacterial Cell. Xi+435p. Sinauer Associates, Inc.: Sunderland, Mass., USA. Illus: XI+435P.
- Inouye, S. und F. I. Tsuji (1994). "AEQUOREA GREEN FLUORESCENT PROTEIN - EXPRESSION OF THE GENE AND FLUORESCENCE CHARACTERISTICS OF THE RECOMBINANT PROTEIN." Febs Letters **341**(2-3): 277-280.
- Jones, B. N., S. Paabound S. Stein (1981). "AMINO-ACID-ANALYSIS AND ENZYMATIC SEQUENCE DETERMINATION OF PEPTIDES BY AN IMPROVED ORTHO-PHTHALDIALDEHYDE PRE-COLUMN LABELING PROCEDURE." Journal of Liquid Chromatography **4**(4): 565-586.
- Kahn, T. W., R. N. Beachy und M. M. Falk (1997). "Cell-free expression of a GFP fusion protein allows quantitation in vitro and in vivo." Current Biology **7**(4): R207-R208.
- Kanehisa, M. und S. Goto (2000). "KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes." Nucleic Acids Research **28**(1): 27-30.
- Keseler, I. M., C. Bonavides-Martinez, J. Collado-Vides, S. Gama-Castro, R. P. Gunsalus, D. A. Johnson, M. Krummenacker, L. M. Nolan, S. Paley, I. T. Paulsen, M. Peralta-Gil, A. Santos-Zavaleta, A. G. Shearer und P. D. Karp (2009). "EcoCyc: A comprehensive view of *Escherichia coli* biology." Nucleic Acids Research **37**: D464-D470.
- King, J. M. H., P. M. Digrazia, B. Applegate, R. Burlage, J. Sanseverino, P. Dunbar, F. Larimer und G. S. Saylor (1990). "RAPID, SENSITIVE BIOLUMINESCENT REPORTER TECHNOLOGY FOR NAPHTHALENE EXPOSURE AND BIODEGRADATION." Science **249**(4970): 778-781.
- Kleckner, N. (1981). "TRANSPOSABLE ELEMENTS IN PROKARYOTES." Annual Review of Genetics **15**: 341-404.
- Knippers, R. (2006). Molekulare Genetik. Stuttgart, Georg-Thieme-Verlag.
- Koch, B., L. E. Jensen und O. Nybroe (2001). "A panel of Tn7-based vectors for insertion of the gfp marker gene or for delivery of cloned DNA into Gram-negative bacteria at a neutral chromosomal site." Journal of Microbiological Methods **45**(3): 187-195.
- Kramer, R. (1994). "SECRETION OF AMINO-ACIDS BY BACTERIA - PHYSIOLOGY AND MECHANISM." Fems Microbiology Reviews **13**(1): 75-93.
- Kramer, R. (1994). "SYSTEMS AND MECHANISMS OF AMINO-ACID-UPTAKE AND EXCRETION IN PROKARYOTES." Archives of Microbiology **162**(1-2): 1-13.

- Kuduvalli, P. N., R. Mitra und N. L. Craig (2005). "Site-specific Tn7 transposition into the human genome." Nucleic Acids Research **33**(3): 857-863.
- Lagendijk, E. L., S. Validov, G. E. M. Lamers, S. de Weert und G. V. Bloemberg (2010). "Genetic tools for tagging Gram-negative bacteria with mCherry for visualization in vitro and in natural habitats, biofilm and pathogenicity studies." Fems Microbiology Letters **305**(1): 81-90.
- Lambertsen, L., C. Sternberg und S. Molin (2004). "Mini-Tn7 transposons for site-specific tagging of bacteria with fluorescent proteins." Environmental Microbiology **6**(7): 726-732.
- Lanzer, M. und H. Bujard (1988). "PROMOTERS LARGELY DETERMINE THE EFFICIENCY OF REPRESSOR ACTION." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **85**(23): 8973-8977.
- Lee, M. C., H. H. Chou und C. J. Marx (2009). "ASYMMETRIC, BIMODAL TRADE-OFFS DURING ADAPTATION OF METHYLOBACTERIUM TO DISTINCT GROWTH SUBSTRATES." Evolution **63**(11): 2816-2830.
- Li, X., A. M. Erickson und S. C. Ricke (2000). "Agitation during incubation reduces the time required for a lysine microbiological growth assay using an Escherichia coli auxotrophic mutant." Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology **8**(2): 83-94.
- Lichtenstein, C. und S. Brenner (1982). "UNIQUE INSERTION SITE OF TN7 IN THE ESCHERICHIA-COLI CHROMOSOME." Nature **297**(5867): 601-603.
- Lindroth, P. und K. Mopper (1979). "HIGH-PERFORMANCE LIQUID-CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF SUBPICOMOLE AMOUNTS OF AMINO-ACIDS BY PRECOLUMN FLUORESCENCE DERIVATIZATION WITH ORTHO-PHTHALDIALDEHYDE." Analytical Chemistry **51**(11): 1667-1674.
- Matz, M. V., A. F. Fradkov, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, A. G. Zaraisky, M. L. Markelov und S. A. Lukyanov (1999). "Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species." Nature Biotechnology **17**(10): 969-973.
- McKenzie, G. J. und N. L. Craig (2006). "Fast, easy and efficient: site-specific insertion of transgenes into Enterobacterial chromosomes using Tn7 without need for selection of the insertion event." Bmc Microbiology **6**.
- Okayasu, T., M. Ikeda, K. Akimoto und K. Sorimachi (1997). "The amino acid composition of mammalian and bacterial cells." Amino Acids **13**(3-4): 379-391.
- Parret, A. H. A. und R. De Mot (2002). "Bacteria killing their own kind: novel bacteriocins of pseudomonas and other gamma-proteobacteria." Trends in Microbiology **10**(3): 107-112.
- Parret, A. H. A., K. Temmerman und R. De Mot (2005). "Novel lectin-like bacteriocins of biocontrol strain Pseudomonas fluorescens Pf-5." Applied and Environmental Microbiology **71**(9): 5197-5207.
- Peters, J. E. und N. L. Craig (2001). "Tn7: smarter than we thought." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(11): 806-814.
- Prasher, D. C., V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast und M. J. Cormier (1992). "PRIMARY STRUCTURE OF THE AEQUOREA-VICTORIA GREEN-FLUORESCENT PROTEIN." Gene **111**(2): 229-233.
- Putnam, S. L. und A. L. Koch (1975). "COMPLICATIONS IN SIMPLEST CELLULAR ENZYME ASSAY - LYSIS OF ESCHERICHIA-COLI FOR ASSAY OF BETA-GALACTOSIDASE." Analytical Biochemistry **63**(2): 350-360.

- Ramanathan, S., W. P. Shi, B. P. RosenundS. Daunert (1997). "Sensing antimonite and arsenite at the subattomole level with genetically engineered bioluminescent bacteria." Analytical Chemistry **69**(16): 3380-3384.
- Rogers, M., N. Ekaterinaki, E. NimmoundD. Sherratt (1986). "ANALYSIS OF TN7 TRANSPOSITION." Molecular & General Genetics **205**(3): 550-556.
- Sachs, J. L., U. G. Mueller, T. P. WilcoxundJ. J. Bull (2004). "The evolution of cooperation." Quarterly Review of Biology **79**(2): 135-160.
- Sambrook, J.undD. W. Russell (2001). "Molecular cloning: A laboratory manual." Molecular cloning: A laboratory manual.
- Sarnovsky, R. J., E. W. MayundN. L. Craig (1996). "The Tn7 transposase is a heteromeric complex in which DNA breakage and joining activities are distributed between different gene products." Embo Journal **15**(22): 6348-6361.
- Schlegel, H. G. (1992). "Allgemeine Mikrobiologie." Thieme Verlag **7**.
- Shaner, N. C., R. E. Campbell, P. A. Steinbach, B. N. G. Giepmans, A. E. PalmerundR. Y. Tsien (2004). "Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp red fluorescent protein." Nature Biotechnology **22**(12): 1567-1572.
- Shaner, N. C., P. A. SteinbachundR. Y. Tsien (2005). "A guide to choosing fluorescent proteins." Nature Methods **2**(12): 905-909.
- Shimomura, O.undF. H. Johnson (1969). "PROPERTIES OF BIOLUMINESCENT PROTEIN AEQUORIN." Biochemistry **8**(10): 3991-&.
- Shimomura, O.undF. H. Johnson (1970). "CALCIUM BINDING, QUANTUM YIELD, AND EMITTING MOLECULE IN AEQUORIN BIOLUMINESCENCE." Nature **227**(5265): 1356-&.
- Shimomura, O., F. H. JohnsonundY. Saiga (1962). "EXTRACTION, PURIFICATION AND PROPERTIES OF AEQUORIN, A BIOLUMINESCENT PROTEIN FROM LUMINOUS HYDROMEDUSAN, AEQUOREA." Journal of Cellular and Comparative Physiology **59**(3): 223-&.
- Siemering, K. R., R. Golbik, R. SeverundJ. Haseloff (1996). "Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein." Current Biology **6**(12): 1653-1663.
- Smith, R. L.undT. M. Smith (2009). Elements of ecology, Pearson Studium.
- Staley, T. E., E. G. LawrenceundD. J. Drahos (1997). "Variable specificity of Tn7::lacZY insertion into the chromosome of root-colonizing *Pseudomonas putida* strains." Molecular Ecology **6**(1): 85-87.
- Tecon, R., O. BinggeliundJ. R. van der Meer (2009). "Double-tagged fluorescent bacterial bioreporter for the study of polycyclic aromatic hydrocarbon diffusion and bioavailability." Environmental Microbiology **11**(9): 2271-2283.
- Tempest, D. W.undO. M. Neijssel (1992). "PHYSIOLOGICAL AND ENERGETIC ASPECTS OF BACTERIAL METABOLITE OVERPRODUCTION." Fems Microbiology Letters **100**(1-3): 169-176.
- Thompson, J. N.undB. M. Cunningham (2002). "Geographic structure and dynamics of coevolutionary selection." Nature **417**(6890): 735-738.
- Tsien, R. Y. (1998). "The green fluorescent protein." Annual Review of Biochemistry **67**: 509-544.
- Tuffnell, J. M.undJ. W. Payne (1985). "A COLORIMETRIC ENZYME ASSAY USING ESCHERICHIA-COLI TO DETERMINE NUTRITIONALLY AVAILABLE LYSINE IN BIOLOGICAL-MATERIALS." Journal of Applied Bacteriology **58**(3): 333-341.
- Vanstockem, M., K. Michiels, J. VanderleydenundA. P. Vangoel (1987). "TRANSPOSON MUTAGENESIS OF AZOSPIRILLUM-BRASIENSE AND

- AZOSPIRILLUM-LIPOFERUM - PHYSICAL ANALYSIS OF TN5 AND TN5-MOB INSERTION MUTANTS." Applied and Environmental Microbiology **53**(2): 410-415.
- Waddell, C. S.undN. L. Craig (1988). "TN7 TRANSPOSITION - 2 TRANSPOSITION PATHWAYS DIRECTED BY 5 TN7-ENCODED GENES." Genes & Development **2**(2): 137-149.
- Yang, F., L. G. MossundG. N. Phillips (1996). "The molecular structure of green fluorescent protein." Nature Biotechnology **14**(10): 1246-1251.
- Zuber, S., F. Carruthers, C. Keel, A. Mattart, C. Blumer, G. Pessi, C. Gigot-Bonnefoy, U. Schnider-Keel, S. Heeb, C. ReimmannundD. Haas (2003). "GacS sensor domains pertinent to the regulation of exoproduct formation and to the biocontrol potential of Pseudomonas fluorescens CHAO." Molecular Plant-Microbe Interactions **16**(7): 634-644.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet zu haben.

.....
Jena, im Juni 2010

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Max-Planck Institut für chemische Ökologie in der Abteilung für Bioorganische Chemie in der Arbeitsgruppe um Dr. Christian Kost angefertigt. Daher gilt in erster Linie mein Dank an Dr. Christian Kost für die Bereitstellung des Themas, dem Beistand in schlechten Zeiten und der freundschaftlichen Art.

Ich danke Prof. Michael Meyer für die Betreuung und Begutachtung der Arbeit seitens der Fachhochschule Jena.

Großer Dank gilt allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Boland, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ganz besonders möchte ich mich bei Holger Merker für die tolle Zusammenarbeit, bei Samay Pande für diverse Helferdienste, bei den Stefan's Franziska, Ilka, Anne, Guanjun, Yonqi und alle anderen der Arbeitsgruppe für die Gesellschaft bei den täglichen Essensgang und im Labor bedanken.

Inniger Dank geht an meiner Freundin Anne die mir immer zur Seite stand und Verständnis für meine Launen zeigte und mir mit Rat und Tat half.

Mein ganz besonderer Dank gilt abschließend meinen Eltern, die durch ihre einzigartige Unterstützung, emotional und finanziell, mir meinen Berufswunsch ermöglicht haben und mir stets helfend zur Seite standen, vielen Dank!