

**Untersuchungen zum Einfluss von  
pH- und CO<sub>2</sub>-Stress auf Physiologie und  
Threoninproduktion von *Escherichia coli***

**Inaugural-Dissertation**

**zur**

**Erlangung des Doktorgrades**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Jeannine Astrid Nettekoven**

aus Bergisch Gladbach

Köln, Dezember 2008



Berichterstatter:

Prof. Dr. Reinhard Krämer

Prof. Dr. Karin Schnetz

Tag der Disputation: 04.02.2009



Was wir wissen, ist ein Tropfen; was wir nicht wissen, ein Ozean.

Isaac Newton



## Kurzzusammenfassung

Das gramnegative Enterobakterium *Escherichia coli* ist nicht nur der bedeutendste mikrobielle Modellorganismus, sondern wird auch zur biotechnologischen Produktion einer Vielzahl von Substanzen, darunter der Aminosäure L-Threonin, eingesetzt. Sowohl in seinem natürlichen Habitat als auch während der Threoninproduktion ist *E. coli* verschiedenen Stresssituationen, wie Veränderungen des externen pH-Werts und der CO<sub>2</sub>-Konzentration, ausgesetzt. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Veränderung des externen pH-Werts in beide Richtungen eine drastische Verringerung von Wachstum und Produktivität der Zellen zur Folge hat. Während eine erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration bei neutralem externen pH-Wert keinen Einfluss hatte, wurde durch die Kombination von niedrigem pH-Wert und erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration die Threoninproduktion komplett inhibiert. *E. coli* besitzt eine effektive pH-Homöostase bei externen pH-Werten zwischen 5,5 und 9. In diesem Bereich wurde ein interner pH-Wert von 7 – 7,5 aufrechterhalten. Dabei wurde beobachtet, dass der Stammhintergrund und die Zusammensetzung des Mediums signifikante Veränderungen der pH-Resistenz zur Folge hatten. Aminosäure-Decarboxylasen und Transporter besitzen bei moderat niedrigen pH-Werten keine Bedeutung im Gegensatz zu Kaliumtransportsystemen, deren Einfluss in diesem Bereich bestätigt werden konnte. Die Aufgabe von Kationen-Protonen-Antiportern scheint auf die Natrium-Homöostase beschränkt zu sein. Es konnte festgestellt werden, dass sowohl bei niedrigem als auch bei hohem pH-Wert weitere, bisher unbekannte Komponenten an der pH-Homöostase beteiligt sein müssen. Die Untersuchung der Bildung von Acetat als Nebenprodukt der Threoninproduktion ergab, dass von den Zellen gebildetes Acetat im Gegensatz zu extern zugegebenem keinen Einfluss auf den internen pH-Wert von *E. coli* hat. CO<sub>2</sub> hatte in hohen Konzentrationen bei Wildtyp und Produktionsstamm einen Zusammenbruch des pH-Gradienten zur Folge. Ein Mechanismus für die Wirkung von CO<sub>2</sub> konnte vorgeschlagen werden. Darüber hinaus konnten Vorschläge zur Optimierung der Prozessbedingungen und der Stämme für die biotechnologische Produktion abgeleitet werden.





## Abstract

*Escherichia coli* is the main model organism for Gram-negative bacteria and used for the biotechnological production of a variety of compounds like the amino acid L-threonine (70.000 t/a). In its natural habitat, as well as during fermentation processes, *E. coli* is exposed to different stress conditions like changes in the external pH or high CO<sub>2</sub>-concentrations. In the present work it was shown, that variations of the external pH in both directions impact growth and productivity of *E. coli* cells. High CO<sub>2</sub>-concentrations had no effect at neutral pH, but inhibited threonine production at low external pH almost completely. In order to address pH-response *E. coli* performs effective pH-homeostasis at external pH between 5.5 and 9. The genetic background of the strain and the composition of the growth medium were found to be relevant for the extent of resistance against variations of the external pH. Furthermore it was shown, that amino acid decarboxylases and transporters are not necessary for effective pH-homeostasis at moderate pH variations. In contrast the importance of potassium import for growth at low external pH was proven. Cation proton antiporters were found necessary for sodium homeostasis but not for pH-homeostasis at alkaline pH. Furthermore, the contribution of so far unknown components of pH homeostasis in *E. coli* was concluded. The formation of acetate as a byproduct of threonine production had no impact on the internal pH, whereas externally added acetate induced a decrease of the internal pH. CO<sub>2</sub> caused a comparable breakdown of the pH gradient in wildtype as well as in the production strain. Based on the experimental results a model is proposed for the CO<sub>2</sub> and acetate dependent decrease of the internal pH. Furthermore, process optimization and improvement of production strains can be suggested from this work.



## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 <i>Escherichia coli</i></b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Threoninproduktion durch <i>E. coli</i></b> .....	<b>1</b>
1.2.1 Industrielle Threoninproduktion mit <i>E. coli</i> .....	2
1.2.2 Threoninbiosynthese, -katabolismus und –transport in <i>E. coli</i> .....	4
1.2.3 Charakteristika des Threoninproduktionsstamms DM1891 .....	7
1.2.4 Nebenproduktbildung bei der industriellen Fermentation von <i>E. coli</i> .....	7
<b>1.3 Mechanismen der pH-Homöostase von <i>E. coli</i></b> .....	<b>9</b>
1.3.1 pH-Homöostase bei niedrigen externen pH-Werten .....	11
1.3.2 pH-Homöostase bei hohen externen pH-Werten .....	14
<b>1.4 Auswirkungen von CO<sub>2</sub> auf <i>E. coli</i></b> .....	<b>16</b>
<b>1.5 Zielsetzung</b> .....	<b>17</b>
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1 Stämme und Plasmide</b> .....	<b>19</b>
2.1.1 Bakterienstämme .....	19
2.1.2 Plasmide .....	20
2.1.3 Oligonukleotide .....	21
<b>2.2 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen</b> .....	<b>21</b>
2.2.1 Nährmedien .....	21
2.2.1.1 Vollmedien .....	21
2.2.1.2 Minimalmedien.....	23
2.2.1.3 Antibiotika .....	25
2.2.1.4 Puffersubstanzen .....	25
2.2.2 Kultivierungsbedingungen.....	26
2.2.2.1 Stammhaltung.....	26
2.2.2.2 Kultivierung auf Agarplatten.....	26
2.2.2.3 Kultivierung in Schüttelkolben.....	26
2.2.2.4 Kultivierung in Mikrotiterplatten.....	27
2.2.2.5 Kultivierung im Bioreaktor .....	27
2.2.2.5.1 Herstellung von Vorkulturen.....	27

## Inhaltsverzeichnis

---

2.2.2.5.2 Ausstattung des Bioreaktors .....	28
2.2.2.5.3 <i>batch</i> -Fermentation im Bioreaktor.....	28
2.2.2.6. Kultivierung unter Begasung mit verschiedenen CO <sub>2</sub> -Konzentrationen	28
<b>2.3 Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>29</b>
2.3.1 DNA - Präparation .....	29
2.3.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	30
2.3.3 Agarosegelelektrophorese und Isolierung von DNA aus Agarosegelen ...	31
2.3.4 Restriktion und Ligation von DNA.....	31
2.3.5 Herstellung von Proteinextrakt.....	32
<b>2.4 Techniken zur Manipulation von Zellen .....</b>	<b>32</b>
2.4.1 Herstellung und Transformation kompetenter Zellen .....	32
2.4.2 Deletionsmutagenese von <i>E. coli</i> .....	34
2.4.3 Expression von EYFP .....	35
<b>2.5 Biochemische Methoden.....</b>	<b>36</b>
2.5.1 Bestimmung des Cytoplasmavolumens.....	36
2.5.2 Bestimmung des internen pH-Werts mit Hilfe radioaktiver Sonden .....	37
2.5.3 Bestimmung des cytoplasmatischen pH-Werts durch Fluoreszenzspektrometrie .....	39
2.5.4 Bestimmung externer Metabolite mittels HPLC .....	40
2.5.5 Bestimmung der internen Konzentrationen der Nicotinamidadenindinukleotide .....	41
2.5.6 Bestimmung der internen Konzentration von ATP, ADP und AMP.....	44
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>47</b>
<b>3.1 Auswirkungen von pH- und CO<sub>2</sub>-Stress auf die Threonin- Produktion.....</b>	<b>47</b>
3.1.1 Einfluss von pH-Stress auf die Threoninproduktion durch <i>E. coli</i> . .....	47
3.1.2 Einfluss einer erhöhten CO <sub>2</sub> – Konzentration auf die Threoninproduktion durch <i>E. coli</i> .....	50
3.1.3 Kombination der Stressfaktoren pH und CO <sub>2</sub> .....	51
3.1.4 Untersuchung der Nebenproduktbildung während der Threonin-produktion .....	53
<b>3.2 Charakterisierung der pH-Homöostase von <i>E. coli</i> .....</b>	<b>54</b>
3.2.1 Untersuchung der pH-Homöostase .....	54

3.2.2 Vergleich des Wachstums verschiedener Stämme bei unterschiedlichen externen pH-Werten. ....	57
3.2.3 Etablierung einer <i>online</i> -Messung des internen pH-Werts mit Hilfe der Fluoreszenz von EYFP .....	59
3.2.3.1 Charakterisierung des Proteins EYFP <i>in vitro</i> .....	60
3.2.3.2 Charakterisierung des Proteins EYFP <i>in vivo</i> .....	62
3.2.3.3 Zeitliche Auflösung der pH-Anpassung von <i>E. coli</i> .....	64
3.2.4 Komponenten der pH-Homöostase von <i>E. coli</i> .....	65
3.2.4.1 Einfluss von Kationen-Protonen-Antiportern auf das Wachstum bei hohen pH-Werten. ....	65
3.2.4.2 Auswirkungen der Zugabe von Glutamat, Arginin oder Lysin auf Wachstum und internen pH-Wert von <i>E. coli</i> .....	69
3.2.4.3 Kaliumtransporter .....	72
<b>3.3 Einfluss von Acetat auf den internen pH-Wert .....</b>	<b>73</b>
3.3.1 Charakterisierung des schnellen Einflusses von Acetat auf den internen pH-Wert von <i>E. coli</i> MG1655 .....	73
3.3.2 Charakterisierung des Einflusses von Acetat auf den internen pH-Wert von <i>E. coli</i> DM1891 .....	75
<b>3.4 Einfluss von CO<sub>2</sub> auf Wachstum und Physiologie von <i>E. coli</i> .....</b>	<b>77</b>
3.4.1 Einfluss von CO <sub>2</sub> auf das Wachstum von <i>E. coli</i> MG1655 .....	77
3.4.2 CO <sub>2</sub> besitzt keinen Einfluss auf die Energieladung der Zelle. ....	78
3.4.3 Auswirkungen von CO <sub>2</sub> auf den internen pH-Wert von <i>E. coli</i> .....	79
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>83</b>
<b>4.1 Der externe pH-Wert hat einen Einfluss auf die Threoninproduktion durch <i>E. coli</i> DM1891 .....</b>	<b>83</b>
<b>4.2 <i>E. coli</i> verfügt über eine effektive pH-Homöostase .....</b>	<b>86</b>
<b>4.3 Die Medienzusammensetzung hat einen signifikanten Einfluss auf die pH-Homöostase von <i>E. coli</i> .....</b>	<b>89</b>
<b>4.4 Der Stammhintergrund ist entscheidend für die pH-Homöostase von <i>E. coli</i> .....</b>	<b>90</b>
<b>4.5 Acetat als Nebenprodukt der Threoninproduktion beeinflusst nicht den internen pH-Wert .....</b>	<b>90</b>

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>4.6 Neben den bisher bekannten Komponenten müssen weitere Systeme maßgeblich an der pH-Homöostase von <i>E. coli</i> beteiligt sein. ....</b>	<b>92</b>
<b>4.7 Das Absinken des internen pH-Werts durch die Anwesenheit von CO<sub>2</sub> führt zum Zusammenbruch der Threoninproduktion bei niedrigem externen pH-Wert .....</b>	<b>98</b>
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>105</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>107</b>

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BTM	Biotrockenmasse
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1-Propan-Sulfonsäure
CCCP	Carbonylcyanid-M-Chlorophenylhydrazon
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpm	Zerfälle pro Minute
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
Homopipes	Homopiperazin-1,4-bis(2-Ethan-Sulfonsäure)
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
Km <sup>R</sup>	Resistenz gegen Kanamycin
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
<i>mdr</i>	<i>multi drug resistance</i>
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
NAD(H)	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP(H)	Nicotinamidadenindinukleotid-phosphat
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte, gemessen bei 600 nm
pH	pH-Wert
PMK	protonenmotorische Kraft
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
Rpm	Umdrehungen pro Minute
Tab.	Tabelle
TG	Trockengewicht
TPP	Tetraphenylphosphoniumbromid
$\Delta\Psi$	Membranpotential
$\Delta\text{pH}$	pH-Gradient

## Abkürzungen

---

v/v *volume per volume*

vvm Gasvolumen pro Flüssigkeitsvolumen pro Minute (Einheit der Begasungsrate)

w/v *weight per volume*



## 1. Einleitung

### 1.1 *Escherichia coli*

Seit seiner Entdeckung (Escherich, 1885) hat sich das Enterobakterium *Escherichia coli* zum bekanntesten bakteriellen Modellorganismus entwickelt. Es gehört zu den *gram*-negativen Enterobakterien, ist stäbchenförmig und nicht sporulierend. Zu den zahlreichen *E. coli*-Stämmen zählen harmlose Varianten, die den Darm jedes Menschen besiedeln. Andere Stämme sind pathogen, wie zum Beispiel *E. coli* O157:H7, der eine Lebensmittelvergiftung auslösen kann (Riley, *et al.*, 1983). Einige Stämme verursachen Harnwegsinfektionen oder eine Form der Meningitis (Everett, *et al.*, 1948; Bonacorsi und Bingen, 2005). Für die Laborarbeit und die biotechnologische Produktion wurden Sicherheitsstämme entwickelt, die keine Pathogenität mehr aufweisen und nicht fähig sind, den Darm von Vertebraten zu besiedeln. Der bekannteste Laborstamm ist *E. coli* K12, von dem die meisten heute verwendeten Stämme abgeleitet wurden. Das Genom von *E. coli* K12 wurde bereits 1997 komplett sequenziert und annotiert (Blattner, *et al.*, 1997). Es besteht aus ca. 4.200 Genen. Dieser Umstand und die sehr kurze Generationszeit von 20 min machen *E. coli* zu einem idealen Modellorganismus.

Eine weitere Bedeutung kommt *E. coli* als Produzent verschiedener Substanzen für die Pharma-, Ernährungs- und Futtermittelindustrie zu. So wird es seit 1982 zur Herstellung von Insulin eingesetzt. Daneben werden weitere Arzneimittel, Vitamine und Feinchemikalien, wie Aminosäuren oder organische Säuren, mit *E. coli*-Stämmen produziert.

### 1.2 Threoninproduktion durch *E. coli*

Die industrielle Produktion von Aminosäuren ist für den Weltmarkt von großer Bedeutung. Während die Produktion von Methionin durch chemische Synthese erfolgt, werden ca. 1,5 Mio. t/a Glutamat, 600.000 t/a Lysin und 70.000 t/a Threonin (Leuchtenberger, *et al.*, 2005; Hermann, 2003) mit Hilfe von Bakterien hergestellt. Die Verwendung der Aminosäuren ist unterschiedlich. Glutamat wird hauptsächlich in

der Nahrungsmittelindustrie als Geschmacksverstärker verwendet. Andere Aminosäuren, wie Arginin, werden als Nahrungsergänzungsmittel oder in der Medizin eingesetzt. Threonin ist wie Lysin eine für Vertebraten essentielle Aminosäure. Deren industrielle Bedeutung liegt vor allem in der Herstellung von Futtermitteln für die Tiermast, da sie in herkömmlichen Futtermitteln auf Weizen- oder Maisbasis nur zu einem geringen Anteil vorkommen. Lysin stellt die erste und Threonin die zweite limitierende Aminosäure bei der Tiermast dar. Der Zusatz von Threonin oder Lysin erhöht also den Nährwert der Futtermittel beträchtlich (Leuchtenberger, *et al.*, 2005).

### **1.2.1 Industrielle Threoninproduktion mit *E.coli***

Grundsätzlich können Aminosäuren durch chemische Synthese, Extraktion aus Proteinhydrolysat, fermentative Synthese oder direkte Fermentation gewonnen werden. Die chemische Synthese von Threonin hat den Nachteil, dass vier Isomere (D, L, D-*allo*, L-*allo*) entstehen, da es zwei asymmetrische Kohlenstoffatome besitzt. L-Threonin, das als einzige Form von Vertebraten genutzt werden kann, wird nur zu einem geringen Prozentsatz gebildet und die enzymatische Spaltung der anderen Stereoisomere stellt einen aufwendigen Reinigungsschritt dar. Die Aufreinigung von L-Threonin aus Proteinhydrolysat ist ebenfalls sehr aufwändig und nicht in größerem Maßstab durchführbar. Die fermentative Synthese aus L-Homoserin ist aufgrund des teuren Substrats nicht wirtschaftlich. Die Produktion über direkte Fermentation mit Mikroorganismen ist dagegen günstig, da als Substrat überwiegend Ausgangsstoffe auf Zuckerbasis und anorganische Stickstoffverbindungen verwendet werden können. Zudem wird ausschließlich die biogene L-Form gebildet. Während andere Aminosäuren wie Glutamat oder Lysin mit *Corynebacterium glutamicum*-Stämmen hergestellt werden, werden für die Threoninproduktion *E. coli*-Stämme eingesetzt.

Die Produktion von Threonin durch die Fermentation von *E. coli* findet in Bioreaktoren mit einem Volumen von 200 – 750 m<sup>3</sup> statt. In den meisten Fällen wird eine sogenannte *fedbatch*-Kultivierung durchgeführt. Dazu werden Zellen kultiviert, bis gegen Ende der exponentiellen Phase die im Medium vorhandenen Nährstoffe fast vollkommen aufgebraucht sind. In dieser Phase ist gewöhnlich das Maximum der Threoninbildung zu beobachten. Um die Zellen möglichst lange in dieser Phase zu halten, werden kontinuierlich Nährstoffe zugeführt (Leuchtenberger, *et al.*, 2005).

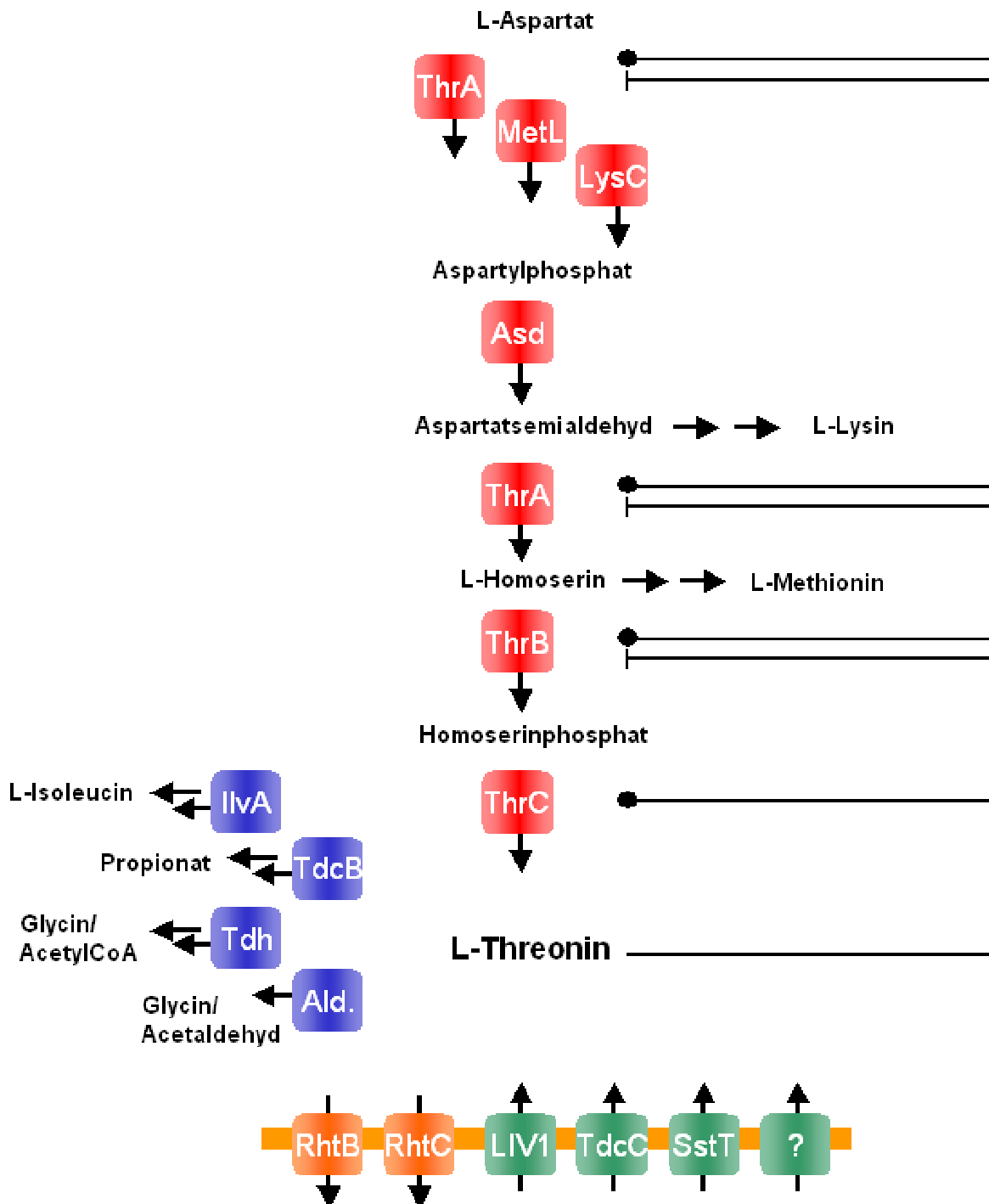
Während der Produktion werden Sauerstoffversorgung, pH-Wert und Temperatur über Sonden bestimmt und konstant im für die Produktion optimalen Bereich gehalten. Da die Mischleistung der industriell eingesetzten Großfermenter begrenzt ist, dauert es jedoch bis zu 100 s bis eine Homogenität von 95 % erreicht ist (Kelle, *et al.*, 2005). Es kann also zu kurzfristigen Schwankungen des pH-Wertes kommen. Außerdem setzen die Zellen im Verlauf der Fermentation durch die Respiration CO<sub>2</sub> frei, so dass der CO<sub>2</sub>-Partialdruck im Fermenter vor allem durch den hohen hydrostatischen Druck am Kesselboden ansteigt. Durch die geringe Durchmischung gelingt keine ausreichende Austreibung des CO<sub>2</sub> aus dem Medium und durch den hohen Partialdruck wird ein hoher Anteil des CO<sub>2</sub> gelöst und kann damit auf die Zellen wirken (Hermann, 2003; McIntyre und McNeil, 1997).

Neben der Kontrolle des Fermentationsprozesses ist die Stammentwicklung Voraussetzung für die Produktion. In Wildtypstämmen unterliegt der Stoffwechsel in der Regel einer strikten Regulation, die verhindert, dass Metabolite in mehr als dem für die Zelle notwendigen Maß gebildet werden. Die gezielte Stammentwicklung hat zum Ziel, diese Regulationsmechanismen zu überwinden, so dass eine Überproduktion erreicht wird. Man unterscheidet hier im Wesentlichen zwei Ansätze: Bei der ungerichteten Mutagenese werden Zellen des betreffenden Stamms unter Selektionsdruck mutagenisierenden Bedingungen unterworfen. Anschließend werden die Zellen auf eine erhöhte Produktbildung untersucht. Dieser Methode gegenüber steht das sogenannte *metabolic engineering*. Hierbei werden anhand der Kenntnisse über den Stoffwechsel der Zellen gezielte Mutationen eingeführt, die die Produktivität erhöhen sollen. Hierbei können Enzyme, die den Abbau des Produkts katalysieren ausgeschaltet werden. Andererseits können die zur Biosynthese benötigten Enzyme überexprimiert oder dereguliert werden. Auch Transportproteine bieten Ansatzpunkte für gezielte Veränderungen. Die Überexpression eines Exporters oder die Deletion eines Importsystems kann die Produktivität eines Stamms beträchtlich steigern. Die Anwendung des *metabolic engineering* erfordert in jedem Fall möglichst genaue Kenntnisse über Stoffwechselwege, deren Regulation und die Stoffflüsse in der Zelle. Außerdem ist es wichtig, die Anpassungsmechanismen der Zellen an äußere Bedingungen zu untersuchen, um die Produktionsbedingungen entsprechend anzupassen. Das neueste Verfahren zur Konstruktion von Produktionsstämmen basiert auf dem Vergleich des Genoms von Wildtyp- und Produktionsstämmen.

Durch diesen Vergleich können Gene identifiziert werden, deren Produkte für eine erhöhte Produktivität verantwortlich sind. Diese Gene können im Folgenden gezielt manipuliert werden.

### **1.2.2 Threoninbiosynthese, -katabolismus und –transport in *E.coli***

Für die Untersuchung der Threoninproduktion ist ein grundlegendes Verständnis des Threoninmetabolismus notwendig (Abb. 1.1). Threonin gehört zu den Aminosäuren der Aspartatfamilie und wird von Aspartat ausgehend gebildet. Dieses entsteht durch Transaminierung aus Oxalacetat, einem zentralen Metabolit des Tricarbonsäurezyklus. Zur Aspartat-Familie gehören neben Threonin auch Lysin, Methionin und Isoleucin. Da alle Produkte Aspartat als Vorstufe benötigen und andererseits im richtigen Verhältnis gebildet werden müssen, um eine optimale Versorgung der Zelle zu gewährleisten, ist eine komplexe Regulation der einzelnen Synthesewege notwendig. In *E. coli* werden daher alle Schritte, die zur Bildung von Threonin benötigt werden, auf Genexpressions- oder Proteinaktivitätsebene reguliert. Den ersten Schritt der Threoninsynthese aber auch der Isoleucin-, Lysin- und Methioninsynthese bildet die Phosphorylierung von Aspartat zu Aspartylphosphat durch eine Aspartatkinase. *E. coli* besitzt drei Isoenzyme der Aspartatkinase, die durch die unterschiedlichen Endprodukte in ihrer Aktivität reguliert werden. Für den ersten Schritt der Threoninsynthese ist die Aspartatkinase I (ThrA) zuständig, ein bifunktionelles Enzym, das gleichzeitig als Homoserindehydrogenase den 3. Schritt der Biosynthese von Threonin katalysiert. Beide Aktivitäten von ThrA werden durch Threonin inhibiert (Cohen, 1983; Cohen und Saint-Geront, 1987). Außerdem bildet das Gen *thrA* ein Operon mit *thrB* und *thrC*. Die Expression dieses Operons wird durch Threonin und Isoleucin reprimiert (Neidhardt, 1996). Die Aspartatkinasen II und III gehören zum Methionin- bzw. Lysin-Biosyntheseweg und werden auf der Transkriptionsebene durch das jeweilige Endprodukt reguliert. Außerdem wird die Aktivität der Aspartatkinase III durch Lysin inhibiert.



**Abb. 1.1:** Schematische Darstellung des Threoninmetabolismus in *E. coli*. Enzyme des Biosynthesewegs sind rot, die des Katabolismus blau dargestellt. Gelb gezeichnete Proteine sind Export-, grüne Importsysteme. Außerdem sind die Abzweige zum Lysin- und Methionin-Biosyntheseweg gezeigt. Im rechten Bereich ist die Regulation dargestellt. Striche kennzeichnen die Inhibition der Enzymaktivität, Kreise die Repression des zugehörigen Gens.

Der zweite Schritt der Threoninbiosynthese vom Aspartylphosphat zum Aspartatsemialdehyd wird von der Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase katalysiert. Die Expression des korrespondierenden Gens *asd* wird durch Lysin gehemmt. Von dem Intermediat Aspartatsemialdehyd zweigt der Lysin-Biosyntheseweg ab.

Im dritten Schritt der Threoninbiosynthese wird, katalysiert von der Homoserin-Dehydrogenase, Homoserin gebildet. An dieser Stelle zweigt die Methionin-Biosynthese ab. Auf dem Weg zum Threonin wird im nächsten Schritt Homoserin zum Homoserinphosphat phosphoryliert. Dieser Schritt wird von der Homoserinkinase (ThrB) katalysiert und kompetitiv durch Threonin gehemmt. Durch die Threoninsynthese wird im letzten Schritt Threonin gebildet (Cohen, 1983; Cohen und Saint-Geront, 1987).

Für den Threoninkatabolismus sind in *E. coli* vier verschiedene Enzyme verantwortlich. Die biosynthetische und die biodegradative Threonindeaminase katalysieren die Reaktion zum 2-Ketobutyrat. Das Produkt der biosynthetischen Threonindeaminase (IlvA) wird zur Isoleucinbiosynthese verwendet. Allerdings ist die Aktivität dieses Proteins strikt reguliert und unter Produktionsbedingungen nicht relevant (Neidhardt, 1996). Der Abbau von Threonin über die degradative Deaminase (TdcB) führt zum weiteren Abbau zu Propionat. Die Enzyme dieses Wegs sind im *tdcABCDEFGF*-Operon kodiert, das der Kohlenstoffkataboliten-repression unterliegt und nur unter anaeroben Bedingungen exprimiert wird (Hesslinger, *et al.*, 1998). Den dritten Abbauweg für Threonin stellt die Threoninaldolase dar, die Threonin in Acetaldehyd und Glycin spaltet. Die Aktivität dieses Proteins konnte allerdings in *E. coli* nicht nachgewiesen werden (Marcus und Dekker, 1993). Am besten charakterisiert ist die Threonin-Dehydrogenase (Tdh). Sie oxidiert Threonin zu 2-amino-3-Ketobutyrat (AKB). Dieses wird dann durch die AKB-CoA-Lyase (Kbl) in Glycin und Acetyl-CoA gespalten. Glycin kann im Folgenden über Serin zu Pyruvat und Ammoniak abgebaut werden und damit als Stickstoffquelle verwendet werden. Die Gene *kbl* und *tdh* sind in einem Operon kodiert und werden in Anwesenheit von Glucose und Leucin bei aeroben Bedingungen exprimiert (Potter, *et al.*, 1977; Neidhardt, 1997).

Die Threoninaufnahme in *E. coli* ist relativ komplex. Beschrieben wurde unter anderem das SstT-System, das Na<sup>+</sup>-abhängig Threonin und Serin transportiert (Ogawa, *et al.*, 1998). Daneben gibt es das LIV1-System, zu dessen Substraten

Threonin, Leucin, Isoleucin, Valin, Alanin und Homoserin zählen (Robbins und Oxender, 1973). Außerdem ist das protonenabhängige System TdcC bekannt, das den Transport von Leucin, Serin, Threonin und Homoserin vermittelt. Dieses System wird nur unter anaeroben Bedingungen exprimiert (Sumantran, *et al.*, 1990). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass mindestens ein weiteres Threoninaufnahmesystem existiert (Kruse, 2000).

Für den Threoninexport sind fünf Systeme postuliert. Mindestens zwei (RhtB und RhtC) üben einen Einfluss auf die Threoninproduktion aus. Es wurde gezeigt, dass die Überexpression von RhtB oder RhtC die Threoninausbeute signifikant erhöht (Zakataeva, *et al.*, 1999; Kruse, 2000; Eggeling und Sahm, 2003).

### **1.2.3 Charakteristika des Threoninproduktionsstamms DM1891**

Als Grundlage für die Herstellung des Threoninproduktionsstamms DM1891 diente das K12-Derivat VL334, das durch ungerichtete Mutagenese und Selektion auf Resistenz gegen ein Threoninanalogen geschaffen wurde (Debabov, 1981). Dieser Stamm wurde mit dem Saccharose-verwertenden System des Stamms *E. coli* H155 ausgestattet, um die Verwertung von Saccharose als Kohlenstoffquelle zu ermöglichen. Zur Verstärkung der Threoninproduktion wurden die Gene *thrABC* mit Hilfe des Plasmids pBR322 überexprimiert. Der Hauptabbauweg wurde durch die Deletion von Threonindehydrogenase und AKB-CoA-Lyase ausgeschaltet. Es folgte eine weitere ungerichtete Mutagenese, während der Mutanten mit einer Resistenz gegen Threonin isoliert wurden. Eine dieser Mutanten wurde als DM1891 bezeichnet (Mechtild Rieping, Evonik Degussa, persönliche Mitteilung). Der Stamm wurde freundlicherweise von Evonik Degussa, Künsebeck, für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

### **1.2.4 Nebenproduktbildung bei der industriellen Fermentation von *E. coli***

*E. coli* bildet während verschiedener Stresssituationen organische Säuren. So ist zum Beispiel die Bildung von Acetat als Nebenprodukt hauptsächlich während des anaeroben Wachstums, aber auch unter aeroben Bedingungen, seit längerem bekannt (Polen, *et al.*, 2002). Während der biotechnologischen Produktion kann sich diese Nebenproduktbildung negativ auf die Produktausbeute auswirken. Zum einen

fließt ein Teil des gefütterten Kohlenstoffs in die Synthese von Acetat anstatt in die Produktbildung. Zum anderen können Nebenprodukte auch toxisch auf die Zelle wirken. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass Acetat das Wachstum von *E. coli* inhibiert. Dabei bewirkten, bei einem pH-Wert von 6 und in Minimalmedium, bereits 8 mM Acetat eine Reduktion des Wachstums um 50 % (Roe, *et al.*, 2005). Die interne Konzentration an Acetatanionen betrug 250 mM und der interne pH-Wert sank von 7,8 auf 7,5 ab (Roe, *et al.*, 1998). Dieser Effekt wurde damit erklärt, dass Acetat in der protonierten Form durch die Membran diffundiert und im Zellinnern aufgrund des höheren pH-Werts dissoziiert. Somit kommt es intern zu einer Akkumulation von Acetatanionen und Protonen. Ein ähnlicher Effekt auf den internen pH-Wert konnte auch für andere organische Säuren nachgewiesen werden (Salmond, *et al.*, 1984). Unklar ist allerdings, ob der Wachstumseffekt auf das Absinken des internen pH-Werts oder die Akkumulation des Anions zurückzuführen ist. Es wird postuliert, dass die Acetatresistenz verschiedener Bakterien bei niedrigen pH-Werten auf die Fähigkeit zurückzuführen ist, den internen pH-Wert in Anwesenheit von Acetat abzusenken, so dass der pH-Gradient niedrig ist. Dadurch wird eine Akkumulation von Acetat in der Zelle verhindert. Dieser Mechanismus wird zum einen für *Streptococcus bovis* angenommen, aber auch für den pathogenen Stamm *E. coli* OH157:H7, der im Vergleich zu K12-Stämmen eine Resistenz gegenüber Acetat bis zu Konzentrationen von 160 mM aufweist. Sollte dieser Mechanismus tatsächlich für die erhöhte Acetatresistenz verantwortlich sein, so muss die Akkumulation des Anions und nicht das Absinken des internen pH-Werts für die Toxizität verantwortlich sein (Russell, 1992; Diez-Gonzalez und Russell, 1997). Neuere Arbeiten konnten jedoch zeigen, dass der toxische Effekt von Acetat auf *E. coli* durch die Zugabe von Methionin aufgehoben werden kann. Des Weiteren wurde festgestellt, dass in Anwesenheit von Acetat Homocystein in der Zelle akkumuliert. Es wird daher angenommen, dass aufgrund des durch Acetat verursachten niedrigen internen pH-Werts die Aktivität eines Enzyms im Methionin-Stoffwechselweg beeinträchtigt ist. Dabei konnte bisher nicht unterschieden werden, ob die Akkumulation von Homocystein, das toxisch auf die Zelle wirkt, oder der Mangel an Methionin für das verlangsamte Wachstum verantwortlich ist. In jedem Fall ist dieser Theorie zufolge der niedrige interne pH-Wert für die Wirkung von Acetat verantwortlich (Roe, *et al.*, 2005).



### 1.3 Mechanismen der pH-Homöostase von *E. coli*

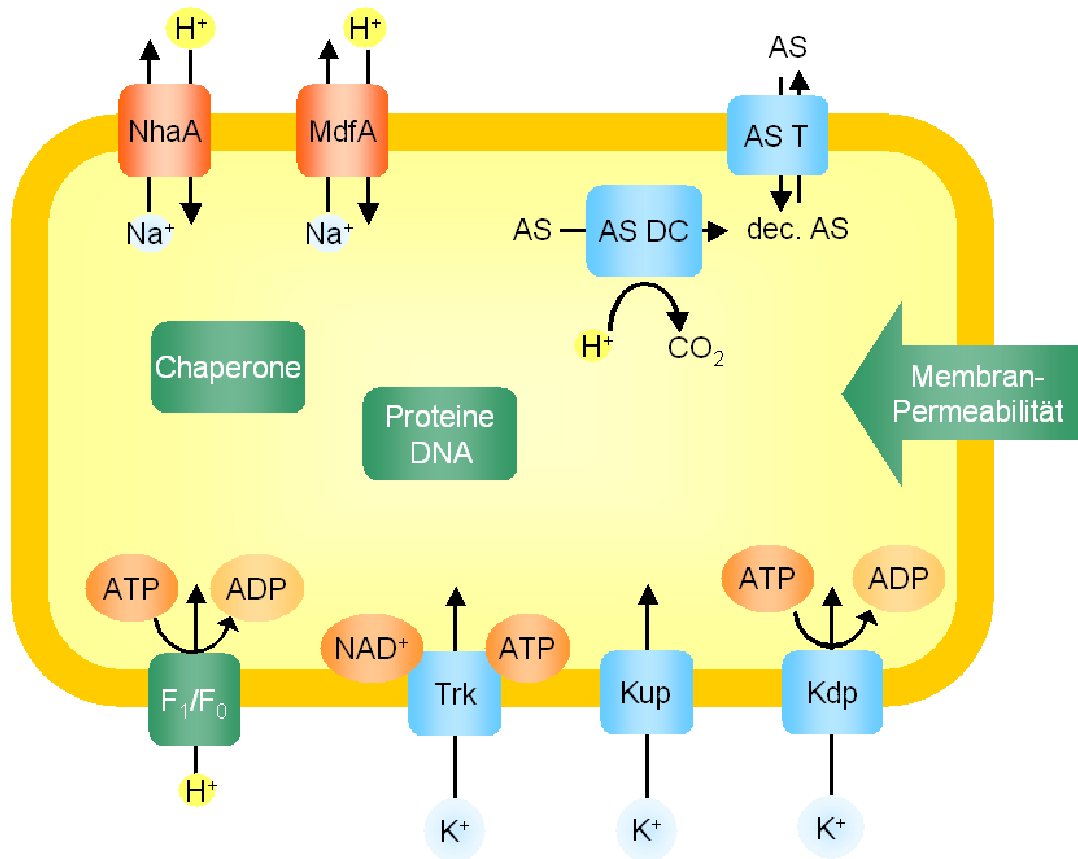
Während der Metabolismus und die Transportmechanismen für Threonin in den *E. coli* charakterisiert wurden, wurde der Einfluss abiotischer Faktoren auf die Produktion nicht eingehend untersucht. Es ist jedoch durchaus möglich, dass zum Beispiel Veränderungen des externen pH-Werts Stoffwechselwege oder Transportmechanismen beeinflussen. So wurde eine Beeinträchtigung der Methioninsynthese bei niedrigem externem pH-Wert beobachtet (Roe, *et al.*, 2005). Für die biotechnologische Produktion ist daher auch die Analyse der Antwort auf externe Stressfaktoren von großer Bedeutung.

Bakterien sind in unterschiedlichem Maße dazu fähig, Veränderungen des externen pH-Werts zu tolerieren. Während acidophile Bakterien bei sauren Bedingungen und alkalophile bei hohen externen pH-Werten ihr maximales Wachstum erreichen, liegt das pH-Optimum von neutrophilen Bakterien wie *E. coli* im neutralen Bereich. Acidophile oder alkalophile Bakterien haben sich auf das Leben bei extremen externen pH-Werten spezialisiert; auch neutrophile Bakterien haben jedoch Mechanismen entwickelt, die bei moderaten Veränderungen des externen pH-Werts den internen pH-Wert aufrechterhalten und Wachstum ermöglichen. Dieser Vorgang wird als pH-Homöostase bezeichnet. Von der pH-Homöostase zu unterscheiden sind Mechanismen, die das Überleben der Zellen bei extremen pH-Werten ermöglichen. Bei diesen extremen pH-Werten wird der interne pH-Wert der Zellen nicht im neutralen Bereich gehalten, d.h. es findet keine pH-Homöostase statt. Dennoch ist *E. coli* zum Beispiel dazu in der Lage, im extrem sauren Milieu des Magens zu überleben.

Veränderungen des internen pH-Werts können die Integrität von Proteinen und Nukleinsäuren beeinträchtigen. Außerdem ist die Aktivität von Enzymen bei Abweichungen des internen pH-Werts vom Optimum eingeschränkt. Zudem stellt der pH-Gradient eine Komponente der protonenmotorischen Kraft (PMK) dar, die sich aus pH-Gradient und Membranpotential zusammensetzt und die Energie für die ATP-Synthese durch die oxidative Phosphorylierung liefert. Veränderungen des externen pH-Werts haben also auch direkte Auswirkungen auf die PMK und damit auf die Energieversorgung der Zelle. *E. coli* ist in seinem natürlichen Habitat verschiedensten pH-Bedingungen ausgesetzt und vor allem starken Schwankungen unterworfen. Als Enterobakterium ist es in der Lage, im extrem sauren Mageninhalt

(pH 1,5) und in basischer Umgebung am Beginn des Darms zu überleben. Es kann aber auch im Boden oder im Wasser unter den verschiedensten Bedingungen wachsen. Für *E. coli* ist bei externen pH-Werten von 5 bis 9 eine effektive pH-Homöostase zu beobachten. In diesem Bereich kann *E. coli* den internen pH-Wert in dem engen Bereich zwischen 7,4 und 7,8 halten (Slonczewski und Foster, 1996). Einige Komponenten der pH-Homöostase von *E. coli* sowie Systeme, die das Überleben bei extremen pH-Werten ermöglichen, sind bereits untersucht, auch wenn die einzelnen Erkenntnisse noch kein vollständiges Bild ergeben. Im Folgenden werden die bisherigen Forschungsergebnisse zusammengefasst.

Man unterscheidet zunächst in passive und aktive Vorgänge der pH-Homöostase. Zu den passiven Mechanismen gehört zum einen die Zellmembran als Permeabilitätsbarriere für Protonen und andere Ionen. Zum anderen spielt die Pufferkapazität des Cytoplasmas eine Rolle, die durch die Aminosäureseitenketten der Proteine und die Nukleinsäuren gewährleistet wird. Die Pufferkapazität des Cytoplasmas wird mit 50 – 100 nmol Protonen pro pH-Einheit und mg Zellprotein bei einem internen pH-Wert von ca. 7 beziffert (Booth, 1985). Die passiven Mechanismen spielen sowohl bei hohen als auch bei niedrigen pH-Werten eine Rolle. Für beide pH-Bereiche sind außerdem verschiedene, an der aktiven pH-Homöostase, beteiligte Systeme beschrieben und werden im Folgenden vorgestellt (Abb. 1.2).



**Abb. 1.2:** Bekannte Komponenten der pH-Homöostase in *E. coli*. Proteine, die an der Antwort auf niedrige externe pH-Werte beteiligt sind, sind blau dargestellt, Komponenten der pH-Homöostase bei hohen pH-Werten sind rot gezeichnet. Grüne Systeme sind in beiden Fällen beteiligt.

### 1.3.1 pH-Homöostase bei niedrigen externen pH-Werten

Bei niedrigen externen pH-Werten ist die Zelle mit einer sehr hohen externen Protonenkonzentration konfrontiert. Ziele der pH-Homöostase sind in diesem Fall, das Eindringen von Protonen zu verhindern und Protonen aktiv aus der Zelle zu entfernen. Eine weitere Strategie ist die Alkalisierung des umgebenden Mediums. Denkbar sind hierfür aktive Exportmechanismen oder Reaktionen, die Protonen verbrauchen. Daneben sind Chaperone in der Lage, die Integrität von Proteinen und Nukleinsäuren wiederherzustellen und somit den Folgen des pH-Stresses

entgegenzuwirken. In *E. coli* konnte nach einem abrupten Absenken des externen pH-Werts auf pH 3 eine verringerte  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität gemessen werden, was auf eine verringerte Proteinstabilität hinweist. Wurden die Zellen jedoch durch Wachstum bei pH 5,8 präadaptiert, war lediglich eine geringere Änderung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nachweisbar, obwohl der interne pH-Wert in beiden Versuchen auf 4,5 – 5 sank. Die erhöhte  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in präadaptierten Zellen wurde mit einer verstärkten Aktivität von Chaperonen erklärt, die die Struktur und Funktion der Proteine erhalten (Booth, *et al.* 2002). Gestützt wird diese Annahme durch Ergebnisse aus DNA-*micro array*-Experimenten, in denen festgestellt wurde, dass die Gene *dnaK* und *groELgroES*, die für Chaperone kodieren, bei niedrigen pH-Werten vermehrt exprimiert werden (Olson, 1993). Zudem ist die vermehrte Expression und Aktivität von Chaperonen ein häufig beschriebener Mechanismus der allgemeinen Stressantwort. An der Regulation dieses Anpassungsmechanismus sind verschiedene Transkriptionsfaktoren und der Sigmafaktor RpoS beteiligt, der unter anderem den Übergang in die stationäre Phase reguliert (Booth, *et al.* 2002, Lange und Hengge-Aronis, 1991).

Das Eindringen von Protonen in die Zelle wird durch eine veränderte Zusammensetzung der Zellmembran erschwert. Für den pathogenen *E. coli* – Stamm OH157:H7 konnte durch gaschromatographische Analyse der Zellmembran gezeigt werden, dass der Anteil an Palmitinsäure (16:0) zunahm, wenn die Zellen bei pH 5 kultiviert wurden. Dagegen war in diesen Zellen wesentlich weniger Vaccensäure (18:1 $\omega$ 7c) nachweisbar. Insgesamt zeigte der Versuch, dass der Gehalt der gesättigten Fettsäuren zunahm. Dies führt zu einer verringerten Membranfluidität (Yuk und Marshall, 2004).

Als bedeutendste Komponenten für das Überleben von *E. coli* bei extrem niedrigen pH-Werten (pH 2) werden Aminosäure-Decarboxylasen-Systeme beschrieben. Sie bestehen jeweils aus einer Decarboxylase und einem Aminosäuretransporter. Bei der Decarboxylierung der Aminosäure wird bei Entstehung eines Moleküls CO<sub>2</sub> ein Proton verbraucht. Das decarboxylierte Produkt wird durch den Transporter im Gegentausch mit einem neuen Substratmolekül aus der Zelle entfernt. In *E. coli* sind drei Decarboxylase-Transporter-Systeme bekannt. Die Glutamat-Decarboxylasen GadA und GadB katalysieren die Umsetzung von Glutamat zu  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) und CO<sub>2</sub>. Der Antiporter GadC exportiert GABA im Gegentausch mit

Glutamat. Dieses System wird vor allem über die Aktivität der Decarboxylase GadB reguliert. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des Proteins sowohl durch Protonen als auch durch Chloridionen, denen *E. coli* bei der Magenpassage ausgesetzt ist, allosterisch aktiviert wird (Gut, *et al.*, 2006). Das zweite System besteht aus der Arginin-Decarboxylase AdiA, die Arginin zu Agmatin und CO<sub>2</sub> umsetzt, und dem Antiporter AdiC. Das dritte System mit der Decarboxylase CadA und dem Antiporter CadB basiert auf der Decarboxylierung von Lysin zu Cadaverin. Die Regulation dieses Systems wird durch CadC vermittelt. Sie erfolgt auf mehreren Ebenen, wobei als Effektoren der externe pH-Wert, die Sauerstoff-versorgung und die externe Lysinkonzentration sensiert werden. Neben CadC ist auch der Lysin-Transporter LysP an der Regulation beteiligt (Tetsch, *et al.*, 2008). Das Lysin-System ist allerdings in Bezug auf die pH-Homöostase weniger effektiv als die beiden anderen Systeme (Foster, 2004). Alle Systeme haben zwei Effekte: Pro Reaktion wird dem Cytoplasma ein Proton entzogen und durch die exportierten, basischeren Produkte kann der pH-Wert in der direkten Umgebung der Zelle nach oben verschoben werden (Slonczewski und Foster, 1996). Allein durch den Verbrauch der Protonen kann allerdings der Einfluss der Decarboxylasen nicht erklärt werden. Neuere Ergebnisse deuten darauf hin, dass nicht nur der Verbrauch eines Protons, sondern auch das decarboxylierte Produkt an sich einen Einfluss auf die pH-Homöostase von *E. coli* hat. Bei der Untersuchung des Gad- und des Adi-Systems konnte gezeigt werden, dass die Zugabe des decarboxylierten Produkts das Überleben unter extrem sauren Bedingungen ermöglicht (Foster, 2004). Es wurde zudem nachgewiesen, dass bei einem externen pH-Wert von 2 der interne pH-Wert in Anwesenheit von Glutamat lediglich von 3,6 auf 4,2 angehoben wurde bzw. durch die Zugabe von Arginin auf 4,7. Dagegen konnte gezeigt werden, dass das Membranpotential nach der Zugabe von Glutamat oder Arginin umgekehrt wurde und innen positiv war. Dies ist eine bekannte Strategie acidophiler Bakterien. Es ist jedoch unklar, welchen Beitrag das umgekehrte Membranpotential beim Überleben von *E. coli* bei niedrigen pH-Werten hat (Richard *et al.*, 2004). Auch wenn viele Aspekte in Bezug auf die Regulation und Auswirkung der Aminosäuredecarboxylasen beschrieben sind, ist der Mechanismus nicht grundlegend verstanden. Zudem ist nicht geklärt, ob diese Systeme an der pH-Homöostase bei moderaten Veränderungen des externen pH-Werts beteiligt sind,

oder ob sie ausschließlich für das Überleben bei extrem niedrigen pH-Werten von Bedeutung sind.

Diskutiert wird eine Beteiligung der  $F_1/F_0$ -ATPase an der pH-Stressantwort bei niedrigen pH-Werten. Ein Anteil der pH-Homöostase besteht aus Komponenten, deren Expression durch den Sigmafaktor RpoS reguliert wird und bis jetzt nicht verstanden ist. Für diesen Mechanismus wird die  $F_1/F_0$ -ATPase benötigt (Richard *et al.*, 2004). Es ist unklar, ob diese aktiv Protonen aus dem Cytoplasma pumpt, wie es für die  $F_1/F_0$ -ATPase aus *Enterococcus hirae* postuliert wird (Harold *et al.*, 1970). Es könnte auch sein, dass sie lediglich die Energie für diesen bisher unbekanntem Mechanismus der pH-Homöostase bereitstellt.

Neben den bis hierher beschriebenen Systemen wird vor allem die Rolle von Kaliumtransportern in der Literatur hervorgehoben. *E. coli* besitzt vier Kaliumaufnahmesysteme, TrkG, TrkH, Kdp und Kup. Kdp ist ein primär aktives, induzierbares System; TrkG, TrkH und Kup sind sekundär aktive, konstitutiv exprimierte Importer. Welche dieser Systeme an der pH-Homöostase beteiligt sind und wie genau die Aufnahme von Kalium zur pH-Homöostase beiträgt, ist noch nicht geklärt. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass die Abwesenheit von Kalium oder das Ausschalten der Importer zu einer erhöhten Sensitivität von *E. coli* gegenüber niedrigen pH-Werten führt. (Booth, 1985, Stumpe, 1996)

### **1.3.2 pH-Homöostase bei hohen externen pH-Werten**

Bei hohen externen pH-Werten ist die Aufgabe der pH-Homöostase die Retention von Protonen. Strategien hierfür beinhalten die vermehrte Produktion metabolischer Säuren, eine erhöhte Aktivität von Protonen importierenden Systemen und eine erhöhte Aktivität der ATP-Synthase. Außerdem kommen auch bei erhöhten externen pH-Werten vermehrt Chaperone zum Einsatz, um die Auswirkungen des pH-Stresses auf die Integrität von Proteinen und Nukleinsäuren zu beheben (Padan, *et al.*, 2005).

Hinweise auf eine erhöhte Produktion metabolischer Säuren liefern Analysen des Proteoms von *E. coli*. In einer Proteomanalyse von Zellen, die bei hohem pH-Wert gewachsen waren, wurden größere Mengen der Proteine TnaA und TnaB nachgewiesen. Bei TnaA handelt es sich um die Tryptophan-Deaminase und bei

TnaB um einen Tryptophan-Transporter. Auch der Proteingehalt der Serin-Deaminase SdaA war erhöht (Stancik *et al.*, 2002). Es wird vermutet, dass die Aminosäure-Deaminasen dem alkalischen Stress in analoger Weise entgegenwirken wie die Aminosäure Decarboxylasen dem Säurestress (Padan, *et al.*, 2005).

Transkriptionsanalysen von *E. coli*-Zellen, die bei hohem pH-Wert kultiviert wurden, zeigten eine erhöhte Expression der ATP-Synthase, die während der ATP-Synthese Protonen importiert (Maurer, 2004). Ebenso ist die Expression einer von dem Gen *cydAB* kodierten, alternativen, terminalen Oxidase erhöht. Diese pumpt nur halb so viele Protonen aus der Zelle wie die von *cyoABCDE* kodierte Oxidase. Das *cyo*-Operon wird unter alkalischen Bedingungen wesentlich schwächer exprimiert. Dies deutet darauf hin, dass die Zelle auch auf diesem Weg eine vermehrte Protonenretention herbeiführen könnte (Padan, 2005, Maurer, 2004).

Als wichtigster Mechanismus gilt jedoch der aktive Import von Protonen durch Kationen-Protonen-Antiporter. Dazu zählen Natrium-Protonen-Antiporter (CPA) und *multi drug resistance* (MDR) Transporter. *E. coli* besitzt mindestens vier Kationen-Protonen-Antiporter, von denen zwei (NhaA und MdfA) an der pH-Homöostase beteiligt sind. Am besten untersucht ist der Natrium-Protonen-Antiporter NhaA. NhaA importiert zwei Protonen im Gegentausch mit einem Na<sup>+</sup>-Ion. Dieser Austausch wird durch das Membranpotential (innen negativ) angetrieben. Der zweite Natrium-Protonen-Antiporter in *E. coli*, NhaB, hat keinen Einfluss auf die pH-Homöostase, was mit der geringeren Elektrogenität des Austauschs erklärt wird (Padan *et al.*, 2005). Die Aktivität von NhaA wird streng reguliert. Bei einem externen pH-Wert unterhalb von 6,5 ist das Protein vollständig inaktiv und bei pH 8 ist es um drei Größenordnungen aktiver als bei pH 7. Aufschlüsse über den Mechanismus und die pH-Abhängigkeit des Transports liefert die kürzlich aufgeklärte Raumstruktur von NhaA (Hunte *et al.*, 2005).

Obwohl es sich bei NhaA um einen pH-regulierten Transporter handelt, der die Aufnahme von Protonen vermittelt, können NhaA-Deletionsmutanten bei alkalischen Bedingungen und in Abwesenheit von Na<sup>+</sup> wachsen. Es muss also ein weiteres System oder andere Mechanismen geben, die das Fehlen von NhaA ausgleichen (Padan *et al.*, 2005). Die Deletion von MdfA, einem sogenannten *multi drug resistance transporter* (MDR Transporter), führt zu einer Alkalisensitivität (Lewinson, *et al.*, 2004). Fluoreszenzstudien mit invertierten Membranvesikeln zeigten, dass

MdfA einen Na<sup>+</sup>- bzw. K<sup>+</sup>-gekoppelten Protonentransport katalysiert. Die Überexpression von MdfA ermöglicht *E. coli*, dessen Toleranzgrenze bei alkalischem Stress bei pH 9 liegt, ein Wachstum bis zu einem externen pH-Wert von 10 (Lewinson *et al.*, 2004). Bisher wurde nicht geklärt, ob NhaA und MdfA redundant wirken.

### 1.4 Auswirkungen von CO<sub>2</sub> auf *E. coli*

Neben dem pH-Wert stellt die CO<sub>2</sub>-Konzentration einen wichtigen Prozessparameter dar. Während der Fermentation entstehen durch die Respiration der Zellen große Mengen CO<sub>2</sub>, die durch Röhren nicht vollständig aus dem Medium entfernt werden können (Hermann, 2003). Die Wirkung von CO<sub>2</sub> auf *E. coli* ist bisher nicht eingehend untersucht. Zum einen wurde eine Toxizität von CO<sub>2</sub> für verschiedene Mikroorganismen gezeigt. CO<sub>2</sub> wird als Schutzgas für Lebensmittel und Futtermittel benutzt und ist dabei zum Beispiel wirksam gegen *Sacharomyces cerevisiae* und *Micrococcus luteus* (Corinth, *et al.*, 1987). In mehreren Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass CO<sub>2</sub> auch auf *E. coli* eine toxische Wirkung ausübt. Diese Wirkung nahm mit einem erhöhten Druck zu (Corinth, *et al.*, 1987; Zhong, *et al.*, 2008). Der Mechanismus der toxischen Wirkung von CO<sub>2</sub> konnte bisher nicht aufgeklärt werden, es werden mehrere Möglichkeiten diskutiert. CO<sub>2</sub> ist lipidlöslich und könnte sich in die Zellmembran einlagern und deren Funktion, z. B. während der Zellteilung oder den Transport betreffend, stören. CO<sub>2</sub> könnte sich über die Bildung und Dissoziation von Kohlensäure auch auf den internen pH-Wert auswirken. Als dritte Möglichkeit wird angegeben, dass CO<sub>2</sub> eine direkte Verbindung mit Proteinen eingehen und deren Funktion beeinträchtigen könnte. Dies könnte zum Beispiel über Carbamatbildung geschehen (Eklund, 1984; Jones und Greenfield, 1982; Bäumchen, *et al.*, 2007).

Neben einer möglichen Toxizität ist CO<sub>2</sub> für die anaplerotischen Reaktionen von Bedeutung. Diese Reaktionen benötigen Bicarbonat als Substrat. Obwohl während der Respiration CO<sub>2</sub> gebildet wird, benötigen viele Bakterien von außen zugeführtes CO<sub>2</sub> für ihr Wachstum (Kusian, *et al.*, 2002). So zeigen auch *C. glutamicum* – Zellen eine lange *lag*-Phase, wenn sie mit einer geringen optischen Dichte inokuliert werden. Diese Phase lässt sich durch eine höhere Animpfdichte oder durch die



Zugabe von Calciumcarbonat verkürzen. Für *E. coli* sind die anaplerotischen Reaktionen auch während der Threoninproduktion von Bedeutung. Als Vorstufe der Threoninbiosynthese dient Oxalacetat, das damit dem Metabolismus entzogen wird. Die Hauptreaktion der Anaplerose in *E. coli* ist die Bildung von Oxalacetat aus Phosphoenolpyruvat (PEP) und Bicarbonat durch die PEP-Carboxylase. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Threoninproduktion in einer Deletionsmutante des korrespondierenden Gens *ppc* um 87 % reduziert war (Lee, *et al.*, 2007). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die anaplerotischen Reaktionen und damit die Versorgung mit Bicarbonat für die Threoninproduktion von Bedeutung sind. In diesem Zusammenhang sind außerdem Carboanhydrasen zu nennen. Sie katalysieren die Reaktion von CO<sub>2</sub> und Wasser zu Kohlensäure. Diese dissoziiert in der Folge zu Bicarbonat und einem Proton. In *E. coli* gibt es mindestens zwei Carboanhydrasen, von denen eine für das Wachstum essentiell ist. Das wird damit erklärt, dass die CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Luft nur 0,04 % beträgt, so dass das im Gleichgewicht mit CO<sub>2</sub> stehende Bicarbonat nicht ausreichen könnte, um den Bedarf der Zelle zu decken. Es ist also essentiell, dass diese Reaktion durch Carboanhydrasen katalysiert wird (Merlin, *et al.*, 2003).

CO<sub>2</sub> bzw. Bicarbonat wird also von den Zellen einerseits für die anaplerotischen Reaktionen zur Auffüllung des Tricarbonsäurezyklus und für weitere Reaktionen benötigt, zum anderen wirkt es unter bestimmten Bedingungen aber cytotoxisch auf *E. coli*.

### 1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die umfassende Charakterisierung des Einflusses von pH- und CO<sub>2</sub>-Stress auf Physiologie und Threoninproduktion von *E. coli*. Im Vorfeld dieser Arbeit war nicht bekannt, welchen Einfluss Veränderungen des externen pH-Werts und der CO<sub>2</sub>-Konzentration auf die Threoninproduktion durch *E. coli* ausüben. Daher sollte zunächst dieser Einfluss quantifiziert werden. Dazu sollten unter möglichst produktionsnahen Bedingungen, die Parameter Wachstum, Threoninproduktion, interner pH-Wert und Energiestatus der Zellen in Abhängigkeit von den beiden Stressfaktoren externer pH-Wert und erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration untersucht werden. Einen weiteren Schwerpunkt der Arbeit bildete die Charakterisierung der pH-

Homöostase von *E. coli*. Dabei sollte der Einfluss bereits bekannter Komponenten auf die effektive pH-Homöostase bei moderaten Veränderungen des externen pH-Werts untersucht werden. Zum Einfluss von CO<sub>2</sub> auf die Physiologie von *E. coli* existierten bisher nur Vermutungen, daher sollten die Auswirkungen von CO<sub>2</sub> auf die physiologischen Parameter von *E. coli* untersucht werden. Außerdem sollte der Wirkmechanismus von CO<sub>2</sub> aufgeklärt werden. In einem Nebenprojekt sollte der Einfluss von Acetat als Nebenprodukt der Threoninproduktion charakterisiert werden. Dabei sollte vor allem der Einfluss von Acetat auf den internen pH-Wert untersucht werden. Aus den Untersuchungen zur Stressantwort von *E. coli* sollten Anhaltspunkte für eine Optimierung der Threoninproduktionsstämme und der Kultivierungsbedingungen während der biotechnologischen Produktion abgeleitet werden.

## 2. Material und Methoden

Alle im Text erwähnten Chemikalien und Reagenzien wurden, sofern nicht näher bezeichnet, von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech Inc. (Freiburg), Applichem (Darmstadt), BioRad GmbH (München), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Millipore (Eschborn), Roth (Karlsruhe), Qiagen (Hilden), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen) und VWR (Darmstadt) bezogen. Voll- und Komplexmedien stammten von Difco Laboratories (Detroit, USA).

### 2.1 Stämme und Plasmide

#### 2.1.1 Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden folgende *E. coli*-Stämme verwendet:

**Tab. 2.1:** Eigenschaften der verwendeten *E. coli*-Stämme

Stamm	Eigenschaften	Referenz
MG1655	K12-Wildtyp $\lambda$ - <i>F-rph-1</i>	Blattner <i>et al.</i> (1997), Jensen (1993)
DH5 $\alpha$ <i>mcr</i> <sup>r</sup>	$\lambda$ - <i>endA1 supE44 thi-1</i> <i>recA1 gyrA96 relA1 deoR</i> $\Delta$ ( <i>lacIZYA argF</i> ) U169 $\Phi$ 80 $\Delta$ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mmr hsdRMS mcrBC</i> )	Grant <i>et al.</i> (1990)
BL21 (DE3)	<i>F ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal</i> <i>dcm (DE3) mit <math>\lambda</math> T7 rna</i> <i>polymerase</i>	Novagen, Darmstadt
MG1655 pUC18 <i>eyfp</i>	MG1655 mit dem Expressionsvektor pUC18 <i>eyfp</i>	Diese Arbeit

Stamm	Eigenschaften	Referenz
DM1891	Produktionsstamm für Threonin	Evonik Degussa, Künsebeck
MG1655 $\Delta nhaA$	MG1655 mit einer Deletion von <i>nhaA</i>	Diese Arbeit
MG1655 $\Delta mdfA$	MG1655 mit einer Deletion von <i>mdfA</i>	Diese Arbeit
MG1655 $\Delta nhaA\Delta mdfA$	MG1655 mit Deletionen von <i>nhaA</i> und <i>mdfA</i>	Diese Arbeit
TK2281	MG1655 mit Deletionen von <i>kup</i> , <i>trk</i> und <i>kdp</i>	Polarek, <i>et al.</i> , 1988

### 2.1.2 Plasmide

In Tab. 2.2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide mit ihren Eigenschaften aufgeführt:

**Tab. 2.2:** Eigenschaften der verwendeten Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pUC18	AP <sup>R</sup> , <i>lacZ</i> $\alpha$ , <i>oriV</i> <sub>E.c.</sub>	Yanisch-Perron, <i>et al.</i> (1985)
pUC18 <i>eyfp</i>	pUC18 mit dem Gen <i>eyfp</i>	Diese Arbeit
pKD46	pINT-ts-Derivat, <i>araC-P</i> <sub>araB</sub> , $\gamma$ $\beta$ <i>exo</i>	Datsenko, <i>et al.</i> (2000)
pKD4	pANTS $\gamma$ -Derivat, FRT-flankierte Kanamycin-resistenz ( <i>kan</i> )	Datsenko, <i>et al.</i> (2000)

### 2.1.3 Oligonukleotide

Tab. 2.3 zeigt die zur Klonierung verwendeten Oligonukleotide. Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind in Fettdruck dargestellt, Sequenzen, die die Bindung an die Vektoren pKD3 und pKD4 ermöglichen (Datsenko, *et al.*, 2000), sind unterstrichen.

**Tab. 2.3:** Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide

Nukleotid	Sequenz	Referenz
mdfA3	TAAGAATGTGCTTAACCGTGGTTTCAGCTACAAAA TTCGCTTTCTCGTT <b>GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC</b>	Diese Arbeit
mdfA5	CACCATTAATTCGAGAATGCCTGATCGCACAAAGC AGTCAGGCATTTTT <b>CATATGAATATCCTCCTTAG</b>	Diese Arbeit
nhaA3	CGGGGTAAAATAGTAAAAACGATCTATTCACCTGA AAGAGAAATAAAA <b>AGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC</b>	Diese Arbeit
nhaA5	GATAACAATGAAAAGGGAGCCGTTTATGGCTCCC CGGTAAACCGTCCTGC <b>CATATGAATATCCTCCTTAG</b>	Diese Arbeit
KmdfA3	TCAGTCAGCGTTCCACAA	Diese Arbeit
KmdfA5	CAGGCAAGTCGTTGAGAA	Diese Arbeit
KnhaA3	GAATCTGTCCGGTAATGG	Diese Arbeit
KnhaA5	TCACTCGTGAGCGCTTAC	Diese Arbeit
EYFP_Bam_3	CAT <b>GGATCCA</b> AGGAGATATAGATATGAGTAAAGG AGAAG	Diese Arbeit
EYFP_Bam_5	CTG <b>GGATCC</b> CTATTTGTATAGTTCATC C	Diese Arbeit

## 2.2 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

### 2.2.1 Nährmedien

#### 2.2.1.1 Vollmedien

*E. coli* wurde in der Regel in LB-Medium kultiviert (Sambrook, *et al.*, 1989). Für die Herstellung von Agarplatten wurden 15 g/L Agar (MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich) zugegeben. Für die Anzucht zur Herstellung kompetenter Zellen wurde

SOB-Medium verwendet, im Anschluss an die Transformation wurde *E. coli* in SOC-Medium kultiviert (Sambrook, *et al.*, 1989).

Für die Untersuchung der Threoninproduktion wurden die Produktionsmedien M1-463 (Hermann und Rieping, 2003) oder M1-1127 (Mechtild Rieping, Evonik Degussa, persönliche Mitteilung) eingesetzt. Außerdem wurde zur Herstellung von Vorkulturen für Fermentationen ein Vorkulturmedium benötigt (Hermann und Rieping, 2003).

**Tab. 2.4:** Zusammensetzung von Vollmedien für *E. coli*

Medium	Zusammensetzung
<b>LB-Medium</b>	10 g/L Trypton 5 g/L Hefeextrakt 10 g/L NaCl
<b>SOB-Medium</b>	20 g/L Trypton 5 g/L Hefeextrakt 0,5 g/L NaCl 2,5 mM KCl pH (NaOH) = 7,0
<b>SOC-Medium</b>	SOB-Medium + 0,4 % Glukose
<b>M1-463</b>	27,7 g/L Saccharose 1,87 g/L Hefeextrakt 4,7 g/L (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,62 g/L NaCl 1,9 g/L K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,38 g/L MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 18 mg/L MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O 18 mg/L FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O

Medium	Zusammensetzung
<b>M1-1127</b>	27,9 g/L Saccharose 9,32 g/L Hefeextrakt 4,73 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,78 g/L $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,4 g/L NaCl 1,32 g/L $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 1,1 g/L $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,037 g/L $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
<b>Vorkulturmedium</b>	2 g/L Hefeextrakt 10 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/L $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,5 g/L $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 20 g/L Saccharose

### 2.2.1.2 Minimalmedien

Für die Kultivierung in Minimalmedium wurde entweder 56/2-Medium (Adelberg und Burns, 1960) oder Minimalmedium nach Roe, *et al.*, 1998 (im Folgenden MMB) verwendet. Von Glucose,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , und Thiamin wurden Stocklösungen hergestellt und getrennt autoklaviert (Glucose) oder sterilfiltriert. Zur Herstellung von Agarplatten wurden 15-20 g/L Agar zugegeben. Bei Versuchen mit dem Produktionsstamm wurde Glucose durch Saccharose ersetzt. Außerdem wurde der erste Schritt der Vorbereitung von Vorkulturen für die Fermentation auf Platten mit einem Minimalmedium durchgeführt (Hermann und Rieping, 2003).

**Tab. 2.5:** Zusammensetzung von Minimalmedien für *E. coli*

Medium	Zusammensetzung
<b>56/2:</b>	5,3 g/L $K_2HPO_4$ 3,03 g/L $NaH_2PO_4$ 1 g/L $(NH_4)_2SO_4$ 2 g/L Glucose 0,12 g/L $MgSO_4 \times 7 H_2O$ 0,065 mg/L $FeSO_4 \times 7 H_2O$ 0,065 mg/L $Ca(NO_3)_2$ 2 mg/L Thiamin pH (NaOH) = 7,5
<b>MMB</b>	17,2 g/L $Na_2HPO_4$ 7,1 g/L NaCitrat 0,87 g/L $K_2HPO_4$ 1 g/L $(NH_4)_2SO_4$ 4 g/L Glucose 0,1 g/L $MgSO_4 \times 7 H_2O$ 20 mg/L $FeSO_4 \times 7 H_2O$ 1 mg/L Thiamin pH (HCl) = 6,0
<b>Minimalmedium für Vorkulturen (Fermentation)</b>	3,5 g/L $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ 1,5 g/L $KH_2PO_4$ 1 g/L $NH_4Cl$ 0,1 g/L $MgSO_4 \times 7 H_2O$ 2 g/L Saccharose



### 2.2.1.3 Antibiotika

Zur Selektion auf Antibiotikaresistenzen wurden folgende Antibiotika verwendet:

**Tab. 2.6:** Übersicht der verwendeten Antibiotika und der eingesetzten Konzentrationen

Antibiotikum	Stocklösung [mg/ml]	Endkonzentration [ $\mu$ g/ml]
Carbenicillin	50	50 oder 100
Kanamycin	25	15 oder 25

### 2.2.1.4 Puffersubstanzen

Für Wachstumsversuche und Messungen des internen pH-Werts wurden folgende Puffersubstanzen in Konzentrationen zwischen 100 und 250 mM eingesetzt. Für Messungen des internen pH-Werts wurden 0,04 % Glucose zugesetzt. Bei Wachstumsversuchen wurden die Puffer dem entsprechenden Medium zugesetzt.

**Tab. 2.7:** Die in dieser Arbeit verwendeten Puffersubstanzen und die pH-Bereiche, in denen sie eingesetzt wurden:

Puffersubstanz	pH-Bereich
Homopipes	4 – 6
MES	6 - 7
MOPS	7 - 8
Tricine	8 - 9
CAPS	9 -10

## 2.2.2 Kultivierungsbedingungen

### 2.2.2.1 Stammhaltung

Für die Stammhaltung wurden Kulturen in Roti<sup>®</sup>-Store – Röhrchen (Roth, Karlsruhe) angelegt. Außerdem wurden Dauerkulturen in 87 % Glycerin hergestellt, aus denen Ausstriche auf Platte vorgenommen wurden. Diese Platten wurden 16 h bei 37 °C inkubiert und anschließend bis zu 30 Tage bei 4 °C gelagert.

### 2.2.2.2 Kultivierung auf Agarplatten

Zur Kultivierung auf Festmedium wurden je 5 µl einer Zellsuspension unterschiedlicher Konzentration von  $OD_{600} = 1$  bis  $10^{-5}$  auf Agarplatten aufgetropft. Die Platten wurden anschließend bis zu 72 h bei 37 °C inkubiert. Zur Dokumentation wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Fotografien mittels UV-Detektor angefertigt.

### 2.2.2.3 Kultivierung in Schüttelkolben

Die Kultivierung in Reagenzgläsern und Schüttelkolben erfolgte in der Regel bei 37 °C und 125 rpm Schüttelfrequenz bei einem Schüttlerradius von 5 cm. Einige Versuche wurden bei 30 °C durchgeführt. Dabei wurden Schüttelkolben mit Schikanen mit den Fassungsvermögen 100, 250, 500 und 2000 ml verwendet, die mit 10, 25, 50 oder 200 ml Kultur befüllt wurden. Die Kontrolle des Wachstums erfolgte durch Messungen der Streuung bei 600 nm im Spektrophotometer (Novaspec II von Pharmacia Biotech Inc., Uppsala, Schweden). Aus der  $OD_{600}$  konnte die Biotrockenmasse (BTM) [g/L] mit Hilfe der folgenden Korrelation berechnet werden:

$$BTM = OD_{600} \times 0,34 \text{ [g/L]}$$

**Gleichung 1:** Korrelation zwischen Zellzahl und  $OD_{600}$

Für Wachstumsversuche und Messungen des internen pH-Werts wurden 5 ml Vollmedium in einem Reagenzglas mit einer sterilen Pipettenspitze mit der entsprechenden Kultur beimpft und für 8 h kultiviert. Aus dieser Vorkultur wurde ein Aliquot entnommen und in 20 – 100 ml des Mediums, in dem der Versuch durchgeführt werden sollte, inkubiert. Nach 16 h wurde eine weitere Kultur in

frischem Medium angesetzt. Diese wurde bis zum Erreichen der spätexponentiellen Phase kultiviert und für den Versuch eingesetzt.

### 2.2.2.4 Kultivierung in Mikrotiterplatten

Die Kultivierung in Mikrotiterplatten erfolgte bei 30 °C und 1200 rpm bei 4 mm Schüttlerradius in 96well – Platten (Rotilabo<sup>®</sup> Mikrosetplatten, Roth, Karlsruhe). Pro well wurden 100 – 200 µl Bakteriensuspension eingesetzt. Zum Schutz vor Verdunstung und Crosskontamination wurden die Platten mit luftdurchlässigen Breathe-Easy – Folien (DiversifiedBiotech, Boston, USA) bedeckt. Die Messung der optischen Dichte der Proben wurde mit dem Plattenlesegerät VICTOR 1420 Multilabel Counter (Wallac, jetzt PerkinElmer, Wellesley, Massachusetts, USA) durchgeführt. Zum Vergleich der Ergebnisse mit denen aus Schüttelkolben- oder Fermentationsversuchen wurde die Korrelation der Messwerte mit denen des Photometers empirisch ermittelt. Im linearen Bereich, der während der Messungen nicht verlassen wurde, konnte die in Gleichung 2 dargestellte Formel für die Umrechnung benutzt werden.

$$OD_{600} = 5,12 \times OD_{Wallac} - 0,52$$

**Gleichung 2:** Korrelation zwischen Messwerten des Plattenlesegeräts und der photometrisch bestimmten  $OD_{600}$

### 2.2.2.5 Kultivierung im Bioreaktor

#### 2.2.2.5.1 Herstellung von Vorkulturen

Für die Herstellung von Vorkulturen für Fermentationen im Bioreaktor wurden Zellen des Threoninproduktionsstamms DM1891 aus einer Dauerkultur auf Minimalmedium-Agarplatten mit Carbenicillin überführt. Nach 4-6 Tagen wurden 50 ml Carbenicillin-haltiges Vorkulturmedium mit einer einzelnen Kolonie beimpft. Nach Erreichen der exponentiellen Phase wurden jeweils 12 ml Zellkultur mit 3 ml Glycerin gemischt und bei –80 °C gelagert. Jeweils eine dieser Vorkulturen wurde zum Beimpfen eines Fermenters benutzt.

### **2.2.2.5.2 Ausstattung des Bioreaktors**

Für Fermentationen wurden 2,5-L-Fermenter mit der Reglereinheit Biostat<sup>®</sup> B (Sartorius BBI Systems, Melsungen) eingesetzt. Die Temperatur wurde über einen wassergefüllten Außenmantel geregelt. Der pH-Wert wurde mit Hilfe von Gelelektrolytelektroden (Mettler Toledo, Gießen) bestimmt und durch die geregelte Zufuhr von Säure oder Base eingestellt. Der Sauerstoffgehalt im Medium wurde über eine O<sub>2</sub>-Elektrode (Mettler Toledo, Gießen) und die Temperatur über einen Temperatursensor (Sartorius BBI Systems, Melsungen) verfolgt. Die Zuluft wurde über einen Sterilfilter mit 0,2 µm Porengröße (Midisart<sup>®</sup>2000, Sartorius BBI Systems, Melsungen) zugeführt. Zur Begasung wurde eine Gasmischbatterie eingesetzt. Eine Steuereinheit und drei Massendurchflussregler für Luft, O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> (Westphal, Haan) ermöglichten die Einstellung beliebiger CO<sub>2</sub>-Konzentrationen bei gleichbleibender O<sub>2</sub>-Versorgung und gleichbleibendem Begasungsvolumen. Insgesamt standen zwei dieser Anlagen zur Verfügung. Die Abluft des Fermenters wurde durch einen Kühler geführt und anschließend sterilfiltriert wie für die Zuluft beschrieben. Die Zellentnahme erfolgte durch einen Schlauch, der an ein Probenahmerohr in der Kultur angeschlossen war.

### **2.2.2.5.3 *batch*-Fermentation im Bioreaktor**

Das Volumen der Zellkulturen im Bioreaktor betrug stets 1,2 L. Das Medium wurde jeweils mit einer Vorkultur beimpft. Zur Sauerstoffversorgung wurden eine Rührerdrehzahl von 1200 rpm und eine Begasungsrate von 1,2 L/min, was 1 vvm entspricht, eingestellt. Der pH-Wert der Kultur wurde durch die automatische Zugabe von 15% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 5 M NaOH geregelt. Die Datenerfassung erfolgte mit Hilfe des Softwarepakets MFCS (Sartorius BBI Systems, Melsungen).

### **2.2.2.6. Kultivierung unter Begasung mit verschiedenen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen**

Wachstumstests unter Begasung mit definierten CO<sub>2</sub>-Konzentrationen in der Zuluft wurden in Glasflaschen (Schott, Mainz) durchgeführt. Das Medium wurde mit 250 mM MES gepuffert, um einen unveränderten pH-Wert sicherzustellen. Die

Durchmischung der Kulturen wurde durch Magnetrührer gewährleistet. Die Begasung erfolgte über Silikonschläuche, die an eine Gasmischbatterie angeschlossen wurden (vgl. Punkt 2.2.2.5.2). Der limitierende Faktor bei diesen Versuchen war die Verdunstung. Um einen Einfluss der verdunsteten Flüssigkeitsmenge auf die Messwerte auszuschließen, wurden relativ große Volumina im Verhältnis zu einer geringen Oberfläche eingesetzt, z.B. 60 ml in einer Flasche mit 100 ml Gesamtvolumen. Zudem wurden die Versuche nach spätestens 8 h abgebrochen und das verbleibende Volumen bestimmt.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 DNA - Präparation

Chromosomale DNA von *E.coli* wurde mit Hilfe einer Phenol-Chloroform-Extraktion gewonnen. Dafür wurden Zellen von Platte in 5 ml LB-Medium überführt und für 16 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch einminütige Zentrifugation bei 14.000 rpm (Zentrifuge 5417 R, Eppendorf, Hamburg) pelletiert und nach Verwerfen des Überstands in 200 µl Wasser resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl Phenol zugegeben, durch vortexen gemischt und 10 min bei 65 °C inkubiert. Der Ansatz wurde 2 min lang auf Eis abgekühlt, dann wurden 200 µl Chloroform:Isoamyl-Alkohol (24:1) und wieder gevortext. Das Gemisch wurde 5 min lang bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert, anschließend wurde der Überstand abgenommen und in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach einem weiteren Waschschrift mit Chloroform wurde die DNA bei 20 °C gelagert.

Um die Reinheit der DNA zu steigern, wurde in einigen Fällen eine Fällung mit Natriumacetat durchgeführt. Dazu wurden 100 µl DNA-Lösung mit 100 µl 2 M Natriumacetat und 1 ml absolutem Ethanol gemischt. Die Fällung erfolgte über 30 – 60 min bei 4 °C. Anschließend wurde der Ansatz 15 min bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann wurde die DNA mit 100 µl 80 % Ethanol gewaschen, abermals zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das DNA-Pellet wurde getrocknet und in 100 µl Wasser resuspendiert.

Für die Extraktion von Plasmid-DNA wurde das Kit Nucleospin<sup>®</sup> Plasmid Quick Pure von Macherey & Nagel (Düren) nach den Anweisungen des Herstellers verwendet.

Dabei werden die Zellen mittels alkalischer Lyse zerstört und die DNA wird über eine Kieselgelmembran gereinigt. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte abweichend von den Herstellerangaben in 20 – 50 µl Wasser. Anschließend wurde die DNA bei -20 °C gelagert.

### 2.3.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung von DNA erfolgte mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion. Oligonukleotide wurden von der Firma Operon (Qiagen, Hilden) bezogen und in Wasser auf eine Konzentration von 100 pmol/µl gelöst. Zur Durchführung der PCR wurde ein Mastermix (Eppendorf, Hamburg) benutzt, der sowohl dNTPs als auch eine Taq-Polymerase enthält. Ein Reaktionsansatz für 50 µl wurde wie folgt zusammengestellt:

20 µl	2,5 x Mastermix
1 µl	Primer I
1 µl	Primer II
2 µl	Chromosomale oder Plasmid-DNA
ad 50 µl	H <sub>2</sub> O

Für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten für die Deletion von Genen in *E. coli* wurde die GoTaq<sup>®</sup> Flexi – Polymerase der Firma Promega (Madison, Wisconsin, USA) mit dem dazugehörigen Puffer verwendet. Hier sah die Zusammenstellung von 50µl Reaktionsvolumen wie folgt aus:

10 µl	10 x Puffer
1 µl	Nukleotid-Mix (10 mM)
1 µl	Primer I
1 µl	Primer II
0,25 µl	Polymerase
2 µl	Plasmid-DNA
ad 50 µl	H <sub>2</sub> O

Die *annealing* – Temperatur wurde anhand der Primer-Sequenzen berechnet. Dabei wurden für ein Adenin oder Thymin 2 °C, für ein Guanin oder Cytosin 4 °C angenommen. Die PCR wurde in den Thermocyclern Mastercycler® personal bzw. Mastercycler® gradient (Eppendorf, Hamburg) oder im Cycler Gene Amp® PCR System 9700 (PE Applied Biosystems, Norwalk, USA) durchgeführt.

### **2.3.3 Agarosegelelektrophorese und Isolierung von DNA aus Agarosegelen**

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA erfolgte elektrophoretisch in 0,8% (w/v)-TAE-Agarosegelen (TAE-Puffer: 40 mM Tris, 2 mM EDTA pH 8,0; 20 mM Essigsäure) nach Sambrook *et al.* (1989). Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das „Nucleo Spin Extract II“ - Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers verwendet. Es wurden alle optionalen Waschschriffe durchgeführt.

### **2.3.4 Restriktion und Ligation von DNA**

Die Restriktion von DNA wurde mit Restriktionsenzymen von NEB (Frankfurt/Main) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zudem benötigte die Restriktion der Vektoren noch das Enzym SAP (Shrimp alkalische Phosphatase), das das 5'-Ende dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors zu unterbinden.

Die Restriktionsansätze wurden entweder mit dem NucleoSpin Extract-Kit (Macherey-Nagel, Düren) direkt oder durch Agarose-Gelelektrophorese in TAE-Puffer (siehe Punkt 3.3) gereinigt. Aus den Agarosegelen wurden die interessierenden DNA-Banden nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung mit einem Skalpell unter UV-Licht ( $\lambda = 366 \text{ nm}$ ) ausgeschnitten und die DNA wurde unter Verwendung des NucleoSpin Extract II - Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach den Angaben des Herstellers isoliert.

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit dem Rapid-DNA-Ligation Kit (Fermentas, St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Um die Anzahl der Kolonien pro Platte zu maximieren, wurden die Ansätze so gewählt, dass

das Insert-Fragment in dreifach höherer Konzentration eingesetzt wurde als das Vektor-Fragment. Für eine Transformation von 200 µl chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen wurden 10 µl Ligationsansatz eingesetzt.

### **2.3.5 Herstellung von Proteinextrakt**

Für die Herstellung eines löslichen Proteinextrakts wurden Zellen des betreffenden Stamms für 16 h in LB-Medium kultiviert. Mit dieser Kultur wurden 50 ml LB-Medium beimpft. Die Zellen wurden bei einer OD<sub>600</sub> von 3 durch 10 min Zentrifugation bei 4.000 rpm, 4 °C geerntet. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 5 ml 10 mM Kalium-Phosphat-Puffer (pH 8) resuspendiert. Für den Aufschluss wurde die Zellsuspension auf 2 ml Cryoröhrchen mit je 300 mg Glasperlen (0,2 – 0,3 mm Durchmesser) verteilt. Der Aufschluss erfolgte durch hochfrequentes Schütteln im FASTPREP-Gerät (FP120, QBIOGENE, Heidelberg) für 4 x 30 Sekunden bei einer Geschwindigkeit von 6,5 m/s. Zwischen den Intervallen wurden die Röhrchen für 3 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C für 30 min sedimentiert. Der Überstand, der die löslichen Proteine enthielt, wurde abgenommen und bei –20 °C gelagert.

## **2.4 Techniken zur Manipulation von Zellen**

### **2.4.1 Herstellung und Transformation kompetenter Zellen**

Chemisch kompetente Zellen von *E. coli* wurden nach INOUE *et al.* (1990) hergestellt. Dabei wurden die Zellen 16 h lang in 5 ml LB-Medium angezogen und von dieser Vorkultur 1 ml in 50 ml SOB-Medium (SAMBROOK *et al.*, 1989) gegeben. Die Zellen wurden 3-4 h bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,6 geschüttelt. Dann wurde die Kultur im Schüttelkolben für 15 min auf Eis gestellt. Nachdem die Zellen in 50 ml „Falcon Tubes“ überführt und bei 4.500x g und 4 °C für 15 min (Eppendorf-Zentrifuge 5810 R) abzentrifugiert wurden, wurde das Pellet in 20 ml eiskaltem TB-Puffer (10 mM Pipes, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl, 55 mM MnCl<sub>2</sub>, pH (KOH) = 6,7) resuspendiert. Es folgte eine weitere Inkubation für 10 min auf Eis. Anschließend wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (4.500x g, 4 °C, 10 min) und das Pellet wurde in 5 ml TB-Puffer resuspendiert. Zu diesem Ansatz wurden dann 350 µl DMSO



portionsweise hinzugefügt und die Kultur wurde ein weiteres Mal für 10 min auf Eis inkubiert. Schließlich wurden die Zellen zu 200 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C aufbewahrt. Für die Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1 – 10 µl Plasmid-DNA vermischt und 30 – 60 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 30 – 45 s bei 42 °C im Heizblock (Thermomixer Compact, Eppendorf, Hamburg) und einer kurzen Inkubation (ca. 2 min) auf Eis wurde dem Ansatz 900 µl SOC-Medium (SAMBROOK *et al.*, 1989) hinzugefügt. Die Zellen wurden direkt danach für 60 min bei 37 °C geschüttelt und schließlich auf LB- Platten mit dem geeigneten Antibiotikum ausgestrichen.

Zur Herstellung elektrisch kompetenter *E. coli* - Zellen wurden Zellen des betreffenden Stamms in 5 ml SOB-Medium bei 37 °C für 16 h kultiviert. Anschließend wurde 1 ml dieser Vorkultur in 50 ml SOB-Medium gegeben und bei 37 °C für ca. 3 h bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 geschüttelt. Die Zellen wurden dann im Schüttelkolben eine Stunde lang auf Eis inkubiert, auf zwei „Falcon-tubes“ verteilt, bei 4 °C und 4.000 rpm in 10 min abzentrifugiert und nach Verwerfen des Überstands in je 25 ml eiskaltem Wasser resuspendiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation, nach der die Pellets vereint und in insgesamt 25 ml eiskaltem Wasser resuspendiert wurden. Nach einem dritten Zentrifugationsschritt wurde wieder der Überstand verworfen und das Pellet mit Hilfe einer Glaspipette in 2 ml 10% Glycerol aufgenommen. Anschließend wurde ein weiteres Mal zentrifugiert und das Pellet wurde schließlich in 200 µl 10% Glycerol resuspendiert. Es folgte eine einstündige Inkubation auf Eis, dann wurden die Zellen zu je 40 µl in Eppendorf-Reaktionsgefäßen aliquotiert und in Flüssigstickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Für die Elektroporation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1 µl Plasmid-DNA vermischt und 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurde der Ansatz in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette mit 1 mm Elektrodenabstand (peQLab, Erlangen) überführt. Die Zellen wurden hierauf in einem Gene-Pulser (Biorad) durch einen Elektropuls von 1,8 kV bei 600 Ω Parallelwiderstand und 25 µF Kapazität elektroporiert. Sofort nach dem Puls wurde 1 ml SOC-Medium zugegeben. Der Inhalt der Küvette wurde danach in ein 1,5 ml- Eppendorf-Gefäß überführt, die Zellen wurden dann 120 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und schließlich auf LB-Platten mit dem geeigneten Antibiotikum ausgestrichen.

### 2.4.2 Deletionsmutagenese von *E. coli*

Die Deletionsmutagenese von *E. coli*-Zellen wurde nach Datsenko, *et al.* (2000) durchgeführt. Dabei wird zunächst das zu deletierende Gen mittels homologer Rekombination gegen ein DNA-Fragment ausgetauscht, das ein Kanamycinresistenzgen enthält. Die dafür notwendigen Rekombinationsenzyme werden über ein Plasmid exprimiert. Die Kassetten enthält außerdem Erkennungssequenzen für eine weitere Rekombinase, mit deren Hilfe die Kassetten wieder entfernt werden kann, so dass eine vollständige Deletion entsteht.

Zur Durchführung der Deletion wurde der Ausgangsstamm zunächst mit dem Plasmid pKD46 transformiert, auf dem die Gene der für die Rekombination nötigen Proteine kodiert sind. Dieses Plasmid besitzt eine temperaturregulierten *origin*, so dass es nur bei 30 °C repliziert wird. Die Zellen wurden daher nach der Transformation nur noch bei 30 °C kultiviert. Das Plasmid enthält außerdem eine Carbenicillinresistenz, daher wurden zur Selektion Medien mit Carbenicillin verwendet. Das für die Deletion notwendige lineare DNA-Fragment wurde mit der GoTaq® Flexi – Polymerase (Promega, Madison, Wisconsin, USA) hergestellt (siehe Punkt 2.3.2). Dabei wurde das Plasmid pKD4 als *template* verwendet. Dieses enthält die Kanamycinresistenzkassette und Schnittstellen für die zweite Rekombinase. Die verwendeten Primer enthielten Sequenzen, die an das Plasmid binden, und 69 Basen lange Sequenzen, die homolog zu den flankierenden Bereichen des Zielgens sind. Dadurch wird die Rekombination ermöglicht. Im folgenden wurden elektrokompente Zellen des Stamms mit dem Plasmid pKD46 hergestellt. Dabei wurde die Kultivierungstemperatur bei 30 °C gehalten und dem Medium Carbenicillin zugegeben, um den Erhalt des Plasmids zu gewährleisten. Außerdem wurden dem Medium 10 mM L-Arabinose zugeführt, um die Expression der Rekombinationsproteine zu induzieren. Die Zellen wurden anschließend mit dem DNA-Fragment elektroporiert und bei 37 °C in SOC-Medium regeneriert. Während dieser Phase sollte die Rekombination stattfinden. Der Ausstrich erfolgte auf LB-Medium mit Kanamycin, um auf den Besitz der Resistenzkassette zu selektieren. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C, so dass das Plasmid pKD46 nicht mehr repliziert wurde und daher nach einigen Verdopplungen nicht mehr in den Zellen anzutreffen war. Das Ergebnis dieser Schritte war ein plasmidfreier Stamm, der anstelle des Zielgens eine Kanamycinresistenzkassette enthielt. Der Austausch wurde mittels PCR mit

Primern, die *upstream* und *downstream* des Gens bzw. der Kasette oder auf der Kasette selbst binden, überprüft.

Im weiteren wurden von diesem Stamm chemisch kompetente Zellen hergestellt und mit dem Plasmid pCP20 transformiert. Dieses Plasmid trägt das Gen für eine Rekombinase, die an den Erkennungssequenzen *upstream* und *downstream* der Resistenzkasette angreift und diese ausschneidet. Das Plasmid hat ebenfalls einen temperaturabhängigen *origin* und kann nach erfolgter Rekombination durch Erhöhung der Kultivierungstemperatur wieder aus den Zellen entfernt werden. Nach erfolgter Transformation und Ausstrich auf Carbenicillin wurden einzelne Kolonien in je 5 ml LB-Medium bei 30 °C für 16 h inkubiert, dann wurden die Zellen in verschiedenen Konzentrationen auf LB-Platten ausgestrichen. Anschließend wurden Kolonien isoliert, die keinerlei Antibiotika-Resistenzen mehr aufwiesen. Diese Klone wurden anschließend mittels PCR überprüft.

### 2.4.3 Expression von EYFP

Das Gen *eyfp*, das für ein gelb fluoreszierendes Protein kodiert, wurde durch PCR mit der genomischen DNA eines *Bacillus subtilis* - Stamms amplifiziert. Das Gen war zuvor in das Genom dieses Stamms integriert worden (Kawai, *et al.* 2006). Die Primer enthielten die Schnittstelle für das Restriktionsenzym BamHI. Das PCR-Produkt und der Vektor pUC18 wurden mit BamHI verdaut und gereinigt. Der Vektor wurde außerdem mit alkalischer Phosphatase behandelt. Anschließend erfolgten die Ligation und die Transformation in *E. coli* DH5 $\alpha$ . Aus diesem Stamm wurde das Plasmid gereinigt, mit Hilfe von PCR und Restriktion überprüft und anschließend in MG1655 transformiert. Die Funktionalität des Proteins wurde durch Fluoreszenzmessungen überprüft.

## 2.5 Biochemische Methoden

### 2.5.1 Bestimmung des Cytoplasmavolumens

Die Bestimmung des Cytoplasmavolumens wurde nach einer modifizierten Methode nach ROTTENBERG durchgeführt (1979). Dabei wird die Verteilung eines permeablen radioaktiven Isotops ( $^3\text{H}_2\text{O}$ ) und eines nichtpermeablen radioaktiven Isotops (Inulin- $^{14}\text{C}$ -carboxylsäure) in der Zelle und im Vergleich dazu im Medium gemessen. Dazu wurden 0,7 ml Aliquots der jeweiligen Zellsuspensionen in exponentieller Phase bei einer  $\text{OD}_{600}$  von 3 bis 5 mit 10  $\mu\text{l}$  einer Gebrauchslösung der markierten Sonden 1 min bei 30 °C unter Rühren inkubiert. Dieser Testansatz (0,71 ml) enthielt dann 0,39  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}_2\text{O}$ , 0,1  $\mu\text{Ci}$  Inulin- $^{14}\text{C}$ -carboxylsäure und zwischen 0,75 und 1,25 mg Biotrockenmasse. Nach der Inkubation wurden dreimal je 200  $\mu\text{l}$  des Testansatzes in Mikrozentrifugenröhrchen (Milian, Genf) pipettiert, die mit 30  $\mu\text{l}$  20%iger Perchlorsäure und 70  $\mu\text{l}$  Silikonöl der Dichte  $d = 1,04 \text{ g/cm}^3$  (Wacker, Burghausen) vorbeladen waren. Diese wurden 30 s in einer Microfuge E (Beckman Instruments, München) zentrifugiert, wodurch die schnelle Trennung der Zellen vom Medium sowie das sofortige Abstoppen des Stoffwechsels erfolgten (KLINGENBERG und PFAFF, 1967). Nach der Zentrifugation wurden je 100  $\mu\text{l}$  des Überstands (zellfreies Medium) abgenommen und in Szintillationsgefäße überführt. Die Zentrifugenröhrchen wurden nun in der mittleren Phase (Silikonölphase) durchtrennt. Die Spitzen, welche das Zellpellet enthielten, wurden mit der Öffnung nach unten in einem Eppendorfgefäß 1 min bei 13000 x g zentrifugiert. Nach Entfernung der Spitzen mit Hilfe von Einmalinjektions-Kanülen (Henke-Sass-Wolf GmbH, Tuttlingen) wurden die Pellets in je 200  $\mu\text{l}$  Wasser resuspendiert und in Szintillationsgefäße überführt. Diese, sowie die Szintillationsgefäße mit den Überständen, wurden nun mit je 3,8 ml Szintillationsflüssigkeit (Ecoszint, Roth, Karlsruhe) versetzt und geschüttelt. Die Zerfälle pro Minute (dpm) von  $^3\text{H}_2\text{O}$  und Inulin- $^{14}\text{C}$ -carboxylsäure wurden nun mit dem Flüssig-Szintillationszähler LS 6500 (Beckman Instruments GmbH, München) ausgezählt. Das spezifische Cytoplasmavolumen wurde mit den ermittelten Werten nach folgender Gleichung (ROTTENBERG, 1979) berechnet:

$$V_C = \frac{V_{\text{Probe}} \times \left( \frac{A_{[{}^3\text{H}]Pellet}}{A_{[{}^3\text{H}]Überstand}} - \frac{A_{[{}^{14}\text{C}]Pellet}}{A_{[{}^{14}\text{C}]Überstand}} \right)}{\text{BTM}}$$

**Gleichung 3:** Berechnung des spezifischen Cytoplasmavolumens

$V_C$  = spezifisches Cytoplasmavolumen [ $\mu\text{l}/\text{mg}$ ]

A = gemessene Aktivität [dpm]

BTM = Biotrockenmasse

Kontrollmessungen mit reinen  ${}^3\text{H}$ - und  ${}^{14}\text{C}$ -Proben zeigten, dass das hierzu verwendete Programm (Nr. 11) zwar die Anzahl der Zerfälle des tatsächlich vorhandenen radioaktiven Isotops richtig wiedergibt, jedoch 0,7 % der  ${}^3\text{H}$ -Counts auch fälschlicherweise als  ${}^{14}\text{C}$ -Counts und 2 % der  ${}^{14}\text{C}$ -Counts als negative  ${}^3\text{H}$ -Counts angegeben werden (Follmann, 2008). Daher wurden die angegebenen Werte vor der Auswertung folgendermaßen korrigiert: Der  ${}^3\text{H}$ -Wert wurde um 2 % des  ${}^{14}\text{C}$ -Wertes vergrößert, der  ${}^{14}\text{C}$ -Wert um 0,7 % des  ${}^3\text{H}$ -Wertes vermindert.

### 2.5.2 Bestimmung des internen pH-Werts mit Hilfe radioaktiver Sonden

Der Gradient zwischen dem zellinternen und dem externen pH-Wert wurde durch die Bestimmung der Verteilung einer schwachen Säure bzw. einer schwachen Base über die Zellmembran berechnet (ROTTENBERG, 1979 und KASHKET, 1985). Die Methode macht sich zu Nutze, dass die Membran für die jeweilige neutrale Form frei permeabel, für das Ion jedoch impermeabel ist. Für den Fall, dass der interne pH-Wert über dem externen lag, wurde [ ${}^{14}\text{C}$ ]-markierte Benzoesäure als Sonde eingesetzt. Unter der Annahme, dass die Säure innerhalb und außerhalb der Zelle die gleiche Dissoziationskonstante ( $\text{p}K_S \sim 4,2$ ) aufweist und die ionisierte Form unter den gegebenen Bedingungen ( $\text{pH}_{\text{ex}} > \text{p}K_S + 1$ ) den weitaus größten Anteil stellt, kann von der Gesamtverteilung der Benzoesäure (nur die Gesamtkonzentrationen sind der Messung zugänglich) direkt auf die Verteilung des Benzoats geschlossen und der pH-Gradient berechnet werden:

$$\Delta\text{pH} = \text{pH}_{\text{in}} - \text{pH}_{\text{ex}} = \log \left( \frac{[\text{Benzoat}]_{\text{in}}}{[\text{Benzoat}]_{\text{ex}}} \right)$$

**Gleichung 4:** Bestimmung  
des pH Gradienten bei  $\text{pK}_{\text{S}}$   
 $+ 1 < \text{pH}_{\text{ex}} < \text{pH}_{\text{in}}$

Wenn der externe pH-Wert nicht um mindestens eine Einheit größer als der  $\text{pK}_{\text{S}}$ -Wert der Sonde war, befand sich ein signifikanter Anteil der Säure in der undissoziierten Form und konnte nicht vernachlässigt werden. Hier ergab sich der interne pH-Wert aus:

$$\text{pH}_{\text{in}} = \log \left( \frac{[\text{Benzoessäure}]_{\text{total in}}}{[\text{Benzoessäure}]_{\text{total ex}}} \left( 10^{\text{pK}_{\text{S}}} + 10^{\text{pH}_{\text{ex}} - \text{pK}_{\text{S}}} \right) - 10^{\text{pK}_{\text{S}}} \right)$$

**Gleichung 5:** Bestimmung  
des pH Gradienten bei  $\text{pK}_{\text{S}}$   
 $+ 1 > \text{pH}_{\text{ex}} < \text{pH}_{\text{in}}$

Zur Bestimmung der intra- und extrazellulären Benzoatkonzentration wurden je 0,7 ml der untersuchten Zellkultur in exponentieller Phase bei einer  $\text{OD}_{600}$  von 3 bis 5 mit 20  $\mu\text{l}$  einer Gebrauchslösung der markierten Sonde 1 min bei 30 °C unter Rühren inkubiert. Dieser Testansatz (0,72 ml) enthielt dann ca. 15  $\mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-markierter Benzoessäure (spezifische Aktivität der Gebrauchslösung: 3,12 mCi/mmol) und zwischen 0,75 und 1,25 mg Biotrockenmasse. Die Zellen wurden anschließend durch Silikonölzentrifugation vom Medium getrennt und die Überstände und die Sedimente wurden für die Bestimmung der internen und externen Benzoatkonzentrationen aufgearbeitet (siehe 5.1). Unabhängig vom pH-Gradienten bindet die Sonde auch unspezifisch an der Zelloberfläche und im Zellinneren. Daher wurde zur Korrektur die Bestimmung der internen Benzoatkonzentration auch mit Zellen durchgeführt, die zuvor mit 50  $\mu\text{M}$  CCCP deenergetisiert worden waren. Der so ermittelte Wert für die Menge des unspezifisch gebundenen internen Benzoats wurde von dem entsprechenden Wert der unbehandelten Zellen abgezogen. Mit Hilfe der parallel durchgeführten Volumenbestimmungen konnten schließlich die interne Benzoatkonzentration und der pH-Gradient nach den oben angegebenen Formeln berechnet werden.

Für den Fall, dass der interne pH-Wert unter dem externen lag, wurde [<sup>14</sup>C]-markiertes Methylammonium (pK<sub>S</sub> = 10,65) als Sonde verwendet. Analog zur Bestimmung mit Benzoesäure kann der pH-Gradient durch die folgenden Gleichungen berechnet werden:

$$\Delta\text{pH} = \text{pH}_{\text{ex}} - \text{pH}_{\text{in}} = \log \left( \frac{[\text{Methylammonium}^+]_{\text{in}}}{[\text{Methylammonium}^+]_{\text{ex}}} \right)$$

**Gleichung 6:** Bestimmung  
des pH Gradienten bei pK<sub>S</sub>  
- 1 > pH<sub>ex</sub> > pH<sub>in</sub>

$$\text{pH}_{\text{in}} = -\log \left( \frac{[\text{Methylammonium}_{\text{total}}]_{\text{in}}}{[\text{Methylammonium}_{\text{total}}]_{\text{ex}}} \left( 10^{-\text{pKs}} + 10^{-\text{pHex}} \right) - 10^{-\text{pKs}} \right)$$

**Gleichung 7:** Bestimmung  
des pH Gradienten bei pK<sub>S</sub>  
- 1 < pH<sub>ex</sub> > pH<sub>in</sub>

Die Bestimmung der intra- und extrazellulären Methylammoniumkonzentrationen erfolgte wie oben beschrieben (15 μM [<sup>14</sup>C]-markiertes Methylammonium Endkonzentration bei einer spezifischen Aktivität der Gebrauchslösung von 3,3 mCi/mmol). Allerdings wurde zur Bestimmung der unspezifischen Bindung CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid) in einer Endkonzentration von 0,022 % verwendet, da CCCP bei hohen pH-Werten nicht schnell genug wirkt.

### 2.5.3 Bestimmung des cytoplasmatischen pH-Werts durch Fluoreszenzspektrometrie

Für die Bestimmung des internen pH-Werts wurde neben radioaktiven Sonden auch die Fluoreszenzspektroskopie benutzt. Dabei wurde die pH-abhängige Fluoreszenz des Proteins EYFP beobachtet. Dieses Protein wurde in den zu untersuchenden Zellen von einem Plasmid exprimiert. Die Messung wurde in der Regel in 250 mM MES-Puffer durchgeführt. Zur Energetisierung der Zellen wurde Glucose in einer Endkonzentration von 0,4% zugegeben. Die Messungen wurden im

Fluoreszenzspektrometer Aminco Bowman Series 2 (SIM-Aminco, Rochester, NY, USA) bei 37 °C und unter ständigem Rühren durchgeführt. Hierfür wurden Makro-Einmalküvetten (Ratiolab, Dreieich) verwendet. Da eine Seite dieser Küvetten weniger durchsichtig ist, wurden sie stets in derselben Ausrichtung in das Gerät gestellt. Für punktuelle Messungen wurde ein Zeitverlauf von 5 s mit einer Auflösung von 1 ms aufgenommen und der Mittelwert aller Messwerte verwendet. Zur Beobachtung der Reaktion des internen pH-Werts auf die Zugabe von Substanzen wurden Zeitverläufe bis zu 10 min mit einer Auflösung von 1 s gemessen. Die ermittelten Werte für die maximale Fluoreszenz ergaben eine Excitationswellenlänge von 512 nm und eine Emissionswellenlänge von 525 nm. Daher wurde stets bei diesen Wellenlängen gemessen.

### **2.5.4 Bestimmung externer Metabolite mittels HPLC**

Für die Bestimmung externer Metabolite mit Hilfe der *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC) wurde während der Wachstumsphase 1 ml Zellsuspension entnommen, in einem Eppendorf-Gefäß für 30 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und der zellfreie Überstand abgenommen und bis zur Messung bei -20 °C gelagert. Für die Bestimmung der Threoninkonzentration wurden die Proben jeweils 1:10 und 1:100 verdünnt. Glutamat wurde unverdünnt gemessen. Für die Analyse von Aminosäuren wurde eine HPLC-Anlage HP 1100 (Hewlett-Packard, Waldbronn, BRD) mit angeschlossenem Fluoreszenzdetektor der Serie HP 1100 verwendet. Die in den Proben enthaltenen Aminosäuren wurden der automatischen Vorsäulenderivatisierung mit 10 fachem Überschuss an o-Phthaldialdehyd/Borat/2-Mercaptoethanol-Reagenz (Pierce Europe, B. V. Oud-Beijerland, NL) unterzogen. Dabei werden primäre Aminosäuren zu fluoreszierenden thiosubstituierten Isoindolen derivatisiert (LINDROTH und MOPPER, 1979), deren Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 230 nm und einer Emissionswellenlänge von 455 nm detektiert werden kann. Die Auftrennung erfolgte über eine „reversed phase“ Säule RP-18 (Vorsäule Multospher: 40 x 4 mm von CS Chromatographie, Langerwehe; Trennsäule Nucleodur RP-18: 125 x 4 mm von Macherey-Nagel, Düren) bei 35 °C und einem Fluss von 0,8 ml/min. Als mobile Phase wurde eine Mischung aus Puffer B (50% Methanol, 50% Acetonitril) und Puffer D (95% 40 mM Na<sup>+</sup>-Acetatpuffer pH =



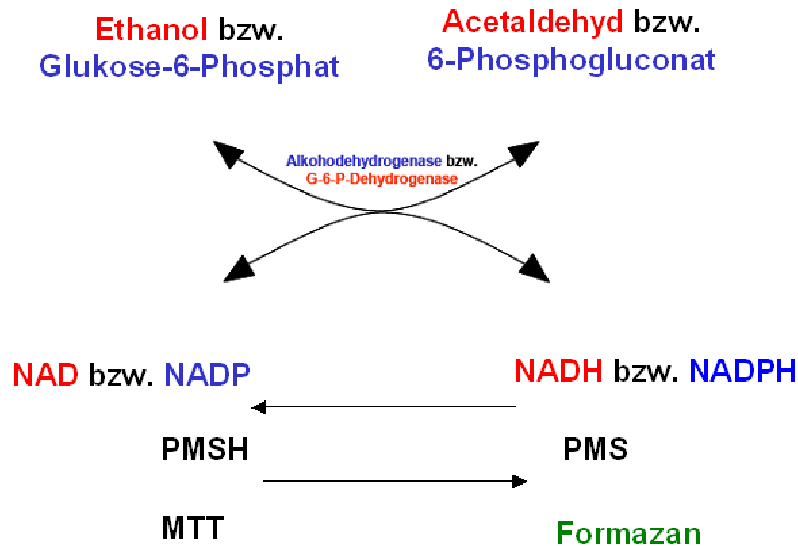
6,5 mit 0,06% Na<sup>+</sup>-Azid; 5 % Puffer B) verwendet. Die Mischung wurde gemäß eines Gradientenprogramms während des Laufs von 100 % Puffer A auf 0 % Puffer A geändert. Durch eine automatisch ermittelte Kalibrierungsreihe, der fünf definierte Konzentrationen der Aminosäuren von 25 µM, 50 µM, 100 µM, 250 µM und 500 µM zugrunde lagen, konnten die *Peak*-Flächen der Proben direkt in die entsprechende Konzentration umgerechnet werden.

Für die Analyse der organischen Säuren wurde eine HPLC-Anlage EZChromElite von VWR mit einem UV-Detektor verwendet. Die Detektion erfolgte bei 210 nm. Zur Auftrennung wurde die Säule Sugar810H von Macherey & Nagel, Düren eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte isokratisch mit 0,01 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> als Laufmittel. Die Temperatur betrug 40 °C. Die Zuordnung der Signale und die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe externer Standards mit 1 mM, 5 mM, 10 mM, 25 mM und 50 mM der entsprechenden Substanz. Dazu wurde die Software EZChromElite (VWR, Darmstadt) verwendet. Die Analyse von Mono- und Disacchariden erfolgte nach derselben Methode, die zum Nachweis organischer Säuren eingesetzt wurde, allerdings erfolgte die Detektion hier mittels RI-Detektor.

### **2.5.5 Bestimmung der internen Konzentrationen der Nicotinamidadenindinukleotide**

Die internen Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Konzentrationen wurden mit Hilfe eines zyklischen Tests bestimmt (BERNOFSKY und SWAN, 1973). Dabei wurden die Coenzyme zunächst in einer enzymkatalysierten Reaktion reduziert. Die Reoxidation führte im Anschluß über zwei nicht enzymatische Schritte zur Reduktion von Thiazolyl-Blau (MTT) und damit zur Bildung eines Formazans, das bei 570 nm photometrisch nachgewiesen werden konnte (Abb. 2.1). Da die Konzentration des zu bestimmenden Coenzym unter dem  $K_M$ -Wert des Eingangsenzyms lag und die enzymkatalysierte Reaktion den geschwindigkeits-bestimmenden Schritt der Reaktionsfolge darstellte, war die der Messung zugängliche Bildungsrate des Formazans der Coenzymkonzentration direkt proportional. Die Eichung der Messung erfolgte mit Hilfe von NAD- bzw. NADPD-Standardlösungen. Der Einsatz entweder der NAD-spezifischen Alkoholdehydrogenase oder der NADP-spezifischen Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase erlaubte die Differenzierung zwischen NAD und NADP.

Zur separaten Quantifizierung von oxidiertem und reduziertem Form kam ein saurer und ein alkalischer Zellaufschluss zum Einsatz: Je nach pH-Wert ist nur die eine Form stabil, während die andere zerfällt. Bei saurem pH-Wert sind die oxidierten Formen stabil, bei alkalischem pH-Wert die reduzierten.



**Abb. 2.1:** Reaktionsprinzip der Bestimmung von NAD, NADH, NADP und NADPH. PMS(H) steht für 5-Methylphenazinium-Methylsulfat, oxidiert/reduziert. MTT steht für Thiazolyl-Blau, 3-(4',5'-dimethyl-thiazolyl-2-)-2,4-(diphenyltetrazoliumbromid)

Für die saure Extraktion wurde 1 ml einer Zellsuspension in exponentieller Phase mit 100  $\mu$ l einer vorgelegten 1 M HClO<sub>4</sub>-Lösung vermischt ( $\rightarrow$  pH 1), 10 min bei 55 °C inkubiert und anschließend mit 90  $\mu$ l einer 2M KOH-Lösung neutralisiert ( $\rightarrow$  pH 7). Für die alkalische Extraktion wurde 1 ml der Zellsuspension mit 200  $\mu$ l einer 1M KOH-Lösung (50 % v/v EtOH) vermischt ( $\rightarrow$  pH 12), 10 min bei 55 °C inkubiert und mit 12  $\mu$ l einer 1 M HCl-Lösung neutralisiert ( $\rightarrow$  pH 7). Die pH-Werte wurden jeweils mit pH-Teststreifen bestimmt. Der Extraktionserfolg wurde mit Hilfe von Standard-Lösungen der Nicotinamid-Adenin-Dinukleotide (je 1  $\mu$ M) überprüft. Dabei wurden die Aktivitäten der NAD-abhängigen Alkoholdehydrogenase bzw. der NADP-abhängigen Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase [ $10^{-3} \Delta E570 \text{ min}^{-1} \text{ pmol}^{-1}$ ] für die Standardnukleotide, welche den Extraktionsprotokollen unterworfen bzw. nicht unterworfen worden waren, gemessen. Die Aktivität (Kontrollwert), bei der das Nukleotid keiner Extraktion unterworfen worden war, wurde als 100% definiert. Diese

Kontrollmessungen zeigten, dass im Fall der oxidierten Formen nach saurer Extraktion noch nahezu 100% der Kontrollaktivität gemessen wurden, während nach alkalischer Extraktion keine Aktivität mehr messbar war. Umgekehrt konnten die reduzierten Formen nach alkalischer Extraktion noch vollständig nachgewiesen werden, während sie bei der sauren Extraktion völlig zerstört wurden.

Aufgrund der durchgeführten Volumenbestimmungen konnten die internen Konzentrationen berechnet werden.

### Katalytischer Test

- 500 µl Testpuffer
  - 0,2 M Glycylglycin
  - 0,2 M Nicotinsäureamid, pH 7,4
- 100 µl PMS (4 mg/ml)
- 25 µl MTT (5 mg/ml)
  - **NAD(H)-Bestimmung**
    - 40 µl EtOH
    - 50 µl Extrakt
    - 275 µl H<sub>2</sub>O
    - Start durch Zugabe von 10 µl Alkoholdehydrogenase (4500 U/ml)
  - **NADP(H)-Bestimmung**
    - 25 µl 15 mM Glukose-6-Phosphat
    - 10 µl 5 mM MgSO<sub>4</sub>
    - 50 µl Extrakt
    - 280 µl H<sub>2</sub>O
    - Start durch Zugabe von 10 µl Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (140 U/ml)
- Messung von  $\Delta E/\text{min}$  bei 570 nm über einen Zeitraum von 1 min

### 2.5.6 Bestimmung der internen Konzentration von ATP, ADP und AMP

Die Bestimmung der internen Adeninnukleotide erfolgte mit dem Luciferin/Luciferase System über die Messung der Lichtemission (modifiziert nach LUNDIN *et al.*, 1976 und SCHIMZ *et al.*, 1981). Die Messungen liefen nach folgendem Reaktionsprinzip ab:



Dabei ist die Lichtemission proportional zur ATP-Menge. Da der verwendete Luciferin/Luciferase-Rohextrakt jedoch keine zeitlich konstante Lichtemission liefert, wurde statt der Emissionsrate die Lichtemission während der ersten 20 Sekunden (oder länger) nach Start der Reaktion bestimmt. Dabei wurde die maximale Emission als Messwert verwendet. Die Proportionalität des Messwertes zum ATP-Gehalt der Probe wurde mit Hilfe eines internen ATP-Standards überprüft. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die ATP-Menge im Standard deutlich höher ist als die ATP-Menge in der Probe. Außerdem mussten die Messwerte innerhalb des linearen Bereichs einer am selben Tag erstellten Eichreihe liegen. Die ATP-Menge im Ansatz wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{ATP-Menge} = C_{\text{Probe}} * \text{ATP-Menge}_{\text{IS}} / (C_{\text{IS}} - C_{\text{Probe}}) \quad \text{Gleichung 8: Bestimmung der ATP-Menge}$$

$C_{\text{Probe}}$  = Counts bei Probe

$C_{\text{IS}}$  = Counts bei Probe mit internem Standard

$\text{ATP-Menge}_{\text{IS}}$  = als interner Standard zugegebene ATP-Menge

Zur Bestimmung von ADP wurde dieses in Anwesenheit von Phosphoenolpyruvat enzymatisch durch die Pyruvatkinase zu ATP umgesetzt und dann ebenfalls entsprechend des oben genannten Prinzips als ATP nachgewiesen. Die ADP-Menge ergab sich aus der Differenz zwischen der ATP-Menge vor und nach der Überführung des gesamten ADPs in ATP. Zur Bestimmung von AMP wurde durch

den Einsatz der Myokinase zunächst das gesamte AMP in ADP überführt, welches anschließend durch die Pyruvatkinase zu ATP umgesetzt wurde. Die AMP-Menge ergab sich aus der Differenz aus ATP + ADP und der Gesamtmenge aller Adeninnukleotide. Aufgrund der durchgeführten Volumenbestimmungen konnten die internen Konzentrationen berechnet werden.

### Extraktion und Probenvorbereitung

Die Nukleotide wurden durch Mischung der Zellen mit Dimethylsulfoxid (DMSO) extrahiert (KRÄMER *et al.*, 1990 und LEFEBVRE *et al.*, 1988). Dafür wurden 40 µl Aliquots von Zellsuspensionen unmittelbar nach Entnahme in 360 µl DMSO eingespritzt, sofort mit 1,4 ml eiskaltem Wasser vermischt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Analyse bei – 80 °C aufbewahrt.

### Durchführung der ATP-Bestimmung

Für die ATP-Bestimmung wurden die unbehandelten Extrakte eingesetzt. Die Bestimmungsansätze setzten sich folgendermaßen zusammen:

- 10 bis 100 µl Extrakt
- 800 µl Testpuffer
  - 50 mM Tris, pH (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) = 7,4
  - 3,5 mM MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O
  - 2,5 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
  - 0,6 mM EDTA
- ad 900 µl H<sub>2</sub>O

Start durch Injektion von

- 100 µl Luciferin/Luciferase
  - Suspension von 50 mg Lyophilisat in 8 ml,
  - unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation entfernt.
  - (Buffered Firefly Lantern Extract, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

### Durchführung der ADP-Bestimmung

Die Überführung des gesamten ADPs der Extrakte in ATP erfolgte in folgendem Reaktionsansatz:

- 500 µl Extrakt
- 45 µl PEP Puffer
  - 50 mM Phosphoenolpyruvat
  - 500 mM MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O
  - 2 M KCl
  - 100 mM Tris, pH 7,5 mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 5 µl Pyruvatkinase (2000 U/ml)

Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der ATP-Gehalt dieser Proben nach dem oben beschriebenen Verfahren bestimmt.

### Durchführung der AMP-Bestimmung

Die Überführung des gesamten ADPs und AMPs der Extrakte in ATP gelang in folgendem Reaktionsansatz:

- 500 µl Extrakt
- 45 µl PEP Puffer
  - siehe oben
- 5 µl Pyruvatkinase (2000 U/ml)
- 10 µl Myokinase (1800 U/ml)

Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der ATP-Gehalt dieser Proben nach dem oben beschriebenen Verfahren bestimmt.

## 3. Ergebnisse

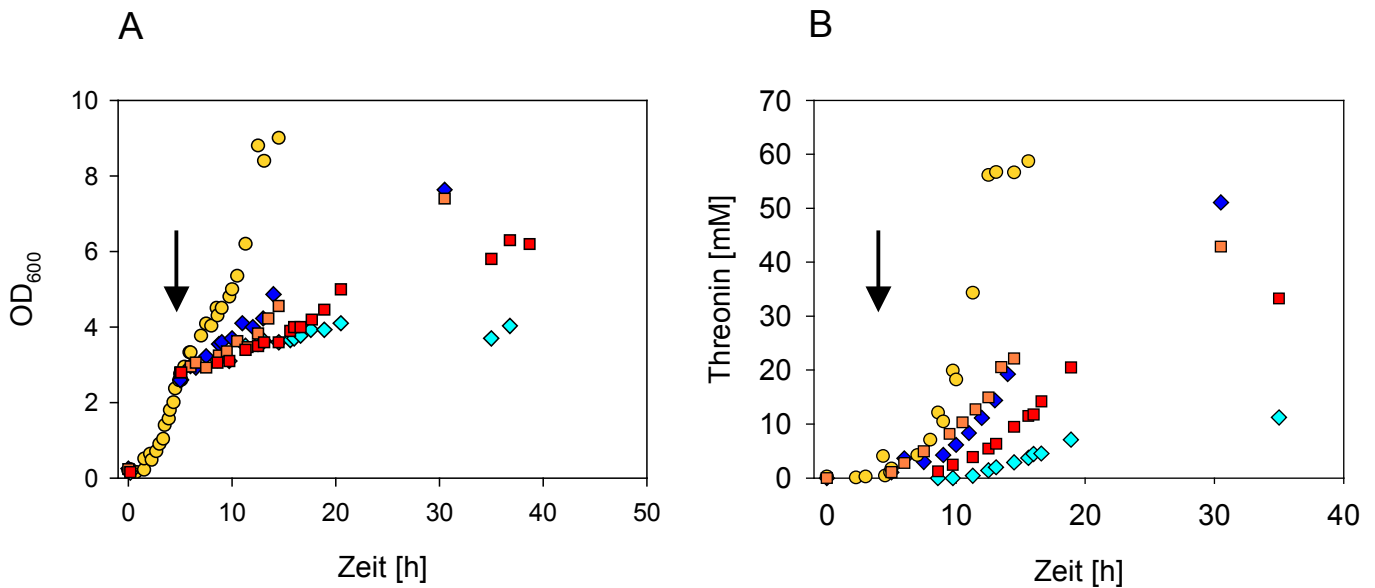
### 3.1 Auswirkungen von pH- und CO<sub>2</sub>-Stress auf die Threonin- Produktion

Im Vorfeld dieser Arbeit war nicht bekannt, ob die abiotischen Faktoren pH und CO<sub>2</sub>-Konzentration einen Einfluss auf die Produktivität des Threoninproduktionsstamms DM1891 ausüben. Zu Beginn der Arbeit wurde daher der Einfluss von pH- und CO<sub>2</sub>-Stress auf die Physiologie und die Threoninproduktion des Stamms charakterisiert.

#### 3.1.1 Einfluss von pH-Stress auf die Threoninproduktion durch *E. coli*.

Der Einfluss von pH-Stress auf die Threoninproduktion mit *E. coli* DM1891 wurde durch die Applikation von Veränderungen des externen pH-Werts untersucht. Dazu wurden *batch* – Fermentationen mit dem Produktionsmedium M1-463 durchgeführt. Zu Beginn wurde der pH-Wert der Kulturen konstant bei 7 gehalten, nach 5 h wurde der externe pH-Wert durch das Zuführen von 15% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bzw. 5 M NaOH auf 5,5; 6; 8 oder 8,5 verändert. Der pH-Wert der Kontrollkultur wurde bei 7 belassen. Während aller Fermentationen wurden das Wachstum der Kulturen und die Threoninkonzentration im Medium zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt (Abb. 3.1).

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Variation des externen pH-Werts das Wachstum des Produktionsstamms beeinflusste. Die Kontrollkultur wuchs mit der höchsten Rate und erreichte nach 12 h eine optische Dichte von 9. Nach der Veränderung auf pH 6 bzw. 8 waren ein verlangsamtes Wachstum und eine leicht verringerte OD<sub>600</sub> von 7,5 am Ende der Fermentation zu beobachten. Der Effekt war noch ausgeprägter, wenn der externe pH-Wert auf 8,5 angehoben wurde. Die Wachstumsrate war deutlich verringert und die Kultur wuchs nur noch bis zu einer OD<sub>600</sub> von 6. Am weitreichendsten wirkte sich das Absenken des pH-Werts auf 5,5 aus. Es hatte eine sehr geringe Wachstumsrate und eine OD<sub>600</sub> von 4 nach 35 h zur Folge, d.h. die Zellen waren kaum noch in der Lage zu wachsen.



**Abb. 3.1:** Wachstum (A) und Threoninproduktion (B) von *E. coli* DM1891 während der Kultivierung bei pH 7 (●) bzw. nach pH-Wert-Veränderungen auf 5,5 (◆), 6 (◆), 8 (■) oder 8,5 (■). Die Veränderung wurde jeweils nach 5 h durch die Zugabe von 15 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oder 5 M NaOH durchgeführt. Der Zeitpunkt der Zugabe ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die Proben für die Analyse der Threoninproduktion wurden per Zentrifugation gewonnen und per HPLC vermessen.

Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben für die Bestimmung der Threoninkonzentration im Medium entnommen und anschließend mittels HPLC analysiert (Abb. 3.1 B). Die Threoninproduktion setzte in der Kontrollkultur bei pH 7 nach 5 h ein. Im weiteren Verlauf stieg die Konzentration im Medium gleichmäßig an und erreichte am Ende der Fermentation knapp 60 mM. Auch im Hinblick auf die Produktion war ein starker Einfluss des externen pH-Werts zu beobachten. Nach einer Veränderung auf pH 6 bzw. 8 war ein verlangsamter Anstieg der Threoninkonzentration im Vergleich zur Kontrollkultur zu erkennen. Im Endeffekt wurden geringere Werte von 51 bzw. 42 mM Threonin erreicht. Das Anheben auf pH 8,5 verstärkte auch hier den Effekt, es konnten am Ende der Fermentation nur 33 mM Threonin im Medium nachgewiesen werden. Nach dem Absenken des externen pH-Werts auf 5,5 wurde nur noch ein Wert von 11 mM erreicht.

Veränderungen des externen pH-Werts übten einen deutlichen Einfluss auf Wachstum und Threoninproduktion von *E. coli* DM1891 aus. Dabei war der Effekt von pH 6 und 8 vergleichbar, eine Variation auf pH 8,5 wirkte sich stärker aus und



der größte Effekt, sowohl auf das Wachstum als auch auf die Produktion, war nach dem Absenken des externen pH-Werts auf 5,5 zu beobachten.

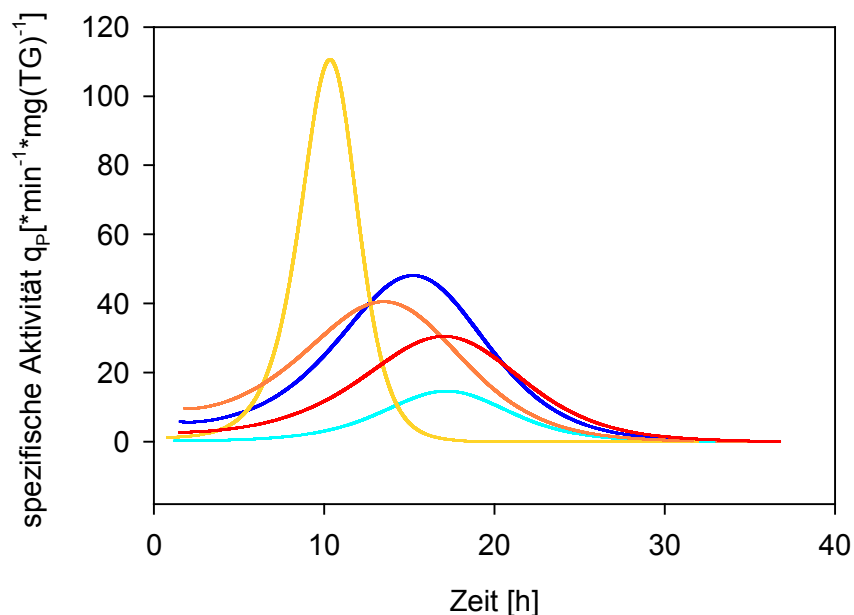
In vielen Fällen korreliert eine geringere Produktionsrate direkt mit einer geringeren Wachstumsrate. Genauere Informationen über die Produktion in Abhängigkeit von der Biomasse liefert die differentielle spezifische Produktivität ( $q_P$ ). Dabei wird die Produktion während der Fermentation im Verhältnis zur Biomasse betrachtet, was Rückschlüsse auf die Produktivität der Zellen zulässt.

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

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

$X$  = Biotrockenmasse (mgTG / ml) zum Zeitpunkt  $t$

Die differentielle spezifische Produktivität wurde für die oben beschriebenen Fermentationen berechnet (vgl. Abb. 3.1).



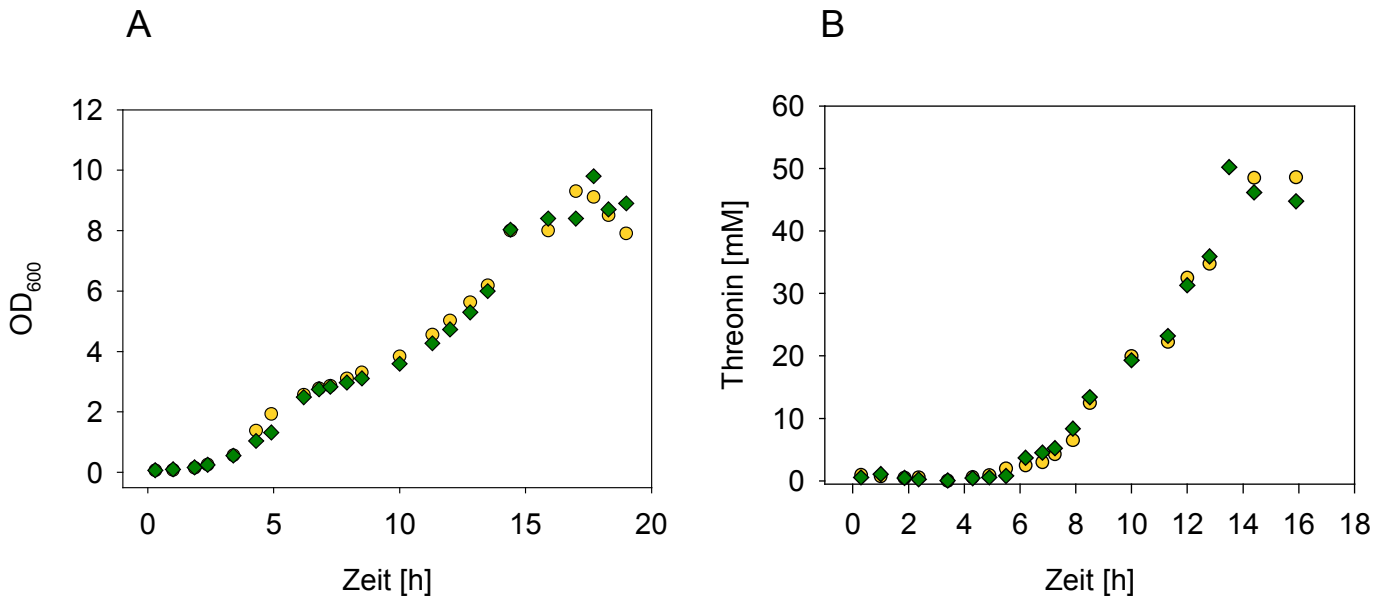
**Abb. 3.2:** Die differentielle spezifische Produktivität der Zellen während der Fermentationen mit Veränderung des pH-Werts auf pH 5,5 (—), 6 (—), 8 (—) oder 8,5 (—) bzw. in der Kontrollkultur (pH 7 —). Die differentielle spezifische Produktivität beschreibt die Produktbildung in Abhängigkeit von der Biomasse.

Abb. 3.2 zeigt, dass in der Kontrollkultur, die durchgehend bei pH 7 wuchs, das Maximum der spezifischen Produktivität nach 10 h, also gegen Ende der Wachstumsphase erreicht wurde. Dieser maximale Wert lag bei  $110 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}(\text{TG})^{-1}$ . Eine Veränderung des pH-Werts auf pH 6 oder 8 hatte zur Folge, dass die maximale Produktivität erst nach ca. 15 h erreicht wurde. Zudem waren die Werte mit 50 bzw. 40  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}(\text{TG})^{-1}$  über 50 % geringer als bei der Kontrollkultur beobachtet. Nach Veränderungen des pH-Werts auf pH 5,5 bzw. 8,5 wurde das Maximum erst nach 18 h erreicht. Die Werte waren noch weiter reduziert und lagen bei 10 bzw.  $30 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}(\text{TG})^{-1}$ .

Es zeigte sich also, dass Veränderungen des externen pH-Werts nicht nur über die Verringerung der Wachstumsrate einen Effekt auf die Produktion ausüben, sondern auch über die verringerte Produktivität der Zellen.

### **3.1.2 Einfluss einer erhöhten CO<sub>2</sub> – Konzentration auf die Threoninproduktion durch *E. coli*.**

Für die Charakterisierung des Einflusses von CO<sub>2</sub> auf die Threoninproduktion wurde eine Gasmischanlage eingesetzt. Diese ermöglicht es, verschiedene CO<sub>2</sub>-Konzentrationen bei einer gleichbleibenden O<sub>2</sub>-Konzentration in der Zuluft einzustellen (Follmann, 2008). Die CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Umgebungsluft beträgt 0,04 % und wurde während der folgenden Versuche auf 20 % angehoben. Im ersten Versuch wurden Wachstum und Threoninproduktion von *E. coli* DM1891 während zwei Fermentationen in M1-463 bei pH 7 und 0,04 bzw. 20 % CO<sub>2</sub> verglichen.



**Abb. 3.3:** Einfluss von CO<sub>2</sub> auf das Wachstum (A) und die Threoninproduktion (B) von *E. coli* DM1891. Der Stamm wurde im Fermenter in M1-463 bei pH 7 und entweder 0,04 % ( ● ) oder 20 % ( ◆ ) CO<sub>2</sub> kultiviert. Threonin wurde im externen Medium mittels HPLC nachgewiesen.

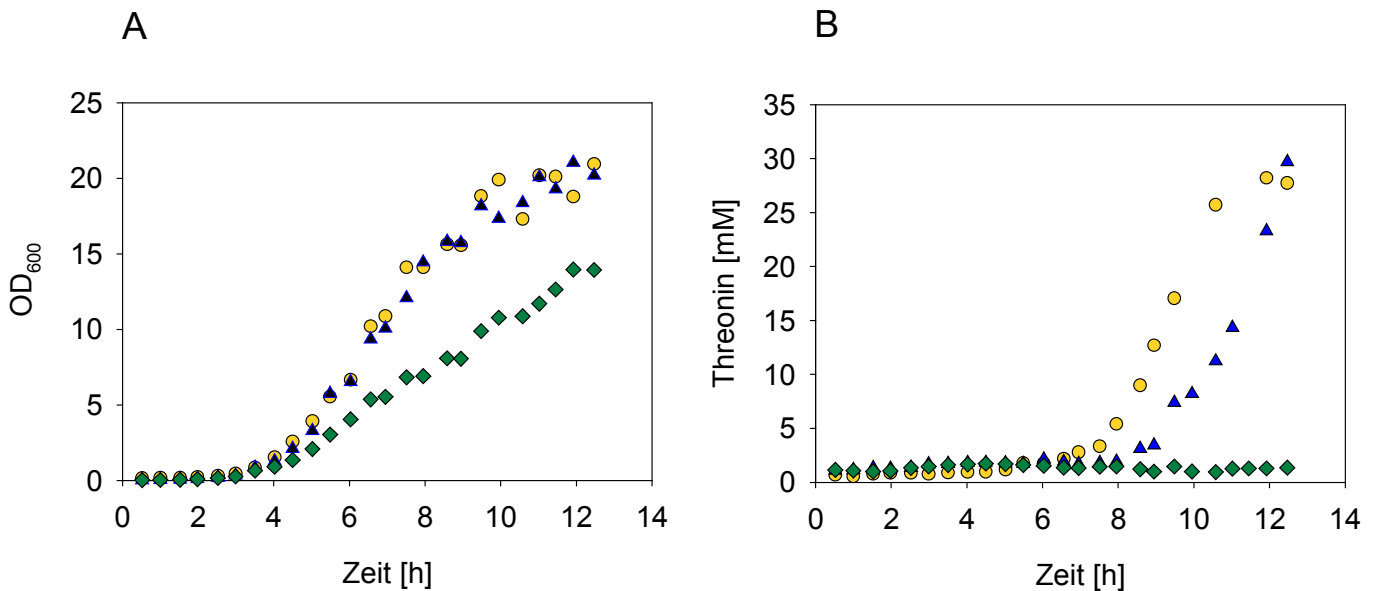
Beide Kulturen zeigten den gleichen Verlauf des Wachstums und erreichten am Ende der Fermentation eine vergleichbare optische Dichte von ungefähr 9. CO<sub>2</sub> hat also keinen Einfluss auf das Wachstum des Produktionsstamms. Auch in diesem Versuch wurde die Threoninkonzentration im Medium analysiert (Abb. 3.3 B). Wie das Wachstum war auch die Threoninkonzentration im Medium während der Kultivierung mit 20 % CO<sub>2</sub> in der Zuluft nicht verändert. Sowohl der Verlauf der Produktion als auch der Endwert waren vergleichbar.

Die Erhöhung der CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Zuluft hat also bei einem neutralen externen pH-Wert von 7 keine Auswirkungen auf Wachstum oder Threoninproduktion von *E. coli* DM1891.

### 3.1.3 Kombination der Stressfaktoren pH und CO<sub>2</sub>

Während der biotechnologischen Produktion treten die Stressfaktoren niedriger pH-Wert und hohe CO<sub>2</sub>-Konzentration vermutlich zum Teil gleichzeitig auf. Daher wurde im Folgenden der Einfluss der Kombination beider Faktoren untersucht. Dabei wurde

das Medium M1-1127 verwendet, mit dem höhere Wachstumsraten erzielt wurden als mit M1-463. Zellen des Stamms *E. coli* DM1891 wurden unter Kontrollbedingungen (pH 7, 0,04 % CO<sub>2</sub> in der Zuluft), bei pH 6 und 0,04 % oder bei pH 6 und 20 % CO<sub>2</sub> kultiviert (Abb. 3.4).



**Abb. 3.4:** Wachstum (A) und Threoninproduktion (B) von *E. coli* DM1891 in M1-1127 bei pH 7 und 0,04 % (●), pH 6 und 0,04 % (▲) oder pH 6 und 20 % CO<sub>2</sub> in der Zuluft (◆).

Es ist deutlich zu erkennen, dass der externe pH-Wert bei der Verwendung von M1-1127 und ohne Veränderung des pH-Werts während der Fermentation keinen Einfluss auf das Wachstum des Produktionsstamms hatte. Wachstumsverlauf und End-OD<sub>600</sub> waren bei pH 6 und 7 vergleichbar. Ein erhöhter CO<sub>2</sub>-Gehalt der Zuluft bei gleichzeitig niedrigem pH-Wert führte zu einem deutlich geringeren Wachstum. Gegen Ende der Fermentation erreichte die Kultur nur eine OD<sub>600</sub> von 14 im Vergleich zur Kontrollkultur, für die eine OD<sub>600</sub> von 21 bestimmt wurde.

Des weiteren wurden die Auswirkungen der Kombination der Stressfaktoren auf die Threoninproduktion durch *E. coli* DM1891 untersucht (Abb. 3.4 B). Unter Kontrollbedingungen konnten nach 12,5 h 30 mM Threonin nachgewiesen werden. Bei pH 6 und 0,04 % CO<sub>2</sub> setzte die Produktion später ein, es wurden aber nach 12,5 h dennoch 30 mM Threonin erreicht. Drastisch war der Effekt einer erhöhten CO<sub>2</sub>-

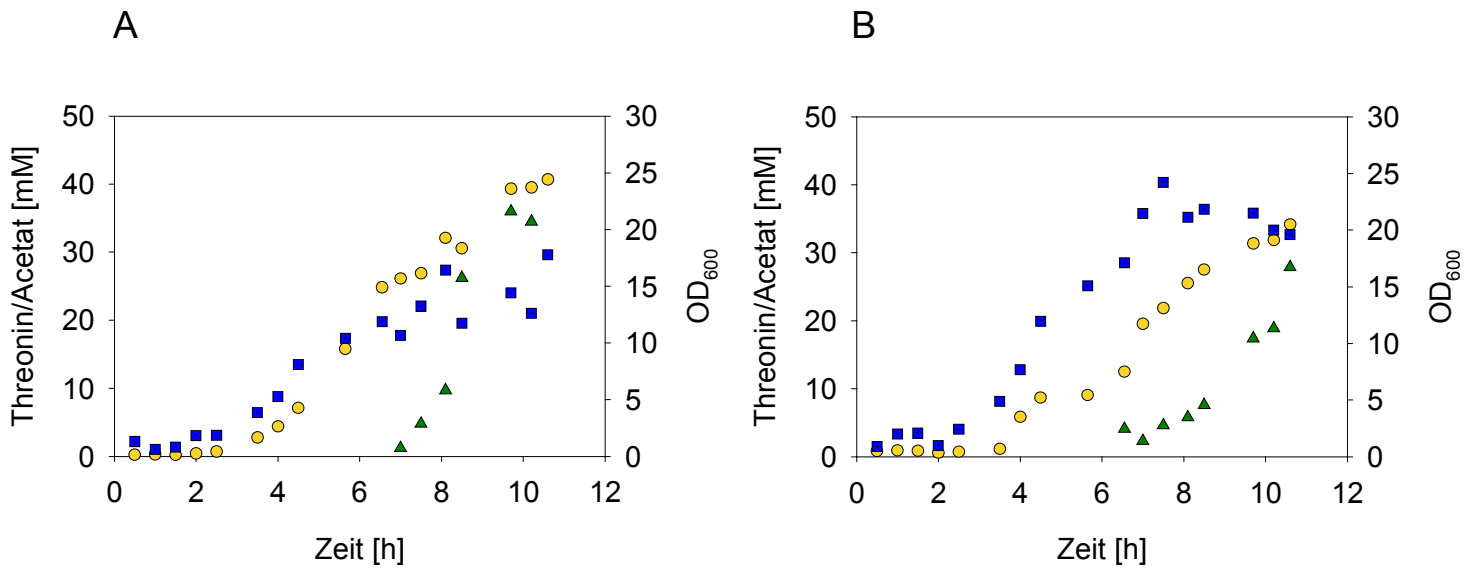
Konzentration bei pH 6. Es konnte kein Threonin im externen Medium nachgewiesen werden, die Produktion war vollkommen inhibiert.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse zur Threoninproduktion, dass eine Erhöhung der CO<sub>2</sub>-Konzentration bei neutralem pH-Wert keinen Einfluss auf die Produktion hatte. Eine Veränderung des externen pH-Werts wirkte sich dagegen auf die Produktion aus. Diese war deutlich geringer und langsamer und die Produktivität der Zellen war wesentlich niedriger. Die Kombination der Stressfaktoren führte zur kompletten Inhibition der Threoninproduktion.

### **3.1.4 Untersuchung der Nebenproduktbildung während der Threoninproduktion**

*E. coli* bildet in Stresssituationen, z.B. unter Sauerstoffmangel, organische Säuren. Da in früheren Arbeiten gezeigt wurde, dass diese bei einem niedrigen externen pH-Wert den internen pH-Wert beeinflussen können (Wilks, *et al.*, 2007), wurde die Bildung organischer Säuren während der Threoninproduktion untersucht. Dazu wurden Überstandsproben aus verschiedenen Fermentationen mittels HPLC analysiert. Lactat konnte lediglich in geringen Mengen nachgewiesen werden, was darauf hinweist, dass die Zellen nicht sauerstofflimitiert waren (Daten nicht gezeigt). Die Proben enthielten jedoch beträchtliche Mengen Acetat.

Betrachtet man eine Fermentation des Produktionsstamms unter Kontrollbedingungen bei pH 7 und 0,04 % CO<sub>2</sub> (Abb. 3.5 A), so war zu Beginn kaum Acetat nachweisbar. Die Acetatbildung begann jedoch bereits nach 3 h, also lange bevor die Threoninproduktion einsetzte. Nach 7 h kam es zu einer Stagnation der Werte. Nach 11 h konnten 30 mM Acetat im externen Medium nachgewiesen werden. Es wird angenommen, dass Acetat bei niedrigen externen pH-Werten vermehrt protoniert vorliegt und in die Zelle diffundiert. In der Zelle herrscht durch die pH-Homöostase ein höherer pH-Wert, so dass Acetat hier deprotoniert wird und nicht mehr aus der Zelle diffundieren kann. Dadurch käme es zu einer Akkumulation von Acetat und Protonen in der Zelle, wodurch wiederum der interne pH-Wert abgesenkt würde. Dieser Effekt sollte vor allem bei niedrigen externen pH-Werten auftreten. Daher wurden die Werte aus der Fermentation bei pH 7 mit denen aus der Fermentation bei pH 6 und 20 % CO<sub>2</sub> verglichen (Abb. 3.5 B).



**Abb. 3.5:** Bildung von Acetat während der Threoninproduktion mit DM1891: Beispielhaft sind Wachstum (●), Threoninproduktion (▲) und Acetatbildung (■) während der Fermentation von DM1891 bei pH 7 und 0,04 % CO<sub>2</sub> (A) sowie bei pH 6 und 0,04 % CO<sub>2</sub> (B) gezeigt.

Bei pH 6 wurde etwas mehr Acetat im Medium nachgewiesen. Das Wachstum und die Threoninproduktion von DM1891 waren etwas langsamer. Der interne pH-Wert lag während der Fermentation bei pH 7 bei 7,4 und während der Kultivierung bei pH 6 bei pH 7,1.

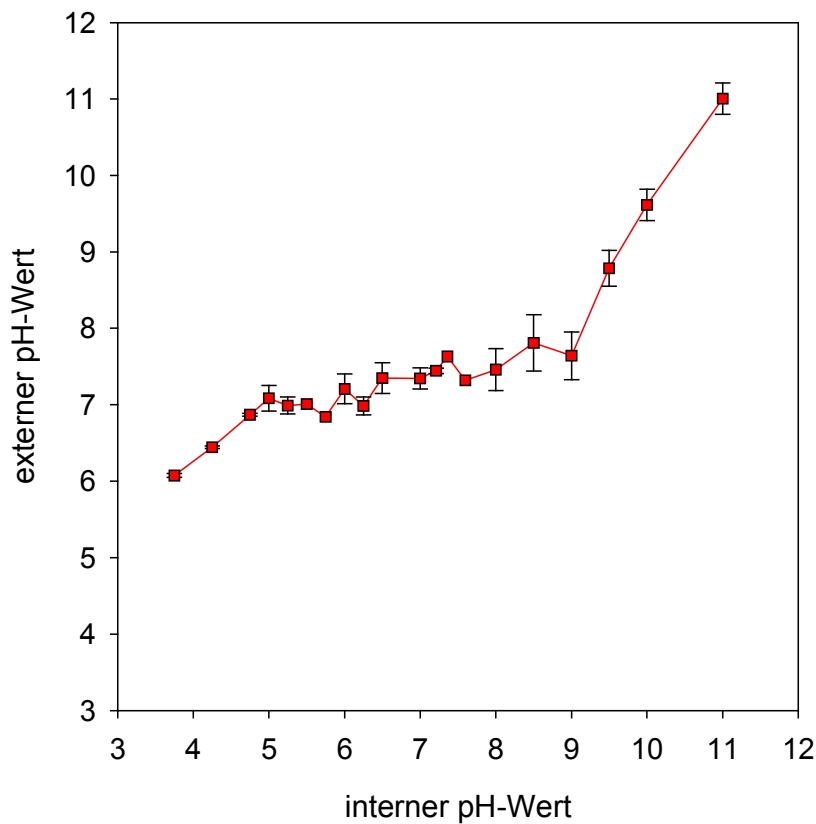
## 3.2 Charakterisierung der pH-Homöostase von *E. coli*

Die Grundlage für ein Verständnis der Auswirkungen von pH-Variationen auf Physiologie und Produktion bildet die Charakterisierung der pH-Homöostase und des Einflusses verschiedener Komponenten. Daher wurde die Fähigkeit von *E. coli* zur pH-Homöostase untersucht und der Einfluss einzelner Komponenten charakterisiert.

### 3.2.1 Untersuchung der pH-Homöostase

Zur Charakterisierung der pH-Homöostase des Wildtypstamms *E. coli* MG1655 wurde der interne pH-Wert in Abhängigkeit vom externen pH-Wert bestimmt (Abb.

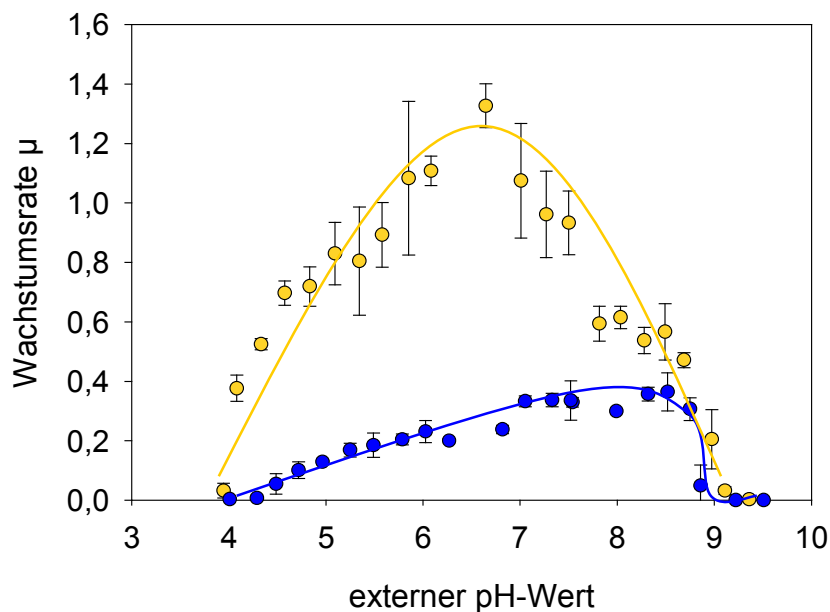
3.6). Dabei wurden Zellen in LB-Medium mit pH 7 angezogen, abzentrifugiert und für 3 min dem veränderten externen pH-Wert ausgesetzt. Dazu wurden sie in Lösungen synthetischer Puffer mit den entsprechenden pH-Werten resuspendiert (siehe Punkt 2.2.1.4). Zur Energetisierung der Zellen wurden 0,04 % Glucose zugesetzt. Die Messung erfolgte mit Hilfe der radioaktiv markierter Sonden [ $^{14}\text{C}$ ]-Benzoessäure bzw. [ $^{14}\text{C}$ ]-Methylammonium.



**Abb. 3.6:** pH-Homöostase von *E. coli* MG1655: Dargestellt ist der interne pH-Wert der Zellen in Abhängigkeit vom externen pH-Wert. Dazu wurden Zellen bei pH 7 in LB-Medium vorkultiviert, abzentrifugiert und in Lösungen synthetischer Puffer mit dem entsprechenden pH-Wert resuspendiert (s. Punkt 2.2.1.4). Die Messung des internen pH-Werts erfolgte nach 3 min. mit Hilfe der radioaktiv markierten Sonden [ $^{14}\text{C}$ ]-Benzoessäure bzw. [ $^{14}\text{C}$ ]-Methylammonium.

Wie Abb. 3.6 zu entnehmen ist, ist *E. coli* MG1655 in der Lage, bei externen pH-Werten zwischen 5,5 und 9 einen neutralen internen pH-Wert von  $7,25 \pm 0,25$  aufrechtzuerhalten. In diesem Bereich war pH-Homöostase zu beobachten.

Zusätzlich zu dieser Kurzzeitanpassung wurde die langfristige Anpassung von *E. coli* MG1655 an Veränderungen des externen pH-Werts charakterisiert. Dazu wurde das Wachstum der Zellen in Mikrotiterplatten beobachtet. Dabei wurde die Wachstumsrate von MG1655 in Abhängigkeit vom externen pH-Wert in Vollmedium (LB) bzw. in Minimalmedium (56/2) (Abb. 3.7) bestimmt. Der pH-Wert der Medien wurde durch synthetische Puffersubstanzen aufrechterhalten (s. Punkt 2.2.1.4) und nach Beendigung des Versuchs verifiziert.



**Abb. 3.7:** Wachstum von *E. coli* MG1655 in Abhängigkeit vom externen pH-Wert. Gezeigt sind die Wachstumsraten des Stamms bei der Kultivierung in Mikrotiterplatten mit LB-Medium (—●—) bzw. 56/2-Medium (—●—). Der pH-Wert der Medien wurde durch synthetische Puffersubstanzen aufrechterhalten (siehe Punkt 2.2.1.4).

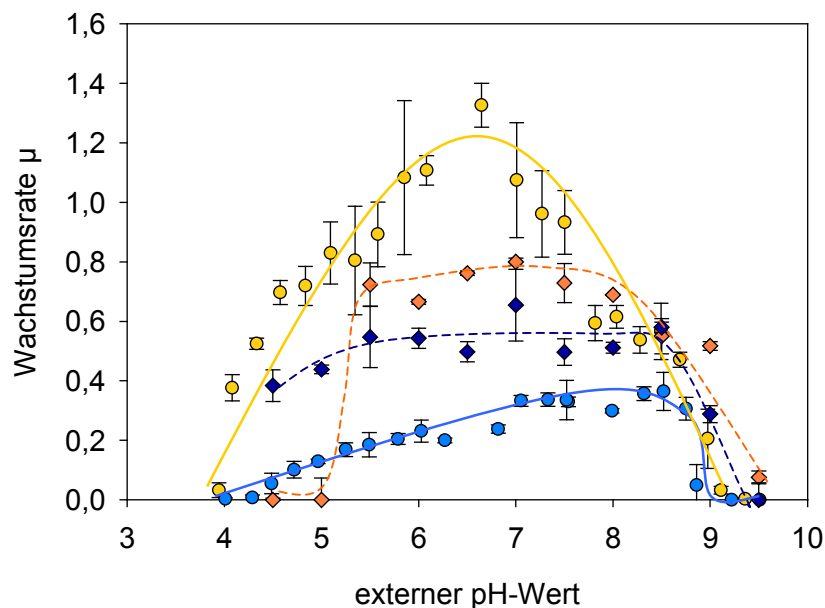
MG1655 kann in Vollmedium bei externen pH-Werten zwischen 4,25 und 9 wachsen. Die Wachstumsraten entsprechen einer Optimumskurve mit einem Maximum bei pH 6,75. In Minimalmedium waren die Wachstumsraten generell geringer. Außerdem



war das Maximum in den alkalischen Bereich verschoben und lag bei pH 8,5. Auffällig war vor allem das stark reduzierte Wachstum bei niedrigen pH-Werten im Vergleich zum Vollmedium.

### 3.2.2 Vergleich des Wachstums verschiedener Stämme bei unterschiedlichen externen pH-Werten.

Um den Einfluss des Stammhintergrunds auf die pH-Homöostase zu untersuchen, wurden Wachstumstests bei verschiedenen externen pH-Werten mit dem Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) und dem Threoninproduktionsstamm *E. coli* DM1891 durchgeführt. Anschließend wurden die Wachstumsraten mit denen des Stamms MG1655 verglichen (Abb. 3.8).

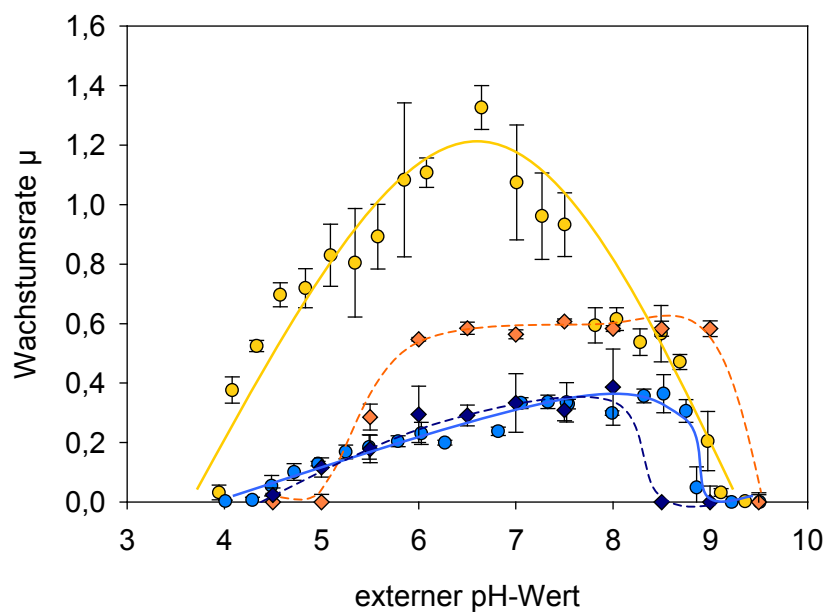


**Abb. 3.8:** Wachstum von *E. coli* BL21 (D3) bei verschiedenen externen pH-Werten. Dargestellt ist das Wachstum des Stamms BL21 in LB- (---◇---) bzw. 56/2-Medium (---◆---), sowie des Stamms MG1655 (LB: ●, 56/2: ●). Für den Versuch wurden Zellen des entsprechenden Stamms in Mikrotiterplatten in Medien mit verschiedenen Puffern kultiviert. Der pH-Wert wurde durch synthetische Puffersubstanzen aufrechterhalten.

Im Vergleich zum Wildtypstamm MG1655 wuchs BL21 (DE3) in Vollmedium im sauren Bereich wesentlich langsamer. Signifikantes Wachstum war erst ab pH 5 zu

beobachten. Im neutralen Bereich war der Unterschied bereits geringer und bei hohen pH-Werten wurden vergleichbare Wachstumsraten erzielt. Auffällig ist auch der Unterschied zwischen BL21 und MG1655 hinsichtlich des Wachstums in Minimalmedium. Hier zeigte BL21 noch bei pH 4,5 eine Wachstumsrate von 0,4 während MG1655 nicht mehr in der Lage war zu wachsen. Außerdem war das Wachstum von BL21 auch im neutralen und basischen Bereich schneller als das von MG1655.

Als Grundlage der Untersuchungen zum Einfluss von Veränderungen des externen pH-Werts auf die Threoninproduktion wurde auch das Wachstum des Produktionsstamms DM1891 bei verschiedenen pH-Werten untersucht (Abb 3.9).



**Abb. 3.9:** Die langfristige Anpassung des Produktionsstamms DM1891 an verschiedene externe pH-Werte. Dargestellt sind Wachstumsraten des Stamms in Vollmedium (---◇---) und Minimalmedium (---◆---) bei verschiedenen externen pH-Werten. Zum Vergleich ist das Wachstum des Wildtypstamms MG1655 (LB: ●, 56/2: ●) aufgeführt.

In Vollmedium wuchs der Produktionsstamm durchgehend langsamer als der Wildtypstamm. Am ausgeprägtesten war dieser Unterschied bei niedrigen pH-

Werten. So wuchs der DM1891 erst ab pH 5 während MG1655 bereits bei pH 4,25 ein langsames Wachstum zeigte. Ein klares pH-Optimum war für DM1891 im Gegensatz zu MG1655 nicht zu erkennen. Bei pH 6 – 9 konnte ein vergleichbares Wachstum beobachtet werden. Insgesamt ähnelte das pH-abhängige Wachstum von DM1891 in Komplexmedium dem des Expressionsstamms BL21 (D3). In Minimalmedium war das Wachstum des Produktionsstamms mit dem des Wildstamms vergleichbar. Es wurden ähnliche Wachstumsraten erreicht, DM1891 wuchs lediglich im alkalischen Bereich bereits bei pH 8,5 nicht mehr. Der Wildtyp konnte dagegen bis pH 9 wachsen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass nicht nur die Zusammensetzung des Mediums sondern auch der Stammhintergrund einen signifikanten Einfluss auf die pH-Resistenz verschiedener Stämme besitzt.

### **3.2.3 Etablierung einer *online*-Messung des internen pH-Werts mit Hilfe der Fluoreszenz von EYFP**

Die Messung des internen pH-Werts von *E. coli* durch die Verwendung radioaktiv markierter Sonden liefert keinen zeitlichen Verlauf des internen pH-Werts. Daher wurde für den Bereich niedriger externer pH-Werte die Messung des internen pH-Werts mit Hilfe fluoreszierender Proteine etabliert. In der Literatur wurde beschrieben, dass mit Hilfe heterologer fluoreszierender Proteine der interne pH-Wert von *E. coli* bestimmt werden kann (Wilks, *et al.*, 2007). Die Fluoreszenz dieser Proteine ist pH-abhängig. Für die folgenden Versuche wurde zunächst ein geeignetes Protein gesucht, indem die optimale Exzitations- und Emissionswellenlänge sowie vor allem der  $pK_a$ -Wert verschiedener fluoreszierender Proteine verglichen wurde (Tab. 3.1, Thomas Gentsch, FZ Jülich, persönliche Mitteilung).

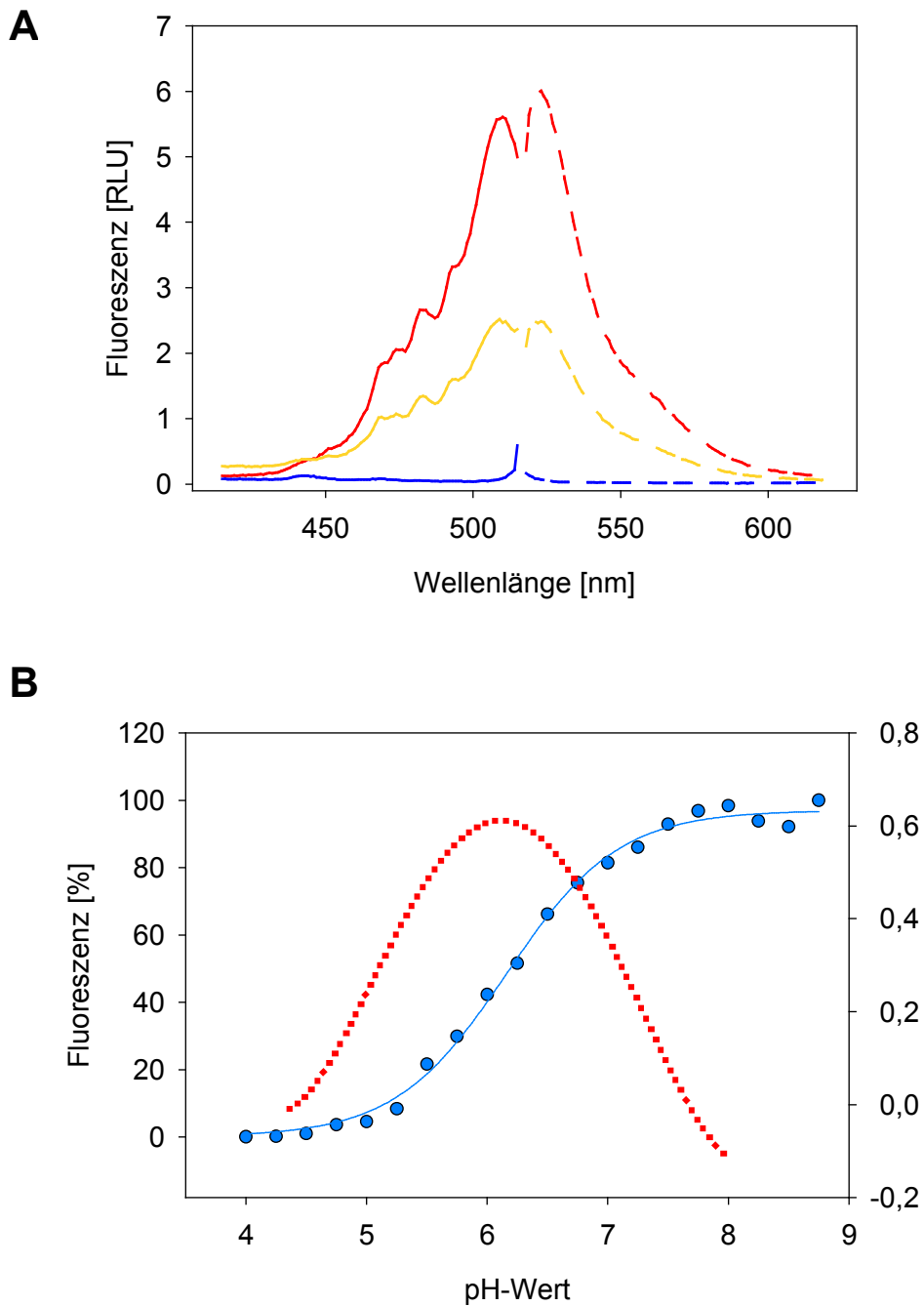
**Tab. 3.1** : Verschiedene fluoreszierende Proteine wurden aufgrund ihrer Exzitations- und Emissionswellenlänge und des  $pK_a$  verglichen (Thomas Gentsch, FZ Jülich, persönliche Mitteilung).

Protein	Exzitations- wellenlänge[nm]	Emissions- wellenlänge[nm]	$pK_a$
EGFP	484	510	5,9
EYFP	515	527	7,1
Citrin	515	527	5,7

Für die folgenden Versuche sollte ein Protein ausgewählt werden, das einen relativ hohen  $pK_a$  besitzt, damit der gesamte Bereich zwischen pH 5 und 7,5 beobachtet werden kann. Daher wurde für die folgende Klonierung ein Gen für ein EYFP verwendet (Kawai, *et al.*, 2006). Dieses Protein wurde in dem Expressionsvektor pUC18 heterolog in *E. coli* MG1655 exprimiert.

### 3.2.3.1 Charakterisierung des Proteins EYFP *in vitro*

Erste Versuche wurden mit dem löslichen Proteinextrakt von Zellen durchgeführt, die EYFP exprimieren. Die Charakterisierung des Proteins ergab eine maximale Fluoreszenz bei einer Exzitation bei 512 nm und einer Emissionswellenlänge von 525 nm. Dann wurde die pH-Abhängigkeit des Proteins als Voraussetzung für alle weiteren Messungen getestet. Dazu wurden Exzitations- und Emissionsspektren des Proteins in Puffer mit pH 4, 6 bzw. 8 aufgenommen (Abb. 3.10 A). Dabei wurde die Emissions- bzw. Exzitationswellenlänge konstant bei 512 bzw. 525 nm gehalten.



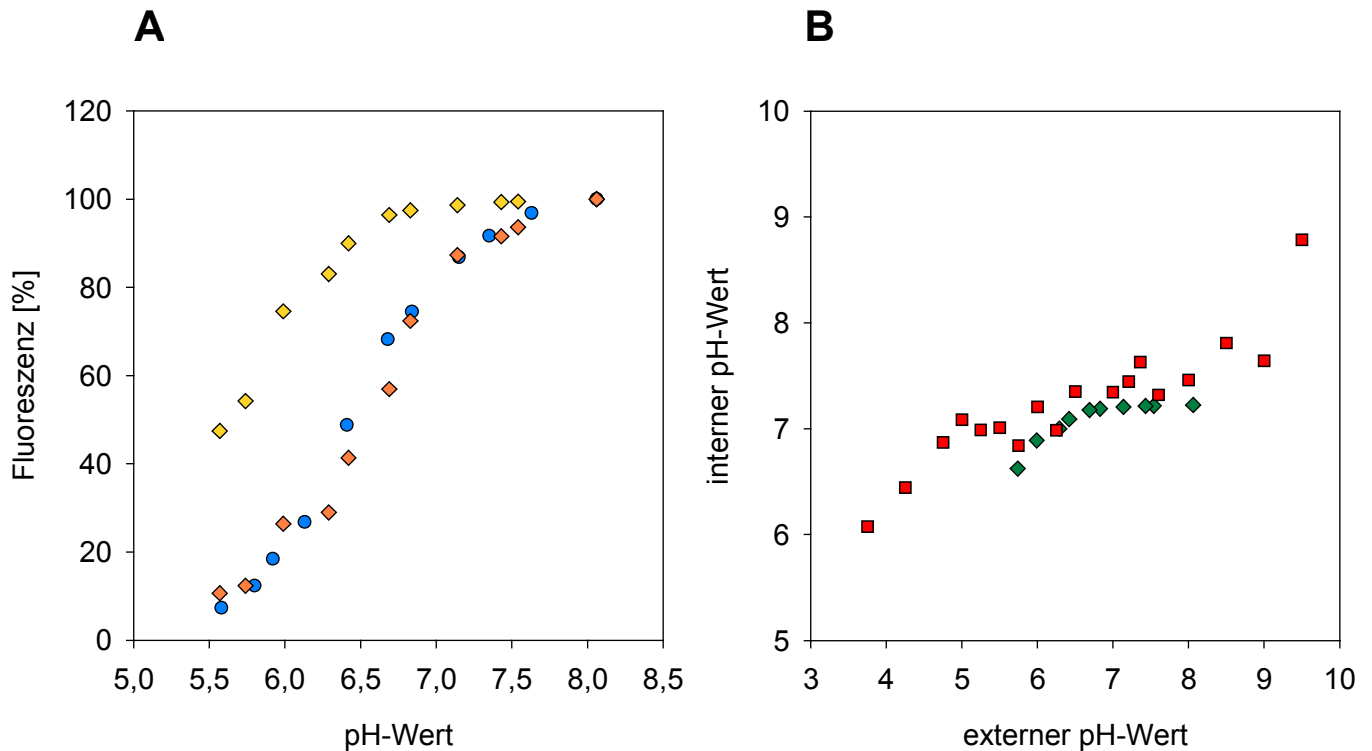
**Abb. 3.10:** Fluoreszenz von EYFP im Proteinextrakt. Gezeigt sind Exzitationsspektren bei einer Emissionswellenlänge von 525 nm und bei pH-Werten von 4 (—), 6 (—) bzw. 8 (—). Außerdem sind die entsprechenden Emissionsspektren bei einer Exzitationswellenlänge von 512 nm dargestellt (A). Weiterhin wurde der  $pK_a$  des Proteins durch Messungen bei verschiedenen pH-Werten und Wellenlängen von 512/525 nm bestimmt (B). Anhand der gemessenen Werte (●) wurde die Ableitung (⋯) berechnet, deren Maximum den  $pK_a$  darstellt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Intensität der Fluoreszenz des Proteins mit sinkendem pH-Wert abnimmt. Bei pH 6 war sie noch halb so groß wie bei pH 8, bei pH 4 konnte keine Fluoreszenz mehr nachgewiesen werden. Während die Intensität der Fluoreszenz abnimmt, kommt es jedoch nicht zu einer Verschiebung des Emissions- oder Exzitationsmaximum. Der pH-Wert sollte also allein über die Bestimmung der Intensität der Fluoreszenz gemessen werden können. Die Messung dieser Intensität bei weiteren pH-Werten zeigte, dass die pH-Abhängigkeit einen sigmoidalen Verlauf besitzt (Abb. 3.10 B). Als Wendepunkt dieser Kurve wurde der  $pK_a$  des Proteins mit 6,1 bestimmt. Damit sollte es möglich sein, pH-Werte zwischen 5 und 7,5 zu messen. Dieser Bereich deckt die für die Charakterisierung der pH-Homöostase interessanten internen pH-Werte ab.

### **3.2.3.2 Charakterisierung des Proteins EYFP *in vivo***

Nachdem die pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz von EYFP *in vitro* gezeigt werden konnte, sollte dies auch in lebenden Zellen untersucht werden. Für die Messungen wurden Zellen des Stamms *E. coli* MG1655 pUC18eyfp in LB-Medium angezogen und durch Zentrifugation geerntet. Die Messungen wurden in MES-Puffer mit Glucose durchgeführt. Zunächst wurde die Fluoreszenz der Zellsuspension bei verschiedenen pH-Werten gemessen und mit den Werten verglichen, die im Proteinextrakt gemessen wurden (Abb. 3.11 A).

Man erkennt, dass die Fluoreszenz der Zellen bei geringen pH-Werten wesentlich höher ist als die des Proteinextrakts. Da sich das Protein in den Zellen befindet, kann man schließen, dass der interne pH-Wert der Zellen höher ist als der externe und somit die höhere Fluoreszenz bedingt. Um diese Annahme zu prüfen wurden die Zellen nach der Messung mit dem Entkoppler CCCP behandelt und die Fluoreszenz nach 5 min ein weiteres Mal gemessen. Die Zugabe des Entkopplers führt zum Zusammenbruch des pH-Gradienten. Tatsächlich wurden nach der Behandlung ähnliche Werte gemessen wie im Proteinextrakt. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Fluoreszenz von EYFP in den Zellen tatsächlich den internen pH-Wert widerspiegelt.

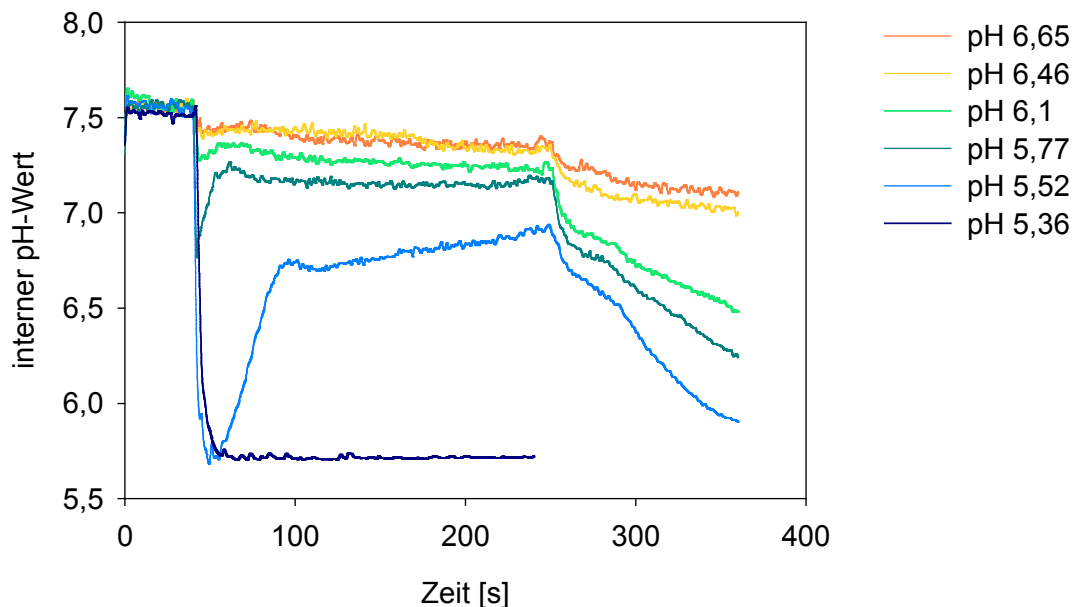


**Abb. 3.11:** Die Fluoreszenz von EYFP *in vivo*. Dargestellt ist die Fluoreszenz von EYFP in Zellen, die das Plasmid pUC18eyfp tragen, in Puffern mit verschiedenen pH-Werten (s. Punkt 2.5.3) (  $\blacklozenge$  ). Zum Vergleich ist die Fluoreszenz von Proteinextrakt dieser Zellen (  $\bullet$  ) und von Zellen, die mit CCCP behandelt wurden (  $\blacklozenge$  ), aufgetragen (A). Über die Fluoreszenz der Zellen wurde der interne pH-Wert (  $\blacklozenge$  ) berechnet und mit den Ergebnissen der radioaktiven Messung (  $\blacksquare$  ) verglichen.

Mit Hilfe der Korrelation zwischen den Werten vor und nach der Behandlung mit CCCP wurde aus den Daten für die Fluoreszenz der interne pH-Wert bei verschiedenen externen pH-Werten berechnet (Abb. 3.11 B). Zur Validierung der Methode wurden diese Werte mit den Ergebnissen der Radioaktivmessungen verglichen. Es stellte sich heraus, dass mit beiden Methoden ähnliche Werte erzielt werden konnten. Die Messung der Fluoreszenz von EYFP ist also dazu geeignet, den internen pH-Wert von *E. coli* zu bestimmen.

### 3.2.3.3 Zeitliche Auflösung der pH-Anpassung von *E. coli*

Durch den Einsatz von EYFP war es möglich, den internen pH-Wert von *E. coli* über einen Zeitraum von einigen Minuten zu beobachten. Dazu wurde die Fluoreszenz der Zellen über diesen Zeitraum hinweg aufgezeichnet. Die Werte konnten dann in interne pH-Werte umgerechnet werden. Zur Charakterisierung der Kurzzeitantwort auf Veränderungen des externen pH-Werts wurden die Zellen zu Beginn des Versuchs bei pH 8 inkubiert. 40 s nach dem Start der Messung wurde der externe pH-Wert durch die Injektion verschiedener Mengen 15 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$  abgesenkt. Nach 250 s wurden CCCP, Valinomycin und Nigericin als Entkoppler zugegeben. Am Ende der Messung wurde jeweils der externe pH-Wert bestimmt.



**Abb. 3.12:** Der Verlauf des internen pH-Werts von *E. coli* MG1655 nach Veränderung des externen pH-Werts. Die Fluoreszenz von Zellen wurde aufgezeichnet, während der externe pH-Wert durch die Injektion von  $\text{H}_2\text{SO}_4$  von 8 auf verschiedene Werte abgesenkt wurde. Am Ende des Versuchs wurden zur Kontrolle Entkoppler zugegeben. Die Fluoreszenzwerte wurden in interne pH-Werte umgerechnet.

Wurde der externe pH-Wert auf pH 6,65 oder 6,46 gesenkt, so sank der interne pH-Wert lediglich leicht ab. Ein anderes Bild ergab sich bei größeren pH-Variationen. Wurde der pH-Wert auf 6,1, 5,77 oder 5,52 abgesenkt, so war ein schnelles, drastisches Absinken des internen pH-Werts zu beobachten. Bald darauf stieg der



interne pH-Wert ebenfalls sehr schnell wieder an. Nach dem Absenken auf pH 5,52 sind zwei Phasen des Anstiegs zu erkennen, eine erste schnelle und später eine langsame. Es ist zu vermuten, dass für diese Phasen verschiedene Mechanismen verantwortlich sind. Die Grenze des Messbereichs wurde durch ein Absenken des externen pH-Werts auf 5,36 erreicht. Es wurde vermutet, dass auch hier der interne pH-Wert nach einer gewissen Zeit wieder ansteigen würde. Diese Vermutung konnte durch Messungen über einen längeren Zeitraum bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Die Behandlung der Zellen mit Entkopplern zum Ende der Versuche hatte ein sofortiges, jedoch recht langsames Absinken des internen pH-Werts zur Folge. Im zeitlichen Rahmen des Experiments konnte nicht verfolgt werden, ob im Endeffekt die Werte des externen pH-Werts erreicht wurden.

Die Messungen mit Hilfe des Proteins EYFP ermöglichen das Verfolgen des internen pH-Werts über einen Zeitraum von einigen Minuten. Die zeitliche Auflösung der pH-Anpassung von *E. coli* zeigt, dass der Zeitabstand von 3 min zwischen der Veränderung des pH-Werts und der Messung ausreicht, damit der interne pH-Wert einen *steady state* erreicht. Es ist also zulässig, in diesem zeitlichen Bereich zu messen. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Kurzzeitantwort auf größere pH-Variationen (pH 5,52) zweistufig verläuft.

### **3.2.4 Komponenten der pH-Homöostase von *E. coli***

Wie in Punkt 1.3 beschrieben, waren zu Beginn der Arbeit bereits einige Komponenten der pH-Homöostase von *E. coli* bekannt. Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung dieser Mechanismen in den relativ gemäßigten pH-Bereichen, die für die Produktion relevant sind, zu untersuchen. Daher wurde in den folgenden Versuchen nicht das Überleben bei extremen pH-Variationen, sondern die pH-Homöostase bei externen pH-Werten von 4 - 9 beobachtet.

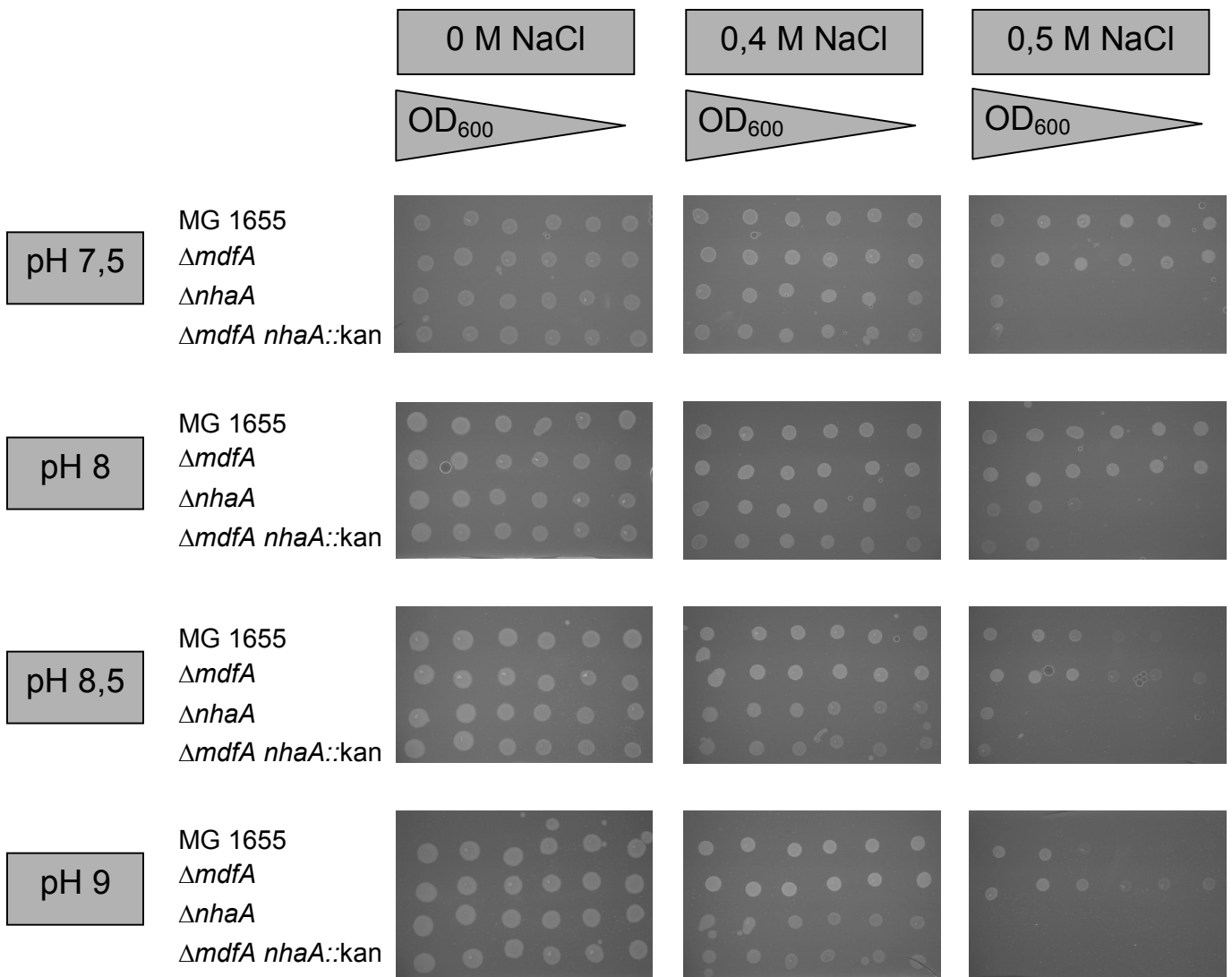
#### **3.2.4.1 Einfluss von Kationen-Protonen-Antiportern auf das Wachstum bei hohen pH-Werten.**

Für die Kationen-Protonen-Antiporter ist bisher eine Funktion bei hohen externen pH-Werten beschrieben. Eine *nhaA*-Deletion bewirkte ein langsames Wachstum nach einer Variation des externen pH-Werts von 7,2 auf 8,3 (Zilberstein, 1982). Außerdem

wurde für die Überexpression von *mdfA* eine erhöhte Alkalitoleranz bis zu externen pH-Werten von 10 beschrieben (Lewinson, *et al.*, 2004). Beide Transporter sind außerdem essentiell für die Natriumhomöostase von *E. coli*. Es wurde gezeigt, dass Wachstumsdefekte der Deletionsmutanten bei hohen Natriumkonzentrationen mit steigendem externen pH-Wert stärker wurden. Eine Doppelmutante der beiden Kationen-Protonen-Antiporter wurde bisher weder in Bezug auf die pH- noch auf die Natrium-Homöostase beschrieben. In den folgenden Versuchen sollte daher vor allem der Einfluss der Doppeldeletion untersucht werden. Zunächst wurden die Einzeldelentionsmutanten von *nhaA* und *mdfA* im Stammhintergrund MG1655 nach dem Protokoll von Datsenko, *et al.* (2000) konstruiert (vgl. Punkt 2.4.2). Dies war notwendig, da die vorherigen Versuche gezeigt hatten, dass der Stammhintergrund einen entscheidenden Einfluss auf die pH-Homöostase besitzt. Auf der Grundlage der Einzelmutanten wurde im nächsten Schritt die Doppelmutante der beiden Transporter hergestellt. Alle drei Mutanten wurden im folgenden mit dem Wildtyp in Bezug auf das Wachstum bei hohen externen pH-Werten untersucht. Dazu wurde zuerst ein Wachstumstest auf Agarplatten mit Minimalmedium (56/2) und mit unterschiedlichen pH-Werten und Natriumkonzentrationen durchgeführt.

Es ist gut zu erkennen, dass alle Stämme in Medium ohne Natriumzugabe bei pH-Werten bis 9 wachsen konnten. Mit steigender Natrium-Konzentration war jedoch ein Wachstumsphänotyp der Stämme ohne *nhaA* zu beobachten. Bei einem pH-Wert von 7,5 war erst bei 0,5 M NaCl ein stark verringertes Wachstum dieser Stämme zu beobachten, während es bei höheren pH-Werten schon in Anwesenheit von 0,4 M NaCl beeinträchtigt war. Bei pH 8,5 und 9 war auch das Wachstum des Wildstamms und der *mdfA*-Deletionsmutante bei 0,5 M NaCl betroffen.

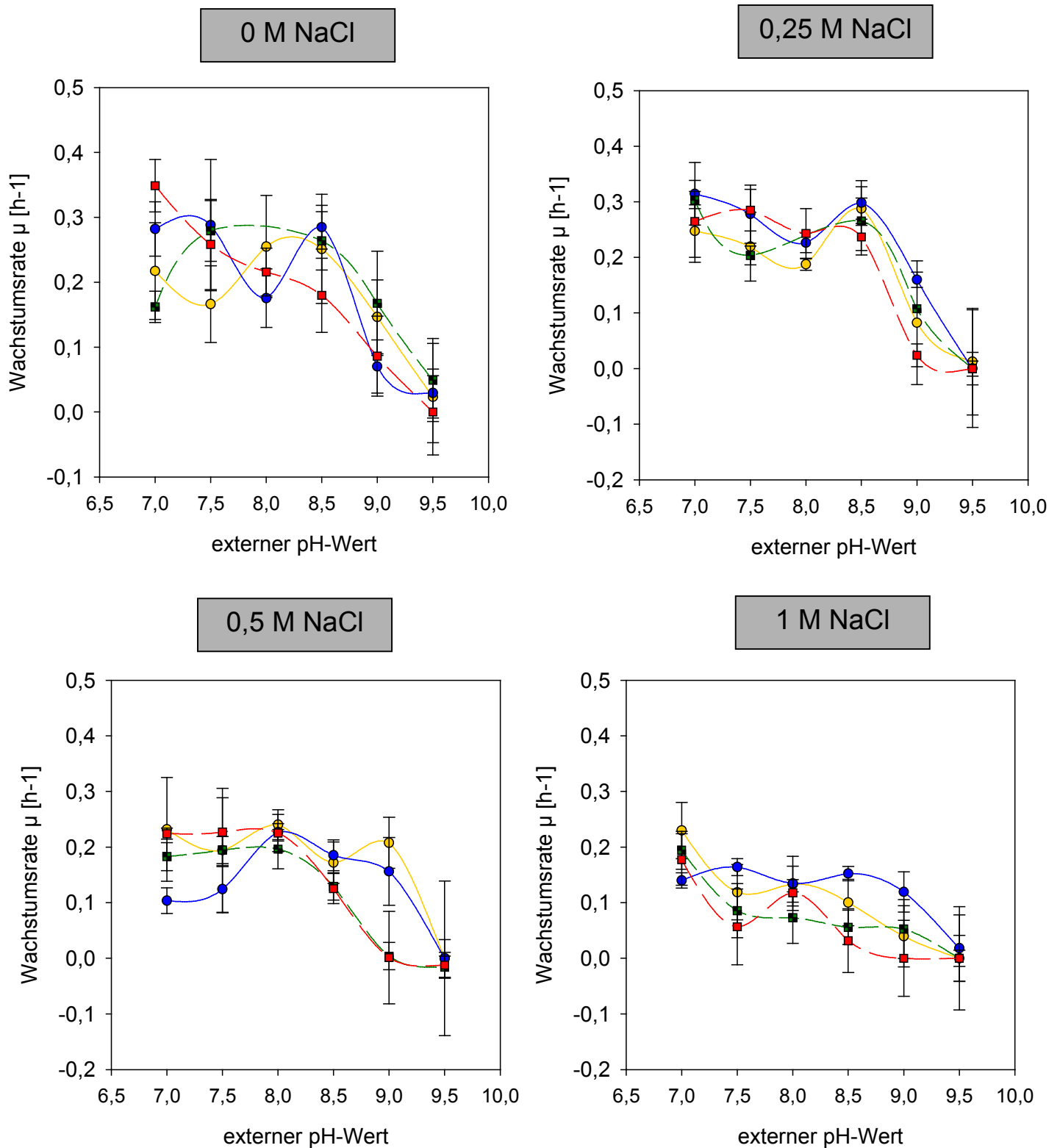
## Ergebnisse



**Abb. 3.13:** Bedeutung der Kationen-Protonen-Antiporter NhaA und MdfA für das Wachstum von *E. coli* bei verschiedenen externen pH-Werten und Natriumkonzentrationen. Dargestellt ist das Wachstum von *E. coli* MG1655 sowie der Deletionsstämme  $\Delta mdfA$ ,  $\Delta nhaA$  und  $\Delta mdfA \Delta nhaA$  auf Minimalmedium (56/2) bei verschiedenen pH-Werten und Natriumkonzentrationen. Die Zellen wurden jeweils in verschiedenen Verdünnungen von  $OD_{600} = 1$  bis  $10^{-5}$  auf Agarplatten aufgebracht und anschließend über 48 h bei 37°C inkubiert.

Da unter verschiedenen Kulturbedingungen oft verschiedene Wachstumsphänotypen beobachtet werden können, wurde das Wachstum der unterschiedlichen Stämme außerdem in Flüssigmedium in Mikrotiterplatten gemessen. Es wurde wiederum das Minimalmedium 56/2 mit verschiedenen pH-Werten und Natriumkonzentrationen verwendet (Abb. 3.14).

## Ergebnisse



**Abb. 3.14:** Wachstum von *E. coli* MG1655 (—●—) sowie der Deletionsstämmen  $\Delta mdfA$  (—●—),  $\Delta nhaA$  (—■—) und  $\Delta mdfA \Delta nhaA$  (—■—) in Mikrotiterplatten. Als Medium wurde 56/2 mit verschiedenen Natriumkonzentrationen und pH-Werten verwendet.

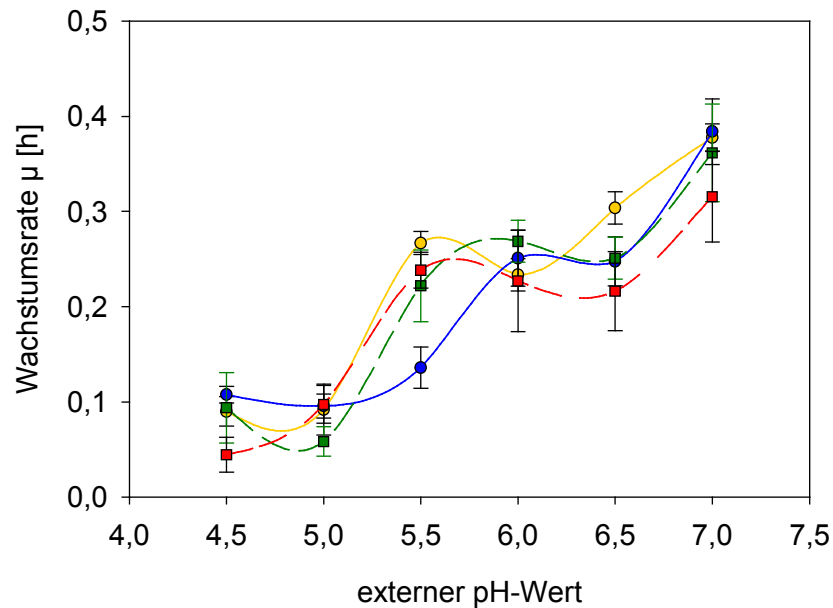
Die Standardabweichung ist bei Wachstumsversuchen in Mikrotiterplatten generell hoch. Wenn man dies berücksichtigt, wuchsen alle Stämme in Minimalmedium ohne Natriumzugabe vergleichbar. Ein Unterschied war erst bei der Zugabe von 0,5 M NaCl zu erkennen. Hier konnten die Stämme ohne NhaA bereits bei pH 9 nicht mehr wachsen. Der Wildtypstamm und die Deletionsmutante von *mdfA* zeigten normale Wachstumsraten. In Anwesenheit von 1 M NaCl war das Wachstum aller Stämme bei hohen pH-Werten stark beeinträchtigt. Auch hier war das Wachstum der Stämme  $\Delta nhaA$  und  $\Delta mdfA \Delta nhaA$  etwas langsamer bei hohen pH-Werten. Allerdings sind die Ergebnisse aus diesem Versuch aufgrund der hohen Standardabweichungen generell nicht sehr aussagekräftig.

In beiden Versuchen zeigte sich, dass das Wachstum aller Stämme bei hohen pH-Werten und gleichzeitig hoher Natriumkonzentration beeinträchtigt war. Einen besonders starken Phänotyp zeigten dabei die Stämme mit einer Deletion von NhaA. Die gleichzeitige Deletion von NhaA und MdfA hatte keinen additiven Effekt.

### **3.2.4.2 Auswirkungen der Zugabe von Glutamat, Arginin oder Lysin auf Wachstum und internen pH-Wert von *E. coli***

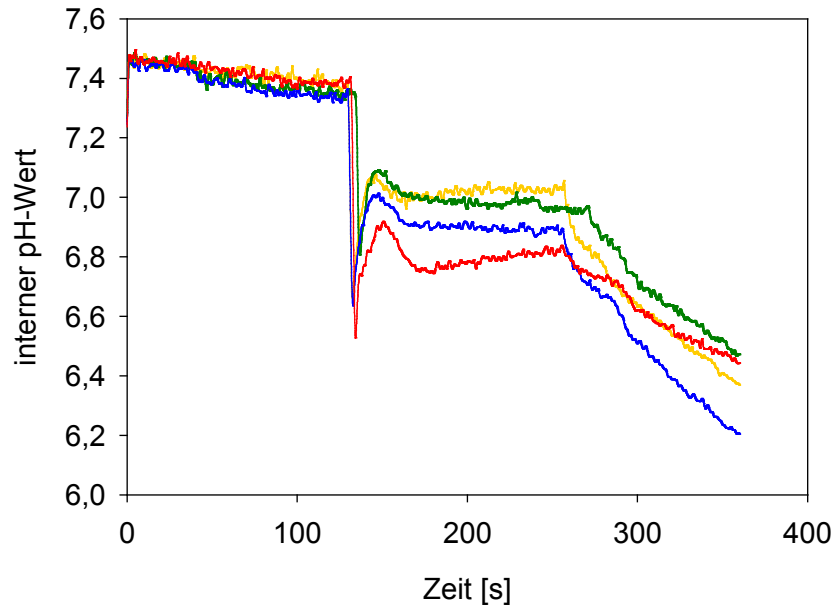
Aminosäure-Decarboxylasen und Transporter sind bisher im Zusammenhang mit dem Überleben von *E. coli* bei extremen niedrigen pH-Werten von pH 3 und darunter beschrieben (Foster, 2004). Eine Bedeutung für die pH-Homöostase bei moderaten Veränderungen des externen pH-Werts wurde bisher nicht gezeigt.

Der Einfluss der Decarboxylasen und Transporter wurde zunächst durch Wachstumstests in 56/2-Medium mit und ohne 100 mM der betreffenden Aminosäuren Glutamat, Arginin oder Lysin getestet. Diese Versuche wurden mit dem Wildtypstamm MG1655 in Mikrotiterplatten durchgeführt (Abb. 3.15). Berücksichtigt man die wiederum erhebliche Standardabweichung für die einzelnen Wachstumsraten, so war kein Unterschied durch die Zugabe der Aminosäuren Glutamat, Arginin oder Lysin zu erkennen. Die Aminosäure-Decarboxylasen und Transporter haben also keinen Einfluss auf das Wachstum von *E. coli* bei niedrigen externen pH-Werten.



**Abb. 3.15:** Einfluss von Aminosäuren auf das Wachstum von *E. coli* bei niedrigen externen pH-Werten. Gemessen wurden die Wachstumsraten des Wildtypstamms MG1655 bei Wachstum in Minimalmedium (56/2) in Mikrotiterplatten bei verschiedenen pH-Werten sowie mit und ohne ( ● ) Zugabe von 100 mM Glutamat ( ○ ), Arginin ( ■ ) oder Lysin ( □ ).

Zur weiteren Charakterisierung wurde der interne pH-Wert der Zellen während eines pH-Schocks beobachtet. Die Messung des internen pH-Werts wurde mit dem Stamm MG1655 pUC18 $eyfp$  über die Messung der Fluoreszenz von EYFP (s. Punkt 3.2.3) durchgeführt. Vor Beginn der Messung wurden je 10 mM der entsprechenden Aminosäuren zugegeben. Der pH-Wert der Zellsuspension wurde während der Messung von 8,0 auf 5,8 gesenkt. Gegen Ende wurden Valinomycin, Nigericin und CCCP als Entkoppler zur Kontrolle zugegeben (Abb. 3.16).



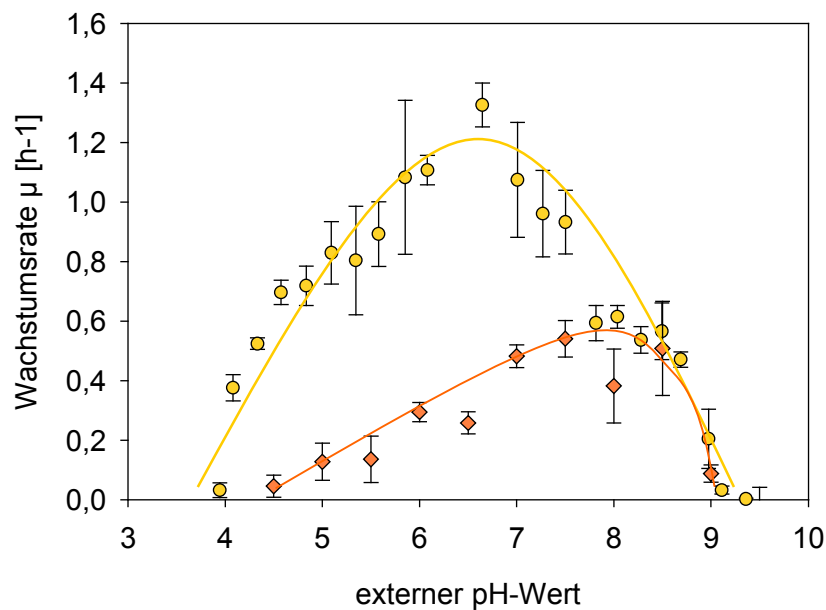
**Abb. 3.16:** Einfluss von Aminosäuren auf die pH-Homöostase. Gezeigt ist die Messung des internen pH-Werts über die pH-abhängige Fluoreszenz von EYFP. Der pH-Wert der Zellsuspension wurde während der Messung von 8,0 auf 5,8 abgesenkt. Vor der Messung wurden je 10 mM Glutamat (—), Arginin (—) oder Lysin (—) bzw. als Kontrolle Wasser (—) zugegeben, gegen Ende des Versuchs wurden Entkoppler eingesetzt.

Der interne pH-Wert nahm nach Applikation des pH-Schocks in jedem Fall schnell ab, um dann nach bekanntem Muster wieder anzusteigen (vgl. Punkt 3.2.3.3). Das Ausmaß der Reaktion war in diesem Versuch größer als im zuvor beschriebenen Versuch. Die Messung fand in einem sehr sensitiven Bereich statt, so dass Abweichungen in diesem Ausmaß häufig beobachtet wurden. Es konnte kein positiver Einfluss der Aminosäuren auf diese Stressantwort beobachtet werden. Nach der Zugabe von Lysin war der Abfall des internen pH-Werts sogar etwas ausgeprägter als ohne Zugabe einer Aminosäure. Diese Abweichung liegt jedoch im Bereich der beobachteten Messungengenauigkeiten.

Die Zugabe von Aminosäuren hat keinen Einfluss auf das Wachstum oder den internen pH-Wert von *E. coli* bei moderat niedrigen pH-Werten.

### 3.2.4.3 Kaliumtransporter

In der Literatur wird beschrieben, dass Kaliumtransporter an der pH-Homöostase beteiligt sind (Kroll und Booth, 1981). Daher wurde ein Wachstumstest mit einer Mutante ohne Kaliumaufnahme-systeme (TK2281, Polarek, *et al.*, 1988) durchgeführt (Abb. 3.17). Das Wachstum des Stamms wurde in LB-Medium mit verschiedenen pH-Werten in Mikrotiterplatten beobachtet.



**Abb. 3.17:** Wachstum von *E. coli* TK2281 in LB-Medium mit verschiedenen pH-Werten (—◆—). Zum Vergleich ist das Wachstum des Wildtyps MG1655 gezeigt (—●—).

Bei pH-Werten über 7,5 war das Wachstum von TK2281 mit dem des Wildtyps vergleichbar, während es bei neutralen pH-Werten stark reduziert. Noch größer war das Wachstumsdefizit bei niedrigen pH-Werten. Bereits bei pH 4,5 war kein Wachstum der Mutante mehr zu beobachten.

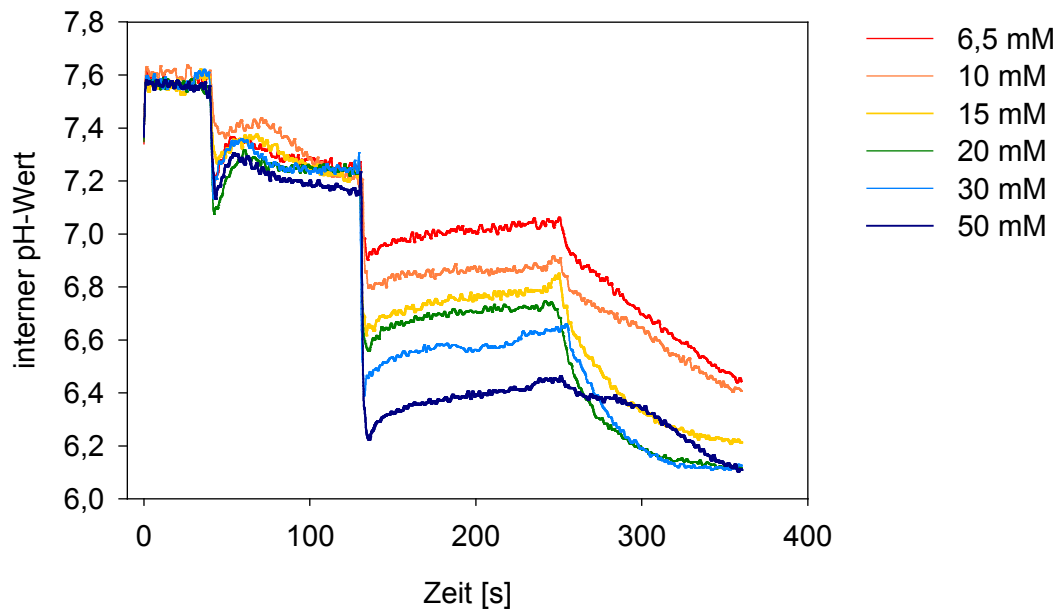


### **3.3 Einfluss von Acetat auf den internen pH-Wert**

#### **3.3.1 Charakterisierung des schnellen Einflusses von Acetat auf den internen pH-Wert von *E. coli* MG1655**

Auch für Acetat wird vermutet, dass es Auswirkungen auf den internen pH-Wert haben kann. Außerdem wurde in früheren Arbeiten gezeigt, dass Acetat bei niedrigen pH-Werten in Minimalmedium das Wachstum von *E. coli* K12-Stämmen beeinträchtigt (Roe, *et al.*, 2002). Dieser Wachstumsdefekt könnte auf einen veränderten internen pH-Wert zurückzuführen sein. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass Wachstum und Threoninproduktion des Produktionsstamms in Anwesenheit von Acetat, das die Zellen selber synthetisieren, nicht beeinträchtigt sind (Punkt 3.1.4). Die Frage ist nun, ob extern zugeführtes Acetat einen Einfluss besitzt. Der interne pH-Wert, sowohl des Wildtyp- als auch des Produktionsstamms, wurde daher in Anwesenheit von Acetat untersucht.

Zur näheren Charakterisierung des Einflusses von Acetat auf den internen pH-Wert wurde auf die Messung des internen pH-Werts mit Hilfe der Fluoreszenz von EYFP zurückgegriffen. Diese Messung erlaubt es, den internen pH-Wert während der Minuten nach der Zugabe von Acetat kontinuierlich zu beobachten. Die folgenden Versuche wurden mit dem Stamm MG1655 pUC18*eyfp* durchgeführt. Der externe pH-Wert lag zu Beginn der Messung bei 8,0 und wurde nach 40 s auf 6,1 abgesenkt. Jeweils nach 130 s wurden verschiedene Konzentrationen Acetat zugegeben. Nach 250 s wurden zur Kontrolle Nigericin, Valinomycin und CCCP als Entkoppler eingesetzt (Abb. 3.18).

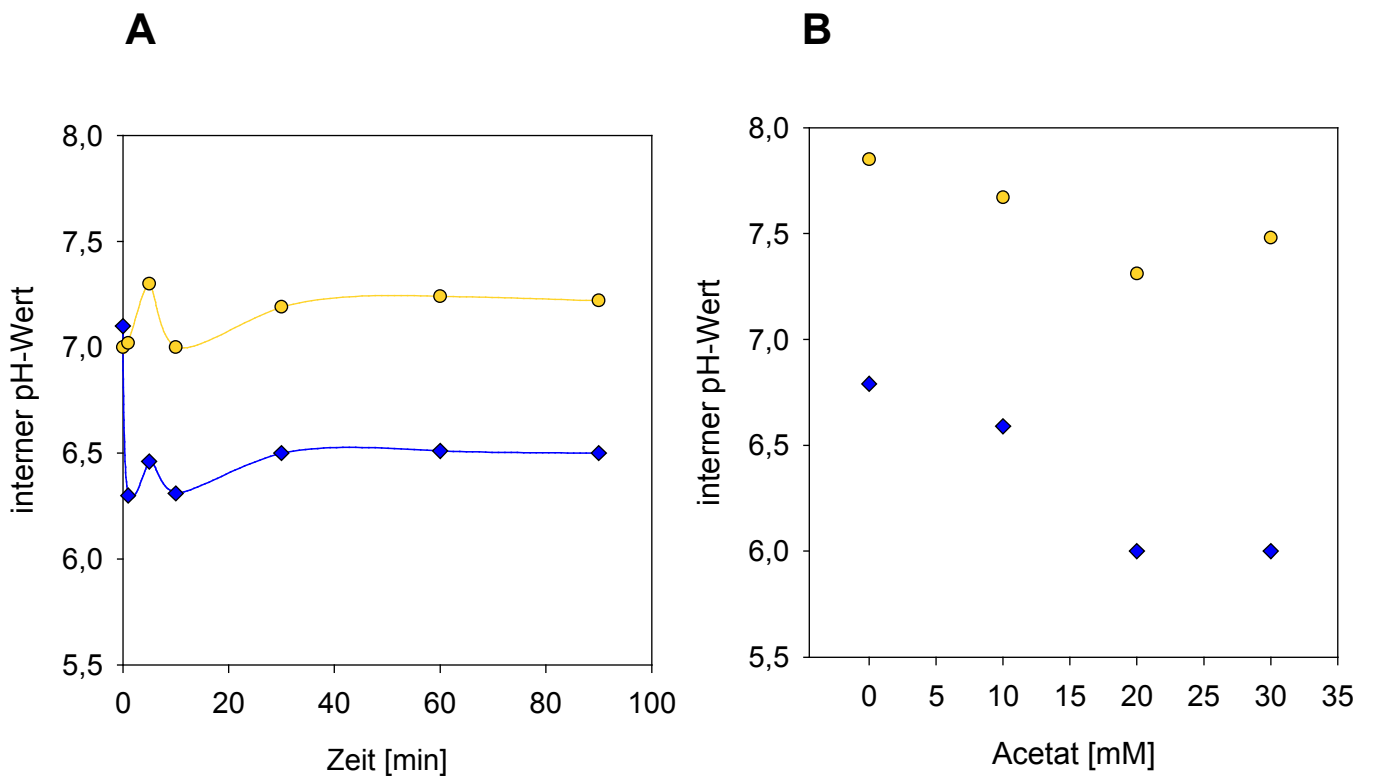


**Abb. 3.18:** Charakterisierung der Antwort von MG1655 pUC18*eyfp* auf die Zugabe verschiedener Mengen Acetat. Gemessen wurde der interne pH-Wert des Stamms über einen Zeitraum von 6 min. Nach 40 s wurde der externe pH-Wert von 8,0 auf 6,1 gesenkt. Nach 130 s wurde Acetat in verschiedenen Konzentrationen zugegeben und nach 250 s wurden pH-Gradient und Membranpotential durch Valinomycin, Nigericin und CCCP aufgehoben.

Das Absenken des externen pH-Werts hatte zur Folge, dass der interne pH-Wert von 7,6 auf 7,1 sank, dann wieder etwas anstieg und bei 7,2 konstant blieb. Die Zugabe von Acetat hatte konzentrationsabhängig einen Abfall des internen pH-Werts zur Folge. Nach der Injektion von 6,5 mM Acetat fiel der interne pH-Wert auf 6,9 und bei höheren Konzentrationen immer tiefer bis er bei 50 mM Acetat auf 6,1 fiel. Dieser Wert entspricht dem externen pH-Wert. Direkt nach dem durch Acetat verursachten Abfallen des internen pH-Werts konnte ein langsamer Anstieg um ungefähr 0,1 pH-Einheit beobachtet werden. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch mit Propionat erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

### 3.3.2 Charakterisierung des Einflusses von Acetat auf den internen pH-Wert von *E. coli* DM1891

Zur Charakterisierung des Produktionsstamms wurde die Messung mittels radioaktiv markierten Benzoats verwendet. Der interne pH-Wert von Zellen des Produktionsstamms wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Zugabe von 30 mM Acetat gemessen (Abb. 3.19 A). Die Zellen wurden dabei entweder bei pH 6 oder 7 kultiviert.



**Abb. 3.19:** Charakterisierung des Einflusses von Acetat auf den internen pH-Wert des Produktionsstamms *E. coli* DM1891. Nach der Zugabe von 30 mM Acetat wurde in verschiedenen zeitlichen Abständen der interne pH-Wert gemessen. Die Kultivierung erfolgte bei pH 6 (◆) oder 7 (●) (A). Außerdem wurde der interne pH-Wert fünf Minuten nach der Zugabe verschiedener Mengen Acetat bestimmt. Auch dieser Versuch wurde bei pH 6 (◆) und 7 (●) durchgeführt (B).

Bei einem pH-Wert von 7 lag der interne pH-Wert vor der Zugabe des Acetats bei 7,4. Nach einer Minute war er bereits auf 7 gesunken, um nach einer halben Stunde

wieder auf 7,2 anzusteigen. Bei diesem Wert blieb er über 1,5 h konstant. Bei einem externen pH-Wert von 6 sank der interne pH-Wert in der Minute nach der Zugabe von Acetat von 7,1 auf 6,3. Nach 30 min war ein kleiner Anstieg auf 6,4 zu beobachten. Dieser Wert blieb während der weiteren Versuchsdauer konstant. Die Auswirkung der Zugabe von Acetat war bei pH 6 wesentlich ausgeprägter als bei pH 7. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der interne pH-Wert nach der Zugabe von Acetat sehr rasch abnahm. Im weiteren Verlauf des Versuchs stieg der interne pH-Wert nach 30 min wieder an, was auf die Auswirkung von Anpassungsmechanismen schließen lässt.

In einem weiteren Versuch wurde der interne pH-Wert fünf Minuten nach der Zugabe verschiedener Mengen Acetat gemessen (Abb. 3.19 B). Dabei wurden die Zellen kontinuierlich entweder bei pH 6 oder 7 kultiviert. Vor der Zugabe von Acetat lag der interne pH-Wert des Stamms bei einem externen pH-Wert von 7 bei 7,8. Nach der Zugabe von 10 mM Acetat sank der interne pH-Wert auf 7,6 und bei 20 mM weiter auf 7,4. Eine weitere Erhöhung der Acetatkonzentration hatte kein weiteres Absinken des internen pH-Werts zur Folge. Bei einem externen pH-Wert von 6 lag der interne pH-Wert zunächst bei 6,8. Dieser Wert ist etwas niedriger als der in Abb. 3.6 gezeigte. Für den Produktionsstamm wurden jedoch stets Werte dieser Größenordnung gemessen. 10 mM Acetat hatten ein Absinken des internen pH-Werts von 6,8 auf 6,6 zur Folge. Bei 20 mM Acetat sank er weiter auf 6,0. Dieser Wert wurde auch bei höheren Acetatkonzentrationen erreicht. In diesen Fällen wurde der pH-Gradient durch die Acetatzugabe komplett aufgehoben. Es gibt also einen konzentrationsabhängigen Einfluss von Acetat auf den internen pH-Wert.

Bemerkenswert ist, dass der interne pH-Wert während der Fermentationen, in denen von den Zellen bis zu 30 mM Acetat gebildet wurde, bei pH 6,8 lag, wenn der pH-Wert extern auf 6 eingestellt wurde. In diesem Versuch lag der interne pH-Wert unter vergleichbaren Bedingungen, jedoch nach der Zugabe von Acetat, bei nur 6,4. Der Einfluss von Acetat auf den internen pH-Wert war also signifikant unterschiedlich, je nachdem ob das Acetat von den Zellen gebildet oder extern zugegeben wurde.

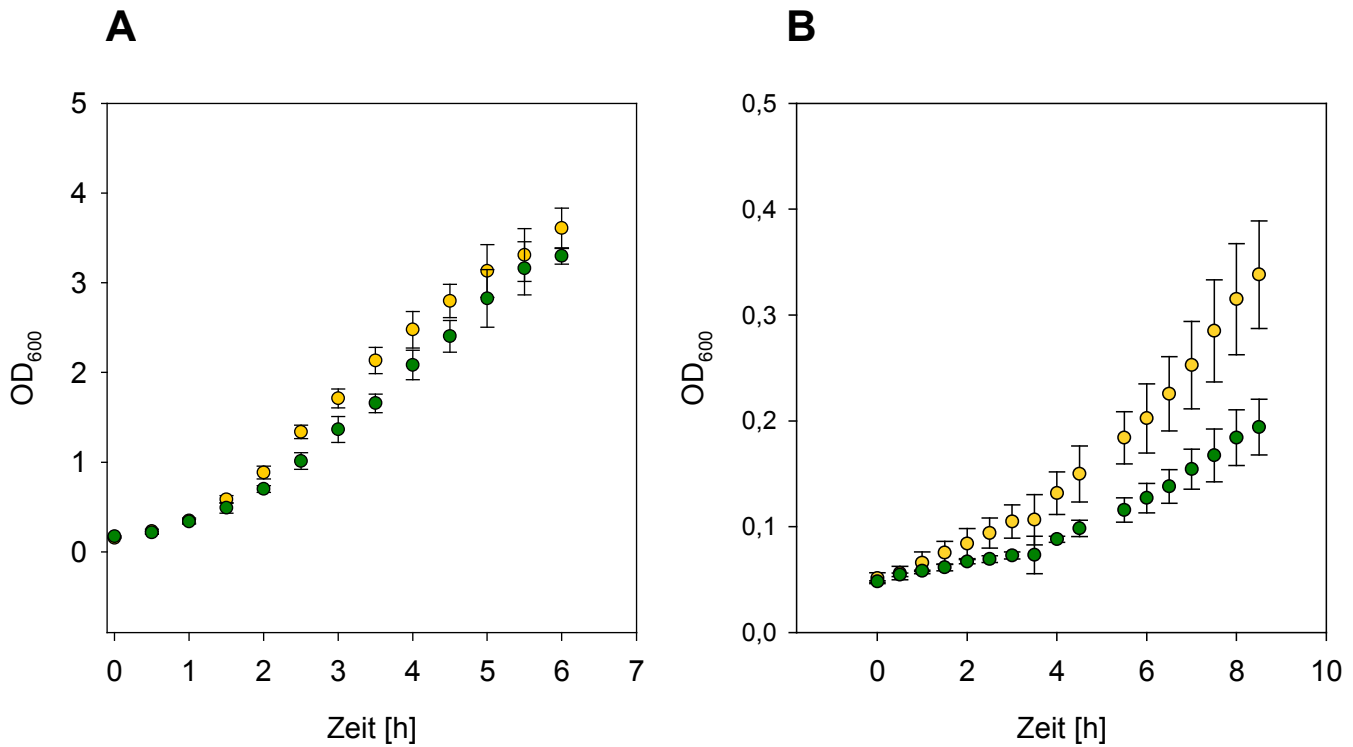
### **3.4 Einfluss von CO<sub>2</sub> auf Wachstum und Physiologie von *E. coli***

In den Versuchen zum Einfluss externer Stressfaktoren auf die Threoninproduktion konnte gezeigt werden, dass die Kombination von niedrigem pH-Wert und erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration die Threoninproduktion des Stamms DM1891 komplett inhibiert. Im Folgenden wurde daher der Einfluss von CO<sub>2</sub> auf Wachstum und Physiologie untersucht.

#### **3.4.1 Einfluss von CO<sub>2</sub> auf das Wachstum von *E. coli* MG1655.**

Es konnte ein massiver Einfluss von CO<sub>2</sub> bei gleichzeitig niedrigem externen pH-Wert auf Wachstum und Threoninproduktion des Stamms DM1891 nachgewiesen werden. Um zu klären, ob dieser Einfluss spezifisch für den Produktionsstamm ist, wurden die Auswirkungen einer erhöhten CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Zuluft auf das Wachstum des Wildtypstamms MG1655 untersucht. Dazu wurden Wachstumstests in Glasflaschen mit Vollmedium (LB) oder Minimalmedium (MMB) mit einem pH-Wert von 6 durchgeführt. Die CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Zuluft wurde mit Hilfe der Gasmischanlage auf 0,04 % bzw. 20 % bei konstanter O<sub>2</sub>-Konzentration eingestellt (Abb. 3.20).

Das Wachstum des Wildtypstamms war in LB-Medium leicht verringert, wenn die CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Zuluft erhöht war. Es wurde jedoch unabhängig vom CO<sub>2</sub>-Gehalt nach 6 h eine vergleichbare optische Dichte erreicht. In Minimalmedium war der Unterschied wesentlich größer, die CO<sub>2</sub>-Konzentration hatte einen erheblichen Einfluss auf Wachstumsrate und die OD<sub>600</sub> nach 9 h.



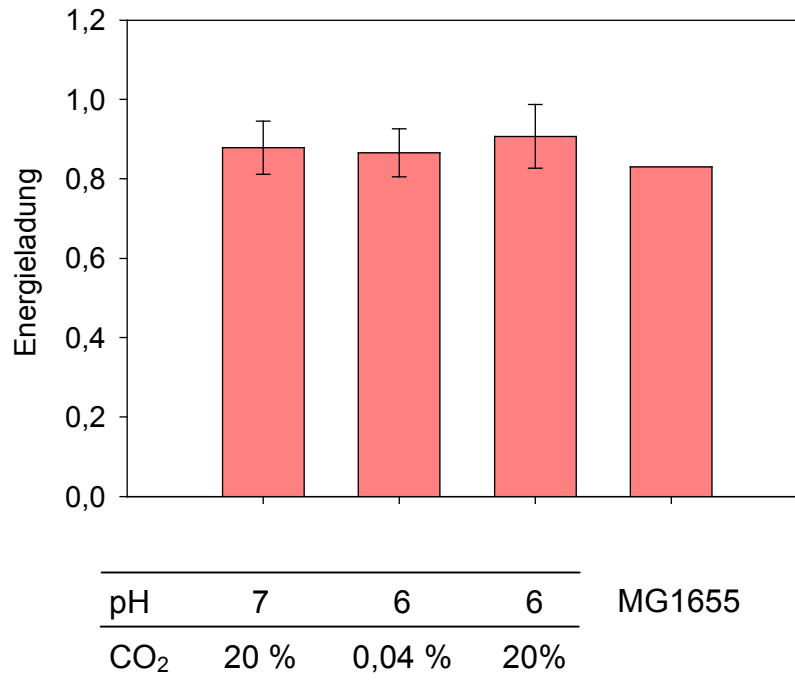
**Abb. 3.20:** Wachstum von *E. coli* MG1655 wurde in Vollmedium (LB) und Minimalmedium (MMB) mit pH 6 untersucht. Dargestellt ist jeweils das Wachstum mit 0,04 (●) bzw. 20% (●) CO<sub>2</sub> in der Zuluft.

Auch das Wachstum des Wildtypstamms MG1655 wurde durch eine erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Zuluft bei gleichzeitig niedrigem externen pH-Wert beeinträchtigt.

### 3.4.2 CO<sub>2</sub> besitzt keinen Einfluss auf die Energieladung der Zelle.

Es konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration das Wachstum von Produktionsstamm und Wildtyp beeinflusst und darüber hinaus die Threoninproduktion komplett inhibiert. Es stellt sich nun die Frage, auf welche Weise CO<sub>2</sub> wirkt. Es könnte sein, dass der Energiestatus der Zelle generell betroffen ist. Eine weitere Möglichkeit ist, dass einzelne Enzyme des Threoninbiosynthesewegs besonders pH-sensitiv und durch den niedrigen internen pH-Wert beeinträchtigt sind. Aus diesem Grund wurde während der Fermentationen von *E. coli* DM1891 die ATP-, ADP- und AMP-Konzentration bestimmt und daraus die Energieladung

berechnet (Abb. 3.21). Zum Vergleich ist die Energieladung des Wildtyps unter Standardbedingungen dargestellt.



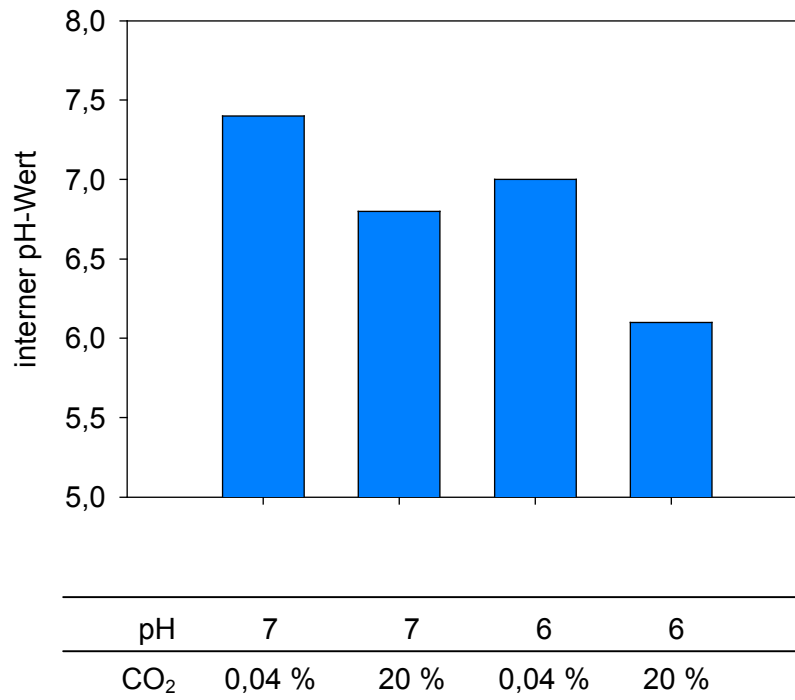
**Abb. 3.21:** Die Energieladung von *E. coli* DM1891 während der Threoninproduktion unter verschiedenen Bedingungen. Zum Vergleich ist die Energieladung des Wildtyps MG1655 gezeigt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Energieladung der Zellen des Threoninproduktionsstamms weder durch einen niedrigen externen pH-Wert noch durch eine hohe CO<sub>2</sub>-Konzentration verändert wird. Die Werte liegen zwischen 0,85 und 0,9. Für den Wildtyp wurden unter Standardbedingungen Werte von 0,8 – 0,85 gemessen, die also etwas niedriger sind.

### 3.4.3 Auswirkungen von CO<sub>2</sub> auf den internen pH-Wert von *E. coli*

Es stellt sich nun die Frage, wie der massive, pH-abhängige Einfluss von CO<sub>2</sub> auf das Wachstum von Wildtyp- und Produktionsstamm und vor allem auf die Threoninproduktion erklärt werden kann. Einen Hinweis darauf liefern die Ergebnisse

der Messungen des internen pH-Werts, die während der oben beschriebenen Fermentationen durchgeführt wurden (Abb. 3.22). Die Messungen wurden jeweils während der Phase, in der Threonin gebildet wurde, mit Hilfe radioaktiv markierter Sonden durchgeführt.



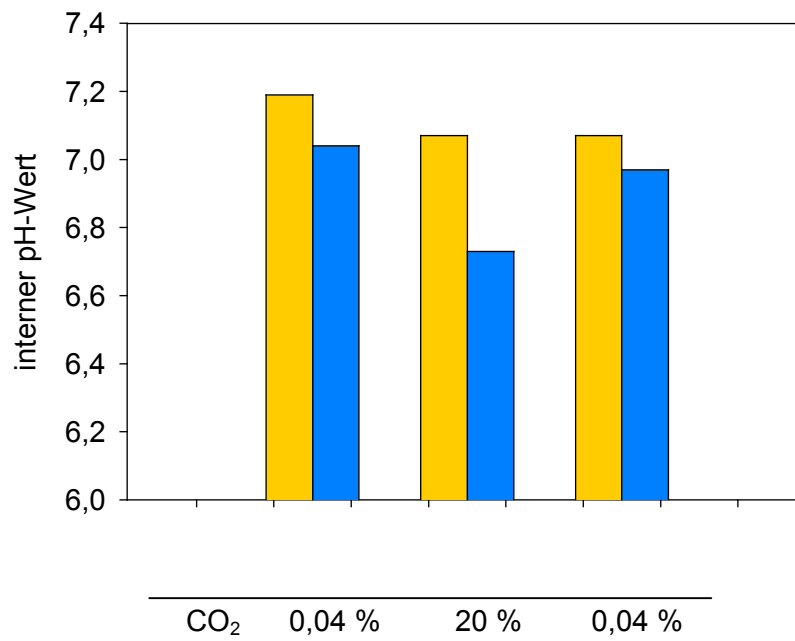
**Abb. 3.22:** Der interne pH-Wert von *E. coli* DM1891 wurde während der Produktion von Threonin bei verschiedenen pH-Werten und verschiedenen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen gemessen. Die Messung erfolgte mit Hilfe radioaktiv markierter Sonden.

Der interne pH-Wert von *E. coli* DM1891 betrug unter Kontrollbedingungen ungefähr 7,4. Wurde der externe pH-Wert auf 6 abgesenkt, so sank der interne pH-Wert auf 6,8. Wurde die CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Zuluft bei pH 7 auf 20 % erhöht, hatte dies ein Absinken des internen pH-Werts von 7,4 auf 7,0 zur Folge, es war also kein pH-Gradient mehr messbar. Wurde die CO<sub>2</sub>-Konzentration bei einem externen pH-Wert von 6 erhöht, so sank der interne pH-Wert von 6,8 auf 6,1. Die erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration führte auch hier dazu, dass kein pH-Gradient mehr detektierbar war. Der Produktionsstamm war nicht in der Lage, einen neutralen internen pH-Wert aufrechtzuerhalten.



## Ergebnisse

Des weiteren wurde untersucht, ob der Effekt von CO<sub>2</sub> auf den internen pH-Wert für den Produktionsstamm spezifisch ist oder ob es sich um ein allgemeines Phänomen handelt. Dazu wurde der Wildtypstamm *E. coli* MG1655 bei pH 6 bzw. 7 in LB-Medium im Fermenter kultiviert. Im zeitlichen Verlauf wurde die CO<sub>2</sub>-Konzentration zunächst von 0,04 % auf 20 % angehoben und dann wieder auf 0,04 % gesenkt. Dabei wurde jeweils der interne pH-Wert bestimmt (Abb. 3.23).



**Abb. 3.23:** Der interne pH-Wert von *E. coli* MG1655 wurde während der Kultivierung in LB-Medium bestimmt. Dabei wurde die CO<sub>2</sub>-Konzentration nach 10 min. von 0,04 % auf 20 % angehoben und nach 30 min. wieder auf 0,04 % abgesenkt. Der externe pH-Wert wurde dabei entweder bei pH 7 (  ) oder bei pH 6 (  ) gehalten. Die Bestimmung des internen pH-Werts erfolgte mit Hilfe radioaktiv markierter Sonden.

Während der Kultivierung bei pH 7 sank der interne pH-Wert nach der Erhöhung der CO<sub>2</sub>-Konzentration von 7,2 auf 7,1. Deutlicher war der Effekt der erhöhten CO<sub>2</sub>-Konzentration bei pH 6. Hier sank der interne pH-Wert von 7,0 auf 6,75. Nachdem der CO<sub>2</sub>-Gehalt der Zuluft wieder abgesenkt wurde, stieg der interne pH-Wert auf 6,9. Der Effekt von CO<sub>2</sub> auf den internen pH-Wert ist also reversibel.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass CO<sub>2</sub> in hohen Konzentrationen den internen pH-Wert verschiedener *E. coli*-Stämme absenkt. Insbesondere ist dies bei

## Ergebnisse

---

niedrigen externen pH-Werten zu beobachten. Dabei ist der Effekt beim Produktionsstamm deutlich ausgeprägter als beim Wildtypstamm.

## 4. Diskussion

*E. coli* wird in großem Maßstab zur biotechnologischen Produktion verschiedener chemischer Verbindungen eingesetzt. Neben der Produktion von Pharmazeutika ist vor allem die Produktion von Aminosäuren von Bedeutung. Im Fokus dieser Arbeit stand die Threoninproduktion. Aufgrund der industriellen Fermentation, aber auch in seinen natürlichen Habitaten ist *E. coli* verschiedenen Stresssituationen ausgesetzt. Unter anderem treten Schwankungen des externen pH-Werts auf. Außerdem kommt es im Verlauf der Fermentation durch die Respiration der Zellen zur Akkumulation von CO<sub>2</sub> und damit zu einem erhöhten CO<sub>2</sub>-Partialdruck, vor allem am Boden des Reaktors. Die Bildung von Nebenprodukten wie Acetat kann die Ausbeute vermindern, hohe Konzentrationen von Nebenprodukten können aber auch einen weiteren Stressfaktor darstellen. Ein Ziel dieser Arbeit war daher die Quantifizierung des Einflusses dieser Stressfaktoren auf die Physiologie von *E. coli*. Neben den Parametern Wachstum, interner pH-Wert und Energieladung wurde auch die Threoninproduktion unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Darüber hinaus sollten bereits bekannte Komponenten der pH-Homöostase und der pH-Stress-Antwort bei moderaten Veränderungen des externen pH-Werts untersucht werden. Hierbei sollte festgestellt werden, welchen Beitrag diese Systeme zur pH-Homöostase leisten. Zudem sollte der bisher unbekannte Einfluss von CO<sub>2</sub> auf die Physiologie von *E. coli* charakterisiert werden.

### 4.1 Der externe pH-Wert hat einen Einfluss auf die Threoninproduktion durch *E. coli* DM1891

Zu Beginn der Arbeit war bekannt, dass es während der bakteriellen Aminosäureproduktion durch die Prozessführung zu lokalen Veränderungen des pH-Werts und zu einer erhöhten CO<sub>2</sub>-Konzentration im Medium kommt (Kelle, *et al.*, 2005; Hermann, 2003; McIntyre und McNeil, 1997). Es war jedoch nicht untersucht, inwiefern sich diese potentiellen Stressfaktoren auf die Threoninproduktion auswirken. Daher sollte zunächst der tatsächliche Einfluss quantifiziert werden. Alle Versuche zur Threoninproduktion wurden im Fermenter durchgeführt. Dadurch

wurde gewährleistet, dass Temperatur, pH-Wert und die Zusammensetzung der Zuluft während des Versuchs konstant gehalten wurden.

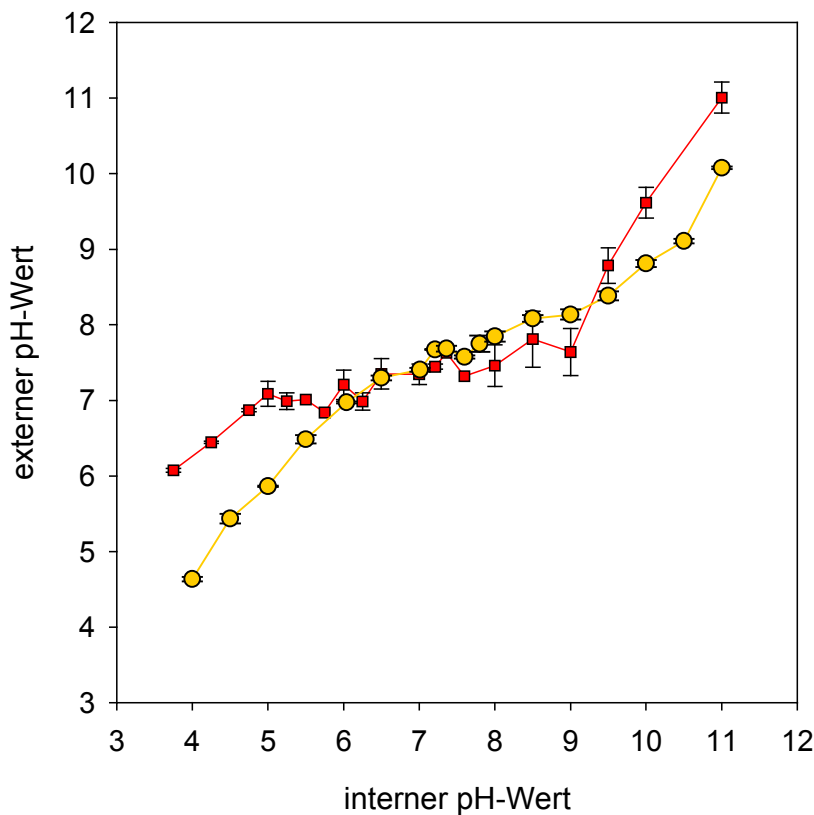
Zunächst wurde der Einfluss einer Veränderung des pH-Werts auf das Wachstum und die Produktivität der Zellen untersucht. Dazu wurde der externe pH-Wert nach einer 5-stündigen Kultivierung bei pH 7 auf verschiedene pH-Werte angehoben bzw. abgesenkt. Es wurde gezeigt, dass die Veränderung um eine pH-Einheit nach oben bzw. nach unten Auswirkungen auf Wachstum und Threonin-Konzentration hatte. Wesentlich ausgeprägter war der Effekt bei einer Veränderung auf pH 8,5 und am stärksten bei einem Absenken des externen pH-Werts auf 5,5. Hier konnten lediglich sehr langsames Wachstum und eine Threoninkonzentration von 11 mM im Vergleich zu 60 mM in der Kontrollkultur nachgewiesen werden. Um zu klären, ob die geringeren Threoninkonzentrationen mit der verringerten Biomasse korrelieren oder ob die Produktivität der Zellen nach Veränderung des externen pH-Werts beeinträchtigt war, wurde die differentielle spezifische Produktivität berechnet. Es stellte sich heraus, dass tatsächlich die Fähigkeit der Zellen zur Threoninbildung nach Veränderung des pH-Werts eingeschränkt war. Die spezifische Produktivität erreichte während der Kultivierung bei pH 7 den höchsten Wert von  $110 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg (TG)}^{-1}$  und war nach einer pH-Variation auf 6 bzw. 8 um über 50 % verringert. Eine stärkere Veränderung des externen pH-Werts hatte eine weitere Verringerung der spezifischen Produktivität zur Folge. Die Variation des pH-Werts während der Fermentation hat also einen Einfluss auf das Wachstum der Zellen, wirkt sich aber auch direkt auf die Threoninproduktion aus. Arbeiten von Follmann (2008) zeigten, dass die Lysinproduktion durch *C. glutamicum* unter Stressbedingungen ebenfalls beeinträchtigt ist. Eine Anhebung des externen pH-Werts auf 8 bzw. 8,5 hatte dabei keinen Einfluss auf die Biomassebildung, die Lysinbildung war jedoch beeinträchtigt. Bei pH 6 wurde weniger Biomasse detektiert als bei pH 7, dafür war die Produktivität der Zellen erhöht. Für die Threoninbildung durch *E. coli* konnte jedoch gezeigt werden, dass sowohl Wachstum als auch Produktivität bei niedrigen und erhöhten pH-Werten beeinträchtigt waren. Die erhöhte Produktivität von *C. glutamicum* - Zellen bei pH 6 wurde mit einer erhöhten Aktivität des Lysin-Export-Systems LysE begründet, das Lysin im Symport mit zwei OH<sup>-</sup>-Ionen transportiert (Bröer und Krämer, 1991; Follmann, 2008). Einen solchen Einfluss des pH-Werts über die Aktivität eines Transporters scheint es bei der

Threoninproduktion mit *E. coli* nicht zu geben, hier wirken sich pH-Änderungen in beide Richtungen inhibierend auf die Produktivität aus. Neben den Auswirkungen von Veränderungen des pH-Werts während der exponentiellen Phase wurde der Einfluss von pH-Stress von Beginn der Kultivierung an untersucht. Dabei wurden Kultivierungen bei pH 6 und 7 miteinander verglichen. Im Vorfeld dieser Versuche wurde das Produktionsmedium gewechselt. Es hatte sich herausgestellt, dass mit M1-1127 stabilere Wachstumsraten erreicht wurden als mit dem bis hierhin verwendeten M1-463. Die Threoninbildung war in beiden Medien vergleichbar. Nach Applikation des pH-Stresses von der Inokulation an war kein verändertes Wachstum bei pH 6 im Vergleich zu pH 7 zu beobachten. Die Threoninproduktion setzte bei pH 6 später ein als bei pH 7; nach beendeter Fermentation konnten jedoch vergleichbare Mengen Threonin im Medium nachgewiesen werden und die Produktionsrate war nicht signifikant verändert. pH-Stress hatte also unter diesen Bedingungen einen geringen Einfluss im Vergleich zur Veränderung des pH-Werts während der exponentiellen Phase. Es könnte sein, dass es sich um einen Einfluss des Mediums handelt. Wenn pH-Stress global auf den Metabolismus der Zelle wirkt und verschiedene Stoffwechselwege beeinflusst, könnte dies einen Mangel an einem Metaboliten verursachen, der nur in M1-1127 in ausreichender Menge vorhanden ist. Die Veränderung des externen pH-Werts zu Beginn der Fermentation könnte jedoch auch eine Adaptation der Zellen durch eine differentielle Genexpression bei pH 6 ermöglichen. DNA-*micro-array*-Experimente mit Zellen, die bei pH 5 bzw. 7 kultiviert wurden, haben gezeigt, dass eine pH-abhängige Genexpression stattfindet (vgl. Punkt 4.6). Dabei wurde eine erhöhte Expression verschiedener Gene, deren Produkte an der allgemeinen Stressantwort beteiligt sind, festgestellt, darunter Chaperone und Enzyme der Membransynthese. Auch Gene, deren Produkte den Abbau von Säuren vermitteln, wurden vermehrt exprimiert. Es könnte für die Zellen von Vorteil sein, wenn diese veränderte Expression bereits während der *lag*-Phase stattfindet und die Genexpression und damit Teile des Metabolismus nicht während der exponentiellen Phase umgestellt werden müssen.

## 4.2 *E. coli* verfügt über eine effektive pH-Homöostase

Die Grundlage für das Verständnis der Auswirkungen von Veränderungen des pH-Werts auf die Threoninproduktion bildet die Charakterisierung der pH-Homöostase. Zur Untersuchung der pH-Homöostase des Wildtyps MG1655 wurden als Parameter der interne pH-Wert und das Wachstum bei verschiedenen externen pH-Werten herangezogen. Der interne pH-Wert wurde jeweils 3 min. nach der Applikation einer pH-Änderung bestimmt. Messungen des Verlaufs der pH-Stressantwort über die Fluoreszenz des Proteins EYFP zeigten, dass der interne pH-Wert nach 3 min einen *steady state* erreichte, so dass dieser Zeitpunkt für die Bestimmung des internen pH-Werts geeignet ist. *E. coli* kann seinen internen pH-Wert bei externen Werten von 5,5 bis 9 in einem Bereich von 7 – 7,5 halten. In diesem Bereich ist also pH-Homöostase zu beobachten. Die Resultate dieser Arbeit stimmen mit denen früherer Arbeiten überein. Slonczewski und Foster (1996) beschrieben, dass der interne pH-Wert von *E. coli* bei externen pH-Werten von 5 bis 9 zwischen 7,4 und 7,8 gehalten wird.

Vergleicht man den internen pH-Wert von *E. coli* mit dem von *C. glutamicum* (Abb. 4.1, Follmann, 2008), so ist zunächst festzustellen, dass der Bereich der pH-Homöostase bei *C. glutamicum* in den alkalischen Bereich verschoben ist. Bei *E. coli* liegt sie bei externen pH-Werten zwischen pH 5,5 und 9, bei *C. glutamicum* dagegen zwischen pH 6 und 9,5. Des weiteren weist *E. coli* in diesem Bereich eine Variation des internen pH-Werts von lediglich einer halben pH-Einheit auf. Bei *C. glutamicum* liegt der interne pH-Wert zwischen 7 und 8,5, kann also nicht so stabil gehalten werden, wie es bei *E. coli* beobachtet wurde. Die pH-Homöostase von *E. coli* ist also im Vergleich wesentlich effektiver als die von *C. glutamicum*.



**Abb. 4.1:** Vergleich der pH-Homöostase von *E. coli* ( -■- ) und *C. glutamicum* ( -●- ): Dargestellt ist jeweils der interne pH-Wert der Zellen in Abhängigkeit vom externen pH-Wert. (Werte für *C. glutamicum*: Follmann, 2008 )

Betrachtet man das Wachstum von *E. coli* bei verschiedenen externen pH-Werten, so folgt dieses einer Optimumskurve mit einem Maximum bei pH 7. Das ist zu erwarten, da es sich bei *E. coli* bekanntermaßen um ein neutrophiles Bakterium mit einem optimalen Wachstum im neutralen pH-Bereich handelt. Dabei ist Wachstum zwischen pH 4,25 und 9 zu beobachten. Auffällig ist, dass die Wachstumsrate bei pH 9 bereits stark reduziert ist, obwohl der interne pH-Wert immer noch bei 7,5 liegt. Dabei ist zu beachten, dass es sich bei der Messung des internen pH-Werts um eine Charakterisierung der kurzfristigen Stressantwort handelt. Das Wachstum bei veränderten pH-Werten setzt dagegen eine langfristige Anpassung voraus. Weiterhin erfordert die Aufrechterhaltung des pH-Gradienten bei hohen externen pH-Werten Energie, die für andere Stoffwechselfvorgänge fehlt, was wiederum das Wachstum

verlangsamt. Dafür spricht, dass auch bei niedrigen externen pH-Werten das Wachstum reduziert ist, obwohl der interne pH-Wert im neutralen Bereich liegt.

*Die Kurzzeitantwort von E. coli auf Veränderungen des externen pH-Werts und der Zugabe von Acetat kann mit Hilfe von EYFP verfolgt werden.*

Zur Charakterisierung der Kurzzeitantwort von *E. coli* auf Veränderungen des externen pH-Werts wurde die Messung des internen pH-Werts über die pH-abhängige Fluoreszenz des Proteins EYFP etabliert. Ähnliche Messungen wurden von Wilks, *et al.* (2007) beschrieben. Im Gegensatz zur Messung mit radioaktiv markierten Sonden ermöglicht es die Fluoreszenz-Messung, den internen pH-Wert sekundengenau über einen Zeitraum von mehreren Minuten zu beobachten. Der in dieser Arbeit gezeigte Verlauf der Kurzzeitantwort der Zellen auf Veränderungen des externen pH-Werts wird durch die Ergebnisse von Wilks *et al.* bestätigt. Nach einem rapiden Absinken des internen pH-Werts bis nahezu auf den Wert des externen pH-Werts kam es innerhalb der nächsten 30 s zu einer schnellen Erholung. Daran schloss sich eine dritte Phase an, während der sich der interne pH-Wert langsamer regenerierte. Der sofortige Abfall des internen pH-Werts kann nur auf den massiven Einstrom von Protonen zurückzuführen sein. Die Funktion der Zellmembran als Permeabilitätsbarriere für Protonen scheint also bei einem akuten pH-Schock weniger ausgeprägt zu sein, als bisher vermutet. Vielmehr zeigt die anschließende Erholung des internen pH-Werts, dass aktive, Protonen aus der Zelle entfernende, Prozesse von Bedeutung sind. Um zu untersuchen, ob eine Präadaptation von Zellen bei niedrigen pH-Werten eine veränderte Membranpermeabilität zur Folge hat, wie DNA-*micro array* Experimente vermuten lassen (vgl. Punkt 1.3.1), könnte der Protoneneinstrom bei präadaptierten Zellen untersucht werden.

Zur Validierung der Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Vergleich zwischen den Werten aus der Fluoreszenz- und der Radioaktivitätsmessung angestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die Werte sehr gut vergleichbar sind. Einen weiteren Hinweis auf die Funktionalität der Methode liefern die Versuche zum Einfluss von Acetat auf den internen pH-Wert. Hier wurden Messungen des Wildtyps mit dem Protein EYFP und Messungen des Produktionsstamms über radioaktiv markierte



Sonden durchgeführt. In den zwei Versuchen wurden vergleichbare Ergebnisse erhalten.

Allerdings musste bei den Messungen des internen pH-Werts in Anwesenheit von CO<sub>2</sub> festgestellt werden, dass der Einfluss von CO<sub>2</sub> auf den internen pH-Wert nicht durch EYFP detektiert werden konnte. Für dieses Phänomen konnte keine physiologische Erklärung gefunden werden. *in vitro* Experimente mit EYFP in Anwesenheit von CO<sub>2</sub> und niedrigem pH-Wert könnten zur Klärung beitragen.

### **4.3 Die Medienzusammensetzung hat einen signifikanten Einfluss auf die pH-Homöostase von *E. coli***

Die Versuche zur Threoninproduktion lassen vermuten, dass die Zusammensetzung des Mediums einen Einfluss auf die pH-Homöostase besitzen könnte (vgl. Punkt 4.1). Zur Charakterisierung des Einflusses des verwendeten Mediums wurden neben Wachstumsversuchen in Vollmedium auch Tests mit Minimalmedium durchgeführt. Wie zu erwarten war, war das Wachstum in Minimalmedium langsamer als in Vollmedium. Das ist damit zu erklären, dass in dem Medium nur grundlegende Bausteine wie eine Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquelle und Spurensalze enthalten sind. Alle anderen Verbindungen müssen von den Zellen selbst synthetisiert werden. In Vollmedium sind dagegen komplexere Verbindungen, wie zum Beispiel Aminosäuren, bereits vorhanden und können von den Zellen direkt aufgenommen und genutzt werden. Auffallend ist, dass beim Wachstum in Minimalmedium das Maximum in den alkalischen Bereich verschoben ist und die höchste Wachstumsrate bei pH 8,5 beobachtet wurde. Der pH-Stress bei niedrigen pH-Werten könnte sich generell auf den Stoffwechsel der Zelle oder auf bestimmte Prozesse auswirken, so dass ein Mangel an verschiedenen Metaboliten entsteht. Dieser Mangel könnte durch Bestandteile des Komplexmediums supplementiert werden. So ist für einen durch Acetat verursachten pH-Stress beschrieben, dass spezifisch die Methioninsynthese inhibiert wird (Roe, *et al.*, 2002). Weitere Wachstumsversuche könnten klären, ob es Substanzen gibt, die das Wachstumsdefizit von *E. coli* in Minimalmedium bei tiefen pH-Werten aufheben können.

#### **4.4 Der Stammhintergrund ist entscheidend für die pH-Homöostase von *E. coli***

Um die grundlegenden Untersuchungen zur pH-Homöostase auf eine breitere Basis stellen zu können, wurde das Wachstum des Expressionsstamms *E. coli* BL21(D3) in Voll- und Minimalmedium untersucht. Dabei zeigten sich gravierende Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp MG1655. Generell wuchs BL21(D3) in Vollmedium langsamer und in Minimalmedium schneller als der Wildtyp. Außerdem verfügte er in Minimalmedium über eine außergewöhnliche Toleranz gegenüber niedrigen pH-Werten. Herausragendes Merkmal des Stamms BL21(D3) ist, dass er den  $\lambda$ -Prophagen D3 trägt, der für die Expression der T7-RNA-Polymerase verwendet wird (Studier und Moffat, 1986). Durch diese Veränderung lässt die erhöhte Säuretoleranz des Stamms, der wie MG1655 ein K12-Stamm ist, nicht erklären. Es bleibt aber festzuhalten, dass der Stammhintergrund einen starken Effekt auf die pH-Toleranz hat. Daher wurden im folgenden ausschließlich Mutanten mit dem Stammhintergrund MG1655 verwendet, um Ergebnisse miteinander vergleichen zu können.

Da die beiden Stämme MG1655 und BL21(D3) große Unterschiede in der pH-Homöostase aufwiesen, wurde außerdem das Wachstum des Produktionsstamms DM 1891 bei unterschiedlichen pH-Werten charakterisiert. Dieser Stamm geht auf den Stamm VL334 zurück, der durch ungerichtete Mutagenese entstand. Die für DM1891 beobachteten Wachstumsraten waren von denen der beiden anderen Stämme verschieden. Während das Wachstumsverhalten in Vollmedium mit dem von BL21(D3) vergleichbar war, verhielt sich der Stamm in Minimalmedium wie MG1655. Dieser Unterschied muss bei der Bewertung der weiteren Ergebnisse in Bezug auf den Produktionsstamm DM1891 berücksichtigt werden.

#### **4.5 Acetat als Nebenprodukt der Threoninproduktion beeinflusst nicht den internen pH-Wert**

Während der Produktion von Threonin durch den Produktionsstamm *E. coli* DM1891 kam es zur Akkumulation von 30 mM Acetat im Medium. Die Bildung von Acetat als Nebenprodukt, auch unter aeroben Bedingungen, ist bekannt (Polen, *et al.*, 2002). Frühere Arbeiten haben außerdem gezeigt, dass Acetat den internen pH-Wert von

7,8 auf 7,5 absenkt (Roe, *et al.*, 1998). Dieser Effekt wurde damit erklärt, dass Acetat in der protonierten Form durch die Membran diffundiert und im Zellinnern aufgrund des höheren pH-Werts dissoziiert. Somit kommt es intern zu einer Akkumulation von Acetatanionen und Protonen. Auch in dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Zugabe von Acetat den internen pH-Wert von *E. coli* absenkte. Auch der Produktionsstamm DM1891 ist von diesem Phänomen betroffen. Das Absinken des internen pH-Werts war jeweils konzentrationsabhängig. Dies ist zu erwarten, da das Ausmaß der Diffusion konzentrationsabhängig ist. Wenn man annimmt, dass die Komponenten der pH-Homöostase immer gleich aktiv sind, müssen höhere externe Acetatkonzentrationen einen erhöhten Einfluss auf den internen pH-Wert ausüben. Es ist außerdem ein unterschiedlicher Verlauf des internen pH-Werts nach der Zugabe von Säure bzw. Acetat zu beobachten (vgl. Abb 3.12 und 3.18). Nach der Zugabe von Säure kommt es durch den großen Konzentrationsgradienten zu einem transienten Einstrom von Protonen. Durch bisher unbekannte, Protonen exportierende, Systeme wird der pH-Wert in der Folge rasch wieder angehoben. Nach der Zugabe von Acetat kommt es dagegen zu einer stetigen Diffusion von Acetat und damit zu einer kontinuierlichen Freisetzung von Protonen. In diesem Fall kann der interne pH-Wert nicht durch die bereits vorhandenen Komponenten wiederhergestellt werden. Es kommt lediglich zu einem leichten und langsamen Anstieg des internen pH-Werts, wie er auch in der zweiten Phase der Säurestressantwort zu beobachten ist. Dieser könnte durch eine biochemische Aktivierung bereits vorhandener Komponenten hervorgerufen werden.

Unklar ist bisher, ob das Absinken des internen pH-Werts oder die Akkumulation des Anions für den wachstumsinhibierenden Effekt von Acetat verantwortlich ist. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass der acetatresistente *E. coli*-Stamm O157:H7 in Anwesenheit von Acetat bei niedrigem externem pH-Wert einen niedrigeren internen pH-Wert aufweist als der gegen Acetat empfindliche Wildtyp MG1655. Es wird postuliert, dass der niedrige interne pH-Wert die Akkumulation des Anions verhindert und damit die toxische Wirkung von Acetat vermindert. In diesem Fall wäre die Akkumulation des Anions für die Toxizität verantwortlich (Russell, 1992; Diez-Gonzalez und Russell, 1997). Neuere Arbeiten zeigten dagegen, dass ein Protein im Methioninstoffwechsel durch den niedrigen internen pH-Wert in der Anwesenheit von Acetat betroffen ist. Dieser Theorie zufolge wäre der niedrige

interne pH-Wert für die toxische Wirkung von Acetat verantwortlich (Roe, *et al.*, 2005).

Die Versuche zur Threoninproduktion zeigten außerdem, dass das unter Produktionsbedingungen von den Zellen gebildete Acetat im Gegensatz zum extern zugegebenen Acetat bei gleichen externen Konzentrationen keinen Einfluss auf den internen pH-Wert hat. Um diese Ergebnisse zu erklären, müsste in weiteren Experimenten zusätzlich die interne Acetatkonzentration der Zellen bestimmt werden. Weiteren Aufschluss könnten außerdem Versuche mit einer Präadaptation auf Acetat liefern. Es könnten auch Mutanten eingesetzt werden, die Acetat nicht verstoffwechseln können, um den Einfluss von intern akkumuliertem Acetat auf die Zelle zu untersuchen.

Bewertet man nun den Einfluss der Bildung von Acetat als Nebenprodukt auf die Threoninsynthese, so lässt sich festhalten, dass zumindest kein toxischer Effekt durch ein Absinken des internen pH-Werts auftreten sollte, da dieser trotz externer Acetatkonzentration stabil blieb. Der einzige Einfluss, den die Acetatbildung also auf die Threoninproduktion haben könnte, ist, dass in der Bilanz weniger Kohlenstoff in Richtung Threonin fließt.

### **4.6 Neben den bisher bekannten Komponenten müssen weitere Systeme maßgeblich an der pH-Homöostase von *E. coli* beteiligt sein.**

Ein Teil dieser Arbeit befasste sich mit dem Einfluss verschiedener Komponenten der pH-Homöostase bei moderaten Veränderungen des externen pH-Werts. Als Systeme, die bei extrem niedrigen pH-Werten von Bedeutung sind, wurden Aminosäuredecarboxylasen und –transporter beschrieben. Bisher wurde festgestellt, dass sie das Überleben von *E. coli* bei extrem niedrigen pH-Werten ermöglichen. (Richard, *et al.*, 2004). Die Frage war also, inwiefern diese Systeme auch an der pH-Homöostase bei moderat niedrigen pH-Werten beteiligt sind. Um dies zu klären, wurden Wachstumstests in An- und Abwesenheit der Aminosäuren Glutamat, Arginin und Lysin durchgeführt. Dabei konnten keine Unterschiede bezüglich der Wachstumsraten detektiert werden. Um einen Einfluss auf die kurzfristige pH-

Stressantwort auszuschließen, wurde der interne pH-Wert bei einem Säureschock in An- und Abwesenheit der Aminosäuren beobachtet. Auch hier konnte durch Zugabe der Aminosäuren kein positiver Effekt festgestellt werden. Die Aminosäure-Decarboxylase-Systeme scheinen also nicht an der pH-Homöostase im beobachteten Bereich beteiligt zu sein.

Des Weiteren wird ein Beitrag von Kalium zur pH-Homöostase postuliert. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass eine Reihe von Bakterien, darunter auch *E. coli*, Kalium für das Wachstum bei niedrigen pH-Werten benötigen (Kroll und Booth, 1981). Es ist außerdem bekannt, dass *E. coli* über vier Kaliumaufnahme-systeme mit unterschiedlichen Eigenschaften verfügt. Bei Kdp handelt es sich um ein primär aktives, induzierbares, hochaffines System; TrkG, TrkH und Kup sind sekundär aktive, konstitutiv exprimierte Transporter (Stumpe, 1996). Für diese Arbeit wurde eine Mutante verwendet, die eine Deletion aller Kaliumimporteure aufweist (TK2281, Polarek, *et al.*, 1988). Diese Mutante ist kaliumbedürftig und benötigt mindestens 10 mM Kalium im Medium. Auch unter Zugabe von 20 mM Kalium konnte kein Wachstum der Mutante im verwendeten Minimalmedium 56/2 erreicht werden. Daher wurden Versuche mit TK2281 in LB-Medium durchgeführt, das mehr als 20 mM Kalium enthält (Flammphotometrische Messung von Markus Becker). Ein Vergleich des Wachstums von MG1655 und TK2281 zeigte, dass die Mutante zwar bei hohen pH-Werten vergleichbare Wachstumsraten erreicht, jedoch im neutralen und vor allem im sauren Bereich ein Wachstumsdefizit im Vergleich zum Wildtyp aufweist. Somit konnte ein weiterer Hinweis dafür geliefert werden, dass Kalium für die pH-Homöostase von *E. coli* wichtig ist. Der dahinterstehende Mechanismus wurde in *E. coli* bisher nicht aufgeklärt. Hinweise liefern Arbeiten mit *C. glutamicum* (Becker, 2007; Follmann, 2008). *C. glutamicum* benötigt ebenfalls für das Wachstum bei niedrigen pH-Werten Kalium. Im Gegensatz zu anderen Bakterien wird die Kaliumaufnahme durch nur ein Protein vermittelt, nämlich den putativen Kanal CgIK. Die Einfachheit des Systems macht *C. glutamicum* zu einem idealen Modellorganismus für die Untersuchung der Bedeutung des Kaliumtransports für die pH-Homöostase (Becker 2007). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die zellinterne Kaliumkonzentration als auch die Aufnahme von Kalium über CgIK für den Aufbau eines pH-Gradienten bei niedrigen pH-Werten essentiell waren. Auch für *E. coli* konnte ein direkter Zusammenhang zwischen internem pH-Wert und

Kaliumaufnahme hergestellt werden (Kroll und Booth, 1981). Für eine genauere Untersuchung des Mechanismus ist es notwendig, die PMK zu betrachten. Diese setzt sich zusammen aus pH-Gradient und Membranpotential. Die Messung des Membranpotentials unter physiologischen Bedingungen ist in *E. coli* bisher nicht möglich. Für *C. glutamicum* sind diese Messungen im Gegensatz dazu etabliert und es wurde gezeigt, dass Zellen, die bei pH 6 keinen pH-Gradienten aufbauen konnten, ein hohes Membranpotential aufwiesen. Die PMK war jedoch in beiden Fällen gleich, d.h. der niedrige pH-Gradient wurde durch das erhöhte Membranpotential ausgeglichen. Die Vermutung ist nun, dass die Erniedrigung des Membranpotentials Voraussetzung für das Einstellen des internen pH-Werts sein könnte. Bei neutralen pH-Werten besteht die PMK hauptsächlich aus dem Membranpotential, da kein pH-Gradient vorhanden ist. Wird nun durch Absenken des externen pH-Werts ein pH-Gradient aufgebaut, so addiert sich dieser mit dem bestehenden Membranpotential zu einer wesentlich höheren PMK. Dies würde den Transport von Protonen, zum Beispiel durch die Atmungskette, erschweren. Um eine konstante PMK zu gewährleisten, müsste also das Membranpotential gesenkt werden. Dies könnte durch die Aufnahme von externem Kalium geschehen. Bisher konnte nicht geklärt werden, ob eine hohe PMK die Kaliumaufnahme induziert oder ob das Absenken der PMK durch die Kaliumaufnahme den Aufbau eines pH-Gradienten erst ermöglicht (Becker, 2007; Follmann, 2008). Da beide Parameter,  $\Delta\text{pH}$  und Membranpotential, in *C. glutamicum* mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen sekundengenau verfolgt werden können, können in Zukunft weitere Erkenntnisse zu diesem Themenkomplex gewonnen werden. Um zu klären ob dieser Mechanismus auch für *E. coli* zutrifft, muss zunächst eine Möglichkeit gefunden werden, das Membranpotential unter physiologischen Bedingungen zu bestimmen.

Wie oben festgestellt, verfügt *E. coli* über eine wesentlich effektivere pH-Homöostase als *C. glutamicum*, vor allem bei niedrigen pH-Werten (Punkt 4.2). Vergleicht man nun die Ausstattung der beiden Organismen mit Kaliumaufnahmesystemen, so fällt auf, dass *E. coli* über wesentlich mehr und affinere Kaliumaufnahmesysteme verfügt. Während in *C. glutamicum* die Aufnahme vermutlich ausschließlich durch einen Kanal vermittelt wird, besitzt *E. coli* ein hochaffines, primär aktives und drei sekundär aktive Aufnahmesysteme. Weil davon auszugehen ist, dass die Kaliumaufnahme einen wesentlichen Einfluss auf die Einstellung des internen pH-Werts ausübt,

könnte die bessere Ausstattung mit Kaliumaufnahmesystemen durchaus eine Ursache für die effektivere pH-Homöostase von *E. coli* im Vergleich zu *C. glutamicum* bei tiefem pH darstellen. Dies trifft allerdings nur zu, wenn die Kaliumaufnahme durch CgIK nicht ausreichend schnell sein sollte und damit limitierend wirkt.

Der Einfluss von Kationen-Protonen-Antiportern auf die pH-Homöostase bei hohen externen pH-Werten wurde durch Wachstumstests mit Minimalmedium untersucht. Dabei konnte kein Phänotyp der Mutanten in Bezug auf den externen pH-Wert beobachtet werden. Die Stämme ohne NhaA zeigten einen natriumsensitiven Phänotyp, der bei hohen pH-Werten verstärkt war. Die zusätzliche Deletion von *mdfA* hatte keinen additiven Effekt.

In Bezug auf MdfA widersprechen die Resultate dieser Arbeit den bisher veröffentlichten Ergebnissen. Es wurde beschrieben, dass eine *mdfA*-Deletionsmutante nicht in der Lage war, bei pH-Werten über 8,5 zu wachsen (Lewinson, 2004). In dieser Arbeit zeigte der *mdfA*-Deletionsstamm unter allen Bedingungen dasselbe Wachstum wie der Wildtyp. Allerdings wurden die Versuche von Lewinson *et al.* in Komplexmedium durchgeführt. Zudem herrschten während des Versuchs nahezu anaerobe Bedingungen, da die Kulturen mit Mineralöl überschichtet waren und nur alle 4 min. für jeweils 20 s geschüttelt wurden. Da die Kultivierungsbedingungen einen entscheidenden Einfluss auf die pH-Stressantwort haben (vgl. Punkt 4.3), könnte hier die Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse liegen. Andererseits könnte auch der Stammhintergrund eine Rolle spielen, der bei der Deletionsmutante, die von Lewinson, *et al.* verwendet wurde, unklar ist. Zudem ist zu berücksichtigen, dass es sich bei MdfA nicht nur um einen Kationen-Protonen-Antiporter, sondern auch um einen *multi drug resistance* (MDR) Transporter handelt, der den Efflux verschiedener Substanzen vermittelt (Lewinson, *et al.*, 2001). In undefiniertem Vollmedium könnten Substanzen vorkommen, deren Export durch MdfA unter alkalischen Bedingungen notwendig ist. Auch so könnte der pH-abhängige Phänotyp bei Lewinson *et al.* (2004) erklärt werden.

Bezüglich der Funktion von NhaA gehen die Meinungen in der Literatur auseinander. Eindeutig ist eine Beteiligung von NhaA an der Natrium-Homöostase. Eine *nhaA*-Deletionsmutante konnte bei einem neutralen pH-Wert von 6,8 und einer hohen NaCl-Konzentration von 0,7 M nicht mehr wachsen (Padan, *et al.*, 1989). Ein

ähnliches Ergebnis wurde auch in dieser Arbeit gezeigt. Mutanten ohne *nhaA* waren bei einem neutralen pH-Wert von 7,5 und einer NaCl-Konzentration von 0,5 M nicht in der Lage zu wachsen, während der Wildtyp unverändertes Wachstum aufwies. Weiterhin wurde in früheren Arbeiten beschrieben, dass das Wachstum einer *nhaA*-Deletionsmutante nach einer Veränderung des pH-Werts von 7,2 zu 8,3 in der exponentiellen Phase im Vergleich zum Wildtyp verringert war. Die Mutante konnte zudem unter diesen Bedingungen einen geringeren pH-Gradienten aufbauen, als der Wildtyp (Zilberstein, *et al.*, 1982). Allerdings ist dieser Einfluss auf die pH-Homöostase nur während der Anwesenheit von Natrium zu beobachten. Die *nhaA*-Deletionsmutante wuchs ohne Zugabe von Natrium bei hohen pH-Werten vergleichbar mit dem Wildtyp (Padan, 1994). In den vorliegenden Versuchen konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Im Gegensatz zum Wildtyp war das Wachstum der *nhaA*-Deletionsmutante bereits bei 0,4 M NaCl im Medium beeinträchtigt. Diese Natriumsensitivität war außerdem vom externen pH-Wert abhängig und bei hohen pH-Werten wesentlich stärker ausgeprägt. Eine pH-Sensitivität ohne Zugabe von Natrium konnte auch in dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Dagegen konnte gezeigt werden, dass auch die pH-Sensitivität des Wildtyps bei hohen pH-Werten stärker ausgeprägt ist. Es scheint also, als ob generell die Natriumsensitivität bei hohen pH-Werten verstärkt ist und dieser Effekt durch die Deletion von *nhaA* verstärkt wird. Zusätzlich zu den schon bekannten Erkenntnissen konnte gezeigt werden, dass die Doppeldeletion von *nhaA* und *mdfA* denselben Phänotyp aufweist wie die Einzeldelation von *nhaA*. Es war also keine Redundanz der beiden Systeme zu beobachten.

Strittig ist die Interpretation der Ergebnisse in Bezug auf NhaA. Es ist möglich, dass das langsamere Wachstum der *nhaA*-Deletionsmutante bei hohen pH-Werten und hohen Natriumkonzentrationen auf eine Beteiligung von NhaA an der pH-Homöostase zurückzuführen ist. Dafür spricht, dass die Mutante unter diesen Bedingungen nicht in der Lage ist einen vergleichbaren pH-Gradienten wie der Wildtyp aufzubauen (Zilberstein, *et al.*, 1982). Außerdem konnte in Proteoliposomen gezeigt werden, dass der Natrium-Protonen-Antiport durch NhaA elektrogen ist, da zwei Protonen gegen ein Natriumion ausgetauscht werden (Taglicht, *et al.*, 1991). Einen weiteren Hinweis liefert die pH-abhängige Regulation der Aktivität von NhaA. Das Protein ist bei pH 8 um drei Größenordnungen aktiver als bei pH 7. Bei pH 6,5



ist es dagegen vollkommen inaktiv (Hunte, *et al.*, 2005). Andererseits könnte es auch sein, dass generell die Natrium-Homöostase bei hohen pH-Werten beeinträchtigt ist. Natrium ist in hohen Konzentrationen für *E. coli* toxisch. Für das Entfernen der Natriumionen aus der Zelle ist jedoch der Antiport mit Protonen essentiell. Diese liegen bei hohen pH-Werten in sehr geringer Konzentration vor, was zur Beeinträchtigung des Natriumexports führen könnte. Für diese Annahme spricht, dass auch im Wildtyp die Natriumsensitivität mit zunehmendem pH-Wert zunimmt, obwohl NhaA anwesend ist. Der Phänotyp in der *nhaA*-Mutante wäre dann verstärkt, weil nur noch ein Natrium-Protonen-Antiporter (NhaB) in der Zelle vorhanden ist. In diesem Fall wäre NhaA nur für die Natrium-Homöostase von Bedeutung (Booth, 1999).

Betrachtet man die Ergebnisse zur pH-Stressantwort und den momentanen Stand der Literatur, so muss festgestellt werden, dass kein schlüssiges Bild der pH-Homöostase beschrieben werden kann. Sowohl bei hohen als auch bei niedrigen externen pH-Werten müssen weitere Komponenten neben den bisher bekannten Systemen beteiligt sein. Hinweise auf deren Identität könnten vor allem globale Ansätze wie DNA-*micro-arrays* oder die Analyse des Proteoms durch zweidimensionale SDS-Gelelektrophorese oder LC/MS liefern. Bereits 2005 wurden DNA- *micro-array*-Experimente von Maurer, *et al.* durchgeführt. Dabei wurde das Transkriptom von *E. coli*-Zellen untersucht, die bei pH 5, 7 und 8,7 kultiviert wurden. Es stellte sich heraus, dass die  $F_1/F_0$ -ATPase bei hohen pH-Werten vermehrt exprimiert wird. Das könnte damit begründet werden, dass während der ATP-Synthese Protonen in die Zelle gelangen und das Protein somit zur Anreicherung von Protonen in der Zelle beitragen könnte. Es ist jedoch auch möglich, dass eine vermehrte Bildung der  $F_1/F_0$ -ATPase zur Bereitstellung der Energie für die pH-Homöostase benötigt wird. Zum anderen wurde eine veränderte Expression der Operons *cydAB* und *cyoABCDE* beobachtet. Während das *cyd*-Operon stärker exprimiert wurde, war die Expression des *cyo*-Operons wesentlich schwächer bei pH 8,7. Beide Gene kodieren für eine terminale Oxidase mit dem Unterschied, dass die von *cyd* kodierte Oxidase pro transportiertem Elektron zwei Protonen ins Cytoplasma pumpt, die von *cyo* kodierte nur eines. Es könnte sich also bei der veränderten Expression um eine weitere Strategie zur Retention von Protonen handeln (Padan, *et al.*, 2005). Eine Funktion der  $F_1/F_0$ -ATPase wird nicht nur für hohe sondern auch für

niedrige pH-Werte postuliert. So wurde gezeigt, dass ein Teil der Antwort auf extrem niedrige pH-Werte von der  $F_1/F_0$ -ATPase abhängt. Es ist jedoch nicht geklärt, ob diese Funktion im aktiven Export von Protonen unter ATP-Verbrauch besteht, wie es für das entsprechende Protein aus *Enterococcus hirae* angenommen wird (Harold *et al.*, 1970) oder ob sie nur die Energie für diesen Teil der Stressantwort bereitstellt (Foster, 2004). Generell stellt sich die Frage ob pH-Homöostase durch Veränderungen der Systeme der Atmungskette und der Energiegewinnung erreicht werden kann, da diese Prozesse Auswirkungen auf den gesamten Stoffwechsel der Zelle haben. Eine mögliche Beteiligung dieser Systeme aufzuklären ist eine Aufgabe für weitere Forschungen. Für die Komplexe der Atmungskette von *E. coli* existieren bekannte Hemmstoffe, so dass ein Einfluss auf den internen pH-Wert untersucht werden kann. Da mindestens zwei, unter aeroben Bedingungen exprimierte, terminale Oxidasen existieren, könnten auch Einzeldelationen der betreffenden Gene untersucht werden. Es dürfte jedoch in jedem Fall schwierig sein, eine spezifische Auswirkung auf die pH-Homöostase von globalen Auswirkungen auf den Metabolismus der Zelle zu unterscheiden.

### **4.7 Das Absinken des internen pH-Werts durch die Anwesenheit von CO<sub>2</sub> führt zum Zusammenbruch der Threoninproduktion bei niedrigem externen pH-Wert**

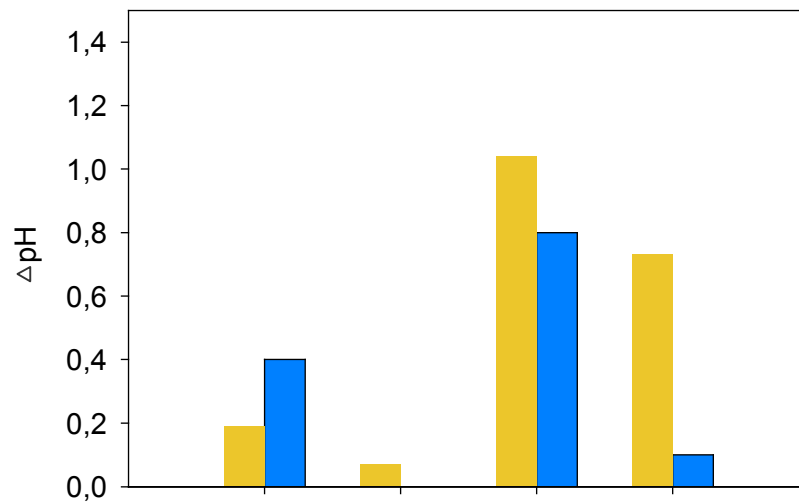
Des Weiteren wurde der Einfluss einer erhöhten CO<sub>2</sub>-Konzentration auf Physiologie und Threoninproduktion von *E. coli* untersucht. Die CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Umgebungsluft beträgt 0,04 %. Für die Versuche wurde sie mit Hilfe einer Gasmischanlage auf 20 % angehoben, wobei die Sauerstoffkonzentration konstant bei 21 % gehalten wurde. Der erste Versuch wurde bei einem externen pH-Wert von 7 durchgeführt. Dabei konnte weder im Bezug auf das Wachstum noch auf die Threoninproduktion eine Veränderung durch die erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration festgestellt werden. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in den Arbeiten zur Lysinproduktion durch *C. glutamicum* erzielt (Follmann, 2008). Hinsichtlich der Threoninproduktion wäre bei einer erhöhten CO<sub>2</sub>-Konzentration eine Steigerung zu erwarten gewesen, da für die anaplerotischen Reaktionen Bicarbonat als Substrat

benötigt wird. Die Anaplerotik könnte unter Produktionsbedingungen von Bedeutung sein, da dem Stoffwechsel Oxalacetat für die Threoninsynthese entzogen wird, das über die anaplerotischen Reaktionen bereitgestellt werden kann. Vermutlich ist jedoch unter den angewendeten Bedingungen die Versorgung mit Bicarbonat nicht limitierend für die Produktion. Darauf deuten Arbeiten hin, in denen gezeigt wurde, dass eine Deletion der PEP-Carboxylase, die in *E. coli* das wichtigste Enzym der Anaplerotik darstellt, eine Reduktion der Ausbeute um 87 % zur Folge hatte. Allerdings führte eine Überexpression des zugehörigen Gens nicht zu einer gesteigerten Ausbeute sondern zu einer Reduktion um 17 %. Dieses Ergebnis sowie die Messungen in Fluxexperimenten lassen vermuten, dass eine gewisse PEP-Carboxylase-Aktivität für die Threoninproduktion wichtig ist, eine zu hohe Aktivität jedoch hemmend wirkt (Lee, *et al.*, 2007). Es scheint, dass das durch die Konzentration von 0,04 % CO<sub>2</sub> in der Luft bereitgestellte Bicarbonat ausreicht, um den Ablauf der anaplerotischen Reaktionen zu gewährleisten. Dafür verantwortlich sind Carboanhydrasen, die die Gleichgewichtsreaktion zwischen CO<sub>2</sub> und Kohlensäure, die dann zu Bicarbonat dissoziiert, katalysieren. Für *E. coli* wird die Existenz mehrerer Carboanhydrasen postuliert, die in verschiedene Stoffwechselwege involviert sind (Merlin, *et al.*, 2003). Unter anderem gibt es eine Carboanhydrase der  $\beta$ -Klasse, kodiert von dem Gen *can*. Dieses Gen ist essentiell für das Wachstum von *E. coli* und es wird angenommen, dass die zugehörige Carboanhydrase die Grundversorgung der Zellen mit Bicarbonat sicherstellt, das nicht nur für die anaplerotischen Reaktionen sondern auch für viele weitere Stoffwechselvorgänge benötigt wird (Merlin, *et al.*, 2003). Im hier beschriebenen Versuch hatte eine Erhöhung der CO<sub>2</sub>-Konzentration keine erhöhte Produktivität zur Folge, so dass sowohl der CO<sub>2</sub>-Anteil der Umgebungsluft als auch die Aktivität der Carboanhydrase ausreichend zu sein scheinen, um die Versorgung der Anaplerotik mit Bicarbonat zu gewährleisten. Es handelt sich allerdings bei DM1891 um keinen hochentwickelten Produktionsstamm. Es ist nicht auszuschließen, dass höher entwickelte Stämme mit höheren Produktionsraten eine Bicarbonatlimitierung erfahren und von einer erhöhten CO<sub>2</sub>-Konzentration profitieren. Dies müsste für die entsprechenden Stämme untersucht werden.

Den gravierendsten Einfluss auf die Threoninbildung hatte die Kombination einer erhöhten CO<sub>2</sub>-Konzentration mit einem niedrigen pH-Wert. Unter diesen

Bedingungen war das Wachstum signifikant verlangsamt. Zudem war zu keinem Zeitpunkt der Fermentation Threonin im Medium detektierbar. Die Threoninbildung durch den Stamm DM1891 wurde also durch die Kombination von niedrigem pH-Wert und erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration komplett inhibiert. In verschiedenen Arbeiten konnte eine toxische Wirkung von CO<sub>2</sub> auf *E. coli* gezeigt werden (Corinth, *et al.*, 1987; Zhong, *et al.*, 2008). Dabei wurde reines CO<sub>2</sub> unter hohem Druck eingesetzt, was zum Absterben der Zellen führte. Eine Toxizität konnte im vorliegenden Versuch, in dem lediglich 20 % CO<sub>2</sub> ohne erhöhten Druck verwendet wurden, nicht nachgewiesen werden. Die Zellen sind jedoch so weit beeinträchtigt, dass das Wachstum verlangsamt und die Threoninproduktion komplett inhibiert ist.

Auch der Wildtyp MG1655 zeigte ein stark verringertes Wachstum in Anwesenheit von CO<sub>2</sub> bei pH 6. Dieser Effekt war beim Wachstum in Minimalmedium wesentlich stärker ausgeprägt als in Vollmedium. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass der interne pH-Wert, sowohl des Wildtyps als auch des Produktionsstamms, in Anwesenheit erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentrationen sofort absank. Dieser Effekt kann damit erklärt werden, dass CO<sub>2</sub> in die Zelle diffundiert und dort in Kohlensäure umgewandelt wird, mit der es im Gleichgewicht steht, und die sofort zu Bicarbonat und einem Proton dissoziiert. Eine erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Zelle führt also zu einer erhöhten Freisetzung von Protonen und damit zu einer Ansäuerung des Cytoplasmas. Die Komponenten der pH-Homöostase von *E. coli* sind bei niedrigen pH-Werten dazu in der Lage, aktiv Protonen aus der Zelle zu entfernen (vgl. Punkt 4.2) und damit einen pH-Gradienten aufzubauen. In Anwesenheit von CO<sub>2</sub> ist dieser pH-Gradient stark beeinträchtigt, was darauf hindeutet, dass die Komponenten der pH-Homöostase durch die massive Freisetzung von Protonen überfordert sind und daher kein pH-Gradient aufgebaut werden kann. Ähnliche Beobachtungen konnten für *C. glutamicum* gemacht werden. Auch hier führte eine erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Zuluft zu einer signifikanten Verringerung des pH-Gradienten (Follmann, 2008). Um den Unterschied des Einflusses von CO<sub>2</sub> auf Wildtyp bzw. Produktionsstamm zu verdeutlichen, ist in Abb. 4.2 der  $\Delta\text{pH}$ , d.h. der Unterschied zwischen internem und externem pH-Wert, in Abhängigkeit von externem pH-Wert und der Anwesenheit von CO<sub>2</sub> dargestellt.



pH	7	7	6	6
CO <sub>2</sub>	0,04 %	20 %	0,04 %	20 %

**Abb. 4.2:** Vergleich des Einflusses von CO<sub>2</sub> auf den internen pH-Wert von MG1655 (  ) und DM1891 (  ): Dargestellt ist jeweils der Unterschied zwischen internem und externem pH-Wert ( $\Delta\text{pH}$ ).

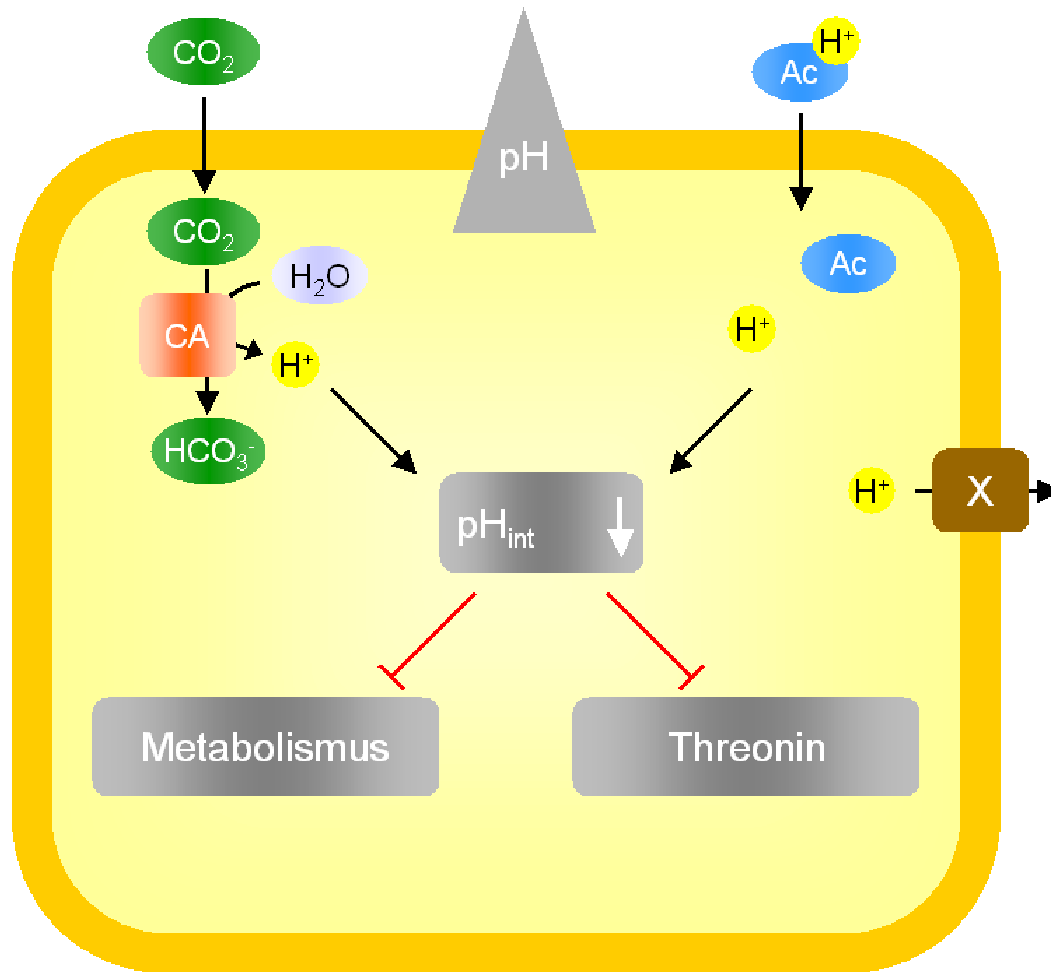
Bei pH 7 war  $\Delta\text{pH}$  relativ gering, da der interne pH-Wert nur knapp über dem externen lag. Nach der Erhöhung der CO<sub>2</sub>-Konzentration sank der Wert für den Wildtyp nur leicht, während für den Produktionsstamm kein pH-Gradient mehr gemessen werden konnte. Bei pH 6 wurde der Unterschied zwischen den Stämmen noch deutlicher. Bei 0,04 % CO<sub>2</sub> lag der  $\Delta\text{pH}$  bei 1,0 bzw. 0,8, da der interne pH-Wert wesentlich höher war als der externe. Bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration sank der pH-Gradient des Wildtyps auf 0,75, während der Produktionsstamm keinen pH-Gradienten mehr aufbauen konnte.

Die Abbildung zeigt, dass der Einfluss von CO<sub>2</sub> auf den internen pH-Wert beim Produktionsstamm wesentlich ausgeprägter ist als beim Wildtyp. Dies kann mit dem unterschiedlichen Stammhintergrund erklärt werden, der eine unterschiedlich ausgeprägte pH-Homöostase zur Folge hat. Außerdem war das Wachstum von

DM1891 bereits bei pH 5 inhibiert, während der Wildtyp bis pH 4,25 wachsen konnte. Es ist möglich, dass DM1891 über eine weniger effektive pH-Homöostase verfügt als MG1655, die durch die Freisetzung von Protonen in Folge der hohen CO<sub>2</sub>-Konzentration eher überfordert ist.

Die Frage ist nun, warum die Threoninproduktion bei hohen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen und niedrigem pH-Wert komplett inhibiert wird. Hier gibt es grundsätzlich zwei Möglichkeiten: Zum einen könnte der Versuch, einen pH-Gradienten aufzubauen, Energie verbrauchen, die nicht mehr für die Threoninproduktion aufgewendet werden kann. Allerdings wurde der Stoffwechsel von DM1891 so manipuliert, dass eine Überproduktion an Threonin stattfindet (vgl. Punkt 1.2.3). Es ist fraglich, ob die Zellen in der Lage sind, die Threoninproduktion zu minimieren, um Energie für die pH-Homöostase zur Verfügung zu stellen. Es könnte, analog zu den Ergebnissen zum Methioninstoffwechsel (Roe, *et al.*, 2005, s. Punkt 4.5), aber auch ein Enzym der Threoninbiosynthese direkt vom niedrigen internen pH-Wert betroffen sein, so dass kein Threonin mehr gebildet werden kann. Das Wachstum der Zellen wäre durch die Kultivierung in Komplexmedium zu erklären. In diesem steht Threonin wie auch Methionin zur Verfügung und kann für das Wachstum genutzt werden. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, sollten Analysen des Metaboloms unter den verschiedenen Bedingungen durchgeführt werden. Für den Fall, dass ein spezifisches Enzym betroffen ist, könnte dies anhand der Akkumulation eines Zwischenprodukts festgestellt werden.

Abb. 4.3 fasst die Erkenntnisse und Thesen zur Wirkung von Acetat und CO<sub>2</sub> als Modell zusammen. Sowohl die Anwesenheit von CO<sub>2</sub> als auch die Zugabe von Acetat bei niedrigem externem pH-Wert führt zur Freisetzung von Protonen in der Zelle. Durch bisher unbekannte Komponenten der pH-Homöostase werden Protonen aus der Zelle entfernt. Die pH-Homöostase ist jedoch durch den Einstrom von Protonen aufgrund des niedrigen externen pH-Werts und die gleichzeitige Ansäuerung des Cytoplasmas durch Acetat bzw. CO<sub>2</sub> überfordert und der interne pH-Wert sinkt ab. Durch den niedrigen internen pH-Wert wird der Metabolismus der Zelle beeinträchtigt und die Threoninsynthese wird entweder direkt oder indirekt inhibiert. In dieser Arbeit konnte erstmals experimentell gezeigt werden, dass die Anwesenheit von CO<sub>2</sub> den internen pH-Wert beeinflusst und dass die pH-Homöostase der Zellen nicht in der Lage ist, diesen Einfluss auszugleichen.



**Abb. 4.3:** Auswirkungen einer erhöhten  $\text{CO}_2$ -Konzentration bzw. der Zugabe von Acetat auf *E. coli*. Durch beide Substanzen werden zellintern Protonen freigesetzt, wodurch die Komponenten der pH-Homöostase bei gleichzeitig niedrigem externen pH-Wert überfordert sind. Die Folge ist ein Absinken des internen pH-Werts und dadurch bedingt eine Beeinträchtigung des Stoffwechsels. Ac bedeutet Acetat, CA steht für Carboanhydrase. Mit x sind die bisher unbekannt, Protonen exportierenden, Systeme bezeichnet.

Die Tatsache, dass die Threoninproduktion durch die Kombination von pH- und  $\text{CO}_2$ -Stress inhibiert wird, ist vor allem für die industrielle Produktion von Bedeutung. Es ist bekannt, dass es während des Produktionsprozesses zum parallelen Auftreten beider Stressfaktoren kommen kann und die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, dass die Ausbeute dadurch beträchtlich verringert werden könnte. Bei der

Optimierung der Produktionsbedingungen sollte darauf geachtet werden, dass niedrige pH-Werte vermieden werden. Der externe pH-Wert sollte im Optimalfall über dem internen pH-Wert der Zellen liegen. Darüber hinaus ist ein ausreichendes Austreiben des, durch die Respiration der Zellen gebildeten  $\text{CO}_2$ , für die Produktivität der Zellen von Bedeutung. Eine Optimierung der Medienzusammensetzung könnte die pH-Resistenz der Zellen erhöhen. Die Einstellung des Gleichgewichts von  $\text{CO}_2$  und Bicarbonat und damit die Freisetzung von Protonen im Cytoplasma wird durch die katalytische Aktivität der Carboanhydrasen beschleunigt. Ein Ansatz zur Verbesserung der  $\text{CO}_2$ -Resistenz von *E. coli* könnte daher in der Verringerung der Carboanhydraseaktivität liegen. Dabei ist zu beachten, dass die Carboanhydrase bei normaler  $\text{CO}_2$ -Versorgung für *E. coli* essentiell ist (Merlin, *et al.*, 2003). Bei der biotechnologischen Produktion ist davon auszugehen, dass zu Beginn lediglich 0,04 %  $\text{CO}_2$  in der Luft vorhanden ist. Die  $\text{CO}_2$ -Konzentration im Medium wird erst im Laufe des Fermentationsprozesses durch die Respiration der Zellen erhöht. Es ist daher zu prüfen, ob eine wachstumsabhängige Expression der Carboanhydrase (zu Beginn stark, gegen Ende der exponentiellen Phase schwächer) eine ausreichende Versorgung mit Bicarbonat zu Beginn der Fermentation und eine Verbesserung der  $\text{CO}_2$ -Toleranz gegen deren Ende bewirken kann.



## 5. Zusammenfassung

Das gramnegative Enterobakterium *E. coli* wird in großem Maßstab für die biotechnologische Produktion verschiedener Substanzen, darunter der Aminosäure Threonin mit 70.000 t/a, eingesetzt. In seinen natürlichen Habitaten, unter anderem während der Magen-Darm-Passage, aber auch unter Produktionsbedingungen ist *E. coli* verschiedenen Stresssituationen ausgesetzt. Dazu zählen Stress durch Veränderungen des externen pH-Werts und eine erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration. Ziel dieser Arbeit war es zum einen, den Einfluss dieser Stressfaktoren auf die Physiologie und die Threoninproduktion von *E. coli* zu untersuchen. Zum anderen sollte der Einfluss verschiedener Komponenten auf die pH-Homöostase von *E. coli* charakterisiert und quantifiziert werden, sowie erstmals der Einfluss von CO<sub>2</sub> auf die Physiologie von *E. coli* eingehend untersucht werden. Aus den Ergebnissen sollten Ansätze zur Stamm- und Prozessentwicklung bzgl. der Threoninproduktion abgeleitet werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Veränderung des externen pH-Werts um 1-1,5 pH-Einheiten eine Verringerung von Wachstum und Produktivität von bis zu 90 % zur Folge hatte. Eine erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration von 20 % hatte bei neutralem pH-Wert keine Auswirkungen auf Physiologie oder Threoninproduktion. Die Kombination von erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration und niedrigem pH-Wert verlangsamte das Wachstum der Zellen und verursachte eine komplette Inhibition der Threoninproduktion.

Für *E. coli* wurde eine effektive pH-Homöostase bei externen pH-Werten zwischen 5,5 und 9 beobachtet. In diesem Bereich lag der interne pH-Wert der Zellen zwischen 7 und 7,5. Es wurde außerdem gezeigt, dass die Fähigkeit zum Wachstum bei verschiedenen externen pH-Werten stark vom Stammhintergrund und der Medienzusammensetzung abhängig ist. Dieser Umstand muss beim Vergleich verschiedener Arbeiten zur pH-Homöostase und bei der Untersuchung von Produktionsstämmen berücksichtigt werden. Zur Charakterisierung verschiedener Komponenten der pH-Homöostase wurde eine Messung mit Hilfe des fluoreszierenden Proteins EYFP etabliert. Mit Hilfe dieser Methode konnte der Einfluss einer Zugabe von Säure oder Acetat auf den internen pH-Wert von *E. coli* sekundengenau beobachtet werden.

Die Beteiligung verschiedener Komponenten an der pH-Homöostase von *E. coli* wurde anhand von Mutanten durch Wachstumstests und Messungen des internen pH-Werts untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass Aminosäure-Decarboxylasen und Transporter nicht an der pH-Homöostase bei moderat niedrigen pH-Werten beteiligt sind; ein zuvor beschriebener Einfluss von Kalium in diesem Bereich konnte dagegen bestätigt werden. Im alkalischen Bereich konnte kein Einfluss von MdfA gezeigt werden; NhaA ist nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von Natrium von Bedeutung. Darüber hinaus müssen sowohl bei niedrigem als auch bei hohem pH weitere, bisher unbekannte, Komponenten maßgeblich an der pH-Homöostase beteiligt sein.

Bezüglich der Bildung von Acetat als Nebenprodukt der Threoninproduktion wurde gezeigt, dass von den Zellen produziertes Acetat, im Gegensatz zu extern zugegebenem, keinen Einfluss auf den internen pH-Wert der Zellen hat. Die Toxizität von extern zugegebenem Acetat wird mit der Diffusion von Essigsäure in die Zelle und der anschließenden Dissoziation begründet.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal experimentell gezeigt werden, dass CO<sub>2</sub> den pH-Gradienten der Zellen zerstört, was bei niedrigen externen pH-Werten zu einer Beeinträchtigung des Wachstums und zu einer Inhibition der Threoninproduktion führte. Als Begründung für dieses Phänomen wird folgender Mechanismus vorgeschlagen: CO<sub>2</sub> diffundiert in die Zelle, reagiert dort in einer Gleichgewichtsreaktion zu Kohlensäure, die sofort dissoziiert. Diese Reaktion wird durch Carboanhydrasen katalysiert. Durch die daraus entstehende Ansäuerung des Cytoplasmas ist die pH-Homöostase überfordert, es kann kein pH-Gradient mehr aufgebaut werden.

Als Ansatz zur Prozessoptimierung für die Threoninproduktion konnte festgestellt werden, dass die genaue Einstellung des externen pH-Werts von entscheidender Bedeutung für die Produktivität der Zellen ist. Darüber hinaus ist das Austreiben des während der Produktion entstehenden CO<sub>2</sub> sehr wichtig. Die Bildung von Acetat hatte keinen Einfluss auf den internen pH-Wert der Zellen. Eine Optimierung des Produktionsmediums könnte zur pH-Resistenz der Zellen während der Produktion beitragen und eingehendere Untersuchungen der Carboanhydrasen von *E. coli* könnten Ansätze zur Weiterentwicklung von Threoninproduktionsstämmen liefern.

## 6. Literaturverzeichnis

**ADELBERG, E. A., BURNS, S. N. (1960)**, Genetic variation in the sex factor of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **79**: 321-30

**BÄUMCHEN, C., KNOLL, A., HUSEMANN, B., SELETZKY, J., MAIER, B., DIETRICH, C., AMOABEDINY, G., BÜCHS, J. (2007)**, Effect of elevated dissolved carbon dioxide concentrations on growth of *Corynebacterium glutamicum* on D-glucose and L-lactate. *J. Biotechnol.* **128**: 868-874

**BECKER, M. (2007)** Untersuchungen zum Kaliumtransport in *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit, Universität zu Köln

**BERNOFSKY, C., SWAN, M. (1973)**, An improved cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotide. *Anal. Biochemistry* **53**: 452-458

**BLATTNER, F. R., PLUNKETT, G., 3rd, BLOCH, C. A., PERNA, N. T., BURLAND, V., RILEY, M., COLLADO-VIDES, J., GLASNER, J. D., RODE, C. K., MAYHEW, G. F., GREGOR, J., DAVIS, N. W., KIRKPATRICK, H. A., GOEDEN, M. A., ROSE, D. J., MAU, B., SHAO, Y. (1997)**, The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*. **277(5331)**:1453-1474

**BONACORSI, S. und BINGEN, E. (2005)**, Molecular epidemiology of *Escherichia coli* causing neonatal meningitis. *Int. J. Med. Microbiol.* **295(6-7)**: 373-81

**BOOTH, I. (1985)**, Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol. Reviews* **13**: 359-378

**BOOTH, I. (1999)**, The regulation of intracellular pH in bacteria. *Bacterial responses to pH*. (Novartis Foundation Symposium) **221**: 19-37

**BOOTH, I., CASH, P., O'BYRNE, C., (2002)**, Sensing and adapting to acid stress. *Antonie van Leeuwenhoek*. **81**: 33-42

**BROER, S., KRÄMER, R., (1991)** Lysine excretion by *Corynebacterium glutamicum*.  
2. Energetics and mechanism of the transport system. *Eur. J. Biochem.* **202**: 137-143

**COHEN, G. N. (1983)**, The common pathway to lysine, methionine, and threonine. Amino acids: Biosynthesis and genetic regulation. K. M. Hermann und R. L. Somerville. Reading, Mass., Addison-Qesley Publishing Co., Inc.:147-171.

**COHEN, G. N. und SAINT-GERONT, I. (1987)**, Biosynthesis of threonine, lysine and Methionine, in **NEIDHARDT, F.C. et al. (1996)**, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. Washington, D. C., American Society for Microbiology. **1**: 429-444.

**CORINTH, H. G., und RAU, G. (1987)**, Schutzgasverpackung mit Kohlendioxid. *Zeitschrift für Lebensmittel-Technologie und Verfahrenstechnik* **38(2)**

**DATSENKO, K.A., WANNER, B.L. (2000)**, One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci* **97(12)**: 6640-6645.

**DEBABOV, V. G., KOZLOV J. I., ZHDANOVA, N. I., KHURGES, E. M., YANKOVSKY, N. K., ROZINOV, M. N., SHAKULOV, R. S., REBENTISH, B. A., LIVSHITS, V. A., GUSYATIVER, M. M., MASHKO, S. V., MASHENTSEVA, V. N., KOZYREVA, L. F., ARSATIANTS, R. A. (1981)**, Method for Preparing Strains Which Produce Aminoacids. United States Patent. Ajinomoto Co., Inc., Tokyo, Japan. **4,278,765**

**DIEZ-GONZALEZ, F. und RUSSELL, J. B. (1997)**, The ability of *Escherichia coli* O157:H7 to decrease its intracellular pH and resist the toxicity of acetic acid. *Microbiology*. **143 (Pt 4)**:1175-1180

**EGGELING, L., SAHM, H. (2003)**, New ubiquitous translocators: amino acid export by *Corynebacterium glutamicum* and *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* **180(3)**: 155-160

**EKLUND, T. (1984)**, The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in bacterial membrane vesicles. *International Journal of Food Microbiology.* **4**: 179-185

**ESCHERICH, TH. (1886)**, Die Darmbakterien des Säuglings und ihre Beziehung zur Physiologie der Verdauung. *Arbeiten aus dem Pathologischen Institut zu München*

**EVERETT, H.S., VOSBERG, G.A., DAVIS, J.M. (1948)**, The treatment of *E. coli* urinary infections with sulfathalidine (phthalylsulfathiazole). *J Urol.* **59(1)**: 83-91

**FOLLMANN, M. (2008)**, Untersuchungen zum Einfluss von pH-Variation und erhöhter CO<sub>2</sub> Konzentration auf Stoffwechsel und Aminosäureproduktion mit *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation an der Universität zu Köln

**FOSTER, J. (2004)**, *Escherichia coli* acid resistance: Tales of an amateur acidophile. *Nature Reviews* **2**: 898-907

**GRANT, S., JESSEE, J., BLOOM, F., HANAHAN, D. (1990)**, Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. USA.* **87**: 4645-4649

**GUT, H., PNNACHIETTI, E., JOHN, R., BOSSA, F., CAPITANI, G., DE BIASE, D., GRÜTTER, M. (2006)**, *Escherichia coli* acid resistance. PH-sensing, activation by chloride and autoinhibition in GadB. *EMBO Journal.* **25**: 2643-2651

**HAROLD, F., PAVLASOVA, E., BAARDA, J. (1970)**, A transmembrane pH gradient in *Streptococcus faecalis*: origin, and dissipation by proton conductors and *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide. *Biochim. Biophys. Acta.* **196**: 235-244

**HERMANN, T. (2003)**, Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *J. Biotechnol.* **104**: 155-172

**HERMANN, T., RIEPING, M. (2003)**, US Patent 6,562,601

**HESSLINGER, C., FAIRHURST, S. A. und SAWERS, G. (1998)**, Novel keto acid formate-lyase and propionate kinase enzymes are components of an anaerobic pathway in *Escherichia coli* that degrades L- threonine to propionate. *Mol. Microbiol.* **27(2)**: 477-492

**HONDORP, E. R. und MATTHEWS, R. G. (2004)**, Oxidative Stress Inactivates Cobalamin-Independent Methionine Synthase (MetE) in *Escherichia coli*. *PLOS Biology.* **2(11)**: 1738-1753

**HUNTE, C., SCREPANTI, E., VENTURI, M., RIMON, A., PADAN, E., MICHEL, H. (2005)** Structure of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter and insights into mechanism of action and regulation by pH. *Nature* **435**: 1197-1202

**IYER, R., IVERSON, T. M., ACCARDI, A., MILLER, C. (2002)**, A biological role for prokaryotic ClC chloride channels. *Nature.* **419(6908)**: 715-718

**SINOUE, H., NOJIMA, H., OKAYAMA, H. (1990)** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* **96**: 23-28

**JENSEN, K. F. (1993)**, The *Escherichia coli* K-12 "wild types" W3110 and MG1655 have an rph frameshift mutation that leads to pyrimidine starvation due to low pyrE expression levels. *J. Bacteriol.* **175(11)**: 3401-3407

**JONES, R., GREENFIELD, P., (1982)**, Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* **4**: 210-223

**KASHKET, E. (1985)**, The proton motive force in bacteria: a critical assessment of methods. *Ann. Rev. Micro* **39**: 219-242

**KAWAI, Y. and OGASAWARA, N. (2006)**, Bacillus subtilis EzrA and FtsL synergistically regulate FtsZ ring dynamics during cell division. *Microbiology*. **152**: 1129–1141

**KELLE, R., HERMANN, T., BATHE, B. (2005)** L-Lysine production. *Handbook of Corynebacterium glutamicum*. **1**: 465- 488

**KLINGENBERG, M., PFAFF, E. (1967)**, Means of terminating reactions. *Methods Enzymol*. **10**: 680-684

**KRÄMER, R., LAMBERT, C., EBBINGHAUSEN, H., HOISCHEN, C. (1990)** Uptake of glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. II. Evidence for a primary active transport system. *Eur. J. Biochem*. **194**: 937-944

**KROLL, R. und BOOTH, I. (1981)**, The role of potassium transport in the generation of a pH gradient in *Escherichia coli*. *Biochem J*. **198**: 691-698

**KRUSE, D. (2000)**, Threoninaufnahme und Threoninexkretion in *Escherichia coli*: molekularbiologische, biochemische und biotechnologische Aspekte. Dissertation an der Universität zu Köln

**KUSIAN, B., SÜLTEMEYER, D., BOWIEN, B. (2002)**, Carbonic anhydrase is essential for growth of *Ralstonia eutropha* at ambient CO<sub>2</sub> concentrations. *J. Bacteriol*. **184**: 5018-5026

**LANGE, R., HENGGE-ARONIS, R. (1991)**, Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol*. **5(1)**: 49-59

**LEE, K. H., PARK, J. H., KIM, T. Y., KIM, H. U., LEE, S. Y. (2007)**, Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-threonine production. *Mol Syst Biol*. **3**: 149

**LEFEBVRE, Y., COUTURE, P., COUILLARD, D. (1988)** An analytical procedure for the measurement of ATP extracted from activated sludge. *Can. J. Microbiol.* **34**: 1275-1279

**LEWINSON, O., BIBI, E. (2001)**, Evidence for simultaneous binding of dissimilar substrates by the *Escherichia coli* multidrug transporter MdfA. *Biochemistry* **40**: 12612-12618

**LEWINSON, O., PADAN, E., BIBI, E. (2004)**, Alkalitolerance: A biological function for a multidrug transporter in pH homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci* **101**: 14073-14078

**LINDROTH, P., MOPPER, K. (1979)**, High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthalaldehyde. *Anal. Chem.* **51**: 1667-1674

**LUNDIN, A., RICKARDSON, A., THORE, A. (1976)**, Continuous monitoring of ATP-converting reactions by purified firefly luciferase. *Anal. Biochem.* **75**: 611-620

**MARCUS, J. P. und DEKKER, E. E. (1993)**, Threonine formation via the coupled activity of 2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A lyase and threonine dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **175(20)**: 6505-6511

**MAURER, L., YOHANNES, E., BONDURANT, S., RADMACHER, M., SLONCZEWSKI, J. (2005)**, pH regulates genes for flagellar motility, catabolism, and oxidative stress in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* **187**: 304-319

**McINTYRE, M., McNEIL, B. (1997)** Effects of elevated dissolved CO<sub>2</sub> levels on batch and continuous cultures of *Aspergillus niger* A60: an evaluation of experimental methods. *Appl Environ Microbiol.* **63**: 4171-4177

**MERLIN, C., MASTERS, M., McATEER, S., COULSON, A. (2003)**, Why Is Carbonic Anhydrase Essential to *Escherichia coli*? *J. Bacteriol.* **185(21)**: 6415–6424



**NEIDHARDT, F. C. (1996)**, *Escherichia coli* and *Salmonella*. Washington, DC, ASM Press

**OGAWA, W., KIM, Y. M. MIZUSHIMA, T., TSUCHIVA, T. (1998)**, Cloning and expression of the gene for the Na<sup>+</sup>-coupled serine transporter from *Escherichia coli* and characteristics of the transporter. *J. Bacteriol.* **180(24)**: 6749-6752

**OLSON, E. (1993)**, Influence of pH on bacterial gene expression. *Molec. Microbiol.* **8**: 5-14

**PADAN, E., MAISLER, N., TAGLICHT, D., KARPEL, R., SCHULDINER, T. (1989)**, Deletion of ant in *Escherichia coli* reveals its function in adaptation to high salinity and an alternative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter system(s). *J Biol Chem.* **264(34)**: 20297-302.

**PADAN, E. und SCHULDINER, S. (1994)**, Molecular Physiology of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in *Escherichia coli*. *J. exp. Biol.* **196**: 443-456

**PADAN, E., BIBI, E., ITO, M., KRULWICH, T. (2005)**, Alkaline pH homeostasis in bacteria: New insights. *Biochimica et Biophysica Acta* **1717**: 67-88

**POLAREK, J. W., WALDERHAUG, M.O., EPSTEIN, W. (1988)**, Genetics of Kdp, the K<sup>+</sup>-transport ATPase of *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **157**: 655-67

**POLEN, T., RITTMANN, D., V. F. WENDISCH, V. F., SAHM, H. (2003)**, DNA microarray analyses of the long-term adaptive response of *Escherichia coli* to acetate and propionate. **69**: 1759-1774

**POTTER, R., KAPOOR, V., NEWMAN, E. B. (1977)**, Role of threonine dehydrogenase in *Escherichia coli* threonine degradation. *J. Bacteriol.* **132(2)**: 385-391

**RICHARD, H., FOSTER, J. (2004)**, *Escherichia coli* glutamate- and arginine-dependent acid resistance systems increase internal pH and reverse transmembrane potential. *J. Bacteriol.* **186(18)**: 6032-6041

**RILEY, L.W., REMIS, R. S., HELGERSON, S.D., MCGEE, H.B., WELLS, J.G., DAVIS, B.R., HEBERT, R.J., OLCOTT, E.S., JOHNSON, L.M., HARGRETT, N.T., BLAKE, P.A., COHEN, M.L. (1983)**, Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New Engl. J. Med.* **308(12)**: 681-685

**ROBBINS, J. C., OXENDER, D. L. (1973)**, Transport systems for alanine, serine, and glycine in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **116(1)**: 12-18.

**ROE, A., MCLAGGAN, D., DAVIDSON, I., O'BYRNE, C., BOOTH, I. (1998)**, Perturbation of Anion Balance during Inhibition of Growth of *Escherichia coli* by Weak Acids. *J. Bacteriol.* **180(4)**: 767-772

**ROE, A., O'BYRNE, C., MCLAGGAN, D., BOOTH, I. (2002)**, Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity. *Microbiology.* **148**: 2215-2222

**ROTTENBERG, H. (1979)**, The measurement of membrane potential and  $\Delta$ pH in cells, organelles, and vesicles. *Meth. Enzymol.* **LV**: 547-569

**RUSSEL, R. (1991)**, Resistance of *Streptococcus bovis* to Acetic Acid at Low pH: Relationship between Intracellular pH and Anion Accumulation. *Appl. Env. Microbiol.* **57** : 255-259

**SALMOND, C. V., KROLL, R. G., BOOTH, I. R. (1984)**, The effect of food preservatives on pH homeostasis in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol* **130(11)**: 2845-2850

**SAMBROOK, J., FRITSCH, E., MANIATIS, T. (1989)**, Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**SCHIMZ, K., RÜTTEN, B., TRETTER, M. (1981)**, Determination of adenosine nucleotides with luciferine/luciferase from crude firefly lantern extract on a bioluminescence analyser. *Adv. Biotechnol.* **1**: 457-462

**SLONCZEWSKI, J., FOSTER, J. (1996)**, pH regulated genes and survival at extreme pH. *Escherichia coli and Salmonella* **1**: 1539-1549

**STANCIK, L.M., STANCIK, D.M., SCHMIDT, B., BANHART, D.M., YONCHEVA, Y.N., SLONCZEWSKI, J.L. (2002)**, pH-dependent expression of periplasmic proteins and amino acid catabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184(15)**: 4246-4258

**STUDIER, F. W. und MOFFATT, B. A. (1986)**, Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189(1)**: 113-130

**STUMPE, S., SCHLÖSSER, A., SCHLEYER, M., BAKKER, E.P. (1996)**, K<sup>+</sup> circulation across the prokaryotic cell membrane: K<sup>+</sup>-uptake systems. *Handbook of Biological Physics* **2**: 473-499

**SUMANTRAN, V. N., SCHWEIZER, H. P., DATTA, P. (1990)**, A Novel Membrane-Associated Threonine Permease Encoded by the *tdcC* Gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172(8)**: 4288-4294

**TAGLICHT, D., PADAN, E., SCHULDINER, S. (1991)** Overproduction and purification of a functional Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter coded by *nhaA* (*ant*) from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **266**: 11289-11294

**TETSCH, L., KOLLER, C., HANEBURGER, I., JUNG, K. (2008)**, The membrane-integrated transcriptional activator CadC of *Escherichia coli* senses lysine indirectly via the interaction with the lysine permease LysP. *Mol. Microbiol.* **67(3)**: 570-583.

**WILKS, J. C. und SLONCZEWSKI, J. L. (2007)**, pH of the Cytoplasm and Periplasm of *Escherichia coli*: Rapid Measurement by Green Fluorescent Protein Fluorimetry. *J. Bacteriol.* **189(15)**: 5601-5697

**YANISCH-PERRON, C., VIERA, J., MESSING, J. (1985)**, Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119

**YUK, H. G., MARSHALL, D. L. (2004)**, Adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 to pH alters membrane lipid composition, verotoxin secretion, and resistance to simulated gastric fluid acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **70(6)**: 3500-3505

**ZAKATAEVA, N. P., ALESHIN, V. V., TOKMAKOVA, I. L., TROSHIN, P. V., LIVSHITS, V. A. (1999)**, The novel transmembrane *Escherichia coli* proteins involved in the amino acid efflux. *FEBS Lett.* **452(3)**: 228-232

**ZHONG, Q., BLACK, D. G., DAVIDSON, P.M., GOLDEN, D.A. (2008)**, Nonthermal inactivation of *Escherichia coli* K-12 on spinach leaves, using dense phase carbon dioxide. *J. Food Prot.* **71(5)**:1015-1017

**ZILBERSTEIN, D., AGMON, V., SCHULDINER, S., PADAN, E. (1982)**, The Sodium/Proton Antiporter is part of the pH homeostasis mechanism in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **257**: 3687-3691

## **Erklärung**

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

Ich versichere, dass ich alle Angaben wahrheitsgemäß nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe, und verpflichte mich, jede, die obigen Angaben betreffende, Veränderung dem Dekanat unverzüglich mitzuteilen.

### **Keine Teilpublikationen**

Köln, Dezember 2008



# Lebenslauf

## Persönliche Daten:

Name: Jeannine Astrid Nettekoven  
Anschrift: Josefstr. 25  
53111 Bonn  
geboren am: 23.04.1981  
in: Bergisch Gladbach  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## Studium:

Ab November 2005: Doktorarbeit am Institut für Biochemie, Universität zu Köln,  
„Untersuchungen zum Einfluss von pH- und CO<sub>2</sub>-Stress  
auf Physiologie und Threoninproduktion von  
*Escherichia coli*“  
24.08.2005: Diplom  
Titel der Diplomarbeit: „Charakterisierung putativer  
Aminosäuretransportsysteme von *Corynebacterium*“  
2002 – 2004: Hauptstudium mit den Schwerpunkten Biochemie, Botanik  
und Pharmakologie  
20. Sept. 2002: Vordiplom  
Ab Oktober 2000: Studium der Biologie an der Universität zu Köln

## Schulische Daten:

06. Juni 2000: Allgemeine Hochschulreife  
1991 - 2000: Friedrich-Wilhelm-Gymnasium in Köln  
1987 - 1991: kath. Grundschule Trierer Str. in Köln