

**Experimente zum proteomweiten Austausch von L-Tryptophan in
Escherichia coli gegen 4-Aza- und 4-Fluor-Tryptophan**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Mohamed Boshra
aus Ägypten

Berlin, August 2017

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Juni 2012 bis August 2017 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. Rupert Mutzel am Institut für Biologie angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Rupert Mutzel
Institut für Biologie - Mikrobiologie, Freie Universität Berlin, Königin-Luise-Straße 12-16 Raum 133, 14195 Berlin

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Nediljko Budisa,
Technische Universität Berlin, Fakultät II, Institut für Chemie, Sekretariat L 1, Müller-Breslau-Str. 10, 10623 Berlin

Tag der Disputation: 15.03.2018

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegenbringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Promotionsschrift niemals zustande gekommen wäre.

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel meinem Doktorvater, für die Betreuung dieser Arbeit, der freundlichen Hilfe und der mannigfachen Ideengebung, die mir einen kritischen Zugang zu dieser Thematik eröffnete. Die zahlreichen Gespräche auf intellektueller und persönlicher Ebene werden mir immer als bereichernder und konstruktiver Austausch in Erinnerung bleiben. Ich habe unsere Dialoge stets als Ermutigung und Motivation empfunden.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Nediljko Budisa für die hilfsbereite und wissenschaftliche Betreuung als Zweitgutachter.

Ferner danke ich Dr. Sascha Thewes, Matthais Bild, Jens Baumgardt, Arkadi Kundik und Madeleine-Marie Gilles für ihren kritischen Diskurs, die kritische Auseinandersetzung mit meinem Themenkomplex und für die Durchsicht meiner Arbeit.

Mein außerordentlicher Dank gilt Angela Lahrz ohne ihre mühevollen Geduld und liebevolles Verständnis in dieser beschwerlichen Zeit ein solcher Arbeitsumfang niemals hätte gelingen können. Die mehrfache Durchsicht dieser Abhandlung, ihre kritischen Betrachtungen, ihre differenzierten Anmerkungen sowie die mit ihr zweckdienlichen Diskussionen, vor allem aber ihr moralischer Beistand und der menschliche Halt, haben mir Kraft und Mut zur Anfertigung und Vollendung meiner Dissertation gegeben.

Tief verbunden und dankbar bin ich meiner Frau Heba Gamal für ihre unglaublich hilfreiche Unterstützung und ihr Verständnis bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
Amp ^R	Ampicillinresistenz
AG	Arbeitsgruppe
4-A-Evolvat	4-Aza-Evolvat
4-A-Ind	4-Aza-Indol
5-A-Ind	5-Aza-Indol
2-A-Trp	2-Aza-Tryptophan
4-A-Trp	4-Aza-Tryptophan
5-A-Trp	5-Aza-Tryptophan
7-A-Trp	7-Aza-Tryptophan
5-OH-Trp	5-Hydroxy-Tryptophan
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
D-Trp	D-Tryptophan
FK	Flüssigkultur
4-F-Evolvat	4-Fluor-Evolvat
4-F-Ind	4-Fluor-Indol
4-F-Trp	4-Fluor-Tryptophan
5-F-Trp	5-Fluor-Tryptophan
6-F-Trp	6-Fluor-Tryptophan
4-F-Trp	4-Fluor-Tryptophan
5-F-Trp	5-Fluor-Tryptophan
6-F-Trp	6-Fluor-Tryptophan
eGFP	His6-markiertes <i>enhanced green fluorescent Protein</i>
Kan	Kanamycin
Kan ^R	Kanamycinresistenz
HK	Hauptkultur
Indel	Insertion und Deletion

LB	<i>Lysogeny Broth</i> oder <i>Luria-Bertani Broth</i>
LBON	<i>Lysogeny Broth</i> ohne NaOH
L-Trp	L-Tryptophan
MQ-H ₂ O	Milli-Q Wasser (deionisiertes Wasser)
MS-Glc Medium	Minimal Medium mit D-Glucose
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
UV	Ultraviolett
VK	VorKultur
[3,2] Tpa	l-β-(Thieno[3,2-b] pyrrolyl) alanin

Zusammenfassung

In dieser Studie zur *in vivo*-Evolution wurden kontinuierliche Kulturen eines L-Tryptophan-auxotrophen Derivats von *Escherichia coli* in zwei Genematen durchgeführt. Dabei sollten eine L-Tryptophan-auxotrophe Mutante (G2748, $\Delta trpEDLC/\Delta tnaA$) des *E. coli* Prototyps MG1655 in Gegenwart der Indol-Analoga 4-Aza-Indol und 4-Fluor-Indol kultiviert, die Anpassung der Evolvate an die Analoga analysiert und Genomsequenzierungen der entstandenen Evolvate durchgeführt werden. Dazu wurden die Bakterien in kontinuierlicher Kultur im Genematen in einem konditionalen *pulse-feed*-Regime über ca. 18000 (4-Aza-Indol) bzw. 18500 (4-Fluor-Indol) Generationen kultiviert.

Im konditionalen *pulse-feed*-Regime wurde eine logarithmisch wachsende große Population (ca. 10^{10} Individuen) von Zellen kontinuierlich mit alternativen Pulsen von Wachstumsmedien verdünnt: Pulse eines "permissiven" Mediums, welches das Wachstum der Zellen erlaubt (MS-Glc Medium mit L-Tryptophan sowie einer von den Zellen tolerierten Konzentration der L-Tryptophan-Analog-Vorstufen 4-Aza-Indol bzw. 4-F-Indol) wurden bei Erreichen einer vorgegebenen Zelldichte von Pulsen eines "nichtpermissiven" Mediums abgelöst, welches nur das jeweilige Analog enthielt. Damit stellen sich im Medium automatisch Analog-Konzentrationen ein, welche von den bestangepassten Varianten gerade noch toleriert werden. Genetische Varianten, die höhere Konzentrationen des Analogs oder geringere Konzentrationen der natürlichen Aminosäure tolerieren, wurden selektiert. Das *Gleichgewicht*-Verhältnis zwischen permissivem und nicht-permissivem Medium informiert über den Stand des Adaptationsprozesses.

Für die unter 4-Fluor-Indol Selektion nach 18500 Generationen und unter 4-Aza-Indol Selektion evolvierten Derivate nach 18000 Generationen wurden bei konstantem Tryptophan-Angebot mit steigenden Konzentrationen an 4-Fluor-Indol und 4-Aza-Indol höhere Wachstumsausbeuten beobachtet. In der Schlussphase des Experiments wurden Evolvate identifiziert, die in der Lage sind in Gegenwart von Analogen kurzfristig über bis zu zwei Passagen wachsen zu können.

Überraschend ist der Befund, dass die Klone F16K und F18K in MS-Glc Medium mit dem Stereoisomer D-Tryptophan gut wachsen konnten. Die Genomsequenz des Evolvats F18,5K zeigt zwei Mutationen, die die D-Aminosäuren-Dehydrogenase (*dadA*-Gen) betreffen. Ob es überhaupt einen Zusammenhang zwischen *dadA* und dem Wachstum der Evolvate gibt, ist ungeklärt und sollte weiter untersucht werden.

Summary

The main objective of our study was the *in vivo* evolution in continuous cultures of a L-tryptophan-auxotrophic mutant (G2748, $\Delta trpEDLC/\Delta tnaA$) of the *Escherichia coli* prototype MG1655 to generate descendants that incorporate the non-canonical amino acids 4-Aza-tryptophan and 4-Fluoro-tryptophan instead of the canonical amino acid L-tryptophan in their proteome by continuous selection for analog incorporation at multiple sites. The auxotrophic mutants were cultivated in continuous cultures in the Genemat using a conditional pulse-feed-regime for approx. 18000 (4-Aza-indole) or 18500 (4-Fluoro-indole) generations. The adaptation of descendants of *Escherichia coli* to the analogues was analysed and genome sequences of the resulting descendants were determined.

Two parallel Genemat cultures were fed with a permissive medium (relaxing medium) containing the precursor 4-Aza-indole and L-tryptophan or the precursor 4-Fluoro-indole and L-tryptophan. Whenever population densities of approx. $4 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ were reached, the cultures were diluted with alternative pulses of non-permissive medium (stress medium) containing only the precursor 4-Aza-indole or the precursor 4-Fluoro-indole. After approximately 18500 generations under selection for the incorporation of 4-Fluoro-indole and 18000 generations for 4-Aza-Indole incorporation descendants were able to grow in the presence of analogues over up to two passages. The steady state relation between the permissive and non-permissive medium indicated the state of the adaptation process and the genetic variations which tolerate higher concentrations of the analogs or lower concentrations of the natural amino acid.

It was surprising to find that the clones F16K and F18K could grow well in the minimal medium with the stereoisomer D-tryptophan. Whole genome sequencing of the F-evolved clone after approximately 18500 generations revealed mutations in the D-amino acid dehydrogenase gene, *dadA*, which may be involved in the utilization of D-tryptophan. The relation between DadA and the growth of the evolutes is therefore so far unclear and should be further investigated.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	i
Abkürzung	ii
Zusammenfassung	iv
Summary	vi
1. Einleitung	1
1.1 Einbau von nicht-kanonischen Aminosäuren in Proteine	1
1.2 L-Trp als Ziel für Protein-Engineering	3
1.3 Die Synthese von L-Trp in <i>E. coli</i>	7
1.4 <i>E. coli</i> und die Biotechnologie	8
1.5 Experimentelle Evolution	9
1.6 Experimentelle Evolution und kontinuierliche Kultur	10
2. Zielsetzung	14
3. Materialien und Methoden	14
3.1 Versuchsorganismus	14
3.2 Plasmide	15
3.2.1 pKD46	15
3.2.2 pKD4	16
3.2.3 pCP20	16
3.2.4 pQE-80L-EGFP-H6	16
3.3 Primer	16
3.4 Geräte	18
3.5 Chemikalien	19
3.5.1 Puffer	20
3.5.2 Medien	22
3.5.3 Gele	25

3.5.4	Färbe- und Entfärbelösungen	26
3.5.5	Sonstige Lösungen	27
3.5.6	Proteinreinigung des 6xHis getaggten GFP	28
4.	Methoden	29
4.1	Der Genemat und die kontinuierliche Kultur	29
4.2	Die Beimpfung des Genematen	30
4.3	Konservierung von Bakterienstämmen	30
4.4	Überprüfung der genetischen Identität von Bakterienstämmen durch PCR	30
4.4.1	PCR Ansatz	31
4.4.2	PCR- Programm	31
4.5	Agarose-Gelelektrophorese	31
4.6	Endpunkt-Wachstumsanalysen	32
4.7	Erstellen einer Wachstumskurve	32
4.8	Proteomaufbereitung	33
4.9	Bradford-Test	33
4.10	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophore (SDS-PAGE)	33
4.11	Überprüfung des Einbaus von L-Trp-Analogen ins Proteom durch die Überexpression von eGFP	34
4.11.1	Herstellung elektrokompeter Zellen und Transformation	34
4.11.2	eGFP-Überexpression	35
4.11.3	eGFP -Reinigung	35
4.12	Genomische DNA-Sequenzierung	36
4.13	Gendeletionen in <i>E. coli</i>	36
4.13.1	Erstellung einer Knockout-Kassette mit einem Kanamycinresistenz-Gen und FRT-Sequenzen	37
4.13.1.1	Pipettierschema des PCR-Ansatzes	37
4.13.1.2	PCR-Programm	37
4.13.1.3	Aufreinigung der PCR-Produkte	37
4.13.1.4	Ausschalten eines Gens durch homologe Rekombination nach der Elektroporation mit einer Knockout-Kassette	38
5.	Ergebnisse	39

5.1	Kinetik des Adaptationsprozesses	39
5.2	Charakterisierung evolvierter Derivate	41
5.2.1	Charakterisierung der Aza-evolvierten Derivate	41
5.2.2	Charakterisierung der F-evolvierten Derivate	46
5.3	Generationszeiten der evolvierten Derivate	50
5.4	Genetische Veränderungen der Evolvate	51
5.5	Analyse der Effekte der Deletionen in den Genen für die Transporter aromatischer Aminosäuren	54
5.6	Überprüfung der L-Trp Analoga-Inkorporation durch Chloroform Färbung	58
5.7	Überprüfung des Einbaus von L-Trp Analogen in eGFP	59
5.8	Charakterisierung des evolvierten Derivates F16K	59
5.8.1	Kinetik des Adaptationsprozesses des unter 4-F-Ind-Selektion entstandenen Derivats in Gegenwart von D-Trp	61
5.8.2	Charakterisierung des F-evolvierten Klons F18,5K unter dem D-Trp Regime	61
5.8.3	Genetische Veränderungen in dem Evolvat F18,5K	63
6.	Diskussion	66
6.1	Kinetik des Adaptationsprozesses	66
6.2	Charakterisierung unter 4-F-Trp Selektion entstandener evolvierter Derivate	67
6.3	Analyse der Effekte von Deletionen der Gene für Transporter aromatischer Aminosäuren im Ausgangsstamm und in 4-F-Trp evolvierten Derivaten	67
6.4	Das Wachstum des Klons F18K in MS-Glc Medium mit D-Trp	69
6.5	Charakterisierung unter 4-A-Ind-Selektion entstandener evolvierter Derivate	70

6.6	Analyse der Effekte von Deletionen der Gene für Transporter aromatischer Aminosäuren im Ausgangsstamm und in 4-A-Trp evolvierten Derivaten	71
7.	Ausblick	72
8.	Literaturverzeichnis	72
	Eigenständigkeitserklärung	xi

1. Einleitung

1.1 Einbau von nicht-kanonischen Aminosäuren in Proteine

Um Struktur-Funktions-Beziehungen in Proteinen zu verstehen, muss man die Dynamik von Protein-Ligand-Wechselwirkungen und Untereinheit-Untereinheit-Wechselwirkungen auf atomarer Ebene mit den strukturellen Informationen, die durch Röntgenbeugungsuntersuchungen bereitgestellt werden, korrelieren. Ein idealer Ansatz, um solche Probleme zu untersuchen, besteht darin, eine Art "Sonde" selektiv in das System einzuführen, die den Wirt nicht signifikant stört und spektroskopische Signale liefern kann, die vergleichsweise frei von Interferenzen sind. Es wurden viele Experimente durchgeführt, um Aminosäure-Analoga in bakterielle Proteine zu integrieren. Eine Reihe von spektroskopischen Sonden, wie die Integration von Spin-Label, ^{13}C - oder ^{19}F -Kerne und Fluoreszenzfarbstoffe an Protein und Liganden gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe wurden verwendet, um Einblick in dieses wichtige Problem zu gewinnen (Yguerabide, 1972). Es erforderte jedoch die Anlagerung einer spektroskopischen Sonde an das Protein oder das Ligandenmolekül. Daher hatte es ernsthafte Einschränkungen, insbesondere wenn sie auf jene Studien angewendet wurden, die die kovalente Bindung einer Sonde an bestimmte Gruppen in einem Proteinmolekül erforderten. Auch beschränken sich die chemischen Funktionen der 20 kanonischen Aminosäuren auf einfache aliphatische, aromatische, basische, saure, hydroxyl- und schwefelhaltige Gruppen und es fehlen daher interessante Funktionalitäten und chemische Verbindungen wie Halogen-, Alkenyl-, Alkin-, Keto-, Cyano-, Azido-, Nitroso- oder Silylgruppen (**Abb .1**).

Im Jahr 1950 konnten Cowie und Cohen die Inkorporation von Selenomethionin anstelle des kanonischen Methionins in Proteine einer auxotrophen Variante von *Escherichia coli* schaffen (Cowie und Cohen, 1957). In den letzten Jahren nahm das Interesse am Einbau unnatürlicher Aminosäuren in Proteine zu. Als Beispiel ist die Substitution von Aminosäuren mit ^{19}F -markierten aromatischen Aminosäuren zur Strukturbestimmung mittels Röntgen-Strahlung zu nennen (Xie und Schultz, 2006; Wang und Schultz, 2005). Jamie M. Bacher und Andrew Ellington versuchten, 4-Fluor-Tryptophan (4-F-Trp) statt L-Tryptophan (L-Trp)

in die Gesamtheit aller Proteine in *E. coli* durch serielle Subkultur in Gegenwart des Analogs zu integrieren, um einen Organismus zu erzeugen, der in der Lage ist, eine unnatürliche Aminosäure in alle Proteine einzubauen und somit unser Verständnis für Biochemie der Proteine zu verbessern (Bacher und Ellington, 2001).

Auch die Erweiterung der kanonischen Sammlung von Aminosäuren mit Halogen-, Alkenyl-, Alkin-, Keto-, Cyano-, Azido-, Nitroso- oder Silylgruppen (**Abb .1**), um die verfügbare Anzahl an Möglichkeiten zur Gestaltung maßgeschneiderter Proteine zu erhöhen (Wang und Schultz, 2004), ist durch das Umbauen des genetischen Codes möglich. Das Umbauen des genetischen Codes basiert auf der Neuordnung eines Triplets. Auf diese Weise codieren die Codons nicht mehr für die kanonische Aminosäure, wie es in (**Abb. 1**) dargestellt ist, sondern für eine neue oder synthetische nicht-kanonische Aminosäure. Grundsätzlich kann die Bedeutung von Sinn- und Stoppcodons neu zugeordnet werden (Wang et al., 2006).

Bei der Stoppcodon-Suppression wird dem Stoppcodon eine neue Bedeutung zugeordnet. Dabei bewirkt das Stoppcodon nicht mehr den Translationsabbruch durch *Release*-Faktoren, sondern es wird von einer Suppressor-tRNA gelesen, welche mit einer kanonischen oder nicht-kanonischen Aminosäure beladen ist. Hierbei kommt es zum ortsspezifischen Einbau der nicht kanonischen Aminosäure an der Position des Stoppcodons (Wang et al., 2009). Es wurde auch gezeigt (Döring et al., 2001), dass eine, mit Mutationen in der Editier-Funktion den Ersatz von Valin durch Cystein, Threonin oder Aminobutyrat ermöglicht. Außerdem wurde eine Tyrosyl-tRNA-Synthetase-Mutante isoliert, die eine höhere Toleranz gegenüber Azatyrosin als das Wildtyp-Enzym aufwies (Hamano-Takaku et al., 2000).

Die hier vorgelegte Studie hatte zum Ziel, den Einbau von nicht-kanonischen Aminosäuren in das Proteom einer L-Trp-auxotrophen Mutante von *E. coli* zu erreichen. Dazu wurden die Bakterien in kontinuierlicher Kultur im Genemat in einem *konditionalen pulse feed*-Regime kultiviert. In den folgenden Abschnitten wird ausführlich erklärt, warum L-Trp als Ziel für den Austausch gegen die nicht-kanonischen Aminosäuren ausgewählt wurde.

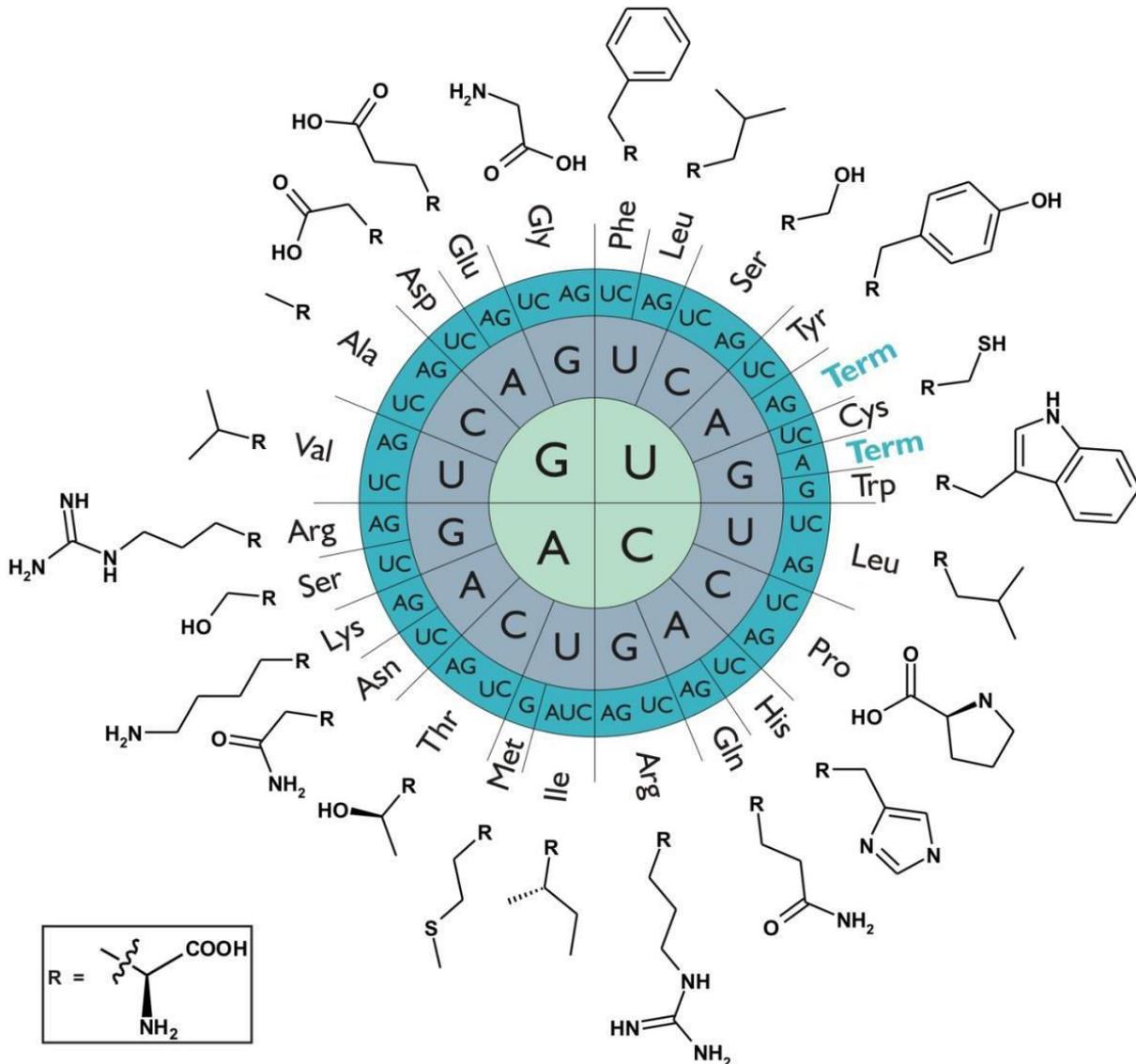


Abb. 1: Darstellung des genetischen Codes (Code-Sonne): In der Abfolge von innen nach außen wird einem Basentriplett der mRNA (gelesen von 5' nach 3') eine der zwanzig kanonischen Aminosäuren zugeordnet oder ein Stoppcodon (Term) markiert (Lepthien, 2008).

1.2 L-Trp als Ziel für Protein-Engineering

L-Trp ist eine proteinogene α -Aminosäure. Gemeinsam mit Phenylalanin und Tyrosin zählt sie zu den aromatischen Aminosäuren. Sie gehört zu den essentiellen Aminosäuren in Säugetieren. Neben der Verwendung als Baustein für Proteine ist L-Trp ein kritischer Nährstoff für die Funktionen von Nerven- und Immunsystemen (Yao et al., 2011). L-Trp stellt mit einem durchschnittlichen Anteil von ca. 1% am gesamten Aminosäurepool die seltenste Aminosäure in Proteinen dar (Budisa et al. 2001).

L-Trp ist ein biosynthetischer Vorläufer für eine Vielzahl komplexer mikrobieller Naturprodukte. Diese reichen von kleinen Molekülen, wie dem antifungalen Pyrrolnitrin, bis zu großen Polypeptiden, wie dem antibakteriellen Cyclomarin. Viele dieser Moleküle sind vielversprechende Gerüste für die Wirkstoffforschung. Die chemischen Eigenschaften von L-Trp, insbesondere die Fähigkeit, enzymatische Modifikationen, wie Halogenierung, Oxidation, Methylierung und Decarboxylierung, an fast jedem Atom seiner Struktur zu erlauben sowie spontane nicht-enzymkatalysierte Reaktionen zu ermöglichen, machen es zu einem einzigartigen biologischen Vorläufer für die Erzeugung von chemischer Komplexität (Alkhalaf und Ryan, 2015).

Unter allen Aminosäuren haben nur L-Trp und Methionin keinen strengen Vorzug für eine Lokalisierung im Protein-Innenraum oder an der Oberfläche (Lepthien, 2008). Im Protein nimmt L-Trp oft an aromatischen Wechselwirkungen über π - π -Wechselwirkung teil (Hoesl, 2015). Wenn L-Trp aber an Oberflächen vorkommt, spielt es in der Regel eine entscheidende Rolle bei der katalytischen Reaktion eines Enzyms oder beteiligt sich an Protein-Protein -Wechselwirkungen.

L-Trp ist eine einzigartige natürliche Aminosäure, die aus verschiedenen Gründen ein sehr attraktives Ziel für ihren Einsatz im Proteinengineering und für Designstudien ist. Sie kommt in Proteinen nicht sehr häufig vor und wird durch nur ein Triplet (UGG) im genetischen Code codiert. Sie besitzt spezielle biophysikalische Eigenschaften, die ihre Teilnahme an zahlreichen Interaktionen in Proteinen erlauben. Sie gilt als die hauptsächliche Quelle der UV-Absorption und Fluoreszenz von Proteinen (Budisa, 2004).

L-Trp ist auch im Metabolismus lebender Zellen außerordentlich wichtig, da es in die Biosynthese von Hormonen wie Serotonin oder Melatonin bei Tieren und Indol-Alkaloiden in Pflanzen involviert ist. Aus diesen Gründen können nichtkanonische Aminosäuren, die L-Trp nachahmen, als potentielle metabolische Antagonisten (Leonard und Tschannen, 1965) oder Ansatz für die Produktion therapeutischer Wirkstoffe sein (Budisa, 2001).

Die mannigfaltige Indolchemie bietet zahlreiche Analoge, wie zum Beispiel 4-Aza-Tryptophan (4-A-Trp), 4-F-Trp und 7-Aza-Tryptophan (7-A-Trp) (**Abb. 2**). Mehrere L-Trp-

Analoge können biosynthetisch eingebaut werden, einschließlich 7-A-Trp, 5-Hydroxy-Tryptophan (5-OH-Trp) und F-Trp (Ross et al., 1997). Die L-Trp-Analoga 7-A-Trp und 5-OH-Trp sind wegen ihres rotverschobenen Absorptionsspektrums von besonderem Interesse. Protein-DNA-Wechselwirkungen wurden nach dem Einbau von 7-A-Trp oder 5-OH-Trp im Protein untersucht (Ross et al., 1997). 4-F-Trp, 5-Fluor-Tryptophan (5-F-Trp) und 6-Fluor-Tryptophan (6-F-Trp) werden seit Jahrzehnten als Sonden in der ¹⁹F Kernmagnetresonanz (NMR) verwendet. 4-F-Trp ist nichtfluoreszierend und kann daher verwendet werden, um fluoreszenzfreie Proteine zu erzeugen, ohne dass die L-Trp Codons auf der genetischen Ebene ersetzt werden müssen. Der Ersatz von L-Trp mit 4-F-Trp bietet daher ein Mittel zur Unterdrückung der L-Trp Fluoreszenz in zellulären Proteinen, so dass allein Tyrosin- und Phenylalanin-Fluoreszenz gesehen werden kann (Bronskill und Wong, 1988).

4-Aza-Indol (4-A-Ind) kann für die Messung des Fluoreszenz-Energie-Resonanztransfers, für intramolekulare Einzelmolekülspektroskopie oder intermolekulare Wechselwirkungen (Rezeptor-Ligand-Bindung) verwendet werden. In diesem L-Trp Isoster ist eine der endocyclischen CH-Gruppen von Indol mit Stickstoff substituiert. Diese Substitution umfasst nicht nur die kleinstmögliche strukturelle Veränderung aller bekannten L-Trp-Analoga, sondern führt auch zu dramatischen Veränderungen in der Photophysik des Aromaten-Systems (Lepthien et al. 2008). Freies 4-A-Ind und 5-Aza-Indol (5-A-Ind) zeigen eine starke rotverschobene Fluoreszenz (400 nm, blaue Fluoreszenz) im Vergleich zu Indol in wässrigen Lösungen (Cash et al., 2005). Deswegen wurden diese Substanzen als gute Kandidaten für die nichtinvasive Gestaltung von Proteinen mit deutlich verbesserten Fluoreszenzeigenschaften identifiziert (Ross et al., 1997; Budisa, 2004).

Versuche, L-Trp durch seine Analogen zu ersetzen, begannen in den 1950er Jahren, als Brawerman und Ycas Experimente über den Einbau von 7-A-Trp und 2-Aza-Tryptophan (2-A-Trp) in das Proteom von *E. coli* berichteten. Unter Verwendung eines L-Trp-auxotrophen *E. coli* Derivats erhielten sie eine Synthese von Protein, das die L-Trp-Analogen anstelle von L-Trp enthielt (Brawerman und Ycas, 1950). Browne und Mitarbeiter haben im Jahr 1970 L-Trp-auxotrophe *E. coli* Derivate unter den Bedingungen der Katabolit-Repression mit F-Trp-Analogen kultiviert und fanden, dass 28% der normalen Menge an β -Galactosidase

in Gegenwart von 4-F-Trp, 5,6% in Gegenwart von 5-F-Trp und 0,7% mit dem 6-F-Trp hergestellt wurden (Browne et al., 1970).

Im Jahr 2008 hat Sandra Lepthien (Lepthien, 2008) durch die Selektionsdruck-Einbaumethode in L-Trp-auxotrophen *E. coli* Zellen den einzigen L-Trp-Rest des humanen Annexins A5 gegen 4-A-Trp und 5-A-Trp ausgetauscht. Damit der Einbau der nicht-kanonischen Aminosäure über die Selektionsdruck-Methode in Proteine stattfindet, müssen eine Reihe von Voraussetzungen erfüllt werden. Erstens müssen die bakteriellen Expressionswirtszellen für die Aminosäure, die ausgetauscht werden sollten, auxotroph sein. Zweitens muss das Gen des Modellproteins in einen hoch induzierbaren Expressionsvektor kloniert werden. Drittens ist für die Fermentation ein Medium mit definierter Aminosäurekonzentration erforderlich. Dies ermöglicht die Kontrolle der Aminosäurezusammensetzung und den Druck auf die Bakterienzelle zu setzen, um die gewünschte nicht-kanonische Aminosäure in Proteine einzubauen.

In dem Experiment von Jamie M. Bacher und Andrew Ellington (Bacher und Ellington, 2001) wurde das 4-F-Trp-zu L-Trp-Verhältnis allmählich geändert, bis nur 4-F-Trp in dem Medium zugesetzt wurde. Nach über 3000 h serieller Verdünnung wurde ein Klon isoliert, der in der Lage war in Medien zu wachsen, die nur 4-F-Trp enthielten.

Michael Hoesl und seine Kollegen (Hoesl et al., 2015) konnten nach Langzeit-Kultivierung in synthetischem Nährmedium die synthetische Aminosäure l-β-(Thieno[3,2-b] pyrrolyl) alanin ([3,2] Tpa) anstelle von L-Trp in die Gesamtheit aller Proteine in *E. coli* einbauen. Im Laufe der Kultivierung wurde der Anteil an L-Trp schrittweise verringert, wobei gleichzeitig der Anteil an [3,2] Tpa erhöht wurde, bis die Zellen letztlich in Gegenwart von [3,2] Tpa wachsen konnten.

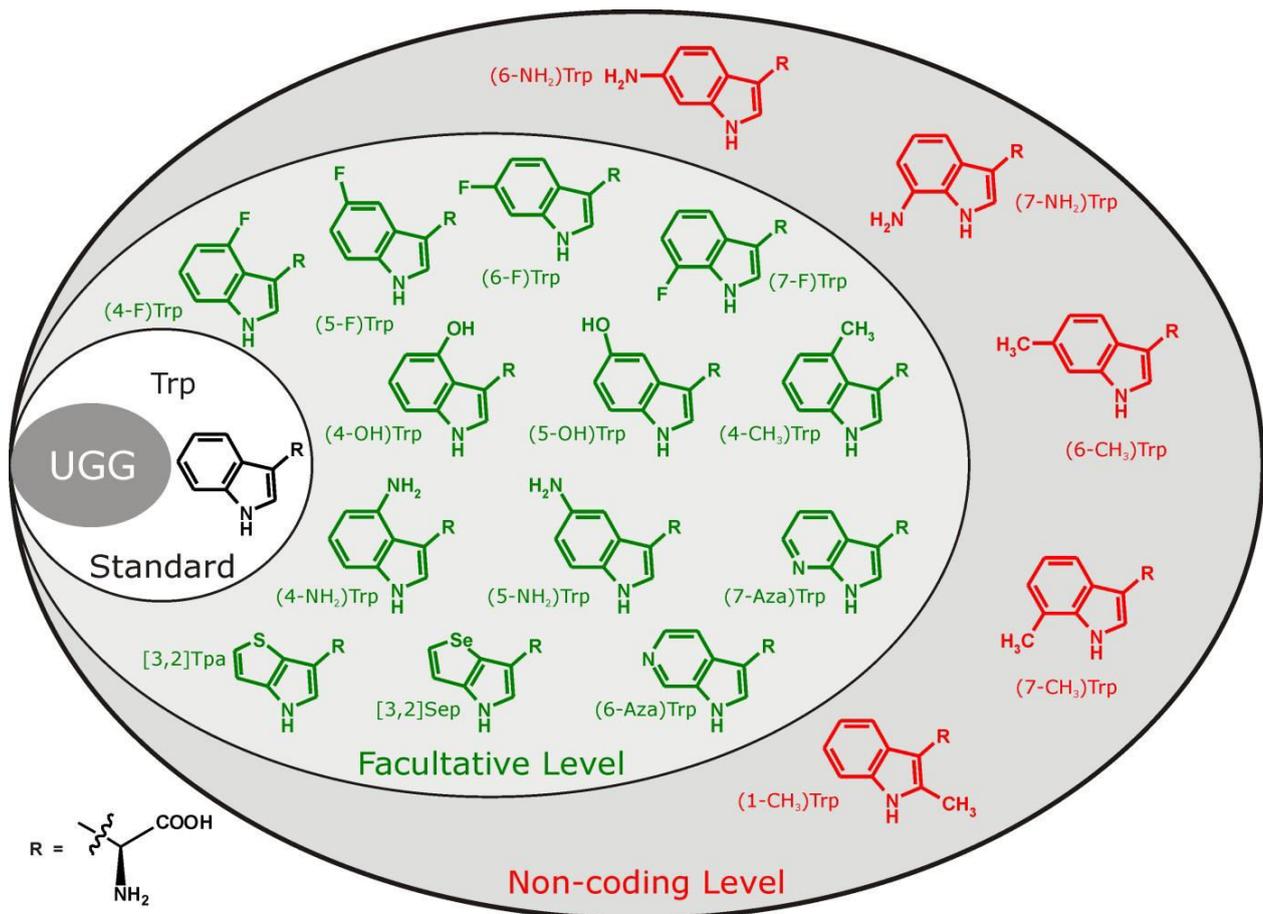


Abb. 2: Chemische Strukturen der kanonischen Aminosäure L-Trp und ihrer Analoga (Lepthien, 2008). Dieses Schema zeigt Beispiele für Trp-Analoga, die bereits erfolgreich in Proteine anstelle von Trp (grün) eingebaut wurden und die Trp-Analoga, die noch nicht in irgendeinem Protein (rot) aufgenommen wurden.

1.3 Die Synthese von L-Trp in *E. coli*

In *E. coli* wird L-Trp aus Chorismat hergestellt. Chorismat ist der wichtigste gemeinsame Vorläufer der aromatischen Aminosäuren L-Trp, Tyrosin und Phenylalanin sowie essentieller Verbindungen, wie der Coenzyme Tetrahydrofolat, Ubichinon-8 und Vitamin Menachinon-8 und des Eisenträgers Enterobactin (Enterochelin). Fünf Gene kodieren fünf Enzyme, die die L-Trp -Biosynthese aus Chorismat katalysieren. Diese fünf Gene (*trpE*, *trpD*, *trpC*, *trpB*, und *trpA*) bilden eine einzige Transkriptionseinheit, das *trp*-Operon (Horowitz und Platt, 1983).

Zwei der Gene im L-Trp-Operon kodieren bifunktionelle Enzyme, die jeweils zwei unabhängige katalytische Domänen enthalten, nämlich *trpC*, das eine Glutamin-Amidotransferase-Untereinheit der Anthranilatsynthase kodiert und *trpF*, das eine Phosphoribosyl-Anthranilat-Isomerase kodiert. Die zwei Gene *trpD* und *trpE* kodieren die Anthranilat-Synthase und die zwei Gene *trpB* und *trpA* kodieren die Tryptophan-Synthase (Yanofsky, 2004).

Die Biosynthese von L-Trp beginnt mit der Umwandlung von Chorismat zu Anthranilat und der anschließenden Bildung von N-5-Phosphoribosylanthranilat unter Verwendung von Phosphoribosylpyrophosphat (Radwanski, 1995). Dann katalysiert TrpC die Isomerisierung und Decarboxylierung von N-5-Phosphoribosylanthranilat zu 3-Indoyl-Glycero-3-phosphat, das durch TrpA unter Abspaltung von D-Glyceraldehyd-3-phosphat in Ind umgewandelt wird. Die L-Trp-Synthase TrpB synthetisiert L-Trp aus Ind und L-Serin.

1.4 *E. coli* und die Biotechnologie

Das einfache Genom der *E. coli*-Bakterien, die hohe Wachstumsrate, die einfache Handhabung im Labor, das vollständig sequenzierte Genom und die Fähigkeit unter aeroben und anaeroben Bedingungen zu wachsen, machen *E. coli* zu einem idealen Organismus in der experimentellen Biologie und Biotechnologie.

Das Genom von *E. coli* besteht aus etwa 4400 Genen, ist vollständig sequenziert und die Funktionen sehr vieler Gene sind gut untersucht (Blattner et al., 1997). Durch das vollständig sequenzierte Genom ist die Anwendung der rekombinanten DNA-Technologie viel einfacher geworden. Ihre Generationszeit, die unter optimalen Bedingungen etwa 20 Minuten beträgt und einfache Laborverfahren zur Kultivierung, sowohl in aerober als auch in anaerober Umgebung, machten *E. coli* bereits früh zu einem vielverwendeten Modell- und Produktionsorganismus auf dem Gebiet der Biotechnologie. Bereits vor der Anwendung der rekombinanten DNA-Technologie gelang die erste industrielle Anwendung von *E. coli* durch die Herstellung der Aminosäure Threonin im Jahr 1961, indem man mit Hilfe von Mutagenen verschiedene Mutanten erzeugte, die die Synthese des Threonins in einer Großproduktion ermöglichten (Shimizu et al., 1995).

1.5 Experimentelle Evolution

Die experimentelle Evolution ist die Verwendung von Experimenten oder kontrollierten Feldmanipulationen, um evolutionäre Dynamik zu erforschen (Kawecki et al., 2012). Die Evolution kann im Labor beobachtet werden, da sich die Populationen an neue Umgebungsbedingungen anpassen und/oder durch stochastische Prozesse, wie zufällige genetische Drift, verändern. Mit modernen molekularen Werkzeugen ist es möglich die Mutationen aufzuzeigen, welche die Anpassungen bewirken, und herauszufinden, wie genau diese Mutationen funktionieren. Evolutionsexperimente werden in der Regel mit Mikroorganismen wie Bakterien, Hefen, Viren oder anderen Organismen mit kurzen Reproduktionszeiten durchgeführt (Buckling et al., 2009; Elena und Lenski, 2003).

Im Jahr 1980 führte Michael R. Rose einen Versuch an *Drosophila melanogaster* durch (Rose, 1984). Der Versuch begann mit zehn Populationen, die im Laufe der Zeit immer weiter kultiviert wurden, wobei die Tiere auf eine verlängerte Lebenszeit selektiert wurden. Seitdem sind mehr als 200 verschiedene Populationen entstanden. Die frühen Experimente an der Taufliege beschränkten sich nur auf das Studium von Phänotypen. Durch die fortgeschrittenen Techniken zur Genomanalyse wurden auch Veränderungen auf molekularbiologischer Ebene studiert.

Eine der interessantesten experimentellen Evolutionsstudien wurde von Gabriel Haddad und seinen Kollegen in San Diego durchgeführt. Haddad und seine Kollegen entwickelten Fliegen, die an niedrige Sauerstoffkonzentrationen angepasst waren. Mittels Genomsequenzierung konnten Haddad und seine Kollegen für nach 200 Generationen die genomischen Regionen identifizieren, die für die Anpassung an niedrige Sauerstoffkonzentrationen verantwortlich sind (Zhou et al., 2007).

Eines der bekanntesten Beispiele der experimentellen Evolution ist das Langzeit-Experiment von Richard Lenski. Im Jahr 1988 begann Lenski sein Experiment mit zwölf Linien von *E. coli*, die unter identischen Wachstumsbedingungen kultiviert wurden. Das Experiment läuft bis heute und gilt als das am längsten laufende (generationsabhängig) kontrollierte Evolutionsexperiment (Fox und Lenski, 2015; Blount et al., 2008).

Ein anderes interessantes und folgenreiches Experiment wurde im Jahr 2011 von der Gruppe um Rupert Mutzel und Philippe Marlière publiziert. In einer kontinuierlicheren Kultur im Genemat (siehe unten, Kapitel 1.7) in einem konditionalen Pulse-Feed-Regime wurde Thymin in der DNA von *E. coli* gegen das Analog 5-Chloruracil ausgetauscht, um einen chemisch modifizierten Organismus zu erzeugen, dessen Genom aus Adenin, Cytosin, Guanin und einer künstlichen Base besteht (Marlière et al., 2011).

1.6 Experimentelle Evolution und kontinuierliche Kultur

Die kontinuierliche Kultivierung beschreibt das ständige Erneuern einer flüssigen Kultur durch konstanten Nährstoffeintrag, so dass die Organismen der Verdünnung durch mindestens gleiches Wachstum entgegenwirken müssen. Vor mehr als 65 Jahren beschrieben Monod (Monod, 1950) sowie Novick und Szilard (Novick und Szilard, 1950) unabhängig voneinander die Technik der kontinuierlichen Kultur von lebenden Organismen in Suspension. Im Chemostat wird ein Kulturgefäß konstanten Volumens mit konstanter Rate mit frischem Nährmedium beschickt und mit gleicher Rate Organismensuspension entfernt. Damit die Population nicht ausgewaschen wird, muss sie mit einer Rate wachsen, die wenigstens der Verdünnungsrate entspricht. Nach einer physiologischen Adaptationsphase stellt sich ein Gleichgewicht ein, bestimmt durch die Verfügbarkeit eines limitierenden Wachstumsfaktors oder die Akkumulation eines wachstumshemmenden Faktors. Auxostaten koppeln die Verdünnungsrate an einen Parameter der Zellsuspension, z. B. die Zelldichte (Bryson und Szybalski, 1952). Hier ist die Verdünnungsrate unter experimentell vorgewählten optimalen Wachstumsbedingungen abhängig von der Wachstumsrate der Organismen.

Historisch gesehen wurde die kontinuierliche Kultur zunächst mit großem Interesse wahrgenommen. Sie ist seit langem ein wertvolles Instrument für verschiedenste physiologische Untersuchungen. Trotz ihrer soliden theoretischen Grundlagen (Kubitschek, 1970) wurde die Technologie schrittweise als Werkzeug in der experimentellen Evolution aufgegeben. Das liegt daran, dass die herkömmliche kontinuierliche Kultur einen großen

Nachteil aufweist, nämlich eine schnelle positive Selektionierung von residenten, adaptiv statischen, biofilmbildenden Varianten.

Dies stellt das Hauptproblem bei Langzeitexperimenten zur experimentellen Evolution von Organismen in kontinuierlicher Suspensionskultur dar (Novick, 1955; Chao und Ramsdell, 1985). Die Vermeidung ihrer Bildung war Gegenstand teils origineller technischer Lösungsansätze bis hin zu „Scheibenwischern“, um adhäsive Zellen mechanisch von den inneren Oberflächen der Kulturapparatur zu entfernen (Anderson, 1953) Keiner dieser Ansätze löste das Problem, sodass als frustrierende Erkenntnis blieb: Die kontinuierliche Kultivierung von lebenden Organismen in konventionellen Kulturapparaturen führt zur raschen Selektion adhäsiver, verdünnungsresistenter Varianten, die sich nicht mit "freischwimmenden" Varianten messen müssen und so dem gewählten Selektionsdruck entkommen. Am deutlichsten kann das im Turbidostat-Regime demonstriert werden, bei dem der Bewuchs von Oberflächen zwischen Sender und Empfänger eines optischen Messsignals zu einer positiven Rückkopplung führt, so dass suspendierte Organismen ausgewaschen werden und Biofilmbildner im Kulturgefäß verbleiben. Dieses Problem kann man mit der Technik der seriellen Kultur überwinden; sie hat aber große Nachteile, nämlich den hohen Arbeitsaufwand und die Kontaminationsgefahr beim Überimpfen. Die technologische Lösung für diese Nachteile ist eine automatisierte Fluidtechnik (Genemat) (Mutzel und Marlière, 2010).

In dieser Studie wurde ein Langzeitexperiment für die gerichtete Evolution mit der L-Trp-auxotrophen Mutante (*G2748ΔtrpEDLC/ΔtnaA*) des *E. coli* Prototyps MG1655 in der GM3 Kulturmaschine (Genemat) durchgeführt. Der Genemat (**Abb. 3a und 3b**) ist eine Apparatur, in der automatisiert große Populationen von Organismen über lange Zeiträume unter gezieltem Selektionsdruck gezüchtet werden können. Dabei wird eine Population von Zellen in Suspension unter permanenter Proliferation gehalten und die adhären, adaptiv statischen Zellen in jedem Teil der Apparatur regelmäßig zerstört. Der Genemat wurde mit zwei Medien verbunden, einem "Relax-Medium", das die kanonischen Nährstoffe enthält und einem "Stress-Medium", das die nichtkanonischen Nährstoffe enthält. Flüssigkeitspulse von definiertem Volumen wurden in regelmäßigen Zeitabständen von diesen Medien zur Kultur je nach Anpassung der Zellen gesendet. Die Kultur erhält periodisch einen Puls von

definiertem Volumen entweder des Relax-Mediums, wenn die Populationsdichte unterhalb einer festgelegten Schwelle fällt oder von Stress-Medium, wenn die Dichte höher als oder gleich dem Schwellenwert ist.

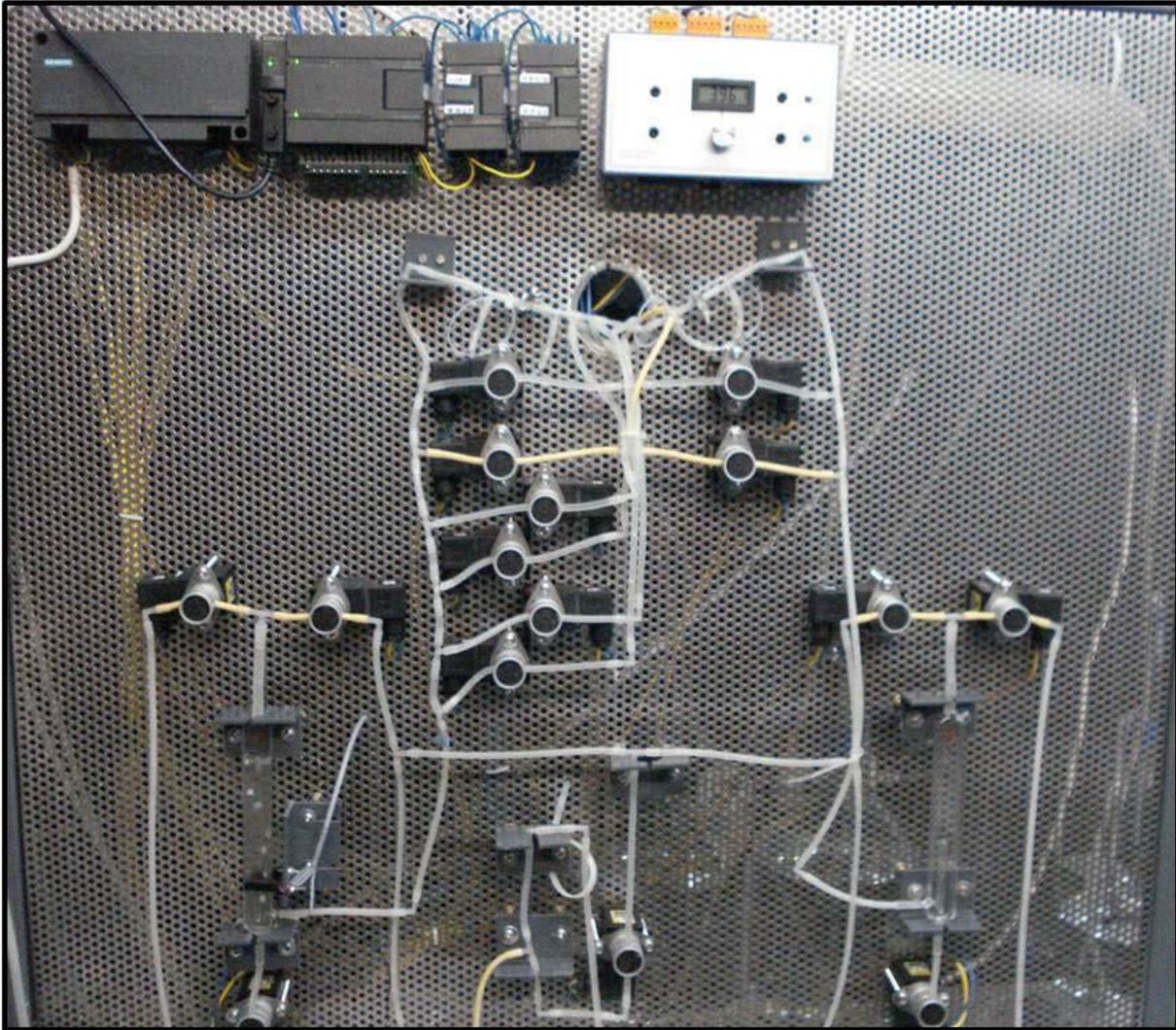


Abb. 3a: Der Aufbau eines Genematen. Der Aufbau eines Genematen. Die Zellen proliferieren kontinuierlich unter Zugabe von einem permissiven (Relax-Medium), das die kanonische Nährstoffe enthält und von Stress-Medium, das die nichtkanonischen Nährstoffe enthält. Flüssigkeitsimpulse von definiertem Volumen wurden in regelmäßigen Zeitabständen von diesen Medien zur Kultur je nach Anpassung der Zellen gesendet.

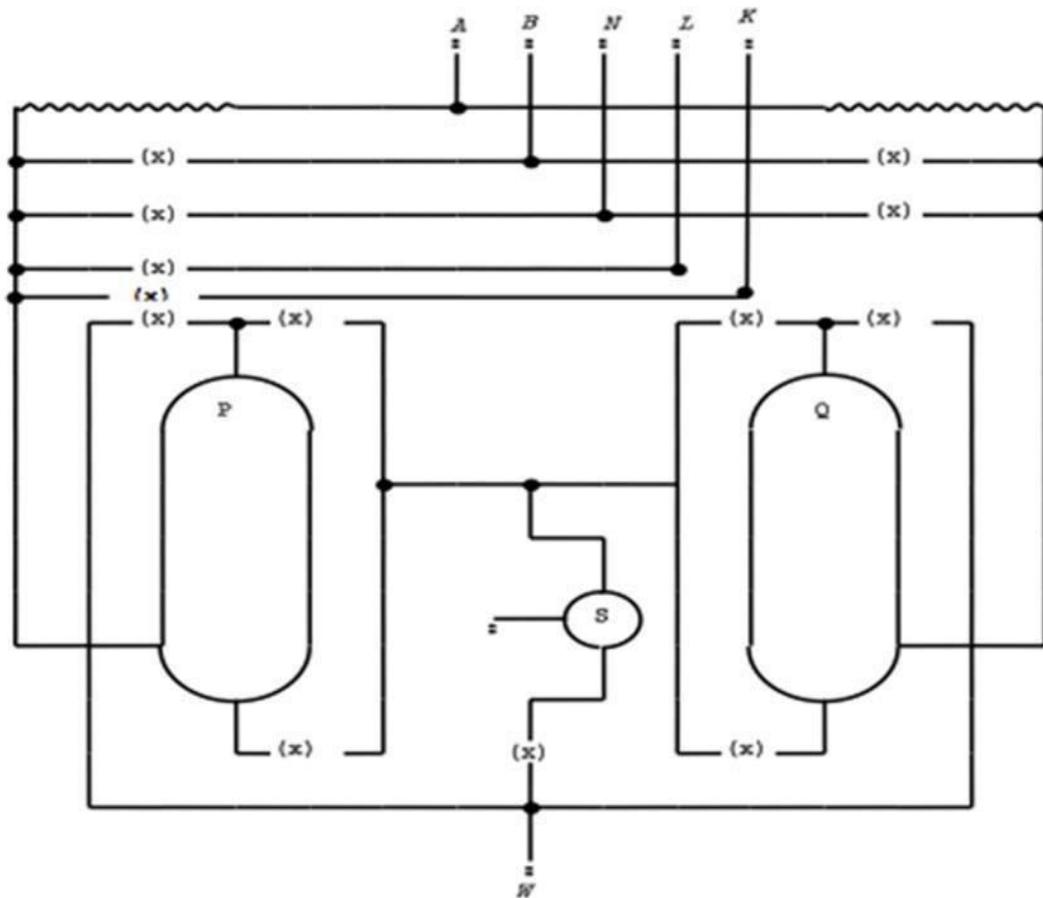


Abb. 3b: Schematische Darstellung des Genemat. Leitungen sind mit durchgezogenen Linien angedeutet; P, Q, Reaktoren; S, Port zur Inokulation und Probennahme; (X) Magnetventile; A, Gasversorgung; B, Pufferversorgung; N, Sterilisationsmittel; L, permissives Medium; K, nichtpermissives Medium; W, Abfall (Khlaf, 2011).

Zusätzlich zu ihrem Potenzial für die gerichtete Evolution von Zelllinien eröffnet diese Technologie Möglichkeiten für eine vollständige mathematische Analyse und Modellierung evolutionärer Prozesse und der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen, da die Eigenschaften der sich entwickelnden Populationen leicht aus ihrem Wachstumsverhalten heraus extrahiert werden können.

2. Zielsetzung

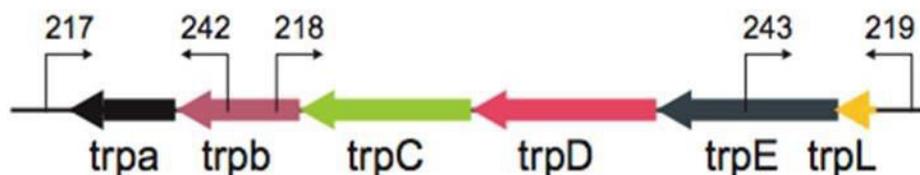
Ziel dieser Arbeit war es, im Proteom einer L-Trp-auxotrophen Mutante (G2748, $\Delta trpEDLC/\Delta tnaA$) des *E. coli* Prototyps MG1655 einen Austausch der kanonischen Aminosäure L-Trp gegen die Analoge 4-A-Trp und 4-F-Trp zu erzwingen. Dabei sollte in kontinuierlicher Kultur im Genemat in einem *konditionalen pulse feed*-Regime die L-Trp-auxotrophe Mutante in Anwesenheit der Analog-Vorstufen 4-A-Ind und 4-F-Ind kultiviert werden. Ungefähr alle 168 Generationen (einmal pro Woche) wurde jeweils eine Probe aus dem 4-A-Ind Genemat und aus dem 4-F-Ind Genemat entnommen. Wachstumsausbeuten wurden analysiert, physiologische Parameter der evolvierenden Populationen bestimmt und Genomsequenzierungen ausgewählter Evolvate durchgeführt.

3. Materialien und Methoden

3.1 Versuchsorganismus

Für die Experimente wurde die L-Trp-auxotrophe Mutante (G2748 $\Delta trpEDLC/\Delta tnaA$) des *E. coli* K12-Prototyps MG1655 verwendet.

Mg1655



G2748

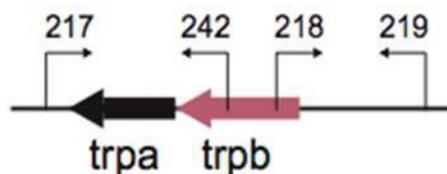


Abb. 4: Schematische Darstellung des L-Trp-Operons und des Tryptophanase-Gens im *E. coli* Wildtyp-Stamm MG1655 und seinem Derivat G2748 ($\Delta trpD$; $\Delta trpL$; $\Delta trpC$; $\Delta trpE$). Die $\Delta tnaA$ -Mutation ist nicht gezeigt (AG Budisa, Institut für Chemie, Technische Universität Berlin).

Evolverte Derivate von G2748

In der gewählten Nomenklatur stehen A bzw. F für die Selektion (4-Aza-Indol oder 4-Fluor-Indol) und die Zahl für die Anzahl der Generationen in 1000 (K).

- A2K Klon nach 2000 Generationen unter 4-A-Ind-Selektion.
- A5K Klon nach 5000 Generationen unter 4-A-Ind-Selektion.
- A14K Klon nach 14000 Generationen unter 4-A-Ind-Selektion.
- A18K Klon nach 18000 Generationen unter 4-A-Ind-Selektion.
- F2K Klon nach 2000 Generationen unter 4-F-Ind-Selektion.
- F9,5K Klon nach 9500 Generationen unter 4-F-Ind-Selektion.
- F16K Klon nach 16000 Generationen unter 4-F-Ind-Selektion.
- F18K Klon nach 18000 Generationen unter 4-F-Ind-Selektion.
- F18,5K Klon nach 18500 Generationen unter 4-F-Ind-Selektion.

3.2 Plasmide

3.2.1 pKD46

Das 6329 Basenpaare (bp) große Helferplasmid pKD46 enthält die ursprünglich aus dem Bakteriophagen λ stammenden Gene γ , β und *exo*, welche für die Red Rekombinationsproteine Gam, Bet und eine Exonuklease codieren (Murphy, 1998). Es besitzt außerdem das für β -Lactamase codierende Gen *bla*, welches dem Trägerorganismus eine Ampicillinresistenz verleiht (Doublet et al., 2008). Als temperatursensitives Plasmid wird es (bei Wachstum) in nicht-selektivem Medium bei 37-42 °C aus dem Organismus entfernt. Die verwendete Plasmid-Lösung wurde von der AG Mutzel bereitgestellt und wies eine Konzentration von 105 ng/ μ l auf.

3.2.2 pKD4

Das synthetisch hergestellte Plasmid pKD4 (3267 bp) dient als Matrize für Knockout (KO)-Kassetten und trägt das Ampicillinresistenz (AmpR)-verleihende Gen *bla* und das für eine Neomycin Phosphotransferase codierende Kanamycinresistenz (KanR)-Gen *neoR* (Datsenko und Wanner, 2000).

3.2.3 pCP20

Das Plasmid pCP20 (9400 bp) enthält das Gen *flp*, welches für die Flippase codiert. Bei diesem Enzym handelt es sich um eine Rekombinase, die ein DNA Fragment, welches von zwei FRT-Sequenzen begrenzt ist, aus dessen ursprünglichem Locus gezielt entfernen kann. Das Plasmid pCP20 verleiht Ampicillin- und Chloramphenicolresistenz und wird bei 43 °C auf nicht-selektivem Medium aus dem Trägerorganismus entfernt (Cherepanov und Wackernagel, 1995).

3.3.4 pQE-80L-EGFP-H6 (wurde von AG Budisa hergestellt)

PQE-Plasmide gehören zur pDS-Familie von Plasmiden und wurden von den Plasmiden pDS56/RBSII und PDS781/RBSII-DHFERS abgeleitet. Das grün fluoreszierende Protein (GFP; *green fluorescent protein*) ist ein erstmals 1962 von Osamu Shimomura (Shimomura et al. 1962; Shimomura, 2005) beschriebenes Protein aus der Qualle *Aequorea victoria*, das bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün fluoresziert. Es besteht aus 238 Aminosäuren, hat eine Molekülmasse von 26,9 kDa und enthält einen einzigen L-Trp Rest, so dass der Einbau von L-Tryptophan Analogen schnell getestet werden kann.

3.3 Primer

Zur Ermittlung der Primersequenzen wurden DNA-Matrizen von *E. coli* und dem Plasmid pKD4 aus der NCBI-Datenbank und das Programm ApE – A plasmid Editor v2.0.47 (Davis, 2009) genutzt. Die Primer wurden von den Firmen Biomers.net und TibMolBiol gekauft.

Tabelle 1: Primersequenz-Beschreibung

Primernamen und Beschreibung	Sequenz
217 Δtrp fwd	5'-CTCCCGTTGCGTTGCATTG-3'
242 Δtrp rev	5'-GGTCGCGGCGATAAAGACA-3'
218 Δtrp fwd	5'-CGCCGTGCAGCAAATCTTC-3'
219 Δtrp rev	5'-AGCTGTGGTGTTCATGGTTCG-3'
oFUM 504: rev für die Kontrolle der Knockouts bei <i>E. coli</i> ; bindet in der KO-Kassette.	5'-TTCCGAAGCCCAACCTTTCATAG-3'
oFUM531: fwd für die Kontrolle des Knockouts von <i>tnaB</i> in <i>E. coli</i> .	5'- GTGGCTATAAGGATGTTAGCCAC-3'
oFUM532: fwd für die Kontrolle des Knockouts von <i>aroP</i> in <i>E. coli</i> .	5'- CGGAATTGCAAACCTTACACACG-3'
oFUM501: fwd zur Herstellung der <i>tnaB</i> -KO-Kassette	ATGACTGATCAAGCTGAAAAAAGCACTCTGC ATTTTGGGGTGTATGGTgtgtaggctggagctgcttc
oFUM502: rev zur Herstellung der <i>tnaB</i> -KO-Kassette	TTAGCCAAATTTAGGTAACACGTTAAAGACGTTG CCGAACCAGCACAAAAatgggaattagccatggtcc
oFUM527: rev zur Herstellung der <i>mtr</i> -KO-Kassette	ATGGCAACACTAACCACCACCCAAACGTCACCGTCGC TGCTTGGCGGCGTgtgtaggctggagctgcttc

oFUM528: fwd zur Herstellung der <i>mtr</i> -KO-Kassette	TTACTGATACACCGGCAGTAAATTAAGCTCGATAAAAATA TGCACCAGTG atggaattagccatggtcc
oFUM529: rev zur Herstellung der <i>aroP</i> -KO-Kassette	ATGATGGAAGGTCAACAGCACGGCGAGCAGCTAA AGCGCGGCCTTAAAAAgtgtaggctggagctgcttc
oFUM530: fwd zur Herstellung der <i>aroP</i> -KO-Kassette	TTAATGCGCTTTTACGGCTTTGGCGGTTTTCTCTTT AAACAGATAGCCGAatggaattagccatggtcc

3.4 Geräte

Tabelle 2: Geräteliste

Geräte	Hersteller
Inkubator	Memmert GmbH
Mikrowave 800W	Severin Elektrogeräte GmbH
Wasserbad	Lauda GmbH
Schüttler	
Elektrophorese Kammer mini Sub Cell GT System	Bio-Rad
Power PAC 200	Bio-Rad
100 Thermal Cycler	Biometra
Zentrifuge 5415D	Eppendorf
Thremostat Plus	Eppendorf
Elektroporation System	Bio-Rad
Feinwaage	Sartorius
Allegra X-30R Zentrifuge	Beckman Coulter
Spectralphotometer	GeneQu
Sterilbank	Heraeus
UV-Tisch	Ray Test Isotopen Messgeräte GmbH
Genemat	Eigenbau, AG Mutzel

3.5 Chemikalien

Tabelle 3: Chemikalienliste

Chemikalien	Formel	Hersteller
4-F-Ind	C_8H_6FN	Sigma-Aldrich
4-A-Ind	$C_7H_6N_2$	Biosynth
Acrylamid 30		Roth
Agar-Agar		Roth
Ammoniumchlorid	NH_4Cl	Merck
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	$H_8N_2O_8S_2$	Roth
β -Mercaptoethanol	C_2H_6OS	Roth
Chloroform	$CHCl_3$	Roth
Citronensäure-Monohydrat	$C_6H_6O_7 \times H_2O$	Roth
Dikaliumhydrogenphosphat	K_2HPO_4	VWR International
Essigsäure	$C_2H_4O_2$	Roth
Ethanol	C_2H_6O	Roth
Ethidiumbromid	$C_{21}H_{20}BrN_3$	Roth
Etylendiamintetraessigsäure (EDTA)	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	AppliChem
D-Glucose	$C_6H_{12}O_6$	Roth
Hefeextrakt		Roth
Imidazol	$C_3H_4N_2$	Roth
Kaliumacetat	CH_3CO_2K	Merck
L-Tryptophan	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	Sigma
Magnesiumsulfat- Heptahydrat	$MgSO_4 \times 7 H_2O$	Merck
Methanol	CH_4O	Roth
Natriumhydroxid	$NaOH$	Roth
Natriumchlorid	$NaCl$	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	$C_{12}H_{25}NaO_4S$	Roth

Tetramethylethyldiamin (TEMED)	$C_6H_{16}N_2$	Roth
Tris(hydroxymethyl)- aminomethan (TRIS)	$C_4H_{11}NO_3$	Merck
Trypton		Serva
D-Trp	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	Sigma
[3,2] Tpa	$C_{10}H_{10}SN_2O_2$	

3.5.1 Puffer

Tabelle 4: 50 x TAE Puffer

Komponenten	Menge
Tris-HCl	242 g/l
Eisessig	57,1 ml
0,5 M EDTA, pH 8,0	100 ml
ddH ₂ O	ad. 1 l

Tabelle 5: Kalium-Phosphat Puffer

Komponenten	Menge
KH ₂ PO ₄	34.03 g/l
ddH ₂ O	5 l

Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 50 mM Dikaliumhydrogenphosphat auf 5 eingestellt, dann wurde der Puffer bei 120 °C sterilisiert.

Tabelle 6: 10 x Laufpuffer für SDS-Page (pH 8,7)

Komponenten	Menge
Tris-HCl	303 g
SDS	10 g
Glycin	144,1 g/l
ddH ₂ O	ad. 1

Tabelle 7: Zell-Aufschlusspuffer (pH 8)

Komponenten	Menge
Tris-HCl	20 mM
EDTA	0,5 mM
ddH ₂ O	ad. 1 l

Tabelle 8: 4 x Sammelgelpuffer (pH 6,8)

Komponenten	Menge
Tris-HCl	182 g/l
SDS	4 g
ddH ₂ O	1 l

Tabelle 9: 4 x Trenngelpuffer (pH 8,8)

Komponenten	Menge
Tris-HCl	61 g/l
SDS	4 g/l
ddH ₂ O	1 l

3.5.2 Medien

Tabelle 10: Nicht-permissives Medium (Stress-Medium)

Komponenten	Menge
$C_6H_6O_7 \times H_2O$	20 mM
$MgSO_4 \times 7 H_2O$	1 mM
NH_4CL	20 mM
K_2HPO_4	50 mM
$C_6H_{12}O_6$	11 mM
1000 x NTA-Mix	5 ml
C_8H_6FN oder $C_7H_6N_2$	30 μM
ddH ₂ O	5 l

Tabelle 11: Permissives Medium (Relax-Medium)

Komponenten	Menge
$C_6H_6O_7 \times H_2O$	20 mM
$MgSO_4 \times 7 H_2O$	1 mM
NH_4CL	20 mM
K_2HPO_4	50 mM
$C_6H_{12}O_6$	11 mM
1000 x NTA-Mix	5 ml
$C_{11}H_{12}N_2O_2$	30 μM
C_8H_6FN oder $C_7H_6N_2$	30 μM
ddH ₂ O	5 l

Tabelle 12: LB-Medium

Komponenten	Menge
Bacto-Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	5 g/l
ddH ₂ O	1l

Tabelle 13: LB-Platten

Komponenten	Menge
Bacto-Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	5 g/l
Agar-Agar	20 g
ddH ₂ O	1l

Tabelle 14: LB-Platten mit Antibiotika

Komponenten	Menge
Bacto-Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	5 g/l
Agar-Agar	20 g
ddH ₂ O	1l

Antibiotika (Amp 100µg/ml, Kan 50µg/ml) wurden jeweils nach dem Autoklavieren dazugegeben.

Tabelle 15: LBoN- Medium

Komponenten	Menge
Bacto-Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
ddH ₂ O	1l

Tabelle 16: 1000 x NTA-MiX

Komponenten	Menge
C ₆ H ₉ NO ₆	10 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	3 mM
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	3 mM
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	1mM
ZnCl ₂	0,3 mM
H ₃ BO ₃	0,3 mM
CrCl ₃ x 6 H ₂ O	0,3 mM
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,3 mM
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	0,3 mM
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,3 mM
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,3 mM
Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O	0,3 mM

3.5.3 Gele

Tabelle 17: 1% Agarosegel

Komponenten	Menge
Agarose	10 g/l
TAE-Puffer (50fach)	20 ml
ddH ₂ O	ad. 1 l

Tabelle 18:15 % SDS-PAGE Trenngel

Komponenten	Volumen
Trenngelpuffer	9,3 ml
Acrylamid	18,6 ml
ddH ₂ O	9,0123 ml
TEMED	0,028 ml
APS	0,28 ml
Endvolumen	37,5 ml

Tabelle 19:15 % Chloroform SDS-PAGE Trenngel

Komponenten	Volumen
CHCL ₃	0,1875 ml
Trenngelpuffer	9,3 ml
Acrylamid	18,6 ml
ddH ₂ O	9,0123 ml
TEMED	0,028 ml
APS	0,28 ml
Endvolumen	37,5 ml

Tabelle 20: SDS-Page Sammelgel

Komponenten	Volumen
Sammelgelpuffer	2,5 ml
Acrylamid	1 ml
ddH ₂ O	6,4 ml
TEMED	0,01 ml
APS	0,06 ml
Endvolumen	9,97 ml

3.5.4 Färbe- und Entfärbelösungen

Tabelle 21: Coomassie-Färbelösung

Komponenten	Menge
Coomassie (Brilliant) Blau	2,5 g/l
CH ₃ OH	450 ml
CH ₃ COOH (100%)	100 ml
ddH ₂ O	ad. 1 l

Tabelle 22: Coomassie-Entfärbelösung

Komponenten	Menge
CH ₃ COOH	100 ml
CH ₃ OH	75 ml
ddH ₂ O	ad. 1 l

Tabelle 23: Bradford-Färbemittel 5X

Komponenten	Menge
Coomassie Brilliant Blau	0,05 %
CH ₃ OH	25 %
CH ₃ COOH (100%)	42,5 %

Tabelle 24: Chloroform-Färbelösung

Komponenten	Menge
CH ₃ OH	45 %
CHCl ₃	10 %
ddH ₂ O	45 %

Tabelle 25: 5 x Gel Sample Buffer (GSB)

Komponenten	Menge
SDS	10 % w/v
Beta-Mercaptoethanol	10 mM
Glycerol	20 % (v/v)
Tris-HCl, pH 6,8	0,2 M
Bromphenolblau	0,05 % (w/v)

3.5.5 Sonstige Lösungen

Präparation von Plasmid-DNA (Minipräparation)

Tabelle 26: Lösung I

Komponenten	Konzentration
DNase-freie RNase A	100µg/ml
EDTA	10 mM
Tris	50 mM

Tabelle 27: Lösung II

Komponenten	Konzentration
NaOH	200 μ M
SDS	1 % (w/v)

Tabelle 28: Lösung III

Komponenten	Konzentration
CH ₃ CO ₂ K	3,2 M

3.5.6 Proteinreinigung des 6xHis getaggtten GFP

Tabelle 29: Lysepuffer

Komponenten	Konzentration
NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	10 mM

Tabelle 30: Waschpuffer

Komponenten	Konzentration
NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	20 mM

Tabelle 31: Elutionspuffer

Komponenten	Konzentration
NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	250 mM

4. Methoden

4.1 Der Genemat und die kontinuierliche Kultur

Der Stamm G2748 (Input-Stamm) wurde im Genematen bei 30 °C kultiviert. Der Genemat besteht aus zwei Reaktoren. Die Kultur befand sich im Reaktor 1 (Hauptreaktor), vermehrte sich unter Zufuhr von permissivem Nährmedium und steriler Luft bis die Zelldichte einen festgelegten Schwellenwert erreicht hatte. Beim Erreichen einer Zelldichte von ca. 4×10^8 Individuen pro ml wurde die Zufuhr von Pulsen von nicht-permissivem Nährmedium zugelassen, bis das Zelldichtesignal unter die Schwelle gesunken war. Dann wurden die Zellen wieder mit permissivem Medium versorgt bis der festgelegte Schwellenwert wieder erreicht wurde, um wiederum die Zufuhr von nicht-permissivem Nährmedium zuzulassen. Um die Bildung von Biofilmen zu vermeiden, wurde die Kultur alle 12 Stunden in Reaktor 2 überführt und der Hauptreaktor und alle anderen inneren Oberflächen des Genematen, die mit lebenden Zellen in Kontakt waren, wurden mit einem Überschuss an konzentrierter (5M) NaOH sterilisiert. Nach der Entfernung von NaOH wurden alle Oberflächen, die mit NaOH im Kontakt waren, durch Spülen mit einem Überschuss von 50mM K-Phosphatpuffer (pH 5,0) neutralisiert. Nach Entfernung der Pufferlösung konnte die Kultur wieder in den nun sterilen Hauptreaktor überführt werden und Reaktor 2 wurde entsprechend sterilisiert.

Das Experiment wurde in zwei Genematen durchgeführt. Ein Genemat enthielt das nicht-permissive Nährmedium mit 30µM 4-A-Ind und das permissive Nährmedium mit 30µM 4-A-Ind und 30µM L-Trp für ungefähr 4800 Generationen. Ab 4800 Generationen wurden die Konzentrationen von 4-A-Ind im permissiven und nicht-permissiven Nährmedium

verdoppelt. Ab 16000 Generationen wurden die Konzentrationen von 4-A-Ind im nicht-permissiven und im permissiven Nährmedium auf 300µM erhöht.

Der zweite Genemat enthielt permissives Nährmedium mit 30µM 4-F-Ind und 30µM L-Trp und nicht-permissives Nährmedium mit 30µM 4-F-Ind- für ungefähr 16000 Generationen. Ab 16000 Generationen enthielten das permissive Nährmedium und das nicht-permissive Nährmedium jeweils 300µM 4-F-Ind. Ab 18000 Generationen wurde für ungefähr 500 Generationen L-Trp im permissiven Nährmedium durch 30µM D-Trp ersetzt. Die Genematen wurden beide mit dem Input-Stamm G2748 ($\Delta tnaA$; $\Delta trpD$; $\Delta trpL$; $\Delta trpC$; Δtrp) beimpft. Der Stamm G2748 ist von dem *E. coli* MG1655 Wildtyp-Stamm abgeleitet und auxotroph für L-Trp. G2748 kann nur wachsen, wenn L-Trp oder Ind zu dem Medium zugegeben wird.

4.2 Die Beimpfung des Genematen

Der Genemat wurde mit dem Ausgangsstamm G2748 angeimpft. Dafür wurde 1ml des Ausgangstamms, der in 10% (v/v) DMSO bei -70°C eingefroren war, bei Raumtemperatur aufgetaut, in 30 ml permissives Nährmedium in einem Erlenmeyerkolben überführt und über Nacht bei 30°C auf einem Rotationsschüttler bei 250 U/min inkubiert. Die gewachsene Kultur wurde komplett über den Maschinenprobenanschluss mit einer sterilen 50 ml Kunststoffspritze angeimpft.

4.3 Konservierung von Bakterienstämmen

Für die Konservierung von Bakterienstämmen wurden wöchentlich Proben aus dem Automaten entnommen, 900 µl Bakterienkultur wurden mit 100 µl DMSO gemischt und die Proben wurden bei -70°C eingefroren.

4.4 Überprüfung der genetischen Identität von Bakterienstämmen durch PCR

Die genetische Identität der Stämme wurde alle 168 Generationen durch PCR überprüft. Das Primer-Paar oFum 218 und oFum 219 wurde eingesetzt, um die Mutation (*ΔtnaA ΔtrpD ΔtrpL ΔtrpC*) zu bestimmen und um den Stamm G2748 zu identifizieren. Das Primer-Paar oFum 217 und oFum 242 wurde eingesetzt, um den Wildtyp MG1655 zu identifizieren. Das amplifizierte DNA-Fragment hat beim Wildtyp MG1655 eine Größe von ca. 1200 bp und beim Stamm G2748 eine Größe von ca. 680 bp. Für die PCR wurde eine Kolonie in 30 µl nukleasefreiem H₂O für 10 Minuten gekocht und 1 µl des Überstandes wurde in der PCR eingesetzt.

4.4.1 PCR Ansatz

Tabelle 32: PCR Ansatz

Reaktionskomponenten	Volumen in µl
PCR-Master Mix (2x)	10
Primer	0,5 (10µM)
DNA Template	1
MQ-H ₂ O	8
Gesamtvolumen	20

4.4.2 PCR- Programm

Tabelle 33: PCR- Programm

Schritt	Temperatur	Zeit in min	Anzahl der Zyklen
Erste Denaturierung	95°C	3:00	1
Denaturierung	94°C	0:30	30
Annealing	55°C	0:30	
Elongation	72°C	1:30	
Letzter Elongationsschritt	72°C	10:00	1
Kühlung	4°C	∞	

Nach Abschluss der Reaktion wurden pro Reaktionsansatz jeweils 8 µl entnommen und elektrophoretisch untersucht.

4.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Proben wurden mit 2 µl Probenpuffer versetzt und auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Die DNA wurde für 30 min bei 100 V aufgetrennt. Nach dem Lauf wurde das Gel in einer 0,003% Ethidiumbromid-Lösung für ca. 30 min angefärbt und anschließend unter UV-Licht betrachtet.

4.6 Endpunkt-Wachstumsanalysen

Um die Wachstumsausbeute (optische Dichte bei 600 nm) von G2748 (Input-Stamm), den Aza-Evolvaten (output-Stamm) und den F-Evolvaten (output-Stamm) zu testen, wurde alle 168 Generationen (einmal pro Woche) jeweils eine Probe aus dem 4-A-Ind Genemat und aus dem 4-F-Ind Genemat entnommen, auf einer LB-Agar-Platte ausplattiert und über Nacht bei 30°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde je eine Einzelkolonie mit einer sterilen Impföse entnommen und in 5 ml MS-Glc Medium mit 30 µM L-Trp bzw. LB-Medium über Nacht bei 30°C auf einem Reagenzglasroller inkubiert. 100µl der Übernacht-Kulturen wurden in 5 ml MS-Glc Medium mit verschiedenen Konzentrationen von L-Trp, D-Trp, 4-A-Ind, 4-F-Ind und [3,2] Tpa in MS-Glc Medium und in LB-Medium über drei Passagen jeweils für 48 h bei 30°C gezüchtet und bei OD₆₀₀ vermessen. Die Auswertung wurde mit Microsoft-Excel 2010 durchgeführt.

4.7 Erstellen einer Wachstumskurve

Einzelkolonien von G2748 und den Evolvaten wurden jeweils in 5 ml MS-Glc Medium mit 30 µM L-Trp in LB-Medium inokuliert und bei 30°C über Nacht inkubiert. Die Vorkulturen wurden in je 25 ml Hauptkultur mit einer Anfangs-OD₆₀₀ von ca. 0,1 für LB- und 0,2 für MS-Glc Medium überführt. Die Hauptkulturen wurden bei 30°C und 200 U/min inkubiert. Für die Messungen wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten 1 ml entnommen, ggf. 1:10 verdünnt und photometrisch bei 600 nm vermessen. Als Referenz diente 1 ml des sterilen Kulturmediums. Die OD₆₀₀-Werte wurden halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Die Wachstumsrate wurde mit Gleichung 1 berechnet.

$$\mu = \frac{\ln x_t - \ln x_0}{t - t_0}$$

Gleichung 1: Berechnung der Wachstumsrate

µ: Wachstumsrate in min⁻¹; X_t: OD zum Zeitpunkt t; X₀: OD zum Zeitpunkt t₀; t: Zeit in min

Durch die Berechnung der Wachstumsrate wurde die Generationszeit mit der Gleichung 2 ausgerechnet.

$$t_d = \ln 2 / \mu$$

Gleichung 2: Berechnung der Generationszeit t_d

μ : Wachstumsrate in min^{-1} ; t_d : Verdopplungs- bzw. Generationszeit in min.

4.8 Proteomaufbereitung

Für die Proteomanalyse musste zunächst das Proteom aus den zu untersuchenden Stämmen gewonnen werden. Dafür wurden Einzelkolonien der zu untersuchenden Stämme in 5 ml MS-Glc Medium mit verschiedenen Konzentrationen von 4-F-Ind, 4-A-Ind, L-Trp und D-Trp inokuliert und bei 30°C und 200 U/min über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 300 μl dieser Vorkulturen in jeweils 30 ml MS-Glc Medium mit verschiedenen Konzentrationen von 4-F-Ind, 4-A-Ind, L-Trp und D-Trp überführt und bei 30°C und 200 U/min inkubiert. Beim Erreichen einer OD_{600} von 0,6 wurden die Kulturen in 50 ml Reaktionsgefäße (*Falcon-Röhrchen*) überführt und bei 5.000 x g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 4 ml Aufschlusspuffer resuspendiert und mittels Ultraschall im Eisbad mit 4 x 25 Pulsen (Power%: 100, Cycle: 70, Sec: 25) aufgeschlossen. Der Zellextrakt wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bis zur Durchführung des Bradford-Tests und der SDS-PAGE bei -70°C aufbewahrt.

4.9 Bradford-Test

Der Test wurde entsprechend den Angaben des Herstellers BioRad durchgeführt. Dafür wurde BSA mit dem Aufschlusspuffer in einer Verdünnungsreihe in drei Replikaten von 1,4 mg/ml bis 0,2 mg/ml angesetzt. Schließlich wurden 30 μl der jeweiligen Konzentration zu 1ml des 1 zu 5 verdünnten Bradford-Färbereagens in 1,5 ml Reaktionsgefäße gründlich gemischt, 30min bei Raumtemperatur inkubiert und die Absorption bei 550 nm gemessen. Proteinkonzentrationen in Proben unbekannter Konzentration wurden anhand einer mit BSA als Standard erstellten Kalibrierung gemessen.

4.10 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophore (SDS-PAGE)

Um das Proteommuster analysieren zu können und L-Trp im Proteom sichtbar zu machen, wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Dazu wurde das Mini-Sub Cell Elektrophorese-System der Firma BioRad verwendet. 50 µl Zellextrakt wurden mit 50 µl 2 x GSB in 1,5 ml Eppendorf Gefäßen resuspendiert, für 10 min bei 95°C erhitzt und bei 13.000 U/min für 1 min zentrifugiert, um unlösliches Material zu entfernen. Die Überstände wurden in frische Röhrchen überführt. Zur Erstellung des Gels wurden ein 5%iges Sammelgel und ein 15%iges Trenngel benutzt. Um das L-Trp zu bestimmen, wurde dem Trenngel 0,5 % Chloroform zugegeben (Ladner et al., 2004). Sorgfältig wurden die Proben auf das Gel übertragen und die Auftrennung der Proteine erfolgte über Nacht bei 70 V. Der Nachweis von L-Trp erfolgte über eine Nachfärbung des Gels in 45 ml Methanol, 45 ml Wasser und 10ml Chloroform für 10 Minuten. Das Gel wurde sorgfältig mit Wasser gewaschen und schließlich wurde die Fluoreszenzintensität der angefärbten Proteine bei 300 nm (UV-Licht) dokumentiert. Das Gel wurde anschließend über Nacht mit Coomassie-Färbelösung gefärbt und dokumentiert.

4.11 Überprüfung des Einbaus von L-Trp-Analogen ins Proteom durch die Überexpression von eGFP

Der Einbau von L-Trp-Analogen ins Proteom wurde durch Transformation der Evolvate mit dem Plasmid pQE-80L-eGFP-H6, das ein induzierbares, His₆-markiertes *enhanced green fluorescent Protein* (eGFP) besitzt, überprüft. Da das eGFP-Protein in seiner Aminosäuresequenz nur ein L-Trp besitzt, konnte die Anwesenheit von L-Trp mit der Chloroform-Färbung überprüft werden.

4.11.1 Herstellung elektrokompenter Zellen und Transformation

Für die Transformation wurden elektrokompente Zellen hergestellt. Dafür wurde eine Einzelkolonie in 5 ml LB Medium inokuliert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde 1/100 Volumen der frischen Übernachtskultur im 300 ml LBoN Medium überimpft und die Zellen bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 1 inkubiert. Um die Zellen zu ernten, wurden die Zellen bei 6.000 x g/min und 4°C für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde

verworfen und das Pellet in 30 ml kaltem, sterilem MQ Wasser resuspendiert. Dann wurden die Zellen erneut bei 10.000 x g und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 30 ml 10% kaltem Glycerin resuspendiert und erneut für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet schließlich in 4 ml 10% Glycerin resuspendiert und je 100 µl in Reaktionsgefäße aliquotiert und sofort bei -70°C gelagert.

Am nächsten Tag wurden die elektrokompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1 µl Plasmid (50ng/µl) gemischt und auf Eis inkubiert, bevor der Ansatz dann in vorgekühlte Elektroporationsküvetten mit 2 mm Elektrodenabstand pipettiert wurde. Für die Elektroporation wurde die Küvette gut abgetrocknet, bevor sie in die Pulsapparatur eingesetzt und der Elektropuls (3 kV, 25 µF, 600 Ω) ausgelöst wurde. Anschließend wurden die transformierten Zellen in 1 ml LB für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz bei 6000 x g für 1 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 100 µl frischem LB resuspendiert und es wurden ggf. Verdünnungen von 1:10 bis 1:100 hergestellt. Schließlich wurden alle Ansätze auf LB_{amp}-Platten ausplattiert und über Nacht bei 30°C wachsen gelassen. Die Transformation des Plasmids wurde durch eine Plasmid-Minipräp überprüft.

4.11.2 eGFP-Überexpression

Für die Expression von eGFP wurden zweimal 5 ml MS-Glc Medium mit 30 µM L-Trp und 100 µg/ml Ampicillin jeweils mit einer frischen Bakterienkolonie der Aza-Evolvate und F-Evolvate beimpft und bei 30°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden verschiedene Ansätze mit 30 ml MS-(Glc) Medium und verschiedenen Konzentrationen von L-Trp (5 µM, 10 µM und 30 µM), L-Trp Analogen (60 µM 4-A-Ind bzw. 4-F-Ind) und 100 µg/ml Ampicillin vorbereitet, mit 100 µl der Übernachtskultur beimpft und bei 37°C und 250 U/min inkubiert. Nachdem die Zellkultur eine OD₆₀₀ zwischen 0,6 und 0,8 erreicht hatte, wurde IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM hinzugefügt. Die Zellen wurden für weitere 6 h bei 30°C inkubiert, um die Expression von eGFP zu induzieren. Im Anschluss wurden die Zellen bei 4°C und 10000 x g für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde bis zur weiteren Verwendung bei -70°C eingefroren.

4.11.3 eGFP -Reinigung

Die Proteinreinigung erfolgte mit dem Ni-NTA Spin Kit (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers. Für die Proteinreinigung wurde das Pellet in 630 µl Aufschlusspuffer (NPI-10) resuspendiert. Dazu wurden 70 µl Lysozym (10 mg/ml) gegeben und auf Eis für 20 min inkubiert. Dann wurde die Zellsuspension bei 10000 x g für 30 Min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde aufbewahrt. Die Ni-NTA-Säulen wurden mit 600 µl NPI-10 Puffer äquilibriert und für 2 min bei 2900 x g und 4 °C abzentrifugiert. Die Säule wurde mit 600 µl des Überstands beladen und für 5 min bei 1600 x g abzentrifugiert und der Durchfluss wurde verworfen. Die Ni-NTA-Säulen wurden zweimal mit je 600 µl NPI-20 Puffer gewaschen und für 2 min bei 2900 x g und 4 °C abzentrifugiert. Die Elution erfolgte durch Zugabe von zweimal 300 µl NPI-500 Puffer und Zentrifugation bei 2900 x g und 4°C. Die Eluate wurden gesammelt und bei -70°C eingefroren. Die Expression von eGFP wurde durch SDS-PAGE mit einer Comassie-Färbung überprüft und die Anwesenheit von L-Trp mittels Chloroform-Färbung nachgewiesen.

4.12 Genomische DNA-Sequenzierung

Für die Gewinnung der genomischen DNA wurden die Evolvat-Proben aus dem Genematen unter sterilen Bedingungen entnommen, auf LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 30°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 5 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert. Die weitere DNA-Reinigung erfolgte mit dem Genomic DNA Purification Kit (Promega) und dem Master Pure Tm Complete Kit (Epicentre) nach Angaben der Hersteller. Die DNA-Sequenzierung (Illumina-Sequenzierung) und bioinformatische Auswertung erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Nediljko Budisa (TU Berlin) und der Arbeitsgruppe von Herrn Torsten Semmler (RKI Berlin).

4.13 Gendeletionen in *E. coli*

Um verschiedene Gene in *E. coli* Wildtypen und Evolvaten zu deletieren, wurde die *One-Step-Inactivation*-Methode (Datsenko und Wanner, 2000) angewendet. Als *Template* zur Amplifikation des Selektionsmarkers *neoR* (Kanamycin-Resistenzkassette) diente das Plasmid pKD4.

4.13.1 Erstellung einer Knockout-Kassette mit einem Kanamycinresistenz-Gen und FRT-Sequenzen

4.13.1.1 Pipettierschema des PCR-Ansatzes

Tabelle 34: PCR- Ansatz

Reaktionskomponenten	Volumen in μl
Pfu-Pufferlösung mit Mg^{2+}	5 μl
dNTP-Lösung (10 μM)	1 μl
Vorwärtsprimer	0,5 μl (10 μM)
Rückwärtsprimer	0,5 μl (10 μM)
DNA (pKD4)	1 μl
Pfu-Polymerase	1 μl
MQ-H ₂ O	40 μl

4.13.1.2 PCR-Programm

Tabelle 35: PCR -Programm

Schritt	Temperatur	Dauer	
erste Denaturierung	95°C	3 min	
Denaturierung	95°C	0,5 min	40 Zyklen
Annealing	55°C	0,5 min	
Elongation	72°C	2 min	
abschließende Elongation	72°C	10 min	
Kühlung	4°C	∞	

4.13.1.3 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit dem PCR *clean-up*, *Gel Extraction Kit* (Machery-Nagel). Zur DNA-Aufreinigung der erstellten Kassette wurde der PCR-Ansatz mit ddH₂O auf 100 μl aufgefüllt, in ein 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß überführt und mit 200 μl Bindepuffer (NT1) vermischt. Die entstandene Lösung wurde auf die Siliziumdioxid-Membran (PCR Clean-up Säule) pipettiert, für 30 Sekunden bei 10.000 x g abzentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Zunächst wurden 700 μl Waschpuffer (NT3) auf die Säule gegeben. Um eine höhere Reinheit zu erzielen wurde das Waschen der Säule dreimal wiederholt. Danach wurde die Säule für 1 min erneut zentrifugiert, um die vollständige

Entfernung des Waschpuffers (NT3) zu erreichen. Für die Elution wurde die Säule mit 20 µl des auf 70°C erhitzten Elutionspuffers benetzt, für 5 Minuten im Heizblock inkubiert und dann für 30 Sekunden bei 800 x g abzentrifugiert, bevor sie abschließend für 60 Sekunden bei 11.000 x g abzentrifugiert wurde. Dieser Vorgang wurde drei Mal wiederholt, so dass am Ende 60 µl der gereinigten DNA-Lösung vorlagen.

4.13.1.4 Ausschalten eines Gens durch homologe Rekombination nach der Elektroporation mit einer Knockout-Kassette

Dafür wurde eine Einzelkolonie in 5 ml LB Medium mit 100 µg/ml Ampicillin inokuliert und über Nacht bei 30°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde 1/100 Volumen in 5 ml LBoN-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin überimpft und bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,5 inkubiert. Dann wurde zu dieser Zellsuspension eine 10 %ige L-Arabinose-Lösung gegeben, so dass die Gesamtkonzentration an L-Arabinose in der Flüssigkultur 0,4 % betrug. Anschließend wurde die Zellkultur für eine Stunde bei 30°C inkubiert, damit die Expression der Red/ET-Rekombinationsproteine induziert wurde. Nach einer Stunde wurden 1,5 ml der Zellkultur in ein 1,5 ml Gefäß überführt und bei 6.000 x g für 1 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde dreimal in 1 ml eisgekühltem ddH₂O vollständig resuspendiert, dann für 60 Sekunden bei 600 x g gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl eisgekühltem ddH₂O vollständig resuspendiert und weiterhin auf Eis inkubiert. Die von Salzen befreite Bakteriensuspension wurde mit ca. 400ng der KO-Kassette transformiert. Schließlich wurden die Zellen über Nacht bei 30°C inkubiert, bevor sie auf einer LB_{kan}-Platte ausplattiert und erneut über Nacht bei 30°C inkubiert wurden. Von der Agar-Platte wurden mehrere Kolonien mittels Kolonie-PCR auf eine erfolgreiche Transformation untersucht.

5. Ergebnisse

Diese Arbeit beschreibt die Anpassung einer Trp-auxotrophen Mutante (G2748, $\Delta trpEDLC/\Delta tnaA$) von *Escherichia coli* K12 MG1655 an die Analoge 4-A-Ind und 4-F-Ind. Dazu wurden die Bakterien in kontinuierlicher Kultur im Genemat in einem *konditionalen pulse feed*-Regime über ca. 18000 (4-A-Ind) bzw. 18000 (4-F-Ind) Generationen kultiviert.

Im *konditionalen pulse feed*-Regime wurde eine wachsende Population von Zellen (ca. 10^{10} Individuen) kontinuierlich mit alternierenden Pulsen mit Wachstumsmedien verdünnt. Pulse eines "permissiven" Mediums, welches Wachstum der Zellen erlaubte (hier: MS-Glc Medium mit L-Trp sowie einer von den Zellen tolerierten Konzentration der Analog-Vorstufen 4-A-Ind bzw. 4-F-Ind) wurden bei Erreichen einer vorgegebenen Zelldichte von Pulsen eines "nicht-permissiven" Mediums abgelöst, welches nur das jeweilige Analog enthielt. Das *Gleichgewicht*-Verhältnis zwischen permissivem und nicht-permissivem Medium informierte über den Stand des Adaptationsprozesses.

5.1 Kinetik des Adaptationsprozesses

In beiden Experimenten wurde im Verlauf der Kultivierung ein Anstieg der *Gleichgewicht*-Konzentration des jeweiligen Analogs beobachtet. Nach 18000 Generationen erhöhte sich das *Gleichgewicht*-Konzentration der Kultur mit 4-F-Ind auf ca. 25 μM . Abbildung 5 und Abbildung 6 zeigen die Kinetik dieser Adaptation für 4-A-Ind bzw. 4-F-Ind. Beim 4-Fluor-Evolvat (4-F-Evolvat) (**Abb. 5**) war eine relative starke Zunahme des Verbrauchs von nicht-permissivem Medium innerhalb der ersten 320 Tage über 5120 Generationen zu beobachten. Dann schwächte sich die Zunahme insgesamt ab bis 730 Tage, um danach stabil zu bleiben.

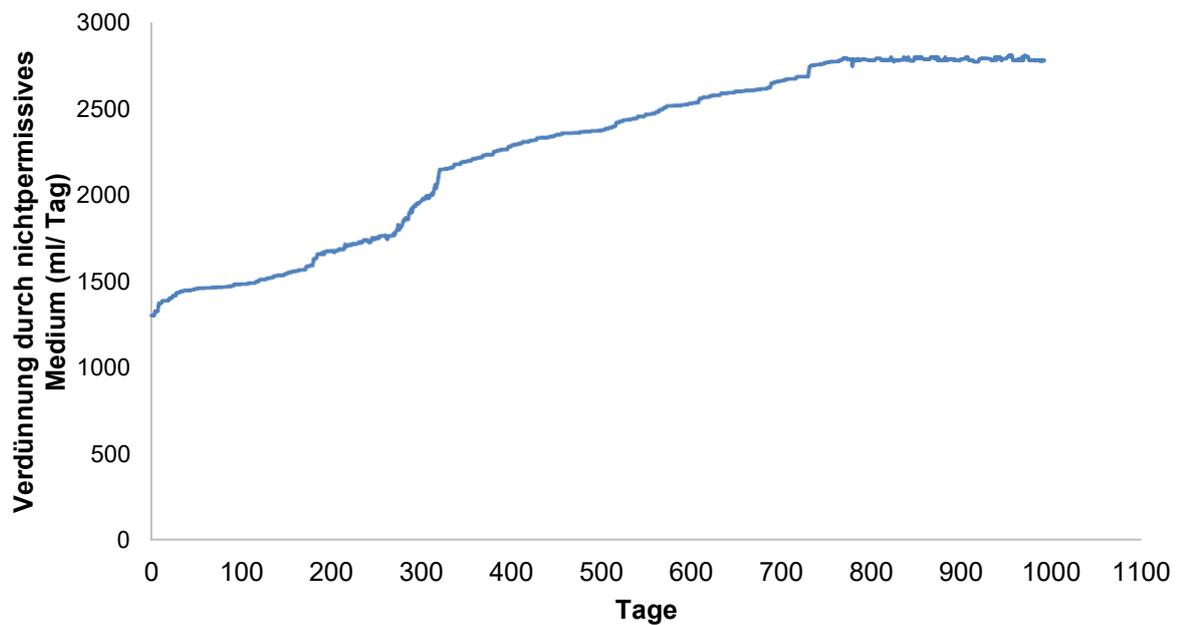


Abb. 5: Evolutionäre Kinetik der Adaptation von *E. coli* G2748 an 4-F-Ind unter dem *konditionalen pulse feed-Regime*.

Kinetik der Adaptation an 4-F-Ind in kontinuierlicher Kultur bei 30°C für 993 Tage im permissivem Medium mit 30 μM L-Trp/30 μM 4-F-Ind und nicht-permissivem Medium mit 30 μM 4-F-Ind. Gezeigt ist die Dauer der Verdünnung proTag mit nicht-permissivem Medium. Ab Tag 800 wurde permissives Medium mit 300 μM 4 -F-Ind / 30 μM L-Trp verwendet und nicht-permissives Medium mit 300 μM 4 -F-Ind.

Beim 4-Aza - Evolvat (4-A-Evolvat) (**Abb. 6**) blieb die Verwendung von nicht-permissivem Medium für 271 Tage über 4336 Generationen fast unverändert. Dann nahm die Verwendung von nicht-permissivem Medium bis Tag 480 über 4320 Generationen leicht zu. Für den Rest des Experiments wurden kaum Änderungen bei der Verwendung des nicht-permissiven Mediums beobachtet.

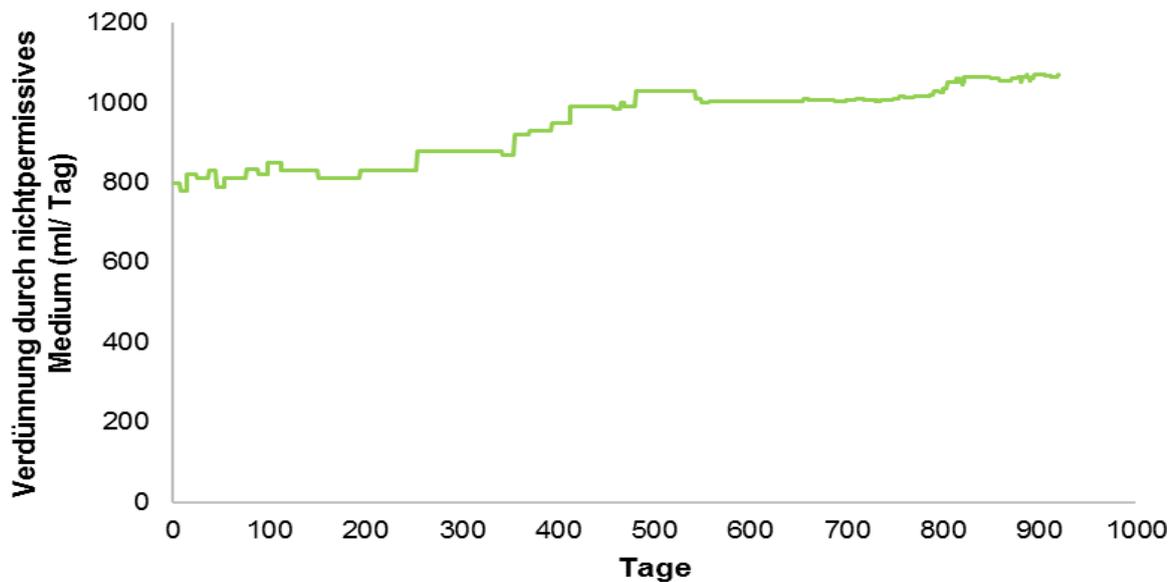


Abb. 6: Evolutionäre Kinetik der Adaptation von *E. coli* G2748 an 4-A-Ind unter dem *konditionalen pulse feed-Regime*.

Kinetik der Adaptation an 4-A-Ind in kontinuierlicher Kultur bei 30°C für 920Tage im permissiven Medium mit 30 μ M L-Trp/30 μ M 4-A-Ind und nicht-permissiven Medium mit 30 μ M 4-A-Ind. Gezeigt ist die Dauer der Verdünnung proTag mit nicht-permissivem Medium. Ab Tag 300 wurde permissives Medium mit 60 μ M 4-A-Ind / 5 μ M L-Trp verwendet und nicht-permissives Medium mit 60 μ M 4-A-Ind. Ab Tag 800 wurde permissives Medium mit 300 μ M 4-A-Ind/30 μ M L-Trp verwendet und nicht-permissives Medium mit 300 μ M 4-A-Ind.

5.2. Charakterisierung evolvierter Derivate

Es wurde erwartet, dass die Evolvate sich an das Stress-Medium anpassen und mit den Analogen besser wachsen können. Deshalb wurden in regelmäßigen Abständen (ca. alle 168 Generationen) Proben aus den Kulturen entnommen und bei -70 °C eingefroren. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Klone isoliert und deren Eigenschaften charakterisiert und mit denen des Ausgangsstamms verglichen. Im Folgenden werden die Wachstumseigenschaften der Klone A2K, A14K, A18K (Klone nach ca. 2000, 14000, 18000 Generationen unter 4-A-Ind-Selektion) und der Klone F2K, F9,5K, F16K und F18K (Klone nach ca. 2000, 9500, 16000 und 18000 Generationen unter 4-F-Ind-Selektion) gezeigt.

5.2.1 Charakterisierung der Aza-evolvierten Derivate

Keines der Derivate konnte alleine mit einem der Analoga in Konzentrationen von 5 μ M bis 60 μ M wachsen (nicht gezeigt). Die Analyse des Klons A2K zeigt, dass die

Wachstumsausbeute des evolvierten Derivats im Vergleich zum Ausgangsstamm in LB-Medium (**Abb. 7 und Abb. 11**) praktisch identisch ist. Auch in MS-Glc Medium (**Abb. 8**) in Gegenwart von L-Trp und dem Analog in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen zeigte das unter 4-A-Ind evolvierte Derivat keine Veränderung der Wachstumsausbeute.

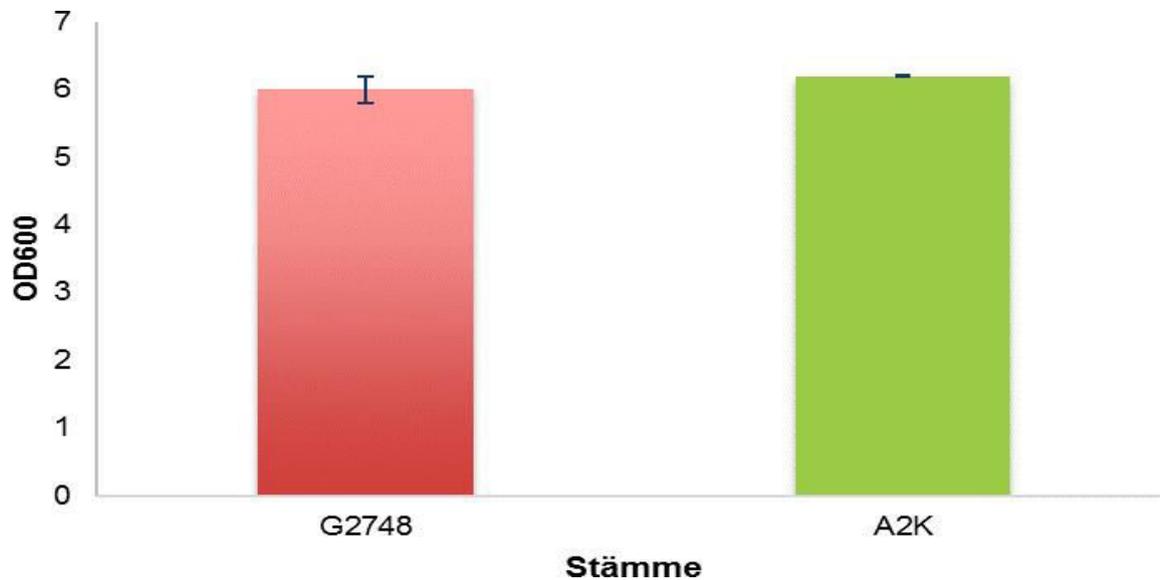


Abb. 7: Wachstumsausbeuten von *E. coli* G2748 und dem evolvierten Derivat A2K in LB-Medium. 5 ml-Batchkulturen wurden über Nacht bei 30°C kultiviert und die optische Dichte der Zellsuspensionen bei 600nm gemessen. Die Kulturen wurden jeweils drei Mal passagiert. Gezeigt ist die Ausbeute der dritten Passage von drei biologischen Replikaten.

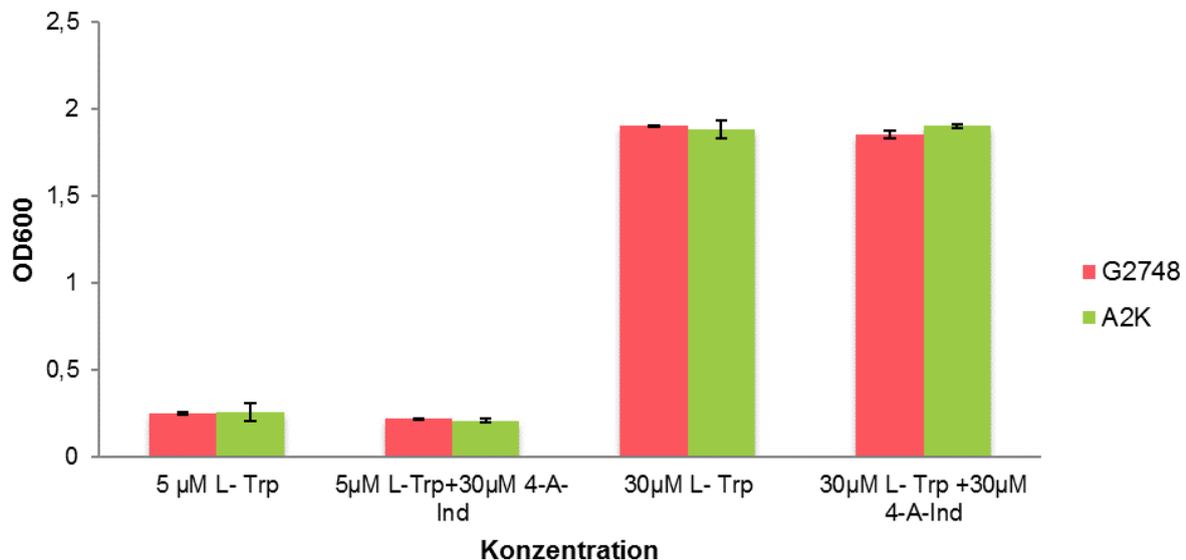


Abb. 8: Wachstumsausbeuten von *E. coli* G2748 und dem evolvierten Derivat A2K in MS-Glc Medium mit verschiedenen Konzentrationen von L-Trp und 4-A-Ind. 5 ml-Batchkulturen wurden über Nacht bei 30°C kultiviert und die optische Dichte der Zellsuspensionen bei 600 nm gemessen. Um Reserven von L-Trp aus Vorkulturen zu verarmen, wurden die Kulturen jeweils drei Mal passagiert. Gezeigt ist die Ausbeute der dritten Passage von drei biologischen Replikaten.

Abbildung 9 zeigt, dass die Wachstumsausbeute des evolvierten Derivats A14K in Gegenwart von L-Trp im Vergleich zum Ausgangsstamm deutlich niedriger liegt. Diese niedrigere Wachstumsausbeute liegt möglicherweise an veränderten Affinitäten der Transportsysteme für aromatische Aminosäuren (s.u.). Abbildung 9 zeigt auch, dass sich die Wachstumsausbeute des Klons Im Gegenwart von L-Trp und dem Analog in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen verbessert hat.

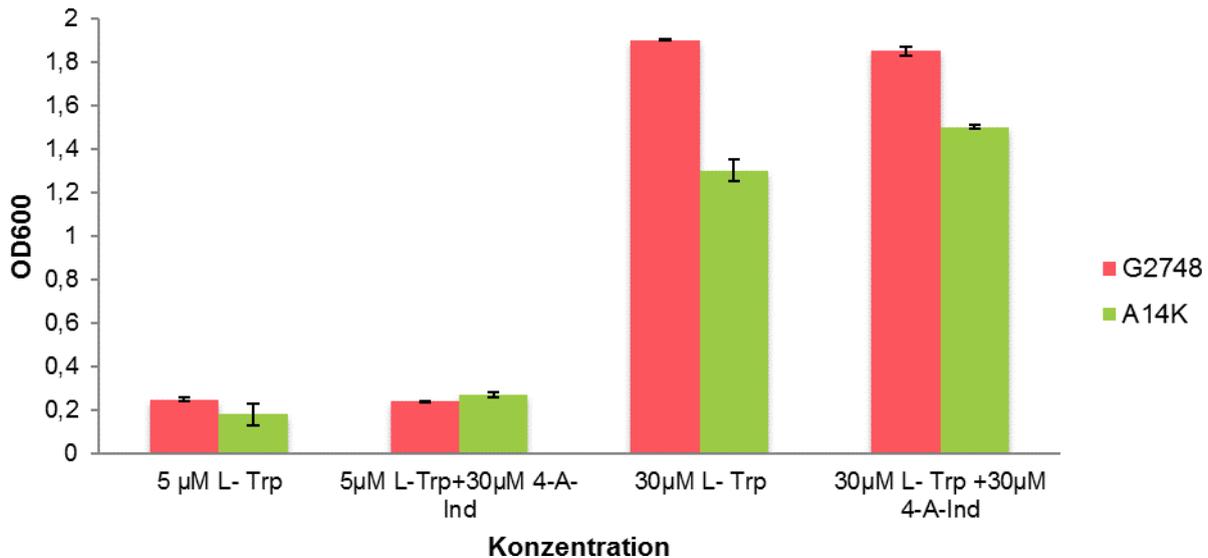


Abb. 9: Wachstumsausbeuten von *E. coli* G2748 und dem evolvierten Derivat A14K in MS-Glc Medium mit verschiedenen Konzentrationen von L-Trp und 4-A-Ind. 5 ml-Batchkulturen wurden über Nacht bei 30°C kultiviert und die optische Dichte der Zellsuspensionen bei 600 nm gemessen. Um Reserven von L-Trp aus Vorkulturen zu verarmen, wurden die Kulturen jeweils drei Mal passagiert. Gezeigt ist die Ausbeute der dritten Passage von drei biologischen Replikaten.

Die Wachstumseigenschaft des Klons A18K (**Abb. 10 und Abb. 11**) in LB-Medium zeigen, dass die Wachstumsausbeute im Vergleich zum Ausgangsstamm deutlich niedriger liegt. Klon A18K (**Abb. 12**) zeigt in MS-Glc Medium bei niedrigen und bei hohen Konzentrationen von L-Trp, dass die Wachstumsausbeute des evolvierten Derivats im Vergleich zu den A14K um etwa einen Faktor 2 gestiegen und fast gleich im Vergleich zum Ausgangsstamm G2748 ist. Die Abbildung 12 zeigt auch, dass sich die Wachstumsausbeute des Klons A18K in MS-Glc Medium bei niedrigen L-Trp Konzentrationen und in Anwesenheit von 4-A-Ind in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen im Vergleich zum Ausgangsstamm und im Vergleich zu den Klonen A2K und A14K deutlich verbessert hat.

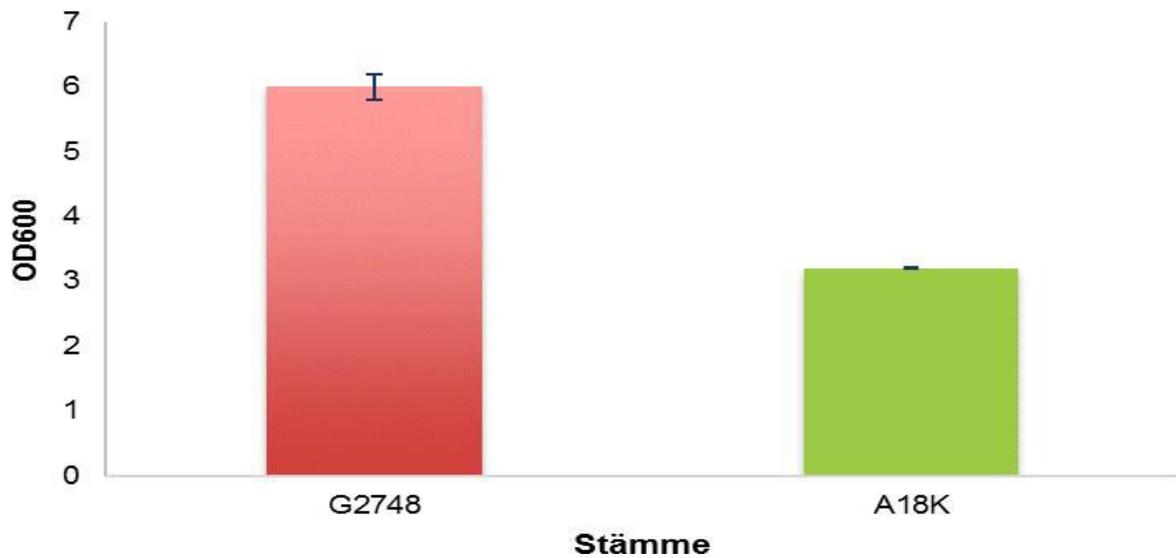


Abb. 10: Wachstumsausbeuten von *E. coli* G2748 und dem evolvierten Derivat A18K in LB-Medium. 5 ml-Batchkulturen wurden über Nacht bei 30°C kultiviert und die optische Dichte der Zellsuspensionen bei 600 nm gemessen. Die Kulturen wurden jeweils drei Mal passagiert. Gezeigt ist die Ausbeute der dritten Passage von drei biologischen Replikaten.

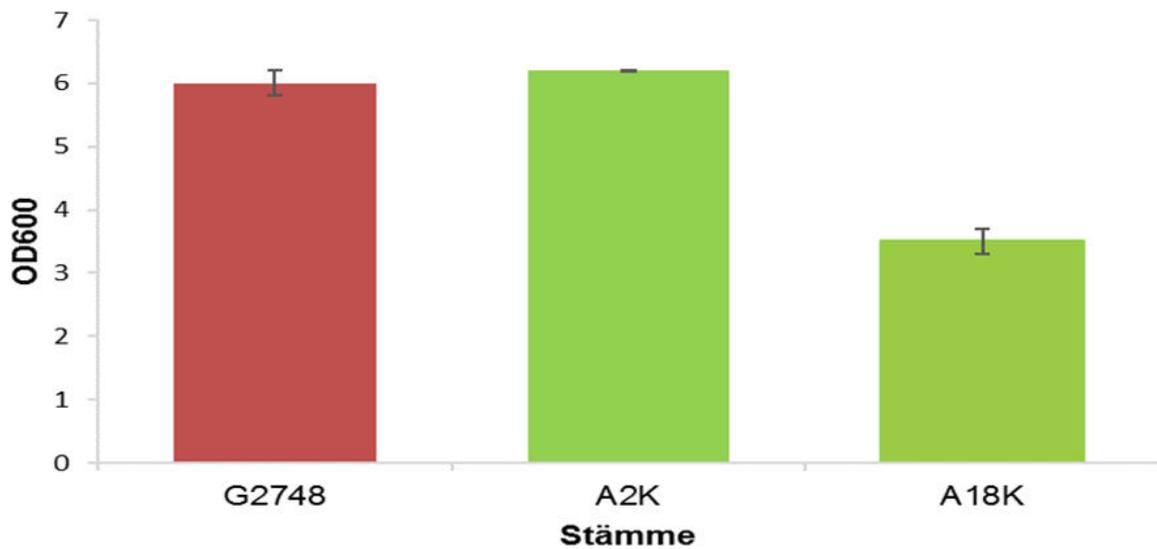


Abb. 11: Wachstumsausbeuten von *E. coli* G2748 und den evolvierten Derivaten A2K und A18K in LB-Medium. 5ml-Batchkulturen wurden über Nacht bei 30°C kultiviert und die optische Dichte der Zellsuspensionen bei 600nm gemessen. Die Kulturen wurden jeweils drei Mal passagiert. Gezeigt ist die Ausbeute der dritten Passage von drei biologischen Replikaten.

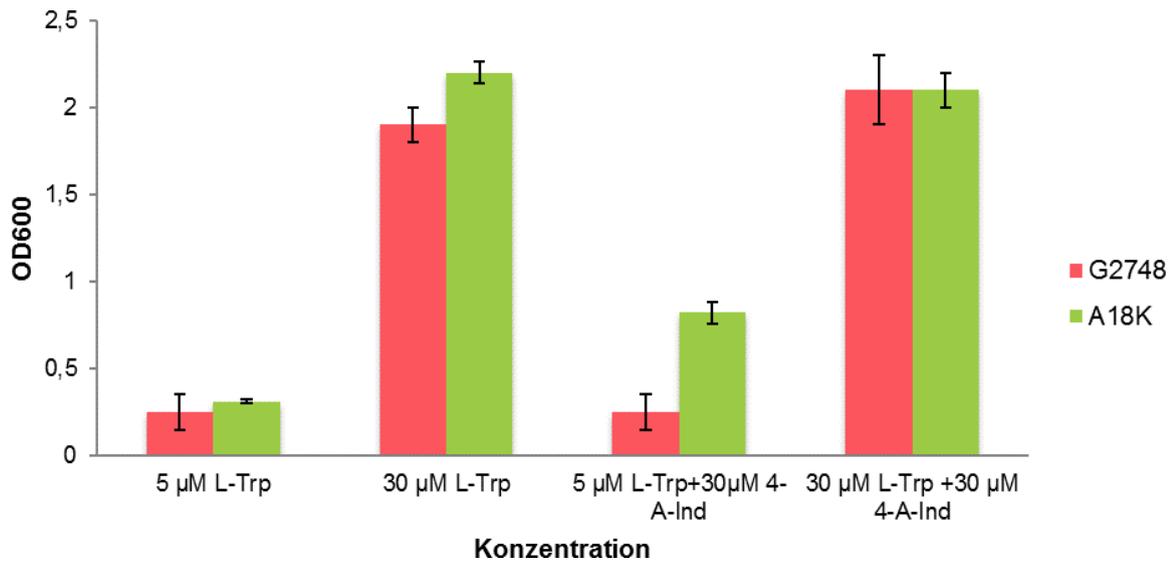


Abb. 12: Wachstumsausbeuten von *E. coli* G2748 und dem evolvierten Derivat A18K in MS-Glc Medium mit verschiedenen Konzentrationen von L-Trp. 5 ml-Batchkulturen wurden über Nacht bei 30°C kultiviert und die optische Dichte der Zellsuspensionen bei 600 nm gemessen. Um Reserven von L-Trp aus Vorkulturen zu verarmen, wurden die Kulturen jeweils drei Mal passagiert. Gezeigt ist die Ausbeute der dritten Passage von drei biologischen Replikaten.

Klone des Evolvats A18K (**Abb. 13 und Abb. 14**) wuchsen in Gegenwart von 4-A-Ind und in der Abwesenheit von L-Trp im MS-Glc Medium bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 1,2 und 1,44. Ab der zweiten Passage gingen die optischen Dichten auf etwa 0,3 zurück.

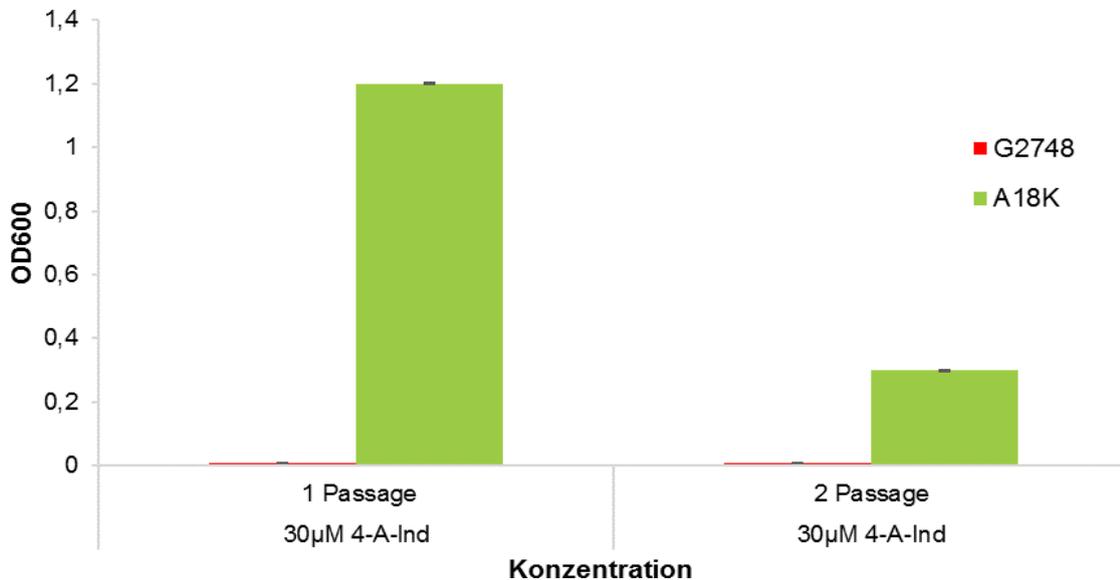


Abb. 13: Wachstumsausbeuten von *E. coli* G2748 und A18K in MS-Glc Medium mit 30 μ M 4-A-Ind. 5 ml-Batchkulturen wurden über Nacht mit 30 μ M 4-A-Ind bei 30°C kultiviert und in MS-Glc Medium mit 30 μ M 4-A-Ind zweimal passagiert. Die optische Dichte der Zellsuspensionen jeder Passage wurde bei 600 nm gemessen. Gezeigt ist die Ausbeute von zwei aufeinanderfolgenden Passagen (drei biologische Replikate).

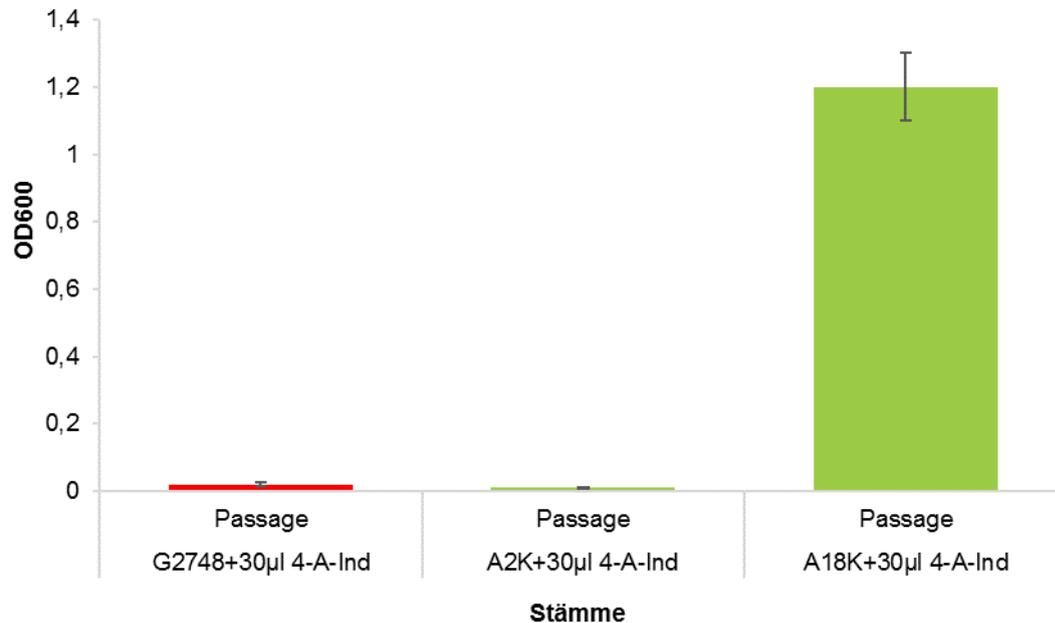


Abb. 14: Wachstumsausbeuten von *E. coli* G2748 und den evolvierten Derivaten A2K, A18K und in MS-Glc Medium mit 30µM 4-A-Ind. 5 ml-Batchkulturen wurden über Nacht bei 30°C kultiviert und die optische Dichte der Zellsuspensionen bei 600 nm gemessen. Gezeigt ist die Ausbeute der ersten Passage von drei biologischen Replikaten.

5.2.2 Charakterisierung der F-evolvierten Derivate

Keines der Derivate konnte alleine mit einem der Analoga in Konzentrationen von 5µM bis 60µM wachsen (nicht gezeigt). Die Wachstumsausbeute des Klons F2K in LB-Medium unterschied sich kaum vom Ausgangsstamm (**Abb. 15**). In MS-Glc Medium (**Abb. 16**) führte 4-F-Ind bei niedrigen L-Trp Konzentrationen beim Ausgangsstamm und in dem unter 4-F-Ind-Selektion entstandenen Derivat F2K zu einer leichten Wachstumsstimulation.

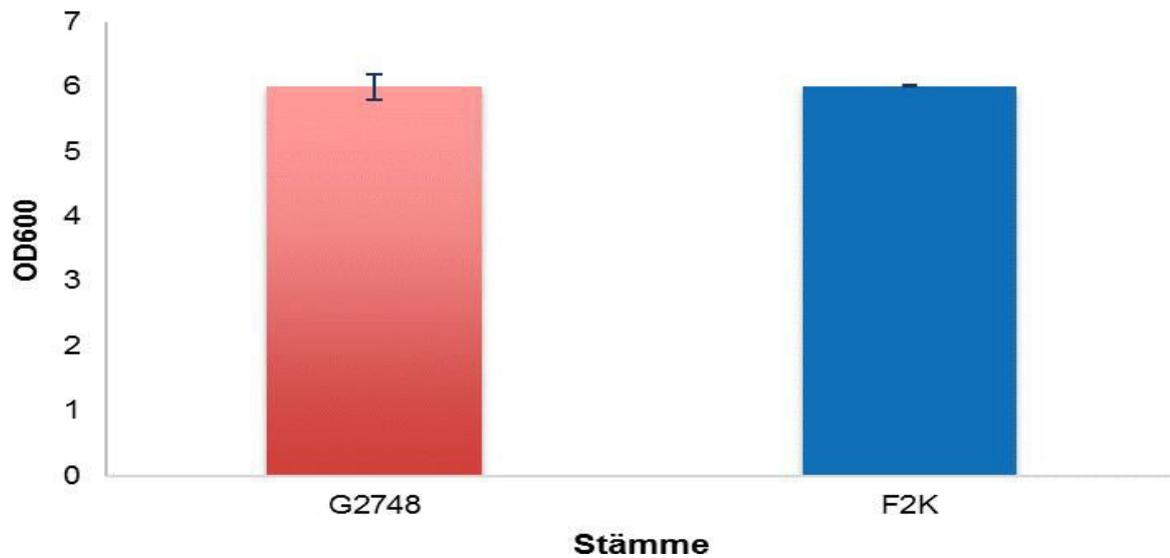


Abb. 15: Wachstumsausbeuten von *E. coli* G2748 und der evolvierten Derivate F2K in LB-Medium. 5 ml-Batchkulturen wurden über Nacht bei 30°C kultiviert und die optische Dichte der Zellsuspensionen bei 600nm gemessen. Die Kulturen wurden jeweils drei Mal passagiert. Gezeigt ist die Ausbeute der dritten Passage von drei biologischen Replikaten.

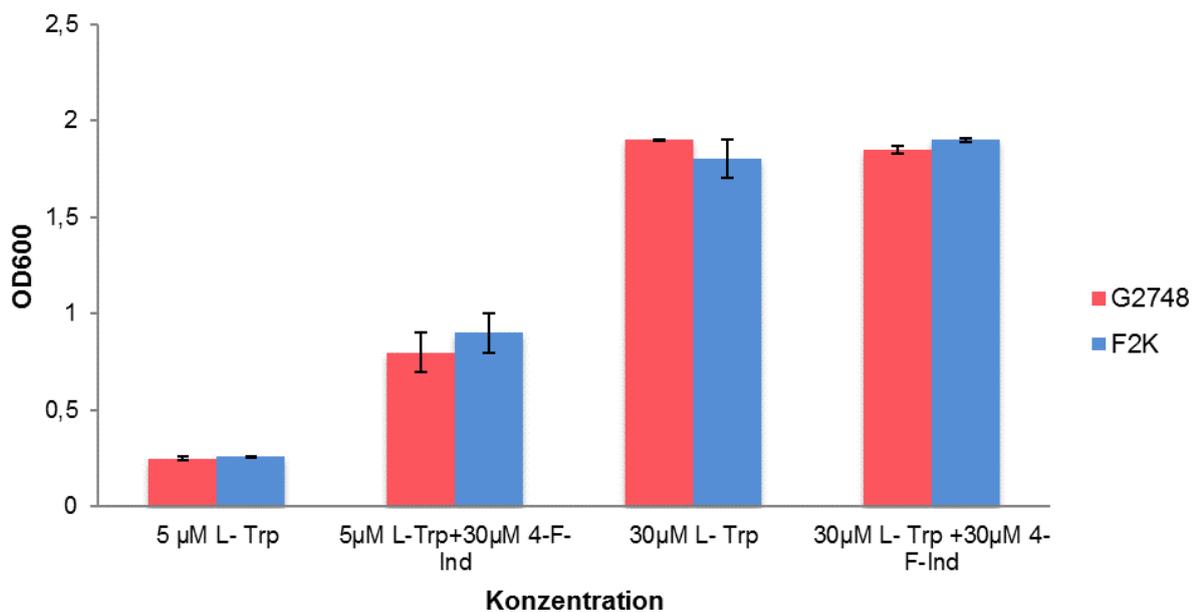


Abb. 16: Wachstumsausbeuten von *E. coli* G2748 und dem evolvierten Derivat F2K in MS-Glc Medium mit verschiedenen Konzentrationen von L-Trp. 5 ml-Batchkulturen wurden über Nacht bei 30°C kultiviert und die optische Dichte der Zellsuspensionen bei 600 nm gemessen. Um Reserven von L-Trp aus Vorkulturen zu verarmen, wurden die Kulturen jeweils drei Mal Passagiert. Gezeigt ist die Ausbeute der dritten Passage von drei biologischen Replikaten.

Abbildung 17 zeigt, dass die Wachstumsausbeuten des evolvierten Derivats F9,5K in Gegenwart von L-Trp im Vergleich zum Ausgangsstamm deutlich niedriger liegen. In MS-Glc Medium führt 4-F-Ind im Ausgangsstamm bei niedrigen L-Trp Konzentrationen zu einer

Wachstumsstimulation, in dem unter 4-F-Ind-Selektion entstandenen Derivat F9,5K fällt das Wachstum geringer aus, so dass die Wachstumsausbeute im Vergleich zum Ausgangstamm und F2K deutlich niedriger liegt.

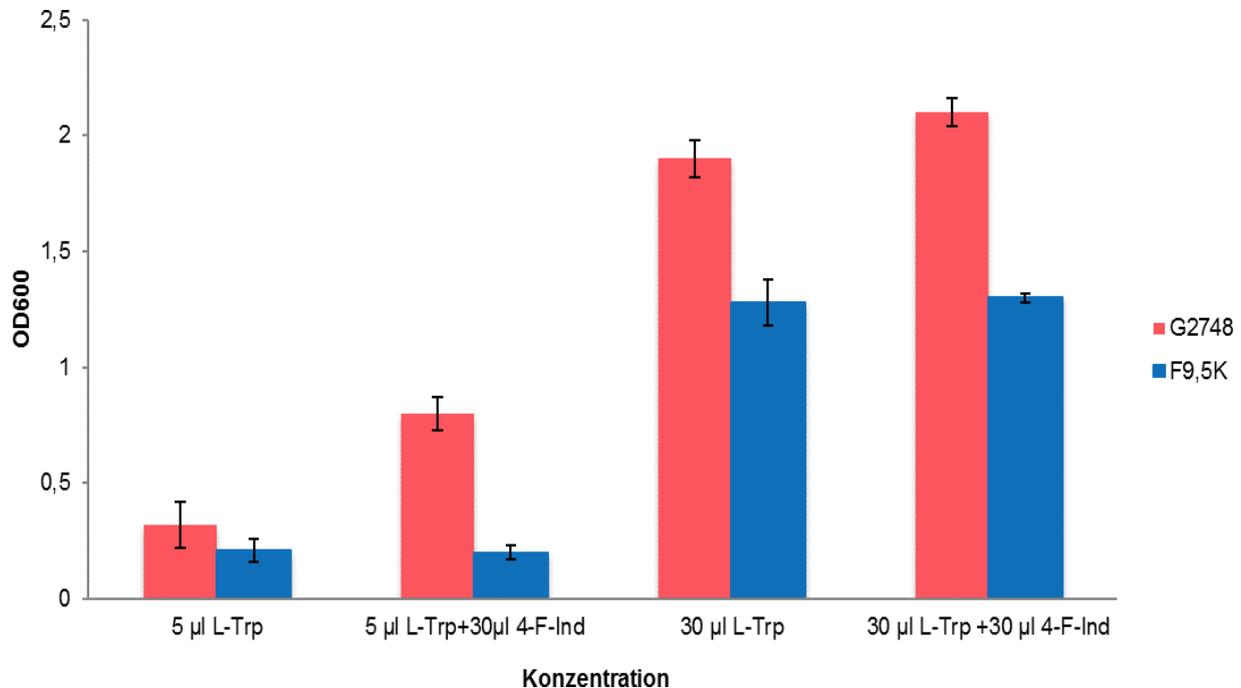


Abb. 17: Wachstumsausbeuten von *E. coli* G2748 und dem evolvierten Derivat F9,5K in MS-Glc Medium mit verschiedenen Konzentrationen von L-Trp. 5 ml-Batchkulturen wurden über Nacht bei 30°C kultiviert und die optische Dichte der Zellsuspensionen bei 600 nm gemessen. Um Reserven von L-Trp aus Vorkulturen zu verarmen, wurden die Kulturen jeweils drei Mal passagiert. Gezeigt ist die Ausbeute der dritten Passage ist gezeigt. Die Ausbeute der dritten Passage von drei biologischen Replikaten.

Das Wachstum der Klone F16K (**Abb.18 und Abb. 19**) und F18K (**Abb.19**) in LB-Medium ist im Vergleich zum Ausgangstamm deutlich geringer. Die Klone F16K (**Abb. 20**) und F18K (nicht gezeigt) zeigten in MS-Glc Medium bei niedrigen und bei hohen L-Trp-Konzentrationen, dass die evolvierten Derivate höhere Populationsdichten im Vergleich zu F9,5K erreichten und die OD bei 600nm bis um ca. einen Faktor 2 höher liegt, fast gleich zum Ausgangstamm G2748. Im Gegensatz zum Ausgangstamm und dem Klon F9,5K zeigt das mit 4-F-Ind selektierte Derivat F16K in MS-Glc Medium bei niedrigen L-Trp-Konzentrationen und 4-F-Ind in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen signifikant höhere Populationsdichten.

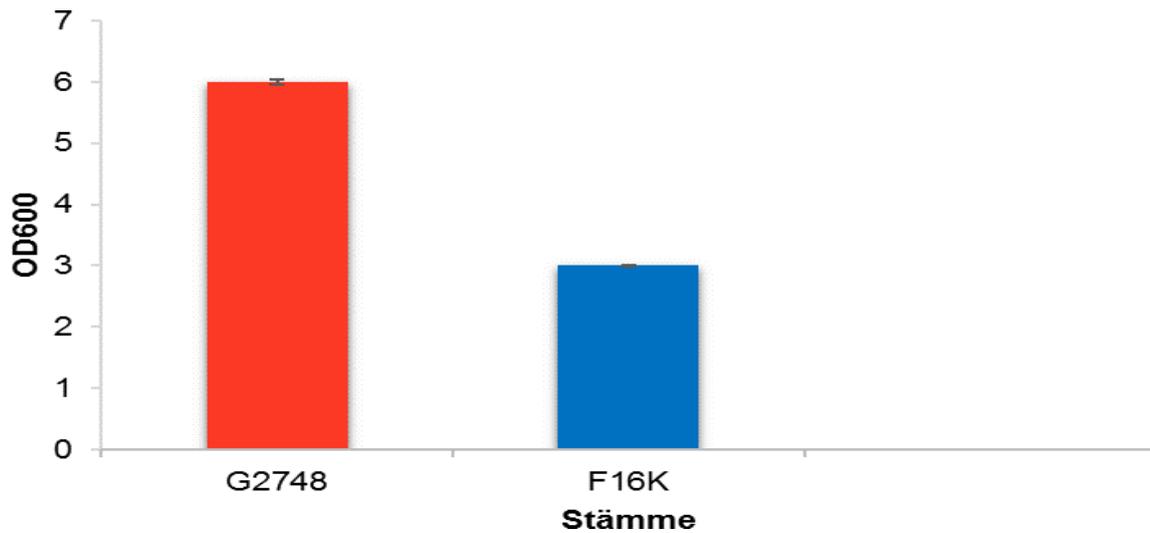


Abb. 18: Wachstumsausbeuten von *E. coli* G2748 und dem evolvierten Derivat F16K in LB-Medium. 5 ml-Batchkulturen wurden über Nacht bei 30°C kultiviert und die optische Dichte der Zellsuspensionen bei 600 nm gemessen. Die Kulturen wurden jeweils drei Mal passagiert. Gezeigt ist die Ausbeute der dritten Passage von drei biologischen Replikaten.

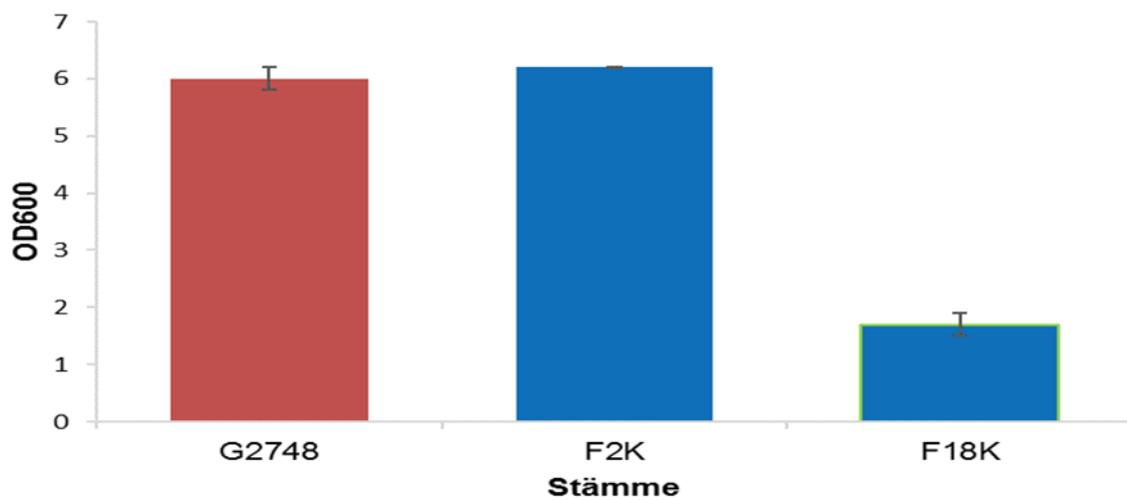


Abb. 19: Wachstumsausbeuten von *E. coli* G2748 und der evolvierten Derivate F2K und F18K in LB-Medium. 5 ml-Batchkulturen wurden über Nacht bei 30°C kultiviert und die optische Dichte der Zellsuspensionen bei 600nm gemessen. Die Kulturen wurden jeweils drei Mal passagiert. Gezeigt ist die Ausbeute der dritten Passage von drei biologischen Replikaten.

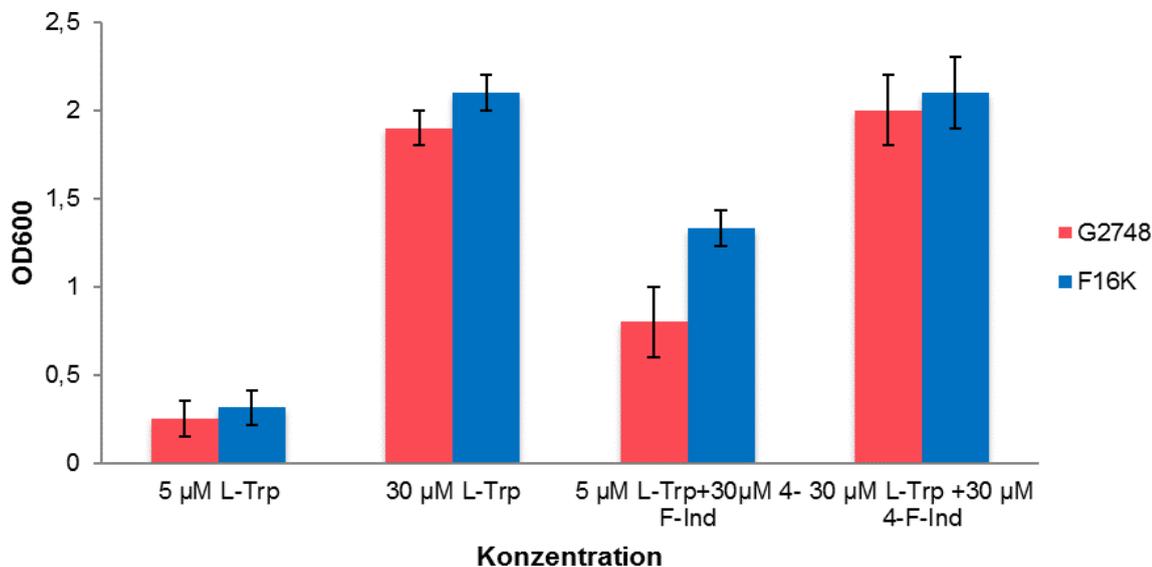


Abb. 20: Wachstumsausbeuten von *E. coli* G2748 und dem evolvierten Derivat F16K in MS-Glc Medium mit verschiedenen Konzentrationen von L-Trp und 4-F-Ind. 5 ml-Batchkulturen wurden über Nacht bei 30°C kultiviert und die optische Dichte der Zellsuspensionen bei 600 nm gemessen. Um Reserven von L-Trp aus Vorkulturen zu verarmen, wurden die Kulturen jeweils drei Mal passagiert. Gezeigt ist die Ausbeute der dritten Passage von drei biologischen Replikaten.

5.3. Generationszeiten der evolvierten Derivate

Während der Evolution wurde erwartet, dass das Wachstumsverhalten und die Wachstumsrate der Evolvate sich im Vergleich zum Ausgangs-Stamm G2748 verändern. Zur genaueren Charakterisierung des Wachstumsverhaltens der Klone F2K, F9,5K, F16K, F18K, A2K, A14K, A18K im Vergleich zum Ausgangs-Stamm G2748 wurde eine Kolonie des jeweiligen Stammes von der entsprechenden MS-Glc Platte in 5 ml MS-Glc Medium mit 30 µM L-Trp angeimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden aus den Übernachtskulturen Hauptkulturen mit einer Anfangs-OD₆₀₀ von 0,2 in MS-Glc Medium hergestellt. Die Kulturen wurden bei 30°C und 200 U/min inkubiert. Die OD₆₀₀-Messungen erfolgten alle 90 Minuten. Zur Berechnung der Generationszeit wurde zunächst die Wachstumsrate mit der Gleichung $t_d = \ln 2 / \mu$ ausgerechnet. Während die Verdopplungszeiten (**Tab. 36**) der beiden Derivate F2K und A2K in MS-Glc Medium (30 µM L-Trp) im Vergleich zum Ausgangsstamm mit 90 Minuten ähnlich waren, unterschieden sich die Verdopplungszeiten von F9,5K und A14K deutlich vom Ausgangsstamm und lagen bei 169 bzw. 148 Minuten. Die Verdopplungszeiten der Derivate F16K und A18K waren im

Vergleich zum Ausgangsstamm 80 bzw. 160 Minuten höher. In LB-Medium zeigten die Verdopplungszeiten der Derivate F2K und A2K keinen Unterschied im Vergleich zum Ausgangsstamm, während die von F16K und A18K um 30 Minuten und von F18K um 159 verlängert waren.

Tabelle 36: Generationszeiten von G2748 und evolvierten Derivaten in verschiedenen Medien

Stamm	Generationszeit [min]
G2748 in MS-Glc Medium	90
A2K in MS-Glc Medium	90
F2K in MS-Glc Medium	90
F9,5K in MS-Glc Medium	169
A14K in MS-Glc Medium	148
F16K in MS-Glc Medium	180
A18K in MS-Glc Medium	249
G2748 in LB-Medium	50
A2K in LB-Medium	48
F2K In LB-Medium	48
F16K in LB-Medium	78
A18K in LB-Medium	78
F18K in LB-Medium	159

5.4. Genetische Veränderungen der Evolvate

Um genetische Veränderungen der Evolvate zu analysieren, wurden im Laufe des Experiments einige Evolvat-Proben aus dem Genematen unter sterilen Bedingungen entnommen und deren Genome sequenziert. Es wurde erwartet, dass Mutationen entstehen können, die die Anpassung an das Stress-Medium und die Analoge ermöglichen. Die Genomsequenz des Evolvats A5K (**Tab.37**) wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Budisa analysiert. Die Tabelle fasst die nach rund 5000 Generationen Kultivierung mit 4-A-Ind (neben den im Ausgangsstamm deletierten Genen *trpE*-, *-D*, *-L*, *-C*- und *tnaA*) gefundenen Mutationen in dem Klon A5K zusammen. Auffällig ist hier, dass die

Gene für die drei Transporter für aromatische Aminosäuren (*aroP*, *tnaB* und *mtr*) nicht-synonyme Mutationen (*aroP*, *tnaB*), eine 3-Basenpaar-Insertion (*aroP*) sowie eine Deletion (*mtr*) aufwiesen. Die Deletion im *mtr*-Lokus umfasst das Startcodon sowie die kodierende Region für die N-terminalen 130 Aminosäuren, weshalb man davon ausgehen kann, dass *mtr* in diesem Stamm nicht mehr aktiv ist. Eine im *fimD*-Gen (*outer membrane protein; export and assembly of type 1 fimbriae*) entdeckte Mutation (L707W) deutet möglicherweise auf eine Adaptation an die Bedingungen der kontinuierlichen Suspensionskultur hin. Das Gen *fimD* ist an der Biofilmbildung beteiligt (Pratt und Kolter, 1998).

Die Genomsequenz des Evolvats F9,5K wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Semmler analysiert. Tabelle 38 fasst die nach rund 9500 Generationen Kultivierung mit 4-F-Ind gefundenen Mutationen in dem Klon F9,5K zusammen. Auch hier haben die Gene für die drei Transporter für aromatische Aminosäuren (*aroP*, *tnaB* und *mtr*) nicht-synonyme Mutationen (*aroP*, *tnaB*) sowie eine Deletion (*mtr*) erfahren.

Tabelle. 37: Genetische Veränderungen in dem unter 4-A-Ind-Selektion evolvierten Derivat A5K. Die Genomsequenz wurde vom Beijing Genomics Institute bestimmt. Bioinformatische Analysen wurden von Michael Hösl (AG Budisa) und Christoph Hartmann (Projektarbeit, AG Mutzel) durchgeführt. SNP, Einzelnukleotidpolymorphismus; Indel, Insertion/Deletion.

Gene	Abdeckung	Polymorphismus Typ	Varianten -frequenz	Aminosäure Änderung	Veränderung der DNA	Proteineigenschaften
<i>aroP</i>	160	SNP	100%	L ₃₇₀ -> Q ₃₇₀	T->A	Aromatische Aminosäure: H ⁺ -Symporter
<i>ylbE</i>	115	SNP	98%	E ₂₁₇ -> E ₂₁₇	A->G	Pseudogen
<i>ompF</i>	130	SNP	100%	R ₂₈₂ -> C ₂₈₂	G->T	Äußeres Membranporin F
<i>tnaB</i>	184	SNP	90%	I ₃₁₆ -> S ₃₁₆	T->G	Tryptophan-Transporter mit niedriger Affinität
<i>fimH</i>	184	SNP	95%	L ₇₀₇ -> W ₇₀₇	T->G	Major type1 Untereinheit Fimbrin, D-Mannose spezifische Adhäsion
<i>ompF</i>	30	SNP Intergenic	100%		C->T	Äußeres Membranporin 1a (Ia; b; F)
<i>uxaB</i>	160	SNP Intergenic	98%		G->T	D-Altronat-Oxidoreduktase, NAD-abhängig
<i>ppiC</i>	170	SNP Intergenic	88%		C->T	Peptidyl-prolyl-cis-trans-Isomerase C
<i>gatC</i>	180	Insertion	90%		CC(Insertion)	Galactitol PTS Permease
<i>cstA</i>	130	Deletion	95%	Frameshift	AGT(Deletion)	Kohlenstoff-Hungerprotein, das an der Peptidverwertung beteiligt ist; Aminosäure, Polyamin und Peptid-Transporter-Familienprotein
repeat region	120	Insertion	98%		CG (Insertion)	
<i>ylbE</i>	170	Insertion	94%		G (Insertion)	Pseudogen
<i>aroP</i>	188	Insertion	95%	Frameshift	ATA (Insertion)	Aromatische Aminosäure: H ⁺ -Symporter
<i>mtr</i>	130	Deletion	100%			Tryptophan-Transporter mit hoher Affinität

Tabelle. 38: Genetische Veränderungen in dem unter 4-F-Ind-Selektion evolvierten Derivat F9,5K. Die Genomsequenz und bioinformatische Analysen wurden von Bárbara Moriel (AG Semmler, Robert Koch Institut, Berlin) durchgeführt. SNP, Einzelnukleotidpolymorphismus.

Gene	Abdeckung	Polymorphismus Typ	Variantenfrequenz	Aminosäure Änderung	Codon Änderung	Proteineigenschaften
<i>alaS</i>	148	SNP (transversion)	100.0%	K18->Q18	AAG -> CAG	Alanyl-tRNA-Synthetase
<i>arcB</i>	115	SNP (transition)	98.3%	L275 -> F275	CTT -> TTT	Sensorische Histidin-kinase
<i>aroP</i>	188	SNP (transversion)	99.5%	I342-> M342	ATT -> ATG	Aromatischer Aminosäure-Transporter
<i>aroP</i>	190	Insertion	95.3%	M341-> I341	ATG -> ATT, ATG	Aromatischer Aminosäure-Transporter
<i>aroP</i>	170	SNP (transversion)	100.0%	L337 -> Q337	CTG -> CAG	Aromatischer Aminosäure-Transporter
<i>aroP</i>	124	SNP (transversion)	98.4%	G13-> C13	GGC -> TGC	Aromatischer Aminosäure-Transporter
<i>cho</i>	109	SNP (transition)	99.1%	None?	GCC -> GCT	Endonuklease der Nukleotid-Exzisionsreparatur
<i>cstA</i>	132	Deletion	97.0%	AV176-> A176	GCA, GTG -> GCG	Kohlenstoff-Hungerprotein, das an der Peptidverwertung beteiligt ist; Aminosäure, Polyamin- und Peptid-Transporter-Familienprotein
<i>fimH</i>	126	SNP (transversion)	99.2%	L129 -> W129	TTG -> TGG	Nebenkomponekte der Typ 1 Fimbrien
<i>fre</i>	114	Deletion	94.7%	Frameshift		NAD(P)H-Flavin-Reduktase
<i>glyQ</i>	190	SNP (transition)	99.5%	E47-> G47	GAG -> GGG	Glycin-tRNA-Synthetase, alpha-Untereinheit
<i>mtr</i>	174	Deletion (tandem repeat)	95.4%			Tryptophan-Transporter mit hoher Affinität
<i>ompF</i>	132	SNP (transition)	99.2%	E138-> G138	GAA -> GGA	Äußeres Membranporin 1a (Ia; b; F)
<i>ompF</i>	155	SNP (transition)	98.7%	R63 -> C63	CGT -> TGT	Äußeres Membranporin 1a (Ia; b; F)
<i>rpoS</i>	122	Deletion	96.7%	Frameshift		RNA-Polymerase, Sigma S (Sigma 38) Faktor
<i>tnaB</i>	105	SNP (transversion)	100.0%	I335-> S335	ATC -> AGC	Tryptophan-Transporter mit niedriger Affinität
<i>yecT</i>	37	Insertion	81.1%	Frameshift		Uncharakterisiertes Protein
<i>yecT</i>	37	SNP (transition)	86.5%	None	GAC -> GAT	Uncharakterisiertes Protein
<i>yedN</i>	124	SNP (transition)	100.0%	None	TCT -> TCC	
<i>yhiE</i>	130	SNP (transversion)	99.2%	F369 -> V369	TTC -> GTC	Mutmaßlicher MFS-Transporter; Membranprotein

5.5. Analyse der Effekte der Deletionen in den Genen für die Transporter aromatischer Aminosäuren

Da die Gene für Transportsysteme aromatischer Aminosäuren möglicherweise bevorzugte Ziele für die Fixierung von Mutationen im Verlauf der Adaptation an die Verwendung von 4-A-Ind sind und die Aufnahme der Analogen über diese Transportsysteme stattfindet, wurden die Effekte von gentechnisch generierten Deletionen dieser Gene im Ausgangsstamm G2748 und in den evolvierten Derivaten A5K und F9,5K analysiert.

Mit der "Wanner/Datsenko-Methode" (Datsenko und Wanner, 2000) der Deletion durch homologe Rekombination wurden die Gene *aroP* und *tnaB* in den Evolvaten A5K, F9,5K und dem Ausgangsstamm G2748 deletiert. Zusätzlich wurde *mtr* in G2748 inaktiviert. Die Deletionen der Gene *aroP* und *tnaB* in G2748 zeigten keinen Effekt auf das Wachstum (optische Dichte nach 24 Stunden Inkubation in MS-Glc Medium mit verschiedenen L-Trp Konzentrationen; **Abb. 21**). Im Gegensatz dazu zeigte die *mtr*-Deletion einen hemmenden Effekt auf das Wachstum.

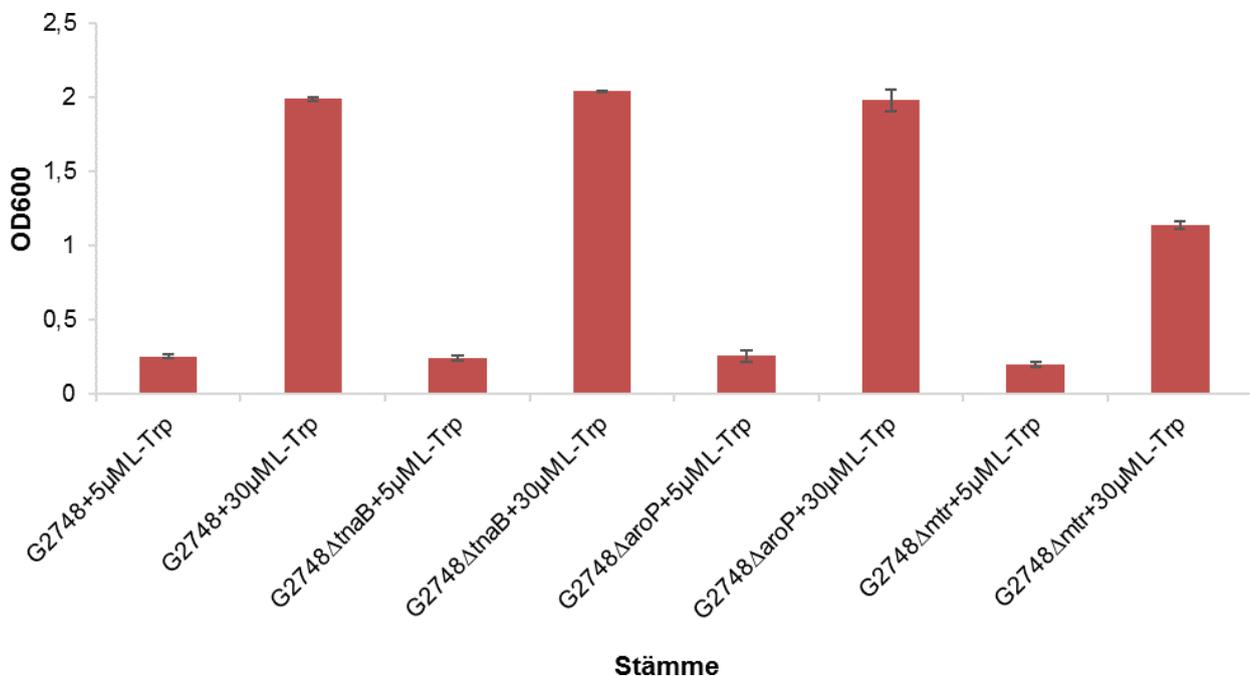


Abb. 21: Wachstumsausbeuten von *E. coli* G2748 und seinen Δ aroP-, Δ mtr- und Δ tnaB-Derivaten in MS-Glc Medium mit verschiedenen L-Trp-Konzentrationen. 5 ml-Batchkulturen wurden über Nacht bei 30°C kultiviert und die optische Dichte der Zellsuspensionen bei 600 nm gemessen. Um Reserven von L-Trp aus Vorkulturen zu verarmen, wurden die Kulturen jeweils drei Mal passagiert. Gezeigt ist die Ausbeute der dritten Passage von drei biologischen Replikaten.

Analysen der Wachstumseigenschaften der Deletionsmutanten des Evolvats A5K zeigten, dass ein Wachstum der $\Delta aroP$ -Mutante in MS-Glc Medium mit L-Trp-Konzentrationen von 5 μ M bis 30 μ M nicht möglich war (dieses Konstrukt trägt außerdem die spontan entstandene partielle Deletion von *mtr*). Die Deletion von *tnaB* in diesem Hintergrund resultierte dagegen in verbessertem Wachstum des Evolvats in Gegenwart von 5 bis 30 μ M L-Trp (**Abb. 22**). Die Funktion von AroP scheint daher kritisch für das Wachstum dieses Derivats in MS-Glc Medium mit L-Trp zu sein. Die Deletionsmutanten *aroP*, *tnaB* und die spontan entstandene partielle Deletion von *mtr* zeigten kein Wachstum in MS-Glc Medium in Anwesenheit von 4-A-Ind.

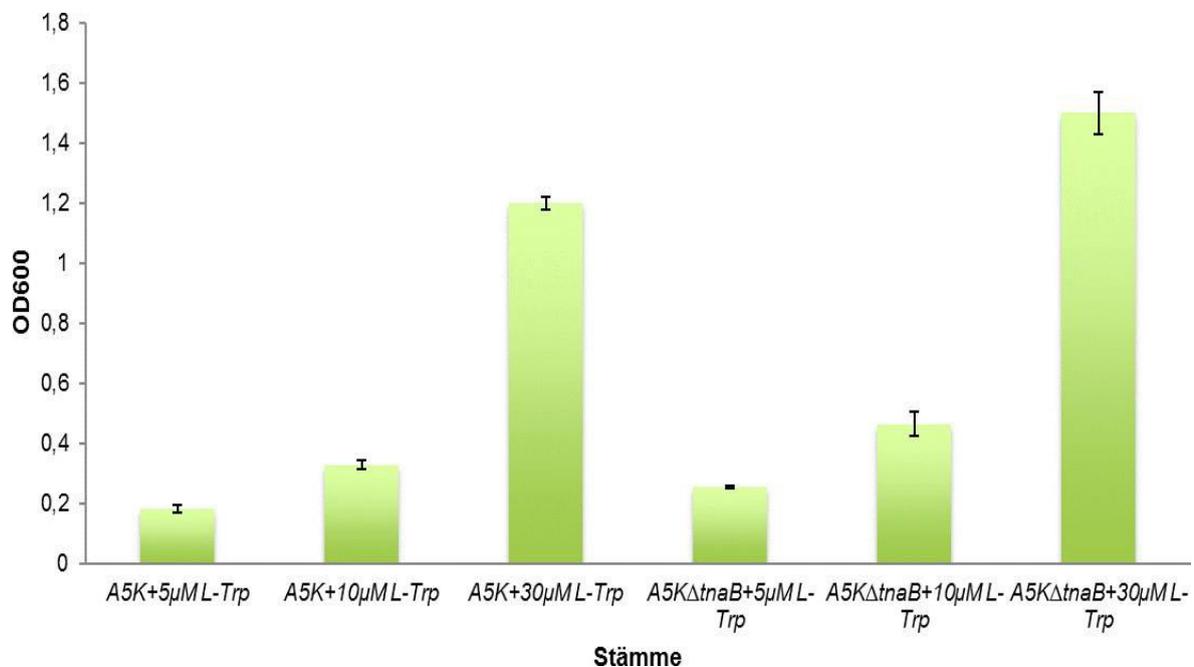


Abb. 22: Wachstumsausbeuten von A5K und seines $\Delta tnaB$ -Derivats in MS-Glc Medium mit verschiedenen L-Trp-Konzentrationen. 5 ml-Batchkulturen wurden über Nacht bei 30°C kultiviert und die optische Dichte der Zellsuspensionen bei 600 nm gemessen. Um Reserven von L-Trp aus Vorkulturen zu verarmen, wurden die Kulturen jeweils drei Mal passagiert. Gezeigt ist die Ausbeute der dritten Passage von drei biologischen Replikaten.

Genauso wie beim Evolat A5K zeigten die Analysen des Wachstums der Deletionsmutanten des Evolvats F9,5K, dass kein Wachstum der $\Delta aroP$ -Mutante in MS-Glc Medium mit L-Trp-Konzentrationen von 30 μ M möglich war. Die Deletion von *tnaB* bei diesem Evolat resultierte dagegen in verbessertem Wachstum des Evolvats in Gegenwart von L-Trp (**Abb. 23**). Die Funktion von AroP scheint daher kritisch für das Wachstum dieses

Derivats in MS-Glc Medium mit L-Trp zu sein. Die Deletionsmutante $\Delta aroP$ wuchs nicht im MS-Glc Medium mit L-Trp.

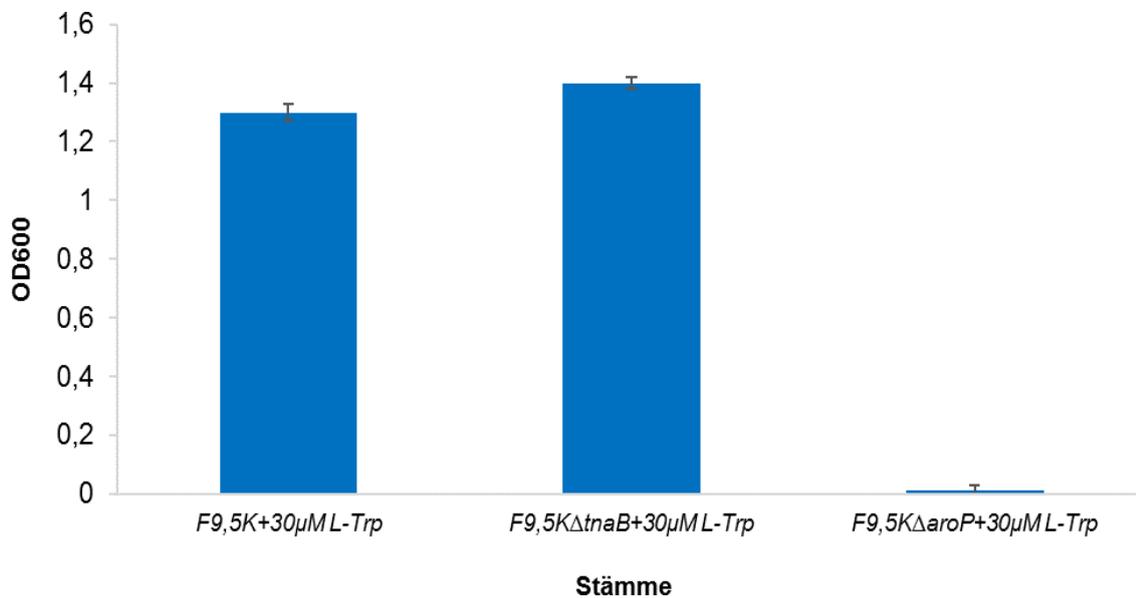


Abb. 23: Wachstumsausbeuten von F9,5K und seinen $\Delta aroP$ - und $\Delta tnaB$ -Derivaten in MS-Glc Medium mit 30 μ M L-Trp. 5 ml-Batchkulturen wurden über Nacht bei 30°C kultiviert und die optische Dichte der Zellsuspensionen bei 600 nm gemessen. Um Reserven von L-Trp aus Vorkulturen zu verarmen, wurden die Kulturen jeweils drei Mal passagiert. Gezeigt ist die Ausbeute der dritten Passage von drei biologischen Replikaten.

Im Gegensatz zu den Evolvaten A5K und F9,5K hatten die Deletionen von *aroP* und *tnaB* beim Evolat A18K (**Abb. 24**) und F18K (**Abb. 25**) keinen Einfluss auf das Wachstum der Evolvate in MS-Glc Medium im Gegenwart von L-Trp.

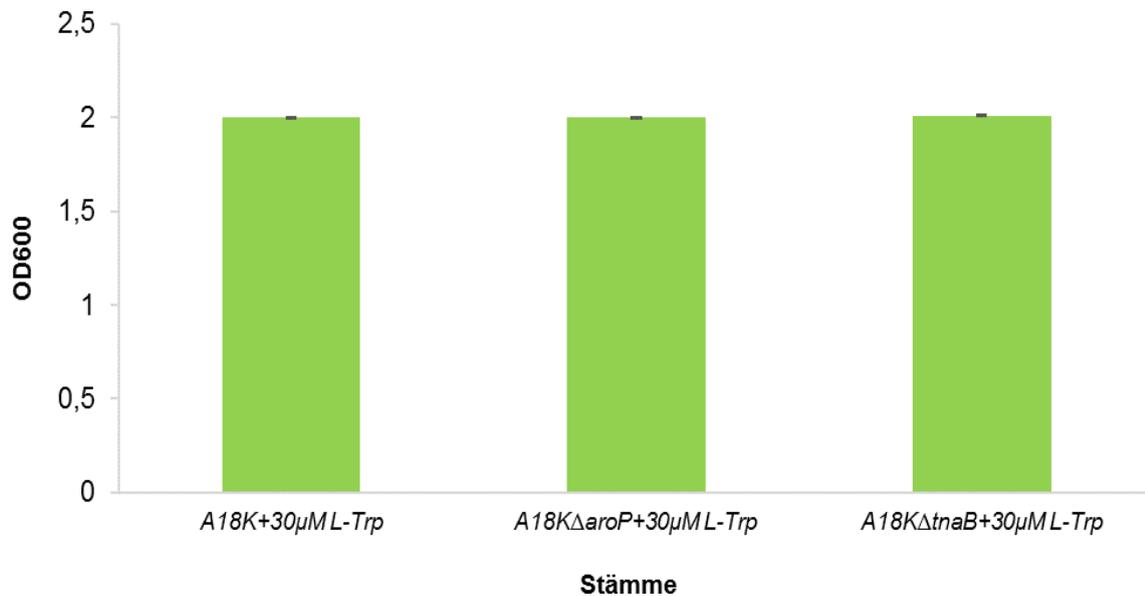


Abb. 24: Wachstumsausbeuten von A18K, seinen $\Delta tnaB$ - und $\Delta aroP$ -Derivaten in MS-Glc Medium mit 30 μM L-Trp. 5 ml-Batchkulturen wurden über Nacht bei 37°C kultiviert und die optische Dichte der Zellsuspensionen bei 600 nm gemessen. Um Reserven von L-Trp aus Vorkulturen zu verarmen, wurden die Kulturen jeweils drei Mal passagiert. Gezeigt ist die Ausbeute der dritten Passage. Drei biologische Replikate aus unabhängigen Vorkulturen.

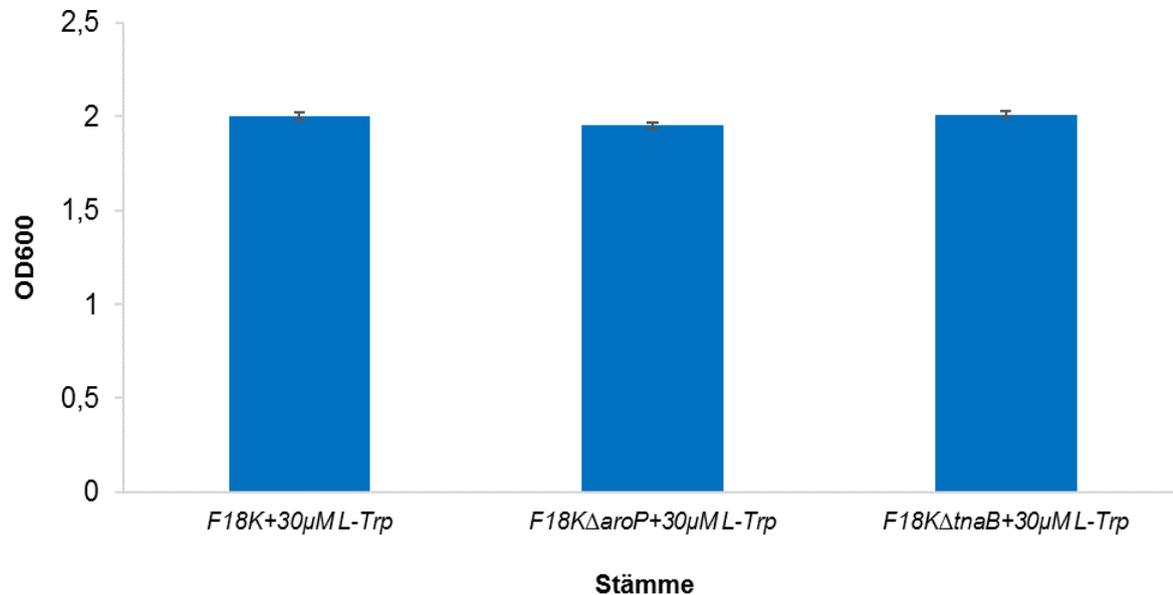


Abb. 25: Wachstumsausbeuten von F18K, seinen $\Delta tnaB$ - und $\Delta aroP$ -Derivaten in MS-Glc Medium mit 30 μM L-Trp. 5 ml-Batchkulturen wurden über Nacht bei 30°C kultiviert und die optische Dichte der Zellsuspensionen bei 600 nm gemessen. Um Reserven von L-Trp aus Vorkulturen zu verarmen, wurden die Kulturen jeweils drei Mal passagiert. Gezeigt ist die Ausbeute der dritten Passage von drei biologischen Replikaten.

5.6. Überprüfung der L-Trp Analoga-Inkorporation durch Chloroform Färbung

Im Laufe des Evolutionsexperiments wurde angenommen, dass einige Proteine in ihren dreidimensionalen Strukturen verändert werden könnten und durch die Anpassung an das Stress-Medium weniger L-Trp in Proteom eingebaut werden könnte. Für eine schnelle Überprüfung dieser Hypothese wurden die Proteinextrakte in Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und mit Chloroform unter UV-Licht (300nm) sichtbar gemacht (Ladner et al., 2004). Die fluoreszierenden Proteinbanden wurden dokumentiert und ihre Intensität mit Hilfe der Software Scion Image 4.0 ausgewertet. Anschließend wurden die Gele mit Coomassie gefärbt und gescannt. Zunächst musste das Proteom aus den zu untersuchenden Stämmen gewonnen werden. Dafür wurden Einzelkolonien der Stämme G2748, A2K, A14K, A18K, F2K, F9,5K und F18K in 5 ml MS-Glc Medium mit 30µM L-Trp inokuliert und bei 30°C über Nacht wachsen gelassen. Am nächsten Tag wurden jeweils 300 µl dieser Vorkulturen in 30 ml MS-Glc Medium mit 30µM L-Trp und in 30 ml MS-Glc Medium mit 30µM L-Trp und 30µM der L-Trp-Analoga überführt. Unterschiede in der Trp-Fluoreszenz zwischen den einzelnen Proben entsprechen grob Unterschieden in den Mengen an aufgetragenem Proteinextrakt. In keinem Fall wurde eine Abwesenheit der Fluoreszenz gefunden, doch können mögliche kleinere Unterschiede im Gehalt an L-Trp in den Proteomen der Evolvate nicht aufgelöst werden.

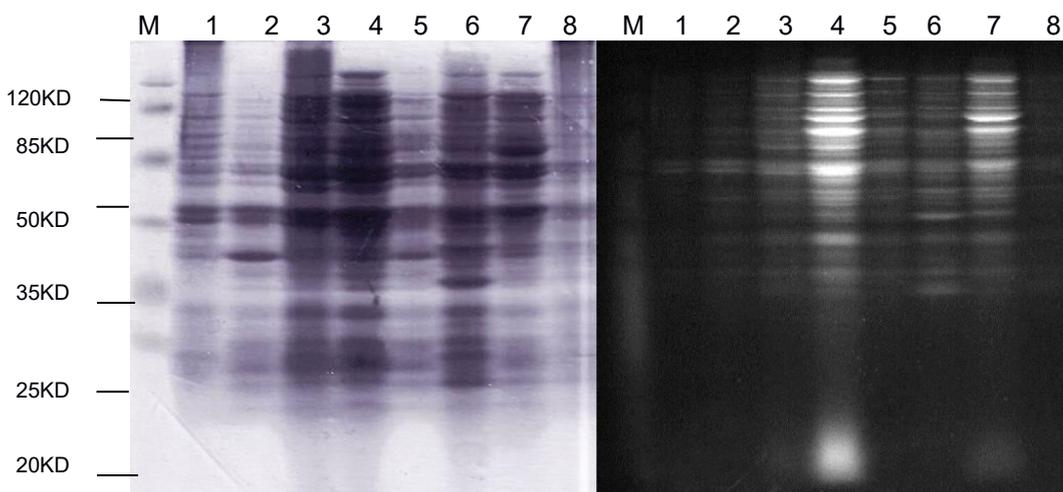


Abb. 26: SDS-PAGE der Proteinextrakte mit Coomassie- und Chloroform-Färbung. Links ist das mit Coomassie und rechts ist das mit Chloroform gefärbte Gel gezeigt; M: Proteinmarker; 1: F2K + 30µM L-Trp + 30µM 4-F-Ind; 2: F2K + 30µM L-Trp; 3: F18K + 30µM L-Trp + 30µM 4-F-Ind; 4: F18K + 30µM L-Trp; 5: A2K + 30µM L-Trp; 6: A21K + 30µM L-Trp +30µM 4-A-Ind; 7: G2748+ 30µM L-Trp; 8: G2748 + 30µM L-Trp + 30µM 4-F-Ind.

.5.7. Überprüfung des Einbaus von L-Trp Analogen in eGFP

Der Einbau von L-Trp-Analoga ins Proteom der Evolvate wurde zusätzlich durch eine Transformation mit dem Plasmid pQE-80L-EGFP-H6, welches ein His₆-markiertes *enhanced green fluorescent Protein* (eGFP) codiert, überprüft. Bei der Durchführung der Chloroform-Färbung (nicht gezeigt) wurde die Anwesenheit von L-Trp im eGFP festgestellt. Ein Einbau der L-Trp-Analoga war nicht nachzuweisen.

5.8. Charakterisierung des evolvierten Derivates F16K

Wie oben beschrieben, zeigt ein Klon des evolvierten Stamms F16K in MS-Glc Medium bei niedrigen L-Trp Konzentrationen und in Anwesenheit von L-Trp-Analoga in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen ein signifikant besseres Wachstum im Vergleich zum Ausgangsstamm. Aufgrund der Anpassung an das Stress-Medium wurde angenommen, dass dieses evolvierten Derivates möglicherweise noch andere L- Trp Analoge tolerieren kann. Deswegen wurde das Wachstum des Klons F16K in MS-Glc Medium mit 4-A-Ind, der nicht-kanonischen Aminosäure [3,2] Tpa (Hoesl et al., 2015) sowie D-Trp getestet.

Abbildung 27 zeigt, dass sich das Wachstum des evolvierten Derivates in Gegenwart von L-Trp und in Gegenwart von L-Trp mit den Analoga in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen kaum voneinander unterschied. Entgegen den Erwartungen wuchs Klon F18K in Gegenwart von D-Trp besser mit maximalen optischen Dichten von ca. 0,7 bis 0,9. Diese Ergebnisse wurden in Gegenwart von D-Trp und den Analoga in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen überprüft, um herauszufinden, ob diese neu entstandene Eigenschaft das Wachstum mit L-Trp Analogen schwächt oder stärkt oder ob sie keinen Einfluss hat.

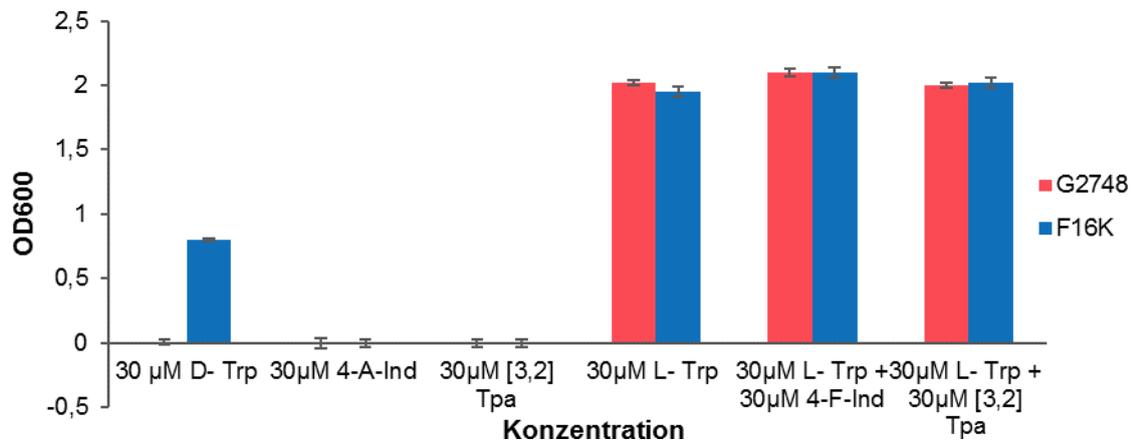


Abb. 27: Wachstumsausbeuten von *E. coli* G2748 und F16K in MS-Glc Medium mit verschiedenen Trp-Analogen und D-Trp. 5 ml-Batchkulturen wurden über Nacht bei 30°C kultiviert und die optische Dichte der Zellsuspensionen bei 600 nm gemessen. Um Reserven von L-Trp aus Vorkulturen zu verarmen, wurden die Kulturen jeweils drei Mal passagiert. Gezeigt ist die Ausbeute der dritten Passage von drei biologischen Replikaten.

Zellen des Klons F16K wuchsen in MS-Glc Medium bei niedriger D-Trp Konzentration von 5 µM in Kombination mit 30 µM 4-F-Ind im Vergleich zum D-Trp alleine zu höherer Dichte (**Abb. 28**). Gleiches ist zu beobachten, wenn die Konzentration von D-Trp auf 30 µM erhöht wurde (Daten nicht gezeigt).

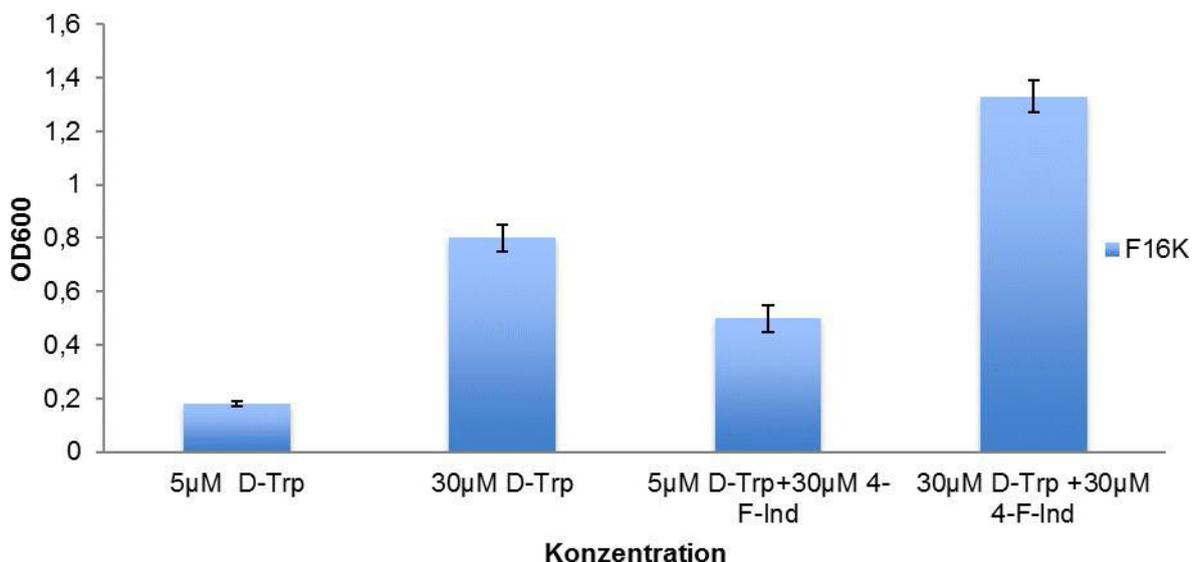


Abb. 28: Wachstumsausbeuten von *E. coli* G2748 und F16K in MS-Glc Medium mit verschiedenen Konzentration von 4-F-Ind und D-Trp. 5 ml-Batchkulturen wurden über Nacht bei 30°C kultiviert und die optische Dichte der Zellsuspensionen bei 600 nm gemessen. Um Reserven von L-Trp aus Vorkulturen zu verarmen, wurden die Kulturen jeweils drei Mal passagiert. Gezeigt ist die Ausbeute der dritten Passage von drei biologischen Replikaten.

5.8.1 Kinetik des Adaptationsprozesses des unter 4-F-Ind-Selektion entstandenen Derivats in Gegenwart von D-Trp

Aufgrund der oben gezeigten Ergebnisse wurde in dem 4-F-Ind Genemat D-Trp anstatt L-Trp ins permissive Nährmedium gegeben. Es wurde angenommen, dass durch Zufuhr von D-Trp statt L-Trp die Anpassung des 4-F- Evolvats an das Stress-Medium verbessert werden kann. Es wurde für ca. 40 Tage im Verlauf der Kultivierung ein Anstieg der Gleichgewichtskonzentration des jeweiligen Analogons beobachtet.

Bei der Zufuhr vom D-Trp statt L-Trp im nicht-permissiven Medium blieb die Verwendung von nicht-permissivem Medium in ca. 40 Tagen über ca. 500 Generationen fast unverändert (Abb. 29).

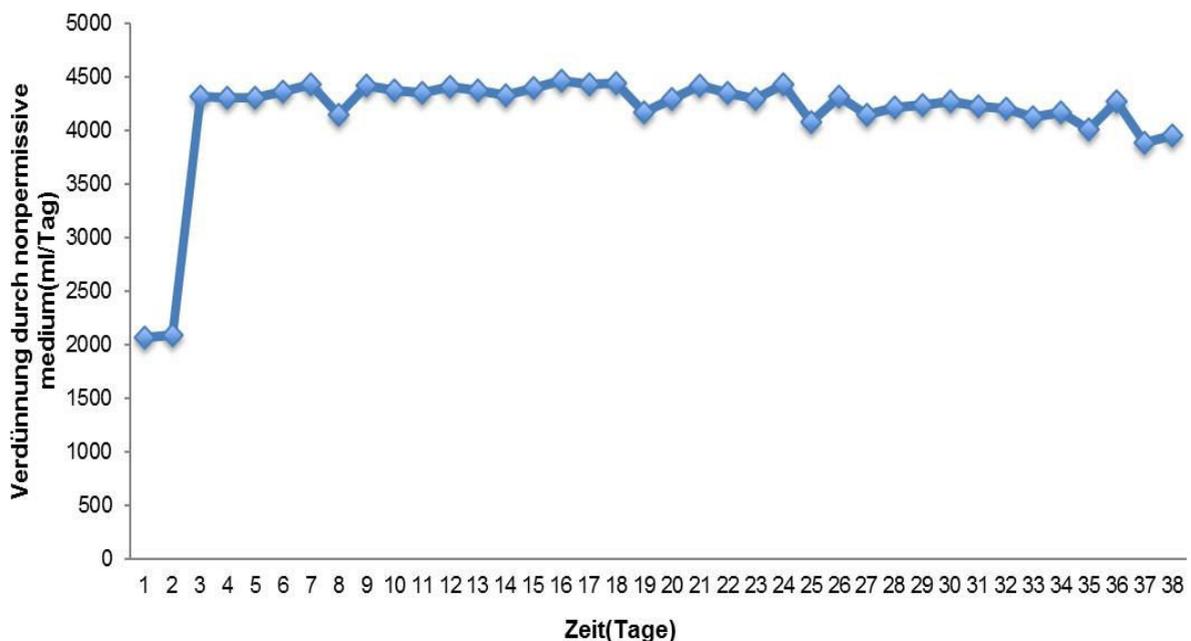


Abb. 29: Evolutionäre Kinetik der Adaptation von Evolvat F18K an 4-F- Indol unter dem modifizierten konditionalen pulse feed-Regime.

Kinetik der Adaptation an 4-F-Ind in kontinuierlicher Kultur bei 30°C für 40 Tage in permissiven Medium: 30 μ M D-Trp und nicht-permissiven Medium 30 μ M 4-F-Ind. Gezeigt ist die Dauer der Verdünnung proTag mit nicht-permissivem Medium.

5.8.2 Charakterisierung des F-evolvierten Klons F18,5K unter dem D-Trp Regime

Die Wachstumseigenschaften des unter 4-F-Ind-Selektion entstandenen Derivates F18,5K (nicht gezeigt) in MS-Glc Medium bei verschiedenen D-Trp Konzentrationen und verschiedenen Konzentrationen des 4-F-Ind unterscheiden sich kaum von den

Wachstumseigenschaften des Klons F16K. Auch im Gegenwart von 4-F-Ind (**Abb. 30 und Abb. 31**) und in der Abwesenheit von D-Trp oder L-Trp in MS-Glc Medium sind die Wachstumsausbeuten des Klons F18,5K und des Klons F16K fast gleich, besser als die Wachstumsausbeute des Klons F2K und des Klones F9,5K. Warum das Wachstum des Klons F9,5 geringer als der anderen war, wird im Kapitel 6.3 näher erläutert.

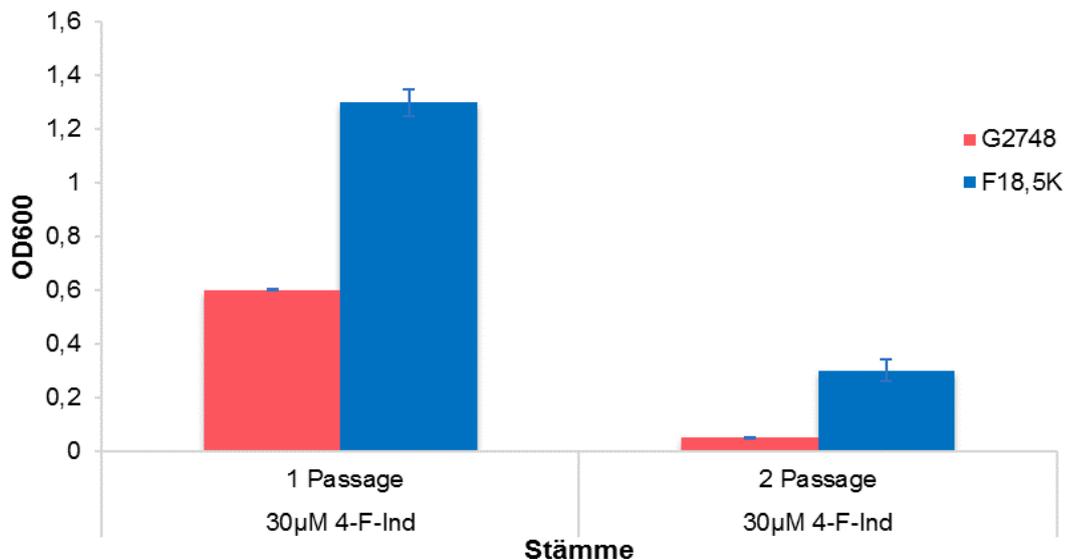


Abb. 30: Wachstumsausbeuten von *E. coli* G2748 und F18,5K in MS-Glc Medium mit 30 µM 4-F-Ind. 5ml-Batchkulturen wurden über Nacht mit 30 µM 4-F-Ind bei 30°C kultiviert und in MS-Glc Medium mit 30 µM 4-F-Ind zweimal passagiert. Die optische Dichte der Zellsuspensionen jeder Passage wurde bei 600 nm gemessen. Gezeigt ist die Ausbeute der zwei Passagen von drei biologischen Replikaten.

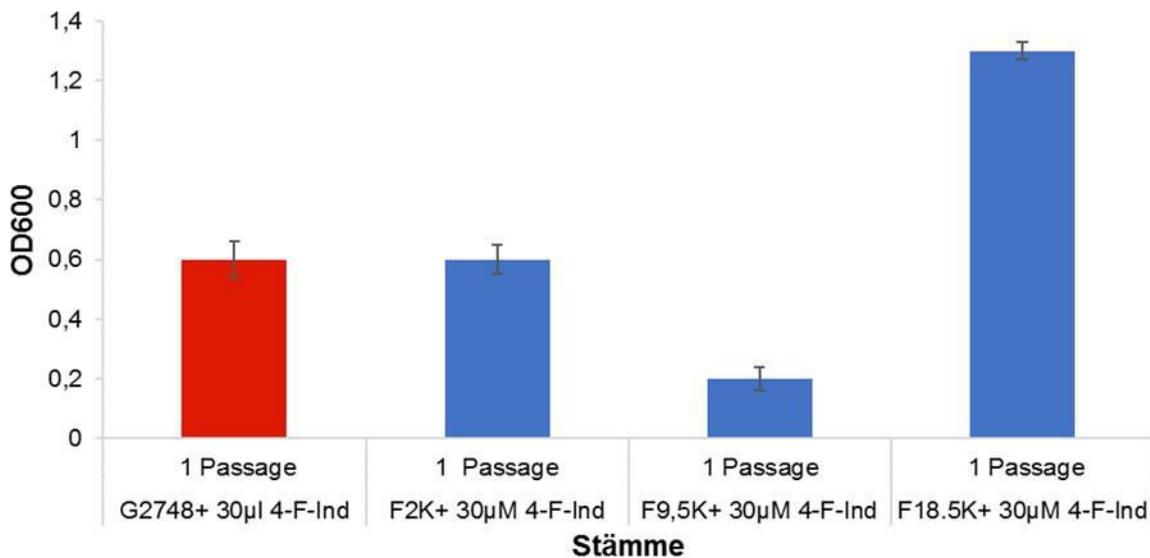


Abb.31: Wachstumsausbeuten von *E. coli* G2748 und den evolvierten Derivaten F2K, F9,5K und F18,5K in MS-Glc Medium mit 30μM 4-F-Ind. 5 ml-Batchkulturen wurden über Nacht bei 30°C kultiviert und die optische Dichte der Zellsuspensionen bei 600 nm gemessen. Gezeigt ist die Ausbeute der ersten Passage von drei biologischen Replikaten.

5.8.3 Genetische Veränderungen in dem Evolat F18,5K

Die Genomsequenz des Klons F18,5K wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Torsten Semmler analysiert. Tabelle 39 zeigt 28 Mutationen in kodierenden Regionen. Die 102 Mutationen in nicht-kodierenden Regionen sind nicht gezeigt. Tabelle 39 fasst die nach 500 Generationen unter 4-F-Ind-Selektion und D-Trp gefundenen Mutationen und die nach 18000 Generationen unter 4-F-Ind und L-Trp gefundenen Mutationen in dem Klon F18,5K zusammen. Auffällig ist hier, dass im Gen *aroP* neue Mutationen zusätzlich zu denen in dem Klon F9,5K entstanden sind. Diese Mutationen umfassen den Austausch von Phenylalanin zu Valin an der Stelle 134 und die Insertion von Isoleucin an der Stelle 411. Es wurden auch zwei Mutationen entdeckt, die die D-Aminosäure-Dehydrogenase (*dadA*-Gen) betreffen. Dabei handelt es sich um den Austausch von Leucin zu Arginin an der Stelle 292 und von Lysin zu Glutamin an der Stelle 297.

Tabelle. 39: Genetische Veränderungen in dem unter 4-F-Ind-Selektion evolvierten Derivat F18,5K. Die Genomsequenz und Bioinformatische Analysen wurden von Bárbara Moriel (AG Torsten Semmler, Robert Koch Institut, Berlin) durchgeführt. Die gelben Markierungen bezeichnen die neu entstandenen Mutationen im Derivat F18,5K.

Gene	Abdeckung	Polymorphismus Typ	Varianten- frequenz	Aminosäure Änderung	Codon Änderung	Proteineigenschaften
<i>yhjE</i>	68	Substitution	100.0%	M ₂₅₇ -> T ₂₅₇	ATG -> ACG	Mutmaßlicher MFS-Transporter; Membranprotein
<i>yhjE</i>	75	Substitution	100.0%	F ₃₆₂ -> V ₃₆₂	TTC -> GTC	Mutmaßlicher MFS-Transporter; Membranprotein
<i>yhjE</i>	52	Substitution	100.0%	A ₄₀₂ -> D ₄₀₂	GCC -> GAC	Mutmaßlicher MFS-Transporter; Membranprotein
<i>yedN</i>	20	None	100.0%		TCT -> TCC	Pseudogen, IpaH / YopM Familie
<i>tnaB</i>	41	Substitution	97.6%	I ₃₄₉ -> S ₃₄₉	ATC -> AGC	Tryptophan-Transporter mit niedriger Affinität
<i>rpoS</i>	74	Frame Shift	100.0%			RNA-Polymerase, Sigma S (Sigma 38) Faktor
<i>rpoC</i>	58	Substitution	100.0%	K ₇₈ -> Q ₇₈	AAA -> CAA	RNA-Polymerase, Beta-Prime-Untereinheit
<i>rplE</i>	70	Substitution	100.0%	T ₁₀₅ -> N ₁₀₅	ACT -> AAT	50S ribosomales Untereinheitsprotein L5
<i>ompF</i>	71	Substitution	100.0%	E ₁₃₉ -> G ₁₃₉	GAA -> GGA	Äußeres Membranporin 1a (Ia; b; F)
<i>ompF</i>	73	Substitution	100.0%	R ₆₃ -> C ₆₃	CGT -> TGT	Äußeres Membranporin 1a (Ia; b; F)
<i>nlpl</i>	56	Frame Shift	100.0%			Lipoprotein, das an osmotischer Sensitivität und Filamentation beteiligt ist
<i>mtr</i>	80	Frame Shift Deletion	100.0%			Tryptophan-Transporter mit hoher Affinität
<i>glyQ</i>	55	Substitution	100.0%	E ₄₈ -> G ₄₈	GAG -> GGG	Glycin-tRNA-Synthetase, alpha-Untereinheit
<i>fre</i>	47	Frame Shift	97.9%			NAD (P) H-Flavin-Reduktase
<i>fimH</i>	44	Substitution	100.0%	L ₁₃₀ -> W ₁₃₀	TTG -> TGG	Nebenkomponekte des Typs 1 Fimbrien
<i>elaD</i>	48	Frame Shift	100.0%			Protease, die in der Lage ist, ein AMC-Ubiquitin-Modellsubstrat zu spalten
<i>dadA</i>	55	Substitution	100.0%	L ₂₉₃ -> R ₂₉₃	CTT -> CGT	D-Aminosäure-Dehydrogenase
<i>dadA</i>	53	Substitution	81.1%	K ₂₉₇ -> Q ₂₉₇	AAA -> CAA	D-Aminosäure-Dehydrogenase
<i>cstA</i>	60	Deletion	100.0%	AV ₈₆ -> A ₈₆	GCA, GTG -> GCG	Galactitol PTS Permease

						Kohlenstoff-Hungerprotein, das an der Peptidverwertung beteiligt ist; Aminosäure, Polyamin und Peptid-Transporter-Familienprotein
cho	44	None	100.0%		GCC -> GCT	Endonuklease der Nucleotid-Exzisionsreparatur
aroP	70	Substitution	100.0%	I ₄₁₉ -> M ₄₁₉	ATT -> ATG	Aromatischer Aminosäure-Transporter
aroP	74	Insertion	100.0%	F ₄₁₂ -> F ₄₁₂	TTT -> TTT, ATT	Aromatischer Aminosäure-Transporter
aroP	74	Substitution	100.0%	L ₃₇₀ -> Q ₃₇₀	CTG -> CAG	Aromatischer Aminosäure-Transporter
aroP	51	Substitution	82.4%	F ₁₃₄ -> V ₁₃₄	TTT -> GTT	Aromatischer Aminosäure-Transporter
aroP	33	Substitution	100.0%	G ₁₃ -> C ₁₃	GGC -> TGC	Aromatischer Aminosäure-Transporter
arcB	57	Substitution	100.0%	L ₂₇₅ -> F ₂₇₅	CTT -> TTT	Sensorische Histidinkinase
adk	52	Substitution	100.0%	D ₁₅₈ -> E ₁₅₈	GAT -> GAA	Adenylatkinase
alaS	35	Substitution	100.0%	K ₁₈ -> Q ₁₈	AAG -> CAG	Alanyl-tRNA-Synthetase

6. Diskussion

Für die *in vivo*-Evolution wurden kontinuierliche Kultivierung eines L-Trp-auxotrophen *E. coli* Derivats in zwei Genematen durchgeführt. Dabei sollte eine L-Trp-auxotrophe Mutante (G2748, $\Delta trpEDLC/\Delta trnA$) des *E. coli* Prototyps MG1655 unter den 4-A-Ind und 4-F-Ind Analogen kultiviert werden, ihre Auswirkungen analysiert und Genomsequenzierungen der entstandenen Evolvate durchgeführt werden. Hierzu wurden die Bakterien in kontinuierlicher Kultur im Genemat in einem *konditionalen pulse feed*-Regime über ca. 18.000 (4-A-Ind) bzw. 18.500 (4-F-Ind) Generationen kultiviert.

6.1 Kinetik des Adaptationsprozesses

Die Technologie der kontinuierlichen Kultivierung ist ein ausgezeichnetes Werkzeug für die experimentelle Evolution von großen Populationen von Zellen unter streng kontrollierten, selektiven Laborbedingungen.

In dem Evolutionsexperiment wurden anfänglich Ind im permissiven Medium und die Ind-Analoga im nicht-permissiven Medium verwendet. Weil Ind unter Sauerstoffeinfluss sehr schnell oxidiert und dann nicht mehr für die Synthese von L-Trp verwendet werden kann, wurde L-Trp statt Ind im permissiven Medium verwendet.

In dem Experiment mit den Analog-Vorstufen 4-A-Ind und 4-F-Ind in kontinuierlicher Suspensionskultur konnten keine Evolvate, welche alleine mit diesen Analogen wachsen können, erzeugt werden. Die physikochemischen Eigenschaften der Analoga und die daraus resultierenden mehr oder weniger drastischen Störungen von Proteinstrukturen spielen offenbar wichtige Rollen beim Tempo der Evolution.

In beiden Experimenten zeigten sich "zähe" Adaptationskinetiken, was darauf hinweist, dass eine Vielzahl an individuellen Mutationen zu steigender Fitness beitragen muss. Welcher Natur diese Mutationen sind, kann aus den Genomsequenzen der evolvierten Derivate erschlossen werden.

6.2 Charakterisierung unter 4-F-Trp Selektion entstandener evolvierter Derivate

im Verlauf der Kultivierung des Evolvats 4-F-Trp wurde ein Anstieg der *Gleichgewicht*-konzentration von 4-F-Ind über ca. 18.500 Generationen beobachtet. Deswegen wurden die Wachstumseigenschaften von verschiedenen Klonen des 4-F-Evolvats charakterisiert. Die Wachstumsausbeute des Evolvats F18K nahm in LB-Medium (**Abb. 20**) mit einer Generationszeit von 159 Minuten im Vergleich zu G2748 signifikant ab. Die Genomsequenz des Evolvats F18,5K zeigt, dass eine Deletion in *cstA* entstanden ist. Es wurde ein Hinweis darauf gefunden, dass CstA an der Peptidabbaubeteiligt ist (Schultz und Matin, 1991). Es ist möglich, dass das CstA Protein zum Abbau L-Trp-haltiger Peptide in LB Medium führt und die Deletion von Valin (GTG Deletion) die Abnahme des Abbaus L-Trp-haltiger Peptide verursacht, so dass die Evolvate nicht mehr gut in LB-Medium wachsen können. In dem verwendeten Regime ist die *cstA* Mutation neutral und kann das Wachstum in MS-Glc-Medium hemmen.

Es wurde gezeigt (**Abb. 32**), dass das Evolat F18,5K in MS-Glc Medium mit 4-F-Ind im Vergleich zu G2748, F2K und F9,5K besser wächst: die OD₆₀₀ des Evolvats F18,5K in ersten Passage betrug 1.2. Ob das Evolat F18,5K die toxische Wirkung des Analogs besser tolerieren kann und ob eine Fraktion der zellulären Proteine oder eine Fraktion der L-Trp Reste in bestimmten Proteinen in diesen Zellen mit 4-F-Trp funktionell ist, sollte weiter untersucht werden.

6.3 Analyse der Effekte von Deletionen der Gene für Transporter aromatischer Aminosäuren im Ausgangsstamm und in 4-F-Trp evolvierten Derivaten

Die Ursachen der niedrigeren Wachstumsausbeuten und längeren Generationszeiten von F16K und F18K liegen möglicherweise auch in veränderten Affinitäten der Transportsysteme für aromatische Aminosäuren. Die Genomsequenz des Evolvats F9,5K zeigte, dass die Gene für die drei Transporter für aromatische Aminosäuren *aroP*, *tnaB* und

mtr nicht-synonyme Mutationen (*aroP*, *tnaB*) sowie eine Deletion (*mtr*) erfahren haben. Mtr hat eine hohe Affinität für L-Trp (K_m ca. 3 μ M) (Brown, 1970) und kann außerdem Ind transportieren (Yanofsky et al., 1991). Die Deletion im *mtr*-Gen führt wahrscheinlich zu einer Inaktivierung des Proteins und kann somit die niedrigere Wachstumsausbeute in Gegenwart von L-Trp erklären.

Durch die Deletion in Mtr wird die Anreicherung von 4-F-Ind in der Zelle verringert, so dass die toxische Wirkung des Analogs und die Störung von Proteinstrukturen abnimmt. Es ist bereits bekannt, dass die Transportsysteme der Aminosäure nicht in der Lage sind, zwischen chemisch- und sterisch ähnlichen Aminosäuren zu unterscheiden (Krämer, 1994; Giese et al., 2008; Budisa, 2004).

Es ist ebenfalls bekannt, dass AroP und TnaB mit einer K_m von weniger als 1 μ M, beziehungsweise mit einer K_m von etwa 70 μ M L-Trp transportieren (Brown, 1970). Analysen der Wachstumseigenschaften der in dieser Arbeit erzeugten Δ *aroP*-Mutante des Evolvats F9,5K (die außerdem die spontan entstandene teilweise Deletion von *mtr* trägt) zeigten, dass kein Wachstum der Δ *aroP*-Mutante in MS-Glc Medium mit L-Trp in Konzentrationen von 5 μ M bis 30 μ M möglich war. Dies zeigt, dass die Funktion von AroP für das Wachstum dieses Derivats in MS-Glc Medium mit L-Trp nötig ist. Die entstandene nicht-synonyme Mutation in AroP hilft vermutlich den Zellen in MS-Glc Medium in Gegenwart von L-Trp wieder gut zu wachsen somit die niedrigere Wachstumsausbeute in Gegenwart von L-Trp durch die Inaktivierung von Mtr zu überwinden. Diese Hypothese wird durch die Analysen der Wachstumseigenschaften der in dieser Arbeit erzeugten Δ *tnaB*-Mutante (die außerdem die spontan entstandene teilweise Deletion von *mtr* trägt) bestärkt. Die Wachstumseigenschaften zeigen, dass die Deletion von *tnaB* vor diesem Hintergrund in verbessertem Wachstum des Evolvats in Gegenwart von 5 bis 30 μ M L-Trp resultierte. Diese Beobachtung ähnelt den Analysen der Wachstumseigenschaften der Deletionsmutanten des Evolvats A5K.

Die Wachstumseigenschaften der Deletionsmutanten F18K Δ *tnaB* und F18K Δ *aroP* zeigen, dass die Zellen mit L-Trp in MS-Glc Medium wieder wachsen können und eine Wachstumsausbeuten bis zu fast 2,0 OD₆₀₀ erreicht wurde. Die Genomsequenz des

Evolvats F18,5K zeigt zwei neue nicht-synonyme Mutationen im Gen *yhiE*. Diese zwei Mutationen umfassen den Austausch von Methionin zu Threonin an der Stelle 256 und den Austausch von Alanin zu Asparaginsäure an der Stelle 402. Ob diese Mutationen für die Verbesserung des Wachstums in MS-Glc Medium mit L-Trp verantwortlich sind, ist fraglich und es sollte weiter untersucht werden. YhiE ist eine Permease (Zellmembran-Protein), die zur MFS Superfamilie gehört (Saier et al., 1999; Pao et al., 1998). Die MFS -Superfamilie ist für den Transport einfacher Zucker, Oligosaccharide, Inositol, Aminosäuren und einer Vielzahl von organischen und anorganischen Anionen und Kationen zuständig (Referenz).

6.4 Das Wachstum des Klons F18K in MS-Glc Medium mit D-Trp

Im 4-F Genemat wurde nach 40 Tagen (ca. 500 Generationen) Kultivierung des Evolvats F18K mit D-Trp in nicht-permissivem Medium (**Abb. 27**) keine große Veränderung beobachtet. Die Transformation der Zellen mit dem Plasmid pQE-80L-EGFP-H6, um die Umwandlung von D-Trp in L-Trp oder den Einbau von D-Trp in das eGFP-Protein festzustellen, war erfolglos. Die Genomsequenz des Evolvats F18,5K zeigt zwei Mutationen, die die D-Aminosäuren Dehydrogenase (*dadA*) betreffen. Diese zwei Mutationen umfassen den Austausch von Leucin zu Arginin an der Stelle 292 und den Austausch von Lysin zu Glutamin an der Stelle 297. Die D-Aminosäure-Dehydrogenase übernimmt die Rolle des katalysators der oxidativen Desaminierung von D-Aminosäuren. Ihre breite Substratspezifität umfasst D-Alanin und in geringerem Umfang andere D-Aminosäuren wie D-Methionin, D-Serin und D-Prolin. DadA ist auch an der Verwendung von D-Aminosäure-Analogen wie 3,4-Dehydro-D-prolin, D-2-Aminobutyrat, D-Norvalin, D-Norleucin, cis-4-Hydroxy-D-prolin und DL-Ethionin beteiligt (Franklin und Venables, 1976; Wild und Klopotoski, 1981). Es wurde gefunden (Hadar et al., 1976), dass eine unbekannt Mutation im *dadA* Gen zur Nutzung von D-Trp führt und der Enzymvariante erlaubt, D-Trp zu L-Trp umzuwandeln. Für die Ausnutzung von D-Trp hat Hadar einen Weg vorgeschlagen, der auf drei Schritten basiert (Abb. 33). Dieser Weg könnte durch das Ausschalten von *tnaB* und *aroP* und *tyrB* (Transaminase) überprüft werden. Durch Expression der *dadA*-Variante in *E. coli* G2478 kann getestet werden, ob die entstandenen Mutationen im *dadA* Gen die Verwertung von D-Trp tatsächlich verursacht und die Verwertung von 4-F-Ind beeinflusst.

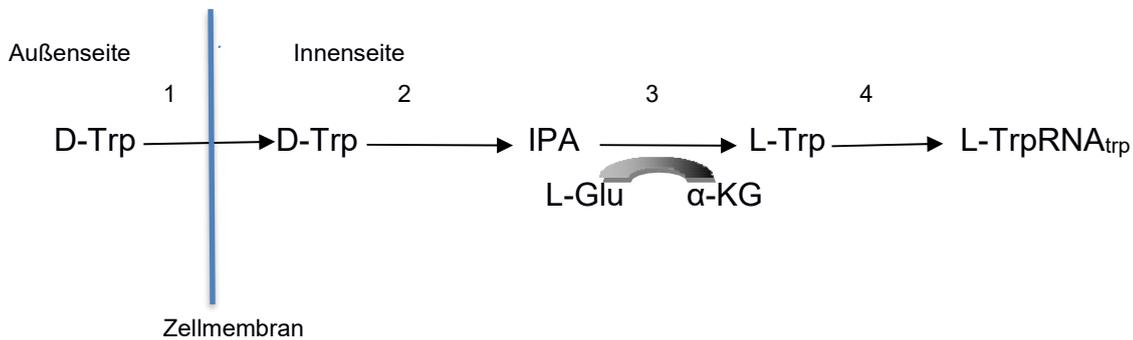


Abb. 33: Schematische Darstellung des vorgeschlagenen Wegs für die Umwandlung von D-Trp zu L-Trp in der *dadA* Mutante.

1, L-Trp / Ind:H⁺-Symporter (Mtr; hier kommen TnaB und AroP in Frage, weil Mtr nicht mehr inaktiv ist.) 2, D-Trp Oxidase (*DadA*); 3, Transaminase A; 4, Tryptophanyl-tRNA Synthetase; IPA, Indol-Brenztraubensäure; α-KG, α-Ketoglutarat (Hadar et al., 1976).

6.5 Charakterisierung unter 4-A-Ind-Selektion entstandener evolvierter Derivate

Im Verlauf der Kultivierung des 4-A-Trp Evolvates wurde ein sehr langsamer Anstieg der *Gleichgewicht*-Konzentration von 4-A-Ind über ca. 18.000 Generationen beobachtet. Die Wachstumseigenschaften der unter 4-A-Ind-Selektion evolvierten Derivate haben sich in MS-Glc Medium mit L-Trp und dem 4-A-Ind ab 14.000 Generationen verbessert. In vorherigen Phasen des Evolutionsprozesses wurde keine signifikante Veränderung der Wachstumsausbeuten der unter 4-A-Ind-Selektion evolvierten Derivate in LB-Medium und in MS-Glc Medium im Gegenwart von L-Trp und den Analogon in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen beobachtet. Es wurden die Wachstumseigenschaften verschiedener Klonen des 4-A- Evolvats charakterisiert.

Die Wachstumsausbeute des Evolvats A18K nahm in LB-Medium (**Abb. 11**) im Vergleich zum A2K Klon und G2748 deutlich ab. Es wurde beobachtet, dass sich die Generationszeit für das Evolat A18K um 28 Minuten verlängert hat. Abbildung 14 zeigt auch, dass das Evolat A18K in MS-Glc Medium mit 4-A-Ind im Vergleich zu G2748, A2K besser adaptiert ist. Die Wachstumsausbeute des Evolvats A18K erreichte in erster Passage einen Wert

von bis zu 1.2 OD₆₀₀. Ob das Evolat A18K die toxische Wirkung des Analogs besser tolerieren kann ist fraglich und sollte weiter untersucht werden.

6.6 Analyse der Effekte von Deletionen der Gene für Transporter aromatischer Aminosäuren im Ausgangsstamm und in 4-A-Trp evolvierten Derivaten

Hier zeigten auch die Analysen der Wachstumseigenschaften der Deletionsmutanten des Evolats A5K wie beim Evolat F9,5K, dass kein Wachstum der *aroP*-Mutante in MS-Glc Medium mit L-Trp-Konzentrationen von 5µM bis 30µM möglich war. Dieser Befund stärkt die Schlussfolgerung, dass die Funktion von AroP kritisch für das Wachstum dieses Derivats in MS-Glc Medium mit L-Trp sein könnte.

Die Analyse der Wachstumseigenschaften der Deletionsmutanten des Evolats A18K und des Evolats F18K zeigen, dass die Zellen mit L-Trp in MS-Glc Medium wieder gut wachsen können und eine OD₆₀₀ von fast 2,0 erreicht wurde. Die Genomsequenzierung des Evolates A18K sollte durchgeführt werden, um festzustellen, ob es eine Mutation gibt, die die Aufnahme von 4-A-Ind positiv beeinflusst.

7. Ausblick

In dem Experiment in kontinuierlicher Suspensionskultur mit den Analog-Vorstufen 4-A-Ind und 4-F-Ind konnten keine Evolvate erzeugt werden, die die Analoge ins Proteom einbauen. In der Schlussphase wurden Evolvate identifiziert, die in der Lage sind, in Gegenwart von Analogen kurzfristig in bis zu zwei Passagen zu wachsen. Die Experimente sollten deshalb weitergeführt werden. Um festzustellen, ob eine Fraktion der zellulären Proteine oder eine Fraktion der L-Trp-Reste in bestimmten Proteinen in diesen Zellen mit L-Trp-Analogen funktionell ist, sollten weitere biochemische Assays wie Aminosäure-Analyse, Massenspektrometrie, UV-Absorptions- und Fluoreszenzmessungen durchgeführt werden.

Die Genomsequenz des Evolvats F18,5K hat mehrere neue nicht-synonyme Mutationen gezeigt. Damit klar wird, wie sich diese Mutationen auswirken bzw. ob sich dadurch das katalytische Zentrum oder Protein-Eigenschaften ändern und ob diese Mutationen überhaupt die Aufnahme der Analoga beeinflussen, sollten die betroffenen Gene einzeln und kombinatorisch im Ausgangs-Stamm G2748 kloniert und auf ihren jeweiligen Einfluss hin getestet werden.

Überraschend und bislang völlig ungeklärt ist der Befund, dass die Klone F16K und F18K in MS-Glc Medium mit D-Trp gut wachsen konnten. Ob es einen Zusammenhang zwischen der Durchführung des Experiments mit L-Trp-Analogen und diesem Befund gibt oder ob D-Trp in L-Trp umgewandelt wird und wenn ja, wie genau das passiert oder ob D-Trp direkt in das Proteom eingebaut wird, ist in weiterführenden Forschungsarbeiten zu klären. Somit sollte das Wachstum der Evolvate mit D-Trp in permissivem Nährmedium in kontinuierlicher Kultur im Genemat in einem *konditionalen pulse feed*-Regime durchgeführt werden und im Verlauf der Kultivierung der Anstieg der *Gleichgewicht*-Konzentration des jeweiligen Analogs beobachtet werden.

Der Einfluss der unbekanntenen Mutation im Gen *dadA* sollte weiter analysiert werden, um die Schlussfolgerung von Hader (Hadar et al., 1976) nachzuvollziehen, die *dadA* für die Nutzung von D-Trp und die Umwandlung D-Trp zu L-Trp verantwortlich macht.

8. Literaturverzeichnis

- Alkhalaf, LM. und Ryan, KS. (2015). Biosynthetic Manipulation of Tryptophan in Bacteria: Pathways and Mechanisms. *Chem Biol.* 22, 317-328.
- Anderson, P. (1953). Automatic recording of the growth rates of continuously cultured microorganisms. *J Gen Physiol.* 36, 733-737.
- Bacher, JM. und Ellington, AD. (2001). Selection and Characterization of Escherichia coli Variants Capable of Growth on an Otherwise Toxic Tryptophan Analogue. *J Bacteriol.* 183, 5414–5425.
- Blattner, FR., Plunkett, G. 3rd., Bloch, CA., Perna, NT., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, JD., Rode, CK., Mayhew, GF., Gregor, J., Davis, NW., Kirkpatrick, HA., Goeden, MA., Rose, DJ., Mau, B. und Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. *Science.* 277, 1453-1462.
- Blount, ZD., Borland, CZ. und Lenski, RE. (2008). Historical contingency and the evolution of a key innovation in an experimental population of Escherichia coli. *PNAS.* 105, 7899-7906.
- Brawerman, G. und Ycas, M. (1950). Incorporation of the amino acid analog tryptazan into the protein of Escherichia coli. *Arch Biochem Biophys.* 68, 112-117.
- Bronskill, PM. und Wong, JT. (1988). Suppression of fluorescence of tryptophan residues in proteins by replacement with 4-Fluortryptophan. *Biochem J.* 249, 305-308.
- Brown, K. (1970). Formation of aromatic amino acid pools in Escherichia coli K-12. *J Bacteriol.* 104, 177-188.
- Browne, DR., Kenyon, GL. und Hegeman, GD. (1970). Incorporation of monofluorotryptophans into protein during the growth of Escherichia coli. *biochem biophys res commun.* 39, 13-19.
- Bryson, V. und Szybalski, W. (1952). Microbial Selection. *Science.* 116, 43–51.
- Buckling, A., Craig Maclean, R., Brockhurst, MA., und Colegrave, N. (2009). The Beagle in a bottle. *Nature.* 457, 824–829.
- Budisa, N. (2004). Prolegomena to future experimental efforts on genetic code engineering by expanding its amino acid repertoire. *Angew Chem Int Ed Engl.* 43, 6426-6463.
- Budisa, N. und Pal, PP. (2004). Designing novel spectral classes of proteins with a tryptophan-expanded genetic code. *Biol Chem.* 385, 893-904.
- Budisa, N., Alefelder, S., Bae, J. H., Golbik, R., Minks, C., Huber, R. und Moroder, L. (2001). Proteins with β -(thienopyrrolyl)alanines as alternative chromophores and pharmaceutically active amino acids. *Protein Sci.* 10, 1281–1292.

- Cash, MT., Schreiner, PR. und Phillips, RS. (2005). Excited state tautomerization of azaindole. *Org Biomol Chem.* 3, 3701-3706.
- Chao, L. und Ramsdell, G. (1985). The effects of wall populations on coexistence of bacteria in the liquid phase of chemostat cultures. *J Gen Microbiol.* 131, 1229-1236.
- Cherepanov, PP. und Wackernagel, W. (1995). Gene disruption in Escherichia coli: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene.* 158, 9-14.
- Cowie, DB. und Cohen, GN. (1957). Biosynthesis by Escherichia coli of active altered proteins containing selenium instead of sulfur. *Biochim Biophys Acta.* 26, 252-261.
- Datsenko, KA. und Wanner, BL. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 6640-6645.
- Döring, V. M., Hendrickson, TL., de Crécy-Lagard, V., Schimmel, P. und Marlière, P. (2001). Enlarging the amino acid set of Escherichia coli by infiltration of the valine coding pathway. *Science.* 292, 501-504.
- Doublet, B., Douard, G., Targant, H., Meunier, D., Madec, JY. und Cloeckaert, A. (2008). Antibiotic marker modifications of lambda Red and FLP helper plasmids, pKD46 and pCP20, for inactivation of chromosomal genes using PCR products in multidrug-resistant strains. *J Microbiol Methods.* 75, 359-361.
- Elena, SF. und Lenski, RE. (2003). Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. *Nat. Rev. Genet.* 4, 457-469.
- Fox, JW. und Lenski, RE. (2015). The Theory and Practice of a Really Long Experiment. *PLoS Biology.* 13, e1002185.
- Franklin, FC. und Venables, WA. (1976). Biochemical, genetic, and regulatory studies of alanine catabolism in Escherichia coli K12. *Mol Gen Genet.* 149, 229-237.
- Giese, C., Lepthien, S., Metzner, L., Brandsch, M., Budisa, N. und Lilie, H. (2008). Intracellular uptake and inhibitory activity of aromatic fluorinated amino acids in human breast cancer cells. *ChemMedChem.* 3, 1449-1456.
- Hadar, R., Slonim, A., und Kuhn, J. (1976). Role of D-tryptophan oxidase in D-tryptophan utilization by Escherichia coli. *J Bacteriol.* 125, 1096-1104.
- Hamano-Takaku, F., Iwama, T., Saito-Yano, S., Takaku, K., Monden, Y., Kitabatake, M., Soll, D. und Nishimura, S. (2000). A Mutant Escherichia coli Tyrosyl-tRNA Synthetase Utilizes the Unnatural Amino Acid Azatyrosine More Efficiently than Tyrosine. *J Biol Chem.* 275, 40324-40328.

- Hoesl, MG., Oehm, S., Durkin, P., Darmon, E., Peil, L., Aerni, H. R., Rappsilber, J., Rinehart, J., Leach, D., Sçll, D. und Budisa, N. (2015). Chemische Evolution eines bakteriellen Proteoms. *Angew. Chem.* 127, 10168 –10172.
- Horowitz, H. und Platt, T. (1983). Initiation in vivo at the internal trp p2 promoter of Escherichia coli. *J Biol Chem.* 258, 7890-7893.
- Jessup, CM. und Forde, SE. (2008). Ecology and evolution in microbial systems: the generation and maintenance of diversity in phage-host interactions. *Res Microbiol.* 159, 382-389.
- Kawecki, TJ., Lenski, RE., Ebert, D., Hollis, B., Olivieri, I. und Whitlock, MC. (2012). Experimental Evolution. *Trends Ecol Evol.* 27, 547-560.
- Khlaf, M. R. K. (2011). Experimental evolution of halotolerance in Escherichia coli. *Dissertation, Freie Universität Berlin.*
- Krämer, R. (1994). Systems and Mechanisms of Amino-Acid Uptake and Excretion in Prokaryotes. *Archives of Microbiology.* 162, 1-13.
- Kubitschek, H. E. (Herbert Ernest). (1970). Introduction to research with continuous cultures. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J.
- Ladner, CL., Yang, J., Turner, RJ., und Edwards, RA. (2004). Visible fluorescent detection of proteins in polyacrylamide gels without staining. *Anal Biochem.* 326, 13-20.
- Leonard, F. und Tschannen, W. (1965). Amino Acid Analogs of Tryptamine Antagonists of Serotonin. *J. Med. Chem.* 8, 287-90.
- Lepthien, S. (2008). In vivo Tandem Labeling of Proteins: Combining Chemical Orthogonality with Intrinsic Blue Fluorescence. *Dissertation, Technischen Universität München.*
- Lepthien, S., Hoesl, M.G., Merkel, L., und Budisa, N. (2008). Azatryptophans endow proteins with intrinsic blue fluorescence. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105, 16095-16100.
- Lepthien, S., Wiltschi, B., Bolic, B., und Budisa, N. (2008). In vivo engineering of proteins with nitrogen containing tryptophan analogs. *Appl Microbiol Biotechnol.* 73,740-754.
- Marlière, P., Patrouix, J., Döring, V., Herdewijn, P., Tricot, S., Cruveiller, S., Bouzon, M. und Mutzel, R. (2011). Chemical Evolution of a Bacterium's Genome. *Angew Chem Int Ed Engl.* 50, 7109-7114.
- Monod, J. (1950). Technique, Theory and Applications of Continuous Culture. *Ann. Inst. Pasteur.* 79, 390-410.
- Murphy, K. (1998). Use of bacteriophage lambda recombination functions to promote gene replacement in Escherichia coli. *J Bacteriol.* 180, 2063-2071.

- Mutzel, R. und Marlière, p. (2010). Experimentelle Evolution in vivo in kontinuierlicher Suspensionskultur. *Biospektrum*. 16, 660-662.
- Novick, A. (1955). Growth of Bacteria. *Annual Review of Microbiology*. 9, 97-110.
- Novick, A. und Szilard, L. (1950). Description of the chemostat. *Science*. 112, 715-716.
- Pao, SS., Paulsen, IT. und Saier, MH. (1998). Major Facilitator Superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev*. 62, 1–34.
- Pratt, LA. und Kolter, R. (1998). Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology*. 30, 285–293.
- Radwanski, ER. und Last, RL. (1995). Tryptophan biosynthesis and metabolism: biochemical and molecular genetics. *Plant Cell*. 7, 921–934.
- Rose, MR. (1984). Artificial Selection on a Fitness-Component in Drosophila melanogaster. *Evolution*. 38, 516-526.
- Ross, JB., Szabo, AG. und Hogue, CW. (1997). Enhancement of protein spectra with tryptophan analogs: Fluorescence spectroscopy of protein–protein and protein–nucleic acid interactions. *Methods Enzymol*. 278, 151–190.
- Saier, MH., Beatty, JT., Goffeau, A., Harley, KT., Heijne, WH., Huang, SC., Jack, DL., Jähn, PS., Lew, K., Liu, J., Pao, SS., Paulsen, IT., Tseng, TT., und Virk, PS. (1999). The major facilitator superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 1, 257-279.
- Schultz, JE. und Matin, A. (1991). Molecular and functional characterization of a carbon starvation gene of Escherichia coli. *J Mol Biol*. 218, 129-140.
- Shimizu, E., Oosumi, T., Heima, H., Tanaka, T., Kurashige, J., Enei, H., Miwa, K. und Nakamori, S. (1995). Culture conditions for improvement of L-threonine production using a genetically self-cloned L-threonine hyperproducing strain of Escherichia coli K-12. *Biosci Biotechnol Biochem*. 59, 1095-1098.
- Shimomura, O. (2005). The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *J Microsc*. 217, 1-15.
- Shimomura, O., Johnson, FH. und Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *J Cell Comp Physiol*. 59, 223-239.
- Wang, L. und Schultz, P. G. (2004). Die Erweiterung des genetischen Codes. *Angew Chem*. 117, 34–68.
- Wang, L. und Schultz, PG. (2004). Expanding the genetic code. *Angew Chem Int Ed Engl*. 44, 34-66.

- Wang, L., Xie, J. und Schultz, PG. (2006). Expanding the genetic code. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 35, 225–249.
- Wang, Q., Parrish, A. R. und Wang, L. (2009). Expanding the Genetic Code for Biological Studies. *Chem Biol.* 16, 323–336.
- Wild, J. und Klopotoski, T. (1981). D-Amino acid dehydrogenase of Escherichia coli K12: positive selection of mutants defective in enzyme activity and localization of the structural gene. *Mol Gen Genet.* 181, 373-378.
- Xie, J. und Schultz, PG. (2006). A chemical toolkit for proteins — an expanded genetic code. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7, 775-782.
- Yanofsky, C. (2004). The different roles of tryptophan transfer RNA in regulating trp operon expression in E. coli versus B. subtilis. *Trends Genet.* 20, 367-374.
- Yanofsky, C., Horn, V. und Gollnick, P. (1991). Physiological studies of tryptophan transport and tryptophanase operon induction in Escherichia coli. *J Bacteriol.* 173, 6009-6017.
- Yao, K., Fang, J., Yin, YL., Feng, ZM., Tang, ZR., und Wu, G. (2011). Tryptophan metabolism in animals: important roles in nutrition and health. *Front Biosci (Schol Ed).* 3, 286-297.
- Yguerabide, J. (1972). Nanosecond fluorescence spectroscopy of macromolecules. *Methods Enzymol.* 26, 498-578.
- Zhou, D., Xue, J., Chen, J., Morcillo, P., Lambert, JD., White, KP. und Haddad, GG. (2007). Experimental Selection for Drosophila Survival in Extremely Low O₂ Environment. *PLoS One.* 5,

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Doktorarbeit erstmalig einreiche, selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den

Mohamed Boshra